

BIOCHEMIE, HEMATOLOGIE A TRANSFUSNÍ LÉKAŘSTVÍ

RNDR. ING. PETR KELBICH, PHD.

MUDR. DAGMAR PARTLOVÁ

MUDR. JAN ŠPIČKA, MBA

ING. ADÉLA JIZEROVÁ

MGR. JANA POŠTOVÁ

ING. PAVLA BRADÁČOVÁ

UNIVERZITA J. E. PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Biochemie, hematologie a transfusní lékařství

RNDr. Ing. Petr Kelbich, Ph.D.

MUDr. Dagmar Partlová

MUDr. Jan Špička, MBA

Ing. Adéla Jizerová

Mgr. Jana Poštová

Ing. Pavla Bradáčová

Text neprošel jazykovou korekturou. Za obsahovou, jazykovou a stylistickou správnost odpovídá autor.

Neoprávněné užití tohoto díla je porušením autorských práv a může zakládat občanskoprávní, správněprávní, popř. trestněprávní odpovědnost.

© Jméno Autora, editora a recenzentů 2022

Vydavatel: Fakulta zdravotnických studií.

Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, 2022

ISBN xxxxxxxxx (online: PDF)

DOI: xxxxxxxxxx

Obsah

ÚVOD

1. Úvod do buněčné biologie	P.KELBICH	0
1.1 Buňka – základní jednotka života		0
1.2 Látkové složení živé hmoty		4
1.2.1 Biogenní prvky		4
1.2.2 Sacharidy		5
1.2.3 Lipidy		8
1.2.4 Peptidy a proteiny		10
1.2.5 Nukleové kyseliny – viz kapitola 1.3.		11
1.3 Kód života – nukleové kyseliny a proteosyntéza		12
1.3.1 Deoxyribonukleová kyselina (DNA)		13
1.4 Energetický metabolismus buňky		20
1.4.1 Enzymy		21
1.4.2 Sacharidy		23
1.4.3 Lipidy		24
2 Procesy klinicko-biochemické diagnostiky	D.PARTLOVÁ	27
2.1 Preanalytický proces mimo laboratorní		27
2.1.1 Příprava pacienta před odběrem biologického materiálu		27
2.1.2 Preanalytické vlivy před odběrem vzorku		28
2.1.3 Odběr biologického materiálu		28
2.1.4 Rozdíl mezi sérem a plazmou		31
2.1.5 Označení vzorku biologického materiálu		32
2.1.6 Transport		33
2.2 Preanalytický proces laboratorní		33
2.3 Analytický proces		34
2.4 Postanalytický proces		34
3 Analytická část vyšetření	D.PARTLOVÁ	35
3.1 Druhy metod v laboratoři KLB		36
3.1.1 Kvalitativní metody		36
3.1.2 Kvantitativní metody		36
3.1.3 Semikvantitativní metody		36
3.2 Typy metod		36
3.3 Referenční hodnoty		37
3.4 Typy laboratorního provozu		37

3.4.1	Manuální provoz	37
3.4.2	Poloautomatizovaný provoz.....	37
3.4.3	Plně automatizovaný provoz	38
3.5	Typy automatických analyzátorů:	38
3.5.1	Otevřené systémy	38
3.5.2	Uzavřené systémy	38
3.5.3	Suchá chemie	39
3.5.4	Imunochemické analyzátory	39
3.6	Režim indikace vyšetření.....	39
3.6.1	Vitální indikace, CMP (cévní mozková příhoda)	39
3.6.2	Statim	40
3.6.3	Rutina	40
3.6.4	Screeningová vyšetření.....	40
3.6.5	Point of care testing (POCT)	40
3.7	Kalibrace metody.....	40
3.7.1	Metoda kalibrační křivky	41
3.7.2	Metoda jednoho standardu	42
3.7.3	Přímý výpočet pomocí molárního absorpčního koeficientu ϵ	42
4	Kontrola analytické metody D.PARTLOVÁ	44
4.1	Podmínky spolehlivosti laboratorní metody	44
4.1.1	Správnost metody.....	44
4.1.2	Přesnost metody (reprodukovatelnost).....	44
4.1.3	Citlivost (senzitivita, detekční limit) metody	45
4.1.4	Specifita (specifičnost) metody	45
4.2	Druhy chyb v laboratorním provozu	45
4.2.1	Absolutní chyba (E)	45
4.2.2	Relativní chyba (E%)	45
4.2.3	Chyby náhodné	45
4.2.4	Chyby systematické	45
4.2.5	Jiné chyby	46
4.3	Validace metody.....	46
4.4	Standardizace metody	46
4.5	Referenční materiály	46
4.6	Kontrola kvality (kontrola jakosti, Quality control – QC).....	46
4.6.1	Analytická kontrola.....	47
4.6.2	Vnitřní (interní) kontrola kvality	47

4.6.3	Externí kontrola kvality (EKK).....	47
5	Vyšetření moče D.PARTLOVÁ	49
5.1	Základní vyšetření moče	51
5.2	Odběr moči	51
5.2.1	Jednorázový odběr moči.....	51
5.2.2	Časový sběr moči	51
5.3	Fyzikální vyšetření moče	52
5.3.1	Množství moče.....	52
5.3.2	Barva moče.....	52
5.3.3	Zákal	53
5.3.4	Zápach	53
5.3.5	pH moče	53
5.3.6	Hustota	53
5.4	Chemické vyšetření moče	54
5.4.1	Bílkovina v moči (proteinurie).....	54
5.4.2	Glukóza v moči (glykosurie).....	56
5.4.3	Ketolátky v moči (ketonurie).....	57
5.4.4	Barviva v moči (bilirubinurie, urobilinogenurie).....	57
5.4.5	Krev v moči (hematurie)	59
5.4.6	Dusitany v moči.....	60
5.5	Močový sediment	60
5.5.1	Příprava vzorku moči	60
5.5.2	Orgánové součásti močového sedimentu.....	61
5.5.3	Neorgánové součásti močového sedimentu.....	64
5.5.4	Močové kameny.....	65
6	Enzymy D.PARTLOVÁ	68
6.1	ENZYM (holoenzym) = KOENZYM (KOFAKTOR) + APOENZYM	68
6.2	Průběh enzymatické reakce	70
6.3	Katalytická aktivita	70
6.4	Faktory ovlivňující enzymatickou aktivitu	71
6.4.1	Koncentrace substrátu.....	71
6.4.2	Teplota	72
6.4.3	pH	72
6.4.4	Aktivátory.....	72
6.4.5	Inhibitory.....	73
6.5	Klasifikace enzymů	74

6.5.1	OXIDOREDUKTÁZY	74
6.5.2	TRANSFERÁZY	74
6.5.3	HYDROLÁZY	74
6.5.4	LYASY	74
6.5.5	IZOMERÁZY	74
6.5.6	LIGASY	75
7	Lipidy a lipoproteiny D.PARTLOVÁ	84
7.1	LIPIDY A LIPOPROTEINY	84
7.2	Rozdělení lipidů	85
7.2.1	Jednoduché lipidy	85
7.2.2	Složené lipidy	85
7.3	Význam lipidů	85
7.4	Triacylglyceroly (TAG, TG)	85
7.5	Cholesterol	87
7.6	Transport lipidů	88
7.7	Rozdělení lipoproteinů	89
7.7.1	Podle hustoty na základě ultracentrifugace	89
7.7.2	Podle elektroforetické pohyblivosti	89
7.7.3	Specifickým srážením (precipitací)	89
7.7.4	Imunochemickými metodami	89
7.8	Apolipoproteiny	90
7.8.1	Apo A – I	90
7.8.2	Apo B	90
7.8.3	Apo C	90
7.8.4	Apo E	91
7.9	Lipoproteiny plazmy	92
7.9.1	Chylomikrony	93
7.9.2	VLDL	93
7.9.3	LDL	93
7.9.4	HDL	93
7.10	Poruchy metabolismu lipoproteinů (dyslipoproteinemie)	94
7.10.1	Klasifikace dyslipoproteinemií	94
7.11	Ateroskleróza	97
7.11.1	Patogeneze aterosklerózy	98
7.11.2	Indexy rizika aterosogeneze	99
8	Acidobazická rovnováha a metabolismus kyslíku D.PARTLOVÁ	100

8.1	Nárazníkové roztoky= pufrý= pufracní roztoky= tlumivé roztoky	101
8.2	Nárazníkové roztoky organismu	102
8.2.1	Hydrogenuhlíčanový nárazníkový systém	102
8.2.2	Hemoglobinový nárazníkový systém	105
8.2.3	Proteinový nárazníkový systém	106
8.2.4	Fosforečnanový nárazníkový systém	106
8.3	Funkce ledvin v udržování acidobazické rovnováhy.....	106
8.4	Odběr krve pro vyšetřování ABR, transport a skladování vzorků.....	107
8.5	Měření parametrů ABR.....	107
8.5.1	Měření pH	107
8.5.2	Měření pCO ₂	108
8.5.3	Měření pO ₂	109
8.6	Acidobazický analyzátor.....	110
8.7	Poruchy ABR.....	110
-	Metabolická acidóza (Mac) je způsobena nadměrnou tvorbou kyselých iontů, nebo ztrátou hydrogenuhlíčanů	110
8.7.1	Metabolická alkalóza (MAI).....	111
8.7.2	Respirační acidóza (RAc).....	111
8.7.3	Respirační alkalóza (RAI)	112
8.8	Způsoby kompenzace poruch ABR.....	112
8.8.1	Metabolické poruchy jsou kompenzovány činností plic	112
8.8.2	Respirační poruchy jsou kompenzovány činností ledvin, které tvoří podle potřeby kyselou nebo zásaditou moč vylučováním nebo zadržováním kyselin či bází	112
9	Bílkoviny D.PARTLOVÁ.....	113
9.1	ÚVOD.....	113
9.2	Hlavní funkce bílkovin krevní plazmy.....	114
9.3	Vyšetření plazmatických bílkovin	114
9.3.1	Celková bílkovina (CB)	114
9.3.2	Albumin (Alb).....	116
9.4	Elektroforéza bílkovin	117
9.4.1	pohyblivost bílkovin je ovlivňována:	117
9.4.2	velikost elektrického náboje bílkovin	117
9.4.3	pufr	118
9.4.4	nosiče.....	118
9.4.5	Provedení elektroforézy	119
9.4.6	Hodnocení elektroforeogramu.....	119

9.4.7	denzitometrické vyhodnocení	120
9.4.8	vyhodnocování elektroforeogramu pomocí PC programu	120
9.4.9	vizuální hodnocení – využívá se hlavně u elektroforeogramů, ve kterých jsou přítomné atypické frakce, např. paraproteiny	121
9.4.10	Poměrné zastoupení frakcí u elektroforézy bílkovin	121
9.5	Některé typy patologických elektroforeogramů	121
9.5.1	Akutní zánět	121
9.5.2	Chronický zánět	121
9.5.3	Chronická hepatopatie	122
9.5.4	Monoklonální hyperimmunoglobulinémie	122
9.6	Elektroforéza bílkovin v moči	122
9.7	Specifické bílkoviny	123
9.7.1	albumin	123
–	představuje přibližně 60 % z celkové bílkoviny séra	123
9.7.2	α_1 globuliny	123
9.7.3	α_2 - globuliny	124
9.7.4	β – globuliny	125
9.7.5	γ -globuliny	126
9.8	Patologické změny imunoglobulinů (gamapatie)	126
9.8.1	Hyperimmunoglobulinémie	126
9.8.2	Hypoimmunoglobulinémie	127
10	Dusíkaté látky nebílkovinné povahy D.PARTLOVÁ	128
	Jsou to látky, které se v určitých koncentracích běžně nacházejí v organismu	128
–	jsou to látky, které se v určitých koncentracích běžně nacházejí v organismu	128
10.1	MOČOVINA (urea)	129
10.1.1	Metody stanovení močoviny	130
10.2	KREATININ	130
10.2.1	Metody stanovení kreatininu	131
10.3	Clearence kreatininu (globální clearance)	132
10.4	KYSELINA MOČOVÁ (KM, UA)	134
10.4.1	Metody stanovení kyseliny močové	135
10.5	AMINOKYSELINY (AK)	136
	FENYLKETONURIE (1 nemocné dítě na 10 000 zdravých)	137
10.5.1	Metody stanovení AK	137
10.6	AMONIAK	138
11	Instrumentální technika A.JIZEROVÁ	140

11.1	Laboratorní technika - základ	140
11.1.1	Odměrné laboratorní sklo	140
11.1.2	Pipety	141
11.1.3	Dávkovače	142
11.1.4	Laboratorní váhy	143
11.1.5	Míchačky a třepačky	143
11.1.6	Centrifugy	143
11.1.7	Teploměry a monitorování teploty	144
11.2	Optické metody	145
11.2.1	Spektrofotometrie	145
11.2.2	Turbidimetrie	147
11.2.3	Nefelometrie	148
11.2.4	Luminiscence	148
11.2.5	Vertikální spektrofotometrie	150
11.2.6	Reflexní spektrofotometrie	151
11.2.7	Plamenová emisní spektrofotometrie	152
11.2.8	Atomová absorpční spektrofotometrie	153
11.3	Elektrochemické metody	155
11.3.1	Potenciometrie	155
11.3.2	Polarografie	158
11.3.3	Coulometrie	158
11.3.4	Konduktometrie	159
11.4	Elektroforetické metody	161
11.4.1	Zónová elektroforéza	161
11.4.2	Izoelektrická fokusace	162
11.4.3	Izotachoforéza	163
11.4.4	Kapilární elektroforéza	164
11.5	Fyzikální metody	165
11.5.1	Osmometrie	166
11.5.2	Onkometrie	167
11.6	Chromatografické metody	168
11.6.1	Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)	168
11.6.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	169
11.6.3	Plynová chromatografie	171
12	Hematologie P.BRADÁČOVÁ	174
12.1	Krev	174

12.1.1	Úvod	174
12.1.2	Funkce krve	174
12.1.3	Složení krve.....	175
1.	Plazma	175
2.	Krevní elementy tvoří 45 % z celkového objemu krve:	175
12.2	Krvetvorba	176
12.2.1	Úvod	176
12.2.2	Prenatální.....	177
12.2.3	Postnatální krvetvorba	177
12.2.4	Přestup buněk z Kostní dřeně do periferní krve	177
12.2.5	Buňky v kostní dřeni	178
12.2.6	Podpora a regulace krvetvorby	178
12.3	Erytrocyty.....	180
12.3.1	Úvod	180
12.3.2	Normoblastová vývojová řada	180
12.3.3	Megaloblastová vývojová řada	181
12.3.4	Retikulocyty	182
12.4	Hemoglobin, hemolýza, metabolismus železa	183
12.4.1	Úvod	184
12.4.2	Hemoglobin.....	184
12.4.3	Druhy hemoglobinů	184
12.4.4	Hemolýza.....	185
12.4.5	Metabolismus železa	186
12.5	Laboratorní vyšetření krevního obrazu	187
12.5.1	Úvod	187
12.5.2	Základní parametry krevního obrazu.....	188
12.5.3	Rozšířené parametry krevního obrazu.....	188
12.5.4	Princip vyšetření krevního obrazu.....	189
12.5.5	Příprava, barvení a prohlížení krevního nátěru	190
12.5.6	Hodnocení patologie erytrocytů	190
12.6	Anémie	192
12.6.1	Anémie	192
12.6.2	Rozdělení anémií.....	192
12.6.3	Anémie z poruchy tvorby erytrocytů	193
1.	Porucha tvorby hemoglobinu.....	193
<i>1.</i>	<i>Porucha tvorby hemu</i>	<i>193</i>

12.6.4	Anémie z předčasného zániku - Hemolytické anémie	195
12.6.5	Anémie z nadměrné ztráty	195
12.7	Leukocyty a trombocyty.....	196
12.7.1	Úvod	196
12.7.2	Granulocyty - Neutrofily, Eosinofily, Basofily	196
12.7.3	Granulocytová vývojová řada.....	196
12.7.4	Agranulocyty - Monocyty	197
12.7.5	Monocytová vývojová řada	198
12.7.6	Agranulocyty - Lymfocyty	198
12.7.7	Lymfocytární vývojová řada	198
12.7.8	Trombocyty	199
12.7.9	Megakaryoblastová vývojová řada	199
12.8	Akutní leukemie	200
12.8.1	Úvod	200
12.8.2	Klasifikace akutních leukemie	201
12.9	Myeloproliferativní onemocnění a myelodysplastický syndrom	203
12.9.1	Myeloproliferativní onemocnění	204
12.9.2	Myelodysplastický syndrom	205
12.10	Lymfoproliferativní onemocnění	206
12.10.1	Úvod	206
12.10.2	Non-Hodgkinské lymfomy z B-lymfocytů.....	206
1.	Chronická lymfatická leukemie B-CLL.....	206
12.10.3	Non-Hodgkinské lymfomy z T-lymfocytů.....	207
12.10.4	Hodgkinův lymfom.....	207
12.10.5	Mnohočetný myelom	207
12.11	Hemostáza	208
12.11.1	Úvod	209
	Laboratorní vyšetření hemostázy	209
12.11.2	Primární hemostáza	209
12.11.3	Koagulační faktory	210
	Koagulační kaskáda.....	211
	Vyšetřovací metody koagulace	211
12.11.4	Fibrinolýza	212
12.11.5	Přirozené inhibitory	212
12.12	Patologie hemostázy.....	213
12.12.1	Porucha primární hemostázy	213

12.12.2	Von Willebrandova choroba vWCH.....	214
12.12.3	Hemofile.....	215
12.12.4	Trombofilie.....	216
12.12.5	Diseminovaná intravaskulární koagulace	216
12.13	Imunohematologie	218
12.13.1	Skupinový systém AB0.....	218
12.13.2	Rh systém	219
12.13.3	Hemolytické onemocnění novorozence.....	220
12.14	Dárcovství krve a hematopoetických buněk.....	222
12.14.1	Dárci krve	222
12.14.2	Transplantace hematopoetických buněk.....	225

Seznam použitých ikon

Referenční seznam



Cíl kapitoly



Klíčová slova



Kontrolní otázky



Místo pro doplnění



Úvod

Přehled o předmětu.

Předmět je koncipován jako teoreticko-praktický celek, který studentům poskytne základní poznatky z mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygieny. Studenti se seznámí s nejdůležitějšími obecnými vlastnostmi mikroorganismů, základy speciální mikrobiologie, strukturou a základními funkcemi imunitního systému, primárními a sekundárními imunodeficiencemi, poruchami imunity, imunomodulací a vakcinací. Dále studenti získají podrobné znalosti o zásadách správného odběru a odesílání biologického materiálu k laboratorním vyšetřením. Seznámí se s mikrobiologickými a imunologickými vyšetřovacími metodami. Získají základní znalosti z epidemiologie, protiepidemických opatření, infekčních onemocnění a jejich prevencí. Orientačně se seznámí s platnými právními předpisy v této oblasti.

Učební cíl.

Cílem studia učebního textu je:

- Osvojit si základní odbornou terminologii v oboru mikrobiologie, imunologie a epidemiologie.
- Získat základní znalosti o původcích infekčních onemocnění.
- Seznámit se s mechanismy účinků mikrobicidních látek a vznikem rezistence.
- Poznat strukturu a funkce imunitního systému.
- Seznámit se s podstatou onemocnění imunitního systému a jeho projevy.
- Poznat způsoby imunizace.
- Seznámit se s procesy šíření infekčních onemocnění, významem a postupy protiepidemických opatření.
- Seznámit se s odběrem biologického materiálu na mikrobiologické a imunologické vyšetření.

1. Úvod do buněčné biologie

P.KELBICH

1.1 Buňka – základní jednotka života

Anotace, abstrakt

Život lze považovat za vysoce organizovaný systém vysoce organizovaných struktur živých organismů, jejichž vysoká organizovanost je udržována stálým přísunem energie. Pokud přijmeme jako podmínku života schopnost samostatného růstu a množení, pak je jeho jednotkou buňka. Tato kapitola seznamuje se základním rozdělením na buňky prokaryotické a eukaryotické a dále na buňky živočišné a rostlinné. Zároveň nabízí přehled jejich uspořádání.

Cíl kapitoly



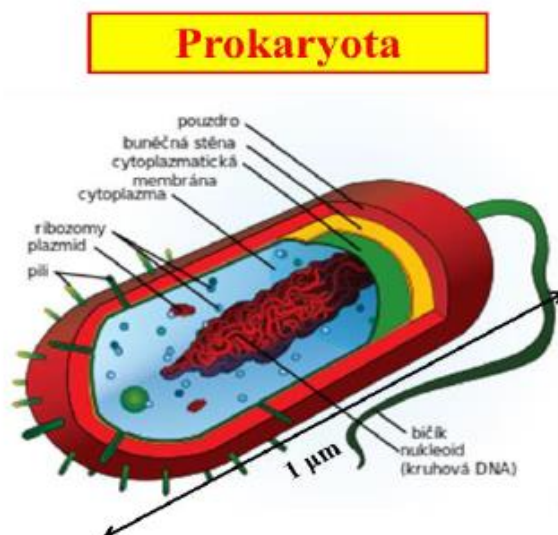
Seznámit studenty s rozdělením buněk a s jejich strukturou a uspořádáním.

Klíčová slova



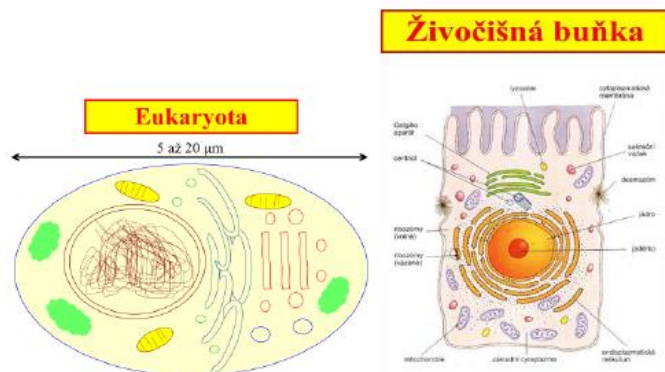
Prokaryotická buňka, eukaryotická buňka, virus, živočišná buňka, rostlinná buňka, buněčné kompartmenty, organely

Základní jednotkou života je buňka. My si buňky rozdělíme na prokaryotické a eukaryotické. Eukaryotické buňky dále na živočišné a rostlinné.



Obr.1 Prokaryota

Prokaryotické buňky náleží bakteriím a sinicím. Představují pouze jeden kompartment ohraničený vůči vnějšímu prostředí cytoplasmatickou membránou a buněčnou stěnou. Nemají jádro. Nositelem genetické informace je kruhová DNA tvořící tzv. nukleoid. Nezávisle je genetická informace obsažena též v podobě plazmidové DNA. Ta poskytuje buňce další životní výhody. Příkladem může být rezistence bakterií vůči antibiotikům. Klíčovým útvarem proteosyntézy jsou ribosomy umístěné v cytoplasmě.



Obr.2 Eukaryota, živočišná buňka

Vnitřní uspořádání **eukaryotických buněk** se vyznačuje kompartmentací a přítomností organel:

Jádro:

- Obsahuje kompletní genetickou informaci organizovanou v podobě sekvence nukleotidových basí tvořících dvoušroubovici deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Od cytoplasmy je jádro odděleno jadernou membránou.

Mitochondrie:

- Poskytují buňkám aerobních organismů (využívajících kyslík) energii. Tu získávají oxidací organického substrátu (sacharidy, lipidy, příp. proteiny) za produkce základního buněčného paliva **adenosintrifosfátu (ATP)**. Tento proces se nazývá dýchání (respirace).
- Původem jejich vzniku je endosymbiosa bakterií. Obsahují vlastní DNA a rozmnožují se dělením.

Endoplasmatické retikulum:

- Tvoří labyrint buněčných prostorů uzavřených membránou.
- Je místem vzniku většiny složek buněčné membrány i materiálů určených pro export z buňky.

Golgiho aparát:

- Představuje stohy membránových váčků, kterými přijímá a často mění molekuly vyrobené v endoplasmatickém retikulu. Ty pak směřuje mimo buňku nebo do jejích různých částí.

Lyzosomy:

- Jedná se o malé organelly, ve kterých probíhá vnitrobuněčné trávení. Uvolňují živiny z potravy.

Peroxisomy:

- Malé váčky ohraničené membránou poskytující svůj obsah reakcím odbourávajícím peroxid vodíku.

Cytosol:

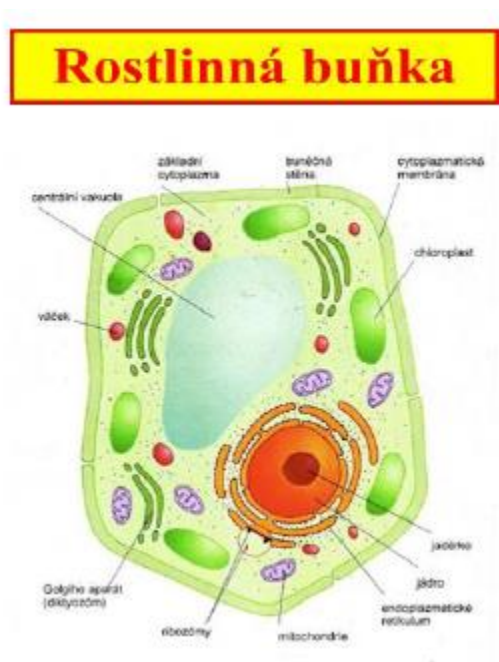
- Koncentrovaný vodný gel malých a melkých molekul.
- Místo mnoha důležitých chemických reakcí.

Ribosomy:

- Organely proteosyntézy (viz dále).

Cytoskelet:

- Je představován soustavou proteinových vláken ovládajících vnitřní uspořádání buňky i její vnější vlastnosti.
- Nejjemnější jsou aktinová vlákna.
- Nejtlustší vlákna jsou mikrotubuly.
- Přechod mezi aktinovými filamenti a mikrotubuly tvoří intermediární filamenta.

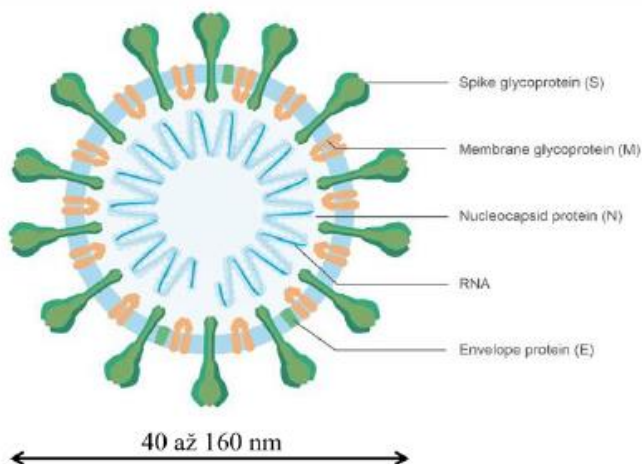


Obr.3 Rostlinná buňka

Pro rostlinné buňky jsou charakteristické přítomnost **chloroplastů** a výrazná vakuolisace. Chloroplasty ukládají energii slunečního světla do molekul organických sloučenin (fotosyntéza).

Z hlediska definice života coby schopnosti samostatného růstu a množení nelze považovat viry za živé organismy. Nedisponují totiž proteosyntetickým aparátem, který by jim umožnil tyto podmínky naplnit.

Jak je to s viry?



Obr. 4 Viry

Jsou pouze nositeli genetické informace v podobě virové deoxyribonukleové nebo ribonukleové kyseliny a jejich životní strategií je absolutní parazitismus, při kterém zcela využívají k růstu a množení hostitelskou buňku.

Kontrolní otázky



1. Uvedte základní rozdíly mezi prokaryotickými a eukaryotickými buňkami.
2. Popište stavbu rostlinné a živočišné buňky.
3. Vysvětlete, proč nelze považovat virové partikule za buňky.

Místo pro doplnění



Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu



ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem, 1998. ISBN 80-902906-0-4

ROSYPAL, S. et al. *Nový přehled biologie*. Scientia, s.r.o., Praha, 2003. ISBN 978-80-86960-23-4

1.2 Látkové složení živé hmoty

Anotace, abstrakt

Pouze několik málo základních kategorií molekul vytvořených z hrstky různých prvků stojí u zrodu celého neobyčejného bohatství tvarů a projevů živých organismů.

Cíl kapitoly



Rámcově seznámit studenty s látkovým složením živé hmoty.

Klíčová slova



Biogenní prvky, sacharidy, lipidy, peptidy, proteiny, nukleové kyseliny

1.2.1 Biogenní prvky

Biogenní prvky

Makrobiogenní prvky	Oligobiogenní prvky	Mikrobiogenní prvky
H	Zn	
O	Mn	
C	Co	
N	Se	
P	B	
S	atd.	
K ⁺		
Na ⁺		
Cl ⁻		
Mg ²⁺		
Ca ²⁺		
Fe		

Obr. 5 Biogenní prvky

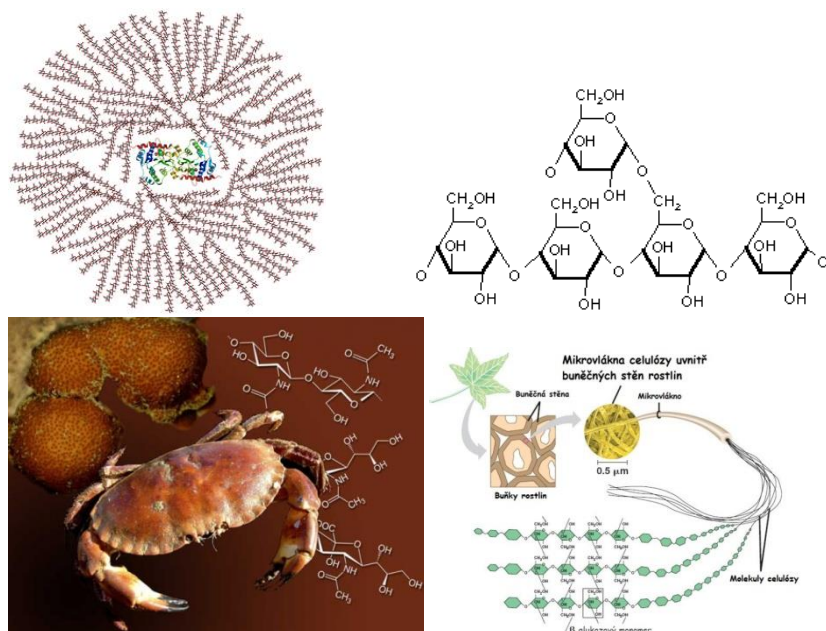
Podle obsahu v buňce se biogenní prvky dělí na makrobiogenní, oligobiogenní a mikrobiogenní. Hranice mezi nimi nejsou ostré.

Makrobiogenní prvky: Hlavními složkami buňky jsou voda a organické látky. Proto jsou nejhojnějšími prvky **H**, **O**, **C**, **N**, **P** a **S**. V cytoplasmě jsou krom fosfátových a bikarbonátových iontů přítomny též **K⁺**, **Na⁺**, **Cl⁻** a **Mg²⁺**. **Ca²⁺** jsou převážně vázány na organické sloučeniny nebo v nerozpustných solích. **Fe** je vázáno v komplexech organických sloučenin (např. hemoglobin).

Oligobiogenní prvky: Tvoří velkou a dosud neuzavřenou skupinu. Patří k nim mnohé těžké kovy. **Zn** je vázán v mnoha proteinech, často s enzymatickou aktivitou, **Co** je součástí všudypřítomného vitamínu B₁₂ atd.

1.2.2 Sacharidy

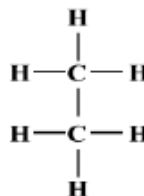
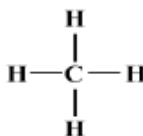
Sacharidy jsou zdrojem energie pro buňku, včetně složitého zásobního polymeru glukosy **glykogenu**. Najdeme je ale také v podobě **celulose** (polymer glukosy) ve stěnách rostlinných buněk či **chitinu** (polymer N-acetylglukosaminu) ve vnějších kostrách hmyzu a buněčných stěnách hub.



Obr. 6 Sacharidy

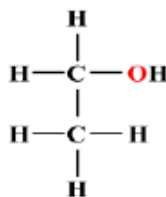
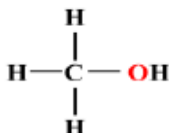
K lepšímu pochopení struktury sacharidů lze dospět seznámením se s jejich genezí:

Uhlovodíky:



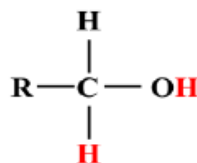
částečná oxidace

Alkoholy:



Uhlovodíky (alkany) jsou částečně oxidovány na alkoholy.

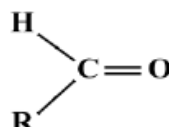
Primární alkoholy:



**dehydrogenace
(oxidace)**

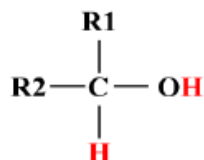
- 2H

Aldehyd (karbonyl):



Oxidací primárních alkoholů vznikají aldehydy.

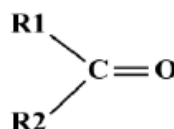
Sekundární alkoholy:



**dehydrogenace
(oxidace)**

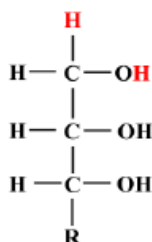
- 2H

Keton (karbonyl):

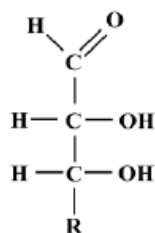


Oxidací sekundárních alkoholů vznikají ketony.

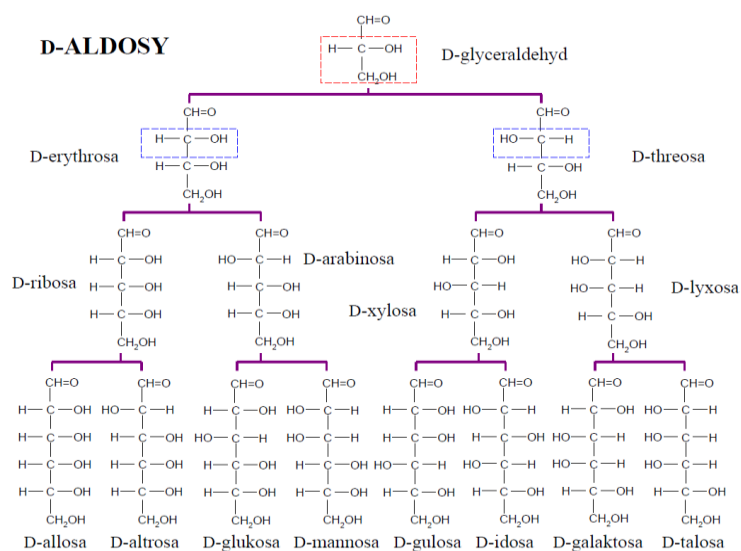
Polyalkoholy:



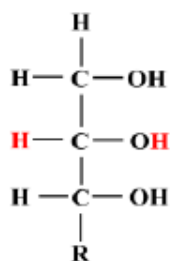
Aldosy (glyceraldehyd):



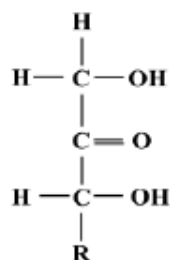
Částečná oxidace polyalkoholů vedoucí ke vzniku aldehydové skupiny dává vzniknout aldosám.



Polyalkoholy:

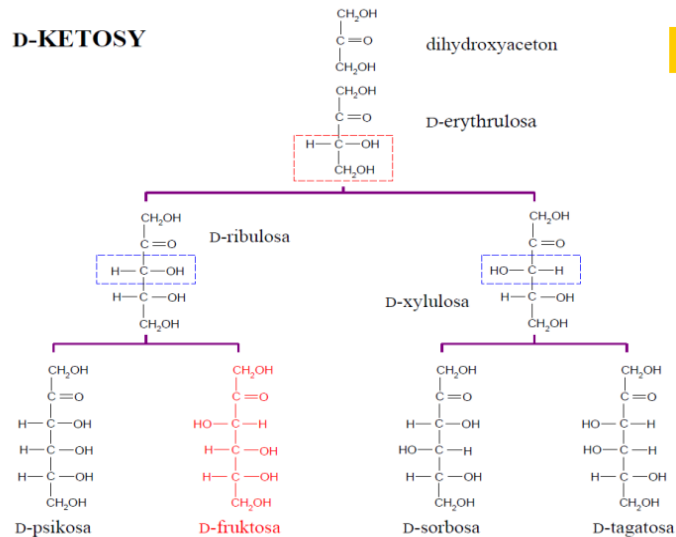


Ketosy (dihydroxyceton):



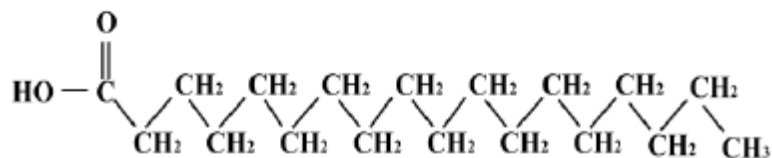
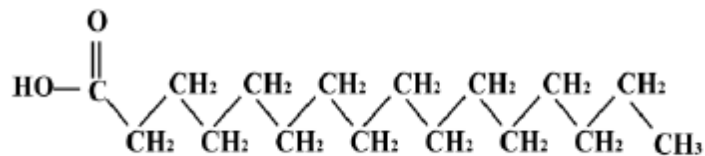
Částečná oxidace polyalkoholů vedoucí ke vzniku ketonové skupiny dává vzniknout **ketosám**.

D-KETOSY

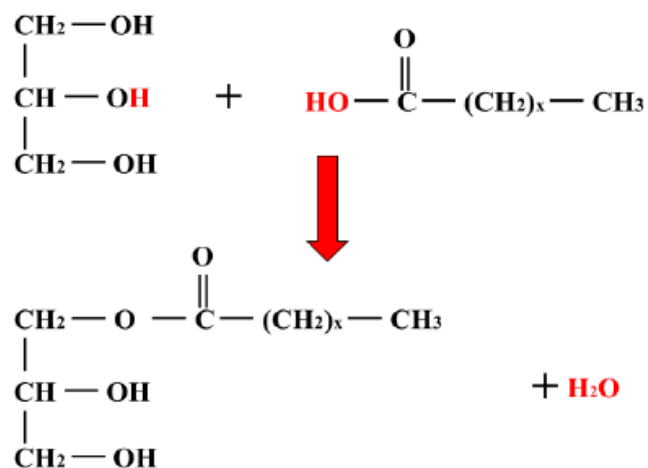


1.2.3 Lipidy

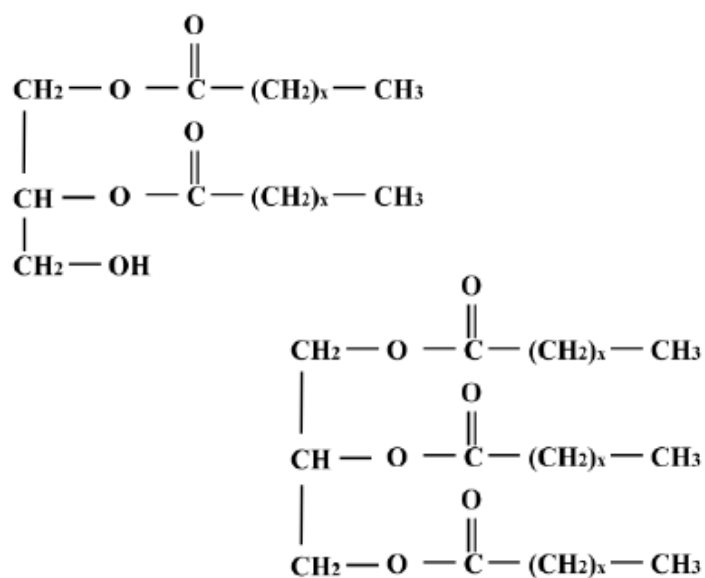
Do této skupiny látek řadíme tuky, oleje, vosky, některé vitamíny a hormony. V dalším textu se zaměříme na acylglyceroly (zejm. triacylglyceroly) a zmíníme fosfolipidy.



Na vyobrazení jsou příklady **mastných kyselin** - kyseliny palmitová a stearová.

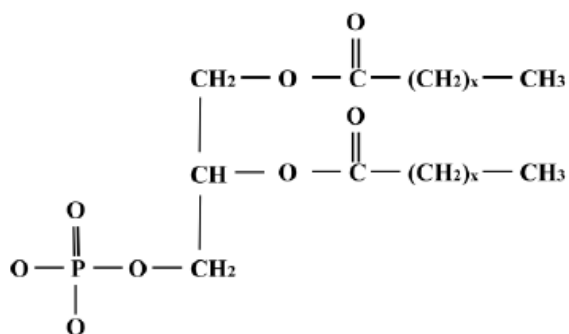


Postupnou esterifikací alkoholu glycerolu s mastnými kyselinami vznikají postupně monoacylglyceroly,

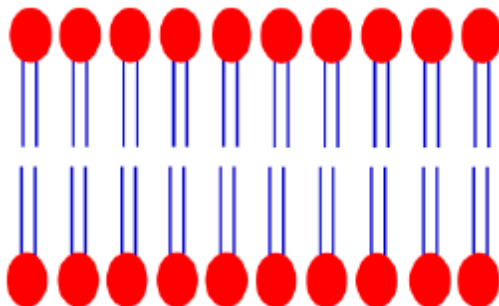


diacylglyceroly a konečně triacylglyceroly, které jsou zásobnou energií.

Fosfolipidy



Podobnou strukturu mají **fosfolipidy**, v nichž jsou dvě hydroxylové skupiny glycerolu esterifikovány mastnou kyselinou. Třetí hydroxylová skupina je vázána na zbytek kyseliny fosforečné.

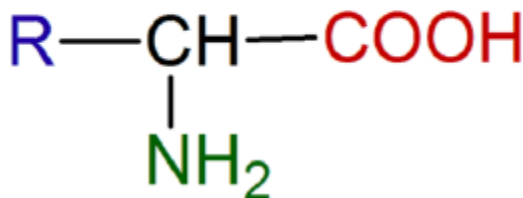


Obr. 7 Fosfolipidová dvouvrstva

V případě těchto struktur hovoříme o amfifilním charakteru, spočívajícím v současné přítomnosti hydrofilní (glycerol – červená část vyobrazení) a hydrofobní (mastné kyseliny – modrá část vyobrazení) části v rámci jedné molekuly. Dvouvrstvy fosfolipidů tvoří podstatu biologických membrán. Vně směřují hydrofilní konce, dovnitř konce hydrofobní.

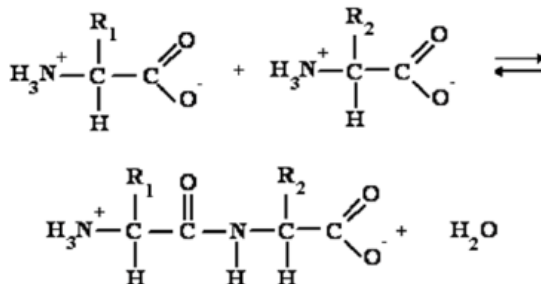
1.2.4 Peptidy a proteiny

Aminokyseliny

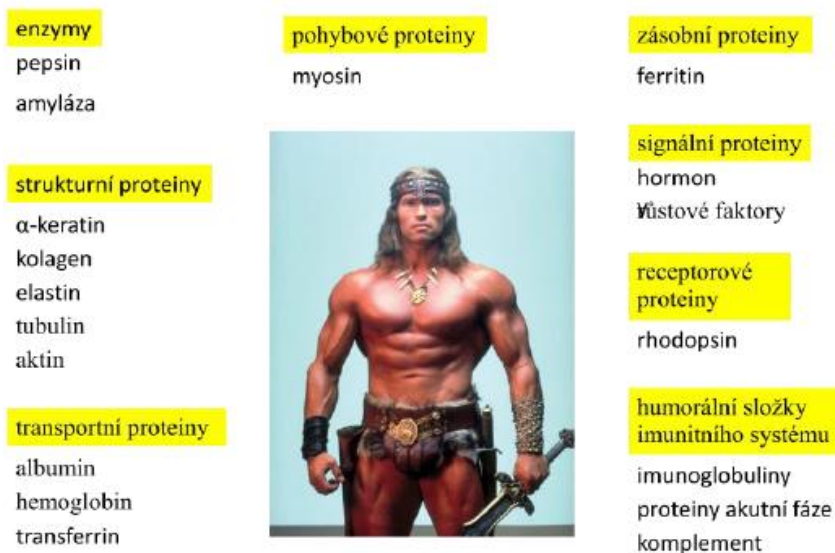


Stavebními kameny **peptidů** a **proteinů** jsou **aminokyseliny**. Obecný vzorec aminokyseliny obsahuje současně aminoskupinu a karboxylovou skupinu.

Peptidová vazba



Peptidový či proteinový řetězec vzniká při **proteosyntéze** (viz kapitola 1.3.) vytvářením peptidických vazeb mezi sousedními aminokyselinami, a to vždy kondenzací karboxylové skupiny jedné aminokyseliny s aminoskupinou aminokyseliny sousední. V případě řetězců s počtem aminokyselin do 10 hovoříme o **oligopeptidech**, pokud je počet aminokyselin v peptidu mezi 10 a 100, hovoříme o **polypeptidech**. Při vyšších počtech aminokyselin v molekule se jedná o **proteiny**.



Obr. 8 Rozmanitost proteinů v živých systémech

Alespoň náznak ohromné funkční rozmanitosti proteinů v živých systémech je patrný z tohoto obrázku.

1.2.5 Nukleové kyseliny – viz kapitola 1.3.

Kontrolní otázky



1. Uveďte příklady makrobiogenních a mikrobiogenních prvků.
2. Vysvětlete význam glykogenu.
3. Objašněte strukturu fosfolipidové membrány.
4. Vysvětlete podstatu peptidové vazby.



Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu



ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem, 1998. ISBN 80-902906-0-4

ROSYPAL, S. et al. *Nový přehled biologie*. Scientia, s.r.o., Praha, 2003. ISBN 978-80-86960-23-4

1.3 Kód života – nukleové kyseliny a proteosyntéza

Anotace, abstrakt

Struktura a veškeré funkce organismu jsou zakódovány v dvoušroubovicovém vlákně deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Ta se nachází v podobě sekvencí čtyř nukleotidových basí (adenin, guanin, cytosin a thymin) zformovaná v chromosomech v jádrech všech jaderných buněk organismu. Každá jaderná buňka organismu tak nese kompletní návod na výstavbu celého organismu. Identická DNA musí být zachována v dceřiných generacích buněk při buněčném dělení. Genetický kód uložený v DNA je pak realizován prostřednictvím překladu sekvence nukleotidových basí do sekvence aminokyselin. Tento proces se nazývá proteosyntéza a jeho produktem jsou strukturální a regulační peptidy a proteiny.

Cíl kapitoly



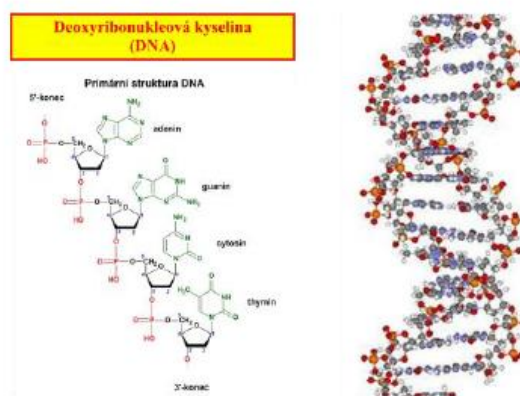
Seznámit studenty s organizací genetické informace v deoxyribonukleové kyselině (DNA), s replikací DNA předcházející buněčnému dělení a s expresí genetické informace prostřednictvím proteosyntézy.



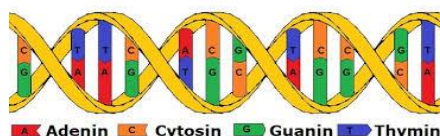
Deoxyribonukleová kyselina (DNA), replikace, transkripce, mRNA, translace, ribozomy, tRNA, proteosyntéza

1.3.1 Deoxyribonukleová kyselina (DNA)

Deoxyribonukleová kyselina (DNA)

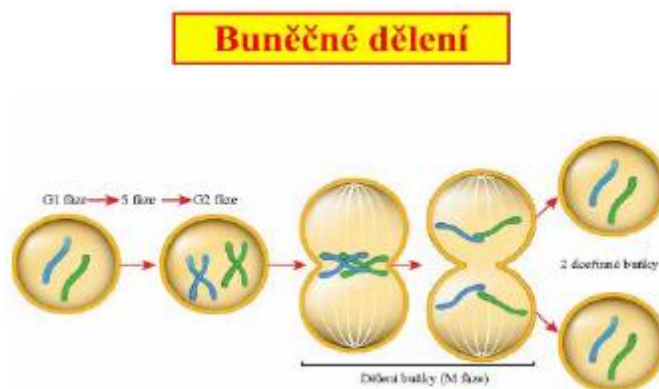


Nositelem dědičné informace prokaryotických i eukaryotických buněk je **deoxyribonukleová kyselina (DNA)**. Ta se skládá z purinových bází **adeninu (A)** a **guaninu (G)** a pyrimidinových bází **cytosinu (C)** a **thyminu (T)** navázaných na cukr deoxyribózu a spojených do řetězce prostřednictvím zbytků kyseliny fosforečné. V tomto uspořádání tvoří tzv. **nukleotidové báze**.



DNA má dvoušroubovicovou strukturu a dědičná informace v ní je uložena v sekvenci zmíněných nukleotidových bází. Báze jsou na protilehlých řetězcích řazeny komplementárně tak, že proti adeninu se vždy za normálního stavu vyskytuje thymin a proti cytosinu guanin.

1.3.1.1 Replikace DNA

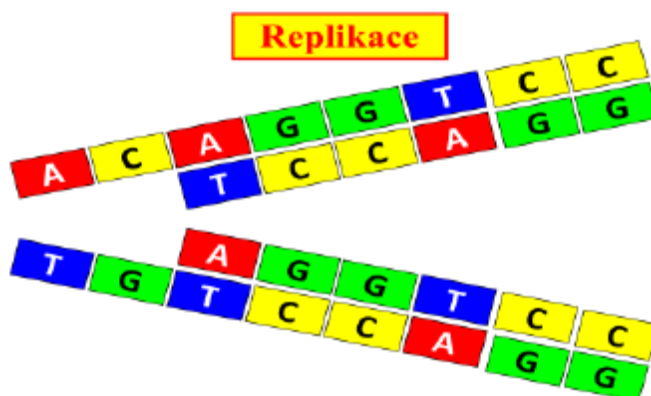


Buněčnému dělení předchází zmnožení stavebního materiálu buňky. Součástí je také zmnožení DNA, ke kterému dochází v procesu **replikace**.

Replikace

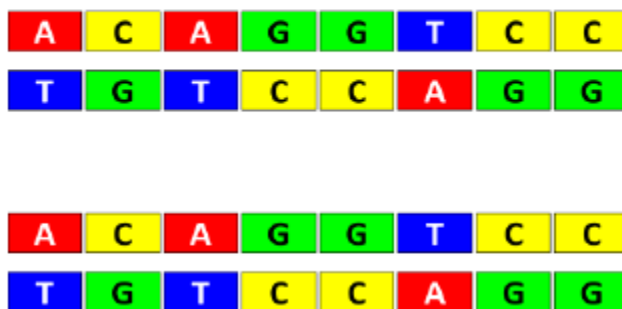


Na jeho počátku jsou dva řetězce nukleotidových basí původní DNA spojené slabými vazebnými interakcemi.



Enzymatickými procesy dojde k narušení těchto spojů, k vzájemnému oddálení obou řetězců DNA a k vytvoření tzv. **replikační vidličky**. Ke každému z původních řetězců DNA se komplementárně syntetizuje řetězec nový. Proto hovoříme o tzv. **semikonzervativní komplementární syntéze DNA**.

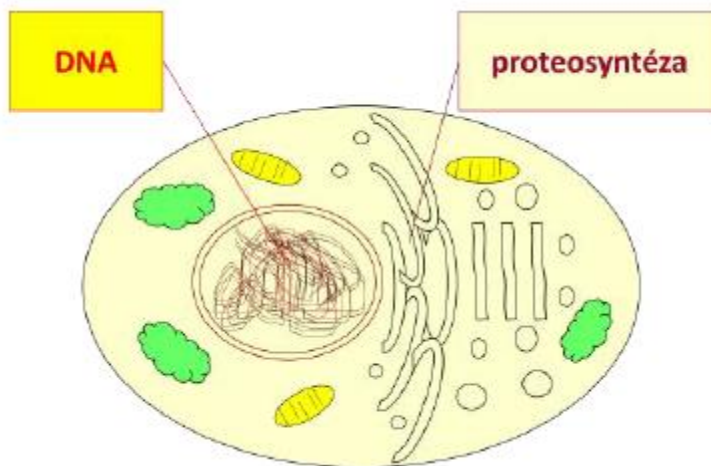
Replikace



Výsledkem jsou dvě nově vzniklé identické dvouřetězcové molekuly DNA.

1.3.1.2 Proteosyntéza

Velmi zjednodušeně můžeme konstatovat, že život stojí na proteinech. Ty tvoří základní stavební kameny živých organismů a také celou řadu různých regulačních působků (enzymů, hormonů, cytokinů atd.). O tom, jak bude organismus vypadat a jak fungovat, rozhoduje to, jaké proteiny budou syntetizovány. Proces, ve kterém se tak děje se nazývá proteosyntéza.

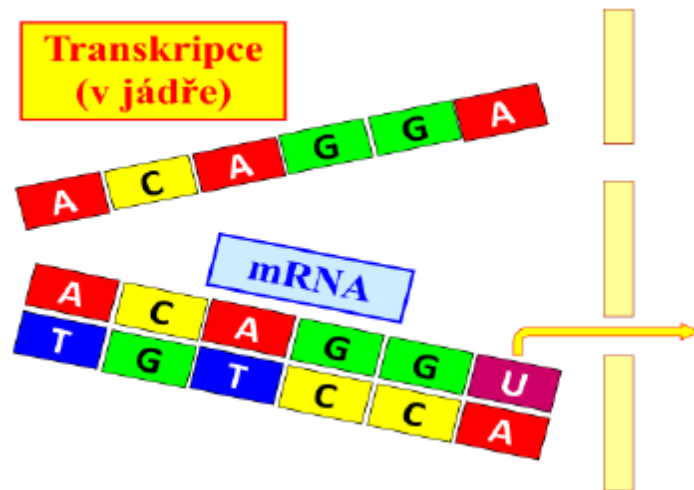


Kompletní návod na vytvoření všech potřebných proteinů pro organismus je zapsán v DNA uložené v jádře každé jaderné buňky. Jejich syntéza ale probíhá v cytoplasmě. Ta je ale vzhledem k přítomnosti jaderné membrány pro DNA nedostupná. Jak tedy dopravit informaci z jádra do cytoplasmy? Řešením je syntéza podstatně menších informačních molekul, které jsou schopné proniknout póry v jaderné membráně. Takovou sloučeninou je ribonukleová kyselina (RNA). V tomto případě tzv. messenger (poslíčková) RNA (**mRNA**). Oproti DNA se liší především tím, že je jednořetězcová a namísto thyminu obsahuje pyrimidinovou bázi uracil (U). K její produkci v jádře vede proces nazývaný transkripce (přepis).

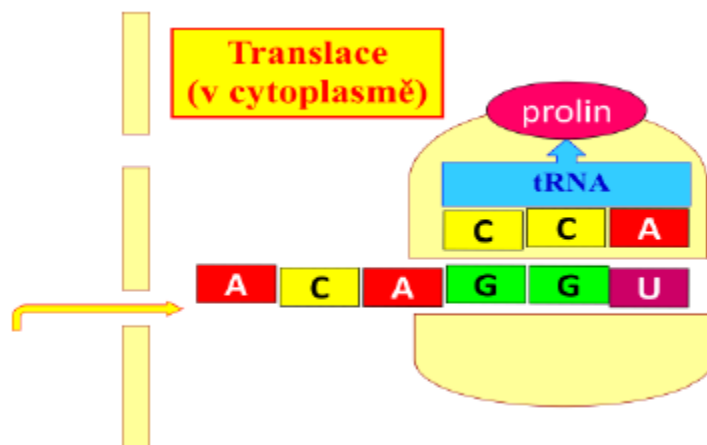
Transkripce



Transkripce je tedy přepis informace z jedné nukleové kyseliny (dvojřetězcové DNA) do jiné nukleové kyseliny (jednořetězcové RNA).

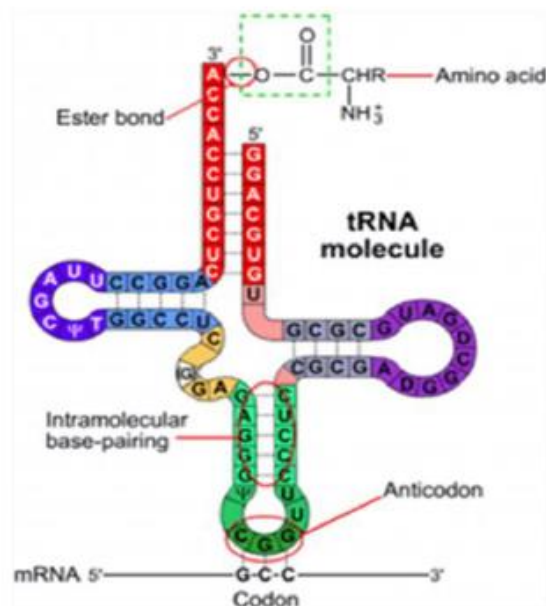


Transkripce probíhá v buněčném jádře a podobně jako v případě replikace spočívá v řazení komplementárních bází podle matrice DNA. Tzn. proti cytosinu na DNA je zařazen guanin na RNA, proti guaninu na DNA cytosin na RNA a proti thyminu na DNA adenin na RNA. Odlišnost spočívá v komplementárním zařazení uracilu do struktury RNA proti adeninu v matricové DNA.



Jednořetězcová mRNA exportuje informaci z jádra do cytoplasmy, kde na ní nasedají tzv. ribozomy, na nichž probíhá překlad (angl. translation) ze sekvence nukleotidových bází do sekvence aminokyselin tvořících primární strukturu peptidů, resp. proteinů. Tento proces se nazývá **translace**.

