

Lékařská chemie a biochemie II

Teorie k praktickým cvičením

2. ročník, všeobecné lékařství

ZIMNÍ SEMESTR

2022/2023



Ústav lékařské chemie a biochemie

Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova

OBSAH

Klinická biochemie

strana 3

- *Proteiny krevní plazmy*
- *Sacharidy a lipidy krevní plazmy*
- *Nízkomolekulární dusíkaté složky krevní plazmy*
- *Vznik moči a funkce ledvin*
- *Základní vyšetření moči*
- *Speciální vyšetření moči*

Klinická enzymologie

strana 46

- *Enzymová aktivita séra*
- *Stanovení enzymové aktivity a její vyjadřování*
- *Názvoslovi a klinický význam rutinně vyšetřovaných enzymů*

Molekulární biologie

strana 58

- *Detekce Leidenské mutace*
- *Metodická část*

Klinická biochemie

Proteiny krevní plazmy

Krev je suspenze červených krvinek, bílých krvinek a krevních destiček v *krevní plazmě*. Jedná se o důležitou součást vnitřního prostředí organismu, zajišťující přívod živin a kyslíku tkáním, odsun metabolických zplodin, udržení stálých osmotických poměrů, konstantních proporcí biologicky důležitých iontů, pH a teploty. V krvi obsažené regulační molekuly umožňují komunikaci mezi orgány a tkáněmi, složky imunitního systému zasahují proti nežádoucím substancím a parazitům. Řada faktorů se po příslušné aktivaci účastní srážení krve a odbourávání krevních sraženin.

Krev je pro svou snadnou dostupnost nejčastěji vyšetřovanou tkání. Celá krev se vyšetřuje jen výjimečně, např. při analýze acidobazických poměrů nebo při stanovení koncentrace glukózy. Daleko nejčastěji provádíme rozbor *krevního séra*, žlutavé vazké tekutiny, získané odstředěním krevní sraženiny, které odstraní spolu s krevními elementy také faktory koagulace. Je nezbytné, aby odstředění krve bylo provedeno bezprostředně po odběru (nejpozději do 1 hodiny), aby se předešlo změnám biochemismu a integrity erytrocytů. Viditelným příznakem poškození červených krvinek je *hemolýza*, na které se účastní teplotní, mechanické a osmotické faktory. Při nesprávném uchování a zpracování vzorků jsou některé biochemické údaje zkresleny, zejména hladina draslíkových iontů.

FUNKCE PLAZMATICKÝCH BÍLKOVIN

Výčet *specifických funkcí* jednotlivých plazmatických bílkovin přesahuje rámec tohoto úvodu. Jmenujme jen ty nejznámější: účast na imunitních reakcích u imunoglobulinů, účast na srážení krve u koagulačních faktorů, transportní funkce bílkovin specializovaných na přenos železa, mědi, thyroxinu, kobalaminu, hemoglobinu, schopnost organizovat lipoproteinové částice a umožňovat tak solubilizaci lipidů. Pozoruhodná je schopnost albuminové molekuly vázat a přenášet hydrofobní substance, jako jsou mastné kyseliny, steroidní hormony, bilirubin, ale i některé ionty, jako Ca^{2+} , Mg^{2+} , jedy a léky. V poslední době se věnuje velká pozornost řadě bílkovin krevního séra, které jsou schopny inhibovat proteolytické enzymy a tím paralyzovat jejich potenciálně destruktivní účinek (α_1 -antitrypsin, antichymotrypsin, inhibitory koagulačních a fibrinolytických faktorů).

Svou důležitost mají rovněž *nespecifické funkce* plazmatických bílkovin. Vzhledem ke své hydrofilní povaze a omezené možnosti difuze mimo cévy jsou schopny udržovat náplň cévního řečiště prostřednictvím vody na ně vázané, a tím zajišťovat životně důležitou cirkulaci krve. V tomto ohledu jsou molekuly albuminu účinnější než globuliny. Při šokových stavech nelze dobře nahradit bílkoviny roztoky solí. Určitým východiskem jsou vysokomolekulární polymery typu dextranu. Bílkoviny mají amfolytový charakter, podílejí se tedy na pufrovací kapacitě krve. Jako proteináty nesou při fyziologickém pH negativní náboj, jsou tudíž partnery ekvimolárnímu množství kationtů (viz iontogram). Při určitých malnutričních stavech a při náhlých zátěžích dochází ke zvýšenému odbourávání krevních proteinů, což se laboratorně projeví jako hypoproteinemie. V případech karence aminokyselin se však dává přednost parenterálnímu podávání aminokyselinových směsí před infuzemi plazmatických proteinů, vzhledem k relativně pomalé degradaci proteinových molekul.

Vzhledem k tomu, že krevní plazma je roztokem bílkovin různé molekulové hmotnosti, vyjadřujeme celkovou koncentraci jako hmotnostní, tj. v g/l. Jedná se o poměrně koncentrovaný roztok v rozmezí 62–82 g/l. V plazmě kvantitativně převažuje jednotná frakce albuminu, zatímco globuliny, ač hmotnostně méně zastoupené, představují pestrou skupinu, sestavenou až na malé výjimky z glykoproteinů a lipoproteinů. V praxi je častější vyšetření krevního séra, takže zde oproti plazmě již nenajdeme fibrinogen a koagulační faktory.

Většina plazmatických proteinů je vytvářena v jaterních buňkách. Hlavní výjimkou jsou imunoglobuliny, produkované plazmatickými buňkami. Vzhledem k tomu, že více než 80 % proteinů syntezovaných v játrech je určeno pro export do plazmy, mají závažnější jaterní poruchy za následek pokles hladin jednoho nebo více proteinů krevní plazmy. Jak již bylo konstatováno výše, téměř všechny bílkoviny plazmy s výjimkou albuminu obsahují ještě cukernou složku, řadí se proto ke glykoproteinům. V řadě případů se prokázalo, že tato cukerná složka se uplatňuje při funkci proteinu a může také prodloužit poločas degradace příslušného proteinu.

DĚLENÍ BÍLKOVIN KREVNÍHO SÉRA, FUNKCE JEDNOTLIVÝCH PROTEINŮ

Sérové proteiny jsou obvykle rozdělovány zonální *elektroforézou* na nosičích, jako je acetát celulózy nebo agarozový gel. Většina klinických analýz je prováděna v barbitolovém pufru při pH 8,6. Při této slabě alkalické reakci jsou všechny sérové proteiny nabitý záporně a pohybují se proto k anodě. Nejvyšší negativní náboj, a tím i nejvyšší anodální mobilitu, vykazuje albumin ($pI = 4,8$), nejpomaleji se pohybují gama-globuliny. Zpravidla se v tomto systému docílí rozdělení na pět hlavních frakcí. Poměrné zastoupení těchto frakcí se určuje denzitometricky po obarvení vhodným barvivem. Individuální proteiny uvnitř frakcí je pak možno určovat specifitějšími *imunochemickými metodami*. Např. klasická Manciniho radiální imunodifuze je založena na difuzi sérových bílkovin z centrální jamky do agarového gelu, obsahujícího specifickou protilátku. Při reakci antigenu s protilátkou dojde k vytvoření nerozpustného komplexu, při čemž průměr kruhové vysrážené (precipitační) zóny je úměrný koncentraci analyzované bílkoviny.

Při běžné analýze sérových bílkovin zonální elektroforézou je obtížné zachytit a kvantifikovat malou frakci bílkovin, která se pohybuje před albuminem, a byla proto nazvána *prealbumin*. Tato bílkovina se účastní transportu thyroxinu a navazuje se na ni také nízkomolekulární protein, přenašejíci vit. A. Klinicky je však zajímavá zejména tím, že obsahuje značný podíl strategické aminokyseliny tryptofanu a má krátký poločas odbourávání. Hodí se proto ke sledování aktuálního stavu výživy. Při malnutrici zaznamenáváme rychlý pokles, normalizace diety vede k návratu na normální hodnoty.

Albumin je hlavním proteinem lidské plazmy. Je produkováno játry, které na produkci albuminu vynakládají 25 % své proteosyntetické kapacity. Je zajímavé, že albumin je hojně zastoupen v intersticiu a je přítomen i v řadě jiných tělesných produktů, jako jsou trávicí šťávy, slzy, pot, ve značné koncentraci pak je nacházen v exudátech. Jak již bylo naznačeno, syntéza albuminu je snížena u některých jaterních chorob, takže se u postižených sníží podíl albuminu ke globulinům (A/G koeficient). Vzácně se setkáváme s nepřítomností albuminu (*albuminémie*). Kupodivu je tento stav provázen jen mírnými edémy, vzhledem ke kompenzačnímu vzestupu koncentrace globulinů. Snížení albuminové frakce je vyvoláno jeho ztrátami ledvinou nebo odbouráním při katabolických stavech. Vzácné zdvojení vrcholu albuminu, *bisalbuminémie*, může být projev genetické strukturní odchylky u heterozygota, nebo také následkem navázání cizorodé substance (např. PNC) na část molekul. Molekula albuminu je tvořena jedním souvislým peptidovým řetězcem o 585 aminokyselinách a molekulární hmotnosti 69 000. Na povrchu zhruba elipsoidní molekuly byl prokázán velký počet *vazebných míst pro četné ligandy*. Je známo, že řada běžných metabolitů, jako jsou volné mastné kyseliny a bilirubin, jsou špatně rozpustné ve vodním prostředí. Albumin tak v krvi plní úlohu jejich přenašeče. Stejně je schopen transportovat i jiné endo- i exogenní substance, např. kalcium, magnesium, vitamin C, a celou škálu léčiv, např. acylpyrin, digoxin, penicilin, kumarinová antikoagulantia a barbituráty. Vzhledem ke své nízké molekulové hmotnosti, vysoké koncentraci, a vazebné schopnosti vůči anorganickým iontům, zajišťuje albumin 75–80 % *onkotického tlaku* lidské plazmy. Albumin je také pokládán za součást mimobuněčného antioxidantního systému.

Hlavní plazmatické proteiny		%
Albumin		53–65
Alfa ₁ -globuliny	α ₁ -antiproteáza (antitrypsin) orosomukoid α ₁ -lipoprotein transkortin (CBG)	2–4
Alfa ₂ -globuliny	makroglobulin haptoglobiny ceruloplazmin	8–13
Beta-globuliny	transferrin β-lipoprotein C-reaktivní protein složky komplementu (fibrinogen 1,5–4,5 g/l)	9–16
Gama-globuliny	IgG 80 % IgA 12 % IgM 7 % IgD <1 % IgE <1 %	12–19

Globuliny tvoří 35–47 % proteinů krevní plazmy. Pokud bychom porovnávali jejich fyzikálně-chemické vlastnosti s albuminy, museli bychom konstatovat relativně nižší rozpustnost, a tím také větší pohotovost k precipitaci. Tato precipitační schopnost je ovšem v přítomnosti přebytku albuminu minimalizována, říká se, že albumin působí jako „ochranný koloid“, a tím zvyšuje stabilitu roztoku. Globulinová frakce je neobvykle heterogenní, bylo charakterizováno mnoho desítek typů molekul, většinou v podobě glykoproteinových komplexů. Kvantitativně významné jsou i lipoproteiny, transportní forma tuků. I když běžná zonální elektroforéza poskytuje jen velmi hrubou představu o distribuci těchto proteinů, často i tato orientační data lze využít ke stanovení diagnózy. Je proto žádoucí získat představu o kvantitativně nejdůležitějších proteinech, tvořících čtyři základní globulinové frakce (viz tabulka). Distribuce bílkovin mezi frakce není vždy přesná, některé proteiny přecházejí z jedné frakce do druhé.

Frakce α₁-globulinů:

α₁-Antitrypsin je tradiční název pro inhibitor několika proteolytických enzymů serinového typu, je proto vhodnější jej nazývat *α₁-inhibitor proteáz*. Tvoří 80–90 % této první globulinové frakce. Jeho fyziologickým posláním je vytvářet proteolyticky inaktivní komplexy s některými proteázami, zejména s leukocytární elastasou. Bylo zjištěno, že tento vysoce aktivní enzym, který je uvolňován při zánětlivé reakci, může při nedostatku zmíněného inhibitoru destruovat i vlastní tkáň, což se projeví zejména porušením jemné elastické tkáně plic. Postižené osoby jsou ohroženy časným výskytem plicní rozedmy. Byly zjištěny i geneticky vázané patologické varianty tohoto inhibitoru, které kromě porušené inhibiční funkce mají sklony k vytváření nerozpustných komplexů, deponovaných na místě biosyntézy, tj. v játrech. Zvyšuje se u akutních stavů, snížení provází těžké hepatopatie.

Orosomukoid je kyselý α₁-glykoprotein s mimořádně vysokým podílem cukerné složky, stoupající při akutních zánětech.

α₁-Lipoprotein je totožný s lipoproteinem vysoké hustoty (*HDL*), což je dáno vysokým podílem proteinů v porovnání s jinými lipoproteinovými třídami.

Kortikosteroidy vázající globulin (transkortin, CBG) je hlavním proteinem plazmy, transportujícím glukokortikoidy.

α₁-Mikroglobulin (MW 26000) inhibuje migraci leukocytů, spolu s ostatními mikroproteiny se nachází v moči při tubulární proteinurii.

Vzácně se v první globulinové frakci setkáme s α_1 -fetoproteinem (AFP). Tato albuminu podobná bílkovina je totiž takřka výhradně produkována v játrech během fetálního období. Po narození však jeho hladina rychle poklesne a pokud se najde v dospělosti, signalizuje zhoubné bujení (hepatom, maligní teratom), někdy ale provází i virovou hepatitidu. Na tomto místě je vhodné uvést, že přítomnost AFP v amniové tekutině provází rozštěpy neurální trubice zárodku a jiné fetální defekty.

Frakce α_2 -globulinů:

α_2 -Makroglobulin, jehož název je odvozen od mimořádné velikosti molekuly (mol.hmotnost 725 000), je dalším proteinem, který je schopen vytvářet komplexy s proteolytickými enzymy a tím neutralizovat jejich destruktivní účinky. Mimo jiné má také určitou antithrombinovou aktivitu. Koncentrace makroglobulinu se zvyšuje při nefrotickém syndromu vzhledem ke špatnému průniku glomerulem, fyziologicky je zvýšen u dětí. Pokles provází akutní pankreatitidu.

Haptoglobiny patří do kategorie proteinů schopných vázat volný hemoglobin. Zatímco volný hemoglobin vzhledem ke své menší molekule (65 000) může proniknout glomerulem, komplex s haptoglobinem (Hb-Hp) vzhledem ke své velikosti (155 000) neprochází. Zdá se tedy, že funkcí haptoglobinu je zabránit úniku cenného železa. Kromě toho vazba na haptoglobin zabraňuje hemoglobinu vytvářet hydroxylové radikály. Poločas Hb-Hp komplexů je kratší než poločas haptoglobinu samotného, takže při zvýšeném uvolňování hemoglobinu, na př. při hemolytické anemii, dochází ke snižování koncentrace haptoglobínů. Na druhé straně dochází ke vzestupu hladiny této bílkoviny při zánětech a jiných akutních stavech. Haptoglobin proto řadíme k proteinům tzv. akutní fáze. Haptoglobin je tetramer typu $\alpha_2\beta_2$, při čemž existují tři typy řetězců α , dávající možnost různých kombinací, které lze separovat elektroforézou. Geneticky rozlišujeme tři polymorfni formy, označované jako 1-1, 2-1 a 2-2. Jsou produkty dvou genů, při čemž Hp 2-1 označuje heterozygotní fenotyp. Dosud nebyly zjištěny fyziologické rozdíly mezi těmito polymorfními typy.

Ceruloplazmin je zodpovědný za transport 90 % plazmatické mědi (zbylých 10 % je vázáno na albumin). Pro vysoký obsah mědi má protein modrou barvu. Nízké hladiny ceruloplazminu jsou nacházeny u Wilsonovy choroby (hepatolentikulární degenerace), což je toxikosa z přebytku mědi, způsobená neschopností vylučovat tento kov. Ceruloplazmin má oxidázovou aktivitu, která může být využita na konverzi $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$, což snižuje riziko vzniku škodlivých hydroxylových radikálů.

Frakce β -globulinů:

Transferin hraje centrální roli v metabolismu železa vzhledem k tomu, že zprostředkovává přenos železa do míst jeho potřeby, tj. ze střeva do kostní dřevě a ostatních orgánů. Volné železo je toxické, vazba na transferin snižuje jeho potenciální toxicitu. Koncentrace transferinu v plazmě je asi 3g/l. Toto množství je schopno přenášet železo až do koncentrací 3 mg/l, což představuje celkovou vazebnou kapacitu pro železo. Vazebnou kapacitu určujeme umělým vysycením plazmy železem. Jmenovaný protein je normálně vysycen jen asi do 1/3, u chudokrevností z nedostatku železa ještě méně. Naopak vyšší sycení je nacházeno při stavech strádání železa, např. u hemochromatosis. Je nutné si však uvědomit, že železo, které se nachází ve vazbě na transferin, reprezentuje jen asi 1 % celkového železa přítomného v těle. Většina je obsažena v hemoglobinu, část v ostatních porfyrinových derivátech, zhruba 35 % je pak deponováno v zásobní formě, vázáno na ferritin, a to převážně v játrech. Hladina transferinu stoupe při nedostatku železa, klesá u jeho nadbytku a při porušené proteosyntéze v játrech.

Lipoprotein β -frakce odpovídá plazmatickým „lehkým“ lipoproteinům (LDL). Podílí se zejména na transportu volného a esterifikovaného cholesterolu, který se na celkové hmotnosti částice podílí 45 %.

C-reaktivní protein (CRP) je sérový protein pojmenovaný podle schopnosti se vázat na C-polysacharid pouzdra pneumokoků. Výrazně se zvyšuje při akutním zánětu, zejména bakteriálním, u zdravých jedinců se neprokazuje. Syntéza je stimulována interleukinem 6 (IL-6).

β_2 -Mikroglobulin (MH 11800) je součástí HLA systému, a protože je produkován hlavně myeloidními a lymfoidními buňkami, patří mezi nádorové markery. V moči je nacházen při tubulární proteinurii.

Složky **komplementového systému** se účastní lýzy cizích buněk a hrají důležitou roli při zánětlivých procesech. Mají proteolytickou aktivitu. Tento systém má devět hlavních frakcí, složky C3 a C4 se však nejsnáze kvantitativně určí imunochemickými metodami, protože tvoří 95 % celku. Informativní je zejména nález jejich snížení, protože signalizuje buď zvýšenou spotřebu, nebo sníženou syntézu. Tyto bílkoviny patří také mezi reaktanty akutní fáze.

Při elektroforéze plazmy se v β -frakci zachytí i **fibrinogen** (1,5–4,5 g/l). Fibrinogen je citlivý indikátor některých poruch pojivových tkání, jako je např. reumatoidní artritida. Řadí se také k proteinům akutní fáze a je rizikovým faktorem pro vznik kardiovaskulárních chorob.

Frakce γ -globulinů:

V této frakci se nachází **imunoglobuliny (Ig)**, bílkoviny s protilátkovou aktivitou. Malá část Ig se vyskytuje i ve frakci β . Vznikají v plazmatických buňkách lymfatické tkáně a kostní dřeně. Protilátky obecně mají schopnost se specificky navázat na antigen (nejčastěji bílkovinné charakteru), a vyvolat tak jeho vysrážení (precipitaci). V případě buněk nebo subcelulárních částic způsobí vazby jejich shlukování (aglutinaci). V přítomnosti komplementu dochází následně až k lýze cizorodého agens. Imunoglobuliny jsou proteiny uniformní stavby, základem je komplex dvou těžkých a dvou lehkých řetězců, propojených disulfidickými můstky, jak je podrobněji pojednáváno v učebnicích biochemie. Jednotlivé molekuly se odlišují jednak svou antigenní specifitou, danou strukturou variabilních úseků molekul, jednak určitými rozdíly ve struktuře konstantních úseků. Podle struktury konstantních domén těžkých řetězců rozlišujeme pět základních tříd, označených velkými písmeny (G, M, A, D, E). Tyto třídy mají odlišné funkce v imunitním systému, např. třída IgM zajišťuje časnou protilátkovou odpověď, třída IgG pozdní protilátkovou odpověď. Nejvíce protilátek náleží právě této třídě. Na sliznicích se setkáváme se sekrečními IgA a IgE, při čemž IgE má úzký vztah k alergickým reakcím. Existují již metody testování vazby IgE na konkrétní alergeny. IgM jsou pentamery, mají tedy největší molekuly (mol. hmotnost $8,7\text{--}9,7 \times 10^5$), IgA se na sliznicích vyskytuje jako dimer, v plazmě jako monomer. Zmnožení IgA se projeví, vzhledem k jeho lokalizaci při elektroforéze, částečným splynutím beta a gama vlny. Tento jev bývá často u jaterních cirrhos.

Ze složek nespecifického obranného systému obsahuje γ -frakce ještě malá množství **properdinu a lysozymu**.

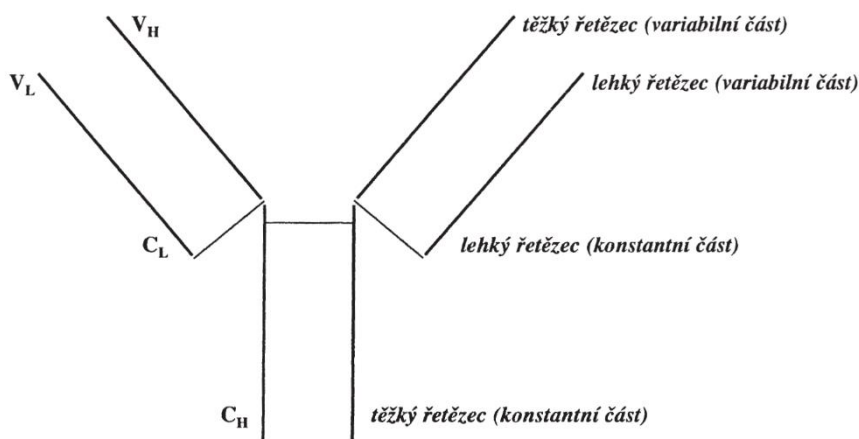


Schéma molekuly IgG, tvořené dvěma těžkými (H = heavy, těžký) a dvěma lehkými řetězci (L = light, lehký). V_L a V_H jsou variabilní úseky (V = variable, proměnný) lehkého a těžkého řetězce, reagující s antigenem, C_L a C_H1-3 jsou konstantní úseky lehkých a těžkých řetězců (C = constant, neměnný).

Vzhledem k výjimečným vlastnostem imunoglobulinů si této frakce všimneme podrobněji. Na elektroforéze ji reprezentuje za normálních okolností difúzně zabarvený, široký pás s nejmenší anodovou mobilitou. Tento obraz je výsledkem vyrovnané syntézy Ig všech tříd a typů. V případě nutnosti mobilizovat protilát-

kový systém, jak je tomu u chronického zánětu, zmnožují se zejména imunoglobuliny třídy G, ale i jiných tříd, takže dochází k difuznímu vzestupu γ -globulinů. Tento stav se nazývá *polyklonální gamapatie*, protože se zvyšuje tvorba různých molekul, byť často zaměřených vůči jedinému infekčnímu agens. Setkáváme se však i s případy, kdy se na elektroforéze objeví uvnitř γ - nebo β -globulinového pásu úzký, intenzivně zabarvený pruh, tzv. *paraprotein*, který odpovídá velkému množství molekul svou strukturou zcela identických. Tomuto stavu říkáme *monoklonální gamapatie*. V tomto případě nelze zjistit žádný antigenní podnět a často zde dochází k redukci Ig jiných tříd. Někdy jsou produkovány jen lehké řetězce imunoglobulinů. Vzhledem ke své malé molekule (MH 22000) přecházejí snadno do moči a mohou tam být detegovány jako *Bence-Jonesova bílkovina*, reverzibilně precipitující při teplotě 50–60 °C. Přítomnost paraproteinu je závažný nálezný, protože provází plasmocytomy (myelomy), tj. nádory z plazmatických buněk, produkující uniformní imunoglobuliny. Je však nutno dodat, že existují i benigní paraproteinemie, jejichž výskyt roste zřetelně s věkem.

Opakem nadprodukcí gamapatií jsou vrozené poruchy syntézy γ -globulinů, *agamaglobulinemie*. Postižené děti nevytvářejí B lymfocyty, a pokud nejsou zajištěny zcela mimořádné životní podmínky, umírají následkem infekcí pyogenními bakteriemi. Odpovědný faktor je vázán na X-chromosomu, výskyt je omezen na mužské pohlaví. Podobné projevy nedostatku nebo úplné absence jsou známy i u jiných frakcích, např. již zmíněná analbuminemie, podobně u jednotlivých proteinů α_1 a β -frakce, u fibrinogenu. Thromboplastické faktory chybějí u hemofilii a jiných koagulopatií.

METODY VYŠETŘENÍ PLAZMATICKÝCH BÍLKOVIN A JEHO HODNOCENÍ

a) Stanovení celkové bílkoviny a albuminu

Ke stanovení *celkových bílkovin* krevního séra pro potřeby klinické biochemie postačují relativně jednoduché barevné reakce. Vzhledem k vysoké koncentraci bílkovin v séru je vhodná i *reakce biuretová*, při které využíváme vzniku modrého komplexu mezi atomy peptidové vazby bílkoviny a měďnatými ionty v alkalickém prostředí. Lze ovšem použít i jiné metody, např. přesnější a náročnější Lowryho reakce, nebo reakce s barvivy bromfenolové modři, atd. Fyzikálních vlastností bílkovinných roztoků využívá refraktometrická metoda, při které se nejčastěji měří mezní úhel lomu světelného paprsku, procházejícího roztokem. Normální plazmatické hodnoty jsou 65–85 g/l. Hodnoty pod touto hranicí se nazývají *hypoproteinemie*, vzácnější zvýšené hodnoty *hyperproteinemie*. Při zjištěných odchylkách je nutno zjistit, která bílkovinná frakce je za tento stav odpovědná. Pokud se jedná o rovnoměrné postižení všech frakcí, je nutno vyloučit zahuštění nebo zředění intravazální tekutiny. Při dehydrataci se koncentrace proteinů zvyšuje, náhlý přísun vody do krevního řečiště se naopak projeví jako hypoproteinemie.

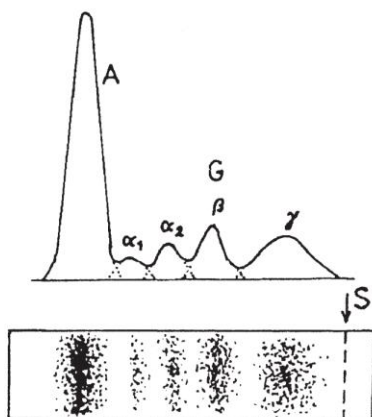
Vzhledem k tomu, že některá barviva mají větší afinitu k *albuminu* než ke globulinům, je možné této vlastnosti využít k selektivnímu stanovení albuminové frakce. Populární je např. metoda stanovení s bromkresolovým purpurem. Nabízejí se však i jiné metody, např. zákalová imunoprecipitační metoda s protilátkou proti lidskému albuminu.

Koncentrace albuminu se může měnit častěji, než koncentrace globulinů. Syntéza albuminu je např. daleko více ovlivněna dostupností proteinů ve výživě, ztráta globulinů po krvácení se daleko rychleji doplňuje. Lze říci, že frakce albuminu zřídka převyšuje normální hodnoty, zatímco globuliny jen vzácně klesají pod fyziologickou hranici. Pokles albuminu nastává především následkem ztrát (proteinurie při nefritidě a nefróze, přechod do výpotků, ztráty při popáleninách a krvácení) a při sníženém přívodu bílkovin. Výrazně je postižena syntéza albuminu při jaterní cirhóze, při cukrovce se může uplatnit zvýšený katabolismus bílkovin.

b) Elektroforetické dělení plazmatických bílkovin

Elektroforéza plazmatických proteinů nám poskytne přehlednou informaci o eventuálních změnách v 5–6 základních elektroforetických frakcích. Jednotlivé proteiny pak je možno analyzovat speciálními metodami, nejčastěji imunochemickými. Metodicky se nejlépe osvědčila elektroforéza v mírně alkalickém prostředí, jako nosiče se používá nejčastěji agarosový gel nebo acetát celulózy. Předností gelové elektroforézy je mj. i uplatnění ultrafiltrace v síťovině gelu, což napomáhá separaci různě velkých molekul. Kvantitativní hodno-

čení je založeno na optické denzitometrii po obarvení bílkovin vhodnými barvivými. Elektroferogram je prosvěcován světlem vhodné vlnové délky, výstup je grafický jako denzitometrická křivka, jednak číselný, odpovídající poměru ploch jednotlivých vrcholů.



Elektroforéza plazmatických bílkovin (elektroferogram, denzitometrická křivka)

Řada chorob se projevuje odchylkami v koncentracích jednoho nebo více proteinů, které je možno postihnout při standardním elektroforetickém vyšetření. Praxe ale ukázala, že existuje jen omezený počet typů porušeného bílkovinného spektra, označovaných jako *dysproteinemie*, takže pro potvrzení diagnózy jsou nezbytná další vyšetření. Hlavní typy demonstruje následující tabulka (upraveno podle Jollifa):

Poruchy složení plazmatických bílkovin (dysproteinemie)

typ	celkový protein	albumin	α_1 -G	α_2 -G	β -G	γ -G
malnutriční	↓↓	↓↓	N, ↑	N, ↑	↓	↓(N)
nefrotický	↓↓	↓↓		↑↑	↑	↓(N, ↑)
hepatický	↓, N	↓↓	↓	↓	↓	↑
zánět akutní		↓	↑	↑		N
zánět chronický		↓	↑	↑		↑
hypergamaglobulinemie	↑	↓				↑
analbuminemie		↓↓↓				
agamaglobulinemie						↓↓↓

↑.....zvýšení

↓.....snížení

N.....normální hodnoty

c) Imunochemické metody

Pro identifikaci a kvantifikaci individuálních sérových proteinů se nejčastěji užívá imunochemických metod. Imunotechniky jsou vysoce specifická stanovení založená na reakci mezi antigenem a protilátkou. *Antigenem* je v tomto případě vyšetřované lidské sérum, častěji jeho frakce. Protilátky jsou obsaženy v séru zvířete, imunizovaného buď kompletním humánním sérem (= *antisérum polyvalentní*), nebo konkrétní plazmatickou bílkovinou (= *antisérum monovalentní*). I monovalentní antisérum obsahuje více variant imunoglobulinových molekul, všechny jsou však schopny se vázat na příslušný antigen. V poslední době se stále čas-

těji užívá protilátek, tvořených jediným klonem identických imunoglobulinových molekul, které se získávají z hybridomových buněčných linií (*monoklonální protilátky*).

Setká-li se antigen se specifickou protilátkou, dojde za předpokladu optimálních koncentrací obou partnerů k propojení antigenních molekul bivalentními molekulami protilátek, což se projeví vytvořením sraženiny neboli *precipitátu* (případ B na obrázku). Tu můžeme detegovat jako zákal v roztoku, nebo jako precipitační oblouček v gelu. Pro kvantitativní stanovení zákalu roztoků je ideální laserový nefelometr, kde je vyhodnocována intenzita rozptylu světla, vysílaného ve směru kolmém k poloze detektoru. Je-li antigen v nízké koncentraci vzhledem k protilátkám, nemůže se uplatnit jejich bivalentní charakter (případ A), precipitace je minimální. Při nadbytku antigenu či nedostatku protilátek (případ C) neodpovídá rovněž intenzita zákalu množství antigenu. Moderní imunochemické techniky zvyšují citlivost a usnadňují měření spráženými analytickými reakcemi, jak bude rozvedeno níže.

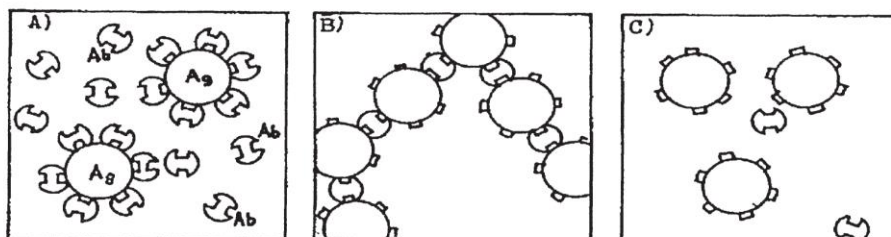
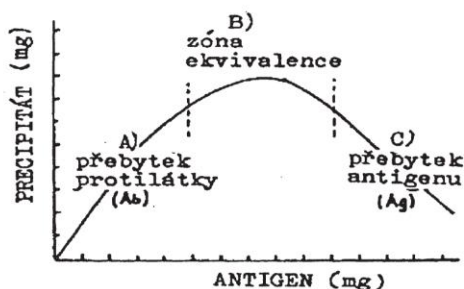


Schéma imunoprecipitace v tekutém prostředí (nefelometrické stanovení precipitátu)

Gelové imunochemické mikrotechniky jsou rozpracovány do celé řady modifikací. Mohou být založeny na prosté difuzi protilátky proti antigenu (*dvojitá difuze* podle Ouchterlonyho), nebo na difuzi antigenu do gelu s rozptýleným antisérem, kde vznikají precipitační prstence s poloměrem úměrným koncentraci antigenu (metoda *lineární imunodifuze*), dále na elektroforéze do gelu s rozptýlenou protilátkou, eventuálně na kombinaci imunodifuze a elektroforézy (*imuno elektroforéza*). Tato posledně jmenovaná metoda, pokud je použito polyvalentní antisérum, dovoluje identifikovat v lidském séru kolem dvou desítek proteinů.

Imunochemické metody jsou dnes používány nejčastěji pro stanovení klinicky významných sérových proteinů. Jako příklad uvedeme bílkoviny, které se zmnožují v případech náhlých zátěží, jako je např. akutní zánět, těžší úrazy, operace, při nekrotizaci tkání z jakéhokoli důvodu. Souborně se nazývají **bílkoviny (reaktanty) akutní fáze**. Patří sem C-reaktivní protein, α_1 -antitrypsin, haptoglobiny, komplement, fibrinogen, a další. Je zajímavé, že je mezi nimi několik inhibitorů proteolytických enzymů. Při elektroforéze se jejich přítomnost projeví mírným zvýšením frakcí α_1 - a α_2 -globulinů za současného slabého poklesu jiných proteinů (albumin, prealbumin, transferin, cholinesteráza), které proto můžeme nazvat „*negativní reaktanty*“.

d) Imunochemické metody se značenými molekulami

Imunochemické metody využívají reakce antigenu s protilátkou, kdy vzniká imunokomplex antigen-protilátka. Kterákoli z těchto dvou základních složek může být označena radioaktivním, enzymovým, nebo fluorescenčním markerem, eventuálně se může připojit k částici o vysoké hmotnosti. Touto modifikací lze významně zvýšit citlivost metod. Co se týče specifity stanovení, je vždy rozhodující specifita použité protilátky. Podstatným pokrokem je používání monoklonálních protilátek, často v kombinaci dvou protilátek zaměřených na dvě vazebná místa antigenu.

Nejčastěji je užito principu kompetitivní inhibice nebo sendvičové metody. Při *kompetitivní inhibici* se jedná o stanovení antigenu, kdy o vazebná místa protilátky (zpravidla imobilizované) soutěží i označený antigen. Po oddělení komplexu se hodnotí množství značky buď v komplexu nebo v supernatantu, kde je zbytek označeného antigenu. Při *sendvičové metodě* je nutno, aby měl stanovovaný antigen dvě různá vazebná místa. V prvním kroku dojde k imobilizaci veškerého analyzovaného antigenu na přebytek neznačené protilátky, která je zakotvená na pevné fázi. V dalším kroku reaguje imobilizovaný antigen prostřednictvím druhého vazebného místa se značenou protilátkou, která je v přebytku. Volná protilátka se odstraní a intenzita značení imobilizovaného sendviče je přímo úměrná koncentraci analyzovaného antigenu.

Radioimunochemická stanovení (RIA, radioimmunoassay) používají jako značku ^{125}I (γ -zářič, poločas 60 dnů) nebo ^3H (β -zářič, poločas 12 let). Bílkoviny se značí iodací aromatických aminokyselin v prvním případě, adičními nebo výměnnými reakcemi v případě druhém. Existují zde určité ekologické problémy, proto je snaha využít pokud možno značení neradioaktivní, zejména *enzymimunochemická stanovení* (EIA, enzyme immunoassay). Zde jako značky nejlépe vyhovuje peroxidáza, alkalická fosfatáza, nebo β -galaktózidasa. Imunokomplexy jsou v tomto případě rozpustné, pro separaci je tedy nutno zařadit ještě další stupeň, a to precipitaci pomocí další protilátky s následnou centrifugací, nebo imobilizaci antigenů či protilátek na pevné fázi s následným oddělením centrifugací nebo magnetickou separací.

Při *fluoroimunochemických stanoveních* (FIA, fluorescence immunoassay) se užívá řady principů, základem kvantifikace je však vždy měření na fluorimetrech. Oblíbené je značení enzymovým markerem, který působí na fluorogenní substrát. *Chemiluminiscenční analýza* je založena na užití luminoforů, jejichž detekce je usnadněna zesilovači (např. luciferinem). Jako luminometr slouží např. scintilační počítač. Uvedené metody jsou dnes přednostně užívány pro rutinní stanovení diagnosticky významných molekul přítomných v submikrogramových množstvích v 1 l.

e) Ostatní testy plazmatických bílkovin

Uvádíme stručně některá stanovení, od kterých se sice dnes již upouští, které však jsou zajímavé z hlediska biochemie bílkovin a které v literatuře ještě bývají citovány. Všimneme si zejména glykoproteinů a zákalových sérových reakcí. *Glykoproteiny* obsahují kovalentně vázané oligosacharidy. Glycidový podíl sestává zejména z galaktózy, mannosy, galaktózaminu, glukózaminu a kys. N-acetylneuraminové. V klinické medicíně je věnována zvýšená pozornost zejména glykoproteinům s vysokým obsahem hexosaminů. Obsahují-li těchto derivátů více než 4 %, je pro ně vyhrazen název *mukoproteiny* (*seromukoid*). Při stanovení se využívá faktu, že jsou rezistentní vůči precipitaci zředěnou kyselinou chloristou. Lze je proto stanovit dostatečně citlivou metodou v supernatantu po odstředění sraženiny ostatních proteinů. Výsledky jsou vztaženy na tyrosinový standard (norma 17–24 mg tyrosinu/l). Mukoproteiny jsou zvýšeny nad normu při akutních zánětech, ale také při zhoubném bujení, zatímco při jaterních poruchách (infekce, cirrhosa) jejich koncentrace klesá.

Koloidní stabilitu séra lze testovat stupněm precipitace, která je uměle vyvolána přidáním malého množství precipitačních činidel. Víme, že tato stabilita je zajištěna zejména správným poměrem albuminu vůči globulinům. Přebytek globulinů, stejně jako nedostatek albuminů precipitaci zvyšují, což se projeví větším zákalom séra, než za normálních podmínek. Největší rozšíření doznala *thymolová zákalová reakce* (TZR), při které fyziologické hodnoty nepřesahují 4 arbitrážní jednotky. TZR byla s oblibou užívána při sledování průběhu infekční hepatitidy, kde se v akutním stadiu uplatňoval jak nadbytek γ -globulinů, tak snížená syntéza albuminu v játrech. Tuto metodu ponecháváme v našem kurzu spíše jako demonstraci vlastností bílkovin, než jako standardní vyšetřovací metodu.

Sacharidy a lipidy krevní plazmy

HLADINA GLUKÓZY V KRVÍ A JEJÍ REGULACE

Základním údajem při vyšetřování poruch metabolismu glycidů je hladina glukózy v krvi (*glykemie*). V celé krvi, která se nejčastěji analyzuje, je hladina glukózy fyziologicky poněkud nižší, než v séru (plazmě):

glykemie v krvi:	3,3- 5,5 mmol/l
glykemie v séru (plazmě):	3,6-5,6 mmol/l

V krvi arteriální a kapilární nacházíme naproti tomu vyšší hodnoty než v krvi venózní. Vzestup hladiny nad referenční hodnotu se nazývá *hyperglykemie*, pokles pod tuto hranici *hypoglykemie*. Zatímco zvýšená hladina glukózy je rizikem z hlediska dlouhodobé prognózy, náhlý pokles hladiny krevního cukru představuje akutní nebezpečí. To je dáno závislostí mozku na přívodu glukózy. Uvádí se, že z 55 mmol glukózy, přiváděné každou hodinu z jater do krevního oběhu, zhruba polovinu spotřebuje CNS. Náhlý výrazný pokles hladiny krevního cukru vede k poruše vědomí, křečím, a může vyústit v nevratné poškození mozkové tkáně.

