

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

BIOCHEMICKÁ VYŠETŘENÍ JATERNÍCH MARKERŮ

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Hradec Králové 2014

Markéta Divecká

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 2014.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi, CSc., vedoucímu mé bakalářské práce, za odborné vedení a cenné rady při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat celé své rodině, zejména rodičům, za jejich trpělivost a podporu, kterou mi po celou dobu poskytovali.

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na biochemická vyšetření schopná odhalit jaterní poškození. Je členěna na část popisující morfologii, rozdělení, funkci a regeneraci jater. Dále se zabývá biochemickými testy, které jsou rozděleny na jednotlivé analyty schopné odhalit jaterní poškození z hlediska jejich konkrétních metabolických funkcí. V závěru práce je kritické zhodnocení schopnosti biochemických testů specificky určit dané poškození jaterní tkáně.

ABSTRAKT

This work is focused on biochemical tests capable of detecting liver damage. It is divided into a section describing the morphology, distribution, function and liver regeneration. It also deals with the biochemical assays that are divided into individual analytes able to detect liver damage in terms of their specific metabolic functions. The end of this work contains critical assessment the ability of biochemical tests specifically identify the damaged liver tissue.

Seznam zkratek

ADP	-	adenosindifosfát
ALB	-	albumin
ALP	-	alkalická fosfatáza
ALT	-	alaninaminotransferáza
AST-c	-	aspartátaminotransferáza cytoplazmatická
AST-m	-	aspartátaminotransferáza mitochondriální
ATP	-	adenosintrifosfát
BCG	-	bromkresolová zeleň
BCP	-	bromkresolový purpur
BIL	-	bilirubin
CNS	-	centrální nervová soustava
EDTA	-	etylendiamintetraoctová kyselina
EIA	-	elektroimunoanalýza
ELFO	-	elektroforéza
ELISA	-	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, imunoenzymatická analýza
ER	-	endoplazmatické retikulum
GIT	-	gastrointestinální trakt
GLDH	-	glutamátdehydrogenáza
GGT	-	gamaglutamyltransferáza
HDL	-	lipoproteinová částice o vysoké hustotě
HL	-	jaterní lipáza
CHE	-	cholinesteráza
CHOL	-	cholesterol
IDL	-	lipoproteinová částice o střední hustotě
IFCC	-	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
LACT	-	lecitincholesterol - acetyltransferaza
LDH	-	laktátdehydrogenáza
LDL	-	lipoproteinová částice o nízké hustotě

LPL	-	lipoproteinová lipáza
MD	-	malátdehydrogenáza
MK	-	mastné kyseliny
NAD ⁺	-	nikotinamidadeninukleotid, oxidovaná forma
NADH	-	nikotinamidadeninukleotid, redukovaná forma
NADP ⁺	-	nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaná forma
NADPH	-	Nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaná forma
NMK	-	nasyčené mastné kyseliny
PALB	-	prealbumin
PCR	-	polymerázová řetězová reakce
PEG	-	polyethylenglykol
RBP	-	retinol binding protein, bílkovina vázající retinol
RES	-	retikuloendotelový systém
TG	-	triacylglyceroly
TP	-	total protein
VLDL	-	lipoproteinová částice o velmi nízké hustotě

Obsah

ÚVOD	8
1 ANATOMIE A FYZIOLOGIE JATERNÍ TKÁNĚ	9
1.1 Zevní členění jater	9
1.2 Vnitřní členění jater.....	11
1.3 Funkce jaterní tkáně	13
1.4 Regenerace jaterní tkáně	20
2 LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ	21
3 HEPATOBILIÁRNÍ POŠKOZENÍ	21
3.1 Aminotransferázy.....	22
3.1.1 ALT, Alaninaminotransferáza.....	22
3.1.2 AST, Aspartátaminotransferáza.....	24
3.2 ALP, Alkalická fosfatáza, monoesterfosfhydroláza	26
3.3 GGT, Gamaglutamyltransferáza	28
3.4 GLDH, Glutamátdehydrogenáza	29
3.5 LDH, Laktátdehydrogenáza.....	30
4 MĚŘENÍ SYNTETICKÉ FUNKCE JATER	31
4.1 TP, Celková bílkovina.....	32
4.2 ALB, Albumin	33
4.2 PALB, Prealbumin	35
4.3 CHE, Cholinesteráza	35
5 MĚŘENÍ TRANSPORTNÍ A EXKREČNÍ FUNKCE JATER	37
5.1 BIL, Bilirubin.....	37
5.2 Amoniak.....	39
6 ZÁVĚR	40
7 LITERATURA	42

ÚVOD

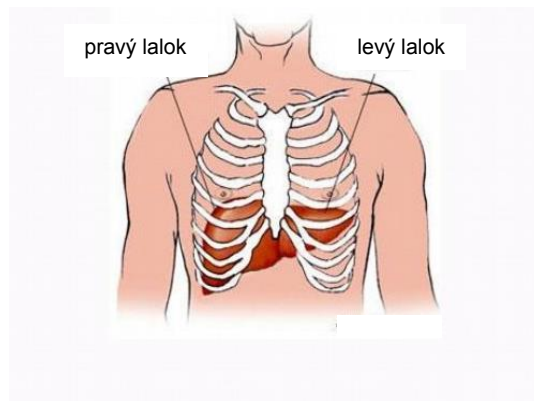
Játra, hepar, představují největší vnitřní orgán a největší žlázu jak s endokrinní, tak i exokrinní sekrecí. Hrají nepostradatelnou úlohu v energetickém a intermediálním metabolismu. Jsou mezistupněm mezi trávicím systémem a krví. Jaterní buňka je patrně nejvšestrannější buňkou. V jediném okamžiku vykonává činnost inaktivační, exkretční, detoxikační i syntetickou. Účastní imunitních pochodů, částečně na trávení a na homeostáze vnitřního prostředí. Úplné vyřazení jaterní tkáně vede v první řadě k rozkolísání hladin krevního cukru, rozvíjí se progresivní hypoglykémie, která vede ke smrti organismu. Při neschopnosti tvoření močoviny dochází k nárůstu toxického amoniaku, což může vést k poruchám CNS, komatu a smrti. Pokud chybí schopnost detoxikace, v organismu dojde k nahromadění toxických endogenních i exogenních produktů. Protože játra hrají tak důležitou roli, je velice důležité odhalit jejich onemocnění v co nejčasnějším okamžiku. Játra jsou na jedné straně velmi citlivá k toxickému působení různých látek, na straně druhé však mají výjimečně velkou regenerační schopnost. Proto včasnou správnou diagnostikou jater a pomocí vhodné terapie je možná úplná obnova jejich funkce. Z hlediska své důležitosti, kterou játra v organismu zaujímají, mají také velkou funkční kapacitu, a proto jsou jejich základní funkce zajištěny až mnohonásobně, tzn., že například defekt ureageneze se projeví až při postižení 90% jaterní tkáně. Jednotlivá onemocnění jater se projevují nejrůznějšími funkčními poruchami, které lze určit nejlépe právě pomocí biochemických vyšetřovacích metod. Proto jsem se ve své práci zaměřila právě na základní diagnostiku jaterní tkáně pomocí tzv. jaterních markerů. Z mé praxe v klinické biochemické laboratoři pozoruji, že s vývojem nových zobrazovacích technik, jako je nukleární magnetická rezonance, ultrasonografie a zejména výpočetní tomografie, mají základní biochemická vyšetření přece jen menší význam, než jak tomu bylo dříve. Jaterní markery se však stále ještě dnes běžně používají při základním vyšetření a to především díky rychlé dostupnosti a mnohdy i ekonomické výhodnosti těchto vyšetření. Pomocí základního biochemického vyšetření je klinik nasměrován do daného místa poškození jaterní tkáně a díky tomu je následně za pomoci dalších speciálních vyšetření možné co nejdříve určit správnou diagnózu.

1 ANATOMIE A FYZIOLOGIE JATERNÍ TKÁŇE

1.1 Zevní členění jater

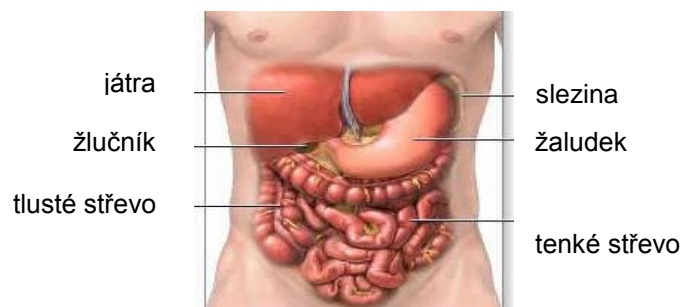
Játra váží zhruba 1,5 kg a proteče jimi asi 1,5 l krve za jednu minutu. Mají červenohnědou barvu, jsou měkká a velice křehká. Při otřesech nebo nárazech snadno dochází k jejich poškození, což vede k život ohrožujícímu masivnímu krvácení (Čihák, 2002).

Jsou uložena těsně pod bránicí na pravé straně dutiny břišní, přesahují až pod střed levé brániční klenby. Podélně měří cca 25 cm, na výšku zhruba 10 cm. (Obr. 1)



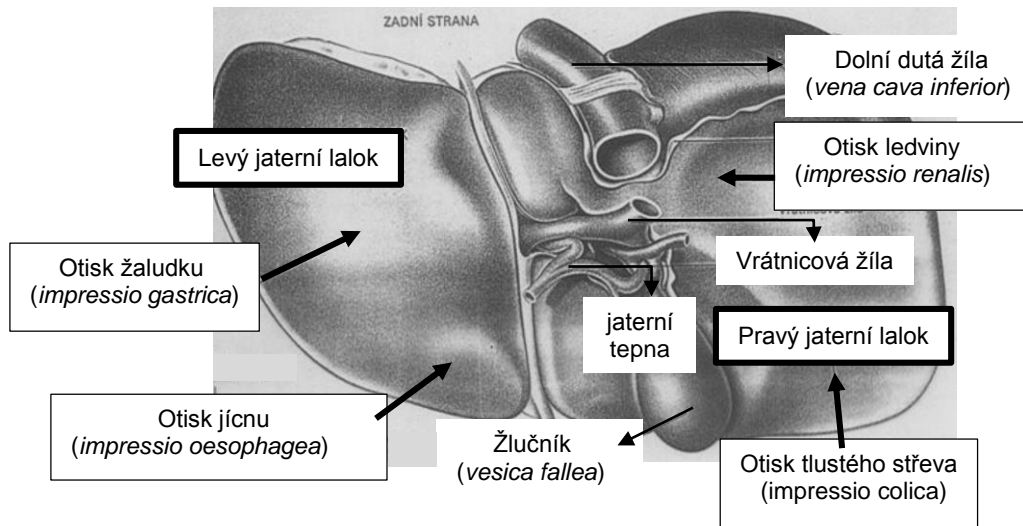
Obr. 1 Umístění jater (Benjamin Wedro 2014)

Horní plocha jater *facies diaphragmatica* se dotýká bránice, spodní plocha *facies visceralis* naléhá na orgány dutiny břišní, žaludek, dvanáctník, pravou ledvinu s nadledvinkou a část tlustého střeva (Janqueira, 1997). (obr. 2)



Obr. 2 Uspořádání břišní dutiny (Caitlin Kelly, 2008)

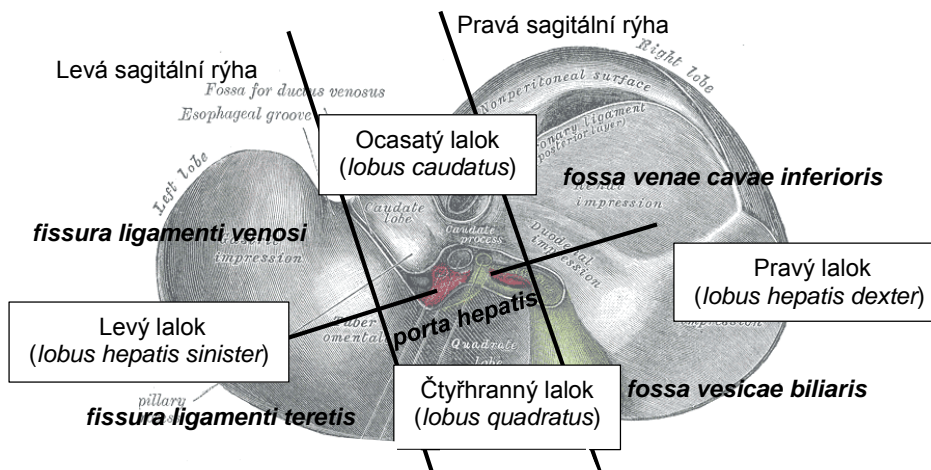
Díky měkké konzistenci jater na nich vznikají otisky orgánů, ke kterým játra těsně přiléhají, tzv. *impressiones* (Čihák 2002). (Obr. 3.)



Obr. 3 Otisk vnitřních orgánů, jaterní tepny a žíly (Ptáček Vladimír, 2010)

Převážná část jater je pokryta peritoneem. Na horní ploše játra přímo srůstají s bránicí v místě *area nuda*. Fixace jater je zajištěna několika závěsy. S bránicí jsou spojena pomocí *ligamentum coronarium hepatis* a *triangulare dextrum et sinistrum*. S bránicí a přední stěnou břišní je pojí *Ligamentum falciforme hepatis* a *ligamentum teres hepatis*. S pravou ledvinou jsou spojena pomocí *ligamentum hepatorenale*. *Ligamentum venae cavae* játra pojí k *vena cava inferior* (Čihák 2002).