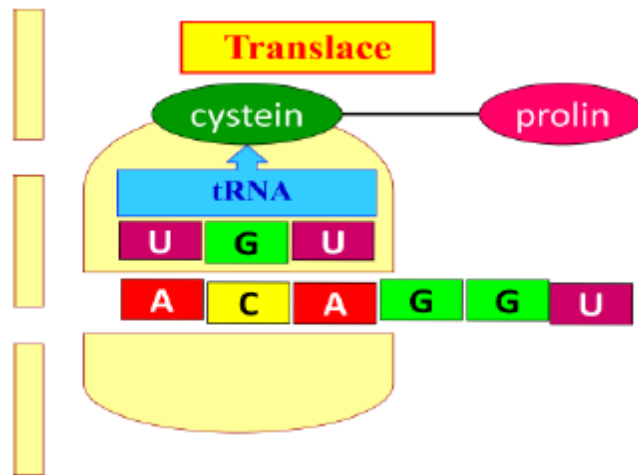
tRNA



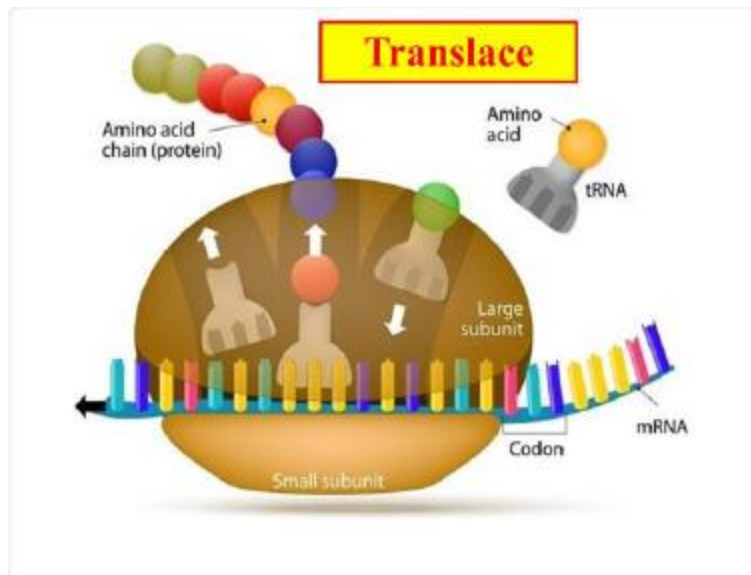
Další důležitou molekulou je **transferová ribonukleová kyselina (tRNA)**. Ta tvoří jakýsi „čtyřlístek“. My se zaměříme na dvě místa tRNA. Tím prvním je trojice nukleotidových bází na „spodním lístku“ (viz obrázek výše). Říká se mu **antikodon** a komplementárně (tzn. C proti G, a A proti U) nasedá na příslušnou trojici nukleotidových bází v řetězci mRNA označovanou jako **kodon**.

		Druhý nukleotid					
		U	C	A	G		
První nukleotid	U	UUU fenyalanin	UCU serin	UAU tyrosin	UGU cystein	U	Třetí nukleotid
		UUC fenyalanin	UCC serin	UAC tyrosin	UGC cystein	C	
		UUA leucin	UCA serin	UAA stop kodon	UGA stop kodon	A	
		UUG leucin	UCG serin	UAG stop kodon	UGG tryptofan	G	
	C	CUU leucin	CCU prolin	CAU histidin	CGU arginin	U	
		CUC leucin	CCC prolin	CAC histidin	CGC arginin	C	
		CUA leucin	CCA prolin	CAA glutamin	CGA arginin	A	
		CUG leucin	CCG prolin	CAG glutamin	CGG arginin	G	
	A	AUU isoleucin	ACU threonin	AAU asparagin	AGU serin	U	
		AUC isoleucin	ACC threonin	AAC asparagin	AGC serin	C	
		AUA isoleucin	ACA threonin	AAA lysin	AGA arginin	A	
		AUG methionin	ACG threonin	AAG lysin	AGG arginin	G	
	G	GUU valin	GCU alanin	GAU kyselina asparagová	GGU glycin	U	
		GUC valin	GCC alanin	GAC kyselina asparagová	GGC glycin	C	
		GUA valin	GCA alanin	GAA kyselina glutamová	GGA glycin	A	
		GUG valin	GCG alanin	GAG kyselina glutamová	GGG glycin	G	

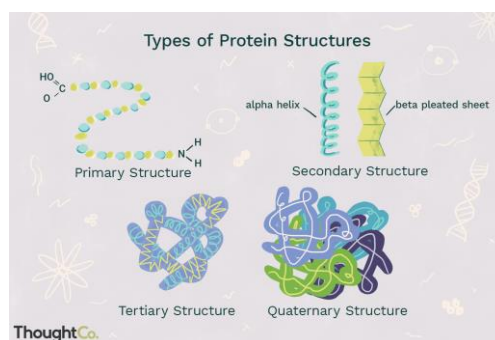
tRNA s konkrétním antikodonem nese příslušnou aminokyselinu (viz tabulka), kterou v ribozomu přidává k prodlužujícímu se řetězci aminokyselin.



Např. tRNA s antikodonem obsahujícím uracil-guanin-uracil nasedá na kodon na mRNA adenin-cytosin-adenin a řetězec aminokyselin doplňuje o aminokyselinu cystein.



Ribozom se po řetízku mRNA posouvá jako „jezdec po zipu“, napojuje další a další aminokyseliny a tím vytváří **primární strukturu proteinu**.



Primární strukturu proteinu tvoří prostá sekvence aminokyselin. Bezprostředně dochází k formování vyšších struktur, při nichž se uplatňují slabé vazebné interakce – vodíkové můstky, disulfidické můstky, van der Waalsovy interakce, iontové vazby atd. Těmi jsou **sekundární struktura** (α -šroubovice nebo β -struktura skládaného listu) a **terciární struktura**. **Kvartérní struktura** proteinu představuje společné uspořádání více peptidových či proteinových řetězců.

Kontrolní otázky



1. Vysvětlete způsob uložení genetické informace v buňkách.
2. Popište strukturu kyseliny deoxyribonukleové.
3. Vysvětlete mechanismus replikace DNA při buněčném dělení.
4. Vysvětlete pojmy transkripce a translace.
5. Popište mechanismus proteosyntézy.

Místo pro doplnění



Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu



ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem, 1998. ISBN 80-902906-0-4

ROSYPAL, S. et al. *Nový přehled biologie*. Scientia, s.r.o., Praha, 2003. ISBN 978-80-86960-23-4

1.4 Energetický metabolismus buňky

Anotace, abstrakt

K udržení vysokého stupně organizovanosti živých struktur je zapotřebí nepřetržitých dodávek značného množství energie. Spíše jako raritu lze zmínit archebakterie, které získávají energii přeměnou anorganických látek. Ostatní organismy na Zemi potřebují k pokrytí svých nároků organické sloučeniny s deponovanou energií ze Slunce. Zcela zásadním procesem pro život je fotosyntéza produkující organické látky pro výstavbu a uspokojování energetických potřeb živých organismů.

Cíl kapitoly



Seznámit studenty s podstatou fotosyntetické asimilace a způsobem získávání energie z organických látek živými organismy.

Klíčová slova



Fotosyntéza, sacharidy, lipidy, proteiny, ATP, NADPH, hoření, dýchání, aktivací energie, enzymy, metabolické dráhy

Při oxidaci organických látek (zde zastoupených glukosou) se uvolňuje energie za produkce CO_2 a H_2O .

Hoření



Dýchání



K tomu může docházet hořením nebo metabolickými procesy. Rozdíl je v množství aktivací energie použité pro iniciaci těchto procesů.



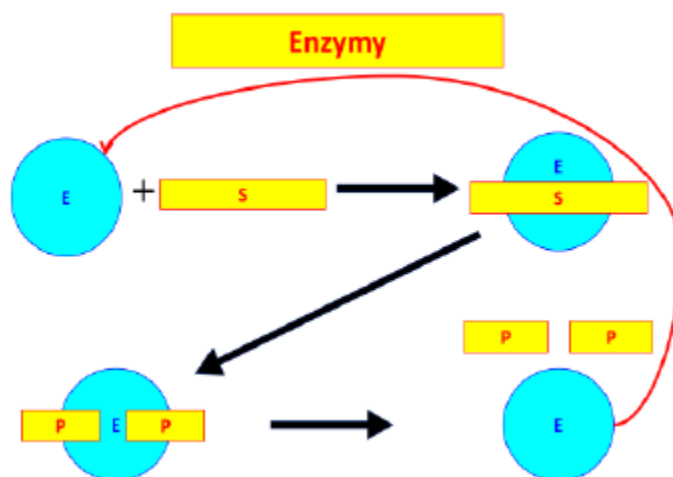
V čem to spočívá? Představme si, že se potřebujeme dostat z bodu A na jedné straně kopce do bodu B na jeho druhé straně. K tomu můžeme použít buď kratší, zato ale energeticky náročnější a krkolomnější

cestu přes kopec. Tento příměr odpovídá investování vysoké aktivační energie vedoucí k oxidaci organické látky při uvolnění tepelné energie.

Druhou možností, jak se dostat z bodu A do bodu B je sice delší, zato méně vysilující, cesta po úpatí kopce za doprovodu průvodce. Tento způsob reprezentuje postupnou metabolickou přeměnu organických látek v organismu za uvolnění energie pro jeho fungování a udržení jeho integrity. Za zmíněného průvodce můžeme považovat enzymy snižující aktivační energii příslušných reakcí.



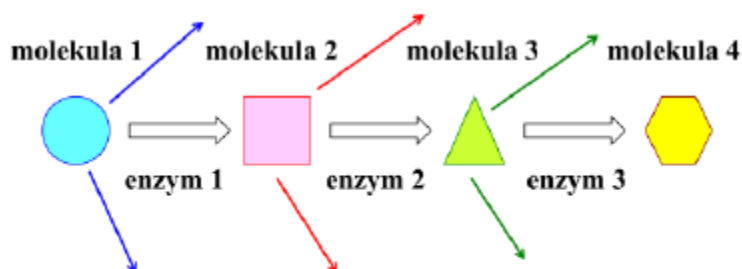
Na schématu je patrná volná energie G_1 molekuly glukosy (substrátu reakce) a volná energie G_2 produktů reakce ($CO_2 + H_2O$). Aby mohla tato reakce proběhnout, musí aktivační energii překonat $\Delta G = G_1 - G_2$. Jak již bylo uvedeno dříve, to lze realizovat pomocí dodávky vysoké aktivační energie vedoucí k uvolnění značného množství tepelné energie hořením nebo dodávkou nízké aktivační energie pro enzymatické reakce uvolňující energii ve formě vhodné pro fungování organismu a zachování jeho integrity.



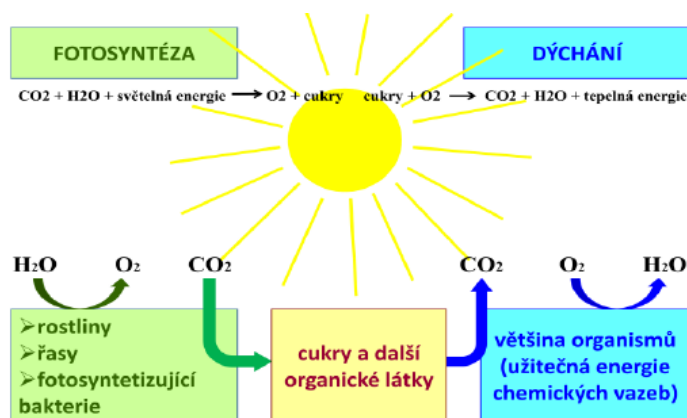
1.4.1 Enzymy

Enzymy jsou katalyzátory snižující aktivační energii metabolických reakcí. Na svém povrchu mají **aktivní místo**, na které se váže substrát a kde probíhá reakce za vzniku produktu. Po proběhnutí reakce se z komplexu produkt oddělí a enzym je připraven pro opětovnou katalýzu.

Metabolické dráhy

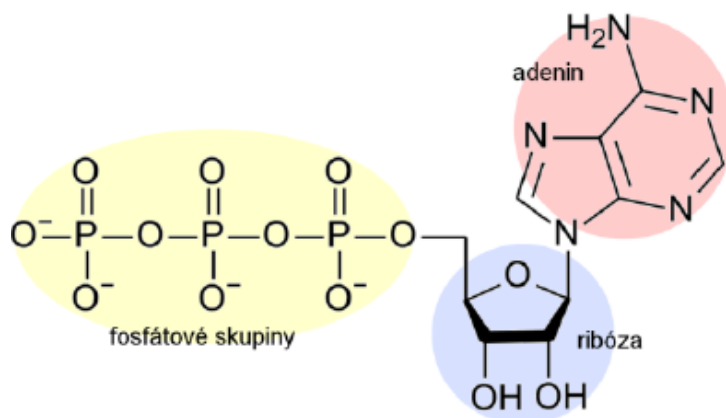


Enzymově katalyzované reakce jsou spojeny za sebou. Produkt předchozí reakce je substrátem reakce následující. Toto je princip **metabolických drah**.

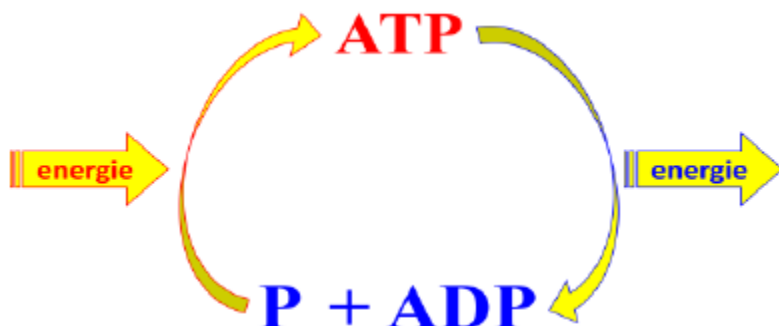


Lze konstatovat, že **fotosyntéza** je klíčovou reakcí pro většinový život na zemi. Za využití energie slunečního svitu zabudovává do struktury molekul organických sloučenin atomy uhlíku (C) z molekul oxidu uhličitého (CO₂), čímž transformuje energii světelných kvant na chemickou energii organických sloučenin. Ta je následně využívána pro energetické potřeby životních procesů.

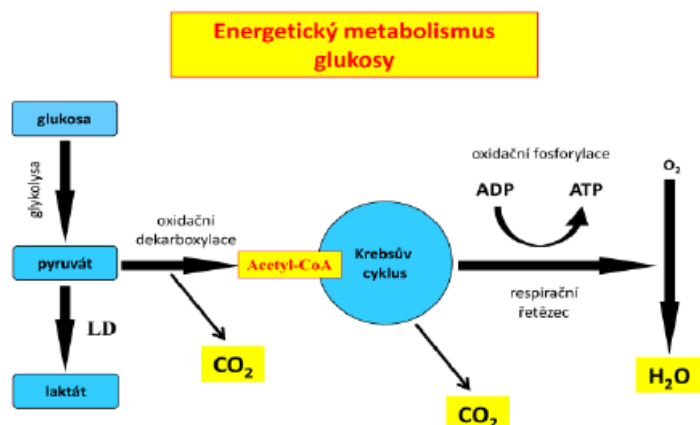
Adenosintrifosfát (ATP)



Pro metabolické procesy v buňkách nelze využít přímo energii uloženou v organických látkách, jako jsou sacharidy, lipidy, příp. proteiny. To se odehrává za pomoci prostředníka. Snad nejvýznamnějším příkladem zprostředkovatele energie pro metabolické procesy je **adenosintrifosfát (ATP)**, považovaný za univerzální buněčné palivo.



Energie obsažená v živinách se ukládá do **makroergické**, čili energeticky bohaté, vazby fosfátu v ATP. ATP se pak účastní metabolických procesů, kterým poskytuje energii uvolněnou při defosforylaci z makroergické vazby.

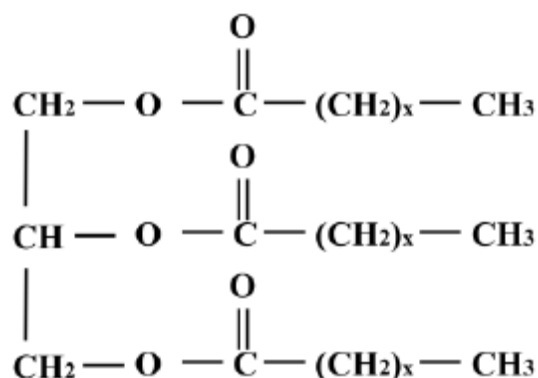


1.4.2 Sacharidy

Sacharidy patří mezi nejvýznamnější zdroje energie. Demonstrujme si jejich energetickou přeměnu na majoritním zástupci, kterým je **glukosa**. Glukosa je v procesu nazývaném **glykolýza** přeměňována na **pyruvát**. Pokud je v prostředí k dispozici dostatečné množství kyslíku (O_2), dochází k přeměně pyruvátu v procesu nazvaném **oxidační dekarboxylace** na **acetylkoenzym A (acetyl-CoA)**. Ten vstupuje do tzv. **Krebsova, neboli citrátového, cyklu**, produkujícího redukované sloučeniny pro systém oxidačně-redukční reakcí, které souhrnně nazýváme jako **respirační (dýchací) řetězec**. Poslední reakcí respiračního řetězce je redukce O_2 na vodu. Respirační řetězec je spřažen s tzv. **oxidační fosforylací** **ADP na ATP**. Přeměnou jedné molekuly glukosy se tímto způsobem získá teoreticky **38 molekul ATP**.

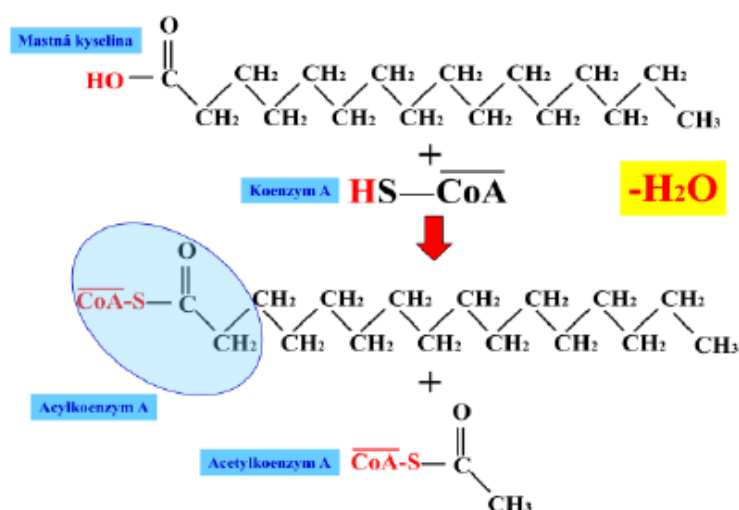
Pokud není k dispozici O_2 , či na aerobní dráze došlo k nějakému metabolickému bloku, dochází k alternativní anaerobní přeměně pyruvátu na **laktát (kyselinu mléčnou)**. Tentokrát s podstatně nižší energetickou výtěžností **2 molekul ATP** na jednu molekulu glukosy.

Energetický metabolismus triacylglycerolů

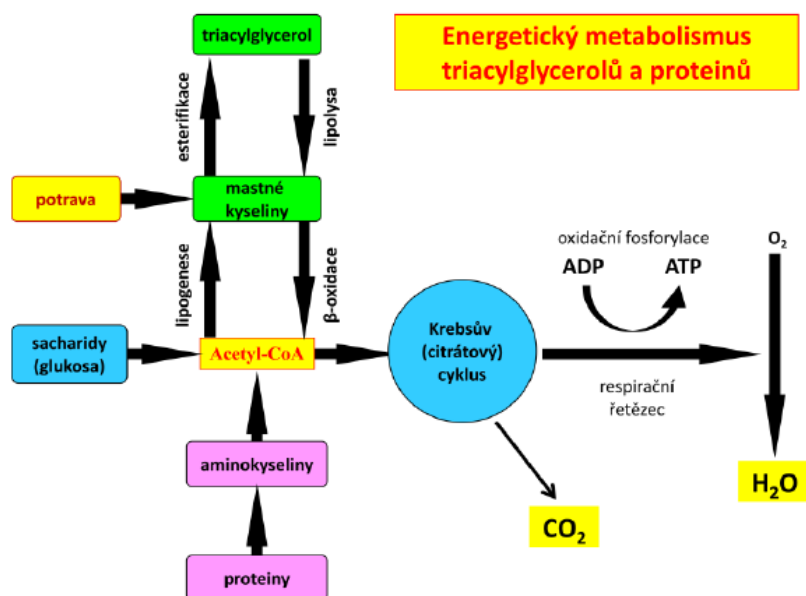


1.4.3 Lipidy

Energetickou přeměnu **lipidů (tuků)** si budeme demonstrovat na příkladu **triacylglycerolů**. Ty jsou tvořeny **glycerolem** se třemi navázanými **mastnými kyselinami**.



Lipolysa vede k oddělení mastných kyselin od glycerolu. Následně dochází v procesu nazývaném **β-oxidace** ke zkracování jejich uhlíkového řetězce za produkce **acetylkoenzymu A**.



Acetylkoenzym A vstupuje do Krebsova cyklu a následné procesy jsou identické s těmi výše popsanými při metabolické přeměně glukosy.

Stejně jako mastné kyseliny, tak také sacharidy přijímáme v podobě potravy, které se známým sledem událostí přeměňují na acetyl-CoA. V případě nadbytečného příjmu sacharidů se z acetyl-CoA v procesu nazvaném **lipogenese** syntetizují mastné kyseliny. Jejich následnou esterifikací s glycerolem vznikají zásobní triacylglyceroly.

Konečně též proteiny se prostřednictvím aminokyselin a jejich přeměny na acetyl-CoA účastní klíčových energetických procesů v buňce.

Kontrolní otázky



1. Vysvětlete mechanismus a význam fotosyntézy.
2. Vysvětlete rozdíl mezi dýcháním a hořením.
3. Vysvětlete význam ATP a NADPH.
4. Popište energetickou přeměnu glukosy.
5. Popište metabolickou přeměnu lipidů.



ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem, 1998. ISBN 80-902906-0-4

ROSYPAL, S. et al. *Nový přehled biologie*. Scientia, s.r.o., Praha, 2003. ISBN 978-80-86960-23-4

2 Procesy klinicko-biochemické diagnostiky D.PARTLOVÁ

Anotace, abstrakt

Procesem se rozumí všechny činnosti, od vzniku požadavku na biochemické(laboratorní)vyšetření až po využití laboratorní informace v diagnostice a léčbě pacienta.

Cíl kapitoly

Seznámit studenty se základními pojmy a principy nezbytnými pro úvod do klinické biochemie

Klíčová slova

Preanalytický, postanalytický, analytický proces

Tradičně se dělí na proces:

- preanalytický
- analytický
- postanalytický

2.1 Preanalytický proces mimo laboratorní

2.1.1 Příprava pacienta před odběrem biologického materiálu

Standardní postup je odběr ráno nalačno, po nočním spánku. provádí se zpravidla mezi 6. – 8. hodinou ranní

- při odběru má pacient sedět nebo ležet (nejedná-li se o ležícího pacienta, měl by alespoň 30 min. před odběrem sedět)
- pacient má být před odběrem biologického materiálu nalačno (ideální je 12 hodin), nemá jíst tučná jídla
- nemá před odběrem kouřit, pít černou kávu a alkoholické nápoje
- pokud je to možné, neměl by 24 hod. před odběrem užívat léky (mohou negativně ovlivnit výsledek analýzy)
- před odběrem má mít pacient dostatečný příjem tekutin (slabý, neslazený čaj)
- nemá dostávat infuzi nebo transfúzi
- nesmí mít přílišnou fyzickou zátěž
- pro řadu vyšetření je nutné dodržovat dostatečně dlouho před odběrem předepsanou dietu

Tělesná poloha při odběru značně ovlivňuje hodnoty makromolekulárních látek jako bílkovin, lipoproteinů a enzymů, jejichž koncentrace je při odběru vleže nižší a při odběru vestoje vyšší o 10 – 15 %.



2.1.2 Preanalytické vlivy před odběrem vzorku

- **Neovlivnitelné** - Pohlaví, rasa a věk, Cyklické variace, Gravidita
- **Ovlivnitelné** - Fyzická zátěž, Dieta, Alkohol, Kouření, Léky, Mechanické trauma, Stres, Hygiena

2.1.3 Odběr biologického materiálu

2.1.3.1 Odběr krve :

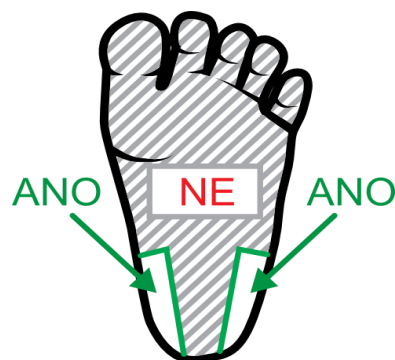
- kapilární
- venózní
- arteriální

Odběr kapilární krve

- provádí se nejčastěji u diabetiků při odběru krve pro stanovení glykémie : přidavek NAF k inhibici glykolytických enzymů a při stanovení ABR (acidobazické rovnováhy = stanovení pH krve a krevních plynů)
- běžně se kapilární odběry provádějí vpichem do posledního článku prstu, u ABR se odběr provádí i z ušního lalůčku, u novorozenců a kojenců z paty

Provedení:

- prst, patičku nebo ušní lalůček dobře promneme (prokrvení)
- příslušné místo desinfikujeme
- provedeme vpich (kopíčkem, jehlou, poloautomatickou lancetou s nastavitelnou hloubkou vpichu) z boční strany prstu (nejčastěji z prsteníku či prostředníku) nebo patičky
- první kapku otřeme (příměs tkáňového moku)
- přiložíme heparinizovanou kapiláru nebo příslušnou nádobku, do které krev natéká
- po odběru místo vpichu otřeme a přelepíme náplastí



Obr. 9 Odběr z patičky u novorozence

Odběr žilní krve

- z loketní žíly
- minimální stažení paže
- použití uzavřeného systému

Provedení:

- pacient při odběru sedí nebo leží
- kůži v okolí místa odběru (nejčastěji loketní jamka) desinfikujeme vhodným prostředkem
- desinfekci necháme volně zaschnout, stékající desinfekci otřeme čtverečkem buničiny
- paže má být natažená směrem dolů, turniket (škrtidlo) alespoň 2,5 cm široký, přiložený ve výši 10 – 15 cm nad loktem, nemá být použit déle než 1 minutu
- paží se necvičí, pacient pouze zatne pěst
- jehla se zasune do žíly
- krev je nasávána do stříkačky, nebo zkumavky pod tlakem
- po odběru se na vpich přiloží sterilní čtvereček a místo se stlačí na 2-3 minuty a přelepí náplastí



Obr.10 Venózní odběr

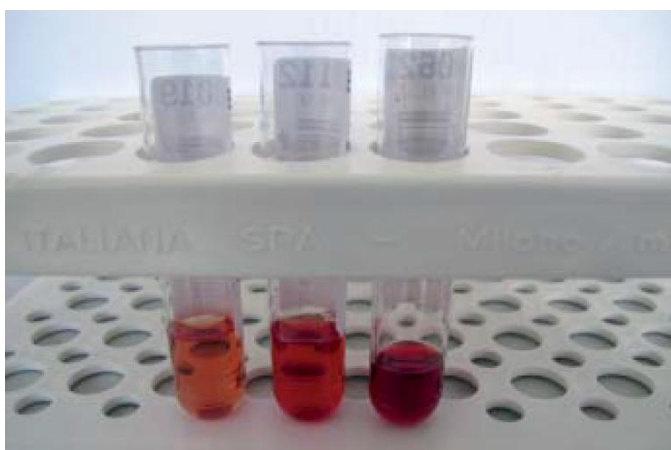
Odběr arteriální krve (punkce arterie, kanyla)

- arterializovaná kapilární krev (ABR, kyslík) – anaerobní odběr
 - o krev můžeme odebírat srážlivou a nesrážlivou
- nesrážlivá krev vzniká přidáním protisrážlivého prostředku do odběrové zkumavky
- tyto prostředky brání srážení krve tím, že váží vápenaté ionty, které jsou nutné pro přeměnu fibrinogenu na fibrin
- nejběžnější protisrážlivé přípravky jsou: heparin, citrát sodný, chelaton – Na_2EDTA , K_2EDTA
- nesrážlivou krev můžeme centrifugovat ihned po odběru
- její centrifugací získáme plazmu
- centrifugací (odstředěním) spontánně sražené krve získáme sérum
- srážlivá krev se centrifuguje 30 min. po odběru
- vzorky nelze opakovaně zmrazovat a rozmrazovat

Hemolytické sérum – má červenou barvu, obsahuje hemoglobin nebo erytrocyty

Porušení membrány erytrocytů

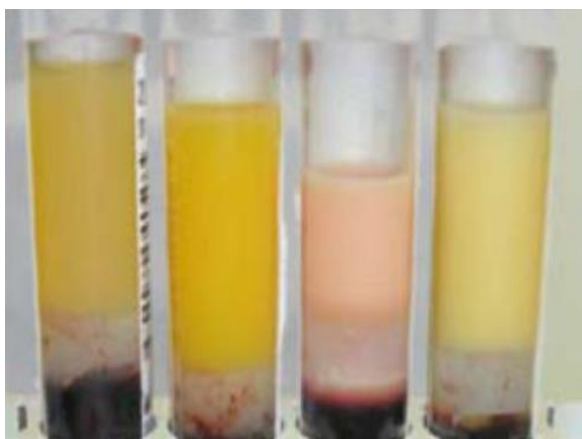
- Uvolnění hemoglobinu a dalšího obsahu z poškozených erytrocytů do plazmy/ séra a změna zabarvení vzorku
- Vliv mechanický, fyzikální, chemický
- Falešné zkreslení mnoha laboratorních vyšetření(kalium, AST,LD)



Obr. 11 Hemolytické sérum

Chylózní sérum - je zakalené, silně chylózní sérum má mléčný zákal způsobený emulgovanými tukovými kapénkami

- chylózní sérum mají pacienti s poruchami tukového metabolismu, ale chylozita může být způsobena také nedodržením odběru nalačno
- chylozita séra způsobuje jeho zákal a ten ruší většinu stanovení
 - o Může zásadně ovlivnit až znemožnit vyšetření



Obr. 12 Chylózní sérum

- Nejcitlivější vyšetření – amoniak, ALT, AST, některé léky, GGT, bilirubin...

- Může způsobit tzv. **pseudohyponatrémii** – falešně snížené koncentrace Na

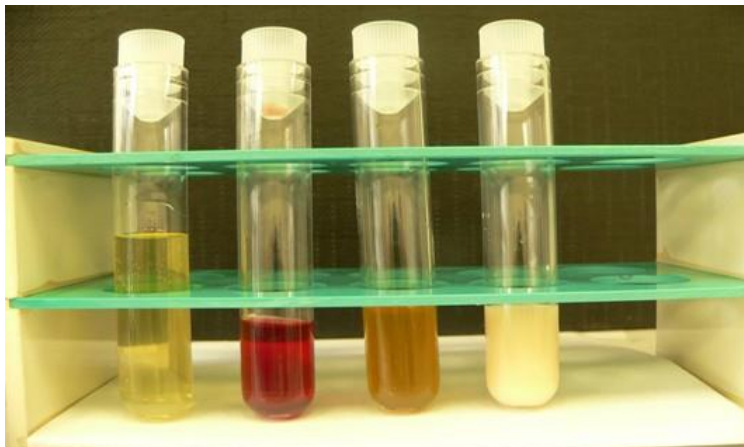
Ikterické sérum - kanárkově žluté

- způsobené hyperbilirubinemií = zvýšená hladina bilirubinu v plazmě
- kanárkově žluté zabarvení séra může rušit některá fotometrická stanovení (u metod kde je výsledkem metody žluté zabarvení)
- u některých metod je možné chybu eliminovat slepou zkouškou

2.1.4 Rozdíl mezi sérem a plazmou

2.1.4.1.1 Sérum

- vzniká tehdy, opustí-li krev krevní řečiště (cévní systém)
- plazmatická bílkovina fibrinogen se mění na fibrin (zástava krvácení)
- je-li krev odebrána do zkumavky bez protistážlivého prostředku, vzniká z plazmy sérum
- po centrifugaci takto odebrané krve se na dně zkumavky usazuje krevní koláč a nad ním je sérum
- sérum se následně odsaje do čisté, suché a označené zkumavky (slouží k vlastnímu vyšetření)
- sérum lze získat z kapilární, venózní i arteriální krve
- sérum obsahuje:
- 93% vody, bílkoviny, dusíkaté látky (močovina, kreatinin, kyselina močová, aminokyseliny), barvivo bilirubin, tukové látky (cholesterol, volné mastné kyseliny...), cukry (glukóza), velký počet enzymů, minerální látky (natrium, kalium, chloridy, , fosfor...), hormony
- obsah mnoha látek v séru nebo plazmě je jiný, nežli v erytrocytech
- sérum je za normálních okolností žluté a čiré



Obr. 13 Normální sérum, hemolytické, ikterické a chylózní sérum

2.1.4.2 Plazma

- získává se odběrem krve do zkumavky s **protisrážlivým činidlem**
- krev se nesrazí
- po centrifugaci dojde k oddělení krvinek od krevní plazmy
- plazma má stejné složení jako sérum, navíc obsahuje **fibrinogen** a ostatní **koagulační faktory** (bílkoviny působící na srážení krve)

2.1.4.3 Odběr moče

- jedná se o nejdostupnější biologický materiál
- vždy je nutné pacienta řádně poučit o správném odběru moče!!!
- pro vyšetření moče a sedimentu je nejvhodnější střední proud ranní moče, po náležité hygienické očiště
- moč se zachytí do čisté nádoby, řádně označené
- pro kvantitativní stanovení se moč sbírá po dobu určitého časového úseku
- použití konzervačních přípravků k zabránění růstu bakterií, případně ke stabilizaci stanovovaných analytů (kyselina vanilmandlová.....kys.octová)

2.1.4.4 Další odběry (mozkomíšni mok, sliny, stolice)

- odběr moku mozkomíšního: lumbální punkcí
- odběr slin: pomocí nasátí slin do porézního váčku
- odběr stolice: ve stolici se v laboratořích OKB nejčastěji vyšetřuje screeningově přítomnost krve (její přítomnost může být příznakem rakoviny tlustého střeva)
- k odběru se používají speciální firemní soupravy (odběr materiálu si obstará pacient sám podle přiloženého návodu nebo poučení)
- ve stolici se vyšetřují i některé enzymy (např. elastáza) pro vyšetření činnosti pankreatu

2.1.5 Označení vzorku biologického materiálu

- každá nádobka či zkumavka s biologickým materiálem musí být označena jménem pacienta, jeho rodným číslem a oddělením, které vyšetření požaduje
- současně s označeným biologickým materiálem se zasílá průvodka (žádanka) s vyznačenými požadavky na vyšetření a s identifikačními údaji o pacientovi. Průvodka může být tištěná nebo elektronická.

2.1.6 Transport

- přesun označeného vzorku s přiloženou žádankou do laboratoře musí být neprodlený, zvláště pokud je odesílána plná krev
- vzorek je nutné chránit před mrazem a před přehřátím (ovlivnění enzymů) i světlem (odbourávání bilirubinu, porfyrinů...)
- do vzdálenějších laboratoří je vhodnější odesílat sérum nebo plazmu (získá se po centrifugaci krve)
- v případě speciálních metod se zasílá sérum zamražené

Ve speciálních případech se vzorky přenášejí na tajícím ledu např. krev pro stanovení ABR, NH_3 (led nesmí být přímo vytažen z mrazáku, mohlo by dojít ke zmrznutí a hemolýze vzorku).

Časovou odezvou (TAT, turne around time) se rozumí doba, za kterou je k dispozici výsledek laboratorního vyšetření. Rozlišujeme TAT laboratorní (doba od příjmu vzorků do vydání výsledku) a celkový TAT (doba od odběru biologického vzorku do vydání výsledku). Někdy se uvádí i tzv. rozšířený TAT (doba od odběru do reakce ošetřujícího lékaře na dodaný výsledek laboratorního vyšetření). Pro statimová laboratorní vyšetření je stanoven TAT na 60 minut (běžná vyšetření) a na 30 minut (glykémie, ABR). Tam, kde transportní možnosti neumožňují dodržení této časové rezervy, jsou plně indikovány analyzátory „u lůžka nemocného“, tzv. POCT (Point of care testing).

2.2 Preanalytický proces laboratorní

Tento proces zahrnuje:

- příjem a identifikace biologického materiálu
- vložení identifikačních údajů pacienta do LIS – manuálně z papírové žádanky nebo automaticky při elektronické formě žádanky
- příprava analytického vzorku-centrifugace
- označení analytického vzorku čárovým kódem
- vytvoření sekundárních analytických vzorků -alíkvotů a jejich označení štítky s čárovým kódem
- roztřídění analytických vzorků pro jednotlivá cílová pracoviště laboratoře

Preanalytická laboratorní fáze končí vložení analytických vzorků do analyzátoru případně zahájením manuálně prováděné metody.

2.3 Analytický proces

Analytický proces probíhá automatizovaným manuálním provedením jednotlivých biochemických metod.

2.4 Postanalytický proces

Laboratorní postanalytický proces je časově ohraničený získáním výsledků analýzy a vydáním laboratorního nálezu.

Zahrnuje validaci výsledku analýzy v rámci interní kontroly kvality, dále kontrolu správnosti provedené analýzy s ohledem na uvedenou diagnózu, předchozí archivní data, rozdíl stanovené hodnoty proti poslední naměřené hodnotě (tzv. delta-check), porovnání s ostatními parametry, případně konzultaci laboratorního nálezu s lékařem. Laboratorní postanalytický proces končí vydáním výsledku biochemické analýzy. Analyzované analytické vzorky se skladují 72 hodin pro možnost opakování analýzy při diskrepanci laboratorního nálezu a klinického stavu.

Mimolaboratorní postanalytický proces končí účelným využitím laboratorní informace ošetřujícím lékařem v diagnostickém nebo léčebném procesu.

Lékařská kontrola zahrnuje:

- kontrolu všech laboratorních nálezů s parametry přesahujícími vložené meze
- kontrolu delta-checku
- srovnání s archivními hodnotami pacienty
- srovnání s ostatními biochemickými výsledky
- srovnání s diagnózou

Kontrolní otázky

-
1. Jaká je příprava pacienta před odběrem?
 2. Jaké jsou nejčastější typy odběrů?
 3. Popište rozdíl mezi sérum a plazmou?
-

Místo pro doplnění



Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, M., BREINEK, P. *Klinická biochemie, bakalářský obor Zdravotní laborant* 2. vydání, Brno: Coprint s.r.o., 2011. ISBN 978-80-87192-18-4

Racek, J., Rajdl, D., *Klinická biochemie 3 vydání*, Praha 5: Galén, 2021

ISBN 978-80-7492-545-0

Matouš. B., *Základy lékařské chemie a biochemie 1. vydání*, Praha 5: Galén 2010. ISBN 978-80-7262-702-8

3 Analytická část vyšetření

D.PARTLOVÁ

Anotace, abstrakt

Analytická část je velmi důležitá pro správnost vydaného výsledku laboratoří.

Cíl kapitoly

Seznámení s analytickou částí laboratorního vyšetření.

Klíčová slova

Metody, referenční materiály, kalibrace, indikace vyšetření, analyzátor, kalibrační křivka

- metody v laboratořích KLB mají své specifické znaky, které se liší od chemických laboratoří
- v laboratořích KLB se zpracovává biologický materiál a v mnoha laboratořích je nepřetržitý provoz (24 hod.)
- současným trendem je unifikace a standardizace metod (provádění laboratorních vyšetření shodným postupem alespoň v rámci jednoho státu)
- pacient totiž může procházet různými zdravotnickými zařízeními a jeho biologický materiál je vyšetřován v různých laboratořích různými metodami na nestejných přístrojích – důsledkem jsou odchylky ve výsledcích, které mohou být vysvětlovány jako klinické změny (= pacientovi se výsledky zlepšily nebo naopak zhoršily)
- k zajištění unifikace a standardizace metod je potřeba používat:

a) jednotné diagnostické soupravy, obsahující komerčně vyráběné reagensie, kalibrační a kontrolní roztoky

b) uzavřené analytické systémy - automatické analyzátory, které zamezují nežádoucím vlivům zvenčí

- všechny používané analytické metody musí být podle správné laboratorní práce (SLP) řádně dokumentovány - v podrobném popisu každé metody musí být obsažen její princip, reagensie a příprava



pracovních roztoků, pracovní postup, přístrojové vybavení, kalibrace metody, používané kontrolní vzorky, rušivé vlivy jiných látek, údaje týkající se bezpečnosti a ochrany zdraví při provádění metody

- podrobný popis každé metody, který je při stanovení nutno dodržovat je standardní operační postup (SOP)

3.1 Druhy metod v laboratoři KLB

3.1.1 Kvalitativní metody

- podávají informaci, zda je zkoumaný analyt (prokazovaná látka) ve vzorku přítomen, či nikoliv, nález je tedy buď pozitivní, nebo negativní (neudává se žádné číslo) např. průkaz glukózy v moči - výsledek *je pozitivní* (moč glukózu obsahuje), výsledek *je negativní* (moč glukózu neobsahuje)

3.1.2 Kvantitativní metody

- udávají přesnou koncentraci analytu ve vzorku, výsledkem je číslo a jednotky, ve kterých se výsledek udává (např. bílkovina v séru = 68 g/l)

3.1.3 Semikvantitativní metody

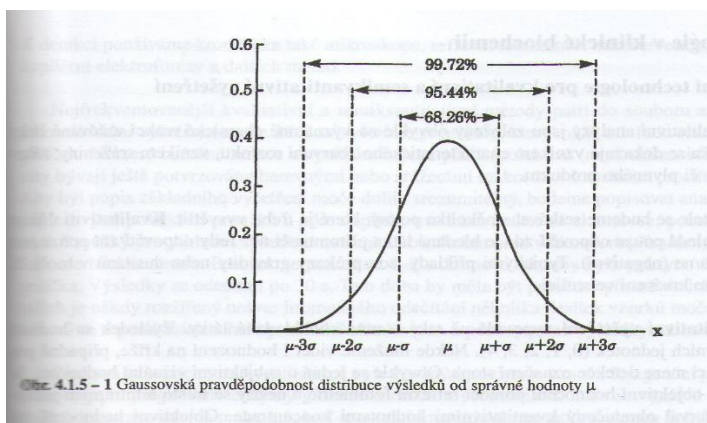
- udávají přibližnou koncentraci analytu pomocí dohodnutých jednotek (např. důkaz patologických součástí moče, jejichž přítomnost hodnotíme tzv. arbitrárními jednotkami od 0 do 4 (bílkovina v moči 3 = patologický nález)

3.2 Typy metod

- **Referenční metoda** (též standardní metoda) = základní, prostudovaný a definovaný měřicí postup, kterým se stanovují hodnoty referenčních materiálů
- **Definitivní metoda** = metoda s nejvyšším stupněm analytické spolehlivosti, slouží ke stanovení hodnot standardů a jako měřítko pravdivosti referenčních hodnot
- **Rutiní metoda** = metoda používaná v běžném provozu laboratoře, která poskytuje výsledky s přijatelnou hodnotou nejistoty (toto zajišťuje používání referenčního materiálu)

3.3 Referenční hodnoty

- dříve nazývané „normální hodnoty“ vymezují interval, ve kterém se nacházejí hodnoty 95% zdravých jedinců
- tento interval se u parametrů, které mají tzv. normální (gausovské) rozložení stanoví jako průměr 2 směrodatné odchylky
- pokud nevykazuje sledovaný parametr normální rozložení hodnot, je nutné použít tzv. neparametrickou metodu
- z hodnot získaných vyšetřením velkého souboru zdravých osob seřazených podle velikosti se „odřízne“ 2,5 % hodnot z dolního i horního konce číselné řady



3.4 Typy laboratorního provozu

3.4.1 Manuální provoz

- nevyužívá přístrojovou techniku, nebo jen velmi jednoduchou, zpracování biologického materiálu je většinou ruční
- jedná se o kvalitativní či semikvantitativní analýzy, odečítané vizuálně (pouhým okem)
např. používání *diagnostických proužků* při chemickém vyšetření moče

3.4.2 Poloautomatizovaný provoz

- při zpracování biologického materiálu jsou využívány různé přístroje, které zrychlují a usnadňují práci
- k tomuto účelu slouží různé dávkovače, dilutory (přístroje, které umí naředit vzorky či roztoky), fotometry s průtokovou kyvetou, tiskárnou, s automatickým výpočtem výsledků, jednoúčelové měřicí přístroje (plamenový fotometr, osmometr, coulometr aj.)

3.4.3 Plně automatizovaný provoz

- biologický materiál je zpracován automatem
- laborant přístroj musí uvést do provozu, zkontroluje jeho nastavení, doplní chybějící reagentie, provede kalibrace jednotlivých metod, analyzuje kontrolní vzorky, zadá naprogramuje metody, které budou ve vzorcích stanoveny a poté pouze doplňuje patientské a kontrolní vzorky, které analyzátor sám zpracuje a vydá příslušné výsledky
- automatické analyzátory vznikly kombinací *dávkočů vzorků*, *dávkočů reagentií*, *podavačů vzorků* (pipetorů) a měřící jednotky *fotometru*

3.5 Typy automatických analyzátorů:

3.5.1 Otevřené systémy

- pod tento pojem lze zařadit analyzátory, u kterých lze volně programovat jednotlivé analytické metody (takové, které chce laboratoř stanovit)
- toto umožňuje použití reagentií od různých výrobců (zohledňuje se cena, kvalita...)
- uživatel si sám programuje na základě pracovního postupu dodaného výrobcem setu (reagenční soupravy) objemy pipetovaných vzorků a reagentií, měřící vlnovou délku, dobu inkubace a měření...

3.5.2 Uzavřené systémy

- mají jednotlivé analytické metody naprogramovány přímo od výrobce a uživatel nemá možnost do těchto programů zasáhnout
- výrobce k přístroji dodává připravené lahvičky s reagentiemi, které se vloží do přístroje bez dalších úprav
- výhody tohoto systému:
- výrobce zodpovídá za celý systém – za přístroj i reagentie
- analyzátor je možné po zakoupení v krátké době uvést do provozu bez dlouhého zavádění metod
- nedochází k omylům při dolévání reagentií, protože lahvičky jsou značeny čárovým kódem a reagentie se nedolévají (prázdná lahvička se nahradí plnou)

nevýhody:

- vysoká cena reagentií (výrobce prodá přístroj za rozumnou cenu, ale laboratoř je na něm závislá v odběru reagentií a jejich cena nikdy neklesne, spíše naopak, narůstá)

- provoz analyzátoru pak finančně zatěžuje laboratoř po celou dobu, kdy je analyzátor funkční

3.5.3 Suchá chemie

- jedná se o analyzátory na principu uzavřeného systému, které k měření využívají tzv. **reflexní fotometrie**
- přístroje neměří paprsek procházející měřeným vzorkem, ale paprsek odražený
- chemikálie jsou nanесeny na pevné fólii (jako na fotografickém filmu)
- na takto upravenou fólii se nanese kapka vzorku, dojde ke zvlhčení fólie a proběhne chemická reakce
- výsledkem reakce je vznik zabarvení, jehož intenzita je úměrná koncentraci stanovené látky
- paprsek, který dopadá na vybarvenou fólii se zčásti pohltí a zčásti odrazí
- intenzita zabarvení je úměrná měřené reflexi = veličině charakterizující poměr dopadajícího a odraženého světla

3.5.4 Imunochemické analyzátory

- opět se jedná o analyzátory pracující na principu uzavřeného systému
- používají se pro stanovení antigenů (cizorodých látek v organismu) nebo protilátek (bílkovin, které se v organismu tvoří jako obrana proti antigenům)
- v obou případech vznikají imunokomplexy (komplex antigenu s protilátkou) jejichž množství se měří

3.6 Režim indikace vyšetření

3.6.1 Vitální indikace, CMP (cévní mozková příhoda)

- Indikováno pouze u pacientů v bezprostředním ohrožení života
- Výsledek vyšetření může mít vliv na přežití pacienta
- Vyšetření má v laboratoři absolutní přednost i před statimovými vyšetřeními
- Zneužití indikace může mít za následek prodloužení doby dodání ostatních skutečně urgentních výsledků !
- Nutno předem telefonicky oznámit do laboratoře, protože laborant přeruší veškerou činnost na dalších vyšetřeních a připraví se na rychlé přednostní zpracování odběru z vitální indikace

- Nejprve odeslat vzorek se žádankou do laboratoře, bezprostředně poté informovat telefonicky laboratoř

3.6.2 Statim

- Výsledek vyšetření může zásadním způsobem ovlivnit rozhodování o další péči o nemocného
- Vyšetření má v laboratoři přednost před ostatními vyšetřeními
- Zneužití indikace může mít za následek prodloužení doby dodání ostatních statimových výsledků

3.6.3 Rutina

- Běžná laboratorní vyšetření
- hematologie - doba odezvy 4 hodiny
- biochemie - výsledky jsou vydávány v den přijetí vzorku

3.6.4 Screeningová vyšetření

- jsou jednoduchá vyšetření, která se využívají k záchytu onemocnění u rizikových skupin obyvatelstva např. vyšetření stolice na okultní krvácení u lidí starších 50 let, vyšetření glykémie u pracovníků některých profesí nebo plošné vyšetření všech novorozenců na novorozenecký screening

3.6.5 Point of care testing (POCT)

- jsou metody, které se provádějí přímo u lůžka pacienta a poskytují výsledky ve velmi krátkém čase
- přístroje, potřebné pro provádění těchto metod jsou umístěny na jednotkách intenzivní péče (JIP), na anesteziologicko – resuscitačním oddělení, metabolických jednotkách aj.

3.7 Kalibrace metody

- soubor úkonů, kterými se za specifických podmínek stanoví vztah mezi hodnotami veličin, indikovanými měřícím přístrojem, měřícím systémem nebo referenčním materiálem, a odpovídajícími hodnotami, které jsou realizovány kalibrátory
- provádí se pomocí standardů

Standardy (= standardní roztoky = kalibrátory = kalibrační roztoky = kalibrační standardy)

- standardy jsou roztoky se známým obsahem stanovovaného analytu o maximální čistotě dodávané výrobcem (výrobce musí splňovat tato kritéria, výrobek je označen značkou CE)
- pomocí standardů se provádí kalibrace metody, která umožní vypočítat koncentrace analytů v neznámých vzorcích

- z naměřené absorbance měřeného vzorku a standardu lze vypočítat koncentraci měřeného analytu ve vzorku pomocí vzorce:

$$C_{vz} = \frac{A_{vz}}{A_{std}} \cdot C_{std}$$

C_{vz} = koncentrace vzorku

A_{vz} = absorbance vzorku

A_{std} = absorbance standardu

C_{std} = koncentrace standardu

- absorbance je hodnota získaná spektrofotometrickým měřením
- měřením standardů je eliminován rušivý vliv některých látek (např. bílkovin) na průběh reakce a slouží také k ověření spolehlivosti výsledků ve vyšetřované sérii vzorků (dojde-li k náhlé změně absorbancí dlouhodobě používaných standardů, upozorní nás to na chybu v analýze, popř. na prošlou expiraci standardů)
- výpočet výsledku laboratorní analýzy se provádí třemi způsoby:
 1. metodou kalibrační křivky
 2. metodou jednoho standardu
 3. přímým výpočtem pomocí molárního absorpčního koeficientu – používá se minimálně

3.7.1 Metoda kalibrační křivky

- ze základního standardu se ředěním připraví řada roztoků o vhodných koncentracích od nejnižší po nejvyšší (např. 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 mmol/l – standardů pro kalibrační křivku musí být minimálně 5 s rostoucí koncentrací, ale i více)
- roztoky se zpracují stejným postupem jako analyzované vzorky
- na základě získaných absorbancí se sestrojí kalibrační křivka, jako grafická závislost absorbance na koncentraci
- na osu x se nanášejí koncentrace
- na osu y se nanášejí absorbance
- body koncentrace a absorbance spojíme a proložíme přímkou
- kalibrační závislost nemusí mít jen tvar přímky, může mít např. tvar hyperboly...
- rozsah standardů kalibrační závislosti zahrnuje patologicky snížené, fyziologické i patologicky zvýšené koncentrace stanovovaného analytu, které přicházejí v biologickém materiálu pro danou metodu v úvahu
- vzorky, které mají naměřené absorbance tak vysoké, že se ocitnou nad posledním bodem kalibrační závislosti, je nutno analyzovat znovu, po vhodném naředění séra
- nikdy neodečítáme vzorky nad posledním bodem kalibrace!!!
- obecně platí, že pro odečtení koncentrace vzorků lze použít pouze tu část křivky, kde je závislost absorbance na koncentraci lineární

- pokud body kalibrace leží na přímce, lze vypočítat tzv. kalibrační faktor

$$F = \frac{C}{A}$$

A je průměrnou absorbancí z většího počtu standardů kalibrační závislosti (alespoň 5)

- kalibrační faktor se používá k přímému výpočtu koncentrace:

$$C = A \cdot F$$

- kalibrační faktor se stanovuje v každé sérii měření, ale i tehdy, dojde-li ke změně pracovních podmínek (činidla, přístroje...)
- pokud je kalibrační závislost v celém rozsahu nelineární, je nutné každou měřenou absorbancí odečítat z kalibrační křivky samostatně
- automatické analyzátory provádějí kalibraci automaticky – nevyhoví-li její nastavení požadovaným podmínkám, analyzátor nezahájí analýzu patientských vzorků

3.7.2 Metoda jednoho standardu

- je variantou metody kalibrační křivky
- používá se k výpočtu výsledku v rutinní biochemické laboratoři nejčastěji
- z kalibrační řady standardů se používá taková koncentrace standardu, která se nachází uprostřed referenčního rozmezí hodnot dané metody, nebo taková koncentrace standardu, která je nejbližší většině naměřených koncentrací patientských vzorků
- metoda jednoho standardu se používá u spolehlivých analytických metod, kde byla opakovaně ověřena lineární závislost absorbance na koncentraci

3.7.3 Přímý výpočet pomocí molárního absorpčního koeficientu ϵ

- používá se minimálně, např. tehdy, není-li možné připravit vhodný standard o přesné koncentraci, nebo je-li průběh analýzy natolik spolehlivý, že není pro stanovení patientských vzorků nutné provádět kalibraci
- výrobci diagnostických souprav někdy uvádějí v pracovním postupu firemní kalibrační faktor získaný pomocí tohoto přímého výpočtu (laborať si ho však musí ověřit pomocí kontrolních sér)
- absorpční koeficient ϵ je konstanta úměrnosti mezi hodnotou absorbance A, koncentrací absorbující látky C a tloušťkou optické dráhy l
- absorpční koeficient, kde je koncentrace vyjádřena v molech, se nazývá molární absorpční koeficient

$$\epsilon = \frac{A}{C \cdot l}$$

Kontrolní otázky

1. Jaké znáte typy automatických analyzátorů?
 2. Vyjmenujte režimy vyšetření
 3. Charakterizujte kalibraci metody
 4. Jaké znáte druhy metod v laboratoři a stručně je charakterizujte
-

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, M., BREINEK, P. *Klinická biochemie, bakalářský obor Zdravotní laborant* 2. vydání, Brno: Coprint s.r.o., 2011. ISBN 978-80-87192-18-4

Racek, J., Rajdl, D., *Klinická biochemie* 3 vydání, Praha 5: Galén, 2021
ISBN 978-80-7492-545-0

Matouš. B., *Základy lékařské chemie a biochemie* 1. vydání, Praha 5: Galén
2010. ISBN 978-80-7262-702-8



Anotace, abstrakt

Analytická metoda musí splňovat podmínky správnosti, přesnosti, citlivosti a specifčnosti, které jsou popsány v kapitole

Cíl kapitoly

Seznámení s kontrolou analytické metody, vysvětlení základních pojmů

Klíčová slova

Spolehlivost, přesnost, správnost, druhy chyb, validace, standardizace chyb, vnitřní kontrola kvality, externí kontrola kvality

4.1 Podmínky spolehlivosti laboratorní metody

- výsledky, získané pomocí analytických metod se mají co nejvíce přiblížit skutečné hodnotě analyzovaného vzorku
- z tohoto důvodu musí být analytická metoda spolehlivá

spolehlivá = musí splňovat podmínky správnosti, přesnosti, citlivosti a specifčnosti

4.1.1 Správnost metody

- vyjadřuje, že se stanovená hodnota analytu shoduje se skutečnou hodnotou měřeného analytu
- správnost metody ovlivňuje mnoho faktorů, které jsou příčinou tzv. systematických chyb – projevuje se to tak, že stanovené výsledky série měření jsou buď vyšší, nebo nižší, nežli je jejich skutečná hodnota (je to např. dáno způsobem pipetování jednotlivých pracovníků, dávkováním, mícháním)

4.1.2 Přesnost metody (reprodukovatelnost)

- vyjadřuje, že při opakovaných stanoveních téhož analytu v tomtéž vzorku nepřekročí rozptyl získaných výsledků stanovené meze
- udává se přesnost v sérii – jeden vzorek se analyzuje několikrát za sebou v jedné sérii spolu se vzorky pacientů
- přesnost v čase- jeden vzorek se analyzuje po dobu několika dní v sérii se vzorky pacientů (většinou měsíc)
- přesnost metody ovlivňují faktory, které jsou příčinou tzv. náhodných chyb (např. kolísající teplota ve vodní lázni, přerušení elektrického proudu...)
- pozn: podle nejnovějších údajů v Mezinárodním metrologickém slovníku je reprodukovatelnost nahrazena pojmem „mezilehlá přesnost“



- pojem reprodukovatelnost je nyní vyhrazen pouze mezilaboratorní přesnosti

4.1.3 Citlivost (senzitivita, detekční limit) metody

- je vlastnost metody, která umožňuje stanovit nízké koncentrace nebo malé změny v koncentracích

4.1.4 Specifita (specifičnost) metody

- je schopnost měřit jen stanovovaný analyt (metoda je co nejméně ovlivněna interferencemi = rušivými vlivy látek podobného složení)

4.2 Druhy chyb v laboratorním provozu

4.2.1 Absolutní chyba (E)

- Je definována jako rozdíl mezi výsledkem měření (x_i) a skutečnou (správnou) hodnotou (X)
- Může být kladnou nebo zápornou veličinou

4.2.2 Relativní chyba (E%)

- Je chyba absolutní vztahená ke skutečné (správné) hodnotě

4.2.3 Chyby náhodné

- ovlivňují přesnost metody
- jsou nepravidelné, způsobují, že se opakované výsledky měření liší
- mají objektivní charakter, četnost výsledků vykazuje normální rozložení (Gaussova křivka normálního rozložení)
- tyto chyby se vyjadřují hodnotou směrodatné odchylky(s) nebo její relativní hodnotou, vyjádřenou jako variační koeficient (CV)

4.2.4 Chyby systematické

- ovlivňují správnost metody
- mají stálý charakter a zkreslují výsledky vždy v určitém směru, takže metoda pak poskytuje výsledky soustavně vyšší nebo nižší
- mají objektivní i subjektivní charakter
- vznikají např. nedokonalou kalibrací, může to být vlivem matrice, interferujících látek
- vyjadřují se hodnotou vychýlení (bias)
- BIAS je odchylka střední hodnoty měření (průměru) od dohodnuté referenční hodnoty, často se vyjadřuje v %

- systematické chyby mohou být konstantní nebo proporcionální

4.2.5 Jiné chyby

- mohou se vyskytovat ve všech fázích laboratorní činnosti – ve fázi preanalytické, analytické i postanalytické
- bývají často administrativního charakteru – odběr do neoznačené zkumavky, nečitelné údaje na žádance, záměna při číslování zkumavek s materiálem a průvodek (vzorek dostane jiné číslo nežli průvodka), nesprávné telefonické nahlášení výsledků (přeslechnutí)...
- přístrojové
- hrubé chyby - velmi nebezpečné, většinou jsou způsobené lidským faktorem

4.3 Validace metody

- potvrzuje, že měřicí postup je schopen splnit požadavky pro analytické použití
- požadavky vycházejí z přesnosti metody, správnosti, selektivity, meze detekce, linearity, specifčnosti...

