



OSTRAVSKÁ
UNIVERZITA

Klinická biochemie

pro bakalářské studijní obory

1. díl

Pavλίna Kušnierová, Zdeněk Švagera,
Radka Šigutová, Kristián Šafarčík,
Vladimír Bartoš, Věra Ploticová

Druhé přepracované vydání

OSTRAVA 2025

© Pavlína Kušnierová, 2025
© Zdeněk Švagera, 2025
© Radka Šigutová, 2025
© Kristián Šafarčík, 2025
© Vladimír Bartoš, 2025
© Věra Ploticová, 2025
© Ostravská univerzita, Lékařská fakulta, 2025

KLINICKÁ BIOCHEMIE PRO BAKALÁŘSKÉ STUDIJNÍ OBORY

1. díl, druhé, přepracované vydání

Autorský kolektiv:

doc. RNDr. Pavlína Kušnierová, Ph.D. (kapitola 6, 7, 8, 12, 13) – vedoucí autorského kolektivu
Oddělení klinické biochemie, Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava
Ústav laboratorní medicíny, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

RNDr. Zdeněk Švagera, Ph.D. (kapitola 2, 10, 11)
Oddělení klinické biochemie, Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava
Ústav laboratorní medicíny, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

RNDr. Radka Šigutová (kapitola 5, 7, 9, 11)
Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava
Ústav laboratorní medicíny, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

doc. RNDr. Kristian Šafarčík, Ph.D. (kapitola 1, 9)
Oddělení klinické biochemie, Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava
Ústav laboratorní medicíny, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

Ing. Vladimír Bartoš, Ph.D. (kapitola 3)
Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava
Ústav laboratorní medicíny, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

MUDr. Věra Ploticová (kapitola 1, 4)
Oddělení klinické biochemie, Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava
Ústav laboratorní medicíny, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

MUDr. Ing. David Zeman, Ph.D. (kapitola 6)
Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava

Recenzenti:

doc. Mgr. Marek Bužga, Ph.D.
Ústav fyziologie a patofyziologie, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

prim. RNDr. Jitka Prošková
Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc

PŘEDMLUVA

Vážení studenti,

kniha, kterou vám předkládáme, je věnována problematice klinické biochemie. Předpokládáme, že jste se již seznámili s odborným textem „Obecná biochemie pro bakalářské studijní obory“, který je úvodem do problematiky obecné biochemie. Bez jeho prostudování by nemělo smysl studovat tato skripta.

Tento studijní materiál vám poskytne základní informace o preanalytických, analytických a postanalytických postupech, interní a externí kontrole kvality, analytech vyšetřovaných v laboratořích klinické biochemie a klinickém významu jednotlivých ukazatelů.

Získáte přehled:

- o základních pojmech v oblasti klinické biochemie,
- o základních parametrech vyšetřovaných v laboratořích klinické biochemie.

Budete schopni:

- navrhnout konkrétní vyšetření a interpretovat laboratorní nález.

Čas potřebný k prostudování učiva předmětu:

- 35 hodin teorie + kontrolní otázky.

OBSAH

PŘEDMLUVA.....	4
OBSAH.....	5
1 KLINICKÁ BIOCHEMIE	8
2 PREANALYTICKÁ FÁZE.....	10
2.1 Úvod	10
2.2 Preanalytická fáze a zdroje její variability.....	10
3 ANALYTICKÁ FÁZE.....	15
3.1 Úvod	15
3.2 Výkonnostní charakteristiky analytické metody.....	15
3.3 Nejistota výsledku měření.....	18
3.4 Návaznost metody.....	19
3.5 Citlivost metody.....	20
3.6 Kontrola kvality.....	20
4 POSTANALYTICKÁ FÁZE	25
5 LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ MOČI.....	26
5.1 Úvod	26
5.2 Složení moči.....	27
5.3 Odběr moči.....	28
5.4 Chemické a morfologické vyšetření moče.....	28
5.4.2 Morfologické hodnocení složek močového sedimentu.....	30
6 BÍLKOVINY KREVNÍ PLAZMY	33
6.1 Úvod do problematiky	33
6.2 Metody vyšetřování plazmatických bílkovin.....	35
6.3 Monoklonální gamapatie.....	42
6.4 Polyklonální gamapatie	42
6.5 Reaktanty akutní fáze	42
6.6 Některé nízkomolekulární bílkoviny	43
6.7 Cytokiny.....	44
7 NEBÍLKOVINNÉ DUSÍKATÉ LÁTKY.....	46
7.1 Urea (močovina)	46
7.2 Kreatinin	46
7.3 Kyselina močová	49
7.4 Amoniak	49
7.5 Aminokyseliny.....	50
8 STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMŮ	52
8.1 Struktura enzymů	52

8.2	Mechanismus účinku enzymů	52
8.3	Vlastnosti enzymů	52
8.4	Katalytická aktivita enzymu	53
8.5	Klasifikace enzymů	54
8.6	Lokalizace enzymů	55
8.7	Význam enzymů v medicíně	55
8.8	Přehled vybraných enzymů	55
8.9	Analytické stanovení vybraných jaterních parametrů	58
9	METABOLISMUS MINERÁLNÍCH LÁTEK A VODY, OSMOLALITA.....	61
9.1	Vnitřní prostředí	61
9.2	Voda a elektrolyty.....	61
9.4	Zevní vodní bilance	63
9.5	Elektrolyty (natrium, kálium, chloridy)	63
9.6	Poruchy v hospodaření s vodou a NaCl	64
9.7	Poruchy v hospodaření s draslíkem	65
9.8	Osmolalita.....	65
9.9	Analytické stanovení iontů a osmolality	66
10	METABOLISMUS VÁPNIKU, HOŘČÍKU A FOSFORU	68
10.1.	Úvod	68
10.2.	Význam a metabolismus.....	68
10.3	Hormonální regulace kalcia, magnézia a fosfátů	69
10.4	Klinická interpretace	69
10.5	Analytické stanovení vápníku, hořčíku a fosfátů	70
11	ACIDOBAZICKÁ ROVNOVÁHA A KYSLÍKOVÝ METABOLISMUS	72
11.1	Úvod do acidobazické rovnováhy (ABR)	72
11.2	Pufrační systémy v organismu	73
11.3	Základní poruchy acidobazické rovnováhy	73
11.4	Regulace acidobazické rovnováhy	74
11.5	Vyšetření parametrů acidobazické rovnováhy	74
11.6	Kombinované poruchy ABR – hodnocení dle Stewart a Fencla	75
11.7	Měření parametrů acidobazické rovnováhy	77
12	STOPOVÉ PRVKY	78
12.1	Úvod	78
10.2	Analytické stanovení vybraných kovů metodami AAS.....	80
13	VITAMÍNY	82
13.1	Úvod	82
13.2	Vitamíny rozpustné v tucích	82

13.4 Analytické stanovení vitamínů	84
PŘÍLOHA 1: Referenční meze.....	85

1 KLINICKÁ BIOCHEMIE

V této kapitole se dozvíte:

V následující kapitole se dozvíte, co znamenají a zahrnují pojmy klinická biochemie a laboratorní medicína.

Klíčová slova této kapitoly:

Biochemie, patobiochemie, klinická biochemie, laboratorní medicína.

Čas potřebný k prostudování této kapitoly: 10 minut (teorie)

Biochemie popisuje struktury, organizaci a funkci živé hmoty na molekulární úrovni.

Dělíme ji na tři základní oblasti:

1. Strukturní chemie složek živé hmoty a vztah mezi biologickou funkcí a chemickou strukturou.
2. Studium metabolismu – sledy chemických reakcí probíhajících v živé hmotě.
3. Molekulární genetika – uchovávání a přenos informací.

Zatímco biochemie je obor teoretický a preklinický, klinická biochemie je obor lékařský, který navazuje na biochemii a patobiochemii (studium změn v organismu při chorobných stavech). Na základě stanovení koncentrací důležitých biologických látek nebo změněné aktivity enzymů a jiných látek v tělesných tekutinách přispívá klinická biochemie ke stanovení diagnózy onemocnění, podílí se na stanovení prognózy i na monitorování terapie onemocnění. Nejvíce laboratorních testů se používá právě k monitorování terapie – příkladem je monitorování diabetiků pomocí plazmatické glukózy a glykovaného hemoglobinu. Klinická biochemie se zaměřuje na vyhledávání závažných chorob v populaci (screening) i rizikových faktorů, které tyto choroby vyvolávají.

Je biochemie samostatný klinický obor?

Jako samostatný lékařský obor se klinická biochemie formovala v 50. a 60. letech 20. století. Původně tvořila součást interní medicíny, s rostoucím počtem, významem a složitostí klinicko-biochemických vyšetřovacích metod došlo k jejímu organizačnímu osamostatnění

V 60. a 70. letech dosáhla vrcholu enzymová diagnostika, zkvalitňující rozhodování při odhalování jaterních onemocnění, infarktu myokardu a jiných chorob. Ještě před tím nastal pokrok ve vyšetřování vnitřního prostředí, zejména acidobazické rovnováhy, což umožnilo adekvátní terapii u nejtěžších případů pacientů na jednotkách intenzivní péče.

Imunochemické metody se prudce rozvíjejí od 80. let a umožňují stanovení nízkých koncentrací antigenů a protilátek.

Zavedení imunoanalýzy rozšířilo možnosti stanovení velmi nízkých koncentrací biologicky účinných látek (hormonů, léků atd.), započalo stanovování důležitých biomarkerů (markery nádorových onemocnění, kostního metabolismu, kardiomarkery atd.).

A co metody molekulární biologie?

V 90. letech nastoupila DNA diagnostika, zejména díky objevu polymerázové řetězové reakce (PCR), která umožňuje odhalit závažná genetická onemocnění na úrovni genu, a to vysoce specificky. Uplatnění našla také u chorob získaných: infekční agens, např. virus hepatitidy C či HIV (human imunodeficiency virus). Metody jsou tak citlivé, že umožňují průkaz už při výskytu 10^4 částic viru v 1 ml krve.

Tyto metody lze uplatnit i při určení HLA genotypu (angl. zkr. human leucocyte antigens, lidské leukocytární antigeny), což umožňuje výběr vhodného dárce pro transplantaci orgánu, či identifikaci jedince v soudním lékařství. V budoucnu by měly především upřesnit personalizovanou terapii onkologických a dalších pacientů.

Co umožnilo rozvoj laboratorní medicíny?

Rozvoj v oblasti laboratorní medicíny umožňuje celkový technický pokrok v oblasti přístrojové a informační techniky. V laboratořích se rozvíjí automatizace laboratorních postupů, které se v analýze uplatňují. Manuální práci nahrazují robotické přístroje – analyzátoři řízené počítači. Informační technologie zároveň zpracovávají naměřená data a třídí je až do výstupních lékařských výsledkových sestav, které jsou důležité pro vlastní klinická hodnocení a závěry.

Jaké jsou trendy poslední doby v oblasti laboratorní medicíny?

V poslední době lze pozorovat, že laboratorní obory, které původně zdůrazňovaly svůj objekt zkoumání, se začínají sbližovat. Biochemie, hematologie, mikrobiologie, klinická farmakologie a molekulární genetika se nyní prolínají na úrovni molekulární biologie a vytvářejí předpoklady pro vznik oboru **laboratorní medicína**, která využívá různé pokrokové technologie laboratorní diagnostiky. Neznamená to ovšem zánik jednotlivých klinických oborů. Ty zůstanou nadále zachovány zejména v oblasti klinické interpretace laboratorních výsledků, diagnostiky i terapie onemocnění. Kompletní sestavy laboratorních vyšetření jednotlivých odborností pomůžou vytvořit komplexní klinické diagnózy pacienta.

Shrnutí kapitoly.

Kapitola podává stručný přehled vývoje oboru klinická biochemie a jejího vztahu k ostatním oborům laboratorní medicíny.

Další doporučené zdroje k této kapitole:

1. Jabor A. a kol. *Encyklopedie laboratorní medicíny*. Dostupné z: <http://www.sekk.cz>.
2. Racek J., Rajdl, D. et al.: *Klinická biochemie*. 3., přepracované vydání. Praha: Galén, 2021.
3. Zima T. *Laboratorní diagnostika*. 3. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén – Karolinum, 2013.

2 PREANALYTICKÁ FÁZE

V této kapitole se dozvíte:

V této kapitole se dozvíte informace o pojmu preanalytická fáze. Pokusíme se vám přiblížit její význam. Je nutné si uvědomit, že tato část diagnostického procesu je velmi důležitá a hraje významnou roli v kvalitě vydaného výsledku. Často totiž v tomto časovém úseku dochází k porušení pravidel, ať ze strany pacienta, odběrové sestry, nebo při transportu materiálu do laboratoře. Z tohoto důvodu může laboratoř vydat chybné výsledky a následně i lékař špatný diagnostický závěr.

Klíčová slova této kapitoly:

Preanalytická fáze, faktory ovlivňující preanalytickou fázi, zásady odběru krve, moči, vliv na výsledky biochemických vyšetření.

Čas potřebný k prostudování této kapitoly: 3,5 hodiny (teorie + řešení úloh)

2.1 Úvod

Laboratorní diagnostický proces vedoucí k získání výsledku lze rozdělit na tři fáze, a to preanalytickou, analytickou a postanalytickou fázi (viz schéma).

Diagnostický proces – časová osa		
preanalytická fáze	analytická fáze	postanalytická fáze

Preanalytická fáze je definována jako období od indikace vyšetření lékařem až po vlastní analýzu biologického materiálu v laboratoři, tzn. představuje přípravu jedince na odběr biologického materiálu, vlastní odběr, uchování a transport odebraného vzorku do laboratoře a jeho přípravu k analýze. Význam této fáze je podpořen i mnoha publikacemi, které zmiňují, že až 46–68 % chybných výsledků je způsobeno nedodržením či nerespektováním právě pravidel preanalytické fáze. Z tohoto důvodu je primárním úkolem laboratoře vybavit klienty všemi potřebnými instrukcemi (o přípravě pacienta, o odběru, o skladování a transportu biologického materiálu, o preanalytické úpravě vzorku) tak, aby bylo minimalizováno riziko vzniku chyb, které následně mohou poškodit pacienta. Všechny tyto informace shrnují laboratorní příručky vyšetřujících laboratoří.

Na preanalytickou fázi navazuje analytická fáze zahrnující vlastní analýzu vzorku. Každá laboratoř musí mít zavedený systém kontroly kvality, aby byla zajištěna validita vydávaných výsledků. Analytickou fázi uzavírá fáze postanalytická, která je definována jako období od získání výsledku v laboratoři po jeho předání lékaři. Důležitou součástí postanalytické fáze je interpretační komentář, v němž lze doporučit další diagnostický algoritmus

2.2 Preanalytická fáze a zdroje její variability

Jak již bylo zmíněno v úvodu, preanalytická fáze může být zdrojem mnoha chyb. Proto je nutné si ozřejmit, jaké faktory preanalytickou fázi nejvíce ovlivňují. Tyto faktory lze rozdělit dle časové posloupnosti:

Preanalytická fáze – časová osa		
před odběrem biologického materiálu	při odběru biologického materiálu	mezi odběrem biologického materiálu a analýzou

2.2.1 Před odběrem biologického materiálu

Faktory ovlivňující preanalytickou fázi před odběrem biologického materiálu můžeme dále rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi ovlivnitelné faktory patří např. dodržování určitého denního režimu, dietní návyky atd. Jako neovlivnitelné faktory vystupují např. věk, pohlaví, rasa atd.

2.2.1.1 Ovlivnitelné faktory před odběrem biologického materiálu

Významným faktorem patřícím mezi ovlivnitelné faktory před odběrem biologického materiálu je strava. Odběr krve by se měl vždy provádět nalačno. Pokud tomu tak není, lze v důsledku metabolismu přijatých živin pozorovat zvýšení hladin některých metabolitů. Dochází ke zvýšení koncentrace glukózy, triacylglycerolů, volných mastných kyselin a lipoproteinů. Pokud má člověk dietu s převážným obsahem tuků, dojde především ke zvýšení koncentrace triacylglycerolů, a naopak snížení koncentrace dusíkatých látek v séru. V případě stravy bohaté na bílkoviny se zvyšuje koncentrace amoniaku a urey. Současně postprandiálně dochází k vyplavení hormonů (např. inzulínu, který snižuje hodnoty kálie a fosfátů). Skladba stravy může ovlivnit i pH moče, např. při konzumování zeleniny a ovoce je moč alkaličtější, naopak po požití masa a jídla s větším obsahem tuků a proteinů je kyselější. Hladiny některých metabolitů ovlivňuje i konzumace různých nápojů (např. kofein zvyšuje koncentraci glukózy v krvi). Významný vliv na biochemické vyšetření má také alkohol. Po požití alkoholu stoupá téměř okamžitě v krvi koncentrace laktátu, klesá koncentrace hydrogenuhličitanů a glukózy. Při dlouhodobé zátěži organismu alkoholem dochází k poškození jater, což se projeví zvýšením koncentrace alaninaminotransferázy (ALT), dále aspartátaminotransferázy (AST) a gamaglutamyltransferázy (GGT). Zvyšují se také koncentrace triacylglycerolů a cholesterolu.

Odběr krve se provádí zpravidla ráno. Pacient by neměl být dehydratovaný, jelikož to může falešně zvýšit koncentrace proteinů a lipoproteinů. Proto se má po probuzení vypít cca 3 deciltry vody nebo hořkého čaje.

Dalším faktorem, který může ovlivnit konečný výsledek, je fyzická zátěž organismu před vlastním odběrem. Dopad na výsledek záleží na typu fyzické aktivity, která může být buď krátkodobá, při níž organismus vykazuje vysoký podíl především anaerobního metabolismu, nebo dlouhodobá (vytrvalostní), kdy organismus využívá převážně aerobního metabolismu. Při střední zátěži se zvyšuje hladina glukózy a dochází ke stimulaci sekrece inzulínu. Díky svalové činnosti se zvyšují také hodnoty enzymů AST, laktátdehydrogenázy (LD), kreatinkinázy (CK) a roste koncentrace laktátu a mastných kyselin. Při dlouhodobé namáhavé činnosti dochází k poklesu glykémie, nárůstu koncentrace kreatininu a mnohonásobnému nárůstu hladiny laktátu. Jsou sníženy i hladiny cholesterolu a triacylglycerolů.

Mechanické trauma je také jedním z ovlivnitelných faktorů před odběrem biologického materiálu. Například svalové trauma včetně intramuskulárních injekcí způsobuje vyplavení enzymů (CK, ALT, AST) a bílkovin svalové tkáně (např. myoglobinu). Jízda na kole může způsobit mechanické trauma prostaty, což se může projevit vyplavením prostatického sérového antigenu s následnou falešnou pozitivitou tohoto vyšetření. Při maratónském běhu a při chlopenních vadách dochází k mechanické hemolýze erytrocytů.

Velmi častým problémem, který lze ovšem těžko postihnout, je vliv léků. Léky mohou ovlivnit hladinu některých sledovaných analytů, např. kyselina acetylsalicylová (anopyrin) v séru zvyšuje AST, ALT, bílkovinu v moči, furosemid zvyšuje v séru glukózu, amylázu (AMS), alkalickou fosfatázu (ALP) a zvyšuje sodný kationt. Léky také mohou interferovat s analytickým principem stanovení, např. vitamín C, který má výrazné redukční vlastnosti, falešně snižuje hladiny analytů, při jejichž stanovení se využívá detekce pomocí peroxidu. Lék může také ovlivňovat rychlost metabolismu nebo eliminace sledovaného analytu, či poškozovat nějaký orgán, např. hepatotoxicita narkotik.

Nezanedbatelným faktorem je také stres. Ve stresových situacích dochází k vyplavení stresových hormonů, např. reninu, aldosteronu, somatotropinu, katecholaminů, kortizolu, glukagonu a prolaktinu. Proto je nutné odběr krve na stanovení prolaktinu provést až tři hodiny po probuzení. Dalším příkladem může být pokles cholesterolu o 60 % proti výchozí hodnotě během 24 hodin po akutním infarktu myokardu. K normalizaci jeho koncentrace dochází až po řadě týdnů. Z tohoto důvodu se při příjmu pacientů s podezřením na akutní infarkt myokardu nedoporučují odběry na stanovení cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu. Naopak, mírný stres může koncentraci cholesterolu zvýšit. Pooperační stres zase snižuje koncentraci TSH a následně i tyreoidálních hormonů, transferinu a sekundárně zvyšuje koncentraci feritinu.

2.2.1.2 Neovlivnitelné faktory před odběrem biologického materiálu

Mezi neovlivnitelné faktory před odběrem biologického materiálu patří věk, pohlaví, rasa, biologické rytmy. Je možné zde zahrnout i graviditu, jež je ale specifickým případem ovlivnění preanalytické fáze, a proto není předmětem tohoto sdělení. Těmto efektům, s výjimkou biologických rytmů a gravidity, není nutné věnovat významnou pozornost, protože je nelze ovlivnit a jsou zohledněny pomocí referenčních mezí pro daný analyt.

Věk je velmi významným neovlivnitelným faktorem, na němž závisí většina sledovaných analytů. Výsledek stanovení významně ovlivňuje také pohlaví. Je známo, že mnoho parametrů závisí na hormonální výbavě a tělesné konstituci. V České republice také přibývá lidí jiné než bílé rasy. Například aktivity CK a AMS či počet granulocytů roste vzestupně od bělochů přes žlutou rasu k Afroameričanům (Afroameričané mají až dvojnásobnou aktivitu CK a Asiaté zase mají vyšší aktivitu slinné amylázy a vyšší koncentraci celkového bilirubinu).

Dalšími vlivy, které je nutné vzít v úvahu, jsou biologické rytmy s různou časovou periodou, ať už v rámci jednoho dne (cirkadiánní), nebo cykly s periodou přibližně jednoho roku (cirkanuální). Snad nejvýraznější cirkadiánní změnou prochází kortizol, a to cca 250 % s minimem ve večerních hodinách. Příkladem cirkanuálního rytmu může být změna koncentrace vitamínu D, která dosahuje maximálních hodnot v letních měsících díky vystavení pokožky intenzivnímu působení slunečního záření.

2.2.2 Při odběru biologického materiálu

Faktory ovlivňující preanalytickou fázi při vlastním odběru biologického materiálu souvisejí především s prací odběrové sestry, která musí mít na paměti základní pravidla odběru mající vliv na výsledek vyšetření. Jedná se především o načasování odběru, volbu vhodné odběrové soupravy, polohu pacienta při odběru, vliv žilní stáze a lokálního metabolismu, eventuálně vliv infuze a transfuze v nemocničním prostředí.

Načasování odběru

Načasování odběru je velmi důležitou součástí strategie získání validního výsledku. Odběry se provádějí nejčastěji ráno, kdy je zajištěno, že je pacient nalačno (pokud respektuje obecná doporučení před odběrem) a je omezen vliv cirkadiánního rytmu zmíněného v předchozí kapitole. Jiným případem je např. sledování glykémie (glykemický profil) nebo sledování farmakoterapie, kdy se provádí odběr na základě poločasů eliminace léčiva.

Poloha pacienta při odběru

Při odběru je důležitá také poloha pacienta. Je nutné mít na paměti, že rozdíl v koncentraci proteinů a látek vázaných na proteiny – vápenatý kationt, hormony (kortizol, tyroxin), či některých léků je ve vzpřímené poloze proti poloze vsedě po dobu 15 minut 5–8 % a polohou vestoje proti poloze vleže cca 10–20 %. Obecně tedy platí, že biologický materiál má být odebírán stále ve stejné pozici, nejlépe standardním způsobem vsedě, což ale u hospitalizovaného pacienta vždy zajistit nelze.

Použití turniketu a vliv lokálního metabolismu

Zajímavý je také vliv lokálního metabolismu při použití turniketu při odběru. Bylo zjištěno, že již po jedné minutě po zatažení paže turniketem dochází k přesunu významného množství vody a iontů z cévy do intersticia s následným vzestupem koncentrace proteinů a látek vázaných na proteiny v krvi. Dlouhým zatažením paže či jejím podchlazením dochází ke změně lokálního metabolismu vlivem hypoxie. To způsobuje vzrůst parciálního tlaku oxidu uhličitého, koncentrace kálie a laktátu, což má za následek snížení pH. Dochází také ke změnám homeostázy spojené s uvolněním tkáňového faktoru. Nedoporučované, či přímo zakázané je cvičení paže, které způsobuje především zvýšení koncentrace kálie. Z těchto důvodů nesmí doba zatažení paže přesáhnout jednu minutu a po napíchnutí žíly je nutné turniket ihned uvolnit.

Volba odběrového systému a vliv protisrážlivých činidel

Velmi důležitá je také volba odběrového systému. Lze použít uzavřený, nebo otevřený odběrový systém. V případě otevřeného odběrového systému se používá klasická jehla a Luerova stříkačka a po venepunkci se volně stékající krev odebírá přímo do zkumavky, nebo velmi jemným tahem pístu. Dnes se ovšem preferuje odběr do uzavřeného systému, při němž je minimalizována kontaminace odebírajícího pracovníka krví a odběrové zkumavky jsou barevně odlišeny podle přidaného konzervačního či protisrážlivého činidla. Další výhodou uzavřeného systému je to, že se dodržuje poměr protisrážlivého, eventuálně konzervačního činidla a odebrané krve. Je však třeba dávat pozor na volbu protisrážlivého činidla při stanovení kationtů, protože protisrážlivé činidlo stanovený kationt nesmí obsahovat. Například použití EDTA s káliem způsobuje nález vysoce patologické koncentrace kálie ve vzorku. EDTA je nevhodná také pro stanovení koncentrace dvojmocných kationtů, protože působí jako chelatační činidlo a tyto kationty váže do komplexu a způsobí nález falešně nízké koncentrace těchto iontů.

Je nutné mít také na paměti, že pokud se použije odběrová souprava s protisrážlivým činidlem, je potřeba odebranou krev ihned po odběru šetrně promíchat. Bez promíchání se omezí účinek protisrážlivého činidla a dojde k nežádoucímu srážení krve. Při odběru je třeba zvolit také vhodný průsvit jehly, aby nedocházelo k hemolýze erytrocytů.

Vliv infuze a transfuze

Pacientům v kritickém stavu je třeba podávat transfuzní přípravky a infuze, které obsahují vysoké koncentrace vybraných látek a nízké koncentrace ostatních. Z tohoto důvodu může infuze ovlivnit stanovení některých látek, a to nejčastěji přímou kontaminací odběru, nebo jen vlivem svých vlastností. Například infuze glukózy s káliem

způsobuje falešné zvýšení koncentrace glukózy a kálie. Infuze tukové emulze způsobuje chylozitu séra a infuze Hartmann obsahující vysokou koncentraci laktátu (> 15 mmol/L) falešné zvýšení koncentrace laktátu. Z tohoto důvodu je nutné při odběru po podání infuzního prostředku dodržovat jistá pravidla. V ideálním případě provést odběr z ruky, kde není aplikována infuze, nebo zastavit infuzi na 15 minut a pak provést vlastní odběr. Při podání transfuze je třeba, z hlediska preanalytické fáze, brát zřetel především na její stáří. Se zvyšujícím se stářím erytrocytárního koncentrátu totiž dochází k poklesu koncentrace natria a glukózy vlivem metabolismu erytrocytů, a naopak ke zvýšení koncentrace kálie a laktátu.

2.2.3 Po odběru biologického materiálu až do analýzy

Toto období se týká období po odběru biologického materiálu až do jeho analýzy v laboratoři a zahrnuje manipulaci se vzorkem po odběru, jeho následný transport do laboratoře, centrifugaci, eventuálně jeho předúpravu před vlastní analýzou.

Obecně platí, že pokud bude prováděn odběr nesrážlivé krve (odběrová nádoba s protisrážlivým činidlem), je třeba zkumavku ihned po odběru šetrně promíchat. V případě odběru srážlivé krve je nutné s transportem vzorku vyčkat zhruba 30 minut, aby došlo k vysrážení vzorku (přesný čas nutný pro srážení udává výrobce odběrových souprav). Okamžitý transport biologického materiálu ihned po odběru může způsobit hemolýzu a tím i znehodnocení vzorku. Problém hemolýzy, která ruší stanovení, nesouvisí jenom s uvolněním obsahu erytrocytů do séra či plazmy a následným zvýšením koncentrace těchto látek ve sledovaném materiálu, ale i uvolněním hemoglobinu, který interferuje vlivem své barevnosti přímo s fotometrickým stanovením nebo činidlem používaným pro stanovení. Pozor, hemolýzu může způsobit i přílišné chlazení vzorku, vysoké otáčky při centrifugaci a také úzká odběrová jehla. V následující tabulce je popsán vliv hemolýzy na vybraná biochemická stanovení.

Zvýšení koncentrace nebo aktivity	kálium, hořečnatý kationt, laktátdehydrogenáza, aspartátaminotransferáza, alaninaminotransferáza, kreatinkináza, kyselá fosfatáza
Snížení koncentrace nebo aktivity	gamaglutamyltransferáza, alkalická fosfatáza, amyláza

Skladování vzorku před transportem či vlastní transport biologického materiálu jsou velmi důležité a je nutné jim věnovat dostatek pozornosti, obzvláště jsou-li vzorky transportovány z periferie. Délka transportu se různí, ale je nutné zabránit působení extrémních podmínek na transportované vzorky – horko, resp. mráz, minimalizovat „třepání“ vzorkem a zajistit, aby nedošlo k jeho úplnému znehodnocení, např. vylitím. Z tohoto důvodu musí být vzorky transportovány v přepravních boxech s regulací teploty a jsou zajištěny proti vylití. Některé vzorky (tkáň) je třeba transportovat zamrazené i při velmi nízkých teplotách (-80 °C) v suchém ledu. Pokud nedodržíme dobu, do níž je nutné vzorky zpracovat, nebo podmínky transportu, dochází ke změnám koncentrace některých látek ve sledovaném materiálu. Příkladem může být pokles koncentrace glukózy, a naopak nárůst koncentrace laktátu vlivem anaerobní glykolýzy krevních elementů. Některé analyty v biologickém materiálu jsou termolabilní, a to jak při pokojové teplotě (většina parametrů), tak některé paradoxně i při teplotě 4 °C (např. klesá aktivita ALT, či vzrůstá koncentrace kálie vlivem inhibice ATPázy v erytrocytu). Některé analyty jsou fotosenzibilní, a pokud se netransportují a neskladují v temnu, dochází k jejich poklesu (např. bilirubin a porfyriny). Z tohoto důvodu existují u některých analytů doporučení pro skladování a transport, která je nutné dodržet.

Jakmile se vzorky doručí do laboratoře, jsou buď přímo analyzovány (při použití plné krve), nebo musí být centrifugovány s cílem získat sérum či plazmu. Při centrifugaci je důležité zachovat správné podmínky, aby se oddělilo sérum (plazma) od erytrocytů a aby v případě plazmy došlo i k dokonalé sedimentaci leukocytů. V případě, že jsou otáčky (relativní odstředivá síla) při centrifugaci příliš vysoké, může dojít k rozbití buněk a vylití jejich obsahu. U mnoha analytů je také nutné centrifugovat při snížené teplotě okolí (chlazené centrifugy), např. při analýzách hormonů.

Samostatnou kapitolou je analýza moče, při níž se používá moč sbíraná, ranní či jednorázová. Velmi často dochází k tomu, že pacient není poučen o pravidlech sběru, tzn. nejčastěji sbírá moč déle, či naopak kratší dobu, než by měl. O přesném odečtu množství moče za sběrné období, nejčastěji 24 hodin, ani nemůže být řeč. Není ani zajištěno požadované skladování sbírané moče v lednici či její předúprava nutná pro stabilizaci sledovaného parametru. Obdobná situace nastává také v případě odběru ranní moče, k jejímuž doručení pro analýzu sedimentu musí dojít do jedné hodiny po odběru. Odebraná moč je do laboratoře často doručena se zpožděním, a tak dochází k nálezům falešně negativních, či pozitivních výsledků (nárůst počtu bakterií, nárůst pH působením ureázy bakterií a rozpadu buněčných elementů).

Obecně tedy platí, že je nutné dodržovat podmínky transportu a skladování, které vzorky, lépe řečeno transportovaný materiál, vyžadují. Je třeba myslet i na svozy materiálu, obzvláště za extrémních podmínek (horko a mráz).

Shrnutí kapitoly

Preanalytická fáze je definována jako období od indikace vyšetření lékařem až po vlastní analýzu biologického materiálu v laboratoři, tzn. představuje přípravu jedince na odběr biologického materiálu, vlastní odběr, uchování a transport odebraného vzorku do laboratoře a jeho přípravu k analýze. Je nutné myslet na faktory ovlivňující preanalytickou fázi jak před odběrem, tak i v průběhu odběru a po něm. Obecně tedy platí, že je třeba dodržovat podmínky transportu a skladování, které vzorky, lépe řečeno transportovaný materiál, vyžadují. Je třeba brát v úvahu i svozy materiálu, obzvláště za extrémních podmínek.

Otázky, úkoly:

1. Definujte pojem preanalytická fáze. Jaké faktory ji ovlivňují?
2. Co patří mezi ovlivnitelné faktory před odběrem biologického materiálu?
3. Co může způsobit hemolýzu?
4. Jakým způsobem může ovlivnit hemolýza výsledek?
5. Co způsobí dlouhodobé skladování moče před analýzou ve vztahu k analýze moče chemicky a při analýze sedimentu?
6. Jaké svalové bílkoviny se vyplaví při mechanickém traumatu?
7. Jaké lze použít protisrážlivé činidlo pro odběr na stanovení kália?
8. Co nelze použít jako protisrážlivé činidlo pro odběr na stanovení dvojmocných kovů (Ca^{2+} , Mg^{2+})?
9. Vyberte správné tvrzení – správný sběr moče za 24 hodin je definován takto:
 - a. Od ranního vymočení do záchodu, celý den do sběrné nádoby, včetně ranního vymočení následující den.
 - b. Od ranního vymočení do záchodu, celý den do sběrné nádoby, bez ranního vymočení do sběrné nádoby následující den.

Další doporučené zdroje k této kapitole:

1. Lippi G, Simundic AM; The EFLM strategy for harmonization of the preanalytical phase. European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE). Clin Chem Lab Med. 2018 Sep 25;56(10):1660-1666. doi: 10.1515/cclm-2017-0277.
2. Cadamuro J, Simundic AM. The preanalytical phase – from an instrument-centred to a patient-centred laboratory medicine. Clin Chem Lab Med. 2022 Nov 4. doi: 10.1515/cclm-2022-1036.
3. <https://www.eflm.eu/site/page/a/1194> [online] (citace 16.03.2022)
4. Jabor A., Zámečník M. *Preanalytická fáze 2005*. Praha: ČSKB ČLS JEP a SEKK, spol. s r. o., 2005.

3 ANALYTICKÁ FÁZE

V této kapitole se dozvíte:

Tato kapitola pojednává o základních vlastnostech analytických metod, které předurčují možnosti jejich využití pro účely klinické laboratorní diagnostiky. Seznámíte se rovněž se základními principy, které jsou v laboratoři realizovány s cílem zajistit dostatečnou věrohodnost výsledků prováděných měření, obecně označovanými jako kontroly kvality.

Klíčová slova této kapitoly:

Preciznost, pravdivost, přesnost, opakovatelnost, reprodukovatelnost, nejistota, návaznost, citlivost, kontrola kvality – vnitřní, externí.

Čas potřebný k prostudování učiva kapitoly: 3 hodiny (teorie + řešení úloh)

3.1 Úvod

S každým měřením, a tedy i s každou metodou používanou v biochemických laboratořích, je spojena typická sada vlastností, jež obecně nazýváme výkonnostní charakteristiky metody. Jejich úroveň vypovídá o možnostech měření realizovaných touto metodou, a jsou proto určujícím faktorem použitelnosti metody pro požadovanou aplikaci.

Úroveň analytických vlastností metody je zároveň určujícím faktorem pro možnost její aplikace ke klinickým účelům.

Proces, jehož cílem je vedle stanovení funkčních charakteristik metody i komplexní posouzení její vhodnosti pro zamýšlený klinický účel použití, se nazývá validace metody. Jeho realizace je nedílnou součástí vývoje metody. Základní analytické vlastnosti metody se prověřují i před zahájením jejího používání v laboratoři a jsou rovněž předmětem pravidelné kontroly během jejího praktického rutinního využívání. V tomto případě se hovoří o verifikaci metody.

Soubor operací, které se v laboratoři provádějí s cílem zajistit odpovídající věrohodnost výsledků měření, je širší. Obecně jsou tyto činnosti označovány pojmem **kontrola kvality**. Tento soubor činností je primárně určen k zajišťování kvality vlastního analytického procesu v klinické laboratoři. V souladu s obecnými trendy jsou i v těchto laboratořích zaváděny komplexní systémy managementu kvality, které slouží k řízení všech činností v laboratoři s cílem udržovat a zlepšovat kvalitu poskytovaných laboratorních služeb. Zavádění takových mechanismů do řízení laboratoře se prověřuje a osvědčuje nezávislémi orgány v procesech akreditace nebo certifikace. Postupem času jej vyžadují i plátcí zdravotní péče.

3.2 Výkonnostní charakteristiky analytické metody

Mezi základní analytické vlastnosti metody patří bezesporu dvě charakteristiky označované pojmy **preciznost** (precision) a **pravdivost** (trueness). Za jejich projekci do konkrétního výsledku měření pak lze považovat vlastnost tohoto výsledku označovanou pojmem **přesnost** (accuracy).

Poznámka: dříve se pro anglický výraz precision jako český ekvivalent používal výraz přesnost a pro pojem accuracy český ekvivalent správnost. Dnešní české termíny byly zavedeny v souladu s překladem mezinárodní metrologické normy TNI 01 0115:2009 Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM).

3.2.1 Preciznost

Těsnost souhlasu (shody) mezi nezávislými výsledky měření získanými za předem specifikovaných podmínek.

Preciznost měření se číselně vyjadřuje mírami nepřeciznosti postihujícími rozptýlení mezi nezávisle získanými výsledky, např. směrodatnou odchylkou, rozptylem nebo variačním koeficientem.

Preciznost je vyhodnocením dopadu existence *náhodných chyb* při měření, které nelze nikdy eliminovat a jejichž velikost je vlastní určité metodě, resp. konkrétnímu postupu měření. Tyto chyby způsobují náhodné vlivy (nestabilita přístrojů, kolísání okolních podmínek měření, např. teploty, výkyvy v činnosti operátora apod.). Výsledkem jejich působení je vznik rozdílů mezi výsledky opakovaných měření. Ty jsou při dostatečném počtu opakování, díky náhodnosti původu, rovnoměrně rozptýleny kolem své průměrné hodnoty. Přitom platí, že nejčastěji se vyskytují minimální odchylky a směrem k vyšším hodnotám odchylek se jejich počet snižuje.

Rozdělení četností odchylek odpovídá normální (Gaussově) distribuci. Mírou rozptýlení, tedy nepřeciznosti výsledků, tak je směrodatná odchylka s . Protože se uvádí v jednotkách měřené veličiny a závisí na její velikosti, používá se raději její relativní vyjádření, tj. variační koeficient CV vyjádřený v % (někdy označován rovněž jako relativní směrodatná odchylka).

Přeciznost metody není stejná v celém pracovním rozsahu metody. Její závislost na velikosti měřené veličiny se nazývá *profil preciznosti* a je důležitým měřítkem kvality měřicí metody. Variační koeficient dosahuje nejnižších hodnot ve střední oblasti rozsahu měření, zatímco směrem k jeho koncům se zvyšuje (především v oblasti velmi nízkých hodnot měřené veličiny významně roste). Velikost nepřeciznosti ovlivňuje reálný pracovní rozsah metody. Jednou z podmínek pro jeho volbu může být to, že CV nepřesahuje požadovanou úroveň, např. 10 %. Předem specifikovanými podmínkami měření v definici pojmu preciznost mohou být podmínky opakovatelnosti nebo reprodukovatelnosti.