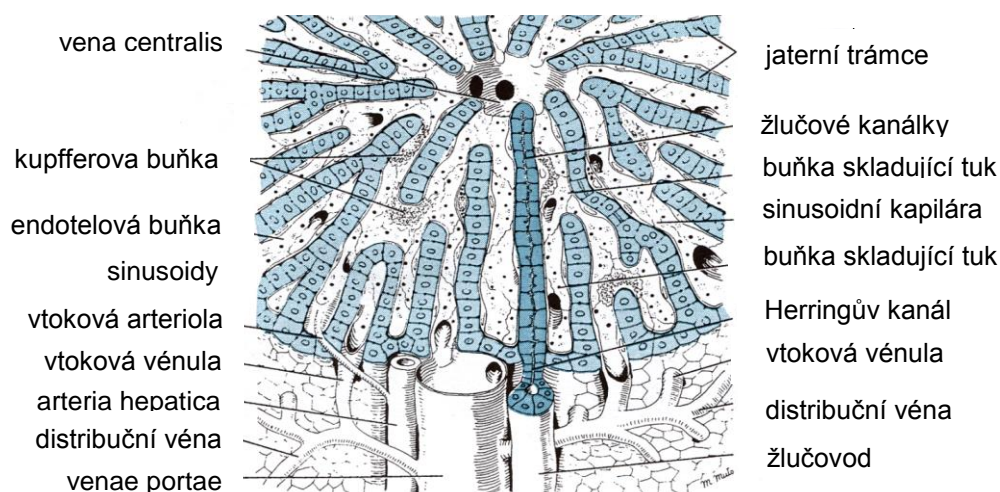
Játra se skládají ze čtyř laloků. Větší *lobus dexter*, menší *lobus sinister*, *lobus quadratus* a *lobus caudatus*. (Obr. 4). Rýhy, které tyto laloky oddělují, mají tvar písmene H a příčná rýha tvoří jaterní bránu *porta hepatis* (Páč 2012). (Obr. 5)



Obr. 4 Členění viscerální plochy jater (Hilary Cable, 2008)

1.2 Vnitřní členění jater

Hlavní komponentou jaterní struktury je hepatocyt. Hepatocyty k sobě těsně přiléhají a tvoří jednotlivé trámce. Mezi trámci probíhají jaterní sinusoidy. Uvnitř trámců se nacházejí počáteční úseky žlučových kanálků. Trámce se sbíhají doprostřed, směrem k *vena centralis* a tvoří tak jaterní lobulus. Žlučové kanálky se spojují s Herringovými kanálky a vytvářejí žlučovod. Žluč je z jaterního lalůčku vedena opačným směrem než krev, tedy z centra na periferii (Junqueira 1997). Uspořádání jaterního lalůčku je zobrazeno na obrázku. (Obr. 5)



Obr. 5 Organizace jaterního lalůčku (Junqueira 1997)

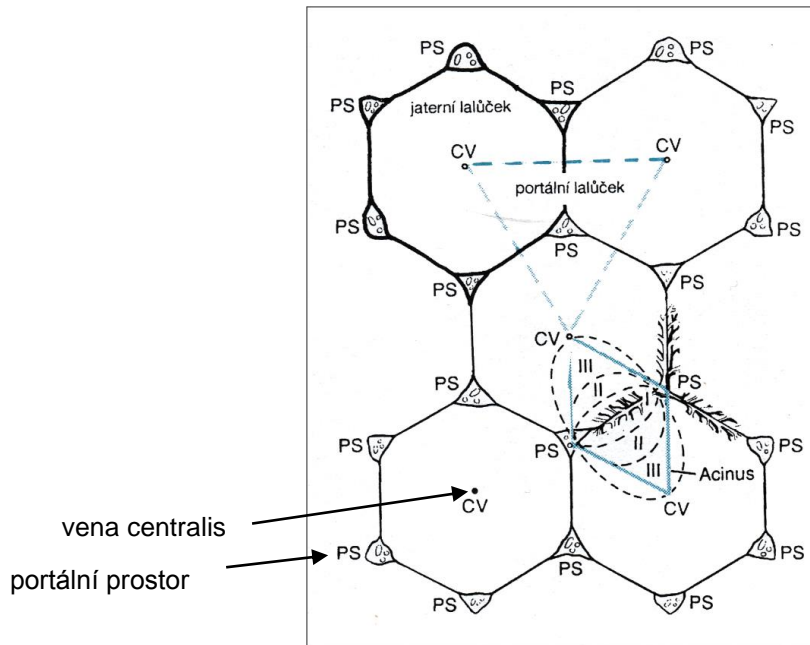
Morfologickou jednotkou jaterní tkáně je jaterní lobulus. Má tvar šestibokého hranolu se zaoblenými stěnami. V místech, kde se scházejí tři jaterní lalůčky, vznikají tzv. portobiliární prostory. Ty obsahují *vena interlobularis* (větev *venae portae*), *arteria interlobularis* (větev *arteria hepatica propria*), interlobulární žlučovod, a mohou jimi procházet i lymfatické cévy (Konrádová 2000).

Jaterní sinusoidy jsou od hepatocytů odděleny tzv. Disseho prostorem. Toto jedinečné uspořádání umožňuje přímý kontakt krevní plazmy s povrchem hepatocytů a díky tomu snadnou výměnu látek mezi jaterními sinusoidami a hepatocyty. Sinusoidy obsahují nejen endotelové buňky, ale také makrofágy, tzv. Kupfferovy buňky. V Disseho prostoru se mohou nacházet tukové buňky (tukové buňky), ty jsou schopné zachycovat exogenní vitamín A (Konrádová 2000).

Kromě již zmíněného jaterního lalůčku můžeme z funkčního hlediska v jaterním parenchymu rozlišit další funkční strukturní jednotky.

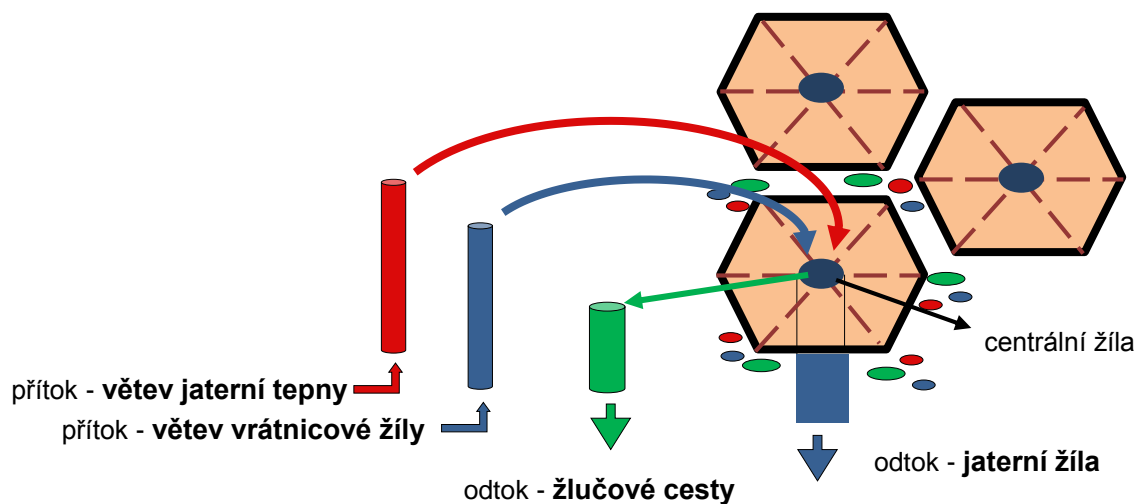
Portální lalůček, *lobulus venae interlobularis*. Pomyslně má tvar trojúhelníku. Tato oblast je zásobována jednou interlobulární vénou a arterií. Nejmenší funkční jaterní jednotkou je primární acinus. Tato část je zásobována jednou cirkumlobulární vénou a arterií. Na řezu má

tvár vybroušeného diamantu. Buňky jaterního acinu můžeme rozdělit do tří zón. Zóna I. přichází jako první do styku s přiváděnou krví, proto jsou tyto buňky nejdříve poškozeny, pokud jde o působení toxických látek. Tato zóna je na straně druhé nejlépe zásobena živinami, a proto zde dochází především k syntéze bílkovin a glykogenu. Buňky zóny III. se účastní především detoxikačních procesů (Junqueira 1997). Všechny funkční strukturální jednotky jaterní tkáně jsou zobrazeny na obrázku. (Obr. 6)



Obr. 6 Jaterní strukturální jednotky (Junqueira 1997)

Játra přijímají krev ze dvou zdrojů. (Obr. 7). Cestou *venae portae*, se přivádí odkysličená krev z břišních orgánů bohatá na živiny. Touto cestou se přivádí do jater 60 - 70 % z veškerého množství krve, které játra prochází. Druhá cesta je pomocí *arteria hepatica propria*, kterou se přivádí z břišní aorty krev okysličená (Junqueira 1997).



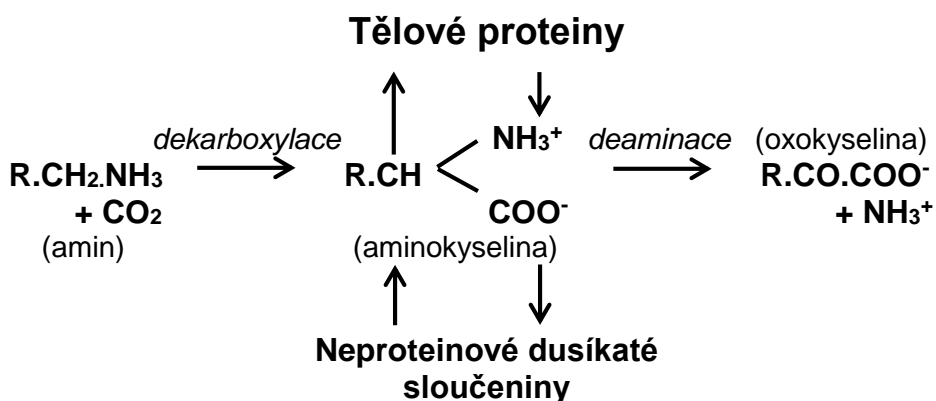
Obr. 7 Krevní oběh jaterním lalůčkem (Wilhelm, Hegyi 2007)

1.3 Funkce jaterní tkáně

Syntéza proteinů

Bílkoviny mají v organismu kromě nutričního významu i další funkce. Podílejí se na udržení onkotického tlaku a acidobazické rovnováhy. Podílejí se na hemokoagulaci, fibrinolýze, transportu látek v organismu. Účastní se imunitních reakcí. Za den jsou játra schopna nasyntetizovat zhruba 50 g bílkovin. Do celkového objemu exportovaných bílkovin se započítává i cca 5% bílkovin tvořených v Kupfferových buňkách, které nalézáme v jaterních sinusoidách (Junqueira 1997).

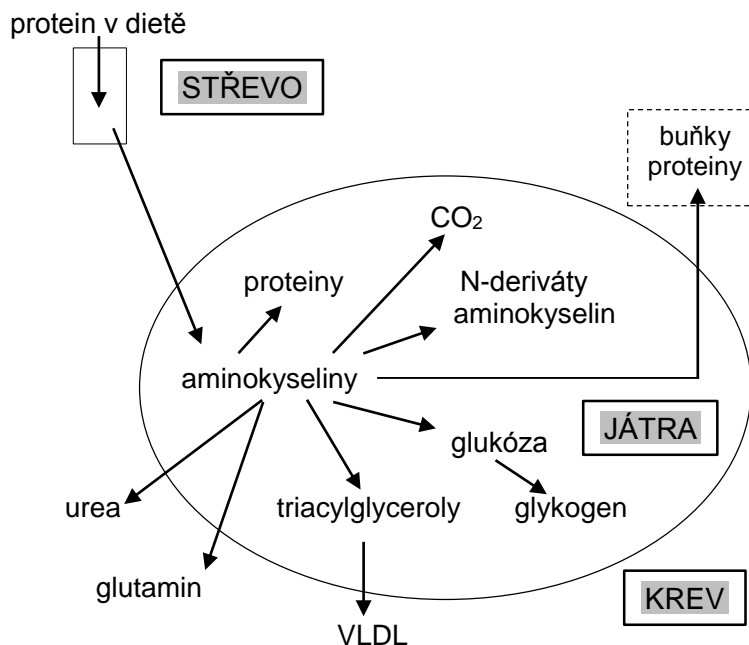
Stavebními kameny proteinů jsou aminokyseliny. Aminokyseliny mají v organismu čtyři hlavní funkce. Jsou hlavní komponentou proteinů. Uhlíkový řetězec aminokyselin může sloužit jako zdroj energie a jako substrát pro další reakce. Přítomné dusíkaté atomy slouží pro syntézu dalších potřebných dusíkatých látek. Zjednodušeně řečeno, po příjmu proteinů potravou dochází k jejich rozštěpení na jednotlivé aminokyseliny. Z nich poté játra syntetizují bílkoviny pro daný organismus potřebné. Aminokyseliny rozeznáváme neesenciální, ty které organismus dokáže syntetizovat, a esenciální, které je nutné přijímat potravou. Po příjmu potravy bohaté na proteiny stoupá i hladina aminokyselin. Nadbytek aminokyselin nedokáže organismus skladovat, a dochází k jejich metabolizaci až na jejich konečné produkty. Schéma katabolismu aminokyselin je znázorněn na obrázku. (Obr. 8)



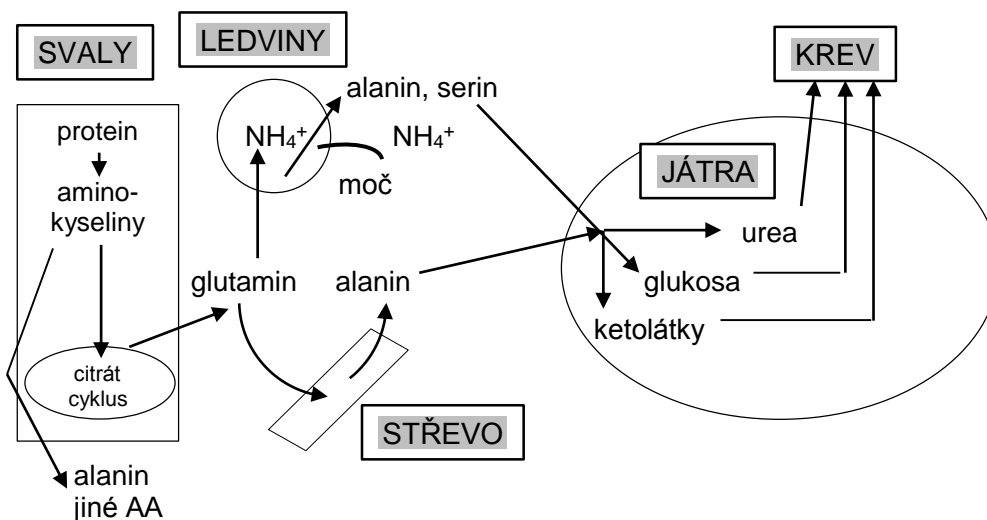
Obr. 8 Katabolismus aminokyselin (Masopust 1999)

Prvním krokem při odbourávání aminokyselin je oxidační deaminace, odstranění aminoskupiny. Vzniká tak pro tělo toxický NH_4^+ respektive NH_3 . Ten je odstraňován dvěma způsoby. Amidací glutamátu na glutamin v mitochondriích buněk. Druhým způsobem detoxikace amoniaku je močovinový cyklus v játrech (Masopust 1999).