4.4 Standardizace metody

- je proces, který vede k vytvoření jednotné, odbornou veřejností přijaté metody stanovení daného analytu

4.5 Referenční materiály

- jsou „nositelem hodnot“
- jsou to látky či materiály s takovými vlastnostmi, které umožňují jejich použití pro kalibraci přístroje, validaci metody...
- těmito vlastnostmi jsou – vysoká čistota, homogenita a dostatečná spolehlivost určených hodnot

4.6 Kontrola kvality (kontrola jakosti, Quality control – QC)

- zahrnuje všechny části laboratorního provozu od odběru materiálu a jeho příjmu v laboratoři až po vydání nálezu, včetně kontroly přístrojů, reagensů, teploty vodních lázní, čistoty vody, laboratorní administrativy a bezpečnosti práce
- součástí kontroly kvality je analytická a lékařská kontrola spolehlivosti laboratorních analýz
- výsledky laboratorních metod pomáhají lékařům určit, či zpřesnit diagnózu, umožňují sledovat průběh léčby pacienta aj. a proto musí být důvěryhodné
- kontrola kvality analytické metody se provádí pomocí tzv. kontrolních sér

4.6.1 Analytická kontrola

- analytik posuzuje různé vlivy na průběh analýzy (hemolýza, lipémie...) a na základě výsledků kontrolních sér, zařazovaných denně mezi patientské vzorky zjišťuje možný výskyt systematických a náhodných chyb

4.6.2 Vnitřní (interní) kontrola kvality

Nejdůležitější součástí systému zajišťování jakosti je vnitřní (interní) kontrola kvality (VKK také IQC), která slouží k :

- dlouhodobému sledování analytických parametrů jednotlivých složek
- sledování správné kalibrace analytických metod
- rozhodnutí o schválení analytické série
- zabezpečení vysoké pravděpodobnosti rozpoznání (detekce) chyby
- zabezpečení nízké pravděpodobnosti falešného zamítnutí analytické série
- získání souboru dat, z nichž je možné odhadnout nejistoty měření
- při vyhodnocení VKK existují kontrolní pravidla, nejznámější jsou Westgardova pravidla

4.6.3 Externí kontrola kvality (EKK)

- Je součástí procesů zajišťování kvality měření, kterými jsou VKK, validace, verifikace
- **principem je provádění mezilaboratorních porovnávacích zkoušek s cílem objektivního hodnocení laboratorních výsledků organizací a získání informací o srovnatelnosti výsledků měření**
- provádí ji pověřená instituce – např. SEKK (systém externí kontroly kvality práce)
- tato instituce rozesílá všem zúčastněným laboratořím kontrolní séra
- výsledky, dosažené v jedné laboratoři pak porovnává s výsledky dosaženými ve všech ostatních laboratořích
- z tohoto srovnání pak objektivně hodnotí kvalitu prováděných analytických metod v dané laboratoři
- na základě dosažených výsledků u jednotlivých prováděných metod uděluje pověřená instituce tzv. certifikáty úspěšnosti neboli ověření o schopnosti laboratoře provádět spolehlivě dané vyšetření na základě výsledků kontrol
- certifikáty jsou udělovány na dobu určitou

Kontrolní otázky

1. Co musí splňovat analytická metoda?
 2. Vyjmenujte chyby , které se mohou objevit v laboratoři a stručně je charakterizujte
 3. Vysvětlete principy kontroly kvality v laboratoři
 4. Co je přesnost metody?
-

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, M., BREINEK, P. *Klinická biochemie, bakalářský obor Zdravotní laborant* 2. vydání, Brno: Coprint s.r.o., 2011. ISBN 978-80-87192-18-4
Racek, J., Rajdl, D., *Klinická biochemie 3 vydání*, Praha 5: Galén, 2021
ISBN 978-80-7492-545-0
Matouš. B., *Základy lékařské chemie a biochemie 1.vydání*, Praha 5: Galén
2010. ISBN 978-80-7262-702-8



Anotace, abstrakt

Patří sem chemické vyšetření testovacím proužkem a morfologické vyšetření moče.

Cíl kapitoly

Seznámení s problematikou vyšetření moče a močových konkrementů včetně základních znalostí ze somatologie.

Klíčová slova

Ledviny, nefros, diuréza, chemické vyšetření moče, močový sediment

Ledviny (nefros) jsou párovým orgánem, uloženým po obou stranách bederní části páteře, na průřezu je ledvina tvořena – kůrou a dřením.

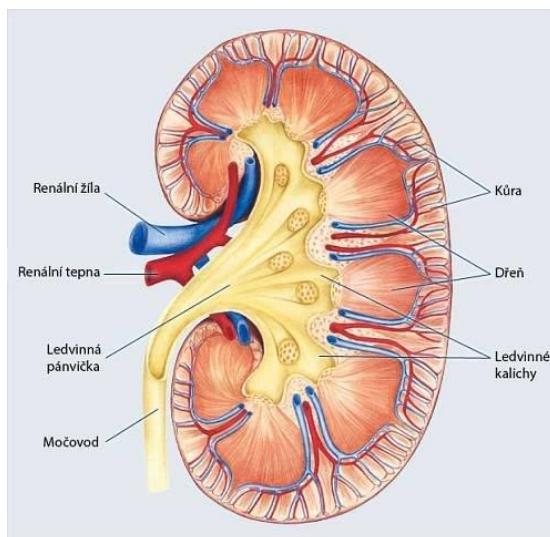
Kůra tvoří úzký pás při povrchu ledviny.

Funkční jednotkou ledvin je N E F R O N.

1. každá ledvina obsahuje 1 – 2 miliony nefronů
 2. nefrony procházejí kůrou i dřením
 3. v nefronech dochází k filtraci krve, tvorbě primární moči, k její úpravě a vzniku sekundární (definitivní) moče
 4. nefron se skládá z glomerulu, proximálního tubulu, Henleovy kličky, distálního tubulu
- renální tepny, vstupující do každé z ledvin, se v ledvinách větví na drobnější tepénky
 - z drobných tepének odstupují *přívodné tepénky*
 - přívodná tepénka vytváří klubíčko kapilár - glomerulus, ze kterého vychází odvodná tepénka
 - odvodná tepénka se větví do kapilárních sítí kolem ledvinných kanálků z těchto kapilár odtéká krev do renálních žil a do *dolní duté žíly*
 - glomerulus (klubíčko kapilár) je obklopen Bowmanovým pouzdrem, což je slepý začátek ledvinných kanálků
 - vnitřní list Bowmanova pouzdra naléhá na glomerulus, vnější list přechází do stěny kanálku
 - Bowmanův váček + glomerulus = Malpighické tělísko
 - krev vstupuje přívodnou tepénkou do *Malpighického tělíska*, kde dochází k její filtraci
 - vzniká primární moč (glomerulární filtrát) - krev se zbavuje toxických látek
 - neprofiltrují se krevní elementy a bílkoviny s velkou molekulovou hmotností



- ostatní složky krve se profiltrují (primární moč se od krve liší pouze tím, že neobsahuje bílkoviny s velkou molekulovou hmotností a krevní elementy = buňky)
- primární moči se vytvoří denně kolem 180 l
- primární moč přechází do proximálního tubulu
- zde dochází k resorpci = vstřebávání látek, které tělo dále využívá – např. glukóza, aminokyseliny, bílkoviny s malou molekulovou hmotností
- primární moč dále prochází Henleovou klíčkou a distálním tubulem – zde se resorbuje hlavně voda a minerály
- v tubulech se vstřebává více než 0,99 podílu primární moči (99%)
- látky resorbované v tubulech se vstřebávají do kapilár, které obtáčí tubuly a vycházejí z odvodné tepénky - odtud přecházejí do ledvinných žil → dolní duté žíly
- pro tělo využitelné látky se tedy vrací zpět do krve
- po průchodu primární moči tubuly a sběracími kanálky vzniká definitivní moč, která odkapává do pánvičky ledvinné (obsahuje vodu, anorganické látky – minerály, organické látky – kyselinu močovou, močovinu, kreatinin aj.)



Obr. 14 Ledvina

Diuréza = množství vyloučené moči za 24 hod.

- běžné množství je 1 – 2 l moče
- diuréza je závislá na *množství přijaté vody* = pití a na *hormonech*, které ji ovlivňují

5.1 Základní vyšetření moče

- složení moče neboli množství látek, které se normálně močí vylučují, kolísá podle toho, jak to vyžadují potřeby organismu
- při chorobných stavech se mohou v moči objevit extrémně vysoká množství normálních součástí moče nebo látek, které v moči za normálních okolností nenajdeme
- sekundární (definitivní) moč obsahuje:
 - konečné produkty látkové přeměny, které jsou pro organismus prakticky nezužitkovatelné - močovina, kreatinin
 - látky, které ledviny tvoří v rámci své regulační činnosti – anionty - H_2PO_4 , ionty amonné - NH_4^+
 - látky, které organismus přijal v nadbytku - Na^+ , Cl^- , K^+ , H_2O
 - látky, které vznikly tabulární resorpcí – aminokyseliny, amyláza

5.2 Odběr moči

- moč je nejdostupnější biologický materiál
- správně provedený odběr moči má zásadní význam pro kvalitní vyšetření moče
- pacient musí být poučen, jak má odběr provést
- odběrová nádoba musí být řádně označena a nesmí obsahovat zbytky čistících prostředků či jiných chemikálií
- vzorek moči má být dopraven do laboratoře co nejrychleji
- vyšetření močového sedimentu je nutné provést nejpozději do 2 hod. po odběru moči (později dochází k rozpadu elementů)

5.2.1 Jednorázový odběr moči

- nejčastěji se provádí jednorázový odběr moči na chemické vyšetření a vyšetření močového sedimentu (M+S)
- nejvhodnější je první ranní moč (je koncentrovaná, není ovlivněna fyzickou námahou ani potravou, popř. léky), ale lze vyšetřit jakýkoliv vzorek moči vyloučený během dne
- na vyšetření se používá tzv. střední proud moči
- provedení odběru: pacient si omyje oblast vývodu močové trubice mýdlem a vodou
- začne močit do toalety
- střední proud moči zachytí do označené nádoby
- zbytek vymočí opět do toalety

5.2.2 Časový sběr moči

- pro provedení některých analýz je nutné moč sbírat po dobu několika hodin (3h., 6h., 12 h., 24 h.)
- na začátku sběrného období se pacient vymočí do toalety a potom sbírá v celém časovém intervalu moč do sběrné nádoby
- naposledy se do sběrné nádoby vymočí v okamžiku, kdy končí sběrné období
- příklad: pacient sbírá moč 24 hod. – sběr začne v 7 hod. ráno; přesně v 7 hod se pacient vymočí do toalety; od tohoto okamžiku začne

močit do sběrné nádoby; sběr ukončí druhý den ráno v 7 hod., kdy se naposledy vymočí do sběrné nádoby;

- pro vyšetření se dodá buď celý objem moči, nebo pouze vzorek
- dodává-li se pouze vzorek moči, je nutné celý objem moči řádně promíchat, změřit objem pomocí odměrného válce, zapsat hodnotu do průvodky (udává se v ml) a potom odlít vzorek
- vzorek se označí jménem pacienta, datem odběru, délkou sběrného období, celkovým objemem a typem konzervačního prostředku, bylo-li použito

Všechny vzorky moči se po vyšetření uchovávají v chladničce při 4°C !!!

Moč je biologický materiál se kterým musíme vždy zacházet jako s infekčním materiálem a dodržovat příslušné bezpečnostní předpisy!!!

5.3 Fyzikální vyšetření moče

5.3.1 Množství moče

- záleží na příjmu a vylučování tekutin, na psychické zátěži, únavě, námaze, používání diuretik (léků, které zvyšují diurézu)

polyurie

- zvýšené vylučování moči
- > 2 000 ml /24 hod.

oligurie

- snížené vylučování moči
- < 500 ml/24 hod.

anurie

- úplná nebo téměř úplná zástava močení
- <100 ml/24 hod.

5.3.2 Barva moče

- zlatavěžlutá – zabarvení je způsobeno pigmenty, které moč běžně obsahuje
- podle množství přijaté vody může být světle žlutá až tmavě jantarová
- zabarvení se mění za přítomnosti abnormálních součástí (patologická barviva, např. hemoglobin, bilirubin)
- netypické zabarvení moče mohou způsobit některé potraviny (červená řepa, karotka) nebo léky, jedy

5.3.3 Zákal

- čerstvá moč je čirá, nebo slabě zakalená – zvláště po ochlazení
- při delším stání se na dně zkumavky vytváří „obláček“ = nubecula, vytvořený hlenem z povrchu močových cest – **Tamm – Horsfallův mukoprotein**
- při dlouhém stání se zakalí – vypadávají různé soli – nejedná se o patologický stav
- patologické je vylučování zakalené moči – může obsahovat krev, bakterie, hnis

5.3.4 Zápach

- určuje se z čerstvé moče – moč má zápach po masovém bujonu
- bývá ovlivněn patologickými pochody v organismu, např. u dekompenzovaných diabetiků je moč cítit po acetonu
- zápach moči ovlivňují také potraviny a léky

5.3.5 pH moče

- za normálních okolností se pohybuje v rozmezí 5,0 – 7,0
- u vegetariánů bývá slabě alkalická - ovlivněna potravou
- vyšetřuje se vždy v čerstvé moči
- k vyšetření se používají diagnostické proužky se směsí acidobazického indikátoru s barevným přechodem z oranžové přes žlutou a zelenou do modré, v rozmezí 5 – 9
- zabarvení zóny se odečítá srovnáním s barevnou škálou ihned po namočení proužku do moči

5.3.6 Hustota

- závislá na množství rozpuštěných látek v moči a na objemu vylučované moče
- u zdravých osob se pohybuje v rozmezí 1,010 – 1,025 g.cm³
- nízká hustota – bývá u chronického onemocnění ledvin, které ztratili schopnost produkovat koncentrovanější moč
- zvýšená hustota – bývá u diabetiků a v případě, že moč obsahuje bílkoviny
- měření hustoty:

a) hustoměrem, upraveným na rozmezí hustoty moči (urometr) – měření založeno na Archimedově zákonu

b) osmometricky – měří se osmolalita moči – vyjadřuje celkovou koncentraci částic rozpuštěných v moči, tzn. závisí pouze na počtu částic a není ovlivňována jejich molekulovou hmotností ani nábojem; jedná se o přesné stanovení – hodnota se pohybuje v rozmezí 350 – 850 mmol/kg;

c) diagnostickými proužky – množství rozpuštěných látek v moči působí změny disociační konstanty elektrolytu (redoxního systému),

dochází ke změně zabarvení plošky diagnostického proužku, která se srovnává s barevnou škálou na tubě

5.4 Chemické vyšetření moče

Diagnostické proužky PHAN [®] pro analýzu moče							
Bazéni zóny	Zkratka	Jednotky	Čas vyhodnocení	Barevné stupnice	Princip reakce	Odkaz	
						SI	CGM
Hemoglobin Erytrocyty	HBNO	trg/l	ca 60 s		oxidace chromogenu ergochromu peroxidem v přítomnosti hemoglobinu	1 trig/l	
Ketony	KETO	mmol/l mg/dl	ca 60 s		alkalický pH v reakci s chromogenem indolym (3-oxoindol)	0,2 - 0,2 mmol/l	10 - 20 mg/dl
Bilirubin	BLU	mg/l	ca 60 s		reakce s diazotovanou solí v kyselém prostředí	4,3 - 3,2 mg/dl	0,25 - 0,20 mg/dl
Urobilinogen	UBO	mmol/l mg/dl	ca 60 s		reakce s diazotovanou solí v kyselém prostředí	4,0 mg/dl	0,20 mg/dl
Glukóza	GLU	mmol/l mg/dl	ca 60 s		enzymatická reakce: glukózydol, peroxidasa, chromogen	0,9 mmol/l	16 mg/dl
Bílky	PRO	g/l mg/dl	ca 60 s		proměna chryse indolitu v anilin obarvený indolový acidobenzidyl indolitu v přítomnosti proteinu	0,2 g/l	10 mg/dl
pH	pH		ca 60 s		enzym: ureolizující bakterie		
Draslík	KRE		ca 60 s		modifikace Griesova reakce	11 mmol/l	0,02 mg/dl
Kyselina askorbová	ASCO	mmol/l mg/dl	ca 60 s		oxidace kyseliny askorbového derivátu na oxalobutyrát	0,2 - 0,2 mmol/l	3,0 - 3,0 mg/dl
Specifická hmotnost	SG		ca 60 s		komerční metoda osmotického indikátoru v zvláštní koncentraci		
Laktózy	LDL	trg/l	ca 120 s		enzymatická reakce: oxidace bílého cukru na bílý cukr, který dává reakci s diazotovanou solí	10 trg/l	
Mikrobion	MicroB	mg/l g/l	ca 60 s		proměna chryse indolitu v anilin obarvený indolový acidobenzidyl indolitu v přítomnosti mikroby	0,03 g/l	20 mg/l
Kreatinin	KRE	mmol/l g/l	ca 60 s		Barodilaminová reakce	0,4 mmol/l	0,04 g/l

5.4.1 Bílkovina v moči (proteinurie)

- za normálních okolností je močí vylučováno malé množství bílkovin –: 0,10 – 0,15 g/24 hod.
- *jedná se o bílkoviny s malou molekulovou hmotností, hl. albumin*
- toto množství je fyziologické a bílkoviny v moči neprokážeme
- proteinurie se podle příčiny dělí na: *prerenální, renální a postrenální*

1. prerenální proteinurie – příčina není v ledvinách, ale „před ledvinami“

- pacienti mají v plazmě zvýšené množství bílkovin s malou molekulovou hmotností
- tyto bílkoviny projdou glomerulárním filtrem (mají malou molekulu), ale proximální tubulus je nestačí všechny vstřebat, proto se dostávají do definitivní moči

- může se jednat o hemoglobin při hemolýze, myoglobin při úrazech svalů, lehké řetězce imunoglobulinů při myomu

2. renální proteinurie – příčinou je poškození glomerulů, nebo tubulů, popřípadě glomerulů i tubulů

- u lehčích poruch jsou v definitivní moči přítomné bílkoviny se středně velkými molekulami, např. albumin, transferin = **selektivní proteinurie**
- u těžšího poškození ledvin se v definitivní moči objevují bílkoviny s velkou molekulovou hmotností = **neselektivní proteinurie**
- u těžké proteinurie jsou močí vylučovány více než 4g bílkovin denně

3. postrenální proteinurie – ledviny jsou zdravé, bílkoviny se do moči dostávají z vývodných cest močových

- příčinou je krvácení do močových cest (kameny, nádory) nebo záněty močových cest
- za určitých okolností může dojít k proteinurii i u zdravých lidí (příčinou může být dlouhodobá námaha, přehřátí nebo prochlazení organismu, psychický stres, těhotenství, některé léky)
- pomine-li příčina, většinou vymizí i proteinurie

Průkaz bílkoviny v moči

a) zkouška s kyselinou sulfosalicylovou

- princip: bílkoviny se vysráží kyselinou sulfosalicylovou (denaturace), což se projeví zákalem až sraženinou (podle množství bílkovin)

b) pomocí diagnostických proužků

- princip: je založen na „proteinové chybě“indikátoru
- roztok indikátoru obsažený v reagenční zóně proužku je pomocí nárazníku udržován na pH 3 ,při tomto pH se reagenční ploška na proužku barví žlutě
- v přítomnosti bílkovin se váží H^+ na zásadité skupiny proteinů a zbarvení přechází do zelena až modra

5.4.2 Glukóza v moči (glykosurie)

- glukóza má malou molekulu a prochází přes glomerulární filtr do moče, v proximálním tubulu se vstřebává zpět do krve
- za normálních okolností je množství glukózy, které se nevstřebalo v tubulech zcela nepatrné a glukóza se v moči běžnými zkouškami neprokáže

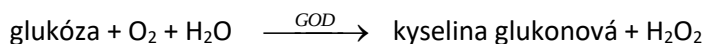
glykosurie = zvýšená koncentrace glukózy v moči = v moči se prokáže běžnými zkouškami přítomnost glukózy

- ke glykosurii dochází obvykle tehdy, je-li koncentrace glukózy v krvi vyšší než 10 mmol/l – glukóza „překročí“ tzv. ledvinový práh

Průkaz glukózy v moči

a) pomocí diagnostických proužků

- na reakční plošce diagnostického proužku dochází k enzymatické reakci **GOD – POD**
- reakce je založena na oxidaci glukózy vzdušným kyslíkem
- reakci katalyzuje enzym glukózooxidáza (GOD), glukóza je rozložena na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku
- v další reakci se využívá peroxid vodíku (je to oxidační činidlo)
- peroxid vodíku reaguje s chromogeny za vzniku barevného produktu – reakci katalyzuje enzym peroxidáza (POD)



b) redukční zkoušky

Jsou založené na schopnosti glukózy redukovat v alkalickém prostředí soli těžkých kovů

- využívá se Fehlingova a Benediktova zkouška – obě mají stejný princip, liší se pouze citlivostí
princip:
- u obou zkoušek redukuje glukóza v alkalickém prostředí síran měďnatý (Cu^{2+}) na síran měďný (Cu^{+})
- reakce probíhá za varu a v případě pozitivní reakce dochází ke vzniku barevné sraženiny (od olivově zelené přes oranžovou až červenou)
- ani jedna z těchto zkoušek není specifická pro glukózu, prokážeme jimi přítomnost jakéhokoliv redukujícího cukru

5.4.3 Ketolátky v moči (ketonurie)

- ketolátky vznikají v játrech jako meziprodukt při metabolismu lipidů, jako produkty rozkladu mastných kyselin za jistých metabolických podmínek, především během hladovění.
- mezi ketolátky patří kyselina acetoctová, kyselina β -hydroxymáselná, aceton
- v moči se vyskytují:
 1. nejčastěji u neléčeného diabetu – může dojít ke vzniku diabetické ketoacidózy
 2. u lidí držících diety nebo u hladovějících (redukční diety, mentální anorexie..)
 3. u pacientů s průjmami, zvracením, při akutních horečnatých stavech, někdy u těhotných (ranní nevolnosti)

Průkaz ketolátek v moči

princip:

- ketolátky reagují s nitroprusidem sodným v alkalickém prostředí za vzniku fialově zbarveného produktu

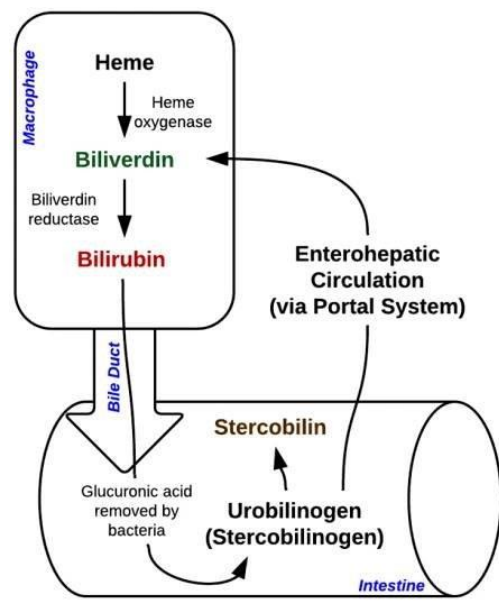
5.4.4 Barviva v moči (bilirubinurie, urobilinogenurie)

- mezi žlučová barviva zařazujeme: bilirubin, urobilinogen, sterkobilinogen – tzv. Ehrlich pozitivní látky
- (Ehrlichovo činidlo – dimethylaminobenzaldehyd)
- bilirubin vzniká z hemu (hem je cyklický tetrapyrrol)
- při rozpadu erytrocytů v retikuloendotelovém systému (RES) sleziny a jater
- tento bilirubin je nerozpustný ve vodě, rozpustný v organických rozpouštědlech a ve vyšších koncentracích je jeho účinek silně toxický
aby mohl být transportován v plazmě a extracelulární tekutině váže se na albumin (bílkovina s malou molekulovou hmotností), albumin ho transportuje do jater
- na membráně hepatocytů se uvolní z vazby na albumin a přechází do jaterní buňky
- zde se bilirubin konjuguje (váže) s kyselinou glukuronovou a stává se rozpustným ve vodě
- přechází do žluče a je vylučován do duodena

k další přeměně dochází v tlustém střevě, kde je bilirubin redukován bakteriální florou na urobilinogeny (urobilinogen a sterkobilinogen), urobilinogeny se vylučují stolicí

část urobilinogenů se ve střevě částečně vstřebává a enterohepatálním oběhem se vrací zpět do jater

- zdravá játra většinu urobilinogenů oxidují na bilirubin a vrací jej žlučí do střeva
- velmi malá část urobilinogenů se dostává periferní cirkulací do ledvin a je vylučována močí (toto množství je tak malé, že ho běžnými chemickými zkouškami neprokážeme)
- bilirubin se též za normálních okolností v moči neprokáže



Obr. 15 Schéma metabolismu bilirubinu

Bilirubin

- za patologických stavů se v moči nachází bilirubin konjugovaný (rozpuštěný ve vodě, přímý),
- nekonjugovaný bilirubin do moče nepřechází, může se v ní vzácně objevit při kombinaci hemolytického ikteru se současnou poruchou ledvin

Průkaz bilirubinu

- diagnostickými proužky

Princip: bílá zóna proužku obsahuje činidlo (stabilizovaná diazoniová sůl), poskytující s bilirubinem v kyselém prostředí růžové až karmínově červené zbarvení.

Test je pro bilirubin specifický.

- moč pro vyšetření musí být čerstvá, bilirubin se na světle rozkládá
- moč obsahující bilirubin má tmavě žlutou až hnědou barvu

Urobilinogen, sterkobilinogen = Ehrlich pozitivní látky

urobilinogen - jeho koncentrace v moči se zvyšuje při poškození jater, u dlouhotrvajících horečnatých stavů, fyziologicky ho lze v moči prokázat po nadměrném požití velkého množství masa, zeleniny

Snížená koncentrace Ubg je při uzávěru žlučových cest = u obstrukčního ikteru je nález negativní!!!

Diagnostickými proužky

Princip: reakční zóna proužku obsahuje aromatickou diazoniovou sůl v kyselém pufru, která reaguje s urobilinogenem za vzniku růžového až karmínově červeného azobarviva

- reakce je specifická pro stanovení urobilinogenu (sterkobilin neprokážeme)

5.4.5 Krev v moči (hematurie)

- Hematurie znamená přítomnost krve v moči. Jedná se o příznak, který může mít mnoho příčin. Nejčastěji se objevují červené krvinky (erytrocyty) v moči, což může být známka nádoru, případně úrazu ledvin, močovodu, močové trubice, močového měchýře nebo prostaty. Obsahuje-li moč spolu s červenými krvinkami i bílé krvinky, může tento příznak signalizovat např. infekci močových cest.
- hematurie se dělí na :

1. mikroskopická hematurie - zbarvení krve není okem viditelné, vidět jej můžeme pod mikroskopem

2.makroskopická hematurie - zbarvení krve je okem viditelné, typické červené nebo růžové zbarvení

- za normálních stavů definitivní moč erytrocyty neobsahuje

průkaz krve v moči

- diagnostické proužky

princip: je založen na pseudoperoxidázové aktivitě hemu

- světle žlutá zóna proužku obsahuje organický hydroperoxid a chromogen (o- toolidin), který se za přítomnosti hemoglobinu oxidaže na modře zbarvené produkty

5.4.6 Dusitany v moči

- používají se jako nepřímý důkaz bakteriurie
- močové ústrojí běžně neobsahuje bakterie, jsou-li v čerstvé moči, jedná se o patologický nález
- bakterie jsou v močovém ústrojí přítomny při infekcích močových cest, které mohou vést k poškození funkčnosti ledvin

průkaz dusitanů

diagnostické proužky

- dusitany reagují v kyselém prostředí s kyselinou sulfanilovou za vzniku diazoniové soli, která poskytuje s alfa – naftylaminem růžověčervené azobarvivo

Postup práce s diagnostickým proužkem

- tento postup je stejný pro výše jmenované analyty, které můžeme v moči prokázat
- močový proužek vyjmeme z tuby tak, abychom se nedotýkali jednotlivých reagenčních plošek
- namočíme ho do moče a poslední kapku otřeme o stěnu zkumavky
- položíme na buničinu, ihned odečteme pH, ostatní plošky po 1 min.
- v současnosti bývají laboratoře vybaveny analyzátory provádějícími chemické vyšetření moče včetně vyhodnocení, tyto analyzátory jsou založené na reflexní fotometrii

5.5 Močový sediment

(kvalitativní vyšetření močového sedimentu)

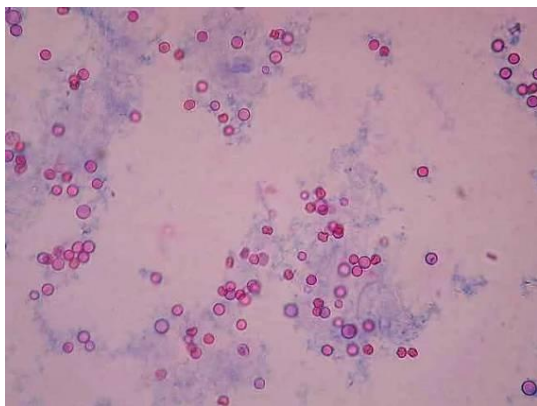
5.5.1 Příprava vzorku moči

- K mikroskopickému vyšetření močového sedimentu je odebírán střední proud první nebo druhé ranní moči. Doporučována je druhá ranní moč, v prvním ranním vzorku bývají buněčné elementy poškozené nebo rozpadlé.
- Pro vyšetření močového sedimentu je nezbytné zpracovávat *čerstvou moč do 1 hodiny po odběru*. Prodlužování intervalu mezi odběrem moči a vyšetřením močového sedimentu je doprovázeno rozpadem a zánikem buněk.
- v současné době se odečítání močového sedimentu provádí ve speciálních destičkách zvaných FAST READ nebo automaticky

5.5.2 Orgánové součásti močového sedimentu

5.5.2.1 Erytrocyty

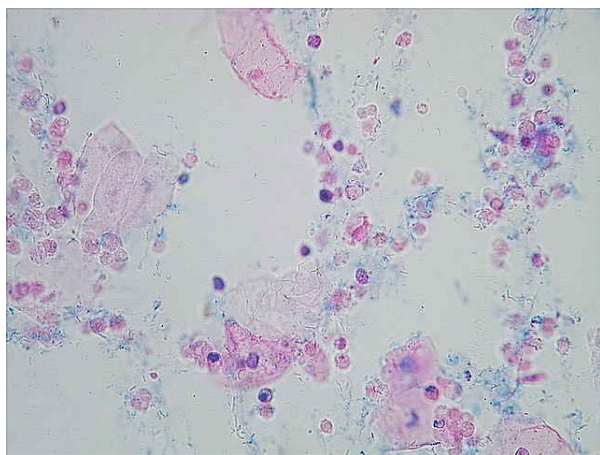
- za fyziologických podmínek se objevují v moči ojediněle
- velikostí jsou menší než leukocyty
- kulaté diskovité útvary, nemají jádro



Obr. 16 Erytrocyty v močovém sedimentu

5.5.2.2 Leukocyty

- množství leukocytů v moči je významnou známkou zánětlivého onemocnění ledvin a moč. cest
- v přímé závislosti na pH moči mají leukocyty různý tvar
- v kyselé, neutrální nebo slabě alkalické moči tvoří většinou kulaté, bezbarvé útvary větší než erytrocyty
- obsahují 1 nebo více jader



Obr. 17 Leukocyty v močovém sedimentu

5.5.2.3 Epitelie

Pocházejí z epitelové výstelky renálních tubulů a vývodných cest močových.

5.5.2.3.1.1 Renální tubulární buňky

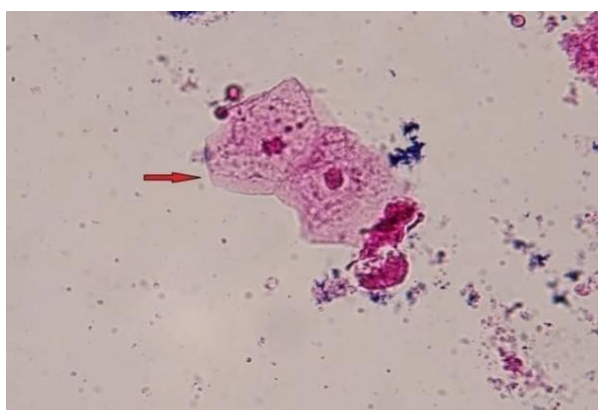
- jejich výskyt v močovém sedimentu je vždy patologickým nálezem a svědčí pro vážné poškození ledvin, Jsou to relativně malé buňky, kulaté, zpravidla excentricky uloženým, kulatým jádrem, bez jadérek. Vyznačují se granulovanou cytoplazmou, v barveném vzorku je červená. Zpravidla se vyskytují samostatně, někdy jsou ve shlucích nebo mohou tvořit válce.
- v nebarveném preparátu se těžko odlišují od buněk přechodného epitelu. Mohou být zaměněny i za leukocyty.

5.5.2.3.2 Buňky přechodného epitelu

- pocházejí z povrchních nebo hlubších vrstev přechodného epitelu vystylajícího vývodné močové cesty. Jejich nález svědčí obvykle o infekci dolních močových cest, zejména při současném výskytu leukocytů. Mohou se vyskytnout i v moči zdravých lidí.

5.5.2.3.3 Dlaždicové epitelie

- jsou největší buňky v močovém sedimentu, obdélníkovitého tvaru s malým jádrem a bohatou cytoplazmou. Pocházejí většinou z uretry, případně z [vaginy](#) a jejich množství závisí na kvalitě provedeného odběru vzorku moči. Nacházejí se obvykle v moči žen při špatném kontaminovaném odběru, nemají diagnostický význam



Obr.18 Dlaždicové epitelie v močovém sedimentu

5.5.2.4 Válce

- nález válců má velký diagnostický význam
- jsou to jediné elementy, o kterých lze bezpečně říci, že pocházejí z ledvin
- tvoří válcovité útvary různé délky a šířky

5.5.2.4.1 hyalinní

- mají homogenní strukturu
- dlouhé útvary, bezbarvé nebo bleděžlutě zabarvené, zaoblené konce (snadno se v mikroskopu přehlédnou)
- tvořené vysráženým Tamm- Horsfallovým mukoproteinem, mohou se vyskytovat ojediněle i v moči zdravých osob
- ve větším množství se objevují při poškození ledvin, u diuretického odvodnění, při horečkách, po těžké tělesné námaze, při dehydrataci
- nejsou specifickou známkou poškození ledvin

5.5.2.4.2 granulované

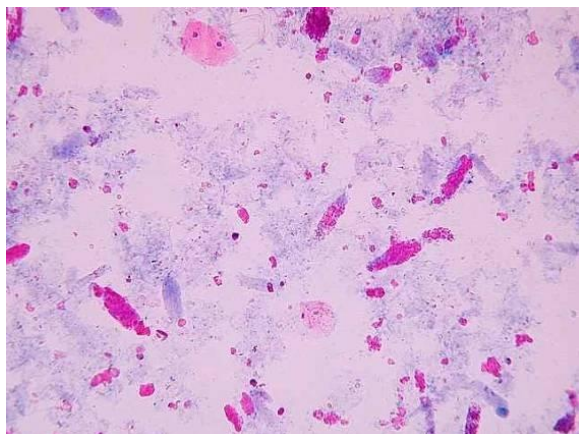
- jsou kratší a silnější nežli válce hyalinní
- na povrchu mají zrnitou strukturu
- granula mají bílkovinnou povahu
- granulace může být hrubá nebo jemná, podle toho se rozlišují na hrubě granulované a jemně granulované válce
- v močovém sedimentu se vyskytují při onemocnění ledvin spojených s proteinurií

5.5.2.4.3 voskové

- široké válce se zářezy
- silně lámou světlo (v mikroskopu se nepřehlédnou)
- mají homogenní strukturu, voskový vzhled a nemají granulaci
- jejich výskyt je známkou vážného poškození ledvin

5.5.2.4.4 buněčné

- na svém povrchu mají nalepené buňky



Obr.19 Různé typy válců v močovém sedimentu

Dále lze v moči nalézt kvasinky, bakterie, spermie, vajíčka parazitů, plísňe, prvoky

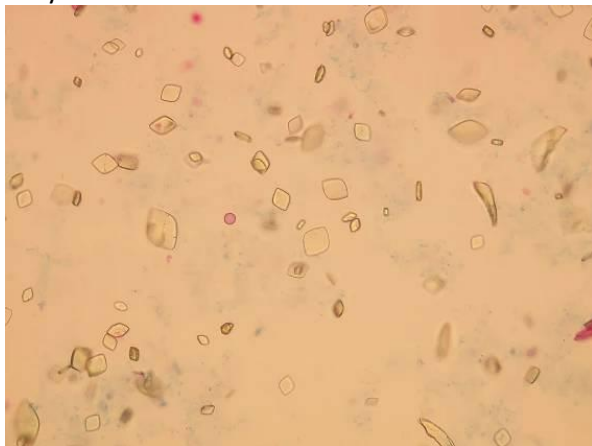
5.5.3 Neorganové součásti močového sedimentu

5.5.3.1 Krystaly

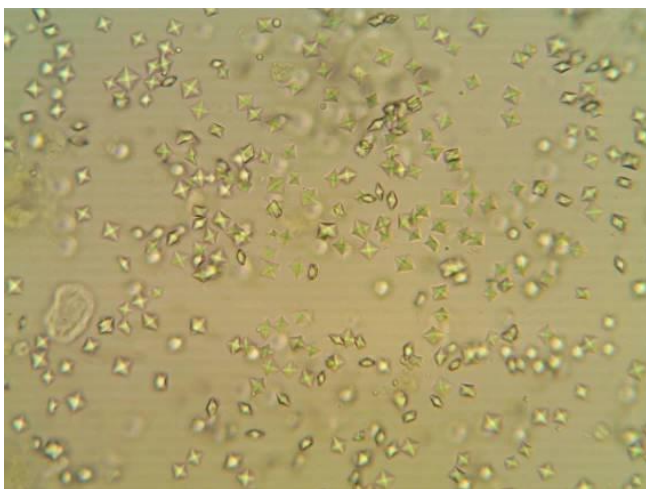
- ve většině případů jsou to normální součásti moče a při chlazení moče krystalizují
v kyselé moči se vyskytují krystaly kyseliny močové – (existuje velké množství forem krystalů kyseliny močové) a šťavelanu vápenatého = oxaláty (mohou se vyskytovat i v neutrální nebo slabě alkalické moči)

v alkalické moči se objevují krystaly fosforečnanu hořečnat-amonného (tripelfosfáty) a uhličitanu vápenatého

- diagnosticky významný je nález krystalů cystinu u dědičné metabolické poruchy cystinurie
- při těžkém poškození jater se v moči mohou objevit krystaly leucinu a tyrozinu



Obr. 20 Krystaly kyseliny močové (citrónky)



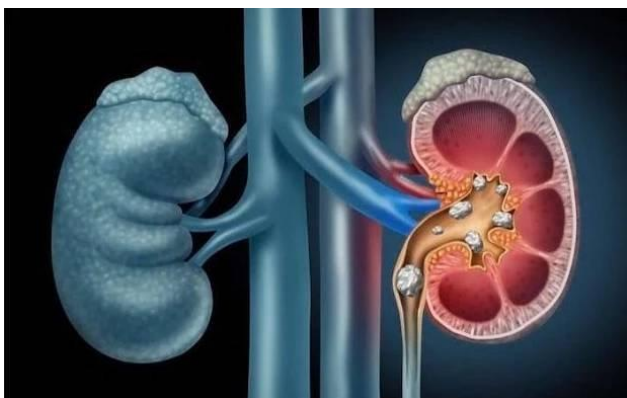
Obr.21 Krystaly oxalátu

5.5.3.2 *Drť (rozpadlé krystaly)*

- rozpadem krystalů v moči vzniká drť
- rozpadem krystalů kyseliny močové vzniká **urátová drť** – sediment ve zkumavce má cihlovou barvu a pod mikroskopem má urátová drť nazelenalou barvu
- rozpadem ostatních druhů krystalů vzniká **amorfni drť** – sediment ve zkumavce má bělavou barvu a pod mikroskopem má drť barvu šedou
- někdy je drť tak masivní, že může překrýt orgánové součásti močového sedimentu – ten je v tomto případě nehodnotitelný

5.5.4 Močové kameny

- přítomnost močových kamenů se nazývá **urolitiáza**



Obr.22 Urolitiáza

- jedná se o onemocnění, které může poškodit ledviny i vývodné močové cesty
- rizikovými faktory urolitiázy je:

a) nízký příjem tekutin – moč se koncentruje, má vysoký obsah sodíku, síranů a fosforečnanů

b) v moči je velké množství kamenotvorných látek získaných z potravy, nebo léků, dále se do moči dostávají u některých onemocnění trávicího ústrojí, popř. u metabolických poruch

c) příčinou může být i nevhodný způsob výživy

Močové kameny se skládají ze dvou složek: z organické matrice a z anorganických látek, které se ve formě krystalů ukládají ve vrstvách do matrice a obalují jádro

- pouze cca ¼ všech kamenů je tvořena pouze jednou minerální složkou
- v naší populaci se nejčastěji vyskytují kameny ze:

a) šťavelanu vápenatého (weddellit = dihydrát, whewellit = monohyrát)

b) neutrálního fosforečnanu vápenatého (brushit)

c) fosforečnanu hořečnatého (newberyit)

d) uhličitanu vápenatého (kalcit)

e) fosforečnanu hořečnatého – amonného (struvit)

f) kyseliny močové a jejich solí

- vzácněji se objevuje: cystin, leucin, tyrozin, bilirubin, cholesterol, xanti

Vyšetření močových kamenů

- provádí se pouze na specializovaných pracovištích, neboť jejich analýza vyžaduje speciální přístrojové vybavení
- identifikace jednotlivých složek kamene pomáhá lékaři určit správnou dietu a léčbu, která je u každého druhu kamene jiná
při vyšetření kamene se hodnotí jeho barva, tvar, jádro, počet vrstev, hmotnost
- metody vyšetření:
 - a) chemická analýza – je dobře dostupná, ale dnes se používá pouze jako doplněk jiných metod, např. polarizační mikroskopie, neboť nejsou vždy identifikovány všechny složky tvořící kámen
 - b) polarizační nebo elektronová mikroskopie – informuje o struktuře a původu krystalů
 - c) infračervená spektrometrie – určuje krystalické i nekrystalické složky

d) rentgenová difrakce + infračervená spektrometrie – kombinace těchto metod umožňuje určování lékových konkrémentů a vzácných složek

Kontrolní otázky

1. Co je to nefron?
 2. Co patří mezi základní fyzikální vyšetření moče?
 3. Co je to diuréza a jaké jsou typy?
 4. Popište chemické vyšetření moče
 5. Popište vyšetření močového sedimentu
-

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, M., BREINEK, P. *Klinická biochemie, bakalářský obor Zdravotní laborant* 2. vydání, Brno: Coprint s.r.o., 2011. ISBN 978-80-87192-18-4
Racek, J., Rajdl, D., *Klinická biochemie 3 vydání*, Praha 5: Galén, 2021
ISBN 978-80-7492-545-0
Matouš. B., *Základy lékařské chemie a biochemie 1. vydání*, Praha 5: Galén
2010. ISBN 978-80-7262-702-8



Anotace, abstrakt

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly, které zařazujeme mezi biokatalyzátory

Cíl kapitoly

Seznámení se základní problematikou enzymů, jejich kinetikou a klinickým významem

Klíčová slova

Enzym, kofaktor, apoenzym, katalytická aktivita, katal, Michaelisova konstanta, substrát, produkt

- jsou převážně složené proteiny, které mají schopnost katalyzovat chemické (biochemické) reakce v buňce (tyto reakce jsou vlastně projevem života v buňce)
- ovlivňují rychlost biochemické reakce – mohou ji zrychlit až 10^{14} krát
- bez enzymů by mnoho reakcí probíhalo velmi pomalu, nebo by neprobíhaly vůbec - jeden enzym dokáže přeměnit za 1 sekundu několik tisíc molekul substrátu
- enzymy neovlivňují rovnováhu chemických reakcí
- mnohonásobně urychlují reakční rychlost tím, že snižují aktivační energii substrátu
- enzymy jsou syntetizovány v buňce, kde většinou také působí (intracelulární enzymy)
- v buňce jsou enzymy buďto volně v cytoplazmě, nebo vázané na membrány, nebo v organelách
- extracelulární enzymy se také tvoří v buňkách, ale jsou jimi vylučovány do extracelulárních tekutin – vyskytují se např. v trávicích šťávách, krvi, moku mozkomíšním aj.

6.1 ENZYM (holoenzym) = KOENZYM (KOFAKTOR) + APOENZYM

- **Kofaktor** – organická molekula, která je součástí aktivního centra. Přenáší atomy nebo skupiny atomů ze substrátu na aktivní centrum enzymu.
- Je-li molekula kofaktoru vázána pevně, nazývá se **prostetická skupina**.
- Je-li kofaktor vázán labilně – může od enzymu oddisociovat a znovu se připojit (asociovat), potom se nazývá **koenzym**.
- Molekula bílkoviny = **apoenzym**.



Apoenzym

- bílkovinná část enzymu
- má znaky proteinů – vysoká molekulová hmotnost, primární struktura, uspořádání molekuly...
- zodpovídá za substrátovou specifitu = která látka, tedy substrát se na enzym naváže a bude přeměněna
- rozhoduje o směru reakce
- má na svém povrchu aktivní centrum (jedno i více) na které se váže substrát – (aktivní centrum odpovídá povrchovým obrysům molekuly substrátu)- jsou zde prostorově uspořádány zbytky AMK, podílející se přímo na tvorbě nebo štěpení vazeb; aktivní centrum je kryto krátkým proteinovým řetězcem, který je před vazbou se substrátem rozštěpen = enzym se stává aktivním

Koenzym

- nebílkovinná složka enzymu
- skladuje energii ve snadno směnitelné formě (jako chemickou skupinu nebo jako elektrony)
- jedná se o vitamíny, nebo nukleosidfosfáty (H_3PO_4 + pentóza + dusíkatá látka) aj.



Obr.23 Molekula enzymu

6.2 Průběh enzymatické reakce

Enzymy vstupují do enzymatických reakcí, tzn. reagují se substrátem.

- 1) substrát (přeměňovaná látka) se naváže na enzym
- 2) k tomu je zapotřebí méně aktivační energie, než při reakci, která probíhá bez enzymu (katalyzátoru).
- 3) vzniká komplex enzym – substrát
- 4) substrát je enzymem přeměněn na produkt
- 5) enzym se uvolní z komplexu enzym – produkt a regeneruje se
- 6) enzym je schopen reagovat s další molekulou substrátu



- enzymy snižují tzv. aktivační energii
- snížením aktivační energie dojde ke zvýšení reakční rychlosti
- každá enzymová reakce probíhá nejvýše tak dlouho, až je dosaženo rovnovážného stavu
- další reakce je možná pouze v případě, že se za sebe zapojí enzymové reakce, v nichž následující reakce spotřebovává produkt předcházející reakce; to vede k tomu, že produkt první reakce se neustále přeměňuje, tím se ruší reakční rovnováha a reakce se nezastaví

Enzymy působí za mírných podmínek:

- při teplotách 20 - 40°C
- pH většinou kolem 7,0 (existují výjimky, které pro průběh reakce potřebují kyselé nebo naopak alkalické pH)
- při normálním tlaku 0,1 MPa
- mají krátký biologický poločas – jsou rychle odbourávány a syntetizovány podle potřeb organismu v závislosti na vnějších vlivech

Izoenzymy

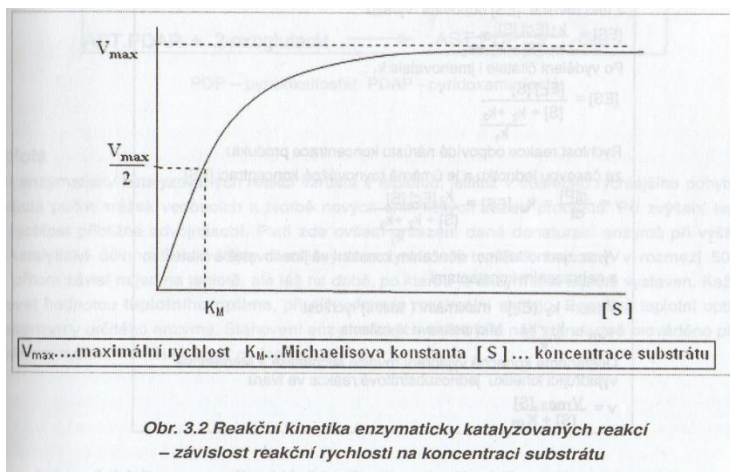
- jsou mnohočetné molekulární formy jednoho enzymu
- mají stejnou substrátovou specifitu
- liší se v primární struktuře bílkovinné části (apoenzymu)

6.3 Katalytická aktivita

Vyjadřování katalytické aktivity

- enzymatická aktivita se vyjadřuje jako rychlost přeměny substrátu za časovou jednotku
- podle soustavy SI je jednotkou katalytické aktivity enzymu katal (zkratka – kat)

- katal vyjadřuje látkové množství substrátu v molech, které je přeměněno za sekundu v enzymaticky katalyzované reakci probíhající za definovaných podmínek (teplota, pH, přítomnost aktivátorů aj.)
- v praxi se používají podíly- mikrokatal, nanokatal
- u moderních diagnostických postupů se využívá přímé imunochemické stanovení hmotnostní koncentrace enzymů v $\mu\text{g/l}$ s využitím specifických monoklonálních protilátek proti danému enzymu (antigenu)

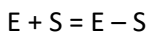


6.4 Faktory ovlivňující enzymatickou aktivitu

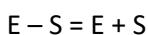
6.4.1 Koncentrace substrátu

- Michaelisova teorie:

S reaguje s E tak, že nejprve vzniká komplex E – S



- může dojít k reakci opačné – k disociaci komplexu E – S



- vlastní chemická reakce nastane pouze tehdy, bude- li reagovat E se S
- rychlost reakce je přímo úměrná koncentraci komplexu E – S
- k danému množství enzymu je postupně přidávána zvyšující se koncentrace substrátu , stále více E bude přecházet do komplexu E – S
- reakční rychlost stoupá tak dlouho, až je téměř všechen enzym přítomen jako E – S
- z toho vyplývá, že enzym je nasycen substrátem - reakční rychlost dosáhne maximální hodnoty

Mezní (limitní) rychlost

- jsou-li všechna aktivní centra nasycena substrátem, probíhá reakce maximální rychlostí, která se již nemění při dalším zvyšování koncentrace substrátu

Michaelisova konstanta (K_m)

- je rovna koncentraci substrátu, při níž rychlost reakce je polovinou mezní rychlosti
- K_m nezávisí na koncentraci enzymu
- závisí na fyzikálně chemických podmínkách reakčního prostředí (pH, teplota, přítomnost aktivátorů...)
- čím nižší je K_m , tím rychleji je substrát enzymem přeměněn na produkt

6.4.2 Teplota

- rychlost enzymatické reakce se zvyšuje s rostoucí teplotou
- je to dáno rychlejším pohybem reagujících molekul, který vede k většímu počtu srážek a tvorbě nových chemických vazeb produktů
- při zvýšení teploty o 10°C se reakční rychlost přibližně zdvojnásobí
- zvyšování teploty je omezené - při teplotách nad 50 °C se enzymy poškozuje (denaturace)
- standardně se v KLB stanovují enzymy při 37 °C – teplota lidského těla

6.4.3 pH

- nejvyšší účinnosti dosahují enzymy při pH optimu
- u většiny enzymů se pohybuje v hodnotách pH 5 – 7
- existuje mnoho výjimek, např. ALP pH optimum při pH 8 – 10, trypsin a chymotrypsin pH 8
- v kyselé oblasti má pH optimum ACP- pH 4 – 5, pepsin pH 1,5 – 2,5

6.4.4 Aktivátory

- enzymy jsou produkovány v neaktivní formě (proenzym)
- aktivátory zvyšují enzymatickou aktivitu
- účinkem aktivátorů, nebo přímo v reakčním prostředí se mění na aktivní formu
- podstata aktivace spočívá v tom, že neaktivní enzym má aktivní místo většinou „skryté“ za krátkým řetězcem peptidu
- působením aktivátoru se tento peptid rozštěpí a aktivní místo se „obnaží“ - enzym je funkční
- mohou to být organické látky nebo určité ionty - Cl , Mn , Zn , Co , Mg , Na, K...

6.4.5 Inhibitory

- jejich působením se enzymatická reakce zpomalí nebo úplně zastaví
- podle typu inhibitoru se rozlišuje inhibice:

6.4.5.1 KOMPETITIVNÍ

- dochází k ní tehdy, jestliže organická látka, podobná svou strukturou substrátu, soutěží se substrátem o vazbu v aktivním místě enzymu
- je-li inhibitor v dostatečném množství, může substrát v aktivním místě vytěsnit, naváže se místo něho a enzym zablokuje
- reakce neprobíhá
- jestliže zvýšíme koncentraci substrátu, inhibitor vytěsníme

6.4.5.2 NEKOMPETITIVNÍ

- inhibitor se naváže na enzym a reakci nevratně zablokuje

1. INHIBICE SUBSTRÁTEM A PRODUKTEM REAKCE

- a) při velkém nadbytku substrátu se může stát, že se na aktivní místo váže více molekul substrátu, tím není vazba dokonalá, reakce se zpomalí, až zastaví
- b) jestliže probíhá enzymatická reakce a hromadí se produkty, které nejsou využity v následné reakci, dosáhne reakce reakční rovnováhy a zastaví se
teprve po odebrání produktů může reakce pokračovat



Obr.24 Kompetitivní a nekompetitivní inhibice

2. ALLOSTERICKÁ

- inhibitor se váže na jinou část enzymu, nežli je aktivní centrum
- dochází ke změně konformace (uspořádání molekuly bílkoviny) enzymu a tím i aktivního centra
- vazba substrátu je znesnadněna

3. AKOMPETITIVNÍ

- enzym reaguje se substrátem, vytvoří se komplex ES

- tím se pozmění konformace aktivního centra a může se navázat inhibitor
- vytvoří se komplex ESI, který nemůže přejít na produkt a volný enzym

Názvosloví a rozdělení enzymů

- nejstarší názvosloví vyjadřovalo funkci enzymu v organismu (pepsin, maltosa)
 - v současné době na základě doporučení Mezinárodní biochemické unie byla vytvořena pravidla pro klasifikaci a názvosloví enzymů
1. enzymy jsou nazývány podle reakce, kterou katalyzují
 2. názvy enzymů mohou být použité jen pro jednotlivé enzymy, nikdy pro pojmenování systému, který obsahuje více než jeden enzym
 3. enzymy jsou zařazeny do skupin na základě typu reakce, kterou katalyzují

6.5 Klasifikace enzymů

6.5.1 OXIDOREDUKTÁZY

- funkce- katalyzují oxidačně redukční procesy. Oxidovaný substrát je dárce elektronu, nebo vodíku

6.5.2 TRANSFERÁZY

- enzymy, které přenášejí různé funkční skupiny z jednoho substrátu na druhý

6.5.3 HYDROLÁZY

- katalyzují hydrolytické štěpení různých vazeb (v reakci se využívá molekula vody)
- podle typu štěpených vazeb se dělí na:
- glykosidázy – štěpí glykosidické vazby v oligosacharidech nebo polysacharidech
- peptidázy- štěpí peptidické vazby v oligo- či polypeptidech
- lipázy – hydrolyzují estery mastných kyselin s alkoholem
- fosfodiesterázy – rozkládají fosfodiesterové vazby v polynukleotidovém řetězci DNA, či RNA

6.5.4 LYASY

- katalyzují odštěpování malých molekul (H_2O , CO_2 , ...), nebo jejich vnášení za tvorby vazeb
- C-C, C-O, C-N, pokud jejich vznik není energeticky náročný

6.5.5 IZOMERÁZY

- katalyzují vnitřní přestavbu molekuly
- přesouvají atomy, nebo skupiny z jednoho atomu uhlíku na jiný
- mění polohu skupin na chirálním centru

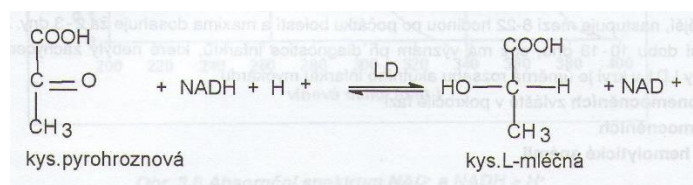
6.5.6 LIGASY

- katalyzují energeticky náročné reakce, obvykle spojení dvou molekul za současné spotřeby ATP
- uplatňují se při biosyntézách mnoha látek

6.5.6.1 OXIDOREDUKTÁZY

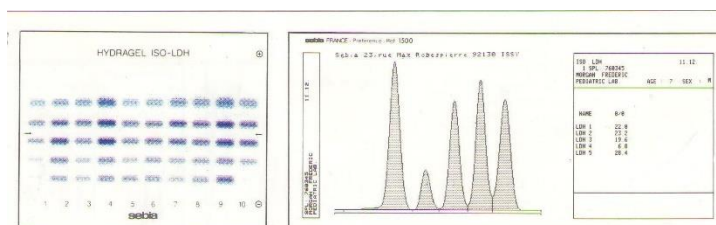
LD- laktátdehydrogenáza

- podílí se na poslední reakci anaerobní glykolýzy
- v této reakci je kyselina pyrohroznová redukována na laktát
- redukčním činidlem (dárce vodíků) je NADH + H⁺
- NADH + H⁺ se touto reakcí oxiduje na NAD⁺, což je nezbytné pro další průběh glykolýzy
- LD je obsažena v cytoplasmě buněk všech tkání organismu
- nejvíce je obsažena v kosterním svalstvu, ledvinách, srdci, lymfatických uzlinách, erythrocytech, v nádorových buňkách



Izoenzymy LD

- LD se skládá ze 4 bílkovinných podjednotek dvojího typu:
 - o podjednotky srdeční (myokardiální) označované H (z anglického heart)
 - o podjednotky svalové (muskulární) označované M (z anglického muscle)
- kombinací obou podjednotek v rámci tetrameru LD vznikne 5 izoenzymů:
- LD 1, LD 2, LD 3, LD 4, LD 5
- jelikož je LD obsažena ve všech tkáních, nemá měření celkové aktivity velký význam pro diferenciální diagnostiku
- orgánově specifitější je vyšetření izoenzymů LD



Klinický význam LD:

- zvýšení aktivity LD je pozorováno u:
 - a) poškození myokardu
 - b) nádorových onemocnění zvláště v pokročilé fázi
 - c) jaterních onemocnění
 - d) perniciozní a hemolytické anemie
 - e) leukémie

Biologický materiál

- vyšetření koncentrace katalytické aktivity LD se provádí v séru
- sérum nesmí být hemolytické (hodnoty LD v erytrocytech jsou až 150x vyšší oproti séru)

Princip stanovení LD

a) přeměna pyruvátu na laktát

- kinetické stanovení, při kterém se měří lineární pokles absorbance při 340 nm
- k poklesu absorbance dochází v důsledku úbytku NADH, který se mění na NAD^+
- vodíky jsou předávány pyruvátu, který je redukován na laktát

b) přeměna laktátu na pyruvát

- jedná se o obrácený směr reakce
- laktát je přeměněn na pyruvát za katalýzy LD a současně je redukován NAD^+ na $\text{NADH} + \text{H}^+$

Stanovení izoenzymů LD

- elektroforetický- elektroforéza probíhá na agaróze v prostředí barbitolového pufru o pH 8,4
- nejrychleji se k anodě pohybuje LD1, nejpomaleji migruje LD5

6.5.6.2 TRANSFERÁZY

Aminotransferázy

ALT- alaninaminotransferáza

- katalyzuje přenos aminoskupiny z alaninu na 2- oxoglutarát za vzniku pyruvátu a glutamátu
- prostetickou skupinou (kofaktor) je pyridoxal-5-fosfát (derivát vit. B6)
- enzym ALT je obsažen hlavně v játrech, dále ve svalech a v ledvinách, pankreatu, slezině a v plicích
- je lokalizován v cytoplazmě jaterních buněk (hepatocytů)
- do krevního oběhu se dostává již při malém poškození buněčné membrány
- ALT se stanovuje hlavně při podezření na jaterní onemocnění
- zvýšené hodnoty jsou:
 - a) při onemocnění jater
- při virové hepatitidě jsou jeho hodnoty zvýšené dříve, nežli se objeví typické příznaky onemocnění

- vrcholu dosahuje 7. - 12. den (zvýšení 20x – 100x)
- infekční mononukleóza se projevuje až 20 ti násobným zvýšením hodnoty ALT
- zvýšené hodnoty jsou u chronických onemocnění jater, toxické hepatitidy a při chorobách žlučových cest
 - b) při poškození svalstva – úrazem, zánětem, degenerativními procesy
 - c) dekompenzované srdeční vady – po IM, při oběhových selháních spojených s šokem, hypoxií

princip stanovení:

- ALT katalyzuje přenos aminoskupiny z L-alaninu na 2- oxoglutarát
- vzniká pyruvát a L-glutamát
- pyruvát je dále redukován laktátdehydrogenázou na laktát za současné oxidace NADH na NAD⁺
- s úbytkem NADH lineárně klesá úměrně aktivitě ALT absorbance měřená při 340 nm (fotometrické kinetické měření)
- stanovení se provádí v séru

AST- aspartátaminotransferáza

- katalyzuje přenos aminoskupiny z aspartátu na 2- oxoglutarát za vzniku oxalacetátu a glutamátu
- prostetickou skupinou (kofaktor) je pyridoxal-5-fosfát (derivát vit. B6)
- AST je obsažena převážně v cytoplazmě buněk, částečně v mitochondriích
- v séru zdravých lidí lze stanovit pouze cytoplazmatický izoenzym
- AST je nejvíce obsažena v játrech, srdci, kosterním svalstvu, ledvinách a v erytrocytech
- zvýšená aktivita v séru bývá u:
 - a) onemocnění srdce – hlavně při nekróze provázející IM
 - b) onemocnění jater – zvyšuje se u infekční hepatitidy a velmi výrazně u toxické hepatitidy, např. otrava alkoholem
 - c) onemocnění kosterního svalstva – úraz, degenerativní svalové onemocnění (svalová dystrofie)

Princip stanovení:

- AST katalyzuje přenos aminoskupiny z L-aspartátu na 2- oxoglutarát
- vzniká oxalacetát a glutamát
- oxalacetát je dále redukován malátdehydrogenázou na malát, za současné tvorby NAD⁺
- měření probíhá kineticky – sleduje se pokles absorbance při 340 nm způsobený úbytkem NADH
- stanovení se provádí v séru
- protože je AST obsažena v erytrocytech, nesmí být sérum hemolytické !!!