Podmínka **opakovatelnosti** měření zahrnuje stejný postup měření, obslužný personál, měřicí systém, pracovní podmínky, totožné místo a opakování měření na stejném nebo podobném objektu v krátkém časovém úseku. Podmínka **reprodukovatelnosti** měření zahrnuje různá místa, obslužný personál, měřicí systémy a opakování měření na stejném nebo podobném objektu. Poměrně velká vůle v nastavení těchto podmínek vyžaduje vždy bližší specifikaci, které faktory byly proměnné.

Specifické podmínky reprodukovatelnosti zahrnující měření provedená sice stejným postupem, na stejném místě a opakováním měření stejných nebo podobných objektů, ale v rozšířeném časovém úseku jsou označovány jako podmínky mezilehlé preciznosti měření. Realizace měření v průběhu delšího časového intervalu může postihovat vliv dalších variabilních faktorů, jako např. změny kalibrací nebo kalibrátorů, změnu šarže používaných reagentů, resp. změny operátorů. Preciznost stanovená za těchto podmínek nejlépe vypovídá o kvalitě realizace metody v konkrétních podmínkách dané laboratoře.

3.2.2 Pravdivost

Těsnost souhlasu (shody) mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření a skutečnou hodnotou, resp. přijatou referenční hodnotou x_0 . Mírou pravdivosti metody je její odchylka (bias – B):

$$B = \bar{x} - x_0$$

nebo v relativním vyjádření:

$$B = \frac{\bar{x} - x_0}{x_0} \cdot 100 (\%)$$

Skutečná (pravdivá) hodnota měřené veličiny je v praxi z principu nedostupná, jelikož bychom ji mohli získat pouze dokonalým měřením. Proto se nahrazuje přijatou referenční hodnotou jako nejlepší praktickou aproximací skutečné hodnoty veličiny. Referenční hodnotu obvykle získáme prostřednictvím měření veličiny konsenzuálně přijatou referenční metodou, nebo jiným všeobecně uznaným postupem (např. měřením ve vybraných referenčních laboratořích apod.).

Pravdivost metody určuje existence systematické chyby provázející měření. Tento druh chyby může ovlivňovat výsledek měření buďto konstantním způsobem (výsledky jsou posunuty o stále stejnou hodnotu), proporcionálně (tedy o stále stejný násobek), anebo se může jednat o kombinaci obou způsobů. V této souvislosti se pak hovoří o konstantní a proporcionální složce systematické chyby.

Zatímco náhodných chyb se při měření nemůžeme zbavit (lze jen ovlivnit jejich velikost), systematické chyby měření lze někdy vhodnými úpravami eliminovat nebo alespoň z části korigovat.

3.2.3 Přesnost

Jedná se o těsnost shody mezi změřenou a pravou hodnotou měřené veličiny. Tato vlastnost se dotýká jednoho výsledku měření a je vlastně aktuálním projevem kombinace preciznosti a pravdivosti metody. Jde o příspěvek náhodné (RE – Random Error) a systematické (SE – Systematic Error) chyby, který nastal právě v okamžiku konkrétního měření. Součet obou těchto příspěvků se označuje jako celková chyba měření (TE – Total Error).

Jak bylo uvedeno výše, míra příspěvků náhodné složky chyby se u dané metody vyjadřuje odhadem směrodatné odchylky s , mírou příspěvků systematické složky chyb je odchylka b . Pomocí těchto dvou parametrů lze metodu charakterizovat odhadem její celkové analytické chyby dosahované při měření TE_A :

$$TE_A = k \cdot s + b$$

Úroveň spolehlivosti odhadu vyjadřuje koeficient k , který se rovná odpovídajícímu kvantilu zvoleného jednostranného intervalu spolehlivosti (pro 95 % má hodnotu 1,65, pro 99 % pak 2,33).

Klinickou využitelnost metody však vedle obou zmiňovaných charakteristik navíc ovlivňuje přirozená proměnlivost sledovaného parametru v běžné populaci, nazývaná biologická variabilita parametru (stanovovaného analytu). S ohledem na původ příspěvku k celkové biologické variabilitě se rozlišuje variabilita interindividuální (mezi různými jedinci dané populace) a intraindividuální (proměnlivost u biologického individua). Pokud se použijí variační koeficienty pro její relativní vyjádření, pak se obvykle označují jako CV_G , resp. CV_I . Pro řadu biologicky významných parametrů byly konkrétní hodnoty obou příspěvků sledovány a publikovány v odborné literatuře.

Z hlediska posouzení klinické využitelnosti metody je žádoucí, aby relativní analytická preciznost metody CV_A byla optimálně lepší než polovina intraindividuální biologické variability, tzn.

$$CV_A \leq 0,5 \cdot CV_I$$

Pro akceptovatelnou relativní analytickou pravdivost metody B_A pak platí požadavek, aby byla lepší než čtvrtina celkové biologické variability, tedy

$$B_A \leq 0,25 \cdot \sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}$$

Pro celkovou akceptovatelnou analytickou chybu metody TE_A pak plyne požadavek

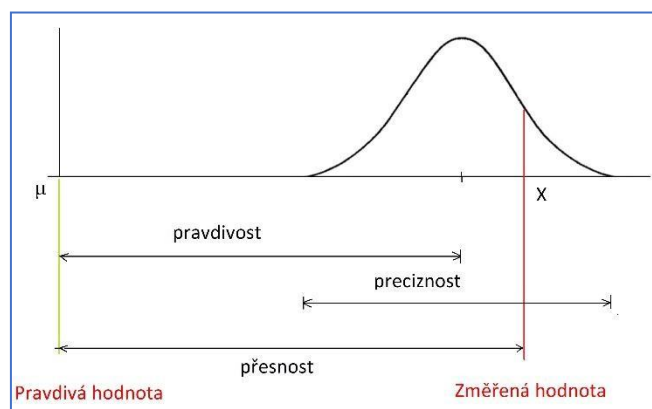
$$TE_A \leq 1,65 \cdot (0,5 \cdot CV_I) + 0,25 \cdot \sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}$$

Z hodnot analytické preciznosti metody a intraindividuální variability daného analytu lze vypočítat tzv. kritickou diferencí CD (někdy označovanou také jako nejmenší významnou změnu LSC – least significant change) mezi dvěma po sobě jdoucími výsledky pacienta. Jedná se o rozdíl mezi dvěma výsledky měření, který lze v závislosti na uvedených charakteristikách označit za významný na zvolené hladině spolehlivosti, resp. s určitou pravděpodobností, obvykle 95 %. Jedná se o parametr, který má pro rozhodování klinika při změně laboratorního výsledku v čase bezpochyby významnou roli.

$$CD = 1,96 \cdot \sqrt{2 \cdot (CV_I^2 + CV_A^2)} = 2,77 \cdot \sqrt{CV_I^2 + CV_A^2}$$

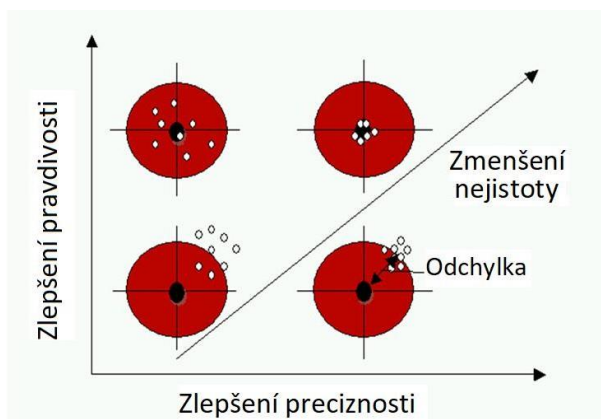
3.2.4 Souvislosti mezi precizností a pravdivostí metody

Jak již bylo uvedeno výše, vzájemné spolupůsobení obou těchto charakteristik v určitém časovém intervalu realizace měření rezultuje v konkrétní úrovni přesnosti daného výsledku měření (viz Obrázek 3.1).



Obrázek 3.1: Vztah mezi pojmy preciznost, pravdivost a přesnost měření (převzato: zdroj č. 13)

V závislosti na úrovních obou charakteristik lze posuzovat celkovou kvalitu metody. Tuto souvislost názorně postihuje příklad s kvalitou střelby na terč, uvedený na Obrázku 3.2. Se zlepšující se kvalitou metody se zároveň zlepšuje i další vlastnost metody, kterou je její nejistota (viz dále).



Obrázek 3.2: Souvislost mezi precizností a pravdivostí metody a jejich vliv na úroveň nejistoty metody (převzato: zdroj č. 13)

3.3 Nejistota výsledku měření

Nejistotou se rozumí parametr přidružený k výsledku měření, který charakterizuje míru rozptýlení hodnot, jež by mohly být důvodně přisuzovány měřené veličině.

Koncepce nejistot nahradila v současné metrologii dřívější koncepci chyb. Na rozdíl od ní lépe postihuje skutečnost, že výsledek měření je s jistou neurčitostí jen odhadem reality. To znamená, že nejde o bodový odhad (číslo) jeho hodnoty vzdálený od reality o stanovenou chybu, ale že s určitou spolehlivostí se tento výsledek nachází v ohraničeném intervalu možných hodnot. Znalost nejistoty umožňuje lépe porovnávat výsledky měření navzájem, nebo například s referenčními intervaly. Odhad nejistoty výsledků měření získaných danou metodou je zároveň součástí její validace, kdy přispívá k posouzení, zda je metoda pro požadovaný účel dostatečně vhodná. Princip určení nejistoty spočívá ve vyhodnocení efektů, které mohou působit na výsledek měření a následně v odhadnutí intervalu, o kterém je s určenou mírou spolehlivosti možné tvrdit, že se uvnitř nachází skutečná hodnota měřené veličiny.

Celková nejistota je výsledkem spolupůsobení mnoha zdrojů. Efektem každého z nich je jeho individuální příspěvek k výsledné nejistotě. Tento příspěvek se označuje jako složka nejistoty. Kvantitativní vyčíslení příspěvku některých složek můžeme získat ze statistických distribucí výsledků série měření, charakterizovaných jejich experimentální směrodatnou odchylkou (tzv. složky nejistot typu A). Vyčíslení příspěvku jiných složek se získá z pravděpodobnostních funkcí založených na zkušenostech nebo poskytnutých informacích (tzv. složky nejistot typu B). Číselná hodnota každé složky nejistoty převedená do podoby směrodatné odchylky se nazývá **standardní nejistotou** a označuje se symbolem u_x (index x vyjadřuje příslušnost ke složce x). Nevýznamné příspěvky standardních nejistot se pominou a ostatní se sloučí podle zákona šíření nejistot do tzv. **kombinované nejistoty** u_c :

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + \dots + u_n^2}$$

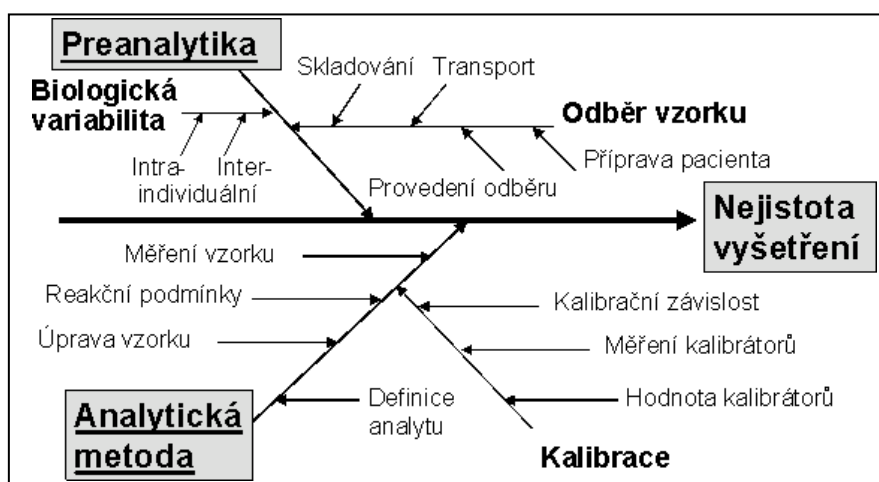
Pozn.: výše uvedený algoritmus je značným zjednodušením provádění odhadu nejistoty měření a současně není jediným možným postupem.

V praxi se uvádějí výsledky měření doprovázené tzv. **rozšířenou nejistotou** U_c , což je vlastně kombinovaná nejistota vynásobená koeficientem rozšíření k tak, aby odhad nejistoty odpovídal požadované úrovni spolehlivosti. Pro 95 % pravděpodobnost má koeficient hodnotu 1,96, ale v praxi se obvykle používá jeho zaokrouhlená hodnota 2:

$$U_c = 2 \cdot u_c$$

Výsledek konkrétního měření je pak prezentován jako hodnota zjištěná měřením doprovázená rozšířenou kombinovanou nejistotou, např.: $132 \pm 6 \text{ nmol.L}^{-1}$.

Vedle zdrojů nejistot, které jsou spjaty s vlastní analytickou metodou, zahrnuje výsledná nejistota výsledek měření i příspěvky zdrojů uplatňujících se především v preanalytické fázi vyšetření, viz Obrázek 3.3.



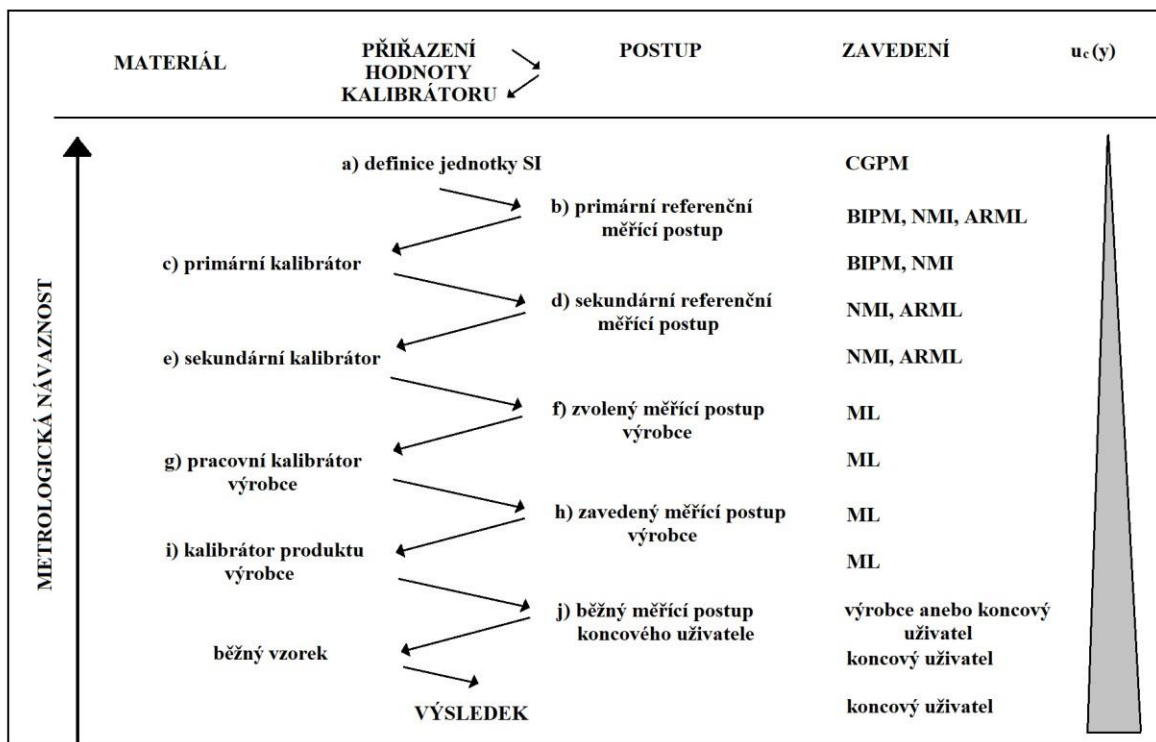
Obrázek 3.3: Hlavní zdroje nejistoty laboratorního vyšetření v klinické laboratoři (převzato: zdroj č. 13)

Význam uvádění nejistoty tkví nejen ve vyjádření jisté míry neurčitosti výsledku, který se s danou pravděpodobností může vyskytovat v celém vymezeném intervalu, ale je důležité s nejistotou výsledku počítat při jeho interpretaci vzhledem k rozhodovacím limitům, především pokud se k těmto limitům přibližuje.

3.4 Návaznost metody

Návazností metody se rozumí vlastnost výsledku měření, pomocí níž může být výsledek vztažen ke stanovené referenci přes dokumentovaný nepřerušovaný řetězec kalibrací, z nichž každá se podílí na stanovené nejistotě měření.

Jedná se o velmi důležitou vlastnost metody s ohledem na dosažení její optimální pravdivosti. Pokud v metodě existuje návaznost každé ze vstupních hodnot veličin, jež jsou zahrnuté do modelu měření, až na základní jednotku SI, pak lze považovat zajištění návaznosti metody za optimální a výsledky měření mají předpoklad být v širokém mezinárodním měřítku srovnatelné. Prakticky to znamená, že především u kalibrátorů používaných v postupu měření se požaduje jejich navázání na standardy vyšší metrologické kvality. Tento princip je zajišťován pomocí existence hierarchické struktury referenčních materiálů a metod, pomocí nichž je pracovní kalibrátor postupně navazován až na nejvyšší standard, optimálně až na jednotku SI. V této hierarchii vystupují současně také různé subjekty, které realizaci jednotlivých kroků zajišťují.



Obrázek 3.4: Hierarchie kalibrace a metrologická návaznost na jednotku SI (převzato: zdroj č. 13)

Pozn.: podle ČSN EN ISO 17511:2004;

CGPM – Všeobecná konference pro váhy a míry, BIPM – Mezinárodní úřad pro váhy a míry, NMI – národní metrologický institut, ARML – akreditovaná referenční měřicí laboratoř, ML – laboratoř výrobce

Setkáváme se s několika typy standardů (referenčních materiálů) vystupujících na různé úrovni:

- primární referenční materiál – substance s maximálně dosažitelnou čistotou, jeho navážením nebo odměřením objemu vzniká materializovaná jednotka měření,
- sekundární (certifikovaný) referenční materiál – obvykle má matricový charakter (obsah proteinové matrice); je doprovázen certifikátem osvědčujícím obsah analytu, zjištěný postupem v návaznosti na primární referenční materiál (obvykle referenční metoda s minimální nejistotou),
- pracovní kalibrátor – určen ke kalibraci rutinních metod, jejichž hodnoty jsou odvozené od certifikovaných referenčních materiálů, nebo na ně navázaných pracovních kalibrátorů výrobce.

Prověření návaznosti metody je nedílnou součástí procesu její validace.

3.5 Citlivost metody

V praxi se používá hned několik charakteristik, které se označují jako citlivost a souvisejí se schopností metody rozlišit určité úrovně měřené veličiny (především v oblasti jejich velmi nízkých hodnot). Pro jejich rozlišení se používají různé přívlastky nebo samostatné pojmy (analytická citlivost, funkční citlivost, mez detekce, mez stanovitelnosti).

Pozor! Je třeba si uvědomit, že tyto charakteristiky popisují metodu z hlediska jejich analytických vlastností. V klinické praxi se však často používá i pojem „diagnostická citlivost“, resp. „diagnostická senzitivita“, který charakterizuje metodu z hlediska její klinické využitelnosti, tedy obvykle její schopnosti rozlišit zdravé od nemocných.

3.6 Kontrola kvality

Pojmem kontrola kvality se obecně označuje soubor činností realizovaných v laboratoři s cílem zajistit dostatečnou věrohodnost výsledků prováděných měření. Tyto činnosti se dotýkají prakticky jen zajištění analytické spolehlivosti používaných metod. Podle toho, kdo se na jejich realizaci podílí, se kontrola kvality dále rozlišuje na:

- vnitřní kontrolu kvality (VKK) – provádí ji pouze personál laboratoře,
- externí hodnocení kvality (EHK) – při organizaci a vyhodnocení se uplatňují i vnější subjekty.

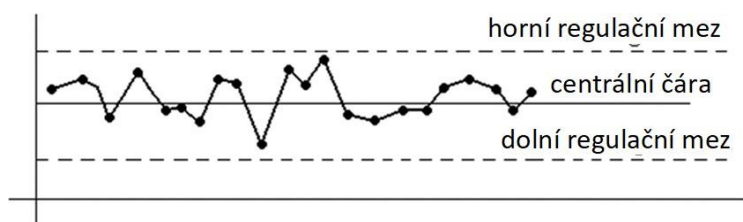
3.6.1 Vnitřní kontrola kvality

Tento druh kontroly realizujeme kontinuálním sledováním mezilehlé preciznosti, případně i pravdivosti metody pomocí průběžného měření kontrolních vzorků, které analyzujeme v každé sérii stanovení. Znalost cílové hodnoty měřené veličiny v kontrolním vzorku je nutností pouze pro sledování pravdivosti metody. Takovou možnost nabízejí např. různé komerčně dodávané kontrolní vzorky s atestem. Jinak lze pro sledování preciznosti využít i vzorky bez atestu a pro sledování pravdivosti zvolit alternativní postup.

Sérií stanovení se myslí obvykle délka jedné pracovní směny v případě nepřetržitého nebo směnného automatického provozu, nebo jedno stanovení prováděné ve skupině (dávce) vzorků u manuálních metod.

Počet kontrolních vzorků v sérii není striktně definován a odvíjí se od znalosti celkové úrovně kvality dané metody. V praxi se obvykle používají 2–3 vzorky s rozdílnou hodnotou měřené veličiny. Vhodnou volbou je např., aby jeden kontrolní vzorek měl tuto hodnotu uvnitř referenčního intervalu a druhý mimo něj, např. nad jeho horní hranici. Výsledky měření kontrolních vzorků se posuzují v souvislosti s výsledky nalezenými dříve. V principu jde o sledování velikosti a charakteru chyb aktuálního měření kontrolního vzorku s cílem identifikovat situace, které jsou z hlediska stanovených požadavků na kvalitu neakceptovatelné. Provedením operativního zásahu chceme předejít vydání neadekvátních výsledků.

Nejčastější formou tohoto sledování je jejich vizualizace v podobě grafů tzv. regulačních diagramů. Tento způsob se zakládá na hodnocení kolísání hodnoty měřené veličiny kolem zvolené – centrální linie diagramu (cílové, deklarované hodnoty veličiny), přípustné rozmezí je dáno intervalem mezi dolní a horní regulační mezí. Těmito mezemi bývá vhodný násobek směrodatné odchylky, odvozené z mezilehlé preciznosti metody dosahované v předchozím období. Příklad regulačního diagramu uvádíme na Obrázku 3.5.

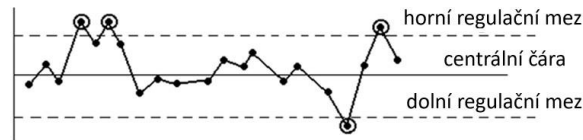


Obrázek 3.5: Příklad regulačního diagramu bez výskytu podezřelých výsledků (převzato: zdroj č. 13)

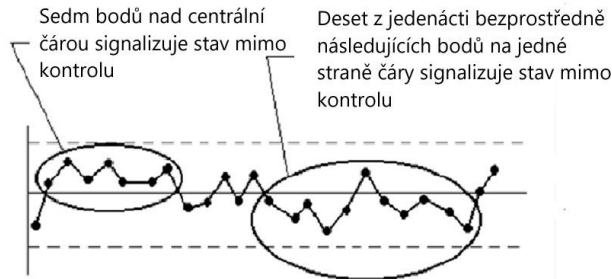
Většinou se do diagramu znázorňují dvě hranice – varovná na úrovni $\pm 2s$ a zásahová (regulační) na úrovni $\pm 3s$. Situace, kdy odchylka výsledku kontrolního měření přesáhne hodnotu $3s$, se stává signálem k pátrání po možné příčině odchylky a k provedení operativního zásahu s alternativou opakování celé série měření vzorků, která analýze kontrol předcházela.

V regulačním diagramu lze pozorovat i další situace, které mohou vést k nutnosti řešení, např. pokud se u výsledků kontrol opakovaně za sebou vyskytuje odchylka od centrální linie stále stejným směrem, nebo mají za sebou získané výsledky shodný trend (viz Obrázek 3.6).

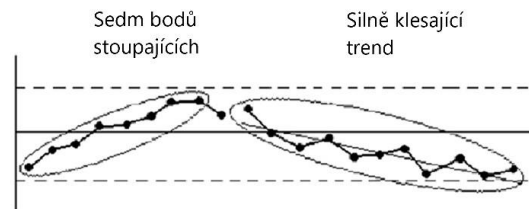
Pro zajištění co největší objektivity při posuzování výsledků vnitřní kontroly byly vyvinuty algoritmy, jejichž cílem je dosažení maximální pravděpodobnosti detekce chyby při minimální pravděpodobnosti falešného zamítnutí série (Westgardova kombinovaná pravidla). Tyto algoritmy jsou dnes součástí řídicích software analyzátorů a bývají rovněž zabudovány i do laboratorních informačních systémů (LIS), čímž přispívají ke zjednodušení hodnocení. Někteří výrobci reagensů nebo komerčních kontrolních vzorků nabízejí rovněž možnost automatického odesílání výsledků kontrolních měření prostřednictvím internetu do hodnoticího centra, kde jsou vyhodnocovány v kontextu ostatních uživatelů stejných kontrolních materiálů (např. firmy BioRad, nebo Randox apod.). Tento způsob realizace kontroly kvality se již částečně blíží externímu hodnocení.



a) Náhodné odchylky



b) Systematické odchylky



c) Trendy

Obrázek 3.6: Regulační diagram s různými typy anomálií (převzato: zdroj č. 13)

Statistické parametry používané v rámci vnitřní kontroly kvality

Výběrový průměr \bar{x} je střední hodnotou z celkového počtu n hodnot ve výběru (n = rozsah výběru):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Výběrový rozptyl s^2 je průměr čtverců odchylek jednotlivých hodnot výběru od výběrového průměru. Při výpočtu výběrového rozptylu se součet čtverců odchylek nedělí celkovým počtem hodnot ve výběru, tj. n , ale hodnotou $(n-1)$, protože se tím docílí lepšího odhadu celkového rozptylu populace σ^2 . Pro výpočet rozptylu tedy platí vztah:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Výběrová směrodatná odchylka s je druhou odmocninou výběrového rozptylu. Používá se častěji, než rozptyl.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Variační koeficient VK je relativní mírou rozptýlení dat. Počítá se jako podíl směrodatné odchylky k průměru a vyjadřuje se obvykle v procentech, tedy:

$$VK = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

3.6.2 Externí hodnocení kvality

Principem EHK (EQA – External Quality Assessment), označovaným také jako externí kontrola kvality, je hodnocení analytické metody na základě vzájemného porovnávání výsledků měření dosažených analýzou identických vzorků v různých laboratořích. Toto hodnocení je organizováno a realizováno za předem definovaných a harmonizovaných podmínek (v souladu s platnými normami a podmínkami regionu, v němž se provádějí).

Organizaci a hodnocení EHK zajišťuje obecně uznávaný subjekt – poskytovatel EHK. V České republice je takovým poskytovatelem pro oblast vyšetření v klinické biochemii firma SEKK s. r. o. Vedle toho však existuje rovněž celá řada zahraničních programů EHK. Vlastní měření se samozřejmě provádí v účastnících se laboratořích. Kontrolní měření jsou obvykle zajišťována v rámci různých programů EHK několikrát do roka.

Vlastní realizaci EHK je možné charakterizovat takto:

- Rozeslání identických kontrolních vzorků do laboratořích; vzorky musí být maximálně komutabilní (tzn. mít vlastnosti obdobné jako vzorky běžně analyzované), musí být dostatečně homogenní a stabilní, tak aby byl zajištěn předpoklad shodných podmínek pro všechny účastníky.
- Účastnické laboratoře provádějí analýzy v rámci konkrétního programu souběžně a jejich výsledky odešlou poskytovateli programu v předem dohodnutém termínu.
- Výsledky jsou poskytovatelem vyhodnoceny podle předem definovaných zásad a kritérií, s nimiž jsou účastníci rovněž předem seznámeni.
- Hodnocení výsledků je sumarizováno do předem dané písemné podoby a rozesláno účastníkům; informace jsou prezentovány jako důvěrné a anonymní s kódovanou identifikací jednotlivých účastníků.

Obvykle se v jednom cyklu EHK rozesílá několik vzorků (nejčastěji 2 vzorky, existují kontrolní programy, kde je v jednom cyklu rozesíláno např. 5 vzorků). Při hodnocení se posuzuje shoda výsledku účastníka se vztažnou hodnotou (cílovou hodnotou). V závislosti na úrovni návaznosti měření dané veličiny a dostupnosti kontrolního materiálu můžeme rozlišit několik typů vztažné hodnoty. Pokud pro měření veličiny existuje referenční metoda, může být vztažnou hodnotou certifikovaná referenční hodnota (CRV). Jiným typem je konsenzus expertů (CVE), což je hodnota získaná měřením ve vybraných expertních laboratořích, nebo konsenzus účastníků (CVP), tedy hodnota vypočtená buďto z výsledků všech účastníků v konkrétním cyklu EHK, nebo z výsledků skupiny účastníků používajících shodný postup měření.

Pro posouzení shody se vztažnou hodnotou se stanovují maximální toleranční limity, které nesmí být překročeny, pokud má být účastník hodnocen jako úspěšný. Tyto limity vyjadřují přijatelný rozdíl v procentech od vztažné hodnoty D_{max} (vymezuje okolí vztažné hodnoty, v němž se výsledky považují za přijatelné). S ní se porovnává odchylka $D\%$, která se jednoduše vypočítá jako relativní chyba účastníka z jeho výsledku x a ze vztažné hodnoty X :

$$D\% = \frac{x - X}{X} \cdot 100 (\%)$$

Konkrétní výše přípustných odchylek zůstává i přes snahy o sjednocení u jednotlivých poskytovatelů různá. K jejich určení může být aplikován některý z možných přístupů:

- na podkladě biologických rozptylů (při jejich výpočtu se bere v úvahu intra a interindividuální variabilita měřené veličiny v populaci),
- na základě soudobých analytických možností (např. jako hodnota mezilaboratorní preciznosti dosažená u 20 % nejlepších laboratořích v kontrolním cyklu EHK).

Z limitu platného pro určitý analyt v daném programu EHK lze odvodit rovněž limit pro vnitřní kontrolu, jehož plnění by mělo zaručovat úspěšné hodnocení v rámci EHK. Zjednodušeně řečeno, platí, že limit pro vnitřní kontrolu (limit pro přípustnou mezilehlou preciznost metody) by měl být na třetinové úrovni limitu pro EHK.

Při hodnocení lze jednoduše posuzovat, zda odchylka laboratoře $D\%$ je menší než D_{max} . Podmínkou úspěšnosti účastníka v cyklu EHK je to, aby podíl obou hodnot, označovaný jako P-skóre, byl v absolutní hodnotě menší než 1, tedy:

$$|P| = \left| \frac{D\%}{D_{max}} \right| \leq 1$$

V některých programech EHK se pro posouzení úspěšnosti účastníků používá odlišný způsob ohodnocení na základě tzv. z-skóre. V tomto skóre se proměňují odchylka výsledku účastníka x od vztažné hodnoty X a zjištěné

mezilaboratorní preciznosti výsledků účastníků cyklu EHK vyjádřené v podobě směrodatné odchylky. Pro úspěšnost účastníka je v tomto případě požadováno, aby absolutní hodnota z byla menší než 3 (hodnota pod 1 je považována za velmi dobrou a pod 2 za akceptovatelnou):

$$|z| = \left| \frac{x - \bar{X}}{s} \right| \leq 3$$

Úspěšná účast laboratoře v programech EHK je známkou kvality její práce, a je tak vyžadována orgány prověřujícími funkčnost systému managementu kvality v laboratoři, ale rovněž i plátcí zdravotní péče. Vedle tohoto z části represivního charakteru mají programy EHK nezanedbatelný edukativní charakter, který spočívá např. v komentování výsledků kontrolních cyklů pověřenými odborníky (supervizory), poskytováním jejich konzultací, publikováním článků v odborných časopisech apod.

Další doporučené zdroje k této kapitole:

1. ČIA [online]. [cit. 2011-09-30]. Dostupné z: <http://www.cia.cz/>.
2. ČSN EN ISO 9001:2009 Systémy managementu kvality – Požadavky.
3. ČSN EN ISO 15189:2007 Zdravotnické laboratoře – Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost.
4. *Metrologická terminologie v klinické a analytické laboratoři*. 2. přepracované vydání. SEKK s. r. o. a Eurachem ČR, 2009
5. NASKL [online]. [cit. 2011-09-30]. Dostupné z: <http://www.naskl.cz/>.
6. Racek J. Rajdl, D. et al.: *Klinická biochemie*. 3., přepracované vydání. Praha: Galén, 2021.
7. SEKK [online]. [cit. 2011-09-30]. Dostupné z: <http://www.sekk.cz/>.
8. Suchánek M. (ed.). *Kvalimetrie 8. Základy metrologie v chemii*, Eurachem ČR, 1999.
9. Suchánek M. (ed.). *Kvalimetrie 9. Vhodnost analytických metod pro daný účel*, Eurachem ČR, 1999.
10. Suchánek M. (ed.). *Kvalimetrie 11. Stanovení nejistoty analytického měření*, Eurachem ČR, 2001.
11. *TNI 01 0115:2009. Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM)*.
12. Zima T. *Laboratorní diagnostika*. 3., doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén – Karolinum, 2013.
13. Bartoš V. *Management kvality v klinických laboratořích*. Ostrava 2014.

Shrnutí kapitoly

Objektem zájmu analytické fáze je samotná analytická metoda a vlastní realizace měření. Proto tato kapitola pojednává o základních vlastnostech – výkonnostních charakteristikách – analytických metod, které jsou určujícím aspektem pro jejich praktické využití. Mezi tyto vlastnosti se řadí především preciznost a pravdivost metody, její citlivost, nejistota, návaznost apod. Jejich konkrétní úroveň pak determinuje možnosti využití analytické metody pro účely klinické laboratorní diagnostiky. Posouzení vhodnosti metody pro daný účel jejího použití spočívá ve stanovení, resp. ověření výkonnostních charakteristik metody a realizuje se v rámci procesů označovaných jako validace, případně verifikace metody. Během praktického používání analytické metody jsou k zajištění odpovídající úrovně měření pracovníky laboratoří prováděny různé činnosti, souhrnně označované pojmem kontrola kvality, které je možné dále dělit na vnitřní a externí kontrolu kvality. Výstupy z těchto činností pomáhají personálu laboratoře zajišťovat odpovídající věrohodnost výsledků měření, a garantovat tak kvalitní analytickou fázi celého laboratorního diagnostického procesu.

Otázky úkoly:

1. Definuj pojmy preciznost a pravdivost metody.
2. Co charakterizuje nejistota výsledku měření?
3. Co se rozumí pod pojmem návaznost metody?
4. K čemu slouží systém vnitřní kontroly kvality?
5. Jakým způsobem (pomocí čeho) lze sledovat velikost a charakter chyb aktuálního měření kontrolního vzorku v rámci vnitřní kontroly kvality?
6. K čemu slouží a jak se realizuje externí hodnocení kvality?

4 POSTANALYTICKÁ FÁZE

V této kapitole se dozvíte:

V této kapitole se dozvíte základní informace o interpretaci a vydávání výsledků.

Klíčová slova této kapitoly:

Interpretace výsledku, lékařská kontrola, referenční hodnota.

Čas potřebný k prostudování učiva kapitoly: 10 minut (teorie)

Postanalytická fáze má interdisciplinární charakter spolupráce: laboratoř – indikující lékař.

Spočívá v interpretaci výsledků ve vztahu k fyziologickým hodnotám, k výsledkům dalších vyšetření a ke klinickému obrazu pacienta.

Součástí vyhodnocování výsledků je i přístup k překvapivému nálezu, např. excesivní nebo neočekávané hodnotě, která nekoreluje s klinickým stavem pacienta, vyžaduje opakování vyšetření nebo ověřování jinou vyšetřovací metodou.

Postanalytická fáze je jen jedním z prvků, který ovlivňuje bezpečnost pacientů. Vyžaduje přístup podložený důkazy a komunikací. Je jedním z hlavních atributů laboratorní medicíny, není pouze záležitostí lékařů, podílejí se na ní všichni laboratorní pracovníci. Musí se aktivně pěstovat a podporovat.

Předpokladem lékařské kontroly, která je posledním stupněm před vydáním laboratorního nálezu, je splnění požadavků analytické kontroly spolehlivosti (viz kapitola Analytická fáze).

K tomu, aby lékař mohl označit laboratorní výsledek za patologický, nebo tzv. normální, musí jej porovnat s referenčními hodnotami. Referenční hodnoty jsou hodnoty, které byly získány vyšetřením velkých souborů jedinců s definovaným stavem zdraví. Podle definice WHO je zdraví „stav úplného fyzického, duševního a společenského blaha, bez známek jakékoliv choroby“. Zdraví je pojem relativní a závisí na mnoha okolnostech. Absolutně zdravý jedinec neexistuje, proto neužíváme termín „normální hodnoty“, nýbrž „referenční hodnoty“. Referenční hodnoty jsou definovány referenčním rozmezím, tj. dvěma mezemi (horní a dolní). Referenční hodnoty se stanovují na základě zpracování biologického materiálu tzv. referenčními metodami.

Důležitou součástí lékařské kontroly výsledků jsou interpretační komentáře, bez nichž se neobejde např. elektroforéza proteinů séra. Interpretační komentář také může diskutovat ordinování nadbytečných testů. Obecně – proč dělat testů 5, když stejnou informační hodnotu mají testy 2? Příklad: testem první volby při podezření na onemocnění štítné žlázy je TSH. Free T4 a free T3 není nutné ordinovat vzhledem k inverznímu logaritmicko-lineárnímu vztahu mezi TSH a fT4.

Abnormální výsledky pacienta mohou vyústit v požadavek konziliárního vyšetření klinického biochemika u lůžka pacienta, na jehož základě se upřesní další diagnosticko-terapeutický postup. U ambulantního pacienta lze při sporných výsledcích odeslat pacienta k cílenému vyšetření do metabolické ambulance klinické biochemie, kde se problém (např. diferenciální diagnostika hypokalémie) dořeší.

Další doporučené zdroje k této kapitole:

1. Čermáková M., Štěpánová, I. *Klinická biochemie*. 1. díl. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 2003.

Otázky úkoly:

1. K čemu slouží postanalytika?
2. Co si představujete pod pojmem interpretace biochemických výsledků?
3. Definujte referenční hodnoty.

5 LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ MOČI

V této kapitole se dozvíte:

V této kapitole se dozvíte základní informace o fyziologii ledvin, jaké je složení moče, o poruchách spojených s vylučováním některých metabolitů ledvinami, jak se vyšetřuje moč chemicky a jak vyhodnotit nález v močovém sedimentu

Klíčová slova této kapitoly:

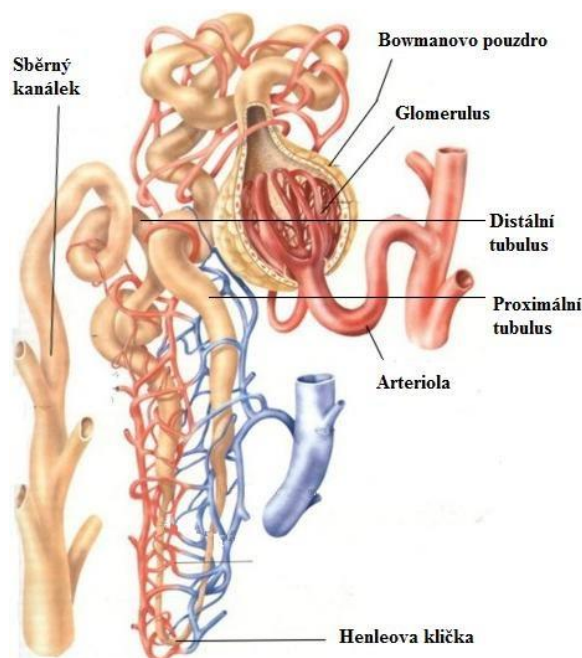
Nefron, glomerulární filtrace, tubulární resorpce, organické a anorganické složky moče, odběr moče, chemické vyšetření moče, mikroskopické vyšetření moče.

