

Vybrané kapitoly z biochemie

Anotace předmětu:

Předmět je koncipován jako teoreticko-praktický. Seznamuje studenty se základními poznatky z oblasti biochemie, informuje o biochemické rovnováze vnitřního prostředí organismu a jeho změnách v souvislosti s různými druhy onemocnění a poruch. Důležitou součástí jsou informace o metodách a technikách odběru biologického materiálu, jeho označování, uchovávání a odesílání ke zpracování do laboratoří. Má za cíl obeznámit studenty s jednoduchými metodami biochemických vyšetření, které se používají v primární péči.

Garant předmětu:

Mgr. Barbora Staňková

1 Preanalytická příprava biologického materiálu

Spolehlivost výsledků laboratorního vyšetření závisí nejenom na pečlivém zpracování biologického materiálu, ale též na kvalitě odběru, transportu a uchování vzorků. Spolehlivý výsledek může být dosažen jen v tom případě, kdy jsou dodrženy veškeré podmínky před samotným stanovením (preanalytická fáze), během stanovení (analytická fáze) a po stanovení (postanalytická fáze). Preanalytická fáze má významný podíl na spolehlivosti a správnosti laboratorního vyšetření. Zahrnuje veškeré procesy před vlastním analytickým stanovením jako je příprava pacienta, odběr biologického materiálu, transport vzorků, příjem a identifikace vzorků v laboratoři, příprava vzorků před vlastním stanovením požadovaných analytů a uchovávání vzorků. Preanalytická část vyšetření je zdrojem preanalytické variability laboratorního výsledku.

1.1 Příprava pacienta

Pro správný odběr biologického materiálu (krev, moč) jsou často požadovány standardní podmínky odběru, podle kterých má pacient dodržet tato pravidla:

- **lačnit po dobu 10–12 hodin**, aby se zamezilo ovlivnění změn koncentrace některých analyzovaných složek dietou
- vyloučit pití slazených nápojů, kávy, vody sycené oxidem uhličitým
- vyloučit kouření, pití alkoholu a užívání drog
- omezit fyzickou aktivitu, vyvarovat se stresu
- podle možností vysadit léky, které by mohly ovlivnit výsledky analýz
- ráno před odběrem vypít 200 ml tekutin (nesycená voda, neslazený čaj).

1.2 Odběr krve

Nejpoužívanějším biologickým materiálem pro biochemické analýzy v laboratoři je krev. Podle místa a způsobu odběru rozlišujeme tři typy krve – **venózní**, **arteriální** a **kapilární**. V závislosti na použití antikoagulačních látek můžeme odebírat krev **srážlivou** (sérum) a **nesrážlivou** (plazma). Na rozdíl od plazmy sérum neobsahuje fibrinogen a další srážecí faktory krve.

Většina biochemických vyšetření je prováděna ze séra, které získáme ze spontánně sražené krve. Pro některá vyšetření je však nutný odběr krve nesrážlivé, kterou získáme

odběrem do zkumavek obsahujících antikoagulační prostředek. Nesražená krev se používá na přípravu krevní plazmy, separaci erytrocytů nebo celá tzv. plná krev. Plná krev je nutná pro stanovení krevních plynů, některých stopových prvků, glykovaného hemoglobinu, amoniaku, laktátu a pro hematologická vyšetření. V erytrocytech se stanovuje např. superoxid-dismutasa či glutathion.

Antikoagulační látky

Nejčastěji používanými antikoagulanty jsou EDTA, citrát, oxalát (základním principem jejich působení je pevná vazba kalciových iontů nutných pro přeměnu fibrinogenu na fibrin) a heparin.

U některých vyšetření jsou naměřené hodnoty nezávislé na použití antikoagulačních látek (u séra i plazmy se neliší), u jiných mohou být v plazmě sníženy (např. albumin, glukosa, sodík, draslík, kyselina močová) či zvýšeny (např. chloridy, celkové proteiny, vápník). Výhodou nesrážlivé krve je rychlejší dostupnost plazmy (pro akutní vyšetření) – není třeba čekat na koagulaci krevních elementů, určitou nevýhodou mohou být problémy s jejím skladováním, především tvorba sraženiny, která může ucpat analytický systém. Při výběru vhodného antikoagulantu je nutno zohlednit jeho možné interference s analytickým stanovením.

EDTA

Kyselina ethylendiamintetraoctová (používá se její dvojsodná nebo draselná sůl) je silným chelatačním (komplexotvorným) činidlem především pro dvoj- a trojmocné ionty. Tuto vlastnost je třeba mít na paměti při stanovení analytů, které mohou být tímto ovlivněny (železo, vápník, hořčík, enzymy s kovovými kofaktory).

Heparin

Heparin je mukopolysulfát a jako antikoagulant je používána jeho sodná, draselná, lithná či amonná sůl. Lithná sůl je nejrozšířenější, protože neovlivňuje stanovení sodíku a draslíku. Inhibuje přeměnu protrombinu na trombin a zabraňuje tak tvorbě fibrinu z fibrinogenu. Heparin inhibuje aktivitu některých enzymů (např. kyselých fosfatasy, laktátdehydrogenasy).

Citrát sodný

Antikoagulační účinek spočívá v chelatační vazbě kalciových iontů, jejich přidáním lze tento účinek zrušit. Nelze jej používat právě pro stanovení vápníku a některých enzymových aktivit (aminotransferasy, alkalická fosfatasa).

Oxaláty

Jako antikoagulant slouží sodná, draselná, lithná či amonná sůl kyseliny šťavelové, která rovněž tvoří nerozpustné komplexní sloučeniny s kalciovými ionty. Oxaláty většinou způsobují snížení hematokritu a tím ovlivňují hodnoty většiny analytů v plazmě, dále inhibují i aktivitu některých enzymů (kyselých fosfatasy, amylasy, laktátdehydrogenasy).

Konzervační látky

Pro stanovení některých analytů je nutné přidáním konzervačních látek zabránit jejich rozkladu. Například působením enzymatických systémů dochází již 30 minut po odběru ke glykolýze (rozklad glukosy). Jako antiglykolytický prostředek je obvykle využíván **fluorid sodný**, který působí také jako slabé antikoagulant. Jiným konzervačním prostředkem je **jodoacetát**, který rovněž zabraňuje glykolýze, ale nemá antikoagulační účinky.

1.2.1 Odběr venózní krve

Tento odběr je prováděn jednak v odběrových centrech či ambulancích, jednak na lůžkových odděleních pověřeným zdravotnickým personálem (sestra, lékař). Před odběrem je třeba připravit příslušnou dokumentaci (žádanku) a pomůcky (řádně označené odběrové zkumavky pro jednotlivá vyšetření). **Identifikační údaje na odběrové zkumavce musí být identické s údaji na žádance!**

Nejčastěji je odebírána krev z loketní žíly (u zavedené infuze nebo u žen po jednostranné mastektomii odebíráme z opačné ruky). Před odběrem je třeba se ujistit, že pacient dodržel požadovaná dietní opatření, zajistit správnou polohu paže a posoudit kvalitu žilního systému. Pacient by měl zaujmout polohu vsedě (zklidnění) nejméně 20 min před odběrem. Pokud to není nezbytně nutné (jako např. u pacientů se špatným žilním systémem) používáme pro odběr krve zásadně uzavřené (nejlépe vakuované) odběrové systémy. Většina výrobců vakuových zkumavek dodržuje doporučené barevné značení zátek odběrových zkumavek podle přídatku antikoagulačních a stabilizačních látek. Příklad barevného kódování odběrových zkumavek přehledně znázorňuje tabulka 1.1. Kromě barevného rozlišení je na každé zkumavce uvedené použité aditivum spolu s jeho množstvím a vyznačená plnicí ryska. Při odběru nesrážlivé krve musí být zkumavky naplněny na požadovanou hladinu vyznačenou na zkumavce, aby byla zachována správná koncentrace antikoagulantu.

Pomocí vakuovaných zkumavek lze z jednoho vpichu naplnit více různých odběrových zkumavek. Při vícenásobném odběru do různých zkumavek by mělo být dodrženo doporučené pořadí:

- nádobky pro odběr hemokultury
- zkumavky bez aditiv (přísad)
- zkumavky pro vyšetření hemokoagulace
- zkumavky pro sedimentaci
- zkumavky s aditivou (přísadami)

Pro usnadnění odběru používáme většinou turniket, z dřívějších dob známý jako Esmarchovo zaškrcovadlo (nesprávně škrtidlo), je však třeba jej uvolnit ihned po odkápnutí první kapky krve do zkumavky. Delší zaškrčení (nad 3 min.) vede ke změnám hladin některých analytů. Při odběru na stanovení laktátu jej použít nesmíme. Dříve praktikované cvičení se zařatou pěstí se dnes již nedoporučuje (vede ke zvýšení hladin např. draslíku či laktátu).

Místo vpichu dezinfikujeme, žílu napichujeme až po úplném oschnutí dezinfekčního prostředku, aby nedošlo k hemolýze. Při odběru na stanovení alkoholu musí být použit dezinfekční prostředek, který alkohol neobsahuje. Předpokládaného místa vpichu se zásadně nedotýkáme. Úhel mezi paží a stříkačkou má být asi 15°.

Všechny zkumavky s aditivou musíme ihned po odběru dokonale promíchat jemným opakovaným obracením zkumavky, nedostatečné promíchání může ovlivnit laboratorní výsledky. **Zásadně se zkumavkou netřepáme**, aby nedošlo k hemolýze.

Tabulka 1.1 Barevné kódy zátek odběrových zkumavek řazené podle doporučeného pořadí při odběru z jednoho vpichu

Barevný kód	Antikoagulans	Biologický materiál	Poznámka
-------------	---------------	---------------------	----------

zátky			
červená	není	sérum	prvky, enzymy
světle modrá	citrát sodný	plazma nebo plná krev	vyšetření hemokoagulace (PT, INR, a PTT)
černá	citrát sodný	plazma nebo plná krev	sedimentace (FW)
zlatá	není	sérum	obsahuje separátový gel
zelená	heparin	plazma nebo plná krev	porfyriny, katecholaminy, chloridy
fialová	EDTA	plazma nebo plná krev	hematologická vyšetření
šedá	oxalát, fluorid, jodoacetát	plazma nebo plná krev	glykémie (stabilizace hladiny glukosy až 24 hod.)
tmavě modrá	není nebo EDTA	sérum nebo plazma nebo plná krev	výhradně plast s garantovaným množstvím kontaminujících látek, stopové prvky a RNA analýzy

1.2.2 Odběr arteriální krve

Odběr z arterie provádí buď lékař, nebo speciálně vyškolený pracovník. Doporučuje se buď radiální arterie na zápěstí, brachiální na loktu nebo femorální v třísele. U novorozenců je nejvhodnější odběr z katétru zavedeného do pupečnickové arterie.

Arteriální krev je využívána ke stanovení krevních plynů, proto je důležité odstranit vzduch z jehly a mrtvého prostoru stříkačky (např. propláchnutím roztokem heparinu). Odběr arteriální krve se někdy nahrazuje odběrem krve **arterializované** (kapilární krev odebraná z prohřátého prstu nebo ušního lalůčku). Podobně jako u arteriální krve je důležitý anaerobní průběh odběru – kapka nesmí stékat po prstu, kapilára musí být bez bublin. **Při nedodržení anaerobních podmínek při odběru nebo nedostatečném prokrvení vyšetření ztrácí svůj význam!**

1.2.3 Odběr kapilární krve

Tento odběr provádíme při potřebě malého množství krve, např. pro stanovení glukosy. Vhodným místem vpichu je bříško třetího nebo čtvrtého prstu, ušní lalůček a u novorozenců pata. Po oschnutí dezinfekčního prostředku se provede vpich cca 2,5 mm, první kapka se odsaje buničinou, další se nasají kapilárním efektem do heparinizované kapiláry. Ve vzorku nesmí být bublinky vzduchu. Prst zásadně nemasírujeme, mohlo by dojít ke zkreslení výsledků. Kapilární odběr není doporučován u pacientů se špatným krevním oběhem.

1.2.4 Faktory ovlivňující složení odebrané krve

Místo odběru – typ krve

Složení krve je značně ovlivněno místem odběru. Kapilární krev se více podobá arteriální než venózní krvi, především parametry acidobazické rovnováhy. Hladina glukosy je ve venózní krvi nižší než v arteriální díky její spotřebě v tkáních. Složení kapilární krve může ovlivnit i odběr z neprohřátých míst, a dále její kontaminace intersticiální a intracelulární tekutinou.

Hemolýza

Při hemolýze dochází ke kontaminaci séra či plazmy obsahem porušených erytrocytů. Příčinou hemolýzy může být nedostatečně oschlý dezinfekční prostředek na místě vpichu, vystavení krve mrazu nebo naopak vysoké teplotě při transportu, mechanické poškození erytrocytů při nesprávném míchání nesrážlivé krve, nesprávný poměr objemu krve a antikoagulačního prostředku, přítomnost vody v odběrové nádobce. Častější bývá hemolýza u séra než u plazmy. Laboratorní výsledky v hemolytických vzorcích jsou ovlivněny například zvýšenou koncentrací (aktivitou) těch analytů, které jsou především intraerytrocytární (draslík, laktátdehydrogenasa) nebo zvýšením absorpance při fotometrickém stanovení vlivem červeného zbarvení hemoglobinem.

Chylózní či ikterické vzorky

Laboratorní výsledky mohou být rovněž výrazně ovlivněny chylózním nebo ikterickým sérem (plazmou). V chylózním séru jsou výrazně zvýšeny triacylglyceroly (způsobují mléčný zákal), v ikterickém séru je zvýšen bilirubin (způsobuje intenzivně žluté zbarvení). Oba tyto faktory výrazně ruší spektrofotometrické stanovení.

1.3 Odběr moči

Pro upřesnění diagnostiky je třeba analyzovat řadu parametrů nejen v krvi, ale i v moči. Orientační biochemická analýza moči zahrnuje stanovení pH, kvalitativní průkaz proteinů, glukosy, ketolátek, žlučových barviv a erytrocytů. Kvantitativně se v moči stanovuje převážně bílkovina (proteinurie) a glukosa (glykosurie). Kvalitativní i kvantitativní vyšetření moči vyžaduje správně provedený odběr, u kvantitativních vyšetření i dodržení časového intervalu sběru a přesné odměření objemu sbírané moči.

1.3.1 Jednorázový odběr moči

Nejčastěji je vyšetřována **první ranní moč**, kdy je po pečlivém očištění genitálu odebrán **střední proud** moči do naprosto **čisté nádobky** (bez čistících nebo dezinfekčních prostředků). Tento vzorek je považován za nejkonzentrovější, proto se používá pro mikroskopická vyšetření (vyšetření močového sedimentu) a pro stanovení koncentrace některých složek (proteinů, hormonů). Pro bakteriologické vyšetření močového měchýře se rovněž používá střední proud moči, při zánětu močové trubice se na bakteriální vyšetření odebírá prvních 10 ml moči.

1.3.2 Sběr moči

Vylučování některých látek je třeba sledovat ve sbírané moči. Před začátkem sběru je důležité zcela vyprázdnit močový měchýř a dále po určenou dobu sbírat moč do jedné nádoby. Nádoba s celkovým sběrem by měla být uchovávána v lednici (při vyšší teplotě se množí bakterie). Je třeba zamezit ztrátám moči při stolici. Moč je obvykle sbírána po dobu 2, 8, 12 anebo 24 hod. Po ukončení sběru je změřen objem, moč promíchána a reprezentativní vzorek odeslán k analýze.

Před začátkem sběru je třeba seznámit pacienta s dietním doporučením a užíváním léků v průběhu tohoto sběru.

1.4 Odběr ostatního biologického materiálu

1.4.1 Odběr stolice

Častým vyšetřením stolice je test na okultní (skryté) krvácení, který je důležitý pro odhalení krvácejícího vředu nebo nádoru v zažívacím traktu. Vzorek stolice pacient odebere špachtlí do sterilní nádoby.

1.4.2 Odběr plodové vody

Odběr plodové vody (amniocentéza) se provádí pro diagnostiku vrozených vad plodu, zjištění jeho zralosti, případně i intrauterinní infekce. Provádí jej lékař v lokální anestezii za současné kontroly ultrazvukem.

1.4.3 Odběr mozkomíšního moku

Vyšetření mozkomíšního moku je indikováno při podezření na demyelinizační choroby, meningitidu nebo na postižení mozku u maligních onemocnění. Odběr mozkomíšního moku (likvoru) provádí zásadně lékař, většinou z oblasti bederní páteře (v lokální anestezii), peroperačně lze provést i odběr z krční páteře či mozkových komor. Okamžitě po odběru je nutné v odebrané tekutině provést stanovení glukosy a současně je pro správnou interpretaci výsledku třeba stanovit i glykemii.

1.4.4 Odběr ostatních tělních tekutin a tkání

Odběr synoviální tekutiny (atrocentéza)

Synoviální tekutinu je třeba vyšetřit pro určení typu artritidy a pro rozlišení zánětlivého a nezápětlivého výpotku. Odběr provádí lékař za sterilních podmínek, odebraný materiál je použit pro kultivaci, stanovení glukosy a proteinů.

Odběr slin

Sliny lze použít pro stanovení krevních skupin, drog a měření hladin léků. Po vypláchnutí úst se žvýká inertní materiál, první sliny se vyplivnou do odpadu a další se sbírají do sběrné nádoby.

Odběr hnisu

Provádí se sterilní stříkačkou na periferii rány (většinou před započatím léčby antibiotiky), obsah stříkačky se přenesse do **sterilní zkumavky** (prázdné nebo s transportní půdou), okamžitě se zazátkuje a odešle do laboratoře. V případě, že nelze stříkačku použít, se odběr provede setřením poškozeného místa sterilním vatovým tamponem, který se vloží do sterilní odběrové soupravy s transportní půdou. U kontrolních odběrů v průběhu antibiotické

léčby (např. při zhoršení stavu pacienta) se musí záznam o použité léčbě uvádět na žádanku!

Odběr tkání – biopsie

Vzorky tkáně odebrané biopsií se nejčastěji používají na **histologická vyšetření** při diagnostice nádorových onemocnění, některých chorob jater, ledvin a poruch svalové tkáně. Mezi nejčastěji analyzovaný materiál patří vzorky prsní tkáně. Biopsie může být provedena pomocí speciální jehly (bioptická jehla), která se po dezinfekci místa vpichu a lokálním umrtvení zavede pod kontrolou ultrazvukem do hmoty nádoru, nebo se biopsie provádí při chirurgickém zákroku.

1.5 Transport biologického materiálu

Transport biologického materiálu by měl být zásadně šetrný a rychlý (nutnost oddělení plazmy nebo séra od krevních buněk nejpozději do 2 hodin od odběru). Veškerý biologický materiál se do laboratoře přepravuje v uzavřených odběrových nádobách při adekvátní teplotě a světelných podmínkách (např. kyselina listová a bilirubin jsou fotosenzibilní – na přímém světle dochází k jejich rozkladu). Krev na některá speciální vyšetření (amoniak, homocystein) vyžaduje transport v ledové tříšti. Před uložením zkumavky s odebraným vzorkem do ledové tříště je nutné počkat na ochlazení krve na pokojovou teplotu (minimálně 10 minut od odběru), aby nedošlo k hemolýze.

Některý biologický materiál (mozkomíšní mok, plodová voda) je vzhledem ke značné zátěži pacienta při jeho odběru nutné doručit do laboratoře maximálně do jedné hodiny od odběru, aby nedošlo k jeho znehodnocení. Moč na morfologické vyšetření močového sedimentu rovněž nesmí být starší než jedna hodina.

2 Indikace a interpretace biochemických vyšetření

Velmi důležité pro stanovení diagnózy (posouzení stavu pacienta) jsou **efektivní indikace** (požadování) a **správná interpretace** (hodnocení) biochemického vyšetření.

Komplexní biochemické vyšetření zahrnuje tři části – část preanalytickou, část analytickou a nejnáročnější část postanalytickou. Do části preanalytické spadá příprava pacienta, odběr materiálu a jeho transport, základní zpracování (např. separace séra, plazmy) a správné uskladnění vzorků. V analytické části je provedeno vlastní stanovení požadovaných analytů a uložení výsledků do laboratorního informačního systému (LIS). Laboratorní informační systém má zadány referenční meze (fyziologické hodnoty jednotlivých analytů), které upozorní na jejich zvýšenou či sníženou hladinu. V postanalytické fázi posoudí ošetřující lékař biochemický nálezný v kontextu s dalšími faktory a stanoví diagnózu.

2.1 Indikace biochemických vyšetření

U biochemických vyšetření rozlišujeme z hlediska indikace 3 úrovně: základní, speciální a vysoce speciální, přičemž indikace v jednotlivých úrovních závisí na přiznané odbornosti pracoviště.

Základní vyšetření obvykle indikují lékaři, kteří jsou v prvním styku s pacientem, a slouží k určení nejpravděpodobnější diagnózy a monitorování následné léčby, ale i pro preventivní vyšetření. Pokud základní vyšetření neposkytne dostatečné informace, případně neumožní stanovení diagnózy, vyvstane potřeba požadavku na speciální vyšetření.

Speciální vyšetření jsou využívána pro diferenciální diagnostiku, hodnocení metabolických funkcí, sledování průběhu terapie, případně slouží i výzkumným účelům. Řada těchto vyšetření může být požadována pouze lékaři s potřebnou specializací.

Vysoce speciální vyšetření slouží pro rozpoznání neobvyklých diagnóz nebo pro složitá funkční vyšetření. Vyžadují technicky náročné vybavení pracoviště a vysokou specializaci pracovníků (vzhledem k charakteru stanovovaných analytů).

Z hlediska účelu rozlišujeme biochemická vyšetření na **orientační, screeningová** a **akutní**. Orientační vyšetření se provádějí přímo v ordinaci či u lůžka pacienta a patří sem především kvalitativní vyšetření moči testovacími (diagnostickými) proužky nebo stanovení glykémie glukometrem. Screeningová vyšetření například umožňují odhalit počáteční stádium choroby u osob bez klinických příznaků; preventivně se používají k monitorování osob s nepříznivou rodinnou anamnézou (diabetes mellitus). Akutní (statimová) vyšetření se provádějí v biochemických laboratořích bezprostředně po dodání materiálu bez ohledu na denní dobu.