γ -glutamyltransferáza (GGT)

- katalyzuje přenos γ -glutamylu z jednoho peptidu na jiný peptid nebo aminokyselinu
- jedná se o transport aminokyselin z extracelulární tekutiny do buňky
- GMT se vyskytuje hlavně v epitelu žlučových cest, v ledvinných tubulech, játrech, pankreatu, střevě, erytrocytech, prostatě
- ke zvýšení aktivity GMT dochází u:
 - a) jaterních onemocnění – obecně je zvýšená při jakémkoliv jaterním onemocnění
- vysoké hodnoty GMT při současném zvýšení ALP svědčí zpravidla o obstrukční hepatitidě (uzávěr žlučových cest)
 - b) maligních nádorových onemocnění – hlavně u karcinomu pankreatu, a metastázách zhoubných nádorů do jater

Princip stanovení GMT

- a) metoda s nerozpustným substrátem
 - GMT katalyzuje přenos γ -glutamylu ze substrátu na dipeptid glycylglycin
 - při reakci se uvolňuje 4 - nitroanilin, který má žluté zabarvení, jehož intenzita, měřená fotometricky je mírou aktivity enzymu
- b) metoda s rozpustným substrátem
 - je přesnější
 - γ -glutamyl je opět přenášen na dipeptid glycylglycin
 - při reakci se odštěpuje 5 - amino -2- nitrobenzoát, jehož absorbance je přímo úměrná katalytické aktivitě enzymu

CK- kreatinkináza

- katalyzuje přeměnu kreatinu na kreatinfosfát jehož prostřednictvím se přeměňuje energie ATP na svalovou práci
- reakce může probíhat i zpětně podle metabolických potřeb organismu
- kreatinfosfát je důležitou rezervou energie v pracujícím svalu
- ATP dodává energii nutnou pro svalovou kontrakci
- v buňce je lokalizován v cytoplazmě a v mitochondriích buněk kosterního svalstva, srdce a mozku
- molekula CK se skládá ze dvou podjednotek 2 typů (M – muscle, B- brain) a tvoří 3 izoenzymy:
 - CK – MM – svalový (normálně je ho nejvíce)
 - CK – MB – srdeční
 - CK – BB – mozkový
- ve tkáních jsou všechny izoenzymy, liší se však svým poměrným zastoupením

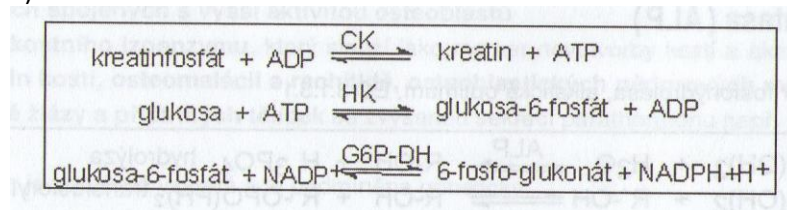
- v séru zdravých osob je CK tvořena z více než 95 % izoenzymem CK-MM, zbytek připadá na CK-MB, mozkový izoenzym CK-BB se v séru zdravých osob prakticky nevyskytuje

Zvýšená aktivita CK bývá u:

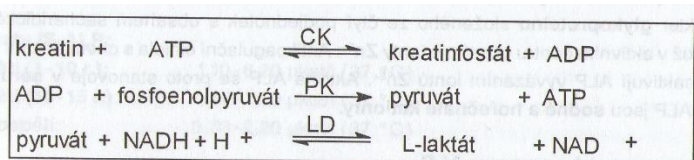
- a) onemocnění srdce – hlavně při infarktu myokardu (IM)
 - CK není dostatečně citlivým parametrem pro diagnostiku IM, zvyšuje se až po 4 hodinách od začátku bolesti a není prokazatelný u pozdě diagnostikovatelných infarktů, protože se vrací k fyziologickým hodnotám přibližně za 3 -5 dní po infarktu
- b) onemocnění svalů – při poškození svalových buněk zánětem, traumatem, operací, výraznou svalovou námahou nebo degenerativním svalovým onemocněním se vyplavuje do krevního oběhu izoenzym CK-MM
- c) onemocnění centrální nervové soustavy (CNS) – úměrně s rozsahem poškození se zvyšuje aktivita CK-BB

Principy stanovení CK

1. kreatinfosfát
 - a) kreatinfosfát s ADP je účinkem kreatinkinázy převeden na kreatin za vzniku ATP
 - b) ATP je využito k fosforylaci glukózy na glukózo-6-fosfát, reakce je katalyzována hexokinázou (HK)
 - c) glukózo-6-fosfát je oxidován účinkem glukózo-6-fosfátdehydrogenázy (G6PDH) na 6 - fosfo-glukonát s přenosem vodíku na NADP⁺ za vzniku NADPH
 - d) přírůstek koncentrace NADPH vyvolá nárůst absorpance při 340 nm, který je úměrný aktivitě CK
 - e)



2. kreatin
 - a) kreatin reaguje s ATP za vzniku kreatinfosfátu a ADP, reakci katalyzuje CK
 - b) ADP reaguje s fosfoenolpyruvátem působením enzymu pyruvátkinázy (PK) na pyruvát a ATP
 - c) pyruvát je účinkem laktátdehydrogenázy (LD) s koenzymem NADH redukován na laktát a NAD⁺
 - d) úbytek NADH se projeví poklesem absorpance při 340 nm a tento pokles je úměrný aktivitě CK



Biochemická diagnostika IM (infarkt myokardu)

a) Troponiny

- podílejí se na regulaci svalové kontrakce
- po IM se jejich koncentrace zvyšuje zhruba za 4 hod., ale zůstává zvýšená až 2 týdny
- hodnota troponinů je po IM až 300x vyšší, nežli před srdeční příhodou
- jsou přítomné i v kosterních svaích, ale jejich zvýšená hodnota je typická pro IM

b) Myoglobin

- je svalová cytoplazmatická bílkovina
- v krvi se objevuje za 30 – 120 min. po IM
- má malou molekulu, proto prochází zdravým glomerulem do moče a jeho koncentrace v krvi se rychle stabilizuje
- nevýhodou pro diagnostiku IM je jeho přítomnost nejen v srdečním, ale i v kosterním svalu

c) Imunochemické stanovení CK-MB „mass“

- jedná se o stanovení antigenu CK-MB
- nestanovuje se aktivita CK-MB, ale prokáží se částečně degradované molekuly, které enzymovou aktivitu ztratily, ale dosud reagují se specifickou protilátkou

6.5.6.3 HYDROLÁZY

Alkalická fosfatáza (ALP)

- ALP odštěpuje kyselinu trihydrogenfosforečnou z jejich sloučenin v alkalickém prostředí
- enzym je složen ze 4 podjednotek
- je obsažena ve dvanáctníku, tenkém střevě, kostech, játrech, ledvinách, placentě
- v erythrocytech je ve vyšší koncentraci nežli v séru, proto se neprovádí její stanovení v hemolytickém séru
- má izoenzymy – kostní, střevní, jaterní, placentární (pouze u těhotných žen)
- u zdravých dospělých osob v séru převažuje jaterní izoenzym, vedle kostního a střevního
- u dětí je 2-3x vyšší aktivita ALP nežli u dospělých a převažuje u nich kostní izoenzym
- během těhotenství jsou též zvýšené hodnoty ALP – narůstá aktivita placentárního izoenzymu

- ALP je významná pro růst a přestavbu kostí, metabolismus glycidů a pro výživu (správnou resorpci ze střev).

Ke zvýšené aktivitě ALP dochází při:

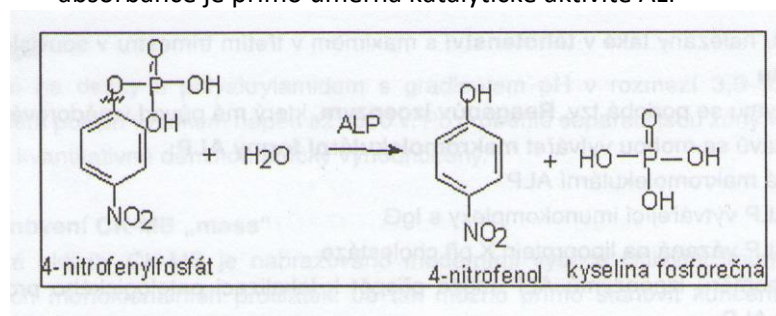
- cholestáze – zastavení odtoku žluči do duodena, příčinou bývá uzávěr žlučových cest kamenem či nádorem
- nádorových onemocnění jater – zejména při metastázách do jater
- zánětlivých onemocnění střev
- kostních procesech spojených s vyšší aktivitou osteoblastů – hojení zlomenin kostí, osteomalacie, rachitis, nádorové metastázy do kostí, hyperfunkce štítné žlázy a příštítných tělísek

Snížená aktivita ALP je vzácná a je podmíněna geneticky

Referenční rozmezí: dospělí: 0,70 – 2,20 μ kat/l

Princip stanovení ALP

- ALP katalyzuje štěpení substrátu 4 - nitrofenylfosfátu v alkalickém prostředí
- hydrolyticky se odštěpí žlutě zbarvený 4 - nitrofenol, jehož absorbance je přímo úměrná katalytické aktivitě ALP



Stanovení izoenzymů ALP

- využívají se při cíleném stanovení izoenzymů

 - tepelná inaktivace – vyšetřovaný vzorek séra se inkubuje 15 min. při $56^\circ C$
 - kostní a zčásti jaterní izoenzym je termolabilní (inaktivují se), placentární a nádorové izoenzymy jsou termostabilní
 - inaktivace inhibitory – různé izoenzymy mohou být inhibovány určitými chemickými látkami
 - elektroforetické metody – využívají rozdílné rychlosti pohybu izoenzymů v elektrickém poli
 - imunochemické metody – používají se specifické monoklonální protilátky proti jednotlivým izoenzymům

- prostatický izoenzym je inhibován L-vínanem (tartarát), takže se vedle celkové ACP stanoví tzv. tartarát rezistentní frakce ACP_{ts}
- aktivita ACP se získá jejím odečtením od celkové aktivity ACP

$$A_{ACPp} = A_{ACP} - A_{ACPts}$$

- pro diagnostiku karcinomu prostaty a monitorování průběhu léčby se v současné době více využívá stanovení prostatického specifického antigenu (PSA)

α-amyláza (α-AMS)

- katalyzuje hydrolytické štěpení glykosidických vazeb v lineárních polysacharidových řetězcích škrobu a glykogenu
- α-AMS je sekretorický enzym, produkováný a vylučovaný pankreatem a slinnými žlázami
- má dva izoenzymy – **slinný, pankreatický**
- α-AMS má malou molekulu, v glomerulech se profiltruje, v tubulech se z 50% vstřebává, zbytek je vylučován močí
- slinný izoenzym může vzácně vytvářet imunokomplexy s IgG nebo s IgA, tím dochází k makroamylasemii = amyláza má velkou molekulu a nemůže se přefiltrovat do moče
- aktivita AMS je zvýšena nejčastěji při:
 - a) akutním zánětu pankreatu
 - b) zánětu příušních žláz
 - c) onemocnění jater
 - d) nádorových onemocnění – u některých nádorů se může amyláza vázat na bílkoviny, vznikají makromolekulární komplexy, které se nemohou přefiltrovat do moči (makroamylasemie) - v tomto případě má AMS v séru vysokou a v moči nízkou hodnotu
- stanovení AMS se provádí v séru a v moči

Princip stanovení α-AMS

- substrátem je oligosacharid, který je na konci řetězce značen chromogenem 4 -nitrofenolem
- v alkalickém prostředí dochází účinkem AMS k hydrolytickému odštěpení
- 4 - nitrofenolátového aniontu z molekuly substrátu
- 4 - nitrofenolátový aniont dává žluté zabarvení, jehož intenzita se měří fotometricky a je přímo úměrná katalytické aktivitě amylázy

Lipáza (LPS)

- katalyzuje hydrolýzu TAG tak, že nejprve štěpí esterovou vazbu na prvním a třetím uhlíku glycerolu
- vznikají monoacylglyceroly, které jsou resorbovány sliznicí tenkého střeva
- pro účinné fungování enzymu je nezbytná přítomnost žlučových kyselin ze žluče, které emulgují tuky
- v organismu se vyskytuje několik druhů lipáz:

- a) pankreatická lipáza – vylučovaná pankreatem do duodena
- b) jaterní lipáza
- c) lipoproteinová lipáza – tvořená v cévním endotelu

- stanovení LPS v séru slouží k diagnostice onemocnění pankreatu – akutní a chronická pankreatitida
- vyšetření lipázy je při tomto onemocnění vhodnější, nežli vyšetření AMS, neboť LPS má rychlejší a výraznější vzestup

Principy stanovení LPS

Turbidimetrická metoda

- LPS katalyzuje štěpení emulze substrátu trioleinu na monoacylglycerol a kyselinu olejovou
- snižování zákalu vede k poklesu absorpance, které je úměrné katalytické koncentraci lipázy

Kolorimetrická metoda

- využívá specifický chromogenní substrát ester kyseliny glutarové emulgovaný žlučovými kyselinami
- lipáza tento substrát v alkalickém prostředí rozkládá za vzniku červeného zbarvení, jehož intenzita je úměrná aktivitě LPS

Kontrolní otázky

1. Z čeho se skládá enzym?
 2. Jak dělíme enzymy?
 3. Charakterizujte oxidoreduktázy
 4. Vyjmenujte transferázy
 5. Jaký je význam amylázy?
-

Místo pro doplnění



Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, M., BREINEK, P. *Klinická biochemie, bakalářský obor Zdravotní laborant* 2. vydání, Brno: Coprint s.r.o., 2011. ISBN 978-80-87192-18-4

Racek, J., Rajdl, D., *Klinická biochemie* 3 vydání, Praha 5: Galén, 2021

ISBN 978-80-7492-545-0

Matouš. B., *Základy lékařské chemie a biochemie* 1. vydání, Praha 5: Galén 2010. ISBN 978-80-7262-702-8

7 Lipidy a lipoproteiny

D.PARTLOVÁ

Anotace, abstrakt

Lipidy jsou složením a funkčně velmi různorodé látky, mají různé fyzikální a chemické vlastnosti. Jsou základními stavebními kameny membránových buněčných útvarů, slouží k zajištění energie, tvoří izolační vrstvu orgánů. V krvi jsou lipidy součástí krevních lipoproteinů, mastné kyseliny jsou vázány na albumin.

Cíl kapitoly

Seznámení se základní charakteristikou a rozdělením lipidů a lipoproteinů, základním dělení dyslipoproteinémií, aterosklerózou

Klíčová slova

Lipidy, lipoproteiny, dyslipoproteinémie, ateroskleróza, rizikové faktory

7.1 LIPIDY A LIPOPROTEINY

- lipidy tvoří velmi nesoudržnou skupinu látek, jejichž společnou vlastností je částečná nebo úplná nerozpustnost ve vodě
- lipidy jsou dobře rozpustné v nepolárních (organických) rozpouštědlech např. benzen, chloroform
- základní složkou jednoduchých i složených lipidů jsou mastné kyseliny (MK)
- v lidském organismu jsou nejvíce zastoupeny MK se sudým počtem uhlíků (12 – 24)
- mastné kyseliny mohou být:
 - a) nasycené – mají mezi uhlíky v řetězci pouze jednoduché vazby, např. kyselina palmitová, stearová, arachidová
 - b) nenasycené – mají mezi uhlíky v řetězci jednoduché i dvojné vazby, např. kyselina linolová, linolenová, arachidonová
- v živočišných tucích převládají nasycené MK
- MK se v živých organismech vyskytují převážně ve formě esterů s alkoholy



7.2 Rozdělení lipidů

7.2.1 Jednoduché lipidy

- estery MK s alkoholy
do této skupiny patří:

a)acylglyceroly – estery MK s alkoholem glycerolem, např.

triacylglyceroly

b)vosky – estery MK s vyššími alifatickými alkoholy

c)steroidy – estery vyšších mastných kyselin se steroidními alkoholy, např. estery cholesterolu

7.2.2 Složené lipidy

- mají ve své struktuře kromě MK a alkoholu ještě další skupinu – fosfatovou, aminoalkoholovou, sulfátovou ...
- tyto další skupiny mají kladný nebo záporný náboj a představují tak polární část molekuly lipidu
- takovéto lipidy se označují jako **amfipatické** – skládají se z nepolárního úseku např. alifatického řetězce MK a polární hlavičky, která je **hydrofilní** a orientuje se k vodné fázi
- tyto lipidy vytvářejí **dvojvrstvy**, které jsou základem **biomembrán**
- příkladem složených lipidů jsou: **lipoproteiny, glykolipidy, sfingolipidy** aj.

7.3 Význam lipidů

- jsou součástí všech živých buněk, kde slouží jako:
 - o zdroj energie – triacylglyceroly v tukové tkáni
 - o součást biomembrán – fosfolipidová dvojvrstva, cholesterol
 - o biokatalyzátory – vitamíny A, D a hormony (steroidní)
 - o izolační vrstva – zabraňují tepelným ztrátám nebo vysoušení (vosky na listech, kůži, peří, podkožní tuk)
 - o ochrana orgánů – např. ledvin před mechanickým poškozením

7.4 Triacylglyceroly (TAG, TG)

- TAG uložené v tukové tkáni tvoří hlavní zásobárnu energie v organismu
- v těle dospělého člověka (při hmotnosti 70 kg) je to cca 15 kg TAG podléhají rychlému katabolismu (lipolýze) a biosyntéze podle potřeb organismu
- hladina TAG se během dne mění, proto je nutné provádět odběr krve na vyšetření po **12 hodinovém lačnění**

Stanovení TAG

- provádí se v séru nebo v plazmě, z krve odebrané po 10 -12 hodinovém lačnění
- **referenční rozmezí: 0,45 - 1,70 mmol/l**

zvýšené hodnoty: (hypertriacylglycerolemie)

- geneticky podmíněné poruchy metabolismu lipoproteinů
- diabetes mellitus (neléčený nebo špatně léčený)
- alkoholismus
- jaterní onemocnění
- dna
- pankreatitida aj.

snižené hodnoty: (hypotriacylglycerolémie)

- dědičné poruchy metabolismu lipoproteinů
- hodnotu mohou snižovat i některé léky

princip stanovení:

enzymatické fotometrické stanovení

metoda zahrnuje několik po sobě jdoucích enzymatických reakcí

1) TAG jsou hydrolyzovány pomocí lipoproteinové lipázy na glycerol a volné MK

2) glycerol je ATP fosforylován na glycerol-3-fosfát, uvolní se ADP, reakce je katalyzována glycerolkinázou

tyto dvě reakce jsou společné pro všechny enzymatické metody stanovení TAG

metoda GPO – PAP (glycerol-3- fosfát oxidáza –peroxidáza)

3) glycerol-3-fosfát je oxidován za katalytického působení glycerol-3-fosfát oxidázy (GPO) na dihydroxyacetonfosfát a peroxid vodíku

4) peroxid vodíku je stanoven tzv. Trinderovou reakcí, katalyzovanou peroxidázou

peroxidáza uvolní z peroxidu vodíku kyslík, který vyvolá oxidační kopulaci substituovaného fenolu se 4- aminofenazonem na červeně zbarvený komplex, jehož absorbance je úměrná koncentraci TAG

fotometrické stanovení TAG v UV oblasti

7.5 Cholesterol

- je hlavním živočišným steroidem
- je odvozen od **cholestanu** – polycyklického uhlovodíku s 27 uhlíky v molekule
- v lidském organismu je cca 100g cholesterolu
- nejvíce se ho nachází v buněčných membránách, mnohem méně v plazmě
- žlučí se vyloučí denně cca 1 g cholesterolu
- cholesterol se **z poloviny syntetizuje v těle**, druhá **polovina je získána z potravy** živočišného původu
- **biosyntéza** cholesterolu probíhá prakticky ve všech tkáních těla, nejvíce **v játrech**, ve **střevě** a v **kůži**
- většina cholesterolu je v těle přítomna ve formě esterů s mastnými kyselinami

význam cholesterolu:

- a) je součástí buněčných membrán a lipoproteinů
- b) je výchozí látkou pro syntézu steroidních hormonů, žlučových kyselin, vitamínu D
- c) v nervové tkáni se podílí na tvorbě myelinových pochv

Stanovení cholesterolu se provádí v **séru** nebo v **plazmě**

vyšší hladina cholesterolu v krvi je hlavním rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění

- **referenční rozmezí: 2,90 – 5,0 mmol/l**

zvýšená koncentrace: (hypercholesterolemie)

- diabetes mellitus
- kardiovaskulární onemocnění
- nefrotický syndrom = chronické onemocnění ledvin
- hypofunkce štítné žlázy aj.

snížená koncentrace (hypocholesterolemie)

- těžké poškození jater
- hladovění
- hyperthyreóza
- dlouhodobá léčba kortikoidy aj.

Stanovení cholesterolu

odběr krve se provádí po 12 hodinovém lačnění

Princip stanovení:

enzymatické fotometrické stanovení – výsledkem tří po sobě následujících, enzymatických reakcí, je vznik červeného zabarvení, které se měří fotometricky

1) hydrolýza esterů cholesterolu katalyzovaná enzymem **cholesterolesterázou** – vzniká cholesterol a volná mastná kyselina

2) oxidace cholesterolu za katalýzy enzymem cholesteroxidázou – vzniká

- Δ^4 -cholestenon a peroxid vodíku

3) peroxidáza uvolní z peroxidu vodíku kyslík, který vyvolá oxidační kopulaci substituovaného fenolu se 4- aminofenazonem na červeně zbarvený komplex, jehož absorpance je úměrná koncentraci cholesterolu

7.6 Transport lipidů

- lipidy se vstřebávají ve sliznici tenkého střeva, odkud přecházejí do lymfy, nebo do krevního oběhu
- stejným způsobem jsou transportovány lipidy, které se uvolňují z tukových zásob (tuková tkáň) nebo z jater
- protože se pohybují ve vodním prostředí (hydrofilní – tuky se s ním neslučují), váží se na bílkovinný nosič
- MK se středně dlouhým řetězcem (do 15 C) se transportují ve vazbě na albumin
- napolární lipidy (hlavně TAG a cholesterol) jsou transportovány ve formě lipoproteinů

Lipoproteiny (LP)

- jsou částice tvořené **lipidy** a **apolipoproteiny** (specifické proteiny)
- jádro lipoproteinů je **hydrofobní** a je tvořeno **TAG** a **estery cholesterolu**
- povrch lipoproteinů je tvořen jednou vrstvou fosfolipidů, do níž jsou zabudovány apolipoproteiny a v níž se volně pohybuje volný cholesterol

7.7 Rozdělení lipoproteinů

7.7.1 Podle hustoty na základě ultracentrifugace

- 1) Chylomikrony
- 2) Lipoproteiny o velmi nízké hustotě – **VLDL** „very low density lipoprotein“
- 3) Lipoproteiny o střední (intermediární) hustotě – **IDL** „intermediary density lipoprotein“
- 4) Lipoproteiny o nízké hustotě – **LDL** „low density lipoprotein“
- 5) Lipoproteiny o vysoké hustotě – **HDL** „high density lipoprotein“

7.7.2 Podle elektroforetické pohyblivosti

- LP se pohybují ve stejnosměrném elektrickém poli = **elektroforézou**
- k dělení se jako nosič používá agarosový gel a barbitolový puf o pH 8,6
- rozdělené frakce jsou barveny sudanovou černí
- metoda je pouze orientační

Elektroforeogram může obsahovat tyto frakce – v pořadí rostoucí elektroforetické pohyblivosti

- 1) **chylomikrony** – na startu
- 2) **β - lipoproteiny (LDL)**
- 3) **pre β - lipoproteiny (VLDL)**
- 4) **α_1 - lipoproteiny (HDL)**

7.7.3 Specifickým srážením (precipitací)

- kombinací polyaniontů s dvojmocnými kationty (kyselina fosfowolframová + MgCl_2 , dextran sulfan + MgCl_2)

7.7.4 Imunochemickými metodami

- ke stanovení se používají specifické protilátky proti jednotlivým apolipoproteinům

- reakcí antigenu s protilátkou vznikají imunokomplexy, které precipitují
- detekce se provádí turbidimetricky nebo nefelometricky

7.8 Apolipoproteiny

- regulují metabolismus plazmatických lipidů
- transportují lipidy v plazmě
- váží se na specifické receptory na plazmatické membráně buněk a tím zajišťují odstranění lipoproteinů z krevního oběhu
- stabilizují strukturu lipoproteinů

7.8.1 Apo A – I

- je hlavním apolipoproteinem HDL lipoproteinů
- je kofaktorem enzymu LCAT (lecithin: cholesterolacyltransferázy)
- katalyzuje esterifikaci volného cholesterolu
- referenční rozmezí:
- muži: 1,0 – 1,5 g/l
- ženy: 1,1 – 1,6 g/l
- vysoké riziko: ≤ 0,9 g/l

7.8.2 Apo B

- má dva podtypy:

apo B - 100

tvorí se v játrech, kde je nezbytný pro tvorbu a transport VLDL lipoproteinů

- je také hlavním apolipoproteinem LDL lipoproteinů
- váže se na specifické receptory v membránách buněk (apo B – receptory) a umožňuje tak průnik LDL do buněk periferních tkání

apo B – 48

je tvořen ve sliznici tenkého střeva

- je součástí chylomikronů – umožňuje jejich vstup z enterocytů do lymfatického systému
- referenční rozmezí:
- nízké riziko: < 0,90 g/l
- střední riziko: 1,20 – 1,40 g/l
- vysoké riziko: > 1,40 g/l

7.8.3 Apo C

- je kofaktorem enzymů, podílejících se na hydrolýze lipoproteinů bohatých na TAG

7.8.4 Apo E

- vyskytuje se ve všech třídách lipoproteinů

Stanovení apolipoproteinů

Imunochemické stanovení

principem je reakce antigenu s protilátkou

- k definovanému množství pacientova séra (antigen) se přidává odpovídající množství antiséra (protilátka)
- vzniknou imunokomplexy, jejich množství se měří nefelometricky nebo turbidimetricky

HDL – cholesterol

lipoproteiny HDL transportují v nich vázaný cholesterol (HDL-cholesterol) z tkání do jater a tím umožňují jeho odbourávání

tento cholesterol přechází do žluče

- **referenční rozmezí:**
- **muži: 0,9 – 1,4 mmol/l**
- **ženy: 1,2 – 1,7 mmol/l**

Stanovení HDL cholesterolu

a) fotometricky s precipitací

- ve vzorku se nejprve vysrážejí (precipitují) chylomikrony, VLDL a LDL lipoproteiny
- vysrážení se provádí precipitačním činidlem (kyselina fosfowolframová + $MgCl_2$)
- vznikne sraženina, která se odstraní centrifugací
- v supernatantu se následně stanoví obsah cholesterolu v HDL frakci stejnou metodou, jakou se provádí enzymatické stanovení celkového cholesterolu

b) přímé stanovení HDL cholesterolu

Stanovení LDL cholesterolu

- **referenční rozmezí:**
- **žádoucí: < 3,0 mmol/l**
- **vysoké riziko: > 4,1 mmol/l**

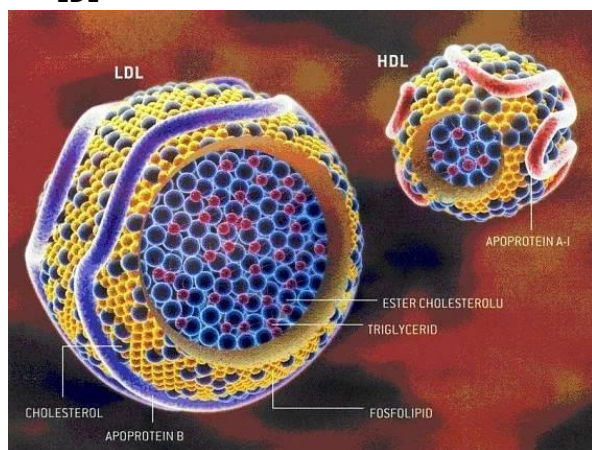
a) precipitační metoda

- využívá selektivního srážecího činidla, které sráží pouze částice LDL
- sraženina se oddělí centrifugací
- v supernatantu se stanoví enzymatickou metodou cholesterol, který zůstal v séru po odstranění LDL

- v dalším vzorku séra téhož pacienta se současně stanoví celkový cholesterol
- koncentrace LDL cholesterolu je rozdílem celkového cholesterolu a cholesterolu v supernatantu
- **LDL cholesterol = celkový cholesterol – cholesterol v supernatantu**
- metodu lze použít pouze tehdy, není-li koncentrace TAG > 4,5 mmol/l

b) přímé stanovení LDL cholesterolu

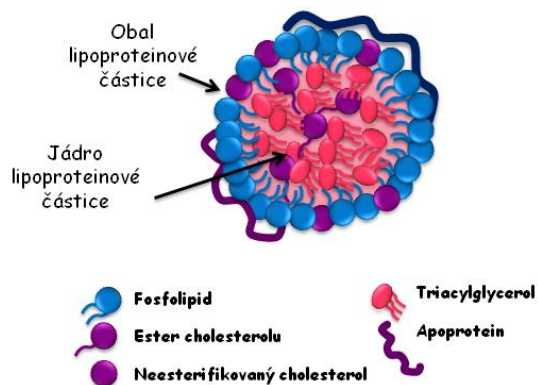
- ze séra jsou nejprve odstraněny lipoproteiny HDL a VLDL imunochemicky pomocí monoklonálních protilátek proti apo A-I a apo E, přítomných v HDL, VLDL a IDL
- protilátky jsou navázány na latexové částice
- po centrifugaci a separaci imunokomplexů se stanoví cholesterol v LDL



Obr.25 Částice LDL,HDL

7.9 Lipoproteiny plazmy

- složité částice, tvořené lipidovou a proteinovou složkou
 - umožňují přenos TAG na místo určení
 - střed lipoproteinové částice je tvořen **estery cholesterolu a TAG**
 - povrch je tvořen **apolipoproteiny, volným cholesterolem, fosfolipidy**
 - povrch částice má **hydrofilní** vlastnosti – umožňuje pohyb částice plazmou
- lipoproteiny lze elektroforeticky rozdělit na základě pohyblivosti v elektrickém poli a velikosti částic na několik frakcí:



Obr.26 Molekula lipoproteinů

7.9.1 Chylomikrony

- vznikají ve střevní stěně, obsahují velké množství **exogenních** TAG (TAG z potravy)
- přecházejí do lymfy a z ní do krevního oběhu
z krve zdravých lidí rychle mizí, neboť je zužitkovávají všechny tkáně kromě mozku (hlavně svalová tkáň), většinou jsou využity jako zdroj energie, část zůstává jako zásoba TAG, pochod štěpení katalyzuje **lipoproteinová lipáza – štěpí je na glycerol + MK**

7.9.2 VLDL

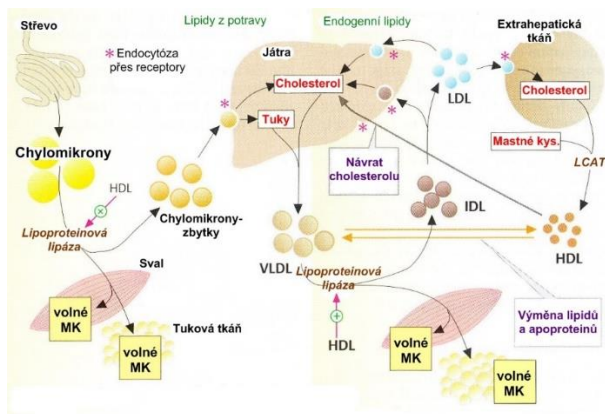
- přenášejí endogenní TAG (vytvořené v játrech, ne z potravy)
- jsou to menší částice nežli chylomikrony, lipoproteinová lipáza v krvi rozkládá jejich TAG a vznikají tzv. „zbytky VLDL“, tyto zbytky vychytávají játra, přestaví je na částice IDL a LDL a vyloučí do krevního oběhu, částice IDL se následně přestaví na LDL

7.9.3 LDL

- mají vysoký obsah cholesterolu, který transportují z jater do tkání
v buňkách tkání se proteiny (Apo B) mění na AMK – ty se vyloučí a esterifikovaný cholesterol se hydrolyzuje na MK a volný cholesterol

7.9.4 HDL

- HDL částice vychytávají přebytečný volný cholesterol z periferních buněk a esterifikují ho
- esterifikovaný cholesterol následně přenášejí z tkání do jater, v játrech z něho vznikají žlučové kyseliny, tyto částice obsahují hodně fosfolipidů a apolipoproteinů



Obr.27 Metabolismus lipoproteinů

7.10 Poruchy metabolismu lipoproteinů (dyslipoproteinemie)

- dyslipoproteinemie jsou metabolická onemocnění
- jejich typickým znakem jsou odchylky ve stavbě, složení a metabolismu lipoproteinů
- tyto odchylky se projevují patologickými hodnotami sérových lipidů = cholesterolu a TAG i bílkovin = apolipoproteinů
- porucha může nastat při syntéze a sekreci určitých tříd lipoproteinů nebo dochází k narušení jejich vzájemných poměrů a katabolismu

7.10.1 Klasifikace dyslipoproteinemií

7.10.1.1 Podle příčiny

- a) primární – vrozené, geneticky podmíněné mutací
 - v jednom genu = monogenní
 - ve více genech = polygenní
- b) sekundární - vyvolané jiným akutním či chronickým onemocněním

7.10.1.2 Podle hodnot cholesterolu a TAG v séru

- a) izolovaná hypercholesterolémie
- b) izolovaná hypertriacylglycerolémie
- c) kombinovaná hyperlipidémie

Primární dyslipoproteinemie – monogenní

a) primární cholesterolémie:

- jedná se o vrozené poruchy metabolismu lipidů

- příčinou je defektní gen pro LDL receptor
- v krvi se zvyšuje hladina LDL z důvodu jejich zvýšené produkce a nižšího vychytávání LDL buňkami, což je způsobeno menším počtem LDL receptorů nebo jejich abnormální strukturou
- tento defekt vede k rychlému rozvoji aterosklerózy, která má za následek vznik kardiovaskulárních onemocnění

b) vrozený defekt apo B – 100

- pacient má defektní apo B – 100, který není schopen se navázat na LDL receptor a tím umožnit průnik LDL do buňky

c) primární hyperchylomikronémie

- projevuje se poruchou odbourávání chylomikronů
- chylomikrony se hromadí v krvi, jejich koncentrace je vysoká, sérum je i nalačno mléčně zakalené
- po 24 hodinovém stání séra v lednici při 4°C se na hladině séra vytvoří vrstva chylomikronů, zatímco pod ní se sérum vyčeří
- příčinou může být buď chybní LPL (lipoproteinové lipázy), nebo defektní apo C – II, který je jejím kofaktorem

Primární dyslipoproteinémie – polygenní

a) hypercholesterolémie

- velmi časté civilizační onemocnění
- v krvi je zvýšený cholesterol
- zvýšené riziko aterosklerózy
- jedná se o kombinaci genetických příčin, životního stylu (výživa, stres, nedostatek pohybu, kouření, obezita...) a faktorů životního prostředí



Obr.28 xantomy

b) polygenní primární triacylglycerolémie

- projevuje se zvýšenou hladinou TAG, která je způsobena zvýšenou koncentrací VLDL
- příčinou je zvýšená syntéza VLDL v játrech nebo jejich snížený katabolismus

c) familiární kombinovaná hyperlipoproteinémie

- projevuje se zvýšenou koncentrací LDL cholesterolu
- příčinou je zvýšená syntéza apo B – 100 a VLDL

d) familiární dysbetalipoproteinémie

- projevuje se zvýšenou koncentrací celkového cholesterolu a TAG bez zvýšení LDL cholesterolu
- příčinou je hromadění IDL v krvi

e) familiární hyperlipoproteinémie typu V

- je typická zvýšenou koncentrací celkového cholesterolu, TAG a přítomností chylomikronů
- není spojena s vyšším rizikem aterosklerózy, ale přináší vyšší riziko akutní pankreatitidy

f) familiární hypolipoproteinémie

- projevují se většinou sníženou hladinou HDL cholesterolu
- výjimkou je familiární hypo- β - lipoproteinémie, která je provázena sníženou tvorbou LDL v játrech a tím je snížena i hladina LDL cholesterolu v krvi → snížené riziko kardiovaskulárních chorob

Sekundární dyslipoproteinémie

1) Hypercholesterolémie

Příčiny:

- hypotyreóza, nefrotický syndrom, cholestáza, léky (antiepileptika, některá diuretika), dieta s vysokým příjmem exogenního cholesterolu

2) Hypocholesterolémie – např. při hypertyreóze

3) Hypertriacylglycerolémie

diabetes mellitus

- nedostatek inzulínu vede ke zvýšenému odbourávání TAG a tím ke zvyšování koncentrace volných mastných kyselin v krvi
 - to vyvolá vyšší jaterní syntézu TAG a tedy i VLDL v játrech
 - diabetici mají zvýšenou koncentraci TAG, cholesterolu, LDL cholesterolu a sníženou koncentraci HDL cholesterolu
- metabolický syndrom X
- jedná se o soubor příznaků, které vedou k urychlení rozvoje aterosklerózy a často ke vzniku diabetu 2. typu
 - inzulín je rezistentní vůči receptorům v plazmatické membráně buněk
 - v krvi se zvyšuje hladina glykémie, kyseliny močové a TAG
 - k dalším projevům tohoto syndromu patří obezita, hypertenze, poruchy krevní srážlivosti

obezita

hypotyreóza

alkoholismus – odbouráváním alkoholu vzniká v játrech acetyl – Co A, který je výchozí látkou pro biosyntézu MK, z nichž dále vznikají TAG a lipoproteiny VLDL

léčiva – estrogeny, některé léky snižující krevní tlak

hepatopatie

stresová hyperlipoproteinémie – např. u infarktu myokardu, rozsáhlých popálenin, emocionálním stresu – ve zvýšené míře se odbourávají volné mastné kyseliny z tukové tkáně

- ve zvýšené míře se tvoří TAG a VLDL v játrech a jsou uvolňovány do krevního oběhu
- hladina cholesterolu v krvi je snížena

7.11 Ateroskleróza

- Chronický zánětlivý proces v cévní stěně, doprovázený akumulací cholesterolu, vazivové tkáně a dalších komponent pod cévní výstelkou
- při tomto onemocnění se ukládají lipidy a další krevní součásti v cévní stěně, čímž céva ztrácí pružnost, a dochází k jejímu zúžení
- k rozvoji tohoto onemocnění přispívá více než 200 tzv. rizikových faktorů

tyto faktory jsou:

- **neovlivnitelné** – mužské pohlaví, věk, genetická dispozice
- **ovlivnitelné** – životní styl (obezita, pohyb, kouření), některé choroby (hypertenze, DM, dna, metabolický syndrom X aj.)

7.11.1 Patogeneze aterosklerózy

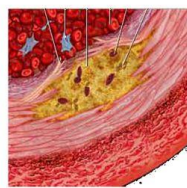
- probíhá desítky let bez zjevných příznaků
- prvním krokem je pravděpodobně **poškození endotelových buněk** (hypertenze, CO – kuřáci, působením volných radikálů, viry...)
- k poškozenému endotelu přilnou trombocyty, které uvolňují růstový faktor podporující **proliferaci buněk hladkého svalstva cévní stěny**
- do míst poškozeného endotelu pronikají monocyty, které se mění na **makrofágy**
- makrofágy intenzivně pohlcují lipoproteiny – nazývají se pěnové buňky
- po odumření pěnových buněk dochází k vylití jejich buněčného obsahu v místě poškozené cévní stěny
- proliferací (bujením) vaziva a hladké svaloviny cévní stěny vzniká tzv. **fibrózní plát**, v němž se později mohou ukládat i kalciové soli
- těmito pochody dochází postupně k zužování průsvitu cév a zvýšené možnosti vzniku **trombu**
- ateroskleróza vede ke kardiovaskulárním onemocněním – ischemická choroba srdce a dolních končetin, IM, mozková mrtvice
- k odhadu rizika aterosklerózy se používá mnoho indexů, vyjadřujících poměr měřených parametrů lipidového metabolismu



Ateroskleróza

Patogeneze aterosklerózy - uplatňuje více mechanismů:

1. „endotelální“ - mechanické poškození endotelu a cévní stěny
2. „zánětlivý“
3. „lipidový“ - metabolické poškození



Obr.29 Patogeneze aterosklerózy

7.11.2 Indexy rizika aterogeneze

CHOL – C/ HDL – C	< 3	nízké riziko
	3 – 5	střední riziko
	> 5	vyšší riziko
LDL – C/ HDL – C	<1,5	nízké riziko
	1,5– 2	střední riziko
	> 2	vysoké riziko

Kontrolní otázky

1. Rozdělení lipidů a jejich význam
2. Co jsou to lipoproteiny?
3. Charakterizujte aterosklerózu a popište její rizikové faktory?
4. Co jsou sekundární dyslipoproteinémie?
5. Doporučená doba lačnění před odběrem na lipidy?
6. Aterogenní index slouží k odhadu?

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, M., BREINEK, P. *Klinická biochemie, bakalářský obor Zdravotní laborant* 2. vydání, Brno: Coprint s.r.o., 2011. ISBN 978-80-87192-18-4
Racek, J., Rajdl, D., *Klinická biochemie 3 vydání*, Praha 5: Galén, 2021
ISBN 978-80-7492-545-0
Matouš. B., *Základy lékařské chemie a biochemie 1. vydání*, Praha 5: Galén
2010. ISBN 978-80-7262-702-8



8 Acidobazická rovnováha a metabolismus kyslíku

D.PARTLOVÁ

Anotace, abstrakt

Podstatou života z biochemického hlediska jsou metabolické děje, při nichž dochází ke vzniku energie (ve formě ATP) a substrátů potřebných pro enzymatické reakce

Cíl kapitoly

Seznámení se základy acidobazické rovnováhy a metabolismu kyslíku, se základním rozdělením a charakteristikou poruch acidobazické rovnováhy

Klíčová slova

Acidobazická rovnováha, nárazníkové systémy, pufr, kyslík, oxid uhličitý, Handersonova-Hasellbachova rovnice acidóza, alkalóza, hypokapnie, hyperkapnie

Podstatou života z biochemického hlediska jsou metabolické děje, při nichž dochází ke vzniku energie (ve formě ATP) a substrátů potřebných pro enzymatické reakce

- při těchto procesech jsou rozkládány složité uhlíkaté sloučeniny na látky jednodušší, které mají převážně kyselou povahu
- organismus má vyvinuté mechanismy k udržení stálé hodnoty koncentrace vodíkových iontů v krvi, neboli pH krve
- optimální hodnota pH krve je 7,4 (7,36 – 7,44)
- za patologických stavů (metabolické rozvraty, např. úrazy, popáleniny, selhání funkce jater, ledvin..., dekompenzovaný diabetes, nedonošené děti) se pH krve mění
- při velkém vychýlení pH - > 7,8 a <6,8 dochází k selhání životních funkcí
- laboratoř KLB vyšetřuje u pacientů tyto parametry ABR:

pH krve

pCO₂

pO₂

- tyto tři parametry se měří pomocí elektrod
- další parametry se vypočítávají z těchto změřených hodnot standardní a

aktuální HCO₃⁻



BB = Buffer Base (celkové báze)

BE = Base Excess (přebytek nebo nedostatek bází)

poruchy ABR postihují celé vnitřní prostředí organismu (extracelulární i intracelulární tekutinu)

Zajišťování stálé koncentrace vodíkových iontů

- během metabolických pochodů v organismu dochází k oxidoredukčním reakcím, při kterých vznikají v těle kyseliny a báze (zásady), které musí být neustále neutralizovány a vylučovány z těla, aby bylo udrženo stálé pH
- tělo k tomuto účelu využívá:
 - a) nárazníkové roztoky
 - b) regulační funkci plic a ledvin

8.1 Nárazníkové roztoky= pufry= pufrční roztoky= tlumivé roztoky

- jedná se o roztoky, které udržují stálé pH i tehdy, přidá-li se k nim kyselina nebo báze (zásada)
- skládají se ze směsi slabých kyselin a jejich solí, nebo slabých bází a jejich solí
- kyseliny jsou schopné uvolňovat proton (vodíkový iont), báze ho přijímají
- odstraněním protonu se z kyseliny stává konjugovaná báze (aniont kyseliny)
- přidáním protonu k bázi vzniká konjugovaná kyselina
- koncentrace vodíkových iontů závisí na poměru koncentrací konjugovaných kyselin a konjugovaných bází

(konjugovaná kyselina)

$$(\text{H}^+) = K \cdot \frac{\text{---}}{\text{---}}$$

(konjugovaná báze)

K = disociační konstanta kyseliny – vyjadřuje, jaký podíl kyseliny je v roztoku ve formě celé kyseliny a jaký podíl je disociován (rozdělen na ionty)

$$K = \frac{(\text{H}^+) \cdot (\text{A}^-)}{(\text{HA})}$$

disociace na ionty
celá molekula

H⁺ vodíkový iont

A⁻ anion

koncentrace vodíkových iontů se vyjadřuje hodnotou pH

- pH = záporný dekadický logaritmus molární aktivity vodíkových iontů
- Hendersonova –Hasselbachova rovnice:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{(konjugovaná báze)}}{\text{(konjugovaná kyselina)}}$$

- v organismu je hlavní zdroj kyselé reakce CO₂
- denně se ho vytvoří cca 330 l
- toto množství CO₂ odpovídá asi 20 mol vodíkových iontů, které se musí z těla vyloučit, aby se radikálně nesnížilo pH

8.2 Nárazníkové roztoky organismu

8.2.1 Hydrogenuhličitanový nárazníkový systém

- má ze všech pufracích systémů největší význam pro udržení stálého pH krve
- jedná se o otevřený systém, který může odebírat tkáním CO₂ a vylučovat jej vydechováním
- za fyziologických podmínek se vyloučí plícemi tolik CO₂, kolik se ho vytvořilo ve tkáních
CO₂ se v organismu vyskytuje ve třech formách:
 - a) plynný CO₂, fyzikálně rozpuštěný
 - b) ve formě kyseliny uhličitě – H₂CO₃
 - c) ve formě jejích solí – HCO₃⁻

vylučování plícemi $\leftarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \rightarrow$ vylučování ledvinami

hydratační reakce

disociační reakce

- směr reakce je dán koncentrací CO_2
- je-li jeho koncentrace vysoká probíhá hydratační reakce a vzniká H_2CO_3
- je-li jeho koncentrace nízká, probíhá disociační reakce a H_2CO_3 disociuje na H^+ a HCO_3^-
- vodíkové ionty vznikající metabolickými pochody jsou neutralizovány vazbou na H_2CO_3 a vyloučeny plícemi ve formě CO_2 , nebo ledvinami ve formě HCO_3^-
- tímto způsobem se plíce a ledviny podílejí na regulaci vnitřního prostředí organismu
- koncentrace kyseliny uhličitě v plazmě ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{CO}_3$) je za normálních okolností 1,2 mmol/l a koncentrace HCO_3^- kolem 24 mmol/l

Hendersonova- Hasselbachova reakce pro hydrogenuhličitánový nárazník:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{HCO}_3^-}{(\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{CO}_3)}$$

záporný logaritmus disociační konstanty kyseliny uhličitě $\text{pK} = 6,1$

po dosazení:

$$\text{pH} = 6,1 + \log \frac{24}{1,2} = 6,1 + \log 20 = 6,1 + 1,3 = 7,4$$

Mezi bazickou (HCO_3^-) a kyselou složkou (H_2CO_3) hydrogenuhličitánového nárazníku se musí udržovat stálý poměr $24 : 1,2 = 20$, aby se pH udrželo na hodnotě 7,4 (7,36 – 7,44)

hodnoty v krvi nižší nežli 7,36 = acidémie, jsou –li postiženy i tkáně = acidóza

hodnoty v krvi vyšší nežli 7,44 = alkalémie, jsou –li postiženy i tkáně = alkalóza

Parciální tlak oxidu uhličitého

- v biologických tekutinách je obsažena kyselina uhličitá i fyzikálně rozpuštěný CO_2

- součet obou složek tvoří tzv. efektivní koncentraci kyseliny uhličitě ($\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{CO}_2$)
- efektivní koncentrace kyseliny uhličitě se však nedá měřit, proto se při vyšetřování ABR měří parciální tlak oxidu uhličitého (pCO_2), který je přímo úměrný součtu obou složek

Hendersonova- Hasselbachova rovnice:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{HCO}_3^-}{(\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{CO}_2) \text{ efektivní koncentrace kyseliny uhličitě}}$$

Je-li efektivní koncentrace kyseliny uhličitě vyjádřena jako pCO_2 , má rovnice tvar:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{HCO}_3^- \text{ metabolická složka}}{(s \cdot \text{pCO}_2) \text{ respirační složka}}$$

s – koeficient rozpustnosti CO_2 v kapalině (0,03)

- pCO_2 v arteriální krvi je v rovnováze s alveolárním vzduchem (směs plynů a par v plicních alveolech)
- součet parciálních tlaků všech plynů v alveolárním vzduchu se rovná barometrickému tlaku 760 torrů, se kterým je alveolární vzduch v rovnováze
- podíl CO_2 na atmosférickém tlaku je 40torrů
- 1 torr = 0,133 kPa
- $\text{pCO}_2 = 40 \cdot 0,133 = 5,3 \text{ kPa}$
- pCO_2 v kapilární krvi (i arteriální) = 5,3 kPa (4,9 – 5,8 = referenční rozmezí)
- $\text{pCO}_2 < 4,9$ = hypokapnie
- $\text{pCO}_2 > 5,8$ = hyperkapnie
- je-li hodnota $> 10,6 \text{ kPa}$ – bezvědomí
- je-li hodnota vyšší než 13,3 kPa – smrt

Parciální tlak kyslíku

- patří mezi měřené parametry ABR

- dospělý člověk spotřebuje v klidu asi 0,25 l/min kyslíku
- je-li potřeba kyslíku větší, nežli může být tkáním dodán, vzniká tzv. kyslíkový dluh
- kyslík se v tomto případě získává anaerobní přeměnou glukózy na kyselinu mléčnou
- kyselina mléčná (laktát) výrazně okyseluje vnitřní prostředí organismu
- hodnota pO_2 je za normálních okolností v krvi 9,9 – 14,4 kPa
- hodnoty nižší než 9,3 v krvi = hypoxémie, ve tkáních hypoxie

Další parametry ABR (vypočítávané)

Standardní hydrogenuhličitaný

- jsou stanovené za standardních podmínek
- a) v plné krvi
- b) nasycené kyslíkem
- c) při 37° C
- d) při pCO_2 5,3 kPa
- fyziologické hodnoty jsou 24 ± 2 mmol/l
- standardní HCO_3^- ukazují, jaké by byly aktuální HCO_3^- , kdybychom upravili pCO_2 na hodnotu 5,3 kPa (třeba řízeným dýcháním)

Aktuální HCO_3^-

- stejné podmínky a) b) c) jako u standardních hydrogenuhličitanů, ale hodnota se řídí aktuálním pCO_2

Buffer base (BB)

= soubor všech krevních pufrů = nárazníková báze

- odráží vliv jiných nárazníkových systémů organismu, nežli je hydrogenuhličitanový systém

Fyziologické rozmezí: 46 – 52 mmol/l

Base excess (BE)

- množství bazí v mmol/l, které je třeba přidat do vyšetřované tekutiny (krev, plazma), aby pH bylo 7,40 při pCO_2 5,33 kPa a teplotě 37°C
- BE je vlastně rozdíl mezi ideálním obsahem kompenzačních metabolických nárazníkových systémů a jejich momentálním stavem
- Fyziologická hodnota: 0 ± 2 mmol/l
-

Další nárazníkové systémy

8.2.2 Hemoglobinový nárazníkový systém

- přítomný v erytrocytech
- odstraňuje vodíkové ionty tvorbou karbaminosloučenin (vazbou CO_2 na postranní

- řetězce AK globinu)
- Hb ovlivňuje pH také množstvím O_2 nebo CO_2 , které váže
- oxyhemoglobin HbO_2 je silnější kyselinou nežli Hb, má proto tendenci uvolňovat vodíkový iont –výhodou je, že HbO_2 vzniká v plicích, kde se zároveň vydychává CO_2 , ubývají proto vodíkové ionty a v důsledku toho se prostředí alkalizuje
- naopak redukovaný Hb vzniká v prostředí s vyšším pCO_2 (venózní krev), přijímá vodíkové ionty a tím snižuje kyselost prostředí

8.2.3 Proteinový nárazníkový systém

Proteiny jsou složené z aminokyselin propojených peptidickými vazbami. Aminokyseliny jsou organické kyseliny obsahující nejméně jednu aminovou ($-NH_2$) a karboxylovou ($-COOH$) skupinu. Postranní řetězce aminokyselin obsahují volné aminové a karboxylové skupiny. V případě hrozící změny pH extracelulární tekutiny dochází u volných aminových a karboxylových skupin ke dvěma reakcím, které se snaží hrozící změnu pH odvrátit:

- disociace karboxylové ($-COOH$) skupiny na ($-COO^-$) a ($-H^+$);
- ($-NH_2$) přijme ($-H^+$) za vzniku ($-NH_3^+$).

Díky těmto změnám dochází k pufování extracelulárního prostředí.

Proteinový nárazníkový systém je:

- založen na amfoterních vlastnostech bílkovin
- v kyselém prostředí se chovají jako báze a přijímají vodíkový iont
- v zásaditém prostředí se chovají jako kyseliny, uvolňují vodíkové ionty a odstraňují hydroxylové ionty tvorbou vody
- kapacita proteinového pufru závisí na koncentraci proteinů v séru

8.2.4 Fosforečnanový nárazníkový systém

- Ačkoliv není fosfátový pufr příliš významným činitelem v udržování pH extracelulární tekutiny, hraje hlavní roli v udržování acidobazické rovnováhy intracelulárně a v ledvinných tubulech.
- **je tedy hlavním nárazníkovým systémem moči**
- pomáhá vylučovat vodíkový iont močí $H_2PO_4^- \leftrightarrow HPO_4^{2-} + H^+$
- ledviny regulují ABR tvorbou amonného iontu NH_4^+
- část amoniaku (NH_3) se v ledvinách slučuje s vodíkovými ionty a vylučuje se jako amonný iont do moče

8.3 Funkce ledvin v udržování acidobazické rovnováhy

- udržování stálého pH těsně souvisí s udržováním poměru koncentrací konjugovaných kyselin a zásad plazmatických pufrů, především hydrogenuhličitanového pufru.

- plazmatická koncentrace konjugované kyseliny (H_2CO_3 , potažmo CO_2) je regulovaná kontrolou pCO_2 změnami plicní ventilace. Úlohou ledvin je tedy udržení koncentrace konjugované zásady HCO_3^- .
- za normálních okolností se z ledvin vrací více hydrogenuhličitanu, než kolik je ho do nich přiváděno a. renalis. To je dáno schopností ledvin vytvářet moč s nízkým pH (4,5–5,0).
- toto množství navíc slouží k neutralizaci neuhlíkatých kyselin, které vznikly metabolismem nebo jsou z potravy. Dodáním bikarbonátu navíc brání ledviny poklesu pufovacích bází.

Ledviny tedy udržují acidobazickou rovnováhu dvěma mechanismy:

1. regulací zpětné resorpce bikarbonátu;
 2. vyloučením 40–80 mmol H^+ za den – pufovaný močovými nárazníky a vázaný na NH_3 .
- ledviny tyto dva děje uskutečňují sekrecí H^+ do tubulární tekutiny, kde v tubulárních buňkách z CO_2 a vody vzniká bikarbonát.

8.4 Odběr krve pro vyšetřování ABR, transport a skladování vzorků

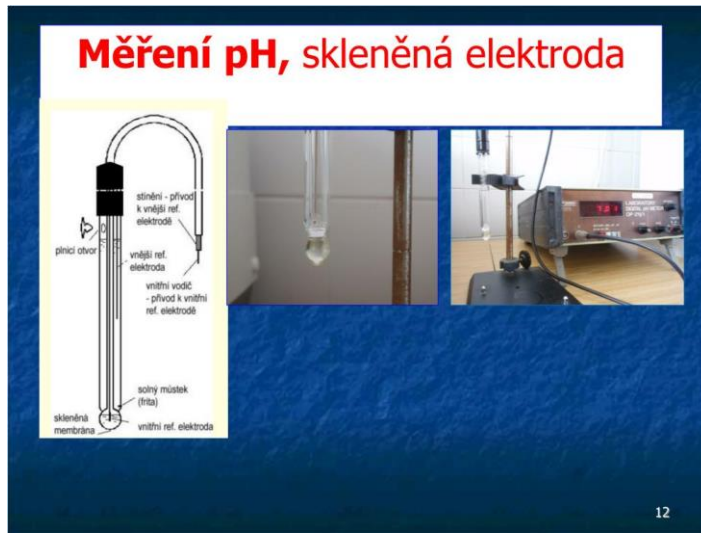
- k měření pH, pCO_2 a pO_2 je nejvhodnější použít arteriální krev
- tento odběr je však náročný
- je nahrazován odběrem kapilární krve
- odběr se provádí z prstu, ušního lalůčku, u novorozenců a malých kojenců z paty
- před odběrem je vhodné zahřát končetinu či ušní lalůček pomocí nahřátého ručníku a příliš nestlačovat tkáň při odběru, aby se v odebírané krvi nezvýšil podíl žilní krve a intersticiální tekutiny
- po vpichu se první kapka otře a krev se odebírá do heparinizované kapiláry tak, aby krev byla odebrána bez bublin
- po naplnění kapiláry se dovnitř vloží kovové míchadlo (drátek) a kapilára se uzavře na obou koncích tmelem nebo plastickou zátkou
- pomocí magnetu se krev v kapiláře promíchá
- krev má být transportována do laboratoře ihned po odběru, nejlépe v boxu chlazeném ledem
- nedodržení podmínek transportu má za následek pokles pH a pO_2 a vzestup pCO_2

8.5 Měření parametrů ABR

8.5.1 Měření pH

- elektrochemickým článkem obsahujícím skleněnou elektrodu (ta je selektivní pro H^+)
- referenční elektrodou je většinou elektroda kalomelová (má konstantní potenciál)
- skleněná + kalomelová elektroda se ponoří do analyzovaného vzorku
- potenciál skleněné elektrody se bude měnit v závislosti na aktivitě vodíkových iontů v měřeném roztoku
- analyzátor musí být před měřením vzorků nastavený na přesné kalibrační roztoky (analyzátory se kalibrují automaticky)
- pO_2 elektroda je amperometrická (polarografická) elektroda.