Čas potřebný k prostudování učiva kapitoly: 3 hodiny (teorie + řešení úloh)

5.1 Úvod

Ledviny jsou uloženy v bederní krajině jako párový orgán po obou stranách páteře. Jsou odděleny pobřišnicí od břišní dutiny a představují nejdůležitější orgán v regulaci objemu a složení tělesných tekutin. V příčném řezu lze rozlišit část korovou (cortex) a dřeňovou (medulla). Dřeň tvoří pyramidové útvary, jejichž vrcholky se nazývají papily, na něž se upínají tzv. kalichy, které ústí do ledvinné pánvičky. Pánvičkou a dále močovodem je moč vytvořená ledvinami transportována do močového měchýře, kde se přechodně uskládňuje. Moč opouští močový měchýř dle potřeby močovou trubicí.

Základní funkční jednotkou ledvin je *nefron*, který je tvořen glomerulem a tubuly, proximálním a distálním tubulem, které jsou propojeny Henleovou kličkou (Obr. 5.1). Glomerulus je tvořen klubkem kapilár s přívodní arterioulou (*vas afferens*) a odvodnou arterioulou (*vas efferens*). Glomerulus je vchlípen do Bowmanova pouzdra, na který navazuje proximální tubulus, Henleova klička, která na začátku tlustou částí směřuje do dřeně, dále následuje tenké sestupné raménko přecházející ve vzestupné raménko, které dále pokračuje tlustým segmentem, který přechází v distální tubulus. Ten svou stočenou částí ústí spojovacím segmentem do sběracího kanálku, který se korovou a pokračující dřeňovou částí spojuje ve vývod ústící v oblasti papily do ledvinné pánvičky.



Obrázek 5.2: Schematické uspořádání nefronu
(převzato: zdroj č. 9)

V nefronu probíhají především 2 děje: **glomerulární filtrace** a **tubulární resorpce**.

Glomerulární filtrace je děj, při kterém dochází k „filtraci“ krve, plazmy za vzniku filtrátu krevní plazmy (primární moč, ultrafiltrát), jehož složení je stejné jako složení extracelulární tekutiny s výjimkou nízkomolekulárních proteinů. Vzniklý ultrafiltrát dále postupuje do tubulů, ve kterých dochází k resorpci (vstřebání) látek důležitých pro udržení homeostázy vnitřního prostředí. Díky tomu se látky, které mají být z organismu vyloučené okamžitě, vůbec nevstřebávají, nebo navíc někdy dochází k jejich tubulární sekreci (např. toxiny). V podstatě vlastní ledvinná kontrola složení vnitřního prostředí připadá tubulům. V glomerulech se z každých 100 ml plazmy vytvoří za minutu asi 20 ml glomerulárního filtrátu. Vzhledem k tomu, že za jednu minutu proteče oběma ledvinami asi 600 ml plazmy, vytvoří se zhruba 120 ml filtrátu, což za 24 hodin znamená neuvěřitelných 172,8 litrů. Jelikož se fyziologicky vylučuje pouze **0,5–2,0 litry moče za den** (zdravý jedinec denně vyloučí asi **1,5 litru moči**), musí být značný objem tekutiny vstřebán zpět v tubulech, k čemuž dochází díky reabsorpci vody (asi 99 % ultrafiltrátu se zpětně vstřebává).

Mezi základní funkce ledvin lze zařadit exkreci odpadních, toxických či nepotřebných látek (urea, kreatinin, mnohé léky, metabolity hormonů atd.). Podílí se na udržování homeostázy vnitřního prostředí a tvorbě biologicky aktivních látek, včetně hormonů (renin, erythropoetin, kalcitriol). Ledviny hrají roli také v intermediárním metabolismu (především glukoneogenezi a v degradaci aminokyselin).

5.2 Složení moči

5.2.1 Organické složky moči

Sloučeniny obsahující dusík:

- *urea (močovina)* – syntetizována v játrech v močovinovém cyklu z amoniaku pocházejícího z degradace aminokyselin. Převážná část (90 %) je vyloučena ledvinami, přičemž polovina z tohoto množství podléhá zpětné pasivní resorpci v tubulech. Zpětná resorpce závisí na tom, zda je vylučována koncentrovaná či zředěná moč. Při dehydrataci se pasivní resorpce urey zvyšuje a v séru pak mohou být její hodnoty vysoké. Vylučované množství závisí na množství metabolizovaných proteinů, např. degradací 70 g proteinů lze získat 30 g močoviny/den.
- *kyselina močová* – konečný produkt katabolismu purinů. Její zpětná resorpce nastává v proximálním tubulu, kde se resorbuje téměř všechna, pak se vrací zpět do moče aktivní tubulární sekrecí v distální části a určitý podíl je opět aktivně resorbován. Děje v distálním tubulu mohou být ovlivněny řadou aniontů a léků (kompetice s kyselinou močovou o transport). V definitivní moči lze nalézt pouze 6–12 % profiltrované kyseliny močové.
- *kreatinin* (cyklický imid kreatinu) – produkt svalového metabolismu, ireverzibilně se tvoří neenzymovou dehydratací a spontánní cyklizací z kreatinu a (po odštěpení fosfátu) kreatinfosfátu. Kromě endogenní tvorby se do organismu dostává také potravou, kdy z celkového množství kreatininu v moči vyloučeného za 24 h, je 15-30 % z potravy.

Nicméně za normálních podmínek je poměr jeho produkce a exkrece konstantní. Z krevní plazmy je z 90 % filtrován do ultrafiltrátu (vylučován glomerulární filtrací), ale i z 10 % secernován tubuly do moči, přičemž se vůbec zpětně neresorbuje. Množství kreatininu vyloučené ledvinami za den je individuální a přímo závisí na hmotnosti svalové hmoty jedince a funkci glomerulů. Kreatinin tedy můžeme použít jako referenční látku pro kvantifikaci ostatních složek moči. Měřenou hodnotu kreatininu v moči lze také využít pro odhad správného sběru moči za 24 h, kdy odpad kreatininu za 24 h by neměl být nižší než 70 % očekávané tabulkové hodnoty (odpad kreatininu vypočtený v závislosti na věku, pohlaví a hmotnosti). V neposlední řadě také, jestliže je zajištěn správný sběr moče, může být clearance endogenního kreatininu (eliminace kreatininu z krve do moči za jednotku času – s⁻¹) spolehlivým odhadem glomerulární filtrace.

Množství a různorodost vylučovaných **aminokyselin** závisí především na stravě a výkonnosti jater. Modifikované aminokyseliny přítomné v proteinech se specializovanou funkcí, např. hydroxyprolin v kolagenu, 3-methylhistidin v aktinu a myosinu, mohou sloužit jako indikátory degradace těchto proteinů.

Proteinurie značí patologické množství bílkovin (hlavně albuminu) v moči (tj. více než 0,15 g/24 hod). Je převážně ukazatelem poškození ledvin, a to buď glomerulární membrány (glomerulární proteinurie) nebo tubulárních buněk (tubulární proteinurie). Vzhledem k tomu, že příjem tekutin významně ovlivňuje koncentraci stanovovaných látek v moči, je vhodné vztáhnout tyto hodnoty k relativně standardně vylučovanému kreatininu (ACR – poměr albumin/kreatinin, popř. PCR – protein/kreatinin) v moči. Testační zóna proužků na vyšetření bílkoviny v moči je citlivá především na albumin, přičemž přítomnost jiných proteinů při vyšetření moči chemicky nemusí být detekována. Vyšetření proteinurie chemickým proužkem je tedy pouze

orientační diagnostikou. Pro přesné, tedy citlivé a specifické stanovení proteinurie je vhodné kvantitativní vyšetření celkové bílkoviny, ideálně albuminu v moči.

Další důležité složky:

Metabolity hormonů (katecholaminy, steroidní hormony, serotonin) lze v moči také nalézt. Lidský choriový chonadotropin (hCG, $M_r = 36\,000$) – hCG je proteohormon, který se vytváří na začátku těhotenství. Cirkuluje v krevním oběhu a díky jeho malé molekule je v moči detekovatelný. Těhotenské testy se zakládají na imunologické detekci právě tohoto hormonu v moči.

V moči se v malém množství nachází také urobilinogen, který se tvoří ve střevě z bilirubinu. Oxidací urobilinogenu (UBG) v moči vznikají urobiliny (žlučová barviva).

Glykosurie označuje výskyt glukózy (Glu) v moči. K filtraci glukózy glomeruly dochází při jakékoli hladině glykémie (i při hypoglykémii). Zpětně resorbována je tím víc, čím je vyšší hladina glykémie, ale pouze do jisté hodnoty (do $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Nad tímto „ledvinovým prahem“ už k resorpci nedochází, protože už jsou obsazené všechny receptorové bílkoviny pro Glu. Díky přítomnosti Glu v moči (glykosurie) se zvyšuje diuréza (např. při diabetes mellitus).

Ketonurie znamená zvýšený výskyt ketolátek (kyselina acetoctová, β -hydroxymáselná, aceton) v moči. Testační zóna proužků na vyšetření ketolátek v moči chemicky je citlivá na acetoacetát, popř. na aceton. Nicméně není citlivá na kys. β -hydroxymáselnou, která při ketoacidóze nabývá na koncentraci. Tato skutečnost může být důvodem negativního nálezu ketolátek v moči, i když je klinicky přítomna ketoacidóza. Jejich zvýšené množství v moči je běžné při nadměrném odbourávání mastných kyselin (např. při hladovění nebo diabetes mellitus).

5.2.2 Anorganické složky moči

V moči se nachází významné množství kationtů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+) a aniontů (Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- a HPO_4^{2-}) a stopová množství dalších iontů. Vylučování iontů ledvinami je ve většině případů regulováno hormonálně. Na množství různých anorganických složek v moči se podílí také skladba stravy. Ke zpětnému vstřebávání výše uvedených iontů dochází v tubulární části nefronu. Místem resorpce většiny iontů Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- atd. je proximální tubulus. Fosfáty a amoniak slouží v moči jako pufrční systémy.

Ledviny jsou také důležitým orgánem pro udržení osmolality vnitřního prostředí organismu. Na velikosti **osmolality moče** se podílí množství *osmoticky aktivních částic* vyloučených do moči. Osmolalita se vyjadřuje jako látkové množství solutu dělené hmotností solventu (rozpuštědla), udává se v jednotkách mmol na kilogram. Normální hodnoty osmolality v moči se pohybují v rozmezí $328\text{--}1128\text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Schück 1997). Osmolalita moči závisí na zředovací a koncentrační schopnosti ledvin. Krajiní hodnoty osmolality při maximálním zředění nebo maximální koncentraci se pohybují v rozmezí $50\text{--}1200\text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$.

5.3 Odběr moči

K vyšetření je možné použít buď vzorek první ranní moče, náhodný vzorek nebo vzorek moče sbírané po určitou dobu. Před odběrem jednorázového vzorku moče je důležité zajistit hygienickou očistu genitálu v rámci běžné hygieny. Následuje odběr ze středního proudu moče. Vzorek moče je nutné do laboratoře dopravit co nejdříve po odběru (především kvůli morfologickému vyšetření močového sedimentu, aby nedošlo k rozpadu buněčných součástí moče).

5.4 Chemické a morfologické vyšetření moče

5.4.1 Chemické vyšetření moče

Chemické vyšetření moče je cenným orientačním vyšetřením, které je logicky svázáno s morfologickým hodnocením složek močového sedimentu. Chemická analýza moče se provádí s využitím testovacích (diagnostických) proužků na principu suché chemie. Na jednotlivé plošky (reagenční zóny) např. filtračních papírků, které jsou ukotveny na polymerním nosiči, jsou nanášena indikační analytická činidla a šetrně vysušena. Po kontaktu se vzorkem moči dojde k reakci, která vede ke změně zbarvení. Tato změna je dnes již obvykle vyhodnocena automatickým analyzátořem na principu reflexní fotometrie. Nicméně dnes stále ještě, například

v ordinacích praktických lékařů, jsou barevné změny reagenčních zón hodnoceny vizuálně porovnáním s barevnou škálou vytištěnou na tubě diagnostických proužků. Obvykle se vyšetřuje okolo 10 základních parametrů (leukocyty, nitrity, glukosa, ketolátky, specifická hmotnost, pH, proteiny, erytrocyty, hemoglobin, bilirubin, urobilinogen). Principy některých indikačních reakcí udává Tabulka 5.2.

Tabulka 5.2: Přehled principů parametrů vyšetřovaných chemicky v moči

Detekční zóna	Fyziologicky	Princip reagenční zóny
pH	5–6	směsný acidobazický indikátor (pH 5-9)
proteiny	0	indikátor reaguje hlavně na albumin
glukóza	0	glukózaoxidáza/peroxidáza → chromogen
ketolátky	0	citlivější na kyselinu acetocetovou než na aceton
urobilinogen	0	specifický na UBG a sterkobilinogen
bilirubin	0	azokopulace (totéž u UBG)
erytrocyty	0	peroxidázová aktivita Hb → oxidace indikátoru
hemoglobin	0	(týká se Hb z rozpadlých erytrocytů)

Výsledky chemického vyšetření jsou vydávány v arbitrárních jednotkách (arb.j., semikvantitativní hodnocení), přičemž každá arbitrární jednotka odpovídá určitému koncentračnímu rozmezí, které je vyjádřeno v jednotkách SI (př. Glukóza = 1 arb.j. = 9,7 – 20,8 mmol/L). Pro hodnocení se využívá škála od 0 až po 4 arb.j., kdy 0 arb.j. znamená negativní nález a 4 arb.j. masivní nález dané látky v moči, viz Tab. 5.3.

Tabulka 5.3: Výsledky chemického vyšetření jednotlivých složek moče udávané v arbitrárních jednotkách a jejich příslušná rozmezí

Krev (ery, Hb)		Bilirubin	Urobilinogen	Ketolátky
Arb. j.	SI jednotky	SI jednotky	SI jednotky	SI jednotky
0	negativní	negativní	(3,2) negativní	negativní
±	4-10 ery/μl		(16) 4-18 umol/L	0,4-0,9 mmol/L
1	10-50 ery/μl	cca 29-40 umol/L	(33) 118-40 umol/L	0,9-2,7 mmol/L
2	50-150 ery/μl	cca 40-100 umol/L	(66) 40-96 umol/L	2,7-6,1 mmol/L
3	> 150 ery/μl	cca > 100 umol/L	(131) ≥ 96 umol/L	> 6,1 mmol/L
4	-	-	-	-
Glukóza		Bílkoviny	Leukocyty	Nitrity
Arb. j.	SI jednotky	SI jednotky	SI jednotky	SI jednotky
0	negativní	negativní	negativní	negativní
±	4,1-9,7 mmol/L	0,15-0,25 g/L	6-30 leuko/μl	pozitivní
1	9,7-20,8 mmol/L	0,25-0,65 g/L	30-100 leuko/μl	pozitivní
2	20,8-41,6 mmol/L	0,65-2,0 g/L	100-250 leuko/μl	pozitivní
3	≥ 41,6 mmol/L	2,0-6,5 g/L	≥ 250 leuko/μl	pozitivní
4	-	≥ 6,5 g/L	-	pozitivní

K základnímu chemickému vyšetření lze využít diagnostické proužky např. PHANY. Počet detekčních zón je na různých PHANEch odlišný (tj. různými proužky lze stanovit jiný počet látek v moči): např. GlukoPHAN s jednou reakční zónou lze využít ke stanovení přítomnosti glukózy v moči, HeptaPHAN stanoví najednou 7 různých analytů, obsahuje totiž reagenční zóny na vyšetření pH, přítomnosti bílkovin, glukózy, ketolátek, urobilinogenu, bilirubinu, krve a hemoglobinu.

Ověření přítomnosti některých složek v moči s využitím chemických činidel

Pro ověření množství **bílkovin** v moči lze využít 20 % roztok kyseliny sulfosalicylové. 2 ml moče ve zkumavce se převrství 10 kapkami 20 % roztoku kyseliny sulfosalicylové a hodnotí se zákal roztoku proti bílému pozadí.

Výsledek se hodnotí: *bez zákalu = 0; zákalem lze číst = 1; zákalem nelze číst = 2; mléčný zákal, ev. vločky = 3; tvarohovitá sraženina = 4.*

Pro ověření přítomnosti **bilirubinu** se využívá Rosinova zkouška, kdy se 2 ml moče převrství 1 % roztokem jódu v etanolu. Přítomnost je prokázána vznikem zeleného prstence biliverdinu.

Pro ověření přítomnosti **žlučových kyselin** se volí Ehrlichovo činidlo, kdy v silně kyselém prostředí HCl reaguje s Ehrlichovým činidlem řada látek obsažených v moči, přičemž vzniká červené zbarvení. Vedle urobilinogenu způsobuje zbarvení sterkobilinogen, indol, některé léky, jako jsou sulfoamidy. V přítomnosti bilirubinu někdy vznikne po přidání činidla zelené zbarvení. Žlutá až oranžová sraženina svědčí o přítomnosti sulfoamidů. K 5 ml chladné moče se přidá 5 kapek Ehrlichova činidla a hodnotí se zbarvení.

5.4.2 Morfologické hodnocení složek močového sedimentu

Močový sediment se vyšetřuje mikroskopicky na automatických analyzátoch (z nezahuštěného i zahuštěného vzorku, záleží na typu analyzátoru) či manuálně (ze vzorku 10x zahuštěného centrifugací a běžně je toto vyšetření spojeno současně s chemickým vyšetřením moči). Vzorek moče by neměl být starší 1-2 hodin (elementy přítomné v moči se rozpadají). Hodnotí se přítomnost a počet erytrocytů, leukocytů, epitelí a jejich typů, bakterií, kvasinek, hleny a případných válců. Dále se uvádí přítomnost a množství nalezených krystalů. Morfologické hodnocení složek močového sedimentu automatickým analyzátoch je interpretováno v případě některých elementů (erytrocyty, leukocyty atd.) jako počet v 1 mikrolitru moče = kvantitativní vyhodnocení. U jiných elementů, např. u krystalů, hleny, dlaždicovitých epitelí, atd., je výsledek udáván v arbitrárních jednotkách = semikvantitativní vyhodnocení. V případě některých poloautomatických analyzátoch, kde je automatické chemické vyšetření spojeno s manuální mikroskopií je výsledek počtu elementů (erytrocyty, leukocyty atd.) vydáván jako interval rozsahu počtu elementů v 1 μ L vyšetřovaného vzorku sedimentu.

Složky močového sedimentu lze rozdělit na orgánové a neorgánové.

Orgánovou část tvoří buňky, jež jsou většinou dvojího původu, a to buňky krevní a buňky pocházející z ledviny či z vývodných močových cest. V moči se mohou objevit prakticky všechny krevní elementy: erytrocyty, neutrofilové, eozinofily, makrofágy a vzácně i lymfocyty. Buňky v močovém sedimentu pocházející přímo z ledvin jsou odloupané epitelie vystylající močové ústrojí, např. renální tubulární epitelie, přechodné epitelie, dlaždicové epitelie. V normální moči zdravého pacienta lze obvykle nalézt, kromě několika málo erytrocytů a leukocytů (viz Tab 5.4), jen několik dlaždicovitých epitelí. Nález ostatních typů, zejména renálních tubulárních buněk, obvykle značí významné poškození ledvin. Ve vzorku močového sedimentu však lze nalézt ještě celou řadu dalších buněk: trichomonády, kvasinky, střevní epitelie nebo nádorové buňky.

Další orgánovou složkou jsou válce tvořené glykoproteinem (Tamm-Horsfallův protein) chránícím povrch tubulu. Formují se v distálních partiích nefronu a jejich tvar kopíruje rozměr tubulů – široké válce – patologicky dilatované tubuly. K tomuto glykoproteinu se mohou vázat leukocyty, erytrocyty, epitelální buňky či bakterie. Malé množství hyalinních válců je fyziologické, nicméně větší množství může být ukazatelem nespecifického onemocnění ledvin. Nález voskových válců ve vzorku moče znamená stázi moče v tubulech a lze je označit za válce „chronického renálního selhání“.

*Složky neorgánové jsou krystaly solí, např. oxaláty, uráty, fosforečnany. Mají patologický význam v případě, že se jejich nález potvrdí u pacientů v současnosti nebo v minulosti léčených pro urolitiázu. V močovém sedimentu lze detekovat také krystaly malých aminokyselin: cystinu, leucinu, tyrosinu. Urolitiáza (řec. *lithos* = kámen) je onemocnění projevující se tvorbou močových kamenů. Močové kameny nejčastěji tvoří oxalát vápenatý, fosforečnan vápenatý nebo amonný nebo uráty.*

Nejčastější barvení mokrého nefixovaného preparátu močového sedimentu (dle Sternheimera), kde některé elementy stále dožívají (supravitální barvení), v praxi probíhá pomocí barviček alcianové modři a pyroninu B. Pomocí barvení jsou v preparátu viditelné detaily močových elementů, a ty jsou tudíž lépe rozlišitelné. Alcianová modř má silnou afinitu k mukopolysacharidovým složkám buněčných i jaderných membrán, močovému hleny a Tamm-Horsfallovu mukoproteinu a barví složky modře. Pyronin B je červené barvivo a barví ostatní složky (matrix voskových válců, cytoplasmu buněk atd.). Barvení preparátů se stále využívá u močových sedimentů, kde je sporný, nejasný nález některých přítomných složek, zejména u dětských pacientů.

Tabulka 5.4: Číselné rozsahy počtu orgánových elementů na 1 μ l moče – manuální mikroskopie.

ANALYT	interval	interval	interval	interval	interval	záplava
Erytrocyty (10⁻⁶) L	0 - 5	6 - 25	26 - 50	51 - 250	> 250	*Záplava (nelze kvantifikovat)
Leukocyty (10⁻⁶) L	0 - 10	11 - 50	51 - 100	101 - 250	> 250	*Záplava (nelze kvantifikovat)
Shluky leukocytů (10⁻⁶) L	0 - 5	6 - 10	10 - 20	> 20		
Válce hyalinní (10⁻⁶) L	0	1 - 4	5 - 10	11 - 20	> 20	
Válce granulované a jiné válce (10⁻⁶) L	0	1 - 4	5 - 10	11 - 20	> 20	
Epitele dlaždicové (10⁻⁶) L	0 - 15	16 - 50	51 - 100	101 - 200	> 200	
Epitele přechodné (10⁻⁶) L	0 - 15	16 - 50	51 - 100	101 - 200	> 200	
Epitele renální (10⁻⁶) L	0 - 1	2 - 4	5 - 10	11 - 20	> 20	

V dřívějších dobách se močový sediment počítal v buňkách na zorné pole mikroskopu, dnes se používá hodnocení v arbitrárních jednotkách nebo v počtech elementů (popř. intervalech) na 1 μ L vyšetřovaného vzorku sedimentu, které je ze všech tří způsobů nejpřesnější.

Vyšetření moče s využitím automatických analyzátorů

V laboratorních podmínkách je dnes již proces chemického a morfologického vyšetření moče často automatizován. Po vložení dobře promíchaných vzorků do analyzátoru probíhá vždy nejprve chemické stanovení, poté morfologické vyhodnocení. Automatická analýza močí přináší rychlejší a objektivnější hodnocení vyšetřovaných vzorků, také je zajištěn vhodný stupeň standardizace daného vyšetření. Nicméně umožnění přímého ověřování výsledků z analyzátoru erudovaným pracovníkem a případné přeřazení elementů při morfologickém hodnocení složek do jiné kategorie je stále velkou výhodou. Zejména v laboratořích velkých nemocnic, kde je možné se setkat s velmi rozmanitými močovými nálezy dle diagnóz pacientů.

Chemická analýza probíhá automatickým pipetováním vzorků moče na jednotlivé reagenční zóny testacích proužků (uloženy v zásobníku) a po změně zbarvení se reflexní fotometrií vyhodnotí jednotlivé výsledky. Analyzátoři měří i barvu, zákal a specifickou hmotnost.

Automatické morfologické hodnocení močí může být založeno na principu fluorescenční průtokové cytometrie, automatické digitální průtokové mikroskopie, či na automatické analýze močového sedimentu. V prvních dvou případech je využíván vzorek nativní, necentrifugované moče. Automatická analýza močového sedimentu probíhá nejčastěji v malé kyvetce, kde je moč centrifugací zahuštěna. Následně je pomocí zabudovaného mikroskopu provedeno několik snímků, které jsou automaticky softwarově vyhodnoceny. Na trhu existuje více typů analyzátorů s mnoha výhodami, ale i nevýhodami. Automatické analyzátoře močí jsou velkým pomocníkem zejména velkých laboratoří, nicméně je stále důležité mít na paměti, že při nejasných výsledcích má stále přednost klasická mikroskopie před automatickým hodnocením složek sedimentu. Hodnocení močí také vyžaduje vhodně erudovaný personál laboratoří.

Další doporučené zdroje k této kapitole:

1. Jabor A. a kol. Vnitřní prostředí. Praha: Grada 2008.
2. Manuál: Diagnostické proužky PHAN, Lachema, Brno, 1996.
3. Racek J., Rajdl D. et al.: Klinická biochemie. 3. přepracované vydání. Praha: Galén 2021.
4. Masopust J. Klinická biochemie: Požadování a hodnocení biochemických vyšetření. Praha: Karolinum, 1998.
5. Nejedlý B., Tobiška J., Zahradníček Z. Základní a morfologické vyšetření moče, MZ ČSR.
6. Silbernagl S., Despopoulos A. Atlas fyziologie člověka. 6. vydání. Praha: Grada 2004.
7. Teplan V. Praktická nefrologie. Praha: Grada 1999.
8. Kouri TT, Hofmann W, Falbo R, Oyaert M, Schubert S, Gertsen JB, Merens A, Pestel-Caron M; Task and Finish Group for Urinalysis (TFG-U), European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). The EFLM European Urinalysis Guideline 2023. Clin Chem Lab Med. 2024 Jun 5;62(9):1653-1786. doi: 10.1515/cclm-2024-0070. PMID: 38534005.
9. Vylučovací soustava a termoregulace. [Online], [Cit 5. března 2025]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/fsp/podzim2014/bp2156/Vylucovací_soustava_a_termoregulace.pdf

Shrnutí kapitoly

Ledviny představují nejdůležitější orgán v regulaci objemu a složení tělesných tekutin. Základní stavební jednotkou je nefron, který tvoří glomerul a tubul (proximální a distální propojené tenkou částí – *Henleovou kličkou*). Moč obsahuje organické (dusíkaté látky atd.) i anorganické složky (ionty). Při pouhém výskytu (bílkoviny) či při zvýšeném množství (glukóza, ketolátky) některých látek v moči dochází ke vzniku poruch (proteinurie, glykosurie, ketonurie atd.) spojených s vylučováním těchto látek močí. Ledviny se podílejí také na udržení osmolality vnitřního prostředí organismu. Osmolalita moče se pohybuje v rozmezí 300–900 mmol.kg⁻¹ a měří se nejčastěji kryoskopicky. Pro vyšetření moči chemicky a mikroskopicky se využívá vzorek první ranní moče a je nutné jej stanovit nejpozději do 2 hodin od odběru. Chemické vyšetření moče se provádí pomocí diagnostických proužků (PHANů), kde se nejčastěji semikvantitativně hodnotí pH, přítomnosti bílkovin, glukózy, ketolátek, urobilinogenu, bilirubinu, krve a hemoglobinu. Existují i zkoušky s využitím chemických činidel pro ověření přítomnosti bílkoviny, bilirubinu či žlučových kyselin. Mikroskopické vyšetření moče lze provést jak manuální mikroskopií, tak s využitím automatického analyzátoru. Hodnotí se množství orgánových (krevní elementy, epitelie, válce, další buňky) a neorganických (krystaly solí – uráty, oxaláty, fosforečnany atd.) složek močového sedimentu na 1 μl moče.

Otázky úkoly:

1. Vysvětlete základní fyziologické funkce ledvin.
2. Popište stavbu nefronu.
3. Popište správný odběr moče.
4. Jaké je základní složení moče?
5. Co je to proteinurie, glykosurie, ketonurie?
6. Jak lze vypočítat osmolalitu moče? Jak se měří?
7. Co je myšleno chemickým vyšetřením moče?
8. Jaký je princip stanovení glukózy s využitím diagnostických proužků?
9. Jak stanovíte bílkovinu v moči s využitím chemického činidla?
10. Které orgánové součásti močové lze nalézt v močovém sedimentu?
11. Je výskyt válců v močovém sedimentu fyziologickým úkazem? Pokud ne, na jaké onemocnění ukazuje.
12. Co je to urolitiáza?

6 BÍLKOVINY KREVŇÍ PLAZMY

V této kapitole se dozvíte:

Následující kapitola podává základní informace o bílkovinách krevní plazmy a intersticiální tekutiny, metodách stanovení plazmatických bílkovin, funkcí a klinickém významu jednotlivých bílkovin.

Klíčová slova této kapitoly:

Bílkoviny krevní plazmy, elektroforéza, alfa1-, alfa2-, beta- a gama-globuliny, proteiny akutní fáze.

Čas potřebný k prostudování učiva kapitoly: 6 hodin (teorie + řešení úloh)

6.1 Úvod do problematiky

V laboratorní terminologii se pojmem celková bílkovina rozumí velká skupina všech proteinů krevní plazmy a intersticiální tekutiny. Jde o více než 100 strukturně známých proteinů lišících se molekulovou hmotností, vlastnostmi, distribucí i biologickou funkcí. Největší podíl na syntéze těchto proteinů mají játra, významně se na ní podílí také lymfocyty. Denní obrat činí přibližně 25 g. Pro syntézu je nezbytný dostatečný přísun proteinů v potravě jako zdroje aminokyselin (zvláště esenciálních). Syntéza se reguluje hormonálně. Produktem odbourávání jsou aminokyseliny, které se opětovně využívají pro syntetické reakce (tvorba nových proteinů, syntéza různých nízkomolekulárních dusíkatých látek) nebo jsou dále odbourávány. Konečným produktem degradace proteinů je močovina, která se z těla vylučuje převážně močí. Malé množství proteinových molekul je z těla vylučováno přímo močí a stolicí.

Před studiem další části této kapitoly si zopakujte:

- 1) Co jsou to aminokyseliny.
- 2) Jak vznikají bílkoviny.
- 3) Strukturu bílkovin.
- 4) Fyzikální a chemické vlastnosti bílkovin.

6.1.1 Chemická a fyzikální charakteristika, struktura a povaha analytu

V krevní plazmě lze prokázat stovky různých bílkovin, které se liší velikostí molekuly, fyzikálně-chemickými vlastnostmi, distribucí, biologickým poločasem a funkcí. Z analytického hlediska řadíme do této skupiny pouze proteiny, které nalzáme v krevním séru / plazmě ve významnějších koncentracích (řádově mg/L až g/L): transportní proteiny, proteiny akutní fáze, antiproteázy, imunoglobuliny, komplement a lipoproteiny. Ostatní proteiny, jako jsou enzymy, hormony, koagulační faktory a buněčné proteiny uvolňované z poškozených tkání, se na celkové hmotnostní koncentraci podílejí jen nepatrně.

Strukturně jde o makromolekulární látky tvořené polypeptidovým řetězcem složeným ze 100 a více aminokyselin, relativní molekulová hmotnost proteinu bývá vyšší než 10 000. Většina proteinů je glykosylována, jde tedy převážně o glykoproteiny.

Hodnota fyziologického pH je vyšší než je pI (izoelektrický bod) většiny proteinů. Výsledkem je záporný náboj těchto proteinů, plazmatické proteiny proto řadíme mezi anionty. V závislosti na pH okolí mohou proteiny na své funkční skupiny proton vázat nebo uvolňovat, působí tedy jako pufrы.

Na základě různého náboje a velikosti molekuly lze směs proteinů dělit pomocí elektroforézy. Elektroforetickým dělením proteinů krevního séra na agaróze nebo na acetylcelulóze tak získáme 5–6 frakcí: albumin, alfa1-, alfa2-, beta- (beta1- a beta2-) a gama-globuliny. Kromě frakce albuminu obsahují ostatní globulinové frakce vždy více než jeden protein, který se významně podílí na zbarvení příslušné elektroforetické zóny.

6.1.2 Role v metabolismu

Mezi hlavní funkce proteinů tělních tekutin patří:

- 1) udržení koloidně-osmotického (onkotického) tlaku krve, který přispívá k uchování tekutin v krevním řečišti; největší podíl na onkotickém tlaku krevní plazmy má albumin, neboť má poměrně malou molekulu a je v plazmě ze všech proteinů v největší koncentraci (asi 60 %),

- 2) pufrací schopnost (udržování pH v úzkém rozmezí), která je dána amfoterním charakterem molekul proteinů; plazmatické proteiny tvoří 7 % pufrací kapacity krve,
- 3) antioxidační působení některých proteinů (albumin, ceruloplazmin, hemopexin, haptoglobin) – ochrana před volnými radikály, resp. zábrana jejich tvorby,
- 4) transport mnoha látek, převážně metabolitů špatně rozpustných ve vodě,
- 5) obrana proti infekci – humorální odpověď na poškození organismu (proteiny akutní fáze, inhibitory proteáz, komplement, protilátky),
- 6) enzymová aktivita (kromě sekrečních enzymů se v tělních tekutinách nacházejí i enzymy buněčné, které zde neplní katalytickou funkci; jde o enzymy uvolněné z buněk při jejich běžném obratu, případně při poškození),
- 7) hemokoagulace a fibrinolýza (koagulační faktory a faktory zajišťující rozpouštění trombu; v plazmě jsou v neaktivní formě, po aktivaci se část z nich mění na proteolytické enzymy).

6.1.3 Zdroj (syntéza, příjem)

Optimální příjem proteinů potravou je 1,0 – 1,5 g/kg/den. Tyto proteiny jsou, v převážné většině, před vstřebáním do krve zcela rozloženy trávicími proteolytickými enzymy na aminokyseliny. Jsou tedy pouze zdrojem aminokyselin pro syntézu proteinů těla vlastních. Významný je především přísun esenciálních aminokyselin. U kojenců se vstřebává též malé množství nerozložených bílkovin (endocytózou), schopnost jejich resorpce se však s věkem snižuje.

Většina proteinů, přítomných v rovnovážných koncentracích v krevní plazmě a intersticiální tekutině, se syntetizuje v játrech. Játra mají významnou rezervní proteosyntetickou kapacitu, např. pro albumin trojnásobnou, pro fibrinogen šestnásobnou. Přechod jednotlivých proteinů přes hepatocyt z místa syntézy do krve trvá 30 minut až několik hodin. Některé proteiny produkují také periferní tkáně (např. alfa1-antitrypsin v hepatocytech, alveolárních makrofázích a monocytech), jiné dokonce všechny jaderné buňky (např. protein buněčného povrchu beta2-mikroglobulin). Imunoglobuliny jsou syntetizovány pouze v plazmatických buňkách. Denní obrat plazmatických proteinů je okolo 25 g.

6.1.4 Distribuce v organismu, obsah ve tkáních

Za fyziologických podmínek jsou jednotlivé proteiny v rovnovážné koncentraci mezi plazmou a intersticiální tekutinou. Míra prostupu kapilární stěnou závisí na velikosti proteinu – bazální membrána působí jako molekulové síto. Malé proteiny procházejí snadněji, proteiny o velké molekule nacházíme naopak ve vyšších koncentracích v plazmě. Do mezibuněčného prostoru se proteiny dostávají pinocytózou přes endotelové buňky, nebo mezibuněčné spoje.

Do moče se glomerulární filtrací dostávají jen malé proteiny (hraniční velikost je přibližně M_r 70 000, ale záleží také na náboji molekuly – záporně nabitě látky neprocházejí díky zápornému náboji glomerulární membránou). Filtrát krevní plazmy obsahuje malé množství albuminu, zhruba stejné množství tzv. mikroproteinů a stopy proteinů o vyšší molekulové hmotnosti. Proteiny jsou však z primárního filtrátu ve velké většině zpětně resorbovány. Množství proteinů přítomné v moči (proteinurie) nepřesahuje u zdravého člověka 150 mg/den.

Koncentrace proteinů v likvoru (proteinorachie) je za fyziologických podmínek 200krát nižší než v plazmě: 150-400 mg/L, stoupá s věkem. 80 % proteinů má plazmatický původ, přes hematoencefalickou bariéru se dostávají pinocytózou a různými specifickými přenašeči. Míra transportu závisí na velikosti molekuly, náboji, koncentraci v plazmě a stavu bariéry. Zbývajících 20 % tvoří proteiny intratekální (imunoglobuliny, beta2-mikroglobulin) + modifikované plazmatické proteiny (prealbumin, transferin) a malé množství (2 %) strukturních bílkovin.

Proteiny se nacházejí také v lymfě, jejich koncentrace je nižší než v plazmě a závisí na oblasti, odkud lymfa odtéká: kosterní sval, kůže (20 g/L), plíce (40 g/L), zažívací trakt (41 g/L), srdce (44 g/L), játra (62 g/L).

Za patologických situací nalézáme plazmatické proteiny i ve výpotku: transsudát¹ obsahuje méně než 30 g/L, exsudát² více než 30 g/L. Tento fakt lze využít k diferenciaci mezi těmito tekutinami.

¹ Tekutina nezánetlivého původu = ultrafiltrát krevní plazmy, svým složením podobný plazmě, nicméně obsahuje nízkou koncentraci bílkovin a látek bílkovinné povahy;

² Tekutina zánětlivého původu, tvoří se v tělesných dutinách, např. pohrudniční (hydrothorax), kloubní aj. Bývá zkalenější, obsahuje více bílkovin

6.1.5 Katabolismus a způsob vylučování

Proteiny jsou z těla částečně vylučovány v nezměněné podobě močí (150 mg/den) a stolicí (po difúzi do gastrointestinálního traktu). Převážně však probíhá jejich odbourání na aminokyseliny. Z uvolněných aminokyselin se 75-80 % opět využije k proteosyntéze. Zbývající aminokyseliny se dále použijí jako substráty pro syntézu mnoha dusíkatých látek, ale také např. i glukózy, nebo se dále odbourávají až na CO₂, vodu a amoniak. Ten je pro organismus toxický, proto se ve velké většině dále v játrech přeměňuje na močovinu, která se vylučuje močí. Katabolismus proteinů probíhá ve všech buňkách, hlavní podíl na odbourávání však mají hepatocyty, tubulární buňky ledvin a endoteliální buňky kapilár. Glykoproteiny jsou nejprve desialovány membránově vázanými nebo cirkulujícími enzymy. Takto pozměněné proteiny jsou rozpoznány povrchovými receptory buněk a následně pinocytózou transportovány do buňky a degradovány lyzozomálními enzymy (katepsiny).

Výbava jednotlivých buněk pro vychytání proteinů z tělních tekutin je různá: jaterní sinusy nemají bazální membránu a mají fenestrované endotelie; tubulární buňky vychytávají proteiny z moče (z primárního filtrátu) pinocytózou; endoteliální buňky mají minimální kapacitu pinocytózy, ale velký katabolický potenciál z důvodu velkého kapilárního povrchu.

Rychlost katabolismu různých proteinů je různá a je popsána pomocí biologického poločasů. Dospělí degradují denně 1 – 2 % svých tělesných proteinů (hlavně svalové proteiny).