Relativně stálá hladina glukózy je dána rovnováhou mezi jejím přívodem a zpracováním (utilizací). Zdrojem krevního cukru je jednak potrava bohatá na glycidy, jednak rozklad glykogenu, nebo glukoneogeneze z jednoduchých prekurzorů, pocházejících zejména z aminokyselin. Glukóza se spotřebovává především oxidacemi při glykolýze, dále se může přeměňovat na tuky, v anabolické situaci kondenzuje na jaterní a svalový glykogen. Při koncentracích převyšujících ledvinový práh dochází k vylučování ledvinami (*glykosurie*).

Kromě metabolické činnosti jater a extrahepatálních tkání se na *regulaci hladiny glukózy* podílí řada hormonů. Glukagon zvyšuje krevní cukr stimulací glykogenolýzy v játrech a podporou glukoneogeneze. Růstový hormon inhibuje utilizaci glukózy tím, že přednostně mobilizuje volné mastné kyseliny z tukových tkání. Glukokortikoidy zvyšují glukoneogenezu a inhibují utilizaci glukózy v extrahepatálních tkáních. Adrenalin, vylučovaný na základě stresových podnětů, zvyšuje glykogenolýzu jak v játrech, tak v nejaterních tkáních, a blokuje uvolňování insulinu. Thyroidální hormony mají do jisté míry také diabetogenní efekt. Všechny jmenované hormony tedy iniciují hyperglykémii.

Proti této mnohostranně zabezpečené schopnosti zvyšovat koncentraci krevního cukru stojí jediný hormon který má účinky opačné, tj. hladinu glukózy snižuje. Je to *insulin*, produkováný B buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu. Insulin jednak potlačuje produkci glukózy játry, jednak zvyšuje její utilizaci, a to celou řadou mechanismů. Insulin především zvyšuje průchod glukózy do buněk mobilizací glukózových přenašečů a zvyšuje její utilizaci aktivací klíčových enzymů glykolýzy (glukokinázy, fosfofruktokinázy a pyruvátkinázy). V játrech a ve svalecth podporuje tvorbu glykogenu stimulací glykogensyntasy a tlumí glykogenolýzu. Inhibuje také iniciaci glukoneogeneze. Podporuje obecně proteosyntézu, naopak potlačuje lipolýzu v tukové tkáni. Insulin působí mj. povzbudivě na proliferaci buněk, podobně jako růstové faktory, s nimiž sdílí společné rysy.

Úplavice cukrová (diabetes mellitus), její formy, sekundární hyperglykemie

Absolutní nebo relativní nedostatek inzulínu způsobuje cukrovku, *diabetes mellitus (DM)*. Jedná se relativně častou a zdravotnický závažnou metabolickou poruchu. Ve střední Evropě postihuje 3–5 % populace. Diabetes je asi v polovině případů je diagnostikována pozdě, tj. již ve stadiu komplikací. Hlavním rysem diabetu je sice porucha glycidového metabolismu s hyperglykemií a často také glykozurií, zasahuje však výrazně také do metabolismu bílkovin a tuků. Nedostatek inzulínu se obecně projevuje nedostatečnou utilizací glukózy, a to vede k mobilizaci jiných zdrojů energie, konkrétně ke zvýšenému zpracování mastných kyselin a k využití aminokyselin a glycerolu k další produkci glukózy.

Rozeznáváme dva základní typy diabetu, které se liší jednak svou etiopatogenezí, jednak průběhem a způsobem léčby. První typ, vyskytující se asi v 10 % případů, se vyznačuje nedostatečnou produkcí inzulínu a je tedy závislý na přísunu inzulínu exogenního. Nazývá se *Insulin-Dependent-DM (IDDM)*. Protože se často projevuje již v dětském věku, označuje se také jako „juvenilní“. Považuje se za autoimunní onemocnění, vyvolané infekční nebo oxidativní modifikací produkčních buněk. Je zajímavé, že 95 % nemocných jsou nositeli totožné „diabetogenní“ HLA alely. Druhý typ, postihující většinu diabetiků, nemusí mít nezbytně sníženou produkci inzulínu. U tohoto typu nacházíme často rodinný výskyt, a k rozvoji diabetu dochází až v pozdějším věku. Je znám pod pojmem *Non-Insulin-Dependent-DM (NIDDM)*. Nejčastěji se jedná o rezistenci vůči inzulínu z příčin poruchy inzulínového receptoru nebo o poruchu v přenosu inzulínového signálu do buňky. Příčinou však může být rovněž snížená odpověď B buněk pankreatu na sníženou hladinu glukózy v krvi.

Hyperglykemické stavy a stavy se sníženou snášenlivostí glukózy nemusejí být způsobeny výhradně diabetem, takže můžeme mluvit o *sekundárních hyperglykemiích*. Jsou průvodním jevem endokrinních chorob jako Cushingův syndrom, tyreotoxikóza a akromegalie, chorob pankreatu, chorob jater, setkáme se s nimi při stresujících srdečních a mozkových onemocněních a u některých infekcí. Hyperglykemie může být vyvolána i léky jako jsou thiazidová diuretika, kortikoidy, salicyláty, nebo při podávání kontraceptiv. Diabetes těhotných matek, který je rizikem pro vývoj plodu, je nutno odlišit od snížené tolerance glukózy ve druhé polovině těhotenství, kdy fyziologicky dochází ke zvýšené produkci kontraregulačních hormonů, což zvyšuje zásobení plodu glukózou. Mimoto může v těhotenství dojít ke glykozurii následkem zvýšené ledvinové filtrace, při které se snadno překročí rezorpční kapacita tubulů.

Časně a pozdní komplikace diabetu

Vzestup hladiny krevní glukózy může vyústit až v *hyperglykemické koma*. Jde o vystupňování patobiochemických mechanismů, příznačných pro diabetes, přesahující kompenzační možnosti diabetika. Absolutní nebo relativní nedostatek inzulínu je prohlouben vlivem stresujícího faktoru jako je interkurentní onemocnění, operace, atd. Disponuje k němu hlavně typ I, ale může se občas vyskytnout i u typu II. Hyperglykemie má za následek glykozurii s osmotickou diurézou. Tím se ztrácí voda s důležitými elektrolyty jako je K^+ , vyplavený z buněk, Na^+ a fosfáty. Následná dehydratace a hypovolemie vede k centralizaci oběhu a vzniku šokového stavu, provázeného laktátovou acidózou. V buňkách je nedostatek glukózy, energie se získává přednostně štěpením mastných kyselin. Tento stav má za následek hromadění kyselých ketolátek, což dále prohlubuje laktátovou acidózu („*koma s ketoacidózou*“). Je třeba si uvědomit, že při běžném vyšetření ketolátek detegujeme pouze acetoacetát a aceton, β -hydroxymáselná kyselina detekci uniká. Přitom za této situace mnohonásobně převyšuje koncentraci stanovovaných analytů. Tento nepoměr, odpovídající redukčnímu prostředí buněk, je přechodný. S úpravou stavu se β -hydroxymáselná kyselina oxiduje zpět na kys. acetoctovou, což může vyvolat mylný dojem zhoršení ketoacidózy.

Zvýšený katabolismus bílkovin provázený glukoneogenezí vede ke ztrátám dusíku moči, tj. *negativní dusíkaté bilanci*. Snížená perfuze ledvin z hypovolemie může v pokročilých stádiích ještě zhoršovat acidózu. Vyplavené kontraregulační hormony (STH, glukagon, kortizol, katecholaminy) dále stimulují glukoneogenezi a lipolýzu. Acidóza je zčásti kompenzována hyperventilací, vědomí je zastřeno. Vzácněji se vyskytuje

hyperosmolární koma bez acidózy, v popředí je hyperglykemie a dehydratace nemocného s hyperosmolárními tělesnými tekutinami. Přes pokroky v léčbě je diabetické koma stále potenciálně letální příhodou. Při terapii acidotického komatu je třeba jen zdrženlivě rehydratovat pro hrozbu edému mozku, a opatrně nahrazovat K^+ navracející se do buněk z ECT. Je nutno pečlivě kontrolovat pH krve vzhledem k hroziící alkalose z nadbytku hydrogenuhličitanu nahrazujícího metabolizované anionty kyselin.

Hypoglykemické koma nastává nejen při předávkování insulinu, ale i při podání běžné dávky nenásledované odpovídajícím příjmem potravy, či při zvýšené utilizaci glukózy následkem nadměrné fyzické námahy. Nástup příznaků je tím dramatičtější, čím rychleji klesá glykemie. Klinický obraz je dotvářen vyplavením adrenalinu v reakci na hypoglykémii (pocení) a nedostatečný přívod glukózy do mozku (poruchy vědomí až koma).

Pozdní diabetické komplikace zahrnují především postižení velkých a malých cév. Postižení velkých cév (*diabetická makroangiopatie*) v podstatě odpovídá ateroskleróze postižených osob bez diabetu. Je urychlena poruchou lipidového metabolismu, typickou pro cukrovku. Snížená utilizace glukózy vede k mobilizaci mastných kyselin a jejich metabolickému zpracování. Neesterifikované mastné kyseliny jsou zčásti využity k resyntéze triacylglycerolů, přebytek acetyl-KoA je přes β -hydroxymethylglutaryl-KoA vestaven do cholesterolu. Výsledkem je hyperlipoproteinemie (viz předchozí kapitola). Jedním z hlavních patogenetických mechanismů pozdních diabetických komplikací jsou *glykace proteinů* jako následek chronické hyperglykemie. Zatímco bílkoviny s krátkým poločasem jsou postupně odbourávány, bílkoviny s dlouhým poločasem podléhají změnám, které postupně postihují jejich funkce. Dochází i k příčným vazbám mezi sousedními bílkoviny, což omezuje jejich posuny. K bílkovinám s dlouhým poločasem patří např. bílkoviny cévního endotelu, jejichž postižení vyvolává *diabetickou mikroangiopatii*. Porušení proteinů sítnice způsobuje *diabetickou retinopatii*, která může vést až ke slepotě, glykace myelinových vrstev *polyneuritidu*, modifikace glomerulární membrány spěje k *diabetické glomeruloskleróze*. K rozvoji těchto změn přispívají oxidativní poškození volnými radikály, takže mluvíme o *glykooxidaci*. Glukóza může být rovněž redukována aldosovými reduktázami na sorbitol (glucitol), který způsobuje nežádoucí osmotické jevy, čímž se vysvětluje např. zákal čočky (*diabetická katarakta*).

KONGENITÁLNÍ GALAKTOSEMIE

Příčinou vrozené galaktosemie je nejčastěji defekt enzymu *galaktóza-1-P-uridylyltransferázy*. Postižený jedinec není schopen přeměňovat galaktózu na glukózu, v krvi se hromadí galaktóza-1-fosfát. Sekundárně je postižen i metabolismus glukózy, gal-1-P inhibuje totiž fosfoglukomutasu, enzym nezbytný pro využití glukózy z glykogenu. Průvodním jevem je tedy vedle galaktozurie i hypoglykemie po podání galaktózy nebo laktózy. Na galaktózu v moči nás upozorní pozitivita redukčních testů při současné negativitě glukózooxidázové reakce (viz indikátorové papírky na stanovení glukózy).

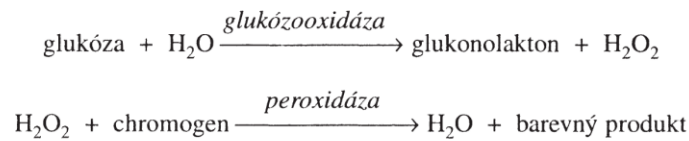
Uvedená patogenese se uplatňuje hlavně u novorozenců a u malých dětí, dospělí díky své dokonalejší enzymové výbavě mohou enzymový blok částečně obejít. V ranném dětství je proto vysoké riziko průvodních orgánových poruch a zpomalení tělesného a duševního vývoje. Chorobu je třeba diagnostikovat co nejdříve, aby bylo možno zahájit bezgalaktózovou dietu. Chybění tohoto cukru v potravě nikterak neohrožuje růst a vývoj těchto dětí, neboť UDP-galaktóza se vytváří epimerázovou reakcí z glukózy.

Galaktosemii může způsobit i chybění enzymu *galaktokinázy*. V tomto, méně častém případě, se v organismu hromadí galaktóza a zejména její redukovaný produkt, galaktitol. Galaktitol nemůže být dále metabolisován ani vyloučen. Pokládá se za příčinu zákalu čočky z dehydratace proteoglykanů.

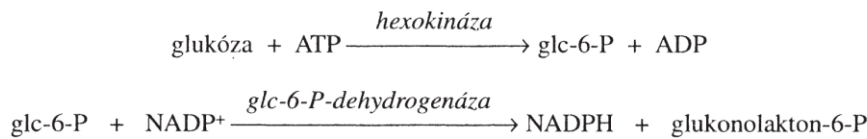
LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ U PORUCH GLYCIDOVÉHO METABOLISMU

Základním vyšetřením, které musí být vždy pohotově, je stanovení *glykemie*. Existuje celá škála metod a přístrojů na stanovení krevního cukru. Zde se omezíme jen na základní biochemické principy měření. Poté, co byly oxidoredukční metody opuštěny jako zdlouhavé a nepřesné, a barevné reakce jako nevhodné z toxi-

kologického hlediska, zůstávají metodou volby testy enzymové. Nejrozšířenější je reakce *glukózooxidázová*. Glukóza je přítom oxidována na glukonolakton a vznikající peroxid vodíku reaguje v přítomnosti peroxidázy se vhodným chromogenem:



Na tomto principu jsou založeny i indikátorové papírky určené k analýze moči. Jak již bylo naznačeno, v případě galaktózie je výsledek negativní. Z tohoto hlediska oxidoredukční reakce typu Fehlingova nebo Benediktova mají stále své opodstatnění. Další možnou enzymovou reakcí je *hexokinázová reakce*:



Hexokinázovou reakci je možno vyhodnocovat přímo v UV oblasti, na základě Warburgova optického testu. Přímé měření poskytují biosenzory se zakotvenými enzymy.

Pokud jednorázová glykemie celé kapilární krve přesáhne 7 mmol/l (u séra 8 mmol/l), a jsou přítomny známky diabetu (polyurie, polydipsie, ketonurie, úbytek hmotnosti), považuje se to za potvrzení diagnózy. Pokud se naměří tyto hodnoty nejméně dvakrát, byť bez klinických příznaků, je závěr stejný. V případě hodnot mezi referenční hranicí a zmíněným limitem, tj. 6–7 mmol/l, je na místě *orální glukózový toleranční test (oGTT)*. Toto vyšetření má zjistit, jak je pacient schopen vyrovnat hladinu krevní glukózy po zátěži standardní dávkou 75 g hroznového cukru per os v daném časovém úseku. Orální cesta umožňuje zapojení gastrointestinálních hormonálních regulací, zejména glukagonu střevní stěny. Napodobuje vlastně reakci organismu na přívod glycidů potravou ve standardních podmínkách. Odráží se v něm nejen stav inzulárního aparátu a antiinsulinových hormonů, ale také rychlost vyprázdnění žaludku, pasáž střevem, schopnost resorpce a stav jaterních funkcí. Vyšetření se provádí na lačno, glukóza se podává ve 300 ml vody, krev se odebírá bezprostředně před příjmem cukru a za 2 hodiny po jeho podání.

oGTT u kapilární plné krve (mmol/l):

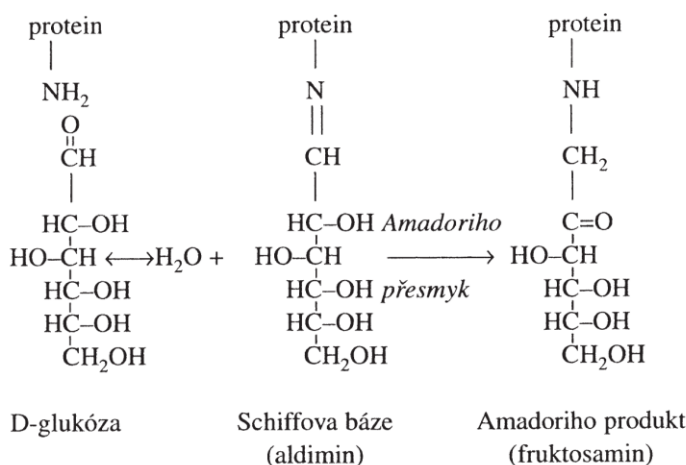
<i>porušená glukózová tolerance</i>	za 2 h 7,8–11,0
<i>diabetes mellitus</i>	> 11,0

U většiny zdravých jedinců se po počátečním mírném vzestupu vrací glykemie do 2 h na normální hodnoty. Jak vyplývá z předchozí tabulky, snížená schopnost zvládnout zátěž glukózou u diabetiků se projevuje neschopností návratu k výchozí hladině za 2 h od začátku testu. Mezi těmito hodnotami a hodnotami fyziologickými leží oblast tzv. *snížené glukózové tolerance*. V názorech na indikaci testu a jeho hodnocení nejsou diabetologové zcela jednotni, v poslední době se připouští mírně zvýšené hodnoty glykemie na lačno, což částečně odpovídá pojmu porušená glukózová tolerance. Glukóza se objevuje v moči, je-li překročen renální práh, normálně odhadovaný na 10 mmol/l, po dobu 15 min. Tam, kde je individuálně snížen, proniká glukóza do moči již při normálních hodnotách glykemie (*renální diabetes*). Naopak u starých diabetiků s glomerulosklerózou dochází ke glykosurii při hodnotách daleko vyšších než 10 mmol/l.

Modifikací oGTT je *intravenosní glukózový toleranční test*, prováděný ve speciálních případech, a *farmakokinetický test*, hodnotící ze sedmibodové křivky získané během 3 hodin další parametry jako je vstřebávání glukózy, pronikání glukózy do buněk a její eliminace. Při rozhodování o způsobu insulinové léčby se sleduje tzv. *glykemický profil*, který spočívá v opakovaném měření glykemie během dne, na lačno i po jídlech. Kompenzaci diabetu je možno zhodnotit *glykemickým indexem (GCI)*, vypočítávaného z 9 odběrů provedených ve standardních časech během 24 h.

Nyní se zmíníme o metodách, kterými se hodnotí průběh diabetu, včetně úspěšnosti jeho léčby. Jedná se především o stanovení, která využívají spontánních chemických reakcí glukózy s proteiny. Z posuzování *glykace proteinů* se postupně stala cenná metoda, pomocí které je možno získat představu o průměrných hodnotách glykemie v předchozích týdnech. Glykovaný protein vzniká neenzymovou reakcí mezi glukózou a volnou aminoskupinou proteinu (zejména u lizinového zbytku). Rychlost tohoto procesu je funkcí koncentrace reagujících složek, tedy především glukózy. Glykace probíhá ve dvou stupních. První je vznik labilní Schiffovy báze (aldiminu), což je reakce reverzibilní, produkt se po snížení glykemie může hydrolyzovat. Ve druhém stupni, který se nazývá Amadoriho přesmykem, se vazba stabilizuje (viz schéma). Přitom vzniká ketoskupina na druhém uhlíku cukru, což je charakteristické pro fruktosu. Vzniká tedy fruktosamin, který můžeme kvantitativně stanovit na základě redukce nitrotetrazoliové modři na modrý formazan.

Schéma glykace bílkovin:



Jednou glykovaný protein zůstává v séru po celé období své existence. Ukázalo se, že nejvýhodnější je stanovení *glykovaného albuminu* a *glykovaného hemoglobinu*. Albumin má poločas degradace asi 19 dnů, takže podle koncentrace fruktosaminu v séru lze odhadnout hodnotu glykemie za poslední 2–3 týdny. Normální hodnoty nepřesahují 285 $\mu\text{mol/l}$. Hemoglobin v erythrocytech podléhá rovněž neenzymové glykaci, při čemž vznikají tři produkty, z nichž pouze jeden je dostatečně stabilní, aby mohl být spolehlivým měřítkem glykemie v uplynulých 6–8 týdnech. Označuje se HbA_{1c} , a podle užití metody se stanovuje buď elektroforeticky, sloupcovou chromatografií, nebo pomocí specifické monoklonální protilátky. Referenční rozmezí pro tuto frakci je 4,3–5,7 % celkového hemoglobinu. Kompenzace diabetu do hodnoty 8 % je dobrá, hodnoty nad tuto hranici jsou neuspokojivé a vyžadují zahájení léčby nebo přehodnocení dosavadního léčebného režimu.

Způsob léčby diabetu by měl odpovídat jeho kategorii. Jak bylo zmíněno v ýše, rozhodující pro zařazení do jednotlivých typů je zejména intenzita produkce insulinu a dále stupeň resistance vůči tomuto hormonu. Ve sporných případech je na místě přímé stanovení hladiny insulinu nebo jeho produkce v pankreatu za standardních podmínek. Ukázalo se, že u *přímého stanovení insulinu* má největší informační cenu vyšetření po zátěži glukózou, např. při oGTT. Tak se vyloučí interference s exogenním insulinem, vliv protilátek, atd. U typu I je hladina snižovaná, opožděná reakce s hypersekrecí inklinuje k diabetu druhého typu. Jedná se tedy

o projev insulinové rezistence, který spolu s dalšími klinickými příznaky je významným rizikovým faktorem pro rozvoj aterosklerózy.

Hladina přímo stanoveného insulinu neodpovídá jeho endogenní produkci, protože velká část je po sekreci z B buněk pankreatu vycytována v játrech (50–60 %). Játra však propouštějí část původního polypeptidu, proinsulinu, v množství odpovídajícím skutečné produkci. Tento 31 členný úsek se nazývá „*spojující (connecting) peptid*“, krátce *C-peptid*, protože v proinsulinu spojuje řetězce A a B definitivního insulinu do souvislého polypeptidu. Stanovuje se imunochemicky, a jeho hladina v periferní krvi je mírou skutečné sekrece insulinu, injekčně podaný insulin C-peptid neobsahuje. Toto vyšetření dovoluje posoudit i funkci transplantační slinivky břišní, event. úplnost pankreatektomie. Referenční hodnoty jsou 0,9–3,5 µg/l.

Pro posouzení inzulinové rezistence je nejuzávanější metodou stanovení množství glukózy, které ještě nevede k hyperglykemii při uměle udržované koncentraci exogenního insulinu tzv. *clampovou technikou*. Čím menší množství glukózy naruší euglykemii, tím je insulinová rezistence pacienta závažnější. Autoimunní složku u diabetu prvního typu (IDDM) můžeme posoudit *stanovením protilátek* proti Langerhansovým ostrůvkům nebo proti enzymu glutamátdekarboxylase. Protilátky se mohou objevit ještě před vypuknutím diabetu. Zjištění protilátek proti zvířecímu insulinu je indikace k převedení pacienta na lidský insulin. Jednou z obávaných komplikací diabetu je poškození ledvin glomerulární sklerózou. Možnost kontrolovat počáteční fáze poškození dává citlivé stanovení albuminu v moči v koncentracích nezjistitelných běžnými papírkovými testy (citlivost od 150 mg/l). Stanovení tzv. *mikroalbuminurie* je vlastně zachycení koncentrací mezi fyziologickou albuminurií zhruba 30 mg/l a běžně stanovovanou hranicí 150 mg/l.

CHARAKTERISTIKA SÉROVÝCH LIPOPROTEINŮ

Důležité nepolární lipidy krevní plazmy, tj. estery cholesterolu a triacylglyceroly mohou být sice chemicky stanovovány jako ucelené plazmatické frakce, jsou však ve vodě nerozpustné, a proto v krvi nemohou existovat jako samostatné molekuly. Jejich transport ve vodním prostředí je umožněn teprve vestavěním do komplexních částic sférického tvaru s hydrofobním jádrem a hydrofilním povrchem, zvaných *lipoproteiny (LP)*. Biologickou funkcí lipoproteinů je tedy přenos ve vodě nerozpustných tuků vodním prostředím tělesných tekutin do tkání, které je potřebují ke splnění svých metabolických nároků, a současně odběr od těch tkání a buněk, které je nejsou schopny samy katabolizovat.

Jak název napovídá, konstantní stavební součástí, a podle dnešních znalostí i rozhodujícím faktorem při vytváření lipoproteinových částic, jsou bílkoviny. Je pro ně vyhrazen speciální termín *apolipoproteiny*, zkráceně *apoproteiny*. Apoproteiny spolu s polárnějšími tuky, jako jsou fosfolipidy a volný cholesterol, tvoří obal LP, uvnitř pak jsou lokalizovány vysoce hydrofobní triacylglyceroly a estery cholesterolu. Apoproteiny se účastní nejen výstavby lipoproteinových částic, ale zajišťují také aktivaci enzymů metabolismu LP a reagují s buněčnými receptory, které umožňují vstup LP do buněk. Na schématu je patrné, že periferní apoproteiny na rozdíl od integrálních jsou volně připojeny na povrch částice, což usnadňuje jejich přesun z jednoho LP na druhý. To je skutečně jedním z hlavních principů interakcí mezi LP třídami. Apolipoproteiny jsou velmi heterogenní skupinou proteinů, rozčleněných do tříd, označovaných velkými písmeny jako apo A, apo B atd. Ke členění uvnitř třídy se používají římské číslovky, např. apo A I, apo A II atd.

Plazmatické lipoproteiny je možno rozdělit do čtyř hlavních rodin, zahrnujících *chylomikrony (CHM)*, *velmi lehké lipoproteiny (Very Low Density LP, VLDL)*, *lehké lipoproteiny (Low Density LP, LDL)* a *těžké lipoproteiny (High Density LP, HDL)*. Mimoto se v plazmě vyskytují sekundární produkty těchto částic, jak bude rozvedeno v dalším textu. Každá rodina obsahuje široké spektrum částic s podobným složením a podobnými metabolickými funkcemi. Tyto rodiny je možno separovat na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností, jako je hustota nebo schopnost migrace v elektrickém poli. Hustota (denzita) lipoproteinů je určena poměrem proteinů k lipidům v rámci té které částice. Nejlehčí lipoproteiny obsahují nejmenší procentuální podíl proteinů, se vzrůstem proteinového zastoupení roste i hydratační denzita.

Nejlehčí lipoproteiny jsou také objemově největší a obsahují nejvyšší množství triacylglycerolů (chylomikrony, VLDL). V krvi se chylomikra objeví po požití tučné potravy a projeví se makroskopicky mléčným

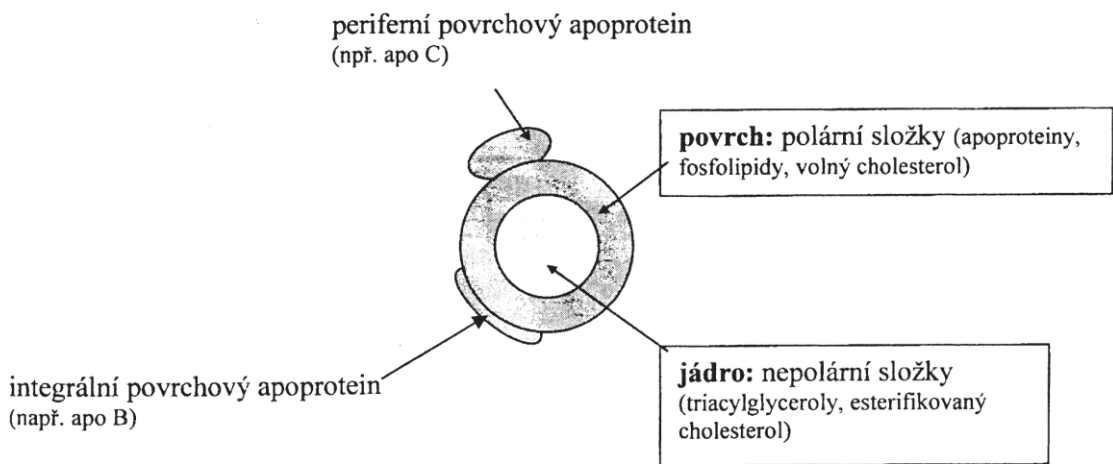
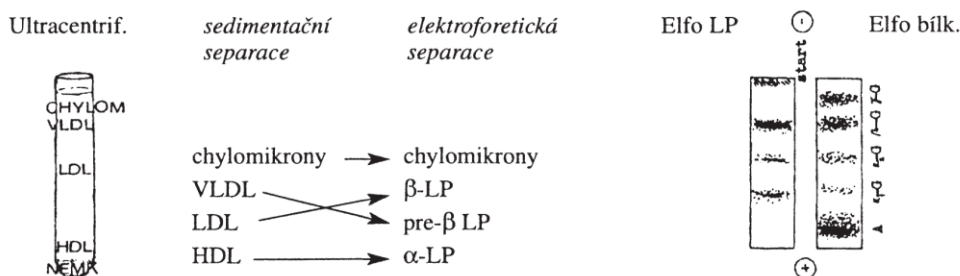


Schéma stavby lipoproteinové částice

(„chylózním“) zakalením séra, zatímco VLDL ve větším množství způsobí pouze opalescenci séra. Naproti tomu HDL, nejtěžší lipoproteiny, jsou také nejmenší a obsahují více fosfolipidů a apoproteinů než kterékoli jiné LP. Co se týče transportu *volných (neesterifikovaných) mastných kyselin*, jsou přenášeny ve vazbě na molekuly albuminu krevní plazmy, takže při fyzikálních analýzách sledují albumin.

Pro separaci lipoproteinů na základě hustoty je možno užít *ultracentrifugace*, při které se LP rozřadí podle rychlosti, jakou vzlínají k povrchu zředěného roztoku NaCl. Tato metoda je ale vyhrazena spíše pro výzkumnou práci. Pro rutinní analýzu je metodou volby *elektroforetické rozdělení*, obdobné dělení plazmatických proteinů, pouze s rozdílnou metodou barvení. Rychlost migrace při elektroforéze LP je úměrná rychlosti sedimentace (a je opakem rychlosti flotace) s výjimkou středních frakcí. Elektroforetické pořadí je znázorněno na obrázku, spolu s lokalizací základních bílkovinných frakcí. Nejrychleji se pohybuje frakce α -lipoproteinů (odpovídá frakci HDL), v oblasti zhruba α_2 -globulinů se nachází tzv. *pre- β* frakce (odpovídá VLDL), ještě pomalejší jsou β -lipoproteiny (LDL). V případě, že sérum obsahuje chylomikra (u zdravých jedinců by se však na lačno neměly vyskytovat), setrvávají na místě startu. Po stránce kvantitativní převládají β -LP (asi 50 % veškerých LP), α -LP a *pre- β* -LP frakce jsou přítomny zhruba v polovičních množstvích.

Jak demonstruje tabulka složení lipoproteinových částic, procentuální podíl proteinů vzrůstá od CHM k HDL, tj. nepřímo úměrně rozměrům komplexů. Nejbohatší na triacylglyceroly jsou frakce chylomikronů a VLDL, nejvíce cholesterolu je ve frakci LDL. Nezanedbatelný podíl cholesterolu však obsahují i HDL, a z kvantitativního hlediska je významný i přísun cholesterolu z potravy prostřednictvím chylomikronů. Z tabulky a z proporcí apoproteinů uvnitř jednotlivých tříd (zde neuvedeno) lze odvodit, že stanovení apo B-100 je obrazem zejména množství LDL, zatímco apo A-I kvantitativně charakterizuje HDL frakci.



Porovnání dělení lipoproteinů ultracentrifugací a elektroforézou

Do výčtu biomedicínsky důležitých lipoproteinů je třeba zahrnout také *lipoprotein (a)*. Je nacházen v různé koncentraci v plazmě a je zjištěno, že při jeho zvýšení nad 0,3 g/l stoupe více než dvojnásobně výskyt kardiovaskulárních onemocnění. Tento rizikový faktor je nezávislý na jiných hyperlipoproteinemiích. Na elektroforéze je hybností nejbližší pre-β LP („sinking pre-β“), tj. VLDL, svou velikostí však odpovídá spíše LDL částicím. Jeho proteinová součást je zajímavá: obsahuje apo B-100 disulfidicky vázaný na protein podobný plasminogenu. Tento fakt naznačuje i patologický mechanismus jeho působení. Předpokládá se, že brání vazbě plasminogenu na monomery fibrinu a vyvazuje aktivátor plasminogenu, takže narušuje koagulační rovnováhu ve smyslu zvýšené tvorby krevních sraženin.

Charakteristika lipoproteinů krevního séra

třída:	<i>CHM</i>	<i>VLDL</i>	<i>LDL</i>	<i>HDL</i>
elfo mobilita:	<i>start</i>	<i>pre-β</i>	β	α
velikost (nm):	10^2-10^4	30–70	15–70	7,5–10,0
složení (%):				
<i>PROTEINY</i>	1	10	22	50
<i>FOSFOLIPIDY</i>	4	15	23	30
<i>CHOLESTEROL</i>	5	15	45	18
<i>TRIACYLGLYCEROLY</i>	90	60	10	2
hlavní apolipoproteiny:	apo A apo B apo C I–III apo E		apo B-100	apo A I apo A II apo C II apo D apo E

METABOLISMUS LIPOPROTEINŮ

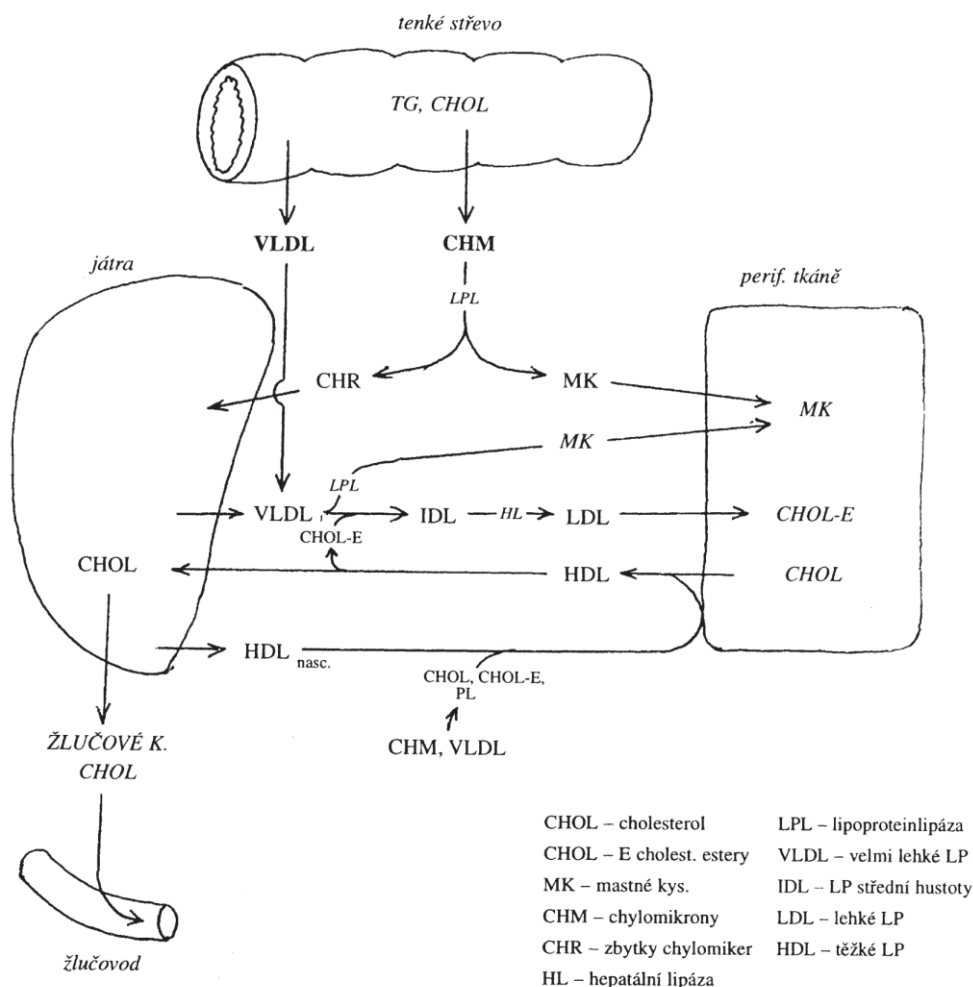
Chylomikrony (CHM) vznikají v intestinálních epiteliálních buňkách po požití tuků v rekonstitučním procesu, při kterém jsou delší mastné kyseliny uvolněné trávicími enzymy reesterifikovány na triacylglyceroly, připojen cholesterol, apoproteiny, a kompletní částice jsou exocytosou transportovány do lymfy. Ačkoli cholesterol přispívá k hmotnosti částice jen nepatrnou měrou (5 %), jedná se o hlavní cestu, kterou je přijímán do těla. V krvi jsou chylomikra obohacována o další apoproteiny, zejména apo C II, apo E, a to přenosem z HDL. Apo C II aktivuje *lipoproteinlipázu*, enzym zakotvený na endothel kapilár, který hydrolyzuje triacylglyceridový podíl na volné mastné kyseliny (NEMK). Zajímavý úkaz vyčerení séra po podání heparinu je způsoben vytěsněním lipázy z vazby na kapilární stěnu, kam se připojuje prostřednictvím heparansulfátu. Lipáza se tak uvolní do krevního oběhu a masivně hydrolyzuje TG lipoproteinů. Chylomikrony jsou za normálních okolností poměrně rychle odbourávány (poločas asi 30 min.), plazma se vyčereje, a neesterifikované mastné kyseliny jsou odebírány tkáněmi pro energetické zpracování (svaly), biosyntézu triacylglycerolů (játra, tuková tkáň), v případě některých nenasycených mastných kyselin pro syntézu eikosanoidů, atd.

Po odbourání většiny triacylglyceridového podílu částice disociují z vazby na lipoproteinlipázu jako *chylomikronové zbytky (chylomicron remnants, CHR)*. Tyto pak jsou rychle odstraněny z cirkulace jaterními buňkami prostřednictvím povrchových receptorů pro apo E.

Velmi lehké lipoproteiny, VLDL, jsou produkovány především játry, ale také střevní sliznicí, jako částice obsahující velké množství triacylglycerolů (TG), z apoproteinů pak zejména apo B-100 a apo C, zčásti přenesuté z HDL. Obdobně jako chylomikrony, také VLDL reagují s lipoproteinlipázou kapilárních stěn za odbourání podstatného podílu TG. Kromě toho přejímají od HDL estery cholesterolu výměnou za TG. Zmen-

šeným částicím se říká *lipoproteiny střední hustoty (intermediate density lipoproteins, IDL, VLDL remnants)*. Mohou mít dvojí osud. Většina je po vychytání játry kompletně metabolizována – což je jednou z možných forem přesunu cholesterolu do jater, značný podíl je však jaterní lipázou zbaven dalších triacylglycerolů a tím přeměněn na částice další kategorie, tj. lehké lipoproteiny, LDL.

Hlavní úlohou *lehkých lipoproteinů (LDL)* je zásobovat tkáň cholesterolem. Cholesterol je pro všechny buňky zcela nezbytný. Většinou jsou schopny jeho syntézy z acetyl-KoA. Pokud odebírají lipoproteinový cholesterol, děje se tak prostřednictvím buněčných receptorů, které reagují s *apo B-100* na povrchu LDL. Apo B-100 je kompletní polypeptidový produkt genu pro apo B, produkovaný jaterními buňkami, a jako takový reaguje s receptorem, na rozdíl od zkrácené varianty apo B-48, produkované ve stěvné stěně a zabudované do CHM. Podle typu tkáň a momentálních potřeb je cholesterol využit na výstavbu membrán nebo produkci steroidních hormonů (ovaria, testes, nadledvinky), případně vyloučen v podobě žlučových kyselin (játra). Ukázalo se, že vysoká koncentrace LDL, jmenovitě vysokodenzitní frakce LDL₃, koreluje se zvýšeným výskytem koronární aterosklerózy. Pokud buňka odebrala adekvátní množství externího cholesterolu, dochází za normálních okolností k omezení vlastní buněčné syntézy. Děje se tak především snížením aktivity klíčového enzymu biosyntézy, *hydroxymethylglutaryl-KoA-reduktázy*, dále je omezena produkce *receptorových bílkovin*, a konečně je zvýšena aktivita *acyl-KoA:cholesterol-acyltransferázy*. Posledně jmenovaný enzym esterifikuje přebytek cholesterolu do zásobní formy.