- Skládá se z katody (platinový drátek zatavený ve skleněné tyčince) a anody (Ag/AgCl argentchloridová elektroda) ponořených do fosfátového pufru
- Plášť elektrody překryt membránou propouštějící molekuly kyslíku
- Kyslík z krevního vzorku difunduje přes polypropylenovou membránu do elektrolytu uvnitř kyslíkové elektrody a je redukován na katodě ($O_2 + 4e^-$)
- Vzniká elektrický proud mezi anodou a katodou - je proporcionální parciálnímu tlaku kyslíku v krevním vzorku



Obr. 30 Skleněná elektroda

8.5.2 Měření pCO₂

- k měření se používá Severinghausova elektroda, která je od měřeného prostředí oddělena teflonovou membránou propouštějící CO₂
- Oxid uhličitý obsažený v měřeném krevním vzorku difunduje přes teflonovou membránu a rozpouští se ve vnitřním elektrolytu elektrody
- Vznikající kyselina uhličitá disociuje a posunuje tak pH vnitřního elektrolytu elektrody na kyselou stranu $CO_2 + H_2O \rightarrow H^+ + HCO_3^-$

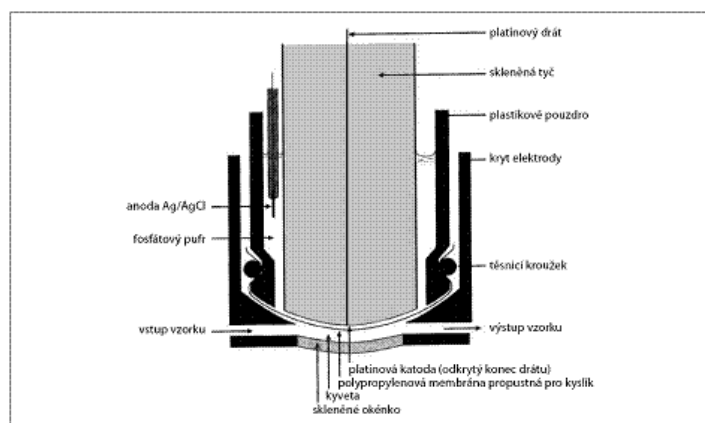
Elektroda na měření CO₂ (Severinghaus)

- Modifikovaná pH elektroda
- Skleněná elektroda oddělena od měřeného prostředí membránou propouštějící CO₂

$$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$$

8.5.3 Měření pO₂

- provádí se pomocí Clarkovy elektrody
- Clarkova kyslíková elektroda se používá pro stanovení rozpuštěného kyslíku. Na povrchu platinové, nebo zlaté elektrody se nachází tenký film elektrolytu, který je pokrytý porézní membránou. Póry membrány mají takovou velikost, aby skrz ně mohl difundovat pouze kyslík. Jako anoda se používá stříbrná disková elektroda.



8.6 Acidobazický analyzátor



8.7 Poruchy ABR

- podle původu se rozdělují na:

metabolické – porucha se odrazí na hodnotě HCO_3^-

respirační - porucha se odrazí na hodnotě pCO_2

smíšené (kombinované) – jsou nejčastější

- Metabolická acidóza (Mac)
je způsobena nadměrnou tvorbou kyselých iontů, nebo ztrátou hydrogenuhličitanů
- k tomuto stavu dochází při hladovění, diabetické ketoacidóze, ztrátě hydrogenuhličitanů průjmem nebo poškozením funkce ledvin, při otravě salicyláty
- **snižuje se HCO_3^- a pH**

1. Metabolická acidóza z hromadění aniontů

Laktátová acidóza

kyselina mléčná v prostředí, jehož pH je blízké hodnotě 7,4, prakticky zcela disociuje na laktátový anion. Koncentrace laktátu významně stoupá zejména při tkáňové hypoxii

Ketoacidóza

rozvíjí se, pokud glukóza nepostačuje jako zdroj energie a ve zvýšené míře se odbourávají tuky: při hladovění, diabetu 1. typu, extrémní zátěži apod.

Renální acidóza

při selhání ledvin se hromadí sulfáty, fosfáty a další anionty, které by se normálně vyloučily do moči.

Acidóza při některých otravách

intoxikace etanolem – etanol se metabolizuje na acetát,
intoxikace metanolem – metanol se metabolizuje na formiát,
intoxikace etylenglykolem – metabolizuje se na oxalát.

2. Metabolická acidóza ze ztrát hydrogenuhličitanů

Je nejčastěji důsledkem ztrát hydrogenuhličitanů z gastrointestinálního traktu. Jinou příčinou mohou být ztráty hydrogenuhličitanů ledvinami (renální tubulární acidóza, nežádoucí účinek diuretické léčby apod.). Do skupiny metabolických acidóz ze ztrát hydrogenuhličitanů můžeme také zařadit tzv. diluční acidózu. Dochází k ní při rychlém podání infuzí. Hydrogenuhličitan se v krvi naředí rychleji, než se stačí metabolismem doplňovat.

8.7.1 Metabolická alkalóza (MAI)

- příčinou je nadměrná ztráta kyselin nebo zvýšený příjem hydrogenuhličitanů
- př. ztráta chloridů při zvracení, dlouhodobé podávání glukokortikoidů (projeví se jejich mineralokortikoidní účinek), zvýšený příjem hydrogenuhličitanů (infúze, i potrava – sodné a draselné ionty z ovoce a zeleniny)
- **zvýšuje se pH a HCO_3^-**

8.7.2 Respirační acidóza (RAc)

- příčinou je snížená schopnost vylučování CO_2
- př. záněty plic, chronické bronchitidy, slabost dýchacích svalů, zranění hrudníku
- **dochází k vzestupu pCO_2 a k poklesu pH**

8.7.3 Respirační alkalóza (RAI)

- je typická pro stavy provázené drážděním dechového centra s následnou hyperventilací
- př. stres a hysterie, poruchy dechového centra [horečky, salicyláty (léky)]
- **klesá $p\text{CO}_2$ a zvyšuje se pH**

8.8 Způsoby kompenzace poruch ABR

- cílem kompenzace je vrátit pH k fyziologickému rozmezí

8.8.1 Metabolické poruchy jsou kompenzovány činností plic

- u metabolické acidózy působí nízké pH krve na stimulaci dýchacího centra, dochází k hyperventilaci a tím ke zvýšenému vylučování CO_2
- při metabolické alkalóze působí vysoké pH na dýchací centrum opačně a dýchání je sníženo

8.8.2 Respirační poruchy jsou kompenzovány činností ledvin, které tvoří podle potřeby kyselou nebo zásaditou moč vylučováním nebo zadržováním kyselin či bází

Kontrolní otázky

1. Vyjmenujte orgány (2), které se účastní regulace ABR.

2. Optimální hodnota pH krve ?

3. Jaké jsou dopočítané parametry ABR (4)?

4. Zvýšení $p\text{CO}_2$ se nazývá?

5. Doplňte: -

- hodnoty v krvi nižší nežli 7,36jsou –li postiženy i tkáň.....

- hodnoty v krvi vyšší nežli 7,44 ,jsou –li postiženy i tkáň.....

6. Definice pH

Místo pro doplnění



Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, M., BREINEK, P. *Klinická biochemie, bakalářský obor Zdravotní laborant* 2. vydání, Brno: Coprint s.r.o., 2011. ISBN 978-80-87192-18-4

Racek, J., Rajdl, D., *Klinická biochemie* 3 vydání, Praha 5: Galén, 2021
ISBN 978-80-7492-545-0

Matouš. B., *Základy lékařské chemie a biochemie* 1. vydání, Praha 5: Galén
2010. ISBN 978-80-7262-702-8

9 Bílkoviny

D.PARTLOVÁ

Anotace, abstrakt

V krevní plazmě se dají prokázat stovky různých bílkovin. Většina je tvořena v játrech a secernována do krve.

Cíl kapitoly

Cílem je seznámení s bílkovinami, jejich složením a významem, dále seznámení s frakcemi a elektroforézou bílkovin včetně jejího hodnocení a typů

Klíčová slova

Bílkoviny, aminokyseliny, peptidová vazba, celková bílkovina, albumin, bílkoviny akutní fáze, elektroforéza

9.1 ÚVOD

- makromolekulární látky složené z AK
- jednotlivé AK jsou vzájemně pospojovány peptidovou vazbou (- CO-NH-)



- ačkoliv jsou bílkoviny základní stavební látkou, tvořící buňky a tkáně, v KLB se rutinně vyšetřují bílkoviny pouze v tělních tekutinách, převážně v plazmě (séru), moči, moku mozkomíšním...
- v krevní plazmě je několik set rozlišitelných bílkovinných složek, jež se liší velikostí molekuly, koncentrací a funkcí
- biosyntéza většiny plazmatických bílkovin probíhá v hrubém endoplazmatickém retikulu jaterních buněk, v menší části probíhá biosyntéza též v lymfocytech a v enterocytech
- plazmatické bílkoviny se odbourávají v játrech, v ledvinách a v trávicím ústrojí
- za patologických stavů dochází k poruše rovnováhy mezi tvorbou a rozkladem bílkovin a tím ke změnám v jejich koncentraci i vzájemném poměru

9.2 Hlavní funkce bílkovin krevní plazmy

- výstavba a obnova buněk a tkání
- transport látek – např. minerálů, hormonů, lipidů, vitamínů, léků
- udržování koloidně osmotického (onkotického) tlaku krve (významné pro udržení normálního objemu krve i obsahu vody v tkáních a v cévách)
- udržování ABR
- hemokoagulace a fibrinolýza
- ochrana před volnými radikály, popř. zábrana jejich tvorby
- ochrana před infekcí
- plazmatické bílkoviny neslouží jako zdroj energie
- zdroj dusíku a esenciálních aminokyselin

9.3 Vyšetření plazmatických bílkovin

9.3.1 Celková bílkovina (CB)

- je tvořena mnoha druhy bílkovin (albumin + globuliny)
- její stanovení patří mezi rutinní vyšetření a poskytuje základní informaci o tvorbě metabolismu a vylučování plazmatických bílkovin
- **dysproteinémie** = změna v koncentraci a složení celkové bílkoviny

snížení koncentrace celkové bílkoviny (hypoproteinémie)

vzniká:

- při nedostatečném příjmu bílkovin potravou
- při zvýšených ztrátách bílkovin např. poškozením funkce ledvin, poruchách trávicího ústrojí, při rozsáhlém krvácení a u popálenin
- při nedostatečné tvorbě bílkovin vlivem chronického onemocnění jater
- důsledkem nízké hodnoty celkové bílkoviny je odsun vody z cév do mimocévního prostoru, což se projevuje hlavně otoky dolních končetin

zvýšení koncentrace celkové bílkoviny (hyperproteinémie)

vzniká:

- při dehydrataci – např. nadměrné ztráty vody pocením, zvracením, průjmem, nebo nedostatečným příjmem tekutin
- zvýšenou tvorbou bílkovin - u maligních nádorů, nebo při akutní infekci (tvoří se Ig)
- referenční rozmezí (sérum): 64-82 g/l

Celková bílkovina se stanovuje nejčastěji v séru, stanoví-li se v plazmě je její koncentrace o 3-5 % vyšší vzhledem k přítomnosti fibrinogenu.

- krev na toto vyšetření by neměla být odebírána po dlouhodobějším stažením paže, neboť dochází ke zvýšení koncentrace CB; obdobné účinky má i tělesné cvičení;

Metody stanovení celkové bílkoviny

Biuretová metoda

- v rutinním provozu je nejrozšířenější, používá se hlavně pro stanovení CB v séru a v plazmě; pro vyšetření biologického materiálu s nižší koncentrací bílkovin je málo citlivá
princip metody:
- bílkoviny a peptidy reagují s měďnatými kationty v alkalickém prostředí za vzniku fialově zbarveného komplexu; intenzita zabarvení je přímo úměrná počtu peptidových vazeb (reagují látky, které mají v molekule alespoň dvě peptidové vazby)
- součástí biuretového činidla je síran měďnatý, který poskytuje Cu^{2+} pro tvorbu komplexů s peptidovými vazbami, a alkalizující složka (hydroxid), dalšími složkami činidla jsou vinan draselný-sodný, který zabraňuje jako komplexotvorná látka srážení Cu^{2+} na $\text{Cu}(\text{OH})_2$, a jodid draselný, který chrání Cu^{2+} před autoredukci. Citlivost biuretové metody se pohybuje kolem 1–10 g bílkoviny/l.
- pokud se tato metoda použije pro stanovení bílkovin v moči, je nutné vysrážet bílkoviny kyselinou trichloroctovou; sraženina se oddělí centrifugací a rozpustí v Biuretové činidle

Metody vazby barviva na bílkovinu

- Pyrogallová červeň, amidočerná 10B, jsou barviva, která tvoří s bílkovinami barevné komplexy, vhodné k fotometrování; intenzita zabarvení je úměrná koncentraci bílkovin;
- tyto metody se využívají hlavně pro stanovení bílkovin v biologickém materiálu, kde je jejich koncentrace nízká, např. moč, mozkomíšní likvor
- v praxi je nejvyužívanější metoda s pyrogallovou červí

Turbidimetrické měření intenzity zákalu

- kyselinou sulfosalicylovou nebo kyselinou trichloroctovou se provede denaturace - (vysrážení) bílkovin v biologickém materiálu
- intenzita vzniklého zákalu závisí na velikosti částic vysrážených bílkovin a na poměru albuminů a globulinů v biologickém materiálu

Kjeldalova metoda

je metodou referenční = postupy měření charakterizované :

- plným pochopením principů,
- maximálně možné dokonalým propracováním postupů,
- eliminací vlivu matrice vzorku,
- co nejtěsnějším propojením metody s jednotkou měření, kterého dosáhneme použitím primárních referenčních materiálů nezprostředkovaně ztělesňujících jednotku měření.
- používá se pro stanovení koncentrace celkové bílkoviny při přípravě komerčních standardních roztoků a kontrolních sér
- metoda je velmi pracná a v rutinním provozu se řadu let nepoužívá

9.3.2 Albumin (Alb)



Obr.31 struktura albuminu

- je součástí celkové bílkoviny
- podílí se na regulaci osmotického tlaku plazmy
- má funkci transportní (je to malá bílkovina), transportuje [bilirubin](#), [hem](#), steroidní látky, [tyroxin](#), mastné kyseliny, žlučové kyseliny, kovy, léky.....
- je zdrojem AK pro organismus (hlavně esenciálních)
- jeho pokles či zvýšení se projevuje rychleji, nežli při stanovení CB

snížená koncentrace albuminu (hypoalbuminemie)

příčiny:

- infekce
- stres
- jaterní onemocnění (snížená syntéza)
- chronické poškození ledvin
- nedostatečný přísun albuminu potravou
- popáleniny, chronický zánět trávicího traktu

zvýšená koncentrace albuminu (hyperalbuminémie)

- je vzácná, hlavně při dehydrataci
- referenční rozmezí: 35-53g/l

Metody stanovení albuminu

- provádí se pomocí speciálních barviv, nejčastěji bromkrezolovým purpurem (BCP) nebo bromkrezolovou zelení (BCG)

Princip metody:

- bromkrezolový purpur tvoří s albuminem ve slabě kyselém prostředí barevný komplex vhodný k fotometrickému měření

9.4 Elektroforéza bílkovin

- fyzikálně-chemická metoda, založená na dělení bílkovin na základě jejich rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli

9.4.1 pohyblivost bílkovin je ovlivňována:

- velikostí elektrického náboje
- velikostí bílkoviny
- vlastnostmi nosiče, na kterém se provádí dělení
- iontovou silou pufru
- napětím, proudem
- bílkoviny putují při elektroforéze tím rychleji, čím větší mají náboj a čím méně jim brání prostředí a vlastnosti nosiče, na kterém dělení probíhá

9.4.2 velikost elektrického náboje bílkovin

- vyplývá z amfoterní povahy bílkovin
- velikost elektrického náboje a směr pohybu bílkovin závisí na pH prostředí, ve kterém elektroforéza probíhá

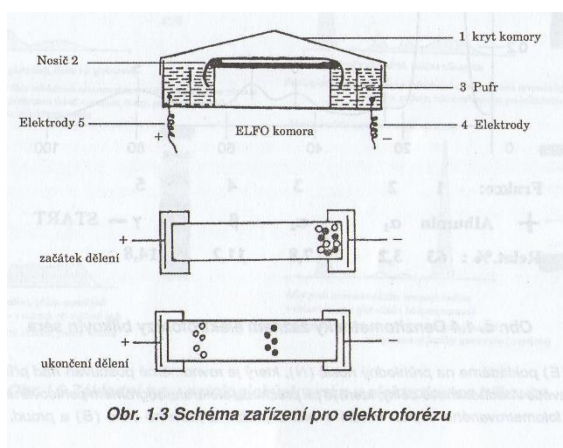
- v alkalickém prostředí dochází k disociaci karboxylových skupin a ztrátě protonu (NH_2 proton nepřijímá), bílkoviny získávají záporný náboj a putují k anodě (+)
- v kyselém prostředí disociují aminové skupiny, přijímají vodíkový proton, získávají kladný náboj a putují ke katodě (-)
- v izoelektrickém bodě (pI) se ionizuje stejný počet zásaditých a kyselých skupin, bílkoviny se navenek jeví jako elektroneutrální a v elektrickém poli se nepohybují
- převážná většina bílkovin má pI ve slabě kyselé oblasti, proto se k elektroforetickému dělení bílkovin používá alkalický pufr

9.4.3 pufr

- je roztok elektrolytů o předepsané koncentraci solí, pH a iontové síle
- zajišťuje vodivost prostředí = zprostředkuje přenos elektrického proudu a udržuje konstantní pH v průběhu dělení
- při elektroforéze bílkovin se používá barbitalový pufr o pH 8,6
- rychlost pohybu bílkovin v elektrickém poli ovlivňuje kromě pH také iontová síla pufru
- zvyšováním iontové síly pufru dochází k pomalejšímu putování bílkovin a jednotlivé frakce jsou ostřejší
- je-li iontová síla pufru příliš vysoká, zvyšuje se produkce Joulova tepla a může dojít k denaturaci bílkovin (bílkoviny přestanou putovat)

9.4.4 nosiče

- v laboratořích KLB se používají pevné nosiče, nejčastěji agarózový gel a acetátocelulózové fólie
- agaróza je přečištěný agar (neobsahuje agaropektin) – agar je polysacharid z mořských řas ruduch



- agar se přečišťuje z důvodu elektroendoosmotického jevu, který způsobuje agaropektin – dochází ke zpětnému toku kladně nabitých částic pufru ke katodě, což zpomalí pohyb bílkovin k anodě; imunoglobulíny se z tohoto důvodu pohybují ke katodě;
- acetátocelulózové fólie jsou homogenní porézní membrány, v suchém stavu bílé, neprůhledné, lomivé

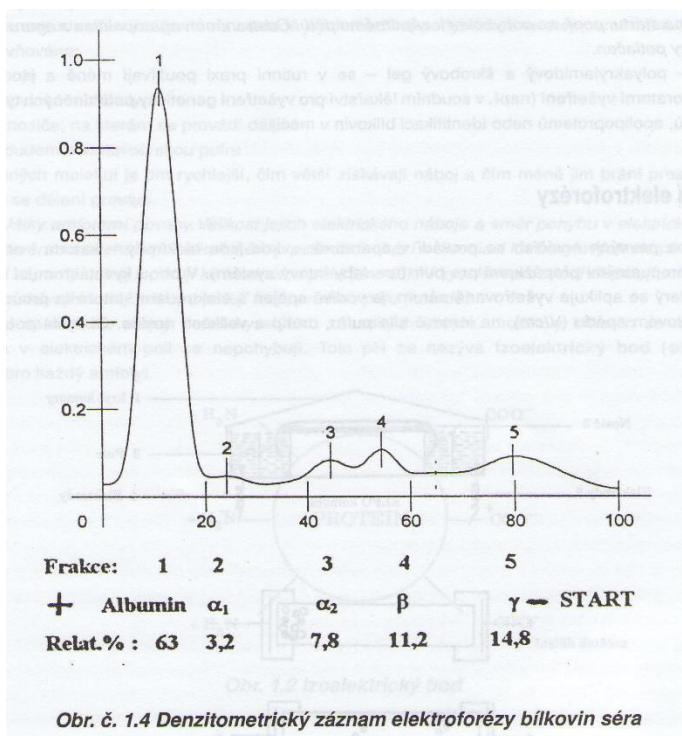
- po nasycení pufrům zbobtnají a ztrácejí lomivost

9.4.5 Provedení elektroforézy

- elektroforéza na pevných nosičích se provádí v elektroforetických vanách
- každá vana je rozdělena na dvě kyvety, ve kterých jsou elektrody
- v kyvetách jsou polopropustné přepážky pro pufr (tzv. labyrintový systém)
- v obou kyvetách musí být stejný objem pufru
- nosič, na který se aplikují vzorky, je vodivě spojen s elektrodami
- elektroforetická vana je připojena na zdroj stejnosměrného proudu
- intenzita proudu a doba dělení je závislá na iontové síle pufru, druhu a velikosti nosiče a potenciálovém spádu (V/cm)
- většinou se používá napětí 220 – 240 V
- doba dělení je přibližně 20 – 30 minut
- po rozdělení se provede detekce bílkovinných frakcí pomocí organických barviv (Amidočern 10B, Ponsaeu S, Coomassie brilliant blue)
- barvivo se naváže v místě bílkovinných frakcí a jeho intenzita odpovídá koncentraci bílkoviny v jednotlivých zónách
- v další fázi se provede odbarvení pozadí nosiče a usušení elektroforeogramu
- běžným elektroforetickým dělením lze získat 5 – 6 frakcí (albuminy, α_1 α_2 β ($\beta_1 + \beta_2$) γ globulíny)
- nejrychleji putuje albumin, který má při pH pufru 8,6 největší náboj

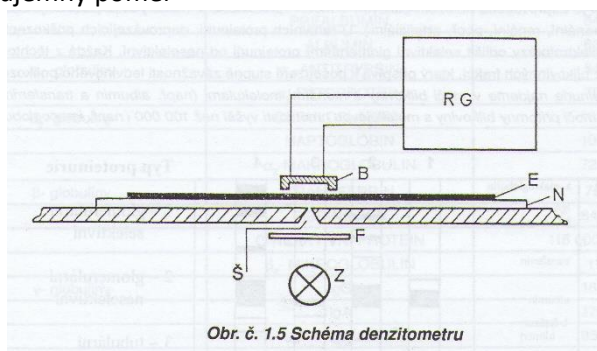
9.4.6 Hodnocení elektroforeogramu

- spočívá ve vyhodnocení jednotlivých bílkovinných frakcí
- provádí se pomocí denzitometru nebo PC programu, popř. vizuálně
- výsledky se uvádějí v procentech (celek = všechny frakce = 100 %, každá z frakcí obsahuje určitý počet %) nebo v poměrných číslech (celek = 1,00, jednotlivé frakce jsou díly celku)
- úkolem vyhodnocení elektroforeogramu je posouzení charakteristických změn v rozdělení bílkovinných frakcí; u různých patologických stavů můžeme nalézt jejich zmnožení, pokles, vymizení, popř. atypickou pohyblivost;



9.4.7 densitometrické vyhodnocení

- elektroforeogram (E) pokládáme na průhledný nosič (N), který je rovnoměrně posouván nad příčnou úzkou štěrbinu (Š)
- štěrbinou prochází světlo vhodné vlnové délky, které je při průchodu elektroforeogramem pohlcováno v míře, odpovídající intenzitě zabarvení fotometrovaného úseku
- prošlé světlo dopadá na světelné čidlo (B) a proud, který v něm vzniká úměrně k osvětlení je registrován na zapisovači (RG)
- grafický záznam je křivka, kde jednotlivé bílkovinné frakce tvoří píky
- po odečtení plochy jednotlivých frakcí se číselně vyjádří jejich vzájemný poměr



9.4.8 vyhodnocování elektroforeogramu pomocí PC programu

- program umožňuje skenovat elektroforeogram a provést jeho denzitometrický záznam s výpočtem poměrného zastoupení jednotlivých frakcí

9.4.9 vizuální hodnocení – využívá se hlavně u elektroforeogramů, ve kterých jsou přítomné atypické frakce, např. paraproteiny

- ve frakcích globulinů se vyskytuje značné množství jednotlivých druhů bílkovin a zkušený praktik, zvyklý vyhodnocovat elektroforézy delší dobu, cíleně ordinuje další specifická vyšetření bílkovin

9.4.10 Poměrné zastoupení frakcí u elektroforézy bílkovin

Frakce	%	poměrné číslo
albumin	55-69	0,55 – 0,69
α_1 globuliny	2-5	0,02-0,05
α_2 globuliny	8-13	0,08 – 0,13
β globuliny	7-15	0,07 – 0,15
γ globuliny	9-20	0,09 – 0,2
Celkem	100	1,00

9.5 Některé typy patologických elektroforeogramů

9.5.1 Akutní zánět

- **výrazné zvýšení α_1 a α_2 globulinů, často i β globulinů**
patologické stavy:
- akutní fáze infekčního onemocnění, zvláště bakteriálního původu
- akutní poškození tkáně – operace, popáleniny většího rozsahu, úrazy, infarkt myokardu

9.5.2 Chronický zánět

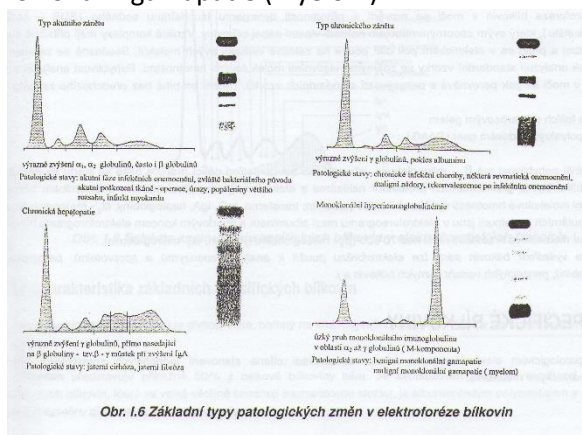
- **výrazné zvýšení γ globulinů, pokles albuminu**
patologické stavy:
- chronická infekční onemocnění
- některá revmatická onemocnění
- maligní nádory
- rekonvalescence po infekčním onemocnění

9.5.3 Chronická hepatopatie

- **výrazné zvýšení γ globulinů přímo nasedající na β globuliny**
patologické stavy:
- jaterní cirhóza
- jaterní fibróza

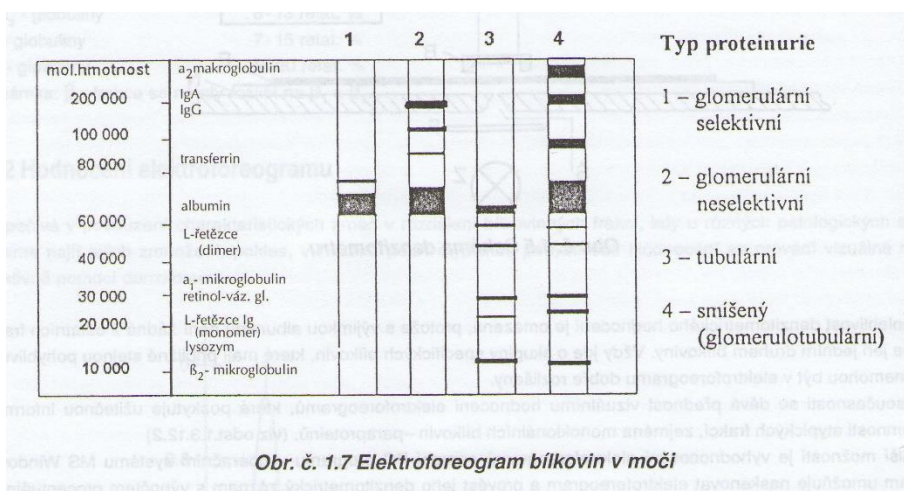
9.5.4 Monoklonální hyperimmunoglobulinémie

- **úzký pik monoklonálního imunoglobulinu v oblasti α_2 až γ globulinu**
patologické stavy:
- benigní monoklonální gamapatie
- maligní monoklonální gamapatie (myelom)



9.6 Elektroforéza bílkovin v moči

- používá se k rozlišení typu proteinurie (prerenální, renální, postrenální)
- u renální proteinurie je možné na základě elektroforézy rozlišit selektivní glomerulární proteinurii od neselektivní
- u selektivní proteinurie jsou v moči přítomné bílkoviny s malou molekulovou hmotností (albumin, transferin)
- u neselektivní proteinurie jsou v moči přítomny bílkoviny s molekulovou hmotností vyšší než 100 000 (např. imunoglobuliny)
- provedení elektroforézy je stejné jako při zpracování séra, ale moč je nutno před dělením upravit
- dělení se provádí na agarózovém gelu nebo na polyakrylamidovém gelu (PAAG)



- elektroforézou lze dělit i jiné látky, které mají ve své molekule bílkovinu, např. lipoproteiny, izoenzymy aj.

9.7 Specifické bílkoviny

- při patologickém elektroforetickém nálezů se provádí cílené stanovení jednotlivých specifických bílkovin imunochemickými metodami

9.7.1 albumin

- představuje přibližně 60 % z celkové bílkoviny séra
- je syntetizován játry

9.7.2 α_1 globuliny

α_1 antitrypsin (α_1 -AT)

- bílkovina akutní fáze (AT)
- zaujímá 90% α_1 globulinové frakce
- působí jako inhibitor trypsinu a chymotrypsinu

- je syntetizován v játrech

α_1 fetoprotein (AFP)

- vyskytuje se v krvi těhotných žen a plodu
- zvýšená koncentrace v plodové vodě signalizuje vývojovou poruchu CNS
- v krvi dospělých zdravých osob se nevyskytuje, zvýšené koncentrace jsou typické pro patologické stavy, nejčastěji primární karcinom jater

další specifické bílkoviny ve frakci α_1 - globulinů:

α_1 - mikroglobulin, α_1 - kyselý glykoprotein (orosomukoid), α_1 -lipoprotein

9.7.3 α_2 - globuliny

ceruloplazmin

- bílkovina akutní fáze (AT)
- transportuje měď a zajišťuje její vylučování z organismu
- má antioxidační aktivitu – působí proti tvorbě volných radikálů
- při nízké koncentraci ceruloplazminu, nebo jeho funkční poruše se měď ukládá v tkáních = Wilsonova choroba – geneticky podmíněná – důsledkem jsou nervové poruchy až mentální retardace

haptoglobin

- bílkovina akutní fáze (AT)
- váže na sebe hemoglobin z rozpadlých erytrocytů – vzniká komplex s velkou molekulou, který neprojde glomerulem ledvin a je vychytáván RES
- slouží k určování otcovství – má 6 genetických forem
- zvýšené hodnoty jsou u zánětů, nádorů a při nekrotizacích tkání
- snížené hodnoty – hemolytické anemie, onemocnění jater

α_2 - makroglobulin (AMG)

- je inhibitorem mnoha enzymů štěpících bílkoviny
- syntetizován v játrech
- jeho koncentrace se výrazně zvyšuje při poškození ledvin a u jaterní cirhózy

9.7.4 β – globuliny

fibrinogen

- bílkovina akutní fáze (AT)
- podílí se na srážení krve
- účinkem trombinu a vápenatých iontů se přeměňuje na fibrin
- syntetizován v játrech
- zvýšená hodnota – u akutních infekcí, revmatických zánětů
- snížená hodnota – akutní poruchy krevní srážlivosti, těžké poškození jater

C-reaktivní protein (CRP)

- bílkovina akutní fáze (AT)
- u zdravého člověka se vyskytuje v nepatrných koncentracích nebo se neprokáže vůbec
- při akutních bakteriálních zánětech se jeho koncentrace mnohonásobně zvyšuje (i 1000x)
- CRP v postižené tkáni váže mukopolysacharidy, které se v ní tvoří a které jsou následně odstraňovány z těla
- nereaguje na virové infekce

Transferin

- váže a transportuje železo v krevním oběhu
- syntetizován v játrech
- zvýšená koncentrace transferinu bývá u anemií z nedostatku železa, těžkého poškození jater

β_2 -mikroglobulin

- nachází se na povrchu většiny buněk lidského těla, hlavně na lymfocytech
- má malou molekulu, prochází glomerulem, v proximálním tubulu je téměř úplně resorbován
- je důležitým ukazatelem činnosti ledvin

složky komplementu C_3 a C_4

- komplement je komplex jedenácti bílkovin, které jsou obsaženy v plazmě v neaktivní formě
- aktivují se při tvorbě komplexu antigenu s protilátkou a tím přispívají k zneškodnění cizorodých látek při imunitních reakcích

C-reaktivní protein, α_1 -antitrypsin, haptoglobin, ceruloplazmin a fibrinogen se nazývají bílkoviny akutní fáze – nespecificky reagují na poškození organismu akutním zánětem

9.7.5 γ -globuliny

imunoglobuliny = protilátky

- vznikají na podnět cizorodých antigenů, které pronikly do organismu
- při elektroforéze se nacházejí hlavně v γ frakci, částečně i v β frakci
- váží specificky antigen na jehož podnět vznikly
- vznikají v B lymfocytech
- řadí se do pěti tříd
- IgG – představuje asi 80% všech imunoglobulinů
- jeho koncentrace se zvyšuje až v pozdější fázi průběhu infekčního onemocnění
- IgA – chrání povrch sliznic trávicího a dýchacího traktu proti virům a bakteriím
- IgM- jeho koncentrace se zvyšuje v časně fázi infekčního onemocnění
- IgD – v krvi zdravých osob se nachází jen ve stopovém množství
- Ig E – jeho koncentrace se zvyšuje v plazmě u lidí trpících alergickými chorobami
- při kontaktu s alergenem vyvolává uvolnění histamin

9.8 Patologické změny imunoglobulinů (gamapatie)

9.8.1 Hyperimmunoglobulinémie

9.8.1.1 *polyklonální hyperimmunoglobulinémie*

- zvýšení více tříd imunoglobulinů, především IgG, IgA, IgM
- vzniká jako imunitní odpověď organismu na přítomnost antigenu
- v elektroforeogramu se jeví γ frakce jako široký pás s neostrým vrcholem

9.8.1.2 *monoklonální hyperimmunoglobulinémie*

- monoklonální imunoglobuliny = **paraproteiny**
- jsou to bílkoviny s atypickou strukturou, jsou produktem jednoho klonu proliferujících buněk B-lymfocytové řady
- monoklonální bílkoviny mají jednotné fyzikálně-chemické vlastnosti a elektroforetickou pohyblivost
- při elektroforéze tvoří úzkou frakci v beta až gama oblasti

- monoklonální imunoglobuliny jsou nejčastěji třídy IgG a IgM
- nález monoklonálních imunoglobulinů je příznakem:
- benigního (nezhoubného) procesu bez klinických příznaků, který se projevuje většinou až ve vysokém věku, nebo maligního (zhoubného) onemocnění

9.8.2 Hypoimmunoglobulinémie

- bývá u vrozeného deficitu tvorby imunoglobulinů
- u snížené syntézy imunoglobulinů
- při jejich zvýšených ztrátách močí nebo střevem
- snížení může postihnout jen jednu třídu, ale i všechny současně
- důsledkem je imunodeficit projevující se opakovanými infekcemi s těžkým průběhem

Kontrolní otázky

1. Jak se nazývá vazba, která spojuje jednotlivé AMK?
2. Jaká je hlavní funkce albuminu a jakou má molekulu (velká X malá)?
3. Na čem je založena elektroforéza bílkovin?
4. Jaké nosiče při elektroforéze bílkovin se používají v laboratořích KLB?
5. Co jsou to paraproteiny? V které oblasti se obvykle nalézají?
6. Jak se nazývá choroba, u které nacházíme nízkou koncentraci ceruloplazminu?
7. Popište Hookův efekt.
8. Jaký je základní princip imunochemických metod?
9. Vyjmenujte bílkoviny akutní fáze.
10. Co patří do frakce beta globulínů?
11. Vyjmenujte hlavní funkce bílkovin krevní plazmy.

Místo pro doplnění



Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, M., BREINEK, P. *Klinická biochemie, bakalářský obor Zdravotní laborant* 2. vydání, Brno: Coprint s.r.o., 2011. ISBN 978-80-87192-18-4

Racek, J., Rajdl, D., *Klinická biochemie 3 vydání*, Praha 5: Galén, 2021
ISBN 978-80-7492-545-0

Matouš. B., *Základy lékařské chemie a biochemie 1. vydání*, Praha 5: Galén 2010. ISBN 978-80-7262-702-8

10 Dusíkaté látky nebílkovinné povahy D.PARTLOVÁ

Anotace, abstrakt

Jsou to látky, které se v určitých koncentracích běžně nacházejí v organismu, nejsou součástí bílkovin a jejich společným znakem je přítomnost dusíku v molekule

Cíl kapitoly

Cílem je seznámení se základními látkami nebílkovinné povahy, metabolickým onemocněním fenylketonurie

Klíčová slova

Urea, kreatinin, clearance kreatininu, kyselina močová, DNA, fenylketonurie, aminokyseliny, amoniak

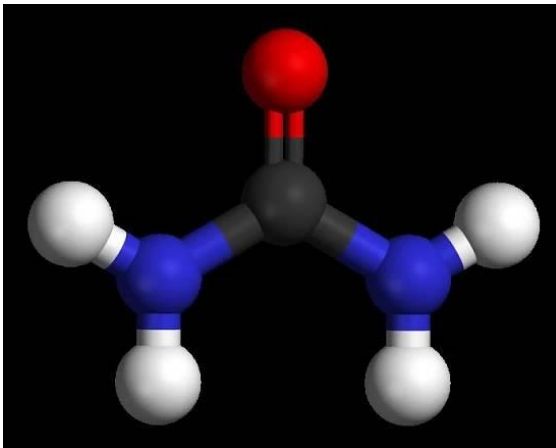
- jsou to látky, které se v určitých koncentracích běžně nacházejí v organismu
- nejsou součástí bílkovin
- jejich společným znakem je přítomnost dusíku v molekule
- mezi nebílkovinné dusíkaté látky patří:
 - urea (močovina)
 - kreatinin
 - kyselina močová
 - aminokyseliny
 - amoniak



- s výjimkou aminokyselin jsou tyto látky odpadní a pro organismus ve vyšších koncentracích toxické
- volné aminokyseliny jsou v organismu využívány pro syntézu (tvorbu) bílkovin, jež jsou stavebními látkami všech tkání

10.1 MOČOVINA (urea)

- urea je konečným produktem odbourávání bílkovin
- je to primární produkt detoxikace amoniaku, který vzniká jako jeden z hlavních produktů metabolismu bílkovin
- její tvorba probíhá v játrech, játra zbavují tvorbou močoviny organismus toxického amoniaku
- močovina se jako odpadní látka vylučuje ledvinami a v primární moči se částečně zpětně vstřebává v tubulech
- koncentrace močoviny v krvi závisí na denním přísunu bílkovin, jejich katabolismu (rozkladu) a vylučování urey močí



Obr.32 Močovina

Klinický význam:

Zvýšená koncentrace

- při minimálně 50% snížené glomerulární filtraci (při normálním příjmu proteinů)
- je-li omezené prokrvení ledvin, způsobené srdeční nedostatečností, šokem, dehydratací, dochází tak k omezené glomerulární filtraci
- zvýšený katabolismus (rozpad) proteinů
- je-li bráněno odtoku moče např. kamenem nebo nádorem
- nadbytečný přísun proteinů

Snížená koncentrace

- při sníženém příjmu proteinů
- při těžkých jaterních poruchách

10.1.1 Metody stanovení močoviny

1. Stanovení jako nebílkovinný dusík- metoda podle Kjeldhala
2. Stanovení s diacetylmonoximem- močovina dává s diacetylmonoximem v kyselém prostředí, za varu, červené zabarvení, v přítomnosti oxidačního činidla. Nevýhodou je nestálost reagensů a omezená kalibrační linearita (pouze do 20 mmol/l)
3. Stanovení s o-ftalaldehydem- močovina dává s touto látkou v kyselém prostředí sloučeninu, která reaguje s naftylethylendiaminem za vzniku červeného produktu
4. Enzymatická reakce s ureázou- princip je založen na vysoce specifickém štěpení močoviny enzymem ureázou. Produktem je CO₂ a NH₃.
5. Berthelotova reakce- stanovení amoniaku, reakce amoniaku s fenolem a alkalickým chlornanem za vzniku modře zbarveného indofenolu
6. Plně enzymová metoda- amoniak se stanoví enzymaticky pomocí enzymu glutamátdehydrogenáza, Amoniak reaguje s NADH a koncentrace močoviny je úměrná změně absorbance při 340 nm a měříme úbytek absorbance k němuž dochází v průběhu reakce. Množství NADH, které se přeměnilo na NAD je úměrné koncentraci močoviny.

Stanovení v moči

- Stejně jako v séru
- Koncentrace v moči je vyšší než v séru, proto se vzorky moče před stanovením musí ředit 50x až 100x.

10.2 KREATININ

- kreatinin vzniká z kreatinu
- kreatinin vzniká jako konečný produkt svalového energetického metabolismu a to neenzymovou dehydratací kreatinu
- koncentrace v krvi je úměrná svalové hmotě a nepodléhá větším změnám s výjimkou onemocnění ledvin, kdy stoupá jeho koncentrace
- je vylučován ledvinami, profiltruje se přes glomeruly, v tubulech se nevstřebává!!!
- ve svazech slouží ve formě kreatinfosfátu (kreatin, který přijal z ATP fosfát = sloučenina energeticky bohatá) jako zdroj energie pro práci svalů
- protože se z plazmy profiltruje do primární moči a v tubulech se nevstřebává, je jeho koncentrace téměř stejná v definitivní moči jako v plazmě

- kreatinin je proto látkou bezprahovou a stanovení jeho koncentrace slouží jako ukazatel funkční schopnosti ledvin
- hodnoty v moči jsou mnohonásobně vyšší, což je dáno resorpcí vody v ledvinách

Klinický význam:

- Pokud není vyřazena z funkce více než 1/3 ledvinné tkáně, stačí zbytek vyloučit tolik kreatininu, aby jeho koncentrace v krvi nepřesáhla horní mez normy.
- Teprve rozsáhlejší poškození je spojeno se vzestupem kreatininu nad normál.
- Čím větší je rozsah funkčního poškození, tím menší je vylučování kreatininu do moče a tím víc stoupá koncentrace v séru.
- Hodnota kreatininu v séru je vhodným ukazatelem funkční kapacity glomerulů.

Zvýšená koncentrace

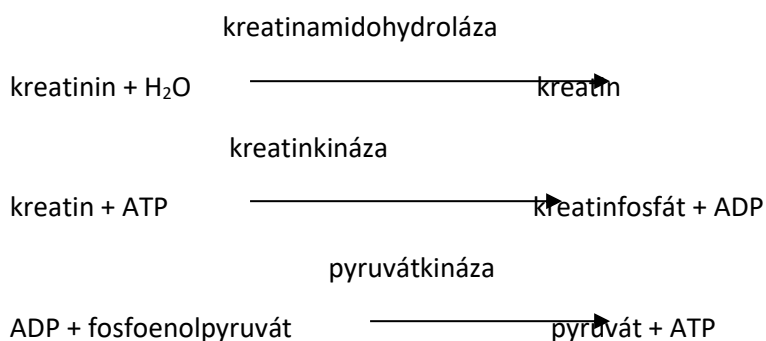
- Ukazatel onemocnění ledvin
- Spáleniny, úrazy
- Svalová dystrofie

10.2.1 Metody stanovení kreatininu

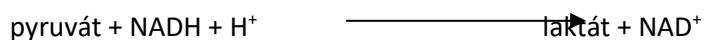
1. Jaffého reakce- kreatinin reaguje s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí za vzniku oranžového zbarvení.

2. Enzymové stanovení kreatininu

- kreatinin je za katalýzy enzymem kreatininamidohydrolázou přeměněn na kreatin
- kreatin je řetězcem enzymatických reakcí za přítomnosti NADH zpracován až na pyruvát
- hydrogenací pyruvátu vzniká laktát a NAD^+
- měří se úbytek absorbance při 340 nm, který je úměrný koncentraci kreatininu ve vzorku



laktátdehydrogenáza



3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

- používá se jako referenční metoda
- nepoužívá se pro rutinní stanovení

- kreatinin v moči se stanovuje stejnými metodami jako v séru. Vzorek je nutné naředit 50x až 100x destilovanou vodou.

10.3 Clearance kreatininu (globální clearance)

- je test pro posouzení funkční schopnosti ledvin
- měřítkem očišťovací schopnosti je objem plazmy zbavený sledované látky v daném časovém intervalu (kolik ml plazmy může být za 1 sekundu očištěno od nějaké látky)
- pro posouzení glomerulární filtrace se nejlépe hodí látky bezprahové (v glomerulech se filtrují, v tubulech se nevstřebávají)
- mezi bezprahové látky patří inulin a kreatinin
- **inulin** – polysacharid – pokládá se za nejvhodnější látku pro posouzení funkčnosti ledvin, používá se však pouze pro výzkumné účely
- **endogenní kreatinin** – v praxi velmi využívaný pro relativně stálou koncentraci kreatininu v krvi a v moči, umožňující její sledování v dostatečně dlouhém období
- vyšetření clearance kreatininu se provádí:
 - a) jednorázové neboli globální, tzn. z moče sbírané 24 hod
 - b) frakcionované – z moče sbírané ve tří – nebo čtyřhodinových intervalech (6 nebo 8 porcí v průběhu 24 hod.) – toto vyšetření se používá pro posouzení funkce ledvin v rámci časových úseků, neboť u zdravých ledvin filtrace během 24 hod. významně kolísá – největší je kolem poledne
- globální clearance je rutinní vyšetření, frakcionovaná clearance se provádí spíše výjimečně

Provedení testu:

- 3 dny před testem nejíst mnoho masa, aby neinterferoval exogenní kreatinin z potravy)
- na lačno se odebere krev a začíná sběr moči (24 hodin)
- základní podmínkou je přesný sběr moči!!!
- Výpočet globální clearance vychází ze tří hodnot:

koncentrace kreatininu v krvi (séru, plazmě) ($\mu\text{mol/l}$)	$C_{\text{krea v séru}}$
koncentrace kreatininu v moči (mmol/l)	$C_{\text{krea v moči}}$
objem moči za 1 sekundu	$V_{\text{m/s}} \text{ (ml/s)}$

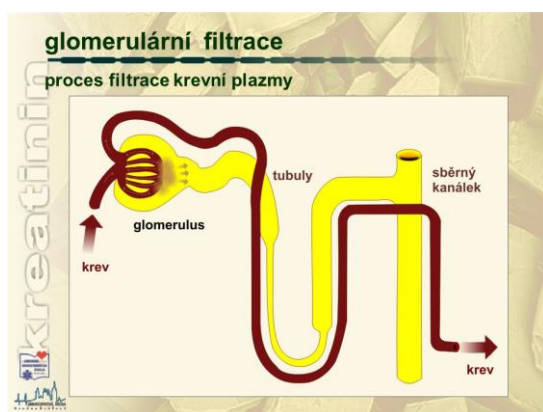
Počítá se glomerulární filtrace a tubulární resorpce.

Výpočet glomerulární filtrace (GF):

$$\text{GF} = \frac{C_{\text{Krea v moči}} \cdot V_{\text{ml/s}}}{C_{\text{Krea v séru}}}$$

Referenční rozmezí GF: u dospělých: 1,28 – 2,29 ml/s, u dětí jsou hodnoty nižší

- glomerulární filtrace je závislá na objemu tělesných orgánů
- platí proto jen pro tzv. ideální povrch těla ($1,73 \text{ m}^2$) – u dospělých
- u dětí je třeba přepočtu na skutečný povrch těla ($\text{GF} \times 1,73 / \text{povrch těla v m}^2$)
- z hodnot GF lze vypočítat tubulární resorpci (TR)
- TR podává informaci o velikosti podílu vody vstřebané v tubulech



Obr.33 Glomerulární filtrace

Výpočet tubulární resorpce (TR):

$$\text{TR} = \frac{\text{GF} - V_{\text{ml/s}}}{\text{GF}}$$

Referenční rozmezí TR: 0,986 – 0,998 (98,6 – 99,8 %)

Klinický význam:

- Hodnota glomerulární filtrace určuje, kolik krevní plazmy se profiltrovalo glomerulem za sekundu.
- Protože jsme přesně změřili množství moče za 24 hodin, můžeme vypočítat, kolik vzniklo moči za sekundu.
- Rozdíl mezi množstvím profiltrovaným glomerulem a množstvím vzniklé moče za sekundu se vstřebá zpět v tubulech a tuto hodnotu označujeme jako tubulární resorpce.
- Snížená GF znamená, že jde o onemocnění ledvin s velkým poškozením glomerulů, čím je hodnota GR nižší, tím závažnější je postižení ledvin.
- při velkém poklesu GR dochází k selhávání ledvin a vzniku urémie (Zvýšená koncentrace močoviny), z mimo ledvinných onemocnění mají vliv srdeční choroby, dehydratace a šok.
- vyšetření clearance kreatininu je citlivějším ukazatelem poškození funkce ledvin než stanovení samotné koncentrace kreatininu.

10.4 KYSELINA MOČOVÁ (KM, UA)

- kyselina močová (uric acid) je konečným produktem odbourávání purinových bází (adenin, guanin)
- vzniká rozpadem buněčných jader jak z potravy (maso), tak i vlastního organismu
- KM se tvoří v játrech a ve střevě
- KM se z 1/3 vylučuje zažívacím traktem, ze 2/3 ledvinami



Obr.34 Vzorec kyseliny močové

Klinický význam:

Zvýšená koncentrace

- **Dna** - vylučování krystalů kyseliny močové v kloubech, zvýšení je u dnavého záchvatu, dochází k bolestem v kloubu, který je oteklý, zarudlý a horký, koncentrace KM stoupá v séru i v kloubní tekutině
- Zvýšený rozpad buněk- zvýšený katabolismus purinových bází- leukémie, hemolytické i perniciózní anémie
- Nedostatečné vylučování KM ledvinami

Význam vyšetření KM u dny

- dna je vrozená porucha metabolismu purinových bází
- u dny dochází ke zvýšené tvorbě KM a zároveň ke snížení jejího vylučování močí
- koncentrace KM stoupá nejen v krvi, ale i v kloubní tekutině, kde dochází k vylučování solí KM ve formě krystalů a k jejich ukládání v okolí kloubních pouzder (klouby jsou oteklé a bolestivé)
- mnohem více jsou postiženi touto chorobou muži, ženy méně
- často se dna vyskytuje u diabetiků
- dna je civilizační onemocnění, postihující hlavně obyvatelstvo v ekonomicky vyspělých zemích
- léčba spočívá kromě podávání léků v omezení příjmu masa a alkoholu
- neléčená dna končí většinou úmrtím na selhání ledvin



Obr. 36 Postižení kloubu u Dny

10.4.1 Metody stanovení kyseliny močové

- v současné době se doporučují **enzymové fotometrické metody**
- jsou specifické a poskytují správné výsledky
- štěpení kyseliny močové katalyzuje enzym urikáza

Princip:

- KM se oxiduje kyslíkem za katalýzy enzymem urikázou na peroxid vodíku a allantoin
- vzniklý peroxid vodíku se stanovuje oxidační kopulací 4 – chlor3-metylfenolu se 4 –aminoantipyrinem za vzniku červeně zbarveného produktu
- stanovení v moči se provádí stejným způsobem jako v séru, moč se však před vyšetřením ředí destilovanou vodou

10.5 AMINOKYSELINY (AK)

- Aminokyseliny nejsou látky odpadní, ale stavební kameny, kterých organismus využívá k tvorbě vlastních bílkovin nebo k přeměně na jiné biologicky významné sloučeniny
- AK jsou uhlíkaté sloučeniny, které vždycky obsahují NH_2 a COOH skupinu
kromě těchto funkčních skupin mohou obsahovat i jiné skupiny, které určují chemické vlastnosti každé aminokyseliny
- Jsou to bezbarvé, krystalické látky, dobře rozpustné ve vodě,
- Mají amfoterní charakter- tzn. mají náboj podle toho, v jakém prostředí se pohybují- v alkal.prostředí se chovají jako kyseliny, výsledný náboj mají záporný, v kyselém prostředí se chovají jako zásady a mají kladný náboj.
- Z analytického hlediska je amfoterní povahy AK využito při jejich dělení a izolaci ze směsi (elektrochromatografie)
- Z biologického hlediska souvisí amfoterní charakter s jejich dobrou pufrovací schopností (čelí výkyvům pH)
- AK jsou schopny se vzájemně vázat peptidovou vazbou $-\text{CO}-\text{NH}-$ za vzniku peptidů a bílkovin
- volné AK jsou za normálních okolností přítomny ve všech tělesných tekutinách – plazmě, moči, mozkomíšním moku, plodové vodě, potu a v sliznicích
- jejich koncentrace je závislá na věku jedince, výživě a zdravotním stavu
- zdrojem AK pro organismus je potrava a vlastní tkáňové bílkoviny
- tkáňové bílkoviny se neustále metabolizují a uvolňují tak AK, které organismus dále využívá
- AK, které organismus neumí vytvořit a získává je pouze potravou, **se nazývají esenciální (nenahraditelné)**
- mezi esenciální AK patří valin, leucin, izoleucin, lyzin, methionin, fenylalanin, tryptofan

Klinický význam:

Nedostatek AK

- porucha růstu a hubnutí
- dědičné metabolické onemocnění
- často se vyskytují v dětském věku a důsledkem je zpomalený duševní vývoj, poruchy růstu, jaterní poškození
- při těchto metabolických onemocnění chybí některý z enzymů, který katalyzuje přestavbu AK
- tyto vrozené metabolické poruchy je třeba včas diagnostikovat a co nejdříve zahájit léčbu
- nejčastější je **fenylketonurie**, kdy chybí enzym, který katalyzuje přeměnu fenylalaninu na tyrosin- dochází k hromadění fenylalaninu v organismu, k zabrzdění vývoje CNS a tím i trvalého poškození dítěte,

FENYLKETONURIE (1 nemocné dítě na 10 000 zdravých)

- jde o vrozený nedostatek enzymu (fenylalaninhydroxylázy), který katalyzuje přeměnu fenylalaninu na tyrozín (přeměna jedné AK na druhou)
- fenylalanin se hromadí v krvi a jiných tělních tekutinách
- klasické příznaky se vyvíjejí až po 6. měsíci života!!!
- zpomaluje se vývoj CNS, dochází ke křečím a poruše pigmentace kůže
- moč dítěte páchne „po myšíně“- způsobeno přítomností fenylacetátu (vzniká z fenylalaninu)
- v krvi se prokazuje zvýšená hladina fenylalaninu
- v moči se prokazuje přítomnost jeho metabolitu – kyseliny fenylpyrohroznové
- dítě drží dietu – (z potravy se vyloučí fenylalanin) minimálně do dospělosti, ale i doživotně



Obr.36 Dítě s fenylketonúrií

10.5.1 Metody stanovení AK

Jednoduché chemické reakce (zkumavkové metody, diagnostické proužky)

- tyto testy jsou rychlé a levné, nejsou však dostatečně citlivé ani specifické
- zkoumaný metabolit dává s příslušným činidlem zabarvení

10.5.1.1 Bakteriální inhibiční testy

- bakteriální testy mají velmi jednoduché provedení
- ke screeningu (vyhledávání) fenylketonurie se užívá **Guthrieho test**
- kapka kapilární krve se aplikuje na filtrační papír a po jejím zaschnutí se transportuje do laboratoře
- v laboratoři se ke kapce krve aplikuje bakteriální kmen *Bacillus subtilis*
- v případě, že krev novorozence obsahuje zvýšenou hladinu fenylalaninu, dojde k podpoře růstu uvedeného bakteriálního kmene v okolí terčíku s krví
- bakteriální kmen *Bacillus subtilis* tuto AK vyžaduje jako esenciální složku potravy

10.5.1.2 Chromatografické metody

- a) tenkovrstevná chromatografie – metoda vhodná pro detekci poměrně velkých změn v koncentraci AK (např. u fenylketonurie nebo hyperglycinurie)
- jedná se o semikvantitativní metodu
 - k vyšetření se používá moč nebo plazma po deproteinaci vzorek se nanese na chromatografickou desku a ve vhodné směsi se nechá dělit v chromatografické vaně
 - poté se provádí identifikace AK
- b) vysokoúčinná kapalinová chromatografie – umožňuje kvantitativní analýzu AK
- je schopná zachytit i malé změny jejich abnormálního je rychlá, plně automatizované systémy umožňují analyzovat několik vzorků najednou v průběhu 30 -40 min.