Pro maximální účelnost biochemických testů je třeba se zaměřit na cílené řešení problému daného konkrétním klinickým stavem pacienta. Je třeba znát význam požadovaného testu pro určení daného onemocnění, i smysl jeho opakovaného požadavku.

Pro správné určení diagnózy obvykle nepostačí stanovení jednoho analytu, ale stejně tak je nevhodné požadovat všechna vyšetření uvedená na žádance. Pro lepší orientaci jsou sestaveny soubory vyšetření s cíleným zaměřením na jednotlivé orgány nebo metabolické funkce.

Obecný biochemický soubor je zaměřený na získání potřebných informací pro určení předběžné diagnózy u pacientů s podezřením na celkové onemocnění, jako doplněk k anamnestickým údajům a fyzikálnímu vyšetření.

K posouzení funkce jednotlivých orgánů slouží **orgánové biochemické soubory**. Pro ověření diagnózy určitého onemocnění (syndromu) či jeho metabolického rizika slouží syndromově specializované soubory

2.2 Interpretace výsledků biochemických vyšetření

Správná interpretace výsledků biochemických testů je nejnáročnější částí celého procesu diagnostiky. Získané výsledky je třeba kvalifikovaně posuzovat v kontextu jednak s preanalytickou variabilitou sledovaných parametrů, jednak s řadou biologických faktorů (ovlivnitelných i neovlivnitelných) a dále ve vztahu k referenčním hodnotám, k jiným vyšetřením, i ke stejným vyšetřením v časovém sledu.

2.2.1 Fyziologické rozmezí biochemických hodnot

Nejčastěji jsou výsledky biochemických vyšetření porovnávány s fyziologickými (referenčními, normálními) hodnotami. Určení fyziologických hodnot jednotlivých analytů je náročný proces, kdy jsou tyto analyty vyšetřovány u definovaných souborů osob bez klinických projevů onemocnění. Je třeba vzít v úvahu i fakt, že tyto hodnoty jsou pro celou řadu analytů závislé na věku a pohlaví.

2.2.2 Biologické faktory ovlivňující biochemické hodnoty

Biologické faktory v zásadě rozdělujeme na ovlivnitelné a neovlivnitelné. K ovlivnitelným řadíme stravovací návyky, fyzickou konstituci, kouření, fyzickou aktivitu, dietní abnormality (konzumace alkoholu), užívání léků nebo návykových látek, vlivy zevního prostředí (geografická lokalizace, pracovní zátěž, stres) a polohu těla při odběru. K neovlivnitelným faktorům patří především rasa, pohlaví a věk, gravidita, biologické cykly.

Stravovací návyky

Odběry krve pro diagnostické účely provádíme zásadně v ranních hodinách po předchozím minimálně dvanáctihodinovém lačnění, v případě akutní potřeby odběru v průběhu dne je třeba vzít v úvahu dobu od požití potravy i její charakter. Lze očekávat např. zvýšenou glykémii, urikémii, koncentraci železa, sodíku atd. I při dodržení standardních podmínek odběru je třeba vědět, že jednostranně zaměřená dieta může významně ovlivnit koncentrace některých analytů (např. strava bohatá na bílkoviny zvyšuje urikémii, strava bohatá na tuky triacylglycerolémii).

Fyzická konstituce

Koncentrace některých analytů souvisí s množstvím tukové i svalové tkáně. U obézních osob je např. známa hypertriacylglycerolémie, hypercholesterolémie, hyperurikémie, hyperinzulinémie; u malnutričních stavů je běžným nálezem hypertriacylglycerolémie a hypocholesterolémie. S množstvím svalové hmoty pozitivně koreluje koncentrace kreatininu.

Kouření

U kuřáků jsou známy zvýšené koncentrace cholesterolu, triacylglycerolů, kortizolu, olova, kadmia; snížené jsou koncentrace HDL-cholesterolu, imunoglobulinů a vitamínu B12. Kouření rovněž zvyšuje koncentrace karbonylovaného hemoglobinu.

Fyzická aktivita

Změny některých biochemických parametrů závisí na délce a intenzitě cvičení. Krátkodobé cvičení např. zvyšuje koncentrace laktátu a glukosy, dlouhodobá zátěž snižuje koncentraci glukosy a zvyšuje koncentrace sodíku, draslíku a močoviny. U trénovaných jedinců fyzická aktivita ve složení lidského séra vyvolává menší změny než u netrénovaných osob.

Konzumace alkoholu

Pravidelná konzumace alkoholu zvyšuje aktivitu aminotransferas, koncentrace kortizolu, adrenalinu, laktátu a kyseliny močové; současně vede k hypoglykémii a ketoacidóze. Charakteristickým znakem požití většího množství alkoholu je hypertriacylglycerolémie; mírná opilost může vyvolat hyperglykémii (obzvláště u diabetiků).

Užívání léků a návykových látek

Pravidelné užívání léků může ovlivnit koncentrace některých analytů přímo in vivo (např. hypercholesterolémie při užívání antihypertenziv diuretického typu), nebo in vitro jejich interferencí při chemické analýze. Vliv léků a drog na biochemické vyšetření nelze zobecnit vzhledem k jejich různorodému působení na biochemické procesy. Pokud je to možné, měl by pacient lék před odběrem krátkodobě vysadit, v opačném případě je třeba užívání léků uvést na žádanku. Ovlivnit hodnoty některých biochemických parametrů mohou nejen podané látky, ale též způsob jejich aplikace. Například intramuskulární aplikace léku/látky vede k podráždění svalu, což má za následek uvolnění intracelulárních enzymů (CK, LD, ALT, AST) do séra.

Vlivy zevního prostředí

Některé biochemické parametry mohou být ovlivněny pobytem ve vysoké nadmořské výšce (adaptace organismu zvýšeným počtem erytrocytů a s tím související zvýšení koncentrace hemoglobinu a CRP, snížení koncentrace kreatininu v moči). Další změny mohou nastat v důsledku odlišné geografické lokalizace a s ní související změny stravovacích návyků.

Dlouhodobé působení stresu charakteristické pro současný životní styl může vést jednak k nadměrné, jednak ke snížené konzumaci potravy, případně i alkoholu a drog; s tím souvisejí výše popsané změny biochemických parametrů.

Tělesná poloha při odběru

Poloha pacienta při odběru krve ovlivňuje plazmatické koncentrace některých analytů, proto je v rámci dodržení standardních podmínek nutné zajistit polohu pacienta vsedě cca 15 minut před odběrem i během něj. Ve vzpřímené pozici je koncentrace vysokomolekulárních látek (bílkoviny, enzymy, látky vázané na bílkoviny, hormony) v průměru o 10-15% vyšší než v poloze vleže.

Pohlaví a věk

Před pubertou nejsou významné rozdíly mezi pohlavími. Po jejím nástupu dochází k odlišení především pohlavních hormonů, ale také k rozdílným sérovým koncentracím/aktivitám některých analytů. Například u mužů jsou fyziologické hodnoty koncentrací kreatininu (větší podíl svalové hmoty), kyseliny močové, močoviny, železa, aktivit kreatinkinasy a g-glutamyltransferasy vyšší než u žen; naopak muži mají nižší fyziologické koncentrace HLD-cholesterolu než ženy. S věkem se také mění celá řada biochemických parametrů, což souvisí s vývojem organismu. **Vliv věku a pohlaví je zohledněn v rozmezí referenčních hodnot.**

Biologické cykly

Některé biochemické parametry vykazují během dne pravidelné cyklické změny - **cirkadiánní cykly** (např. variabilita koncentrací kortizolu, železa, bílkoviny, draslíku, jejichž koncentrace dosahují maxima ráno a minima večer; naopak koncentrace kreatininu dosahuje svého maxima večer). K fyziologickým změnám hladin některých analytů dochází i v průběhu ročních období – **sezónní variace** (např. koncentrace trijodthyroninu je nižší v létě).

Gravidita

Při normálně probíhajícím těhotenství dochází k řadě biochemických procesů, jejichž důsledkem jsou změny v koncentracích některých analytů v krvi matky (např. zvýšení koncentrace plazmatických transportních proteinů, proteinů akutní fáze, snížení koncentrace železa).

Rasa

Základní biochemické parametry nejsou rasou výrazně ovlivněny, určité změny se však mohou vyskytnout v souvislosti s množstvím svalové hmoty (např. černoši mají zvýšenou aktivitu kreatinkinasy a amylasy).

Složení tělních tekutin může být ovlivněno např. i zvýšenou teplotou, traumatem, terapeutickým nebo diagnostickým zásahem.

Vliv biologických faktorů na sérové koncentrace některých analytů přehledně ukazuje tabulka 2.1.

Tab. 2.1: Příčiny změn koncentrací vybraných biochemických parametrů

Analyt	Příčina zvýšené koncentrace/aktivity v séru	Příčina snížené koncentrace/aktivity v séru
ALT	intenzivní svalová aktivita, chronický alkoholismus	
AST	chronický alkoholismus, dlouhodobá fyzická zátěž	
GMT	chronický alkoholismus	hladovění
ALP	hladovění, dlouhodobá fyzická zátěž, prepubertální věk, strava bohatá na sacharidy, BPPO*	
CK	svalová aktivita, rasa, dlouhodobá fyzická zátěž	
LD	strava bohatá na sacharidy	BPPO *
Laktát	intenzivní cvičení, chronický alkoholismus	
Kreatinin	pohlaví (muži)	prepubertální věk
Kyselina močová	strava bohatá na proteiny, intenzivní tělesná zátěž, hladovění, BPPO*, chronický alkoholismus	strava bohatá na lipidy
Močovina	strava bohatá na proteiny, dlouhodobá fyzická zátěž	
Cholesterol	strava bohatá na lipidy, kouření, chronický alkoholismus	hladovění, strava bohatá na sacharidy, dětství, intenzivní tělesná zátěž
HDL-C		kouření
TAG	strava bohatá na lipidy, kouření, chronický alkoholismus i jednorázové požití, BPPO *	hladovění, strava bohatá na sacharidy, intenzivní tělesná zátěž
Glukosa	strava bohatá na sacharidy, BPPO, kouření, krátkodobé intenzivní cvičení, mírné požití alkoholu, kofein	chronický alkoholismus, dlouhodobé intenzivní cvičení
Bílkoviny	strava bohatá na proteiny	strava bohatá na sacharidy
Transportní proteiny	Gravidita	
Reaktanty akutní fáze	gravidita, horečka	
Fe	BPPO*	gravidita
Na	BPPO*, dlouhodobá fyzická zátěž	
Ca	dlouhodobá fyzická zátěž	
K	dlouhodobá fyzická zátěž	
Fosfáty	strava bohatá na proteiny, dlouhodobá fyzická zátěž	BPPO*

Hemoglobin	nadmořská výška	
------------	-----------------	--

*BPPO – bezprostřední požití potravy před odběrem

Seznam zkratk:

ALP: alkalická fosfatasa

ALT: alaninaminotransferasa

AST: aspartátaminotransferasa

CK: kreatinkinasa

GMT: g-glutamyltransferasa

HDL: lipoproteiny o vysoké hustotě

HDL-C: HDL-cholesterol

LD: laktátdehydrogenasa

TAG: triacylglyceroly

3 Sacharidy

Sacharidy, látky složené pouze z uhlíku, vodíku a kyslíku, jsou nejrozšířenější skupinou organických látek a tvoří největší podíl organické hmoty na Zemi. Formálně lze jejich složení vyjádřit vzorcem $(CH_2O)_n$, kde $n \geq 3$. Slouží jako důležitý zdroj a zásoba energie jak pro živočichy (glykogen), tak pro rostliny (škrob). U rostlin a bakterií tvoří i základní součást buněčných membrán (celulóza). D- ribosa/D-deoxyribosa je základní složkou ribonukleových kyselin (RNA, DNA).

3.1 Rozdělení sacharidů a nejdůležitější zástupci sacharidů

Podle počtu sacharidových jednotek se sacharidy dělí do tří skupin:

a) monosacharidy (1 cukerná jednotka, 3-7 uhlíků)

b) oligosacharidy (2-10 cukerných jednotek)

c) polysacharidy (velký počet monosacharidových jednotek).

U oligosacharidů a polysacharidů jsou jednotlivé sacharidové jednotky spojeny jednoduchými kovalentními vazbami.

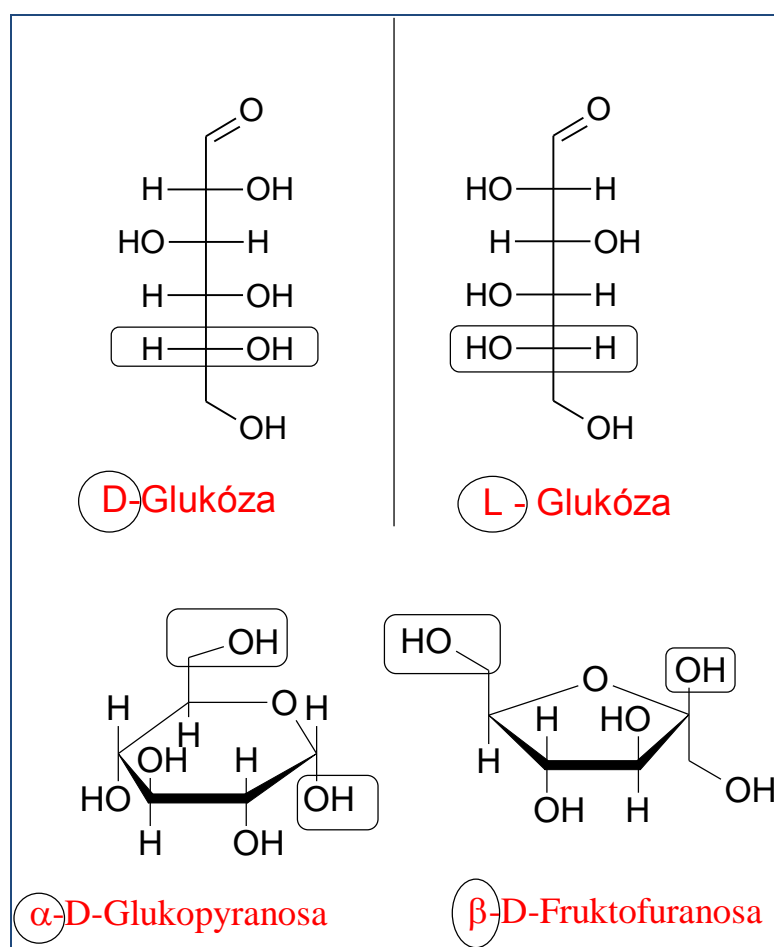
Monosacharidy

Jednoduché sacharidy neboli monosacharidy jsou tvořeny 3 až 7 uhlíky a podle jejich počtu, se monosacharidy rozdělují na triosy, složené ze tří uhlíků (dihydroxyaceton = glyceron, glyceraldehyd), tetosy (4 uhlíky), **pentosy** (5 uhlíků), **hexosy** (6 uhlíků) a heptosy (7 uhlíků). Na základě funkční skupiny monosacharidu jsou rozlišovány **aldosy** (polyhydroxyaldehydy) s aldehydovou funkční skupinou (-CHO) a **ketosy** (polyhydroxyketony) s ketonovou funkční skupinou (-CO-) na druhém uhlíku.

Každá molekula aldosa obsahuje $n-2$ a každá ketosa $n-3$ chirálních uhlíků (uhlíky se 4 různými substituenty), kde n vyjadřuje počet uhlíků monosacharidu. Na základě počtu chirálních uhlíků můžeme určit počet stereoizomerů monosacharidů o určitém počtu uhlíků. Aldosa s n uhlíky existuje v počtu 2^{n-2} stereoizomerů, ketosa pak v počtu 2^{n-3} stereoizomerů. Podle uspořádání substituentů (určováno na základě polohy OH- skupiny) na předposledním uhlíku monosacharidového řetězce se rozlišují D- a L-monosacharidy (obrázek 3.1.). Součástí biologických molekul jsou mnohem častěji **D-formy** než **L-formy**.

Monosacharidy s 3 a 4 uhlíky jsou běžně přítomny v lineární podobě, zatímco u monosacharidů s 5 a více uhlíky dochází reakcí karbonylové skupiny s alkoholovou skupinou k tvorbě vnitřních hemiacetalů/hemiketalů a tak se tyto monosacharidy vyskytují v cyklické podobě. Sacharidy uspořádané do 5-ti členných kruhů se nazývají **furanosy**, sacharidy tvořící šestičlenný kruh pak **pyranosy** (obrázek 3.1.). Zacyklením řetězce dojde k vytvoření nového chirálního centra a to na uhlíku, který byl původně nositelem karbonylové skupiny (C1 či C2). Cyklické uspořádání umožňuje rozlišení pouze dvou prostorových uspořádání v tomto novém centru, tedy vznikají dva stereoisomery, nazývané anomery a podle umístění OH- skupiny se rozlišují **a-anomer** a **b-anomer** (obrázek 3.1.).

K biologicky nejvýznamnějším aldosam patří D-glukóza, D-ribóza, D-glyceraldehyd či D-galaktóza a nejdůležitějšími ketosami jsou D-fruktóza, D-ribulóza, D-dihydroaceton či D-xylulóza.



Obrázek 3.1: Monosacharidy

Oligosacharidy

Při vzájemném spojování monosacharidových jednotek vzniká glykosidická vazba, do názvu daného oligosacharidu se uvádí, mezi kterými uhlíky daných sacharidových jednotek tato vazba vznikla (např.: -(1@2)). Jsou-li pro vytvoření glykosidické vazby využity pouze uhlíky, které nesly karbonylovou skupinu, ztrácejí nově vzniklé oligosacharidy redukční schopnosti, proto jsou nazývány **neredukující sacharidy** a v názvu je zakončení

–id. Zůstane-li u jedné z jednotek tento uhlík volný, redukční schopnosti zůstávají zachovány. Takovéto sacharidy se označují jako **redukující** a v názvu je koncovka **–osa**. K nejdůležitějším oligosacharidům patří disacharidy a to sacharóza, laktóza a maltóza. **Sacharóza** (α -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fruktofuranosid) je známá jako kuchyňský cukr a je nejrozšířenějším disacharidem, který je k nalezení v celé rostlinné říši. Jako mléčný cukr je označována **laktóza** (β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopyranosa) obsažená v mléce savců. Produktem enzymatické hydrolýzy škrobu a glykogenu je **maltóza** (α -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glukopyranosa).

Polysacharidy

Polysacharidy mohou být složeny pouze z jednoho typu (homopolysacharidy) nebo z různých typů monosacharidových jednotek (heteropolysacharidy). V živých organismech mohou polysacharidy sloužit buďto jako **stavební polysacharidy**, takovými polysacharidy jsou celulóza v rostlinné říši a chitin v říši hub, nebo jako zásobárny energie, **zásobními polysacharidy** jsou škrob u rostlin a glykogen u živočichů.

3.2 Metabolismus sacharidů a jeho poruchy

Trávení sacharidů

Trávení stravou přijatých sacharidů začíná již v ústech, kde **α -amylasa** (ptyalin) endohydrolyticky štěpí 1,4- α -glukosidové vazby potravou přijatých stravitelných polysacharidů (škrob, glykogen). V žaludku je aktivita α -amylasy (pH optimum ~6,7) utlumena nízkou hodnotou pH. Trávení pokračuje v tenkém střevě v duodenu, kde jsou přítomny pankreatické α -amylasy. Výsledkem působení α -amylasy je směs disacharidu maltózy, trisacharidu maltotriózy, glukosy a α -limitních dextrínů. Ze sliznice tenkého střeva se uvolňují oligosacharidasy (maltasa, dextrinasa), které dokonají štěpení polysacharidů na konečný produkt – glukózu. V tenkém střevě probíhá i štěpení disacharidů laktózy (laktasa; vzniká glukóza a galaktóza) či sacharózy (sacharasa; vzniká glukóza a fruktóza). Monosacharidy jsou vstřebávány enterocyty. Glukóza a galaktóza jsou aktivním kotransportem s Na^+ po gradientu uvolňovány do portální krve. Fruktóza se z buněk dostává transportem pasivním. Portální krví jsou monosacharidy transportovány do jater (zásobárna - tvorba glykogenu) a poté do tkání (zdroj energie). Je-li nadbytečný příjem sacharidů, jsou ukládány v podobě tuků.

Metabolismus sacharidů

Na katabolických a anabolických procesech u sacharidů se podílí několik důležitých metabolických drah. Hlavní dráhu **katabolismu** monosacharidů představuje glykolýza. **Glykolýza** je sled reakcí vedoucích k přeměně glukózy na 2 molekuly pyruvátu. Za fyziologických podmínek (aerobní odbourávání) je pyruvát přeměněn na acetyl-CoA, který pak vstupuje do **citrátového cyklu**. Těmito katabolickými procesy je z 1 molekuly glukózy vytvořeno 36 molekul ATP a glukóza je odbourána na CO_2 a vodu. Ostatní monosacharidy jsou nejprve fosforylovány a poté převedeny na glukózu či jiný meziprodukt glykolýzy. Alternativní katabolickou dráhou glukózy je **pentosofosfátový cyklus** důležitý pro produkci $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (redukční ekvivalenty pro anabolické děje) a ribózy-5-fosfát (prekurzor nukleových kyselin).

Nadbytečné množství glukózy je ukládáno v podobě glykogenu. Syntéza glykogenu (glykogeneze) probíhá z glukóza-1-fosfátu a glykogen je poté ukládán v játrech a svalech. Má-li pak organismus nedostatek glukózy, dojde k uvolnění glukózy z glykogenu (glykogenolýza). Další možnou cestou zisku glukózy je její syntéza z nesacharidových

prekurzorů, jako jsou pyruvát, glycerol, laktát či aminokyseliny. Tento **anabolický** proces je nazýván **glukoneogeneze**.