Pro buňky je však nezbytná určitá pohotovostní hladina aminokyselin. V cirkulaci se jejich množství udržuje v malé, ale velmi stálé koncentraci (Masopust 1999). Metabolismus bílkovin je shrnut ve schématech na obrázcích. (Obr. 9, Obr. 10)



Obr. 9 Metabolismus bílkovin – aminokyselin po jídle (Masopust 1999)



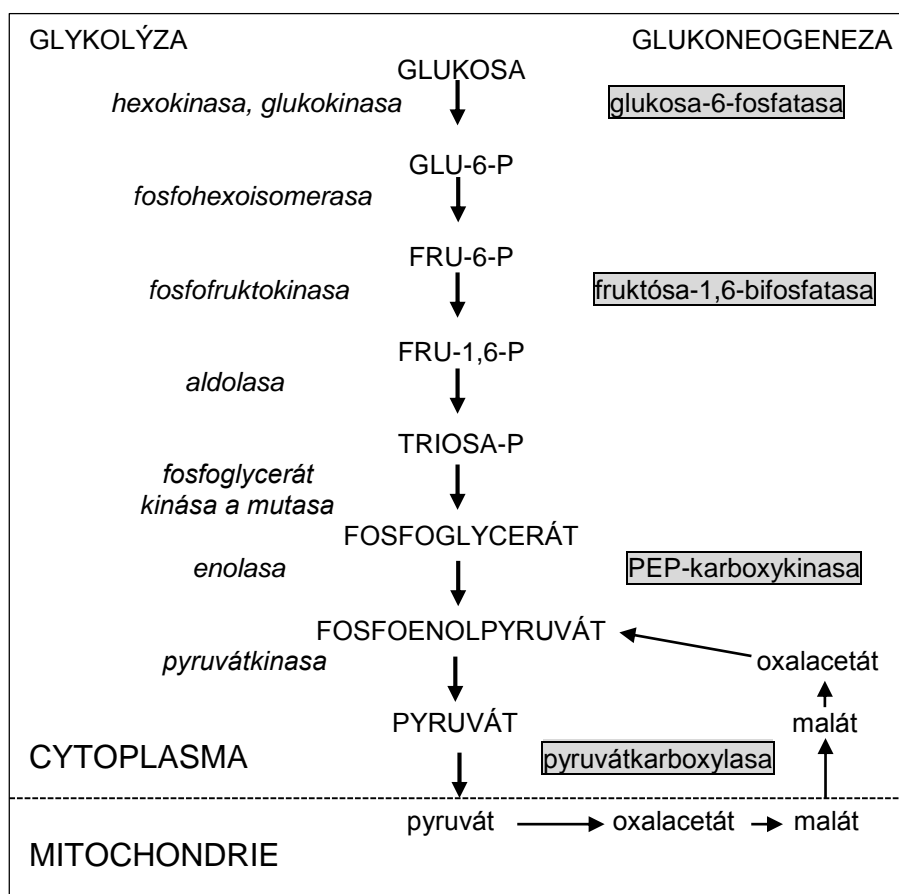
Obr. 10 Metabolismus bílkovin – aminokyselin při lačnění (Masopust 1999)

Mezi hlavní bílkoviny tvořené v játrech patří albumin, protrombin, fibrinogen a lipoproteiny. Játra je využívají pro svou vlastní potřebu a také je plynule vyplavují do periferní krve. Díky

této funkci můžeme játra považovat za endokrinní žlázu (Junqueira 1997). Při poškození jaterní tkáně dochází k poklesu plazmatických bílkovin, což má vliv na hodnotu onkotického tlaku. Jeho pokles zabrání návratu tekutiny do kapilár, tekutina s odpadními látkami zůstává v tkáních a dochází ke vzniku otoků.

Udržování hladiny glukózy v organismu

Udržování hladiny cukru v organismu je prioritní funkcí jaterní tkáně. Při jaterním selhání dochází nejdříve ke snížení hladiny cukru a tím i k neschopnosti zajišťovat energii pro další pochody v organismu. Úplné vyřazení jaterní tkáně z funkce vede ke komatu a smrti. Glukosemie je v organismu udržována pomocí glykolýzy (tvorba ATP), glykogenogeneze (tvorba glykogenu), lipogeneze (přeměna glukózy na mastné kyseliny), glykogenolýzy a glukoneogeneze. (Obr. 11)

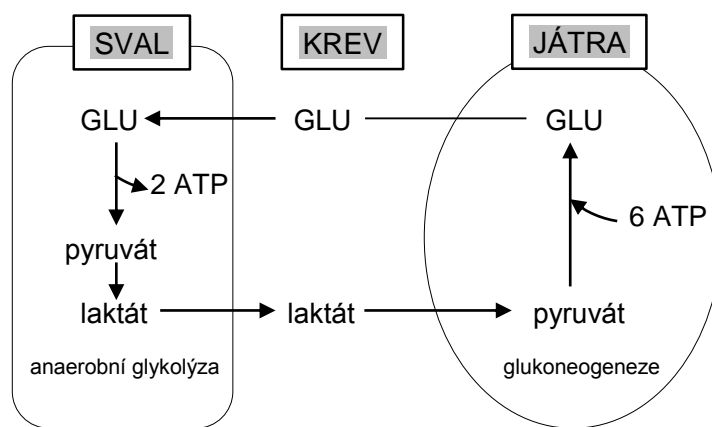


Obr. 11 Schéma glykolýzy a glukoneogeneze (Masopust 1999)

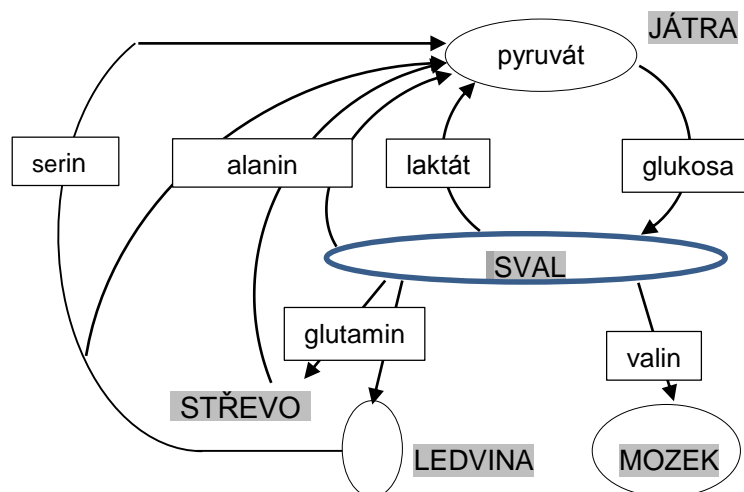
Jednotlivé pochody zprostředkovávají energii pro potřebu buněk ze zásobního glykogenu. V případě potřeby zvyšují hladinu glukózy nebo se aktivují, když je její hladina v krvi zvýšená a podporují tvorbu glykogenu. (Masopust 1999).

Po požití potravy se cestou *vena portae* dostává glukóza do jater. Zde je z větší části přeměněna na glykogen. Za normálních okolností se hladina glukózy pohybuje v rozmezí 6.5 – 7.2 mmol/l (Masopust 1999). Z cirkulace je přenášena do tkání, které ji využívají (např. svalstvo, tuková tkáň). Tento proces je regulován insulinem. Vstup glukózy do tkání, které této regulaci nepodléhají (např. mozek), závisí pouze na její hladině v krvi. Vychytávání glukózy pomocí inzulinu se děje pouze v případě jejího přebytku. V době lačnění, při poklesu glukózy na spodní hranici, dochází k rozpadu jaterního glykogenu v procesu glykogenolýzy. Až po vyčerpání veškerého zásobního glykogenu dochází ke tvorbě glukózy „de novo“ v procesu glukoneogeneze, především z proteinových aminokyselin.

Pro tvorbu glukózy je využit i svalový laktát, který se tvoří zvýšenou svalovou aktivitou (Obr. 12), i svalový alanin (Obr. 13). (Masopust 1999).



Obr. 12 Coriho (laktátový) cyklus (Masopust 1999)



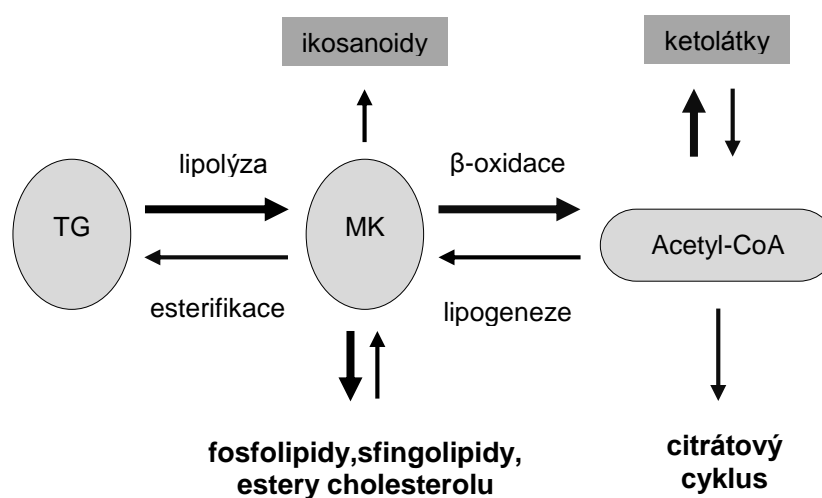
Obr. 13 Glukosa – alaninový cyklus (Masopust 1999)

Metabolismus lipidů a lipoproteinů

Lipidy mají v organismu tři hlavní funkce. Slouží jako zdroj zásobní energie, jsou součástí buněčných membrán a slouží jako izolační vrstva a mechanická ochrana (Trojan 2003).

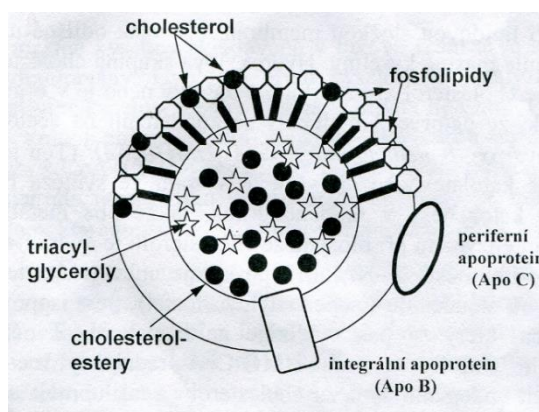
Chemicky se v podstatě jedná o estery vyšších mastných kyselin a alkoholů, v závislosti na druhu lipidu. Složené lipidy obsahují kromě alkoholu i mastné kyseliny a další komponenty. Lipidy odvozené získáváme hydrolýzou lipidů.

Hlavní energetickou zásobárnou jsou triacylglyceroly uložené v tukové tkáni. Jde o neutrální lipid, ester, tvořený třemi mastnými kyselinami a glycerolem. Při příjmu nadbytku potravy, je přebytečné množství glukosy a aminokyselin v játrech metabolizováno na mastné kyseliny. Podle potřeb organismu může docházet k dalším procesům. (Obr. 14)



Obr. 14 Přeměna triacylglycerolů a mastných kyselin (Fialová 2009)

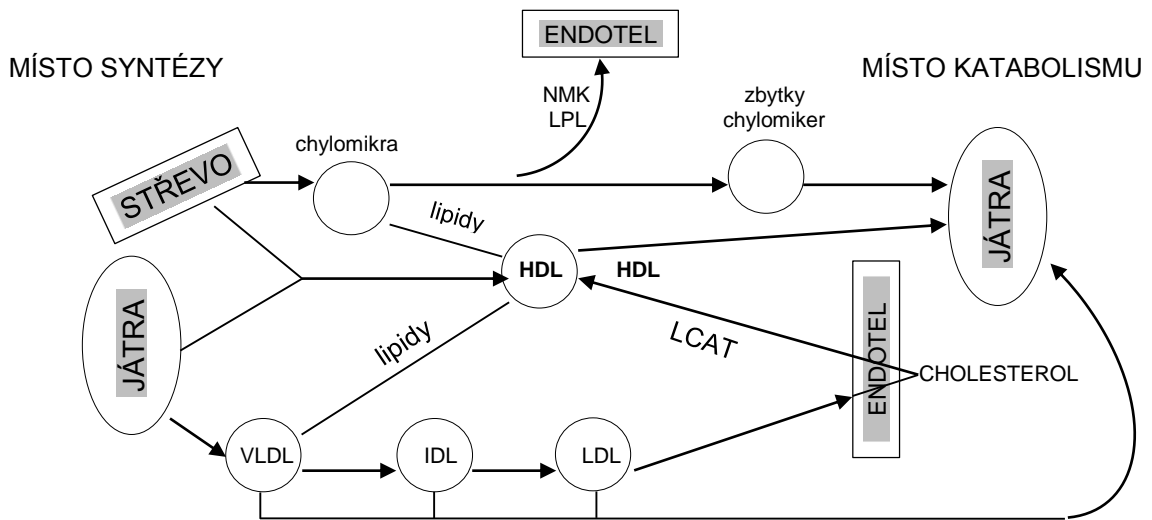
Lipidy jsou částice ve vodě nerozpustné. Mastné kyseliny jsou přenášeny v komplexu s albuminem. Cholesterol, jeho estery, triacylglyceroly a fosfolipidy jsou přenášeny pomocí lipoproteinů (Masopust 1999). (Obr. 15)



Obr. 15 Schéma lipoproteinové částice (Masopust 1999)

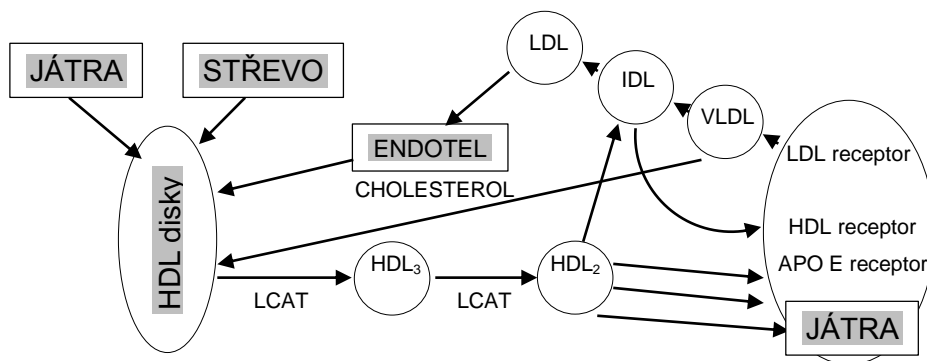
V povrchové vrstvě lipoproteinové částice se nacházejí specifické proteiny zvané apolipoproteiny (Masopust 1999). Ty zprostředkovávají vazbu lipoproteinů na specifické receptory. Za jejich účasti dochází k přenosu lipidů do cílových tkání. Působí také jako kofaktory enzymů, které se uplatňují v metabolismu lipoproteinů. Lipoproteinové částice se dělí podle velikosti a hustoty na chylomikrony, VLDL, IDL, LDL, HDL.