6.1.6 Biologický poločas

Pro různé proteiny je různý, pohybuje se v rozmezí několika hodin (proteiny akutní fáze) do několika týdnů (3 týdny pro albumin nebo IgG).

6.1.7 Kontrolní (řídící) mechanismy

Koncentrace proteinů v tělních tekutinách závisí na rychlosti syntézy, katabolismu, distribuci v kompartmentech a ztrátách do tzv. třetího prostoru (ascites, pleurální exsudát) nebo mimo organismus (proteinurie). Organismus se snaží udržet celkovou koncentraci proteinů v plazmě konstantní. Z toho důvodu se syntéza některých proteinů snižuje v případě, že se zvýší syntéza proteinů jiných (např. při zánětu vede zvýšení koncentrace proteinů akutní fáze a imunoglobulinů ke snížení koncentrace tzv. negativních proteinů akutní fáze).

Syntéza proteinů je regulována hormonálně, nebo produkcí různých cytokinů (např. syntéza proteinů akutní fáze). Významnou roli hraje dostupnost aminokyselin, tj. strava s dostatkem proteinů, které dodávají esenciální aminokyseliny. Glukagon a malnutrice (hlavně nedostatek tryptofanu) syntézu inhibuje. Naopak na stimulaci proteosyntézy v játrech mají vliv glukokortikoidy, růstový hormon, inzulin a thyroideální hormony.

Katabolismus proteinů může být ovlivněn defektem receptorů, které vychytávají proteiny určené k degradaci (např. v játrech při jaterní cirhóze) nebo zvýšenou sialilací některých proteinů, která vede ke sníženému vychytávání takových proteinů játry.

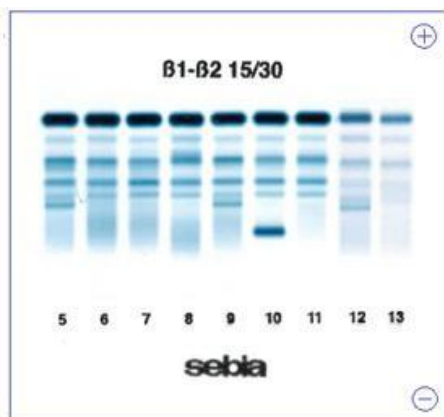
6.2 Metody vyšetřování plazmatických bílkovin

6.2.1 Stanovení koncentrace celkových bílkovin

Pro stanovení koncentrace sérových bílkovin se používá tzv. biuretová reakce, která je v současné době i referenční metodou. V principu jde o tvorbu červenofialového komplexu měďnatých kationtů s dusíkovými atomy peptidových vazeb v alkalickém prostředí. Intenzita zbarvení je úměrná počtu peptidových vazeb a relativně málo závisí na ostatních vlastnostech jednotlivých bílkovin. Falešně vyšší hodnoty naměříme u silně lipemických a silně hemolytických sér a při výrazné hyperbilirubinémii; falešně nižší hodnoty u výrazné hyperamonémie (kompetující reakce amoniaku s Cu²⁺ ionty). Pro stanovení o dva až tři řády nižších koncentrací bílkovin v moči a likvoru nelze tuto metodu použít; zde se využívají turbidimetrické reakce (měření zákalu vzniklého přidáním trichloroctové kyseliny nebo benzethoniumchloridu ke vzorku) nebo vazba různých barviv (pyrogallolová červeň/molybdenan, Coomassie modř) na bílkoviny vzorku. Tyto metody závisí již více na vlastnostech měřených bílkovin: vazba barviva na obsahu aromatických aminokyselin, turbidimetrické reakce na tvaru molekuly.

6.2.2 Elektroforéza sérových bílkovin

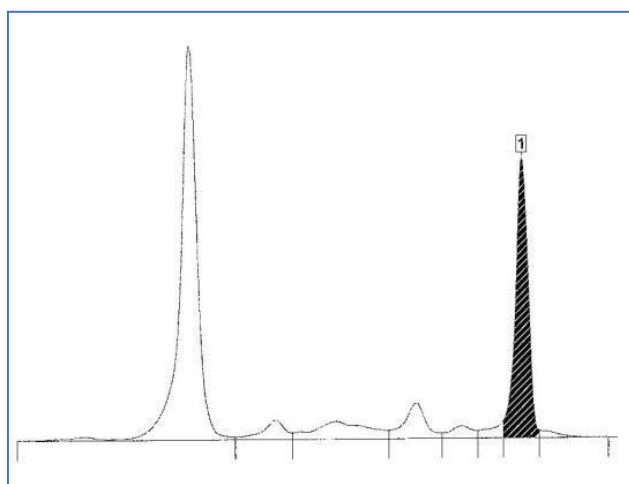
Metoda využívá rozdílné pohyblivosti bílkovin v elektrickém poli. V prostředí alkalického pufru migrují bílkoviny od katody k anodě. Podle pohyblivosti lze rozlišit pět až šest frakcí: albumin, alfa1, alfa2, beta (často beta1 a beta2) a gama globuliny. Prealbumin migrující ještě rychleji, než albumin není běžně patrný anebo se nachází těsně nad albuminovou frakcí.



Obrázek 6.1: Elektroforéza sérových bílkovin. V pozici č. 10 je patrný výrazný gradient odpovídající monoklonálnímu imunoglobulinu; v pozicích č. 5, 9 a 12 lze pozorovat v beta2/gama-interzóně gradient odpovídající přítomnosti fibrinogenu (vzorek plazmy), (zdroj: Kušnierová – vlastní foto).

Elektroforéza má význam především jako levné screeningové vyšetření pro diagnostiku monoklonálních gamapatií. Poskytuje také celkový přehled o bílkovinném spektru a umožňuje usoudit na přítomnost akutního či chronického zánětu, hepatopatie nebo stavů spojených se ztrátou bílkovin (ledvinami, gastrointestinálním traktem).

Některá pracoviště dnes využívají techniky kapilární elektroforézy, při níž se bílkoviny separují ve velmi tenkých křemenných kapilárách od anody ke katodě podle své iontové pohyblivosti s využitím elektroosmotického toku a u katody jsou detekovány fotometricky v UV oblasti. Výhodou je možnost statimové analýzy; chybí však možnost přímého vizuálního hodnocení. Záznam elektroforeogramu s patrným monoklonálním imunoglobulinem gradientem znázorňuje obrázek 6.2.



Obr. 6.2: Elektroforeogram: zleva doprava albumin, alfa1, alfa2, beta1, beta2-globuliny, vysoký štíhlý pík paraproteinu (M-gradient) v zóně gama-globulinů (zdroj: Kušnierová – vlastní foto).

Ve skutečnosti se elektroforeogram při kapilární elektroforéze „vykresluje“ zprava doleva, tj. první jsou v popsaném uspořádání detekovány gama-globuliny a poslední albumin.

Zopakujte si principy dělení bílkovin elektroforézou a kapilární elektroforézou (zejm. pojem elektroosmotický tok) a uvědomte si, proč tomu tak je.

6.2.3 Stanovení koncentrace jednotlivých plazmatických bílkovin

Koncentrace specifických proteinů se měří imunochemickými metodami, tj. metodami využívajícími reakce příslušné bílkoviny se specifickou protilátkou. Pro většinu významných plazmatických bílkovin lze použít turbidimetrický nebo nefelometrický princip měření, který z klinických laboratoří zcela vytlačil dříve používanou radiální imunodifúzi. Pro bílkoviny přítomné ve velmi nízkých koncentracích se používají metody se značeným reaktantem (ELISA, RIA, chemiluminiscence, fluorescence). Výjimkou je stanovení albuminu v plazmě, pro které lze využít jednak výpočet z koncentrace celkové bílkoviny a relativního podílu albuminu na elektroforeogramu (ostatní bílkoviny takto stanovit nelze, protože frakce, v nichž na elektroforéze migrují, jsou tvořené více bílkoviny, které nelze navzájem rozlišit), jednak jednoduchou fotometrickou reakci založenou na vazbě barviva na albumin (bromkresolová zeleň, BCG; bromkresolový purpur, BCP) s následnou změnou jejich absorpčního maxima (komplex BCG-albumin anebo BCP-albumin poskytuje výrazné maximum při 630, resp. 600 až 605 nm).

Vyšetření plazmatických/sérových bílkovin pro potřeby klinické diagnostiky:

- 1) Stanovení koncentrace celkové bílkoviny.
- 2) Elektroforéza sérových bílkovin.
- 3) Kvantitativní stanovení specifických bílkovin imunochemickými metodami.

6.2.4 Přehled nejdůležitějších plazmatických bílkovin

Existuje více různých hledisek dělení bílkovin. Zvolíme přehled bílkovin podle elektroforetické pohyblivosti, od anodicky migrujících bílkovin, prealbuminu a albuminu přes alfa₁, alfa₂ a beta-globuliny až ke katodicky umístěným gama-globulinům, tj. imunoglobulinům. V návaznosti na imunoglobuliny probereme problematiku tzv. monoklonálních gamapatií. Dále uvedeme skupiny bílkovin se společnými znaky, tj. skupinu reaktantů akutní fáze, skupinu nízkomolekulárních bílkovin a skupinu enzymů. Problematika bílkovinných hormonů bude probrána v jiné kapitole.

Prealbumin a retinol vázající protein

Prealbumin (transthyretin – může vázat dvě molekuly thyroxinu nebo trijodthyroninu) se tvoří v játrech a v choroidálním plexu mozkových komor. Je částečně asociován s retinol vázajícím proteinem v poměru 1:1. Jedná se o neglykosylovanou tetramerní bílkovinu složenou ze čtyř identických podjednotek. Pro svůj krátký biologický poločas (48 hodin; retinol vázající protein 12 hodin) je citlivým markerem akutní malnutrice a stavu proteosyntézy.

Prealbumin patří k negativním reaktantům akutní fáze (viz níže). Jeho koncentrace klesá při zánětlivých a nádorových onemocněních, u jaterní cirhózy a při ztrátách bílkovin ledvinami nebo gastrointestinálním traktem. Retinol vázající protein je monomerní transportní protein pro all-trans retinol (forma vitamínu A). Je syntetizován v játrech a jeho sekrece z hepatocytu je stimulována vazbou retinolu. Tvorba komplexu s prealbuminem zabraňuje filtraci retinol vázajícího proteinu v glomerulech. Po uvolnění retinolu následuje disociace komplexu prealbuminu a retinol vázajícího proteinu, který je pak eliminován ledvinami. Zvýšené koncentrace retinol vázajícího proteinu nacházíme u pacientů s chronickým renálním onemocněním; snížené koncentrace u jaterních onemocnění a proteinové malnutrice.

Albumin

Je syntetizován výhradně v játrech, která disponují vysokou rezervní kapacitou v případě jeho zvýšené potřeby nebo ztrát. Jako jeden z mála plazmatických proteinů neobsahuje sacharidy. Při fyziologickém pH má záporný náboj. Díky vysoké koncentraci v plazmě se významně podílí na udržování koloidně-osmotického tlaku. Jedná se o kvantitativně nejdůležitější transportní bílkovinu v organismu. Vazba řady látek v krvi na albumin je podmíněna přítomností početných nabitých skupin, iontových i hydrofobních specifických vazebných míst. Zejména jde o nerozpustné látky (nekonjugovaný bilirubin, mastné kyseliny, hormony, léky). Hydrofilní látky mohou být na albumin vázány adsorpcí (např. Ca²⁺, Zn²⁺, kyselina močová). Transportní funkce albuminu je nespecifická, na rozdíl od specifických transportních bílkovin uvedených níže. Albumin se dále podílí na antioxidační aktivitě, za patologických stavů působí jako pufr a inhibuje produkci leukotrienů a aktinu. Albumin je negativním reaktantem akutní fáze, jeho koncentrace klesá v přítomnosti prozánětlivých cytokinů (TNF-alfa, IL-1, IL-6).

Alfa1-globuliny

Alfa1-lipoprotein (HDL) – viz příslušná kapitola

Orosomukoid (kyselý alfa1-glykoprotein, AAG)

Je syntetizován převážně v játrech, ale při septických stavech přispívá ke zvýšení plazmatické koncentrace významně syntéza v granulocytech a monocytech. Katabolismus se děje převážně vychytáváním desialovaného AAG jaterními receptory pro asialoglykoproteiny; zatímco biologický poločas intaktního AAG činí asi 3 dny, poločas desialovaného AAG je jen několik minut. AAG patří mezi lipokaliny, tj. bílkoviny vázající lipofilní látky. Jeho funkce není dosud plně známá; předpokládá se i jeho imunomodulační efekt, podmíněný patrně strukturou oligosacharidových řetězců molekuly AAG.

Alfa1-fetoprotein

Alfa1-fetoprotein zastává v případě plodu funkce albuminu, postnatálně jej nahrazuje albumin. AFP je významným markerem v prenatalní diagnostice (zvýšené koncentrace v amniové tekutině a také v séru matky u defektů neurální trubice, ale i u vícečetných těhotenství, snížené koncentrace u Downova syndromu – v této indikaci se dnes používá v rámci screeningu vrozených vývojových vad – „screening VVV“ v 2. trimestru – výhradně kombinované stanovení s beta-HCG a popř. ještě nekonjugovaným estriolem v séru matky, tzv. „tripletest“). U netěhotných dospělých může být AFP zvýšený v případě hepatocelulárního karcinomu a nádorů ze zárodečných buněk; anebo u pacientů s jaterní cirhózou či hepatitidou.

Alfa1-antitrypsin (Alfa1-inhibitor proteináz, AAT, alfa1-Pi)

Alfa1-antitrypsin je kvantitativně nejvýznamnější inhibitor proteináz v plazmě. Při jeho geneticky podmíněném významném snížení až chybění (genotypy PiZZ a Pi00) dochází k nedostatečné inaktivaci proteináz (elastázy v plicních sklípcích) uvolňovaných granulocyty a makrofágy při fagocytóze a proteolytickému rozrušení tkáně. To má za následek plicní emfyzém s poruchou ventilace a sklonem k těžkým infekcím dýchacích cest a často i poškození jater.

Alfa1-antichymotrypsin

Alfa1-antichymotrypsin je další proteinázový inhibitor; inhibuje katepsin G, chymasu žírných buněk a PSA (zvýšené koncentrace PSA navázaného na alfa1-antichymotrypsin nacházíme u pacientů s karcinomem prostaty).

Alfa2-globuliny

Alfa2-makroglobulin

Alfa2-makroglobulin (AMG) je další z proteinázových inhibitorů. Skládá se ze čtyř polypeptidových řetězců; aktivní jednotkou je dimer (tj. jedna molekula AMG může vázat dvě molekuly proteináz). Je syntetizován převážně hepatocyty. Biologický poločas intaktního proteinu činí několik dnů, ale po rozštěpení nitrořetězcové thioesterové vazby nebo po odštěpení kyseliny sialové je rychle (v řádu minut) vychytáván receptory na hepatocytech. Kromě hlavní funkce – inhibice proteináz – se AMG účastní transportu řady peptidů (cytokinů, růstových faktorů) a divalentních kationtů (zejména Zn^{2+}) a moduluje zánětlivé reakce.

Zvýšené koncentrace AMG nacházíme u nefrotického syndromu, u dětí jsou koncentrace vyšší než u dospělých a u žen v reprodukčním věku vyšší než u stejně starých mužů (estrogeny zvyšují syntézu AMG). Snížené koncentrace AMG nacházíme u pankreatitidy a u pokročilého karcinomu prostaty (AMG se váže na PSA a tento komplex je velmi rychle vychytáván játry).

Haptoglobin

Haptoglobin váže hemoglobin vzniklý při intravazální hemolýze; komplex je pak z krevního oběhu rychle vychytáván buňkami RES v játrech. Zabraňuje tak ztrátám hemoglobinu (Fe^{2+}) močí a vzniku nebezpečného hydroxylového radikálu, na němž se podílí volný hemoglobin.

Haptoglobin je citlivým markerem hemolýzy, při níž dochází k výraznému snížení jeho koncentrace až k nulovým hodnotám. Snížené koncentrace doprovázejí také poruchy proteosyntézy v játrech, u hepatitidy koreluje hladina haptoglobinu s tíží onemocnění. Zvýšené koncentrace nacházíme u reakce akutní fáze.

Ceruloplazmin

Hlavní úlohou ceruloplazminu je ferroxidázová aktivita (oxiduje Fe^{2+} na Fe^{3+} a zprostředkuje tak vazbu železa na transferin). Jedna molekula ceruloplazminu váže 6-8 atomů mědi, ale hlavní transportní bílkovinou pro měď je albumin.

Výrazně snížené koncentrace ceruloplazminu nacházíme u Wilsonovy nemoci (většinou $< 0,1$ g/L) a Menkesova syndromu. Druhotně mohou být koncentrace ceruloplazminu sniženy při ztrátách bílkovin a poruchách jejich syntézy (jaterní cirhóza). Zvýšené koncentrace nemají diagnostický význam; nacházíme je při zánětech a nádorech, v těhotenství nebo při užívání orálních kontraceptiv (vliv estrogenů) a u cholestázy.

Gc-globulin (group specific component, vitamin D vázající protein)

Gc-globulin je hlavní transportní bílkovinou pro vitamín D; další jeho funkcí je vychytávání aktinu uvolněného z buněk při jejich poškození. Koncentrace Gc-globulinu jsou poněkud vyšší u žen než u mužů, stoupají v těhotenství a klesají při akutním jaterním onemocnění a u závažných traumat.

Beta-globuliny

Transferin

Každá molekula transferinu má dvě vazebná místa pro železitý kationt (Fe^{3+}). Apo-transferin se syntetizuje především v játrech, syntéza stoupá při nedostatku železa v organismu. Transferin je nejdůležitější transportní prostředek pro železo z míst resorpce (tenké střevo) a odbourávání hemoglobinu do krvetvorných orgánů, kde se prostřednictvím receptoru váže na erytroblasty. Při nedostatku železa dochází ke stimulaci syntézy transferinového receptoru a ke zvýšení koncentrace solubilního transferinového receptoru v séru (sTfR). Koncentrace sTfR není ovlivněna reakcí akutní fáze, proto je sTfR cenným markerem pro odlišení anémie při deficitu železa od anémie chronických chorob.

Procentuální nasycení transferinu železem lze vypočítat podle vzorce:

$$\text{Saturace transferinu} = 3,98 * \frac{\text{Železo v séru } (\mu\text{mol/L})}{\text{Transferin v séru (g/L)}}$$

Fyziologicky je transferin nasycen železem asi z 1/3, neobsazená místa pro vazbu železa představují tzv. volnou vazebnou kapacitu.

U mužů alkoholiků se projevuje zvýšená koncentrace transferinu s nízkým obsahem cukerné složky (tzv. bezsacharidový transferin, carbohydrate-deficient transferrin, CDT), která se využívá pro odlišení alkoholiků.

Hemopexin

Hemopexin váže hem. Jeho pokles je méně citlivým ukazatelem hemolýzy než haptoglobin. Po vyčerpání kapacity haptoglobinu pro vazbu hemoglobinu cirkuluje zbylý hemoglobin v plazmě; zčásti je pak vychytáván jaterními buňkami, zčásti vylučován močí (hemoglobinurie) a zčásti oxidován na methemoglobin, z něhož snadno disociuje hem. Hem se může vázat na hemopexin a v této vazbě je transportován k jaterním buňkám. Hem se také může nespecificky vázat na albumin za vzniku methemalbuminu, z něhož může být „předán“ opět hemopexinu, jakmile je hemopexin k dispozici.

Koncentrace hemopexinu bývá snížena u hemoragické pankreatitidy a krvácení do tělesných dutin při současně normálních koncentracích haptoglobinu.

Beta-lipoprotein

Lipoprotein pohybující se v beta2 oblasti odpovídá lipoproteinu o nízké hustotě (LDL). *LDL (low density lipoproteins)* jsou hlavní lipoproteinové částice, které přenášejí cholesterol v krevní plazmě, pocházejí z katabolismu IDL a VLDL a jejich hlavní apoprotein je apoB-100. Největší část pochází z transformace VLDL, ale některé jsou syntetizovány přímo (zvláště u pacientů s familiární hypercholesterolemií). LDL mohou být

katabolizovány různými typy buněk (75 % játry), a to jak LDL-receptor dependentním mechanismem, tak mechanismy na těchto receptorech nezávislými (např. pomocí „scavenger“ receptorů).

C3 a C4 složky komplementu

Komplementový systém se skládá z přibližně 30 bílkovin, které lze rozdělit podle funkce do několika skupin:

1. bílkoviny klasické cesty (C1, C4, C2, C3)
2. bílkoviny alternativní cesty (C3, faktory B a D, properdin)
3. membránu atakující komplex (C5-C9)
4. inhibitory uvedených drah
5. buněčné receptory.

Hlavními funkcemi komplementového systému jsou:

- opsonizace (fragment složky C3, označovaný C3b, který se pevně váže na mikrobiální povrch)
- chemotaxe (fragmenty C3a a C5a)
- osmotická lýza (komplex C5b-C9, který se zanořuje do plazmatické membrány atakované buňky a vytváří v ní póry (většina mikroorganismů je však vůči tomuto lytickému působení komplementu chráněna buněčnou stěnou).

V klinické praxi se nejčastěji stanovují složky C3 a C4. Jejich koncentrace mírně stoupá při reakci akutní fáze, klesá při jejich aktivaci, resp. spotřebě u některých systémových autoimunitních onemocnění. C3 složka je v plazmě přítomná v nejvyšší koncentraci ze všech komponent komplementu. Syntetizuje se převážně v játrech; bakteriální endotoxin indukuje také syntézu v monocytech a fibroblastech. Rovněž C4 složka je syntetizována převážně jaterními buňkami, v malém množství jinými tkáněmi.

Fibrinogen

Fibrinogen je glykoprotein o molekulové hmotnosti 340 kDa. Při elektroforéze se pohybuje mezi beta a gama-globuliny. Jedná se o symetrický dimer, složený ze tří párů řetězců alfa, beta a gama.

Během hemokoagulace se působením proteolytického enzymu trombinu uvolňuje fibrinopeptid A a vzniká monomer fibrinu. Pak trombin odštěpuje fibrinopeptid B a dojde k polymerizaci monomeru fibrinu, které jsou příčně pospojovány aktivovaným koagulačním faktorem XIII za vzniku stabilního trombu.

Patří mezi pozitivní reaktanty akutní fáze zánětu. Jeho hladina stoupá během několika hodin po vzniku zánětu navozením zvýšené syntézy v játrech a během několika dní může dosáhnout několikanásobku vstupní hladiny. Vysoké koncentrace nacházíme např. u zánětlivých chorob pojiva. Fibrinogen představuje rizikový faktor aterosklerózy.

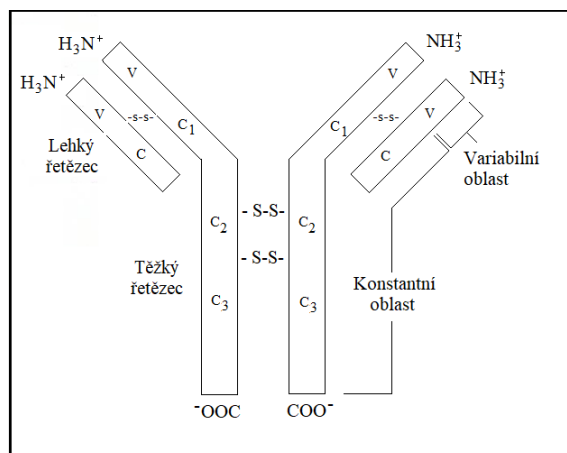
Pokles jeho koncentrace může být způsoben nedostatečnou syntézou u těžkých hepatopatií nebo zvýšenou spotřebou, např. při diseminované intravaskulární koagulopatii (DIC).

Gama-globuliny

Imunoglobuliny

Imunoglobuliny (protilátky) rozpoznávají antigen a iniciují mechanismy jeho zničení. Všechny imunoglobulinové molekuly se skládají ze dvou identických těžkých (H z angl. heavy) řetězců (alfa u IgA, delta u IgD, gama u IgG, mí u IgM, epsilon u IgE) a dvou identických lehkých (L z angl. light) řetězců (kappa nebo lambda). Každý z řetězců má konstantní část a část variabilní, která se účastní rozpoznání a vazby antigenu. Variabilní část těžkého i lehkého řetězce tvoří jediná doména; konstantní část lehkého řetězce rovněž tvoří jediná doména, ale konstantní část těžkého řetězce více domén. Lehký řetězec spolu s variabilní částí a první doménou konstantní části těžkého řetězce tvoří tzv. Fab fragment (ab znamená „antigen binding“, tj. fragment vázající antigen); další domény konstantních částí těžkých řetězců tvoří tzv. Fc fragment (c zde znamená crystallizable, tj. krystalizovatelný). Každá molekula imunoglobulinu má tedy dva Fab fragmenty a jediný Fc fragment. Na rozdíl od většiny plazmatických bílkovin, které jsou syntetizovány v játrech, jsou imunoglobuliny syntetizovány a secernovány plazmatickými buňkami.

Imunoglobuliny jsou glykoproteiny; oligosacharid se vždy váže na konstantní část těžkého řetězce (na řetězec gama se váže jeden oligosacharid, na ostatní typy H řetězců více molekul oligosacharidů).



Obrázek 6.3: Schematické znázornění molekuly imunoglobulinu (zdroj: Kušnierová – vlastní)

Imunoglobulin G (IgG)

Je kvantitativně nejvíce zastoupen (70-75 % celkových imunoglobulinů). Hlavní funkcí IgG je neutralizace toxinů v tkáních. Prochází fetoplacentární bariérou, a novorozenci tak mají vysokou koncentraci IgG, která postupně klesá a nejnižší koncentrace dosahuje mezi 3. – 6. měsícem věku. Vlastní IgG se začíná tvořit již před narozením. IgG se dělí do několika podtříd (IgG1–IgG4), které se liší zejména uspořádáním pantové oblasti.

Imunoglobulin M (IgM)

IgM je první imunoglobulin syntetizovaný v průběhu protilátkové odpovědi a také jediný imunoglobulin normálně syntetizovaný již u novorozenců. Existuje jako monomer vázaný na membránu, zatímco většina IgM přítomného v séru je pentamerem složeným z pěti monomerních imunoglobulinových jednotek spojených malým glykopeptidem, tzv. J řetězcem. IgM obsahuje asi 10 % sacharidů. Jeho velká molekulová hmotnost (M_r 900 000 pro pentamer) zabraňuje jeho úniku do extravaskulárních prostor. IgM účinně aktivuje komplement; tuto funkci zajišťuje Fc část molekuly.

Imunoglobulin A (IgA)

Představuje 10 – 15 % sérových imunoglobulinů. Většina IgA je přítomna jako monomer, ale 10-15 % sérového IgA je dimerem. Dimer je více odolný vůči destrukci patogenními mikroorganismy. Jinou formou IgA je tzv. sekreční IgA, přítomný v slizích, slinách, potu, mléce, kolostru a v sekretech dýchacích cest a trávicího traktu. Je syntetizován hlavně plazmocytů ve sliznicích střeva a bronchů a ve vývodech mléčné žlázy. Sekreční komponenta uděluje sekrečnímu IgA zvýšenou rezistenci k enzymům, což umožňuje ochranu sliznic před mikroorganismy. Jeho přítomnost v kolostru a mléce chrání novorozence před střevními infekcemi.

Imunoglobulin D (IgD)

Představuje méně než 1 % sérových imunoglobulinů. Je to monomer obsahující 12 % sacharidů. Je přítomen jako membránový receptor pro antigen na B lymfocytech.

Imunoglobulin E (IgE)

IgE obsahuje 15 % sacharidů. IgE molekuly se vážou na povrch žírných buněk (svou Fc oblastí). Dojde-li k vazbě antigenu (alergenu) a spojení dvou takto navázaných IgE molekul, žírné buňky jsou stimulovány k uvolnění histaminu a dalších vazoaktivních látek odpovědných za projevy alergických reakcí.

6.2.5. Volné lehké řetězce kappa a lambda

Lehké řetězce jsou součástí molekuly imunoglobulinů; fyziologicky jsou však produkovány v mírném nadbytku nad řetězci těžkými, a proto se nachází i v krevním séru. Zdá se, že mají určitý význam pro regulaci imunitní odpovědi. Při nádorových proliferacích vycházejících z plazmatických buněk můžeme najít v krevním séru výrazně

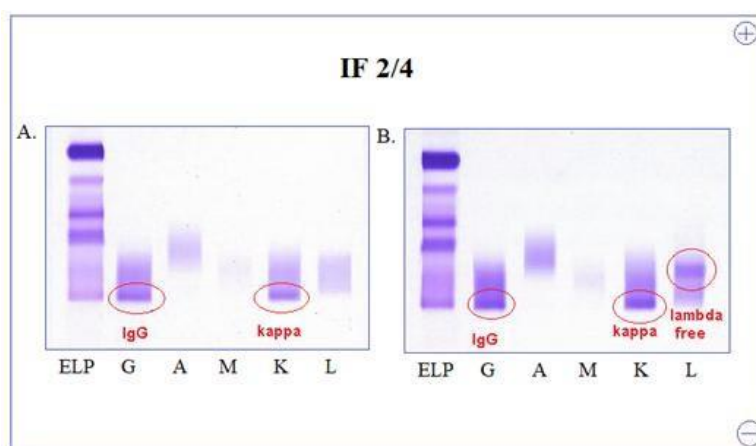
(až o několik řádů) zvýšené koncentrace volných lehkých řetězců jednoho typu; kromě absolutních koncentrací sledujeme také poměr (free kappa/free lambda) nebo rozdíl (diferenci) jejich koncentrací (free kappa – free lambda, nebo naopak). Jejich stanovení vyžaduje použití protilátky specifické proti tzv. skrytým determinantám, tj. determinantám „neviditelným“, je-li lehký řetězec vázán na těžký řetězec v kompletní imunoglobulinové molekule, je značně specifická. Volné lehké řetězce imunoglobulinů jsou považovány za cenný markerem v diagnostice i sledování léčebné odpovědi u pacientů s monoklonálními gamapatiemi, marker aktivity některých autoimunitních onemocnění (systémový lupus erythematosus, revmatoidní artritida, Sjögrenův syndrom aj.), jejich stanovení v mozkomíšním moku má význam v diagnostice neurologických onemocnění, zvláště roztroušené sklerózy.

6.3 Monoklonální gamapatie

Termín označuje přítomnost imunoglobulinů (popř. jejich fragmentů) produkovaných jedním patologicky zmnoženým klonem plazmatických buněk. Patří zde stavy jako monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS), mnohočetný myelom a řada dalších nádorových onemocnění.

Vzácně nacházíme monoklonální imunoglobuliny i u nenádorových onemocnění (AIDS, chronická hepatitida, cirhóza, revmatoidní artritida aj.); v části případů jde pravděpodobně o koincidenci s MGUS.

Screeningovým testem pro diagnostiku monoklonálních gamapatií je elektroforéza sérových bílkovin. Při nálezu monoklonálního gradientu se doplňuje imunofixační elektroforéza, kdy je přítomný anomální gradient typizován při reakci se specifickými antiséry proti těžkým a lehkým řetězcům imunoglobulinů (γ , α , μ , κ , λ , popř. δ , ϵ , anebo free κ , free λ), viz obrázek 6.4.



Obrázek 6.4: Výsledek imunofixační elektroforézy; A – monoklonální imunoglobulin IgG kappa; B – monoklonální imunoglobulin IgG kappa a monoklonální volné lehké řetězce lambda. (zdroj: Kušnierová – vlastní foto).

6.4. Polyklonální gamapatie

Zvýšené koncentrace polyklonálních imunoglobulinů nacházíme u onemocnění poжива, jater, chronických infekcí, lymfoproliferativních onemocnění i nehematologických malignit. Onemocnění kůže, plic a střev a také některé jaterní nemoci často provází zvýšená koncentrace IgA, zatímco systémové infekce vedou ke zvýšeným koncentracím všech imunoglobulinů, zejména IgG.

6.5 Reaktanty akutní fáze

Označujeme tak bílkoviny, jejichž koncentrace v plazmě se mění při akutním zánětlivém postižení. Dělíme je na pozitivní (CRP, SAA a další), jejichž koncentrace za těchto okolností stoupá, a negativní (prealbumin, albumin, transferin), jejichž koncentrace v séru naopak klesá.

C-reaktivní protein (CRP)

Název této bílkoviny se odvozuje od schopnosti vázat C-polysacharid buněčné stěny *Streptococcus pneumoniae*. Váže však různé polysacharidy na povrchu bakterií, hub a prvoků, ale také fosfatidylcholinu a polyaniony. Po vazbě dochází k aktivaci komplementu klasickou cestou. Hlavní úlohou CRP je rozpoznání potenciálně toxických látek uvolněných z poškozených tkání.

CRP je nejvýznamnějším pozitivním reaktantem akutní fáze vzhledem ke snadné dostupnosti jeho stanovení a rychlému vzestupu koncentrace (do 24-48 hodin). Jeho koncentrace stoupají u bakteriálních infekcí, ale také po infarktu myokardu, traumatech, chirurgických výkonech a při nádorových onemocněních.

Sérový amyloid A (SAA)

SAA je protein o celkové M_r 220 000 – 235 000, složený z monomerů o M_r 12 500. Většinou je navázán na HDL lipoproteiny. Jde o skupinu malých lipoproteinů, které při akutní infekci vychytávají lipidové zbytky buněčných membrán, a má tak pozitivní účinek; naopak u chronických zánětů může prekursorový protein SAA vytvářet nerozpustná depozita v orgánech, a podílet se tak na vzniku sekundární amyloidózy. Sérová koncentrace SAA se zvyšuje rovněž u některých maligních nádorů a stoupá s progresí onemocnění.

Prokalcitonin (PCT)

Prokalcitonin se zvyšuje v plazmě při bakteriálních infekcích, při sepsi a multiorgánovém selhání. Hlavním stimulem jsou bakteriální endotoxiny. Zvýšení v plazmě nastává po 2 hodinách, jasně zvýšené koncentrace jsou 6-8 hodin a zůstávají zvýšené po dobu 72 hodin.

Feritin

Feritin je především zásobní bílkovinou pro železo; jedna molekula apoferitinu může vázat až 4500 atomů železa (Fe^{3+}). Protože je současně pozitivním reaktantem akutní fáze, zmiňujeme jen i na tomto místě.

6.6 Některé nízkomolekulární bílkoviny

Nyní probereme stručně některé významnější nízkomolekulární bílkoviny. Obecným znakem nízkomolekulárních bílkovin je vzestup sérové koncentrace při poklesu glomerulární filtrace, uplatňují se tedy jako markery renálního onemocnění a jako takové jsou probrány v příslušné kapitole. Zde zmíníme nejvýznamnější z nich.

Beta2-mikroglobulin

Beta2-mikroglobulin je jednoduchý neglykosylovaný polypeptid tvořený 100 aminokyselinami s jedním disulfidickým můstkem o M_r 11 800. Je součástí HLA systému na povrchu buněk. Plazmatický beta2-mikroglobulin produkují hlavně myeloidní a lymfoidní buňky. Využívá se tak jako tumorový marker odrážející proliferaci buněk tohoto původu.

Volně prochází plně funkčním glomerulem. V moči roste jeho hladina při lézi tubulárních buněk, hladina v séru stoupá s poklesem glomerulární filtrace. Dlouhodobě zvýšená koncentrace beta2-mikroglobulinu v séru, např. u dialyzovaných pacientů, může být příčinou sekundární amyloidózy.

Cystatin C

Cystatin C je protein z rodiny inhibitorů cysteinových proteáz, filtrovaný glomeruly a plně reabsorbovaný tubuly ledvin, vhodný pro posuzování glomerulární filtrace. Cystatiny mají evoluční a funkční vztah k serinovým proteázovým inhibitorům. Cystatin C, který je především předmětem zájmu klinických biochemiků, patří do cystatinové rodiny II., která je tvořena skupinou extracelulárních inhibitorů cysteinových proteáz. Jednotliví zástupci této skupiny se označují pořadovými čísly, ačkoli třetí cystatin se i nadále nazývá cystatin C.

Beta-trace protein

Je enzym konvertující PGH2 na PGD2 (prostaglandin-H2 D-isomeráza) o M_r 25 000. Jeho původ je výhradně mozkový, hlavním místem syntézy je chorioidální plexus a leptomeningy. Odtud je BTP uvolňován do likvoru. BTP je přítomen ve stopách i v jiných tělních tekutinách včetně séra. Jeho koncentrace v likvoru je 32krát vyšší než v séru. Jedná se tedy o výborný marker likvorey. Vedle uplatnění v likvorologické diagnostice se někdy používá jako marker glomerulární filtrace (podobně jako cystatin C). Nevýhodou je vysoká cena stanovení.

6.7 Cytokiny

Termínem „cytokin“ se označuje signální látka celulárního původu. Cytokiny jsou nízkomolekulární bílkoviny (často glykosylované) produkované buňkami imunitního systému (lymfocyty, monocyty, makrofágy, neutrofilní granulocyty) i buňkami v klasickém pojetí „neimunitními“ (endotel, fibroblasty aj.). Vyznačují se převážným působením na buňky, které je vytvářejí, a na buňky v blízkém okolí (autokrinní a parakrinní působení). Působí ve velmi nízkých koncentracích, jejich poločas je krátký (minuty).

Interleukin 6 (IL-6)

Při akutním zánětu stoupá již za 2-4 hodiny, nezávisle na funkci jater. Proto je vhodný zejména k časně diagnostice. V praxi se využívá především u předčasně narozených novorozenců, jejichž játra ještě nejsou vyzrálá a neprodukují dostatečně CRP. Koncentrace IL-6 v plazmě nebo séru zdravých osob je < 11,3 ng/L; koncentrace > 400 ng/L vzbuzuje naléhavé podezření na sepsi. Senzitivita testu je téměř stoprocentní; specificita závisí na základním onemocnění. Zvýšené koncentrace mohou být u autoimunitních onemocnění, glomerulonefritidy, nádorů a v prvních dnech po chirurgickém výkonu.

Interleukin 8 (IL-8)

Má podobný význam jako IL-6. Zvýšené koncentrace nacházíme u akutního zánětu, ale také při tkáňové hypoxii a traumatech.

Tumor nekrotizující faktor (TNF- α)

Je považován za marker syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS, systemic inflammatory response syndrom). Stanovení je však problematické. TNF- α je po stimulaci secernován jen několik hodin a jeho poločas činí < 5 minut. Je třeba rozlišovat mezi testy stanovujícími biologicky aktivní TNF- α (trimer) a testy stanovujícími „celkový“ TNF- α (detekuje i monomery a štěpné produkty).

Současné zvýšení koncentrací IL-8 a TNF- α svědčí o aktivaci monocytů (SIRS). Je-li zvýšen jen IL-8, svědčí to o aktivaci neimunitních buněk, např. po vazbě bakterií nebo jejich lipopolysacharidu na endotelové buňky. Nevýhodou je vysoká cena stanovení cytokinů, z nichž pouze stanovení IL-6 jako časného markeru akutního zánětu doznalo širšího použití.

Shrnutí kapitoly

Bílkoviny jsou makromolekulární látky složené z alfa-aminokyselin, vzájemně spojených peptidovou vazbou. Biosyntéza bílkovin probíhá převážně v endoplazmatickém retikulu jaterních buněk, odbourávání se rovněž uskutečňuje v játrech, dále v ledvinách a trávicím ústrojí. Za fyziologického stavu se bílkoviny nacházejí ve vzájemné rovnováze a stále se obnovují. Za patologických stavů se jejich koncentrace a vzájemný poměr mění. Mezi hlavní funkce plazmatických bílkovin řadíme výstavbu a obnovu buněk a tkání, transport životně důležitých látek, zajišťování koloidně osmotického tlaku, udržování acidobazické rovnováhy, hemokoagulace a fibrinolýza, ochranu před volnými radikály a ochranu proti infekci. Pro potřeby klinické diagnostiky stanovujeme koncentraci celkové bílkoviny, elektroforézu sérových bílkovin, které nám umožní rozdělení bílkovin na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli a kvantitativní stanovení jednotlivých specifických bílkovin imunochemickými metodami.