10.5.1.3 Enzymová stanovení

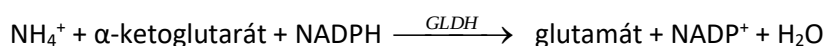
- prokazují nedostatek příslušného řídícího enzymu
- používají se enzymové elektrody, které jsou od zkoumaného vzorku odděleny membránou, ve které je zakotven enzym aminooxidáza
- produktem enzymové reakce je amoniak, který mění pH
- změna pH se měří ampérometricky nebo potenciometricky

10.6 AMONIAK

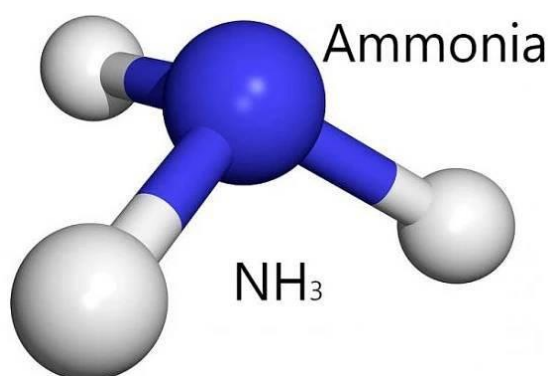
- vzniká v organismu nepřetržitě během metabolismu AMK
- nejvíce se ho tvoří v tlustém střevě, kde se účinkem bakterií deaminují AMK pocházející z bílkovin přijatých potravou
- amoniak je sloučenina pro organismus nesmírně toxická zejména jako amonný iont (NH_4^+)
- amonný iont totiž může snadno procházet všemi membránami v buňkách organismu a buňky poškodit
- vzniklý amoniak je ze střeva portálním oběhem přenášen do jater
- v játrech dochází k jeho přeměně na močovinu
- v ostatních buňkách se váže amoniak na kyselinu glutamovou za vzniku aminokyseliny glutaminu
- stanovení amoniaku se provádí u: těžkých forem akutní i chronické hepatitidy, u jaterní cirhózy při podezření na jaterní kóma (u jaterního kómatu je jeho koncentrace v krvi vysoká)

Metody stanovení amoniaku:

- nejužívanější je enzymatická metoda pomocí glutamátdehydrogenázy (GLDH)



- při přeměně NADPH na NADP^+ dochází k úbytku absorbance při 340 nm
- vzorek pro stanovení amoniaku se musí odebírat anaerobně, uchovávat v ledu a analýza se musí provést 30 min po odběru (koncentrace rychle klesá)



Obr.37 Amoniak

Kontrolní otázky

1. Co patří mezi dusíkaté látky nebílkovinné povahy?
 2. Z jakých hodnot se vypočítá globální clearance kreatininu?
 3. Jaký je diagnostický význam kreatininu?
 4. Z čeho vzniká kreatinin?
 5. Popište stanovení močoviny enzymatickou reakcí pomocí enzymu.....
 6. Vzorec pro výpočet glomerulární filtrace
 7. Kde se nachází zvýšená koncentrace kyseliny močové
 8. Vstřebává se kreatinin v tubulech ledvin?
 9. Amoniak je toxický v jaké formě?
 10. Jaký musí být odběr pro stanovení amoniaku?
 12. Co to je fenyketonurie (název chybějícího enzymu a základní příznaky)
-

Místo pro doplnění



Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, M., BREINEK, P. *Klinická biochemie, bakalářský obor Zdravotní laborant* 2. vydání, Brno: Coprint s.r.o., 2011. ISBN 978-80-87192-18-4

Racek, J., Rajdl, D., *Klinická biochemie* 3. vydání, Praha 5: Galén, 2021
ISBN 978-80-7492-545-0

11 Instrumentální technika

A.JIZEROVÁ

11.1 Laboratorní technika - základ

Anotace, abstrakt

Laboratorní pomůcky a zařízení patří k základní výbavě všech laboratoří.

Cíl kapitoly

Seznámit studenty se základní laboratorní technikou a pojmy nezbytné pro úvod do instrumentální techniky.

Klíčová slova

Odměrné sklo, pipety, dávkovače, váhy, míchačky, třepačky, centrifugy, teploměry

11.1.1 Odměrné laboratorní sklo

Odměrné laboratorní sklo se v laboratoři používá k odměřování různého objemu kapalin.

Dělíme na odměrné laboratorní sklo:

- Kalibrované na **vylití** – označeny „V“ (ang. „Exclude“)
 - Správný objem kapaliny lze získat po jejím vylití z nádoby
- Kalibrované na **dolítí** – označeny „D“ (ang. „Include“)
 - Správný objem kapaliny lze získat po naplnění kapaliny po rysku

Mezi laboratorní odměrné sklo patří:

- Kádinky
- Odměrné válce
- Odměrné baňky





Obr.36 Kádinka o objemu 250ml a 600 ml



Obr.37 Odměrné válce



Obr.38 Odměrné baňky

11.1.2 Pipety

Pipety nám slouží k odměřování menšího množství kapalin. Dříve se v laboratoři pipetovalo ústy, ale kvůli bezpečnosti a ochrany zdraví při práci, byl tento úkon zrušen. V dnešní době se používají pomůcky, které se nasazují na pipety (balónky a píсты). Tyto pomůcky vytvářejí podtlak a dochází k nasávání kapaliny. Umožňují přesně zvolený objem v pipetě.

Pipety dělíme na:

- Skleněné – objemy 1ml, 2ml, 5ml, 10ml
- Automatické – nastavený objemy, plastové (vícekanálové)



Obr.39 Skleněná pipeta



Obr. 40 Automatická pipeta

11.1.3 Dávkovače

Slouží v laboratoři k nadávkování přesného objemu kapalin ve větších sériích. Jsou nasazeny na určitou nádobu s kapalinou. Po jejich zmáčknutí dochází k nadávkování tekutiny.



Obr.41 Dávkovač

11.1.4 Laboratorní váhy

Laboratorní váhy se v laboratořích používají především k navážení standardů pro speciální metody.

Rozlišujeme **dva typy** laboratorních vah:

- Předvážky – přesnost na setinu gramu
- Analytické váhy – přesnost na 0,1-0,01 miligramu



Obr. 42 Analytické váhy



Obr.43 Předvážky

11.1.5 Míchačky a třepačky

Míchačky se v laboratoři používají k urychlení přípravy a homogenizaci roztoku.

Třepačky se používají např. k vytřepání těkavého rozpouštědla.



Obr.44 Třepačka



Obr.45 Rotační míchačka na zkumavky

11.1.6 Centrifugy

Odstřeďování patří k jednoduchým laboratorním metodám. Má v laboratoři různého využití v rutinní analýze.

1. Odstranění sraženin
2. Odstranění buněk
3. Izolace

4. Zahuštění bílkovin
5. Dělení směsí

Slouží k rozdělení částic pomocí odstředivé síly. Často jde o urychlení sedimentace. Zatímco při sedimentaci se částice rozdělují podle své hustoty vlivem gravitačního zrychlení, při centrifugaci na ně působí mnohem větší odstředivé zrychlení. Rozdělení směsi proto probíhá mnohem rychleji.



Obr. 46 centrifuga EBA 12 R

11.1.7 Teploměry a monitorování teploty

Laboratorní teploměry slouží k monitorování teploty v prostředí. Patří spolu s váhami k tzv. stanoveným měřidlům. Podléhají zvláštnímu režimu kalibrace, validace a pravidelných kontrol. V moderní laboratoři s používají teploměry digitální, mohou mít i záznam na externí úložiště. Zaznamenávají jak minimální, maximální, ale i aktuální teplotu. Používají se pro měření teploty ve skladech (reagencií) a v chladících, mrazících zařízeních.

Rozsah měření:

- -70°C - $+45^{\circ}\text{C}$



Obr.47 Digitální teploměr

Kontrolní otázky

1. K čemu se využívá laboratorní sklo?
2. Rozdíl mezi předvážkami a analytickými váhami?
3. Jaká měřidla patří mezi stanovená?
4. Druhy pipet?

Místo pro doplnění



Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, Milan. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. 2., dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7103-2.

11.2 Optické metody

Anotace, abstrakt

Optické metody jsou **analytické metody, které využívají interakce optického záření s hmotou**.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o optických metodách a instrumentaci.

Klíčová slova

Spektrofotometrie, turbidimetrie, nefelometrie, luminiscence, fluorimetrie

11.2.1 Spektrofotometrie

Světlo je druh elektromagnetického záření. Vlnová délka je vzdálenost mezi dvěma vrcholy vln. Označuje se řeckým písmenem λ (lambda).

Lambert – Beerův zákon

Lambert-Beerův zákon platí pro zředěné roztoky látek, v nichž nedochází k vzájemnému ovlivňování rozpuštěných částic, jimiž prochází monochromatické záření.

Absorbance je přímo úměrná absorpčnímu molárnímu koeficientu látky v roztoku, koncentraci látky v roztoku a šířce vrstvy vzorku, přes kterou záření prochází.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$



ϵ = molární absorpční koeficient, c = koncentrace v mol/l, l = délka vrstvy v kyvetě

Spektrofotometr

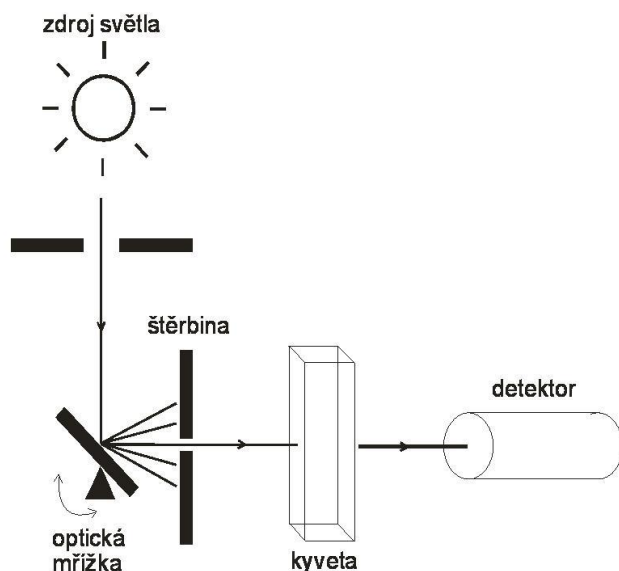
Je tvořen pěti základními částmi

- **Zdroj záření** – žárovky s wolframovým vláknem, halogenové lampy, deuteriová nebo vodíková výbojka
- **Monochromátor** – rozkládá polychromatické bílé světlo na spektrum barev (hranol, mřížka)
- **Optický systém** – vstupní a výstupní štěrbina ovládá velikost a pozici světelného paprsku, zrcadla pomáhají nasměrovat světelný paprsek uvnitř spektrofotometru
- **Absorpční prostředí** – kyveta s měřeným vzorkem (různá velikost a tloušťka)
- **Detektor** – je složen z detekujícího zařízení a zařízení, které zpracovává odezvy detektoru (fotonásobič, fotočlánek, diodové pole)

Jednopaprskový spektrofotometr - měří absorbanci pouze v jednom absorpčním prostředí (kyveta se vzorkem a kyveta se slepým vzorkem)

Dvoupaprskový spektrofotometr

- Paprsek rozdělen na dvě části (jedna část prochází slepým vzorkem, druhá část prochází měřeným vzorkem)
- Zrcadlo, které rotuje střídavě usměrňuje paprsek na kyvetu s měřeným a slepým vzorkem



Obr.48 Spektrofotometr jednopaprskový

11.2.2 Turbidimetrie

Optická metoda založená na měření procházejícího světla zeslabeného rozptylem na částicích.

V klinické biochemii je celá řada metod založených na měření stupně zákalu - turbidity - a nejvýznamnější z nich je soubor imunochemických metod, které využívají precipitační reakce mezi antigenem a protilátkou. Při turbidimetrických měřeních je nejobtížnější získat reprodukovatelně suspenzi měřené reakční směsi, která je dostatečně stálá.

K tomu účelu se používají **ochranné koloidy** (nejčastěji polyetylglykol).

Tyndalův efekt - jedná se o typ fyzikálního jevu, který vysvětluje, jak se určité částice mohou stát viditelnými díky skutečnosti, že jsou schopné rozptýlit světlo, které jimi prochází. Dochází k rovnoměrnému rozptylu u částic menší než jedna desetina vlnové délky dopadajícího záření.

Absorpce záření po průchodu nehomogenním prostředím, tj. koloidním roztokem nebo roztokem zakaleným jemnou sraženinou se měří absorpčními fotometry a spektrofotometry.

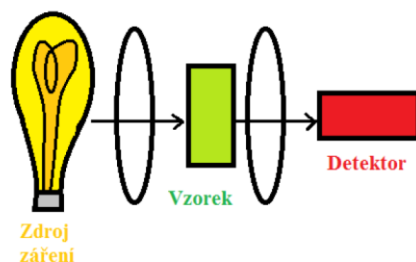
Fotometrická **citlivost je nepřímo úměrná vlnové délce**. Proto se např. specifické proteiny stanovují při nejkratší vlnové délce dosažitelné standardním fotometrem, tj. při 340 nm v blízké UV oblasti.

Do střední UV oblasti nelze dále postupovat, i kdyby to spektrofotrické technicky umožňoval, neboť se začne projevovat absorpce nezreagovaných bílkovin, která může hrubě zkreslit měření zákalu imunokomplexu.

U molekul velikostí větší než jedna desetina a jedním násobkem vlnové délky záření je maximum rozptýleného světla směřováno dopředu.

U velkých proteinových agregátů převažuje rozptyl ve směru dopadajícího záření.

U turbidimetrie je detekční zařízení umístěno ve stejném směru ke zdroji světla a měrné kvetě.



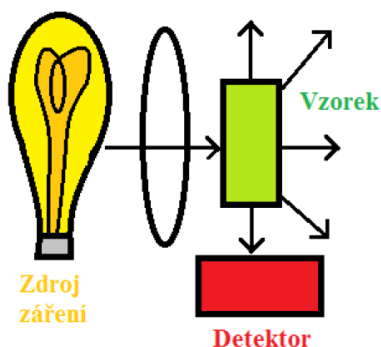
Obr. 49 Turbidimetr

11.2.3 Nefelometrie

Měření intenzity difuzně rozptýleného světla na dispergovaných částicích.

Rozptýlené světlo vychází z roztoku všemi směry (tzv. světlo **Tyndallovo**) a měří se pod úhlem, který je odlišný od směru dopadajícího záření.

U nefelometrie je detekční systém umístěn pod úhlem 90° k rovině dopadajícího světla a měrné kyvety.



Obr.50 Nefelometr

Zdrojem světla se používají halogenové nebo xenonové lampy.

Obě tyto metody se využívají v biochemické praxi především ke stanovení bílkovin nebo detekci zákalových metod, kde vzniká komplex antigen-protilátka, dříve také ke sledování znečištění ovzduší a vod. Pro vzorky s menší koncentrací stanovované látky je vhodnější metodou nefelometrie.

Laserový nefelometr používá jako světelného zdroje helium-neonového laseru. Tento zdroj monochromatického světla je mimořádně intenzivní a má vysoký stupeň směrovosti. Laserový paprsek prochází přes kyvetu s měřeným roztokem a rozptýlené světlo se sleduje detektorem nastaveným pod úhlem 5 až 35° (fotonkou nebo fotonásobičem).

Konvenční nefelometry používají jako světelných zdrojů žárovku s halogenovou atmosférou nebo xenonovou výbojku. Optika těchto přístrojů obsahuje navíc interferenční filtr, protože světelný zdroj poskytuje polychromatické světlo. Detektor je nastaven pod úhlem 70 až 90° , protože stupeň směrovosti světla z konvenčního zdroje je nízký. Nefelometry mohou měřit také rychlost změny rozptylu světla - **kinetiku**, která je přímo úměrná rychlosti vzniku imunokomplexu antigen-protilátka.

11.2.4 Luminiscence

Luminiscence představuje produkci světla atomy a molekulami, které se nacházejí v excitovaném stavu.

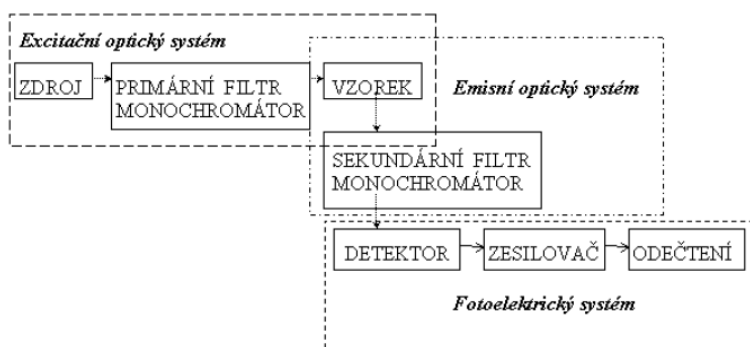
Stokesův posun – rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního a emitujícího záření.

11.2.4.1 Fluorimetrie

Při fluorimetrických stanoveních se využívá jevu, kdy v některých látkách po ozáření dostatečně energetickým zdrojem světla (excitační záření) vzniká **fotoluminiscence**. Látky přitom vyzařují (emitují) světlo, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci fluoreskující sloučeniny. Při excitaci se molekuly dostanou na vyšší energetickou hladinu a při návratu do základního stavu se část energie vyzáří také ve formě tepla. Proto má emitované záření fluoreskujících sloučenin vždy vyšší vlnovou délku (tj. méně energie) než excitační záření, vyvolávající fotoluminiscenci. Fluoreskující sloučeniny jsou často citlivé na malé změny pH, polarity, na přítomnost oxidačních činidel nebo zhasedel fluorescence.

Základní konstrukce **fluorimetrů** sestává ze zdroje zářivé energie, dvou optických separačních prvků a detektoru. **Zdrojem** záření jsou nejčastěji halogenové žárovky a xenonové výbojky. Světlo ze zdroje prochází buď interferenčním filtrem nebo mřížkovým monochromátorem. Dále prochází kyvetou s roztokem měřeného vzorku a emitovaná **fluorescence se měří pod úhlem 90°** (při měření v mikrotitračních destičkách je jiné uspořádání), kdy po průchodu filtrem nebo po difrakci reflexní mřížkou dopadá emitované světlo vybrané vlnové délky na fotonásobič.

Zdroj světelného záření je xenonová výbojka. Kyvety jsou z křemenného skla. A detektor se používá fotonásobič.



Obr.51 Fluorimetr

11.2.4.2 Chemiluminiscence

Chemiluminiscence se liší od ostatních luminiscenčních jevů tím, že excitace fotonů je vyvolána chemickou reakcí, která proběhne buď po nástřiku syntetizovaného činidla, nebo se použije biologická substance (enzym luciferáza ze světlušek - chemiluminiscenční varianta se označuje jako **bioluminiscence**), nebo se k aktivaci činidel využívá oxidace na anodě a technika se nazývá **elektrochemiluminiscence**.

Pro chemiluminiscenční reakci musí být splněny **tři základní požadavky**:
1. Při reakci musí vznikat dostatek energie, aby došlo k excitaci elektronů. Proto musí být reakce exotermní a obvykle je to oxidace.

2. Musí existovat způsob jak tuto energii usměrnit do excitace elektronů. Jestliže se chemická energie ztrácí ve formě tepla jako obvykle, pak se chemiluminiscence neobjevuje.

3. Excitovaný produkt musí být schopený ztrácet svoji energii buď ve formě fotonu, nebo ji převádět na fluoreskující sloučeniny.

Přímá emise fotonu z excitovaného produktu obvykle poskytuje krátké záblesky světla, zatímco transfer energie na fluoreskující sloučeniny se většinou projevuje jako dlouhodobá (v minutách) světelná emise.

Přístrojové vybavení pro tuto techniku je pestré: od jednoduchých luminometrů až po vysoce automatizované chemiluminiscenční analyzátory, ve kterých se provádí imunochemické reakce s chemiluminiscenční detekcí. Standardní luminometry se do určité míry podobají fluorimetřům.

Před měřicí kyvetou ovšem nemají žádný zdroj světla ani filtr. Uspořádání za kyvetou odpovídá fluorimetřům (filtr, fotonásobič).

Téměř všechny luminometry mají také nastřikovací zařízení, protože u zábleskové chemiluminiscence je nutné provést měření ihned po nástřiku reagensů.

Některé luminometry měří luminiscenci v mikrotitračních destičkách.

11.2.5 Vertikální spektrofotometrie

Vertikální fotometrie je specifické přístrojové uspořádání využívající principu absorpční fotometrie.

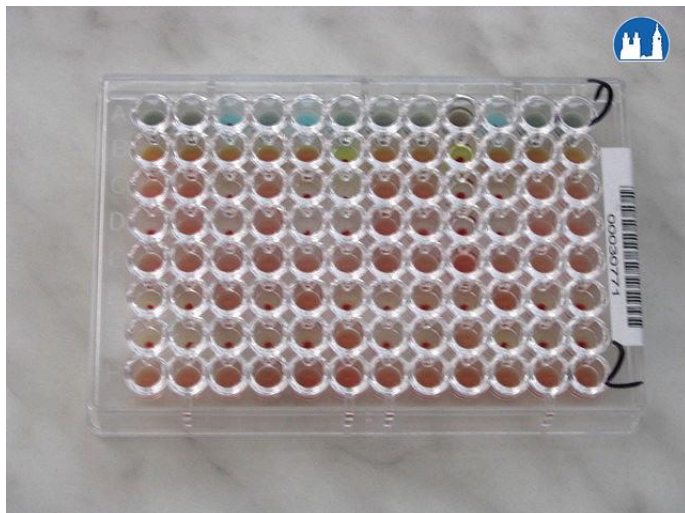
Vertikální fotometry mají jeden zdroj světla (žárovku), sadu filtrů a fotonku jako detektor. Zatímco u klasické absorpční fotometrie prochází paprsek kyvetou kolmo ke svislé ose (horizontálně), při vertikální fotometrii prochází kyvetou vertikálně.

Přístroje tohoto typu jsou určeny k měření roztoků v mikrotitračních destičkách, popřípadě stripech (tj. proužcích s osmi mikrotitračními jamkami).

Také denzitometry pro kvantitativní hodnocení elektroforegramů na průhledných nosičích pracují na principu vertikální fotometrie. Jednoduché vertikální fotometry nemají jiné vybavení než žárovku, filtr a fotonku a na mikrotitrační destičce měří postupně všechny jamky jednu po druhé.

Sofistikovanější přístroje jsou vybaveny skleněnými vlákny, **světlovody**, které přivádějí světlo ze zdroje do osmi nebo více jamek najednou, a dalšími světlovody, které prošlé světlo odvádějí k detektoru. Elektronicky se přepíná signál z jednotlivých světlovodů na registrační fotonku. Ve zlomku sekundy se tak změří celá řada jamek, mikrotitrační destička se posune a může se měřit řada následující. Tento způsob měření je velmi rychlý a umožňuje změřit celou mikrotitrační destičku (tj. 96 jamek) za 5 s.

Při vertikální fotometrii závisí dosažené výsledky měření pouze na přesnosti pipetování kalibrátorů, kontrolních materiálů a vzorků. Mikrotitrační destička nebo strip, určené k měření, mají vždy konstantní plochu kruhové základny a pro stejnou koncentraci je **konstantní součin absorbance a délky optické dráhy** roztokem.



Obr. 52 Mikrotitrační destička

11.2.6 Reflexní spektrofotometrie

Při této technice se sleduje **odražené záření** od homogenně zbarvené podložky. Reflexní fotometry se používají pro kvantitativní vyhodnocení reakcí probíhajících na pevné fázi se suchými činidly po jejich aktivaci vodou obsaženou v měřeném vzorku. Na principu reflexní fotometrie jsou také založeny denzitometry pro kvantitativní hodnocení chromatogramů na tenké vrstvě (viz dále) nebo obarvených elektroforeogramů na neprůhledných nosičích. **Matrice** pro suchá činidla v systémech tzv. "suché chemie" může být dvojího druhu: buď se jedná o **impregnovaná vlákna** anebo o **vícevrstvý film**. Obě skupiny matric vyhodnocujeme reflexní fotometrií, ale přístrojové uspořádání se zásadně liší.

Proužky z impregnovaných vláken dokonce umožňují vyšetřovat celou řadu analytů z plné krve. Zdrojem světla je světlo emitující dioda nebo několik diod, když je zapotřebí několika vlnových délek, nebo xenonová výbojka (v tom případě je nutno použít vždy vhodný interferenční filtr). Vzhledem k tomu, že světelný výtěžek odraženého světla je poměrně malý, používá se bílý kulový reflektor - **Ulbrichtova koule** - který fokusuje veškeré odražené světlo z reagenčního políčka impregnovaného vlákna na fotonku.

Vícevrstvý film představuje na rozdíl od impregnovaných vláken homogenní matici a reflexní fotometrie prováděná tímto způsobem může při vysoké automatizaci poskytnout výsledky srovnatelné s absorpční fotometrií v roztocích. Zdrojem světla je žárovka s halogenovou atmosférou. Světlo selektované interferenčním filtrem dopadá na film, prochází absorpční vrstvou, odráží se od reflexní podložky, opět prochází absorpční vrstvou a

dopadá na fotonásobič. V tomto případě se nepoužívá reflektor (Ulbrichtova koule), ale mnohem citlivější detektor - fotonásobič.

11.2.7 Plamenová emisní spektrofotometrie

Při této technice se měří intenzita zbarvení plamene. K emisi záření charakteristické vlnové délky dochází při návratu elektronů z excitovaného stavu (vyvolaného plamenem) na původní dráhy.

Plamenové fotometry používané v klinické biochemii jsou konstruované zpravidla pro paralelní stanovení koncentrace sodných a draselných iontů v séru nebo moči.

Mohou být využity i pro analýzy lithia (monitorování lithných psychofarmak).

U běžných plamenových fotometrů je palivem propan, který ve směsi se vzduchem poskytuje teplotu 1930 °C.

Některé plamenové fotometry používající palivo acetylen-vzduch mají výhřevnější plamen (2300 °C) a umožňují tak i stanovení vápenatých iontů.

Roztok analyzovaného vzorku se přivádí do bezbarvého plamene ve formě jemné mlhy, která se vytváří v pneumatickém zmlžovači - atomizéru.

K izolaci spektrálních čar se používá interferenčních filtrů a jako detektor intenzity emitovaného světelného toku slouží fotonka. Pro zajištění konstantních podmínek měření se ve všech plamenových fotometrech používá **vnitřní standard**, kterým je roztok LiCl nebo CsCl a pro stanovení lithia KCl, a který se ve značném množství přidává ke kalibračnímu i zkoumanému roztoku. Vždy se měří současně spektrální linie stanovovaného kovu a kovu vnitřního standardu. Tímto způsobem se kompenzuje vliv změn tlaku plynné směsi a viskozity roztoku.

V případě vysokých koncentrací bílkovin a lipidů v séru jsou výsledky měření koncentrace iontů plamenovou fotometrií nižší než naměřená aktivita ionselektivními elektrodami, hovoří se např. o **pseudohyponatrémii**.

Je to způsobeno tím, že část objemu rozhodného pro výpočet koncentrace je obsazena bílkovinami a lipidy, takže i když se aktivita ve zbylém vodném objemu nezměnila, bude koncentrace v celkovém objemu nižší.

Dnes se zdá, že vývoj plamenových fotometrů je už uzavřený a to přesto, že některé přístroje jsou značně automatizované a sofistikované. Plamenový fotometr se obtížně zařazuje do vybavení automatického analyzátoru a vyžaduje dodržování specifických bezpečnostních předpisů. Navíc u pacientů v těžkých stavech (např. při dehydrataci) mohou výsledky, jak bylo výše uvedeno, zkreslovat skutečný stav aktivity iontů v organismu.



Základní schéma optické emisní spektrometrie

Obr.53 Optická emisní spektrometrie

11.2.8 Atomová absorpční spektrofotometrie

Je to optická metoda založená na měření absorpce elektromagnetického záření v ultrafialové a viditelné části spektra. Atomizace vyžaduje teplotu 2000 až 3000 °K. Volné atomy stanovovaného prvku, v klinické biochemii nejčastěji Ca, Mg a dále Cu, Zn, popřípadě Fe a jiné, absorbují výhradně záření takových vlnových délek, které mohou samy vyzařovat. Paprsek světla vhodné vlnové délky prochází plamenem, do něhož je rozprašován vzorek, nebo je veden přes elektrickou pec (tzv. bezplamenová verze), do které se zavádí vzorek.

Základní části atomového absorpčního spektrofotometru jsou zdroj záření, absorpční komora, monochromátor a detektor.

Zdrojem záření je při stanovení netěkavých kovů dutá katodová výbojka (katoda je z kovu, pro který je lampa určena).

V plamenové verzi je vzorek rozprašován tryskou do **mlžné komory** a proudí společně s palivem (acetylén-vzduch) přes hořák do laminárního **plamene**.

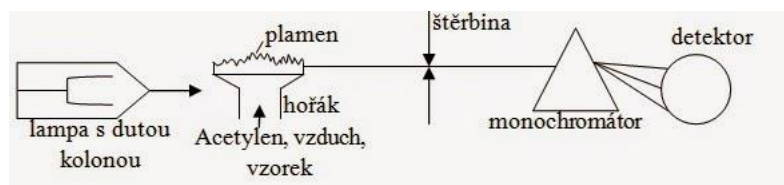
Bezplamenové elektrotermické **atomizátory** pracují ve třech teplotně odlišných krocích: napřed se vzorek z odporově vyhřívané podložky (nejčastěji grafitové) v elektrické peci odpaří, poté se odstraní těkavé látky pyrolýzou, a nakonec se provede atomizace.

K izolaci analyzované spektrální čáry od ostatních čar zdroje záření se používá **monochromátor** (mřížka) a k detekci **fotonásobič**.

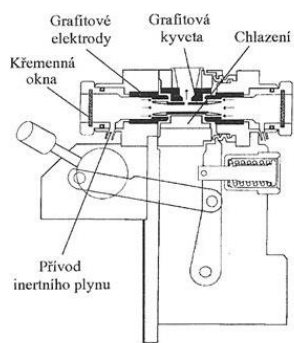
Současné špičkové přístroje umožňují automatickou volbu analyzovaného prvku (včetně všech potřebných analytických parametrů) a vzorky jsou odebírány automaticky z podavače vzorků.

V klinické biochemii jsou tato zařízení málo rozšířena, protože jsou nákladná a pokrývají poměrně úzký sortiment vyšetření.

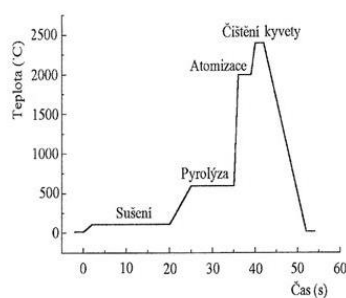
Jistý počet těchto přístrojů v oboru je ovšem nezbytný, protože stanovení většiny stopových prvků (zejména Cu a Zn) nelze spolehlivě provést jiným dostupnějším způsobem.



Obr.54 AAS s plamenem



Hlavice elektrotermického atomizátoru



Teplotní program

Obr.55 AES bez plamene



Obr.56 Grafitová kyveta

Kontrolní otázky

1. Co je AAS?
2. Rozdíl mezi turbidimetrií a nefelometrií?
3. Lambert-Beerův zákon?
4. Rozdíl mezi jednopaprskovým a dvoupaprskovým spektrofotometrem?

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, Milan. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. 2., dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7103-2.



11.3 Elektrochemické metody

Anotace, abstrakt

Elektrochemické metody patří ke **klasickým analytickým metodám využívaným pro měření fyzikálně-chemických veličin a na určování koncentrace sledovaných látek**. Základní podmínkou elektrochemické metody je, že stanovovaná látka musí mít charakter iontu nebo amfolytu, tedy látky schopné přenášet elektrický náboj.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o elektrochemických metodách a instrumentaci.

Klíčová slova

Potenciometrie, ISE, polarografie, coulometrie, konduktometrie

11.3.1 Potenciometrie

Elektrochemická metoda, při které se měří **rozdíl potenciálů** (napětí) mezi dvěma elektrodami, se nazývá potenciometrie.

Jedna z elektrod pracuje jako **referenční** (srovnávací) a má konstantní potenciál, který nezávisí na složení měřeného roztoku.

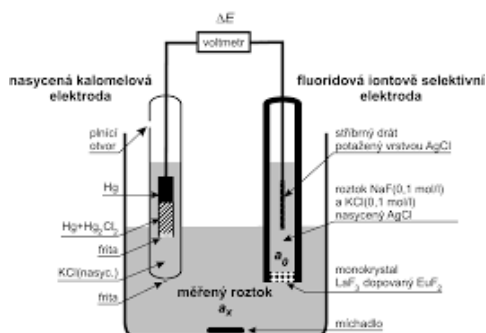
Druhá elektroda je označována jako **indikační** (měrná) a její potenciál závisí na aktivitě měřeného analytu ve zkoumaném roztoku.

Napětí mezi oběma elektrodami se měří digitálním voltmetrem.

Elektrochemické reakce probíhají téměř výhradně na povrchu elektrod.

Jde tedy o reakce heterogenní, kde velmi záleží na povrchu elektrod, který musí být dostatečně stálý a reprodukovatelný.

Biologické tekutiny jsou složité systémy a obsahují celou řadu povrchově aktivních látek, takže je to technicky dost obtížné.



Obr. 57 Stanovení Fluoridů ISE elektrodou



11.3.1.1 ISE (iontově selektivní elektrody)

Při použití iontově selektivních elektrod (ISE) rozeznáváme dva typy metod.

Nepřímé metody, kde je vzorek vkládán do měřicí komůrky s dosti velkým obsahem diluentu o vysoké iontové síle.

Jestliže se měření provádí bez ředění, hovoříme o **přímé metodě**. V tomto případě lze pracovat i s plnou krví z kapiláry, podobně jako při stanovení parametrů acidobázické regulace.

V klinické biochemii se používají tři základní konstrukce ISE: **ponorné, průtočné a suché elektrodové systémy** (slidy).

Citlivou membránu tvoří anorganická sůl (např. chloridová elektroda), sklovina (pH elektroda), polymerní matrice nebo iontoměničový roztok, nasáklý do vhodné pórovité struktury (tzv. kapalná membrána).

Komerčně dostupné přístroje používají ISE pro stanovení sodných, draselných, lithných, vápenatých, hořečnatých a amonných kationtů a pro oxid uhličitý.

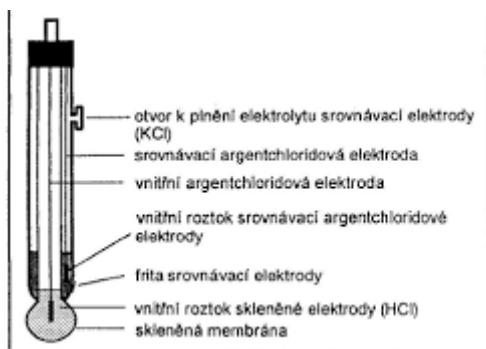
K měření oxidu uhličitého se používá **složená elektroda**; jedná se o skleněnou elektrodu, která je od měřeného prostředí oddělena membránou propouštějící CO₂.

Difuzí oxidu uhličitého do tohoto prostředí vzniká ve vodném prostředí disociovaná kyselina uhličitá a množství vzniklých protonů je stanoveno pH elektrodou. Jako referenční elektroda je téměř ve všech případech používána Ag/AgCl elektroda.

Všechny ISE jsou elektrody s velkým odporem a přesnost jejich měření závisí na citlivosti voltmetru.

Při **stanovení v moči** se musí vzorky vždy ředit diluentem s velkou iontovou silou, aby se kompenzoval vliv kolísání iontové síly v samotném vzorku moče.

Současné ISE analyzátory jsou vybaveny podavačem vzorků, dokonalým proplachovacím zařízením a možností automatické recalibrace.

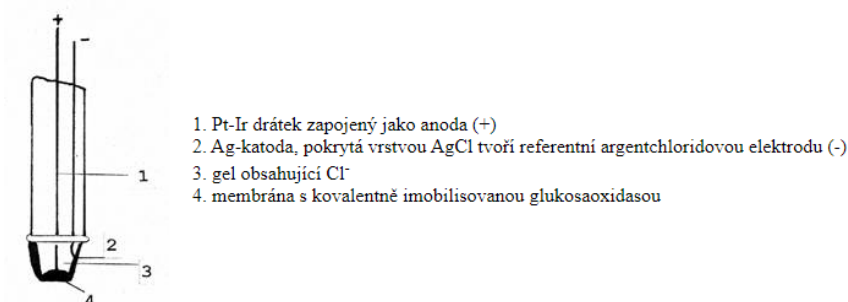


Obr.58 Schéma skleněné elektrody

11.3.1.2 Enzymové elektrody

Podstatou konstrukce enzymových elektrod je předřazení membrány s imobilizovaným enzymem (např. ureázou pro stanovení močoviny nebo glukózaoxidázou pro stanovení glukózy) před vlastní elektrochemické čidlo.

Stanovovaný substrát difunduje do enzymové membrány, kde reaguje s imobilizovaným enzymem na produkt, který se pak deteguje potenciometricky nebo ampérometricky.

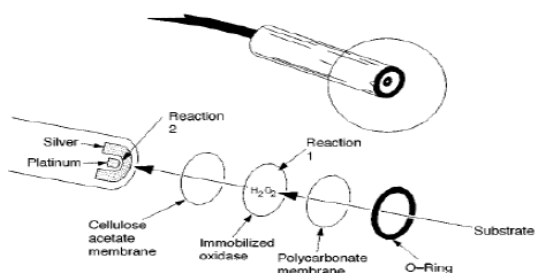


Obr.59 Enzymová elektroda

Biosenzory

Jako biosenzory jsou označovány enzymové elektrody založené na přímém přenosu elektronů. V tomto případě se mediátor využívá pro spojení enzymu s elektrodou.

Enzym je nemožné redukovat (oxidovat) přímo na elektrodě, protože by docházelo k denaturaci jeho proteinové části a tím by se celý proces velmi zpomalil a stal by se ireversibilním.



Obr.60 Glukozový biosenzor

11.3.2 Polarografie

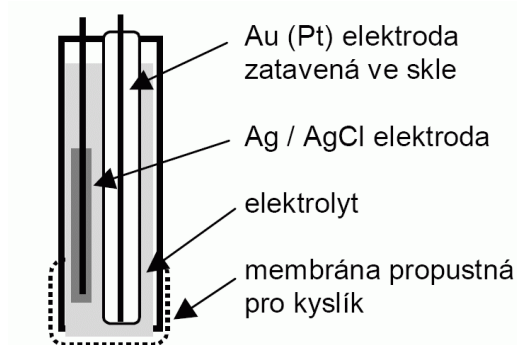
Při této elektrochemické metodě měříme intenzitu proudu ampérometricky při konstantním vnějším napětí (potenciálu).

Na tomto principu je založena **Clarkova elektroda**, která slouží ke stanovení množství kyslíku.

Kyslík rozpuštěný ve vzorku nebo v pufru difunduje přes hydrofobní membránu propustnou pro plyny ke katodě, která je obvykle z platiny.

Jako anoda slouží Ag/AgCl elektroda.

V klinické biochemii se s Clarkovou elektrodou setkáváme nejčastěji u acidobázických analyzátorů, kde se používá k měření parciálního tlaku kyslíku a v některých analyzátoch glukózy, kde se touto elektrodou sleduje úbytek kyslíku v glukózaoxidázové reakci.



Obr.61 Clarkova elektroda

11.3.3 Coulometrie

Coulometrie je metoda založená na měření náboje potřebného k úplnému vyloučení, rozpuštění nebo jiné přeměně stanovené látky na pracovní elektrodě.

Coulometrickou analýzu lze provádět za konstantního potenciálu, hovoříme o **potenciostatické coulometrii**, nebo za konstantního proudu, potom se jedná o **coulometrickou titraci**.

Coulometrické titrace se dále dělí na primární a sekundární.

V naší praxi se používá coulometrie za konstantního proudu.

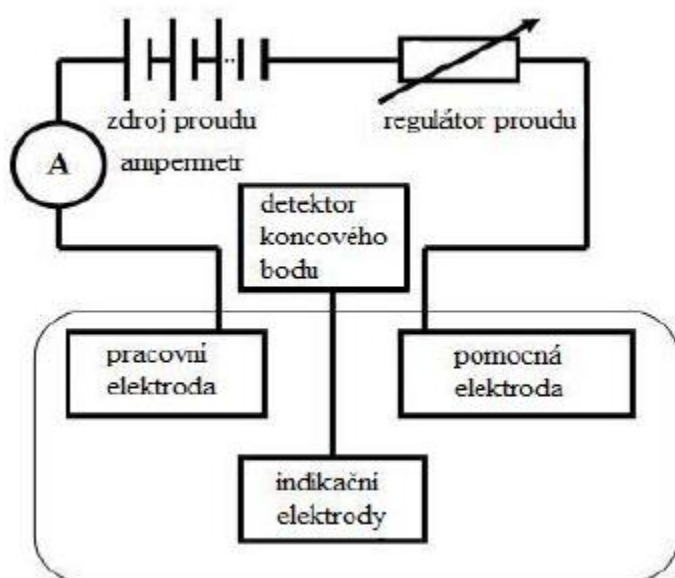
Tento postup se používá pouze ke stanovení chloridů.

Stanovovaná látka reaguje s činidlem vzniklým na jedné z elektrod ve vhodném elektrolytu.

Reakce musí probíhat se 100 % proudovým výtěžkem a činidlo musí reagovat rychle.

Např. stříbrná anoda vyvíjí Ag^+ ionty, které s chloridovými ionty vytvářejí sraženinu AgCl . Referenční elektroda je merkuro-sulfátová. Konec titrace (tj. vysrážení všech chloridových iontů) se indikuje potenciometricky dalšími dvěma elektrodami.

Podle délky titrace (t) se při konstantním proudu (I) určí náboj (Q) dle vztahu $Q = I \cdot t$ a tomu odpovídající množství titrované látky.



Obr.62 Schéma zapojení coulometrické titrace

11.3.4 Konduktometrie

Konduktometrie je elektroanalytická metoda založená na měření vodivosti elektrolytů ve vodě či jiném rozpouštědle.

Jednotkou vodivosti je **Siemens [S]**.

Hodnota vodivosti závisí na množství iontů v roztoku obsažených a na jejich pohyblivosti.

Vodivost měříme **kontuktometrem** vybaveným sondou se 2 platinovými elektrodami (povrch 1 cm^2 , vzdálenost 1 cm).

Důležitým parametrem konduktivity je **kapacita sondy C**.

$$C = \frac{\gamma}{G}$$

C - kapacita sondy [S.cm⁻¹]

γ - vodivost

G - vodivost naměřená konduktometrem



Obr.63 Konduktometr se sondou

Kontrolní otázky

1. Co je metoda konduktometrie?
2. Clarkova elektroda?
3. Princip polarografie?

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, Milan. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant. 2., dopl. vyd.* Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7103-2.



11.4 Elektroforetické metody

Anotace, abstrakt

Elektroforéza je analytická metoda založená na rozdílné pohyblivosti částic látky v elektrickém poli, která závisí na velikosti náboje, velikosti molekul, jakož i na vlastnostech prostředí.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o elektroforetických metodách a instrumentaci.

Klíčová slova

Elektroforéza, izotachoforéza, izoelektrická fokusace, kapilární elektroforéza

11.4.1 Zónová elektroforéza

Jde o nejrozšířenější elektroforetickou metodu.

Využívá jako nosiče acetylcelulózu, nebo různé gely (agarový, agarózový nebo polyakrylamidový).

Pro kvalitu separace jsou rozhodující:

- homogenita a velikost elektrického pole
- homogenita a velikost pórů nosiče a jeho fyzikálně-chemické vlastnosti,
- pH pufru, jeho iontová síla a případné interakce se vzorkem.

Při dělení na acetylcelulózových fóliích dochází k distribuci převážně podle velikosti náboje. K dělení se v elektroforetické vaně používá napětí 10 - 30 V/cm, intenzita proudu do 0,3 až 0,5 mA/cm a elektroforéza trvá 15 - 30 minut.

Po ukončení dělení se jednotlivé složky fixují a barví.

Pak se fólie odbarví, příp. zprůsvitní a vysuší. Při práci s agarem (směs polysacharidů agarózy a agaropektinu) anebo s purifikovanou agarózou se postupuje podobně.

Použití agaru má relativní nevýhodu v tom, že jeho vlákna obsahují řadu fixních disociovatelných skupin, které za alkalického pH nesou negativní náboj.

To se projevuje **elektroendoosmózou**, tedy tokem pufru směrem ke katodě, tj. proti směru dělení např. většiny sérových bílkovin. To může při elektroforéze dokonce vyvolat zpětný pohyb některých frakcí, takže místo k anodě se "pohybují" ke katodě.

Při elektroforéze na polyakrylamidovém gelu (PAGE) se látky dělí nejen na základě elektrického náboje, ale i podle velikosti molekul.



Efekt **molekulového síta** se zesílí v polyakrylamidovém gelu s gradientem hustoty.

V tomto uspořádání se ve směru pohybu dělených látek zvyšuje koncentrace akrylamidu, a tím se zmenšuje při polymeraci velikost ok sítě.

V místech zastavení pohybufrakce se vytvoří linie, aprotose tento typ elektroforézy nazývá **disková**.

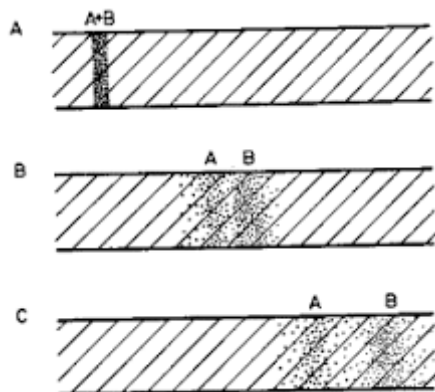
Rozlišovací schopnost tohoto typu elektroforézy je mnohem vyšší než u předchozích nosičů. Jestliže se k polyakrylamidovému gelu přidá laurylsíran sodný (dodecylsulfát sodný, SDS), mají všechny molekuly téměř stejný elektrický náboj a dělí se jen podle velikosti svých molekul.

Vyhodnocení obarvených elektroforeogramů se provádí na **densitometru** tak, že se elektroforeogram automaticky posunuje nad štěrbinou, kterou prochází světlo zvolené vlnové délky (z žárovky s halogenovou atmosférou, světlo emitující diody nebo výjimečně i laseru).

V místě frakcí dochází k částečné absorpci záření. To se projeví při jeho dopadu na čidlo (fotonku, fotonásobič) a převodu signálu na analogový záznam elektroforeogramu.

Po zpracování integrátorem získáme číselné výsledky jednotlivých elektroforetických frakcí. Tento způsob je častý při rutinních elektroforézách sérových bílkovin, kdy na jedné podložce může být současně i několik desítek elektroforeogramů.

Po ukončení snímání prvního elektroforeogramu se měřená deska automaticky posune a může se vyhodnocovat další dráha.



Obr.64 Zónová elektroforéza

11.4.2 Izoelektrická fokusace

Od předchozích technik se izoelektrická fokusace liší tím, že dělení probíhá v **gradientu pH**, který se mění rovnoměrně od kyselé do alkalické oblasti (u anody je pH nejnižší a směrem ke katodě roste).

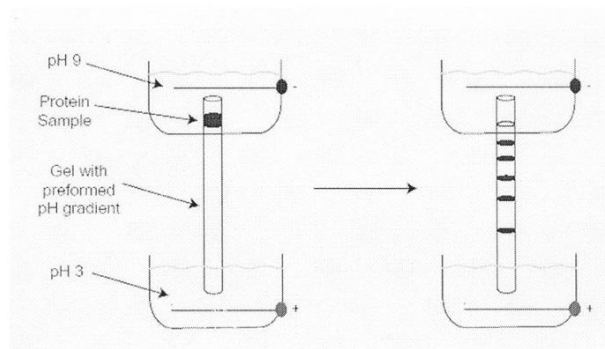
Gradientu se dosahuje pomocí amfolytů, tj. elektrolytů, obsahujících směsi organických látek se skupinami $-NH_2$ a $-COOH$), které se ve stejnosměrném

elektrickém poli seřadí podle velikosti svého **izoelektrického bodu** (pI) a vytvoří tak gradient pH.

Izoelektrický bod je hodnota pH, při níž je pro danou látku vyvážen počet kladných a záporných nábojů, takže se molekula jeví navenek jako elektroneutrální.

Při izoelektrické fokusaci je nosičem agarózový nebo polyakrylamidový gel. Metoda se používá zejména pro dělení izoenzymů.

Předností je vysoká ostrost dělení (rozlišovací schopnost), nevýhodou je pak vyšší cena amfolytových pufrů a zdlouhavost metody.



Obr.65 Izoelektrická fokusace

11.4.3 Izotachoforéza

Je to analytická metoda pro dělení kationtů a aniontů ve stejnosměrném elektrickém poli podle jejich rozdílných pohyblivostí.

U izotachoforézy je vzorek umístěn mezi dva různé elektrolyty s odlišnou pohyblivostí iontů. Na čele se pohybuje vedoucí elektrolyt, který musí mít větší pohyblivost než kterýkoliv z kationtů resp. aniontů (podle typu izotachoforézy) obsažených ve vzorku.

Na konci kapiláry je koncový elektrolyt, který má menší pohyblivost než kterýkoliv z kationtů resp. aniontů (podle typu izotachoforézy) obsažených ve vzorku. Všechny ionty se pak kapilárou pohybují stejnou rychlostí k opačně nabitým elektrodám, avšak budou seřazeny podle svých pohyblivostí. Po určité době jednotlivé složky vytvářejí ostře oddělené zóny seřazené těsně za sebou.

To, že se pomalejší ionty pohybují stejně rychle jako ionty pohyblivější je možné díky tomu, že v každé zóně je jiný **gradient potenciálu**, který je **nepřímo úměrný vodivosti** roztoku v zóně.

Na konci kapiláry je umístěné čidlo detektoru, které měří vodivost nebo absorpci UV světla dané vrstvy.

Naměřený signál se pak převede na analogový zapisovač a může být vyjádřen také v číselné formě. Při izotachofórze pracujeme s vysokým napětím (až 35 kV).

Předností izotachofórze je rychlost provedení (někdy postačují 4 minuty) a ostrost dělení.

Tímto způsobem lze stanovit několik aniontů (nebo kationtů) současně.

V klinické biochemii se tímto způsobem stanovují hlavně anionty (laktát, pyruvát, ketokyseliny aj.)

11.4.4 Kapilární elektroforéza

Provádí se v tenkých skleněných kapilárách (světlost 0,1 mm) dlouhých až 1 m, které mohou být plněny polyakrylamidovým gelem (PAA) nebo analytickým pufrům.

Při práci s PAA je princip dělení stejný jako u zónové elektroforézy.

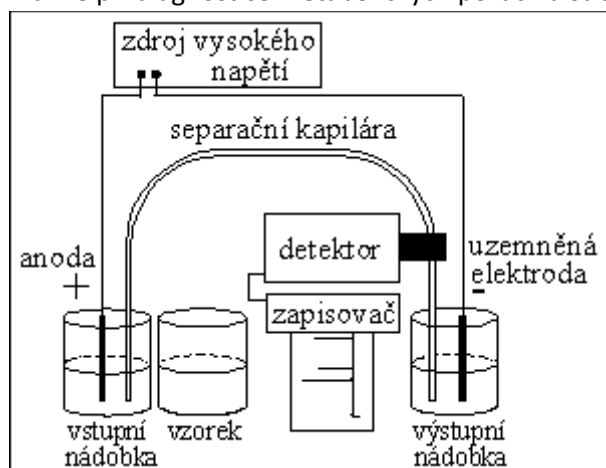
V případě použití analytického pufru se obvykle používá fosfátový pufr a vyšší napětí.

Detekce frakce se na rozdíl od zónové elektroforézy provádí UV absorpčním detektorem nebo detektorem diodového pole.

Kapilární elektroforéza je rychlá, má vysokou rozlišovací schopnost a nízkou spotřebu vzorku.

Stupeň automatizace je značný, součástí zařízení může být automatické dávkování, několikanásobný nástřik, výměna nebo doplnění pufru, změna polarity, program napětí a tlaku a sběr frakcí.

V klinické biochemii se kapilární elektroforéza používá dosud omezeně, hlavně při diagnostice metabolických poruch a subfrakcí imunoglobulinů.



Obr. 66 Kapilární elektroforéza

Kontrolní otázky

1. Co je metoda kapilární elektroforéza?
 2. Princip izotachoforézy?
 3. Princip izoelektrické fokusace?
-

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, Milan. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant. 2., dopl. vyd.* Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7103-2.

11.5 Fyzikální metody

Anotace, abstrakt

Metody založené na měření fyzikálního jevu.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o fyzikálních metodách a instrumentaci.

Klíčová slova

Osmometrie, onkometrie



11.5.1 Osmometrie

Tlak rozpuštěných, zejména nízkomolekulárních látek a iontů v roztoku odděleném polopropustnou membránou od samotného rozpouštědla se nazývá **osmotický tlak**.

Osmotický tlak je přímo úměrný celkovému počtu rozpuštěných nebo disociovaných částic. Pokud látka disociuje, je každá její disociovaná část osmoticky aktivní částicí.

Nedisociovaná látka představuje jen jednu osmoticky aktivní částici. Látková koncentrace osmoticky aktivních částic v 1 kg rozpouštědla se označuje jako **osmolalita** (mmol/kg). Měření osmolality se nazývá osmometrie.

V laboratorní práci se používá **nepřímé měření osmotického tlaku**. Vychází se z měření těch vlastností roztoků, které se mění v závislosti na změně osmolality.

V klinické biochemii se používají dva typy osmometrů. První typ využívá **snížení teploty tuhnutí** roztoku v závislosti na koncentraci částic v roztoku (kryoskopie).

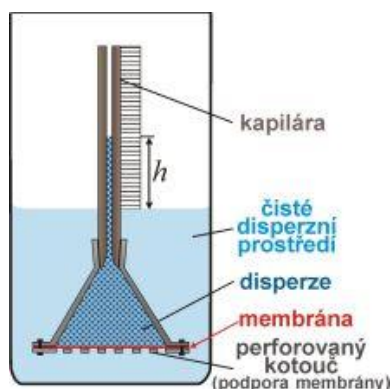
Osmometry musí být vybaveny velmi citlivým teploměrem (s rozlišitelností tisícin °C), protože snížení teploty tuhnutí je velmi malé (přibližně o 0,5 °C v séru).

Druhý typ sleduje snížení tenze par rozpouštědla nad roztokem (zvýšení teploty varu, ebullioskopie), resp. **snížení rosného bodu** par nad roztokem v závislosti na koncentraci částic v roztoku pomocí termoelektrického hygrometru.

Osmometry mohou být vybaveny podavačem vzorků a automatizovány.

Rozhodující pro osmolalitu biologického vzorku je koncentrace sodných iontů, močoviny a glukózy. V případě, že není k dispozici osmometr, lze osmolalitu orientačně vypočítat takto:

$$\text{OSM (mmol/kg)} = 2 \cdot \text{sodný iont} + \text{glukóza} + \text{urea}$$



Obr.67 Měření osmotického tlaku

11.5.2 Onkometrie

Koloidně osmotický tlak plazmatických bílkovin se nazývá **onkotický tlak**. K měření se používá polopropustná membrána, která odděluje tekutiny o různé koncentraci vysokomolekulárních látek.

Principem měření onkotického tlaku onkometrem je sledování rozdílu tlaku mezi referenční komůrkou a komůrkou s měřeným vzorkem, které jsou oddělené polopropustnou membránou, pomocí indikátoru tlaku.

Výstupní signál z indikátoru tlaku je zesílen a převeden na základě kalibrace přímo na jednotky tlaku [kPa].

Onkometry se v klinické biochemii používají vzácně a většinou bývají součástí přístrojové výbavy jednotek intenzivní péče a ARO.

Kontrolní otázky

-
1. Co je osmometrie?
 2. Vzorec pro výpočet osmolality?
-

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, Milan. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. 2., dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7103-2.



11.6 Chromatografické metody

Anotace, abstrakt

Chromatografií se rozumí analytická technika běžně používaná pro oddělení směsi chemických látek na jednotlivé složky, které pak mohou být dále analyzovány. Existuje mnoho typů chromatografie, např. kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, ionexová chromatografie, či afinitní chromatografie, ale všechny používají stejné základní principy.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o chromatografických metodách a instrumentaci.

Klíčová slova

TLC, HPLC, GC

11.6.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Při těchto postupech se využívá principu rozdělovací, adsorpční, ionexové (výměna iontů) i afinitní (specifická vazba látek na ligand, navázaný na nosič) chromatografie.

Před plotnami připravovanými v laboratoři se dnes dává přednost průmyslově vyráběným hliníkovým fóliím s litým silikagelem nebo oxidem hlinitým.

Vzorky se nanášejí pipetou a vyvíjejí se v chromatografické vaně (komoře) v soustavě rozpouštědel.

Je možné použít i dvourozměrné tenkovrstevné techniky, kdy se chromatogram po doběhnutí čela rozpouštědla na konec desky vysuší, deska se otočí o 90° a provede se chromatografie v kolmém směru s jinou soustavou rozpouštědel.

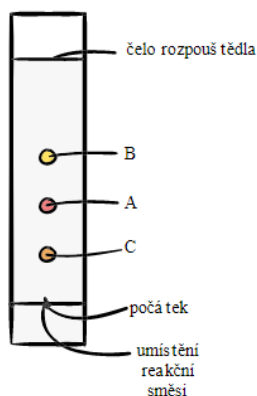
Detekce může být destruktivní (reakce s H_2SO_4 , KMnO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) nebo nedestruktivní (UV světlo, přechodná absorpce par jódu).

V současné době se také používá výraz "vysoce účinná chromatografie na tenkých vrstvách" (HPTLC) pro komerční desky s velmi tenkou vrstvou silikagelu s malou velikostí částic (do 10 μm), které umožňují podstatně účinnější dělení.

V klinické biochemii se chromatografie na tenkých vrstvách používá méně než v minulosti a spíše se dává přednost exaktnějším chromatografickým metodám.



Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)



Obr.68 TLC

11.6.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Při kapalinové chromatografii se látky dělí ve dvoufázovém dělicím systému na základě adsorpce, výměny iontů, fyzikální distribuce látek mezi kapalnou mobilní a s ní nemísitelnou kapalnou stacionární fází, nebo na principu pronikání molekul z mobilní fáze do pórů tuhých částic, které mají funkci molekulového síta.

Celý děj se odehrává ve speciálně konstruovaných trubicích, nazývaných kolony.

Účinnost všech typů chromatografických kolon se hodnotí podle počtu teoretických pater, které odpovídají výkonem zhruba patrům destilační kolony.

Čím je větší počet pater, tím je kolona účinnější. Účinnost chromatografických kolon je obrovská, dosahuje i několika set tisíc teoretických pater.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) pracuje s úzkými ocelovými, skleněnými nebo křemennými kolonami, které obsahují nosné částice (<10 µm) se stacionární fází.

Průtok mobilní fáze neprobíhá účinkem gravitace jako u klasické kapalinové chromatografie, ale obvykle pod určitým tlakem. Někdy postačuje 1 MPa, skleněné kolony vydrží až 30 MPa, ale čerpadla mohou vyvinout tlak kolem 100 MPa. Častěji se používá nízkotlaká HPLC (několik MPa) než vysokotlaká HPLC (desítky MPa).

Při dávkování vzorku do kapalinového chromatografu lze v případě nízkotlaké verze použít přímý nástřik na kolonu přes elastickou membránu.

Vysokotlaká HPLC vyžaduje použít speciální ventil s dávkovací smyčkou. Vícecestný ventil umožňuje nástřik do smyčky a současně jinou cestou prochází mobilní fáze ze zásobníku do kolony. Po přepnutí ventilu se vytlačí vzorek mobilní fází ze smyčky na kolonu.

Na koloně se látky rozdělují zpravidla eluční metodou. Kolony mohou být také mírně vyhřívány, ale zpravidla se ohřev nepoužívá.

Na výstupu z kolony je připojen detektor UV-VIS, fluorimetrický, detektor diodového pole, popřípadě elektrochemický, kde se sleduje coulometricky oxidoredukční reakce stanovených látek na pracovní elektrodě.

Získaný signál jde na analogový zapisovač a je číselně vyhodnocen integrátorem. Jako detektor lze také použít **hmotnostní spektrometr**, což je analyticky vynikající, ale technicky i finančně velmi náročné řešení, protože je nutné propojit vysokotlakou HPLC část s hmotnostním spektrometrem, kde je naopak vysoké vakuum.

Významnou částí kapalinového chromatografu jsou čerpadla. Moderní přístroje využívají obvykle dvě pulzní pístová čerpadla, jejichž činnost je fázově posunuta a pohybují se tak, aby došlo k maximálnímu potlačení pulzace toku mobilní fáze.

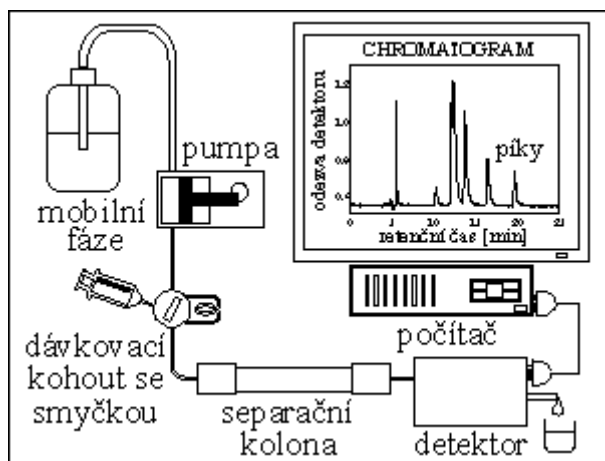
Mobilní fáze může mít konstantní polaritu, kdy čerpadlo pumpuje do kolony jediné rozpouštědlo (např. metanol).