Hormonální regulace metabolismu glukózy

Hladiny glukózy v krvi se pohybují v poměrně úzkém rozmezí mezi 3,3 až 5,8 mmol/l a jsou ovlivňovány celou řadou hormonů, jsou to hormony produkované buňkami pankreatu (insulin a glukagon), hormony štítné žlázy, hormony dřeně nadledvin (katecholaminy) či kortisol. Snížení hladin glukózy v krvi způsobuje **insulin** a to podporou transportu glukózy do buněk, ve kterých stimuluje glykolýzu a dále aktivací syntézy glykogenu. Insulin je hormon účinkující prostřednictvím membránových receptorů. Dojde-li k navázání insulinu na insulinové receptory, dochází nejprve k autofosforylaci receptoru, který pak slouží jako kinasa pro další nitrobuněčné bílkoviny. Spuštění fosforylační kaskády má za následek aktivaci (např.: transport glukózy do buněk, glykolýza, tvorba glykogenu) či inhibici (např.: glukoneogeneze, glykogenolýza) daných procesů. Zvýšení hladiny glukózy v krvi působí **glukagon**, **kortisol** či **adrenalin**. Glukagon působí též prostřednictvím membránových receptorů, ale využívá G-proteinů a molekul cAMP jako druhých posílů. Glukagon stimuluje glykogenolýzu a glukoneogenesi v játrech a v menší míře inhibuje některé enzymy glykolýzy (např.: fosfofruktokinasa) v ostatních tkáních. Dalším hormonem stimulujícím glykogenolýzu a glukoneogenesi je kortisol, ovlivňující především genovou expresi klíčových enzymů obou pochodů.

Jak je patrné z předcházejících řádků, ústřední roli v metabolismu sacharidů hraje glukóza. Nejčastější (v populaci nad 70 let více jak 20%) a též nejznámější poruchou metabolismu glukózy je bezesporu diabetes mellitus, charakterizovaný zvýšenými hladinami glukózy v krvi (= hyperglykémie).

3.2.1 Diabetes mellitus (DM)

Diabetes mellitus neboli cukrovka je metabolické onemocnění charakterizované porušeným metabolismem nejen sacharidů, ale i lipidů a proteinů, které je zapříčiněno poruchou při sekreci nebo účinku insulinu. Při nedostatku insulinu v organismu dochází ke snížení utilizace glukózy, neboť insulin je hormon stimulující klíčové enzymy glykolýzy. Dále při nedostatku insulinu dochází ke změně poměru mezi glukagonem a insulinem a k relativnímu nadbytku glukagonu, který stimuluje glukoneogenezi a glykogenolýzu, tedy procesy vedoucí k vyšším hladinám glukózy. Nedostatek insulinu je způsoben destrukcí či poruchou β -buněk pankreatu, která může být zapříčiněna působením některých léků či chemikálií, onemocněním exokrinního pankreatu, genetickou poruchou či autoimunitní nebo idiopatickou reakcí organismu. V některých případech je organismus schopen produkovat dostatečné množství insulinu, ale je snížena jeho účinnost a to díky narušené funkci insulinových receptorů.

Z klinického hlediska jsou rozlišována tři stádia ve vývoji poruch sacharidového metabolismu:

I. normoglykémie

II. porucha glukózové regulace – jedná se o poruchu glykémie na lačno a/nebo poruchu glukózové tolerance, u těchto osob existuje vyšší riziko vývoje DM

III. diabetes mellitus

Podle klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou rozlišovány diabetes mellitus 1. a 2. typu, gestační diabetes mellitus a potom celá řada specifických typů DM.

DM 1. typu byl dříve též označován jako insulin-dependentní DM a to na základě absolutního nedostatku insulinu v organismu a nutnosti insulinové terapie. Dnes se již od tohoto označení upouští. Příčinou vzniku DM 1. typu je buďto destrukce b-buněk pankreatu bez známé etiologie a patofyziologie (**idiopatický DM 1. typu**) nebo autoimunitní destrukce b-buněk pankreatu (**autoimunitní DM 1. typu**). Tito pacienti jsou náchylní ke ketoacidóze. Předpokládá se, že rozvoj autoimunitního DM 1. typu je ovlivněn genetickými faktory (gen insulinu, geny HLA II. třídy) a faktory vnějšího prostředí (viry, toxiny, léky, chemické látky), k jeho manifestaci dochází až při zničení asi 80% b-buněk. Nejčastěji se projevuje v období puberty, kolem 12 roku života, ale objevit se může v kterémkoli věku. Typickými příznaky jsou únava, hubnutí, polyurie (nadměrné močení), polydipsie (nadměrná žíznivost) a polyfagie („žravost“).

V 80–90 % případů diabetu se však vyskytuje **DM 2. typu**, který je způsoben **poruchou sekrece insulinu a insulinovou rezistencí**. Rizikovými faktory pro vznik tohoto onemocnění je genetická predispozice, obezita, či nezdravý životní styl (nízká fyzická aktivita, stres, přejídání). Častěji se vyvíjí až po čtyřicátém roce života, dále pak u pacientů s hypertenzí či dyslipidemií. Rozvoj insulinové rezistence může být zapříčiněn snížením počtu insulinových receptorů, poruchou insulinových receptorů nebo poruchou v přenosu signálu v buňce. Insulinová rezistence vede k hyperinsulinémii, která kompenzuje hladiny glykémie v krvi, na druhou stranu však dlouhodobá hyperinsulinémie vyčerpává b-buňky pankreatu a dochází k defektům b-buněk a tím následně i k porušení sekrece insulinu a rozvoji DM.

DM 2. typu může být dlouho nerozpoznán a odhalení nemoci je často náhodné, nebo až na základě projevů komplikací daných DM. Častými projevy bývají únava, špatné hojení ran, rekurentní infekce, neuropatie či retinopatie.

Gestační diabetes mellitus se objevuje kolem 20. týdne těhotenství a jeho příčinou může být genetická predispozice, nadměrné přibývání na váze či zvýšené hladiny hormonů jako např. kortisolu. U většiny žen se po porodu glykémie upraví, ale asi u 30 % z nich se do 20 let od porodu vyvine DM 2. typu.

Mezi specifické formy DM řadíme DM způsobené genetickými defekty b-buněk či insulinových receptorů, endokrinopatiemi, nemocemi exokrinního pankreatu nebo infekcemi či indukované drogami nebo léky.

Akutní komplikace DM

Akutní komplikace diabetu jsou komplikace s rychlým nástupem (od minut u hypoglykémie až po hodiny či dny), řadíme mezi ně hypoglykémii, ketoacidózu a ketoacidotické koma či hypersomální hyperglykemické neketoacidotické koma.

Hypoglykémii nevyvolává onemocnění DM, ale jeho léčba, častěji se vyskytuje u pacientů léčených insulinem. K jeho vzniku může vést nadměrná fyzická aktivita, nadměrná dávka insulinu nebo alkohol. Příznaky hypoglykémie se různí mezi jednotlivci, ale dojde-li k opakování hypoglykémie u daného jednotlivce, bývají příznaky stejné. Mezi možné příznaky se řadí: bledost, pocení, tachykardie, palpitace, hlad, neklid, úzkost, třes, únava, podrážděnost, bolest hlavy, nesoustředěnost, zrakové obtíže, závrať, zmatenost, přechodné sensorické a motorické výpadky. Pokud nedojde ke kompenzaci, mohly by postupně nastat křeče, kóma a následně smrt.

Ketoacidóza a ketoacidotické kóma se častěji vyskytují u DM 1. typu. K jejich rozvoji přispívá akutní stres (emoční stres, infekce, infarkt myokardu, operace), vynechání insulinu či léky potlačující účinky insulinu. Mezi příznaky se řadí: nauzea, zvracení, acetonový zápach z úst, sucho v ústech, polyurie, polydipsie, pokles tělesné váhy, malátnost, letargie, bolest hlavy, bolest břicha, Kussmaulovo dýchání (z metabolické acidózy). Při laboratorním vyšetření bývá zjištěna hyperglykémie (15-40 mmol/l), pH < 7,35, zvýšené hladiny ketolátek, zvýšený anion gap (viz kapitola 8) či hladiny HCO₃⁻.

Hypersomální hyperglykemické neketoacidotické kóma je častější u DM 2. typu a to hlavně u starších osob a osob s renální insuficiencí. K jeho rozvoji přispívá akutní stres (emoční stres, infekce, infarkt myokardu, operace), vysoká konzumace sacharidů, vynechání insulinu či léky potlačující účinky insulinu a manitol. Laboratorně se projevuje zvýšenou osmolaritou séra (³ 310mOsm/l), hyperglykemií (30-270 mmol/l), zvýšenou ureou a kreatininem.

Chronické komplikace DM

K rozvoji chronických komplikací DM dochází vlivem dlouhodobé hyperglykémie v organismu pacienta. Dlouhodobá hyperglykémie má za následek ireverzibilní glykosylaci proteinů, tj. navázání glukózy na aminoskupiny proteinů při které vznikají tzv. AGEs (konečné produkty pokročilé glykosylace). AGEs mají negativní vliv na cévy, poškozují endotel, stimulují uvolňování zánětlivých mediátorů do krve a proliferaci fibroblastů. Na všech úrovních krevního řečiště dochází k rozvoji angiopatie. S rozvojem angiopatie jsou spojeny komplikace DM: **diabetická retinopatie**, **diabetická nefropatie** či **diabetická neuropatie**.

Při nedostatku insulinu a hyperglykémii je glukóza uvnitř buněk redukována na sorbitol a později reoxidována na fruktózu. Hromadění sorbitolu a fruktózy vede k poškození iontových pump, zvýšení intracelulární osmolarity, což může mít za následek poškození oční čočky a vznik **katarakty**, poškození Schwanových buněk a rozvoj diabetické neuropatie a poškození perycytů kapilár sítnice což vede k rozvoji **mikroaneurysmat**.

3.2.2 Ostatní poruchy metabolismu sacharidů

Existuje celá řada vrozených poruch metabolismu sacharidů, které jsou přenášeny většinou autozomálně recesivně. Tyto poruchy se vyznačují hromaděním daných sacharidů v tkáních a krvi až do dosažení jejich prahové koncentrace, poté jsou vylučovány do moče. Příčinou bývá deficiencie určitých enzymů sacharidového metabolismu, která způsobuje nemožnost přeměny jejich substrátu nebo přeměnu defektní. Poruchy metabolismu sacharidů, spolu s popisem jejich projevů a příčin jsou shrnuty v tabulce 3.1.

Tabulka 3.1. Poruchy sacharidového metabolismu

sacharid	onemocnění	Projevy	Příčina/y
Fruktosa	esenciální fruktosurie	odbourávání ATP, vzestup hladiny laktátu, hyperurikémie, hyperfruktosemie a hyperfruktosurie	deficit fruktokinasy
	hereditární intolerance fruktosy	po požití fruktosy - vzniká těžká hypoglykémie, zvracení, hepatomegalie, hepatopatie,	deficit fruktoaldolasy B v játrech, ledvinách

		žloutenka, krvácení, až jaterní selhání a smrt	-autozomálně recesivní onemocnění
	hereditární deficit fruktosa-1, 6 - bisfosfatasy	akumulace prekurzorů glukoneogeneze, při hladovění hyperventilace, apnoe, hypoglykémie, laktátové acidémie	deficit fruktoso-1, 6-bisfosfatasy
Galaktosa	klasická galaktosémie	v prvních týdnech života: úbytek na váze, zvracení, průjem, letargie a hypotonie, těžká hepatopatie, hepatomegalie, ikterus, sklon ke krvácivosti, sepse, renální tubulární porucha; katarakty; ↑ galaktosa, galaktitol, galaktosa-1-fosfát	deficit galaktosa-1-fosfát uridyltransferázy -autozomálně recesivní onemocnění
	deficit galaktokinasy	obvykle bilaterální katarakty detekovatelné v prvních týdnech života	-autosomálně recesivní onemocnění
	deficit uridindifosfát 4-epimerázy	těžká forma: novorozenci: zvracení, neprospívají, hepatopatie připomínající klasickou galaktosemii; mentální retardace lehká forma: benigní stav	-autosomálně recesivní onemocnění
Glykogen	jaterní glykogenosy Typ I - von Gierkova nemoc Typ III – Coriho/Forbesova nemoc Typ IV – Andersenova nemoc Typ VI a IX	hypoglykemie nalačno, hepatomegalie, porucha růstu panence podobná tvář, hubené končetiny, malý vzrůst, velké břicho (hepatomegalie), zánětlivé střevní onemocnění; postižena játra i kosterní svaly: cirhosa, myopatie; abnormální glykogen: limitní dextrin abnormální glykogen podobný amylopektinu s méně rozvětvenými	-autozomálně recesivní onemocnění deficit glukosa-6-fosfatasy deficit amylo 1→6 glukosidasa deficit „větvičího“ enzymu jaterní fosforylasa a kinasa
	Svalové glykogenosy Typ V/Typ VII Typ X/Typ XI Typ XII/XIII	intolerance fyzické zátěže, křeče po svalové námaze, rhabdomyolýza	deficit svalové fosforylasy/fosfofruktokinasy/ fosfoglycerátmutasy/ aktátdehydrogenasy/ beta-enolasy

	Generalizovaná glykogenosa (Typ II)	enzymopatie - stádání abnormálního množství a/nebo forem glykogenu	
Glykoproteiny	poruchy glykosylace N-	porucha tvorby N- glykamů a N-glykanů	-autozomálně recesivní onemocnění
	poruchy glykosylace O- Dědičné mnohočetné exostozy	osteochondromy na koncích dlouhých kostí, omezená hybnost kloubů	- autozomálně recesivní onemocnění (zbylých 5 typů) - autozomálně dominantní onemocnění
	poruchy glykosylace glykolipidů	hypoalbuminemie, zvýšené aktivity transaminas, nízký cholesterol a triacylglyceroly	deficit GM3 synthasy -autozomálně recesivní onemocnění

3.3 Laboratorní diagnostika

K nejdůležitějším laboratorním vyšetřením u metabolismu sacharidů patří metody sloužící k diagnostice a monitorování pacientů s DM.

3.3.1 Biochemická vyšetření u pacientů s podezřením na DM a s DM

Při diagnostice pacientů s DM se využívá v první řadě stanovení hladin glukózy v krvi (glykémie).

Pro monitoring dlouhodobé hladiny glukózy v plazmě je využíváno stanovení hladin glykovaného hemoglobinu.

U pacientů se zvýšeným rizikem výskytu autoimunitního DM 1. typu, nebo ve sporných případech k rozlišení 1. a 2. typu DM se využívá stanovení specifických autoprotilátek v séru (ICA: islet cell autoantibodies, anti- IA-2, anti-GAD, IAA insulinové autoprotilátky).

U pacientů s již potvrzeným DM se kromě sledování hladin glukózy v krvi provádí dále vyšetření lipidového metabolismu a metabolismu proteinů. Sledovány jsou hladiny albuminu vylučovaného močí (**mikroalbuminurie a proteinurie**), hladiny lipidových parametrů v krvi (diabetická dyslipidémie - TAG, HDL-C) či hladiny glykovaných proteinů.

Jako ukazatele endogenní sekrece insulinu je možno využít stanovení hladiny C-peptidu. Stanovují se též hladiny hormonu insulinu v krvi.

Stanovení glukózy nalačno a postprandiálně (2 hodiny)

Podle doporučení WHO by se hodnoty glykémie měly stanovovat pouze v plazmě a nikoliv v plné krvi. V plazmě jsou hodnoty glykémie přibližně o 15 % vyšší než v plné krvi. Důležitým faktorem ovlivňujícím správnost tohoto stanovení je nutnost okamžité separace plazmy od červených krvinek. Pomocí může odebírání vzorků do zkumavek obsahujících inhibitory glykolýzy (NaF) a okamžité umístění zkumavek se vzorkem do ledové tříště. Doporučuje se provést separaci plazmy do 30 minut od náběru.

Vlastní stanovení probíhá dvou krokovou enzymatickou metodou, kdy nejprve za katalýzy glukózaoxidasy je glukóza oxidována kyslíkem na glukonát a peroxid vodíku, který pak následně reaguje s chromogenem a vzniklý produkt je stanovován spektrofotometricky při 492 nm.

Opakovaně naměřené hodnoty glykémie v plazmě nalačno vyšší než 7,0 mmol/l a postprandiálně vyšší než 11,1 mmol/l jsou považovány za průkaz onemocnění DM.

Orální glukózový toleranční test (OGGT)

Pohybují-li se hodnoty glykémie v plazmě na lačno v rozmezí 6,1 až 6,9 je k upřesnění diagnózy prováděn OGGTT. V rámci OGGT je hladina glukózy měřena nejprve nalačno, poté je pacientovi podán roztok glukózy (75 g glukózy ve 250-300 ml vody) a glykémie je opět změřena po 2 hodinách od požití glukózového roztoku. U dětí se podává 1,75 g glukózy na 1 kg váhy.

Tento test umožňuje diagnostikovat poruchu glukózové tolerance (glukóza po 2 hodinách je mezi 7,8 a 11 mmol/l, při lačné glykémii pod 7,0 mmol/l) či porušenou glykémii nalačno (lačná glykémii 6,1 až 6,9 a glukóza po 2 hodinách pod 7,8 mmol/l).

Stanovení glykovaného hemoglobinu

Hladiny glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}) odráží průměrnou hladinu glukózy v plazmě za poslední 2-3 měsíce. Proto je považován za „zlatý standard“ pro kontrolu glykémie. Jeho stanovení není ovlivněno lačněním a je ho tedy možno provádět kdykoliv. Výsledky však mohou být ovlivněny anémií, abnormalitami ve struktuře hemoglobinu, těhotenstvím či urémií. Ke stanovení se nabírá zkumavka s plnou krví a glykovaný hemoglobin je stanovován pomocí HPLC. Referenční hodnoty se pohybují v rozpětí 2,8–4,0 %, někdy se též uvádějí jako 28–40 mmol HbA_{1c}/molHb.

3.3.2 Laboratorní vyšetření ostatních parametrů sacharidového metabolismu

V rámci diagnostiky vrozených metabolických poruch sacharidů se dříve využíval fruktózový toleranční test, dnes je pro diagnostiku fruktózové intolerance využíváno vyšetření DNA. Při podezření na laktózovou intoleranci se provádí laktózový toleranční test.

4 Lipidy

Lipidy jsou vedle sacharidů a bílkovin základními stavebními kameny živé hmoty. Z chemického hlediska je to **heterogenní skupina látek**, kterou v živé přírodě spojuje jejich biologická úloha v organismu. Původně byly jako lipidy označovány látky nerozpustné ve vodě a rozpustné v organických rozpouštědlech; dnes je známo, že existují nepolární (hydrofobní) lipidy, např. estery cholesterolu, triacylglyceroly, které jsou ve vodě nerozpustné, a lipidy polární (hydrofilní), např. gangliosidy, které jsou ve vodě rozpustné. Z biologického hlediska je důležitá jejich úloha jako zásobáren energie, izolátorů, strukturních součástí membrán a prekurzorů pro řadu důležitých sloučenin, které se účastní regulačních mechanismů.

4.1 Struktura, rozdělení a funkce lipidů

Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s lineárním řetězcem, jejich obecný vzorec je R-CO-OH, schematické označení CN:p, kde CN je celkový počet atomů uhlíku v molekule a

p počet dvojných vazeb. U člověka mají mastné kyseliny prakticky vždy sudý počet atomů uhlíku (2 - 30) a počet dvojných vazeb může být 0 - 6. Podle jejich počtu rozlišujeme nasycené (žádná dvojná vazba), mononenasycené (1 dvojná vazba) a vícenenasycené (polynenasycené; 2 - 6 dvojných vazeb) mastné kyseliny. Dvojně vazby mají vždy tzv. pentadienové uspořádání, tj. mezi dvěma dvojnými vazbami jsou vždy 2 jednoduché (-C=C-C-C=C-). Poloha první dvojně vazby od karboxylového konce se označuje symbolem Δx , od metylového konce symbolem n-x nebo vx. Značení n-x je praktičtější, protože kyseliny stejné metabolické řady mají vždy stejnou hodnotu x, zatímco u značení Δ je x rozdílné a to v závislosti na počtu uhlíků daných mastných kyselin. Přehled důležitých mastných kyselin krevní plazmy je uveden v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1 Značení a názvy důležitých mastných kyselin

Značení	Systematický název	Triviální název
12:0	dodekanová	laurová
14:0	tetradekanová	myristová
14:1n-5	<i>cis</i> -9-tetradecenová	myristolejová
16:0	hexadekanová	palmitová
16:1n-7	<i>cis</i> -9-hexadecenová	palmitolejová
18:0	oktadekanová	stearová
18:1n-9	<i>cis</i> -9-oktadecenová	olejová
18:1n-9	<i>trans</i> -9-oktadecenová	elaidová
18:1n-7	<i>cis</i> -11-oktadecenová	vakcenová
18:2n-6	<i>cis, cis</i> -9,12-oktadekadienová	linolová
18:3n-6	<i>cis</i> -6,9,12-oktadecatrienová	γ -linolenová
18:3n-3	<i>cis</i> -9,12,15-oktadekatrienová	α -linolenová
20:3n-9	<i>cis</i> -5,8,11-eikosatrienová	Meadova
20:3n-6	<i>cis</i> -8,11,14-eikosatrienová	dihomo- γ -linolenová
20:4n-6	<i>cis</i> -5,8,11,14-eikosatetraenová	arachidonová
20:5n-3	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-eikosapentaenová	timnodonová , EPA
22:4n-6	<i>cis</i> -7,10,13,16-dokosatetraenová	adrenová
22:5n-3	<i>cis</i> -7,10,13,16,19-dokosapentaenová	
22:5n-6	<i>cis</i> -4,7,10,13,16-dokosapentaenová	
22:6n-3	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová	klupadonová , DHA
24:0	tetrakosanová	lignocerová
24:1n-9	<i>cis</i> -15-tetrakosenová	nervonová
26:0	hexakosanová	cerotová
28:0	oktakosanová	montanová
30:0	triakontanová	melissová

Jednoduché lipidy

Za jednoduché lipidy jsou považovány estery mastných kyselin s jedno- nebo vícesytnými alkoholy (sytnost alkoholu je dána počtem OH- skupin alkoholu). Nejdůležitější jsou estery mastných kyselin s trojsytným alkoholem – glycerolem. Podle počtu esterifikovaných hydroxylových skupin jsou rozlišovány mono-, di- a triacylglyceroly. **Triacylglyceroly** (TAG) jsou hlavní součástí pokrmových tuků a olejů, v lidském organismu jsou přítomny v krevním séru a jsou hlavní součástí tukové tkáně. Vedle nich jsou v séru přítomny ještě estery mastných kyselin s cholesterolem, a dále neesterifikovaný cholesterol a neesterifikované

mastné kyseliny. **Cholesterol** patří mezi steroidy, je součástí membrán všech tělních buněk a prekurzorem steroidních hormonů, žlučových kyselin a vitamínu D. Estery mastných kyselin s aminoalkoholem sfingosinem se nazývají **ceramidy**, u člověka jsou přítomny např. v mozkové tkáni. Mezi jednoduché lipidy dále řadíme vosky – estery mastných kyselin s alifatickými alkoholy, které se v lidském organismu nevyskytují.