Zjednodušené schéma transportu lipidů (podrobnosti v textu)

Kromě přísunu cholesterolu buňkám musí být zajištěn také odsun nadbytečného cholesterolu, protože naše buňky nejsou schopny odbourat steranové jádro. Cholesterol jsou schopny vyloučit pouze jaterní buňky. Cholesterol je odstraňován jen z menší části jako takový, hlavní odpadní formou tvoří žlučové kyseliny. Přesun cholesterolu do této „konečné stanice“, tj. reverzní transport, mají za úkol *těžké lipoproteiny, HDL*. Nově vytvořené HDL („nascent HDL“) jsou produkovány játry, částečně také střevní sliznicí, a to jako diskovité útvary, které teprve po odběru cholesterolu z buněčných membrán, eventuálně z lehčích LP, a po jeho esterifikaci nabývají sférického tvaru. Esterifikace, která je velmi důležitá pro další osud cholesterolu, je umožněna dalším klíčovým enzymem lipidového metabolismu, *lecitin:cholesterol-acyltransferázou (LCAT)*. Aktivátorem tohoto plazmatického enzymu je apo A I. LCAT esterifikuje cholesterol na povrchu disku, přenášejíc mastnou kyselinu z polohy 2 lecitinu (fosfatidylcholinu). Tím se cholesterol stává nepolární a putuje do středu částice. Rozlišuje se několik klinicky významných subfrakcí zralých HDL. Cholesterol z HDL může být odebrán játry přímo, ale může být předán i jiným LP. Jsou-li těmito akceptory zbytky chylomiker (CHR), putuje cholesterol rovněž do jater. V případě IDL je možný jak transfer do jater, tak do různých tkání ve formě LDL. Z toho je patrné, že reverzní transport cholesterolu do jater za pomoci HDL nemusí být přímý, ale může zahrnovat také lipoproteiny jiné třídy nebo buňky nejaterního původu. V protikladu k LDL je koncentrace HDL v plazmě, a to zejména subfrakce HDL₂, nepřímo úměrná výskytu koronární aterosklerózy.

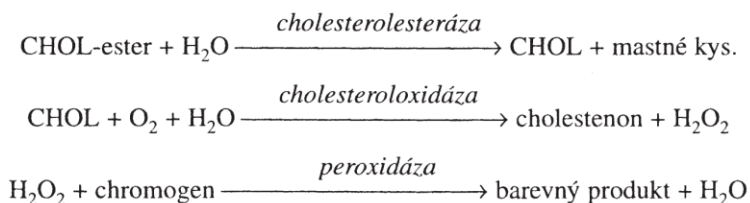
Pokud bychom měli na závěr zhodnotit hlavní funkce jednotlivých kategorií lipo-proteinů, je možno uvést, že (1) chylomikra a VLDL jsou zdrojem energeticky bohatých mastných kyselin, včetně esenciálních; (2) LDL poskytují cholesterol, což je důležité zejména pro buňky, které si jej samy nevytvářejí; (3) HDL regulují přesuny a vylučování cholesterolu a katabolismus lipoproteinů s vysokým obsahem triacylglycerolů poskytovaním apoproteinů (C, E).

LABORATORNÍ STANOVENÍ SLOŽEK LIPOPROTEINŮ

<i>složka</i>	<i>muži</i>	<i>ženy (před menopausou)</i>
<i>CHOLESTEROL (celkový)</i>	< 5 mmol/l	
<i>LDL cholesterol</i>	< 3 mmol/l	
<i>HDL cholesterol</i>	> 1 mmol/l	> 1,2 mmol/l
<i>TRIACYLGLYCEROLY</i>	0,9–1,7 mmol/l	
<i>NEESTERIFIKOVANÉ MK (NEMK)</i>	0,1–0,6 mmol/l	
<i>Apolipoprotein A-I</i>	> 1,4 g/l	> 1,6 g/l
<i>Apolipoprotein B</i>	< 0,9 g/l	
<i>Apo A-I / Apo B</i>	> 1,5	> 1,7
<i>Lipoprotein (a)</i>	< 0,3 g/l	

Vyšetření lipidového metabolismu patří mezi nejžádanější laboratorní testy vzhledem ke klíčové roli, kterou lipidy hrají v patogenezi aterosklerotických cévních onemocnění, především u ischemické choroby srdeční. Mezi základní stanovení patří hladina celkového cholesterolu a triacylglycerolů. Ve zdůvodněných případech se určuje distribuce cholesterolu mezi HDL a LDL, event. se stanoví hlavní apoproteiny těchto lipoproteinů. V rámci pátrání po dalších rizikových faktorech pro rozvoj aterosklerózy je možno stanovit i LP(a). Hladina NEMK se vztahuje spíše k metabolickým situacím, které jsou provázeny zvýšenou užitím triacylglycerolů.

Stanovení *cholesterolu (CHOL)* je zahájeno hydrolyzou jeho esterů, tj. formy, ve které se většina CHOL v plazmě nachází. Kvantitativní analytické metody dnes využívají specifických enzymových reakcí. Celosvětově je rozšířeno zejména použití následující trojice enzymů: cholestrolesterázy, cholesteroloxidázy a peroxidázy, účinkujících podle rovnic:



Zvýšení celkového cholesterolu je jedním z nejznámějších a zároveň nejzávažnějších rizikových faktorů rozvoje aterosklerózy. U osob středního věku by se hladina měla pohybovat v rozmezí 3,8–5,2 mmol/l. Zvýšení na 6,5 mmol/l již zdvojnásobuje riziko, při ještě dalším vzestupu roste riziko exponenciálně. Je však třeba dodat, že řada pacientů se srdečním infarktem má hodnotu cholesterolu uvnitř referenčního rozmezí. Je tedy zřejmé, že v těchto případech musíme hodnotit i distribuci cholesterolu v jednotlivých lipoproteinech.

HDL cholesterol v krevním séru je možno stanovit stejnou analytickou metodikou, po odstředění ostatních CHOL obsahujících frakcí precipitovaných fosfowolframovou kyselinou s hořečnatými ionty. Co se týče *LDL cholesterolu*, je možno kromě přímé metody stanovení použít i následující výpočet pomocí *Friedewaldovy formule*:

$$\text{CHOL}_{\text{LDL}} = \text{CHOL}_{\text{celk.}} - (\text{CHOL}_{\text{HDL}} + 0,457 \text{ TG})$$

Index u sérové hodnoty triacylglycerolů (TG) je zdůvodněn přítomností CHOL ve frakci VLDL (viz tabulku složení lipoproteinů). Tuto rovnici nelze použít při vzestupu TG nad 4,5 mmol/l.

Poměr mezi „*ne-HDL*“ a HDL cholesterolem lze vyjádřit jako tzv. *aterogenní index (AI)*. Při jeho vzestupu nad hranici zhruba 3 se zvyšuje nebezpečí výskytu aterosklerotických komplikací.

$$\text{AI} = \frac{\text{CHOL}_{\text{celk.}} - \text{CHOL}_{\text{HDL}}}{\text{CHOL}_{\text{HDL}}}$$

Zjištění koncentrace hlavních *apoproteinů* je nákladnější, provádí se imunochemickými metodami. Jeho výhodou je však přesnější určení molární koncentrace klíčových LP. *Apo A-I* je ukazatelem množství HDL, *Apo B-100* je měřítkem LDL frakce. Oba apoproteiny se vyskytují v poměru jedné molekuly na LP částici, nemůže tedy dojít ke zkreslení kolísavým podílem lipidických složek. Zvýraznění změn z hlediska apoproteinů se docílí stanovením *poměru Apo A-I / Apo B-100*. Tento podíl by měl dosahovat alespoň 1,5 u mužů a 1,7 u žen fertilního věku.

Stanovení *triacylglycerolů (TG)* je rovněž několikastupňový proces. Jako v případě cholesterolu je zahájen hydrolyzou esterových vazeb, a to buď zmýdelněním, nebo pomocí lipázy. Při vlastním stanovení je dnes dáována přednost enzymovým metodám. Jako příklad je možno uvést kombinaci glycerolkinázy a glycerolfosfát oxidázy s peroxidázovým zakončením. Alternativní metodou je chemická modifikace glycerolu s následnou barevnou reakcí. Vyžaduje však extrakci TG do organického rozpouštědla. Referenčním rozmezím pro triacylglyceroly je 0,9–1,7 mmol/l. Při hodnocení se přihlíží k pohlaví a věku, zvýšené hladiny se nacházejí u mnoha pacientů s ischemickou srdeční chorobou.

Neesterifikované mastné kyseliny (NEMK) patří rovněž k lipidickým frakcím. Ke zvýšené hladině, tj. nad 0,6 mmol/l přispívá rychlejší odbourávání tukových zásob při hladovění, cukrovce, po vyplavení adrenalinu. Pokles jejich hladiny může být vyvolán přísunem glukózy nebo insulinem. Ke stanovení se využívá prevence na měďnatá mýdla s následným stanovením mědi barevnou reakcí.

HYPERLIPOPROTEINEMIE A OSTATNÍ RIZIKOVÉ FAKTORY SE VZTAHEM K ROZVOJI ATEROSKLERÓZY

Poruchy lipoproteinového metabolismu se projevují především jako zmnožení jednotlivých frakcí. Úbytek nebo chybění LP jsou vzácné a jsou způsobeny vrozenými defekty apoproteinů.

Hyperlipoproteinemie provázejí často choroby a patologické stavy jako je diabetes, hypothyreóza, nefrotický syndrom, choroby jater a pankreatu, chronický alkoholismus, nebo zvýšený přívod estrogenů a glukokortikoidů. Kromě toho se však vyskytují i jako primární poruchy, a to následkem vrozených dispozic, k nimž přispívá i nevhodný způsob života. Jak primární, tak sekundární stavy jsou význačným rizikovým faktorem pro vznik aterosklerózy a jejich komplikací. Nejsou však jediným rizikovým faktorem, který je možno odhalit v biochemické laboratoři. V závěru se proto zmíníme i o ostatních důležitých rizikových faktorech.

Jak již bylo naznačeno v předchozí kapitole, při *vyšetření lipidového metabolismu* vycházíme ze základních ukazatelů, tj. z koncentrace cholesterolu a triacylglycerolů v séru. Jejich odchylky nám dovoluji zařadit hyperlipoproteinemii do jedné ze tří základních kategorií (viz tabulka).

Jak vyplývá z předchozího výkladu, v případě cholesterolu je velmi důležité, v jakém typu lipoproteinu je cholesterol zabudován. Vyšetření se proto zpravidla doplňuje o *HDL cholesterol* (dává většinou současně informaci o LDL cholesterolu, viz předchozí kapitola), eventuálně se stanovují apoproteiny *Apo A-I* a *Apo B(100)*. Tímto způsobem můžeme zhodnotit riziko aterosklerózy pomocí *aterogenního indexu (AI)* nebo poměru *Apo A-I / Apo B*. Fyziologická rozmezí jsou uvedena v tabulce stanovení složek lipoproteinů.

Klasifikace hyperlipoproteinemii dle hladin CHOL a TG

I.	<i>Hypercholesterolemie</i> (izolované zvýšení celkového CHOL, převážně v LDL)
II.	<i>Kombinované hyperlipidemie</i> (současné zvýšení CHOL a TG)
III.	<i>Hypertriacylglycerolemie</i> (izolované zvýšení TG)

Donedávna se prováděla klasifikace hyperlipoproteinemii metodou vypracovanou *Fredricksonem*. Vzhledem k tomu, že je zmiňována v základní literatuře, stručně ji popíšeme. Fredrickson rozdělil hyperlipoproteinemii na 5 skupin podle vzhledu séra (na lačno odebraného) po 12 hodinách, koncentrace CHOL a TG, a elektroforetické frakcionace. U vzorků byl hodnocen zákal, ev. přítomnost smetanovité povrchové vrstvy. Zákal vzniká při převaze VLDL frakce, flotující bílá vrstva signalizuje intaktní chylomikrony, které persistují při vzácném *defektu lipoproteinlipázy*. Čiré sérum se pozoruje pouze u zvýšení LDL frakce, bohaté na cholesterol. Nejčastějšími poruchami jsou typy II a IV. Typ IIa je charakterizován zvýšeným cholesterolem a β -LP, u typu IV jsou zvýšeny triacylglyceroly a $\text{pre}\beta$ -LP, typ IIb je kombinací obou předchozích. Jmenované nejběžnější poruchy jsou tedy analogické již uvedenému třídění podle hladin CHOL a TG.

Genetická složka vystupuje do popředí zejména u *familiární hypercholesterolemie*. Zde se jedná o postižení funkce LDL receptorů, ať už je následkem konkrétní mutace, nedostatečná syntéza nebo porucha transportu tohoto proteinu. Podobně se projevuje i defekt Apo B-100, který není schopen vazby na receptor. Následkem je zvýšená koncentrace LDL v krvi, ale i zvýšená syntéza CHOL v buňkách. Homozygoti vykazují hyperlipoproteinemii typu IIa dle Fredricksona, heterozygoti typ IIb. Homozygoty může postihnout srdeční infarkt již ve třetí dekádě života. V této oblasti se počítá s rozvojem diagnostiky na úrovni DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Na vzniku aterosklerózy se však mohou podílet i faktory jiného druhu, často kombinované. Apoprotein B-100 může totiž být sekundárně chemicky pozměněn, čímž vážně jeho rozpoznání LDL-receptory. Jedná se o modifikace dvojího druhu. Apo B může být v cévní stěně, kam proniká zejména při poškození endothelu, jednak oxidován volnými radikály, jednak podléhat glykaci, čemuž napomáhá zvýšená koncentrace glukózy. Synergické působení těchto dvou procesů se nazývá *glykooxidace*. Tím se stává modifikovaný apoB iniciátorem zánětu cévní stěny, který dnes pokládáme za základ kornatění tepen. V této souvislosti je třeba se zmí-

nit o protektivní funkci HDL. HDL brání totiž oxidaci LDL jednak likvidací oxidačních faktorů, jednak výměnou oxidovaných složek LDL, za vlastní neoxidované, a jejich vyloučením.

Nyní pojednáme krátce o dalších rizikových faktorech. V přehledu klinicky významných LP (kap. 2.5) byl již zmíněn *lipoprotein(a)*. Jedná se o kombinovanou molekulu, kde je k řetězci Apo B-100 disulfidickou vazbou připojen protein s vysokou homologií vůči plasminogenu, základní bílkovině fibrinolytického systému. Jak je zřejmé, působení se týká hlavně zvýšení rizika thrombotických komplikací aterosklerózy. LP(a) však navíc podněcuje také proliferaci buněk hladkého svalstva cévní stěny, jeden ze důležitých činitelů v patogenezi aterosklerózy. Zvýšení LP(a) nad 0,3 g/l se nachází u osob s infarktem myokardu, mozkovými cévními příhodami a sklerotickými chorobami dolních končetin.

Dalším rizikovým faktorem pro vznik předčasné aterosklerózy a jejích komplikací je zvýšená hladina *homocysteinu* v plazmě. Z metabolismu aminokyselin vyplývá, že na množství homocysteinu mají vliv enzymy methylenetetrahydrofolátreduktáza, methylenetetrahydrofolát:homocystein-methyltransferáza a cystathioninsynthasa, a příslušné koenzymy. Teoreticky postižení aktivity kteréhokoli enzymu nebo deficit koenzymu může vést k hromadění homocysteinu, ev. homocystinu. U latentních poruch je možno sledovat jeho hladinu po podání methioninu. Mechanismus působení je dosud nejasný, je však důležité, že tento významný rizikový faktor lze často velmi dobře kontrolovat podáváním kyseliny listové.

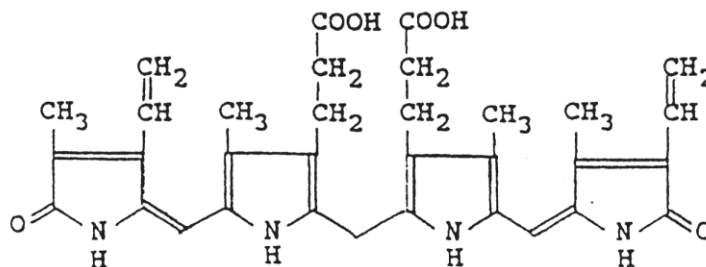
Fibrinogen je protein akutní fáze (viz kapitola Bílkoviny krevní plazmy), současně také nezávislý faktor aterogeneze. Uplatňuje se zvýšenou viskozitou krve, infiltrací arteriální stěny, vazbou lipoproteinů, stimulací buněčné proliferace a agregace trombocytů.

Proteinurie mírného stupně, zvaná *mikroalbuminurie*, rovněž predisponuje ke kardiovaskulárním chorobám. Signalizuje zvýšenou propustnost endotelu, a to nejen glomerulárních kapilár, ale i větších tepen koronárních a mozkových.

Nízkomolekulární složky krevní plazmy

Bilirubin: vznik, transport, degradace

Hem je degradován mikrosomálními enzymy retikuloendoteliálního systému (RES), převážně ve slezině. Zdrojem hemu jsou převážně zaniklé erythrocyty, část ale pochází i z myoglobinu a cytochromů. Prvním krokem je otevření porfyrinového prstence v přítomnosti *hemoxygenázy*, molekulárního kyslíku a NADPH. Uvolňuje se přitom atom železa a molekula oxidu uhelnatého, produkt oxidace methylenového můstku mezi isopyrrolovými kruhy. Vzniklý lineární tetrapyrrol byl nazván *biliverdin*, vzhledem ke své zelené barvě. Následuje redukce centrálního methylenového můstku biliverdinreduktázou za vzniku oranžového *bilirubinu*. Denní produkce bilirubinu je za normálních okolností 250–300 mg. Barevnou proměnu hemu na bilirubin všichni známe z vývoje krevních výronů.



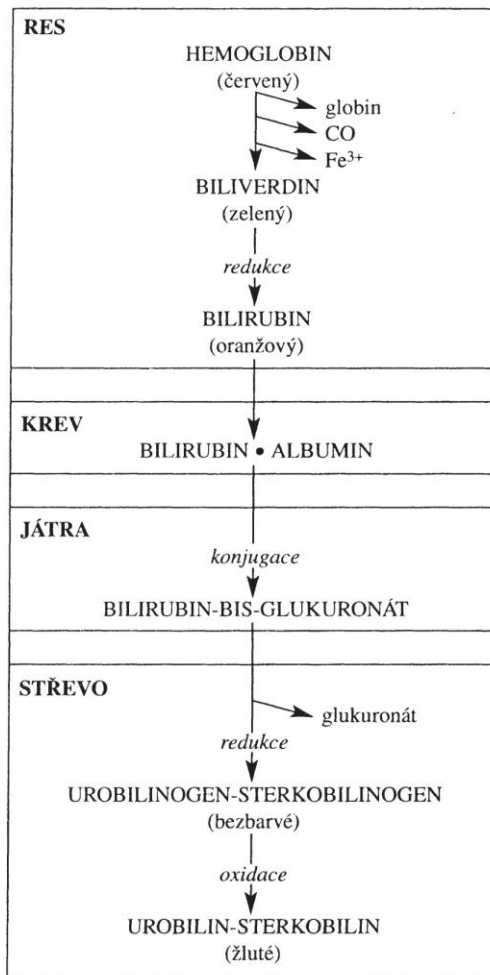
bilirubin

Z buněk RES je bilirubin uvolněn do krevního oběhu. Transport ve vodě špatně rozpustného bilirubinu je umožněn připojením k albuminu krevní plazmy. Vazebná kapacita albuminu pro bilirubin je značná, ale neomezená. Asi 250 mg bilirubinu se může vázat na 1 l plazmy relativně pevnou vazbou, přebytek má však jen velmi nízkou vazebnou schopnost, takže snadno přechází do tkání. Četné látky, mezi které patří i salicyláty, sulfonamidy a antibiotika, soutěží s bilirubinem o vysoce afinitní místa na molekule albuminu. Infiltrace tkání, zejména CNS, bilirubinem je obávanou komplikací novorozenecké hyperbilirubinemie, které je nutno zabránit.

Navzdory své vazbě k albuminu je bilirubin snadno přebírán povrchovými strukturami jaterních buněk, které mají k bilirubinu mimořádně vysokou afinitu. Odběrový systém hepatocytu má tedy za normálních okolností dostatečnou kapacitu vzhledem k nabídce bilirubinu, což neplatí vždy pro jeho následné zpracování a vylučování. Pro nitrobuněčný transport mají význam bílkoviny Y a Z. V játrech probíhá navázání (*konjugace*) jedné až dvou molekul kys. glukuronové esterickou vazbou na zbytky propionové kyseliny bilirubinu. *Konjugovaný bilirubin* je slabá kyselina, při fyziologickém pH ve formě soli. Touto modifikací se zvyšuje rozpustnost ve vodě a jsou vytvořeny předpoklady pro vyloučení do žluči. Celý proces katalyzuje enzym *glu-*

kuronyltransferáza, donorem kys. glukuronové je UDP-glukuronid. Indukce glukuronyltransferázy může být vyvolána i určitými farmaky, např. barbituráty. Sekrece bilirubin-bis-glukóziduronátu (diglukuronidu) do žluči je zprostředkována aktivním transportem, který má však na rozdíl od absorpce kapacitu omezenou, a je proto rychlost určujícím faktorem odstraňování bilirubinu.

Zjednodušené schéma tvorby a přeměn bilirubinu



Rozpustnost konjugovaného bilirubinu usnadňuje jeho analytické stanovení. Je schopen s činidly reagovat „přímo“, na rozdíl od bilirubinu nekonjugovaného, který je nutno nejprve uvolnit z vazby na albumin a solubilizovat, aby mohl reagovat s diazočínidlem. Proto se užívá pro konjugovaný bilirubin někdy synonymum „přímý“ bilirubin, pro nekonjugovaný „nepřímý“. Protože konjugovaný bilirubin není vázán na bílkovinu, může pronikat glomerulem do moči.

Konjugovaný bilirubin je špatně vstřebáván střevní sliznicí. Během střevní pasáže však jsou odštěpeny zbytky glukuronové kyseliny bakteriálními hydrolázami a bilirubin je redukován na řadu produktů, zejména bezbarvý *urobilinogen* a *sterkobilinogen*. Tyto tetrapyrroly se již vstřebávají lépe, takže větší část je reabsorbována (asi 70 %), zachycena jaterními buňkami a znovu vyloučena do žluči, účastní se tedy *enterohepatálního oběhu*. Při poškození hepatocytu nebo jeho přetížení množstvím produktů pronikají tyto látky do velkého oběhu a jako bezprahové látky se vylučují ledvinami, takže je prokazujeme v moči. Urobilinogen a sterkobilinogen se vzdušným kyslíkem oxidují na žluté pigmenty *urobilin* a *sterkobilin*, k čemuž dochází

v distální části trávicího traktu. I tyto produkty se částečně účastní enterohepatálního oběhu. Malé množství uvedených produktů se vylučuje i za normálních okolností do moči, což bývá vysvětlováno mj. průnikem do velkého oběhu cestou haemorrhoidálního plexu. Souborně můžeme degradační produkty bilirubinu, vyskytující se ve střevě, nazvat *urobilinoidy*.

Část urobilinoidů je degradována na dipyrrolové fragmenty, které mohou polymerizovat na hnědé *mesobilifusciny*. Tyto produkty, společně s oranžovým urobilinem a sterkobilinem, zabarvují stolici. Je-li však zablokován odtok žluči do střeva, např. zaklíněným kamenem, má stolice bělošedou barvu pro nepřítomnost žlučových barviv, a vysoký obsah nestrávených tuků (*acholická stolice*). V tomto případě nemohou být degradační produkty bilirubinu přítomny ani v moči. Jiný vzhled má stolice při chybění nebo při poruše střevní bakteriální flóry, která se účastní redukčních přeměn bilirubinu. Tento stav se nachází fyziologicky u novorozenců, případně je navozen léčbou širokospektrými antibiotiky. Zde je vylučován nezměněný bilirubin, eventuálně dochází k jeho oxidaci na zelený biliverdin, jak vidíme na meconiu novorozenců. Podobný efekt má i velmi rychlá pasáž střevního obsahu.

Stanovení bilirubinu v krvi

V krvi stanovujeme bilirubin kvantitativně po převedení na diazobarvivo (*Van den Berghova diazoreakce*). Činidlem je diazotovaná kyselina sulfanilová, připravená bezprostředně před stanovením ze sulfanilové kyseliny a dusitanu sodného v prostředí HCl. Barevný produkt má povahu indikátoru: v silně kyselém prostředí je modrý, v neutrálním červený a v alkalickém zelenomodrý. Bilirubin konjugovaný („přímý“) vstupuje do reakce okamžitě, bilirubin nekonjugovaný („nepřímý“) reaguje kvantitativně až po přidání urychlovače, akcelérátoru, který zajistí vytěsnění z vazby na albumin a solubilizaci, což je předpoklad pro kvantitativní reakci s diazočinidlem. Akcelérátorem mohou být organická rozpouštědla mísitelná s vodou (methanol, ethanol), nebo cyklické organické sloučeniny (kofein, benzoan, salicylát). Při stanovení většinou postupujeme tak, že jednak v přítomnosti akcelérátoru stanovíme obě složky najednou, jako *celkový bilirubin*, jehož koncentrace by neměla přesahovat $25 \mu\text{mol/l}$. V obdobné reakci, ovšem bez akcelérátoru, určíme pak koncentraci *konjugovaného („přímého“)* bilirubinu, který by neměl přesáhnout $8 \mu\text{mol/l}$. Rozdíl těchto dvou hodnot odpovídá bilirubinu nekonjugovanému. Přesáhne-li koncentrace konjugovaného bilirubinu asi $34 \mu\text{mol/l}$, tj. ledvinový práh, uniká pigment do moči, která tmavne, případně po oxidaci na vzduchu nabývá zelený odstín. Nekonjugovaný bilirubin renální bariérou neprojde ani při velmi vysokých koncentracích.

Při kvantitativním stanovení abnormálně vysokých sérových hodnot, které přicházejí v úvahu při novorozeneckých žloutenkách, je nejpraktičtější *přímé fotometrické stanovení* při dvou vlnových délkách, s následným výpočtem. Vyšetření je důležité vzhledem k hranici (asi $340 \mu\text{mol/l}$), nad kterou je již indikována výměna krve novorozence, tzv. exsanguinační transfuze.

Klasifikace hyperbilirubinemií

Vystoupí-li hladina bilirubinu v krvi nad zhruba $35 \mu\text{mol/l}$, začne barvivo infiltrovat sklery a sliznice, rozvíjí se *žloutenka (ikterus)*. Žloutenka je příznak, který provází více chorob různého původu. Ke zmnožení bilirubinu dochází jeho nadměrnou tvorbou, porušením transportu v hepatocytu, nedostatečnou konjugací, sníženým vylučováním do žluči, nebo překážkou odtoku (obstrukcí) ve žlučových cestách. Na základě centrálního postavení jater při vylučování bilirubinu byly iktery členěny na prehepatální, hepatální a posthepatální. S ohledem na laboratorní nález a patogenezi však dnes preferujeme rozdělení hyperbilirubinemií na nekonjugované, smíšené a konjugované.

Nekonjugované hyperbilirubinemie

Při některých defektech erytrocytů vrozených či získaných (hemolytické anemie, hemoglobinopatie, transfuze inkompatibilní krve) je produkováno takové množství bilirubinu, že je překročena vylučovací kapacita jater a dochází ke hromadění nekonjugovaného bilirubinu v krvi („*prehepatální ikterus*“). Masivní kon-

verze na produkty typu urobilinogenu a urobilinu se projeví jednak na zabarvení stolice (polycholická stolice), jednak nálezem Ehrlich a Schlesinger pozitivních látek v moči. Bilirubin a žlučové kyseliny však v moči chybějí. Do této kategorie řadíme i *novorozenecký ikterus*, na kterém se primárně podílí zvýšený rozpad fetálního hemoglobinu, ale uplatňují se i další mechanismy, jako je nezralost konjugačního systému a nedostatek nitrobenčických vazebných proteinů. Zvýšená propustnost hematoencefalické bariéry zvyšuje riziko prostupu lipofilního nekonjugovaného bilirubinu do CNS a jeho vazby na citlivé struktury, zejména bazální ganglia („kernikterus“) s následnou encefalopatií. Podobný laboratorní obraz může vyvolat dědičná porucha glukuronyltransferázy, kde však není nadprodukce urobilinogenu a močový nález je proto chudší. Enzymový defekt se klinicky manifestuje jako vcelku benigní Gilbertův syndrom nebo jako Crigler-Najjarův syndrom, u něhož známe i letální formu. Částečnou inhibici enzymu u kojenců může vyvolat pregnandiol obsažený v mateřském mléce.

Smíšené hyperbilirubinemie

Jmenovaná kategorie se překrývá s pojmem „*hepatální iktery*“, protože je spojena s poškozením jaterního parenchymu. Častou příčinou je virová infekce, může se však uplatnit i jiný mikrobiální faktor a celá škála toxických látek (chlorované uhlovodíky, faloidin, etanol, atd.). Žloutenka je přítomna i v terminálních stadiích cirrhosy jater. U těchto stavů je zpravidla postiženo jak vychytávání a transport bilirubinu v játrech, tak jeho konjugace. Průvodním jevem je tedy vzestup obou forem bilirubinu v plazmě a jeho přítomnost v moči, jakmile je překročen ledvinový práh. Velmi časným nálezem je pozitivní Ehrlichova aldehydová reakce v moči, která signalizuje přítomnost urobilinogenu (dříve nazývaného „pigment nemocných jater“, i když je, jak víme, bezbarvý). Urobilinogen v období kulminace zánětu zmizí, aby se znovu objevil při poklesu bilirubinu. U hepatitid je narušen poměr albuminu a globulinů v séru, což se projeví poklesem A/G koeficientu. V plazmě se zvyšuje aktivita některých enzymů, zejména aminotransferáz. Aktivita ALT je přítom úměrná počtu postižených hepatocytů, zatímco AST informuje o závažnosti buněčného postižení. Typické je i zvýšení LD izoenzymu M₄ a železa.

Orientační schéma laboratorních nálezů u žloutenek (hyperbilirubinemií, HB)

		<i>hemolytický ikterus (nekonjug.HB)</i>	<i>hepatální poškození (smíšené HB)</i>	<i>obstrukční ikterus (konjug. HB)</i>
KREV	bilirubin konjugovaný	–	+	+
	bilirubin nekonjugovaný	+	+	–
	↓ A/G koef.	–	+	–
	ALT (AST), LD-M ₄	–	+	–
	ALP, GMT	–	–	+
MOČ	bilirubin	–	+	+
	urobilinogen	+	+	–
	žluč. kyseliny	–	+	+

Konjugované hyperbilirubinemie

Nejčastější příčinou této kategorie ikterů, která zhruba odpovídá „*posthepatálnímu ikteru*“, je přerušení odtoku žluči do střeva. Dochází k tomu ve žlučových cestách mimo játra zaklíněním konkrementu – nejčastěji v distální části choledochu, okluzí nádorem, parazitem, jizevnatým zúžením, ale také intrahepatálně (při cholangiolitidě, cholestatické formě zánětu jater, atd.). U novorozenců přichází vzácně v úvahu i atresie žlučových cest. Je zde postižen transport bilirubinu z místa konjugace, což má za následek vzestup konjugované formy v krvi. Je-li uzávěr úplný, je stolice acholická, a v moči se nevyskytuje urobilinogen a jiné urobilinoidy. Typicky je v moči nacházen konjugovaný bilirubin a žlučové kyseliny. Z enzymových aktivit je výrazný vzestup alkalické fosfatázy (ALP) a γ -glutamyltransferázy (GMT). Průvodním zjevem obstrukčního ikteru je hypercholesterolemie a přítomnost lipoproteinu x (Lpx), na který jsou uvedené enzymy zčásti vázány.

ny. Tento obraz nemusí vždy způsobit obstrukce. Známe také dědičné syndromy postihující přenos konjugovaného bilirubinu přes žlučový pól hepatocytu (Dubin-Johnsonův a Rotorův syndrom). Po odstranění příčiny déle trvající hyperbilirubinemie může překvapit pomalý ústup žloutenky; je následkem vytvoření kovalentní vazby mezi konjugovaným bilirubinem a albuminem (tzv. *delta-bilirubin*). Tento komplex má podstatně delší poločas odstraňování než konjugovaný bilirubin.

NEBÍLKOVINNÉ DUSÍKATÉ LÁTKY PLAZMY

Obecná charakteristika nebílkovinného dusíku krevní plazmy, jeho původ, složení a vylučování

Nebílkovinné dusíkaté složky plazmy v tradičním pojetí, tj. látky, které není možno oddělit vysrážením precipitačními činidly pro bílkoviny, jako jsou kys. trichloroctová nebo kys. sulfosalicylová, byly souborně označovány jako *nebílkovinný (zbytkový) dusík*. Tento pojem byl aktuální v době, kdy přímé kvantitativní stanovení dusíku patřilo mezi běžná laboratorní vyšetření. Spolu s rozvojem biochemické analytiky se však brzo ukázalo, že daleko větší diagnostickou hodnotu mají jednotlivé složky nebílkovinného dusíku. Nejčastěji analyzované látky ukazuje následující tabulka:

Hlavní nebílkovinné dusíkaté látky krevní plazmy

močovina		3-8 mmol/l
α-aminodusík		3,6-4,8 mmol/l
kyselina močová	muži	210-450 μmol/l
	ženy	140-360 μmol/l
kreatinin	muži	60-100 μmo/l
	ženy	50-90 μmo/l
amoniak		pod 50 μmol/l

Jak vyplývá z tabulky, hlavními složkami nebílkovinného dusíku jsou močovina, aminokyseliny, kys. močová, kreatinin a amoniak. Není uveden kreatin, nukleotidy, indikán, bilirubin (viz předchozí text), peptidy a další minoritní dusíkaté sloučeniny. Jedná se tedy hlavně o koncové produkty degradace dusíkatých látek. Jejich celkovou hladinu proto ovlivňuje přísun dusíkatých látek potravou a rychlost odbourávání vlastních bílkovin, nukleových kyselin a svalového kreatinu. Důležitou roli zde hraje stav jater jako centrálního orgánu metabolismu dusíkatých látek, ale zejména *vylučovací funkce ledvin*, protože uvedené látky se z těla přednostně odstraňují renální cestou.

Zdravá ledvina průběžně vylučuje vyprodukovanou „katabolickou nálož“, představovanou především složkami nebílkovinného dusíku. Při *renální nedostatečnosti (insuficienci)* ledviny vylučují dusíkaté katabolity jen v omezené míře, totéž platí o udržování vodní, elektrolytové a acidobazické rovnováhy. Podmínkou zachování přijatelného vnitřního prostředí je ovšem vyloučení tělesné námahy, minimální příjem bílkovin a regulovaný příjem tekutin a minerálů. Tento stav může plynule přejít v *chronické selhání ledvin (renal failure)*, kdy ani za shora uvedených podmínek nejsou ledviny schopny plnit svou funkci a laboratorní nálezy se začínají zhoršovat. Příčinou je redukce počtu zdravých nefronů následkem chronického onemocnění, nejčastěji ledvinových zánětů, nebo při nezvládnutí akutních stavů. Zvyšují se dusíkaté látky v krvi, vzniká dehydratace z polyurie, nastupuje acidóza. Prohlubuje-li se zánik nefronů, dojde nakonec ke vzestupu K⁺ a močoviny. *Akutní selhání ledvin* vzniká naproti tomu náhle, během několika hodin až dnů, a to jako projev akutní glomerulonefritidy, vlivem nefrotoxických jedů, nebo při šoku. Změny při šoku spočívají ve sníženém prokrvení kůry ledvin a jsou zpočátku reverzibilní. Dochází k retenci dusíkatých látek a některých iontů (K⁺), a vzniká metabolická acidóza následkem neschopnosti vyloučit netěkavé zplodiny katabolických pochodů (sulfáty, fosfáty). Zejména je obávaná hyperkaliemie a hromadění vody, které může vést k edému plic. Akutní i chronické selhání ledvin je indikací k dialyzační léčbě.

Chronické selhávání ledvin může vyústit v klinický syndrom *uremie*. Kromě již zmíněných biochemických známek ledvinného selhání se navíc projeví charakteristické nervové, gastrointestinální a respirační příznaky. Neurologické příznaky si vysvětlujeme inhibičním účinkem tzv. uremických toxinů (různé deriváty guanidinu) na enzymové děje, např. transketolázovou reakci v CNS. Amoniak v mozku odčerpává 2-oxoglutarovou kys. z Krebsova cyklu. Bývá zhoršená utilizace sacharidů, v krvi stoupají triacylglyceroly, cholesterol je na rozdíl od nefrotického syndromu normální. Dlouhotrvající porucha, hlavně u dialyzovaných pacientů, vede k vývoji *uremického kostního syndromu* z vyplavování kalcia, tzv. renální osteomalacii. V patogenezi tohoto stavu se uplatňuje pufování průvodní acidózy hydroxylapatitem, nedostatek vitamínu D₃, který se vytváří v ledvinách, a sekundární hyperparathyreoidismus. Remodelace kostí je provázena vzestupem sérové alkalické fosfatázy a dalších ukazatelů, zejména vylučováním degradovaných příčných spojek kolagenu, „crosslinks“ (deoxypyridinolinu). Klinický obraz doplňují krvácivé projevy z nedostatku koagulačních faktorů a chudokrevnost ze snížené produkce erythropoetinu v ledvinách a z útlumu kostní dřeně.

Stanovení močoviny

Ve formě *močoviny* je vylučováno 80–90 % celkového dusíku. U lidí je močovina hlavní konečný produkt katabolismu proteinů a detoxikace amoniaku. Vzniká v játrech, převážně z aminodusíku kyseliny glutamové a kys. asparagové, kam je usměrněn α -aminodusík z většiny katabolisovaných aminokyselin. Dalšími zdroji jsou amidický dusík glutaminu a amoniak jako takový, přisunovaný portálním oběhem ze střeva. Urea je syntezována v ornithinovém cyklu z jednoho molekuly amoniaku, aminodusíku kys. asparagové a jednoho hydrogenukarbonátového iontu, za spotřeby 3 molekul ATP. Vlastní biosyntéza probíhá v několika stupních (viz učebnice biochemie). Vrozené metabolické poruchy mohou postihnout každý z nich, což vede k intoxikaci amoniakem a vývojem svérázných klinických příznaků, včetně mentálních poruch. Neurologické příznaky jsou typické i pro zkratový transport amoniaku ze střevního traktu do velkého oběhu, jak vidíme např. u cirrhosy. Močovina je mimořádně difuzibilní substance, a jako taková se vyskytuje ve všech tělních tekutinách ve srovnatelné koncentraci. Protože je eliminována téměř výhradně ledvinami, její koncentrace v krvi je ovlivněna především funkcí ledvin. Vylučuje se glomerulární filtrací, přičemž 40 % se v proximálním tubulu opět vtřebává s vodou. Vedle toho je ovšem hladina urei závislá také na příjmu bílkovin, na intenzitě katabolických dějů, a na stavu jaterní tkáně. Zvýšená produkce se pozoruje při masivním krvácení do trávicího traktu, určité zvýšení může být následkem intenzivní sportovní činnosti. Snížené hladiny upozorňují na snížený přísun bílkovin potravou nebo na selhávání biosyntézy močoviny v játrech.

Pro stanovení močoviny je k dispozici řada metod. Můžeme užít přímé barevné reakce (např. s diacetylmonooximem a thiosemikarbazidem), nebo stanovit amoniak po rozkladu močoviny enzymem ureasou. Referenční rozmezí je relativně široké, 3 - 8 mmol/l. Pokud vyloučíme vliv zvýšeného katabolismu bílkovin, lze ze vzestupu hladiny urei při renálních poruchách poměrně dobře odhadnout postižení vylučovací funkce ledviny.