Většina lipoproteinů je tvořena v játrech, kromě chylomikronů, které se jako jediné tvoří v tenkém střevě. Jednotlivé třídy jsou nositeli různého množství cholesterolu. Lipoproteinové částice jsou postupně štěpeny, také pomocí enzymu HL, a při tom si předávají částice cholesterolu, tak aby byly nakonec játry vychytány a přebytečný cholesterol mohl být eliminován (Zima 2002).



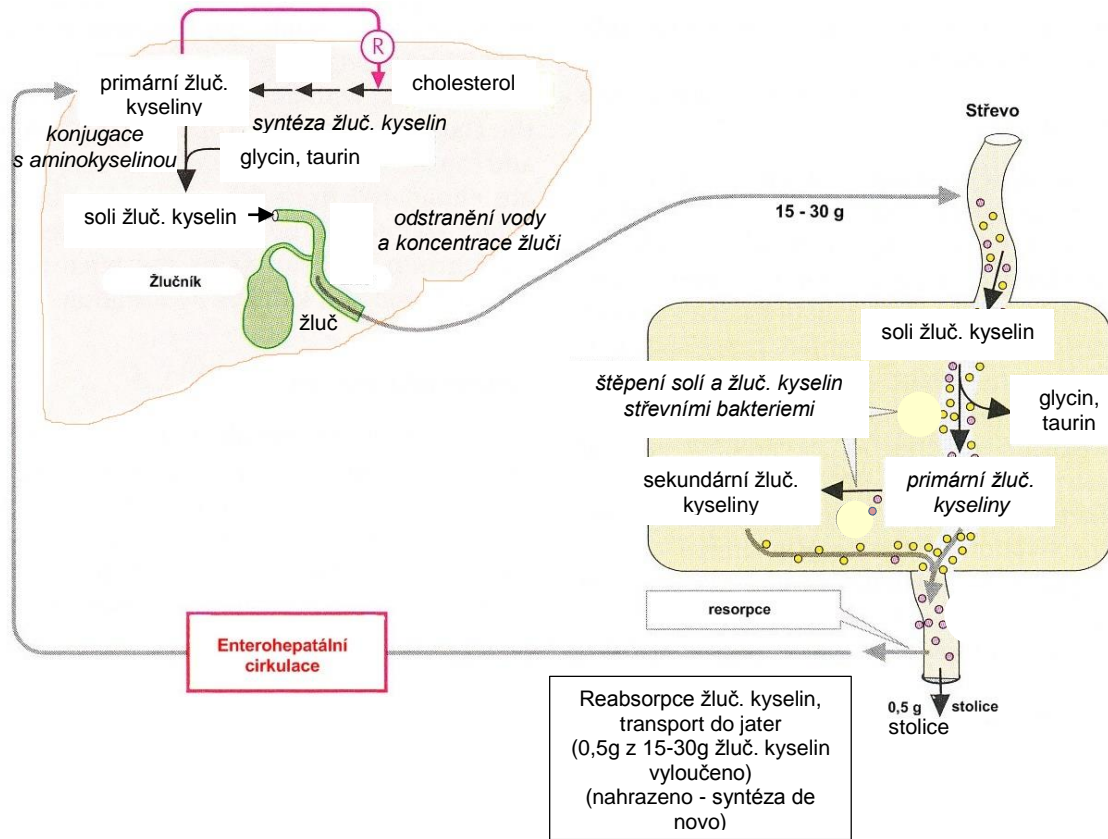
Obr. 16 Schéma mechanismu lipoproteinových částic. (Masopust 1999)

Cholesterol je tvořen v játrech, ve střevě a zčásti také v nadledvinách a pohlavních orgánech. Je součástí buněčných membrán, stabilizuje jejich strukturu a zajišťuje jejich permeabilitu. Účastní se mezibuněčné komunikace. Transport cholesterolu v organismu je znázorněn na obrázku. (Obr 17)



Obr. 17 Reverzní transport cholesterolu (Masopust 1999)

Ze vzniklého cholesterolu jsou syntetizovány žlučové kyseliny, jejichž metabolismus probíhá výhradně v játrech. (Obr. 18)



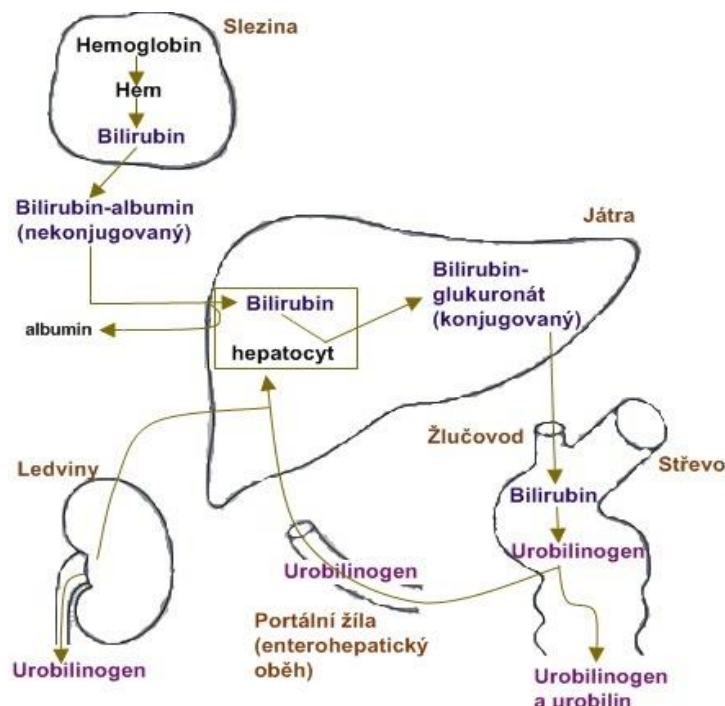
Obr. 18 Metabolismus žlučových kyselin (Skoumalová 2012)

Tvorbu žluči můžeme řadit k exokrinní sekreci. Žluč obsahuje vodu, elektrolyty, žlučové pigmenty, jako je bilirubin a biliverdin, žlučové kyseliny, fosfolipidy a cholesterol. Denně jsou játra schopna vytvořit 500 – 1000 ml této žlutozelené husté tekutiny (Janqueira 1997). Z jater žluč odtéká do žlučníku, kde je skladována. Po příjmu potravy odchází žluč do střeva a účastní se trávicích pochodů.

Detoxikace a inaktivace

Hlavní biotransformační funkcí jater je především zpracování degradačních produktů hemoglobinu a steroidních hormonů, dále eliminace léků a dalších xenobiotik. Dochází k inaktivaci a k přeměně na polární metabolity, které jsou snadno rozpustné ve vodě a díky tomu mohou být vyloučeny z organismu. Řada toxických látek může být metabolizována pomocí oxidace, metylace a konjugace. Tyto procesy probíhají v hladkém ER hepatocytů. Při odbourávání hemoglobinu nejprve dochází k rozštěpení, uvolňuje se globin, proteinová část, která je využívána přímo. Železo je skladováno v játrech jako rezervní pool, ve formě ferritinu, a zbylé porfyrinové jádro je kompletně degradováno ve slezině, játrech a kostní dřeni. Konečným produktem je bilirubin. Ten není rozpustný ve vodě a v organismu je

přenášen v komplexu s albuminem. Aby mohl být vyloučen, je nutná jeho konjugace, ke které dochází v játrech. Metabolismus a vylučování bilirubinu je schematicky popsáno na obrázku. (Obr. 19)



Obr. 19 Metabolismus a exkrece bilirubinu. (Skoumalová 2012)

V detoxikaci a inaktivaci hrají svou roli také přítomné Kupfferovy buňky se svojí fagocytární aktivitou (Janqueira 1997).

Játra jsou orgánem, který produkuje velké množství tepla díky svojí vysoké metabolické aktivitě. Krev, která z jater vychází, má nejvyšší teplotu z celého organismu, cca 39 °C, a díky tomu se játra podílejí asi z jedné sedminy na tvorbě celkové tělesné teploty (Trojan 2003). V játrech jsou tvořeny i některé hormony, jako je angiotenzinogen, který má svůj podíl v udržování krevního tlaku. Dále je to somatomedin, který je vylučován působením růstového hormonu. Somatomediny mají například proteoanabolický účinek (zvyšují svalovou hmotu), zvyšují proteosyntézu a mají inhibující účinek na glukoneogenezi.

1.4 Regenerace jaterní tkáně

Jaterní tkáň je jediným orgánem, který je schopen plné regenerace. Dojde-li ke ztrátě jaterní tkáně, ať již úrazem, chirurgickým zákrokem nebo toxickým poškozením, játra jsou schopná ze čtvrtiny dorůst na svou původní velikost. Dorostlá tkáň je většinou plnohodnotná a znovu začne plnit svou funkci. Pouze v případě chronického poškozování, např. alkoholem, dochází

ke vzniku jizev v kolagenní struktuře jaterní buňky, její struktura ztrácí fyziologické uspořádání a taková buňka již není nadále schopna plné funkce.

Při regeneraci se spouští mechanismy, které jaterní tkáň obnovují. Tyto procesy mají svou autoregulaci pomocí cirkulujících látek zvaných chalonů. Ty selektivně inhibují proliferaci určitých typů buněk. Je-li tkáň poškozena nebo zmenšena, chalonů je méně, to působí mitotickou explozi, a jaterní tkáň se obnovuje. S nárůstem nové tkáně chalonů přibývá, a mitotická aktivita buněk se přirozeně inhibuje (Janqueira 1997).

2 LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ

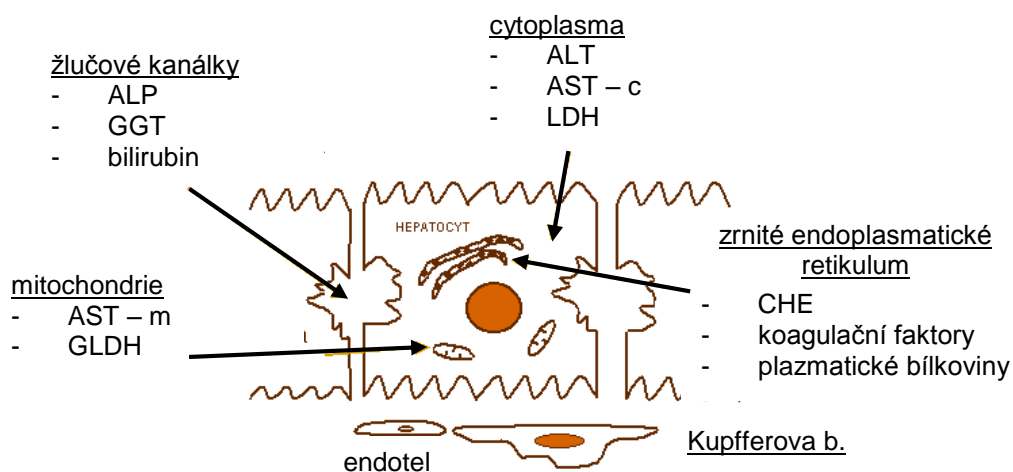
Laboratorní vyšetření můžeme pomyslně rozdělit do dvou skupin. Na testy, které odhalují okamžitou metabolickou funkci jater, a na testy, jejichž zhodnocením můžeme určit funkční jaterní rezervu (Zima 2002).

Podrobněji můžeme laboratorní testy rozdělit na:

- 1) Stanovení hepatobiliárního poškození
- 2) Měření syntetické funkce jater
- 3) Měření transportní a exkreční funkce jater
- 4) Měření schopnosti jater metabolizovat cizorodé látky – dynamické testy
- 5) Vyšetření nespecifických protilátek (Zima 2002)

3 HEPATOBILIÁRNÍ POŠKOZENÍ

Poškození jaterní buňky. Toto poškození zjišťujeme nejčastěji na základě zvýšené aktivity enzymů. Při poškození hepatocytů totiž dochází k uvolňování enzymů, které se v buňce nacházejí, a právě podle zvýšené aktivity daného enzymu je možné usuzovat na tíži postižení.



Obr. 20 schéma hepatocytu (Fialová, Vejražka 2005)

Dojde-li ke zvýšení propustnosti cytoplazmatické membrány, při sebemenším poškození jaterní buňky, dojde k vyplavování enzymů, které se nacházejí v cytoplazmě. Jedná se o enzymy ALT a AST cytoplazmatického původu. Při těžším poškození jsou zasaženy i mitochondrie buněk, dochází k nekróze, a do krve se dostávají i ty enzymy, které se za běžných fyziologických podmínek v krvi nevyskytují. Jedná se o enzymy GLDH a AST mitochondriálního původu. Při poškození buněčné membrány jsou do krve vyplavovány enzymy GGT a ALP. Všechny tyto testy jsou poměrně citlivým ukazatelem poškození hepatocytu, ale funkčnost jaterní tkáně se jimi odhalit nedá.

K elevaci enzymů může docházet i z nehepatálních příčin. Nesprávné stravování, virové onemocnění, zvýšená tělesná aktivita, gravidita, apod. Proto je důležité výsledky těchto testů hodnotit komplexně s přihlédnutím na celkový stav pacienta.

3.1 Aminotransferázy

Jde o enzymy katalyzující reverzibilní přenos alfa aminoskupiny z alaninu (ALT) nebo aspartátu (AST) na alfa ketoskupinu kys. ketoglutarové. Reakce nazýváme transaminační, jsou vratné a hrají významnou roli jak při syntéze, tak při odbourávání aminokyselin.

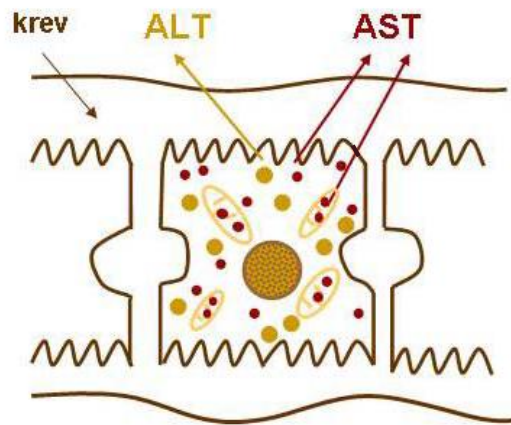
Velmi často se stanovuje poměr AST/ALT, který nás informuje o tom, zda se jedná o proces zánětlivý, například u hepatitidy, nebo zda se již jedná o proces nekrotický (Zima 2002). Tento poměr je významný především u sledování alkoholického poškození jater. Obecně můžeme říci, že čím je hodnota AST vyšší, tím je poškození závažnější.