Složené lipidy

Pokud je v molekule lipidu přítomna vedle mastné kyseliny a alkoholu ještě další složka (kyselina fosforečná, sacharidy, proteiny), jedná se o lipidy složené. Podle složky, která je součástí lipidu, se rozlišují různé typy složených lipidů (fosfolipidy, glykolipidy, lipoproteiny). **Fosfolipidy** vznikají esterifikací OH- skupiny glycerolu na třetím uhlíkovém atomu (fosfoacylglyceroly) nebo OH- skupiny sfingosinu (sfingomyeliny) kyselinou fosforečnou. Ta je dále esterifikována ještě aminoalkoholy nebo aminokyselinami (fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin). **Glykolipidy** obsahují ve své molekule sacharidovou složku, u živočichů se jedná o galaktosu a u rostlin o glukosu. Živočišné glykolipidy jsou odvozeny od sfingosinu. Přenosem galaktosy na ceramid vzniká **cerebrosid**, pokud vstoupí do molekuly více cukerných jednotek a kyselina neuraminová, vznikne **gangliosid**; oba jsou důležitou složkou nervových tkání i mozku.

4.2 Lipoproteiny

Lipoproteiny jsou nejdůležitější transportní formou lipidů v krevní plazmě. Hydrofobní lipidy – estery cholesterolu a triacylglyceroly – jsou obklopeny polárními lipidy (převážně fosfatidylcholinem a sfingomyelinem), neesterifikovaným cholesterolem a specifickými proteiny, které se nazývají **apolipoproteiny** (apo). Vznikne tak hydrofilní micelární komplex, který je rozpustný ve vodném prostředí plazmy, a umožňuje katalytické působení enzymů na fázovém rozhraní. Lipoproteiny jsou převážně kulovitého tvaru a podle velikosti a hustoty je dělíme na jednotlivé třídy, jak ukazuje tabulka 4.2.

Tabulka 4.2 Základní parametry lipoproteinů lidské krevní plazmy

Frakce*	ELFO ⁺ (agarosa)	Průměr (nm)	Hustota (g/ml)	Protein (%)	Lipid (%)	Zdroj
CM	start	90-1 000	< 0,95	1-2	98-99	střevo
VLDL	pre-beta	30-90	0,95 - 1,006	7-10	90-93	játra (střevo)
IDL		25-30	1,006 - 1,019	11	89	z VLDL
LDL	beta	20-25	1,019 - 1,065	21	79	z VLDL
LDL-I		27,5-26,0	1,025 - 1,034			
LDL-II		26,0-25,5	1,034 - 1,044			
LDL-III		25,5-24,2	1,038 - 1,050			
LDL-IV		24,2-21,8	1,048 - 1,065			
HDL	alfa	7,5-20	1,065 - 1,210			játra, střevo, z VLDL, CM
HDL ₂		10-20	1,065 - 1,125	33	67	
HDL ₃		7,5-10	1,125 - 1,210	57	43	

* CM – chylomikrony; VLDL – lipoproteiny o velmi nízké hustotě; IDL – lipoproteiny o střední hustotě; LDL – lipoproteiny o nízké hustotě; HDL – lipoproteiny o vysoké hustotě

+ ELFO – elektroforetická pohyblivost

4.3 Metabolismus lipidů a jeho poruchy

Tuky obsažené v potravě (exogenní) jsou směsí lipidů, které jsou z 90% tvořeny triacylglyceroly, dále volným i esterifikovaným cholesterolem a fosfolipidy (převážně fosfatidylcholinem). Trávení a vstřebávání lipidů probíhá především v tenkém střevě, kde se exogenní lipidy mísí s lipidy endogenního původu. Při trávení se lipidy rozkládají na glycerol a mastné kyseliny působením hydrolas (lipas), které hydrolyticky štěpí esterové vazby mezi glycerolem a mastnými kyselinami. Vlastní vstřebávání lipidů je složitý proces, který kromě syntézy endogenních lipidů zahrnuje i distribuci mastných kyselin a resyntetizovaných lipidů krví do jater a jednotlivých tkání.

Metabolismus lipidů

Triacykglyceroly se začínají vstřebávat v žaludku, kde se mechanickým způsobem vytváří emulze lipidů, která je uvolňována do duodena. V tenkém střevě se TAG štěpí pankreatickou lipasou (= lipolýza); tento enzym má největší afinitu k esterové vazbě na C1 a C3 glycerolu a působí jen na fázovém rozhraní tuk-voda. Procesu se účastní i žlučové kyseliny, které napomáhají tvorbě micel a tak umožňují solubilizaci lipidů ve vodném prostředí střeva. Střevní lipasa pak štěpí monoacylglyceroly na glycerol a volné mastné kyseliny. Volné mastné kyseliny a mono- a diacylglyceroly mohou být vstřebány enterocyty, ve kterých probíhá reesterifikace na triacylglyceroly. Ty jsou pak ve formě chylomiker transportovány lymfatickou cestou do krevního oběhu. Glycerol je uvolňován do krve a následně transportován do jater, kde dochází k jeho fosforylaci. Volné mastné kyseliny mohou být též uvolněny do krevního oběhu, kde jsou transportovány prostřednictvím albuminu k potřebným buňkám (kosterní svalstvo, myokard), ve kterých slouží jako zdroj energie. Ta je získávána jejich odbouráváním při tzv. β -oxidaci.

Cholesterol v potravě je převážně ve volné formě, esterifikovaný je ve střevě rychle štěpen pankreatickou cholesterolesterasou na volný cholesterol a volné mastné kyseliny. Volný cholesterol se vstřebává do enterocytu, kde je opět z velké části esterifikován a stává se součástí chylomiker.

Fosfolipidy jsou v tenkém střevě hydrolyzovány působením pankreatické fosfolipasy A2, která odštěpuje mastnou kyselinu z C2 fosfolipidu za vzniku lysofosfolipidu.

Metabolismus lipoproteinů

Chylomikrony jsou největší lipoproteinové částice s vysokým obsahem triacylglycerolů. Tvoří se ve střevě v postprandiální fázi, na lačno jsou v enterocytech syntetizovány lipoproteiny VLDL (cca 10% celkové produkce, zbytek je syntetizován v játrech). V plazmě zdravých osob se chylomikrony nevyskytují.

Lipoproteiny VLDL představují v organismu mobilní zásobu triacylglycerolů. Proteinovou složkou je z 90% apo B48, ve stopách jsou obsaženy apo C a apo E. Působením enzymů lipoproteinové lipasy a lecitin:cholesterol acyltransferasy (LCAT) je částice VLDL metabolizována na IDL, která má méně TAG a apo C, více esterů cholesterolu a apo E (důležitý pro transport esterů cholesterolu mezi jednotlivými lipoproteinovými třídami). Lipoprotein IDL je v další fázi katabolizován na LDL za účasti jaterní (triglyceridové) lipasy a LCAT, který je konečným produktem metabolismu VLDL.

Lipoprotein LDL transportuje v plazmě přibližně 70% celkového cholesterolu, jeho hlavní proteinovou složkou je apo B100. Odbourávání LDL, a tím i regulace metabolismu cholesterolu, probíhá v periferních tkáních za účasti specifických LDL-receptorů.

Lipoproteiny HDL jsou syntetizovány převážně v játrech jako primární (nascentní) HDL částice diskovitěho tvaru. Dalším zdrojem jsou zbytky membrán chylomiker a VLDL. Jejich

hlavní funkcí je transport cholesterolu z periferních tkání zpět do jater, kde dochází k jeho eliminaci. Hlavní proteinovou složkou je apo AI. Lipoproteiny HDL nemají afinitu k LDL-receptorům.

Pokud dojde v této složité metabolické kaskádě k poruše rovnováhy, hovoříme o tzv. dyslipidemii (dyslipoproteinemii), která představuje závažné metabolické onemocnění.

4.3.1 Hyperlipoproteinemie

Zvýšené koncentrace lipidů či lipoproteinů cirkulujících v plazmě jsou charakteristické pro metabolickou poruchu zvanou **hyperlipoproteinemie** (hyperlipidemie), při níž dochází k nadměrnému ukládání lipidů v cévních stěnách a tkáních. V 60. letech minulého století formuloval Frederickson 5 typů hyperlipidemií, které charakterizoval obsahem jednotlivých lipidů a apolipoproteinů v séru a přítomností chylomikrů. Tyto tzv. Fredericksonovy typy I-V byly původně považovány za genotypy. V průběhu času však bylo zjištěno, že některé typy mohou přecházet v jiné, ať už důsledkem příznivého působení léčby či naopak zhoršení choroby, a jedná se tedy jen o fenotypy.

Familiární hypercholesterolemie (Fredericksonův typ II) je vrozená choroba, charakterizovaná zvýšenou koncentrací cholesterolu a apolipoproteinu B, xantomatozními lezemi kůže a šlach, a výskytem předčasné koronární aterosklerózy. Byl u ní prokázán autozomálně dominantní způsob genetického přenosu. Z patofysiologického hlediska jde o poruchu funkce LDL-receptorů, spojené s rozvojem předčasné aterosklerózy. U homozygotních osob dochází k problémům již ve velmi mladém věku.

Familiární dysbetalipoproteinemie (Fredericksonův typ III) je zřídka se vyskytující dědičné onemocnění, u kterého dochází k hromadění atypického lipoproteinu „ β -VLDL“, který má v gravitačním poli vlastnost VLDL, při elektroforéze se pohybuje v oblasti β . Tyto VLDL částice mají vyšší poměr cholesterol/triacylglycerol než klasické VLDL. V plazmě jsou zvýšené koncentrace cholesterolu i triacylglyceroly. Osoby s tímto postižením mají vysoké riziko předčasné aterosklerózy, xantomy, často jsou obézní a mají porušenou glukózovou toleranci. Asi polovina potomků těchto osob má hyperlipidemii a přibližně stejně zastoupený Fredericksonův typ III a IV. Sekundární dysbetalipoproteinemie je často doprovodným příznakem např. u těžkého diabetu nebo hypothyreózy. Poměrně dobře reaguje na hypolipidemickou léčbu, ale typ β -VLDL přetrvává i po snížení koncentrací lipidů na fyziologické hodnoty.

Familiární hypertriacylglycerolemie (Fredericksonův typ IV) je dědičné autozomálně dominantní onemocnění, charakteristické zvýšenými koncentracemi plazmatických TAG a lipoproteinu VLDL, a normální, nebo lehce zvýšenou koncentrací cholesterolu; v plazmě nejsou přítomna chylomikra. Z patofysiologického hlediska se jedná o zvýšenou tvorbu VLDL a/nebo jejich snížené odbourávání.

Familiární kombinovaná hyperlipidemie (Fredericksonův typ V) se projevuje zvýšenými plazmatickými koncentracemi cholesterolu i triacylglycerolů v důsledku zvýšené produkce a/nebo sníženého odbourávání VLDL, a přítomností chylomikrů. Koncentrace LDL a HDL cholesterolu jsou normální, event. mohou být i snížené. Forma genetického přenosu není zcela jasná, znám je výskyt atypické izofomy apolipoproteinu E a zvýšená koncentrace

apolipoproteinu C-III. U tohoto onemocnění nejsou časté kardiovaskulární problémy v mladém věku.

Familiární hyperalfalipoproteinemie je vzácně se vyskytující porucha charakterizovaná vysokými (až dvojnásobnými) koncentracemi HDL-cholesterolu, díky které bývá zvýšená koncentrace celkového cholesterolu při fyziologických či lehce snížených koncentracích cholesterolu LDL. Lipoprotein HDL má protektivní účinky na kardiovaskulární choroby, proto je u osob s touto poruchou snížený jejich výskyt. Genetický přenos je pravděpodobně autozomálně dominantní.

Sekundární hyperlipoproteinemie zahrnují všechny typy familiárních a jsou doprovodným jevem některých onemocnění (diabetes, hypothyreosa, Cushingova choroba, pankreatitida, jaterní onemocnění, nedostatečnost ledvin, nefrotický syndrom, dysgamaglobulinemie, akutní porfyrie glykogenosa. Mohou být též vyvolány některými léky (kortikoidy, antihypertensiva diuretického typu, hormonální antikoncepce) i toxickými látkami (alkohol, organofosfáty).

4.3.2 Hypolipoproteinemie

Velmi nízké koncentrace lipoproteinů znamenají, stejně tak jako vysoké, poruchy lipidového metabolismu s vážnými zdravotními následky.

Kongenitální abetalipoproteinémie je vzácná autozomálně recesivně přenášená choroba, charakterizovaná neschopností jater a střevní sliznice syntetizovat lipoproteiny obsahující apolipoprotein B. V postprandiální fázi tak nejsou v plazmě přítomna chylomikra, koncentrace triacylglycerolů v enterocytech mohou být až 5x vyšší než za fyziologického stavu, vzhledem k jejich nedostatečnému odsunu do lymfy. Tato nedostatečnost má pravděpodobně za následek změny v metabolismu lipoproteinu HDL, který obsahuje (subfrakce HDL2) více lipidů při zachované celkové koncentraci. Koncentrace subfrakce HDL3 je výrazně snížena (až na 1/3 fyziologických hodnot). Klinicky se tato porucha projevuje steatoreou, degenerativními neurologickými změnami a pigmentovou degenerací sítnice.

Kongenitální analfalipoproteinémie, zvaná též tangierská choroba, je rovněž přenášená autozomálně recesivně a její výskyt je rovněž vzácný. Je charakterizována velmi rychlým katabolismem HDL v lysozomech jater a ledvin a tedy minimálními plazmatickými koncentracemi apolipoproteinu AI a AII, i změnou jejich poměru oproti zdravým osobám. Ostatní lipoproteiny jsou zvýšeny, v plazmě na lačno jsou přítomna chylomikra, lipoprotein LDL má méně cholesterolu a více triacylglycerolů než za fyziologického stavu. Klinické příznaky jsou vedle zvětšených nažloutlých tonsil, hepatomegalie a hromadění esterů cholesterolu v rohovce, střevní mukóze, médiu cév, thymu, kůži a periferních nervech.

Familiární deficience apolipoproteinu C-II je třetí autozomálně recesivně přenášenou poruchou charakterizovanou vysokou hypertriacylglycerolémií a lipoproteinovým typem V. Klinicky je charakterizována ataky akutní pankreatitidy, které jsou mírnější u heterozygotů než homozygotů.

Hypobetalipoproteinémie je přenášená autozomálně dominantně a její výskyt je rovněž vzácný. Charakterizuje ji neschopnost syntetizovat apolipoproteiny B. Plazmatická

koncentrace LDL je významně snížena, koncentrace ostatních lipoproteinů se neliší od zdravých osob. Porucha nemá zvláštní klinické příznaky, zajímavý je nižší výskyt koronární srdeční choroby.

4.3.3 Ateroskleróza

Ateroskleróza a její komplikace patří vedle karcinomu k nejčastějším příčinám úmrtnosti ve vyspělých společnostech. Zvýšené koncentrace lipidů, především cholesterolu, mají za následek jejich usazování v cévní stěně. Usazené lipidy se formují do tzv. plaků, v jejichž okolí probíhá zánětlivý proces. V narušeném endotelu pak vznikají fibrinové tromby, jejichž důsledkem jsou kardiovaskulární onemocnění. Ucpáním cév v srdečním svalu dochází k infarktu myokardu, v mozku k mozkové cévní příhodě. Na vznik kardiovaskulárních onemocnění má vliv řada rizikových faktorů, které jsou jednak primární, neovlivnitelné (věk, pohlaví genetická zátěž), jednak sekundární, ovlivnitelné (hypertenze, obezita, životní styl – kouření, fyzická aktivita, stravování).

4.3.4 Ostatní poruchy lipidového metabolismu

Mezi vrozené metabolické choroby patří také poruchy katabolismu některých lipidů. Jedná se o tzv. lyzozomální nemoci, při kterých je příslušný katabolický enzym inaktivní, nebo zcela chybí.

Gaucherova choroba je způsobena akumulací glukocerebrosidu v důsledku nedostatečné aktivity β -glukocerebrosidasy. Akutní forma je provázená neuropatiemi a postihuje centrální nervový systém.

Niemann-Pickova choroba je způsobena nedostatkem aktivity sfingomyeliny a má za následek hromadění sfingomyelinu. Akutní forma je provázená neuropatiemi, které ústí ve smrtelná psychomotorická poškození.

Krabbeho choroba je způsobena nedostatečnou aktivitou enzymu galaktocerebrosid- β -galaktosidasy, která má za následek hromadění galaktocerebrosidu. Postihuje centrální nervový systém a je smrtelná do šesti až dvanácti měsíců.

Metachromatická leukodystrofie je způsobena deficitem aktivity enzymu arylsulfatasy, jehož důsledkem je akumulace sulfoesterů cerebrosidů. Projevuje se progresivní paralýzou a mentálním chátráním.

Fabryho choroba je způsobena nedostatečnou aktivitou α -galaktosidasy A, dochází k akumulaci ceramidtrihexosidu v centrálním nervovém systému. Projevuje se především hypertenzí, srdečními potížemi, bolestmi končetin a zarudlými lézemi na pokožce.

GM2 gangliosidosa (Tay-Sachsova choroba) je způsobena akumulací GM2 gangliosidu v důsledku nedostatečné aktivity enzymu hexoaminidasy A. Projevuje se psychomotorickým chátráním a demencí v časných obdobích vývoje.

GM1 gangliosidosa je způsobena nedostatkem aktivity GM1 β -galaktosidasy a má za následek hromadění GM1 gangliosidů a galaktosu obsahujících oligosacharidů.

Fukosidosa je zapříčiněna nedostatečnou činností α -fukosidasy, důsledkem je hromadění sfingolipidů obsahujících fukosu a glykoproteinových fragmentů. Projevuje se častými infekcemi dýchacího traktu, progresivním psychomotorickým zaostáváním, zvětšením srdečního svalu a zbytnělou pokožkou, která sekretuje velká množství slané potu.

4.4 Laboratorní diagnostika

Biochemická vyšetření lipidových parametrů plazmy/séra jsou zaměřená na stanovení rizikových faktorů rozvoje aterosklerózy a diagnostiku lipoproteinových poruch. Na základě stanovení koncentrací triacylglycerolů a cholesterolu klasifikujeme tři typy hyperlipoproteinémií:

- hypercholesterolémie (izolované zvýšení celkového cholesterolu, převážně na vrub LDL) - stanovení koncentrace celkového cholesterolu (volný + esterifikovaný)
- kombinovaná hyperlipidémie (současné zvýšení cholesterolu i TAG)
- hypertriglyceridémie (izolované zvýšení TAG v kombinaci s normálním cholesterolem).

Pro posouzení rizika aterosklerózy se používá výpočet **aterogenního indexu (AI)**

$$AI = (\text{celkový cholesterol} - \text{HDL-C})/\text{HDL-C}$$

hodnocení: prognosticky příznivý: < 3, standardní riziko: 3-4, zvýšené riziko: > 4

Před odběrem krve na analýzu lipidů by měl pacient dodržet standardní podmínky, navíc by se měl alespoň dva dny před odběrem vyvarovat konzumaci alkoholu, který může způsobit zvýšení hladiny triacylglycerolů.

Základní používané testy lipidového souboru a orientační fyziologické rozmezí u dospělých osob:

- stanovení koncentrace triacylglycerolů (0,68-1,69 mmol/l)
- stanovení koncentrace celkového cholesterolu (3,1-5,8 mmol/l)
- stanovení koncentrace HDL-cholesterolu (1,1-2,3 mmol/l)
- stanovení koncentrace LDL-cholesterolu (2,2-4,5 mmol/l)

Doplňkové testy:

- stanovení koncentrace lipoproteinů a - Lp(a)
- stanovení koncentrace Apo B (hlavní složka VLDL a LDL)
- stanovení koncentrace Apo AI (hlavní složka HDL)
- elfo lipoproteinů (pouze pro diferenciální diagnostiku)

4.4.1 Stanovení cholesterolu

Cholesterol je v plazmě/séru ze dvou třetin transportován jako součást LDL (aterogenní částice), asi jedna třetina je vázaná na HDL (neaterogenní částice).

Celkový cholesterol se v plazmě nachází ve dvou formách a to jako cholesterol volný (FC) - 30% a cholesterol esterifikovaný (CE) - 70%. Toto je nutné brát v úvahu při jeho stanovení. Nejčastěji se používá spektrofotometrická enzymová metoda. Princip metody: CE jsou cholesterolesterasou hydrolyzovány na FC a volnou mastnou kyselinu, FC se dále oxiduje cholesteroloxidásou na cholest-4-en-3-on a peroxid vodíku, jehož koncentrace se po reakci s indikátorem stanovuje.

Princip stanovení **HDL-cholesterolu** (HDL-C): lipoprotein HDL se od ostatních lipoproteinových částic separuje vysrážením lipoproteinů obsahujících apo B, další postup je stejný jako u celkového cholesterolu.

Koncentrace LDL-cholesterolu (LDL-C) se obvykle určuje výpočtem podle Friedewaldovy rovnice: $LDL - C \text{ (mmol/l)} = \text{celkový cholesterol} - TAG \cdot 0,4537 - HDL - C$

4.4.2 Stanovení triacylglycerolů

Exogenní TAG jsou obsaženy převážně v chylomikronech, endogenní převládají v částicích VLDL. Zvýšená koncentrace TAG je rizikovým faktorem aterosklerózy, vyskytuje se však i u diabetu, snížené funkce štítné žlázy, u nefrotického syndromu a u jaterních onemocnění. Triacylglyceroly se stanovují v plazmě nebo séru enzymovou metodou. Princip metody: působením lipoproteinové lipasy jsou TAG hydrolyzovány na glycerol a volné mastné kyseliny, glycerol je dále fosforylován na glycerol-3-fosfát, který lze stanovit např. optickým testem.