Bílkoviny krevní plazmy můžeme dělit dle elektroforetické pohyblivosti do několika frakcí – albumin, alfa1-globuliny (alfa1-lipoprotein, alfa1-kyselý glykoprotein, alfa1-fetoprotein, alfa1-antitrypsin, alfa1-antichymotrypsin), alfa2-globuliny (alfa2-makroglobulin, haptoglobin, ceruloplazmin, Gc-globulin), beta-globuliny (transferin, hemopexin, beta-lipoprotein, C3 a C4 složka komplementu, fibrinogen) a gama-globuliny (imunoglobuliny).

Otázky, úkoly:

1. Popište základní charakteristiky bílkovin
2. Jaké jsou hlavní funkce a klinický význam bílkovin krevní plazmy?
3. Kterými metodami stanovujeme koncentraci celkové bílkoviny v séru a moči?

4. Vysvětlíte pojem elektroforéza sérových bílkovin a vyjmenujte základní frakce získané elektroforézou?
5. Charakterizujte imunoglobuliny.
6. Z čeho se skládá molekula monomerního imunoglobulinu?
7. Která třída imunoglobulinů se nejvíce uplatňuje při obraně proti parazitárním infekcím?
8. U které populace se setkáváme s fyziologickou přechodnou hypogamaglobulinémií?
9. Je prealbumin negativní reaktant akutní fáze?
10. Jaké jsou normální koncentrace CRP v séru?
11. Při kterém onemocnění nacházíme významně sníženou koncentraci alfa1-antitrypsinu?
12. Který analyt označujeme zkratkou CDT?

Další doporučené zdroje k této kapitole:

1. Bradwell A. R. *Serum Free Light Chain Analysis (plus Hevylite)*. 6. vydání. Birmingham: The Binding Site Group Ltd., 2010.
2. Burtis C. A., Ashwood E. R. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3. vydání. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999.
3. Dörner K. *Klinische Chemie und Hämatologie*. 6. aktualizované vydání. Stuttgart: Thieme, 2006.
4. Hořejší V., Bartůňková J. *Základy imunologie*. 3. vydání. Praha: Triton, 2005.
5. Kolektiv autorů (editoři A. Jabor, M. Zámečník, L. Straka). *Encyklopedie laboratorní medicíny*. Dostupná z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie>
6. Racek J., Rajdl, D. et al.: *Klinická biochemie*. 3., přepracované vydání. Praha: Galén, 2021.
7. Tichý M. *Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů)*. Český Těšín: A. L. Instruments, 1997.
8. Zima T. *Laboratorní diagnostika*. 3., doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén – Karolinum, 2013.

7 NEBÍLKOVINNÉ DUSÍKATÉ LÁTKY

V této kapitole se dozvíte:

V této kapitole se dozvíte informace o dusíkatých látkách nebílkovinné povahy, jako je urea, kreatinin, amoniak a aminokyseliny. Seznámíte se s jejich základními vlastnostmi a diagnostickým významem.

Klíčová slova této kapitoly:

Urea, močovina, kreatinin, amoniak, aminokyseliny.

Čas potřebný k prostudování učiva kapitoly: 3 hodiny (teorie + řešení úloh)

7.1 Urea (močovina)

Urea je konečný metabolit odbourávání bílkovin, resp. aminodusíku aminokyselin. Smyslem syntézy močoviny je uložení, resp. vyloučení dusíku prostřednictvím molekuly, která je daleko méně toxická než ostatní reaktivnější formy dusíku, zejména amoniak, anebo aminové skupiny na malých aminokyselinových molekulách.

Močovina je syntetizována v játrech v tzv. močovinovém cyklu, v malém množství také v ledvinách a mozku. Do močovinového cyklu vstupuje karbamoylfosfát s ornitinem a během čtyř enzymových reakcí vzniká močovina a ornitin, který opět vstupuje do močovinového cyklu. Močovina se vylučuje z těla glomerulární filtrací, současně se asi 40 % profiltrovaného množství vstřebává zpět v tubulárním systému a zbytek se vyloučí močí.

Koncentrace močoviny v krvi se pohybuje v rozmezí 2,8 – 8,3 mmol.L⁻¹. Sérová koncentrace je ovlivňována stupněm její tvorby, která je dána množstvím bílkovin přijímaných potravou a schopností ledvin ji vylučovat.

Urea v séru

Zvýšená koncentrace močoviny v séru může mít několik příčin:

- zvýšený příjem bílkovin potravou
- zvýšený katabolismus vyžadující zvýšenou spotřebu energie (horečka, sepse, šok, popáleniny, pooperační stavy, ...)
- krvácení do trávicího traktu
- zvýšená produkce glukokortikoidů nebo léčba velkými dávkami steroidních hormonů
- funkční (šok, kardiální insuficience) nebo renální selhání ledvin (glomerulonefritida, porucha tubulární resorpce)
- obstrukce močových cest
- komplikace spojené s jaterním selháním.

Sníženou koncentraci močoviny v séru nacházíme u:

- sníženého příjmu bílkovin potravou
- při onemocnění jater
- fyziologicky u dětí (zvýšený anabolismus).

Urea v moči

Stanovení urey (močoviny) v moči se využívá ke zhodnocení **ztrát celkového dusíku** močí a tím i k posouzení dusíkové bilance. Koncentrace urey v moči se pohybuje v rozmezí 320-570 mmol/24 hod.

7.2 Kreatinin

Kreatinin (vnitřní anhydrid kreatinu) je cyklická dusíkatá organická látka, vznikající jako konečný produkt katabolismu kreatinu a kreatinfosfátu. V kosterním a srdečním svalu slouží kreatinfosfát (fosforylovaný kreatin) jako zásobárna vysokoenergetického fosfátu. V případě nedostatku ATP slouží jako „dárce“ fosfátu pro ADP, a tak k doplnění molekul ATP potřebných pro svalový stah. Tato reakce se využívá v prvních několika minutách intenzivní svalové práce.

Přeměna:



je reverzibilní, katalyzována kreatinkinázou (CK). Cyklizace kreatinfosfátu na kreatinin a fosfát je spontánní, pomalá, ale kontinuální.

Množství kreatininu v organismu závisí na množství svalové hmoty. Kreatinin se dostává do organismu také potravou a vylučován je především ledvinami, v moči se nachází díky glomerulární filtraci a také tubulární sekreci, přičemž nedochází k jeho zpětnému vstřebávání. Denní exkrece kreatininu je pro danou osobu konstantní, závisí hlavně na množství svalové hmoty, dietě a funkci ledvin.

V játrech a ledvinách probíhá syntéza kreatinu z glycinu, guanidinové skupiny argininu a methylové skupiny poskytované S-adenosylmethioninem. Ve svalu se vyskytuje převážně ve fosforylované formě jako kreatinfosfát (20-30 % tvoří volný kreatin, zbytek se nachází ve fosforylované formě; 98 % veškerého kreatinu se vyskytuje ve svalech) a je zde transportován krví. Kreatinin se denně tvoří neenzymatickou cyklizací 1-2 % kreatinfosfátu. Množství kreatinu, které je přeměněno na kreatinin, bývá opět resyntetizováno a kreatinin je poté z těla vyloučen jako odpadní látka.

Denní produkce kreatininu je kolem $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti (průměrné hodnoty u dospělých neobézních mužů: $13,3 \text{ mmol} \cdot \text{den}^{-1}$, u žen: $10,6 \text{ mmol} \cdot \text{den}^{-1}$). Denní produkce kreatininu pro danou osobu je téměř konstantní, protože tvorba kreatininu je přímo úměrná svalové hmotě.

Kreatinin se nachází ve všech půdách, v obilných zrnech a další rostlinné hmotě, také v některých rybách a extraktu z krabího masa. Kreatinin se do organismu dostává jako součást masa a masných výrobků, včetně vývarů z masa. V mrtvém mase se kreatinin nachází díky hydrolyze kreatinfosfátu přítomného ve svalové tkáni živočichů na kreatin, který se při tepelném zpracování masa a masných výrobků dehydratuje na kreatinin.

Vlivem nedostatku proteinů v potravě dochází i ke snížení množství kreatininu v organismu. Příčinou je snížený přísun esenciálních aminokyselin (arginin, methionin), z nichž je syntetizován kreatin. Kreatinin se také jako kreatin nachází ve svalové tkáni, mozku, krvi a je běžnou součástí moči. Poměr produkce a exkrece kreatininu je za normálních podmínek konstantní a oba pochody se nacházejí v rovnováze. Z 90 % je kreatinin filtrován do moči a 10 % se do moči dostává tubulární sekrecí. Se vzrůstající koncentrací v séru roste i množství secernované tubuly. Veškerý kreatinin v ledvinách profiltrovaný je z těla vyloučen a v tubulech není zpětně vstřebáván, označuje se za tzv. bezprahovou látku.

Díky příjmu kreatinu a kreatininu v masných výrobcích může být denní exkrece kreatininu o 10-30 % vyšší než syntéza. Množství vyloučeného kreatininu za 24 hodin závisí na množství svalové hmoty, dietě a funkci ledvin. Při výrazném zvýšení koncentrace kreatininu v plazmě (při chronické nedostatečnosti ledvin) byla zjištěna také exkrece kreatininu střevní sliznicí (až 60 % přijatého kreatininu). Ve střevech je kreatinin hydrolyzován bakteriální kreatininázou.

Kreatinin v séru

Koncentrace kreatininu v séru závisí na svalové hmotě jedince, proto tato hodnota bývá vyšší u mužů než u žen. Stanovení koncentrace kreatinu v séru se využívá pro hodnocení velikosti glomerulární filtrace. Jestliže glomerulární filtrace klesne pod 50 %, začínají hodnoty kreatininu stoupat nad horní hranici referenční meze. Je nutné si uvědomit, že pokud se sérová koncentrace kreatininu zvýší nad horní hranici normy, je jisté, že funkce ledvin je snižena. Pokud je ale koncentrace kreatininu v séru v mezích normy, nelze zcela říci, že glomerulární filtrace není snižena oproti normálu. Je tedy patrné, že samotné stanovení sérové koncentrace kreatininu je pro včasné odhalení poškození ledvin velmi málo citlivé, proto je lepší využít zjištění clearance endogenního kreatininu (viz níže).

Kreatinin v moči

Vyšetření kreatininu v moči a stanovení odpadu kreatininu obvykle za 24 hodin se využívá pro posouzení funkce ledvin v různých výpočtových ukazatelích, stavu výživy a svalové hmoty a pro orientační standardizaci látek vylučovaných močí vzhledem k objemu moče. Variabilita vylučování kreatininu močí je vysoká, záleží totiž na příjmu masa, fyzické aktivitě, denním rytmu a dalších faktorech. Může se pohybovat až kolem 30 %. Hodnoty kreatininu v moči závisejí také na věku a pohlaví. Interference při stanovení Jaffého metodou jsou méně časté než v séru.

Před vyšetřením se nedoporučuje dieta s vyšším obsahem masných bílkovin (maso, vývary) nebo větší fyzická zátěž. Klade se důraz na správný kvantitativní sběr moči. Neúplný sběr moče může být příčinou nepřesných výsledků, dále to může být interference při stanovení, katabolismus.

Pro stanovení kreatininu v moči se tedy doporučuje sbíraná moč do plastových lahví (polystyrén) bez konzervačních přípravků a po dobu sběru je vhodné skladovat je v lednici. Před odlitím vzorku je nutné moč pořádně promíchat, s přesností na 10 ml změřit objem (u velmi malých dětí s přesností na 1 ml) a uvést přesnou dobu sběru.

Clearance kreatininu

K měření glomerulární filtrace se využívá tzv. renální clearance, měří se tedy nepřímou. Clearance lze definovat jako objem plazmy, který se za určitou časovou jednotku zcela očistí od dané látky. Clearance látky, která se v glomerulech volně filtruje, není metabolizována a z organismu se vylučuje pouze glomerulární filtrací, přičemž nedochází k její zpětné resorpci, a navíc ani k sekreci tubuly, se rovná hodnotě glomerulární filtrace. Výpočet clearance libovolné látky:

$$GF = C_x = \frac{U_x \cdot V}{P_x}$$

kde C_x je clearance látky ($\text{ml} \cdot \text{s}^{-1}$), U_x je koncentrace dané látky v moči ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), V je diuréza za čas ($\text{ml} \cdot \text{s}^{-1}$), P_x je koncentrace dané látky v plazmě ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Látka, jejíž vlastnosti odpovídají výše uvedeným, je inulin, tzv. „zlatý standard“ pro měření glomerulární filtrace (GF). Pro praxi je však stanovení GF pomocí inulinu nepravděpodobné. V současnosti preferovaným způsobem odhadu glomerulární filtrace (eGF) jsou rovnice CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) vycházející z koncentrací sérového kreatininu, které byly odvozeny na základě analýzy 13 studií s 5352 účastníky zahrnujícími všeobecnou populaci, diabetiky i pacienty s chronickým selháním ledvin (CKD, chronic kidney disease), Tabulka 7a. Hodnoty sérového kreatininu však závisejí na množství svalové hmoty, proto u žen či nemocných svalovou atrofií, u různých malignit a jaterní cirhózy lze očekávat výrazně nižší hodnoty. U těchto skupin pacientů je nutné použít jiný marker glomerulární filtrace, např. cystatin C. Také zde je doporučeno využívat rovnici CKD-EPI (Tabulka 7b) anebo kombinovanou rovnici CKD-EPI ze sérového kreatininu a cystatinu C (Tabulka 7c), která poskytuje nejpřesnější hodnoty eGF. Důležitou podmínkou je stanovení koncentrace kreatininu i cystatinu C metodou metrologicky navázanou na referenční materiál (NIST 967 pro kreatinin, resp. DA ERM 472 pro cystatin C).

Tabulka 7a. Rovnice odhadu glomerulární filtrace ze sérového kreatininu (Krea-S) dle CKD-EPI.

Pohlaví	Krea-S [$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]	Vzorec pro výpočet eGF [$\text{ml} \cdot \text{s}^{-1} \cdot 1,73 \text{ m}^{-2}$]
Ženy	≤ 62	$2,4 \cdot (\text{Krea-S}/61,9)^{-0,329} \cdot 0,993^{\text{věk}} \cdot 1,159$ (černá populace)
	> 62	$2,4 \cdot (\text{Krea-S}/61,9)^{-1,209} \cdot 0,993^{\text{věk}} \cdot 1,159$ (černá populace)
Muži	≤ 80	$2,35 \cdot (\text{Krea-S}/79,6)^{-0,411} \cdot 0,993^{\text{věk}} \cdot 1,159$ (černá populace)
	> 80	$2,35 \cdot (\text{Krea-S}/79,6)^{-1,209} \cdot 0,993^{\text{věk}} \cdot 1,159$ (černá populace)

Tabulka 7b. Rovnice odhadu glomerulární filtrace ze sérového cystatinu C (CysC-S) dle CKD-EPI.

Pohlaví	CysC-S [$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$]	Vzorec pro výpočet eGF [$\text{ml} \cdot \text{s}^{-1} \cdot 1,73 \text{ m}^{-2}$]
Ženy	$\leq 0,8$	$2,217 \cdot (\text{CysC-S}/0,8)^{-0,499} \cdot 0,996^{\text{věk}} \cdot [0,932 \text{ žena}]$
Muži		
Ženy	$> 0,8$	$2,217 \cdot (\text{CysC-S}/0,8)^{-1,328} \cdot 0,996^{\text{věk}} \cdot [0,932 \text{ žena}]$
Muži		

Tabulka 7c. Kombinované rovnice CKD-EPI pro eGF pomocí sérového kreatininu (Krea-S) a cystatinu C (CysC-S).

Pohlaví	Analyt	Vzorec pro výpočet eGF [$\text{ml}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 1,73 \text{ m}^{-2}$]
Ženy	Krea-S $\leq 62 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CysC-S $\leq 0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$2,17 \cdot (\text{Krea-S}/61,9)^{-0,248} \cdot (\text{CysC-S}/0,8)^{-0,375} \cdot 0,995^{\text{věk}}$ [1,08 černá populace]
	Krea-S $\leq 62 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CysC-S $> 0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$2,17 \cdot (\text{Krea-S}/61,9)^{-0,248} \cdot (\text{CysC-S}/0,8)^{-0,711} \cdot 0,995^{\text{věk}}$ [1,08 černá populace]
	Krea-S $> 62 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CysC-S $\leq 0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$2,17 \cdot (\text{Krea-S}/61,9)^{-0,601} \cdot (\text{CysC-S}/0,8)^{-0,375} \cdot 0,995^{\text{věk}}$ [1,08 černá populace]
	Krea-S $> 62 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CysC-S $> 0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$2,17 \cdot (\text{Krea-S}/61,9)^{-0,601} \cdot (\text{CysC-S}/0,8)^{-0,711} \cdot 0,995^{\text{věk}}$ [1,08 černá populace]
Muži	Krea-S $\leq 80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CysC-S $\leq 0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$2,25 \cdot (\text{Krea-S}/79,6)^{-0,207} \cdot (\text{CysC-S}/0,8)^{-0,375} \cdot 0,995^{\text{věk}}$ [1,08 černá populace]
	Krea-S $\leq 80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CysC-S $> 0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$2,25 \cdot (\text{Krea-S}/79,6)^{-0,207} \cdot (\text{CysC-S}/0,8)^{-0,711} \cdot 0,995^{\text{věk}}$ [1,08 černá populace]
	Krea-S $> 80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CysC-S $\leq 0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$2,25 \cdot (\text{Krea-S}/79,6)^{-0,601} \cdot (\text{CysC-S}/0,8)^{-0,375} \cdot 0,995^{\text{věk}}$ [1,08 černá populace]
	Krea-S $> 80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CysC-S $> 0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$2,25 \cdot (\text{Krea-S}/79,6)^{-0,601} \cdot (\text{CysC-S}/0,8)^{-0,711} \cdot 0,995^{\text{věk}}$ [1,08 černá populace]

7.3 Kyselina močová

Kyselina močová a její soli (uráty) jsou konečným produktem odbourávání purinových bazí (adeninu, guaninu) u člověka. Puriny jsou základní stavební složkou nukleových kyselin, řady koenzymů a ve formě ATP (adenosintrifosfát) představují důležitý zdroj energie pro buňky.

Kyselina močová, a tedy i puriny, se do krevního oběhu dostává nejen odbouráváním, ale i potravou, anebo při rozpadu a obnově buněk organismu.

Kyselina močová je vylučována převážně ledvinami, přičemž asi 90 % se zpětně resorbuje zpět do krve. Z toho vyplývá skutečnost, že kyselina močová není pouze odpadní látkou, ale významně se podílí např. na antioxidační ochraně organismu (chrání před nepříznivým účinkem volných radikálů).

Kyselina močová je velmi málo rozpustná ve vodě, což vede k ukládání jejich krystalů ve tkáních, a to hlavně v ledvinách a v kloubní tekutině. V močových cestách se mohou krystaly kyseliny močové podílet na vzniku močových kamenů.

Kyselina močová v séru

Výskyt zvýšené koncentrace kyseliny močové v séru může mít za následek zvýšenou produkci, nebo snížené vylučování kyseliny močové.

Zvýšená produkce může souviset se zvýšeným příjmem purinů v potravě (maso), zvýšenou degradací nukleových kyselin při zvýšeném rozpadu buněk (po cytotoxické léčbě, po ozáření atd.).

Se sníženým vylučováním kyseliny močové se setkáváme u poruchy funkce ledvin, spojených jak se sníženou glomerulární filtrací, tak se zvýšenou tubulární resorpcí.

Dna

Dna je metabolické purinové onemocnění, které způsobuje ukládání krystalů kyseliny močové především v kloubech. Objevuje se u osob po chronické hyperurikémii, nicméně není s ní totožná a můžeme se s ní setkat i u osob s normální sérovou koncentrací kyseliny močové. Jde o časté onemocnění, které postihuje 1–2 % dospělé populace a jeho výskyt stále narůstá.

Dna je charakterizována atakami artritidy (zánětlivé onemocnění kloubů). Souvisí však i s dalšími chorobami, jako je hypertenze, metabolický syndrom, diabetes mellitus, ale také s ledvinnými a kardiovaskulárními nemocemi.

7.4 Amoniak

Amoniak jako nejjednodušší sloučeninu dusíku a vodíku řadíme do skupiny látek nebiřkovinného dusíku. V lidském těle vzniká především při odbourávání proteinů – je odpadním produktem aminodusíku aminokyselin.

Jedná se o neurotoxickou látku. V tělních tekutinách se za fyziologických podmínek vyskytuje z 97,5 % jako amonný kationt (NH_4^+), ve formě NH_3 se nachází pouze 2,5 % amoniaku. Poměr koncentrací amonného kationtu a amoniaku závisí na pH, při alkalóze se zvyšuje podíl NH_3 . Ten pak snadněji difunduje hematoencefalickou bariérou a může způsobit poškození centrálního nervového systému. Toxicitu vykazují obě formy amoniaku, v mozku je detoxikace zajištěna tvorbou glutaminu v astrocytech.

Hlavním orgánem detoxikace amoniaku jsou játra, kde v průběhu močovinového cyklu dochází k tvorbě urey (močoviny), současně také syntéze glutaminu, a to jak v játrech, tak extrahepatálně.

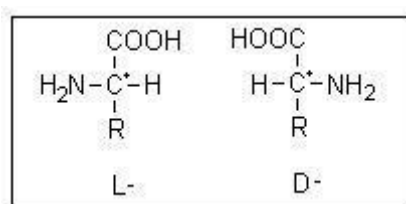
Amoniak se z těla vylučuje močí převážně jako urea, ale také jako amonný kationt (NH_4^+). Je tedy hlavní kyselinou obsaženou v moči – polovina až dvě třetiny denního množství kyselin (vodíkových kationtů) je takto vylučována. Tím se umožní vylučování velkého množství kyselin z těla, aniž by docházelo ke snížení pH moči. Amoniak zde působí jako pufr, zabráňuje přílišnému okyselení moči vazbou protonu ($\text{pH} < 4,5$).

Amoniak v plazmě

Zvýšená koncentrace amoniaku se projevuje u selhání jater, koreluje s tíží jaterní encefalopatie. Vzácnými příčinami jsou Reyeův syndrom, dědičné defekty týkající se enzymů cyklu močoviny či masivní krvácení do trávicího ústrojí.

7.5 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou základními stavebními jednotkami bílkovin, které se dále využívají k tvorbě vlastních bílkovin těla. Z chemického hlediska se jedná o substituční deriváty karboxylových kyselin. Dnes je známo více než 300 aminokyselin, v bílkovinách se jako stavební jednotky vyskytuje pouze dvacet aminokyselin, a to výhradně v L- konfiguraci.



Za fyziologických podmínek jsou volné aminokyseliny přítomné ve všech tělních tekutinách. Jejich koncentrace závisí na věku, stravě a zdravotním stavu jedince. Zdrojem aminokyselin jsou bílkoviny z potravy, které si tělo rozloží na aminokyseliny, dále opotřebované bílkoviny z tkání a malé množství vzniká při přeměně sacharidů.

Aminokyseliny jsou potřebné k syntéze stavebních bílkovin těla, enzymů a hormonů, současně k syntéze plazmatických bílkovin, k přeměně na sacharidy. Část aminokyselin se odbourává na látky jednodušší a při tom se uvolňuje energie (u nezdravého organismu).

Metabolismus aminokyselin probíhá enzymaticky řízenými pochody, kdy se příslušná aminokyselina účastní sledu reakcí za vzniku močoviny, nebo se přeneše na ketokyseliny za vzniku nové aminokyseliny. Některé aminokyseliny se zapojují do cyklu dikarbonových kyselin, který zajišťuje energetické zásobování organismu. Nedostatečné množství nebo snížení aktivity některého z enzymů katalyzujících přeměnu aminokyselin může být příčinou dědičných metabolických poruch aminokyselin. Výsledkem je pak nadměrné hromadění, nebo vylučování některého typického metabolitu v krvi a moči, popř. v jiném biologickém materiálu. Jeho průkaz nám umožňuje odhalit příslušnou dědičnou metabolickou poruchu.

V séru nebo moči můžeme stanovit:

- souhrnně všechny aminokyseliny jako tzv. α -aminodusík
- konkrétní aminokyselinu
- celé spektrum aminokyselin pomocí elektroforetických či chromatografických metod.

Další doporučené zdroje k této kapitole:

1. ČSKB [online] [cit. 2013-06-26] Dostupné z: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni>.
2. Masopust J. *Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. Praha: Karolinum, 1998.
3. Racek J., Rajdl D. et al.: *Klinická biochemie. 3., přepracované vydání*. Praha: Galén, 2021.
4. SEKK [online]. [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.sekk.cz/>.
5. Thomas L. *Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*. Frankfurt/Main: TH-Books-Verl.-Ges., 1998.
6. Zima T. *Laboratorní diagnostika. 3., doplněné a přepracované vydání*. Praha: Galén – Karolinum, 2013.

Shrnutí kapitoly

Tato kapitola popisuje nebílkovinné dusíkaté látky, jejich původ, metabolismus a diagnostický význam. Některé z nich patří do skupiny biologicky aktivních látek, jiné jsou odpadními produkty metabolismu.

Otázky, úkoly:

1. Kde je syntetizována močovina?
2. Jaký význam má v našem organismu kreatinin?
3. Čím může být ovlivněna hladina kreatininu?
4. Co je to clearance kreatininu?
5. Je amoniak zdraví prospěšnou látkou?
6. Jak stanovujeme aminokyseliny?

8 STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMŮ

V této kapitole se dozvíte:

Tato kapitola pojednává o složení, významu a funkci enzymů, zmínka je věnována názvosloví a vyjádření enzymové aktivity a faktorům, které ovlivňují katalytickou aktivitu. Závěrem jsou vyjmenovány nejznámější enzymy a je popsána jejich funkce v našem organismu či jejich diagnostický význam.

Klíčová slova této kapitoly:

Enzym, katalytická aktivita, aktivátory, inhibitory, kinetika, AST, ALT, GGT, CK, ALP, AMS, CHE, LPS, GMD, LD.

Čas potřebný k prostudování učiva kapitoly: 4 hodiny (teorie + řešení úloh)

8.1 Struktura enzymů

Enzymy řadíme mezi biomakromolekuly s relativní molekulovou hmotností v rozmezí 10^4 až 10^6 . Tvoří je složené globulární bílkoviny, na jejichž stavbě se podílí jeden či více polypeptidových řetězců. Tato část se označuje jako *apoenzym*. Vedle toho se na stavbě enzymů podílí i nebílkovinná část, nízkomolekulární, označovaná jako *kofaktor*. Kofaktor zahrnuje jak prostetickou skupinu, tak koenzym, které se liší silou vazby na apoenzym. Koenzym je vázán slabě a snadno se odštěpuje, prostetická skupina je naopak vázána pevně a v průběhu enzymatické reakce se neodštěpuje. Koenzym se vždy podílí na katalytické reakci. Kompletní funkční komplex, tzn. proteinová část a další přídavné složky, se nazývá holoenzym.

8.2 Mechanismus účinku enzymů

Na rozdíl od bílkovin bez katalytické funkce obsahují enzymy specifická místa, na něž se váže substrát, který je zde chemicky přeměněn na produkt reakce. Tato místa se označují jako **aktivní místa**. Jedná se o specifickou oblast molekuly enzymu, k níž se může vázat substrát, jenž je strukturně doplňkový (komplementární). Původní představa „zámku“ a „klíče“ o vazbě substrátu do aktivního centra enzymu vycházely z teorie E. Fischera (1980). Tato teorie však považovala aktivní místo za prostorový útvar, který je strukturně neměnný (nepřizpůsobuje se tvaru substrátu). S prohlubováním poznatků o konformaci biomolekul se prosadilo dynamické vnímání prostorových struktur a vznikla nová teorie indukovaného přizpůsobení. Podle ní se aktivní místo přizpůsobuje tvaru substrátu teprve při kontaktu. Tvar aktivního místa tedy odpovídá struktuře substrátu a typu katalyzované reakce. Současně obsahuje přesně rozmístěné funkční skupiny, které jsou součástí aminokyselin bílkovinné části enzymu a jsou významné z hlediska specifity vazby substrátu, typu katalyzované reakce, udržování prostorové struktury a vhodných reakčních podmínek aktivního centra.

Na povrchu enzymu se rovněž vyskytují místa vzdálená od aktivního centra, jež na sebe váží různé efektoři, tzv. alosterické regulátory, vyvolávající změnu struktury aktivního místa. Výsledkem této vazby je změna katalytické funkce enzymu, to znamená, že tyto látky mohou vystupovat jako alosterické aktivátory nebo inhibitory. Současně na enzymu rozpoznáváme determinantní místa neboli epitopy, které určují imunitní charakteristiku molekuly enzymu.

8.3 Vlastnosti enzymů

- vysoká katalytická účinnost (1 molekula enzymu za 1 sekundu přemění až $5 \cdot 10^4$ molekul substrátu)
- vysoká specifita:
 - vzhledem ke struktuře substrátů (substrátová specifita) – enzym může být vzhledem k substrátu *absolutně specifický*, tzn. váže jen jeden druh molekuly (např. ureáza váže výhradně močovinu), nebo *relativně specifický*, tzn. enzym je schopen vazby s několika substráty, ale ne se stejnou afinitou (např. hexokináza váže a přeměňuje glukózu, galaktózu a jiné hexózy)
 - vzhledem k typu katalyzované reakce (reakční specifita)
 - nenáročné reakční podmínky (nízká teplota 20–40°C, normální tlak 0,1 MPa, pH=7)
- snadná regulace jejich účinku
- asociace v tzv. multienzymových komplexech (efektivní katalýza sledu několika následných reakcí)
- netoxičnost
- krátký biologický poločas

8.4 Katalytická aktivita enzymu

Jednotkou katalytické aktivity enzymů je **katal**, zkratka **kat**. Katal je takové množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 molu substrátu za sekundu. Je odvozenou jednotkou SI ($1 \text{ kat} = 1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$). Nejpoužívanější jsou menší jednotky μkat , nkat a pkat .

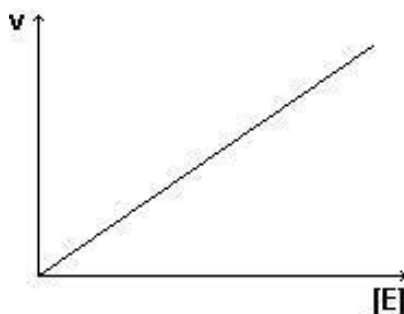
8.4.1 Faktory ovlivňující enzymovou aktivitu

1) Fyzikální vlivy

- *Teplota* (rychlost enzymaticky katalyzované reakce vzrůstá s teplotou, zvýší-li se teplota o 10°C , rychlost reakce se zvýší 2krát, nicméně je nutné si uvědomit, že enzymy jsou bílkoviny, tudíž při vysoké teplotě hrozí denaturace enzymu, *teplotní optimum* většiny enzymů se pohybuje v rozmezí $50\text{--}60^\circ\text{C}$, při této teplotě dosahuje enzym maximální aktivity. Standardně se u nás provádí stanovení enzymu při teplotě 37°C a tato teplota by během měření neměla kolísat o více než $0,1^\circ\text{C}$).
- *pH* (vazebné a katalytické schopnosti aktivního místa závisí na koncentraci vodíkových iontů, v závislosti na pH prostředí tak mohou přijímat či odevzdávat protony, a tak ovlivňovat katalytickou aktivitu, optimální pH se pohybuje v rozmezí pH $5\text{--}7$, setkáme se ale i s výjimkami, např. pepsin má pH optimum $1\text{--}2$. Opět ale platí skutečnost, že při extrémních změnách pH může dojít k denaturaci enzymu).
- *Redoxní potenciál* (ovlivňuje rovnováhu mezi skupinami $-S-S-$ a $-SH$).
- *Ionizující záření* (paprsky γ ve vysokých dávkách enzym poškozují).
- *Iontová síla* (může měnit hydratační plášť a konfiguraci enzymové molekuly a tím ovlivnit katalytickou schopnost).

2) Chemické vlivy

- *Koncentrace substrátu*, viz kinetika enzymové reakce.
- *Koncentrace enzymu* – závislost rychlosti enzymatické reakce na koncentraci enzymu je při konstantní koncentraci substrátu lineární, nalezená linearita však platí pouze pro počáteční rychlost. Jakmile koncentrace substrátu výrazněji klesne, reakční rychlost klesne a při dynamické rovnováze klesne na nulu.



Obrázek 8.1: Závislost rychlosti enzymatické reakce na koncentraci enzymu při konstantní koncentraci substrátu. (zdroj: Kušnierová – vlastní).

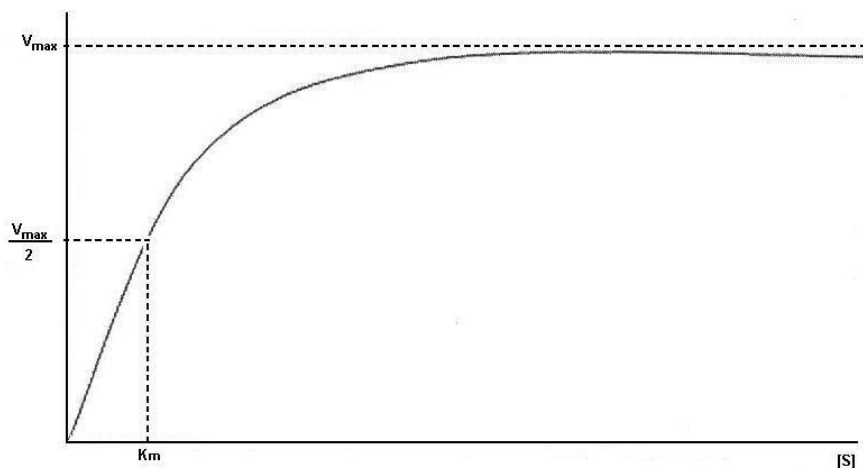
- *Efektory* – skupina látek, které ovlivňují enzymatickou aktivitu:
 - aktivátory – zvyšují enzymatickou aktivitu (např. organické látky, anorganické ionty),
 - inhibitory – tlumí enzymatickou aktivitu, dělí se na:
 - inhibitory kompetitivní – soutěží se substrátem o vazbu na aktivní místo enzymu, mají podobnou strukturu jako substrát, míra inhibice je dána poměrem koncentrací substrátu a inhibitoru, lze ji tedy potlačit zvýšením koncentrace substrátu, tento typ inhibitoru tedy neovlivňuje maximální rychlost, ale snižuje K_m ,
 - inhibitory nekompetitivní – mechanismus této inhibice je založen na alosterickém principu, inhibitor se váže mimo aktivní místo, vyvolá změnu struktury, která zasáhne i aktivní místo a tím blokuje jeho aktivitu, tento inhibitor nevyvolává změnu K_m , ale snižuje maximální rychlost reakce,
 - akompetitivní inhibitory – látky, které se váží na již vzniklý aktivovaný komplex ES, vytvoří se ESI, který nemůže být přeměněn na konečný produkt.

Kinetika enzymové reakce

Nejjednodušší kinetiku mají jednosubstrátové reakce typu:



Rychlost reakce závisí na koncentraci substrátu [S]. Získaná křivka má tvar hyperboly. Při nízkých koncentracích substrátu pozorujeme závislost odpovídající reakci 1. řádu (lineární závislost). Při vyšších koncentracích se vzestup zpomaluje, až se nakonec rychlost se stoupající koncentrací prakticky nemění (maximální rychlost V), enzym je substrátem nasycen.



Obrázek 8.2: Závislost rychlosti jednosubstrátové reakce na koncentraci substrátu [S].
(zdroj: Kušnierová – vlastní).

Průběh enzymové reakce vyjadřuje rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v_o = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

kde K_m se nazývá Michaelisova konstanta, nejdůležitější charakteristika každého enzymu. Rovnici lze dále upravit a platí

$$K_m = [S] \cdot \left(\frac{v_{max}}{v} - 1 \right).$$

Následně z rovnice vyplývá, že bude-li poměr: $\frac{v_{max}}{v} = 2$, bude K_m rovno [S]. Z toho plyne definice Michaelisovy konstanty: K_m je koncentrace substrátu, při níž enzymová reakce probíhá polovinou maximální rychlosti. Michaelisova konstanta je tedy mírou afinity enzymu k substrátu. Čím je jeho hodnota nižší, tím je afinita enzymu k substrátu větší. K_m má rozměr látkové koncentrace (mol/L) a pohybuje se v rozmezí 10⁻¹–10⁻⁶ mol/L.

8.5 Klasifikace enzymů

Enzymy dělíme do jednotlivých tříd podle typu katalyzované reakce:

- Oxidoreduktázy – katalyzují oxidačně redukční přeměny mezi molekulami, např. dehydrogenáza, oxidáza.
- Transferázy – katalyzují přenos skupin atomů z donorové molekuly na akceptor, např. aminotransferázy, transmetylázy.
- Hydrolázy – štěpí substráty hydrolyticky za vstupu vody. Patří zde peptidázy, lipázy, glukosidázy.
- Lyázy – katalyzují odštěpení malých molekul (H₂O, CO₂ atd.) nebo jejich vnášení za tvorby vazby C-C, C-O, C-N. Příkladem mohou být syntézy, dekarboxylázy atd.

- e) Izomerázy – katalyzují izomerace, tzn. vzájemnou přeměnu izomerů přesunem atomů nebo jejich skupin v rámci jedné molekuly.
- f) Ligázy – katalyzují vznik energeticky náročných vazeb za současného katabolismu vysoce energetických látek, např. ATP.

8.6 Lokalizace enzymů

Enzymy jsou přítomné intracelulárně i extracelulárně. Extracelulární enzymy jsou jako všechny ostatní bílkoviny syntetizovány uvnitř buňky a na místo působení jsou transportovány. Vyskytují se např. v trávicích šťávách, likvoru, v plazmě, příkladem mohou být faktory krevního srážení, lipoproteinová lipáza atd.

Intracelulární enzymy působí uvnitř buňky a jsou obsaženy volně v cytoplazmě nebo v jednotlivých buněčných kompartmentech. Jejich rozložení je nestejněměrně, např. cytochromoxidáza se vyskytuje v mitochondriích, kyselá fosfatáza je typická pro lysozomy a cytosol je místem působení enzymů glykolýzy.

8.7 Význam enzymů v medicíně

- 1) Enzymy umožňují život jako takový, neboť za daných podmínek (vodné prostředí, teplota 37 °C, pH 7,4 a tlak 100 kPa) by žádná pro život potřebná chemická reakce neprobíhala.
- 2) Enzymy patří mezi látky, které se používají pro diagnostiku a hodnocení řady onemocnění. Mluvíme zde především o intracelulárních enzimech, které se za fyziologických okolností vyskytují v krvi v určitém rozmezí. V případě poškození buněk se pak intracelulární enzymy vyskytují v krvi v několikanásobně vyšší koncentraci a umožňují nám stanovit i prognózu choroby.
- 3) Enzymy se využívají pro diagnostiku různých látek, příkladem může být enzymatické stanovení glukózy v krvi nebo stanovení hladiny cholesterolu, triacylglycerolů atd.
- 4) Enzymy se často využívají k léčebným účelům, nahrazují chybějící trávicí enzymy, používají se k odstranění ložisek fibrinu atd.
- 5) Podpůrným působením zvyšují účinky antibiotik (i chemoterapeutik), čímž umožňují snížení dávek těchto léků.
- 6) Při postižení horních i dolních dýchacích cest působí proti otokům sliznice, rozpouštějí hustý hlen a zlepšují jeho transport a následné odstranění z organismu atd.