Stanovení kyseliny močové

Kyselina močová se vyskytuje ve formě urátu jednosodného, který je asi 20 krát rozpustnější než vlastní kyselina. U člověka a primátů je kys. močová konečným degradačním produktem katabolismu nukleových kyselin a jejich složek, včetně nukleoproteinů exogenních, přijatých potravou. Člověk průměrně eliminuje 4,4 mmol kys. močové denně. Asi dvě třetiny tohoto množství jsou vylučovány ledvinami, zbytek střevním traktem, kde bakterie degradují tento purin na allantoin a CO₂. Zvýšená hladina v séru nad limit referenčních hodnot, tj. u mužů 210 - 450 $\mu\text{mol/l}$ a žen 140 - 360 $\mu\text{mol/l}$, se nazývá *hyperurikemie*. Na syndromu hyperurikemie se podílí zvýšený příjem nukleoproteinů potravou, zvýšený rozpad vlastních nukleoproteinů, masivní zvýšení pozorujeme u nádorových chorob po ozáření nebo aplikaci cytostatik. Mezi další příčiny se řadí snížené vylučování ledvinou a nadprodukce endogenní kys. močové. Oba poslední mechanismy se mohou uplatnit v patogenezi poměrně časté poruchy metabolismu purinů, *dny* (*arthritis uratica*). Na tomto místě je

třeba připomenout, že ne každá hyperurikemie je dna, ale každá dna má alespoň v některém stadiu hyperurikemii. Významným momentem je nedostatečná regulace prvního, klíčového kroku syntézy purinů, katalyzovaného 5-fosforibosyl-1-difosfát-amidotransferázou. V případě porušené regulace tohoto enzymu nukleosidmonofosfáty se začne vytvářet nadbytečné množství purinů, které je terminálně přeměněno xanthinoxidázou na kys. močovou. Je-li tento mechanismus kombinován navíc s nedostatečnou reutilizací purinových bazí, dostáváme obraz debilizujícího a terminálně letálního *Lesh-Nyhanova syndromu*. Dna je charakterizována záchvaty krutých kloubních bolestí způsobených krystalizací urátu jednosodného v kloubech, zejména v oblasti bazálního kloubu palců dolních končetin. V dutém systému ledviny dochází často k vypadávaní urátů v podobě močových konkrementů, krystaly v ledvinovém parenchymu mohou vést až k renální insuficienci.

Při stanovení kys. močové je možno využít redukčních vlastností tohoto purinu, např. redukcí fosfowolframového činidla po deproteinaci. (Připomeňme, že uráty jsou významnými antioxidanty krevního séra!) Reakce je však zatížena určitou chybou, a za výhodnější se proto považují enzymové testy s urikasou, kde je kromě alantoinu a CO₂ vedlejším produktem peroxid vodíku, vhodný ke kvantitativnímu stanovení. Uráty je možno prokázat i mikroskopicky ve dnavém tofu nebo v leukocytech kloubní tekutiny.

Stanovení kreatininu, amoniaku a aminokyselin

Kreatinin je anhydrid kreatinu, vznikající ve svalech z kreatinfosfátu neenzymovou dehydratací a odpojením fosfátu. Denně se na kreatinin přemění 1–2 % kreatinu. Jeho produkce je za předpokladu fyzického klidu a bezmasé diety stabilní, úměrná pouze tělesné hmotnosti. Vzhledem k tomu, že kreatinin je téměř výhradně vylučován glomeruly, je jeho hladina ukazatelem glomerulární filtrace. Plazmatický kreatinin se zhruba zdvojuje při každé redukcí glomerulární filtrace o 50 %. Přesnější informaci však poskytne, zejména v časném období poruchy, až clearance endogenního kreatininu (viz funkční vyšetření ledvin). Při porovnání s inulinovou clearancí je možno vůči této metodě vyslovit určité výhrady, týkající se částečného vylučování kreatininu tubuly při jeho zvýšené hladině a relativní nespecifičnosti analytické metody, jsou však vyváženy jednoduchostí a nízkou cenou vyšetření. Kreatinin se stanovuje klasickou *Jaffeho reakcí* s alkalickým pikrátem, při které vzniká oranžový podvojný pikrát, který se kvantitativně určuje fotometrií. Vzhledem k tomu, že pozitivně reagují i jiné součásti, jako pyrohroznová kyselina, ketolátky aj., je výsledek často nadhodnocen. Referenční hodnoty jsou 50–125 $\mu\text{mol/l}$, kde je vodítkem v tomto širokém rozmezí pohlaví (u mužů jsou vyšší hodnoty) a věk (zvyšuje se s věkem).

Jedním z konečných produktů degradace aminokyselin ve většině orgánů je *amoniak*, NH₃. Amoniak je rovněž adsorbován ze střevního lumen jako výsledek bakteriální deaminace proteinů potravy, odloupaných epitelů, a z rozkladu močoviny bakteriální ureasou. Tato potenciálně toxická substance může být detoxikována dvěma způsoby. První je předběžný, a spočívá v přenosu amoniaku na ketokyseliny (např. 2-oxoglutarát) za tvorby minokyselin, nebo na glutamát za vzniku glutaminu. Ledviny pak mohou vylučovat amoniak glutaminu jako amoniový iont, což je současně proces zmirňující acidózu vazbou H⁺ iontů. Rozhodující je však detoxikace v játrech, prostřednictvím tvorby močoviny (viz kapitola Stanovení močoviny). Při akutním selhávání jater se zvyšuje sérový amoniak nad limit 35–50 $\mu\text{mol/l}$, vzhledem ke ztrátě enzymových aktivit v destruovaných hepatocytech. U chronických jaterních chorob je hlavním faktorem portovenózní zkrat, kterým amoniak obchází játra a proniká do systémového řečiště. K tomu ovšem může přistoupit snížená biosyntéza močoviny v hepatocytech. Standardně přispívají k *hyperamonemii* vrozené defekty ornitinového cyklu. Vzhledem ke snadné prostupnosti membránami se uplatňuje zejména působení amoniaku na CNS, kde přispívá k hepatogenní encefalopatii. Zpočátku jsou v popředí funkčními poruchy, v terminálních stádiích jaterních chorob může vyústit až v bezvědomí, *coma hepaticum*. Mechanismus toxického působení není zcela jasný, víme však, že reaguje s kys. glutamovou a 2-oxoglutarovou za vzniku glutaminu a 2-oxoglutaramidu, čímž je postižena utilizace pyruvátu v cyklu kys. citronové, vedle toho se však předpokládá i přímé působení toxických metabolitů. Stanovení amoniaku je vždy velmi choulostivé vyšetření a vyžaduje okamžité zchlazení vzorku a co nejrychlejší zpracování, aby nedošlo k falešnému zvýšení hodnot.

Vznik moči a funkce ledvin

Ledviny jsou nejmohutnější sekreční orgán lidského těla, jehož důležitým úkolem je udržovat stále vnitřní prostředí organismu. Ledviny *vylučují* z těla nepotřebné látky, především t.zv. „metabolický odpad“ (např. močovina, kreatinin, kyselina močová atd.), řadu léků a toxických látek, současně průběžně *vstřebávají* životně důležité látky (např. glukóza, aminokyseliny). Tvorba amoniaku v epitelu ledvinných tubulů, regulace vylučování určitých aniontů a kationtů představuje důležitou roli při regulaci acidobazické rovnováhy.

Každá ledvina se skládá asi z jednoho milionu funkčních jednotek – *nefronů*. Ty jsou tvořeny glomerulem (klubko 20–40 kapilár vchlípené do Bowmanova váčku), stočeným kanálkem 1. řádu (proximální tubulus), Henleovou kličkou, stočeným kanálkem 2. řádu (distální tubulus) a sběrným kanálkem. Glomeruly a stočené kanálky jsou umístěny v kůře ledvin, Henleovy kličky se zanořují do dřeně ledvin, právě tak, jako sběrné kanálky. Celá ledvina je silně vaskularizována a představuje z hlediska prokrvení, spotřeby kyslíku a živin metabolicky neobyčejně aktivní orgán.

VZNIK A SLOŽENÍ MOČI

V *glomerulech* dochází k nepřetržité filtraci krevní plazmy přes bazální membránu kapiláry do Bowmanova váčku, odkud se odvádí tzv. *primární moč* neboli *glomerulární filtrát* v množství 2 ml/s (více než 170 l/24 h), což představuje 1/5 objemu krevní plazmy proteklé ledvinami. Primární moč je ultrafiltrát krevní plazmy, tj. má stejné složení jako plazma, ale téměř neobsahuje bílkoviny.

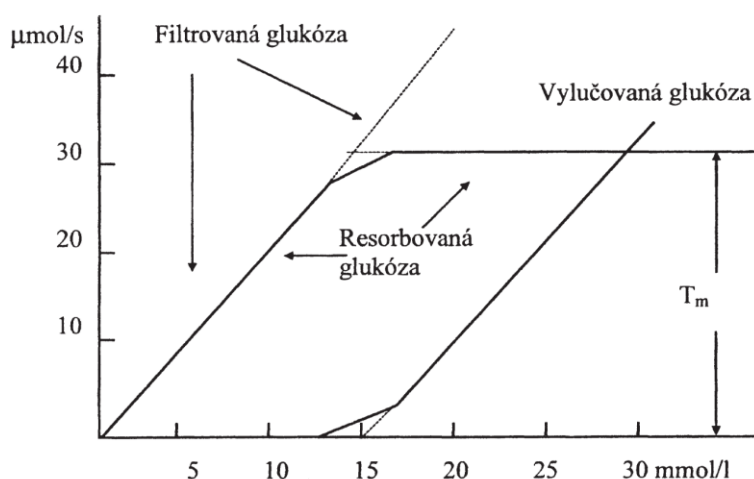
V *tubulárním systému* ledvin dochází k úpravě primární moči resorpcí důležitých látek a vody, ale také k exkreci některých látek do tvořící se moči.

V *proximálním tubulu* probíhá resorpce Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , glukózy, aminokyselin a dalších látek prováděná isoosmotickou resorpcí vody, takže 80 % původního filtrátu je resorbováno.

Do *Henleovy kličky* tak vstupuje 0,4 ml/s tekutiny isoosmotické s krevní plazmou, zbavené glukózy a obvykle kyselejší než plazma. Henleova klička sestupuje do dřevné části ledviny, kde je značně hyperosmolární intersticiální tekutina (osmolarita vzrůstá směrem k papile). V důsledku toho dojde v *sestupném raménku* kličky k pasivní resorpci vody, takže ve vrcholu kličky je moč rovněž hyperosmolární a ve značně zredukovaném objemu. Ve *vzestupném raménku* pak osmolarita moči opět klesá, ovšem nikoliv příjmem vody, nýbrž aktivním přenosem především Na^+ do intersticia. Výsledkem je tedy zredukovaný objem opět isoosmolární tekutiny. Připomeňme, že ne všechny nefrony se podílejí stejně na tomto procesu. Jen asi 1/7 nefronů obsahuje Henleovy kličky tak dlouhé, že pronikají do výrazně hyperosmolární části dřevně (k papile), zbytek kliček je krátkých a jejich přínos k úpravě moči v této fázi není tak podstatný.

V *distálním tubulu a sběrném kanálku* dochází k dalším selektivním úpravám moči, z nichž k nejpodstatnějším patří aktivní vylučování K^+ nebo H^+ výměnou za Na^+ (řízeno aldosteronem) a další acidifikace moči. Ta se realizuje aktivním přenosem H^+ z tubulárních buněk do moči, a to jednak ve formě NH_4^+ (rozkladem glutaminu), jako H_2PO_4^- (z HPO_4^{2-}) i jako volný H^+ . Konečně všechny sběrné kanálky procházejí hyperosmolárním prostředím dřevně, kde je možné dosáhnout značné resorpce vody a vytvořit tak hyperosmotickou moč (řízeno antidiuretickým hormonem).

Epiteliální buňky ledvinných tubulů se chovají různě vůči jednotlivým látkám přítomným v glomerulárním filtrátu. Pro některé látky je stěna tubulů nepropustná (inulin, manitol, EDTA), takže tyto látky se octnou v definitivní moči ve stejném množství, jako byly v glomerulárním filtrátu, i když v důsledku konečného zahuštění moči se jejich koncentrace v definitivní moči výrazně zvýší. Tyto látky nazýváme *bezprahové* a jsou pro nás cenným ukazatelem ledvinných funkcí, především jsou měřítkem glomerulární filtrace. Jiné látky mohou prostupovat stěnou tubulů pasivně podle koncentračního nebo osmotického spádu (voda, močovina, aceton aj.) a konečně je řada látek aktivně resorbována nebo naopak secernována tubulárními buňkami. Transportní tubulární mechanismy představují z hlediska své celkové kapacity určitý „práh“, do jehož výše je určita látka zcela resorbována a při jeho překročení se látka objevuje v moči. Tyto aktivně resorbované látky nazýváme *prahové* (např. glukóza). Celková schopnost ledvin resorbovat konkrétní látku v tubulárním systému se nazývá *tubulární resorpční maximum* (T_m), např. pro glukózu je 27–33 $\mu\text{mol/s}$. Analogicky vyjadřujeme tubulární sekreční maximum pro látky, které jsou aktivně v tubulech do moči secernovány (p-aminohipurát).



Koncentrace glukózy v plazmě
Vztahy mezi koncentrací v plazmě, filtrací a resorpcí v ledvinách

Lidské ledviny denně vyprodukuji více než 170 l glomerulárního filtrátu, přičemž denní výdej definitivní moči je 1–2 litry. V důsledku tubulárních funkcí došlo tedy ke stonásobnému zahuštění primární moči, čímž se dosáhlo i výrazného zkoncentrování látek určených k eliminaci z organismu, zatímco látky pro organismus cenné byly zcela resorbovány.

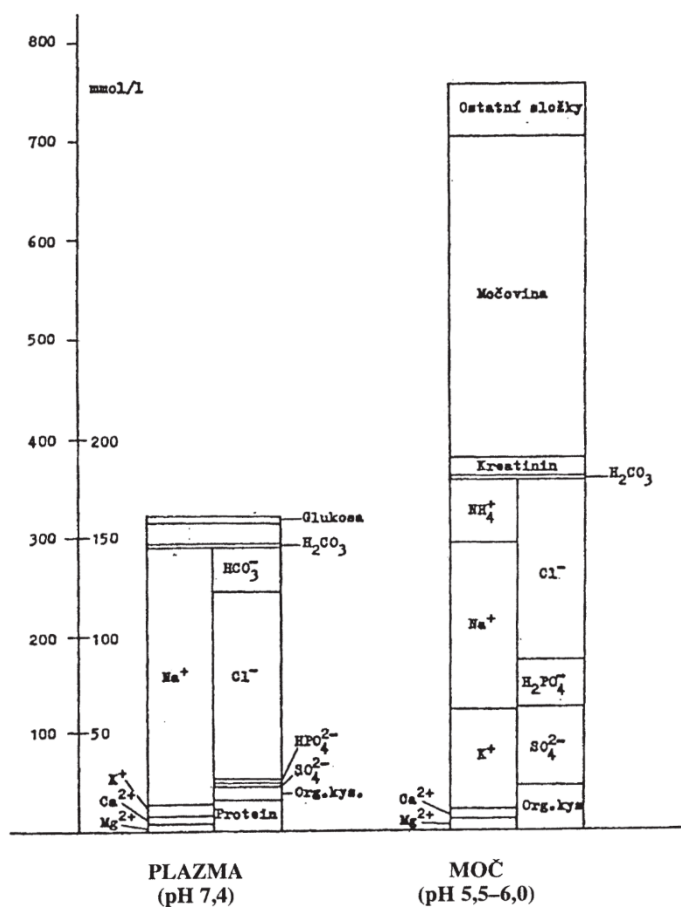
Představu o složení normální moči dospělého člověka dává následující tabulka. Uvádí jen nejdůležitější komponenty a z minoritních složek jen ty, které mají diagnostický význam.

Normální součásti moči dospělého člověka

Nejdůležitější anorganické součásti	
Sodík	120–240 mmol/24 h
Draslík	45–90 mmol/24 h
Hořčík	0,6–5,0 mmol/24 h
Vápník	0,6–5,0 mmol/24 h
Amonný iont	30–75 mmol/24 h
Vodíkový iont	1–10 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ (pouze v kyselé moči)
Chloridy	120–240 mmol/24 h
Fosfáty	25–35 mmol/24 h
Hydrogenuhlíčitan	0–50 mmol/24 h (pouze v alkalické moči)

Významné organické složky			
Močovina		333–583 mmol/24 h	
Kreatinin		9–16 mmol/24 h	
Kyselina močová		1,5–5 mmol/24 h	
Jiné dusíkaté látky		0,5 g N/24 h	
Diagnosticky významné součásti			
Vanilmandlová kyselina		8–30 μmol/24 h	
5-hydroxyindolactová kys.		10–42 μmol/24 h	
Porfobilinogen		do 6 μmol/24 h	
δ-aminolevulová kys.		20 ± 11 μmol/24 h	
17-hydroxykortikoidy	muži	8–28 μmol/24 h	
	ženy	5–17 μmol/24 h	
17-ketosteroidy	muži	14–76 μmol/24 h	
	ženy	7–52 μmol/24 h	
α-amyháza		17–33 μmol/24 h	
Objem	0,6–2,5 l/24 h	Hustota	1003–1035
pH	4,7–8,0 (průměr 6,0)	Osmolalita	50–1400 mmol/kg

Je třeba připomenout, že jak množství, tak vlastnosti a složení moči kolísají především podle množství přijaté vody a druhu potravy, mění se též podle metabolických okolností.



Složení moči v porovnání s krevní plazmou
(Vnější stupnice hodnot slouží k posouzení celkové výše koncentrací látek,
vnitřní stupnice představuje hodnoty zvlášť pro kationty a zvlášť pro anionty.)

Dobrou představu o funkci ledvin při přeměně glomerulárního filtrátu na definitivní moč dávají sloupcové diagramy, které porovnávají složení krevní plazmy a moči. Nejnápadnější rozdíl je v extrémním zvýšení koncentrace močoviny, kreatininu a dalších odpadních metabolitů v moči při absenci glukózy a proteinů. V iontové oblasti je nápadná retence sodíku, který je v moči nahrazován draslíkem a amonným iontem. Stejně tak chloridové ionty jsou zadržovány ve vnitřním prostředí a nahrazeny fosforečnany a sírany. Kyselá moč neobsahuje hydrogenuhličitan. Z iontových rozdílů vyplývá i mírně kyselý charakter moči ve srovnání s plazmou.

FUNKČNÍ VYŠETŘENÍ LEDVIN

Pod tímto pojmem rozumíme vyšetřovací metody, které kvantitativně hodnotí jak glomerulární funkci (filtraci), tak tubulární ledvině funkce. Hlavní funkční zkoušky ledvin jsou clearance, vylučovací zkoušky a koncentrační zkoušky.

Glomerulární filtrace, clearance

Z mechanismu tvorby moči víme (viz výše), že filtrací krevní plazmy v glomerulech vzniká primární moč (glomerulární filtrát) asi 2 ml/s. Množství tohoto filtrátu však závisí na několika okolnostech:

- filtračním tlaku (tj. rozdíl mezi kapilárním tlakem a součtem tlaků intersticiálního + intratubulárního + onkotického tlaku bílkovin krevní plazmy)
- permeabilitě glomerulární membrány
- velikosti filtrační plochy

Z mechanismu tvorby moči rovněž vyplývá, že různé látky jsou eliminovány z krve do moči různou rychlostí. Výrazem rychlosti, s jakou látka přechází z krve do moči je clearance dotyčné látky. *Clearance* je teoreticky takový *objem plazmy*, z něž je *během časové jednotky daná látka* činností ledvin *zcela odstraněna* (neboli clearance je takový objem plazmy v ml, který je úplně očištěn od určité látky při jednom průtoku ledvinami).

Vylučování jakékoliv nízkomolekulární látky *x*, která volně prochází glomerulem a v tubulech je buď resorbována nebo secernována, můžeme vyjádřit následující rovnicí:

$$GF \cdot P \pm T = U \cdot V$$

GF...množství glomerulárního filtrátu

P.... koncentrace látky *x* v plazmě i v glomerulárním filtrátu (látka volně prochází glomerulem)

T.... množství látky *x* secernované (+T) nebo resorbované (-T) v tubulech

U.... koncentrace látky *x* v definitivní moči

V.... objem definitivní moči

Chceme-li zjistit glomerulární filtraci, musíme zvolit takovou látku, která se bez omezení filtruje v glomerulech a nepodléhá přitom ani tubulární sekreci ani resorpci, tzn., že $T = 0$. Pak platí vztah:

$$GF \cdot P = U \cdot V$$

a glomerulární filtraci vypočteme podle vzorce:

$$GF = \frac{U \cdot V}{P}$$

Pro zjištění glomerulární filtrace stanovíme tedy clearance takové látky, která splňuje shora uvedené podmínky (pouze filtrace, $T = 0$). Těmto podmínkám vyhovuje řada látek: inulin, mannitol, kreatinin, thiosíran a EDTA. *Clearance* těchto látek je 2 ml/s za standardních podmínek, které charakterizuje hlavně tzv. *ideální tělesný povrch*, jehož průměrná hodnota je 1,73 m². Clearance těchto látek pak počítáme podle rovnice:

$$GF = \frac{U \cdot V}{P}$$

Cl = clearance (ml/s)
U = koncentrace látky v moči (mmol/l)
V = objem moči (ml/s)
P = koncentrace látky v plazmě (mmol/l)

Nejpoužívanějším vyšetřením v oblasti funkčních zkoušek ledvin je *clearance kreatininu*. Nevyžaduje totiž podávání žádné cizorodé látky vyšetřované osobě, neboť při vyloučení kreatinu z potravy (omezený příjem masa) a vyloučení svalové práce (klid na lůžku) je hladina endogenního kreatininu v krvi celkem stálá. Za klidových podmínek je kreatinin vylučován filtrací v glomerulech, podle novějších ukazatelů se nepatrně vylučuje i tubulární sekrecí. Množství secernované tubuly roste se stoupající koncentrací kreatininu v plazmě. Při normální funkci ledvin odpovídá clearance kreatininu glomerulární filtraci, při prohlubující se renální insuficienci klesá clearance kreatininu pomaleji, než odpovídá poklesu glomerulární filtrace.

Vlastní zkouška trvá 24 h nebo 12 h, kdy se sbírá veškerá moč do jedné nádoby (*clearance jednorázová*), nebo do různých nádob většinou po 3 hodinách (*clearance frakcionovaná* – získáme 8 hodnot/24 h). Pečlivě se vždy změří objem moči a stanoví se v ní koncentrace kreatininu (Jaffeho reakce–alkalický pikrát). Hladina kreatininu v krvi vyšetřované osoby se stanoví na začátku a na konci pokusu a stanoví se průměrná hodnota. Výpočtem zjistíme clearance, která normálně činí $1,33\text{--}3,34\text{ ml/s/1,73 m}^2$. Z této hodnoty lze vypočítat tubulární resorpci, normální hodnota je $0,98\text{--}0,99$ (98–99 %). Glomerulární filtrace a tedy i clearance kreatininu klesá s věkem.

Pro přesnější vyjádření glomerulární filtrace se v indikovaných případech provádí *clearance inulinu* nebo nověji *clearance $^{51}\text{Cr-EDTA}$* (i jiného radioaktivního kovu v komplexu s EDTA). Pomocí infuze je třeba zajistit stálou hladinu inulinu nebo jiné látky v krvi po celou dobu vyšetření. Inulin je polysacharid (polyfruktosid), který se filtruje glomerulem a všechno profiltrované množství se bez dalších změn vyloučí v definitivní moči. Stanovení je náročnější, než stanovení kreatininu. Normální hodnoty jsou $2,07 \pm 0,43\text{ ml/s}$ u mužů a $1,82 \pm 0,23\text{ ml/s}$ u žen.

Tubulární funkce

U většiny látek je jejich množství v glomerulárním filtrátu dále upravováno v tubulárním systému resorpcí nebo sekrecí těchto látek. Clearance mnoha látek je několikanásobně větší, než glomerulární filtrace, jelikož dochází k jejich sekreci v tubulárním systému. p-aminohippurová kyselina (PAH) v nízké plazmatické koncentraci má extrémně vysoké clearance, je úplně vyloučena z krve do moči při jednom průtoku plazmy ledvinou, takže její koncentrace ve venosní krvi se rovná nule. Clearance PAH nám ve skutečnosti udává aktuální *průtok krve ledvinou*. Fyziologické hodnoty jsou $10,9 \pm 2,7\text{ ml/s/1,73 m}^2$ pro muže a $9,9 \pm 2,6\text{ ml/s/1,73 m}^2$ pro ženy. Známe-li clearance inulinu, lze zároveň vypočítat $T_{m\text{ PAH}}$ (tubulární sekreční maximum PAH), jehož normální hodnota je $8,83 \pm 1,43\text{ }\mu\text{mol/s}$ u mužů a $6,63 \pm 0,93\text{ }\mu\text{mol/s}$ u žen. Obě uvedené clearance nám umožní vyčíslit další ukazatel činnosti ledvin, tzv. *filtrační frakci* ($FF = Cl_{\text{inulin}}/Cl_{\text{PAH}}$), jejíž hodnota je $0,194 \pm 0,039$. Měří objem glomerulárního filtrátu, k celkovému objemu plazmy proteklé ledvinou (asi 20% plazmy je profiltrováno).

Jestliže Cl_x je nižší než Cl_{IN} , vylučování se děje filtrací a resorpcí. V tom případě je množství vylučované látky v moči menší, než množství látky profiltrované za stejný čas.

Pro posouzení renální funkce v minerálním metabolismu, v acidobasické rovnováze a při regulaci osmotických poměrů v organismu, slouží stanovení *clearance Na^+* , *clearance K^+* , *osmolální clearance*, *clearance bezsolutové vody*, *ev. bezelektrolytové vody*. Všechna tato vyšetření vyžadují zároveň stanovení alespoň kreatininové clearance, aby mohla být posouzena resorpce jednotlivých složek. Vedle vlastní hodnoty clearance totiž vyjadřujeme, jaká část z celkového množství iontu v glomerulárním filtrátu se močí vyloučí a jaká část byla zresorbována.

Platí vztah, že profiltrované množství (GF) se rovná množství vyloučenému (*frakční exkrece*, FE) plus množství vstřebanému v tubulech (*tubulární resorpce*, TR):

$$GF = FE + TR$$

TR = tubulární resorpce dané látky (podíl z množství glomerulárního filtrátu vstřebaného v tubulech)

FE = frakční exkrece dané látky (podíl z množství glomerulárního filtrátu, který je za stejnou časovou jednotku vyloučen v definitivní moči).

Logicky tedy platí: $FE + TR = 1$ nebo $FE + TR = 100\%$.

Základní vyšetření moči

Základním vyšetřením moči rozumíme fyzikální vyšetření, vyšetření močového sedimentu a chemické vyšetření na bílkovinu, glukózu, aceton, bilirubin, Ehrlich pozitivní látky a krevní barvivo.

SBĚR MOČI A FYZIKÁLNÍ VYŠETŘENÍ

Moč sbíráme zásadně do suché, čisté nádoby vymyté pouze horkou vodou, bez přítomnosti saponátů a dezinfekčních prostředků. Pokud se vyšetření neprovádí do 2 h, je lépe moč uchovávat v chladničce, nejlépe při teplotě 2–8 °C, nádoba má být zakrytá a při delším skladování je lépe moč konzervovat (např. thymol, benzoan sodný, HCl, Na₂CO₃ atd.). Je totiž nutné zabránit bakteriální kontaminaci a pomnožení bakterií, neboť jejich metabolickou činností se výrazně mění chemické složení moči. Každou *konzervaci je nutno hlásit laboratoři*.

Na vyšetření zasíláme moč získanou nejčastěji jednorázovým odběrem nebo moč sbíráme za určité časové období. *K jednorázovému odběru* používáme zásadně čerstvou I.ranní moč, která je nejkoncentrovanější, a proto eventuálně přítomné patologické látky se snáze prokazují. Při podezření na přítomnost glukózy je lépe odebrat moč 1–2 h po jídle. Pro výrazné změny ve vylučování v průběhu dne způsobené fyzickou námahou, příjmem potravy a tekutin apod. dáváme přednost *24hodinovému sběru*, zejména jedná-li se o kvantitativní stanovení. Moč se sbírá od 6,00 h do 6,00 h. Pacient se v 6,00 h ráno vymočí a od té doby stírá moč do označené, čisté a suché nádoby, umístěné v chladničce a opatřené víkem. Sběr končí následujícího dne v 6,00 h. Moč se musí velmi důkladně promíchat, pečlivě změřit objem a do laboratoře zaslat nejméně 5 ml průměrného vzorku/24 h s uvedením přesné diurézy/24 h. Pro některá vyšetření je nutno moč acidifikovat nebo naopak alkalizovat. Je-li nutný odběr moči při menstruaci, provádí se cévkováním.

Nikdy nevyšetřujeme moč teplou ani příliš chladnou. Ochlazená moč se před vlastní analýzou nechá ohřát na laboratorní teplotu, čímž se také zčásti rozpustí v chladu vzniklý zákal. Masivní zákal, který znemožňuje analýzu se odstraní filtrací, avšak pak již není možné vyšetřovat sediment.

Fyzikální vyšetření moči

Množství moči kolísá, průměrná diuréza je 1000–1500 ml denně. *Polyurie* znamená zvýšený objem moči nad 2500 ml/den (častá u dekompenzovaného diabetu), pod 400 ml/den mluvíme o *oligourii*, pod 100 ml/den jde o *anurii* (např. při hypoxii ledvin, šoku, poklesu krevního tlaku).

Barva moči je jantarově nebo slámově žlutá. Zbarvení vyvolávají *urochrom* (žlutý) a uroerytrin (růžový). Intenzita zbarvení závisí především na koncentraci moči (ranní moč bývá nejkoncentrovanější, tudíž nejtmavší). Abnormální barvu moči způsobuje nejčastěji *krev*, která dává moči červenou až hnědou barvu, stejně tak jako *myoglobin*. *Bilirubin* nebo *methemoglobin* způsobuje hnědé až tmavohnědé zbarvení moči, podobně i *urobilin*, *melaniny*, *kyselina homogentisová (alkapton)* a *indikán*. Barvu moči ovlivňují i některá *léčiva*, např. antipyrin barví moč růžově, chinin tmavohnědě. Při podávání těchto léků je třeba pacienta vždy upozornit na změnu zbarvení moči.

Pěna bývá u čerstvé moči běžně v malé míře. Zvýšenou pěnivost může způsobit bílkovina nebo glukóza. Žlutá pěna je charakteristická pro bilirubin.

Zákal se objevuje v moči, která chladne. Čerstvá moč je normálně čirá. Zákal způsobují jednak *epitelie*, *hlen*, patologicky též *bakterie* a *hnis*. V chladnoucí moči vypadávají z roztoku anorganické i organické látky. V *kyselém moči* to bývá kyselina močová a její soli, které mají charakteristickou cihlovou barvu a lze je rozpustit přidáním KOH. V *neutrální moči* bývá zákal způsobený nejčastěji fosfáty, které se rozpustí přidáním kyseliny octové. V *alkalické moči* tvoří zákal nejčastěji uhličitany, které rovněž rozpouští kyselina octová, přičemž šumí uvolněným CO₂. Zákal, který se podařilo rozpustit až po přidání HCl, byl způsoben oxalátem vápenatým (moč bývá kyselá nebo neutrální). Zákal způsobený tuky se vyčeří éterem nebo chloroformem, hnís vytvoří rosolovitou hmotu s koncentrovaným roztokem KOH. Zákal, který nejde rozpustit ani odstranit filtrací, bývá způsoben bakteriemi.

Zápach může být charakteristický pro některá onemocnění např. *amoniak* při bakteriální infekci (bývá doprovázen stoupajícím pH), *aceton* při ketonurii (hladovění, dekompenzovaný diabetes), *maggi* při vylučování valinu, leucinu, isoleucinu (maple sugar disease).

Hustota moči se pohybuje v rozmezí 1003–1035 (1,003–1,035) a je výrazem zakoncentrování moči. Stanovení hustoty je důležité pro posouzení ledvinných funkcí (viz funkční zkoušky ledvin).

pH moči se pohybuje v rozmezí 4,7–8,0 průměrně bývá 6,0. Při vyváženém metabolismu je normální slabě kyselá moč, výkyvy pH moči jinak signalizují lehčí stavy acidózy nebo alkalózy. Těžší metabolický rozvrat ve smyslu acidózy nebo alkalózy však nemusí být sledován adekvátními změnami pH moči. Měřit pH moči má smysl jen pokud je moč čerstvá, u starší moči se bakteriálním rozkladem močoviny uvolňuje amoniak (při pokojové teplotě někdy již za 2–4 h), takže se moč stává alkalickou. Někdy se u kyselé moči stanovuje *titrovatelná acidita*, která je normálně 25–70 mmol/l.

ZÁKLADNÍ CHEMICKÉ VYŠETŘENÍ MOČI

Jedná se o zkoušky na *bílkovinu*, *glukózu*, *acetonové látky*, *krevní barvivo* a *žlučová barviva*. Většina z těchto látek je ve skutečnosti v malých kvantech normální součástí moči, ovšem citlivost běžně užívaných zkoušek je taková, že tato malá množství nelze chemicky prokázat a výsledky jsou u zdravých jedinců negativní. Pozitivní reakce tedy znamená téměř vždy patologickou přítomnost příslušné látky.

Bílkovinu v moči zdravého člověka běžně neprokážeme. Normální moč sice obsahuje asi 150 mg bílkovin za den, což je pod hranicí citlivosti běžných testů. Jedná se asi o 40 mg albuminu, o něco méně IgG, některé nízkomolekulární globuliny a konečně Tammův-Horsfallův mukoprotein, který je produkován tubulárními buňkami a je zdrojem hyalinních válců v normální moči (viz močový sediment).

Stav, kdy prokážeme bílkovinu v moči, nazýváme *proteinurie*. Jde o důležitý symptom, který provází ledvinná onemocnění. Proteinurie nastává v důsledku zvýšené permeability glomerulu, při narušené tubulární resorpci normálních množství bílkovin v glomerulárním filtrátu, nebo v důsledku tubulární exkrece. Druh bílkoviny v moči při patologické proteinurii se mění podle povahy základního onemocnění. Čím více jsou postiženy glomeruly, tím vznikají větší otvory v bazální membráně a tím větší proteiny mohou přes ní pronikat. V takovém případě označujeme proteinurii jako *neselektivní*. Naproti tomu při zachovaném menším průměru pórů bazální membrány pronikají jen některé (menší) proteiny a proteinurie se označuje jako *selektivní*. Rozlišení selektivních a neselektivních proteinurií je důležité z důvodů diagnostických i prognostických. Použitím speciálních metod (např. immunoassay) lze tyto proteinurie rozlišit. Např. dětské glomerulonefritidy provázené selektivní proteinurií mají příznivou prognosu, zatímco glomerulonefritidy s neselektivní proteinurií přecházejí obvykle v nefrotický syndrom.

Pro posouzení typu proteinurie je tedy třeba laboratorní identifikace proteinů v moči. Provádí se elektroforeticky, imunochemicky nebo gelovou filtrací. Přesná stanovení jednotlivých proteinů umožňují provést i vyšetření ledvinné clearance několika bílkovin různé velikosti (α_2 -makroglobulin, imunoglobulinu G a albuminu) a z těchto hodnot kvalitně posoudit charakter proteinurie. Někdy se z těchto důvodů posuzuje poměr hodnot clearance IgG/transferin. Některé specifické proteiny signalizují primární tubulární poškození, jako např. nález muramidasy (lysozomu) u Fanconiho syndromu, IgA při pyelonefritidě nebo nález některých enzymů tubulárního původu. Zvláštní kapitolu tvoří hodnocení proteinů v moči při posuzování stavu transplantátů ledvin, respektive posouzení časných stadií rejekcí.

Do moči snadno pronikají částečně degradované proteiny nebo atypické proteiny, které nejsou normálně přítomné v plazmě. Mezi ně patří i hemoglobin a myoglobin. Charakteristický je také tzv. *Bence-Jonesův protein*, vylučovaný močí u myelomů. Jedná se o lehké řetězce myelomového imunoglobulinu, které jsou nápadné tím, že při teplotě 45–55 °C precipitují a při vyšších teplotách se opět rozpustí.

Vedle vysloveně patologických proteinurií existují i proteinurie na okraji fyziologických poměrů. Jde o tzv. *ortostatickou (juvenilní) neboli posturální proteinurii*, která provází určité procento mladistvých, objevuje se pouze ve vzpřímené poloze a souvisí nejspíše s venózní vazokonstrikcí při bederní hyperlordóze. Proteinurie někdy provází *horečnaté stavy*, dlouhodobé vystavení *chladu*, *stresu* nebo při velké *tělesné námaze*, časté jsou proteinurie u těhotných žen. Většinou však po odeznění příčiny se proteinurie spontánně upraví.

Průkaz bílkovin v moči se provádí jejich vysrážením různými denaturačními činidly. Nejspolehlivější a nejcitlivější je srážení kyselinou sulfosalicylovou, vhodné je použití různých indikátorových proužků (Albuphan, Heptaphan atd.). Někdy se provádí i kvantitativní stanovení. Na stanovení bílkoviny nelze použít moč upravenou (konzervovanou) přidáním jakékoliv látky!

Glukóza se rovněž normálně v moči nevyskytuje, což vyplývá z výkladu o mechanismu vzniku moči. Stoupne-li však glykemie nad 9 mmol/l kapacita transportních mechanismů v tubulech nepostačí všchnu glukózu resorbovat (tubulární resorpční maximum pro glukózu je 27–33 $\mu\text{mol/s}$), glukóza zůstává v definitivní moči a ztrácí se z organismu, vzniká *glykozurie*. Ta bude tedy provázet všechny stavy se zvýšenou glykemií, především cukrovku (diabetes mellitus), některá endokrinní onemocnění (hyperparathyreoidismus, Cushigův syndrom, zvýšená produkce adrenalinu u feochromocytomu aj.), některé poruchy jater a těžké srdeční poruchy. Objeví-li se glykozurie bez hyperglykemie, jde o poruchu ledvin, a to tubulárních buněk, které zajišťují resorpci glukózy (je sníženo T_m pro glukózu), vzniká renální diabetes. Kapacita tubulárních resorpčních mechanismů klesá s věkem. Glykozurie může být i alimentární, po požití většího množství cukrů, rovněž u těhotných žen se může občas objevit, oba typy však spontánně mizí a považujeme je spíše za fyziologické.

Od pravé glykozurie (vyučování glukózy) je třeba odlišit **mellituri** (vyučování jiných cukrů), jde většinou o vrozené metabolické defekty.

Fruktózie je neobyčejně vzácná anomálie, kdy je porušen metabolismus fruktózy. Může vznikat při nadměrném požití potravin, obsahujících fruktózu (ovoce, zejména třešně a švestky, med).

Laktózie je častá u kojících matek a dětí dlouhodobě držených na mléčné dietě.

Pentozúzie je poměrně vzácná, vrozená metabolická porucha, alimentární pentozúzie se může vyskytovat „v ovocné sezóně“.

Galaktózie je jedním ze symptomů vrozené galaktózie (viz glycidový metabolismus).

Jednoduchý průkaz glukózy v moči je založen na jejích redukčních vlastnostech (obsahuje aldehydovou skupinu) nebo na schopnosti reagovat s glukózooxidázou. Pro výpočet ztrát glukózy při glykózii je třeba i kvantitativní stanovení, které se provádí polarimetricky (glukóza je opticky aktivní) nebo fotometricky po karamelizaci glukózy v moči. Všechny uvedené cukry v moči, lze dobře prokázat papírovou chromatografií.

Zkoušky na cukry zásadně provádíme až po zkouškách na bílkovinu. Bílkovina může totiž způsobit falešnou pozitivitu redukčních zkoušek, a proto je třeba při nálezu bílkoviny moč před další prací odbílkovat. Před vyšetřením je nutné omezit vitamin C.