4.4.3 Další stanovení

Relativní zastoupení jednotlivých lipoproteinových tříd se stanovuje elektroforézou na agaróze nebo akrylamidu. Kvantitativní stanovení lze provést metodou gelové filtrace s detektorem rozptylu světla, provádí se však pouze pro výzkumné účely.

Kvantitativní stanovení Lp(a), jehož zvýšené koncentrace ukazují na zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění, se provádí buď imunoturbidimetry nebo imunoefektoreticky.

Pro zvláštní detailní diagnostiku provádějí ještě specializovaná pracoviště stanovení profilu mastných kyselin a tzv. necholesterolových sterolů (prekurzory cholesterolu a rostlinné steroly) metodami plynové nebo kapalinové chromatografie.

Stanovení cholesterolu chromatografickou metodou s hmotnostně-spektrometrickou detekcí je referenční metodou pro tento analyt.

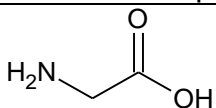
5 Aminokyseliny

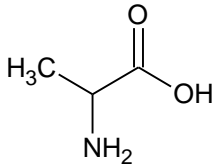
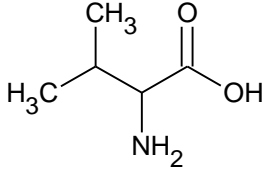
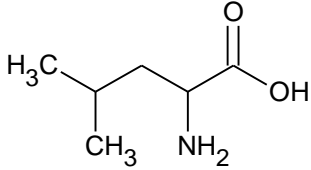
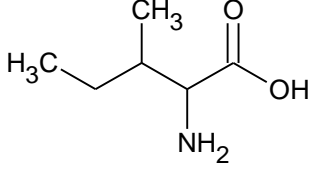
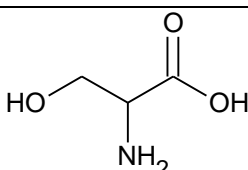
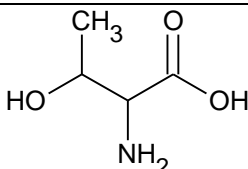
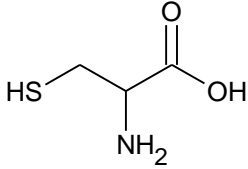
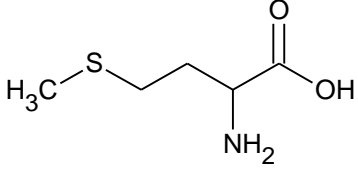
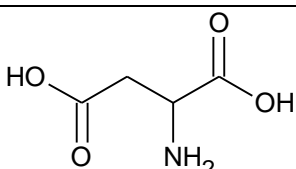
Aminokyseliny jsou organické kyseliny obsahující kromě **karboxylové skupiny –COOH** ještě další funkční skupinu a to **aminoskupinu –NH₂**. Aminokyseliny (AMK) jsou základními stavebními jednotkami proteinů, ale mohou se vyskytovat i jako volné AMK (např. metabolismus močoviny – citrullin, ornithin) či jako součást biologicky aktivních peptidů (např. glutathion - γ-glutamylcysteylglycin; karnosin ve svalech). S AMK či jejich deriváty se můžeme setkat i ve funkci neurotransmiterů (např. dopamin, kyselina γ-aminomáselná), hormonů (např. tyroxin, adrenalin) či antibiotik (např. azaserin).

5.1 Přehled a rozdělení základních aminokyselin

I když již bylo identifikováno více jak 250 různých AMK, na tvorbě proteinů se podílí pouze 20 tzv. **proteinogenních AMK** (někdy se uvádí počet 21, selenocystein jako 21. AMK). Přehled rozdělení, vzorce a charakteristiku AMK shrnuje tabulka 5.1. V odborné literatuře se často setkáváme se zkratkami názvů AMK, nejčastěji se využívají třípísmenné zkratky, tvořené převážně z prvních 3 písmen názvu. Ke srovnání podobných sekvencí AMK v proteinech se pak spíše používají zkratky jednopísmenné.

Tabulka 5.1: Proteinogenní aminokyseliny

AMK	ZKRATKA	VZOREC	CHARAKTERISTIKA
Aminokyseliny s alifatickým řetězcem - nepolární			
Glycin	Gly G		opticky inaktivní, důležitou součástí kolagenu a elastinu, inhibičně působící neurotransmiter v CNS

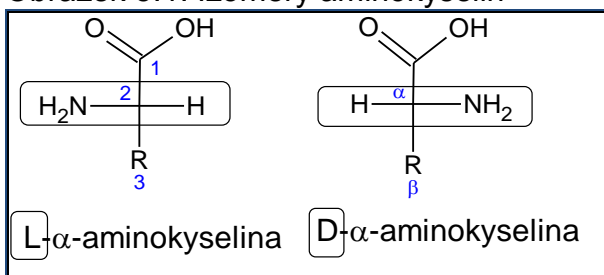
Alanin	Ala	A		hojně využíván při syntéze proteinů, možný zdroj pro syntézu glukózy, nebo jako zdroj energie
Valin	Val	V		esenciální AMK, zdroje: kozí sýry, rybí maso, čočka, drůbež
Leucin	Leu	L		esenciální AMK; důležitý pro svalový aparát, podporuje syntézu proteinů ve svalech a játrech; zdroje: kravské mléko, kuřecí a hovězí maso, hrách
Isoleucin	Ile	I		esenciální AMK; zdroje: ryby, kuřecí a krůtí maso, vajíčka, sója
Aminokyseliny s alifatickým řetězcem – obsahující v molekule –OH skupinu				
serin	Ser	S		stavební kámen biomembrán, součást fosfolipidů (fosfoatidylserin)
Threonin	Thr	T		esenciální AMK; zdroje: ryby, drůbeží maso, čočka
Aminokyseliny s alifatickým řetězcem – obsahující v molekule síru				
Cystein	Cys	C		významně se podílí na struktuře bílkovin tvorbou disulfidových můstků; zdroje: cibule, česnek, brokolice, oves
Methionin	Met	M		esenciální AMK, obvykle první AMK v peptidovém řetězci
Aminokyseliny s alifatickým řetězcem – s další COOH skupinou a jejich amidy				
Asparagová kyselina	Asp	D		jeden z hlavních substrátů pro syntézu purinových a pyrimidinových bází

Asparagin	Asn	N		jeho prostřednictvím jsou často vázány sacharidové složky v glykoproteinech
Glutamová kyselina	Glu	E		uplatňuje se při transaminačních reakcích a metabolismu lipidů, podílí se na detoxikaci amoniaku; je důležitým neurotransmitterem v CNS
Glutamin	Gln	Q		důležitý v detoxikaci amoniaku; zdroje: hovězí maso, luštěniny, mléčné výrobky
Aminokyseliny s alifatickým řetězcem - bazické				
Arginin	Arg	R		u dětí esenciální AMK, jeho důležitým metabolitem je oxid dusnatý
Lysin	Lys	K		esenciální AMK; zdroje: ryby, luštěniny, hovězí a vepřové maso
Aminokyseliny s aromatickým jádrem v molekule				
Fenylalanin	Phe	F		esenciální AMK, prekurzor neurotransmiterů; zdroj: mléčné výrobky, vejce, ryby, kvasnice
Tyrosin	Tyr	Y		prekurzor např. pro adrenalin, noradrenalin, dopamin, thyroxin
Tryptofan	Trp	W		esenciální AMK; prekurzor serotoninu a melatoninu
Histidin	His	H		u dětí esenciální AMK; prekurzor histaminu
Iminokyselina				

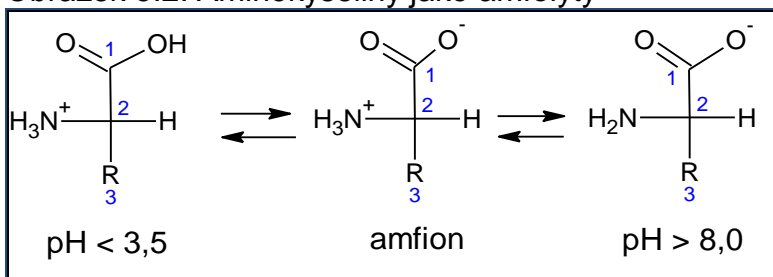
Prolin	Pro	P		důležitý pro tvorbu kolagenu, zdroje: včelí med, kvasnice, kolagen
--------	-----	---	--	--

Jelikož α -uhlík je asymetrický tzn., že váže čtyři různé substituenty (karboxylovou skupinu, aminoskupinu, vodík a nějaký alifatický či aromatický zbytek - R) jsou aminokyseliny látky opticky aktivní (výjimkou je glycin) a dají se u nich rozlišovat dva izomery – L- a D- izomer (obrázek 5.1). Proteinogenní AMK jsou **L- α -aminokyseliny** (výjimkou je prolin, který je L- α -aminokyselina). Některé AMK ve své molekule obsahují dva asymetrické uhlíky (threonin, isoleucin). Základní charakteristickou vlastností AMK je jejich schopnost působit i jako kyselina i jako zásada – AMK jsou tedy **amfolyty**. Náboj, který AMK nese, závisí na pH prostředí. Ve fyziologickém rozpětí pH se všechny AMK vyskytují v podobě tzv. **zwitteriontu** jinak označovaného jako **amfion** neboli **obojetný ion**, což znamená, že obě funkční skupiny AMK jsou v iontové podobě a nesou tedy kladný i záporný náboj (obrázek 5.2). Obě funkční skupiny se vzájemně ovlivňují – skupina COO^- zvyšuje zásaditost aminoskupiny a skupina NH_3^+ zase pomáhá odpuzovat H^+ ze skupiny COOH .

Obrázek 5.1: Izomery aminokyselin



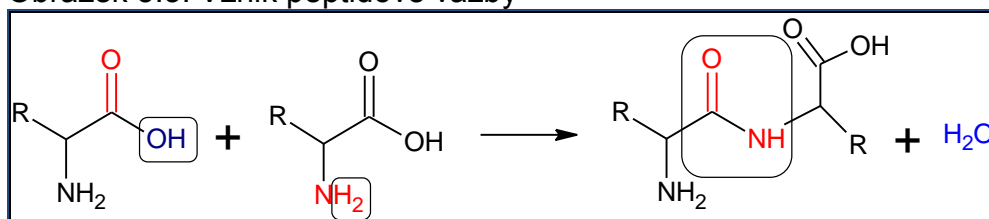
Obrázek 5.2: Aminokyseliny jako amfolyty



Většinu aminokyselin si lidský organismus dokáže sám syntetizovat z meziproductů sacharidového metabolismu. Některé AMK si však organismus vyrobit neumí a je závislý na jejich příjmu potravou (v bílkovinách), tyto AMK označujeme jako **esenciální**.

V proteinech jsou AMK mezi sebou vázány tzv. **peptidovou vazbou** (obrázek 5.3), která spojuje amino skupinu jedné a karboxylovou skupinu druhé aminokyseliny. Takto může vznikat libovolně dlouhý řetězec AMK na jehož N- konci se vyskytuje aminokyselina s volnou amino skupinou a na C-konci aminokyselina s volnou karboxylovou skupinou. Aminokyseliny v proteinech zapisujeme a pojmenováváme od N-konce k C-konci. C-koncová AMK si ponechává svůj název, ostatní zamění koncové –in za –yl.

Obrázek 5.3: Vznik peptidové vazby



5.2 Metabolismus aminokyselin a jeho poruchy

Aminokyseliny jsou organismem přijímány v potravě a to v proteinech, které jsou peptidasami štěpeny na oligopeptidy až aminokyseliny a poté ve střevě vstřebávány střevní sliznicí. V krvi AMK vytvářejí část tělesné zásoby AMK – tzv. pool AMK, krví jsou také přenášeny k cílovým tkáním, kde mohou být využity k syntéze plazmatických a intracelulárních proteinů. Při dostatku AMK, dochází k jejich degradaci.

Degradace AMK může probíhat 4 různými způsoby, přičemž první 3 z nich využívají koenzymu pyridoxalfosfátu a tvoří s ním tzv. Schiffovu bázi (obrázek 5.4):

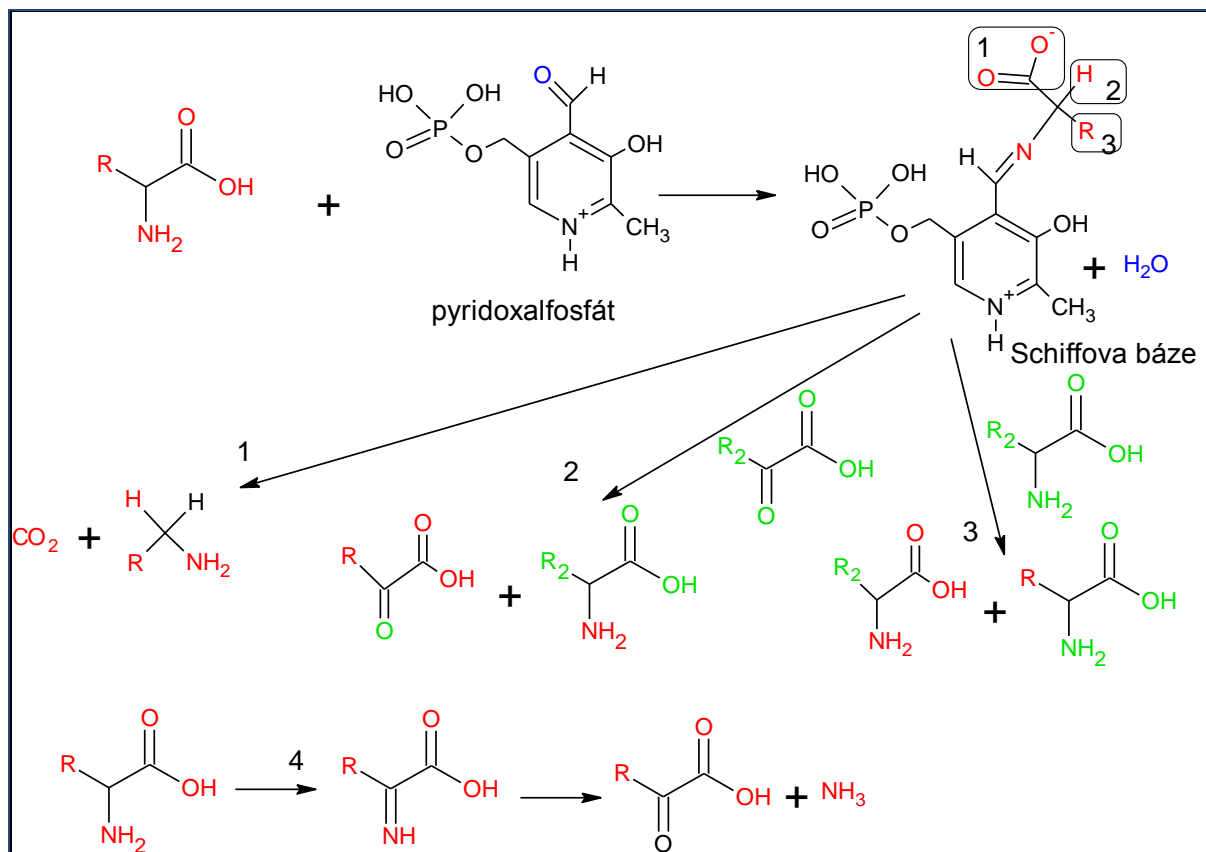
1. dekarboxylace (dochází k odštěpení CO_2 za katalýzy dekarboxylasou a vzniku biogenních aminů)
2. transaminace (reakce aminokyseliny s ketokyselinou, kdy dojde k výměně amino- a keto-skupiny, reakce je katalyzována transaminasami)
3. změna R
4. oxidační deaminace (dochází k odštěpení NH_3 a oxidaci na ketokyselinu, vzniklý NH_3 je odbouráván v tzv. **močovinovém cyklu**)

Močovinový cyklus probíhá v játrech v hepatocytech a to částečně v cytosolu a částečně v mitochondriích. Konečným produktem je močovina, která je krví transportována do ledvin a nakonec vylučována močí.

Podle dalšího osudu uhlíkaté kostry AMK se rozlišují:

- a) glukoplastické neboli glukogenní AMK (většina)
 - b) ketoplastické neboli ketogenní AMK (lysin, leucin)
 - c) AMK, které mohou tvořit jak cukry, tak ketolátky (isoleucin, tyrosin, tryptofan, fenylalanin)
- Vzniklé produkty se zapojují do **citrátového cyklu**.

Obrázek 5.4: Degradace aminokyselin



Nadměrné vylučování AMK močí se nazývá **aminoacidurie**. Rozlišuje se tzv. **primární** aminoacidurie (přehled podává tabulka 5.2), která je způsobena vrozenou metabolickou poruchou a tzv. **sekundární** aminoacidurie, kterou způsobuje buďto onemocnění jater, nebo porucha funkce ledvinových tubulů.

Tabulka 5.2: Primární aminoacidurie

ONEMOCNĚNÍ/ INCIDENCE	PŘÍZNAKY	PŘÍČINA
Homocystinurie 1 : 200 000	↑ homocystein v krvi, dislokace čočky, deformity kostí, skolióza, patologické zlomeniny, mentální retardace, tromboembolické komplikace	porucha metabolismu methioninu – defekt enzymu cystathionin-β-syntasy
Cystinurie 1 : 7000 – 1 : 20 000	tvorba ledvinových kamenů již v dětství, cystinové krystalky v moči	defekt ledvinové tubulární reabsorpce - porucha transportu AMK – Cys, Lys, Arg
Cystinóza 1 : 40 000 a) infantilní – těžká	postihuje různé orgány: játra, slezinu, ledviny, kostní dřeň, lymfatické uzliny a oční rohovku renální rachitida, trpasličí vzrůst, tubulární acidóza, hypokalemie a retinopatie poškození glomerulů s proteinurií a	porucha transportu cystinu přes membránu lyzozomů - hromadění krystalků cystinu v makrofázích

b) juvenilní c) c. dospělých	postupným selháním ledvin, retinopatie funkce ledvin není výrazně narušena, cystinové krystalky v rohovce, leukocytech a v kostní dřeni	
Fenylketonurie (hyperfenylalaninemie) 1 : 10 000	hromadění fenylalaninu v krvi (snaha o metabolizaci přes fenylpyruvát) a jeho vylučování do moče; potíže s krmáním, zvracení, opožděný vývoj, neléčená f. - těžké mentální postižení	defekt v přeměně fenylalaninu na tyrosin - nedostatkem enzymu fenylalaninhydroxylasy
Tyrosinemie I 1 : 100 000	vylučování 4-hydroxyfenylpyruvátu při normální dietě; ↑ tyrosin v krvi i moči, ↑ methionin a α-fetoprotein v krvi, poškození jater a ledvin	deficit fumarylacetoacetáthydroxylasy
Tyrosinemie II (Tyrosinemie)	↑ tyrosin v moči i krvi; zánět a následné léze v oku a na kůži, někdy mentální retardace	nedostatek jaterního enzymu tyrosinaminotransferasy
Alkaptonurie 1 : 250 000	vylučování homogentisátu do moče; tmavnutí moče po vystavení vzduchu a slunečnímu záření, nebo po zalkalizování, později artritické změny	defekt homogentisát oxidasy
Leucinóza (Maple syrup urine disease) 1 : 200 000	sladká vůně moči, vylučování α-oxoderivátů AMK – Leu, Ile a Val močí, hypoglykemie, acidóza, letargie, ztráta chuti k jídlu a zvracení; není-li zjištěna včas, vede k těžkému poškození mozku a smrti;	defekt dekarboxylasi (nefunguje přeměna α-oxokyselin na acylCoA)
Okulokutánní albinismus typu I 1 : 10 000 typu II 1 : 60 000	úplná absence melaninu, projevující se na pokožce, na vlasech i na očích, dochází k postižení zraku syntetizováno malé množství melaninu, nedochází k postižení zraku	nepřítomnost nebo nedostatek enzymu tyrosinasy, která přeměňuje tyrosin na melanin

6 Proteiny

Proteiny (bílkoviny) jsou makromolekulární látky polymerního charakteru tvořené polypeptidovými řetězci. Jsou to heterogenní biomolekuly s významnými biologickými

vlastnostmi. V organismu zajišťují celou řadu funkcí a jsou nezbytnou součástí každé buňky.

6.1 Struktura, funkce a metabolismus proteinů

Polypeptidový řetězec bílkovin je složený ze sta až několika tisíc proteinogenních aminokyselin vzájemně spojených **peptidovou vazbou** (viz kapitola 5). Spojením dvou, tří, několika málo (3-10) či mnoha (11-100) aminokyselin vznikají dipeptidy, tripeptidy, oligopeptidy a polypeptidy.

V organismu **peptidy** vznikají štěpením bílkovin nebo syntézou z aminokyselin. Mezi peptidy patří mnoho biologicky aktivních látek, jako jsou **hormony** (insulin, kortikotropin, endorfiny), **glutathion** (silný antioxidant) a rovněž některá antibiotika, protinádorové léky nebo jedy.

Na rozdělení proteinů neexistuje žádný univerzální systém, můžeme je klasifikovat z několika hledisek.