8.8 Přehled vybraných enzymů

Aminotransferázy – tvoří skupinu celulárních enzymů, které katalyzují přenos aminoskupiny z aminokyseliny na oxokyselinu. Patří zde např. alaninaminotransferáza (ALT) a aspartátaminotransferáza (AST).

Alaninaminotransferáza (ALT)

Katalyzuje přenos aminoskupiny z alaninu na 2-oxoglutarát za vzniku pyruvátu a glutamátu. Jako prostetická skupina se uplatňuje pyridoxal-5-fosfát.

ALT se vyskytuje převážně v játrech, je nejcitlivějším indikátorem léze postihujících jaterních parenchym. V menší míře se vyskytuje v ledvinách, srdci, kosterním svalstvu, pankreatu, slezině a plicích. Biologický poločas je 48 hodin.

Nejčastější příčinou výrazného nárůstu je virová hepatitida. I když v těchto případech dochází ke zvýšení hodnot aktivit obou aminotransferáz, je aktivita ALT mnohonásobně vyšší. Výrazné zvýšení hodnoty ALT můžeme pozorovat také v případě infekční mononukleózy, chronických jaterních onemocnění, nemocí žlučových cest. Další příčinou může být poškození svalů v důsledku úrazu, zánětu či degenerativních procesů. Častým důvodem zvýšené koncentrace ALT mohou být také dekompenzované srdeční vady.

Aspartátaminotransferáza (AST)

Katalyzuje přenos aminoskupiny z aspartátu na 2-oxoglutarát za vzniku oxalátu a glutamátu. Jako prostetická skupina se opět uplatňuje pyridoxal-5-fosfát.

AST se vyskytuje v játrech, srdci, kosterním svalstvu, méně v ledvinách a mozku. Také se vyskytuje v erytrocytech, proto je nutné se při jeho stanovení vyhnout hemolytickému séru.

Existují dva izoenzymy – mitochondriální (65 % celkového množství v buňce) a cytoplazmatický (35 % celkového množství v buňce).

V séru zdravých lidí převládá cytoplazmatický izoenzym, neboť se uvolňuje z buňky do krve i při jejím velmi malém poškození. Mitochondriální izoenzym stoupá velmi rychle při nekróze buňky, proto jeho výskyt považujeme za významně patologický nález.

Nejčastější příčinou zvýšené katalytické aktivity AST může být postižení kosterních svalů při úrazu, užívání statinů (léky snižující cholesterol), jaterní onemocnění, akutní infarkt myokardu, kde vzestup jeho koncentrace je pozorován 4–6 hodin po infarktu, maxima pak dosahuje po 16–48 hodinách, k poklesu dochází za 3–7 dní. Současně můžeme pozorovat nárůst AST při cévní mozkové příhodě, u otrav, po podání morfinu, po šoku, srdeční masáži a u zhmožděnin svalstva. Se sníženou katalytickou koncentrací AST se naopak můžeme setkat při nedostatku vitamínu B₆ (derivát vitamínu B₆ – pyridoxalfosfát je koenzymem aminotransferáz).

Gamaglutamyltransferáza (GGT)

Jedná se o enzym, který katalyzuje přenos γ -glutamylového zbytku na vhodný akceptor (peptid či aminokyselinu). Donorem bývá nejčastěji tripeptid glutation lokalizovaný v cytoplasmě a akceptorem aminokyselina umístěná mimo buňku nebo vázaná na receptor v cytoplazmatické membráně.

Nejvyšší aktivita GGT je v epitelu žlučových cest, ledvinných tubulech, játrech, pankreatu, střevě a erytrocytech. K patologickému zvýšení GGT dochází při jaterních onemocněních, což je typické při poškození jater alkoholem či jinými hepatotoxickými látkami, dále při cirhóze a steatóze jater, při obstrukci žlučových cest (zvýšená je i ALP) a při maligních nádorových onemocněních, zejména při sekundárních nádorech jater (metastázy do jater způsobují mikrocholestázu, proto dojde ke zvýšení GGT a ALP).

Kreatinkináza (CK)

Kreatinkináza katalyzuje vratnou reakci mezi kreatinem a adenosintrifosfátem (ATP) za vzniku kreatinfosfátu a adenosindifosfátu (ADP). Reakce má význam především pro energetický metabolismus svalu.

CK se nachází v cytoplasmě mitochondriálních buněk kosterního svalstva, srdce a mozku. Jeho molekula se skládá ze dvou podjednotek: M (muscle) a B (brain). Jejich vzájemnou kombinací vznikají 3 izoenzymy: svalový (CK-MM), srdeční (CK-MB) a mozkový (CK-BB). Izoenzym CK-MM nacházíme především v kosterním a srdečním svalu, izoenzym CK-BB se vyskytuje v mozku, v krvi jej nalezneme pouze vzácně, důvodem je existence hematolickorové bariéry, dále ho můžeme pozorovat také ve střevě a prostatě. Izoenzym CK-MB je obsažen především v srdečním svalu (20 %), nelze ho však považovat za specifický marker pro myokard, protože až 3 % tohoto izoenzymu se nachází v kosterním svalstvu.

V praxi se stanovuje podíl CK-MB na celkové aktivitě CK v séru. Čím je tento podíl vyšší, tím je větší pravděpodobnost, že je kardiálního původu.

Zvýšená aktivita CK může být následkem onemocnění kosterních svalů (svalová dystrofie), zhmoždění svalů, resuscitace, užívání statinů, šoku, svalové námahy především u netrénovaných jedinců, křečových stavů atd. Dalším důvodem výrazného vzestupu koncentrace CK je onemocnění srdečního svalu (infarkt myokardu – nárůst 4–8 hodin po ataku, maximum za 24 hod), operace srdce.

Hydrolázy – skupina enzymů štěpící hydrolyticky kovalentní vazby ve sloučenině. Podskupinami jsou esterázy, glykosidázy, peptidázy a amidázy. Nejznámějším představitelem této skupiny enzymů je alkalická fosfatáza.

Alkalická fosfatáza (ALP)

Jedná se o membránově vázaný enzym, který v alkalickém prostředí katalyzuje hydrolytické štěpení monoesterů kyseliny fosforečné na fosfátový aniont a příslušný alkohol nebo fenol, popř. katalyzuje přenos fosfátové skupiny na jiný alkohol za vzniku esteru, tzv. transfosforylace.

ALP tvoří skupina izoenzymů, mezi tři hlavní patří placentární, střevní a tkáňově nespecifická ALP, kam řadíme izoformy jaterní, kostní a ledvinnou. Můžeme se setkat i s tzv. onkogenními izoenzymy, které produkují nádorové buňky. ALP se nevyskytuje v erytrocytech a v trombocytech.

K rozlišení jednotlivých forem izoenzymů se využívá elektroforéza, nejčastěji na acetátcelulósových gelech, jejímž výsledkem je separace jaterního, kostního a střevního izoenzymu. Ke stanovení placentárního izoenzymu můžeme použít také tepelnou inaktivaci (zahřátí na 56 °C po dobu 15 min), kterou inaktivujeme kostní izoenzym, a tak můžeme prokázat izoenzym placentární. Další možností pro stanovení izoenzymů je použití imunochemických metod.

Stanovení aktivity ALP v séru se využívá k posouzení kostních a hepatobiliárních onemocnění. Zvýšenou aktivitu ALP pozorujeme při virové, chronické, toxické alkoholové hepatitidě, při chorobách jater, obstrukci žlučových cest např. nádorem, při cirhóze jater, nádorech jater (hepatom), mononukleóze, při kostních nádorech (resp. metastázy primárního nádoru z kostních buněk), metastatickém postižení kostí při karcinomu prostaty (karcinom prostaty tvoří osteoplastické metastázy), osteosarkomech, při frakturách kostí, křivici (nedostatek vitamínu D). Stanovení aktivity ALP společně s ALT, AST, GGT a bilirubinem se využívá jako součást screeningového testu při vyšetření jater a žlučových cest.

Alfa-amyláza (AMS)

Katalyzuje štěpení α -1,4-glykosidických vazeb v molekulách škrobu a glykogenu za účasti vody. Výsledkem štěpení jsou oligosacharidy. Ty se dále štěpí na disacharidy maltózu, izomaltózu a glukózu.

Alfa-amylázu produkuje slinivka břišní (pankreas) a slinné žlázy, v malém množství i další orgány, jako jsou játra, vaječníky a prsní žláza. Tyto enzymy – slinný a pankreatický – se od sebe liší cukernou složkou, označujeme je jako izoenzym slinné a pankreatické amylázy. Lze je od sebe odlišit např. elektroforézou.

Amyláza má poměrně malou molekulu (M_r 55 000–60 000) a velmi snadno prochází glomerulárním aparátem.

V tubulárním systému je pak z 50 % zpětně resorbována. Zbytek je vyloučen močí.

Aktivita AMS se zvyšuje v případě akutního zánětu pankreatu, při zánětech příušních žláz, onemocnění jater. Zvláštním případem může být nález makroamylazémie, kdy vlastní enzym AMS může být navázán na molekulu imunoglobulinu, což vede k vzestupu koncentrace AMS v séru, a naopak k poklesu AMS v moči, neboť molekula AMS je po navázání na molekulu Ig tak velká, že již neprojde glomerulárním aparátem. Příčina tohoto nálezu není jednoznačně objasněna.

Cholinesteráza (CHS)

Rozlišujeme dvě formy tohoto enzymu – acetylcholin acetylhydrolázu (acetylcholinesteráza) a acetylcholin acylhydrolázu označovanou jako pseudocholinesterázu.

Jedná se o skupinu enzymů, které katalyzují hydrolytické štěpení esterů cholinu. Acetylcholinesteráza se vyskytuje v mozku, nervových buňkách a v erythrocytech, zatímco pseudocholinesteráza je syntetizována játry. Klinicky významné je snížení hladiny cholinesterázy v séru, které je typické pro poškození jater, nedostatek bílkovin v potravě (játra nemají z čeho CHE syntetizovat), intoxikaci organofosfáty (inhibují acetylcholinesterázu).

Lipáza (LPS)

Jedná se o enzym, který katalyzuje hydrolýzu triacylglycerolů na monoacylglyceroly a mastné kyseliny. V organismu existuje několik druhů lipázy, z klinického hlediska je nejvýznamnější pankreatická lipáza, která je vylučována binárními buňkami pankreatu do duodena společně s kolipázou a účastní se na trávení lipidů z potravy. Kolipáza je protein nezbytný pro aktivaci pankreatické lipázy, inhibované solemi žlučových kyselin. Pankreatická lipáza štěpí pouze estery dlouhých mastných kyselin. Triacylglyceroly musí být nejprve emulgovány, neboť k jejich hydrolýze dochází jen na rozhraní vodné a tukové fáze. Pankreatická lipáza se v malém množství dostává i do krevní plazmy. Filtrují ji ledviny, dostává se do primární moči, avšak v tubulech je zpětně resorbována a degradována, takže na rozdíl od amylázy se v moči nevyskytuje.

Jaterní lipáza (hepatální lipáza) štěpí triacylglyceroly, monoacylglyceroly i fosfolipidy. Vyskytuje se na endotelu jaterních kapilár. K aktivaci nevyžaduje kofaktor. Její fyziologickou funkcí je odbourávání lipoproteinů bohatých na triacylglyceroly a degradace HDL-lipoproteinů, zvláště HDL₂.

Dalším typem je lipoproteinová lipáza, která hydrolyzuje triacylglyceroly lipoproteinů typu VLDL a chylomikronů a je obsažená v buňkách endotelu.

Na patologickém zvýšení LPS se podílí onemocnění pankreatu, především akutní pankreatitida. Na rozdíl od amylázy nestoupá při onemocnění slinných žláz a ledvin.

Oxidoreduktázy – enzymy katalyzující oxidačně-redukční reakce

Glutamátdehydrogenáza (GMD)

Glutamátdehydrogenáza je mitochondriální enzym. Hraje významnou roli v dusíkovém a glutamátovém metabolismu a je důležitá k udržení energetické homeostázi.

GMD se vyskytuje v jaterní tkáni, mozku, slinivce břišní a ledvinách. GMD má význam jak pro syntézu, tak pro katabolismus glutamátu a detoxikaci amoniaku.

Ke zvýšení jeho koncentrace dochází při těžkém poškození jaterních buněk. Je mírou rozsahu nekrotického procesu v játrech. Společně s dalšími enzymy se využívá rovněž pro diferenciaci jaterních onemocnění.

Laktátdehydrogenáza(LD)

LD je enzym, který katalyzuje reverzibilní přeměnu pyruvátu na laktát – jedná se o poslední reakci anaerobní glykolýzy. Z toho plyne i jeho výskyt, nacházíme jej v cytoplazmě všech buněk.

Molekula LD má tetramerní strukturu tvořenou dvěma různými podjednotkami – H (heart) a M (muscle). Jejich vzájemnou kombinací vzniká pět izoenzymů LD. K jejich rozlišení je možné využít elektroforetických technik. S jednotlivými izoenzymy se můžeme setkat pod označením LD1 až LD5, resp. H₄, H₃M, H₂M₂, HM₃, M₄. Isoenzymy s podjednotkou H jsou schopné na rozdíl od podjednotky M katalyzovat i oxidaci homologického substrátu LD a to α-hydroxybutyrátu.

LD se vyskytuje téměř ve všech buňkách těla. V jednotlivých tkáních se liší poměrem izoenzymů. Isoenzym H₄ (LD₁) převažuje v myokardu a erytrocytech, naopak M₄(LD₅) v játrech a některých typech vláken kosterního svalu. Isoenzymy LD₃ a LD₄ se vyskytují v monocytech. V ostatních tkáních je jiný poměr izoenzymů, není však specifický, a nelze jej proto využít pro diagnostické účely.

LD se vyskytuje také v likvoru a jeho stanovení se využívá pro diagnostiku některých neurologických onemocnění, zejména k rozpoznání meningitid a jejich etiologie.

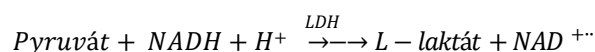
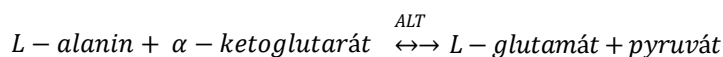
LD produkují také nádorové buňky. Zvýšenou aktivitu nalézáme ve výpotku karcinomatózního původu.

8.9 Analytické stanovení vybraných jaterních parametrů

V diagnostice se uplatňují především metody spektrofotometrické pro stanovení aktivit enzymů (ALT, AST, GGT, ALP). Uvědomte si, že jde o kinetické stanovení. Stanovení bilirubinu je popsáno v další kapitole.

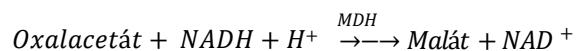
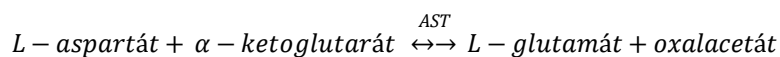
8.9.1 Stanovení aktivity ALT

Stanovení aktivity ALT je založeno na měření poklesu absorbance reakční směsi při 340 nm, dané změnou koncentrace redukované formy NADH na oxidovaný koenzym oxidoreduktáz NAD⁺ (nikotinamidadenindukleotid) ve spřažené reakci s laktátdehydrogenázou. Reakce vyžaduje přídavek pyridoxalfosfátu (P5P; kofaktor přenosu aminoskupin). Koncentrace NADH je měřena jako jeho absorbance při λ = 340/410 nm, pokles absorbance je přímo úměrný aktivitě ALT. Jedná se o metodu doporučenou IFCC (International Federation of Clinical Chemistry).



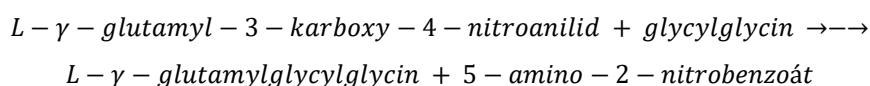
8.9.2 Stanovení aktivity AST

Stanovení aktivity AST je obdobné jako stanovení aktivity ALT. Reakce probíhají v přebytku P5P (metoda IFCC). Koncentrace NADH je měřena jako pokles absorbance při λ = 340/410 nm, který je úměrný aktivitě AST.



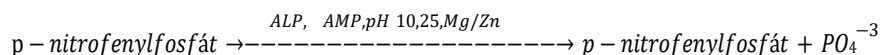
8.9.3 Stanovení aktivity GGT

GGT katalyzuje přenos γ-glutamylové skupiny z jednoho peptidu na jiný peptid, L-aminokyseliny, jiné molekuly substrátu nebo vody. Rychlost vzniku 5-amino-2-nitrobenzoátu je měřena při 410/478 nm a je úměrná aktivitě GGT.



8.9.4 Stanovení aktivity ALP

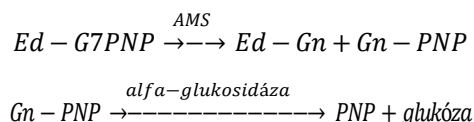
Stanovení aktivity ALP se provádí v tzv. transfosforylačních pufrch. Jako substrát slouží 4-nitrofenylfosfát, který je účinkem ALP hydrolyticky rozštěpen. Fosfátová skupina je přenesena na pufr (pH 10,1 - 10,2). Měří se přírůstek absorbance při 401 až 420 nm, který je dán uvolněným žlutým 4-nitrofenolátem. Pro zachování stálého pH během reakce v hodnotách 10,25 se používá pufr 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP). Pro dosažení aktivace a stabilizace enzymu se do AMP pufru přidávají ionty hořčíku a zinku.



8.9.5 Stanovení aktivity AMS

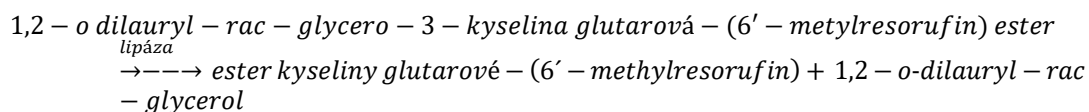
Stanovení aktivity amylázy je založeno na štěpení tzv. chromogenního substrátu a měření zbarvení uvolněného chromogenu (chromogenní či chromolytické metody). Metoda IFCC využívá jako substrát 4,6-ethyliden(G1)-4-NP(G7)- α -(1 \rightarrow 4)-D-maltoheptaosid. Působením α -AMS je substrát hydrolyzován na různé oligosacharidy, obsahující buď ethyldenovou skupinu nebo 4-nitrofenol (4-NP). Oligosacharidy obsahující 4-NP jsou degradovány pomocným enzymem α -glukosidázou na glukózu a 4-nitrofenol, jehož absorbance se měří při 405 nm.

Test Atellica používá jako substrát p-nitrofenyl maltoheptaosid blokový etyldenovou skupinou. V tomto testu se používá také indikační enzym α -glukosidáza používaný pro uvolnění p-nitrofenolu (PNP). Absorbance uvolněného p-nitrofenolu se měří při vlnové délce 410/694 nm.



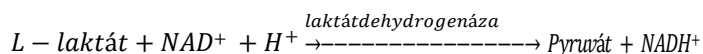
8.9.6 Stanovení aktivity lipázy

Ester 1,2-O-dilauryl-glycero-3-glutarové kyseliny a 4-metylresorufinu se štěpí na nestabilní ester s kyselinou glutarovou a dále na barevný 4-metylresorufin, který se spektrofotometricky měří. Reakce má dva kroky. Chromogenní substrát lipázy, DGGMR, 1,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-kyselina glutarová-(6'-metylresorufin) ester je štěpen katalytickým účinkem lipázy za vzniku 1,2-O-dilauryl-racglycerolu a nestabilního meziprojektu, kyselina glutarová-(6'-metylresorufin) esteru. Ten se v alkalickém prostředí spontánně rozkládá na kyselinu glutarovou a metylresorufin. Aktivita lipázy ve vzorku je přímo úměrná produkci metylresorufinu při reakci a je měřena spektrofotometricky při vlnové délce 571/694 nm.



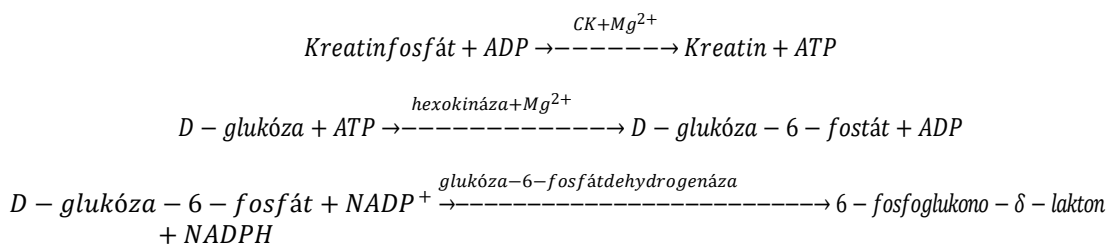
8.9.7 Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy

Laktátdehydrogenáza (LD) katalyzuje přeměnu L-laktátu na pyruvát za přítomnosti nikotinamidadeninukleotidu (NAD). Enzymatická aktivita LD je úměrná rychlosti tvorby NADH (redukovaný NAD). Množství vytvořeného NADH je dáno měřením vzrůstu absorbance při vlnové délce 340/410 nm.



8.9.8 Stanovení aktivity kreatinkinázy

Kreatinkináza reaguje s kreatinfosfátem a adenosindifosfátem (ADP) za vzniku adenosintrifosfátu (ATP), přičemž reakce je spojena s reakcí hexokinázy-G6PD (glukóza-6-fosfátdehydrogenázy), a tvoří se NADPH. Koncentrace NADPH se měří nárůstem absorbance při 340/596 nm.



Další doporučené zdroje k této kapitole:

1. Čermáková M. *Klinická biochemie*. 2 díl. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005.
2. Racek J., Rajdl D. et al.: *Klinická biochemie*. 3., přepracované vydání. Praha: Galén, 2021.
3. SEKK [online]. [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.sekk.cz/>.
4. Zima T. *Laboratorní diagnostika*. 3., doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén – Karolinum, 2013.

Shrnutí kapitoly

Enzymy jsou biokatalyzátory odpovědné za katalýzu chemických reakcí v živém organismu. Poruchy ve funkci jednotlivých enzymů mají za následek řadu chorob. Enzymy, které ke své funkci vyžadují přítomnost koenzymů, katalyzují reakce, při nichž dochází k přenosu skupin, izomerizaci, syntéze kovalentních vazeb, oxidaci a redukci. Měření katalytické aktivity je základem kvantitativního stanovení enzymů v klinických laboratořích. Většina enzymů se v laboratořích stanovuje spektrofotometricky, kdy měříme změnu absorbance za jednotku času při 340 nm spojené s oxidací či redukcí NAD(P)⁺/NAD(P)H. Mezi nejznámější enzymy patří ALT, AST, GGT, ALP, AMS, LPS.

Otázky úkoly:

1. Jaký je rozdíl mezi koenzymem a prostetickou skupinou?
2. Jaké jsou vlastnosti enzymů?
3. Vysvětlíte pojem katalytická aktivita.
4. Co je to Michaelisova konstanta?
5. Jaké třídy enzymů známe?
6. Který z enzymů má význam při diagnostice infarktu myokardu?
7. Jaké známe izoenzymy laktátdehydrogenázy?
8. Který z enzymů má zvýšenou aktivitu při akutní pankreatitidě?

9 METABOLISMUS MINERÁLNÍCH LÁTEK A VODY, OSMOLALITA

V této kapitole se dozvíte:

V této kapitole se dozvíte, co je to vnitřní prostředí, o distribuci vody a iontů v buňce, v mezibuněčném prostoru, v krvi, o regulaci a stálosti vnitřního prostředí, o zastoupení hlavních iontů v jednotlivých kompartmentech, co je to osmolalita.

Klíčová slova této kapitoly:

Vnitřní prostředí, voda, sodík, draslík, chloridy, osmolalita.

Čas potřebný k prostudování učiva kapitoly: 4 hodiny (teorie + řešení úloh)

9.1 Vnitřní prostředí

Pojem vnitřní prostředí byl definován v roce 1878 významným vědcem a lékařem C. Bernardem. Za vnitřní prostředí se považovala tekutá část krve, krevní plazma plus všechny tekutiny omývající buňky a tkáně organismu. Vnitřním prostředím lze tedy označit *tekutinu, která je v přímém styku s jednotlivými buňkami*. Buňky z ní přijímají vše potřebné pro svůj metabolismus, a naopak do ní vydávají nepotřebné odpadní látky. Objem a složení vnitřního prostředí jsou stálé. Stálost vnitřního prostředí je nezbytnou podmínkou života vyšších organismů. Nejedná se však o statický, ale dynamický stav, o dynamickou rovnováhu všech procesů, které vlastnosti vnitřního prostředí ovlivňují. Hovoříme o *homeostáze vnitřního prostředí, která je zajištěna* stabilitou objemu, průtoku tělesných tekutin, stabilitou iontového složení, pH i stabilitou teploty.

9.2 Voda a elektrolyty

V živých organismech tvoří voda hlavní složku podílející se na složení vnitřního prostředí a na transportních procesech. Je výchozím i konečným produktem mnoha biochemických reakcí, slouží jako rozpouštědlo, rozvádí teplo. Celková tělesná voda může být rozdělena do několika tělesných prostor, a to intracelulární (ICT – uvnitř buněk), extracelulární (ECT – vně buněk), která se dále dělí na složku intravazální (IVT – uvnitř cév) a intersticiální (IST – mezibuněčná tekutina), Tabulka 9.1. Dále to může být tzv. transcelulární tekutina (TCT), kterou nelze zahrnout k žádné ze složek ECT. Jedná se o cerebrospinální mok, kloubní tekutinu a tekutinu v trávicím ústrojí. Za patologických situací lze nalézt tekutiny i v třetím prostoru – můžeme zde zařadit tekutiny hromadící se v ileu či peritoneu. Tělesné tekutiny představují krystaloidní a koloidní roztoky organických a anorganických látek. Koncentrace elektrolytů je u většiny organismů stálá a je přísně regulována. Protože se elektrolyty v organismu ani netvoří, ani nespotebouvávají, podstatnou roli v tomto procesu hraje příjem a výdej iontů spolu s mechanismy udržujícími stálost vnitřního prostředí.

Podíl celkové tělesné vody (CTV) na celkové tělesné hmotnosti (CTH) je rozdílný u mužů a žen a závisí také na věku jedince: muži – 62 %, muži po 60. roce – 54 %, ženy – 51 %, ženy po 60. roce – 46 % (vyšší podíl tukové tkáně), novorozenci – 76–78 %, půlroční děti – 72 %, jednorocní děti – 65 %.

Relativně větší podíl na celkové tělesné hmotnosti má tuková tkáň u obézních jedinců. V jejich případě je proto nutné počítat s nižším podílem celkové tělesné vody na celkové tělesné hmotnosti, u hubených lidí je tomu naopak. V praxi se nejčastěji setkáváme s tím, že se uvažuje 60% podíl celkové tělesné vody na celkové tělesné hmotnosti u mužů a 55% podíl u žen.

Tabulka 9.1: Zastoupení vody v jednotlivých kompartmentech organismu

Celková tělesná voda (CTV) tvoří 50-60% celkové tělesné hmotnosti (CTH)		
ICT 40% CTH <i>Intracelulární tekutina</i> (voda uvnitř buněk) tvoří 40 % CTH, z toho 30–35 % je v buňkách především svalových, 8–10 % je v pojivu, chrupavkách, kostech	ECT 20% CTH <i>Extracelulární tekutina</i> (mimo buňky)	
	IVT Intravazální tekutina (plazma) tvoří 3,5–5 % CTH	IST Intersticiální tekutina (mezibuněčná) tvoří 10–15 % CTH
TCT <i>Transcelulární tekutina</i> (likvor, voda v lumen střeva, kloubní tekutina) a tzv. <i>třetí prostor</i> (patologické hromadění tekutin v ileu, peritoneu atd.). Celkové množství TCT obvykle nepřesahuje 500 ml, po jídle však roste na 2–3 litry. Objem tekutin v třetím prostoru závisí na patologickém stavu.		

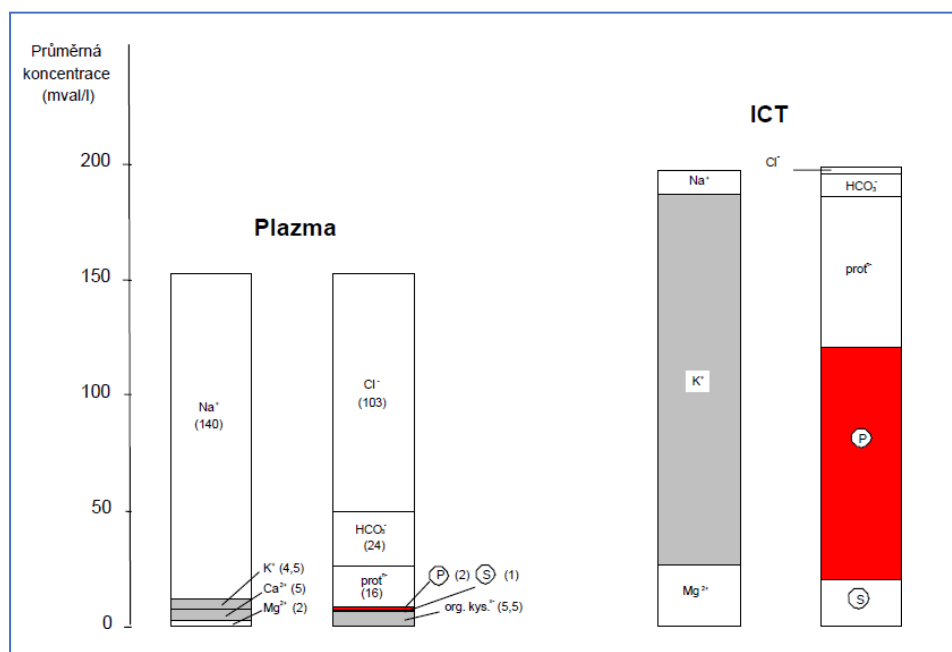
Rozdíl není jenom v rozdělení tekutin mezi jednotlivé kompartmenty, ale i v iontovém složení mezi nimi, např. hlavním kationtem intracelulární tekutiny je *kálium* (K^+) a hlavními anionty jsou *fosfáty* a *bílkoviny*. V případě intravaskulární a intersticiální tekutiny to jsou *sodný kation* (Na^+) a *chloridy* (Cl^-), *popř. hydrogenuhličitan* (HCO_3^-), Tabulka 9.2.

Tabulka 9.2: Tabulka koncentrací kationtů a aniontů v jednotlivých tělních tekutinách

Ionty	Plazma	ICT	IST
	mmol.l ⁻¹		
Na⁺	141	10	143
K⁺	4	155	4
Ca²⁺	2,5	< 0,001	1,3
Mg²⁺	1	15	0,7
Cl⁻	103	8	115
HCO₃⁻	25	10	28
Prot.	17	47	1
pH	7,4	7,4	7,4

Iontové složení plazmy a intersticiální tekutiny je téměř shodné. IST představuje ultrafiltrát krevní plazmy s minimem bílkovin. Aby byla i v IST zachována elektroneutralita v nepřítomnosti bílkovin, musí se ustavit nová (tzv. Gibbsova-Donnanova) rovnováha. Proto je koncentrace aniontů (Cl^- , HCO_3^-) v IST vyšší než v plazmě a koncentrace Na^+ naopak lehce nižší. Bílkoviny krevní plazmy nemohou unikat z cévního řečiště a vážou na sebe určité množství vody. Tím se vytváří **koloidně osmotický (onkotický) tlak**. Proti tomuto tlaku působí tlak krve, který je na počátku kapilárního řečiště větší než onkotický tlak, a naopak na konci kapilár je vyšší. To umožňuje, že na počátku kapilárního řečiště tkáně dochází k filtraci určitého podílu tekutiny z krve do intersticia a v oblasti koncových úseků kapilár je tomu naopak a většina intersticiální tekutiny je nasávána zpět do krevního řečiště.

Ionogram plazmy, viz Obrázek 9.1, názorně ukazuje, že počet nábojů (ekvivalentů) kationtů se rovná počtu nábojů aniontů a je zachována celková elektroneutralita.



Obrázek 9.1: Schematické znázornění koncentrací hlavních kationtů a aniontů v extracelulární tekutině (plazmě). (Prot⁻ = proteiny ve formě aniontů, RA⁻ = residuální čili zbytkové anionty, tzn. fosfáty, sírany, laktát a další zbytky organických kyselin.) Složení intracelulární tekutiny je v jednotlivých tkáních odlišné, diagram uvádí nejčastěji prezentované zastoupení. (zdroj: Švagera – vlastní).

9.4 Zevní vodní bilance

Pojem vodní bilance představuje rozdíl mezi příjmem a výdejem tekutin. Za normálních okolností je obsah vody v těle výsledkem vyrovnané vodní bilance, tedy konstantní.

Průměrný denní **příjem vody** – cca 2,5 l – sestává z:

- nápojů (1,5 l)
- vody v potravě (0,6 l)
- oxidační vody vzniklé při metabolismu (0,4 l).

Výdej vody musí být stejně velký jako příjem vody – sestává z:

- vody vyloučené močí (1,5 l)
- vody vydané dýcháním a kůží (0,95 l)
- vody vydané stolicí (0,05 l).

Pokud je příjem tekutin vyšší, je vyšší vylučování močí a následně zvýšený výdej vede k pocitu žízně. Při nemoci, kdy pacient nepřijímá potravu, nelze doplňovat pouze to množství vody, které vyloučí močí, ale je nutné počítat i s množstvím vody v potravě, která chybí, a se zvýšenými ztrátami při hyperventilaci (intenzivním dýcháním), zvýšeném pocení, horečkách a také při zvýšeném metabolismu (např. při tyreotoxikóze). Při pocení lze jen těžko měřit množství vyloučené vody, ztráty dýcháním lze odhadnout výpočtem z alveolární ventilace a tělesné teploty. V některých případech (onemocnění ledvin) je základní metodou sledování vodní bilance **vážení pacienta**. Naopak, v případě, že pacient normálně jí, je potřeba počítat při sledování vodní bilance i s vodou v potravě.

Obrat vody činí u dospělého průměrně **1/30** tělesné hmotnosti, u kojence mnohem více až **1/10** tělesné hmotnosti (proto jsou kojenci velmi citliví na poruchu vodní bilance).

9.5 Elektrolyty (natrium, kálium, chloridy)

9.5.1 Natrium (Na⁺) – hlavní kation extracelulární tekutiny

Jeho relativně stálá koncentrace v ECT je udržována aktivitou sodno-draselné pumpy (ATPázy). Hlavní úlohou této pumpy je transport iontů Na⁺ ven z buňky a K⁺ do buňky, čímž vzniká koncentrační a potenciálový rozdíl na

membráně, který umožňuje transport různých látek, jako jsou glukóza, kalcium, fosfáty, chloridy a aminokyseliny. Dále pumpa zajišťuje udržení buněčného objemu a tvorbu akčních potenciálů na membráně. Činnost pumpy podmiňuje přítomnost iontů Mg^{2+} . V případě, že by se zastavila či omezila činnost této pumpy, došlo by k přesunům iontů včetně iontů kalcia a poruchám kontraktility cév nebo myokardu. Činnost pumpy je možné ovlivnit srdečními glykosidy (digoxin, ouabain).

Z celkového množství sodíku přítomného v organismu se asi polovina nachází v kostech. V ECT je Na^+ kolem 2000 mmol, tj. 140 mmol.l^{-1} (v asi 14 litrech ECT).

Na^+ se podílí také na udržování stálého objemu tělesných tekutin. Ve formě $NaHCO_3$ ovlivňuje acidobazickou rovnováhu (ABR), činnost nervů a svalů.

Denní příjem Na^+ je 50–300 mmol. Je vylučován ledvinami, chová se jako prahová látka. V tubulech se resorbuje až 99 % Na^+ (regulace osmotického tlaku v ECT), resorpci řídí hormon aldosteron (Regulace „Renin-angiotenzin – aldosteron“).

9.5.2 Kálium (K^+) - hlavní kation ICT, ale je důležitý i v ECT.

Draselný kationt ovlivňuje činnost mnoha tkání i orgánů, např. svalstva, dýchacího systému kardiovaskulárního systému, nervového systému, ledvin. Je nepostradatelný v procesu růstu a dělení buněk. Zásadní funkci má v elektrických procesech nervového systému pro vedení nervosvalové dráždivosti. Uvnitř buněk se spolu s fosfáty a bílkovinami podílí na udržení osmotického tlaku buňky a jeho koncentrace se zde udržuje činností sodíkodraslíkové pumpy. Podílí se na tvorbě i rozpadu makroergních vazeb, hlavně adenosintrifosfátu (ATP).

Zdrojem draslíku je ovoce, zelenina a výrobky z nich připravené. Draslík je resorbován především v horních oddílech gastrointestinálního traktu. Nejdůležitějším mechanismem transportu je právě sodnodraselná pumpa. Asi 90 % draslíku se za fyziologických okolností vylučuje ledvinami, a to i při jeho nedostatku. Aldosteron především ovlivňuje jeho výdej opačným směrem, než v případě natria (Na^+) (resorpce natria = ztráta kalia). Organismus paradoxně více šetří sodíkem, kterého je v přírodě dostatek než draslíkem, jehož je méně (pozůstatek evoluce). Jeho koncentrace v plazmě závisí na pH, acidóza podporuje únik kalia z buňky, proto při nižším pH bude v plazmě vyšší koncentrace tohoto iontu (K^+) a opačně. Z toho vyplývá, že pro posouzení stavu zásob draslíku v organismu nestačí znát pouze hladinu kalia v séru/plazmě, ale i aktuální pH měřeného vzorku.

9.5.3 Chloridy (Cl^-) - hlavní anion ECT

Chloridy doprovázejí sodík a spolu s ním se podílejí na udržování osmotického tlaku ECT. Současně mají význam pro udržování acidobazické rovnováhy, kdy při poklesu koncentrace chloridových iontů vzrůstá koncentrace hydrogenuhličitanů, což vede k rozvoji metabolické alkalózy, naopak zvýšená koncentrace chloridových iontů vede k poklesu koncentrace hydrogenuhličitanů a rozvíjí se metabolická acidóza. Chloridy mají význam také pro tvorbu kyselého žaludeční šťávy.

Koncentraci chloridů ovlivňuje hlavně aldosteron.

Chloridy stejně tak jako sodík přijímáme potravou ve formě $NaCl$. Ztráty Cl^- závisejí na jejich příjmu a za fyziologických okolností jsou stejné jako ztráty Na^+ . Vylučování je obdobné jako u Na^+ , jsou filtrovány v glomerulu a následně reabsorbovány v tubulárním systému. Nadměrné ztráty Cl^- močí mohou souviset s hypofunkcí nadledvin, popř. s podáváním diuretik. Současně se na zvýšených ztrátách Cl^- může podílet dlouhotrvající zvracení, nadměrné pocení.

9.6 Poruchy v hospodaření s vodou a $NaCl$

Dehydratace

- **izotonická:** ztráta izotonické tekutiny – zvracení, průjmy, ztráta krve, diuretická léčba; projevy: žízeň, únava, slabost, urémie,

- **hypotonická:** ztráta Na^+ (hyponatrémie – příčina: ztráty močí, např. po thiazidových diureticích, při selhání ledvin, nedostatečná produkce aldosteronu, ztráty sekrety GIT, potem při práci v horkých provozech nebo při sportovních výkonech aj.) – voda přechází do buněk (nitrobuněčný edém), snížený objem ECT, současně ale vzniká nadbytek vody, otrava vodou, zhoršení funkce ledvin (přitom jsou nutné pro obnovu rovnováhy); projevy: slabost, obluženost, cerebrální křeče, horečka,

- **hypertonická:** nedostačující přívod vody (hypernatrémie), voda z buněk přechází do ECT; projevy: velká žízeň, suché sliznice, snížené napětí (turgor) kůže, oligurie s vysokou specifickou hmotností moče.