Hodnota poměru vyšší jak 2 se pokládá za specifický test pro jaterní alkoholické onemocnění. U hepatitid je hodnota poměru nižší jak 1. Pokud hodnoty poměru stoupají, napovídá to progresi onemocnění a možnosti nástupu jaterní cirhózy (Zima 2002).

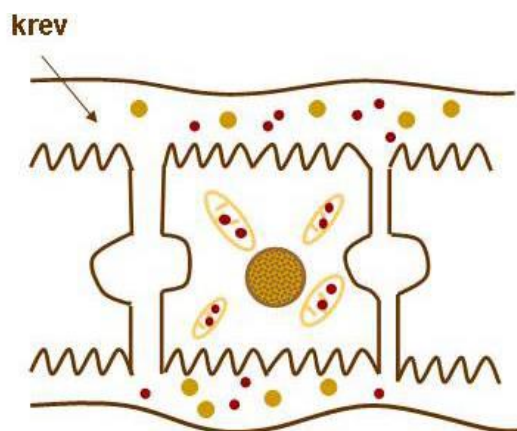
Hodnoty enzymů ALT a AST jsou ovlivňovány řadou faktorů. Je to fyzická aktivita, a to zejména u mužů (vyšší podíl svalové hmoty). Zvýšené hodnoty byly také zjištěny u silně obézních osob bez jaterního poškození. V případech dlouhodobé dialýzy nebo urémie se můžeme setkat s falešně sníženými hodnotami. Pokud je vzorek před danou analýzou nesprávně skladován, např. delší dobu ponechán při pokojové teplotě, následně provedené biochemické testy mohou vykazovat falešně snížené hodnoty (Doležalová a kol. 1995).

3.1.1 ALT, Alaninaminotransferáza

Vyskytuje se především v játrech. V malém množství se nachází i v dalších tkáních, např. v myokardu (Roche Diagnostics 2012). Tento enzym se nachází výhradně v cytoplazmě (Obr. 21). Do krve se uvolňuje poměrně snadno, už při mírném poškození jaterních buněk, kdy dochází ke zvýšené permeabilitě buněčné membrány.



Obr. 21 Hepatocyt za fyziologických podmínek (Fialová, Vejražka 2005)



Obr. 22 Zvýšená permeabilita buň. membrány hepatocytu (Fialová, Vejražka 2005)

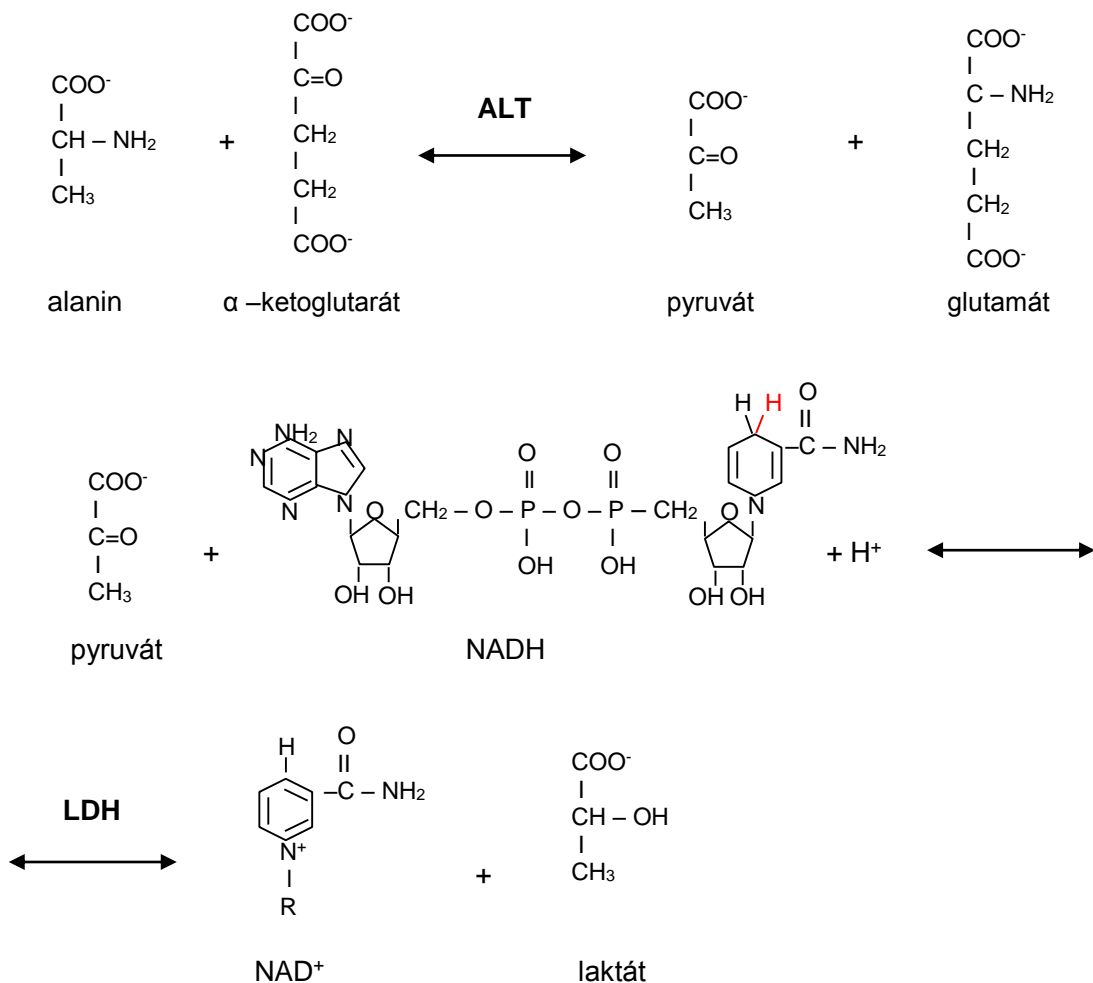
Hlavním zdrojem ALT jsou především játra, a proto se tento test využívá především při diagnostice jaterních onemocnění. Zvýšené hodnoty byly naměřeny při hepatitidě, cirhóze, rakovině jater a u chronického alkoholismu. Slabě zvýšené hodnoty se mohou vyskytovat u pacientů s nekomplikovaným infarktem myokardu (Roche Diagnostics 2012). Dále ho můžeme diagnostikovat při onemocnění žlučových cest a při dekompenzovaných srdečních vadách, kdy dochází k venostáze v játrech (Doležalová a kol. 1995).

Stanovení:

Ke stanovení se využívá dvou po sobě jdoucích enzymatických reakcí. ALT katalyzuje reakci L- alaninu s alfa-ketoglutarátem. Vzniká pyruvát a L-glutamát. Druhou reakcí je oxidačně-redukční děj, kdy je vzniklý pyruvát redukován na laktát a redukováná forma NADH je oxidována na NAD⁺. Tato reakce probíhá za katalýzy enzymu LDH (Obr. 23). Výsledné hodnoty jsou zjišťovány fotometricky. Měří se úbytek absorbance NADH při vlnové délce 340 nm (Roche Diagnostics 2012). Při tomto stanovení se využívá rozdílných vlastností

redukováné a oxidované formy NADH/NAD⁺. Při vlnové délce 340 nm totiž dochází k absorbování redukováné formy, kdežto u oxidované formy k absorpci při této vlnové délce nedochází. Je to dáno rozdíly v nikotinamidovém kruhu obou forem. Tuto metodiku v praxi využívají jak Beckman Coulter tak Roche Diagnostics.

Reagencie využívané při stanovení obsahují L-alanin, albumin, NADH, LDH, pufr, stabilizátory a konzervanty (Roche Diagnostics 2012). K odstranění endogenního pyruvátu a k aktivaci ALT se používá pyridoxal-5-fosfát (Doležalová a kol 1995). Metody mohou mít své nepřesnosti, proto je nutné reakce provádět v prostředí s určitým pH, optimum je pH 7,3, a za teploty 37°C (Roche Diagnostics 2012). Přidaný pufr, stabilizátory a konzervanty eliminují případné souběžně probíhající reakce tak, aby výsledek vlastní reakce nebyl ovlivněn.

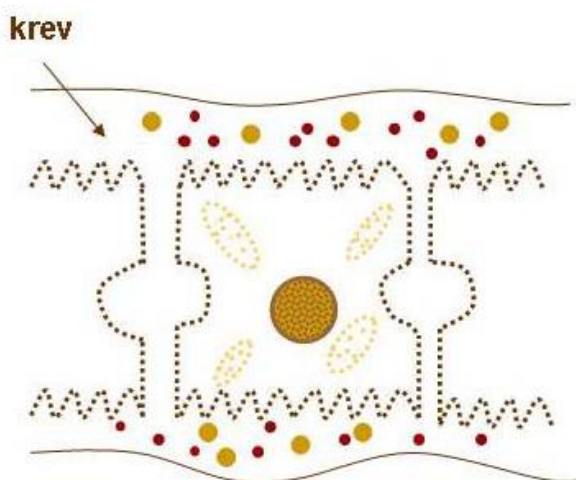


Obr. 23 Reakční schéma stanovení ALT (Roche Diagnostics 2012)

3.1.2 AST, Aspartátaminotransferáza

Vyskytuje se především v játrech, velké množství však nalezneme také v buňkách kosterního svalu, v myokardu a v ledvinách (Roche Diagnostics 2011). Malé množství se nachází

v dalších parenchymatózních orgánech. Velké množství nacházíme v erythrocytech, a proto při stanovení AST vadí hemolýza, která zvyšuje množství AST (Zima 2002). AST se vyskytuje ve dvou izoformách, z menší části v cytoplazmě, z větší části v mitochondriích. (Obr. 21). Identifikujeme-li v séru AST mitochondriálního původu, je to vždy známkou vážného poškození buněk. Za fyziologických podmínek se totiž tento izoenzym v krvi nenachází.



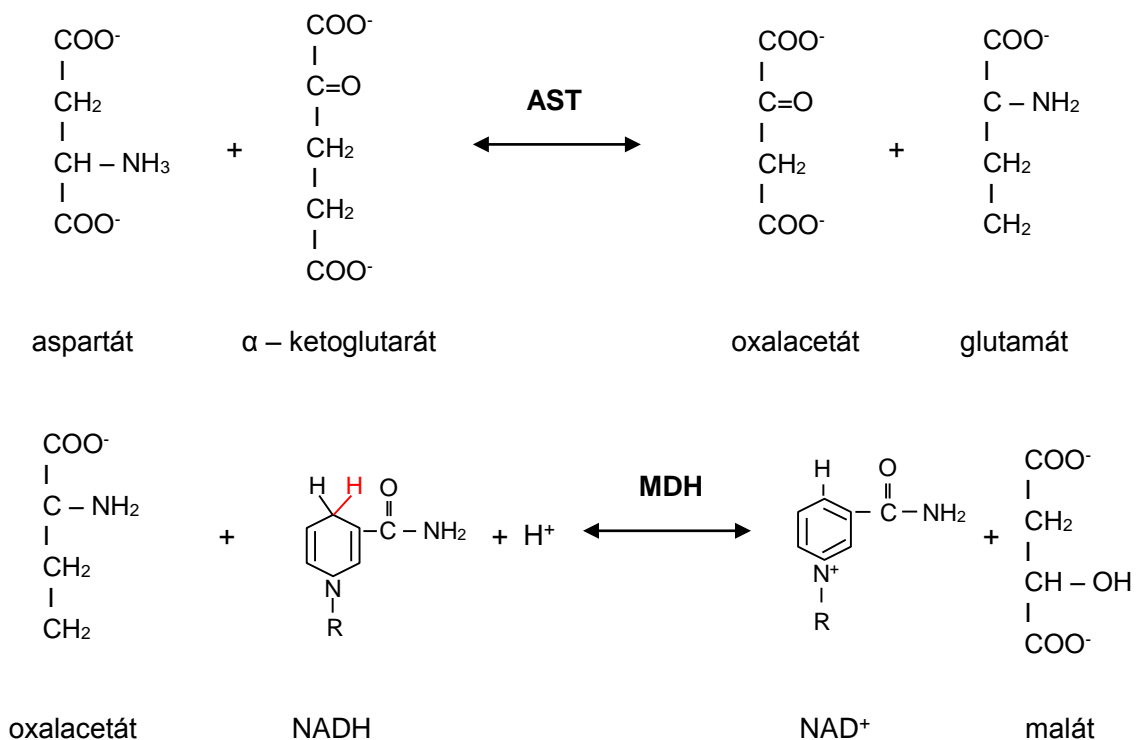
Obr. 24 Hepatocyt při poškození mitochondrií (Fialová, Vejražka 2005)

Zvýšené hodnoty nacházíme při nekróze myokardu, jaterních chorobách a u nemocí kosterního svalstva (Zima 2002).

Stanovení:

Stanovení se provádí obdobně, jako u ALT. Jde o enzymatickou reakci za katalýzy AST. Při tomto stanovení se využívá reakce aspartátu s alfa – ketoglutarátem, za vzniku oxalacetátu a glutamátu. (Obr. 25). Výsledné hodnoty se měří fotometricky. Měří se úbytek absorbance redukované formy NADH při vlnové délce 340 nm, stejně jako u stanovení alaninaminotransferázy (Roche Diagnostics 2011). I tuto metodiku v praxi využívají jak Beckman Coulter, tak Roche Diagnostics.

Reagencie využívané při stanovení obsahují aspartát, malátdehydrogenázu, laktátdehydrogenázu, albumin, NADH, α – ketoglutarát, pufr, stabilizátory a konzervanty. Stanovení se provádí při pH 7,8 a při teplotě 37°C. Přidané stabilizátory, pufr, konzervanty a LDH eliminují případné souběžně probíhající reakce tak, aby výsledek vlastní reakce nebyl ovlivněn (Roche Diagnostics 2011).



Obr. 25 Reakční schéma stanovení ALT (Roche Diagnostics 2012)

3.2 ALP, Alkalická fosfatáza, monoesterfosfohydroláza

ALP je membránově vázaný enzym, ale může se vyskytovat i ve volné formě. Hydrolyticky štěpí estery kyseliny fosforečné při alkalickém pH. Její biologický poločas rozpadu je cca 10 dní. Můžeme ji nalézt téměř ve všech buňkách lidského těla.