Na základě rozpustnosti a tvaru dělíme proteiny na **globulární - sféroproteiny** (např. albumin, globuliny; jsou rozpustné ve vodě a svým tvarem se blíží kouli) a **fibrilární - skleroproteiny**, které jsou ve vodě nerozpustné, mají vláknitou strukturu a v organismu plní podpůrnou a strukturní funkci (např. kolagen, keratin). Podle složení dělíme proteiny na **jednoduché** (obsahují pouze aminokyseliny) a **složené** (obsahují i nebílkovinnou část - např. lipidy - lipoproteiny, sacharidy - glykoproteiny, nukleotidy - nukleoproteiny). Z hlediska výskytu v organismu lze rozdělit na svalové, krevní (plazmatické) a mléčné. Podle **funkce**, kterou v organismu zajišťují, je můžeme rozdělit na:

- enzymy - katalyzují biochemické reakce (podrobněji viz kapitola 7)
- strukturální proteiny – převážně fibrilární, plní podpůrné funkce, poskytují buněčnou nebo tělesnou oporu (kosti, šlachy a kůže - kolagen, vlasy a nehty – kreatin)
- transportní proteiny – přenos látek krevním oběhem nebo přes buněčnou membránu (albumin – bilirubin, mastné kyseliny; transferin – železo; lipoproteiny – cholesterol; hemoglobin – kyslík)
- kontraktilní proteiny- aktin a myosin, fibrilární, umožňují pohyb (kontrakci a relaxaci) svalů
- protilátky – imunoglobuliny, obrana proti infekci
- hormony – regulační funkce (insulin)

Dalším kritériem pro dělení proteinů je jejich struktura, kterou lze popsat na čtyřech úrovních. **Primární struktura** polypeptidového řetězce je určena pořadím jednotlivých aminokyselin, je geneticky kódovaná v DNA a ovlivňuje biologickou aktivitu (náhrada jediné aminokyseliny může snížit, nebo úplně odstranit biologickou aktivitu proteinu, čímž může být příčinou mnoha dědičných poruch). **Sekundární strukturu** charakterizuje prostorové uspořádání řetězce aminokyselin. Vzniká tvorbou vodíkových můstků (mezi atomem kyslíku z $-CO-$ skupiny a vodíku ze skupiny $-NH-$, případně $-OH$) a zaujímá tvar α – šroubovice (v rámci stejné oblasti řetězce) nebo β – skládaného listu (mezi dvěma řetězci nebo z různých oblastí jednoho řetězce). Sekundární struktury velkých bílkovin jsou organizovány do domén, jejichž vzájemné vztahy popisuje **terciární struktura**. Je to energeticky nejvýhodnější konformace, která je udržovaná disulfidovými můstky, iontovými a hydrofobními interakcemi. Bílkoviny tvořené dvěma nebo více polypeptidovými řetězci (podjednotkami) zaujímají **kvartérní strukturu**. Proteiny tedy dělíme na primární, sekundární, terciární a kvartérní.

Potravou přijaté proteiny jsou v trávicím traktu postupně rozštěpeny **proteolytickými enzymy – proteasami** na molekuly peptidů, které jsou dále hydrolyzovány působením **aminopeptidas** na jednotlivé aminokyseliny. Aminokyseliny můžou sloužit jako zdroj stavebních jednotek pro syntézu tělu vlastních proteinů - **proteosyntézu**, nebo jsou degradovány a využity jako zdroj energie.

Endogenní proteiny (uvolněné do oběhu stárnutím buněk) jsou opět katabolizovány proteolytickými enzymy až na jednotlivé aminokyseliny, které jsou dále využity pro novou proteosyntézu. V krevním oběhu proto dochází ke změnám koncentrací některých proteinů v průběhu několika hodin nebo dnů.

Za fyziologických podmínek není většina proteinů vylučována močí. Glomerulární filtrací se do moče dostávají pouze bílkoviny s molekulovou hmotností menší než 60 000 (např. amylasa). Takto mohou do moče přecházet i určité fragmenty imunoglobulinů, které jsou produkovány u některých typů kostních nádorů a jejich náleznost má proto značný klinický význam.

6.2 Bílkoviny krevní plazmy

V krevní plazmě se v různých koncentracích vyskytuje celá řada proteinů s rozličnou funkcí, většina z nich je syntetizována v játrech. Specifickou skupinu proteinů tvoří tzv. **reaktanty akutní fáze zánětu**, což jsou proteiny měnící svoji koncentraci v odpovědi na akutní zánět nebo u nekróz tkáně. Podle toho jestli jejich koncentrace klesají či stoupají, rozlišujeme tzv. **negativní** respektive **pozitivní** reaktanty akutní fáze. K negativním reaktantům se řadí **albumin, prealbumin a transferin** a k pozitivním reaktantům **C-reaktivní protein, $\alpha 1$ – antitrypsin, fibrinogen, haptoglobin a ceruloplasmin**. Další významnou skupinou proteinů jsou **imunoglobuliny (Ig)** – protilátky, které jsou produkovány B-lymfocyty a přímo se účastní imunitní odpovědi (humorální imunita). Imunoglobuliny lze rozdělit do pěti tříd: IgG, IgA, IgM, IgD a IgE. Přehled klinicky významných plazmatických proteinů a příčiny změn jejich koncentrací ukazuje tabulka 6.1.

Tabulka 6.1. Plazmatické proteiny a příčiny změn jejich koncentrací

Protein	Funkce	Snížené hodnoty	Zvýšené hodnoty
Prealbumin	transport hormonů štítné žlázy	malnutrice akutní fáze zánětu jaterní poruchy maligní tumory ztráty bílkovin	chronické infekce močových cest
Albumin	nejvýznamnější transportní protein, udržení onkotického tlaku, proteinová rezerva organismu	akutní fáze zánětu jaterní léze nekrózy tkání maligní tumory ztráty bílkovin malnutrice	dehydratace průjmy
$\alpha 1$ -antitrypsin ($\alpha 1$ -inhibitor proteas)	inhibitor serinových proteas (např. elastasa)	plicní choroby těžké jaterní poškození nefrotický syndrom	akutní a chronické záněty maligní tumory nekrózy

		malnutrice kachexie vrozená deficiencie - onemocnění plic (emfyzém) a jater (cirhóza)	hematologické abnormality pobyt ve znečištěném ovzduší gravidita
α 1-kyselé glykoprotein (orosomukoid)	inaktivace progesteronu, ovlivňuje farmakokinetiku bazických farmak	jaterní poškození akutní renální poškození malnutrice kachexie perorální antikoncepce	akutní a chronické záněty maligní tumory kolagenózy stresový syndrom
Haptoglobin	vychytává volný hemoglobin a transportuje ho do retikuloendoteliálního systému k odbourání	jaterní onemocnění hemolytické anémie	akutní záněty maligní tumory infarkt myokardu
Ceruloplasmin	vazba a přenos mědi (váže až 90 % mědi v séru), oxidasová aktivita (polyaminové a polyfenolové substráty)	Wilsonova choroba podvýživa hepatitida syndrom ztráty bílkovin	akutní a chronické záněty maligní tumory gravidita hormonální antikoncepce
Transferin	transport a vychytávání volného železa	nemoci ledvin maligní tumory akutní a chronické záněty pokročilé jaterní poruchy	anémie - nedostatek železa infekční hepatitida (časná fáze) gravidita
Fibrinogen	součást koagulační kaskády, prekursor fibrinu	diseminované nitrožilní srážení krve	zánět
C-reaktivní protein	aktivace komplementu	není známa	akutní zánět (bakteriální) maligní tumory nekrózy
IgG	pozdní protilátky		chronický zánět
IgA	protilátky slizniční imunity		záněty sliznic a jater
IgM	časné protilátky		akutní zánět

6.3 Laboratorní diagnostika

Pro většinu patologických stavů je charakteristické zvýšení hladiny určitého proteinu v plazmě, moči nebo v tkáňovém moku, způsobené např. odbouráváním buněk některé tkáně; pokles koncentrace může být způsoben sníženou syntézou nebo zvýšenými ztrátami do moči. Proto někdy z diagnostického hlediska stačí průkaz přítomnosti proteinu ve vzorku, jindy je nutné stanovit koncentraci proteinu, k čemuž v klinické biochemii slouží celá řada technik od nespecifických testů až po speciální specifické metody.

6.3.1 Stanovení proteinů v plazmě

Fyziologická koncentrace celkových plazmatických proteinů je 65-85 g/l, zvýšené hladiny mohou být způsobeny např.: dehydratací, intenzivním cvičením, infekcí či nádory a snížené koncentrace mohou být dány gastrointestinálními nádory, onemocněním jater nebo podvýživou.

Jednou ze základních technik diagnostiky proteinů je elektroforéza, při které se proteiny dělí na **pět frakcí** (zón) podle pohyblivosti v elektrickém poli na:

- 1) albumin – relativní zastoupení: 52–68 %
- 2) a1 – globuliny – relativní zastoupení: 2,4–4,4 %
- 3) a2 – globuliny – relativní zastoupení: 6,1–10,1 %
- 4) b - globuliny – relativní zastoupení: 8,0–14,5 %
- 5) g- globuliny – relativní zastoupení: 10,0–21,0 %.

Určitá změna elektroforetických frakcí souvisí s daným patologickým stavem např. snížená frakce albuminu u nefrotického syndromu, zvýšené g- globuliny u infekcí a zánětů. Fyziologické koncentrace nejvýznamnějších proteinů v plazmě, metody jejich stanovení a příslušnost k elektroforetické frakci jsou přehledně uvedeny v tabulce 6.2.

Tabulka 6.2 Koncentrace plazmatických proteinů

Protein	Fyziologické rozmezí v plazmě [g/l]	Metoda stanovení	Elektroforetická frakce
prealbumin	0,2–0,4	nefelometrie	prealbumin
albumin	Sérum 35–53 moč < 10mg/l likvor 120-300mg/l	fotometrie	albumin
α1-antitrypsin (α1-inhibitor proteas)	0,9–2,0	nefelometrie	α1 - globuliny
α1-kyselý glykoprotein (orosomukoid)	0,5–1,2	nefelometrie	
haptoglobin	0,3–2,0	nefelometrie	α2 - globuliny
ceruloplasmin	0,2–0,6	nefelometrie	
transferin	2,0–3,6	imunoturbidimetrie	β - globuliny

fibrinogen	2–4	koagulačně	
C-reaktivní protein	< 7 mg/l	turbidimetrie	γ- globuliny
IgG	7,0–16,0	imunoturbidimetrie	
IgA	0,7–4,0	imunoturbidimetrie	
IgM	0,4–2,3	imunoturbidimetrie	

6.3.2 Stanovení proteinů v moči

Pro posouzení většiny klinických stavů stačí průkaz přítomnosti proteinů v moči. Stanovení koncentrace určitého proteinu se provádí ve sbírané moči. Fyziologická koncentrace proteinů v moči je 0,15 g za 24 hodin. K proteinurii může docházet u poškození ledvin, u mnohočetného myelomu, či u hypertonických stavů. Proteinurie u poškození ledvin je způsobena především zvýšeným vylučováním albuminu (albuminurie). U diabetických pacientů dochází ke zvýšeným ztrátám albuminu v kapilárních cévách tzv. **mikroalbuminurii**, která je ukazatelem cévního poškození (diabetická nefropatie a retinopatie). Nízká koncentrace proteinů v moči nemá klinický význam.

7 Enzymy

Enzymy jsou součástí všech živých systémů a slouží v nich jako **biokatalyzátory** urychlující chemické reakce. Při enzymatických reakcích se substrát (nebo několik substrátů) přeměňuje na produkt. Enzymy jsou **druhově** (každý biologický druh má své vlastní enzymy), **účinkově** (každá biochemická reakce má svůj enzym a **substrátově specifické** (každý substrát má svůj enzym). Předností enzymů jako katalyzátorů biochemických reakcí je jejich schopnost fungovat při nízké reakční teplotě (20–40 °C) a možnost snadné regulace jejich účinku a to i na několika úrovních.

Podle místa působení můžeme enzymy rozdělit na **intracelulární** a **extracelulární**. Většina enzymů působí uvnitř buňky, ve které vznikly; extracelulární enzymy jsou z buněk vylučovány do tělních tekutin (krev, trávicí šťávy).

7.1 Struktura, názvosloví, klasifikace enzymů

Z chemického hlediska jsou enzymy většinou globulární, jednoduché nebo složené proteiny. Bílkovinná část enzymu se nazývá **apoenzym**, nebílkovinná část enzymu je **kofaktor**. Kofaktorem může být anorganická látka (kovový ion, např. Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+}), organická sloučenina nebo obě složky najednou. Organické kofaktory se nazývají **koenzymy**, enzym s kovovým kofaktorem se nazývá **metaloenzym**. Kofaktory mohou být integrální součástí enzymu (stálá vazba) nebo mohou být na enzym vázány volně (přechodná vazba). Pevně vázané koenzymy se nazývají **prostetické skupiny**. Komplex apoenzymu a kofaktoru tvoří katalyticky aktivní **holoenzym**. Oblast enzymu, kde dochází k vazbě substrátu, se nazývá **aktivní místo** enzymu. V aktivním místě se rozlišují skupiny odpovědné za vazbu substrátu (vazebné místo) a skupiny odpovědné za vlastní chemickou přeměnu (katalytické skupiny, katalytické místo). Prostorové uspořádání (konformace)

aktivního místa určuje substrátovou specifitu – aktivní místo musí svým tvarem přesně odpovídat tvaru molekuly substrátu.

Celá řada enzymů má triviální název, který bývá zakončen koncovkou –in (např. trypsin, pepsin). Systematický název enzymu je tvořen označením substrátu, názvu katalyzované reakce a zakončením **-asa** (např. laktát-dehydrogen- **asa**). Podle typu katalyzované reakce rozdělujeme enzymy celkem do šesti tříd:

1. oxidoreduktasy – katalyzují redoxní reakce
2. transferasy – katalyzují přenos funkčních skupin
- 3- hydrolasy – katalyzují hydrolytické štěpení vazeb
4. lyasy - katalyzují nehydrolytické štěpení vazeb
5. isomerasy – katalyzují isomerační reakce
6. ligasy – katalyzují tvorbu vazeb spojených se spotřebou energie (např. za současného rozkladu ATP)

Každému enzymu je přiřazen speciální EC (Enzyme Commission) kód podle International Union of Biochemistry (IUB).

7.2 Enzymová aktivita a její regulace

Enzymová aktivita je ovlivňována celou řadou faktorů, mezi které řadíme teplotu, pH, koncentraci substrátu/ů a přítomností aktivátorů či inhibitorů. Zpravidla platí, že se vzrůstající teplotou roste rychlost katalyzované reakce, pokud však teplota přesáhne kritickou mez (55–60 °C), dochází ke ztrátě aktivity způsobené denaturací proteinu. Většina enzymů je aktivních jen v úzkém rozpětí pH a to většinou v neutrálním či slabě kyselém prostředí (výjimkou jsou žaludeční proteasy). Enzymovou aktivitu lze ovlivnit též **aktivátory** – látky stimulující aktivitu enzymu (např. ionty kovů) nebo **inhibitory** – látky snižující aktivitu enzymu. Podle mechanismu působení inhibitorů rozlišujeme několik typů enzymové inhibice. Základní rozdělení je na inhibici nevratnou (**ireverzibilní**) a vratnou (**reverzibilní**).

Regulace katalytické aktivity enzymu je možná dvěma způsoby a to buďto ovlivněním množství enzymu nebo ovlivněním jeho aktivity. Množství enzymu je ovlivněno jeho syntézou, sekrecí do místa účinku a jeho odbouráváním. Aktivita enzymu je regulována prostřednictvím strukturních a konformačních změn enzymu.

7.3 Klinicky významné enzymy

Vyšetřovaným materiálem pro stanovení enzymů v laboratořích klinické biochemie je plazma, do které jsou enzymy vylučovány tkáňovými buňkami nebo jsou uvolňovány při jejich poškození či rozpadu. Nestanovuje se jejich koncentrace, nýbrž **katalytická aktivita**, která je mírou přeměny substrátu na produkt. Standardní jednotkou enzymové aktivity je mezinárodní jednotka enzymové aktivity IU, ale v laboratorní praxi se používá jednotka **katal (1IU = 16,67nkat)**. Jednotka aktivity se vztahuje na litr vyšetřované tekutiny (plazmy). Za patologických stavů, které jsou doprovázeny destrukcí tkáně, dochází k uvolňování příslušných specifických enzymů do krevního oběhu a jejich stanovení se využívá ke zjištění druhu a rozsahu poškození. Pro diagnostické účely je podstatná správná interpretace laboratorních výsledků, která vychází ze znalosti **tkáňové specificity enzymů** a ze znalosti **míry zvýšení aktivity enzymů** včetně doby, po kterou tato změna přetrvává.

Přehled klinicky významných enzymů a příčiny změn jejich aktivity v plazmě ukazuje tabulka 7.1.

Tabulka 7.1 Klinicky významné enzymy a příčiny změn jejich aktivity v plazmě

Enzym	Aktivita v plazmě [μkat/l]	Funkce	Snížené hodnoty	Zvýšené hodnoty
ALT	0,1-0,78	katalyzují přenos aminoskupiny na oxokyseliny	deficit vitamínu B6	poškození jater (virová hepatitida) sepse po požití alkoholu
AST	0,1-0,72			poškození jater (virová hepatitida) infarkt myokardu onemocnění kosterních svalů
GMT	muži: 0,14-0,84 ženy: 0,14-0,68	přenos aminokyselin přes buněčné membrány		obstrukce žlučových cest jaterní choroby chronický alkoholismus
ALP	0,66-2,2	hydrolýza monoesterů kyseliny fosforečné v alkalickém prostředí	těžké anemie kurděje kretenismus	fyzilogicky u rostoucích dětí choroby kostí, žlučových cest a jater
ACP	muži: 0-108 nkat/l ženy: 0-92 nkat/l	hydrolýza monoesterů kyseliny fosforečné v kyselém prostředí		choroby prostaty a kostí
PCP	muži: 0-43 nkat/l	tkáňově specifická ACP		nádorová onemocnění prostaty
LD	2,25-3,75	reverzibilní přeměna pyruvátu na laktát		infarkt myokardu hematologické choroby, svalové nemoci akutní hepatitidy a ledvinové choroby



CK	muži: 0,2-4,3 ženy: 0,2-3,1	fosforylace kreatinu na kreatinfosfát	hyperfunkce štítné žlázy snížení svalové hmoty chronický alkoholismus	infarkt myokardu onemocnění kosterních svalů svalové křeče svalová traumata při poraněních
CHE	87-190	katalyzuje hydrolýzu esterů cholinu	poruchy proteosyntézy při těžké hepatopatii i při proteinové malnutrici	nefrotický syndrom alkoholismus
α-amylasa celková	sérum: 0,30-1,67 moč: do 7,67	hydrolýza vnitřních glykosidových vazeb ve škrobu a glykogenu		akutní pankreatitida snížené vylučování amylázy ledvinami
α-amylasa pankreatická	sérum: 0,22-0,88 moč: do 5,83			
lipasa	0,0-1,0	hydrolýza triacylglycerolů		akutní pankreatitida akutní otrava alkoholem zranění břicha při nehodách nebo chirurgickém zásahu

ALT: alaninaminotransferasa, AST: aspartátaminotransferasa, GMT: g-glutamyltransferasa, ALP: alkalická fosfatasa, ACP: kyselá fosfatasa, PCP: prostatická kyselá fosfatasa, LD: laktátdehydrogenasa, CK: kreatinkinasa, CHE: cholinesterasa

8 Acidobazická rovnováha

Rovnováha mezi tvorbou a vylučováním kyselin a zásad, tedy stálá hodnota pH prostředí je označována jako **acidobazická rovnováha** (ABR). Stabilita pH vnitřního prostředí je zajišťována především pufracími (nárazníkovými) systémy. Udržování ABR je nutnou podmínkou pro zajištění stálého vnitřního prostředí (**homeostázy**) organismu a to jak na úrovni nitrobuněčné (**intracelulárně**) tak mimobuněčné (**extracelulárně**). Již velmi malá odchylka v hodnotách pH ovlivní buněčný a energetický metabolismus, změni konformaci proteinů a tím i jejich vlastnosti (např. aktivitu enzymů), transport látek a další životně důležité pochody.

Produkce kationtu H^+ (přesněji H_3O^+) v organismu
Vodíkové ionty vznikají metabolismem (katabolismem) jednotlivých biomolekul. Koncovým produktem katabolismu sacharidů je acetylkoenzym A ($CH_3CO-SCoA$) a oxid uhličitý (CO_2); při odbourávání mastných kyselin vzniká acetylCoA a H^+ v podobě $NADH+H^+$ či $FADH_2$, proteiny (aminokyseliny) jsou katabolisovány na močovinu a rovněž CO_2 . Vzniklý CO_2 tvoří

s vodou kyselinu uhličitou (H_2CO_3), která disociuje na **hydrogenuhličitan** (HCO_3^-) a **kation $\text{H}^+/\text{H}_3\text{O}^+$** .

Katabolismem proteinů obsahujících síru vzniká kyselina sírová, fosfolipidů kyselina fosforečná; anaerobní glykolýzou se tvoří kyselina mléčná (laktát).

8.1 Regulační mechanismy organismu

Na udržování ABR, která je metabolismem neustále narušována, se svojí činností podílejí některé orgány – plíce (**respirační regulace**), ledviny (**renální regulace**) a játra (jaterní regulace), a nárazníkové systémy (extra- a intracelulární **nárazníkové roztoky - pufrý**).

Obecně jsou pufrý roztoky slabých kyselin a jejich solí odvozených od silných zásad, nebo slabých zásad a jejich solí odvozených od silných kyselin. Výsledné pH pufru je dáno jejich vzájemným poměrem, hodnotu pH pufru lze vypočítat pomocí Henderson-Hasselbalchovy rovnice. Význam pufrů v regulaci ABR spočívá v jejich schopnosti vázat vznikající H^+ neutralizační reakcí.

Nárazníkové systémy reagují na změny pH bezprostředně po jejich vzniku, ale jejich kompenzace není dostatečná. Následná regulace uplatňovaná činností orgánů nastupuje pomalu, ale při normální funkci orgánů dochází k úplnému odstranění poruchy.

Nárazníkové systémy

Akutní změny pH v organismu jsou během několika sekund regulovány nárazníkovými systémy v krvi, které rozdělujeme na dva základní typy:

- I. hydrogenuhličitanový (zastarale bikarbonátový) – převážně extracelulární
- II. ostatní - nehydrogenuhličitanové (nebikarbonátové) – převážně intracelulární

I. Hydrogenuhličitanový nárazníkový systém

Hydrogenuhličitanový nárazník působí především v krevní plazmě a je tvořen slabou kyselinou uhličitou a hydrogenuhličitanovým aniontem. V regulaci ABR má největší význam, protože je to **systém otevřený**, ve kterém se koncentrace jeho složek může regulovat jak vydechováním (respirací), tak vylučováním ledvinami. Hydrogenuhličitanový systém se skládá z disociované kyseliny uhličitě (na H^+ a HCO_3^-) a z CO_2 (CO_2 rozpuštěný v tělních tekutinách a CO_2 v plynné fázi).



CO_2 vznikající metabolickými ději ve tkáních je vylučován plícemi a jeho koncentrace je tedy regulována respirací a označuje se jako **respirační složka systému**. Koncentraci CO_2 v krvi nelze měřit, proto se v laboratorní diagnostice vyjadřuje jako parciální tlak oxidu uhličitého (pCO_2) - podle Henryho zákona je množství rozpuštěného CO_2 přímo úměrné jeho parciálnímu tlaku nad tekutinou.