Ketolátky (acetoacetát, β -hydroxybutyrát, aceton) jsou sice normální produkty metabolismu, avšak jejich koncentrace v tkáních a v krvi je za běžného metabolismu tak nízká, že jejich vylučování močí je zcela nepatrné (do 0,8 mmol/l) a běžně se v moči neprokáží. Vážne-li však zpracování acetyl-KoA při nedostatečné funkci citrátového cyklu (zpravidla pro absenci glykolytických produktů, hlavně oxalacetátu, nebo při nadměrném zpracování mastných kyselin), hromadí se acetyl-KoA. Ten může být přeměněn na acetoacetyl-KoA a využit pro syntézu cholesterolu, později se přeměňuje ve zvýšené míře na acetoacetát a ostatní ketolátky, ty se hromadí v organismu, způsobují *ketoacidózu* a začnou se vylučovat močí, kde se dají prokázat. Vzniká *ketonurie*. Ta provází především diabetickou ketoacidózu, ale může být i průvodním příznakem hladovění, provází febrilní stavy, zvracení a průjemy, těhotenské toxemie, acetonemické zvracení dětí a pod.

K průkazu ketolátek se využívá jejich reakce s nitroprusidem sodným v alkalickém prostředí (Legalova a Lestradetova zkouška). Reaguje přitom hlavně aceton, jehož podíl mezi ketolátkami je výrazně nejnižší (nejvíce bývá hydroxybutyrátu a poté acetoacetátu). Jde o těkavou látku, proto se zkouška musí provádět v moči čerstvé, rozhodně nelze očekávat pozitivní výsledek v moči staré, ohřáté nebo dokonce povařené. Při vyšší koncentraci acetonu v moči, můžeme cítit jeho charakteristický zápach.

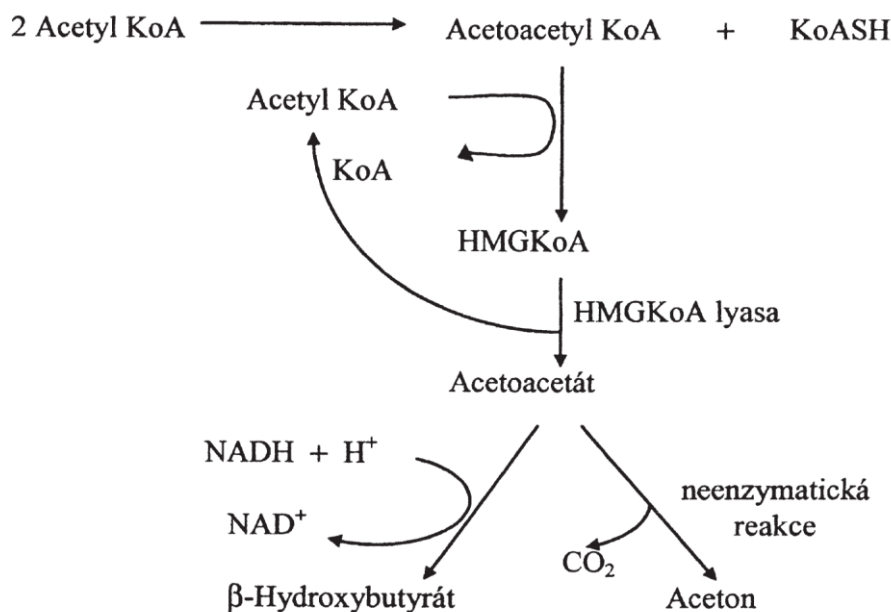
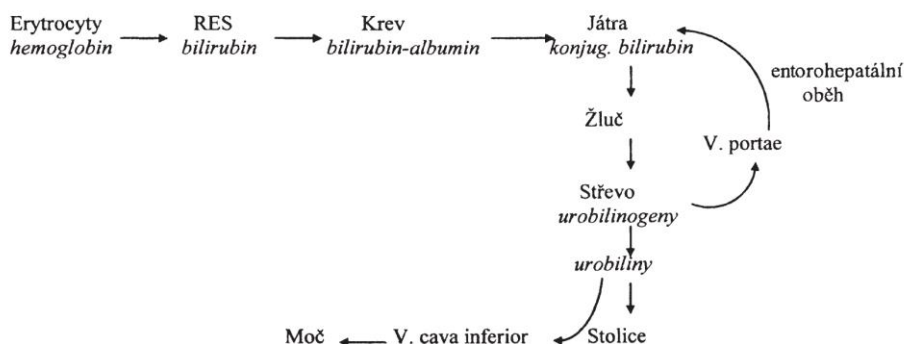


Schéma tvorby ketolátek

Krevní barvivo za normálních podmínek do moči neprochází. Za patologických okolností je můžeme v moči prokázat při *hematurii* (přítomnost krve v moči) nebo při *hemoglobinurii* (přítomnost hemoglobinu v moči). Při *hematurii* se může jednat o masivní krvácení z ledvin nebo do močových cest nebo pouze o přítomnost více než 3 erytrocytů na 1 zorné pole při vyšetření močového sedimentu. Hematurii dělíme na extrarenální a intrarenální. *Extrarenální hematurie* znamená poškození vývodných cest močových (pánvička, ureter, močový měchýř, prostata), bývá nejčastěji způsobena záněty, poraněním (často konkrémentem nebo úrazem) nebo nádorem. *Intrarenální hematurie* znamená především poškození glomerulů většinou zánětlivým procesem, časté jsou rovněž různé malignity (Grawitzův nádor aj.) nebo může být ledvina zachváčena tuberkulosou apod.

Při hemolyse z nejrůznějších důvodů (vysoká teplota, nevhodná transfuse krve, při krizi u různých anemií, působení různých jedů atd.), dochází k nadměrnému uvolnění hemoglobinu a volný hemoglobin proniká pak i neporušenou ledvinou. Krevní barvivo v moči se projeví červeným zabarvením, dále přítomností bílkoviny a konečně specifickými zkouškami, které prokazují přítomnost hemového železa. Chemicky nelze rozlišit hematurii od hemoglobinurie, neboť v obou případech prokazujeme hemové železo. *Hematurii* potvrdíme pouze *vyšetřením močového sedimentu*. Poškozením svalů se může v moči objevit také *myoglobin*, moč má v tom případě červenohnědé zabarvení.

Žlučová barviva jsou degradační produkty hemu, jejichž přeměny jsou podrobně popsány v kapitole 3.1.1. Moč na žlučová barviva vyšetřujeme tehdy, jestliže je tmavě zbarvena nebo pacient má žluté zbarvení kůže a sliznic (ikterus, žloutenka) a nebo jako součást rutinního vyšetření. Možnost přechodu do moči je logicky dána jejich výskytem v krvi. Prvý důležitý meziprodukt, transportovaný krví je bilirubin. Vázaný na albumin je přenášen z místa svého vzniku (většinou RES) do jater, kde dochází k jeho zpracování. Pomocí ligandinu je transportován do endoplazmatického retikula jaterní buňky, kde se konjuguje (s kyselinou glukuronovou), čímž se stává ve vodě rozpustný. Z jater je vylučován do žluči. Za fyziologických okolností volný bilirubin nemůže přestupovat do moči (je ve vodě nerozpustný), prokážeme jej však u žloutenek obstrukčních a z hepatálního poškození. Stanovení je založeno na oxidaci bilirubinu na zelený biliverdin nebo modrý bilicyanin. Ve střevě je bilirubin dále přeměňován na bezbarvé urobilinogeny, které se z části vstřebávají a venou portae se vrací do jater, kde jsou opět vychytány a vyloučeny do žluče. Za fyziologických podmínek se v moči neprokáží. Pozitivní Ehrlichova aldehydová reakce (p-dimethylaminobenzaldehyd + HCl) znamená jaterní poškození nebo přetížení jater při zvýšené produkci bilirubinu. Urobilinogeny se nakonec ve střevě oxidují na urobiliny a sterkobiliny, barevné (oranžové) produkty vylučované stolicí. Rovněž ty se z části vstřebávají a přes vena cava inferior se vrací do velkého oběhu a jsou vylučovány ledvinou do moči. Vyskytují se tedy pravidelně v malém množství a prokážeme je pozitivní Schlesingerovou reakcí. Naopak negativita této reakce znamená porušení pasáže žluči do střeva (obstrukční ikterus).



Diagnostickým významem se ke žlučovým barvivům řadí **žlučové kyseliny**, i když se jedná o látky chemicky zcela odlišné. Jsou to metabolity cholesterolu, tvoří je játra a jsou vylučovány žlučí. Prodělávají stejně jako některá žlučová barviva enterohepatální oběh. V moči se normálně nevyskytují, můžeme je však prokázat při obstrukčních žloutenkách a někdy při jaterním poškození.

Základní chemické vyšetření moči se opírá o jednoduché chemické reakce, jejichž provedení nevyžaduje speciální laboratorní vybavení, a proto se může provádět v každém zdravotnickém zařízení. Situaci navíc usnadňuje výroba různých tablet, které nahrazují klasické roztoky a zejména výroba indikátorových proužků. V současné době se používají především kombinované indikátory např. tuzemský *Heptaphan* firmy Lachema, které obsahují na jediném proužku indikátorové zóny pro stanovení pH, bílkovin, glukózy, ketolátek, bilirubinu, urobilinogenu a krve. Zahraniční papírky (Boehringer Mannheim či Bayer Multistix) mají navíc další políčka pro průkaz leukocytů, nitritů a orientačně stanovení hustoty moči. Většinou všechny papírky slouží pro kvalitativní vyšetření, ale porovnáním zbarvení políčka s barevnou škálou lze vyšetřovaný vzorek vyhodnotit i semikvantitativně.

Speciální vyšetření moči

MOČOVÝ SEDIMENT

Vyšetření močového sedimentu je nejpoužívanější, pro pacienta nenáročný, klinický test, který vhodně doplňuje fyzikální a chemické vyšetření moči. Moč na vyšetření musí být zcela čerstvá (do 1 hodiny po odběru), jinak dochází k rozpadu buněk a válců, zejména v moči hypotonické a alkalické.

Každý zákal moči samovolně sedimentuje a lze jej vyšetřovat kromě jiného mikroskopicky. Avšak i moč bez zjevného zákalu obsahuje určité množství elementů schopných sedimentace a hodnotitelných pod mikroskopem. Preparát močového sedimentu se připravuje šetrnou centrifugací dobře zamíchané moči, supernatant se z větší části slijí a ze sedimentu se zhotoví nativní mikroskopický preparát. Vhodnější a diagnosticky významnější je však barvený preparát. Nejčastěji se užívá *Sternheimerova supravitální cytodiagnostická metoda*, upravená podle tzv. „finské modifikace“. Používá se Lachemou dodávaná: Souprava na „*Barvení močového sedimentu*“. Metoda využívá kombinace vodných roztoků *Alciánové modři a Pyroninu B– červeně*. Touto metodou lze rozlišit erytrocyty, leukocyty, benigní a nádorové buňky a různé typy válců. Jádra buněk jsou zbarvena tmavě modře, zatímco cytoplazma je zbarvena růžově. Hodnocení počtu elementů v *jednom zorném poli* se provádí při 400 násobném zvětšení nebo se kvantitativně hodnotí počet elementů na 1 μ l.

Podle druhu elementů dělíme pak sediment na *orgánový a neorgánový*.

Větší diagnostickou cenu má *orgánový sediment*, do kterého zahrnujeme především buněčné elementy:

Epitelie – jsou buď velké polygonální a cylindrické z vývodných cest močových, které pokud nepřesáhnou limit 0–5 nemají klinický význam. Malé polygonální až kulaté buňky z ledvinných tubulů (mohou se zaměnit s leukocyty) jsou vždy patologickým nálezem a svědčí pro vážné poškození ledvin. Někdy mohou být i tukově degenerované. Jádra jsou tmavě modrá, cytoplazma růžová.

Leukocyty – normálně nacházíme 0–4 v jednom zorném poli. K jejich zmnožení dochází zejména při zánětech ledvin a vývodných cest močových, kdy při těžkých zánětech můžeme najít až chuchvalce hnisu. Mají vysokou peroxidázovou aktivitu. Jádra mají zbarvena modře, cytoplazmu růžově.

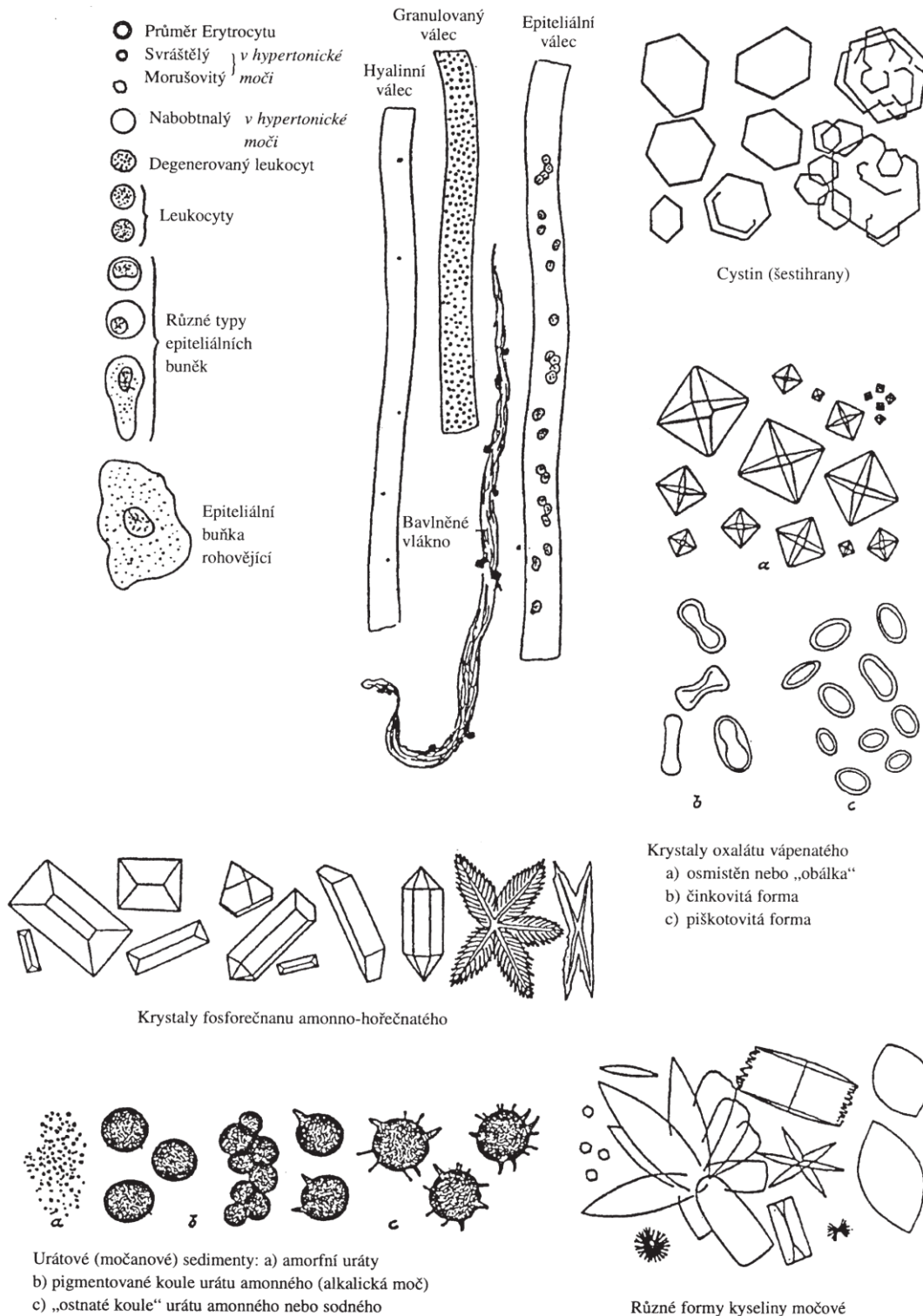
Erytrocyty – normálně jsou 0–3 v jednom zorném poli. Větší počet nacházíme při hematurii (viz výše), jejich zjištění vyloučí hemoglobinurii nebo myoglobinurii. Kromě svého typického vzhledu (kulatý, s boku piškotovitý-bikonkávní) mohou být v *hypertonickém* prostředí svráštělé, tzv. morušovitý vzhled, v *hypotonickém* prostředí naopak praskají a nacházíme pouze jejich zbytky. Ve starší moči z nich bývá vylouženo krevní barvivo, takže nalezneme jen stromata (stíny) erytrocytů. Zbarvení mají růžové až šedorůžové.

Válce – jsou jakési odlitky ledvinných tubulů nebo sběrných kanálků a jsou vždy renálního původu. Základem válců bývá často sražená bílkovina, zpravidla mukoprotein Tammův-Horsfallův, produkovaný tubulárními buňkami. Tím dojde k ucpání tubulu a tlakem nově vznikající moči je sraženina vypuzena ven jako *hyalinní válec*. Jsou to jediné válce, které v malém množství nacházíme fyziologicky. Často vznikají při dehydrataci, horečkách a acidóze. Splením dalších elementů orgánového sedimentu vznikají válce: *erytrocytární* zejména při hematurii renálního původu, *leukocytární* při zánětlivých procesech v ledvině (pyelonefritida), *epiteliální* a vzácněji *voskové válce* (vznikají tukovou degenerací tubulárních buněk) ukazují na závažná poškození ledvin, *granulované válce* jsou tvořeny granuly původem z denaturovaných bílkovin při proteinurii a degenerovanými tubulárními epitelii, svědčí rovněž pro poškození ledvin. *Pseudoválc*e jsou náhodné splepiny amorfního nebo krystalického sedimentu.

Další součástí močového sedimentu mohou být: *bakterie, paraziti, kvasinky* (častý výskyt u diabetiků), *spermie, tkáňová a buněčná drť, hlen a různá znečištění*.

Hodnocení močového sedimentu se provede tak, že se prohlídne minimálně 20 zorných polí v mikroskopu při 400 násobném zvětšení a nález se vyjadřuje průměrným počtem elementů na jedno zorné pole. Sediment lze však hodnotit i zcela kvantitativně. Tzv. *Addisův sediment* znamená sběr moči po dobu 24 h (nebo 12 h) a počítání elementů v komůrce. V současné době se provádí tzv. *Hamburgerův sediment* (rychlost, jakou jsou do moči eliminovány morfologické elementy), zejména při močových infekcích. Moč se sbírá po dobu *přesně 3. hodin* (mezi 7. a 10. hodinou ranní), její množství musí být v rozmezí 30–250 ml, *osmolalita* > 300 mmol/kg a *pH* < 7,5. Nález se udává v počtech elementů za časovou jednotku. Normální hodnoty jsou: *erytrocyty do 33/s, leukocyty do 67/s a hyalinní válce do 1/s*.

Diagnosticky mnohem méně významný je **neorganový sediment**, poněvadž se jedná o normální součásti moči, které vypadávají z roztoku v důsledku snížení teploty a v závislosti na změnách pH. Jen vyjimečně může výskyt určité látky v sedimentu signalizovat metabolickou poruchu (*vrozené aminoacidurie, zejména nález krystalů cystinu je vždy patologický*). Sraženiny jsou buď *amorfní* nebo tvoří charakteristické *krystaly*, kterým se v poslední době opět začíná věnovat pozornost, neboť se předpokládá jejich význam při tvorbě močových konkrémentů, onemocnění, které je stále častější. V *kyselé moči* bývají amorfní sraženiny soli kyseliny močové, v *alkalické moči* bývají amorfní fosfáty a uhličitany. Charakteristické krystaly žluté barvy tvoří kyselina močová, žluté jsou též krystaly močanu amonného. Ostatní krystaly jsou bezbarvé: oxalát vápenatý, fosforečnan amonno-hořečnatý a vápenatý, uhličitán vápenatý. Krystaly tvoří také cholesterol, cystein, leucin, tyrosin aj.



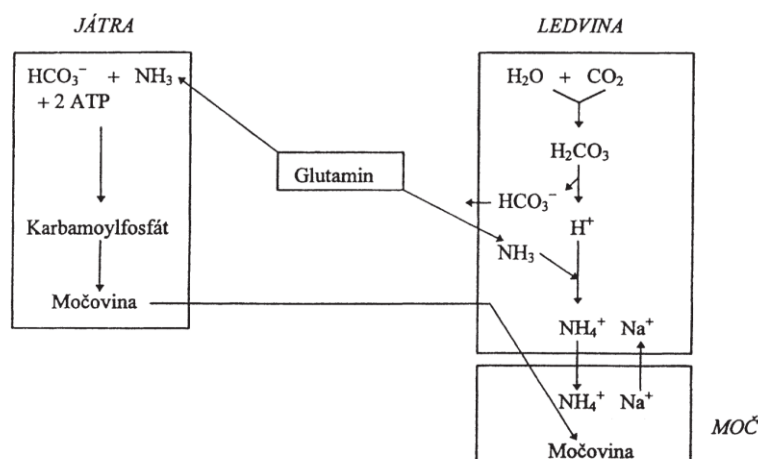
DUSÍKATÉ LÁTKY V MOČI

Produkty dusíkatého metabolismu se vylučují z největší části právě močí. *Močovina* je syntézována v játrech a jako hlavní degradační produkt aminokyselin dosahuje normálně ze všech složek moči nejvyšší koncentrace (333–583 mmol/24 h). Její vylučování závisí na příjmu bílkovin, zvyšuje se, kdykoliv se zvyšuje katabolismus bílkovin (při horečce, diabetu atd.). Je v určité rovnováze s amonným iontem (30–75 mmol/24 h), jehož vylučování stoupá při acidóze na úkor močoviny, což představuje jeden z hlavních regulačních mechanismů acidobazické rovnováhy organismu (viz schéma). Při acidóze se oslabí tvorba močoviny v játrech, která mimo jiné spotřebovává HCO_3^- . Glutamin se přesune do ledvin, kde se z něho uvolní NH_3 (amoniak), který se pak vyloučí jako amonný iont (nahradí v moči Na^+) a zároveň se formuje HCO_3^- , tedy alkalická složka základního pufru organismu.

Zvýšené nebo snížené vylučování močoviny a amonného iontu souvisí především s dietními okolnostmi a s chorobnými stavy v rámci celkové dusíkaté bilance organismu.

Výrazem degradace purinových sloučenin je vylučovaná *kyselina močová* (normální hodnoty 15–45 mmol/24 h). Větší význam má ovšem sledování její hladiny v krvi. Zvýšené vylučování provází všechny stavy se zvýšeným rozpadem buněk, zejména buněk obsahujících jádro (leukocyty, nádorové buňky po ozáření nebo po podání cytostatik), dále při požívání stravy bohaté na puriny (vnitřnosti, játra). Pro svoji špatnou rozpustnost je kyselina močová častou součástí zákalů a také neorganového sedimentu. Její nebezpečí spočívá v tom, že se ukládá v různých částech těla (svaly, klouby) ale zejména v ledvinách, kde je častým zdrojem močových konkrementů, zvláště u lidí, kteří trpí chorobou zvanou dna (viz kapitola krev).

Kreatinin je produktem odbourávání kreatinu. Endogenně se vytváří u každého jednotlivce poměrně ve stálém množství, bez závislosti na skladbě potravy. Je normální součástí moči v množství 9–16 mmol/24 h a jeho vylučování se sleduje v rámci funkčního vyšetření ledvin (viz kapitola 2.4). Při jednostranné masité stravě,

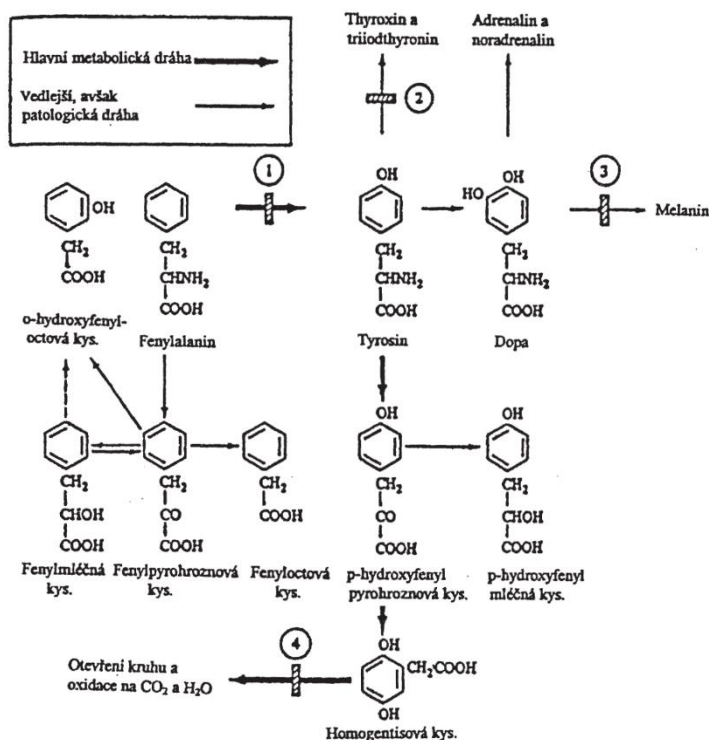


při nadměrné svalové činnosti a při některých chorobných stavech se vylučování kreatininu zvyšuje, jiné patologické okolnosti (např. těžké poškození jater) mohou vést ke sníženému vylučování. Jeho metabolický prekursor kreatin je normálně přítomen v moči dětí, zatímco u dospělých je jeho přítomnost patologická.

V moči nacházíme pravidelně také *aminokyseliny*, avšak v nízkých koncentracích (do 14 mmol/24 h). Stanovujeme je jako tzv. celkový α -aminodusík reakcí s ninhydrinem. Aminokyseliny jsou v tubulech aktivně resorbovány, podobně jako glukóza, a proto vyšší *aminoacidurii* považujeme za patologickou. Většinou jde o projev postižení tubulů, vážne zejména zpětná resorpce příslušných aminokyselin, při normální hladině v krvi, vzniká *renální aminoacidurie*. Např. *cystinurie* je geneticky podmíněný defekt tubulární resorpce cystinu a basických aminokyselin – lysinu, argininu a ornithinu. Z nich nejhůře rozpustný cystin krystalizuje v tělních tekutinách (především v moči) a vede ke vzniku cystinových kamének.

Při některých dědičných onemocněních nebo u jaterních onemocněních produkce několika nebo i jedné aminokyseliny převyší resorpční kapacitu ledvinných tubulů a dochází k tzv. „overflow“ *aminoacidurii* (např. homocystinurie).

Abnormální metabolity aminokyselin vylučovaných močí svědčí rovněž pro vrozené metabolické poruchy. Hojně jsou v oblasti přeměn aromatických aminokyselin. Vrozený defekt hydroxylace fenylalaninu na tyrosin (chybí enzym fenylalaninhydroxyláza) se projevuje vznikem abnormálních metabolitů: fenylpyruvátu, fenylalaninu, a kyselin o-hydroxyfenylactové, fenylmléčné a fenylactové. Všechny tyto látky se hromadí v těle, některé jsou vylučovány do moči, kde mohou být detegovány např. fenylpyrohroznová kyselina (fenylketonurie). Většina těchto metabolitů je vysoce toxická pro vyvíjející se CNS, takže se porucha klinicky manifestuje, dříve se užíval i název: „*Oligophrenia phenylpyruvica*“. Účinná prevence tohoto onemocnění spočívá především ve včasné diagnóze, a proto se dnes všichni novorozenci screeningově vyšetřují ihned po narození (odebírání se krev z patičky na Guthrieho mikrobiologický test, kdy se prokazuje přítomnost kys. fenylactové a fenylalaninu v krvi). Je bezpodmínečně nutné *okamžitě zavedení speciální diety téměř bez fenylalaninu*.



Místa možného zablokování metabolické dráhy pro: 1. fenylketonurii, 2. jednu forem kretenismu, 3. albinismus a 4. alkaptonurii.

Mnoho vrozených defektů se týká metabolismu aminokyselin s rozvětveným řetězcem, leucinu, isoleucinu a valinu. Jedná se o defekt nebo abnormalitu běžné oxidační dekarboxylázy, vedoucí ke zvýšenému vylučování těchto aminokyselin a také jejich ketokyselin (oxokyselin). Porucha je označována jako „*nemoc javorového sirupu*“ (*Maple-sirup urine disease*).

Jiná porucha je *alkaptonurie*, vrozená neschopnost štěpit kyselinu homogentisovou (alkapton), metabolit tyrosinu, který se prozradí výraznými redukčními vlastnostmi. Další vrozené poruchy spojené s vylučováním tyrosinu je *tyrosinosa* eventuelně *albinismus*. Kožní pigment melanin je totiž rovněž produkt přeměny tyrosinu. Melanin se může patologicky vyskytovat v moči při melanoblastomu.

Normální moč obsahuje rovněž malá množství *porfyrinů* a jejich prekursorů, tj. porfobilinogenu (do 6 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$) a δ -aminolevulové kyseliny (průměrně 20 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$). Porfyriny se v moči patologicky zvyšují při kongenitálních nebo i získaných porfyrinách různého typu, při některých poruchách jater a při infekcích. Vylučování uvedených prekursorů ve zvýšené míře doprovází poruchy krvetvorby a intoxikace olovem. Postižený bývá velice citlivý na světlo, má tmavou moč a zvýšenou pigmentaci pokožky. Za určitých okolností, kdy je podezření na *akutní porfyrii* (vrozený defekt metabolismu porfyrinů) má být na odděleních jako je např. úrazová chirurgie aj. při nejasné diagnóze proveden test na porfobilinogen. Je shodný s Ehrlichovým aldehydovým testem na urobilinogen, avšak vzniklé zbarvení se nevytřepe do amylalkoholu.

Klinická enzymologie

ENZYMOVÁ AKTIVITA SÉRA

Stanovení enzymových aktivit v krvi, plazmě, nebo v krevním séru patří mezi základní biochemická vyšetření. Ve speciálních případech je možno stanovit enzymy i v biotickém materiálu, zejména při podezření na vrozenou metabolickou poruchu. V krvi lze prokázat velké množství různých enzymových aktivit. V zásadě rozlišujeme enzymy, jejichž aktivita v krvi je vyšší než v buňkách a krev je tudíž kompartment, kde provozují svou funkci, a enzymy, které nemají plazmatickou funkci a jejich nitrobuněčná aktivita podstatně převyšuje aktivitu plazmatickou. Do první skupiny enzymů řadíme např. pseudocholinesterázu, cholesterolesterázu, ceruloplazmin a proenzymy koagulace a thrombolýzy. Protože vznikají v hepatocytech a jsou secernovány do krve, můžeme je nazvat také *enzymy sekrečními*. Jejich aktivita je poměrně vysoká, diagnosticky je důležité její snížení, protože poukazuje na genetický defekt nebo poruchu produkčního orgánu.

Druhá skupina enzymů se za normálních okolností prokazuje jen velmi citlivými metodami. Patří k normální buněčné výbavě nebo jsou vylučovány žláзовými orgány trávicího traktu. Jejich přítomnost se přičítá přirozené obměně buněk ve tkáních a nejvíce jich pochází z orgánů s rychlým metabolickým obratem (játra, pankreas). Ke zvýšení jejich aktivity dochází v souvislosti s poruchou orgánu, ve kterém se vyskytují, takže indikují jeho postižení. Odtud pochází název *enzymy indikační*. Je však nutno dodat, že vzestup některých enzymových aktivit lze vyprovokovat i některými látkami, známá je např. indukce jaterních aminotransferáz barbituráty a alkoholem. Indukci je ovšem nutno odlišit od toxických projevů. Předpokladem průniku enzymů z buněk do extracelulárních tekutin je porušení buněčné membrány. Nejmírnějším stupněm je postižení energetického metabolismu buňky, které vede k poruše transportu iontů s retencí vody a ke kalcium podminěné vezikulaci části buněčných membrán. To může být provázeno dočasným vyplavováním *cytoplazmatických enzymů*. Při pokračující poruše dochází k narušení kontinuity membrány, což je již jev nevratný. Nejprve unikají cytoplazmatické enzymy, později *enzymy mitochondriální*.

Enzymy lyzozomální se uvolňují jako poslední a likvidují struktury již zaniklé buňky. Z hlediska časné diagnózy je tedy prvořadé stanovení vzestupu aktivit cytosolových enzymů, průkaz enzymů vázaných na membrány či buněčné organely je pak úměrné spíše hloubce postižení.

Při hodnocení zvýšených hladin intracelulárních enzymů je třeba přihlídnout k *enzymovému profilu* jednotlivých orgánů. Některé enzymy mají totiž ubikvitární výskyt, nacházejí se prakticky ve všech buňkách, jako např. enzymy glykolýzy (laktátdehydrogenáza, aldoláza), takže jejich nález nemusí vést přímo k diagnóze orgánového postižení. U řady enzymů je však řádový rozdíl v expresi u různých orgánů, takže nález zvýšených aktivit je již informativní. Tak např. ALT převládá v játrech, AST ve svalech, játrech a erytrocytech, kreatinkináza ve svalech, kyselá fosfatáza v prostatě. Jen málo enzymů je absolutně orgánově specifických. Jako příklad lze uvést sorbitoldehydrogenázu, vyskytující se výlučně v hepatocytech. V případě aminotransferáz je možno využít faktu, že AST je přítomna jednak v cytoplazmě jaterních buněk podobně jako ALT, jednak v mitochondriích, kde se ALT nenachází, takže poměr těchto dvou aminotransferáz se mění podle závažnosti postižení hepatocytu. Při poměru AST/ALT (*DeRitisův kvocient*) menším než 1 se jedná o lehké postižení s přítomností plazmatické formy AST, vzestup nad 1 už signalizuje únik mito-

chondriální frakce, což je ukazatelem nekrózy jaterních buněk. Zvláštní situace je u enzymů, které se normálně vylučují do trávicího traktu (*sekreční enzymy*). Jedná se o amylázu, lipázu, jaterní alkalickou fosfatázu a leucinarylamidasu (leucinaminopeptidasu). V případě amyláz v klidu převládá enzym produkovaný příušní žlázou, při nekrose pankreatu prudce stoupne enzym slinivky břišní, vyplavovaný z acinů lymfatickými cestami. Aktivita posledních dvou jmenovaných enzymů se zvyšuje při stagnaci žluči následkem uzavěru žlučových cest.

Enzymové profily vybraných orgánů

	srdce	játra	kosterní sval
AST			
ALT			
SD			
LD ₁			
LD ₅			

Při enzymologickém monitorování poruch je třeba sledovat aktivity jednotlivých enzymů v čase a hodnotit je vzhledem k jejich *poločasu odbourávání* (biologickému poločasu). Je to doba, za kterou by aktivita enzymu klesla na polovinu, pokud by nebyl doplňován ze tkání. Poločasy inaktivace kolísají od 3–6 hodin u amylázy do 10 dnů u alkalické fosfatázy, cholinesterázy a lipázy. K odbourávání dochází po endocytóze hlavně v játrech a ve slezině. Na krátkém poločasu amylázy se podílí především vylučování v ledvinách, vzhledem k poměrně malé molekule (MH 50 tis.). Zahuštění moči pak způsobuje nález vyšších aktivit v moči než v krevním séru. Při renální insuficienci ovšem vylučování ledvinou klesá a sérové hodnoty jsou pak vyšší. Vylučování je vzácně blokováno při vytvoření plazmatických komplexů mezi amylázou a imunoglobulinovými molekulami, které neprojdou glomerulární membránou (makroamylasemie). Trvá-li porucha tkáně, produkující indikační enzymy déle (např. u cirhózy jater), může dojít k poklesu celkové proteosyntézy natolik, že se enzymové zvýšení zdánlivě normalizuje. Obecně tedy pokles aktivit může znamenat jak reparaci chorobného procesu, tak selhávání funkce produkujícího orgánu.

Většina klinicky významných enzymů se vyskytuje ve dvou nebo více variantách, které se nazývají *izoenzymy*. Jedná se o molekuly se stejnou, nebo velmi blízkou enzymovou aktivitou, ale s určitými změnami v aminokyselinovém složení. Rozdíly ve fyzikálně-chemických vlastnostech se využívá k separaci a identifikaci izoenzymů. V předchozí kapitole jsme se již setkali s existencí 5 izoenzymových forem laktátdehydrogenázy. Zmíněná cytosolová a mitochondriální forma AST jsou také izoenzymy, další příklady uvidíme u fosfatáz. Od izoenzymů musíme odlišit enzymové molekuly, lišící se pouze svou sacharidovou složkou, tj. charakterem posttranslačních modifikací, při stejném genovém transkriptu. Tyto produkty jsou uváděny jako *izoformy enzymů*.

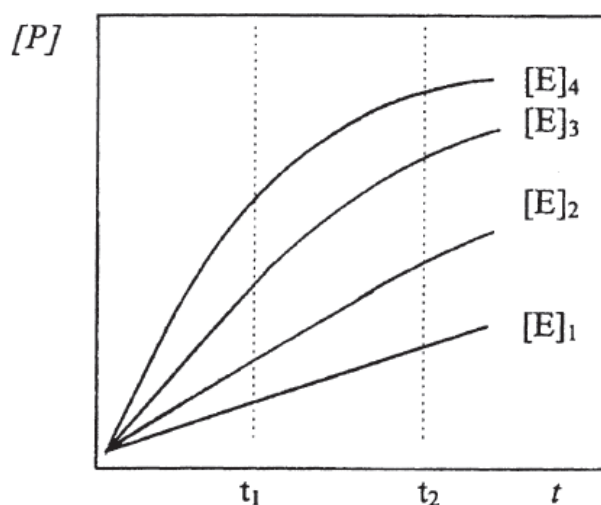
STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY A JEJÍ VYJADŘOVÁNÍ

Množství enzymu se v enzymologii zpravidla nahraňuje pojmem *enzymová aktivita* a místo pojmu koncentrace enzymu se užívá aktivita vztahená na 1 litr vyšetřované tekutiny (*katalytická koncentrace*). Výjimku tvoří výsledky speciálních imunochemických metod, které mohou jako antigen detegovat i degradované formy enzymů, které by nebyly dostatečně aktivní při kinetických měřeních. Zde se výsledky vyjadřují v jednotkách hmotnostní koncentrace ($\mu\text{g/l}$). Jednotkou enzymové aktivity je množství substrátu (*mol*) přeměněné za jednotku času (*s*) a nazývá se *katal* (*kat*). V oblasti klinické biochemie připadají v úvahu odvozené jednotky μkat a nkat , aplikované na katalytickou koncentraci pak $\mu\text{kat/l}$ a nkat/l .