Tento enzym je tvořen skupinou izoenzymů, které potřebují pro svou funkci přítomnost Zn^{2+} iontů ve svém aktivním centru. ALP kódují čtyři geny, a proto rozeznáváme 4 izoenzymy. Izoenzymy jsou enzymy, které katalyzují stejný typ reakce, ve své primární struktuře se však liší. ALP tedy rozeznáváme placentární, embryonální, střevní a tkáňově nespecifické, které zahrnují izoformy kosterní, ledvinné a jaterní. Izoformy, na rozdíl od izoenzymů, jsou kódovány stejným genem, liší se pouze různým počtem navázaných komponent (Zima 2002).

Embryonální ALP mohou tvořit jak buňky embryonálního původu, tak buňky nádorové (Zima 2002).

ALP mají význam především transportní. V kostech napomáhají zabudování Ca^{2+} iontů do struktury kosti. Jsou součástí membrány osteoblastů, buněk, které se podílejí na tvorbě kosti. Ve střevě se účastní absorpce Ca^{2+} iontů a přenosu lipidů. Ve volné formě proniká do moče, žluče, plasmy i séra. Vzrůstající aktivita ALP může ukazovat v různých etapách vývoje organismu jak na fyziologický, tak i patologický stav. V dětství a raném věku je její vyšší aktivita fyziologická, a je dána vyšší aktivitou osteoblastů (Zima 2002).

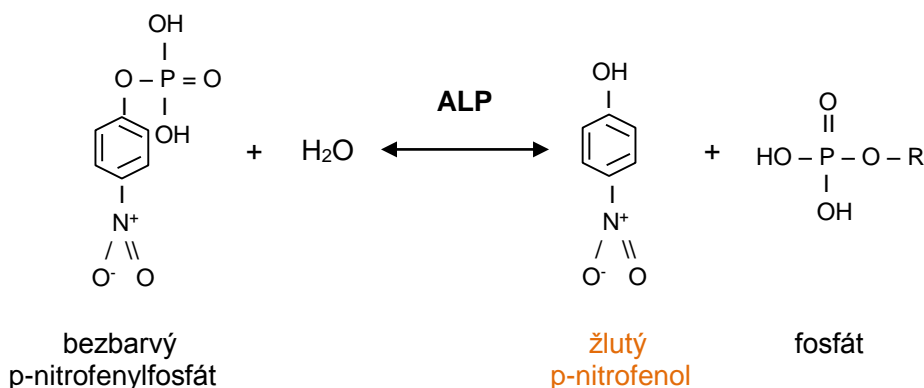
U osob s krevní skupinou 0 a B byla zjištěna přítomnost i ALP střevního izoenzymu. Ve třetím trimestru těhotenství se hodnoty enzymu zvyšují díky placentárnímu izoenzymu ALP (Doležalová a kol. 1995).

Zvýšené hodnoty ALP se vyskytují u všech forem cholestázy, především je-li cholestáza spojena s obstrukcí. Hodnoty ALP mohou být zvýšené při poruchách kostního metabolismu, při poruchách růstu, při jakékoli zvýšené remodelaci kosti, osteomalacie, malabsorpce, toxickém poškození jater, chronickém poškození jater i při hematologickém onemocnění (Roche Diagnostics 2012). Z uvedeného je patrné, že použití tohoto vyšetření pro specifikaci jaterního onemocnění není vhodné. Toto vyšetření se využívá především jako marker poškození výstelky žlučových cest. K určení přesné diagnózy jaterní disfunkce je nutné využít dalších testů.

Stanovení:

Stanovení se provádí pomocí kalorimetrického testu za přítomnosti hořečnatých a zinečnatých iontů. P – nitrofenylfosfát je štěpen za katalýzy ALP fosfatázou na fosfát a p – nitrofenol (Roche Diagnostics 2012). (Obr. 26). Reakce probíhá za pH 10,3. Obsahuje-li pufr přítomný v reakci aminoalkoholy určitého typu, má to vliv na rychlost reakce. Dochází k aktivaci enzymu ALP. Využívají se například diethanolamin, ethylaminoethanol. Lachema Brno využívá jako pufr N-metyl-D-glukamin, jedná se o český patent. Roche Diagnostics a Beckman Coulter využívají pufr 2-amino-2-metyl-1-propanol.

Tato metoda byla poprvé popsána Kingem a Armstrongem. Na metodě dále pracovali a postup modifikovali Ohmori, Bessey, Lowry a Brocke a byla vylepšena Hausamem a jeho kolektivem. V roce 1983 byla tato metoda doporučena pro standardizaci Mezinárodní federací klinické chemie (IFCC) za použití optimalizované koncentrace substrátu 2-amino-2-metyl-1-propanol s ionty hořčíku a zinku (Roche Diagnostics 2012).



Obr. 26 Reakční schéma stanovení ALP (Roche diagnostics 212)

Ke stanovení se používají reagentie obsahující 2-amino-2-methyl-1-propanol, octan hořečnatý, síran zinečnatý, N-(2-hydroxyetyl)-etylendiamin triacetát, nitrofenylfosfát

a konzervanty, pH reakční směsi je 10,44, reakce probíhá za teploty 30°C. Výsledek reakce se měří fotometricky. Systém vyhodnocuje změnu absorbance při 410 nm (Roche Diagnostics 2012).

Rozlišení kosterní a jaterní izoformy se provádí imunochemickými metodami, kdy dochází k vazbě ALP na speciální lektin (Doležalová a kol. 1995). Mezi závažností poškození jaterních buněk a aktivitou ALP není korelace (Zima 2002).

3.3 GGT, Gamaglutamyltransferáza

Jde o glykoprotein. GGT je enzym katalyzující přenos gama-glutamylového zbytku na jiné peptidy či aminokyseliny. Nachází se v buněčných membránách především v těch tkáních, které mají vylučovací nebo vstřebávací aktivitu. Můžeme ho tedy nalézt v játrech, žlučových cestách, ledvinách, tenkém střevě, slezině i ve slinivce. Můžeme se nacházet i v srdci a mozku. Jeho hodnota v séru závisí na pohlaví i na věku. U mužů jsou hodnoty vyšší než u žen, což se dá vysvětlit přítomností GGT v prostatě. U dětí je jeho množství naopak až 5x nižší než u dospělých.

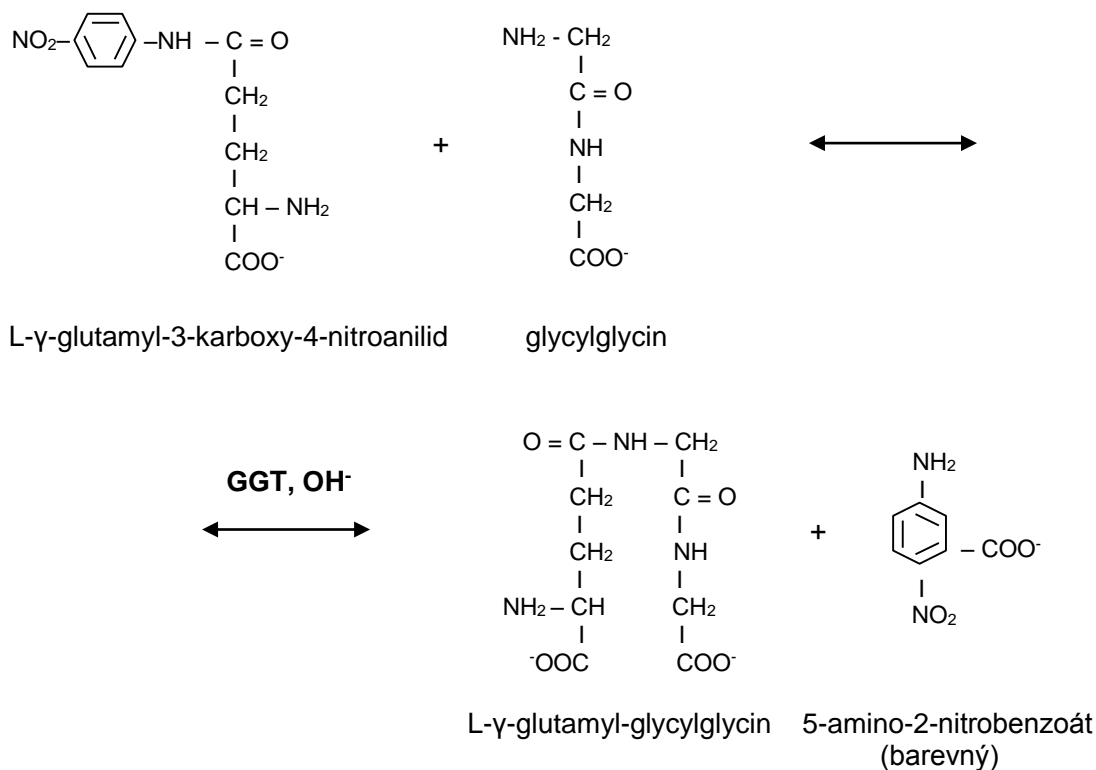
GGT je často jediným parametrem, který se nachází ve zvýšené aktivitě právě u hepatobiliárního onemocnění. Je také jedním z nejcitlivějších známých markerů pro odhalení tohoto onemocnění. Jelikož se jedná o membránově vázaný enzym, jeho elevace nastává při jakékoli poruše jaderné membrány hepatocytu. Jeho stanovení je využíváno také pro screeningové testy na skrytý alkoholismus. Zvýšené hodnoty lze nalézt u pacientů s dlouhodobou léčbou fenobarbitalem a fenytoinem (Roche Diagnostics 2012).

Stanovení:

Stanovení se provádí enzymatickým kalorimetrickým testem. GGT přenáší γ -glutamylovou skupinu z L- γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilidu na glycyglycin. Vzniká L- γ -glutamyl-glycyglycin a barevný 5-amino-2-nitrobenzoát (Roche diagnostics 2012). (Obr. 27)

Kinetický postup stanovení GGT pomocí substrátu γ -glutamyl-p-nitroanilidu a pomocí akceptoru glycyglycinu poprvé publikoval Szasz v roce 1969 (Roche Diagnostics 2012). Použitý substrát měl však horší rozpustnost. Persijn a van der Slik při zkouškách tohoto stanovení objevili vhodnější substrát L- γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid. Má dobrou rozpustnost ve vodě i vyšší stabilitu. Výsledky získané tímto způsobem korelovaly s výsledky při použití původního substrátu. Metodu v roce 2002 Mezinárodní federace klinické chemie (IFCC) doporučila jako standardizovanou metodu za použití optimalizované koncentrace substrátu, s použitím NaOH a s puforem glycyglycinem (Roche Diagnostics 2012).

Beckman Coulter používá jako substrát γ -glutamyl-p-nitroanilin. GGT přenáší γ -glutamylovou skupinu z tohoto substrátu na akceptor glycyglycin za vzniku barevného p-nitroanilinu.



Obr. 27 reakční schéma stanovení enzymu GGT (Roche Diagnostics 2012)

Stanovení se hodnotí fotometricky měřením absorbance při vlnové délce 415 nm. Množství vzniklého 5-amino-2-nitrobenzoátu je přímo úměrné aktivitě GGT ve vzorku. Ke stanovení se využívají reagentie obsahující glycyglycin, acetát, γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid, konzervanty, aditiva, stabilizátory. Reakční směs má pH 4,5 (Roche Diagnostics 2012).

3.4 GLDH, Glutamátdehydrogenáza

GLDH patří do třídy oxidoreduktáz. Hraje důležitou roli v metabolismu dusíku, kdy katalyzuje oxidační deaminaci kyseliny glutamové (Racek 2006). V jaterní buňce se nachází v mitochondriích a za fyziologických podmínek se v krvi nenachází. Jde tedy o poměrně specifický enzym hepatobiliárního poškození, a proto je klinicky požadován především pro posouzení rozsahu poškozené jaterní tkáně. Jeho elevace je spojena s akutní hepatální dystrofií, nekrotickou hepatitidou a obstrukční žloutenkou. GLDH můžeme nalézat i v ostatních orgánech jako je mozek, ledviny, pankreas a leukocyty, zde je však jeho aktivita zanedbatelná (Roche Diagnostics 2013). Zvýšené hodnoty se mohou vyskytovat

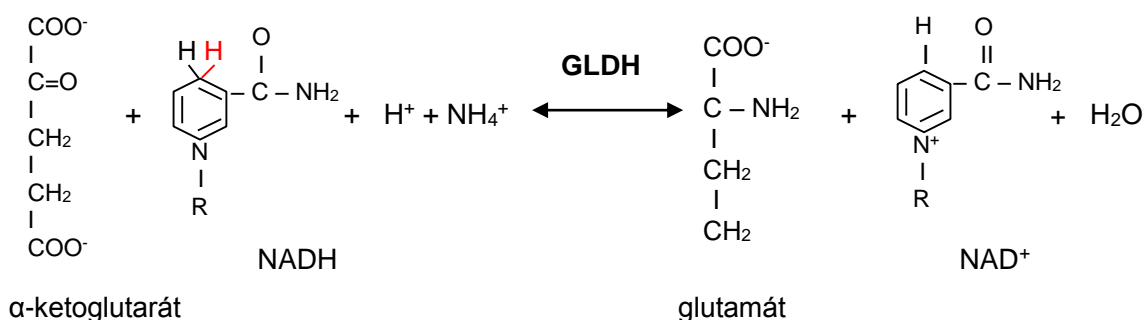
při cholestáze, alkoholizmu, i při infarktu myokardu (Doležalová a kol. 1995). I přesto že je diagnostická senzitivita tohoto stanovení pouze 50%, patří mezi důležité parametry při vyšetření jaterní tkáně (Zima 2002).

Stanovení:

GLDH se stanovuje UV reakcí. Do děje vstupuje α -ketoglutarát, redukovaná forma NADH a amoniak. Vzniká glutamát a NADH se oxiduje na NAD^+ . Pokles NADH je přímo úměrný aktivitě GLDH a je detekován fotometricky při vlnové délce 340 nm (Roche Diagnostics 2013).

Tato metoda byla doporučena pro standardizaci v roce 1972 Německou společností klinické biochemie (DGKC). Reakce probíhá v nadbytku NADH a GLDH je aktivováno přidávkem ADP (Roche Diagnostics 2013).

Pro správné stanovení hodnot glutamátdehydrogenázy je nutné, aby pacient 24 h před odběrem nepřijímal alkohol (Doležalová a kol. 1995).