Respirační regulace se uskutečňuje prostřednictvím zadržování nebo naopak vydechování CO_2 z organismu a to změnou dechové frekvence (hypo- a hyperventilací plic). Plicní regulace nastupuje během několika minut a maximálního efektu dosahuje do 12-24 hodin.

hyperventilace → snížení pCO_2 → alkalizace → alkalóza
hypoventilace → zvýšení pCO_2 → okyselení → acidóza

Anion HCO_3^- je označován jako **metabolická složka systému** a jeho koncentrace v arteriální krvi je regulována činností ledvin.

Renální regulace je uskutečňována prostřednictvím zvýšení nebo snížení zpětné resorpce HCO_3^- a zadržováním nebo zvýšeným vylučováním H^+ - v ledvinách se podle potřeby tvoří kyselá nebo alkalická moč. Nastupuje obvykle za 1-2 hodiny a maximálního efektu dosahuje za 2-5 dnů.

II. Ostatní nárazníkové systémy

a) **Hemoglobinový nárazník** se skládá z hemoglobinu a oxyhemoglobinu, působí v erythrocytech a je těsně spjatý s přenosem kyslíku. Hemoglobin udržuje stálé pH transportem protonů H^+ z tkání do plic, kdy hemoglobin (Hb) s navázanými H^+ je venózní krví přiváděn do plic, kde se Hb saturuje kyslíkem (vzniká oxyhemoglobin HbO_2) při současné ztrátě H^+ . Kationty H^+ jsou následně zapojeny do hydrogenuhličitanového pufracího systému.

Z plic je HbO_2 transportován arteriálním oběhem do tkání, kde jsou buněčným metabolismem produkovány protony H^+ , které vytěsňují kyslík z vazby na HbO_2 za opětového vzniku Hb.

b) **Proteinový pufrací systém** využívá amfoterních vlastností bílkovin a je hlavní složkou nehydrogenuhličitanové pufrací kapacity plazmy. Pufrací působí v molekulách proteinů skupiny $-\text{NH}_2$ a $-\text{COO}^-$ postranních řetězců aminokyselin.

c) **Fosfátový pufrací systém** je výrazným intracelulárním nárazníkem. Konstantní pH v buňkách udržuje vylučováním vodíkových iontů močí. V plazmě a erythrocytech tvoří minoritní složku.

8.2 Poruchy acidobazické rovnováhy

Poruchy ABR dělíme podle příčiny na respirační (porucha dýchání nebo výměny plynů) a metabolické (porucha buněčného metabolismu), a podle efektu na pH arteriální krve na acidózy a alkalózy.

Respirační poruchy přímo souvisejí s funkcí plic a vedou ke **změně pH v důsledku změny pCO_2** . Primárně respirační poruchy jsou kompenzovány činností ledvin. Cílem kompenzace je vrátit pH krve na fyziologickou hodnotu.

Metabolické poruchy se vyznačují buď nadměrnou produkcí vodíkových iontů, nebo sníženou schopností vylučovat je z těla a vedou ke **změně pH v důsledku změny koncentrace HCO_3^-** . Primárně metabolické poruchy jsou kompenzovány respiračně (činností plic).

Acidóza označuje klinický stav, kdy je pH arteriální krve $< 7,36$ (acidémie); dochází k hromadění kyselých nebo ztrátě alkalických metabolitů.

Alkalóza označuje klinický stav, kdy je pH arteriální krve $> 7,44$ (alkalémie); znamená ztrátu kyselých nebo nahromadění alkalických metabolitů.

Acidózy i alkalózy mohou vznikat z respiračních i metabolických příčin. Kombinací těchto extrémních stavů rozeznáváme čtyři typy jednoduchých poruch ABR: respirační acidózu (RAC), respirační alkalózu (RAL), metabolickou acidózu (MAC) a metabolickou alkalózu

(MAL). Při současném výskytu dvou nebo více jednoduchých poruch ABR vznikají kombinované (smíšené) poruchy.

Respirační acidóza je způsobena hromaděním CO_2 v krvi (hyperkapnie) poklesem alveolární ventilace – dochází k nerovnováze mezi produkcí CO_2 v tkáních a jeho nedostatečným vylučováním plicemi. Příčinou mohou být například nemoci dýchacích cest (astma), plicní onemocnění (zánět, edém) nebo zranění hrudníku. RAC může mít akutní nebo chronický průběh, u kterého dochází k úpravě pH na normální hodnoty renální kompenzací a pacient se postupně adaptuje na vyšší pCO_2 .

Primární příčinou **respirační alkalózy** je převládající vylučování CO_2 nad jeho produkci v tkáních, kde je množství vznikajícího CO_2 relativně konstantní a RAL je proto způsobena hyperventilací plic (zrychleným dýcháním). Hyperventilace vede k poklesu koncentrace CO_2 v krvi (hypokapnii) a může být způsobena například centrální stimulací dechového centra (při strachu, bolesti, horečce, cévní mozkové příhodě, mozkových nádorech) nebo toxickým drážděním dechového centra v ranných stadiích při předávkování aspirinem. Poruchou v udržování hladiny CO_2 trpí také často pacienti připojení na mechanické ventilátory plic.

Metabolická acidóza je způsobena nahromaděním netěkavých kyselin nebo ztrátou HCO_3^- z extracelulární tekutiny. Je to klinicky nejčastější porucha ABR, která se vyznačuje nízkým pH v krvi a sníženou koncentrací HCO_3^- . Podle příčiny můžeme MAC klasifikovat jako: vysoký anion gap (viz kap. 8.3):

- **ketoacidózu** - nadměrná produkce H^+ (kys. octové, kys. β -hydroxymáslé, kys. mléčné) při dekompenzaci diabetu, při hladovění, alkoholismu
 - **laktátovou acidózu** - hromaděni kyseliny mléčné (při nedostatečné oxygenaci krve, poruše perfuze tkání; fyziologicky při anaerobní fyzické zátěži)
- normální anion gap (hyperchlorémie):
- renální tubulární acidózu - zvýšené ztráty HCO_3^-
 - acidózu při zvýšené ztrátě HCO_3^- ze střeva (při těžkých průjmech).

Nejčastější příčinou **metabolické alkalózy** je ztráta kyselin (HCl) při zvracení nebo zvýšený příjem hydrogenuhličitanů (infuze, některé složky potravy).

Kombinované poruchy ABR se mohou vyvíjet nezávisle na sobě, nebo jedna porucha podmiňuje rozvoj další poruchy. Může se jednat o kombinaci acidózy a alkalózy (poruchy působící proti sobě), takže výsledné pH nemusí být vychýleno, nebo mohou obě poruchy posouvat pH stejným směrem a navzájem se potencionují.

K **fyziologickým změnám** parametrů ABR dochází v těhotenství: těhotná žena hyperventiluje, čímž dochází ke snížení pCO_2 a respirační alkalóze, která je kompenzovaná metabolickou acidózou snížením koncentrace HCO_3^- i BBs (viz kap. 8.3) v plazmě.

8.3 Laboratorní vyšetření parametrů ABR

Stanovení acidobazických parametrů se provádí nejčastěji v arteriální nebo arterializované krvi a musí být provedeno **neprodleně po odběru**, aby nedošlo k poklesu pH, pO_2 a vzestupu pCO_2 ; odběr musí být proveden za striktně **anaerobních podmínek!** Základní parametry charakterizující acidobazický metabolismus se měří na analyzátoch krevních plynů (Astrup), které jsou vybaveny elektrodami pro přímé měření pH, pCO_2 a

pO₂, s možností automatického dopočítávání odvozených parametrů ABR (v současnosti místo výpočtu snaha o přímé měření koncentrace hydrogenuhličitanů). Komplexní laboratorní diagnostika poruch ABR zahrnuje:

- stanovení základních parametrů: pH, pCO₂, pO₂
- stanovení odvozených parametrů výpočtem: koncentrace aktuálních hydrogenuhličitanů, koncentrace standardních hydrogenuhličitanů, celkový CO₂, saturace Hb kyslíkem, odchylka bází (Base Excess BE)
- ostatní vyšetření – stanovení koncentrace Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, laktátu,
- ostatní odvozené parametry - pufrové báze séra (Buffer Base - BBs), rozdíl silných iontů (Strong Ion Difference SID), aniontová mezera (Anion Gap AG).

Odvozené parametry ABR

Aktuální hydrogenuhličitaný vyjadřují koncentraci HCO₃⁻ v litru krve nasycené kyslíkem za aktuálních podmínek (pCO₂ a teplota pacienta).

Standardní hydrogenuhličitaný vyjadřují koncentraci HCO₃⁻ v litru krve nasycené kyslíkem při teplotě 37°C a pCO₂ 5,33 kPa.

Saturace Hb kyslíkem vyjadřuje podíl oxyhemoglobinu a efektivního hemoglobinu (Hb který se zúčastňuje přenosu kyslíku).

Base Excess vyjadřuje množství bází, které je potřeba ubrat nebo přidat k jednomu litru krve, aby se pH vrátilo k hodnotě 7,4.

Buffer Base je celkové množství nárazníkových bází v jednom litru krve při aktuálním pH, pCO₂ a koncentraci Hb.

Anion Gap vyjadřuje koncentraci všech běžně nestanovovaných aniontů v plazmě a používá se k diferenciální diagnostice MAC. Popisuje tedy odchylky v koncentraci ketokyselin, laktátu, fosfátů, síranů.

Zvýšené hodnoty:

- snížená koncentrace měřených kationů a zvýšená koncentrace neměřených aniontů

Snížené hodnoty:

- zvýšená koncentrace měřených kationů a snížená koncentrace neměřených aniontů

Strong Ion Difference udává součet aniontů slabých kyselin (HCO₃⁻, proteinů, reziduálních aniontů); je dán rozdílem koncentrací iontů silných kyselin a silných bází.

Tabulka 8.1.: Orientační fyziologické hodnoty vybraných parametrů ABR v arteriální krvi

parametr	interval
pH	7,36 -7,44
pCO ₂	M 4,8 – 6,4 kPa Ž 4,4 – 5,7 kPa
pO ₂	10,4 – 14,3 kPa
HCO ₃ ⁻	22 – 26 mmol/l
BE	± 2 mmol/l
BB	44 – 53 mmol/l
AG	14 – 18 mmol/l
Saturace Hb	94 – 99 %

9 Hormony

Hormony jsou látky různého chemického složení s regulační funkcí vytvářené v organismu a k místu svého určení přenášené tělními tekutinami. **Hormonální regulace** je typická pro

vyšší organismy a v organismu ovlivňuje děje pomalé. Je schopna ovlivnit současně orgány (tkáně, buňky) v různých částech organismu. Hormony na cílové buňky působí tzv. receptorovým mechanismem a jejich působení je látkové. Účinnost hormonů je závislá na přítomnosti látek schopných hormon rozeznat a interagovat s ním, tyto látky jsou nazývány **receptory** a jsou jimi jednoduché či složené proteiny. Receptory mohou být umístěny buďto **na povrchu cílových buněk** jako součást buněčné membrány a pak působí prostřednictvím tzv. druhých posílů na enzymy uvnitř buňky tzv. efekторы a vyvolávají změny ve smyslu zvýšení nebo snížení aktivity určitého biochemického procesu nebo řetězce reakcí, nebo **intracelulárně**, kde působí jako regulátory genové exprese. Hormony, jejich struktura, funkce, mechanismus působení a klinické projevy jejich nadbytku či nedostatku spolu s diagnostikou a léčbou onemocnění jsou předmětem **endokrinologie**.

9.1 Definice a rozdělení hormonů

Hormony lze rozdělovat na základě jejich původu, tedy podle žláz, ve kterých jsou vytvářeny, podle jejich chemického složení a podle mechanismu jejich působení. Rozdělení hormonů na základě místa jejich vytváření je asi nejběžnějším způsobem klasifikace hormonů, i když ne zcela bezproblémovým. Některé hormony jsou totiž vytvářeny i v jiných místech než v dané endokrinní žláze (např. somatostatin: hypothalamus x pankreas, estrogény: Graafovy folikuly x fibroblasty pojiva). Mezi žlázy s vnitřní sekrecí (endokrinní žlázy) se řadí hypofýza, štítná žláza, kůra a dřeň nadledvin, gonády, epifýza, insulární aparát pankreatu a příštítná tělíska. Hormony jsou dále vytvářeny v neuroendokrinních jádrech hypothalamu a v gastrointestinálním traktu (GIT).

Hormony jsou látky rozmanité chemické struktury, ale v zásadě by bylo možné je rozdělit do 4 skupin chemických sloučenin:

- peptidy – hormony hypofýzy a hypothalamu, atriový natriuretický hormon, insulin, glukagon, hormony GIT, kalcitonin, parathormon či choriogonadotropin
- deriváty aminokyselin – serotonin, melatonin, katecholaminy, hormony štítné žlázy
- steroidy – kortikoidy, gestageny, estrogény a androgeny
- deriváty mastných kyselin – deriváty kyseliny arachidonové.

Hormony s podobnou chemickou strukturou mají často stejný mechanismus působení, i když se účastní rozdílných biochemických procesů. Naopak někdy chemicky naprosto odlišné hormony mohou mít stejné účinky (např.: glukagon - peptid a kortisol - steroid).

Podle mechanismu jejich působení můžeme hormony rozdělit na hormony působící

- přes receptory na povrchu buněk
 - prostřednictvím G proteinů a cyklických nukleosidmonofosfátů jako druhých posílů (např.: katecholaminy, glukagon, liberiny, atriový natriuretický hormon)
 - prostřednictvím G-proteinů a jiných druhých posílů jako např. Ca^{2+}
 - bez G-proteinů, katalytickou funkci má samotný receptor (např.: insulin)
- přes intracelulární receptory (steroidní hormony, hormony štítné žlázy).

Přehled hormonů a jejich funkcí na základě místa tvorby je uveden v tabulce 9.1.

Tabulka 9.1.: Hormony a jejich funkce

Místo tvorby	Hormon	Funkce
--------------	--------	--------

Adenohipofýza	Somatotropin – růstový hormon (STH)	- podporuje růst prakticky všech buněk a tkání (nejdůležitější kostní a svalová tkáň) -ovlivňuje vychytávání glukosy buňkami
	Thyreotropin (TSH)	-stimuluje folikulární buňky štítné žlázy k uvolňování T3 a T4
	Adrenokortikotropní hormon - kortikotropin (ACTH)	-stimuluje produkci kortikosteroidů v kůře nadledvin
	Prolaktin (PRL)	-ovlivňuje růst a funkci mléčné žlázy (u žen) -řadí se mezi tumorové markery
	Luteinizační hormon – lutropin (LH)	-stimuluje tvorbu androgenů v tzv. Leydigových buňkách varlat -stimuluje steroidogenesi v kůře nadledvin (u mužů) -stimuluje tvorbu pohlavních steroidů ve vaječnicích -podílí se na cyklických změnách funkce ženských reprodukčních orgánů
	Folikuly stimulující hormon – folitropin (FSH)	-ovlivňuje zrání spermií v sementvorných kanálcích -stimuluje tvorbu sexuálních steroidů ve vaječnicích -podílí se na cyklických změnách funkce ženských reprodukčních orgánů
	Melanocyty stimulující hormon (MSH)	-působí v kožních buňkách -melanocytech
Neurohipofýza Hypothalamus (tvorba)	Oxytocin	-uplatňuje se při reprodukci, hlavně při porodu a během laktace
	Vasopresin - adiuretin	-reguluje příjem a výdej vody -zajišťuje stálost vnitřního prostředí – udržuje poměr mezi obsahem vody v buňkách a v extracelulární tekutině a jejím celkovým objemem
Hypothalamus	Somatoliberin	-stimuluje sekreci a biosyntézu STH
	Somatostatin	-inhibuje sekreci TSH a sekreci a biosyntézu STH
	Somatomediny – růstové faktory	-regulace genové exprese a proteosyntézy -působí parakrinně na sousední buňky
	Tyreoliberin (TRH)	-řídí a stimuluje výdej a tvorbu TSH
	Kortikoliberin (CRH)	-stimuluje sekreci ACTH
	Gonadoliberin (GnRH)	-stimuluje výdej a syntézu LH a FSH v gonadotropech
	Prolaktin inhibující faktor (PIF)	-řídí výdej prolaktinu -jedná se o dopamin
Štítná žláza	Tyroxin (T₄)	-působí na vývoj CNS, regulátory nervového přenosu
	Trijodthyronin (T₃)	-ovlivňují celkovou energetickou bilanci -termogenní působky
	Kalcitonin (CT)	-antagonistou PTH -snižuje hladinu Ca ²⁺ v krvi -tumorový marker (nádory štítné žlázy)
Příštitná tělíska	Parathormon (PTH)	-vyvolává zvýšení hladiny Ca ²⁺ v krvi: osteolýzou, resorpcí Ca ²⁺ ledvinami a tenkým střevem
Epifýza	Melatonin	-kontroluje denní rytmus výdeje dalších hormonů - gonadotropinů a pohlavních hormonů -„biologické hodiny“ člověka -antioxidant



Kůra nadledvin	Kortisol	-stimuluje glukoneogenezi, glykogenezi -snižuje vychytávání glukózy svaly a trávicím traktem -navozuje rozpad proteinů a demineralizaci kostní tkáně -stimuluje CNS, zvyšuje její dráždivost a emoční labilitu -ovlivňuje děje, probíhající při zánětu, alergických reakcích a při imunitní odpovědi – protizánětlivé, antialergenní, imunosupresivní, antiproliferativní účinky -stimulace buněčné diferenciaci a buněčné smrti - apoptózy
	Aldosteron (ALD)	-udržení rovnováhy v koncentraci elektrolytů - především sodných a draselných iontů -resorpci vody a Na ⁺ v ledvinách a vylučování K ⁺ a H ⁺ iontů do moči
Děň nadledvin „Katecholaminy“	Adrenalin - epinefrin	-hormon stresové reakce, neurotransmitér -bronchodilatace; urychlení srdeční činnosti -aktivace potních žláz -zvyšuje hladinu glukagonu, snižuje hladinu insulinu
	Noradrenalin – norepinefrin	-hormon, hlavně však neurotransmitér -urychluje srdeční tep -zvyšuje rozklad glykogenů
Langerhansovy ostřivky pankreatu	Insulin	-způsobuje snížení koncentrace glukosy v krevním oběhu -aktivuje některé z enzymů glykolýzy (fosfofruktokinázu, glukokinázu, fosfoenolpyruvát kinázu) -ve svalu a v tukové tkáni podporuje transport glukosy do buněk, v játrech stimuluje tvorbu glykogenů -stimuluje transport aminokyselin do buněk a následnou proteosyntézu
	Glukagon	-zvyšuje hladiny glukosy v oběhu -stimuluje glykogenolýzu a glukoneogenezi v játrech -aktivuje fosfoenolpyruvát-karboxy-kinázu
Mужské varlat (androgen)	Testosteron	-odpovědný za vývoj a funkci mužského reprodukčního systému -tvorba svalové hmoty
	Dihydrotestosteron	-odpovědný za vývoj a funkci mužského reprodukčního systému -odpovědný za vývoj druhotných pohlavních znaků
Ženské gonády	Estradiol, estriol	-ovlivňují vývoj sekundárních pohlavních znaků ženského těla
	Estron	-ovlivňují periodický vývoj děložní sliznice -zabraňují řídnutí kostí
	Progesteron	-navozuje sekreční fázi menstruačního cyklu - podporuje růst děložní sliznice po ovulaci

9.2 Klinická aplikace a laboratorní diagnostika

V rámci laboratorní diagnostiky mohou být hormony stanovovány v krvi a v moči. Hladiny vlastních hormonů je možno stanovovat v krvi, kde se jejich koncentrace pohybuje v řádu piko- až nanomolů a ke stanovení se využívají imunochemické metody (radioimunoanalýza – RIA, imunoradiometrická analýza – IRMA, chemiluminiscenční imunoanalýza – CLIA, enzymatická imunoanalýza - EIA).

Mezi rutinní biochemická vyšetření patří stanovení sérových hladin těhotenského hormonu (choriagonadotropin - hCG) a dvou hormonů spojených s funkcí štítné žlázy a to thyrotropinu a volného tyroxinu. V rámci speciálních vyšetření se stanovují hladiny hormonů štítné žlázy, kůry nadledvin, adenohipofýzy, příštítných tělísek či pohlavních gonád. Dále je možné stanovovat hladiny insulinu. V moči jsou stanovovány převážně hladiny metabolitů hormonů, ne vlastní hormony. Do moči nejsou vylučovány hormony peptidové či bílkovinné povahy (výjimkou je hCG).

Přehled stanovení vybraných hormonů spolu s klinickou aplikací podává tabulka 9.2.