Tento režim, který se nazývá **izokratický**, se používá nejčastěji. Je také možné měnit eluční sílu mobilní fáze tak, že se postupně mění zastoupení dvou nebo více rozpouštědel.

Tuto **gradientovou** eluci lze provést jak v nízkotlaké, tak ve vysokotlaké variantě. Stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze je polární. Nejrychleji se tedy eluují nejvíce polární sloučeniny.

Toto uspořádání se nazývá **reverzní (obrácené) fáze**. Název reverzní má historickou podstatu: v začátcích HPLC byla stacionární fáze polárnější než mobilní, dnes je to obráceně - proto reverzní (obrácené) fáze.

HPLC má v klinické biochemii podobné využití jako plynová chromatografie, ale navíc lze tuto metodu aplikovat i při stanovení termolabilních látek, např. enzymů. Existují plně automatizované HPLC systémy schopné nepřetržitého provozu, kde lze udělat i několik set analýz za 24 hodin.



Obr.69 Schéma HPLC

11.6.3 Plynová chromatografie

Je to fyzikálně chemická metoda, při které dochází k dělení směsi látek na základě distribuce mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (zakotvenou) fází.

Mobilní fází je plyn, stacionární fází může být pevná látka a metoda se označuje jako **adsorpční** plynová chromatografie, nebo kapalina, a pak se jedná o **rozdělovací** plynovou chromatografii.

Těmito technikami můžeme dělit všechny látky, které lze po zahřátí kolony na pracovní teplotu (až 400 °C) převést bez rozkladu na plynnou fází. U látek s vysokou teplotou varu se provede **derivatizace**, tj. reakce, jejímž výsledkem jsou deriváty původní sloučeniny s nižší teplotou varu. Pevné vzorky se předem rozpustí v těkavých kapalinách.

Dělení probíhá v plynovém chromatografu. Vzorky se nastříkují do vyhřívaného dávkovače přes plynotěsnou elastickou membránu velmi přesnou stříkačkou.

Pak dochází ke zplynění vzorku a jeho páry jsou nosným plynem, jímž je zpravidla dusík nebo argon, unášeny do vyhřívané kolony. Používají se kolony náplňové nebo kapilární.

Při průchodu kolonou se jednotlivé látky dělí na principu adsorpční nebo rozdělovací chromatografie. Po rozdělení procházejí separované sloučeniny detektorem.

Detektor pracuje na principu **plamenoionizačním**, kde se rozdělené složky zavádějí do plamene vodík-vzduch a sleduje se jejich ionizace, nebo se jedná o **detektor elektronového záchytu**, kde dochází k záchytu elektronů z beta-zářiče elektronegativními atomy stanovené látky a tím ke snížení měřeného ionizačního proudu.

Signál jde na analogový zapisovač a integrátorem je zpracován na číselný výstup.

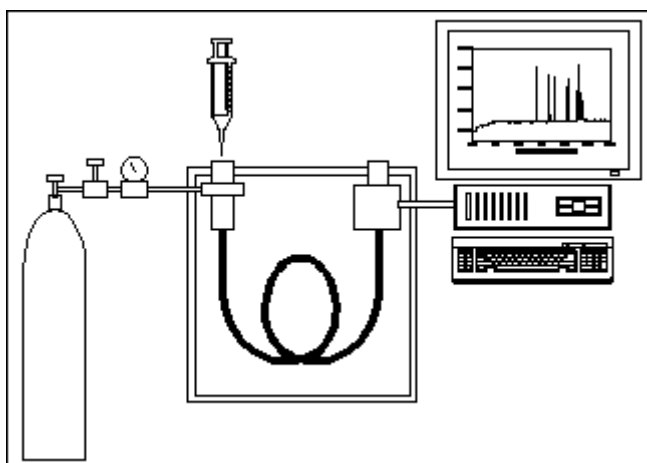
Pro stanovení jednotlivých složek separovaných plynovou chromatografií lze použít také **hmotnostního spektrometru**.

Tento způsob detekce nabízí špičkové plynové chromatografy. V iontovém zdroji hmotnostního spektrometru při vysokém vakuu dostávají molekuly pozitivní náboj.

Pak procházejí elektrickým polem, kde se jednotlivé fragmenty i molekulový kation urychlují podle velikosti náboje a kolmo působícím magnetickým polem, kde se vychylují podle své hmotnosti a dopadají na detektor (počítač částic).

Tak vzniká hmotnostní spektrum, které charakterizuje nejen kvantitativní zastoupení látek, ale také velmi spolehlivě vypovídá o jejich kvalitě (tj. o jakou sloučeninu se jedná).

V klinické biochemii se plynová chromatografie používá zejména při stanovení léčiv a jejich metabolitů, a dále pro stanovení alkoholu, organických kyselin, hormonů a steroidů.



Obr.70 Schéma GC

Kontrolní otázky

1. Princip TLC?
2. Princip HPLC?
3. Princip GC?



Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

DASTYCH, Milan. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. 2., dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7103-2.



12 Hematologie

P.BRADÁČOVÁ

Hematologie je lékařská disciplína, která se zabývá studiem krve (lat.hema = krevní) a všemi jejími složkami.

Studuje krevní buňky, leukocyty, erytrocyty a trombocyty z hlediska jejich počtu, morfologie a funkce. Hematologické laboratorní vyšetření patří mezi základní vyšetření, bez kterého se neobejde žádný lékař. Na jeho základě lékař stanovuje diagnózu, a prognózu onemocnění, nebo kontroluje účinnost léčby. Stanovení diagnózy lékařem je až z 80 % závislé na výsledcích laboratorních vyšetření.

Vyšetření krevního obrazu a **morfologické vyšetření krevního nátěru** mohou velmi napomoci při diagnostice onemocnění krvetvorby, jako jsou například anémie, trombocytopenie, akutní leukemie, lymfoproliferativní nebo myeloproliferativní onemocnění atd.

Hematologie se dále zabývá **srážlivostí krve a všemi faktory**, které se na srážení podílejí. Koagulační vyšetření mohou odhalit různé vrozené nebo získané poruchy srážlivosti krve, například krvácivé stavy u koagulopatií, nebo naopak trombotické stavy u trombofilií.

12.1 Krev

Anotace, abstrakt

Krev je tekutý orgán, který přichází do kontaktu se všemi vnitřními orgány, a proto se jejich poruchy odrazí i na změnách složení krve.

Cíl kapitoly

Seznámit studenty se základními pojmy a principy nezbytnými pro úvod do studia hematologie.

Klíčová slova

Leukocyty, erytrocyty, trombocyty, plazma.

12.1.1 Úvod

Krev je tekutá tkáň složená z krevních elementů a plazmy. **Objem krve dospělého člověka činí cca 4,5 – 5,5 litrů.** U mužů je objem krve vyšší než u žen. Krev je důležitý spojovací a transportní systém = zajišťuje nepřetržitou výměnu látek mezi buňkami. Napomáhá udržovat stálost vnitřního prostředí. Krev plní svou funkci pouze tehdy, jestliže se v organismu pohybuje, což je zajištěno cévami a činností srdce.

12.1.2 Funkce krve

Hlavní funkcí krve je transport okysličené krve s O₂ z plic do tkání, a naopak CO₂ z tkání do plic. Dále přenos živin, hormonů, minerálů, vitamínů,



enzymů, protilátek atd. do různých tkání a orgánů. Krev také zajišťuje odvod odpadních látek. Složky krve, např. leukocyty a protilátky, se podílí na imunitní obraně organismu.

Krev a její složky pomáhají udržovat:

- Stálé pH 7,36 – 7,42
- Stálou teplotu
- Stálou tekutost krve

12.1.3 Složení krve

Již řecký lékař Hippokrates vyzoroval, že pokud necháme krev po přidání soli v klidu stát, rozdělí se na dvě části:

- Plazma
- Krevní elementy



1. Plazma

Plazma je extracelulární nažloutlá průhledná tekutina. Tvoří fyziologicky 55 % z celkového objemu krve. Obsahuje z velké části vodu, bílkoviny, sacharidy, lipidy, vitamíny, hormony, enzymy, protilátky, stopové prvky atd. V plazmě jsou přítomny plazmatické bílkoviny - koagulační faktory, které jsou nezbytné pro hemostázu. Plazmu získáme centrifugací nesrážlivé krve, sérum získáme centrifugací srážlivé krve.

2. Krevní elementy tvoří 45 % z celkového objemu krve:

- **Erytrocyty** - červené krvinky (*lat.erythros = červený*). Hlavní funkcí transport krevních plynů O₂, CO₂. Ve zralém stadiu jsou bezjaderné buňky.
- **Leukocyty** - bílé krvinky (*lat.leukos = bílý*). Hlavní funkcí je obrana organismu a tvorba protilátek. Dělí se dále neutrofily, eosinofily, basofily, monocyty, lymfocyty. Obsahují jádro
- **Trombocyty** – krevní destičky (*lat.thrombos = sraženina*). Hlavní funkcí je účast na zástavě krvácení a regeneraci cév. Považují se za útržky cytoplazmy plazmy mateřské buňky megakaryocytu.

Kontrolní otázky

1. Jaká je základní funkce krve?
2. Jaké je základní složení krve?



Místo pro doplnění



Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. *Hematologie a transfúzní lékařství*, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.



12.2 Krvetvorba

Anotace, abstrakt

Krvetvorba je v různých obdobích života odlišná, reaguje tak na neustále se měnící potřeby jedince od embryonálního období, přes fetální až po krvetvorbu v dospělém věku.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o hematopoéze a hematopoetických kmenových buňkách.



Klíčová slova

Hematopoetická pluripotentní kmenová buňka, prekurzorová buňka, progenitorová buňka, efektorová buňka.



12.2.1 Úvod

Krvetvorba, neboli hematopoéza, také hemopoéza, se v různých obdobích života jedince liší. Období krvetvorby lze rozdělit na prenatální a postnatální. Krvetvorba nejprve začíná ve žloutkovém vaku, později v játrech, ve slezině a nakonec v kostní dřeni.

12.2.2 Prenatální

Jedná se o krve tvorbu embryonální nebo fetální v době těhotenství.

1. Mezoblastové období

Probíhá během embryonálního vývoje mezi **3-10 týdnem gravidity**. Nejprve **ve žloutkovém vaku** vznikají ostrůvky primitivních hematopoetických buněk, okolo epitelie area vasculosa. Tvoří se převážně erytroidní elementy. Dochází ke vzniku **pluripotentních kmenových buněk** – z nich se tvoří primitivní velké erytroblasty, které obsahují embryonální hemoglobiny Hb Gower a Hb Portlans, dále fetální HbF a také v menší míře HbA dospělých (adult). 4. týden vývoje se cévy žloutkového vaku spojí s cévním systémem embrya.

2. Hepatolienální období

Trvá zhruba od 6. týdne embrya do porodu. Extramedulární krev tvorba (mimo kostní dřev) probíhá v játrech, a dále pak ve slezině. Nyní se již tvoří mateřské buňky leukocytů a trombocytů. Tvoří se thymus, kde vznikají mateřské lymfocyty.

3. Medulární krev tvorba

Dřeňová krev tvorba začíná od 20. týdne vývoje plodu. V kostech vznikají dutiny pro dřeňovou krev tvorbu. V kostní dřev plodu je pool (zásoba) mateřských hematopoetických buněk na různém stadiu vývoje, a také jsou přítomny zralé buňky.

Normoblasty nazýváme mladé jaderné erytroblasty. V prenatálním období obsahují HbF až v 90 %.

12.2.3 Postnatální krev tvorba

Jedná se o poporodní krev tvorbu, která probíhá po narození až do smrti. 2-3 týdny po narození zaniká extramedulární krev tvorba v játrech a slezině. Nové erytrocyty se již tvoří s převahou HbA, postupně ubývá HbF. Za patologických stavů může znovu dojít k extramedulární krev tvorbě v játrech, slezině a v mizních uzlinách.

Kostní dřev

- **Aktivní červená** je ve všech kostech po narození, později už jen ve sternu, obratlích, pánvi, žebrech, lopatkách.
- **Inaktivní tuková** postupně nahradí v ostatních kostech kostní dřev červenou.

Kostní dřev je tvořená krev tvornou tkání s kmenovými buňkami, viz výše, podpůrnou tkání tvořenou fibroblasty, cévami – sinusoidami pro krevní zásobení a nervy.

12.2.4 Přestup buněk z Kostní dřevě do periferní krve

- **Erytrocyty jsou deformovatelné**, mají flexibilní membránu a mohou přestupovat skrz mezery mezi endotelovými buňkami do krevních sinusoid, kterými jsou pak dopraveny do krevního oběhu.
- **Leukocyty prochází diapedézou**, zralá buňka vysune výběžek cytoplazmy mezi endotelové buňky a pak se protáhne celé jádro a zbytek

cytoplazmy. Nezralé buňky u zdravého jedince tuto schopnost nemají, na rozdíl od leukemických buněk, které jsou sice nezralé, ale mají schopnost přesunu do periferní krve.

- **Výběžky megakaryocytů, mateřských buněk trombocytů**, prorůstají do krevních sinusoid a krevní proud strhává útržky trombocytů do periferní krve.

12.2.5 Buňky v kostní dřeni

1. Hematopoetická pluripotentní kmenová buňka

Fyziologicky se nachází pouze v kostní dřeni. Zajišťuje dlouhodobou obnovu krvetvorby. Tyto buňky mají schopnost pluripotence, to znamená, že se mohou diferencovat do všech buněk krevních řad, myeloidní i lymfoidní, ale ne do buněk jiných tkání, např. kostní, svalová atd. Mají schopnost nekonečné sebeobnovy, tím je zajištěna jejich nesmrtelnost. Migrují z kostní dřeni do periferní krve a zpět.

Dělení probíhá asymetricky, to znamená, že z jedné mateřské buňky vznikne jedna zralejší dceřiná buňka a jedna stejně nevyzrálá buňka, tím je zajištěna sebeobnova a dochází k udržení stálého počtu kmenových buněk.

2. Progenitorové buňky

Fyziologicky se nachází pouze v kostní dřeni. Progenitorové buňky již nemají schopnost sebeobnovy.

Buňky jsou schopny diferenciace pouze pro:

- myeloidní řadu – **myeloidní progenitorová buňka** pro erytrocyty, granulocyty, monocyty, trombocyty
- nebo pro lymfoidní řadu – **lymfoidní progenitorová buňka** pro T-lymfocyty, B-lymfocyty a NK buňky.
-

3. Prekurzorové buňky

Fyziologicky se nachází pouze v kostní dřeni. Tyto buňky jsou určené už pouze pro jednu krevní linii:

- Proerytroblast pro erytrocyty
- Myeloblast pro granulocyty
- Monoblast pro monocyty
- Megakaryoblast pro trombocyty
- Lymfoblast pro lymfocyty
-

4. Zralé efektorové buňky

Buňky, které plní funkci, pro kterou byly vytvořeny. Nachází se v kostní dřeni i periferní krvi. Patří sem erytrocyty, neutrofily, eosinofily, basofily, monocyty, lymfocyty a trombocyty.

12.2.6 Podpora a regulace krvetvorby

Velmi složitý proces krvetvorby musí být regulován a podporován dalšími činiteli:

- **Růstové faktory**
- **Hormony**

- Erythropoetin – tvořen v ledvinách, podporuje tvorbu erytrocytů.
- Trombopoetin – tvořen v játrech a ledvinách, podporuje tvorbu trombocytů.
- **Cytokiny-interleukiny** IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7 atd.
- **Hematopoetické indukční prostředí kostní dřeně**
- **Pohlavní hormony**
 - Mužské podporují krve tvorbu
 - Ženské tlumí krve tvorbu

Kontrolní otázky

1. Vysvětlete pojem „pluripotentní kmenová buňka“.
 2. Vyjmenujte druhy buněk v kostní dřeni.
 3. Vyjmenujte hormony ovlivňující vznik erytrocytů a trombocytů.
-

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. *Hematologie a transfúzní lékařství*, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.



12.3 Erytrocyty

Anotace, abstrakt

Hlavní funkcí erytrocytů je transport krevních plynů O₂ a CO₂. Fyziologická vývojová řada erytrocytů se nazývá normoblastová, patologická krvetvorba megaloblastová.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o vývojových řadách erytrocytů a látkách, které ji ovlivňují.

Klíčová slova

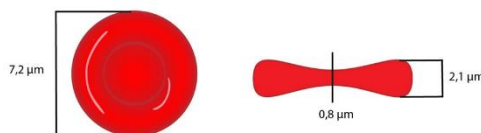
Normoblasty, megaloblasty, retikulocyty.

12.3.1 Úvod

Hlavní funkcí erytrocytů je přenos krevních plynů O₂ z plic do tkání a CO₂ z tkání do plic. Velikost erytrocytu je fyziologicky 7,2 μm. Má bikonkávní tvar, což mu dává velký povrch pro přenos O₂. Zralý erytrocyt je bezjaderná buňka. Erytrocyt žije 120 dní, vývoj jeho zrání trvá 7 dní. Erytropoéza je podporována hormonem erythropoetinem, který se tvoří v ledvinách.

Fyziologický počet erytrocytů:

- muži 4,0-5,8 x 10¹²/l
- ženy 3,8-5,2 x 10¹²/l



Pro fyziologickou krvetvorbu jsou nezbytné aminokyseliny, železo, vitamíny B12, B6, kyselina listová. Pokud je nedostatek, může dojít ke vzniku anémie.

Krvetvorba může být dvojího typu:

- **Normoblastová krvetvorba** – fyziologická krvetvorba, kdy se tvoří normální erytrocyty, také je nazýváme normocyty.
- **Megaloblastová krvetvorba** – patologická krvetvorba, ke které dochází vlivem nedostatku vitamínu B12 a kyseliny listové. Tvoří se obrovské erytrocyty, které nazýváme megalocyty.

12.3.2 Normoblastová vývojová řada

Zráním buňky se její velikost buňky se postupně zmenšuje. Jádru má nejprve jemný chromatin, později hutný až hrudkovitý. Cytoplazma je nejprve sytě modrá, poté světle modrá, modro-růžová až nakonec růžová. Erytoblasty nacházíme fyziologicky pouze v kostní dřeni.



Proerythroblast

Prekursorová buňka, nejmladší nejméně zralá buňka. Velikost 14-20 um. Jádru má jemný chromatin. V cytoplazmě je počínající tvorba hemoglobinu (HGB). Jádru tvoří 80 % plochy buňky, v jádru může být přítomno 1 a více tmavších jadérek. Cytoplazma je silně basofilní-modrofialová, a může vytvářet tzv. pseudopodie – ouška po stranách buňky. Okolo jádra lze vidět perinukleární projasnění, jedná se o oblast Golgiho komplexu.

Basofilní erythroblast

Velikost buňky je 12-17 um. Jádru má zralejší, lehce hrubší chromatin, je menší a bez jadérek a je centrálně uložené. Plazma je méně basofilní, dochází k větší tvorbě HGB.

Polychromní erythroblast

Velikost buňky je 12-15 um. Jádru má hrubý chromatin, cytoplazma je modrošedá, stále se zde tvoří HGB. Buňka je ještě schopna dělení.

Ortochromní erythroblast

Velikost buňky je 8-12 um. Jádru má velmi hrubý a hutný chromatin, již v něm neprobíhá syntéza DNA. Plazma je šedorůžová, ještě není plná hemoglobinizace, stále probíhá tvorba HGB. Buňka již není schopna dělení.

Retikulocyt

Velikost buňky je 7-9 um. Retikulocyt vzniká z ortochemního normoblastu po vypuzení jádra. Je větší než normocyt. V kostní dřeni je asi 2-3 dny, pak přechází do periferní krve. V cytoplazmě probíhá ještě syntéza HGB, plazma je již růžová. Po obarvení Brilant-Kresylovou modří lze v cytoplazmě pozorovat substantia reticulofilamentosa – zbytky ribosomální RNA.

Normocyt

Velikosti buňky je 7,2 um. Normocyt je zralá bezjaderná buňka. Cytoplazma je růžová, nemá jádro, již neprobíhá proteosyntéza, netvoří se enzymy. Vzniká za 48 hod po stádiu retikulocyty.

12.3.3 Megaloblastová vývojová řada

Hlavní rozdíl u megaloblastové řady oproti normoblastové je ve struktuře jaderného chromatinu. U megaloblastové řady zaostává vývoj jádra za cytoplazmou, dochází k plazmojaderné asynchronii. Buňky jsou obvykle větší, cytoplazma je basofilnější.

Promegaloblast

Velikost buňky je 19-28 um. Jádru má velmi jemný chromatin, mnohem jemnější než erythroblast. V jádru může být přítomno 3–5 jadérek. Cytoplazma silně basofilní.

Basofilní megaloblast

Velikost buňky je 17-24 um. Chromatin je lehce zahuštěný než u megaloblastu. Jádru je centrálně uložené a plazma je silně basofilní.

Polychromní megaloblast

Velikost 15-20 μm . Chromatin je více zhuštěný a cytoplazma je modrošedá.

Ortochromní megaloblast

Velikost 10-15 μm , chromatin je hustý, hrudkovitý, jádro je obvykle excentricky uložené. Plazma je již růžovošedá.

Retikulocyt

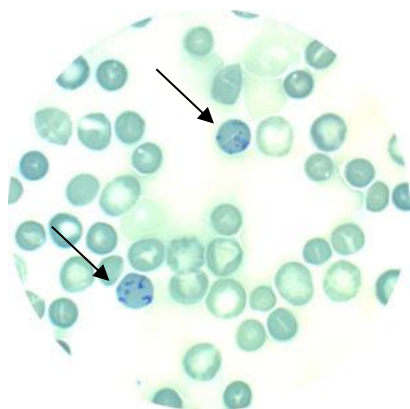
V megaloblastové řadě není přítomen, protože než došlo k jádru, ve zralé cytoplazmě už nezůstaly žádné zbytky RNA.

Megalocyt

Velikost je 9-12 μm , cytoplazma je růžová.

12.3.4 Retikulocyty

Vyšetření retikulocytů lze provést mikroskopicky. Vzorek krve se obarví supravitálním barvením Brillant-Kresylovou modří, poté se provede nátěr a při zvětšení 1000x se hodnotí počet retikulocytů na 1000 erytrocytů. Moderní analyzátory již umožňují automatické stanovení počtu retikulocytů v rámci měření krevního obrazu.



Kontrolní otázky

1. Vyjmenujte buňky normoblastové vývojové řady
2. Vyjmenujte buňky megaloblastové vývojové řady.
3. Co jsou to retikulocyty.



Místo pro doplnění



Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. Hematologie a transfuzní lékařství, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.



12.4 Hemoglobin, hemolýza, metabolismus železa

Anotace, abstrakt

Hemoglobin je krevní barvivo, jehož hlavní úlohou je vazba O₂ a CO₂. V různých obdobích života se tvoří různé druhy hemoglobinu. Při hemolýze dochází k rozpadu erytrocytů. Pro správnou krevtvorbu je nezbytný dostatek železa.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o struktuře hemoglobinu a hemolýze a metabolismu železa.

Klíčová slova

Hemoglobin, hem, globin, železo



12.4.1 Úvod

Hemoglobin je krevní barvivo, jehož hlavní funkci je vazba O₂. Hemoglobin tvoří 80-90% sušiny erytrocytu. Uprostřed molekuly je centrální dutina, její velikost se mění podle toho, zda je navázán O₂.

Fyziologické rozmezí hemoglobinu:

- ženy 120-160 g/l
- muži 135-175 g/l

12.4.2 Hemoglobin

Hemoglobin je tetramer, který se skládá z hemu a globinu. Je tvořen 4 hemy a 4 globiny (2x řetězec alfa a 2x řetězec beta). Uprostřed jedné podjednotky je vždy železo Fe²⁺ (celkem 4x Fe²⁺ v HGB). Fe²⁺ váže celkem 6 ligandů, čtyři vazby jsou v tetrapyrolovém kruhu, jedna vazba je na globin a jedna vazba je na O₂. Celkem HGB váže 4x O₂

Hem

Enzym hemsyntetáza zabudovává do protoporphyrinu Fe²⁺, vznikne hem. Hem je tvořen v erytroblastech (ne v erytrocytech) v mitochondriích. Skládá se ze 4 tetrapyrolových prstenců protoporphyrinu se 4 atomy Fe²⁺. Na hem se váže O₂. Hem je obsažen v myoglobinu, cytochromu, peroxidázách. Hem stimuluje tvorbu globinových řetězců.

Globin

Globin je bílkovinná část hemoglobinu. Je tvořen v ribozomech na endoplazmatického retikulu v erytroblastech. Enzym hemsyntetáza připojí ke globinu hem = vznikne hemoglobin. Maximální tvorba hemoglobinu probíhá v basofilním erytroblastu. Na globin se váže CO₂.

Druhy globinových řetězců v hemoglobinu:

- **Embryonální Hb Gower** – skládá se ze 2 řetězců alfa, 2 řetězců epsilon
- **Fetální HbF** – skládá se ze 2 řetězců alfa, 2 řetězců gama
- **HbA1 dospělých** – tvoří 97 % všech erytrocytů dospělých, skládá se ze 2 alfa, 2 beta
- **HbA2** – tvoří fyziologicky <3 % všech erytrocytů, skládá se ze 2 alfa, 2 delta.
- **Embryonální a fetální hemoglobin má ↑ afinitu k O₂**, aby mohlo dojít k přenosu O₂ z mateřského HbA do HbF.

12.4.3 Druhy hemoglobinů

Oxyhemoglobin

Vzniká oxygenací po vazbě O₂ na Fe²⁺ v hemu. K vazbě O₂ na hem dochází za 0,01 s, uvolní se H⁺ a naváže se O₂, vzniká HbO₂. První molekula O₂ se váže pomalu, druhá a třetí rychle, čtvrtá pomalu (protože HGB už je saturován). Vazba první molekuly O₂ vyvolá strukturální změny v Hb, a proto se další molekuly O₂ se váží snadněji. Má jasně červenou barvu. Při deoxygenaci dochází k uvolnění O₂ z Hb a vzniká deoxyhemoglobin.

Karbaminohemoglobin

Vzniká po vazbě CO₂ na globin. Má tmavě červenou barvu.

Methemoglobin

Jedná se o hemoglobin, který obsahuje hem s navázaným Fe³⁺ namísto Fe²⁺. Tento hemoglobin-methemoglobin není schopen vazby O₂. Vzniká při působení oxidačních činidel, léků a u vrozené methemoglobinémie. Má hnědou barvu.

Karbonylhemoglobin

Vzniká při otravě oxidem uhelnatým, dochází k pevné vazbě CO na Fe²⁺. CO má 300x silnější afinitu k HGB než O₂. Vzniká v důsledku otravy při špatném spalování, kouřem při požáru, výfukovými plyny. Již po pár minutách vdechování CO vznikne až 50 % COHb. Reverzibilní vazbu lze porušit po inhalaci O₂ v hyperbarické komoře. Silní kuřáci mají až 10 % COHb, Karbonylhemoglobin je karmínově červený.

12.4.4 Hemolýza

Hemolýza je rozpad erytrocytů. Erytrocyty fyziologicky přežívají 120 dní. Při stárnutí erytrocytu se snižuje obsah enzymů glukózo-6-fosfát-dehydrogenázy, hexokinázy a pyruvátkinázy a energetické sloučeniny adenosin trifosfátu. Buňka se postupně zmenšuje, ztrácí schopnost deformace a při průchodu tenkými kapilárami se poškodí. Dochází k jejímu odbourávání a recyklaci.

Extravaskulární hemolýza

90% destrukce probíhá extravaskulárním rozpadem mimo cévy. K destrukci a k recyklaci přibližně 1 % erytrocytů denně dochází fyziologicky ve slezině prostřednictvím monocytomakrofágového systému (MMS). Dojde k protržení membrány erytrocytu, hemoglobin je rozštěpen hemoxygenázou na hem, uvolní se Fe, a dále na globin, uvolní se aminokyseliny. Fe se váže na transferin a putuje do zásob jako feritin nebo hemosiderin. Nebo je Fe transportováno do kostní dřeně, kde je zabudováno do nově vznikajících erytrocytů. Zbýlý protoporfyrinový kruh je rozštěpen a vzniká zelený biliverdin. Tento je redukován na nekonjugovaný bilirubin, je transportován do jater, kde je konjugován s kyselinou glukuronovou. Poté je vyloučen žlučí do střeva, zde se mění na urobilinogen na urobilin a je vyloučen do moči. Nebo se přemění na sterkobilinogen, poté na sterkobilin a je vyloučen stolicí.

Intravaskulární hemolýza

10 % destrukce naprosto zničených erytrocytů, které se rozpadají přímo v cévách v krevním oběhu. Hemoglobin je uvolňován do krve a váže se na **haptoglobin**. Tento komplex je vychytáván MMS a dále už podléhá běžnému rozpadu (viz extravaskulární rozpad).

Pokud je ale hemolýza masivní, haptoglobin je celý spotřebován a volný hemoglobin zůstává v plazmě. Volný hemoglobin se vylučuje ledvinami, může dojít k jejich poškození vlivem velké molekuly hemoglobinu.

12.4.5 Metabolismus železa

60-70 % železa je v organismu uloženo v hemoglobinu, 10 % tvoří myoglobin, cytochromy a enzymy, 20-30 % je uloženo jako zásobní železo. Ženy mají méně železa než muži. Hlavní místo regulace železa v organismu je v játrech.

Funkce železa v organismu:

- Přenos O₂, syntéza DNA, RNA a dalších proteinů
- Účast na buněčné proliferaci a apoptóze
- Syntéza myelinu a dendritů, což má vliv na učení a paměť
- Ovlivňuje imunitní systém

Potravou přijímáme železo ve formě Fe³⁺, následně je cytochrom B reduktázou redukováno na Fe²⁺. Fe²⁺ se z potravy vychytává střevní mukózou do enterocyty. Ceruloplazmin opět oxiduje Fe²⁺ na Fe³⁺. Část železa se inkorporuje do zásobní formy feritinu ve formě Fe³⁺. Část absorbovaného železa přestupuje pomocí feroportinu z enterocyty do plazmy, kde je Fe³⁺ transportováno ve vazbě na transportní bílkovinu transferin. Transferin je zachycen erytrocyty přes transferinový receptor, dochází k redukci na Fe²⁺. Fe²⁺ je zabudováno do protoporfyrinu pomocí hemsyntetázy za vzniku hem a následně hemoglobinu.

Transferin je transportní bílkovina pro Fe³⁺. Transferin je fyziologicky saturován z 1/3 celkové vazebné kapacity, toto se nazývá vázaná kapacita železa. Pokud je snížené množství železa v organismu, snižují se i zásoby železa a volná vazebná kapacita železa stoupá.

Hepcidin je syntetizován v játrech a reguluje metabolismus železa v organismu. Hepcidin blokuje feroportin. Hladina hepcidinu se zvyšuje při zánětu.

Transferinový receptor odráží hladinu zásobního železa. Při vyšetření sideropenické anemie je vyšetření transferinového receptoru nejprůkaznější.

Solubilní transferinový receptor se uvolní z membrány erytroblastu, zachytí volné železo z plazmy a znovu se připojí k erytroblastu a železo předá do buňky.

Rofeocytóza je přestup železa do erytroblastů z makrofágů se zásobím železem, buňky se k sobě přiblíží a předají si železo.

Kontrolní otázky

1. Vyjmenujte druhy hemoglobinu.
2. Popište rozdíl mezi intravaskulární a extravaskulární hemolýzou.
3. Co je rofeocytóza.



Místo pro doplnění



Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. Hematologie a transfuzní lékařství, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.



12.5 Laboratorní vyšetření krevního obrazu

Anotace, abstrakt

Krevní obraz patří mezi základní laboratorní hematologická vyšetření. Součástí je počet krevních elementů leukocytů, erytrocytů a trombocytů, ale i dalších parametrů.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o laboratorním vyšetření krevního obrazu a jeho parametrech.



Klíčová slova

Leukocyty, erytrocyty, trombocyty, hematokrit, MCV, MCH, MCHC



12.5.1 Úvod

Krevní obraz je základní hematologické vyšetření, při kterém se hodnotí počet krevních elementů – leukocytů, erytrocytů, trombocytů, hemoglobinu a dalších parametrů. Odběr se provádí do zkumavky s protisrážlivým činidlem K3EDTA. Stabilita krve je 5 hodin od odběru. V současnosti se vyšetření krevního obrazu provádí na automatických hematologických analyzátozech. Zkumavka se řádně promíchá a vloží do

analyzátoru. Obvykle postačí množství krve 80 ul pro kompletní analýzu. Analýza 1 vzorku trvá přibližně 60 sekund.

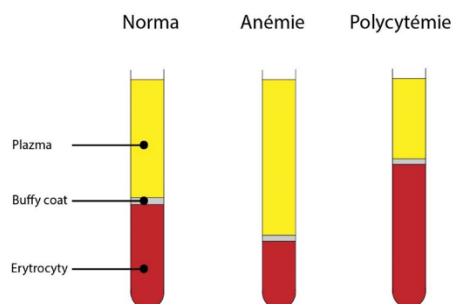
12.5.2 Základní parametry krevního obrazu

Zkratka	Název		Rozmezí		Jednotka
			Muži	Ženy	
WBC	White blood cells	Leukocyty	4,0 - 10,0		$\times 10^9$ /l
RBC	Red blood cells	Erytrocyty	4,0 - 5,8	3,8 - 5,2	$\times 10^{12}$ /l
HGB	Hemoglobin		135 - 175	120 - 160	g/l
HCT	Hematokrit		0,40 - 0,50	0,35 - 0,47	-
PLT	Platelets	Trombocyty	150 - 400		$\times 10^9$ /l

12.5.3 Rozšířené parametry krevního obrazu

Zkratka	Název		Rozmezí		Jednotka
			Muži	Ženy	
MCV	Mean corpuscular volume	Střední objem erytrocytů	82 - 98		fl
MCH	Mean corpuscular hemoglobin	Množství HGB v 1 erytrocytu	28 - 34		pg
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration	Střední koncentrace HGB v erytrocytech	320 - 360		g/l
RDW	RBC distribution width	Šíře distribuce erytrocytů	< 15,2		%

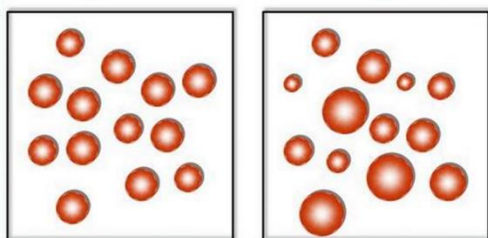
Hematokrit HCT vyznačuje poměr erytrocytů k celému objemu krve. Snížená hodnota hematokritu značí anémii a zvýšený hematokrit pak polycytémií, ale i dehydrataci.



Střední objem erytrocytu (*Mean corpuscular volume MCV*) značí střední velikost erytrocytů. Hodnota se udává ve femtolitrech. Erytrocyty s MCV ve fyziologickém rozmezí jsou označovány jako normocyty, erytrocyty s nižším MCV jako mikrococyty, s vyšším MCV jako makrococyty.

Množství hemoglobinu v jednom erytrocytu (*Mean corpuscular hemoglobin MCH*) se udává v pikogramech. **Množství hemoglobinu ve všech erytrocytech** (*Mean corpuscular hemoglobin concentration MCHC*) se udává v g/l. Erytrocyty s MCH a MCHC ve fyziologickém rozmezí jsou označovány jako normochromní, s nižším obsahem hemoglobinu jako hypochromní, s vyšším obsahem hemoglobinu jako hyperchromní.

Šíře distribuce erytrocytů (*RBC distribution width RDW*) odráží vzájemnou velikost erytrocytů. U normocytózy fyziologická hodnota RDW připouští průměrný rozdíl velikosti mezi nejmenšími a největšími erytrocyty maximálně 15,2 %. Stav, kdy jsou erytrocyty významně nestejně velké je označován jako anisocytóza. Anisocytóza bývá nacházena u anémií, ale i po transfuzi krve, kdy jsou v oběhu pacienta dvě populace erytrocytů, vlastní a dárcovské.



12.5.4 Princip vyšetření krevního obrazu

Impedanční princip

Měření krevního obrazu se provádí na plně automatických hematologických analyzátoch. Krevní buňky vstupují jednotlivě pomocí hydrodynamické fokusace do měřicí kyvety. Při vstupu dojde ke změně elektrického odporu a je zaznamenán elektrický impuls. Velikost impulsu odráží velikost buňky, to znamená, že čím větší je impuls, tím větší je buňka. Počet impulsů detekovaný za časovou jednotku značí počet buněk. Impedančně lze měřit leukocyty, erytrocyty a trombocyty.

Fotometrická metoda stanovení hemoglobinu

Dříve se používala metoda s kyanidem, ale vzhledem k toxicitě reagentů se nyní používají bezkyanidové metody. Erytrocyty jsou pomocí lyzačního činidla zlyzovány, tím dochází k jejich rozpadu. Uvolní se hemoglobin, který reaguje s reagentem, čímž dojde ke změně zabarvení roztoku. Fotometricky je detekována absorbance - průchod světelného paprsku kyvetou. Intenzita zabarvení je přímoúměrná koncentraci hemoglobinu ve vzorku.

Výpočtové metody

Hematokrit

$$\text{HCT} = \text{MCV} \times \text{RBC} / 1000$$

MCH

$$\text{MCH} = \text{HGB} / \text{RBC}$$

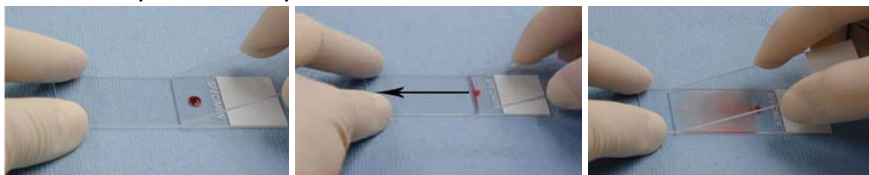
MCHC

$$\text{MCHC} = \text{HGB} / \text{HCT}$$

12.5.5 Příprava, barvení a prohlížení krevního nátěru

Provedení nátěru

Na podložní sklo se kápne kapka nesrážlivé krve odebrané do EDTA asi 1,5 cm od okraje. Přiloží se druhé roztírací sklo pod úhlem 45° a provede se rovnoměrný nátěr, který se nechá se řádně zaschnout.



Barvení nátěru

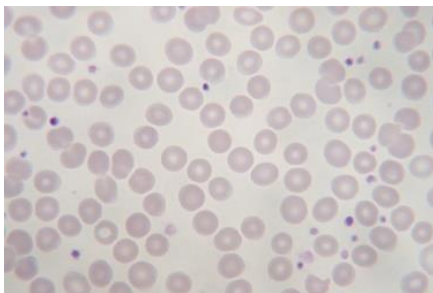
Po řádném zaschnutí se sklo nafiluje fixačním roztokem May-Grunwald s metanolem cca 5 min. Poté se provede oplach v fosfátovém pufru pH 6,8. Sklo se poté barví v barvicím roztoku Giemsa-Romanovski cca 10 min. Důkladně se opláchne vodou a nechá se řádně zaschnout.

Hodnocení nátěru

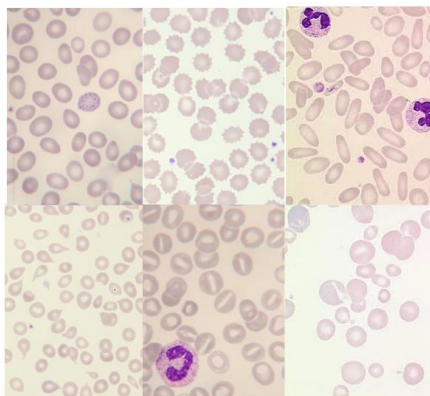
Na suché sklo se kápne imerzní olej a do něj se ponoří imerzní objektiv. Nátěr se hodnotí při zvětšení 1 000x (okulár 10x objektiv 100x) v části, kde se buňky nepřekrývají a jsou rovnoměrně rozprostřené. V nátěru hodnotíme odchylky tvaru, velikosti a barvitelnosti erytrocytů, inkluse a parazity v erytrocytech. Dále přítomnost normoblastů (erytroblastů), které jsou fyziologicky pouze u novorozenců, patologicky mohou být přítomny u malignit, anemií atd.

12.5.6 Hodnocení patologie erytrocytů

Normální erytrocyty (normocyty) mají pravidelný kulatý tvar, při správném obarvení jsou růžově zbarvené s centrálním projasněním.



Patologické erythrocyty mohou mít odchylky velikosti, tvaru a barvitelnosti u různých anemií, leukemií atd.



Kontrolní otázky

1. Vysvětlete, co je hematokrit.
2. Vyjmenujte parametry krevního obrazu.
3. Vysvětlete parametr RDW.
4. Při jakém zvětšení se hodnotí krevní nátěr?

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. Hematologie a transfuzní lékařství, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.



12.6 Anémie

Anotace, abstrakt

Anémie je patologický stav definovaný sníženou hodnotou hemoglobinu. Počet erytrocytů může být snížený, zvýšený nebo může být v normě.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o různých typech anémií, příčinách jejich vzniku a léčbě.

Klíčová slova

Anémie, sideropenická anémie, talasemie.

12.6.1 Anémie

Anémie je chorobný stav, kdy je snížena hodnota hemoglobinu pod spodní mez normy. Erytrocyty mohou být sniženy, zvýšené, nebo i v normě. Základní hematologické laboratorní vyšetření je krevní obraz a retikulocyty.

HGB norma:

- ženy 120-160 g/l
- muži 135-175 g/l

Tíži anémie lze rozdělit podle hodnoty hemoglobinu:

- Lehká anémie - HGB >100 g/l
- Střední anémie - HGB 80-100 g/l
- Těžká anémie - HGB <80 g/l
- Život ohrožující anémie <60 g/l

Ke vzniku anémie často dochází velmi pozvolna, pokud nejde o náhlou akutní ztrátu krve. Pacient cítí postupně se **prohlubující únavu, slabost, dušnost při námaze**. Může pociťovat bolesti hlavy, hučení v uších, palpitaci, tachykardii. Může trpět závratěmi a být podrážděný.

Organismus pacienta se na postupný rozvoj anémie dokáže adaptovat. Pomocí **kompensačních mechanismů zajistí dodávku O₂** do tkání například zvýšením minutového výdeje (tachykardie), zvýšením erythropoézy pomocí zvýšené tvorby hormonu erythropoetinu, přesunem krve ze tkání méně citlivých na snížený přísun O₂, jako je kůže nebo ledviny. Disociační křivka při uvolňování O₂ z erytrocytů při tkáňové hypoxii je posunuta více doprava, je zvýšen 2,3-difosfoglycerát.

12.6.2 Rozdělení anémií

Podle morfologie

- Velikost (MCV) - mikrocytární, normocytární, makrocytární



- Barvitelnost (MCH) – hypochromní, normochromní
- Šíře distribuce (RDW) – anizocytóza, normocytóza

Podle příčiny

- Z poruchy tvorby erytrocytů
- Z předčasného zániku, nadměrného rozpadu erytrocytů
- Z nadměrné ztráty erytrocytů při krvácení

12.6.3 Anémie z poruchy tvorby erytrocytů

1. Porucha tvorby hemoglobinu

1. *Porucha tvorby hemu*

a) Sideropenická anémie

Hlavní příčinou sideropenické anémie je **nedostatek železa**. Příčinou může být silné menstruační krvácení, krvácení do GIT, snížený přívod Fe potravou např. u vegetariánů nebo veganů (tablety Fe většinou nestačí), porucha vstřebávání Fe v GIT u celiakie, ale i opakované odběry krve u hospitalizovaných. Dále při infekci střevními parazity, v těhotenství, kdy zvýšená spotřeba Fe, u dětí v době růstu. Anémie se většinou vyvíjí postupně, dle stavu zásob železa.

Stupně anémie:

- **Prelatentní** – zásoby Fe se snižují, krevní obraz je v normě
- **Latentní** – zásoby Fe jsou vyčerpány, krevní obraz bývá ještě v normě
- **Sideropenická anémie** – rozvoj anémie, krevní obraz je snížený

Mezi další projevy sideropenické anémie, mimo základní anemické projevy, patří také pálení jazyka nebo třepení nehtů.

V krevním obraze nacházíme **snížený HGB <110 g/l**, mikrocyty MCV <82 fl, hypochromii MCH <32 pg, anisocytózu, trombocyty bývají zvýšené, retikulocyty lehce zvýšené. V plazmě je snížený obsah železa, je snížený feritin. Léčba sideropenické anémie spočívá v doplnění zásob železa různými preparáty železa.

b) Sideroblastická anémie

U této anémie je **železa dostatek**, ale je **porucha jeho využitkování**, zabudování do erytrocytu. Dochází k inefektivní erytropoéze a v důsledku toho k přetížení organismu železem. Sideroblastickou anémii nalézáme u myelodysplastického syndromu, alkoholismu, při užívání různých léků, u otrav, nedostatek Cu, Zn.

c) Anémie chronických onemocnění

Závažnost anémie souvisí se závažností základního onemocnění. Patří sem například anémie u chronických infekcí nebo nádorového onemocnění.

II. Porucha tvorby globinu – Talasemie

Talasemie jsou vrozené **poruchy tvorby** jednoho, nebo více **globinových řetězců** alfa nebo beta.

a) Alfa-Talasemie

Dle počtu postižených genů (celkem jsou 4) pro tvorbu alfa řetězce rozlišujeme **čtyři typy alfa-talasemií**: tiché nosičství (postižen 1 gen) většinou bez klinických projevů, alfa-talasemie minor (postiženy 2 geny) s různě vyjádřenými anemickými projevy, choroba hemoglobinu H (postiženy 3 geny) se závažnými klinickými projevy již v roce života. Nejtěžší typ, neslučitelný se životem je choroba hemoglobinu Bart's (postiženy jsou všechny 4 geny).

b) Beta-Talasemie

Dělí se na dva typy, heterozygotní forma **beta-talasemie minor** s lehčím průběhem, je postižení tvorby jednoho řetězce beta, alfa řetězce jsou zachovány. Homozygotní forma **beta-talasemie major** má těžký průběh s postižením obou řetězců beta. Precipitující alfa řetězce vedou k hemolýze erytrocytů. Pacient má splenomegalii, retardaci růstu a postižení sexuálního vývoje. Dochází k tkáňové hypoxii, smrt může nastat už i v jednom roce života.

2. Porucha tvorby DNA – Megaloblastové anémie

a) Nedostatek vitamínu B12 a kyseliny listové

Megaloblastové anémie vznikají v důsledku **nedostatku vitamínu B12 a kyseliny listové**, dochází k poruše tvorby purinů při tvorbě DNA, a k poruše zrání jádra buňky.

b) Perniciózní anémie

Příčinou snížení vitamínu B12 v organismu je **nedostatek vnitřního faktoru**, který je důležitý pro vstřebávání vitamínu B12 v GIT. Nedostatek vnitřního faktoru je způsoben **vlivem autoprotilátek** proti vnitřnímu faktoru. Anémie začíná plíživě s postupně se prohlubujícími projevy, pacienti mohou mít citlivý hladký jazyk.

3. Selhání hematopoetické buňky – Aplastické anémie

Mohou být vrozené, nebo získané. U **vrozených aplastických anémií** je příčinou genetická porucha kmenové buňky, **porucha její sebeobnovy**. Telomera je konec chromozomu, s každým dělením buňky se zkracuje. Pokud dojde vlivem mutace k progresivnímu zkrácení telomer, dochází k předčasnému zániku buňky k apoptóze, dochází ke vzniku aplastické anémie. Později může přejít do akutní leukemie.

U **získané aplastické anémie** je kmenová buňka v pořádku. Jsou **poškozené erytrocytové prekursory**, například vlivem virové infekce,

protilátek proti erytrocytům, nebo vlivem působení cytostatik nebo ionizujícího záření.

12.6.4 Anémie z předčasného zániku - Hemolytické anémie

U korpuskulární hemolytické anémie je příčina v samotném erytrocytu. Porucha může být v membráně erytrocytu, například u vrozené sférocytózy, ovalocytózy, v enzymatické výbavě, nebo v záměně aminokyselin v hemoglobinovém řetězci u hemoglobinopatií například u srpkovité anémie.

U extrakorpuskulární hemolytické anémie je příčina mimo erytrocyt, například působením **protilátek proti erytrocytům**, vlivem mechanického, fyzikálního poškození, působením jedu vosy nebo včely. Dále sem patří **mikroangiopatické hemolytické anémie**.

12.6.5 Anémie z nadměrné ztráty

Jedná se o akutní posthemoragickou anémii. **Nemocný je zpočátku spíše ohrožen prudkým snížením objemu krve**, než samotnou anémií. Příčinou jsou různé úrazy, prasklé jícnové varixy, prasklý duodenální vřed, pooperační krvácení, ruptura aorty. Krevní obraz je zpočátku v normě, klesá až po několika hodinách.

Kontrolní otázky

1. Vyjmenujte klinické projevy anémie.
2. Co je příčinou sideropenické anémie.
3. Vysvětlete, co je Talasemie.

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. Hematologie a transfuzní lékařství, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.



12.7 Leukocyty a trombocyty

Anotace, abstrakt

Hlavní funkcí leukocytů je účast na imunitních dějích při obraně organismu. Dělíme je na granulocyty a agranulocyty.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o druzích leukocytů z hlediska morfologie a funkce.

Klíčová slova

Neutrofily, eosinofily, basofily, monocyty, lymfocyty.

12.7.1 Úvod

Leukocyty, bílé krvinky, dělíme na granulocyty a agranulocyty. Granulocyty obsahují specifická granula, dělí se na neutrofily, eosinofily a basofily. Agranulocyty dělíme na monocyty a lymfocyty, neobsahují specifická granula.

Trombocyty, krevní destičky, se účastní dějů potřebných k zástavě krvácení.

12.7.2 Granulocyty - Neutrofily, Eosinofily, Basofily

Hlavní funkce granulocytů, také nazývaných polymorfonukleáry, je účast na obranných reakcích organismu. Nazývají se mikrofágy, hlavní funkce je fagocytóza. Granulocyty jsou skladovány ve dvou skladovacích poolech. Rezervní pool granulocytů je v kostní dřeni. Marginální pool (okrajový) je v periferní krvi, granulocyty ulpívají na stěnách cév, jsou zde připraveny pro rychlou obranu proti infekci.

Granulocyty dělíme dle specifických granul, charakteristických pro jednotlivé druhy, na **neutrofily, eosinofily a basofily**. Hlavní funkcí neutrofilů je fagocytóza a ničení bakterií, vývoj v kostní dřeni trvá 10 dní, v periferní krvi pak žije pouze cca 6 hodin. Eosinofily narušují parazity a účastní se zánětlivých a alergických reakcí. V periferní krvi žijí 12-24 hodin. Basofily uvolňují histamin a serotonin, mají účast v hypersenzitivitě. V periferní krvi žijí 4-7 dní.

Granulace se dělí na primární a sekundární-specifickou. Primární granula, neboli azurofilní granulace má červenou barvu a obsahují enzym myeloperoxidázu (MPO). Jsou přítomna v neutrofilech a eosinofilech již od nejmladších vývojových stádií. Sekundární granulace vzniká až od stádia myelocytu. V neutrofilech má specifická granulace fialovou barvu, v eosinofilech oranžovou a v basofilech černou.

12.7.3 Granulocytová vývojová řada

Myeloblast - prekurzor



Velikost buňky je 10-18 um, jádro má jemná chromatin, může obsahovat 1-2 nukleoly, úzký lem světle modré cytoplazmy.

Promyelocyt

Větší buňka než myeloblast, velké excentrické jádro, hrubší chromatin, viditelné nukleoly. Mohou být 2-4 jadérka. V modré cytoplazmě se tvoří četná primární granula MPO pozitivní. Nejsou přítomna sekundární granula.

Myelocyt

Je menší než promyelocyt, má hrubší chromatin, plazma je růžová. Je ještě schopen dělení. Jádro oválné nebo kulaté, nejsou patrná jadérka. Počátek sekundární granulace neutrofilní, eosinofilní, basofilní. Sekundární granula jsou MPO negativní.

Metamyelocyt

Menší než myelocyt, menší hutnější jádro, ledvinovitý tvar, mají růžovou cytoplazmu. Buňky až do tohoto stádia se fyziologicky nevyskytují v periferní krvi. Obsahují četná sekundární granula.

Tyč

Je menší než metamyelocyt, má tyčovité jádro, zahnuté, hutný chromatin. V periferní krvi se vyskytují fyziologicky do 5 %.

Neutrofilní segment – neutrofil

Zralá, plně funkční buňka. Velikost 10-15 um, jádro členité na 2-5 segmentů spojenými můstky, síla můstku nepřesahuje polovinu nejširšího místa. V růžové cytoplazmě jsou fialová granula.

Eosinofilní segment - eosinofil

Velikost 9-16 um, sekundární oranžová eosinofilní granula obsahují prozánětlivé cytokiny. Jádro je často dvojsegmentované, tvar brýlí nebo činky.

Basofilní segment - basofil

Velikost 9-12 um, jádro je laločnaté, členité, ve tvaru jetelového listu. Sekundární černá basofilní granula obsahují histamin.

12.7.4 Agranulocyty - Monocyty

Monocyty patří mezi buňky monocytomakrofágového systému. Nazývají se makrofágy. Hlavní funkcí je fagocytóza, eliminace antigenů a destrukce poškozených erytrocytů. Ihned po svém vzniku v kostní dřeni, jsou monocyty vyplaveny do periferní krve, proto je fyziologicky v kostní dřeni nalézáme jen ojediněle. V periferní krvi přebývají několik hodin až dní, poté cestují do tkání, ale i zpět do periferní krve. Produkují interleukiny, interferony a komplement.

12.7.5 Monocytová vývojová řada

Monoblast

Velikost 14-22 um, má kulaté nebo oválné jádro, velmi jemný chromatin, jádérka. Cytoplazma mírně basofilní až šedá, většinou bez granulace.

Promonocyt

Velikost 14-20 um, jádro nepravidelné skládané. Chromatin jemný, bez patrných jadérek. Modrošedá cytoplazma, může být jemná azurofilní granulace.

Monocyt

Velikost 14-22 um, oválné, ledvinovité, laločnaté jádro. Řídký chromatin. Kouřová cytoplazma, jemná azurofilní granula, vakuoly.

12.7.6 Agranulocyty - Lymfocyty

Hlavní funkci lymfocytů je obrana organismu a účast na imunitních reakcích. Lymfatické orgány lze rozdělit na **primární**, kam patří kostní dřeň a thymus (brzlík) a dále na **sekundární**, uzliny a slezina. Uzlinami protéká lymfa, ve které jsou přítomny B-lymfocyty. Lymfocyty se dělí na T-lymfocyty, B-lymfocyty a NK buňky.

T lymfocyty vyžívají v thymu. Dělí se na **pomocné T-lymfocyty** (helpery), tyto aktivují makrofágy k fagocytóze a podporují B-lymfocyty k přeměně na plazmocyt, které produkují protilátky. Dále se dělí na **cytotoxické T-lymfocyty**, které vyhledají infikovanou buňku a způsobí její destrukci.

B-lymfocyty produkují protilátky, **vyžívají v kostní dřeni** (Bone marrow). NK buňky, natural killer (přirození zabíječi), slouží jako protinádorová imunita.

12.7.7 Lymfocytární vývojová řada

Lymfoblast

Velikost 10-18 um, je menší než myeloblast, jádro je nepravidelné. Má úzký lem basofilní cytoplazmy, která může být vytažená k jedné straně jako zrcátko, obsahuje 1-2 jádérka. Lymfoblast je myeloperoxidáza negativní.

Prolymfocyt

Velikost 10-18 um, má menší hutnější jádro s 1 velkým jadérkem a bohatou modrou cytoplazmou.

Lymfocyt

Malý lymfocyt je velký 8-12 um, menší, jádro je hutné, úzký lem světle modré cytoplazmy. Velký granulovaný lymfocyt LGL, má velikost 12-16 um, excentricky uložené jádro, lehce vpáčené, světle modrá cytoplazma s azurofilními granuly.

12.7.8 Trombocyty

Hlavní funkce je účast na zástavě krvácení, poskytují negativně nabitě povrchy pro koagulační děje. Trombocyty jsou bezjaderné buňky, považují se za útržky plazmy mateřské buňky megakaryocyty.

Trombocytopéza je regulována hormonem **trombopoetinem** (TPO), s nižším počtem trombocytů stoupá TPO a naopak. Je podobný hormonu erytropoetinu (EPO), mají společný základní gen.

Normální hodnota trombocytů je $150-400 \times 10^9/l$. Trombocyt žije 9-11 dní, denně se vytvoří 1 000 - 5 000 trombocytů z jednoho megakaryocyty. Tvoří se v kostní dřeni, ale i v plicích. 1/3 trombocytů je skladována ve slezině, po splenektomii se počet trombocytů v periferní krvi zvýší. Staré trombocyty zanikají ve slezině, ale i v játrech a kostní dřeni. U trombocytopenie často bývá splenomegalie.

12.7.9 Megakaryoblastová vývojová řada

Megakaryoblast

Velikost 6-20 μm , úzký lem basofilní cytoplazmy, jádro je velké, kulaté, lobulizované, má několik nukleol, někdy může být s výběžky. Může mít na svém povrchu naadherované destičky.

Promegakaryocyt

Velikost 15-20 μm , má více cytoplazmy. Dochází k **endomitóze** - k opakovanému dělení jádra bez současného dělení celé buňky. S každým dělením jádra se zmnožuje genom v jádře 2N, 4N, 8N, 16N. Jádro je výrazně lobulizované = polyploidie.

Megakaryocyt

Velká buňka 40-60 μm . Dochází k políčkování cytoplazmy, uvolňují se fragmenty plazmy, která nazýváme prototrombocyty, uvolňují se do krevních kapilár jako trombocyty.

Trombocyt

Velikost 1-4 μm , je to malá bezjaderná modrošedá buňka s azurofilní granulací. Výběžky cytoplazmy megakaryocyty se dostávají do sinusoid v kostní dřeni a strhává s sebou útržky – trombocyty.

Kontrolní otázky

1. Vyjmenujte druhy leukocytů.
2. Vyjmenujte buňky granulocytové vývojové řady.
3. Vyjmenujte buňky lymfocytární vývojové řady.



Místo pro doplnění



Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. Hematologie a transfúzní lékařství, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.



12.8 Akutní leukemie

Anotace, abstrakt

Akutní leukemie je hematologické onemocnění charakterizované klonální přestavbou hematopoetické buňky. Vzniká klon leukemických buněk, který utlačuje ostatní krvetvorbu.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o základních typech akutních leukemií, o jejich projevech, příčinách vzniku a laboratorních nálezech.



Klíčová slova

Akutní leukemie, blast, klon



12.8.1 Úvod

V pluripotentní hematopoetické kmenové buňce vznikne odchylka v genetické výbavě, která se pak předává na dceřiné buňky. Vzniká klon leukemických buněk, které nazýváme **blasty**. **Tvorba leukemických buněk převyšuje jejich zánik, je zvýšená buněčná proliferace (dělení) a současně je snížena jejich apoptóza.** Dochází k **zablokování diferenciaci** (vyzrávání) a tím k zástavě zrání buněk, toto vše má za následek **utlačení normální krvetvorby**.

Za normálních okolností se do periferní krve dostávají jen zralé buňky diapedézou, protáhnou se skrz endotelové buňky. Fyziologické mladší buňky endotelem neprojdou, nemají flexibilní jádro. **Leukemické buňky do periferní krve procházejí.** Rozhodující pro diagnózu akutní leukemie je počet blastů v kostní dřeni >20 % ze všech jaderných buněk.