Hyperhydratace

- **izotonická:** nedostatečné vylučování či retence Na^+ (vznik edémů),

- **hypotonická:** nadměrný příjem prosté vody, porucha vylučování vody (hyponatrémie), nitrolební tlak; projevy: nausea, zvracení, zmatenost,
- **hypertonická:** (vzácná) větší přísun Na^+ než vody (pití mořské vody), hypernatrémie, těžká poškození mozku.

Izolovaná hypochlorémie

Koncentrace chloridových aniontů sleduje všeobecně koncentraci sodíkových kationtů a podléhá stejným regulacím. K izolované hypochlorémii dochází např. po úporném zvracení nebo odsávání žaludeční šťávy (zde jsou pak chloridy nahrazovány bikarbonáty a dochází k hypochloremické alkalóze), může dojít až k žaludeční tetanii.

9.7 Poruchy v hospodaření s draslíkem

Hyperkalémie: $\text{cK}^+ > 5,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, porucha vylučování draselného kationtu ledvinami, případně při snížené činnosti kůry nadledvin. Postiženo je především srdce (poruchy dráždivosti).

Hypokalémie: $\text{cK}^+ < 3,5 \text{ mmol.l}^{-1}$; nedostatečný příjem v potravě, ztráta draslíku (např. porucha resorpce, ztráty ve střevě při průjmech i jinak): neuromuskulární symptomy (chabá obrna, apatie), postižení hladkého svalstva, srdeční poruchy až zástava.

Alkalóza: hypokalémie (K^+ přechází do buněk; tento pochod podporuje hormon pankreatu *inzulin*).

Acidóza: hyperkalémie (K^+ přechází z buněk do extracelulárního prostoru).

Důležité je i sledovat odpad Na^+ a K^+ v moči. Poměr Na^+/K^+ je ukazatelem funkce kůry nadledvin.

Je třeba mít na paměti, že sérové koncentrace K^+ (kalémie) neodráží celkové zásoby draslíku díky převaze intracelulární koncentrace (zásob).

Běžně uváděné **referenční hodnoty** koncentrací hlavních iontů v séru (mohou se částečně lišit podle zdroje i podle použité metody):

Na^+ : 135–145 mmol.l^{-1} ,

K^+ : 3,5–5,5 mmol.l^{-1} ,

Cl^- : 93–109 mmol.l^{-1} .

9.8 Osmolalita

Osmolalita závisí na **počtu částic v roztoku** bez ohledu na jejich velikost. Vyjadřuje se v molech částic obsažených v 1 kg rozpouštědla (**mmol.kg^{-1}**). Pokud membrána odděluje roztok částic od čisté vody, působí rozpuštěné částice na membránu tlakem. Osmolalitu lze vyjadřovat i jako osmotický tlak (Pa). Stejnou osmolalitu bude mít roztok obsahující 1 mol glukózy, močoviny i vysokomolekulárního albuminu. NaCl bude mít osmotický tlak dvojnásobný, protože disociuje na dvě částice 1 mol Na^+ a 1 mol Cl^- .

Osmolalitu vypočítáme pomocí vzorce:

$$2 [\text{Na}^+] + [\text{glukóza}] + [\text{urea}] = \text{OSM} [\text{mmol.kg}^{-1} \text{ vody}]$$

Za extrémně patologických stavů neodpovídá vypočtená osmolalita změřené hodnotě.

Změřená osmolalita je vyšší než vypočtená osmolalita v případě přítomnosti např. etanolu v organismu. 1 promile etanolu zvýší osmolalitu až o 23 mmol.kg^{-1} . (etanol je rovněž osmoticky aktivní).

Klinický význam měření osmolality:

- odhaluje poruchy v metabolismu vody,
- pomáhá rozpoznat druh diabetického komatu,
- využívá se při sledování všech typů šoků,
- používá se k posouzení koncentrační schopnosti ledvin,
- nepřímá diagnostika intoxikací etanolem, metanolem, etylenglykolem, izopropylalkoholem (změřená osmolalita je větší, než by odpovídalo výpočtu dle vzorce).

Hodnoty osmolality jsou identické ve všech tělesných kompartmentech, přičemž se voda neustále redistribuuje tak, aby tato podmínka byla zajištěna. **Normální hodnoty osmolality v plazmě jsou 275–295 mmol.kg^{-1} .**

9.9 Analytické stanovení iontů a osmolality

V diagnostice se uplatňují především metody potenciometrie s využitím iontově selektivních elektrod a v případě osmolality kryoskopické metody.

9.9.1 Stanovení sodného, draselného a chloridového iontu

Stanovení těchto iontů je založeno na potenciometrickém stanovení založené na měření rozdílu elektrického potenciálu (napětí) mezi dvěma elektrodami, a to indikační a referenční při nulovém elektrickém proudu. V případě stanovení těchto iontů se využívá jako indikačních elektrod – iontově selektivních elektrod (ISE), což jsou elektrochemická čidla, která umožňují selektivní měření aktivity iontů, tzn. změna potenciálu je primárně způsobena stanovovaným iontem. Měření probíhá nejčastěji tak, že je vzorek (sérum, plazma, moč) v biochemickém analyzátoru před stanovením naředěn (nepřímá potenciometrie), čímž je zajištěno konstantní pH a iontová síla roztoku. Pufrovaný vzorek je následně dopraven do senzoru, kde dochází ke změně elektrického potenciálu mezi indikační ISE elektrodou a referenční elektrodou. Velikost změny potenciálu mezi indikační elektrodou a referenční elektrodou odpovídá koncentraci daného iontu.

Koncentrace iontů se určuje podle Nernstovy rovnice pomocí hodnoty vzorku o známé koncentraci.

$$E = E_{IS} + S * \log c,$$

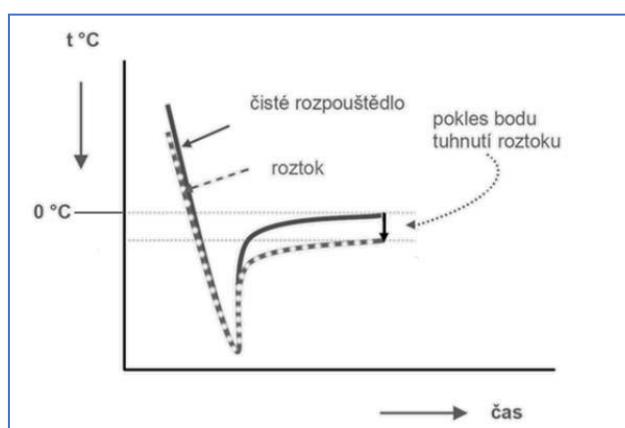
kde E_{IS} = konstantní potenciál referenční elektrody, S = směrnice, c = koncentrace iontů v naředěném vzorku.

V případě stanovení K^+ iontově selektivní membrána obsahuje specifický nosič draselných iontů, kterým je neionogenní makrocyclické antibiotikum valinomycin na porézním PVC nebo teflonovém nosiči.

Pozn.: V případě analyzátorů acidobazické rovnováhy je využita přímá potenciometrie, při které vzorek není ředěn, ale je použita přímo plná krev.

9.9.1 Stanovení osmolality

Stanovení osmolality se provádí nejčastěji kryoskopicky, při které se využívá snížení teploty tuhnutí roztoku v závislosti na koncentraci částic v roztoku. Osmolalita se měří osmometry vybavenými citlivými teploměry. Při kryoskopickém stanovení osmolality neinterferuje ani hemolýza či alkohol. **Kryoskopie** využívá měření snížení bodu tuhnutí roztoku oproti vodě. Jinými slovy, koncentrace osmotických aktivních částic ovlivňuje bod tuhnutí roztoku, viz Obrázek 9.2.



Obrázek 9.2: Grafické znázornění měření snížení bodu tuhnutí. Kryoskopie (převzato: zdroj č. 5)

Shrnutí kapitoly

Vnitřním prostředím lze tedy označit *tekutinu, která je v přímém styku s jednotlivými buňkami*. Objem a složení vnitřního prostředí jsou stálé. Hovoříme o *homeostáze vnitřního prostředí*. Celkovou tělesnou vodu rozdělujeme na intracelulární (ICT), extracelulární (ECT), která se dále dělí na složku intravazální (IVT) a intersticiální (IST). Dále to může být transcelulární tekutina, kterou nelze zahrnout k žádné ze složek ECT. Za patologických situací se tekutiny nacházejí i v třetím prostoru. Hlavním kationtem ICT je kálium a hlavními anionty jsou fosfáty a bílkoviny. V případě IVT a IST to jsou sodík a chloridy, popř. bikarbonáty. Vodní bilance představuje rozdíl mezi příjmem a výdejem tekutin. Za normálních okolností je obsah vody v těle výsledkem vyrovnané vodní bilance, tedy konstantní. Mezi základní elektrolyty řadíme natrium, kálium a chloridy. Normální hodnoty osmolality v plazmě jsou 275–295 mmol.kg⁻¹. Normální hodnoty osmolality v moči se pohybují v rozmezí 328–1128 mmol.kg⁻¹.

Otázky úkoly:

1. Charakterizujte pojem vnitřní prostředí organismu.
2. Jak se rozděluje celková tělesná voda?
3. Jmenujte hlavní ionty intracelulární a extracelulární tekutiny.
4. Co je myšleno vodní bilancí?
5. Jaké jsou normální hodnoty osmolality v plazmě a moči?
6. Jakou úlohu v organismu zastává natrium?
7. Charakterizujte poruchy hospodaření organismu s vodou.
8. Jaké existují poruchy hospodaření s káliem?
9. Co znamená izolovaná hypochloremie?

Další doporučené zdroje k této kapitole:

1. Jabor A. a kol. *Vnitřní prostředí*. Praha: Grada 2008.
2. Masopust J. *Klinická biochemie: Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. Praha: Karolinum, 1998.
3. Racek J., Rajdl D. et al.: *Klinická biochemie*. 3., přepracované vydání. Praha: Galén, 2021.
4. Zima T. *Laboratorní diagnostika*. 3., doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén – Karolinum, 2013.
5. Lékařská chemie a biochemie I, Teorie k praktickým cvičením, 1. ročník, všeobecné lékařství, LETNÍ SEMESTR 2020/2021. [Online], [Cit 5. března 2025]. Dostupné z: https://lfp.cuni.cz/wp-content/uploads/2024/05/2021_Teorie_ChB_ZS.pdf

10 METABOLISMUS VÁPNIKU, HOŘČÍKU A FOSFORU

V této kapitole se dozvíte:

Cílem kapitoly je podání základního přehledu metabolismu vápenatých, hořečnatých a fosfátových iontů, včetně regulace hladiny těchto iontů v organismu.

Klíčová slova této kapitoly:

Vápenaté, hořečnaté a fosfátové ionty, parathormon, vitamín D, kalcitonin.

Čas potřebný k prostudování učiva kapitoly: 1 hodina a 20 minut (teorie + řešení úloh)

10.1. Úvod

Vápenaté ionty (kalcium), hořečnaté ionty (magnézium) a fosfátové ionty jsou v organismu vázány majoritně v kostech a dalších tkáních. Hlavním rozdílem je intracelulární lokalizace. Intracelulárně jsou lokalizovány především hořečnaté a fosfátové ionty. Vápenaté se v buňkách takřka nevyskytují.

V krvi se tyto ionty objevují ve velmi nízké koncentraci, která odpovídá zhruba 1 % zásob těchto iontů. V krvi je kalcium a magnézium vázáno v různých formách, a to majoritně na albumin, dále ve formě rozpustných komplexů (fosfát, laktát, citrát a uhličitán) a pak také v ionizované formě. Fosfátové ionty mají jiné rozdělení. Majoritní je difuzibilní forma a méně nedifuzibilní. Přehledně vše zobrazuje tabulka 10.1.

Tabulka 10.1: Procentuální zastoupení jednotlivých forem iontů v plazmě

Forma/ Ref. meze	Frakce	Kalcium 2,1–2,65 mmol/L	Magnézium 0,7–1,0 mmol/L	Fosfáty 0,84– 1,45 mmol/L
nedifuzibilní	vázaná na albumin	40 %	33 %	12 %
difuzibilní	vázaná v rozpustných komplexech	12 %	5–12 %	35 %
	ionizovaná	48 %	55–60 %	53 %

Je nutné si uvědomit, že pouze difuzibilní forma těchto iontů je fyziologicky aktivní a jejich koncentrace je velmi přísně regulována.

V rutinní praxi se běžně používá stanovení celkového kalcia a magnézia, tzn. všech forem, které se nacházejí v krvi. V tomto případě je ale nutné získané výsledky používané pro diagnostiku vždy hodnotit ve vztahu k pH krve a koncentraci albuminu. Koncentrace celkového kalcia a magnézia totiž ovlivňuje koncentrace albuminu a hodnota pH. Snížení koncentrace albuminu způsobí snížení koncentrace celkového kalcia, resp. magnézia vlivem poklesu nedifuzibilní formy, ale ionizovaná frakce je většinou v normě. Snížení pH způsobí snížení vazby kalcia a magnézia na albumin, které po uvolnění z vazby zvýší koncentrace svých ionizovaných forem. Tento princip funguje i obráceně. Pokud bychom chtěli znát přesnou hodnotu ionizovaných forem těchto iontů, museli bychom použít potenciometrické stanovení pomocí iontově selektivních elektrod (ISE). Odběr pro stanovení je třeba provést za anaerobních podmínek, obdobně jako u odběru pro stanovení krevních plynů.

10.2. Význam a metabolismus

Vápenaté ionty jsou významným regulátorem řady procesů v organismu obdobně jako hořečnaté a fosfátové ionty. Význam vápenatých, hořečnatých a fosfátových iontů v organismu shrnuje tabulka 10.2.

Tabulka 10.2: Význam vápenatých, hořečnatých a fosfátových iontů v organismu

Vápenaté ionty
snižují nervosvalovou dráždivost (při nízké koncentraci riziko křečí)
snižují propustnost membrán a kapilárních stěn (intravenózní aplikace pro potlačení alergické reakce)
nezbytné pro hemokoagulaci (aktivují některé koagulační faktory)
nutné pro kostní mineralizaci (hydroxyapatit)
nutné pro svalovou kontrakci
přenos signálu uvnitř buněk (2. posel)
Hořečnaté ionty
snižují nervosvalovou dráždivost (při nízké koncentraci riziko křečí)
významný kofaktor kináz a aktivátor dalších enzymů
podporují fibrinolýzu
nezbytné pro sekreci parathormonu
chrání buňku před oxidativním stresem
Fosfátové ionty
nutné pro kostní mineralizaci (hydroxyapatit)
součástí nukleových kyselin
součástí energetického metabolismu (makroergní fosfáty)
nezbytné pro sekreci parathormonu
chrání buňku před oxidativním stresem
součástí pufrčních systému organismu

Všechny zmíněné ionty člověk přijímá stravou. Hlavní vstřebávání probíhá v tenkém střevě. Vylučování se děje majoritně ledvinami pod hormonální kontrolou parathormonu a částečně i aldosteronu.

10.3 Hormonální regulace kalcia, magnézia a fosfátů

Hormonální regulace těchto iontů je velmi úzce propojena. Základním cílem hormonální regulace je koncentrace kalcia a fosfátů (normokalcémie a normofosfatémie).

O homeostázu kalcia se primárně stará parathormon, vitamín D a kalcitonin.

Parathormon (PTH) je hormon příštítných tělísek, jenž se uvolňuje v případě poklesu ionizovaného vápníku. Parathormon zvyšuje koncentraci kalcia tak, aby bylo opět dosaženo homeostázy. Tento úkol plní následujícími mechanismy:

1. uvolnění kalcia z kostí pomocí systému osteoprotegerin-RANKL,
2. zvýšení resorpce kalcia a exkrece fosfátů v ledvině,
3. aktivace α -hydroxylázy v ledvině, která přemění 25(OH)vitamín D (kalcidiol) na aktivní formu 25(OH)₂vitamínu D – kalcitriol, který stimuluje tvorbu přenašečů pro kalcium ve střevě, čímž dochází ke zvýšení resorpce kalcia ve střevě.

Kalcitonin – hormon produkovaný parafolikulárními C buňkami štítné žlázy. Impulsem pro jeho uvolnění je vysoká koncentrace kalcia. Zvyšuje kalciiúrii a fosfátúrii. Jeho efekt je ale minoritní, protože hlavním důvodem nedostatku kalcia je nejčastěji jeho nedostatek ve stravě či nedostatečná produkce PTH v příštítných tělískách.

Regulace metabolismu magnézia je téměř totožná s metabolismem kalcia, a je tedy pravděpodobně řízena obdobným systémem jako v případě kalcia. Normofosfatémie je řízena působením PTH, jak již bylo zmíněno dříve, a pak dalšími faktory, jako je např. fosfourický efekt působení fibroblast growth faktoru 23 (FGF23). Tyto znalosti stojí však již nad rámcem výuky.

10.4 Klinická interpretace

Na tomto místě se seznámíme se stručným souhrnem příčin poruch metabolismu kalcia, magnézia a fosfátů. Výsledky je vždy nutné hodnotit ve vztahu ke klinickému stavu pacienta a nálezům na zobrazovacích metodách, např. RTG, denzitometrie.

Hyperkalcémie

- primární hyperparatyreóza (může být i sekundární či terciární),
- nádorové onemocnění s metastatickým postižením kostí při nadprodukci parathormon-related proteinen (PTHrP), který má shodnou homologii s PTH,
- mnohočetný myelom,
- Pagetova choroba,
- hypofunkce nadledvin.

Hypokalcémie

- nedostatečný příjem vápníku a vitamínu D (malabsorpce, osteomalácie),
- chronické renální selhání, hypoparatyreóza, medulární karcinom.

Hypermagnezémie

- renální selhání s oligurií až anurií,
- vzrůstá při acidémii a katabolismu (vyplavuje se z buněk),
- nedostatečnost nadledvin (nemůže být vylučován ledvinami).

Hypomagnezémie

- nedostatečný příjem hořčíku (malabsorpce),
- zvýšené ztráty ledvinami,
- klesá při alkalémii a anabolismu (vstupuje do buněk).

Hyperfosfatémie

- renální selhání,
- hypoparatyreóza,
- poškození velkého množství buněk (Crush syndrom, ozařování, chemoterapie).

Hypofofosfatémie

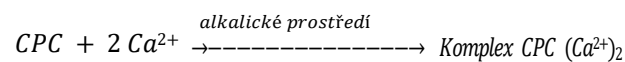
- vlivem malabsorpce či těžkého deficitu vitamínu D,
- primární hyperparatyreóza, renální poruchy,
- nádorová onemocnění.

10.5 Analytické stanovení vápníku, hořčíku a fosfátů

V diagnostice se uplatňují metody spektrofotometrické end-point. V případě stanovení ionizovaného hořčíku a vápníku se uplatňuje použití iontověselektivních elektrod.

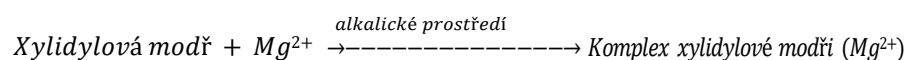
10.5.1 Stanovení celkového vápníku

Ionty vápníku tvoří s o-kresolftalein komplexonem (CPC) v alkalickém prostředí fialový komplex. Reakce se měří při 545/658 nm.



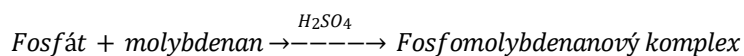
10.5.2 Stanovení celkového hořčíku

Ionty hořčíku reagují s v alkalickém prostředí s xylidylovou modří a vytváří se červenofialový komplex rozpustný ve vodě. Vzrůst absorbance xylidylové modři při vlnové délce 505/694 nm je přímo úměrný koncentraci hořčíku ve vzorku. Vápník je z reakce vyloučen vytvářením nerozpustného komplexu.



10.5.3 Stanovení fosfátů

Anorganický fosfor reaguje s molybdenanem amonným v přítomnosti kyseliny sírové, přičemž se vytvoří neredukovaný fosfomolybdenanový komplex, který se měří jako při 340/658 nm.



Shrnutí kapitoly

V této kapitole jste byli seznámeni se třemi dalšími ionty, které se nachází v krvi, a to kalcium, magnéziem a fosfáty. Mají společnou distribuci v organismu s majoritním zastoupením v kostech a tkáních a malou volnou frakcí (cca 1 %), která je ovšem fyziologicky aktivní. Hlavními regulačními hormony, které zajišťují rovnováhu těchto iontů v organismu, jsou parathormon, vitamín D. Proti kalcémii působí kalcitonin. V závěru kapitoly byly zmíněny hlavní funkce jednotlivých iontů s typickými důvody jejich nerovnováhy v organismu.

Otázky úkoly:

1. Popište význam vápenatých iontů v organismu.
2. Popište význam hořečnatých iontů v organismu.
3. Popište význam fosfátových iontů v organismu.
4. Které hormony se podílejí na regulaci magnézia, kalcia a fosfátů a jak?

Další doporučené zdroje k této kapitole:

1. Hoorn E. J., Zietse R. Disorders of calcium and magnesium balance: a physiology-based approach. *Pediatr Nephrol.* 2012 Nov 10. [Epub ahead of print].
2. Kolektiv autorů (eds. A. Jabor, M. Zámečník, L. Straka). *Encyklopedie laboratorní medicíny.* Dostupná z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie>.
3. Racek J., Rajdl D. et al.: *Klinická biochemie.* 3., přepracované vydání. Praha: Galén, 2021.

11 ACIDOBAZICKÁ ROVNOVÁHA A KYSLÍKOVÝ METABOLISMUS

V této kapitole se dozvíte:

V této kapitole se dozvíte, co znamená pojem acidobazická rovnováha a proč je důležité ji monitorovat. Dozvíte se o pufracích systémech v organismu, jakým způsobem organismus udržuje homeostázu vnitřního prostředí, včetně acidobazické rovnováhy. Dále je uvedeno základní dělení základních poruch acidobazické rovnováhy, včetně moderního hodnocení poruch acidobazické rovnováhy dle Stewarta a Fencla.

Klíčová slova této kapitoly:

Acidobazická rovnováha (ABR), poruchy acidobazické rovnováhy, acidémie, alkalémie, acidóza, alkalóza.

Čas potřebný k prostudování učiva kapitoly: 3 hodiny

11.1 Úvod do acidobazické rovnováhy (ABR)

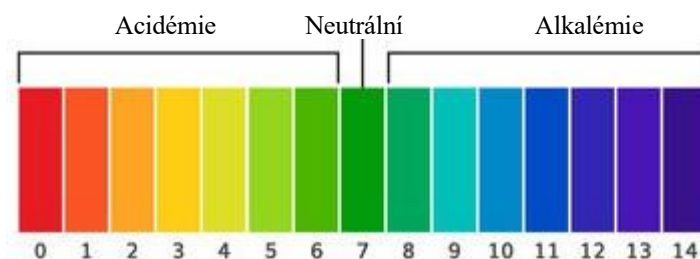
V organismu probíhají nejrůznější metabolické děje, při nichž se tvoří jak kyselé metabolity s acidifikujícím vlivem, tak alkalické metabolity (alkalizující vliv). Přehled acidifikujících vlivů uvádí Tabulka č. 11.1.

Tabulka 11.1: Přehled acidifikujících procesů v organismu

Kyselina	Zdroj	Odstranění	Množství (mmol/d)
CO ₂	tkáňové dýchání	exkrece plicemi	20 000
laktát	glykolýza (anaerobní)	glukoneogeneze, oxidace	1 300
H ⁺ ze syntézy urey	ureageneze	oxidace aminokyselin	1 100
mastné kyseliny	lipolýza	reesterifikace, oxidace	600
ketolátky	ketogeneze	oxidace	400

Upraveno dle Marshall W. J., Bangert S. K. (2008). *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. 2. vydání. Churchill Livingstone.

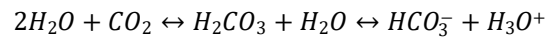
Úkolem organismu je udržet tyto vlivy v rovnováze tak, aby byla zajištěna homeostáza vnitřního prostředí. Z hlediska acidobazické rovnováhy to tedy znamená udržení úzkého rozmezí fyziologických hodnot, a to především pH (záporný dekadický logaritmus koncentrace hydroxoniových iontů - H₃O⁺). Je nutné si uvědomit, že na hodnotě pH v organismu závisí celá řada jevů, včetně vlastností bílkovin. Se změnou pH se mění aktivita enzymů, struktura součástí buňky, propustnost membrán a s ní související distribuce elektrolytů. Optimální pH v organismu se pohybuje okolo hodnoty $7,4 \pm 0,04$ (*pH < 7,0 nebo > 7,8 není téměř slučitelné se životem*). Snížení pH krve ve smyslu poklesu mimo referenční interval se označuje jako acidémie, naopak vzestup hodnot nad horní referenční mez se nazývá alkalémie.



Akutní změny pH jsou vyrovnávány krevními pufracními systémy. Nejdůležitějšími z nich jsou hydrogenuhličitanový (HCO₃⁻/H₂CO₃), bílkovinný (protein/H-protein) a fosfátový pufr (HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻).

11.2 Pufrační systémy v organismu

Pufračních systémů se v organismu nachází celá řada. Je však nutné si uvědomit, kde primárně tyto pufrы působí, zda především intravazálně, intersticiálně, nebo intracelulárně. Intravazálně (v plné krvi) působí především uhličitánový a proteinový pufr, k němuž je nutné započítat i hemoglobinový pufr v erythrocytech. Intersticiálně reguluje ABR hlavně uhličitánový pufr. Proteiny se v intravazálním prostoru při regulaci ABR významně neuplatňují vzhledem k jejich nízké koncentraci v tomto prostoru. V intracelulárním prostoru působí především proteinový a fosfátový pufr. Zaměříme-li se tedy na extracelulární tekutinu (intravazální a intestinální tekutinu), je zřejmé, že uhličitánový pufr je nejdůležitějším pufrem pro regulaci ABR vzhledem k jeho koncentraci a také schopnosti organismu aktivně měnit koncentraci jeho jednotlivých složek (viz schéma):



Koncentrace HCO_3^- je regulována ledvinami a koncentrace CO_2 neboli parciální tlak CO_2 (pCO_2) je regulován plicní ventilací.

Hodnotu pH uhličitánového pufru lze vypočítat z Henderson–Hasselbalchovy rovnice:

$$pH = pK_a + \log \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} = 6,1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{0,225 \cdot pCO_2}$$

kde

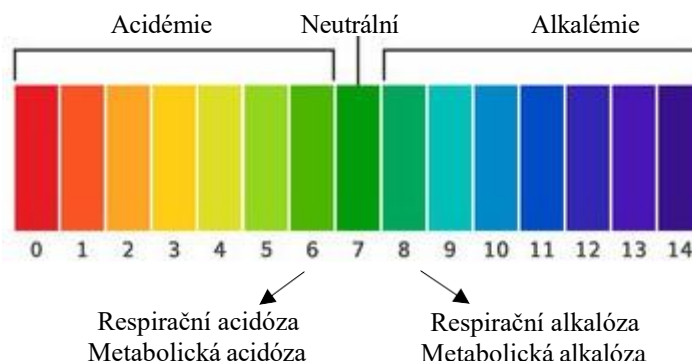
- $pK_a = 6,1$ (disociační konstanta kyseliny uhličitě),
- $[H_2CO_3] = pCO_2 \cdot 0,225$ (koeficient rozpustnosti CO_2).

11.3 Základní poruchy acidobazické rovnováhy

Poruchy regulace acidobazické rovnováhy postihují celý organismus a jsou definovány primárně v závislosti na změnách jednotlivých komponent hydrogenuhličitánového pufru (viz rovnice pro výpočet pH). Může tedy dojít ke změně v koncentraci hydrogenuhličitánových bází (HCO_3^-) nebo v pCO_2 . Jestliže nastanou změny v koncentraci HCO_3^- , jedná se o metabolické poruchy. V případě, že dojde ke změně pCO_2 , hovoří se o poruše respirační. Nahromadění kyselých produktů či ztráta alkalických metabolitů se označuje jako acidóza. Alkalózou se rozumí nahromadění alkalických, či ztráta kyselých produktů metabolismu.

Vzhledem k tomuto předpokladu lze poruchy ABR lze rozdělit na čtyři podskupiny:

- metabolickou acidózu,
- metabolickou alkalózu,
- respirační acidózu – způsobenou zvýšením $pCO_2 \rightarrow$ hyperkapnie,
- respirační alkalózu – způsobenou snížením $pCO_2 \rightarrow$ hypokapnie.



Příčiny základních poruch acidobazické rovnováhy

Metabolická acidóza může být způsobena:

- zvýšenou tvorbou H_3O^+ – laktátová acidóza (hypoxie, šok), ketoacidóza, acidóza ze zadržetí endogenních netěkavých kyselin při renálním selhání,
- exogenním přívodem H_3O^+ – intoxikace (salicyláty, metanol),
- ztrátou HCO_3^- – průjmy, popáleniny,
- poruchy poměru Na^+/Cl^- – např. infuze fyziologického roztoku.

Metabolická alkalóza může být způsobena:

- ztrátou H_3O^+ , Cl^- – zvracení, odsávání žaludečního obsahu,
- hypoalbuminemií (nefrotický syndrom, pokročilá cirhóza jater).

Respirační acidóza (zvýší se pCO_2) může být způsobena:

- útlumem dýchacího centra,
- poruchami ventilace, difuze, perfuze (onemocnění plic a dýchacích cest),
- poruchami transportu plynů (anemie, oběhová nedostatečnost, otravy CO).

Respirační alkalóza (sníží se pCO_2) může být způsobena:

- nesprávným řízením dýchání,
- zvýšeným drážděním dýchacího centra (hysterie, úzkost, infekce, horečka, fyzická práce) a poruchami dechového centra (iktus, trauma, tumor, zánět).

11.4 Regulace acidobazické rovnováhy

Při akutních změnách ABR dochází nejprve k uplatnění pufracních systémů. V případě, že se jejich kapacita vyčerpá, dochází následně ke změně pH krve. U acidózy nastává acidémie a u alkalózy alkalémie. Pokud porucha trvá delší dobu, organismus se snaží o znovu nastavení normálního pH, tedy **kompenzaci**, kdy jeden děj nahrazuje funkci děje druhého, poškozeného. Respirační poruchy bývají kompenzovány činností ledvin. Na kompenzaci metabolických poruch se podílejí plicé a rovněž i ledviny. Finálně dochází ke **korekci** poruchy, za což jsou odpovědné ledviny. Detailněji, vzhledem k časové ose, tento proces popisujeme níže:

1. **Nárazníková reakce** (změna jedné složky pufracních systémů)

Pufracní systémy

- extracelulární – řádově minuty
- intracelulární – řádově hodiny

2. **Kompenzační reakce** (změna druhé složky pufr. systémů)

- plicé – řádově minuty, maximum za 12–24 hodin
- ledviny – řádově hodiny, maximum za 2–5 dní

3. **Korekce poruchy** (změna původně změněné složky v nárazníkové reakci)

- ledviny

Hodnotí-li se poruchy ABR v krvi, je nutné vzít v úvahu i možnou situaci v intracelulárním prostoru, např. výměnu draselného kationtu za hydroxoniový kationt při poklesu pH. Poruchy ABR jsou navíc v čase probíhajícími procesy, k jejichž pochopení je nutné znát řadu anamnestických a klinických dat, nicméně vlastní mechanismus ABR je úzce spjat s metabolismem iontů a celou řadou dalších parametrů – viz kapitola kombinované poruchy ABR.

11.5 Vyšetření parametrů acidobazické rovnováhy

Vyšetření ABR se provádí z plné krve odebrané za anaerobních podmínek. Stanovují se tyto parametry:

1. **pH krve** – přímo měřený ukazatel – pH elektroda,
2. **parciální tlak kyslíku – pO_2** – přímo měřený ukazatel – Clarkova kyslíková elektroda,
3. **parciální tlak oxidu uhličitého – pCO_2** – přímo měřený ukazatel – Severinghausova elektroda,
4. **aktuální hydrogenuhličitan – HCO_3^-** – výpočet dle Hendersonovy a Hasselbalchovy rovnice nebo přímé enzymatické stanovení v séru.

Dále jsou pro hodnocení nutné některé vypočtené parametry:

1. **Base Excess (BE)** – (-2,5...0...+2,5 mmol/L) - jde o nadbytek, nebo nedostatek všech pufrových bazí v krvi. Dle definice: *množství silných kyselin nebo bazí v mmol/L, které je třeba přidat do vyšetřované tekutiny, aby pH bylo 7,40 při $pCO_2 = 5,33$ kPa a teplotě 37 °C.* Záporná hodnota svědčí pro metabolickou acidózu, kladná pro metabolickou alkalózu.
2. **Buffer Base (BB)** – součet všech pufrových bazí v krvi (42 ± 4 mmol/L). Vzorec: $BB = [Na^+] + [K^+] - [Cl^-]$ – používá se ke zhodnocení podílu chloridů na poruše ABR. Zvýšení znamená relativní pokles chloridů a tím vzrůst podílu hydrogenuhličitanů – tedy podílu metabolické alkalózy. Snížení – opačný efekt.
3. **Aniontová mezera (AG)** - (12 -18 mmol/L) – rozdíl mezi nejméně zastoupenými kationty a anionty. Vzorec: $AG = [Na^+] + [K^+] - ([Cl^-] + [HCO_3^-])$. Popisuje odchylky v koncentraci laktátu, ketokyselin, fosfátů, síranů a dalších aniontů. Zahrnuje také anionty albuminu a fosfátu (neměřené kyseliny).

11.6 Kombinované poruchy ABR – hodnocení dle Stewart a Fencla

Problémem hodnocení poruch ABR je skutečnost, že různé poruchy ABR se velmi často kombinují, tzn. mohou se vzájemně umocňovat, nebo dokonce působit proti sobě. Příkladem může být kombinace metabolické alkalózy vlivem zvracení (snížení koncentrace chloridů) a metabolické acidózy vlivem současného hladovění (zvýšení koncentrace ketolátek). Z tohoto příkladu je patrné, že zmíněné hodnocení dle základních poruch je nedostatečné (pH může být v normě, na změnu nás upozorní pouze změna BB). Proto bylo zavedeno modernější hodnocení poruch dle Stewart a Fencla.

Ale pozor! Oba modely hodnocení spolu úzce souvisejí. Neznačená to, že by klasické hodnocení bylo zbytečné.

Moderní hodnocení dle Stewart a Fencla vychází z modelu **elektroneutrality plazmy**, tzn. součet kationtů a aniontů **musí být nulový (obr. 11.1).**

Na ⁺ (142)	Cl ⁻ (103)
	HCO ₃ ⁻ (24)
	Prot ⁻ (16)
K ⁺ (4,5)	UA ⁻ (10)
Ca ²⁺ (2,5)	
Mg ²⁺ (0,9)	

Obrázek 11.1: Zobrazení iontového diagramu v plazmě (zdroj: Švagera – vlastní)

Vlevo sloupec kationtů, vpravo sloupec aniontů v plazmě, tzn. za podmínky elektroneutality musí být oba sloupce stejně vysoké (obrázek je ilustrativní, hodnoty v závorkách jsou v mmol/L). V případě změny některé složky v jednom sloupci (např. ztráta chloridů) musí za podmínky elektroneutality (oba sloupce stejně vysoké) následovat změna v složkách pufracího systému (např. zvýšení koncentrace HCO_3^- jako majoritního extracelulárního pufru) a to způsobí vychýlení acidobazické rovnováhy v tomto případě na stranu alkalózy.

Pozn.: Pro jednoduchost si představte, že uhličitánový pufr je majoritním extracelulárním pufrům a že odchylky koncentrace iontů se nejnázne kompenzují změnou koncentrace $\text{HCO}_3^- \Rightarrow$ ABR tak ovlivňuje minerálový metabolismus – koncentrace iontů.

Při hodnocení acidobazických poruch se využívají tři základní proměnné, a to:

1. **$p\text{CO}_2$** – respirační složka poruchy ABR

2. **SID (strong ion difference) = diference silných iontů (39 ± 1 mmol/L)**– rozdíl koncentrací iontů silných bází a silných kyselin, tzn. rozdíl součtu kladných a záporných nábojů na zcela disociovaných kationtech a aniontech.

$$\text{SID}_{\text{eff}} = (\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}) - (\text{Cl}^- + \text{UA}^-).$$

Problém je ale s měřením UA^- (neměřitelné aniony), které obsahují např. ketolátky, laktát, sírany a další anionty.

Z tohoto důvodu se po matematickém přepočtu používá vztah:

$$\text{SID}_{\text{eff}} = [\text{HCO}_3^-] + 0,28 * [\text{Alb}^-] + 1,8 * [\text{P}^-],$$

což je vlastně vyjádřený matematický rozdíl mezi silnými kationty a aniony.

SID tedy určuje prostor pro hydrogenuhličitán a ionizaci slabých netěkavých kyselin, a proto změny SID způsobují metabolické poruchy acidobazické rovnováhy.

3. **A_{tot}** → celková koncentrace netěkavých slabých kyselin, tj. součet negativních nábojů na aniontech albuminu a anorganického fosfátu.

$$A_{\text{tot}} = [\text{Alb}^-] + [\text{P}^-]$$

Na ⁺	Cl ⁻
	SID _{eff}
K ⁺	UA ⁻
Ca ²⁺	
Mg ²⁺	

Detailní souhrn těchto parametrů ve vztahu k hodnocení poruch ABR naleznete v Tabulce 11.2.

Tabulka 11.2: Souhrn příslušných parametrů ve vztahu k hodnocení poruch ABR

Poruchy			Acidóza	Alkalóza	
respirační			↑pCO ₂	↓pCO ₂	
nerespirační (metabolické)	abnormální SID	nadbytek/nedostatek vody	↓SID ↓[Na ⁺]	↑SID ↑[Na ⁺]	
		dysbalance silných aniontů	nadbytek /deficit Cl ⁻	↓SID ↑[Cl ⁻]	↑SID ↓[Cl ⁻]
			nadbytek neměřených aniontů	↓SID ↑[UA ⁻]	
	netěkavé slabé kyseliny	sérový albumin	↑[Alb]	↓[Alb]	
	anorganické fosfáty	↑[P ⁻]	↓[P ⁻]		

Příklad č. 1

Pro lepší pochopení si ukážeme příklad kombinované metabolické acidózy: ketoacidózy a laktátové acidózy. Velmi často se jedná o neléčeného diabetika 1. typu (nulová produkce endogenního inzulínu), nebo pacienta, který si zapomněl vzít dávku inzulínu. Nedostatek inzulínu způsobí zvýšenou lipolýzu, uvolnění mastných kyselin a zvýšení energie pro tkáň a především mozek. V nálezů se projeví hyperglykémie a vysoká koncentrace ketolátek. Navíc, v důsledku toho, že se organismus snaží snížit osmolalitu plazmy, pacient zvýšeně močí (osmotická diuréza). Z tohoto důvodu trpí dehydratací a rozvratem minerálového metabolismu. Vlivem dehydratace dochází ke sníženému prokrvení tkání a produkci laktátu. V sloupci aniontů tedy vidíme zvýšení UA^- (laktátu a ketolátek). Jelikož musí být splněna podmínka elektroneutality, tzn. součet nábojů kationtů a aniontů musí být nulový, dojde k poklesu jedné ze složek uhličitánového pufru, a to HCO_3^- . pH se tedy sníží (viz Henderson–Hasselbalchova rovnice) a v nálezů se projeví acidémie s vysokým laktátem. Klinicky nastanou projevy acidózy.