Obr. 28 Reakční schéma stanovení GLDH (Roche Diagnostics 2013)

3.5 LDH Laktátdehydrogenáza

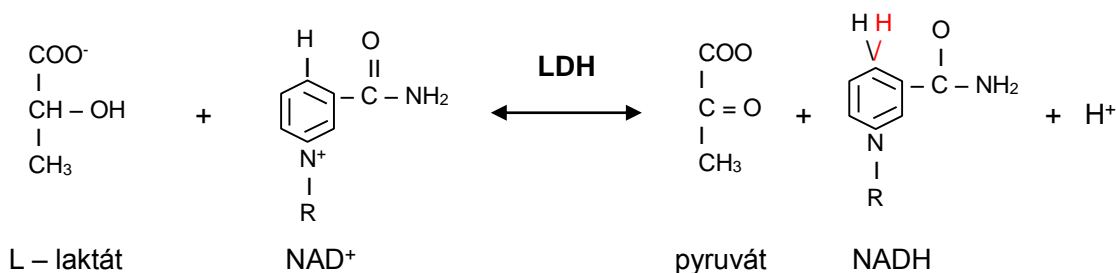
Jde o oxidoredukční enzym, který katalyzuje přeměnu pyruvátu na laktát. Tato reakce je poslední z reakcí anaerobní glykolýzy, a to vysvětluje přítomnost LDH prakticky ve všech tkáních. LDH je tetramer a tvoří ho podjednotky dvou typů. M – muscle a H – heart. Kombinací těchto dvou podjednotek vzniká 5 izoenzymů. Tkáně, které pracují převážně aerobně (srdce) obsahují více podjednotek typu H a jako substrát preferují laktát ($\text{LDH}_1 - \text{H}_4$, $\text{LDH}_2 - \text{H}_3\text{M}$). U tkání s anaerobním metabolismem se vyskytuje větší množství podjednotky M ($\text{LDH}_4 - \text{HM}_3$, $\text{LDH}_5 - \text{M}_4$) a tyto tkáně, jako jsou svaly a játra, upřednostňují jako substrát pyruvát (Racek 2006).

Stanovení LDH se používá při diagnostice jaterních nemocnění, mezi která patří virová hepatitida, cirhóza a karcinom jater. Zvýšené hodnoty se mohou vyskytovat u onemocnění srdce, infarktu myokardu, onemocnění ledvin nebo plic (Beckman Coulter 2010).

Stanovení:

LDH se stanovuje pomocí UV metody. Laktátdehydrogenáza katalyzuje oxidačně redukční reakci laktátu, který se oxiduje na pyruvát a současně se NAD^+ redukuje na formu NADH (Roche Diagnostics 2012). Metodiku využívá jak Roche Diagnostics, tak Beckman Coulter.

Ke stanovení se využívají reagentie obsahující methylglukamin, lithium laktát, NAD^+ , stabilizátory a konzervanty. Reakční směs má pH 9,4, reakce probíhá při teplotě 37°C . Počáteční rychlost, s jakou se NADH vytváří, je přímo úměrná katalytické aktivitě laktátdehydrogenázy. Přírůstek redukované formy NADH se stanovuje fotometricky při vlnové délce 340 nm (Roche Diagnostics 2012).



Obr. 29 Reakční schéma stanovení LDH (Roche Diagnostics 2012)

4 MĚŘENÍ SYNTETICKÉ FUNKCE JATER

Jak již bylo řečeno, významnou funkcí jaterní tkáně je syntéza proteinů, lipidů, lipoproteinů, cholesterolu a mastných kyselin. Při diagnostice selhávání těchto funkcí je problémem značná jaterní funkční rezerva. Pokles jednotlivých parametrů při syntetické nedostatečnosti jaterní tkáně se může projevit dlouhodobě, také zde hraje důležitou roli velká regenerační schopnost jater.

Pro zjištění syntetické funkce se stanovuje především albumin, prealbumin, gamaglobuliny, cholinesteráza a koagulační faktory (Zima 2002).

V klinické praxi se provádí základní vyšetření celkové bílkoviny, tedy zjištění celkové koncentrace bílkovin v krvi. Toto vyšetření poskytne klinikovi informaci o syntéze, utilizaci a exkreci bílkovin. Na základě daného diagnostického problému, nebo při zjištění patologických hodnot celkové bílkoviny, se provádí další následná vyšetření, vyšetření albuminu, fibrinogenu, cholinesterázy, ELFO apod. Pomocí elektroforézy rozdělíme bílkoviny do 5 – 6 frakcí. Při určitých chorobných stavech byly dlouholetým vyšetřováním stanoveny

tzv. elektroforetické typy, které odpovídají určité skupině chorob nebo stavů, nelze jimi však určit konkrétní onemocnění. Toto vyšetření může být bráno především jako další vodítko při stanovování konečné diagnózy (Zima 2002).

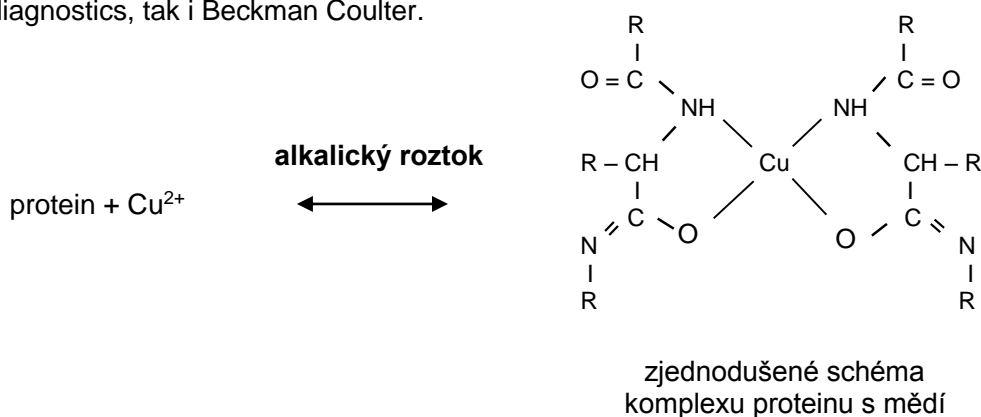
4.1 TP, Celková bílkovina

Plazmatické proteiny jsou syntetizovány především v játrech. Také v plazmatických buňkách, slinivce a v kostní dřeni. V případě onemocnění dochází ke změnám v celkové koncentraci bílkovin, i v procentuálním zastoupení jednotlivých frakcí, oproti fyziologickému stavu (Roche Diagnostics 2012).

Snížení hodnoty celkové bílkoviny se objevují při ztrátě krve, nefrotickém syndromu, u těžkých zánětů, syndromu retence solí a kwashiorkoru (akutní deficit proteinu). Zvýšené hodnoty tohoto parametru se mohou objevit při vážné dehydrataci a v přítomnosti mnohočetného myelomu. Pokud dojde ke snížení jen jedné z frakcí, na hodnotě celkové bílkoviny se to většinou neprojeví. Pro oddělení globulinových frakcí a albuminu se stanovuje poměr albuminu a globulinů. Tento poměr se výrazně mění u jaterní cirhózy, glomerulonefritidy, u akutní hepatitidy, a také u nefrotického syndromu. Stanovení celkové bílkoviny se provádí především při diagnostice jater, ledvin, kostní dřeně a také u metabolických a výživových onemocnění (Roche diagnostics 2012).

Stanovení:

Stanovení se provádí pomocí kalorimetrického testu. Jedná se o reakci dvojmocné mědi s peptidickými vazbami v proteinech. Reakce probíhá v alkalickém prostředí za vzniku purpurově zbarveného biuretového komplexu (obr. 30). Ke stanovení se používají reagentie obsahující hydroxid sodný, jodid draselný a síran měďnatý. Do reakční směsi se přidává vinan sodnodraselný, který zabraňuje precipitaci síranu měďnatého a jodidu draselného, bránícího autoredukci mědi (Roche diagnostics 2012). Tuto metodiku používá jak Roche diagnostics, tak i Beckman Coulter.



Obr. 30 Reakční schéma stanovení celkové bílkoviny (Roche Diagnostics 2012)

4.2 ALB, Albumin

Albumin je kvantitativně nejvýraznějším sérovým proteinem, který játra tvoří (Zima 2002).

Zastupuje více jak polovinu všech plazmatických bílkovin. Díky molekulové hmotnosti a vysoké koncentraci v krvi se podílí z více než 75 % na udržení onkotického tlaku plazmy. Má elipsoidní tvar a nezvyšuje viskozitu plazmy. Podílí se na udržení normálního objemu krve a vody ve tkáních a intersticiální tekutině. Významnou funkcí albuminu je také transport. Přenáší mnoho látek špatně rozpustných ve vodě, jako je nekonjugovaný bilirubin, neesterifikované kyseliny, thyroidální hormony, minerální látky - vápník, hořčík, zinek a další.

Na albumin se váže mnoho léků. U těchto léků je v organismu účinná pouze jejich volná frakce, která není na albumin vázaná. Jednotlivé látky se mohou navzájem z vazby na albumin vytěsňovat. Příkladem jsou volné mastné kyseliny, které vytěsňují nekonjugovaný bilirubin. Ten jako neurotoxin u novorozenců může způsobit vážné poškození centrální nervové soustavy (Zima 2002).

Téměř polovina z celkového množství albuminu se nachází v krevní plazmě. Zbytek nalézáme v tkáních, ve svalech a v podkoží. Malá část také proniká hematoencefalickou bariérou do mozkomíšního moku.

Denní syntéza albuminu v játrech je okolo 12 – 15 g denně. Poločas rozpadu je 19 – 21 dní. To je poměrně dlouhé období, a proto je albumin vyloučen z posouzení u akutních jaterních onemocnění (Zima 2002).

Hyperalbuminémie má jen malý diagnostický význam s výjimkou vážných stavů dehydratace. Hypoalbuminémie je diagnostikována u selhání proteosyntetické funkce jater, u sníženého přísunu proteinů, u zvýšeného katabolismu při poškození tkání např. u těžkých popálenin, u zánětů, malabsorpce aminokyselin a mnoha dalších (Roche Diagnostics 2012).

Koncentrace albuminu je ovlivněna řadou dalších faktorů. Jsou to hormonální vlivy, osmotický tlak nebo distribuční prostor u nemocných s ascitem. U těhotných se fyziologicky snižuje hladina albuminu v krvi vlivem zvýšeného objemu cirkulující tekutiny v těle. Při stanovování množství albuminu v séru je nutné také dbát na preanalytickou fázi vyšetření, a to zejména odběr daného vzorku. Pacienta je nutné odebrat v leže nebo v sedě, a to po alespoň 15 minutách klidu v sedě. V poloze ve stoje byly naměřeny hodnoty až o 10% vyšší vlivem přesunu tekutin z intravazálního prostoru do intersticia. Falešně nižší hodnoty se mohou vyskytovat díky látkám, které jsou na albumin navázány. Mohou to být léky, antikoncepce i inhibující interleukiny (Racek 2006).

Stanovení:

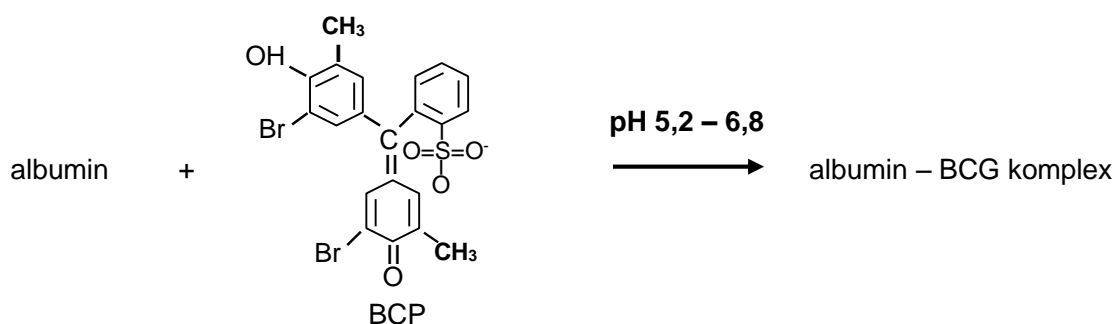
Stanovení albuminu se provádí v séru, plazmě, likvoru, i v moči. Stanovuje se různými metodikami. V roce 1953 Bracken a Klotz popsali jako první použitelnou techniku stanovení albuminu pomocí roztoku metyloranže pufrované na pH 3.5. Dochází ke snížení zabarvení roztoku a tento pokles je detekován měřením absorbance při 550 nm. Využívá se schopnosti

albuminu chovat se jako kation, pokud se nachází v kyselém prostředí. Mezi používané barevné roztoky patří 2-(4-hydroxy)-azobenzen, benzoová kyselina, bromkresolová zeleň BCG a bromkresolový purpur BCP. Z uvedených barevných roztoků nejvíce vyniká svou citlivostí bromkresolový purpur, má totiž vyšší interval pH pro změnu barvy, takže se snižuje počet slabých elektrostatických interakcí barva-protein. Pro BCP je interval pH 5,2 – 6,8, pro BCG je to interval pH 3,8 – 5,4. Při použití postupu s purpurem dochází k eliminaci většiny nespecifických reakcí s ostatními přítomnými proteiny.

Roche Diagnostics ke stanovení používá metodu kalorimetrickou, využívající specifickou vazbu albuminu na BCP. Tato vazba způsobí změnu zabarvení, a tato změna se měří fotometricky, měřením absorbance 600 nm (Obr. 31). Používané reagensie obsahují BCP, pufr, konzervanty a detergent. (Roche diagnostics 2012). Princip této metody využívá i Beckman Coulter.

Roche Diagnostics ke stanovení využívá i BCG jako barevného roztoku. Reagensie u tohoto stanovení obsahují citrátový pufr, BCG, konzervanty a detergenty. pH reakční směsi je 4,1 a absorbance se měří při 570 nm. (Roche diagnostics 2012).

Stanovení albuminu se může provádět i imunoturbidimetrickou metodou. Do reakční směsi se přidávají polyklonální protilátky proti lidskému albuminu (ovčí), ty reagují s antigenem ve vzorku a vytváří se komplex antigen/protilátka, vzniklá aglutinace je měřena turbidimetricky. Reakční směs obsahuje protilátky, pufr s pH 7,2 – 8,0, konzervanty, EDTA a PEG. Do reakce vstupuje i reagensie pro kontrolu nadbytku antigenu. Ta obsahuje albumin v ředěném séru, chlorid sodný a fosfátový pufr s pH 7,0 (Roche diagnostics 2012).



Obr. 31 Reakční schéma stanovení albuminu (Roche Diagnostics 2012)

Stanovení albuminu v moči, tzv. mikroalbuminurie, ukazuje spíše na cévní hyperpermeabilitu, než na onemocnění jaterní tkáně. Jde o poměrně snadné vyšetření. Provádí se podle pH moče, buď pomocí diagnostického proužku s navázaným acidobazickým indikátorem, nebo pomocí kys. sulfosalicylové. Vylučování albuminu močí je závislé na mnoha faktorech a za přípustnou hodnotu je považováno maximum 30 mg/den (Zima 2002).