Klinické projevy akutní leukemie

Náhlý začátek s horečkou, třesavkou, slabostí, únavou. První příznaky mohou být bolesti kloubů a břicha. **Dochází ke snížení funkčních leukocytů**, což se projeví infekcí, horečkou, častými opakujícími se infekcemi až nekrózami v dutině ústní. Jsou sníženy erytrocyty, rozvíjí se anémie, únava, dušnost. Dále může dojít ke snížení počtu trombocytů, což způsobí krvácivé projevy, objevuje se petechie - drobné tečkovité krvácení do kůže či sliznic, krvácení z nosu, modřiny.

Někdy dochází k **infiltraci orgánů**, zduření orgánů, například oteklé dásně, zvětšení lymfatických uzlin, jater, sleziny.

12.8.2 Klasifikace akutních leukemie

Akutní leukemie se dělí na myeloidní (AML) a lymfoblastické (ALL), podle toho, v jaké vývojové linii došlo ke genetické odchylce a vzniku leukemického klonu.

1. AML s rekurentní cytogenetickou abnormitou

Patří sem **akutní promyelocytární leukemie (APL) s translokací (15;17), vznikne fúzní gen PML-RAR α** . Často u mladých osob, ale pokud se včas zahájí léčba, má dobrou prognózu. Fúzní gen PML-RAR α zabraňuje myeloidní diferenciaci, vývoj skončí na stadiu promyelocytu se sníženou apoptózou, ale se schopností proliferace. Atypické promyelocyty postupně utlačují normální krvetvorbu. Započítávají se do blastů, pokud je jejich počet >20 % jedná se o akutní promyelocytární leukemii.

Z granul atypických promyelocytů se uvolňují prokoagulační látky, nastává porucha koagulace, která **často vyústí v diseminovanou intravaskulární koagulaci (DIC)**. Nastává krvácení, i život ohrožující, je nutná rychlá diagnostika a neodkladné zahájení léčby kyselinou alfa-retinovou, rozhodují hodiny. Počet leukocytů může být v normě nebo snížený, typická je pancytopenie – snížení všech tří buněčných populací.

Atypické promyelocyty mají četná granula, jádro je nepravidelné, rozštěpené, nemusí být pod granuly vidět. Jsou přítomny silné a výrazné Auerovy tyče ve snopcích – **Faggot cells**. Kostní dřevina je obvykle hypercelulární, masivně jsou zastoupeny atypické promyelocyty.

2. AML jinak neurčené

Není známa genetická odchylka, blasty v kostní dřevině >20 %, základní rozdělení vychází z FAB klasifikace (Franch, American, British z roku 1976, M0-M7).

AML s minimální diferenciací M0: blasty nalézáme bez auerových tyčí, <3 % blastů je MPO pozitivní.

AML bez vyžrávání M1: je přítomno >90 % myeloblastů, někdy jsou patrné auerovy tyče.

AML s vyžráváním M2: počet blastů je 20-89 %, přítomna azurofilní granulace, četnější auerovy tyče, MPO je silně pozitivní.

Akutní myelomonocytární leukemie M4: počet blastů >20 %, současně přítomna monocytární komponenta >20 %.

Akutní monoblastická/ monocytární leukemie M5: buňky v kostní dřeni tvoří >80 % monocytární komponenty (monocyty, promonocyty, monoblasty).

Akutní erytroidní leukemie M6: je zmnožená erytropoéza s dysplázií, přítomny megaloblasty, a mnohojaderné formy. Je velmi vzácná.

Akutní megakaryoblastická leukemie M7: v kostní dřeni je >50 % megakaryoblastů ze všech blastů, často je suchá punkce, lepší je provést trepanobiopsii. Je velmi vzácná.

3. Akutní lymfoblastická leukemie

Může vycházet z B lymfocytů, nebo z T lymfocytů.

B-ALL nespecifikovaná bez genetické abnormality je leukemií dětského věku, 75 % případů je do věku 6 let. Lepší prognóza je u mladších nemocných pod 25-35 let.

B-ALL s rekurentní genetickou abnormitou se vyskytuje asi 75 % nemocných, genetická abnormalita má prognostický význam. Pokud je přítomna translokace **t(9;22) fúzní gen BCR/ABL Philadelphský chromozom**, je horší prognóza. Genetické odchylky mají přímou souvislost se vznikem nádoru, vznik ještě v děloze, proto jsou tyto B-ALL u malých dětí.

T-ALL vychází z T-lymfoblastů. Mohou být postiženy i jiné tkáně než kostní dřeň, pak se jedná o T-lymfoblastický lymfom. Vyskytuje se často v mladším věku u mladých mužů. Postiženo bývá mediastinum se zmnoženou masou lymfoblastů. Prvním projevem může být dechová tíseň a výpotek na plicích.

Léčba akutní leukemie

V **prefázi** je cílem snížit nádorovou masu leukocytů, podávají se kortikoidy na 5-7 dní, v tuto chvíli se vyšetří genetika, určí se přesná diagnóza, stanoví se prognóza. Následuje **indukce**, cílem je dosažení kompletní remise - ústup onemocnění, vymizení blastů. Provádí se pomocí chemoterapie nebo radioterapie. V další fázi při **konsolidační léčbě**, která trvá 6-12 měsíců se aplikuje chemoterapie. **Udržovací léčba** trvá cca 2 roky, je zásadní pro zničení rezidua akutní leukemie, pokud se vynechá, je zhoršené přežití pacienta.

Transplantace kostní dřeně

V některých případech je nutné přistoupit k transplantaci pacienta dárcovskými hematopoetickými buňkami. Volí se, pokud je šance na přežití méně než 50 %. Vhodnému dárci se odebere více vpichy do lopaty kosti kyčelní **kostní dřeň s hematopoetickými buňkami**. Nebo se prostřednictvím separátoru odebere **periferní krev s hematopoetickými buňkami** po předchozí stimulaci růstovými faktory. Pacientovi je následně zničena jeho

vlastní krvetvorná tkáň a poté se podá transfuze dárcovských hematopoetických buněk. Přihojení nové tkáně trvá 2-3 týdny. Pacient je umístěn ve sterilním prostředí, nemá vlastní imunitu, je ohrožen banálními infekcemi.

Kontrolní otázky

1. Vysvětlíte vznik akutní leukemie.
 2. Vyjmenujte jednotlivé druhy AML.
 3. Co je to Philadelphský chromozom a jeho význam u B-ALL?
-

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. Hematologie a transfuzní lékařství, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.

12.9 Myeloproliferativní onemocnění a myelodysplastický syndrom

Anotace, abstrakt

Myeloproliferativní onemocnění vychází z myeloidní kmenové progenitorové buňky. Může dojít ke zvýšené proliferaci jedné, dvou nebo všech tří myeloidních řad. Dochází ke zmožení granulocytů, erytrocytů, nebo trombocytů.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o myeloproliferativních onemocnění, typech, nálezech a klinických projevech.





Polycytemie vera, chronická myeloidní leukemie, esenciální trombocytémie, primární myelofibróza

12.9.1 Myeloproliferativní onemocnění

U myeloproliferativních onemocnění dochází ke **klonální proliferaci myeloidní kmenové progenitorové buňky**, následkem j zvýšená proliferace jedné nebo více myeloidních řad. V periferní i kostní dřeni se nachází zvýšený počet granulocytů, erytrocytů, trombocytů. Nacházíme posun k nezralým formám (posun doleva). Nacházíme zralé elementy, ale i celé vývojové řady. Blasty jsou přítomny jen ojediněle.

Pacienti jsou nejčastěji ve věku 50-70 let. Onemocnění postupně přechází do myelofibrózy, selhává kostní dřeň, nebo může dojít k transformaci do akutní leukemie.

Léčba spočívá obvykle v podávání hydroxyurey k potlačení růstu klonu, později je vhodná u mladých pacientů transplantace.

Mezi klinické projevy patří únava, noční pocení, váhový úbytek, krvácení.

1. Chronická myeloidní leukemie CML

Je přítomen **fúzní gen BCR/ABL, translokace t(9;22), Philadelphský chromozom**, který stimuluje proliferaci buněk. Počet leukocytů bývá $>100 \times 10^9/l$. Jsou zmnoženy granulocyty, eosinofily, basofily, v periferní krvi nacházíme promyelocyty, myelocyty, metamyelocyty, tyče, segmenty. V kostní dřeni jsou přítomny trpasličí megakaryocyty a jejich shluky.

Rozeznáváme tři fáze CML. První **chronická fáze** je charakterizována leukocytózou, posunem doleva, basofilií, eosinofilií, počet blastů v periferní krvi je $<3 \%$, dřeň je hypercelulární. Ve druhé **akcelerované fázi** se více zvyšuje počet leukocytů, trombocyty $>1\,000 \times 10^9/l$, nebo naopak $<100 \times 10^9/l$. V kostní dřeni jsou blasty $<20 \%$. V poslední **blastické fázi** dochází k přechodu do akutní leukemie, počet blastů je $>20 \%$ v kostní dřeni.

2. Pravá polycytémie

Také nazývána **polycytémie vera**. U 95 % pacientů je přítomna **mutace Janus 2 kináza**, zapříčiňuje zvýšenou proliferaci erytrocytů nezávisle na regulaci erythropoetinem. Pacienti mají potíže se zvýšenou viskozitou krve, svědění kůže v teplé vodě, mají načervenalou kůži a splenomegalie. HGB $>165 \text{ g/l}$, je přítomna erytrocytóza. Postupně přechází do anémie a do fibrózy kostní dřene. Léčba spočívá v provádění venepunkce nebo erythrocytaferézy.

3. Primární myelofibróza

Vznikají patologické rychle se rozpadající megakaryocyty, dochází ke **stimulaci tvorby fibroblastů**. Zpočátku jsou zvýšené trombocyty, megakaryocyty, v posledním stadiu dojde k vyčerpání kostní dřene, přechod do fibrózy, kdy je krvetvorná tkáň je nahrazena fibrotickou tkání. Odběr

kostní dřeň je velmi obtížný, tzv. suchá punkce. Aktivuje se extramedulární krvetvorba v játrech a slezině.

4. Esenciální trombocytémie

Postihuje megakaryocyty, počet trombocytů je $>450 \times 10^9/l$. Pacient může trpět trombózou, ale i krvácením. Erytrocyty a leukocyty jsou v normě. V kostní dřeni nacházíme **gigantické megakaryocyty**, parožnaté, ve shlucích, jádra spojená nitkou. V poslední stadiu dochází k fibróze.

12.9.2 Myelodysplastický syndrom

Dochází k poškození kmenové buňky, kdy vzniká patologický klon s růstovou výhodou, utlačuje normální krvetvorbu a vzniká **pancytopenie**. Mutace vede k nestabilitě celého genomu a vznikají další mutace, je **zvýšená apoptóza** buněk. Dochází k **dysplazii jedné nebo více řad** (erytrocyty, granulocyty, trombocyty). HGB je $<100 \text{ g/l}$. Postupně se zvyšuje počet blastů, je riziko zvratu do akutní leukemie. Počet blastů u MDS je $<20 \%$.

Příznaky MDS jsou anémie, dušnost, únava, opakované infekce, krvácení. MDS se objevuje převážně u starších osob. Primární MDS může vzniknout působením benzenu, kouřením, chemikáliemi. Sekundární MDS může vzniknout po chemoterapii nebo radioterapii. Léčba spočívá v podávání transfuzí erytrocytů, trombokoncentrátů, aplikací chemoterapie, kortikoidů na blokaci apoptózy.

Kontrolní otázky

1. Vysvětlíte, co je příčinou vzniku myeloproliferativního onemocnění.
2. Vyjmenujte jednotlivé typy myeloproliferativního onemocnění.
3. Čím je charakterizován myelodysplastický syndrom?

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. Hematologie a transfuzní lékařství, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.



12.10 Lymfoproliferativní onemocnění

Anotace, abstrakt

Lymfoproliferativní onemocnění vychází z lymfoidní kmenové progenitorové buňky. Dochází ke zvýšené proliferaci zralých klonálních lymfocytů.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o lymfoproliferativních onemocněních, jednotlivých typech, laboratorních nálezech a klinických projevech.

Klíčová slova

Lymfoproliferace, lymfom, klon, plazmocyt, paraprotein



12.10.1 Úvod

U lymfoproliferativních onemocnění dochází ke **klonální nádorové přestavbě zralých lymfocytů** na různém stadiu vývoje. Tvoří se klon identických buněk, které utlačují ostatní krvetvorbu.

Patří sem **Non-Hodgkinské lymfomy** - neoplázie z B-lymfocytů, T-lymfocytů a NK buněk. Dále sem patří **Hodgkinův lymfom**.

Většinou bývá lymfocytóza. Jsou postiženy uzliny, lymfatická tkáň, slezina, střevo, nebo i jiné orgány. Hromadí se zde masa patologických lymfocytů, onemocnění také nazýváme lymfomem. Pokud se lymfoproliferativní onemocnění objeví i v periferní krvi nebo kostní dřeni jedná se o **leukemizovaný lymfom**.

Lymfoproliferace jsou častější u osob se sníženou imunitou, u pacientů s HIV, u autoimunitních onemocnění, po infekci způsobující virus Epstein-Barrové. B-lymfocyty produkují protilátky, v nátěru často vidíme penízkovatění erytrocytů vlivem protilátek. Onemocnění je častější u mužů nad 60 let.

Onemocnění je provázeno **B-symptomy**, kam patří noční pocení, váhový úbytek, nechutenství, únava, teplota, zvětšené uzliny, játra, slezina.

12.10.2 Non-Hodgkinské lymfomy z B-lymfocytů

1. Chronická lymfatická leukemie B-CLL

Počet leukocytů bývá $>100 \times 10^9/l$. Vliv má i genetická predispozice. Onemocnění má pozvolný průběh nemoci, vyvíjí se i >20 let. V periferní krvi je naprostá převaha lymfocytů v nátěru – lymfocytóza. Lymfocyty mají políčkovitý chromatin, jsou přítomny četné jaderné stíny – jádra rozetřených fragilních lymfocytů.

2. Prolymfocytární leukemie B-PLL

V nátěru nacházíme četné prolymfocyty, jsou to kulaté buňky s 1 velkým jadérkem. Onemocnění je vzácné, převážně muži nad 70 let.

3. Mantle cell lymfom B-MCL

Lymfom z plášťových buněk, buňky jsou větší i menší, cytoplazma různě objemná, jádro s nepravidelnými zářezy, špatná prognóza.

4. Folikulární lymfom FL

Lymfom ze zárodečného centra uzliny, častý lymfom. Buňky FL jsou malé buňky, velmi úzký lem plazmy, jemný chromatin, bez jadérka, v jádře hluboký zářez, tvar kávového zrna.

5. Vlasatobuněčná leukemie HCL

Leukemie má indolentní průběh, typická je pancytopenie. Lymfocyty mají excentricky uložené oválné, ledvinovité jádro. Cytoplazma je bohatší, šedomodrá, vlásky cytoplazmy po celém obvodu buňky.

6. Difuzní velkobuněčný lymfom DLBCL

Vznik primárně nebo sekundárně z B-CLL. Velké lymfocyty 2x větší než normální lymfocyty, jádro je oválné, kulaté, s jadérky.

7. Burkittův lymfom

Rychlý agresivní růst, může být přechod do leukemie, postiženy i děti. Často dochází k postižení čelisti. Buňky jsou středně velké, s kulatým, oválným jádrem, silně basofilní cytoplazma, četné vakuoly.

12.10.3 Non-Hodgkinské lymfomy z T-lymfocytů

1. T-LGL – leukemie

Leukemie s velkými granulovanými lymfocyty, indolentní průběh.

2. Mycosis fungoides a Sezary syndrom

Jedná se kožní T-lymfomy, způsobené infiltráty malých a středních lymfocytů. Sezaryho buňky mají laločnaté cerebroformní jádro.

12.10.4 Hodgkinův lymfom

Lymfom vzniká v uzlinách na krku, převážně u mladých dospělých. V uzlinách histologicky nacházíme **buňky Sternberg-Reedové**. Jsou to velké mnohoaderné s bohatou cytoplazmou, jadérky. Typické jsou 2 velká jádra, nebo více jader penízkovitě uspořádaných. V periferní krvi nebo kostní dřeni tyto buňky nenacházíme. Onemocnění má čtyři stadia, dle postižení uzlin.

12.10.5 Mnohočetný myelom

Jedná se o nádory z plazmatických buněk. Patří mezi monoklonální gamapatie s klonální proliferací plazmatických buněk, které sekretují klonální paraprotein. V elektroforéze bílkovin se objeví paraprotein. Dochází útla ku krvetvorby, klonální plazmocyty nacházíme v kostní dřeni. Pacient pociťuje únavu, bolesti zad a skeletu, trpí opakovanými infekty. Vlivem produkce paraproteinu je zvýšená celková bílkovina. Vzácně může myelom přejít do plazmocelulární leukemie s množ ením plazmocytů v periferní krvi.

Mezi klinické projevy (CRAB) dále patří:

- C – hyperkalcemie, Ca se zvýšeně uvolňuje se z kostí, tvoří se osteolytická ložiska, vznikají spontánní zlomeniny kostí.
- R – Renal – dochází k poškození ledvin paraproteinem
- A – Anemie – vzniká anémie, plazmocyty utlačují erytroidní řadu
- B – Bone – v kostní dřeni nacházíme klonální plazmocyty

Kontrolní otázky

1. Vysvětlíte co, znamená leukemizovaný lymfom.
 2. Vyjmenujte jednotlivé typy lymfoproliferací.
 3. Jaké jsou klinické projevy u mnohočetného myelomu.
-

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. Hematologie a transfuzní lékařství, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.

12.11 Hemostáza

Anotace, abstrakt

Hemostáza je komplexní proces, který zajišťuje zástavu krvácení pouze v místě poranění a současně zachovává tekutost krve v ostatním neporušeném krevním řečišti. Účastní se ho všechny složky krve, trombocyty, plazmatické koagulační faktory, atd.

Udržuje rovnováhu, nesmí docházet ke spontánnímu krvácení nebo naopak ke spontánnímu srážení krve. Při narušení některých složek hemostázy může dojít k nadměrné krvácivosti, nebo nadměrné srážlivosti.



Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o základních funkcích hemostázy.

Klíčová slova

Koagulace, endotel, primární hemostáza, fibrinolýza



12.11.1 Úvod

Na hemostáze se podílejí:

- **Cévní stěna** – má mechanickou funkci, při poranění dochází k vazokonstrikci. Skládá se z vrstev intima, media a adventicie.
- **Endotel** – vnitřní povrch cév je vystlán endotelovými buňkami. Je v přímém kontaktu s krví. Pouze neporušený a nesmáčivý endotel chrání před trombotickým účinkem. Při poranění je odhalený subendotel velmi trombogenní, uvolní se tkáňový faktor a dojde k aktivaci hemokoagulace.
- **Trombocyty** poskytují negativně nabitě povrchy pro koagulační děje.
- **Plazmatické koagulační faktory, inhibitory, faktory fibrinolýzy**

Hemostatické děje lze rozdělit na čtyři základní oblasti:

- 1) **Primární hemostáza** se zabývá tvorbou primární hemostatické zátky, účastní se zde hlavně trombocyty.
- 2) **Systém koagulačních faktorů** – při aktivaci koagulační kaskády dojde ke vzniku koagula a k zástavě krvácení.
- 3) **Fibrinolýza** – hlavním úkolem je rozpouštění koagula po zhojení cévy.
- 4) **Inhibitory krevního srážení** mají za úkol regulovat všechny děje hemostázy.

Laboratorní vyšetření hemostázy

Odebírá se nesrážlivá krev do citrátu sodného. **Krve je nutné odebrat až k rysce na zkumavce**, aby byl zachován správný poměr mezi krví a protisrážlivým činidlem. Stabilita krve je 4 hodiny od odběru, **transport do laboratoře maximálně do 2 hodin od odběru**, vzorek uchovávat **při 18-25 °C**. V laboratoři se krev centrifuguje, vyšetření se provádí z plazmy. Hemolýza a chylóza plazmy brání vyšetření. Plazmu získáme centrifugací nesrážlivé krve, sérum získáme centrifugací srážlivé krve.

12.11.2 Primární hemostáza

Při tvorbě primární hemostatické zátky vznikne agregát destiček, k zástavě krvácení dojde do cca 5 minut. Dochází k zacelení porušené integrity cévy při jejím poranění. **Hlavní úlohu zde hrají trombocyty**. Jsou to bezjaderné buňky, vznikají odštěpením z megakaryocytů. Na povrchu mají dvojvrstvu fosfolipidů a různé povrchové glykoproteiny a receptory. **Trombocyty obsahují α-granula, δ-granula**. Pro zajištění primární

hemostázy je důležitý nejen dostatečný počet trombocytů, ale i jejich správná funkce. V opačném případě dochází ke krvácivým stavům.

Základní funkce trombocytů:

- 1) **Adheze trombocytů** – trombocyty rolují po povrchu neporušeného endotelu v cévách, pokud je endotel porušen a je odhalený kolagen dojde k adhezi trombocytů na kolagen.
- 2) **Aktivace trombocytů** - z poškozené tkáně se uvolní ADP. Dojde ke změně tvaru trombocytu z diskovitého na výběžky, povrch je 10x větší. Z granul se uvolní další ADP.
- 3) **Agregace trombocytů** – dochází k agregaci trombocytů. Vznikne bílý destičkový trombus
- 4) **Retrakce** – smrštění destičkového trombu pro zpevnění trombu (sraženiny) fibrinovou sítí vytvořenou koagulačními faktory, viz Systém koagulačních faktorů.

Vyšetření primární hemostázy na přístroji PFA

Přístroj Platelet function analyzer (PFA) provádí vyšetření primární hemostázy z plné necentrifugované citrátové krve. Principem je tvorba destičkového trombu, který postupně uzavírá otvor v membráně cartridge potažené collagenem, epinefrinem, ADP. **Měří se schopnost tvořit agregáty trombocytů při arteriální rychlosti krve.** Lze využít při předoperačním screeningu, diagnostice trombocytopatií, u von Willebrandovy choroby a při sledování účinnosti antiagregační léčby.

12.11.3 Koagulační faktory

Koagulační faktory jsou glykoproteiny, enzymy v krevní plazmě, které se účastní krevního srážení, většina se tvoří v játrech. Značíme je římskými číslicemi, neaktivní forma, např. FVIII, aktivní forma např. FVIIIa. Můžeme je rozdělit na proenzymy, kofaktory, fibrinogen a von Willebrandův faktor.

Mezi **proenzymy** patří tzv. **faktory vitamin K dependentní** FII, FVII, FIX, FX, Protein C, Protein S. Tyto faktory potřebují vitamin K, jinak není faktor schopen vazby na Ca^{2+} a fosfolipidy. Při snížení vitaminu K se sice faktory tvoří, ale nejsou koagulačně aktivní. Toho se využívá antikoagulační léčbě, kdy lék warfarin blokuje oxidaci vitaminu K a tím dochází ke snížené koagulaci. Patří sem **FIIa trombin**, klíčový enzym koagulace, aktivuje FVIII, trombocyty, fibrinolýzu. Dále sem patří **FIX**, který je aktivní v komplexu vnitřní tenáza FIXa FVIIIa fosfolipidy Ca^{2+} , který aktivuje FX na FXa. Nedostatek FIX je **hemofilie B**.

Mezi **kofaktory** patří **FVIII**, nedostatek je **hemofilie A**. Je součástí vnitřní tenázy FVIIIa FIXa fosfolipidy Ca^{2+} . Tvoří se na chromozomu X, zvyšuje se při zánětech, stresu.

Fibrinogen zprostředkovává agregaci trombocytů. Jedná se o faktor akutní fáze, zvyšuje se při zánětech, poranění, v těhotenství.

Von Willebrandův faktor (vWF) je tvořen megakaryocyty a endotelovými buňkami ve Weibel-Paladeho tělískách. Hlavní funkce vWF je v primární hemostáze, zprostředkovává adhezi trombocytů na endotel. V koagulaci stabilizuje FVIII. Ihned po uvolnění vWF z Weibel-Paladeho tělísek je přebytečný vWF štěpen enzymem ADAMTS13.

Koagulační kaskáda

Při poranění cévy je cílem tvorba trombinu a vytvoření pevného fibrinového vlákna, které vede k zástavě krvácení. Neaktivní koagulační faktory jsou štěpeny na aktivní formu: např. FVIII → FVIIIa. **Probíhá kaskádovitý děj**, kdy jeden faktor štěpí/aktivuje další a tento aktivuje faktor následující. Jsou dvě cesty koagulace, vnitřní a vnější, začínají každá zvlášť, poté se spojí a děj pokračuje jednou společnou cestou.

Vnější cesta začíná uvolněním **tkáňového faktoru** z poškozené tkáně, vznikne **vnější tenáza FVIIa Ca²⁺ TF**, která aktivuje FX na FXa.

Vnitřní cesta začíná odhalením subendotelu při poranění cévy, vznikne **vnitřní tenáza FVIIIa FIXa fosfolipidy Ca²⁺**, která také aktivuje FX na FXa. Odtud se obě cesty spojí do jedné společné. Vznikne **protrombináza FXa FVa fosfolipidy Ca²⁺**, protrombin se aktivuje na trombin, fibrinogen na fibrin. Nejprve se tvoří rozpustný fibrin. Vlivem účinku FXIIIa dojde k vytvoření nerozpustné fibrinové sítě.

Vyšetřovací metody koagulace

1. Protrombinový test PT

Starší název, ale dodnes občas používaný je Quickův test. **Monitoruje vnější cestu koagulace**, to znamená, že při deficitu FII, FV, FVII, FX bude čas PT prodloužený. Výsledky se udávají v poměru (R) času PT pacienta a času normální plazmy. Norma je R= 0,8-1,2.

Při **léčbě warfarinem** se výsledky udávají také v mezinárodním normalizovaném poměru (INR). Každá reagentie má vlastní mezinárodní index citlivosti (ISI), přepočten se provede R umocněno na ISI. Toto je důležité pro vydávání shodných výsledků z různých laboratoří v ČR, ale i ve světě.

Prodloužení PT bývá také u nedostatku FBG, vitamínu K, onemocnění jater, u antikoagulační léčby a u novorozenců.

2. Aktivovaný parciální tromboplastinový test APTT

Monitoruje vnitřní cestu koagulace, to znamená, že při deficitu FVIII, FIX, FXII, FXII bude čas PT prodloužený. Prodloužení PT bývá také u nedostatku FBG, vitamínu K, onemocnění jater, u antikoagulační léčby a u novorozenců. Výsledky se udávají v poměru (R) času PT pacienta a času normální plazmy. Norma je R= 0,8-1,2.

3. Fibrinogen

Monitoruje společnou cestu koagulace. Výsledky se vydávají v g/l, norma je 2-4 g/l. Snížení FBG je u onemocnění jater, při antikoagulační léčbě, u novorozenců, zvýšení FBG u zánětů, v těhotenství, u tumorů.

12.11.4 Fibrinolýza

Proces, při kterém dochází k **rozpuštění koagula**, nerozpustného fibrinu, při zhojení cévy. Jedná se o tzv. úklid cévy po proběhlé koagulaci, dochází k opětovnému zprůchodnění cévy. Fibrinolýza udržuje rovnováhu v krevním srážení. Je to složitá síť aktivátorů a inhibitorů propojených zpětnými vazbami.

Při poranění **fyziologicky dochází k fibrinolýze pouze v místě poranění**. Z poraněné tkáně se uvolní tkáňový a urokinázový aktivátor plazminogenu, který je aktivován na plazmin. Plazmin štěpí rozpustný fibrin, vznikají fibrin fibrinogen degradační produkty FDP, také štěpí nerozpustný fibrin, vznikají **D-Dimery**.

Snížená fibrinolýza je u sepse, trombóz, v těhotenství. Zvýšená fibrinolýza je při zvýšené produkci plazminu u DIC a u krvácivých stavů.

Vyšetřovací metoda fibrinolýzy

D-Dimery

Stanovení se provádí **latexovou imunoaglutinací** (LIA metoda) pomocí monoklonálních protilátek, vznikající aglutinace je měřena turbidimetricky na přístroji. Výsledek vydáváme v mg/ml v FEU jednotkách (fibrinogen equivalent unit). 1 FEU odpovídá množství fibrinogenu, který se spotřeboval ke vzniku 1 D-Dimeru.

Norma D-Dimerů je <0,5 mg/ml FEU. Metoda je vysoce senzitivní až 100 % pro vyloučení trombózy, tzn. pokud jsou negativní D-Dimery, lze vyloučit trombózu. Metoda je ale málo specifická, hodnota D-Dimerů je zvýšená u mnoha stavů - u trombózy, diseminované intravaskulární koagulace (DIC), zánětů, po operaci, poranění, v těhotenství.

12.11.5 Přirozené inhibitory

Fyziologicky je v plazmě přítomno malé množství trombinu a aktivních koagulačních faktorů. Je tedy nutno **udržovat stálou koagulační rovnováhu**. Toto mají za úkol regulační proteiny - přirozené inhibitory, které slouží k zabránění nekontrolovanému srážení krve. Při snížené hladině přirozených inhibitorů je riziko vzniku trombózy.

Jedním z přirozených inhibitorů je **antitrombin** (AT). AT působí na endotelu, je primární inhibitor trombinu IIa, inhibuje vnější tenázu, vnitřní tenázu i protrombinázu. Za přítomnosti heparinu inhibuje i FXa.

Protein C a protein S jsou přirozené inhibitory, k jejich snížení dochází v těhotenství a účinkem warfarinu.

Kontrolní otázky

1. Vysvětlete funkci hemostázy.
2. Popište koagulační kaskádu.
3. K čemu slouží fibrinolýza.
4. Vysvětlete, jaký je úkol přirozených inhibitorů.





Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu



PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. Hematologie a transfuzní lékařství, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.

12.12 Patologie hemostázy

Anotace, abstrakt

K patologickým stavům v hemostáze dochází při porušení křehké rovnováhy mezi sklonem ke krvácení a sklonem k trombotizaci. Příčinou může být snížení, nebo naopak zvýšení hladiny plazmatických faktorů nebo inhibitorů. K patologickým stavům v hemostáze může dojít na všech jejích úrovních.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o patologii hemostázy, jejich příčin a laboratorní diagnostiky.

Klíčová slova

Trombocytopatie, hemofilie, inhibitor



12.12.1 Porucha primární hemostázy

Projevuje se přítomností **petechií** - drobné tečkovité krvácení do kůže, krvácení z drobných cévek při poruše funkce destiček, nebo poruchy cévní stěny. Mnohočetný výskyt petechií se nazývá **purpura**.

Poruchy cévní stěny mohou být vrozené nebo získané. U vrozené vaskulopatie dochází ke značnému ztečení cévní stěny. U získané při nedostatku vitamínu C vznikají **kurděje**, infekce, snížení rutinu, dříve nemoc námořníků.

U trombocytopenie je snížený počet trombocytů $<150 \times 10^9/l$. Mezi trombocytopenie z imunitních příčin patří **idiopatická trombocytopenická purpura** (ITP). Akutní ITP vzniká často u předškolních dětí po virové infekci,

kdy vznikají protilátky proti trombocytům. Počet trombocytů je $<20 \times 10^9/l$. Upraví se do půl roku, léčba kortikoidy. Chronická ITP bývá hlavně u žen, často provází jiné onemocnění.

K **heparinem indukované trombocytopenii** (HIT) dochází u 3 % pacientů při léčbě heparinem. Tvoří se protilátky proti komplexu heparin + destičkový faktor 4. Trombocyty s navázanými protilátkami jsou vychytávány ve slezině. U HIT počet trombocytů klesne na polovinu výchozího počtu, nebo je $<50 \times 10^9/l$. U HIT může být trombóza mozkových splavů, v plicích, ale i krvácení a DIC. Léčba – neprodleně vysadit heparin, podat jiný lék například fondaparinux.

Trombotická trombocytopenická purpura (TTP) je život ohrožující stav, kdy je nutná rychlá diagnostika a zahájení léčby. U TTP vlivem vzniku protilátek (inhibitoru) dojde k zablokování enzymu ADAMTS13, který fyziologicky štěpí volné multimery von Willebrandova faktoru, tím dochází k tvorbě mikrotrombů hlavně v mozku. U TTP jsou trombocyty velmi sniženy $<30 \times 10^9/l$. V krevním nátěru lze pozorovat schistocyty - útržky erytrocytů. Tento nálezn musí laboratoř neodkladně nahlásit lékaři. Léčba spočívá v okamžité výměnné plazmaferéze, jen nutno z plazmy pacienta odstranit protilátky proti ADAMTS13.

Trombocytóza je reaktivní stav, kdy je zvýšený počet trombocytů $>400 \times 10^9/l$. K trombocytóze dochází u bakteriální infekce, u nádorů, u sideropenické anémie. Při úpravě výchozího onemocnění se počet trombocytů normalizuje. Na rozdíl **trombocytémie**, která se vyskytuje u hematologických maligních onemocněních – myeloproliferací.

Trombocytopatie jsou stavy, kdy dochází k poruše funkce trombocytů. I přes dostatečný počet trombocytů může docházet ke krvácivým projevům. Mohou být vrozené, nebo získané například vlivem působení léků. Tohoto se využívá u antiagregační léčby kyselinou acetylsalicylovou.

Projevy poruch primární hemostázy:

- petechie povrchové a slizniční
- krvácení z nosu, dásní
- hematurie
- krvácení z konečníku
- gynekologické krvácení

12.12.2 Von Willebrandova choroba vWCH

Vrozená krvácivá choroba (nepatří mezi koagulopatie). Dochází k defektu vWF. Výskyt v populaci cca 1 %, nemoc postihuje obě pohlaví. Pojmenována po lékaři (Erik Adolf von Willebrand), který v roce 1924 nemoc zachytil ve Finsku u 5-leté dívky, která pak ve 13-letech vykrvácela při 4. menstruaci. Norma vWF v plazmě 50-150 %, krevní skupina 0 má fyziologicky nižší vWF 40 %, vyšší hodnoty jsou v těhotenství, při užívání antikoncepce, u infekcí, nádorů.

Projevy vWCH

- nadměrné krvácení kůže a sliznic, krvácení z nosu
- krvácení dásní po vytržení prvních zubů u dětí
- hematomy, silná menstruace
- může být i fatální krvácení
- opakované aborty = nedojde k nidaci embrya

12.12.3 Hemofilie

Hemofilie patří mezi **koagulopatie**, kdy dochází ke snížení nebo nedostatku některého koagulačního faktoru, což má za následek krvácení. Hemofilie jsou převážně vrozené, ale i vzácně získané stavy. Nejzávažnější je **deficit FVIII u hemofilie A a deficit FIX u hemofilie B**. Příčinou krvácení je nedostatečné množství vnitřní tenázy ve které je obsažen FVIIIa a FIXa, tím vzniká málo FXa, málo trombinu, tvoří se nekvalitní zátka a pacient krvácí dál. Na rozdíl od poruchy primární hemostázy se netvoří petechie, ale hluboké hematomy.

Vrozené hemofilie A, B

Dědičnost je recesivní, vázaná na X chromozom. Muž hemofilik je nemocný s krváivými projevy, přenáší chybný gen na potomky. Žena je přenašečka, nemá projevy hemofilie, ale přenáší chybný gen na potomky. 30 % mutací vznikne nově (oba rodiče jsou zdraví). Normální aktivita FVIII a FIX je 50-150 %.

Dle aktivity faktoru lze tíži hemofilie rozdělit:

- 5-50 % - lehká hemofilie, krvácí po vytržení zubu
- 1-5 % - střední hemofilie, krvácí po drobných úrazech
- 0-1 % - těžká hemofilie, spontánní krvácení do kloubů

Léčba spočívá v injekčním celoživotním podávání chybějícího koagulačního faktoru. V ČR je asi 1 000 hemofiliků.

Získaná hemofilie A

Příčinou je vznik specifického inhibitoru/autoprotilátky proti FVIII. Dochází k zablokování funkce FVIII a pacient začne krvácet. Získaná hemofilie se může objevit u pacientů s lymfomy, tumory, v graviditě. **Při léčbě není derivát FVIII účinný, protože i zde dojde k zablokování podaného faktoru inhibitorem.** Podává se rekombinantní FVII. Pro potlačení tvorby inhibitoru se podávají vysoké dávky kortikoidů. Síla inhibitoru se laboratorně stanovuje v Bethesda jednotkách (BU). Za poměrně silný inhibitor se považují hodnoty od 5 BU.

12.12.4 Trombofilie

Trombofilie je tromboembolická nemoc, jedná se **hyperkoagulační stav**. Trombofilie mohou být vrozené nebo získané defekty se sklonem k trombóze a zvýšená predispozice k recidivám.

Mezi rizikové faktory patří **vrozený deficit inhibitorů** antitrombinu, proteinu C a S, Leidenská mutace FV.

Mezi získané rizikové faktory trombózy patří obezita, kouření, věk, antikoncepce, operace, zaoceánské lety, hypertenze, těhotenství. Jedinci s krevní skupinou non 0 mají 2x vyšší riziko trombózy než jedinci s krevní skupinou 0. V mladém věku mají trombózu hlavně ženy, ve vyšším věku hlavně muži.

Při vzniku trombózy se uplatňuje **Virchowova triáda**, soubor faktorů působících při vzniku trombózy:

- **Poškození cévní stěny** při poranění nebo u hypertenze.
- **Porucha krevního toku** při stáze, u varixů, u srdečních chorob
- **Změna složení krve**, kdy jsou zvýšené koagulační faktory, snížené inhibitory, u paraproteinemie, karcinomu, endoprotézy, TTP, HIT.

Antifosfolipidový syndrom

Příčinou jsou antifosfolipidové protilátky typu například lupus antikoagulans. Jedná se o nespecifický inhibitor/protilátku, která není namířena proti konkrétnímu faktoru, ale proti negativně nabitým fosfolipidům na povrchu trombocytů, tím blokují vazebná místa pro koagulační faktory. **Laboratorně je prodloužené APTT, ale klinicky se jedná o trombofilní stav**. Antifosfolipidový syndrom je nejčastější příčina potratů, žilní i tepenné trombózy.

12.12.5 Diseminovaná intravaskulární koagulace

Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC) je aktivovaná koagulace na mnoha místech v organismu současně. Jedná se o život ohrožující stav. Dochází k **uvolnění velkého množství tkáňového faktoru** z poškozených tkání, tím je masivně aktivována koagulace, tvoří se **velké množství trombinu**, aktivují se koagulační faktory i trombocyty.

Současně se z poškozené tkáně uvolňuje aktivátor plazminogenu, vzniká velké množství plazminu, který aktivuje fibrinolýzu.

Pacient je ohrožen mikrotrombózami a neztížitelným krvácením. Faktory, inhibitory i trombocyty se rychle spotřebovávají, nestačí se vytvořit nové a pacient začne krvácet. Každé velké krvácení může přejít po 1-3 hodinách do DIC, je nutno včas jej zastavit. DIC má horší prognózu u mladých mužů, nebo starších osob.

Příčiny diseminované intravaskulární koagulace

- Polytrauma, crush syndrom, porodnické komplikace, nádory
- Endotoxiny v hadích jidech, produktech bakterií
- Kontakt s cizím povrchem při mimotělním oběhu, umělá chlopeň
- Potransfuzní reakce při inkompatibilitě
- Hemoragické horečky

Laboratorně neexistuje 100 % specifický test na DIC. U DIC bude snížený fibrinogen, zvýšené D-Dimery a snížené trombocyty.

Kontrolní otázky

1. Vysvětlete vznik heparinem indukované trombocytopenie.
 2. Vysvětlete, co je hemofilie.
 3. Vyjmenujte rizikové faktory pro vznik trombózy.
 4. Vysvětlete, co je diseminovaná intravaskulární koagulace.
-

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. Hematologie a transfuzní lékařství, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459



12.13 Imunohematologie

Anotace, abstrakt

Imunohematologie se zabývá se zákonitostmi imunitních reakcí v lidské krvi, zdravých i nemocných. Vyšetřuje antigeny a protilátky, aby se zabránilo nežádoucím účinkům transfuze. Transfuziologie je nauka o hemoterapii (léčba krevní transfuzí) a o transfuzních přípravcích.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o krevních skupinových systémech, dědičnosti krevních skupin a problematice dárcovství krve a kostní dřeně.

Klíčová slova

Antigen, protilátka, gen, alela, recesivní, dominantní, kodominantní

12.13.1 Skupinový systém ABO

Hlavní skupinový systém na erytrocytech je systém ABO. Rozlišujeme čtyři základní krevní skupiny A, B, AB, O. Na erytrocytech je dalších 35 skupinových systémů. V roce 1907 Jan Jánský, český neurolog a psychiatr, uveřejnil objev čtyř krevních skupin I, II, III, IV. Byl to náhodný objev při studiu souvislosti duševních poruch a srážlivosti krve. V roce 1937 v Paříži byla ujednocena celosvětová nomenklatura krevních skupin A, B, AB, O.

Antigeny, antigen A, antigen B, v systému ABO se nachází na membráně erytrocytů. Protilátky, anti-A, anti-B jsou v plazmě/séru. Protilátky jsou přirozené (vrozené) a pravidelné. U novorozenců do 3-4 měsíců nejsou plně vytvořeny. Krevní skupina je určena přítomností nebo chyběním antigenu na membráně erytrocytu a přítomností nebo chyběním protilátky v séru.

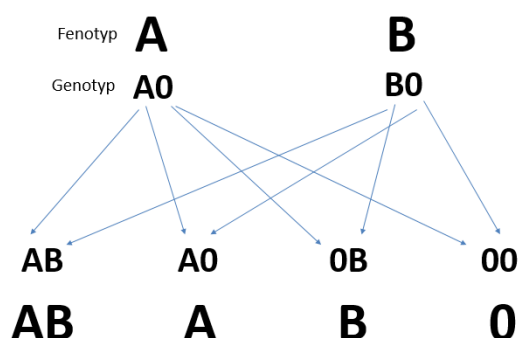
Dědičnost krevních skupin ABO

Krevní skupina je tvořena vždy dvěma alelami, jedna je od otce, jedna od matky. **Alela je alternativa genu.** Gen kóduje znak, nebo vlastnost, například barvu očí nebo krevní skupinu. Jedince, který zdědí stejnou alelu od matky i od otce, označujeme jako **homozygota**. Jedinec, který zdědí jinou alelu od matky a jinou od otce, je označován jako **heterozygot**. Dítě nemůže mít alelu, kterou nemá ani jeden z rodičů. Alely v ABO systému jsou tři A, B, O. Dominantní alely jsou A, B. Recesivní alela je O, to znamená, že se projeví pouze v homozygotní formě. Pokud zdědíme A i B, jedná se o kodominanci, vznikne krevní skupina AB. Genotyp je soubor všech alel jedince, fenotyp je vnější projev genotypu, viz Tabulka.



Genotyp	Fenotyp
A0	A
AA	A
B0	B
BB	B
AB	AB
00	0

Dědičnost krevních skupin



Dle databáze Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze je krevní skupina A zastoupena u 40 % obyvatel v ČR, 0 u 34 %, B u 18 %, AB u 8 %.

Význam KS ABO pro transfuzi

- Univerzální dárce erytrocytů je 0 (nemá žádné antigeny)
- Univerzální dárce plazmy je AB (nemá žádné protilátky)
- Univerzální příjemce erytrocytů je AB (má oba antigeny)

Příjemce nikdy nesmí dostat krev s antigenem, proti kterému má přítomny protilátky.

12.13.2 Rh systém

Po ABO je druhý nejvýznamnější. Je druhou nejčastější příčinou hemolytického onemocnění novorozence HON. Rh systém byl pojmenován podle pokusného zvířete opice Makak Rhesus - Rhesus factor.

Antigenů v Rh systému je více než 56. Nejvýznamnější jsou antigeny **D, C, c, E, e**. U novorozence jsou velmi dobře vyvinuté. **Pozitivita nebo negativita v Rh systému** je dána **přítomností nebo chyběním antigenu D** na erytrocytech. U jedinců **RhD+** je na erytrocytech přítomen antigen D (85 % Evropanů, 95 % Afričanů). U jedinců **RhD-** není na erytrocytech přítomen antigen D (15 % Evropanů, 5 % Afričanů).

Protilátky v Rh systému jsou pouze imunní (získané), přirozeně se nevyskytují. Imunní protilátky anti-D vznikají při imunizaci RhD- jedince po podání RhD+ krve, nebo v těhotenství RhD- matky s plodem RhD+. Antigen

D je velmi silný imunogen, pokud příjemce RhD- obdrží krev RhD+, může dojít k tvorbě anti-D, výsledkem může být silná potransfuzní reakce.

Jedinec	Jakou krev může přijmout?	Komu může krev darovat?
RhD+	RhD+, RhD-	RhD+
RhD-	RhD-	RhD+, RhD-

12.13.3 Hemolytické onemocnění novorozence

Hemolytické onemocnění novorozence je stav, kdy dochází ke zkrácenému přežívání a hemolýze erytrocytů plodu nebo novorozence vlivem navázaných protilátek od matky.

Plod zdědí od otce antigeny, které matka na svých erytrocytech nemá (například matka 0 RhD-, plod B RhD+). Erytrocyty plodu proniknou do krevního oběhu matky. Dojde k imunizaci matky, matka si tvoří proti „cizím“ antigenům plodu **protilátky typu IgM** (pentamer je velká molekula), které nemohou procházet placentou. Po několika týdnech se **IgM přemění na IgG** (monomer je malá molekula), které již mohou procházet placentou.

V druhém a dalším těhotenství při dalším pronikání erytrocytů plodu do oběhu matky dochází k velmi rychlé tvorbě mateřských protilátek IgG, které snadno procházejí přes placentu, váží se na antigeny na erytrocytech plodu a dochází k jejich hemolýze.

Fetomaternální krvácení FMH

Za normálních okolností erytrocyty plodu nepronikají do oběhu matky, oba krevní oběhy jsou oddělené. K FMH může dojít ve třetím trimestru nebo při porodu, při spontánním abortu, interrupci, mimoděložním těhotenství, císařském řezu, atd.

Klinické projevy HON

Může být různá míra postižení od lehké žloutenky až po těžké klinické stavy, nebo úmrtí plodu, novorozence. Lze pozorovat anémii, hepatosplenomegálii. Při hemolýze erytrocytů plodu vzniká velké množství bilirubinu, a může dojít k poškození mozku. Nejzávažnějším stavem je hydrops plodu, dochází k srdečnímu selhání a úmrtí plodu.

Léčba HON

Cílem je předejít vzestupu hladiny bilirubinu, která by ohrozila novorozence rozvojem encefalopatie.

- **Fototerapie**, světelné záření způsobí přeměnu bilirubinu na netoxickou formu.
- **Imunoterapie**, podání imunoglobulinů může zabránit předčasnému odbourávání erytrocytů plodu s navázanými protilátkami od matky.
- **Substituční transfuze** malých objemů krve k léčbě anemie novorozence od jednoho dárce. Kompatibilita musí být s krví novorozence i matky.

- **Výměnná exsanguinační transfuze**, novorozenecká krev se nahradí dárcovskými erytrocyty a plazmou, kompatibilními s krví novorozence i matky. Podává se cca 100 ml krve/ kg dítěte
- **Intraumbilikální transfuze** je vysoce riziková invazivní léčba HON pro úpravu anémie plodu. Provádí se od 20 týdne těhotenství.

Prevence HON

Spočívá v podávání imunoglobulinu anti-D do 72 hodin po porodu všem RhD-ženám po porodu RhD+ dítěte. Podává se i po potratu, amniocentéze a při jiných rizikových situacích v těhotenství. Podaná anti-D se naváže na RhD+ erytrocyty plodu v krvi matky, dojde k jejich destrukci dříve, než si matka proti nim vytvoří protilátky.

Kontrolní otázky

1. Vysvětlete pojmy homozygot, heterozygot, recesivní, dominantní.
2. Čím je dána Rh+ pozitivní krev?
3. Vysvětlete mechanismus vzniku HON.
4. Jaká je prevence HON?

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. Hematologie a transfuzní lékařství II, Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3460-6

MASOPUST JIŘÍ, PÍSAČKA MARTIN, Praktická imunohematologie Erytrocyty, Mladá fronta, 2017. ISBN 978-80-204-3740-2.



12.14 Dárcovství krve a hematopoetických buněk

Anotace, abstrakt

Ztrátu krve u člověka lze nahradit pouze lidskou krví získanou od jiného člověka - dárce krve. Jsou určité pokusy o „výrobu“ umělé krve, ale tato se zdaleka nepřibližuje krvi lidské. Je tedy nutné mít vytvořený organizovaný systém dárcovství za účelem pravidelného získávání krve od dárců.

Cíl kapitoly

Poskytnout studentům základní informace o dárcovství krve a hematopoetických buněk.

Klíčová slova

Dárce, registr, HLA, transplantace

12.14.1 Dárci krve

Dárci by měli být dobrovolní a bezplatní, neměli by být motivováni penězi, pak mohou zamíčet závažné údaje o zdravotním stavu, to znamená vyšší riziko pro příjemce. **Dárcem může být svéprávná osoba ve věku 18-65 let s dobrým zdravotním stavem a s trvalým nebo dlouhodobým pobytem v ČR, váha >50 kg.** Každá transfuzní stanice má vlastní registr dárců. Musí mít dostatečné zásoby krve všech krevních skupin.

Před každým odběrem dárce vyplní **Dotazník dárce**, kde odpoví na otázky zaměřené na případnou rizikovou činnost v nedávné době, například cestování do exotických oblastí (malárie), nitrožilní užívání drog, vakcinace živou vakcínou, prodělaná hepatitida B, vztekliny, operace, piercing, tetování atd. Dárce podepíše prohlášení, že sám sebe nepovažuje za rizikovou osobu. Před odběrem lékař zkontroluje dotazník a celkový zdravotní stav dárce.

Samovyhloučení - dárce má právo kdykoliv od odběru odstoupit bez udání důvodu.

Odběr krve

Vpich se provádí do loketní jamky po předchozí dezinfekci. Používá se odběrový set, jehož součástí je odběrový vak s protisrážlivým a konzervačním roztokem, jehla a predepozitní (satelitní) váček na 25ml, ze kterého se provádějí odběry materiálu na předepsaná vyšetření a současně slouží jako prevence bakteriální kontaminace. Odběrový vak je umístěn na odběrové míchací váze, odebírá se 450 ml $\pm$ 10 %, odběr nesmí trvat déle než 10 minut.



Aferézy

Používají se pro odběry jednotlivých složek krve pomocí automatizovaných separátorů. Krev ze žíly odtéká do separátoru, zde se přidá antikoagulační činidlo, oddělí se požadované složky krve a zbytek se vrátí zpět do těla dárce. Plazmaferéza slouží k odběru samotné plazmy, trombocytaferéza pro odběr trombocytů.

Imunohematologické vyšetření dárce

Vzorek krve pro vyšetření se získá při samotném odběru z predepozitního vaku. Při každém odběru se pokaždé vyšetří krevní skupina a nepravidelné protilátky, dále infekční markery anti-HIV, anti-HCV, HBsAg, protilátky proti syfilis. Pozitivní výsledky testů se oznamují dárce a zpětně se dohledá osud přípravků z předchozích odběrů.

Výběr krevní transfuze

Cílem je zajistit pacientovi bezpečnou transfuzi kompatibilní krve, při které budou transfundované erytrocyty dlouhodobě přežívat a nedojde k jejich destrukci. **V případě inkompatibility mohou být následky fatální.** Nejčastější příčiny většiny potransfuzních reakcí jsou chyby v identifikaci pacienta, záměna vzorku a nedetekovatelné protilátky.

Při požadavku na krevní transfuzi se vyšetří u příjemce krevní skupina v systému ABO a RhD a provede se screening nepravidelných protilátek. Poté se provede výběr transfuzního přípravku a test kompatibility. Při **testu kompatibility** se smíchá plazma příjemce a erytrocyty vybraného transfuzního přípravku. Nesmí dojít k pozitivní reakci, pacient nesmí mít protilátky proti antigenům dárce. Případné reakce je nutno objasnit před podáním transfuze.

Platnost testu kompatibility a screeningu protilátek je 72 hodin od vyšetření. Pokud nebyl transfuzní přípravek do té doby podán pacientovi, je nutno provést nové předtransfuzní vyšetření z nového vzorku krve. Důvodem je možná tvorba nových protilátek.

Požadavky na rychlost přípravy krevní transfuze

- **Standard/rutina** - přípravek se připravuje na stanovený den a čas. Předtransfuzní vyšetření se provádějí v sérii, slouží pro plánované operační výkony.
- **Statim** - požadavek na přednostní přípravu přípravku do 60-90 minut od dodání požadavku do laboratoře. Předtransfuzní vyšetření se provádí jednotlivě.
- **Vitální indikace** - nebezpečí z prodlení. Přípravek se vydá okamžitě bez předtransfuzního vyšetření. Podají se erytrocyty O RhD negativní a plazma AB. Nelze vyloučit akutní potransfuzní reakci z důvodu inkompatibility v jiných skupinových systémech. Předtransfuzní vyšetření se vždy provede dodatečně, co nejdříve.

Podání krevní transfuze

Za podání odpovídá lékař. Pod odborným dohledem může asistovat při zahájení transfuze všeobecná sestra nebo záchranář.

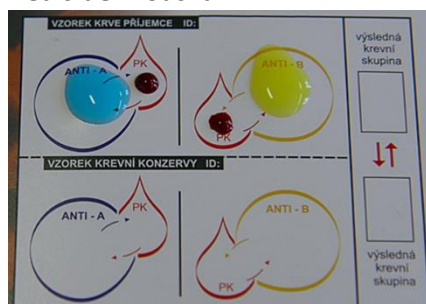
Příprava transfuze u lůžka pacienta:

- Identifikace pacienta, kontrola shody dokumentace.
- Kontrola transfuzního přípravku - neporušenost obalů, změna vzhledu atd.
- Písemný souhlas pacienta, vyšetření tlaku, pulsu, teploty.
- Podává se temperovaná transfuze na 25°C. Temperovaná na 37°C se podává u masivních transfuzí, novorozenců a pacientů s chladovými protilátkami.
- Transfuzní souprava s filtrem se připojí k vaku.
- Komůrka se naplní do ½ transfuzním přípravkem.
- Uvolní se tlačka a přípravek vyplní i dolní část soupravy, nesmí být vzduchová bublina.
- Proveďte se vpich, odebere se krev na „bed side“ zkoušku, zavede se kanyla, na kterou se připojí transfuzní souprava.
- Proveďte se „bed side“ zkouška, pokud je vše v pořádku necháme protéct 20-30 ml krve a transfuzi zpomalíme.
- Sledujeme pacienta cca 5 minut, pokud je vše v pořádku, transfuzi zrychlíme. Pacienta i na dále pravidelně kontrolujeme.

Bed side zkouška

- Ověření krevní skupiny pacienta a transfuzního přípravku (provádí se u lůžka pacienta).
- Na kartu se nakapou diagnostická séra anti-A, anti-B.
- Přidá se kapka krve pacienta a kapka krve z transfuzního přípravku.
- Krev se promíchá s diagnostickými séry a vyhodnotí. Krevní skupiny se musí shodovat, musí být shoda s dokumentací, s přípravkem i průvodkou.
- Při neshodě nepodávat a ihned kontaktovat laboratoř.

Bed side zkouška



Ukončení transfuze

Transfuzi ukončíme, pokud ve vaku zbývá cca 5-10 ml přípravku. Vak ponecháme v chladničce 24 hodin po podání pro případný vznik potransfuzní reakce, poté vak zlikvidujeme. Po ukončení transfuze se pacientovi znovu změří tlak, puls, teplota.

12.14.2 Transplantace hematopoetických buněk

Cílem je osídlit kostní dřeň příjemce hematopoetickými kmenovými buňkami dárce. Provádí se při akutních leukemiích, útlumu krvetvorby, u těžkých imunodeficitů. Pro úspěšnou transplantaci je potřeba najít dárce kompatibilního v HLA antigenech.

Human leukocyte antigen (HLA) je složitý systém uplatňující se při imunitní odpovědi organismu. HLA se nachází na povrchu leukocytů, hlavně lymfocytů, ale i jiných buněk. HLA obsahuje cca 17 tisíc alel, je vysoce polymorfní, **každý jedinec má unikátní genotyp HLA, kromě jednovaječných dvojčat.**

HLA systém umí rozlišit co je tělu cizí a co vlastní. Není snadné nalézt HLA kompatibilního dárce, 4 pacienti z 10 svého dárce nenajdou (včas). Čím více dárců bude v registru, tím větší šance je na vyhledání vhodného dárce. Pro vstup do registru je nutno splnit podmínku věku dárce 18-35 let, musí být zdravý, bez závažných onemocnění.

Při posuzování shody v HLA systému se hodnotí 5 párů alel (celkem 10 alel), musí být shoda alespoň 8/10, ideálně 10/10, neshoda v 1 alele nevadí. Nehoda v ABO a RhD není na překážku.

Vyhledávání dárce

1. **Úzká rodina** – sourozenec jako vhodný dárce pouze v 25 %, 75 % pacientů nenalezne dárce v rodině.
2. **Registr nepříbuzenských dárců** v ČR, Německo, Evropa, USA
3. **Haploidentická příbuzenská transplantace** se používá, když není k dispozici nepříbuzenský dárce. Rodič daruje dítěti, nebo dítě daruje rodiči.
4. **Nezletilý dárce** může darovat pouze pro vlastního sourozence, schvaluje etická komise

Odběr hematopoetických buněk

Může být dvojího typu. Při **odběru kostní dřeně** je dárce hospitalizován cca 3 dny. V celkové anestezii se provede několik vpichů do pánevní kosti. Odsaje se potřebné množství kostní dřeně (dle váhy pacienta a dárce). Po probuzení dárce pociťuje mírnou bolest beder. Kostní dřeň se očistí od úlomků a nechá se v transfuzi vykapat do krevního oběhu příjemce. Dárce může darovat kostní dřeň maximálně 2x za život

Odběr periferní krve na separátoru se provádí ambulantně, bez anestezie. Dárce užívá čtyři dny před odběrem růstové faktory, aby došlo ke zvýšené tvorbě a **vyplavení hematopoetických buněk do periferní krve.** Mohou se objevit chřipkovité příznaky, únava, bolesti svalů. Dárce je napojen na separátor, který hematopoetické buňky zachytí, zbylou krev vrátí zpět dárci. Separátorem proteče cca 10-15 litrů krve. Celá procedura trvá cca 4 hodiny. Poté se nechá vykapat v transfuzi příjemci.

Komplikace transplantace u příjemce

Po transplantaci může pacient pociťovat nevolnost, může se objevit zvracení, průjem, zápal plic, zánět močových cest, nekróza myokardu, infekce bakteriální, kvasinkové, virové. Pacient je v izolaci, personál i rodina nosí roušky. Jako profylaxe se podávají antibiotika a antimykotika. Přijetí nové krve trvá asi 3 týdny.

Kontrolní otázky

1. Vysvětlíte, jaké požadavky musí splňovat dárce krve.
2. Popište odběr krve dárce.
3. Jaký je rozdíl mezi odběrem kostní dřeně a hematopoetických buněk na separátoru.
4. Jak se postupuje při výběru dárce hematopoetických buněk.

Místo pro doplnění

Referenční seznam a doporučená literatura ke studiu

PENKA MIROSLAV, TESAŘOVÁ EVA A KOL. Hematologie a transfúzní lékařství, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
MASOPUST JIŘÍ, PÍSAČKA MARTIN, Praktická imunohematologie Erytrocyty, Mladá fronta, 2017. ISBN 978-80-204-3740-2.