Při stanovení aktivit musí být definovány podmínky katalytické reakce, snahou je, aby byly optimální pro činnost vyšetřovaného enzymu. Protože se katalytická koncentrace enzymu stanovuje z *rychlosti enzymové reakce*, musí být množství biologického materiálu, substrátu a kofaktorů takové, aby rychlost v prakticky měřitelném intervalu odpovídala *rychlosti maximální* (viz výklad kinetiky enzymových reakcí). Základní podmínkou je proto dostatek substrátu aby byla splněn předpoklad $[S] > K_m$, v druhé řadě pak přiměřená aktivita enzymu. Ideální technikou je kinetické měření ve více časových intervalech, při kterém se vybere úsek s největším sklonem pro výpočet maximální rychlosti reakce. Na následujícím schématu je znázorněn průběh tvorby produktu při různých aktivitách enzymu. Všimněte si, jak se mění přírůstek produktu ve druhém časovém intervalu při vyšších katalytických koncentracích enzymu, kdy dochází k rychlému poklesu koncentrace substrátu:

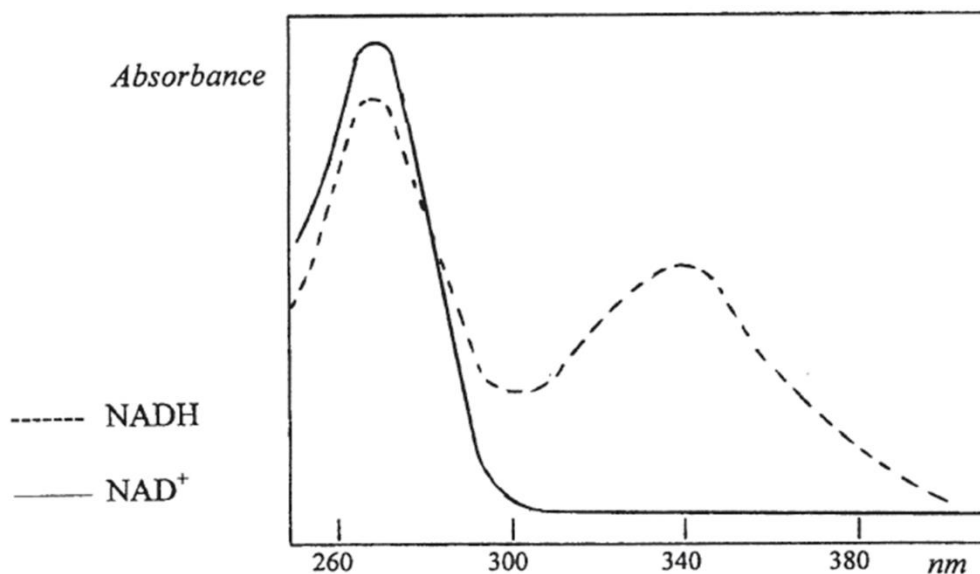
Při sledování enzymové reakce dáváme v klinickobiochemických laboratořích přednost optickým metodám. Je lhostejné, zda sledujeme přírůstek produktu nebo úbytek substrátu. Některé produkty je možno stanovit fotometricky ve viditelném světle, např. fosfatázy odštěpují žlutý p-nitrofenol z p-nitrofenylfosfátu. Zde můžeme využít běžný fotometr s wolframovou žárovkou jako zdrojem světla. Jiné produkty je možno stanovit následnou jednoduchou reakcí se vznikem barevného adduktu, jako např. DNP-hydrazonu

kys. pyrohroznové při testu na aminotransferázy. Ukázalo se však, že nejspolehlivější jsou metody založené na sledování *změny koncentrace pyridinových koenzymů*, které se účastní enzymové reakce oxidoredukčního typu buď přímo, jako je tomu u stanovení laktátdehydrogenázy, nebo jsou kofaktory spřažené reakce, kvantitativně přeměňující produkt (viz alternativní stanovení aminotransferáz). Tato metoda, známá pod názvem *Warburgův optický test*, je založena na rozdílech v UV absorbanci redukované a oxidované formy pyridinových koenzymů. NADH má druhý vrchol absorpance při vlnové délce 340 nm, kde NAD^+ má absorpanci nulovou. Je-li UV-spektrofotometr nastaven na tuto délku, při redukčním procesu měříme úbytek, při oxidačním ději přírůstek absorpance.



Kinetika enzymových reakcí při různých katalytických koncentracích enzymu

Rutinní metody stanovení enzymových aktivit jsou zatíženy největší průměrnou chybou ze všech klinickobiochemických vyšetření (uvádí se asi 15 %), což je zčásti dáno choulostivostí metodik samotných. O tom se ostatně studenti sami přesvědčí při praktických cvičeních. Je dále třeba vyvarovat se všech technických chyb při manipulaci se vzorkem před vyšetřením, tj. dodržovat zásady správného odběru materiálu, krev by měla být co nejdříve odstředěna (aby se zabránilo kontaminaci séra erytrocytárními enzymy) a krevní sérum uchováváno při 4 °C, event. zmrazené, a to co nejkratší možnou dobu. Při vyšších koncentracích enzymu je nutno sérum ředit, což je zdrojem dalších chyb. K ředění by se mělo užívat tepelně inaktivované sérum.



Warburgův optický test

NÁZVOSLOVÍ A KLINICKÝ VÝZNAM RUTINNĚ VYŠETŘOVANÝCH ENZYMŮ

Aldoláza (ALD): štěpí fruktosa-1,6-bisfosfát

- orgánově nespecifická, stoupá hlavně u poškození jater a svalů
- norma do 50 nkat/l.

α -Amyláza (AMS): hydrolyzuje škrob a glykogen v centru molekul, produkuje oligosacharidy

- jsou známy slinná (S) a pankreatická (P) izoforma, liší se od sebe sacharidovou složkou, lze je od sebe odlišit pomocí lektinů nebo specifických protilátek, vzestup jednotlivých izoform u chorob pankreatu, zejména akutní nekrosy, a u chorob slinných žlaz (parotitis), další informace v oddílu 5.3.1, vylučování močí, kde jsou vzhledem ke zkoncentrování vyšší aktivity
- norma AMS(sérum): do 2,0 μ kat/l, AMS(moč): do 8 μ kat/l.

Alaninaminotransferáza (ALT): L-alanin-2-oxoglutarát-aminotransferáza

- cytoplazmatický enzym, nejvyšší aktivita v hepatocytech, podílí se na přeměnách aminokyselin a eliminaci α -aminodusíku, podrobnosti v kap. 5.3.1, zvyšuje se při chorobách jater (hepatitis, inf. mononukleóza, toxická poškození)
- norma do 0,8 μ kat/l.

Aspartátaminotransferáza (AST): L-aspartát-2-oxoglutarát-aminotransferáza

- nejvyšší koncentrace v játrech a srd. svalu, existuje izoenzym plazmatický a mitochondriální, podrobnosti viz oddíl 5.3.1., vzestup při infarktu myokardu, postižení hepatocytů (zejména těžších), poškození kosterních svalů, třeba hodnotit vzhledem k aktivitě ALT
- norma do 0,8 μ kat/l.

Fosfatáza alkalická (ALP): hydrolyzuje monoestery kys. fosforečné v alkalickém prostředí

- existují tři izoenzymy ALP: (1) placentární, (2) střevní, (3) izoenzym kostí, jater a ledvin, při čemž kostní a jaterní izoenzym se vyskytuje v odlišné izoformě oproti ledvinovému (nepřítomen v séru), zvýšení při jaterních afekcích spojených s cholestázou a u onemocnění kostí (obtěže s rozlišením), fyziologicky jako výraz osteoblastické aktivity u dětí, placent. izoenzym stoupe v těhotenství
- norma u dospělých: 0,7-2,2 μ kat/l.

Fosfatáza kyselá (ACP): hydrolyzuje monoestery kys. fosforečné v kyselém prostředí

- vyskytuje se nejvíce v prostatě, obsažena také v kostech, erytrocytech a trombocytech, prostatický izoenzym je tartarát labilní, stoupe při karcinomu prostaty, zejména při jeho generalizaci, izoenzym kostní, erytrocytární a trombocytární je tartarát stabilní (využívá se při stanovení), stoupe při osteoklastických procesech kostních, fyziologicky je zvýšen u dětí, zvyšuje se při hemolýze, proto je lépe vyšetřovat plazmu, ACP je nestabilní při fyziologickém pH, plazmu je nutno okyselit citrátovým pufrem
- norma ACP(muži): pod 108 nkat/l, ACP(ženy): pod 92 nkat/l.

γ -Glutamyltransferáza (GMT): přenos γ -glutamylového zbytku na peptidový akceptor

- obsažena hlavně v hepatocytech a stěnách žlučových cest, v tubulárních buňkách ledvin, význam nejasný, zvyšuje se zejména u toxických postižení jater (alkohol, léky) a při obstrukcích žlučových cest
- norma GMT(muži): pod 1,2 μ kat/l. GMT(ženy): 0,7 μ kat/l.

Glutamátdehydrogenáza (GMD): oxidoreduktáza deaminující kyselinu glutamovou, NAD⁺ závislá

- obsažena v mitochondriích jaterních buněk, zvyšuje se při těžším jaterním postižení (nekrózy)
- norma: do 23 nkat/l.

Cholinesteráza (CHS): hydrolýza esterů cholinu

- v erytrocytech specifická **acetylcholinesteráza**, v séru **pseudocholinesteráza** secernovaná játry, štěpí i jiné estery, klinicky významné je snížení aktivity, provázející těžké jaterní léze, intoxikaci organofosfáty, a vrozený defekt enzymu, manifestující se hlavně při aplikaci myorelaxancií typu sukcinylcholinu v souvislosti s operačním zákrokem
- norma: 76–230 μ kat/l.

Kreatinkináza (CK): ATP: kreatin-fosfottransferáza

- nejvíce obsažena v kosterním a srdečním svalu a v mozku, dimer ze subjednotek dvou typů, M(muscle), B(brain), možné tři kombinace, BB v mozku, v krvi jen při mozkových nádorech, MM v kosterních svalech a srdci, myokard však obsahuje více hybridního MB izoenzymu, takže zvýšený podíl MB při vzestupu CK (**CK-MB**, samostatně stanovitelný při inhibici M subjednotek) podporuje diagnosu infarktu, jinak nejvyšší hodnoty CK u svalových dystrofií, mírný vzestup i po nadměrném svalovém výkonu u netrenovaných
- norma CK(muži): pod 3,2 μ kat/l, CK(ženy): pod 2,4 μ kat/l, CK-MB: pod 0,4 μ kat/l, nebo pod 6 % celkové aktivity CK.

Laktátdehydrogenáza (LD): L-laktát:NAD⁺oxidoreduktáza

- jako závěrečný enzym anaerobní glykolýzy se vyskytuje prakticky ve všech tkáních, podrobnosti v kap. 5.2.3., tetramerní struktura, 2 typy subjednotek (H, M), 5 izoenzymů, H₄ hlavně v myokardu a erytrocytech, stoupe u infarktu a při hemolýze, H subjednotky schopny dehydrogenovat i α -hydroxybutyrát, proto je ekvivalentní stanovení aktivity α -**hydroxybutyrátdehydrogenázy (HBD)**, M₄ v játrech a ve svalech, stoupe u jaterních chorob a svalových dystrofií jako CK
- norma LD: pod 4 μ kat/l
- norma HBD: pod 6 μ kat/l.

Leucinarylamidáza (LAS, dříve leucinaminopeptidáza): štěpí jednoduché peptidy s leucinem i jinými aminokyselinami

- vyskytuje se hlavně v hepatocytech a buňkách žlučových cest, zvýšené aktivity provázejí zejména uzávěry žlučových cest
- norma: 0,13–0,37 μ kat/l.

Lipáza (LPS): hydrolýza triacylglycerolů na monoacylglyceroly a mastné kyseliny

- jedná se o enzym vylučovaný pankreatem, třeba odlišit od lipoproteinové lipázy, obsažené v endothelu cév (viz kapitola Lipoproteiny), stoupá u pankretických poruch, zejména akutní nekrosy, podobně jako pankreatický izoenzym amylázy
- norma: pod 3,2 $\mu\text{kat/l}$.

Sorbitoldehydrogenáza (SD): katalyzuje přeměnu sorbitolu na fruktosu

- enzym specifický pro jaterní buňky, zvyšuje se u různých poruch jater, u infarktu pouze dojde-li k jaterní hypoxii
- norma: pod 6,7 nkat/l.

Z dalších, méně častých stanovení, je možno uvést vyšetření *5'-nukleotidasy*, která se zvyšuje při uzávěrech žlučových cest, **thymidinkinázy (TK)**, která stoupá v krvi při rakovinném bujení, takže se řadí k tzv. tumorovým markerům, stanovení *prostata-specifického antigenu (PSA)*, který je vlastně proteolytickým enzymem a jeho přítomnost v krvi signalizuje rakovinu prostaty. PSA je z větší části v komplexu s antichymotrypsinem a alfa-2-makroglobulinem, menší část je volná. Hraniční koncentrace celkového PSA je asi 6 $\mu\text{g/l}$.

ENZYMY ENERGETICKÉHO METABOLISMU: ALDOLÁZA, LAKTÁTDEHYDROGENÁZA

Buňky získávají energii degradací energeticky bohatých sloučenin především při glykolýze, při β -oxidaci mastných kyselin a v cyklu kys. citronové, což jsou procesy napojené prostřednictvím redukovaných koenzymů na oxidativní procesy dýchacího řetězce. V následujícím textu uvidíme, že nález některých enzymů

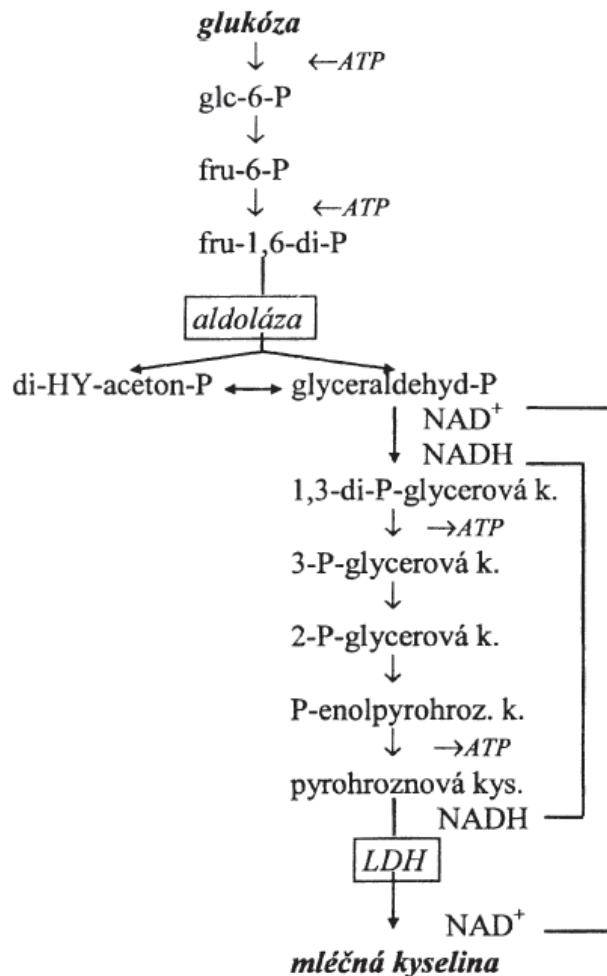


Schéma anaerobní glykolýzy

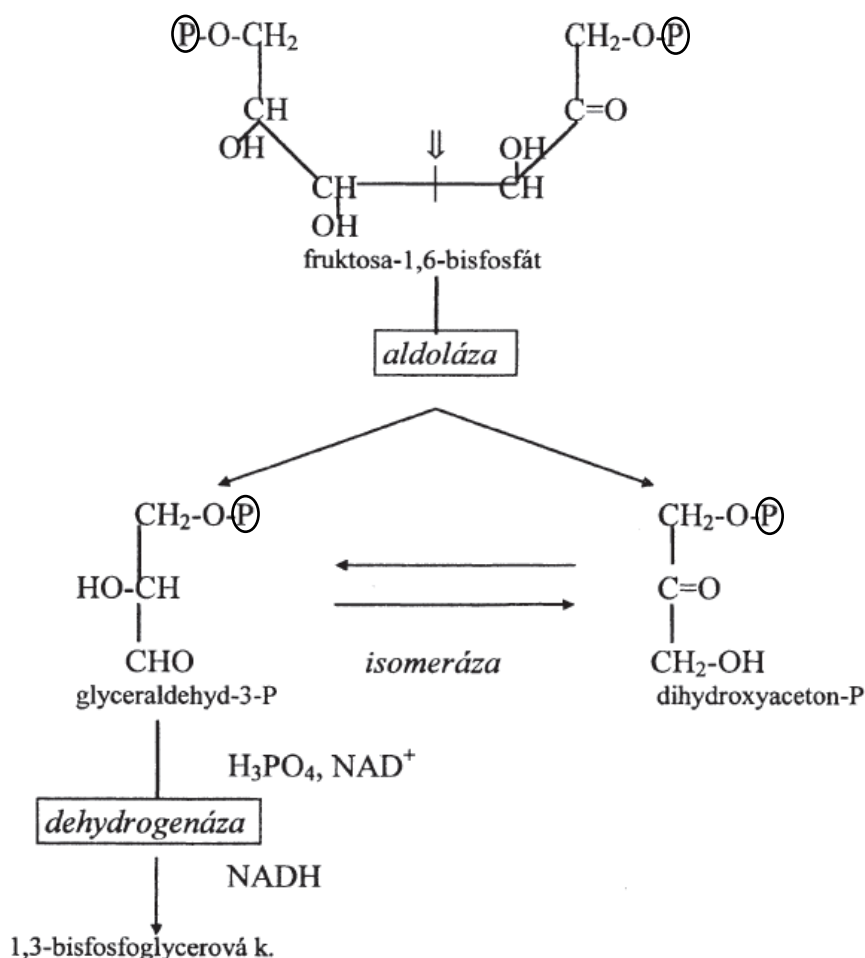
zmíněných drah v séru má také medicínský význam jako více nebo méně specifický indikátor orgánového poškození.

Při anaerobní glykolýze je konečným produktem odbourávání glukózy *kys. mléčná*. Vzniká např. ve velkém množství v pracujícím svalu, nestačí-li nabídka kyslíku krýt potřeby tkáňového dýchání. Konverze pyruvátu na laktát je zde nutná z energetických důvodů, neboť glykolýza a tím i produkce ATP na úrovni substrátů mohou probíhat jen při regeneraci NAD^+ z NADH , vzniklého při oxidaci glycerinaldehyd-P na di-P-glycerovou *kys.* Kyselina mléčná je dodatečně regenerována v játrech na glukózu. Některé tkáně mají zvlášt dobře vyvinutou schopnost krýt energetickou spotřebu glykolýzou za anaerobních podmínek. Vedle tkáně svalové to jsou např. nádorové buňky. U bakterií mléčného kvašení se jedná dokonce o hlavní metabolickou dráhu.

Pro osvěžení znalostí základních reakcí anaerobní glykolýzy včetně role pyridinových koenzymů připojujeme zjednodušené schéma této důležité metabolické dráhy.

Funkce a vlastnosti aldolázy

Aldoláza umožňuje jeden z klíčových kroků glykolytické dráhy, totiž štěpení **fruktosa-1,6-bisfosfátu** na dvě triosy, glycerinaldehyd-P a dihydroxyaceton-P. Tyto dva produkty jsou vzhledem k dalšímu průběhu glykolýzy rovnocenné, díky zapojení fosfotriosoisomerázy, která zajišťuje vzájemnou konverzi obou trios. Tak může glycerinaldehyd-P, který je dehydrogenován na fosfoglycerovou kyselinu, vznikat rovnoměrně z obou produktů. Rovnováha izomerizace je posunuta na stranu dihydroxyacetonfosfátu (96 %).

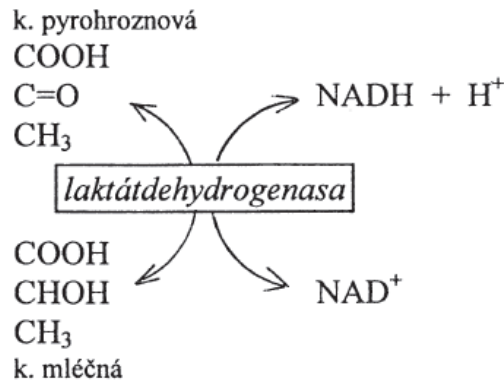


Aldoláza je nitrobuněčný enzym, lokalizovaný v cytoplazmě, ve vysoké koncentraci zejména u svalových, méně jaterních buněk. Při destruktivních pochodech těchto tkání se objeví i v krevním séru, jeho nález však není příliš specifickým ukazatelem. Protože se vyskytuje i v červených krvinkách, automaticky se zvyšuje jeho hladina při hemolýze.

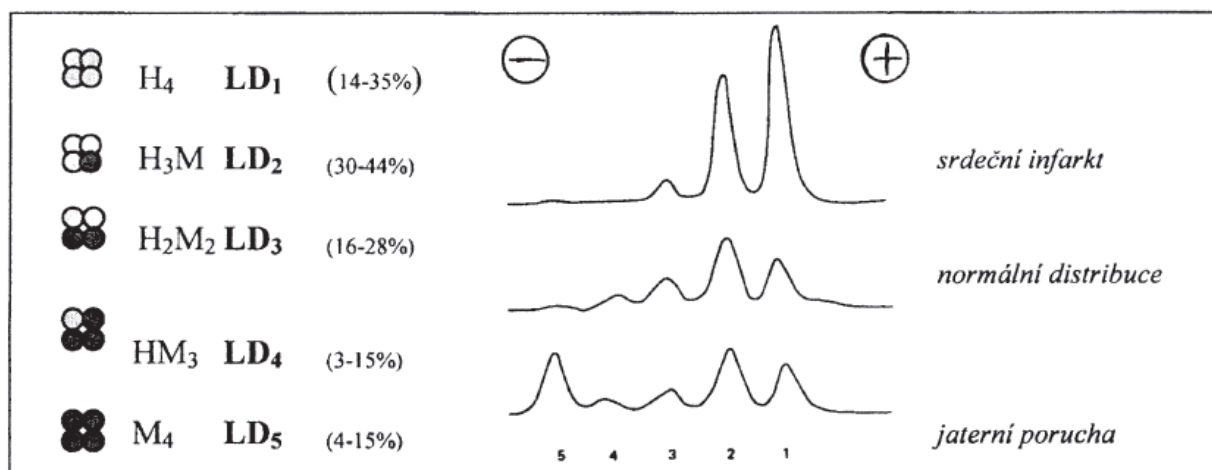
Pro stanovení aktivity enzymu máme k dispozici jednak barevnou reakci, při které reagují produkty aldolázové reakce s dinitrofenylhydrazinem za vzniku barevných hydrazonů, jednak spřaženou reakci, ve které je dihydroxyaceton-P redukován na glycerol-1-P za současné konzumace NADH, což lze přímo sledovat v UV světle (*Warburgův optický test*). Normální aktivity v séru nepřesahují 50 nkat/l.

Funkce a vlastnosti laktátdehydrogenázy

Laktátdehydrogenáza (LD) katalyzuje vratnou přeměnu pyruvátu na laktát. Patří mezi NAD^+ závislé oxidoreduktázy. Rovnováha je při tom posunuta výrazně ve prospěch laktátu. Význam enzymu pro regeneraci oxidované formy nikotinamidového koenzymu při anaerobní glykolýze vyplývá ze schématu v úvodní kapitole.



Molekula enzymu je složena ze čtyř bílkovinných subjednotek. Vzhledem k tomu, že existují dva typy monomerů, které jsou kombinovatelné, rozeznáváme 5 variant kvarterní struktury laktátdehydrogenázy. Tyto monomery se liší jak svou primární strukturou, což dovoluje např. elektroforetickou separaci typů, tak i svým metabolickým zapojením a expresí v různých orgánech. „H“ (*heart*) subjednotka je produkována především v srdeční svalovině, kde také převládají tetramery H_4 . Komplexní struktura je specializována na přednostní oxidaci kys. mléčné na pyruvát, který pak slouží jako zdroj energie pro srdce. Naopak v kosterním svalu a v játrech jsou přepisovány především geny pro subjednotky „M“ (*muscle*), takže se zde vyskytují v největší míře tetramery typu M_4 , specializované na pochod opačný, tj. redukci pyruvátu na laktát, předpoklad anaerobní glykolýzy. Jiné kombinace subjednotek mají afinity proporcionální počtu jednotlivých monomerů. „H“ subjednotky mají vyšší anodickou mobilitu při elektroforéze než subjednotky „M“, což vedlo ke klasifikaci 5 isoenzymů laktátdehydrogenázy dle rychlosti migrace (LD_{1-5}). Souběžně se však užívá i klasifikace podle poměru subjednotek.



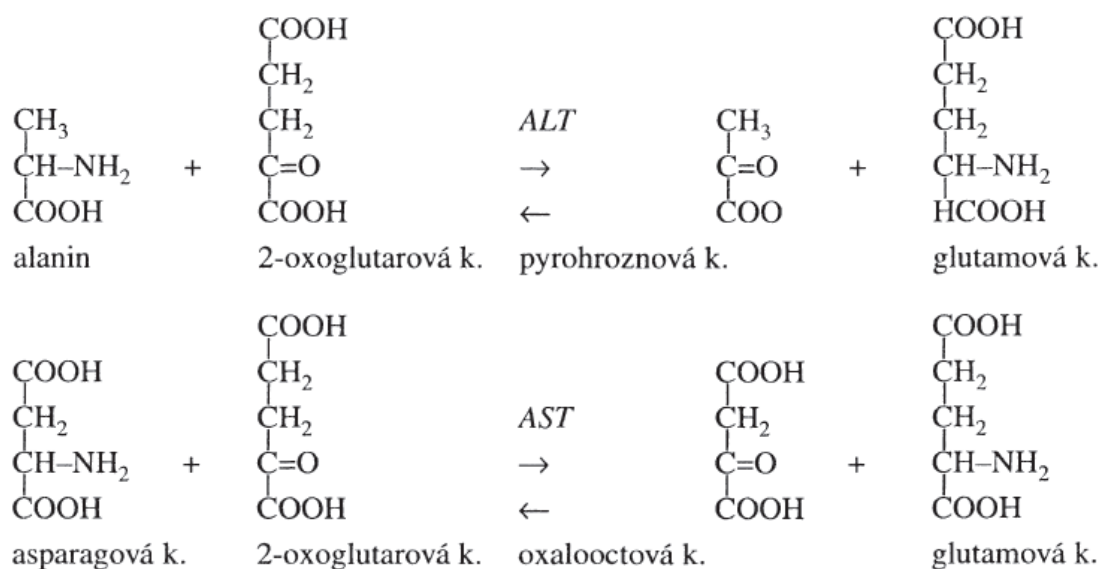
První izoenzym je kromě srdečního svalu také obsažen v erytrocytech, takže hemolýza arteficiálně zvyšuje koncentrace právě této frakce. Je zajímavé, že komplex obsahující více H subjednotek může oxidovat i α -hydroxybutyrát, takže aktivita α -hydroxybutyrát-dehydrogenázy v séru je vlastně aktivitou izoenzymů LD bohatých na H subjednotky.

Stanovení laktátdehydrogenázy je založeno na sledování poměru oxidované a redukované formy NAD koenzymu. Měřit je možno přímo v UV oblasti (340 nm) nebo převést změnu do barevné oblasti redukcí jodonitrotetrazoliové violeti na červený formazan, měřitelný při 510 nm. Za normální se považují hodnoty celkové LD menší než 8 μ kat/l séra.

ENZYMY PŘEMĚN AMINOKYSELIN: AMINOTRANSFERÁZY

Centrální postavení v metabolismu aminokyselin má **kys. glutamová**, která se jako jediná může přímo deaminovat při biosyntéze močoviny, hlavního odpadního dusíkatého produktu v katabolismu bílkovin. Téměř všechny ostatní aminokyseliny předávají svůj α -aminodusík prekurzoru kys. glutamové, kys. 2-oxoglutarové, mechanismem transaminace. Reakce je katalyzována enzymy, nazývanými **aminotransferázy**, dříve **transaminázy**. Ve všech je jako prosthetická skupina zabudován fosfopyridoxal a vyznačují se úzkou substrátovou specifitou jak pro donor α -aminoskupin, tak pro 2-oxo akceptor. Nejsou známy žádné genetické defekty postihující aminotransferázy, tento stav by nebyl slučitelný se životem.

Z klinického hlediska má význam zejména stanovení aminotransferáz alaninu a kys. asparagové, které přenášejí aminoskupiny na totožný akceptor, kys. 2-oxoglutarovou. Zkratky *ALT* (L-alanin:2-oxoglutarát-aminotransferáza) a *AST* (L-aspartát:2-oxoglutaryl-aminotransferáza) vystihují hlavní směr této vratné reakce lépe než dřívější symboly GPT a GOT, odvozené od převažujících produktů reakce:

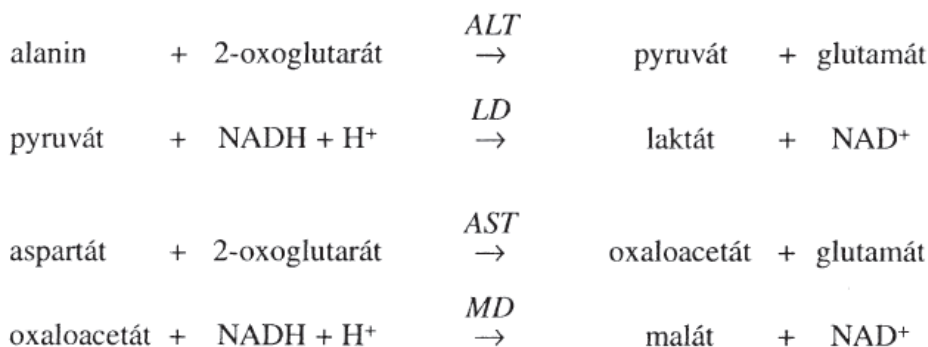


Aspartátaminotransferáza zajišťuje mj. rovnováhu mezi kys. glutamovou a asparagovou při biosyntéze močoviny, na které se obě aminokyseliny podílejí svým aminodusíkem. Oba enzymy jsou přítomny ve značném množství v játrech, AST je rovněž velmi aktivní v srdečním a kosterním svalu a v erytrocytech. U AST jsou známy 2 izoenzymy, plazmatický a mitochondriální, zhruba ve stejné katalytické koncentraci. Jak bylo již uvedeno v kap. 5.3.1, poměr AST/ALT je ukazatelem závažnosti jaterního onemocnění. Klinický význam a referenční hodnoty aminotransferáz jsou uvedeny v kap. 5.3.3.

Laboratorní stanovení aktivity aminotransferáz je založeno na *barevné reakci 2-oxoderivátů s 2,4-dinitrofenylhydrazinem* (metoda Reitman-Frankela) nebo na kvantifikaci spřažených enzymových reakcí (viz níže). Červený hydrazon v barevné reakci kys. pyrohroznové, produktu ALT reakce, poskytuje vyšší absorbanci při 505 nm než hydrazon kys. 2-oxoglutarové, substrátu enzymové reakce. Přesto je však žádoucí, aby koncentrace tohoto substrátu v reakční směsi byla co nejnižší, aby nedocházelo k falešné pozitivitě testu. To přináší

ovšem nevýhodu v poměrně úzkém rozmezí měřených aktivit, při vyšších katalytických koncentracích enzymu je nutno vzorek ředit. Při stanovení AST je využita stejná reakce, oxaloacetát z větší části spontánně dekarboxyluje na pyruvát.

Vzhledem k určitým teoretickým a technickým problémům zatěžujícím tuto jinak jednoduchou a levnou metodu dáváme v současné době přednost využití *spřažených enzymových reakcí*, kde je kofaktorem pyridinový koenzym. Zde jsou oba 2-oxoprodukty během reakce redukovány na kys. mléčnou a jablečnou za vzniku NAD⁺ z NADH:



Aktivity jsou úměrné rychlosti redukčního procesu, tj. úbytku NADH, který lze měřit přímo *Warburgovým optickým testem* (viz kap. 12.2.), tj. sledováním úbytku absorbance při 340 nm, nebo navázat barevnou reakci s pyridinovými koenzymy ve viditelné oblasti. Uvedené stanovení je zejména výhodné při kinetickém sledování transaminační reakce.

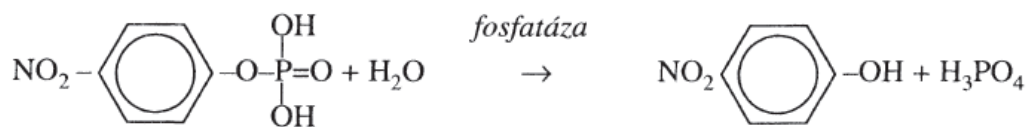
ENZYMY ŠTĚPÍCÍ ESTERY KYSELINY FOSFOREČNÉ

Fosfatázy patří systematicky do skupiny hydroláz štěpících estery kyseliny fosforečné. Tyto enzymy se rozdělují na fosfomonoesterázy a fosfodiesterázy podle počtu esterových vazeb kyseliny trihydrogenfosforečné. **Fosfomonoesterázy** hydrolyzují různé fosforečnanové estery především cukrů a bílkovin, ale i nukleotidy. Patří sem klinicky důležité indikační enzymy. Podle optimálního pH reakce se dělí na alkalické (pH optimum 7–10) a kyselé (pH optimum 4–6). **Fosfodiesterázy** jsou důležité enzymy katabolismu nukleových kyselin, ale mohou štěpit i fosfolipidy (fosfatázy z hadích jedů).

Alkalická fosfatáza (ALP) se vyskytuje ve formě tří izoenzymů. Střevní izoenzym je důležitý pro vstřebávací procesy, kostní izoenzym se účastní výstavby a přestavby kostí. Stejný izoenzym se nachází v játrech, kde je nezbytný pro přeměny glycidů, a v ledvinách. Třetí je izoenzym placentární. Ve všech případech jsou enzymy lokalizovány v cytoplazmatické membráně, k aktivaci jsou nezbytné ionty Mg²⁺. Zvýšení sérové aktivity ALP se pozoruje u poruch jater, provázených cholestázou. Soudí se, že městnání vyvolá zvášenou syntézu alkalické fosfatázy v epiteliálních buňkách žlučových kanálků. Vzestup provází také metabolické poruchy kostí (křivici) a kostní nádory primární a metastatické. Vzhledem ke zvýšené aktivitě osteoblastů u dětí jsou zde fyziologicky nacházeny vyšší sérové katalytické koncentrace. Aktivitu ALP je možno stanovovat také v leukocytech, kde je enzym ve značné koncentraci. Změny aktivit jsou příznačné pro některé leukemie.

Kyselá fosfatáza (ACP) je v nejvyšší katalytické koncentraci v prostatě dospělých mužů, ostatní tkáň jí obsahuje o 2–3 řády méně. Protože je lokalizována v lyzosomech, souvisí její uvolnění do krve s hlubším zásahem do struktury buňky, při kterém dojde k porušení lyzosomální membrány. U zdravého jedince je proto aktivita prostatického izoenzymu v séru sotva postižitelná. Nález zvýšené aktivity může být známkou karcinomu prostaty, zejména jeho kostních metastáz. Prostatický izoenzym můžeme odlišit od druhého izoenzymu z kostí, erytrocytů a trombocytů jeho citlivostí vůči vinanu („tartarát labilní frakce ACP“). Značnou aktivitu tohoto exkrecečního enzymu má seminální tekutiny, což se v soudně-lékařské praxi využívá k průkazu spermatu. Vzhledem k tomu, že ACP je přítomna i v erytrocytech, jsou vyšetření znehodnocena hemolýzou séra. Doporučuje se proto vyšetřovat krevní plazmu, a to po okyselení acetátovým pufrem pro zamezení degradace enzymu při fyziologickém pH.

Biochemické stanovení obou typů fosfatáz je založeno na štěpení syntetických esterů kys. fosforečné. Odštěpené substituenty jsou buď samy barevné, nebo je lze na základě jednoduché barevné reakce stanovit. Sety Lachema obsahují jako substrát *p*-nitrofenylfosfát:



Podle typu stanovovaného enzymu probíhá reakce buď v kyselém nebo v alkalickém prostředí. Žlutý *p*-nitrofenol stanovujeme fotometricky při 405 nm.

Molekulární biologie

Detekce leidenské mutace

Toto praktikum využívá prvky přístupu PBL (problem based learning).

problém: "Leidenská mutace" - ze všech úhlů pohledu

(molekulární podstata, fyziologie hemostázy, patofyziologie, klinický význam a diagnostika)

Leidenská mutace je autozomálně intermediárně (neúplná dominance) dědičná jednobodová mutace v genu pro hemokoagulační faktor V. Jde o nejběžnější genetickou příčinu trombofilie (zvýšené krevní srážlivosti) v evropské populaci. Tato mutace byla objevena v roce 1993 (publikováno r. 1994) a pojmenována podle místa objevu – město Leiden v Nizozemsku.

Molekulární podstata

Na molekulární úrovni se jedná o jednonukleotidový polymorfismus, SNP (z anglického *Single Nucleotide Polymorphism*) označovaný v databázích rs6025. Písmeno představuje laboratoř nebo výzkumný tým, který daný SNP objevil, číslo pak pořadí objevu v rámci příslušného týmu. Jde o substituci G1691A, tedy záměnu G (guanin) za A (adenin) na pozici 1691 v kódující oblasti genu pro faktor V. Gen pro faktor V je lokalizován na dlouhém raménku prvního chromozomu (locus q23), celková délka tohoto genu je 80 kb. Gen obsahuje celkem 25 exonů, přičemž Leidenská mutace (také označovaná jako faktor V Leiden) se nachází na exonu číslo 10.

```
ATATTAATTGGTTCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTATCATGAAATAACTTTGCA
AATGAAAACAATTTTGAATATATTTTCTTTCAGGCAGGAACAACACCATGATCAGAGCAG
TTCAACCAGGGGAAACCTATACTTATAAGTGGAAACATCTTAGAGTTTGATGAACCCACAG
AAAATGATGCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA
TCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCAG
GAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCT
```

Obr. 1 Část nukleotidové sekvence genu pro faktor V. Barevně označen exon 10.

Následkem této mutace/substituce/polymorfismu/záměny v genu je změna primární struktury produkovaného proteinu hemokoagulačního faktoru V (jde o kofaktor, bez proteolytické funkce). Na pozici 506 dochází k záměně aminokyseliny argininu za glutamin. Podle změny genetické informace se jedná o nesynonymní SNP typu missense. To znamená, že kodon se zaměněnou bází kóduje jinou aminokyselinu a může tak být změněná funkce proteinu.

FV wild type CTG GAC AGG C**GA** GGA ATA CAG AGG GCA

Leu-Asp-Arg-**Arg**-Gly-Ile-Gln-Arg-Ala

FV Leiden CTG GAC AGG C**AA** GGA ATA CAG AGG GCA

Leu-Asp-Arg-**Gln**-Gly-Ile-Gln-Arg-Ala

Arg 506 Gln G 1691 A

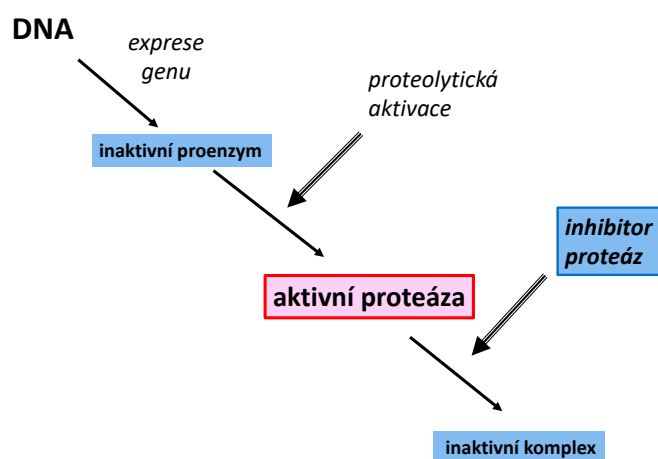
Obr. 2 Část nukleotidové a aminokyselinové sekvence zdravého (wild type) a mutovaného genu. Zdůrazněna záměna nukleotidu a aminokyseliny.

Hemostáza

Hemostáza (zástava krvácení) je životně důležitý děj chránící organismus před nadměrnou ztrátou krve při porušení vaskulární integrity (porušení kontinuity krevního řečiště). Na zástavě krvácení se podílejí tyto mechanismy: reakce cév (vazokonstrikce), činnost krevních destiček (aktivace a jejich nahromadění v místě poranění) a srážení krve tzv. hemokoagulace. Tyto procesy vedou ke vzniku krevní sraženiny (trombu).

Rozlišujte trombus a koagulum: trombus je intravitálně a intravazálně vzniklá krevní sraženina, zatímco koagulum je krevní sraženina vzniklá extravazálně nebo posmrtně.

Samotná **hemokoagulace** je kaskáda enzymových reakcí vedoucí k přeměně fibrinogenu na nerozpustný fibrin. Tento proces vyžaduje souhru mnoha koagulačních faktorů, fosfolipidů a vápenatých iontů. Koagulační faktory jsou označovány názvem a římskou číslicí, která má pouze historický charakter, to znamená, že neudává posloupnost reakcí. Koagulační faktory mají většinou charakter proteolytických enzymů (F II, VII, IX, X, XI, XII, prekalikrein), podle mechanismu účinku jde o tzv. serinové proteázy. Jsou syntetizovány v játrech ve formě inaktivních proenzymů (zymogenů), které se postupně (kaskádovitě) vzájemně aktivují. Aktivace jednotlivých proenzymů na aktivní enzymy spočívá v jejich proteolytickém štěpení enzymem aktivovaným v předchozí reakci.



Obr. 3 Zjednodušené schéma exprese, aktivace a inhibice proteolytického enzymu

Dále existují přídatné faktory urychlující aktivaci zymogenů (FIII, V, VIII...). Pro úspěšné zapojení koagulačních faktorů II, VII, IX, X a antikoagulačních faktorů - proteinu C a S nestačí pouze proteolýza. Podstupují nejprve posttranslační úpravu (jde o karboxylaci 10 – 12 zbytků kyseliny glutamové na γ uhlíku), která bezpodmínečně vyžaduje vitamín K. Smyslem této posttranslační úpravy je zvýšení schopnosti reagovat s ionty Ca^{2+} a připoutat koagulační faktor k fosfolipidové membráně. Nedojde-li ke karboxylaci, je afinita faktoru k membráně nízká, což se projeví poruchou srážlivosti.