Příklad č. 2

Příkladem respirační poruchy je hysterický jedinec, např. klaustrofobik ve výtahu. V důsledku úzkosti dojde k dráždění dýchacího centra, které spustí hyperventilaci. Tím dojde k vydýchání velkého množství CO_2 , což má za následek snížení pCO_2 v krvi. Vzniká respirační alkalóza se všemi důsledky, včetně možného kómatu. Této situaci lze předejít dýcháním do sáčku. Vysvětlení spočívá v umělém zvýšení koncentrace CO_2 v sáčku vlivem dýchání (ve vzduchu je nízká koncentrace CO_2 , kdežto ve vydechaném vzduchu je vyšší). Jedinec pak dýchá vzduch obohacený o CO_2 , čímž se sníží riziko vzniku respirační alkalózy.

11.7 Měření parametrů acidobazické rovnováhy

Měření ABR se dnes provádí na acidobazických analyzátoch, které primárně měří pH, pO_2 , pCO_2 , Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} a saturace (SO_2). Tyto přístroje pak dopočítávají další parametry nutné pro hodnocení.

11.7.1 Měření iontů Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}

Ionty se měří pomocí iontově-selektivních elektrod (kapitola 9.9.1).

11.7.2 Měření pO_2

Měření parciálního tlaku kyslíku (pO_2) na acidobazickém analyzátoru je prováděno pomocí Clarkovy elektrody, což je amperometrická (polarografická) elektroda. Skládá se z katody (platinový drátek zatavený ve skleněné tyčince) a anody (Ag/AgCl argentchloridová elektroda) ponořených ve fosfátovém pufru. Plášť elektrody překryt membránou propouštějící molekuly kyslíku, která současně chrání platinovou elektrodu před kontaminací bílkovinami obsaženými v krevním vzorku. Kyslík z krevního vzorku difunduje přes polypropylenovou membránu do elektrolytu uvnitř kyslíkové elektrody a je redukován na katodě ($\text{O}_2 + 4\text{e}^-$). Vznikající elektrický proud mezi anodou a katodou je úměrný parciálnímu tlaku kyslíku v krevním vzorku. Jedná se tedy o amperometrii.

11.7.2 Měření pCO_2

Měření parciálního tlaku oxidu uhličitého (pCO_2) na acidobazickém analyzátoru je prováděno pomocí Severinghausovy elektrody, která využívá měření změny pH (skleněná elektroda) v roztoku hydrogenuhličitanu a chloridů, kterou je obklopena. Molekuly pCO_2 difundují do tohoto roztoku přes teflonovou membránu a rozpouští se v tomto roztoku. Tím dochází ke snížení pH, které detekuje zmíněná skleněná elektroda. Jako referenční elektroda se využívá argenchloridová (Ag/AgCl) elektroda. Jedná se tedy o potenciometrii.

Shrnutí kapitoly

Kapitola pojednává o acidobazické rovnováze a jejím významu pro lidský organismus. Současně se zmiňuje o hlavních pufracích systémech v organismu s důrazem na jejich lokalizaci. Následně popisuje dělení poruch acidobazické rovnováhy a parametry, které nám v orientaci pomáhají. Probírá i moderní hodnocení poruch acidobazické rovnováhy dle Stewart a Fencla, které pro hodnocení poruch využívá tří základních parametrů, a to SID, pCO_2 a A_{tot} . Pro lepší pochopení uvádí i příklad dvou poruch ABR.

Otázky úkoly:

1. Jaké máme pufracní systémy v organismu a kde se primárně uplatňují?
2. Jaké je dělení základních poruch ABR?
3. Vyjmenujte příčinu vzniku metabolické acidózy.
4. Vymyslete příklad respirační acidózy.
5. Jakým způsobem bude kompenzována metabolická acidóza a alkalóza?
6. Zamyslete se nad tím, proč je v organismu lépe kompenzována metabolická acidóza než alkalóza.
7. Vysvětlete pojem SID neboli difference silných iontů.
8. Jaké jsou příčiny poklesu SID?
9. Co způsobí podání fyziologického roztoku ve vztahu k ABR??

Další doporučené zdroje k této kapitole:

1. Jabor A. a kol. *Vnitřní prostředí*. Grada Publishing a.s., Praha 2008. ISBN: 978-80-247-1221-5.
2. Jabor A., Franeková J., Kubiček Z. *Principy interpretace laboratorních testů. 2., přepracované vydání*. Grada Publishing, a.s., ISBN: 978-80-271-1272-2.
3. Racek J., Rajdl D. et al.: *Klinická biochemie. 3., přepracované vydání*. Praha: Galén, 2021.
4. Zima T. *Laboratorní diagnostika. 3., doplněné a přepracované vydání*. Praha: Galén – Karolinum, 2013.

12 STOPOVÉ PRVKY

V této kapitole se dozvíte:

Tato kapitola pojednává o biogenních prvcích, které jsou nezbytné pro stavbu a funkci lidského organismu. Jejich nedostatek v těle může vést k závažným chorobám, naopak vysoká koncentrace může být toxická. V nejvyšších koncentracích se vyskytuje železo (Fe), měď (Cu) a zinek (Zn), v řádově nižších koncentracích se vyskytuje selen (Se), fluór (F), jód (J), kobalt (Co), chrom (Cr), mangan (Mn) a molybden (Mo).

Klíčová slova této kapitoly:

Makrobiogenní, mikrobiogenní, stopové, ultrastopové, železo, měď, zinek, selen, chrom, fluór, jód, kobalt, mangan, molybden.

Čas potřebný k prostudování učiva kapitoly: 2 hodiny (teorie + řešení úloh)

12.1 Úvod

Stopové prvky se označují jako biogenní nebo těž esenciální. Podle jejich obsahu v organismu je dělíme na makrobiogenní, které se vyskytují ve vysokých koncentracích, a mikrobiogenní neboli stopové, jež se vyskytují v krvi, popř. jiných biologických tekutinách v mikromolárních, či dokonce nižších koncentracích.

Železo (Fe)

Železo se v našem organismu vyskytuje v podobě hemoglobinu (60 %), v myoglobinu (4 %), ve tkáních ve formě feritinu a hemosiderinu (30 %) a v plazmě ve vazbě na transferin. Železo je strukturální součást řady enzymů a je nezbytné ke správné funkci dýchacího řetězce.

Železo přijímáme potravou, nejbohatší zdroje jsou vnitřnosti, maso a luštěniny. V trávicím traktu se železo vstřebává za účasti kyselého žaludečního šťávy v horní části tenkého střeva v podobě železnatých iontů (asi 7–10 %). Množství vstřebaného železa záleží na kapacitě apoferitinu, bílkovně střevní sliznice, jež váže železité ionty jako feritin. V plazmě se železité ionty vážou na transferin, který prostřednictvím transferinových receptorů předává železo do buněk. Ve tkáních se železo ukládá v podobě feritinu a hemosiderinu.

Železo má význam především pro přenos kyslíku a oxidoredukční děje, jeho nevýhodou je účast na tvorbě nebezpečného hydroxylového radikálu z peroxidu vodíku v tzv. Fentonově reakci, který může vést k poškození nukleových kyselin, bílkovin nebo může nastartovat lipoperoxidaci.

Nedostatek železa může být způsoben nedostatečným příjmem potravou, poruchami vstřebávání v důsledku nedostatku žaludeční kyseliny nebo záněty střevní sliznice, poruchami transportu, zvýšenou potřebou železa během dospívání, silným menstruačním krvácením či krvácením do trávicího traktu způsobeným vředy nebo nádory.

Zvýšená koncentrace železa v plazmě se projeví při zvýšeném rozpadu erytrocytů, při zvýšeném vstřebávání nebo při dlouhodobém podávání železa při léčbě anémie nebo při častých krevních transfuzích.

Měď (Cu)

Obdobně jako jiné stopové prvky, také měď se v našem organismu váže na bílkoviny, albumin, histidin a speciální transportní bílkovinu transkuprein, odkud je vychytávána hepatocyty. Měď je játry zabudována do ceruloplazminu a následně vylučována do krve. Měď je součástí mnoha enzymů, které hrají klíčovou roli v různých metabolických procesech, např. v metabolismu katecholaminů, při stabilizaci kolagenu a elastinu, v energetickém metabolismu buňky atd. Má antioxidační vlastnosti.

Měď přijímáme potravou, nejbohatšími zdroji jsou mořské plody, játra a luštěniny. Měď je absorbována podobně jako železo v tenkém střevě, zbytek je vyloučen stolicí. Koncentrace mědi v moči je zanedbatelná.

Nízká koncentrace mědi může být následkem hladovění, malnutrice, těžkých průjmů, dlouhodobé parenterální výživy bez suplementace mědi. Příčinou mohou být také poruchy absorpce a transportu mědi, tzv. Menkesova choroba, při níž se projeví nízká koncentrace mědi, ceruloplazminu a enzymů obsahujících měď.

Současně může být měď toxická, u tzv. Wilsonovy choroby nacházíme nízkou koncentraci mědi a ceruloplazminu, což má za následek, že volná frakce mědi proniká do jater, mozku, ledvin a vede k poškození těchto orgánů – cirhóza, neurologické poruchy atd.

Zvýšená koncentrace mědi se nachází u hepatitid, různých typů anémií a leukémií a projevuje se zvracením a bolestmi v nadbříšku. Může vést až k akutnímu selhání jater a ledvin.

Zinek (Zn)

Zinek se v organismu vyskytuje v prostatě, mozkové tkáni a játrech. Je integrální součástí řady enzymů nezbytných pro syntézu bílkovin a nukleových kyselin. Má antioxidační vlastnosti. Je nezbytný pro buněčnou imunitu, tvorbu vaziva, hojení ran a tvorbu spermií.

Doporučený denní příjem zinku u dospělého jedince je 12–19 mg, u dětí 50 µg/kg, větší množství vyžadují novorozenci. Vyšší přísun je důležitý také u těhotných a kojících žen. Zinek je nejvíce obsažen v červeném mase, ústřicích a mořských rybách, sýrech, vejcích, ořechách.

Snížená koncentrace zinku může být následkem nedostatečného přísunu potravy, zvláště u vegetariánů, při malnutrici, malabsorpci či při nedostatečné suplementaci v parenterální výživě, při poruše vstřebávání, při zvýšených ztrátách (průjemy, poškození ledvin), popř. při zvýšené spotřebě (horečky, nádorové onemocnění atd.). Příznaky se projevují poruchou růstu, špatným hojením ran, poruchou imunity, vypadáváním vlasů a poruchou metabolismu cukrů.

Nadměrné požití zinku může být toxické, akutní otrava se projeví zvracením, průjemy a horečkou.

Selen (Se)

Selen se v organismu vyskytuje ve formě selenoproteinu-P, který slouží jako zásoba. Selen je důležitou součástí antioxidačních enzymů, které chrání buňku proti účinku volných radikálů (glutathionperoxidáza). Současně do skupiny enzymů obsahujících selen patří jodthyronin-5-dejodáza, důležitá pro tvorbu hormonů štítné žlázy. Selen je důležitý také pro správný vývoj spermií a chrání před rozvojem zhoubného bujení.

Selen obsahuje zejména cibulovitá zelenina. Z potravy se vstřebává v tenkém střevě. Selen se v organismu neukládá do zásob, proto při nedostatku v potravě se velmi rychle projeví jeho deficit. Vylučuje se močí.

Běžně se s patologicky sníženou koncentrací selenu v krvi nesetkáváme, nicméně dlouhotrvající deficit může vést k závažné kardiomyopatii a k dlouhodobému postižení kosterních svalů (Keshanská choroba). Současně se zvyšuje riziko karcinogeneze, rozvoje aterosklerózy, poruchy funkce štítné žlázy a dochází ke snížení imunity.

Chrom (Cr)

Biologický význam závisí na mocnosti chromu, v němž se dostává do organismu. Zatímco trojmocný chrom působí jako antioxidant, šestimocný chrom je toxický, má mutagenní a karcinogenní účinky.

Nedostatek se může projevit u starých lidí a podvyživených dětí, kteří přijímají málo minerálních látek v potravě. Dlouhodobý nedostatek chromu zhoršuje schopnost těla efektivně zpracovávat cukr, což způsobuje jeho zvýšenou hladinu v krvi.

Fluór (F)

Fluór patří mezi esenciální stopové prvky. Jeho vliv na organismus může být jak pozitivní, tak negativní, vždy záleží na dávce, které je lidský organismus vystaven. Doporučená denní dávka se pohybuje v rozmezí 3–4 mg/den u dospělého člověka, u dětí je dávka menší, závisí na věku a musí se hlídat, aby nedošlo ke vzniku dentální fluorózy (z nadměrného množství fluóru). Stejně tak se hlídá minimální dávka za účelem prevence zubního kazu. Mezi další účinky fluóru patří vliv na funkci enzymu, jeho možná karcinogenita, genotoxicita, ovlivňování apoptózy a oxidačního stresu.

Jód (I)

Jód je esenciální stopový prvek velmi důležitý pro lidský organismus. Přijímáme ho v potravě ve formě jodidových iontů, které se z gastrointestinálního traktu velmi rychle vstřebávají. Z krve jsou pak vychytávány štítnou žlázou, která si z něj vytváří důležité hormony (tyroxin – T₄, trijódtyronin T₃), které regulují tempo metabolismu, přeměnu látek ve většině buněk organismu. Jód je důležitý během raného vývoje, výrazný nedostatek vede k poškození mozku s oslabením duševních funkcí, se vznikem poruch tělesného růstu a vývoje.

Podobně jako řada jiných zdravotně důležitých prvků má jód určité optimální rozmezí denního příjmu, které se u dospělého člověka pohybuje v rozmezí 150–220 µg. Dlouhodobě vysoký příjem jódu vede k hypertyreóze. Důvodem může být nesprávné podávání léků obsahujících jód anebo mnohem častější porucha imunitního

systemu z mnoha různých příčin. Onemocnění z dlouhodobého nedostatku tyreoidálních hormonů se nazývá hypotyreóza, při níž postupně dochází k poškozením celého organismu.

Kobalt (Co)

Kobalt je esenciální stopový prvek, který je součástí vitamínu B₁₂ (kyanokobalaminu), jenž hraje klíčovou roli při aktivaci mnoha enzymů. Kobalt má význam v tvorbě erythropoetinu a inhibuje enzymy oxidace v kostní dřeni, což vede k její stimulaci. Kobalt se uplatňuje v syntéze hormonů štítné žlázy, kde se podílí na vychytávání jódu. Jeho deficit i nadbytek vede ke strumě. Kobalt způsobuje vasodilataci a zarudnutí kůže.

Kobalt přijímáme v potravě, především v listové zelenině a játrech. K absorpci dochází v tenkém střevě, vylučuje se hlavně močí, v malém množství stolicí a potem. Příznaky deficitu kobaltu jsou obdobné jako v případě deficitu vitamínu B₁₂, projevují se anémií, hubnutím, únavností, nechutenství a zpomalení růstu.

Mangan (Mn)

Mangan je stopový prvek, který hraje důležitou roli v řadě biochemických procesů v těle, zejména jako součást enzymů, které se podílejí na metabolismu sacharidů, aminokyselin a cholesterolu. Mangan je také nezbytný pro správnou tvorbu kostí, hojení ran a antioxidační obranu organismu.

Nedostatek manganu je vzácný, ale může vést k poruchám růstu, snížené mineralizaci kostí nebo narušené imunitní funkci. Naopak, zvýšené hladiny manganu mohou být toxické, zejména při dlouhodobé expozici, a mohou způsobit neurologické příznaky podobné Parkinsonově nemoci.

Molybden (Mo)

Molybden je stopový esenciální prvek, který je součástí metaloenzymů (xanthinoxidáza, aldehydoxidáza, sulfátoxidáza). Vstřebává se v žaludku a v tenkém střevě, vylučuje se ledvinami a žlučí. Nadměrný příjem molybdenu má za následek vzestup kyseliny močové v krvi, toxické účinky se projevují změnami v sulfátovém metabolismu. Při nedostatku se projevuje hypermethioninémie, hypourikémie, xanthinurie, hypourikosurie, nízká exkrece síranů. To vede k tachykardiím, zvracení, mentálním poruchám až ke kómatu.

10.2 Analytické stanovení vybraných kovů metodami AAS

V laboratorní diagnostice stopových prvků se nejčastěji využívá atomová absorpční spektrometrie (AAS) a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (ICP-MS).

AAS je kvantitativní optická metoda, která umožňuje stanovit kovy jako Cu, Zn, Pb, Se, Al a další. Využívá princip absorpce vhodného elektromagnetického záření (fotonu) volnými atomy prvků v plynném stavu. Měří se absorpce záření (absorbance), která je přímo úměrná koncentraci atomů sledovaného prvku ve vzorku. Z kalibrační křivky se na základě měření standardních roztoků o známé koncentraci vypočte koncentrace analyzovaného vzorku.

Přístroj, který využívá tohoto jevu se nazývá atomový absorpční spektrometr a skládá se ze čtyř základních částí: zdroj, atomizátor, optický systém, vyhodnocovací jednotka. Využívají se dva základní zdroje pro atomizaci analyzovaného prvku. Prvním zdrojem je plamen (F-AAS), druhým je grafitová kyveta (ETA-AAS nebo GF-AAS), kde je atomizátorem grafitová píčka s kyvetou, která je vyhřívána elektrickým proudem.

Výhoda plamenové AAS je velmi rychlá analýza, žádné nebo jen mírně rušivé vlivy a relativně nízké provozní náklady. Plamenová AAS bohužel nedosahuje potřebné citlivosti pro stopovou analýzu, ETA-AAS je až o 3 řády citlivější. Analýza ETA-AAS je pomalejší a může být ovlivněna četnými rušivými vlivy matrice vzorku.

Shrnutí kapitoly

Stopové prvky jsou minerální látky, které jsou nezbytné pro správné fungování organismu, avšak ve velmi malých množstvích. Jejich koncentrace v krvi a jiných biologických tekutinách je obvykle v mikrogramových nebo nižších koncentracích. I přesto, že jsou přítomny v malých množstvích, mají klíčovou roli v různých biologických funkcích, jako je enzymatická aktivita, metabolismus, a regulace růstu a vývoje. Mezi stopové prvky patří Fe, Cu a Zn s koncentracemi 10–20 μmol/L, a také prvky s výrazně nižšími koncentracemi, Se, F, J, Cr, Co, Mn a Mo. Ultrastopové prvky zahrnují křemík a vanad. Většinu z nich získáváme z potravy, a při jejich nedostatku je nutná suplementace. Dlouhodobý deficit může vést k vážným zdravotním problémům, zatímco nadbytek bývá toxický.

Otázky úkoly:

1. Co jsou to biogenní prvky?
2. V jakých koncentracích se vyskytují?
3. Jaký je biologický význam železa?
4. Vyjmenujte choroby související s nedostatečným, popř. nadměrným množstvím mědi.
5. Jak se dostává do našeho těla jód. Má pro organismus nějaký význam?

Další doporučené zdroje k této kapitole:

1. Čermáková M., Štěpánová I. *Klinická biochemie*. 1. díl. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 2003.
2. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. *Harperova biochemie*. 3. vydání. H+H, 2002.
3. Racek J., Rajdl D. et al.: *Klinická biochemie*. 3., přepracované vydání. Praha: Galén, 2021.

13 VITAMÍNY

V této kapitole se dozvíte:

Tato kapitola vás uvede do problematiky vitamínů, živin organického původu, které naše tělo potřebuje v malých dávkách. Protože však nejsme schopni syntetizovat vitamíny sami, musíme je tělu dodávat potravou. Můžeme je rozdělit do dvou skupin, na vitamíny rozpustné ve vodě (vitamíny skupiny B, vitamín C) a vitamíny rozpustné v tucích (vitamín A, D, E, K).

Klíčová slova této kapitoly:

Vitamíny rozpustné v tucích a rozpustné ve vodě, vitamín A, vitamíny skupiny B, vitamín C, vitamín D, vitamín E, vitamín K.

Čas potřebný k prostudování učiva kapitoly: 2 hodiny (teorie + řešení úloh)

13.1 Úvod

Vitamíny jsou definovány jako organické látky nezbytné ve velmi nízkých koncentracích pro průběh řady biochemických pochodů. Jejich nedostatek vede k charakteristickým poruchám či chorobám z nedostatku příslušného vitamínu.

13.2 Vitamíny rozpustné v tucích

Vitamín A (retinol)

Jedná se o vitamín, který běžně přijímáme potravou, a to buď přímo (máslo, tučné mléčné výrobky, vejce, játra, rybí tuk), nebo ve formě provitaminu β -karotenu (karotka, rajčata, zelená listová zelenina). β -karoten se ve střevě hydrolyticky štěpí a poskytuje nám dvě molekuly vitamínu A. Vitamín A je krví transportován ve vazbě na speciální bílkovinu, retinol-binding protein (RBP). Ten se v plazmě váže na prealbumin, čímž je zajištěno, že nedojde ke ztrátě vitamínu A močí.

Vitamín A je nezbytný pro vidění a pro správnou tvorbu a rohovatění pokožky a funkci sliznic. Současně má mírné antioxidantní účinky. Jeho provitamin β -karoten má však mnohem silnější antioxidantní účinky a je schopen velmi efektivně likvidovat volné radikály a další reaktivní formy kyslíku.

Nadměrné požití vitamínu A může vést k hypervitaminóze (intoxikace organismu), nicméně podání β -karotenu je zcela bezpečné.

Vitamín D (cholecalciferol, ergocalciferol)

Vitamín D existuje ve dvou formách: rostlinné, známé jako ergocalciferol, a živočišné, označované jako cholecalciferol. Cholecalciferol se syntetizuje v pokožce působením UV světla a částečně ho také získáváme z potravy, jako je rybí tuk, játra a mořské ryby.

Vitamín D je klíčový pro metabolismus vápníku a fosforu. Jeho aktivní forma vzniká v játrech a ledvinách po dvojí hydroxylaci steroidního jádra na pozicích 1 a 25. Kromě toho má vitamín D důležitou roli ve funkci svalů, nervů, krevním srážení, růstu buněk a využívání energie. Pomáhá zpomalovat ztrátu kostní hmoty a je důležitý pro prevenci osteoporózy.

Vitamín E (tokoferol)

Vitamín E se vyskytuje v podobě několika izomerů, nejúčinnější je α -tokoferol. Nachází se v potravinách rostlinného i živočišného původu. Je přítomen v mléce, másle, mase, rybách, vejcích a obilninách, také v zelenině, ovoci a ořechách.

Má výrazné antioxidantní vlastnosti, likviduje volné radikály a sám se stává volným radikálem, který může způsobit lipoperoxidaci (oxidaci vícenasycených mastných kyselin). K plnému projevu antioxidantních účinků vitamínu E je zapotřebí přítomnost dalších antioxidantů, např. kyseliny askorbové, vitamínu C atd.

Nedostatek vitamínu E např. v důsledku dlouhodobé parenterální výživy, popř. při těžké steatorei může vést k progresivní nervově-svalové chorobě, k poruše rovnováhy, koordinace.

Vitamín K (menadiol)

Vitamín K se vyskytuje ve formě K1 a K2, což jsou přirozené formy, a K3, který je syntetický a může být přeměněn na vitamín K2. Je obsažen v zelené listové zelenině (špenát, brokolice, kapusta, sója, hovězí játra atd.).

Vitamín K je nezbytný pro dobrou srážlivost krve (tvorbu protrombinu a koagulačního faktoru VII) a tvorbu osteokalcinu v kostní matrix.

Nedostatek vitamínu K může mít za následek poruchu krevního srážení a poruchu absorpce vápníku v kosti.

13.3 Vitamíny rozpustné ve vodě

13.3.1 Vitamíny skupiny B

Jedná se o skupinu látek, které vystupují jako koenzymy či prostetické skupiny různých enzymů.

Vitamín B₁ (thiamin)

Jedná se o vitamín, jenž se vyskytuje v potravinách rostlinného i živočišného původu (např. v obilovinách, rajčatech, zelí, kvěťáku, brokolici, ořeších, kvasnicích, játrech, ledvinách, srdci a vepřovém masu).

Z hlediska významu je důležitá jeho aktivní forma, thiamindifosfát, která vzniká v játrech. Thiamindifosfát je koenzymem oxidativních dekarboxyláz a transferáz, z čehož vyplývá jeho význam pro energetický metabolismus. Jeho nedostatek se projevuje poruchami nervového a kardiovaskulárního charakteru. Těžký deficit má za následek onemocnění beri-beri.

Vitamín B₂ (riboflavin)

Zdrojem tohoto vitamínu jsou především kvasnice, játra, mléčné výrobky, maso, obiloviny.

Riboflavin je součástí flavinových nukleotidů (FAD, FMN) a účastní se transportu elektronů v dýchacím řetězci, současně vystupuje jako koenzym nebo prostetická skupina řady dehydrogenáz a oxidáz. Je důležitý pro metabolismus sacharidů, bílkovin a tuků.

Deficit vitamínu B₂ doprovází nedostatek ostatních vitamínů rozpustných ve vodě. Projevuje se bolavými koutky úst, záněty sliznice jazyka, vypadáváním vlasů a zánětem spojivek.

Vitamín B₅ (kyselina pantotenová)

Vitamín B₅, známý jako kyselina pantotenová, se nachází v rostlinné i živočišné potravě, především v játrech, srdci, mase, vajíčkách a obilovinách. Je součástí koenzymu A (CoA) a hraje klíčovou roli v metabolismu sacharidů, bílkovin a tuků. Je nezbytný pro syntézu sterolů, hormonů, neurotransmiterů, fosfolipidů, hemoglobinu, myoglobinu a dalších důležitých látek. Jeho nedostatek je vzhledem k tomu, že je obsažen prakticky ve všech zdrojích potravy velmi vzácný.

Vitamín B₆ (pyridoxin)

Vitamín B₆ neboli pyridoxin je všudypřítomnou látkou, vyskytuje se jak v rostlinné, tak živočišné potravě. Ve své aktivní formě, pyridoxalfosfátu, vystupuje jako koenzym enzymů účastnících se metabolismu bílkovin, sacharidů a lipidů, především aminotransferáz a dekarboxyláz.

Nedostatek vitamínu B₆ se projevuje velmi zřídka a většinou jej doprovází deficit vitamínu skupiny B.

Vitamín B₁₂ (kyanokobalamin)

Vitamín B₁₂ je syntetizován výlučně mikroorganismy, a proto se vyskytuje v živočišné stravě a v rostlinné zcela chybí. Velmi dobrým zdrojem vitamínu B₁₂ jsou játra. Je nezbytný pro tvorbu nukleových kyselin a pro dělení buněk, z čehož vyplývá jeho význam pro růst a krvetvorbu. Jeho nedostatek bývá způsoben poruchou absorpce vitamínu B₁₂ žaludeční sliznicí, která tvoří tzv. vnitřní faktor, jenž je nezbytný pro jeho vstřebávání. Vzniká perniciózní anémie. Příznaky nedostatku vitamínu B₁₂ jsou megaloblastová anémie, slabost, únava, ztráta chuti, čichu a tělesné hmotnosti.

Kyselina listová

Kyselina listová a od ní odvozené foláty, se skládají z pteridinu, kyseliny p-aminobenzoové a kyseliny glutamové. Jejimi nejbohatšími zdroji jsou játra, kvasnice a listová zelenina. Deriváty kyseliny listové, zejména tetrahydrofolát, jsou koenzymy metabolismu jednovláknitých zbytků. Mají význam v řadě důležitých reakcí, především pro syntézu nukleových kyselin.

Nedostatek kyseliny listové je velmi často spojován s mírnou hyperhomocysteinémií. Může se projevit v těhotenství, při infekčních a nádorových onemocněních, u alkoholiků a seniorů. Vede k megaloblastové anémii projevující se únavou, slabostí, ztrátou chuti k jídlu atd.

Niacin (nikotinamid, vitamín PP)

Vitamín PP se vyskytuje v rostlinné i živočišné stravě, nejbohatšími zdroji jsou kvasnice, játra, drůbež, ořechy a zelenina.

Niacin je součástí koenzymů (NAD⁺ a NADP⁺) řady dehydrogenáz, účastní se mnoha oxidoredukčních reakcí, je nezbytný pro metabolismus sacharidů, bílkovin i tuků.

Jeho nedostatek pozorujeme při dlouhodobém nedostatku v potravě, projevuje se žaludečními, střevními problémy, kožními změnami a poruchami nervové činnosti (deprese, ztráta paměti).

Vitamín C (kyselina askorbová)

Hlavním zdrojem vitamínu C je ovoce a zelenina (citrusové plody, černý rybíz, jahody, kiwi, šípky, brokolice, rajčata, paprika), ze živočišných surovin to jsou játra a ledviny.

Vitamín C je nezbytný pro tvorbu kolagenu (hydroxylaci prolinu a lyzinu), a tak i pro tvorbu kostí, zubů a jiných tkání, urychluje hojení ran, udržuje elasticitu kůže, přispívá k odolnosti organismu proti infekcím, vysokému krevnímu tlaku a ateroskleróze. Má antioxidantní účinky. Společně s vitamínem E chrání buněčné membrány a lipoproteiny LDL před oxidací, a má tak pozitivní vliv na snížení výskytu kardiovaskulárních onemocnění.

Jeho nedostatek se objevuje zřídka, projevuje se únavou, častým nachlazením, krvácením z dásní, ztrátou chuti k jídlu atd. Těžký deficit, s nímž se dnes setkáváme velmi vzácně, je znám jako kurděje.

13.4 Analytické stanovení vitamínů

V diagnostice se uplatňují moderní instrumentální metody, jako kapalinová chromatografie s hmotnostní dektací (HPLC/MS/MS).

Shrnutí kapitoly

Vitamíny jsou nezbytně důležité složky potravy, které mají řadu významných funkcí v metabolismu. Protože si je však organismus neumí sám vytvořit, musíme je v malých množstvích přijímat potravou. Dělíme je do dvou skupin, na vitamíny rozpustné ve vodě a v tucích. Do první skupiny řadíme vitamíny skupiny B, z nichž řada působí jako kofaktory enzymů, a vitamín C, který má významné antioxidantní vlastnosti. Do skupiny vitamínů rozpustných v tucích řadíme vitamín A, D, E, K. Vitamín A je důležitý pro vidění a syntézu glykoproteinů, vitamín D se uplatňuje v regulaci metabolismu vápníku a fosforu a jeho nedostatek ve stravě má za následek křivici a osteomalácii, vitamín E je nejdůležitějším antioxidantem v těle a vitamín K je potřebný k syntéze faktorů krevního srážení (např. II, VII, IX, X).

Otázky úkoly:

1. Jaký mají vitamíny biomedicínský význam?
2. Jak vitamíny dělíme?
3. Které vitamíny mají antioxidantní vlastnosti?
4. Který vitamín má vztah k osteoporóze?
5. Který vitamín není obsažen v rostlinné stravě?

Další doporučené zdroje k této kapitole:

1. Čermáková M. *Klinická biochemie*. 2. díl. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005.
2. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. *Harperova biochemie*, 3. vydání. H+H, 2002.
3. Racek J., Rajdl D. et al.: *Klinická biochemie*. 3., přepracované vydání. Praha: Galén, 2021.

PŘÍLOHA 1: Referenční meze

Analyt	Materiál	Referenční rozmezí				
		Jednotky	Muži		Ženy	
			Dolní mez	Horní mez	Dolní mez	Horní mez
Albumin	Sérum	g/L	35,00	52,00	35,00	52,00
	Moč	mg/L	0,00	19,9	0,00	19,9
Alfa1-kyselý glykoprotein (orosomukoid)	Sérum	g/L	0,50	1,30	0,50	1,20
	Moč	mg/L	0,00	50,0	0,00	50,0
Alfa1-mikroglobulin	Moč	mg/L	0,00	12,5	0,00	12,5
Alfa2-makroglobulin	Sérum	g/L	1,30	3,00	1,30	3,00
ALP	Sérum	μkat/L	0,58	1,75	0,58	1,75
ALT	Sérum	μkat/L	0,17	1,13	0,17	0,75
Amoniak	Plazma	μmol/L	18,0	72,0	18,0	72,0
Amyláza	Sérum	μkat/L	0,15	1,97	0,15	1,97
	Moč	μkat/L	0,10	10,8	0,10	10,8
Amyláza pankreatická	Sérum	μkat/L	0,22	0,88	0,22	0,88
Apolipoprotein A1	Sérum	g/L	1,00	1,70	1,10	1,90
Apolipoprotein B	Sérum	g/L	0,50	1,00	0,50	1,00
AST	Sérum	μkat/L	0,25	0,75	0,25	0,58
Beta2-mikroglobulin	Sérum	mg/L	0,80	2,34	0,80	2,34
Bilirubin celkový	Sérum	μmol/L	5,0	25,0	5,0	25,0
Bilirubin přímý	Sérum	μmol/L	0,00	5,00	0,00	5,00
C3 komplement	Sérum	g/L	0,90	1,80	0,90	1,80
C4 komplement	Sérum	g/L	0,10	0,40	0,10	0,40
Celková bílkovina	Sérum	g/L	62,0	78,0	62,0	78,0
	Moč	g/L	0,00	0,149	0,00	0,149
	Moč	g/24 h	0,00	0,20	0,00	0,20
Ceruloplazmin	Sérum	g/L	0,20	0,60	0,20	0,60
CK	Sérum	μkat/L	0,77	2,85	0,57	2,42
C-reactive protein	Sérum	mg/L	0,00	10,00	0,00	10,00
Cystatin C	Sérum	mg/L	0,62	1,11	0,62	1,11
Draslík	Sérum	mmol/L	3,50	5,10	3,50	5,10
	Moč	mmol/d	40,0	90,0	40,0	90,0
Fosfor	Sérum	mmol/L	0,75	1,65	0,85	1,50
	Moč	mmol/d	12,90	42,00	12,90	42,00

Analyt	Materiál	Referenční rozmezí				
		Jednotky	Muži		Ženy	
			Dolní mez	Horní mez	Dolní mez	Horní mez
Glukóza	Sérum	mmol/L	3,60	5,59	3,60	5,59
GGT	Sérum	μkat/L	0,17	1,67	0,17	0,75
Haptoglobin	Sérum	g/L	0,30	2,00	0,30	2,00
HbA1c	Plná krev	mmol/mol	20,0	42,0	20,0	42,0
HCO ₃ ⁻ std.	Plná krev	mmol/L	22	26,00	22,00	26,00
HCO ₃ ⁻ akt.	Plná krev	mmol/L	22,0	26,0	22,0	26,0
Hořčík	Sérum	mmol/L	0,71	0,94	0,71	0,94
	Moč	mmol/d	1,00	10,5	1,00	10,5
Chloridy	Sérum	mmol/L	97	108	97	108
	Moč	mmol/d	110	270	110	270
Cholesterol celkový	Sérum	mmol/L	2,90	5,00	2,90	5,00
Cholesterol HDL	Sérum	mmol/L	1,00	2,10	1,20	2,70
Cholesterol LDL	Sérum	mmol/L	1,20	3,00	1,20	3,00
Imunoglobulin A	Sérum	g/L	0,88	4,10	0,7	3,7
Imunoglobulin G	Sérum	g/L	7,0	16,00	7,0	16,00
Imunoglobulin M	Sérum	g/L	0,40	2,30	0,40	2,30
Kreatinin	Sérum	μmol/L	60,00	105,00	45,00	90,00
	Moč	mmol/d	8,00	18,00	8,00	18,00
Kyselina močová	Sérum	μmol/L	230,0	480,0	155,0	400,0
	Moč	mmol/d	1,48	4,43	1,48	4,43
Laktát	Plazma	mmol/L	0,50	2,20	0,50	2,20
LD	Sérum	μkat/L	1,75	3,42	1,75	3,42
Lipáza	Sérum	μkat/L	0,20	0,88	0,20	0,88
Lipoprotein (a)	Sérum	mmol/L	0,00	0,30	0,00	0,30
Měď	Sérum	μmol/L	11,00	20,00	13,40	24,50
Osmolalita	Sérum	mmol/kg	280,00	300,00	275,00	295,00
	Moč	mmol/kg	50,00	Viz pozn.	50,00	Viz pozn.
pH	Plná krev		7,36	7,44	7,36	7,44
pCO ₂	Plná krev	kPa	4,80	5,90	4,80	5,90
pO ₂	Plná krev	kPa	9,90	14,40	9,90	14,40
SO ₂	Plná krev		0,95	0,985	0,95	0,985
Sodík	Sérum	mmol/L	137	145	137	145

Analyt	Materiál	Jednotky	Referenční rozmezí			
			Muži		Ženy	
			Dolní mez	Horní mez	Dolní mez	Horní mez
Sodík	Moč	mmol/d	120	220	120	220
Transferin	Sérum	g/L	2,00	3,60	2,00	3,60
Triacylglyceroly	Sérum	mmol/L	0,45	1,70	0,45	1,70
Urea (močovina)	Sérum	mmol/L	3,20	8,10	2,60	6,40
	Moč	mmol/d	167,0	583,0	167,0	583,0
Vápník celkový	Sérum	mmol/L	2,15	2,60	2,15	2,60
	Moč	mmol/d	2,50	7,50	2,50	7,50
Vápník ionizovaný	Sérum	mmol/L	1,15	1,33	1,15	1,33
Vitámín A	Sérum	μmol/L	1,05	2,80	1,05	2,80
Vitámín B ₂	Sérum	nmol/L	106,0	638,0	106,0	638,0
Vitámín B ₃	Sérum	μmol/L	0,90	8,20	0,90	8,20
Vitámín B ₆	Plazma (EDTA)	nmol/L	20,20	121,80	20,20	121,80
Vitámín B ₁₂	Sérum	ng/L	125,0	512,0	125,0	512,0
Vitamin C	Plazma	μmol/L	23,0	85,0	23,0	85,0
Vitamin D ₂	Sérum	μg/L	8,90	46,70	8,90	46,70
25-hydroxy-vitamin D	Sérum	nmol/L	75,0	250,0	75,0	250,0
Vitamin E	Sérum	mg/L	5,5	17,0	5,5	17,0
Vitamin K	Sérum	nmol/L	0,29	2,64	0,29	2,64
Zinek	Sérum	μmol/L	9,10	18,00	9,10	18,00
Železo	Sérum	μmol/L	11,60	31,30	9,00	30,4

Poznámka: orientační hodnoty, není uvedeno rozdělení dle jednotlivých věkových kategorií

Název:

Klinická biochemie pro bakalářské studijní obory 1. díl

Autoři:

doc. RNDr. Pavlína Kušnierová, Ph.D. ^{1,2}

RNDr. Zdeněk Švagera, Ph.D. ^{1,2}

Mgr. Radka Šigutová^{1,2}

Doc. RNDr. Kristián Šafarčík, Ph.D. ^{1,2}

Ing. Vladimír Bartoš, Ph.D. ^{1,2}

MUDr. Věra Ploticová^{1,2}

¹Ústav laboratorní medicíny, Ostravská univerzita v Ostravě, Lékařská fakulta

²Ústav laboratorní medicíny, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Ostrava

Recenzenti:

RNDr. Jitka Prošková

Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc

doc. Mgr. Marek Bužga, Ph.D.

Ústav fyziologie a patofyziologie, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

Vydavatel:

Ostravská univerzita

Dvořákova 7

701 03 Ostrava

Vydání:

Druhé přepracované vydání, 2025

Počet stran:

88

Jazyková korektura nebyla provedena. Za jazykovou stránku je odpovědný autor.
Jedná se o autorské dílo.

CC BY-SA 4.0 (Uveďte původ – Zachovejte licenci) – dílo lze volně šířit s uvedením autora (původce) a zachováním licence, a to ke komerčním i nekomerčním účelům.

ISBN 978-80-7599-486-8 (online ; pdf)