Tabulka 9.2: Klinická aplikace a laboratorní diagnostika vybraných hormonů

Hormon	Metoda stanovení	Projevy nadbytku (hyperfunkce) - a s tím spojená onemocnění	Projevy nedostatku (hypofunkce) - a s tím spojená onemocnění
STH	IRMA sérum	v dětství dochází k nadměrnému vzrůstu (gigantismus) v dospělosti ke vzniku akromegálií	v dětství vzniká trpaslictví (nanismus)
Prolaktin	CLIA sérum	ztráta sexuálního apetitu, neočekávaná laktace, vynechávání menstruace a neplodnost u žen a dysfunkce pohlavních žláz, zmenšení varlat, zvětšení prsů u mužů - hypofyzární adenomy a mikroadenomy (prolaktinomy), funkční a organické poruchy hypofyzární regulace	dysfunkce vaječníků u žen, erektilní dysfunkce, hypofunkce semenných váčků a hypoandrogenismus u mužů - Sheehanův syndrom
adenohypofýzy		hyperpituitarismus: útlak optického chiasmatu a různé poruchy vidění, většinou způsobena adenomem – nadprodukce hormonu podle buněk, kterými je tvořen, útlak ostatních sekretorických buněk	hypopituitarismus: pokles funkčnosti hormonů adenohypofýzy – nedostatek kortisolu, tyreoidních hormonů, příznaky Diabetes insipidus, ztráta funkce pohlavních orgánů a vymizením sekundárních pohlavních znaků
Vasopresin	-	syndrom neadekvátní sekrece ADH: způsobuje zadržování vody, hypoosmolalitu, hyponatrémii, svalovou slabost, poruchy vědomí	nadměrné vylučování tekutin - Diabetes insipidus – žíznivka
T ₄	CLIA sérum	hypertyreóza: urychlení metabolismu, váhový úbytek, nespavost, zvýšené pocení, pocit horka, únava, bušení srdce, arytmie, tachykardie a v některých případech zvětšení štítné žlázy - autoimunitní onemocnění, adenomy, karcinomy štítné žlázy, nadprodukce TSH, Basedowova choroba,	hypotyreóza: únava, zimomřivost, poruchy paměti, pomalé psychomotorické tempo, dušnost po námaze, hrubý hlas, zácpa, suchá kůže, váhový přírůstek, anemie, zpomalení metabolismu a snížení bazálního metabolismu u těžkého stavu až bezvědomí, hypotermie, hypotenze s
T ₃	CLIA sérum		

		Gravesova choroba	rozvojem šokového stavu tzv. myxedémového komatu - autoimunitní onemocnění, odebrání štítné žlázy, snížená sekrece TSH, těžký nedostatek jódu v potravě – kretenismus
PTH	ECLIA sérum, plazma	primární hyperparathyroidismus: autonomní, abnormální sekrece PTH – slabost, nausea, zvracení, nechutenství, bolest kostí a svalů, polyurie, polydipsie, ledvinné kameny, osteoporóza sekundární hyperparathyroidismus: nadměrná produkce PTH jako odpověď na hypokalcémii	snížené hladiny Ca^{2+} v krvi, zvýšené vylučování Ca^{2+} močí, svalové křeče a tenze, ledvinové kameny - autoimunitní onemocnění, odstranění příštítných tělísek, DiGeorge syndrom
Kortisol	sérum, moč, sliny	- Cushingova choroba, tumor nadledvin, akutní infekce, těžké popáleniny, šok, stres	- Addisonova choroba, autoimunitní onemocnění, nedostatečnost hypofýzy
Aldosteron	EIA, RIA sérum	hypertenze a hypokalémie, svalová slabost, polyurie a bolesti hlavy - Connův syndrom, Bartterův syndrom	hyponatrémie a hyperkalémie - primární adrenální insuficience, diabetes, vrozená adrenální hyperplazie, Addisonova choroba
Insulin	ECLIA, RIA sérum, plazma	hypoglykémie - insulinoma (tumor β -buněk pankreatu)	hyperglykémie, glykosurie - Diabetes mellitus, metabolický syndrom, polycystický syndrom ovarií
Glukagon		Hyperglykémie, snížená hladina aminokyselin - glukagonoma (tumor pankreatu)	
Testosteron	CLIA sérum		primární hypotestosteronismus: abnormálně snížená produkce testosteronu, dysfunkce varlat sekundární hypotestosteronismus: hypotalamická dysfunkce
Estradiol	CLIA sérum	pozastavení menstruačního cyklu, podpora růstu plodu u	

		těhotných žen zvětšená prostata a získání ženských pohlavních znaků u mužů - během těhotenství	
Progesteron	CLIA sérum	- během těhotenství, u nádorů vaječnicků	- při poruchách menstruačního cyklu, nedostatečně u vaječnicků vyvinutých

10 Vyšetření vybraných biochemických parametrů

Jedním z cílů této kapitoly je podat stručný přehled o možnostech rychlého a zároveň spolehlivého stanovení vybraných biochemických parametrů zdravotnickým personálem přímo u lůžka pacienta nebo v ambulancích. Některé přenosné přístroje mohou používat i samotní pacienti v domácí péči.

Součástí kapitoly jsou také základní informace o diagnostických postupech v prenatální diagnostice a o vyšetření funkce ledvin.

10.1 Vyšetření rychlými testy

Pro orientační (kvalitativní, semikvantitativní, kvantitativní) stanovení hladin některých biochemických parametrů v moči a krvi se používají **diagnostické testovací papírky** nebo malé přenosné reflexní fotometry, případně amperometrické měřicí přístroje.

Předností vyšetření rychlými testy je snadná manipulace a obsluha měřících přístrojů a především dosažení **rychlých a spolehlivých výsledků**, díky nimž lze bezprostředně upravit dávkování léků (glykémie - insulin, CRP – antibiotika, PT – Warfarin). Lze je používat jak u lůžka hospitalizovaného pacienta, tak v ambulanci nebo domácí péči (např. u diabetiků pro monitorování glykémie glukometry).

10.1.1 Vyšetření moči

Orientační chemické vyšetření základních složek moči se provádí diagnostickými testovacími proužky, které umožňují efektivní screening při rutinním vyšetření a zároveň monitorování následné léčby. Screeningové vyšetření moči může odhalit počáteční příznaky onemocnění ledvin a močových cest, jater či metabolické nebo hemolytické poruchy. Základní chemické vyšetření moči zahrnuje semikvantitativní (případně kvalitativní nebo kvantitativní) stanovení pH, specifické hmotnosti, leukocytů, dusitanů, glukózy, bílkovin, ketolátek, kyseliny askorbové, urobilinogenu, bilirubinu a krve (erytrocytů resp. volného hemoglobinu nebo myoglobinu). Fyziologicky se všechny tyto analyty v moči vyskytují v minimálních koncentracích, které jsou testovacími proužky neprokazatelné, ale při různých patologických stavech se jejich koncentrace zvyšuje na detekovatelné množství a stávají se patologickými součástmi moči.

Testovací proužky jsou vyrobeny z umělé hmoty, která slouží jako nosič pro indikační zóny impregnované reagenčními činidly ke stanovení jednotlivých analytů.

Po namočení proužku do moče dochází k aktivaci činidel imobilizovaných v suchém stavu na reakčních ploškách proužku. Činidla jsou aktivována vodou, která je obsažena v měřeném vzorku, a reagují pak s příslušným analytem. Dochází k barevné kolorimetrické

reakci, kterou je možno odečíst v předepsaném čase buď vizuálně, nebo reflexní fotometrií (spíše u vyšetření krve).

Testační proužky se vyrábějí jako monofunkční, polyfunkční nebo proužky pro speciální vyšetření. Monofunkční proužky obsahují jednu indikační zónu pro semikvantitativní stanovení určitého analytu (např. glucoPHAN pro stanovení glukózy), polyfunkční proužky obsahují 2 až 11 semikvantitativních indikačních zón, které umožňují vyšetření několika biochemických parametrů najednou podle typu proužku (např.: heptaPHAN – pH, bílkovina, glukóza, ketony, urobilinogen, bilirubin a krev). Pro screening určitého onemocnění jsou určeny proužky s kombinací dvou a více indikačních zón zaměřených na vyšetření analytů souvisejících s daným onemocněním (např.: diaPHAN pro screening DM – glukóza a ketony nebo tetraPHAN dia – pH, bílkoviny, glukóza a ketony). Pro speciální vyšetření jsou určeny speciální proužky, například OVUTEST (imunoPHAN LH) k semikvantitativnímu stanovení luteinizačního hormonu nebo těhotenské testy od celé řady výrobců, které fungují na principu stanovení přítomnosti lidského choriového gonadotropinu (hCG) v moči.

Vyšetření se zásadně provádí v **čerstvé, nekonzervované (nativní) neodstředěné a dobře promíchané moči** podle instrukcí výrobce testačního proužku. Obecně však platí tato pravidla:

- ze zásobní tuby vyjmeme pouze potřebný počet proužků, aniž bychom se dotkli reagenčních zón a tubu ihned pečlivě uzavřeme
- proužek **všemi reagenčními zónami** ponoříme na 1-2 sekundy do vyšetřované moče
- přebytečnou moč hranou proužku otřeme o stěnu nádoby
- proužek cca jednu minutu necháme ležet (nebo držíme) ve **vodorovné poloze**, aby nedošlo ke smíchání činidel z jednotlivých reakčních zón
- po uplynutí reakční doby (většinou jedna minuta) uvedené v návodu výrobce podle typu proužku vizuálně vyhodnotíme zbarvení reagenčních zón s odpovídající barevnou stupnicí na etiketě obalu – **proužek ke stupnici přikládáme ve směru vyznačeném šipkami**, aby bylo dodrženo stejné pořadí analytů na stupnici a na proužku!

Proužky je nutné chránit před účinkem vzdušné vlhkosti, přímého slunečního světla a zvýšené teploty, proto se musí skladovat pouze v **dobře uzavřených** původních obalech na suchém a tmavém místě.

Dalším analytem, jehož koncentrace v moči může být stanovena pomocí rychlého testu, je albumin. Jedná se o imunochemický test založený na principu imunofiltrace přes membránu napuštěnou monoklonální protilátkou proti albuminu. Vzorek moči se aplikuje na políčko s membránou v testovací kazetě a při průchodu membránou dojde k navázání albuminu na protilátku. Poté se na políčko aplikuje konjugační roztok s částicemi zlata navázanými na další monoklonální protilátku a v případě přítomnosti albuminu v moči dojde k červenému zbarvení membrány. Intenzita zbarvení odpovídá koncentraci albuminu a je změřena fotometricky.

10.1.2 Vyšetření krve

V plné kapilární krvi se rychlými testy nejčastěji stanovuje koncentrace glukózy a to jak na lůžkových odděleních, tak v domácí péči. Ve specializovaných ambulancích se pomocí rychlých testů stanovuje např. protrombinový čas (PT), C – reaktivní protein (CRP) nebo lipidové parametry (celkový cholesterol, HDL cholesterol).

Na testovací proužky se do vyznačeného políčka nanáší kapka kapilární krve odebrané z konečků prstu (někdy lze použít i krev venózní nebo sérum či plazmu) a vyhodnocení testů (stanovení koncentrace) se provádí reflexními fotometry nebo amperometry (na rozdíl od vizuálního hodnocení při vyšetření moči). Testovací proužky se do měřících přístrojů vkládají ještě před nanesením krve, důležitá je **kontrola čísla testovacího proužku s číslem proužku použitého pro kalibraci přístroje**.

Reflexní fotometry se používají pro kvantitativní vyhodnocení reakcí probíhajících na pevné fázi (proužku) se suchými činidly po jejich aktivaci vodou obsaženou v měřeném vzorku. Matricí pro suchá reagenční činidla může být vícevrstvý film nebo impregnovaná vlákna. Proužky z impregnovaných vláken umožňují vyšetřovat celou řadu analytů z plné krve. Princip reflexní fotometrie spočívá ve vyhodnocení odraženého záření od homogenně zbarvené podložky.

Pro vyhodnocení elektrochemických metod založených na měření elektrického proudu mezi pracovní a registrační elektrodou se používají amperometrické měřící přístroje.

Stanovení glykémie

Na principu reflexní fotometrie pracují starší typy glukometrů, do kterých se vkládá proužek, jehož reakční zóna obsahuje enzym glukózaoxidázu, která katalyzuje oxidaci glukózy na glukonát a peroxid vodíku. Ten redukuje chromogen za vzniku barevného produktu, který se detekuje reflexní fotometrií. Nevýhodou této metody je možnost ovlivnění výsledku vnějším světelným zdrojem, dlouhá doba měření a potřeba časté kalibrace glukometru.

Novější typy glukometrů pracují na principu měření elektrického proudu, jehož velikost odpovídá výsledné glykémii. Vyšetřovaná krev se na proužek nenanáší, ale je do něj nasávána úzkou kapilárou. Chemickou reakcí opět vzniká z glukózy peroxid vodíku, který je tentokrát rozkládán na ionty, které vedou elektrický proud, a ten je glukometrem změřen.

Koagulační vyšetření - stanovení PT (Quik, INR - mezinárodní normalizovaný poměr)

Podobně jako stanovení glykémie lze koagulační test provádět pomocí přenosných fotometrů nebo na amperometrických měřících přístrojích. Testovací proužek obsahuje tromboplastin, který po nanesení vzorku aktivuje koagulaci, což vede k tvorbě trombinu a v případě amperometrie k zastavení času (při vytvoření fibrinového vlákna proběhne elektrický impuls mezi elektrodami a zastaví se čas).

Fotometrické koagulometry měří absorbanci (zákal) způsobený přítomností fibrinových vláken. Fotometrické stanovení je nevhodné u hemolytických, lipemických nebo ikterických vzorků.

Stanovení C-reaktivního proteinu

Koncentrace CRP se stanovuje imunofiltrací metodou s fotometrickou detekcí. Princip metody je popsán výše u stanovení albuminu, rozdíl je pouze v navázané protilátce – zde se jedná o protilátku proti CRP.

10.2 Prenatální diagnostika

Po laboratorním potvrzení těhotenství se provádí základní stanovení biochemických parametrů v krvi a moči těhotné pro posouzení jejího zdravotního stavu a případnou diagnostiku komplikujících onemocnění (gestační diabetes, neuropatie, hepatopatie). Při hodnocení laboratorních výsledků je nutno mít na paměti, že u celé řady analytů dochází

k fyziologickým změnám referenčního rozmezí (např. zvýšení koncentrace ceruloplazminu, $\alpha 1$ – antitrypsinu, cholesterolu a TAG; proteinurie).

Další vyšetření v těhotenství neboli **prenatální diagnostika a screening**, představuje soubor vyšetření a testů prováděných za účelem odhalení patologických stavů u dosud nenarozeného jedince, především stanovení míry rizika pro přítomnost vrozených vývojových vad (VVV) plodu (např. Downova syndromu - trisomie 21. chromosomu, Edwardsova syndromu - trisomie 18. chromosomu). Celá řada těchto vyšetření je prováděna rutinně a během těhotenství mohou být doporučena a doplněna i další. Mimo analytů vyšetřovaných v laboratořích klinické biochemie se v prenatální diagnostice významně uplatňují také zobrazovací metody a klinická genetika. Metodické přístupy jsou **invazivní** (např. odběr plodové vody – **amniocentéza**, odběr pupečnickové krve plodu v děloze – **kordocentéza**, odběr fetálních buněk - **biopsie choria**) i **neinvazivní** (např. ultrazvuk, biochemické vyšetření krve).

Ultrazvukové vyšetření (UZ) představuje citlivou zobrazovací metodu, kterou je možné hodnocením morfologických znaků diagnostikovat některé viditelné vrozené vývojové vady (defekty neurální trubice: např.: anencefalii – nedokončený vývoj mozku a lebky, spinu bifidu - otevřený rozštěp páteře) nebo např. přesně stanovit velikost, stáří a počet plodů, uložení placenty, množství plodové vody.

Pod UZ kontrolou se provádějí také invazivní vyšetření, která jsou doporučována při pozitivním neinvazivním screeningu. Invazivní metody slouží k odběru biologického materiálu (vzorku tkáně plodu), který je dále vyšetřován v laboratořích molekulární biologie a genetiky s cílem vyloučit či potvrdit chromozomální aberace nebo geneticky podmíněné choroby.

Dřívější schéma genetického screeningu VVV bylo rozděleno na:

I. trimestrální genetický screening - stanovení volné β podjednotky hCG, plazmatického proteinu A spojeného s těhotenstvím (PAPP-A) v 9.–11. týdnu a ultrazvukové měření šíjového projasnění (nuchální translucence - NT) mezi 11.–14. týdnem těhotenství)

II. trimestrální genetický screening – provedení tzv. **Tripple testu**, který zahrnoval stanovení alfa – fetoproteinu (AFP), volné β podjednotky hCG a nekonjugovaného estriolu (uE3), obvykle v 16. týdnu těhotenství.

Před triple testy, které často dávaly falešně pozitivní výsledek, je dnes preferovaný **kombinovaný screening** mezi 10.–14. týdnem těhotenství, který kombinuje biochemické vyšetření krve matky (10.–11. týden - PAPP-A, β hCG) a cílené UZ vyšetření plodu (11.–14. týden - UZ měření NT a vyšetření přítomnosti nosní kůstky). Posun diagnostiky většiny VVV na konec prvního trimestru umožnilo výrazné zlepšením rozlišovacích možností ultrazvukových přístrojů a přesnější objasnění závislosti hladin stanovovaných biochemických parametrů a výsledků UZ vyšetření. **Krev odebranou na stanovení β hCG je nutné co nejrychleji a v chladu doručit do laboratoře**, protože při delším stání při laboratorní teplotě dochází k disociaci hCG na volné podjednotky a tudíž ke změně jejich koncentrací!

Ve druhém trimestru se u pacientek s negativním kombinovaným testem provádí biochemický screening, který zahrnuje stanovení β hCG a AFP pro posouzení rizika VVV (pozitivní výsledek podobně jako u kombinovaného screeningu vede k doporučení invazivního vyšetření) a screening hemolytického onemocnění novorozence (ve 28. týdnu vyšetřením Rh protilátek). Dále se mezi 18.–23. týdnem těhotenství provádí druhé UZ

vyšetření, tzv. **orgánový ultrazvuk**, který je zaměřen na hodnocení vývoje jednotlivých orgánů (srdce, mozku, ledvin, žaludku, končetin).

Pro **výpočet rizika VVV** je velmi důležité hodnotit výsledky screeningových vyšetření v závislosti **věku matky** a na přesném stanovení **stáří plodu**!

Ve třetím trimestru se může provést test na určení zralosti plic plodu (nedonošení novorozenci především diabetických matek bývají postiženi syndromem dechové tísně novorozence), stanovením poměru fosfatidylcholin : sfingomyelin v plodové vodě.

Během těhotenství je dále důležité monitorování glykémie a případné provádění oGTT na potvrzení nebo vyloučení gestačního diabetu.

10.3 Vyšetření funkce ledvin

Základní funkcí ledvin je vylučovat odpadní (nepotřebné a toxické) látky z organismu, zadržovat živiny a udržovat stabilitu vnitřního prostředí (hladiny minerálů – elektrolytů a pH). Vylučování odpadních látek ledviny zajišťují tvorbou moči, její složení se mění podle potřeb organismu. Základní funkční jednotkou ledvin je nefron. Tvorba moči začíná v glomerulu - filtrační část nefronu, kde vzniká primární moč, která se podobá plazmě, ale neobsahuje bílkoviny (jen amylázu, hemoglobin). Glomerulární filtrát se vstřebává v tubulech (vstřebávají se všechny látky pro organismus důležité - glukóza, aminokyseliny, minerály) a vzniká definitivní moč. Poruchy funkce ledvin mohou být primárně způsobeny postižením glomerulů (**exkreční funkce**) nebo tubulů (**retenční funkce**), později většinou dochází k postižení celého nefronu. Při selhání funkce ledvin se v moči objevují látky, které do ní nepatří nebo se normální součástí moči objevují ve zvýšených koncentracích; v plazmě může docházet ke zvýšení koncentrací odpadních (toxických) látek. Mezi základní vyšetření funkce ledvin patří posouzení jejich exkreční schopnosti, která může být zjištěna na základě stanovení **ledvinové clearance**, která je definovaná jako objem krve, který je očištěn od určité látky za časovou jednotku. Mírou glomerulární filtrace je hodnota ledvinové clearance látek, které se v tubulech nevstřebávají a do moči se dostávají pouze glomerulární filtrací, proto je jejich koncentrace stejná jak v definitivní, tak i v primární moči a plazmě – jsou to tzv. **látky bezprahové**.

Poruchy funkce ledvin můžeme rozdělit na:

- renální insuficienci (ledvinovou nedostatečnost), při které jsou ledviny schopny udržet stabilitu vnitřního prostředí jen při dodržení určitých omezení (snížený příjem bílkovin, minerálů, tekutin)

- selhání ledvin, při kterém již ledviny nejsou schopny udržet stabilitu vnitřního prostředí ani za dodržení všech omezení a výrazně se zhoršují biochemické parametry.

Selhání ledvin, které je doprovázeno typickými klinickými příznaky (např. zvracení nalačno, průjemy, anémie) se označuje jako **urémie** a dochází při ní k intoxikaci organismu látkami, které jsou normálně ledvinami vylučovány (např. kreatinin, močovina).

Vyšetření funkce ledvin zahrnuje stanovení – **kreatininu** (bezprahová látka), **močoviny**, **kyseliny močové** a **clearance kreatininu**. Jsou to pro organismus toxické látky, které se v tubulech vstřebávají jen velmi málo a přecházejí do definitivní moči; jejich koncentrace v moči je proto za fyziologických podmínek podstatně vyšší než v plazmě a organismus se jejich vylučováním zbavuje toxických metabolitů - močovina je produktem metabolismu bílkovin, kreatinin je produktem svalové činnosti a kyselina močová je produktem metabolismu purinů. **Koncentraci močoviny a kreatininu stanovujeme vždy současně**,

protože pouze zvýšení obou látek v plazmě je charakteristickým ukazatelem poškození funkce ledvin. Stanovení obou analytů rovněž slouží pro kontrolu dialyzovaných pacientů. Při rozsáhlém krvácení do břišní dutiny (např.: při operacích) dochází k izolovanému zvýšení hladiny močoviny v séru – tento stav označujeme jako **extrarenální urémii**. Orientační fyziologické hodnoty a příčiny zvýšených hodnot dusíkatých nebílkovinných látek v krvi je uveden v tabulce 10.1.

Stanovení clearance kreatininu se provádí ve vzorku sbírané moči za 24 hod., důležité je přesné změření konečného objemu moči! Pro výpočet glomerulární filtrace, která odpovídá clearanci kreatininu (viz výše) je nutné stanovit rovněž koncentraci kreatininu v krvi odebrané kdykoliv během sběru moče. Hodnotu glomerulární filtrace je potřeba (především u dětí) přepočítat na skutečný povrch těla (protože je závislá na objemu tělesných orgánů) – získáme tak hodnotu korigované glomerulární filtrace.

Tabulka 10.1 Dusíkaté látky nebílkovinné povahy – fyziologické rozmezí

Analyt	Fyziologické rozmezí		Příčiny zvýšené koncentrace v krvi
	Plazma (μmol/l)	Moč (mmol/24hod)	
Močovina	2,5–8,5 mmol/l	333-583	renální: pokles funkce ledvin; prerenální: popáleniny, krvácení do GIT, stres, šok
Kreatinin	M 50–115 Ž 45-90	4,5-18	renální: pokles funkce ledvin; prerenální: poranění svalstva, popáleniny, extrémní svalová námaha
Kyselina močová	M 200-450 Ž 140-380	4,5-6	renální: pokles funkce ledvin; prerenální: nádorová proliferace, hemolytické anemie, artritida, dna