Koagulační děje se rozdělují do dvou systémů: vnitřního a zevního/vnějšího, které však na sobě nejsou nezávislé a společně směřují k aktivaci faktoru X. Ve vnitřním systému (všechny prokoagulační faktory jsou v krvi) je aktivován faktor XII (tzv. Hagemanův faktor) kontaktem s negativně nabitým povrchem (kolagen, fosfolipidy destiček) poškozené cévy. Za spolupůsobení vápenatých iontů se postupně aktivují faktory IX (tzv. Christmasův faktor), VIII (tzv. antihemofilní faktor) a X (tzv. Stuart-Prowerův faktor). Zevní systém začíná uvolněním faktoru III – tkáňového tromboplastinu. Faktor III spolu s uvolněnými membránovými fosfolipidy z buněk, faktorem VII (tzv. prokonvertin) a vápenatými ionty vede k aktivaci faktoru X. Pro oba systémy pak pokračuje společná cesta. Aktivovaný faktor Xa, vápenaté ionty, destičkové fosfolipidy, aktivovaný faktor Va (tzv. proakcelerin) a neaktivní protrombin (faktor II) vytvoří protrombinázový komplex. Pak může dojít k aktivaci protrombinu na trombin. Trombin je serinová proteáza, která odštěpuje z fibrinogenu dva fibrinopeptidy. Tím je umožněna spontánní polymerace fibrin-monomerů nekovalentními vazbami. Pak zasáhne fibrin stabilizující faktor (faktor XIIIa), který stabilizuje za přítomnosti vápenatých iontů nově vzniklý fibrin-polymer. Nerozpustný fibrin vytvoří společně s destičkami sraženinu, zátku uzavírající ránu.

Hemokoagulace je mnohastupňově regulovaný proces, protože spontánní srážení krve v cirkulaci může mít fatální následky. Proto v krvi koluje společně s koagulačními faktory i několik inhibitorů koagulačních faktorů. Tyto inhibitory se řadí mezi serpiny (serin proteázové inhibitory). Patří sem hlavně antitrombin, protein C (PC), protein S a na endotel vázaný trombomodulin.

Přesto k hemokoagulaci dochází i v nenarušeném žilním systému, pokud zde dojde ke stáze krve. V tomto případě jde o patologický proces vedoucí k tromboembolismu (bližší vysvětleno v kapitole Klinický význam). Přispívá k tomu i nefunkčnost nebo nedostatek přirozených inhibitorů koagulace často jako následek genetické poruchy (např. FV Leiden).

Dalším, časově vzdálenějším mechanismem navazujícím na zástavu krvácení je **fibrinolýza** (odstranění trombu) a aktivace fibroblastů a hladkých svalových buněk. Výsledkem je zahojení poraněné tkáně.

Primární fibrinolýza je přirozený fyziologický proces, jehož cílem je odstranit ze zhojené cévy již nepotřebný trombus. Fibrin (v menší míře také fibrinogen), je štěpen plasminem na rozpustné fibrinové štěpy. Plasmin (dříve nazývaný fibrinolyzin) je aktivní forma bílkoviny plasminogenu. Jde o serinovou proteázu. Aktivaci plasminogenu na plasmin způsobuje účinný enzym, tkáňový aktivátor plasminogenu (tissue plasminogen activator, t-pA). Naopak rychlou degradaci plasminu způsobuje α_2 -antiplasmin, plazmatický protein, který s ním vytváří nevratný inaktivní komplex.

Při štěpení fibrinu se do krve uvolňují produkty této degradace. Jde o dva propojené D fragmenty proteinu fibrinu, které se nazývají **D-dimery**. Jejich stanovení našlo uplatnění

v klinické praxi při diagnostice trombóz a embolií. Vzhledem k faktu, že vznik sraženiny i její odbourávání jsou fyziologické děje, nemůžeme jednoduše spojit zvýšenou hladinu D-dimerů s nějakým onemocněním. Avšak jsou-li D-dimery negativní, můžeme vyloučit přítomnost jakékoliv sraženiny v krevním řečišti (tím pádem lze vyloučit i diagnózu trombózy nebo embolie). Jedná se o relativně levný, rychlý a především pacienta nezatěžující test a proto je využíván v klinické praxi k prvnímu rozřídění pacientů s podezřením např. na plicní embolii. Pomocí testu může lékař rozdělit pacienty na zdravé, které již není třeba dále vyšetřovat a na ty, u nichž je třeba chorobu dále prokázat či vyloučit pomocí dalších metod.

Sekundární fibrinolýza (častěji označovaná jako trombolýza) je poměrně nebezpečný avšak nezřídka život zachraňující lékařský výkon, využívaný dnes především u masivní plicní embolie. Do krevního oběhu pacienta jsou podávány preparáty s fibrinolytickou aktivitou (altepláza, streptokináza atd.) za účelem rozpustit sraženinu uzavírající tepnu a obnovit tak krevní oběh za ní. Hlavním rizikem může být závažné krvácení, znemožňující navíc případné chirurgické řešení situace, která si podání trombolýzy vyžádala.

Bezchybný vznik koagula omezeného v konkrétním místě a čase je podmíněn správnou interakcí mnoha specifických látek. Některé působí ve smyslu posílení a zrychlení srážení krve, jiné mají za úkol mechanismus srážení krve brzdit. Úkolem tohoto složitého systému je zajistit dynamickou rovnováhu, která nejen že zastaví krvácení v případě poranění, ale na druhé straně i zabrání nekontrolovatelnému srážení krve, které by v konečném důsledku uzavřelo cévní řečiště.

Patofyziologie Leidenské mutace

Faktor V (FV) je glykoprotein, koagulační faktor, nazývaný také proakcelerin nebo labilní faktor. Na rozdíl od většiny koagulačních faktorů nemá enzymatickou aktivitu, funguje jako kofaktor. FV je aktivován trombinem na FVa. Při aktivaci se rozštěpí na dva řetězce, které jsou spojeny prostřednictvím vápenatých iontů viz obr.5. FVa se váže na specifické receptory na membráně destiček a společně s faktorem Xa a protrombinem tvoří protrombinázový komplex. Protrombin je následně štěpen aktivovaným faktorem Xa na trombin. Role FVa je tedy na straně prokoagulačních faktorů. Mohlo by se zdát, že důsledkem mutace faktoru V, který má prokoagulační účinky, by mělo být snížení účinnosti koagulačního systému. Záměna 1 aminokyseliny ve struktuře proteinu FV Leiden oproti FV wild type nemá kupodivu žádný vliv na jeho prokoagulační aktivitu. Trombofilie spojovaná s Leidenskou mutací je podmíněná změnou v jeho odbourávání.

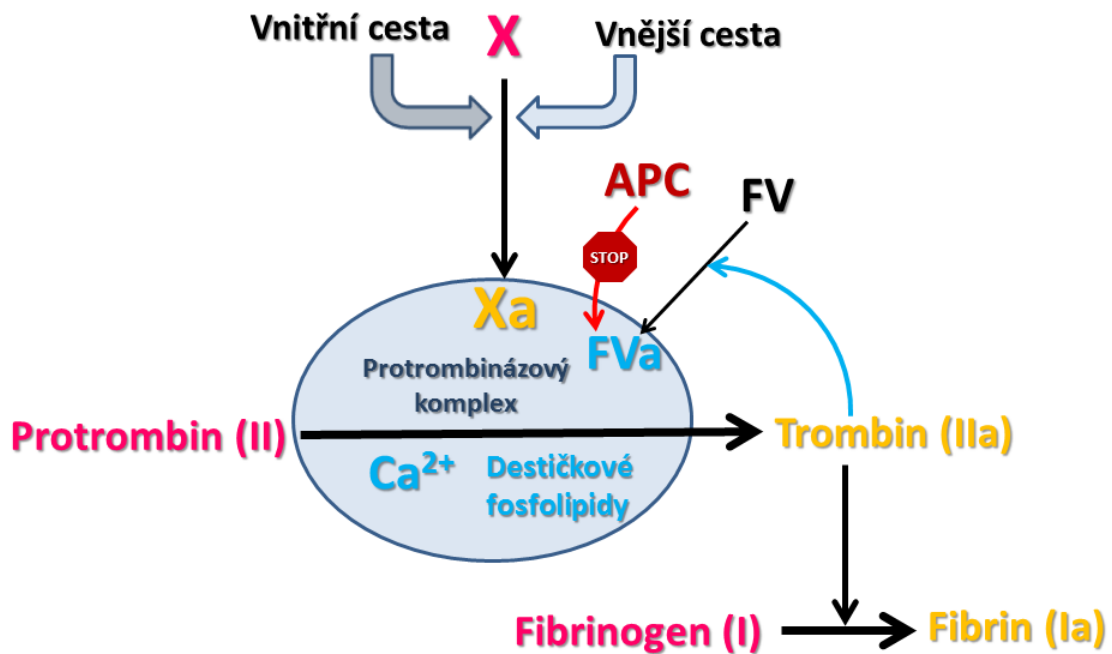
Aktivovaný faktor Va je inaktivován aktivovaným proteinem C (APC), což omezuje jeho působení v koagulaci. APC se váže na FVa v místě tří různých argininových zbytků a proteolytickým štěpením způsobí jeho inaktivaci.

Leidenská mutace faktoru V způsobuje záměnu aminokyseliny argininu za glutamin na 506 pozici FV, kde se nachází jedno vazebné místo pro APC. Ten se na FV obtížněji váže. Výsledkem je perzistence (prodloužení doby trvání) aktivity FVa. Tento trombofilní stav je výsledkem prodloužení doby působení FVa.

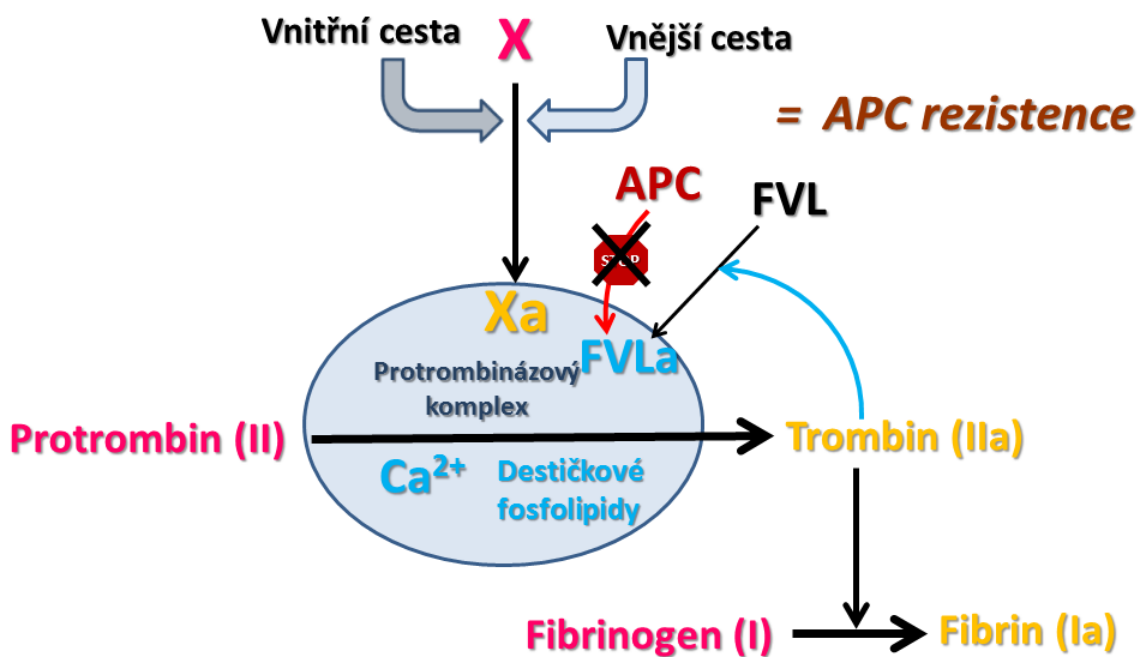
Leidenská mutace je také někdy popisována jako APC rezistence - rezistence aktivovaného faktoru Va k antikoagulační aktivitě aktivovaného proteinu C (APC). APC je potřebný pro inaktivaci faktoru Va a VIIIa, a je jedním ze základních fyziologických inhibitorů

koagulace. Tyto inhibitory se řadí mezi serpiny (serin proteázové inhibitory). Patří sem hlavně antitrombin, protein C (PC), protein S a na endotel vázaný trombomodulin.

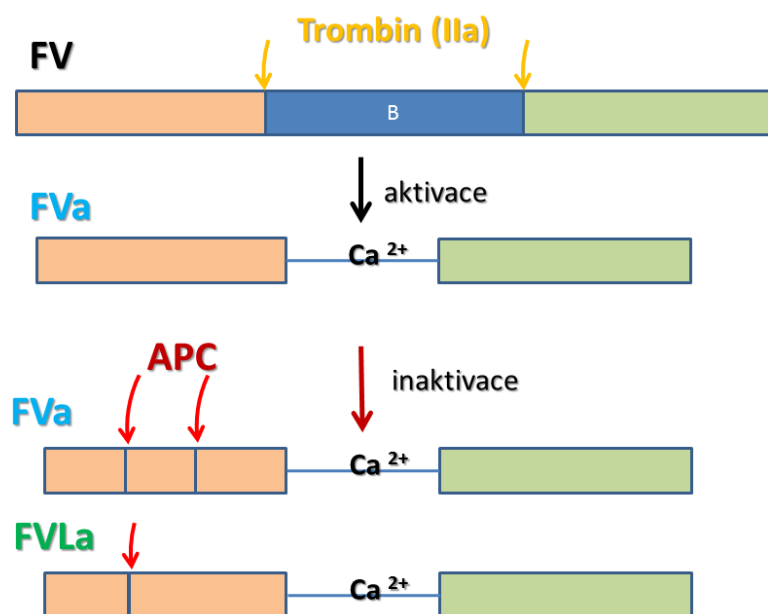
Koagulační kaskáda



Koagulační kaskáda - Faktor V Leiden



Obr. 4 Zjednodušené schéma hemokoagulační kaskády s důrazem na vztah k APC



Obr. 5 Faktor V (FV)

Klinický význam

Leidenská mutace vykazuje zajímavou závislost na rase a zeměpisné lokalizaci. V České republice se homozygoti pro faktor V Leiden vyskytují 1 na 5000 obyvatel, heterozygoti tvoří cca 5% populace. Nejvyšší výskyt mutace FV Leiden byl detekován ve Švédsku, naopak v asijských či afrických populacích se jedná o velmi vzácnou mutaci. Vysvětluje se to tím, že mutace vznikla v Kavkazské populaci asi před 20 až 34 tisíci lety. Mutace faktor V Leiden (a další trombofilní mutace) se udržely v populaci dlouhou dobu, musely být tedy z hlediska evoluce výhodné. Trombofilní mutace vedou k rychlejší zástavě krvácení, např. při boji, lovu nebo po porodu, což zvyšuje pravděpodobnost přežití jejich nositele. To, co však bylo výhodné kdysi, se dnes stává přítěží. Homozygoti pro faktor V Leiden mají asi 80× vyšší riziko vzniku hluboké žilní trombózy. U heterozygotů je riziko asi 8× vyšší bez jiného rizikového faktoru a 30× vyšší při kombinaci s kombinovanou hormonální antikoncepcí nebo hormonální substitucí.

Hluboká žilní trombóza je vznik krevní sraženiny (trombu) v hlubokém žilním systému. Sraženina vede k obstrukci, tj. omezení toku krve žilou. Hluboká žilní trombóza postihuje převážně hluboké distální žíly bérce, výjimkou nejsou ani popliteální žíly či femorální žíly až k vena iliaca. Utržením trombu a jeho průchodem přes pravou síň a komoru do plicnice vzniká nejzávažnější komplikace - **plicní embolie**. Jde o život ohrožující stav vzniklý obstrukcí a. pulmonalis nebo jejích větví. Trombóza povrchových žil, která je většinou doprovázena zánětem (tromboflebitida) ke vzniku plicní embolie nevede.



Obr. 6 Plicní embolie

Za normálních okolností je v organismu rovnováha mezi vznikem a rozpuštěním trombu. V patogenezi trombózy se uplatňují rizikové faktory označované jako **Virchowova trias**. Jsou to: **1. změny hemodynamiky** – zpomalený tok krve tzv. venostáza. Příčinou může být dlouhodobé upoutání pacienta na lůžko, imobilizace končetiny, dlouhé cestování s omezeným pohybem. **2. poškození stěny cévy** např. během chirurgické operace, dále úrazem, zánětem, arteriosklerózou. **3. trombofilní stavy** např. mutace genů koagulačních faktorů (Leidenská mutace faktoru V) nebo stavy získané během života například nádorovým bujením. I u pacientů se zvýšeným rizikem vzniku trombu je k jeho tvorbě nutný nějaký spouštěč např. infekce, úraz, dehydratace, kouření, hormonální změny, nádorová onemocnění.

Prevence a monitorace léčby

U trombofilních stavů existuje reálné riziko opakování hluboké žilní trombózy, u žen jsou vyšší rizika porodnických komplikací vedoucí k potratům či předčasným porodům. Ženy s trombofilií by také neměly užívat hormonální antikoncepci, protože estrogeny zvyšují sklon ke srážení krve i u zdravých žen. U trombofilních stavů by měla být zajištěna prevence specialistou hematologem zvláště před plánovanými operačními výkony, dlouhodobými lety, v těhotenství, období kolem porodu a šestinedělí. V některých případech je nutná prevence v průběhu celého života.

Prevence spočívá v podávání antikoagulancií, tedy léčiv snižujících srážlivost krve. Léčba těmito preparáty má svá rizika: předávkování může vést k závažnému krvácení, zatímco při poddávkování je léčba neúčinná. Proto je během léčby obvykle nutné stav koagulačního systému monitorovat pomocí speciálních testů.

Pro krátkodobou prevenci má nejvhodnější vlastnosti heparin nebo modernější nízkomolekulární heparin (Fraxiparin, Clexan). Oba mají rychlý nástup účinku a jejich predikovatelné (mající předpověditelný průběh) vlastnosti umožňují fixní dávkování. Nevýhodou je nutnost podávání parenterální cestou (parenterální = mimostřevní) např.: Fraxiparin s.c. - podkožně. Účinnost terapie heparinem lze kvantifikovat pomocí času **aPTT (activated partial thromboplastin time)**. Toto vyšetření odráží stav vnitřní a společné cesty koagulačního systému. Terapii nízkomolekulárním heparinem obvykle není nutné kontrolovat, lze ji však v případě potřeby posoudit vyšetřením **aktivity anti Xa**.

Skupinu perorálních antikoagulancií reprezentují moderní xabany nebo gatrany a především, stále ještě nejpoužívanější, **warfarin**. Warfarin je kumarinový derivát, původně používaný jako jed na krysy, který má schopnost inhibovat enzym *vitamin K reductázu*. Tento enzym obnovuje redukovanou formu vitamínu K, která je nezbytná pro karboxylaci několika koagulačních faktorů. Za nedostatečné nabídky redukovaného vitamínu K nejsou jaterní buňky schopné syntetizovat vitamin K-dependentní koagulační faktory (II, VII, IX a X). Výsledkem je menší množství na vitamín K závislých faktorů kolující v krvi, a tím i menší pohotovost ke koagulaci.

Účinky warfarinu se začnou projevovat až za několik dní po zahájení terapie a jsou velice variabilní jak interindividuálně, tak v rámci času (například v závislosti na obsahu vitamínu K v potravě). Proto je léčbu warfarinem nutné průběžně monitorovat stanovením **protrombinového času (PT)**. K plazmě antikoagulované citrátem se přidá tkáňový faktor (F III) spolu s dostatkem iontů Ca^{2+} a změří se čas do vzniku koagula. Zjištěný čas v sekundách

dobře odráží funkčnost zevní cesty koagulačního systému. Aby ale bylo možné porovnávat hodnoty z různých laboratoří, ukázalo se jako praktičtější vyjádřit výsledky jako hodnotu **INR (International Normalized Ratio)**. Zjednodušeně jde o poměr protrombinového času pacienta ke kontrolnímu (zdravému) protrombinovému času.

Hodnota INR u zdravého pacienta se pohybuje mezi 0,8 - 1,2. Pacient je účinně koagulovaný při hodnotách mezi 2,0 - 3,5.

$$\text{INR} = \text{PT}_{\text{pacient}} / \text{PT}_{\text{norma}}$$

Metodická část

Izolace nukleových kyselin

Nukleové kyseliny lze izolovat z jakéhokoli biologického materiálu, který obsahuje buňky se zachovanými jádry. Běžným zdrojem DNA jsou leukocyty nesrážlivé krve. Obvykle se odebírá 0,5 – 10 ml žilní krve nejlépe uzavřeným odběrovým systémem do sterilních zkumavek s K₂-EDTA. V prenatalní diagnostice jsou obvyklým zdrojem amniotické buňky a choriové klky. Pokud je třeba získat materiál pro izolaci DNA neinvazivním způsobem, provádí se odběr DNA z buňkami sliznice. DNA lze získat dokonce i ze skvrn zaschlé krve. Zdrojem RNA bývá nejčastěji tkáň získaná biopsií nebo nesrážlivá žilní krev.

Kvalita výchozího materiálu významně ovlivňuje výtěžek, kvalitu a neporušenost/celistvost izolované nukleové kyseliny. Nejlepších výsledků se dosahuje s čerstvým materiálem. Vzorek by měl být okamžitě zpracován nebo neprodleně zamrazen (v případě DNA do tří hodin po odběru) a dále skladován při -80°C, aby nedošlo ke štěpení DNA na kratší fragmenty nebo k degradaci RNA (především mRNA). Materiál musí být přechováván ve vhodném obalu zbaveném příslušných nukleas. Toto je důležité hlavně v případě RNA, která je daleko méně odolná, navíc ribonukleázy jsou všudypřítomné a velmi odolné enzymy.

V poslední době lze pro izolaci obou nukleových kyselin využít vzorky tkáně fixované formaldehydem a zalité v parafínu (FFPE = formalin-fixed paraffin embedded), které byly původně odebrány pro histologická vyšetření. Přestože takto zpracované vzorky neposkytují ideální výsledky (dochází k fragmentaci nukleových kyselin) jsou velmi cenné, protože jsou mnohdy jediným zdrojem biologického materiálu, zvláště v případě retrospektivních studií u zemřelých pacientů.

Se vzorky pro stanovení genové exprese je nutné zacházet obzvláště pečlivě, aby naměřené hodnoty odpovídaly skutečným hladinám přítomným *in vivo* a ne aby odrážely změny, které nastaly během zpracování vzorku. Vzorky proto musí být neprodleně po odběru zamrazeny v tekutém dusíku a dále skladovány při -80°C. Pro případy, kdy toto není možné, jsou komerčně dostupné stabilizátory.

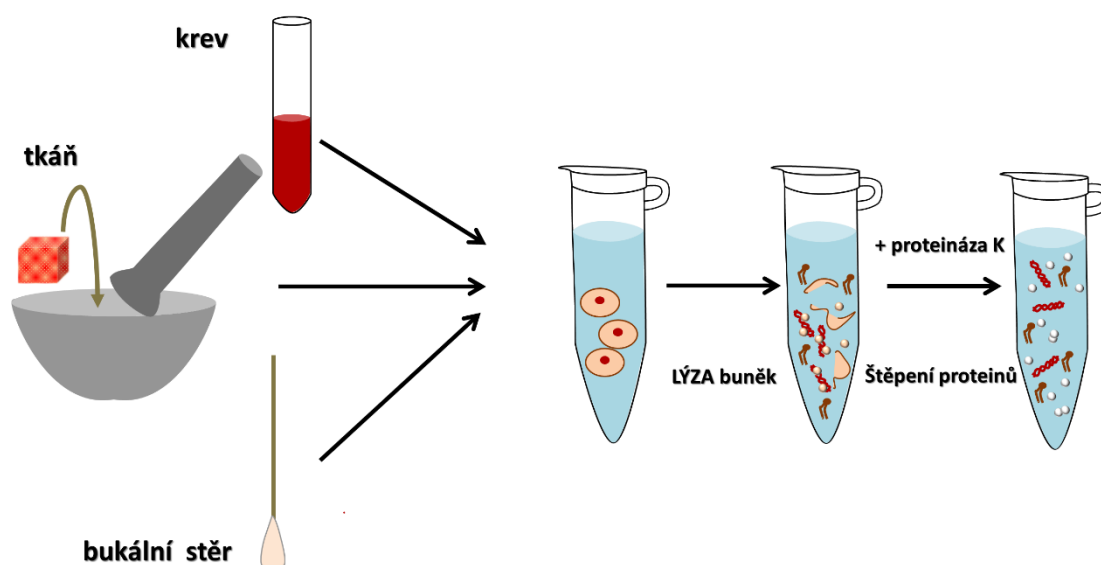
DNA byla poprvé izolována roku 1869 Friedrichem Miescherem, v současné době se jedná o rutinní techniku molekulární biologie.



Friedrich Miescher (1844-1895)

byl švýcarský lékař, který v roce 1869 izoloval z buněčného jádra leukocytů neznámou látku, kterou nazval „nuclein“. Že se jedná o novou látku, usoudil z toho, že svými vlastnostmi neodpovídala, v té době známým proteinům ani lipidům. Nuclein byl rezistentní k proteázám, neobsahoval síru, ale obsahoval velké množství fosforu. Miescherovo pojmenování zůstalo zachováno v dnešním názvu DNA - deoxyribonukleová kyselina.

Izolační metoda závisí jednak na povaze biologického materiálu, ze kterého má být nukleová kyselina získána, jednak na metodě následné analýzy získané molekuly. Ve všech případech je prvním krokem lýza buněk, ze kterých chceme nukleové kyseliny získat. U krevních buněk obvykle stačí k rozrušení biomembrán detergent. Pro rozrušení pevných tkání musí být použita mechanická síla, např. drcení tkáně zmrazené tekutým dusíkem v třecí misce, protřepávání s kuličkami z různých materiálů, speciální homogenizátory. Do lyzačního roztoku se přidává také chelatační činidlo - etylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), která s ionty vápníku vytvoří nedisociovatelné komplexy. Tím zabrání štěpení čerstvě uvolněné DNA nukleázami (DNázy), které se při lýze buněk také uvolňují. Ionty vápníku totiž slouží jako kofaktory nezbytné pro jejich funkci. Aby bylo zajištěno rozštěpení proteinů, včetně histonů vázaných na DNA, přidává se enzym proteináza K (jedná se o bakteriální enzym s teplotním optimem kolem 60 °C, který nevyžaduje vápenaté ani hořečnaté ionty a který neinhibují ani koncentrované tenzidy. Navíc velmi účinně štěpí DNázy). Při izolaci RNA se do lyzačního roztoku přidává guanidin thiokyanát a β -merkaptoethanol jako inhibitory ribonukleas lokalizovaných na membránách organel.



Obr. 7 Příprava buněčného lyzátu pro izolaci DNA

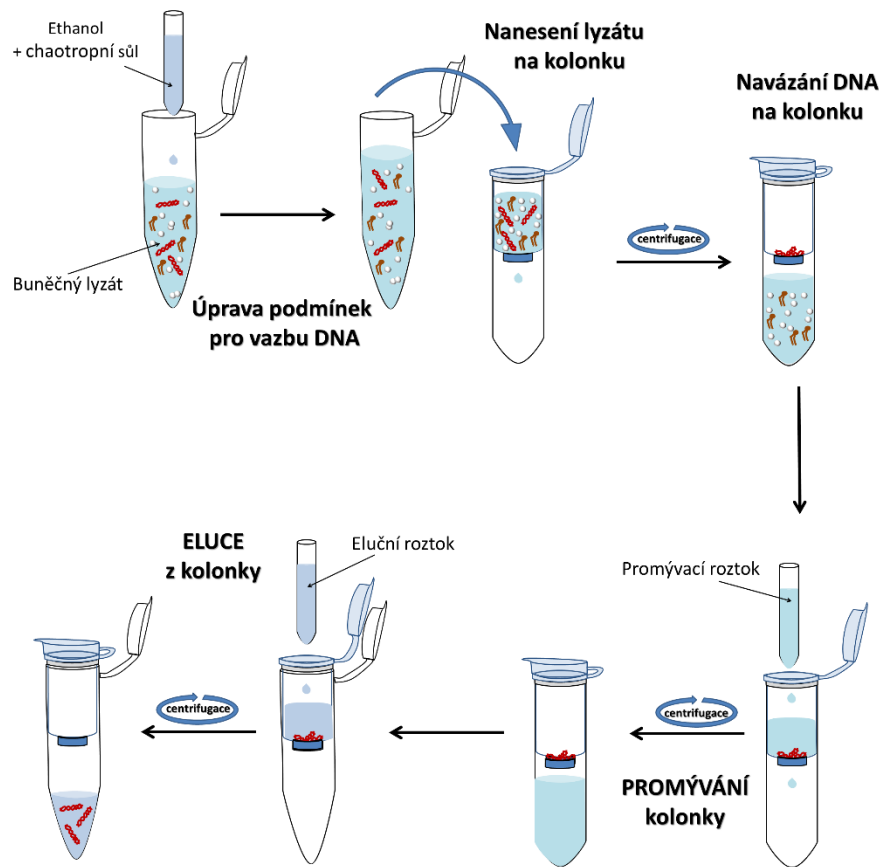
Ze získaného lyzátu je nutno odstranit balastní látky. Získaná čistá nukleová kyselina se ředí na optimální koncentraci pro další použití ve vhodném rozpouštědle, nejčastěji ve vodě nebo pufru.

V současnosti se k odstranění balastních látek nejčastěji používají dvě metody:

- **Kolonková metoda**

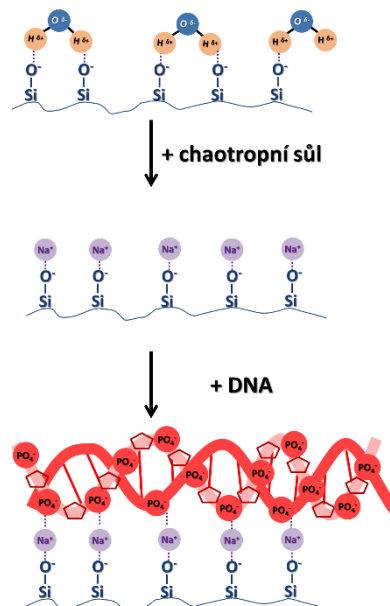
Kolonková metoda obecně pracuje na principu iontové výměnné chromatografie. Molekuly DNA i RNA nesou záporný náboj. V přítomnosti vysoké koncentrace tzv. chaotropních solí se nukleové kyseliny naváží na silikát, zatímco většina kontaminujících látek kolonkou proteče. Obvykle se pro zlepšení vazby nukleové kyseliny na silikátovou kolonku přidává k lyzátu ethanol nebo izopropanol. Poté se postupně kolonka promývá různými pufrů, aby se navázané

kontaminanty odstranily. Na závěr se čistá nukleová kyselina vymyje zředěným pufrům nebo destilovanou vodou



Obr. 8 Extrakce DNA z buněčného lyzátu kolonkovou metodou

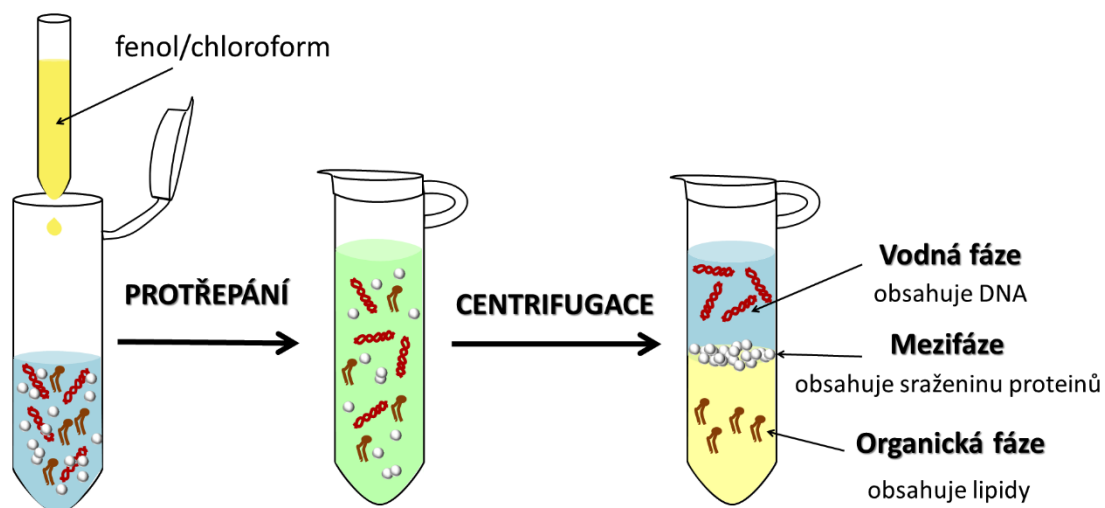
Chaotropní soli = iontové sloučeniny, které narušují svou přítomností pravidelnou strukturu vodíkových můstků ve vodě v tekutém skupenství. Při izolacích nukleových kyselin se nejčastěji používá jodid sodný, guanidin hydrochlorid nebo guanidin thiokyanát.



Obr. 9 Princip vazby DNA na silikátovou membránu v přítomnosti chaotropních solí

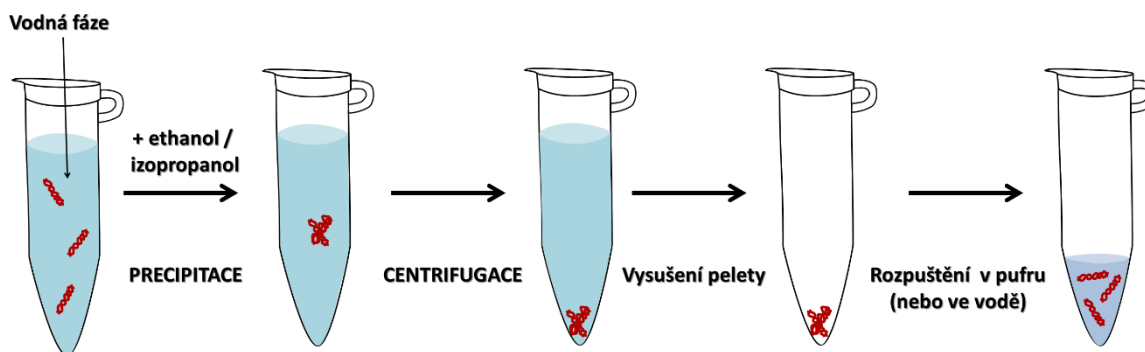
• Fenol-chloroformová metoda

Tradiční spolehlivá, levná metoda, která poskytuje velmi čisté nukleové kyseliny. Jejimi nevýhodami jsou pracnost a zdolouhavost postupu (celý postup izolace zabere cca. 3 dny), práce s toxickými, žíravými, hořlavými a zápachajícími látkami. K lyzátu se přidává s vodou nemísitelná směs fenolu a chloroformu, která denaturuje přítomné proteiny. Denurací se proteiny stávají hůře rozpustné ve vodě a přecházejí do organické fáze nebo zůstávají na rozhraní fází, zatímco nukleové kyseliny zůstávají ve vodné fázi. Lipidy se rozpouštějí v chloroformu. Někdy se přidává izoamylalkohol, který brání tvorbě pěny zvláště u vzorků bohatých na proteiny. Vzniklá směs se důkladně protřepe a poté se odstředí, aby došlo k oddělení fází - horní vodné a dolní fenol-chloroformové. Na rozhraní těchto fází obvykle vzniká mezifáze tvořená bílým prstencem sražených proteinů. Vodná fáze obsahující nukleové kyseliny se opatrně přenesou do nové čisté zkumavky. Pro dokonalé odstranění proteinů je většinou nutné extrakci několikrát opakovat (na rozhraní se už neobjeví bílá sraženina proteinů). I pouhé stopy fenolu mohou ovlivnit následnou analýzu izolované nukleové kyseliny, např. fenol inhibuje PCR. Proto se pro poslední extrakci používá samotný chloroform nebo směs chloroformu s izoamylalkoholem, který usnadňuje odstranění fenolu z vodné fáze tím, že zvyšuje jeho rozpustnost v chloroformu.



Z čisté vodné fáze je nutno nukleovou kyselinu precipitovat, nejčastěji absolutním ethanolem nebo isopropanolem. Zvýšení účinnosti srážení lze docílit snížením teploty a přidávkem solí (např. acetát sodný, chlorid sodný, chlorid litný nebo acetát amonný). Soli precipitaci usnadňují tím, že nukleové kyselině odebírají hydratační obal, neutralizují náboj na cukr-fosfátové kostře a tím snižují její rozpustnost ve vodě. Ethanol je méně polární rozpouštědlo než voda. Nukleová kyselina je tedy v ethanolu ještě méně rozpustná a vypadáva z roztoku. Přítomnost solí zabarvuje peletu do běla.

Po odstranění supernatantu a promytí 70% etanolem (rozpuští přítomné soli) je získaná čistá nukleová kyselina rozpuštěna ve vhodném rozpouštědle, nejčastěji ve vodě nebo pufru.



Obr. 11 Precipitace DNA z vodné fáze získané fenol-chloroformovou metodou

Podle toho, kterou nukleovou kyselinu potřebujeme získat, volíme extrakční pufr. pH použitého extrakčního pufru značně ovlivňuje, zda ve vodné fázi bude převažovat DNA nebo RNA. V neutrálním nebo mírně alkalickém prostředí ($\text{pH} \approx 7-8$) převažuje DNA. Kyselé prostředí je naproti tomu vhodnější pro izolaci RNA. Důvodem je rozdílný náboj, který nesou tyto molekuly v kyselém prostředí. Cukr-fosfátová kostra nukleových kyselin nese na svém povrchu v neutrálním prostředí záporný náboj. Pokud ale molekula DNA je v prostředí s nízkým pH, a tedy vysokou koncentrací iontů H^+ , fosfátové skupiny jsou neutralizovány. To vede ke ztrátě polárního charakteru DNA a jejímu přechodu do nepolární organické fáze. Oproti tomu jednovláknová RNA má obnažené dusíkaté báze, které zachovávají její polární charakter a udržují ji tak ve vodné fázi.

V každém případě, ale získáme požadovanou nukleovou kyselinu kontaminovanou tou druhou. Pokud je nutné pracovat s čistou DNA, kontaminující RNA se odstraní působením RNázy a DNA se znovu přečistí fenol-chloroformovou extrakcí a následnou precipitací etanolem. Pokud potřebujeme získat pro další práci čistou RNA, odstraníme přítomnou DNA působením DNázy. RNA reprecipitujeme isopropanolem a promyjeme etanolem.

Popsaným postupem získáme celkovou RNA. Někdy je výhodné izolovat pouze mRNA, protože celková RNA obsahuje vysoký podíl tRNA a rRNA. Po lýze a homogenizaci vzorku a denuraci celkové RNA se provede selektivní zachycení poly(A)RNA = mRNA na imobilizovaném afinantu oligo(dT)₂₀, nežádoucí složky se odstraní, navázaná mRNA se promyje a následně uvolní z afinantu do roztoku.

V současnosti existuje celá řada komerčně dostupných kitů pro izolaci genomické DNA, plasmidové DNA, celkové RNA i jednotlivých typů RNA (mRNA, rRNA, miRNA, snRNA atd.) z různých biologických materiálů. Pro rutinní klinické laboratoře jsou dokonce dostupné automatické izolátory nukleových kyselin. Protože pro automatické linky je obtížné zařadit centrifugace, využívají se k oddělování jednotlivých složek např. magnetické kuličky. Tyto kuličky mají silikátový povrch, na který se nukleová kyselina specificky naváže. Při promývání jsou kuličky přidrženy magnetem. Nakonec se čistá nukleová kyselina eluuje z povrchu oddělených kuliček.

Uchovávání izolované nukleové kyseliny

DNA je relativně stabilní molekula, přesto je nutné ji chránit před degradací nukleázami. Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi dlouhou molekulu, je náchylná k tvorbě zlomů. Proto je nutné se při izolaci a další manipulaci se vzorkem DNA vyvarovat hrubého pipetování (příliš prudkého nasávání a vypouštění pipetované kapaliny) a nadměrného prudkého vortexování. DNA se uchovává rozpuštěná v pufru např. v TE (*Tris/EDTA*) pufru (roztok 10mM Tris-HCl (tris-hydroxymethylaminomethan hydrochlorid) a 1 mM EDTA (chelaton 3), pH 8,5), protože ve vodě hydrolyzuje. Složka Tris udržuje stabilní pH, EDTA chelatuje vápenaté a hořečnaté ionty, čímž blokuje nežádoucí činnost DNáz a do jisté míry i RNáz ve vzorku. Vyizolovaná DNA je skladována krátkodobě (dny) při 4°C a dlouhodobě (týdny – měsíce) při -20°C, nebo při -80°C. Je nutné vyvarovat se opakovanému zamrazování a rozmrazování, které také poškozuje DNA. RNA se obvykle uchovává ve vodě bez nukleas (RNase-free water) při -20°C nebo při -80°C.

Kvantifikace a kontrola čistoty nukleových kyselin

Pro stanovení koncentrace nukleových kyselin a kontrolu jejich čistoty lze využít několik metod - spektrofotometrii, elektroforetické vyhodnocení nebo stanovení pomocí fluorescenčních DNA-vazných barviv.

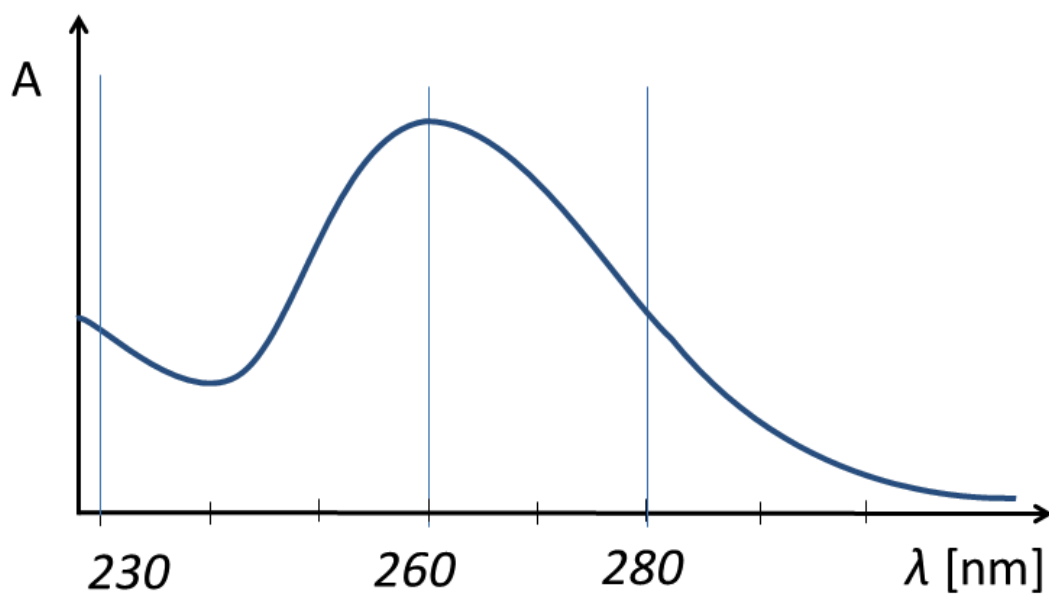
V praxi využijeme spektrofotometrické stanovení. Čistý roztok nukleové kyseliny (DNA i RNA) má absorpční maximum při 260 nm, proteiny maximálně absorbují při 280 nm, při 230 nm mají absorpční maximum nízkomolekulární látky (např. fenol, chloroform, EDTA, polysacharidy...). Absorbance při 320 nm znamená přítomnost nerozpuštěných pevných částic nebo znečištěnou květu.

Koncentrace nukleové kyseliny se počítá ze změřené absorbance při 260 nm. Vychází se z následujících vztahů:

$A_{260} = 1$, pokud je v měřeném roztoku:

- dvouřetězcová DNA (dsDNA) o koncentraci 50 µg/ml
- jednořetězcové DNA o koncentraci 37 µg/ml
- RNA o koncentraci 40 µg/ml

Čistota vzorku se hodnotí podle poměrů absorbancí A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} . Poměr A_{260}/A_{280} by měl být pro čistou DNA okolo 1,8, u RNA okolo 2. Poměr A_{260}/A_{230} by měl být pro čistou DNA vyšší než 2,0. Pokud hodnota poměrů je výrazně nižší, je roztok kontaminován proteiny nebo fenolem. Není-li u vzorků splněna požadovaná čistota, je nutné provést reprecipitaci vzorku, což vede k výraznému snížení obsahu nečistot.



Obr. 12 Absorpční spektrum DNA



Obr. 13 Ukázka záznamu z přístroje DeNovix DS-11

PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z *anglického Polymerase Chain Reaction*) je enzymatická metoda umožňující *in vitro* zmnožení (amplifikaci) vybraného úseku DNA, ohraničeného krátkými oligonukleotidy, tzv. primery. Metoda pracuje na principu replikace nukleových kyselin. Umožňuje velmi rychle získat milióny přesných kopií z velmi malého množství vstupního materiálu, dokonce i z DNA z jediné buňky, tj. pouze z jediné molekuly DNA. Vlastní reakce je založena na cyklickém střídání teplot. Protože se jedná o řetězení těchto cyklů, nazýváme tuto metodiku řetězová reakce.

Složení reakční směsi

Do polymerázové řetězové reakce je nutné vložit:

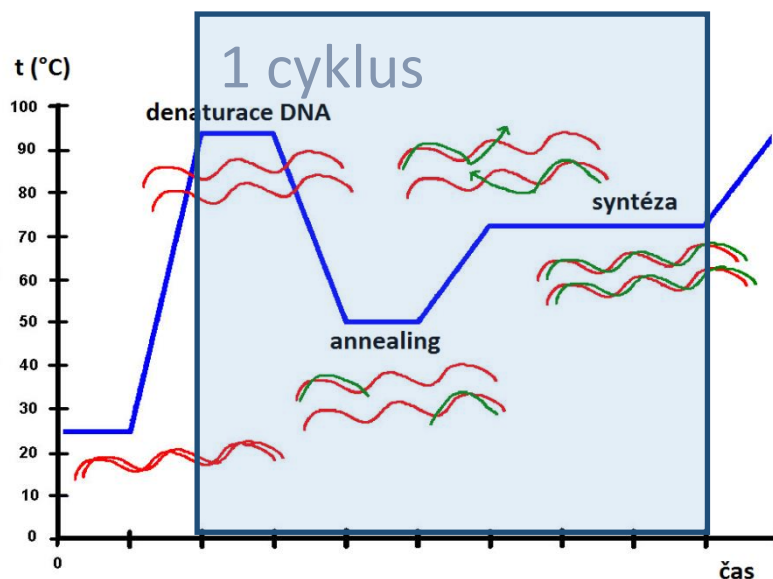
1. **templát DNA** – dsDNA jako předlohu (templát) pro syntézu
2. **dNTP** = dATP, dGTP, dCTP, dTTP – směs deoxynukleosidtrifosfátů představující stavební kameny, z nichž se syntetizuje nový řetězec DNA.
3. **primery** - dva syntetické oligonukleotidy, které vymezují amplifikovaný úsek
4. **DNA polymerázu** - enzym, který provede syntézu DNA
5. pufr = prostředí vhodné pro aktivitu polymerasy, složením lze ovlivnit výtěžek i specifitu reakce.

Celkový reakční objem se volí podle potřeby, nejběžněji 15 – 100 μ l.

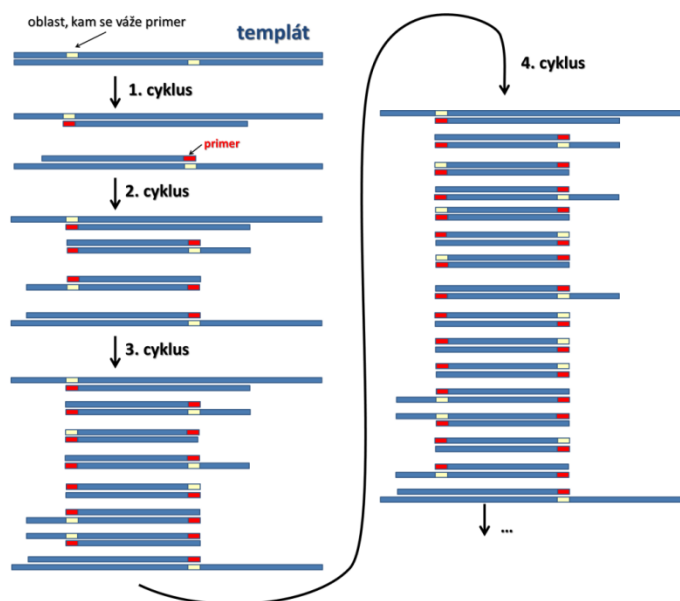
Princip a průběh reakce

Reakce, založená na cyklickém střídání teplot, se skládá ze tří periodicky se opakujících kroků:

1. **Denaturace** - zvýšením teploty reakční směsi na cca. 95°C dochází k porušení vodíkových můstků mezi bázemi v dvouvláknové DNA. Vzniknou tedy dvě jednovláknové molekuly DNA.
2. **Hybridizace** (nasednutí) primerů - tzv. „*annealing*“ – ochlazení reakční směsi na teplotu, při níž se mohou primery specificky navázat na komplementární sekvenci templátového vlákna DNA. Teplota závisí na délce a nukleotidovém složení primerů. Nejčastěji se tato teplota pohybuje mezi 50 a 60°C.
3. **Syntéza** nových řetězců – v tomto kroku dochází k nasednutí DNA polymerázy prodlužování primerů (*elongace*) – zahřátí směsi na teplotní optimum DNA polymerasy (obvykle 72°C) umožní efektivní syntézu fragmentu požadované délky v daném čase. Doba trvání jednotlivých cyklů závisí na délce replikovaného fragmentu a na typu polymerasy.



Cyklus se periodicky opakuje 15 – 40 krát, což vede k exponenciálnímu zmožení zvoleného fragmentu. Jak je zajištěno, že vznikne právě zvolený fragment? Nové vlákno DNA syntetizuje DNA polymeráza, která nesedne v místě primeru a prodlužuje jej. V prvním cyklu by teoreticky mohla syntetizovat až do konce řetězce předlohy. Prakticky toto nenastává, protože dříve dojde k denaturaci v dalším tj. 2. cyklu. Ve 2. cyklu dojde k rozvolnění dvouvláknové DNA na jednotlivá vlákna. Na takto vzniklé 4 řetězce nasednou znovu primery a vše se opakuje a tím rozdílem, že je-li předlohou vlákno vzniklé v 1. cyklu, toto vlákno končí v místě prvního primeru, tudíž nový řetězec už má příslušnou délku. Tyto krátké specifické produkty přibývají exponenciálně, zatímco delší produkty (podle původního dlouhého templátu) se množí lineárně.



Obr. 15 Průběh PCR

Aby nebylo nutno po každé denaturaci přidávat nový enzym, používá se termostabilní DNA polymerasa, která neztratí svoji aktivitu ani po zahřátí na 95°C. Nejčastěji se používá DNA polymerasa získaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, zvaná Taq polymerasa. Aby se zabránilo práci polymerázy při nízké teplotě, která může vést k nespecifické amplifikaci, používá se tzv. hot-start polymerázy. Tyto enzymy obvykle využívají monoklonální protilátky, které se vážou do katalytického místa enzymu, čímž reverzibilně blokují jeho aktivitu. Při prvním denaturačním cyklu dojde k ireverzibilní teplotní denaturaci protilátky a tím k odblokování enzymatické aktivity.

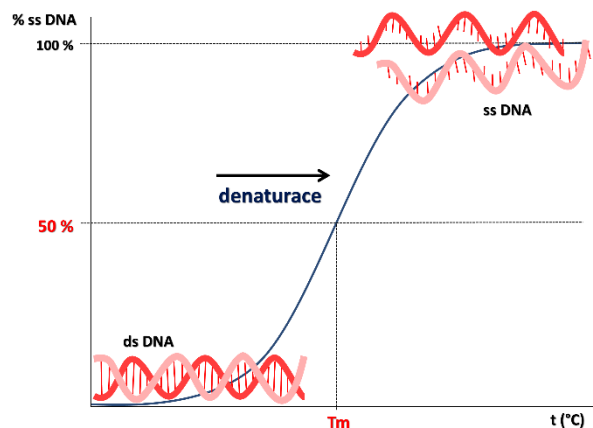
Klíčovou podmínkou úspěchu je výběr správných primerů. Tyto oligonukleotidy obvykle o délce 17-25 nukleotidů, hybridizují s komplementární sekvencí opačných vláken templátové DNA a ohraničují tak amplifikovanou sekvenci. Musí být tedy komplementární k cílové DNA, ale nesmí být komplementární vůči sobě navzájem či uvnitř jednoho z primerů. Tyto oligonukleotidy jsou po hybridizaci na 3'-konci prodlužovány DNA polymerasou, která neumí začít syntézu komplementárního řetězce DNA de novo. Jejich sekvence se udává ve směru 5'-3' kopírovaného vlákna, první označujeme forward (upstream) a druhý reverse (downstream). Vybrané sekvence by měly být jedinečné, specifické pro amplifikovanou sekvenci, aby se nemnožil jiný úsek než požadovaný. Také by měly mít stejnou nebo alespoň podobnou teplotu annealingu. Teplotu annealingu lze různými metodami přibližně vypočítat, vždy však musí být empiricky optimalizována, aby amplifikace byla specifická při dostatečném výtěžku. Při příliš nízké teplotě mohou primery nasedat i na sekvence, se kterými nejsou zcela komplementární. Vytvoří se tak nespecifický produkt. Při příliš vysoké teplotě primery hybridizují nedostatečně a produkt se tvoří ve velmi malém množství.

V neposlední řadě je účinnost amplifikace ovlivněna kvalitou a čistotou templátové DNA. Nečistoty obsažené ve vzorku mohou působit jako inhibitory polymerázy, nebo polymerasovou reakci výrazně zpomalovat tím, že se váží na templátovou DNA a znepřístupňují ji pro vazbu polymerázy.

Protože pro úspěšný průběh PCR je bezpodmínečně nutná dobře denaturovaná DNA, předřazuje se před blok cyklů úvodní denaturace (obvykle 95°C 2 – 3 min), která zabezpečí rozdělení dsDNA na dvě ssDNA. Po proběhnutí zvoleného počtu cyklů se standardně vkládá krok pro dosyntetizování fragmentů - 72°C, 5 - 7 min, pak se reakční směs zchladí na 4°C.

Denaturace a renaturace DNA

Stoupající teplota prostředí (stejně tak silně alkalické pH) vede k porušení vodíkových můstků mezi vlákny dvoušroubovice. Hovoříme o denaturaci DNA. Tato změna je reverzibilní. Navrácení do původního dvouvláknového stavu, tzv. renaturace (= hybridizace) lze dosáhnout pomalým ochlazením. Při prudkém ochlazení nenastává. Za vhodných podmínek mohou takto vytvořit dvoušroubovici i vlákna různého původu pouze na základě komplementarity bází.



Obr. 16 Denaturace DNA

Charakteristikou stability fragmentu dsDNA je jeho teplota tání T_m (melting temperature). Je to teplota, při které je dvouřetězcová DNA z poloviny denaturována. Tato teplota závisí na délce fragmentu, na jeho nukleotidovém složení (vyšší podíl GC párů zvyšuje teplotu tání) a na dalších faktorech jako pH nebo iontová síla roztoku.

U oligonukleotidů kratších než 50 bp lze orientačně vypočítat podle vzorce:

$$T_m = 2 \times (\text{počet AT párů}) + 4 \times (\text{počet GC párů})$$

Hybridizační teplota je o 5 °C nižší, než je T_m .

Amplifikace RNA

V případě amplifikace RNA se provádí reverzní transkripce s následnou polymerázovou řetězovou reakcí (RT – PCR). Při reverzní transkripci se reakční směs skládá z následujících složek:

- templátová RNA
- reverzní transkriptasa, což je enzym, který provede zpětný přepis RNA na jednovláknovou DNA
- syntetický oligonukleotid
- při reverzní transkripci mRNA se používá oligonukleotid oligo(dT)_{12–24}, který se přichytí na polyadenylový řetězec, nebo směs oligonukleotidů (obvykle hexamerů) s různými sekvencemi, které se přichycují na náhodné komplementární sekvence RNA
- při reverzní transkripci určité vybrané RNA se známou částí nukleotidové sekvence se používá genově specifický primer
- inhibitor ribonukleas

Běžná reverzní transkripce má tento průběh:

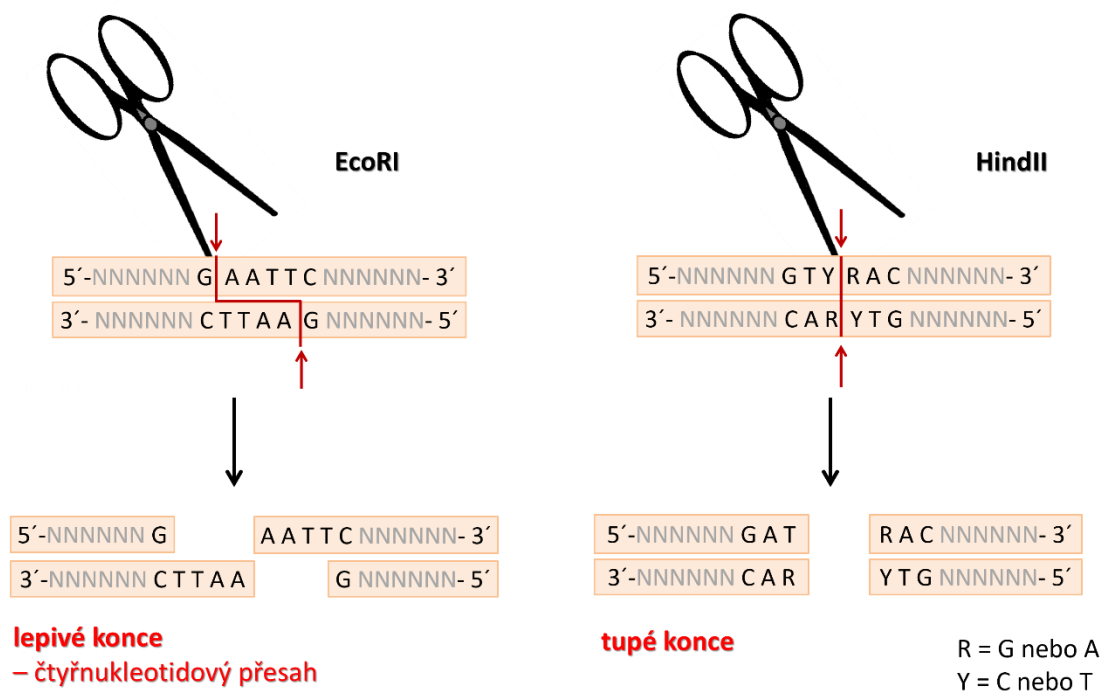
1. denaturace RNA před přípravou reakční směsi
2. příprava reakční směsi
3. přichycení primeru při vhodné teplotě (pro oligo(dT)₁₅ 25°C 10 min)
4. vlastní syntetická reakce (cca 42°C 60 min)
5. teplotní inaktivace enzymu (při 99°C 5 min)
6. zchlazení směsi na 4°C

Následná PCR, při níž je reverzní transkriptázou syntetizované 1. vlákno cDNA amplifikováno na běžnou dvouvláknovou DNA, se již podstatně neliší od PCR výše uvedené.

Restrikční endonukleazy (restriktazy)

Restrikční endonukleázy jsou bakteriální enzymy štěpící cizorodou dsDNA na kratší úseky, tzv. restrikční fragmenty. Bakteriím tyto enzymy slouží jako jakýsi „imunitní systém“, který je chrání před cizorodou DNA. Vlastní DNA bakterie je chráněna proti degradaci methylací v místech rozpoznávaných sekvencí. Tyto bakteriální enzymy lze izolovat a využít v molekulárně biologické laboratoři k fragmentaci DNA.

Restrikční endonukleázy jsou podle svých vlastností rozdělovány do 4 typů. Praktické využití při analýzách DNA mají endonukleázy typu II. Tyto restriktázy neštěpí DNA náhodně, ale rozpoznávají specifické sekvence (restrikční místa) a DNA přímo v nich, nebo v jejich těsné blízkosti štěpí. Tato místa bývají obvykle dlouhá asi 4-8 nukleotidů, často mají charakter palindromů (obrácených repetit). Štěpení fosfodiesterové vazby probíhá současně na obou řetězcích. Pokud dochází ke štěpení přesně uprostřed restrikčního místa, vznikají tzv. tupé konce. Pokud dochází ke štěpení v jiném místě, vznikají konce s různě dlouhým přesahem, tzv. lepivé konce.



Obr. 17 Způsob štěpení

V současnosti je známo více jak 4 000 restriktáz, které rozpoznávají více jak 300 různých sekvencí. Existují databáze, např. REBASE® (rebase.neb.com), ve kterých je možné vyhledávat restriktázy např. podle rozpoznávané sekvence.

Názvosloví restrikčních endonukleáz je poměrně specifické. První tři písmena názvu jsou odvozena z rodového (první písmeno), respektive druhového jména (druhé a třetí písmeno) organismu, ze kterého restriktasa pochází, např. *Eco* pro *Escherichia coli* nebo *Hin* pro *Haemophilus influenzae*. Následuje symbol pro označení kmene, *Hind* pro *H. influenzae* kmen d. Poslední součástí názvu je římská číslice označující jednotlivé restriktázy produkované

stejným kmenem, *HindII* a *HindIII*. Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz má široké využití např. restrikční analýza DNA, molekulární klonování, tvorba cDNA knihoven...

Stanovení SNP

Ke stanovení jednonukleotidových polymorfismů lze využít metodu nazvanou „polymorfismus délek restrikčních fragmentů“ (RFLP, restriction fragment length polymorphism) nebo její modifikaci PCR-RFLP = AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). V praxi využijeme modifikovanou metodu.

V prvním kroku se izoluje DNA, která má být analyzována. Oblast s předpokládaným výskytem polymorfismu je amplifikována pomocí PCR. Získaný PCR produkt je podroben restrikčnímu štěpení. Původní metoda používá k restrikčnímu štěpení přímo izolovanou genomovou DNA. Liší-li se dvě alely nukleotidovou sekvencí, která je na jedné z nich součástí místa rozeznávaného restrikční endonukleasou, je toto restrikční místo na druhé z nich porušeno, tj. DNA není v tomto místě danou restriktaázou štěpena. Po rozštěpení daným restrikčním enzymem se původně stejně dlouhé fragmenty liší svojí délkou. Získané fragmenty se analyzují pomocí gelové elektroforézy.

Protože genomová DNA je kromě cílové sekvence štěpena danou restriktaázou ještě v obrovském počtu dalších restrikčních míst, výsledkem štěpení je obrovské množství fragmentů, které tvoří na elektroforéze souvislou „šmouhu“. Pro zjištění polohy fragmentů sledované sekvence je proto nutné použít tzv. Southern blot. V případě metody PCR -RFLP je výsledkem štěpení jen několik málo fragmentů a proto na elektroforéze přímo vidíme výsledek.

Southernův přenos (Southern blot/blotting)

Southernův přenos je hybridizační technika, pojmenovaná podle E. Southerna, který daný postup zavedl. DNA se elektroforézou na agarosovém gelu rozdělí podle velikosti fragmentů a denaturací v roztoku NaOH se převede na jednovláknovou strukturu. Jednovláknová DNA (ssDNA) se přenese na nylonovou nebo nitrocelulosovou membránu. Přenos DNA z gelu na membránu (blotting) se uskutečňuje buď pomocí kapilárních jevů nebo pomocí elektrických sil (elektroblotting). DNA se na membráně zakotví (nejčastěji UV zářením). Poté se membrána nechá inkubovat v roztoku, který obsahuje značené definované fragmenty DNA - sondy (próby). Tyto sondy hybridizují (vytvářejí dvouvláknové úseky) s komplementárními řetězci zakotvené DNA. Po hybridizaci se nenávané sondy odmyjí a deteguje se poloha navázaných sond. Jsou-li sondy značeny radioaktivně, provede se autoradiografie – membrána se položí na rentgenový film a nechá exponovat. Po vyvolání filmu bude na místě hybridizované radioaktivní sondy signál. Existují však i komerčně dostupné sety pro neradioaktivní značení, např. fluorescenční nebo chemiluminiscenční.

Existuje obdobná hybridizační technika pro analýzu RNA nazvaná Northern blot.

Elektroforéza

Základní technikou dělení, identifikace a purifikace nukleových kyselin je elektroforéza na gelu. Nukleové kyseliny se v mírně zásaditém prostředí (pH \approx 8,5) chovají jako polyanionty. Se zvyšujícím se počtem nukleotidů v molekule úměrně roste její náboj. Proto se v elektrickém poli pohybují směrem k anodě. Abychom docílili jejich rozdělení podle velikosti, používáme vhodný nosič, nejčastěji agarosový nebo polyakrylamidový gel, které slouží jako molekulové síto. Větší molekuly se jimi pohybují mnohem hůře než molekuly menší.

Pro delší fragmenty (500 bp – 25 kbp) se používají agarosové gely, pro kratší fragmenty gely polyakrylamidové. Dělicí schopnost agarosového gelu lze ovlivnit koncentrací agarosy, standardně používané koncentrace uvádí tabulka.

koncentrace agarosy v gelu (%)	délky efektivně dělených fragmentů DNA (kbp)
0,5	30 – 1
0,7	12 – 0,8
1,0	10 – 0,5
1,2	7 – 0,4
1,5	3 – 0,2

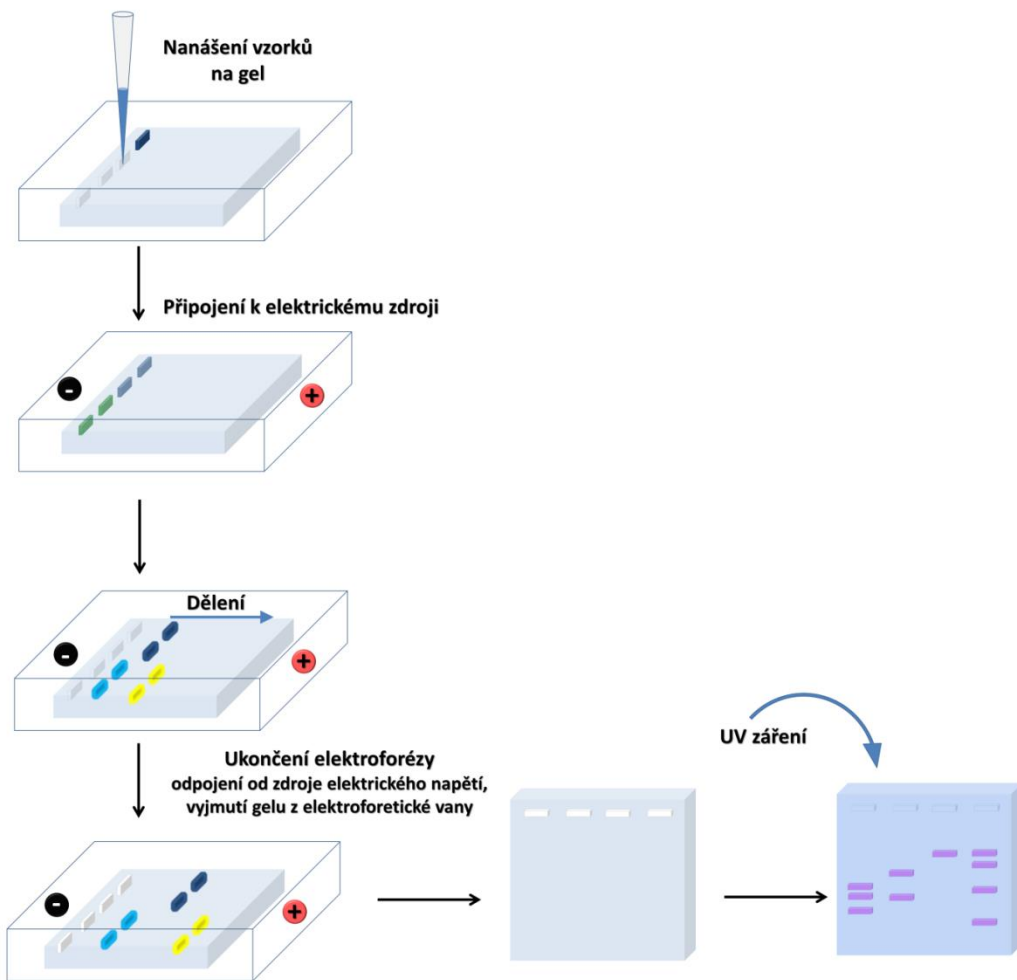
Elektroforéza na agarosovém gelu se provádí v horizontálním provedení. Připraví se gel s danou koncentrací agarosy v elektroforetickém pufru (TAE nebo TBE), který má tloušťku 0,5 – 1 cm a na startu jamky pro nanesení vzorků. Gel se vloží do elektroforetické nádoby a zalije se elektroforetickým pufrem tak, aby nad gelem byla vrstva pufru 1 mm.

Před nanesení na gel se vzorek smísí s nanášecím pufrem (loading buffer), což zvýší hustotu směsi a tím usnadní aplikaci do jamky. Nanášecí pufr obsahuje navíc i barvivo, které vlivem elektrického pole migruje stejným směrem jako nukleové kyseliny a poskytuje tak možnost odhadnout pozici dělených fragmentů. Nejčastěji se používá bromfenolová modř, která postupuje rychlostí stejnou jako fragment DNA o délce 500bp.

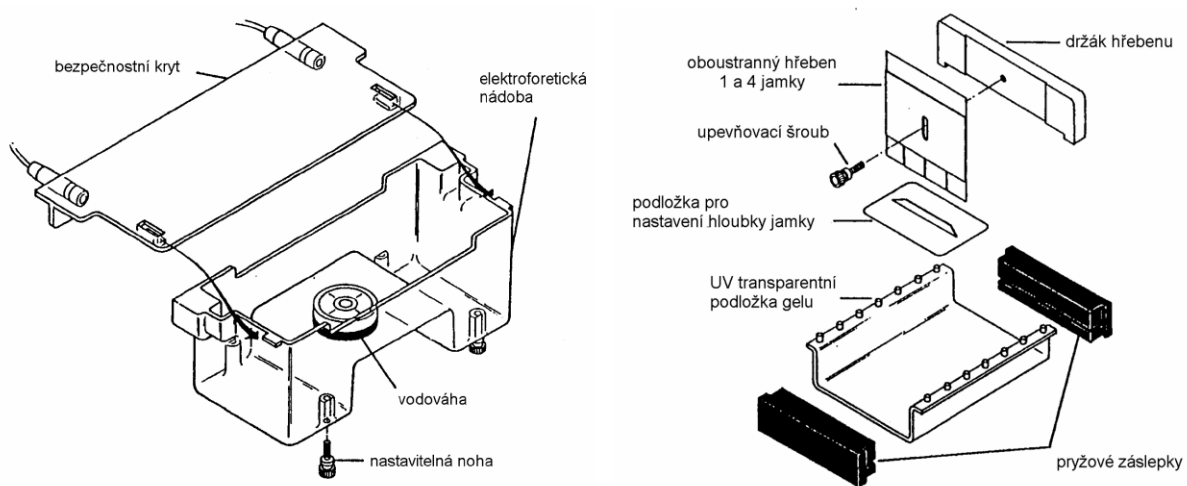
Pro určení délek analyzovaných fragmentů je vhodné se vzorky nanést na gel i marker, tj. směs DNA fragmentů vhodných délek, jejichž velikost je známa.

Po nanesení vzorků se elektroforéza připojí k elektrickému zdroji, nastaví se napětí 1 - 10 V / cm délky gelu a podle délky dělených fragmentů se zvolí doba průběhu.

Rozdělené fragmenty mohou být vizualizovány vybarvením gelu ethidiumbromidem, což je barvivo, které se interkaluje do DNA a pod ultrafialovým zářením oranžově fluorescenčně září. Barvení gelu může být provedeno po ukončení elektroforézy koupáním v roztoku ethidiumbromidu (0,5 μ g/ml) nebo lze ethidiumbromid do gelu přidat již při jeho přípravě (konečná koncentrace ethidiumbromidu v gelu - 0,5 μ g/ml). Ethidiumbromid je potenciální karcinogen.



Obr. 18 Elektroforéza – princip



Obr. 19 Elektroforetická vanička

Interpretace výsledků

alela normální (wt)

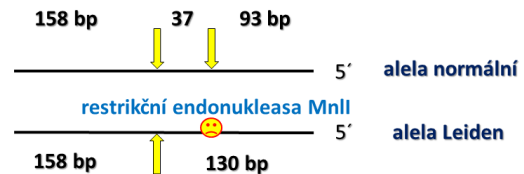
GGTGAGCACACCAACATGACACATGTATACATATGTAACAAACCTGCACGTTGTGCACA
TGTACCCCTAGAACTTAAAGTATAATTTAAAAAATAAAAAATAAAAGAATTCCTTTTGCA
ATATTAATTGGTTCCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTTATCATGAAATAAAGTTTGCA
AATGAAAACAAATTTGAATATATTTCTTTTCAGGCA**GGAAACAACCCATGATCAGAGCAG**
TTCAACCAGGGGAAACCTATACTTATAAGTGGAAACATCTTAGAGTTTGGATGAACCCACAG
AAAATGATGCCCGAGTGCCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA
TCGCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCAG
GAATACAGGTATTTTGCCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCGAGAATTTCTTCTGGCT
AGAACATGTTAGGCTCTCCTGGCTAAATAATGGGGCATTTCCTCAAGAGAACAGTAATTG
TCAAGTAGTCCTTTTAGCACCAGTGTGATAACATTTATCTTTTTTTTTTTTTTGTCTTG
TCTATTTTTATCAGTACCATCACTGCCGAAGGCAAGTCTAGAGTGTGATAACATATTTTG

délka PCR produktu: **288 bp**

wild type: **158 bp** **37 bp** **93 bp**

5'...C C T C (N)₇...3'
3'...G G A G (N)₈...5'

FVL F	5'- GGAACAACA CCA TGA TCA GAG CA -3'	23 mer
FVL R	5'- TAG CCA GGA GAC CTAACA TGT TC -3'	23 mer



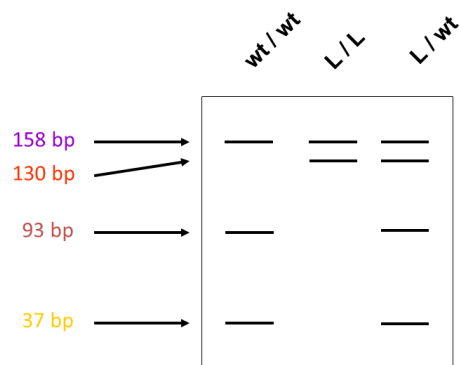
alela Leiden (L)

GGTGAGCACACCAACATGACACATGTATACATATGTAACAAACCTGCACGTTGTGCACA
TGTACCCCTAGAACTTAAAGTATAATTTAAAAAATAAAAAATAAAAGAATTCCTTTTGCA
ATATTAATTGGTTCCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTTATCATGAAATAAAGTTTGCA
AATGAAAACAAATTTGAATATATTTCTTTTCAGGCA**GGAAACAACCCATGATCAGAGCAG**
TTCAACCAGGGGAAACCTATACTTATAAGTGGAAACATCTTAGAGTTTGGATGAACCCACAG
AAAATGATGCCCGAGTGCCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA
TCGCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCAG
GAATACAGGTATTTTGCCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCGAGAATTTCTTCTGGCT
AGAACATGTTAGGCTCTCCTGGCTAAATAATGGGGCATTTCCTCAAGAGAACAGTAATTG
TCAAGTAGTCCTTTTAGCACCAGTGTGATAACATTTATCTTTTTTTTTTTTTTGTCTTG
TCTATTTTTATCAGTACCATCACTGCCGAAGGCAAGTCTAGAGTGTGATAACATATTTTG

délka PCR produktu: **288 bp**

Leiden: **158 bp** **130 bp**

5'...C C T C (N)₇...3'
3'...G G A G (N)₈...5'



U heterozygota, který zahrnuje obě varianty, uvidíme 4 proužky (1. je společný oběma variantám - 158bp, 2. nerozštěpený (alela L) - 130bp, 3. a 4. dvě části vzniklé štěpením (normální alela) 93 a 37bp).

Pomůcky a slangové termíny

Eppendorfka (mikrozukmavka typu Eppendorf)



Malá plastová zkušavka (nejčastěji o objemu 1,5 ml) s víčkem a s kónickým dnem. Je to snad nejuniverzálnější a nejvíce používaná "nádobka" v laboratořích biochemie a molekulární biologie. Uplatnění má všude tam, kde se pracuje s malými objemy (v řádu desítek až stovek mikrolitrů). Slouží nejen k provádění reakcí, ale i pro přípravu a skladování roztoků. Je vhodná i pro skladování hluboce zamražených vzorků (-80 °C). Při provádění reakcí odolá i teplotám 100 °C. Zkušavka je autoklávovatelná.

Autoklávování je v laboratořích běžný a velice účinný způsob sterilizace vlhkým vzduchem za vysokého tlaku a teploty (parní sterilizace), typicky 120 °C po dobu 15 minut.

Připojené víčko snadno umožňuje těsné uzavření, které brání kontaminaci během práce a dělá z eppendorfky nádobku vhodnou i na dlouhodobé skladování.

Kónické dno umožňuje centrifugaci, navíc tento tvar zkušavky s úzkým prostorem dna usnadňuje práci s malými objemy, tj. i pokud je ve zkušavce jen minimální objem, pořád je odtud relativně pohodlně pipetovatelný.

Slangový název eppendorfka pochází od názvu firmy, která tento typ zkumavky poprvé v roce 1963 uvedla na trh (německá firma Eppendorf založená roku 1945 v Hamburku ve čtvrti Eppendorf, podle které si dala firma jméno). Zkumavky jsou vyráběny z polypropylenu, což je materiál chemicky velmi odolný, snese i extrémní teploty (-90 °C až +121 °C). Za více než 50 let existence se v designu zkumavek projevila mnohá drobná vylepšení, která mohou zpříjemnit práci a některá směřují zkumavky k jednomu určitému typu použití. Dostupné jsou eppendorfky se "safe-lock" pojistkou víčka, která brání snadnému otevření, zkumavky s naprosto čirou stěnou, která umožní jejich přímé použití jako kyvet pro optické metody. Stěna zkumavek může mít hrubé měřítko objemu nebo plošku pro "nesmazatelné" označení.

Vortex (vortex mixer)

Přístroj určený k důkladnému promíchání obsahu malých zkumavek a nádobek. Když je zkumavka vtlačena do gumové části nahoře na přístroji, spustí se motor a gumová část rychle osciluje kruhovitým pohybem, pohyb se přenáší na tekutinu uvnitř nádoby a ta se vířivým způsobem (vortex = vír) velice efektivně míchá. Většina přístrojů má nastavitelnou rychlost pohybu a možnost volby, zda je motor spuštěný nepřetržitě nebo se zapne jen na dobu, kdy na gumovou část tlačíme zkumavkou.



Je možných více způsobů, jak zkumavku na vortex přikládat (vtlačit do středu gumové části nebo jen opřít o hranu). Pro běžné promíchání roztoku stačí většinou jen krátké přiložení (5-10 sekund), ale přinejmenším v některých procedurách je ale vyžadováno intenzivní míchání po delší dobu.

Při míchání obsahu eppendorfky je nutné, aby jeden prst ruky, ve které eppendorfku držíme, jistil víčko proti možnému otevření! Jinak hrozí vystříknutí obsahu. Z tohoto důvodu se nedoporučuje vortexovat žiraviny.

zvortexovat = promíchat na vortexu

Mikrocentrifuga

Centrifuga určená k odstředování malých zkumavek (eppendorfek)