4.2 PALB, Prealbumin

Pro posouzení akutních stavů syntetické schopnosti jater má lepší vypovídající hodnotu stanovení prealbuminu, jehož biologický poločas je 2 dny, oproti albuminu s biologickým poločasem 19 – 21 dní. Albumin se tvoří v játrech a v mozkových komorách. Nalézáme ho tedy jak v krvi, tak i v mozkomíšním moku. Při pH 8,6 se objevuje při elektroforéze před albuminem, protože má větší rychlost difúze k anodě (Roche Diagnostics 2012). Má menší molekulovou hmotnost a jde především o transportní bílkovinu pro thyreoidální hormony. Má také důležitý význam v udržování hladiny vitamínu A. Vytváří komplex s bílkovinou RBP, která vitamín A přenáší. Tato transportní bílkovina má velmi malou molekulovou hmotnost a proniká i zdravým glomerulem. U těžkého poškození jaterní tkáně dochází k výraznému poklesu jeho koncentrace, a proto ho můžeme považovat za citlivý marker syntetického poškození jater (Racek 2006). Pokles jeho koncentrace se výrazně projeví také při poruchách výživy, právě díky jeho krátkému biologickému rozpadu. Prealbumin je negativním reaktantem akutní fáze a jeho koncentrace prudce klesá při zánětlivých procesech (Roche Diagnostics 2012). Jeho vyšetření je indikováno i v případech onemocnění štítné žlázy, v případech malého vzrůstu dětí, amenorei, náhlého úbytku váhy, které může signalizovat závažné onemocnění zažívacího traktu. Snížené množství se vyskytuje u infekční hepatitidy, v těhotenství a u pooperačních stavů. Zvýšené hodnoty lze nalézt u nefrotického syndromu a při terapii prednizonem (Doležalová a kol. 1995).

Stanovení:

Prealbumin se v krvi nachází jen v malých koncentracích, a proto se při ELFO běžně nevyhodnocuje (Doležalová a kol. 1995). Způsobů jeho stanovení je mnoho, radiální imunodifuze, nefelometrie i turbidimetrie. Roche Diagnostics využívá stanovení pomocí imunoturbidimetrie. Po přidání specifických protilátek vytváří albumin precipitát, který je následně měřen turbidimetricky, absorbance se měří při 340 nm. Reakční směs obsahuje polyethylenglykol, fosfátový pufr, antisérum proti prealbuminu (králíčí), které je specifické pro lidský prealbumin, a konzervanty (Roche diagnostics 2012).

Stejný princip imunoturbidimetrického stanovení prealbuminu využívá i Beckman Coulter.

4.3 CHE, Cholinesteráza

Cholinesteráza je skupina enzymů katalyzující hydrolýzu acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou. Tato reakce je nezbytná pro to, aby se cholinergní neuron mohl vrátit do klidového stavu po předešlé aktivaci. Rozeznáváme dva typy cholinesteráz. Jejich rozdíl je jak v místě výskytu, tak i v substrátu, který pro svou reakci preferují (Soreq Hermona a Zakut Haim

5 MĚŘENÍ TRANSPORTNÍ A EXKREČNÍ FUNKCE JATER

Do této kategorie patří stanovení bilirubinu, urobilinogenu, žlučových kyselin a amoniaku. Bilirubin v krvi, spolu s urobilinogenem v moči se stanovuje především jako ukazatel cholestázy. Dalšími ukazateli cholestázy jsou již výše popsané enzymy alkalická fosfatáza a γ - glutamyl transferáza.

5.1 BIL, Bilirubin

Bilirubin vzniká především v RES z rozpadu starých erytrocytů. Z hemoglobinu se uvolňuje hem, který je metabolizován na bilirubin. Tento bilirubin je ve vodě nerozpustný a v komplexu s albuminem je transportován do jater (Roche diagnostics 2012). Za fyziologických podmínek se v moči nekonjugovaný bilirubin nenachází. V játrech dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou a konjugovaný bilirubin je dále žlučovodem odváděn se žlučí do tenkého střeva. Část bilirubinu je pomocí střevní mikroflóry rozložena na urobilinogen a následnou oxidací vzniká urobilin (zbarvení moče), který je eliminován močí. Ve střevě z urobilinogenu vzniká sterkobilinogen, a jeho oxidovaná forma sterkobilin (zbarvení stolice). Tato barviva podléhají enterohepatálnímu oběhu. Při poškození jaterní buňky urobilinogen prochází do systémového oběhu a objevuje se v moči (Zima 2002).

Pokud v krvi nacházíme zvýšené hladiny nekonjugovaného bilirubinu, ukazuje to na zvýšenou hemolýzu. Vznikající bilirubin játra nestačí metabolizovat a ve zvýšené míře se následně vyskytuje v periferní krvi. Vzestupem hladin nekonjugovaného bilirubinu se projevuje také nezralost jaterní tkáně a další nemoci, u kterých je porušena schopnost konjugace. Pokud dochází k výskytu zvýšených hladin jak konjugovaného, tak nekonjugovaného bilirubinu, ukazuje to na obstrukci žlučových cest, což vede k městnání žluči (k cholestáze) nebo na poškození hepatocelulární struktury (Roche diagnostics 2010).

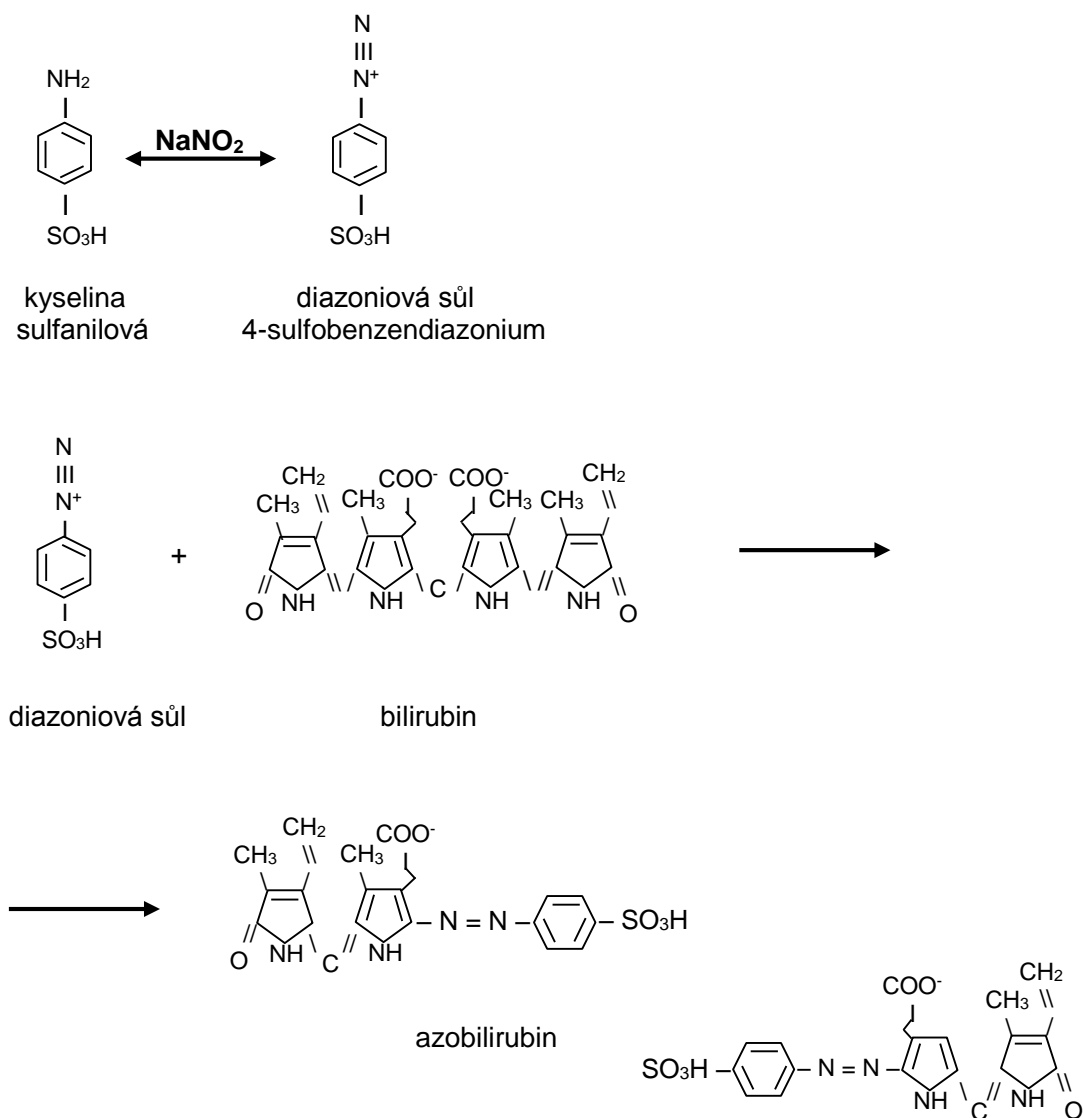
Biologický poločas nekonjugovaného bilirubinu je 5 minut. Biologický poločas konjugovaného bilirubinu vázaného na albumin je 17 – 20 dnů. Normální hladiny jsou u žen vyšší než u mužů a pohybují se v rozmezí 3 - 15 $\mu\text{mol/l}$. Při hodnotách nad 43 $\mu\text{mol/l}$ dochází ke žlutému zbarvení kůže sliznic (Racek 2006).

Stanovení:

Jelikož nepřímý, tedy nekonjugovaný, bilirubin je možné stanovit až po uvolnění z vazby na albumin, přidává se do reakční směsi akcelerator, kofein a octan sodný, který bilirubin z vazby uvolňuje. Bilirubin konjugovaný (přímý) vstupuje do reakce ihned. Ke stanovení celkového bilirubinu Roche Diagnostics využívá diazometody, kdy v silně kyselém prostředí pH 1 – 2 v přítomnosti solubilizačního činidla bilirubin kopuluje s diazoniovými ionty. Vzniká

barevný azobilirubin, jehož intenzita je přímo úměrná množství celkového bilirubinu. Stanovuje se fotometricky, kdy se měří absorbance při vlnové délce 546 nm. Reakční směs obsahuje kyselinu sulfamovou, pufr octanu sodného, kyselinu chlorovodíkovou, diazoniové ionty, detergenty a rozpouštědlo (Roche Diagnostics 2012). Ke stanovení přímého bilirubinu využívá Roche diagnostics reagentie obsahující kyselinu sulfanilovou, kyselinu oxalovou a dusitan sodný. Dochází k diazotaci kyseliny sulfanilové, se kterou následně přímo reaguje konjugovaný bilirubin a v kyselém prostředí vzniká červený azobilirubin (Obr. 33). Stanovuje se měřením absorbance při vlnové délce 546 nm.

Beckman Coulter využívá ke stanovení celkového bilirubinu také diazometodu, kdy celkový bilirubin reaguje s diazosloučeninou za vzniku barevného azobilirubinu. Jako akcelerační činidla je využíván kofein, benzoát a acetát. Měření se provádí fotometricky při vlnové délce 520 nm. (Beckman Coulter 2012)



Obr. 33 Reakční schéma vyšetření bilirubinu (Roche Diagnostics 2012)

5.2 Amoniak

Pokud selhává tvorba močoviny v jaterní tkáni, zvyšuje se v periferní krvi hodnota amoniaku. Amoniak je v játrech odbouráván pomocí močovinového cyklu. Zdrojem amoniaku je odbourávání dusíku z aminokyselin (oxidační deaminace), a také z aminoskupin purinových a pyrimidinových bází nukleotidů. Druhé místo jeho vzniku je proximální tubulus ledvin, kde amoniak vzniká hydrolýzou glutaminu za působení glutaminázy. Amoniak mohou produkovat i bakterie přítomné ve střevě. Ze střeva se pak dostává vrátnicovou žilou do jater. Při infekci *H. pylori* vzniká amoniak již v žaludku štěpením močoviny bakteriální ureázou. Bakterie se tvorbou amoniaku chrání před kyselým pH žaludečních šťáv (Racek 2006).

Amoniak je pro organizmus neurotoxický a může poškodit CNS. Za fyziologických podmínek se v organismu vyskytuje převážně jako amonný kation NH_4^+ , jen malé množství se vyskytuje ve formě NH_3 (Zima 2002).

Amoniak přispívá k udržení acidobazické rovnováhy a působí jako pufr moče. Většina kyselin (vodíkových iontů H^+) se vylučuje močí v podobě amonného kationtu. Tímto způsobem ledviny reagují na acidózu. Mají schopnost zvýšit produkci amoniaku. Indukuje se vznik enzymu glutaminázy, který katalyzuje hydrolýzu glutaminu a vznik NH_3 . Amoniak umožňuje vyloučení potřebného množství kyselin do moče, aniž by se změnilo její pH (Racek 2006).

Zvýšené hodnoty amoniaku u dospělých mohou odlišit jaterní selhání a jaterní encefalopatii od pokročilých stádií jaterních chorob. U dětí mohou být zvýšené hodnoty způsobené dědičným nedostatkem enzymů v cyklu močoviny nebo chronickým onemocněním jater (Roche diagnostics 2012). Zvýšené hodnoty se mohou vyskytovat také po fyzické zátěži, to je hodnota amoniaku vyšší až 3x, hodnotu koncentrace zvyšuje i kouření. Jedna cigareta zvedne hladinu NH_3 o 10 $\mu\text{mol/l}$. Hodnoty amoniaku zvyšují i nejaterní poruchy, jako je leukémie, krvácení do GIT, krevní transfuze, transplantace kostní dřeně i zvýšený přísun proteinů v potravě. Chyby ve stanovení mohou vznikat i při špatně provedeném odběru a v preanalytické fázi (Doležalová a spol. 1995).

Stanovení:

Amoniak se může stanovovat pomocí chemické metody, kdy se amoniak zachytí v kyselině a následně se stanoví fotometricky (Doležalová a kol. 1995). Roche diagnostics využívá ke stanovení enzymatickou metodu, kdy glutamátdehydrogenáza katalyzuje reduktivní aminaci α -ketoglutarátu s amoniakem a NADPH za vzniku glutamátu a NADP^+ . Množství vytvořeného NADP^+ je přímo úměrné koncentraci amoniaku. Stanovuje se pokles absorbance při 340 nm.

Použité reagensy obsahují glutamátdehydrogenázu, α -ketoglutarát, NADPH, konzervanty, detergent, nereaktivní pufr a stabilizátor (Roche diagnostics 2012).

normálních fyziologických hodnot jaterních testů ještě neznamená vyloučení jaterního onemocnění a naopak. Pokud byly zjištěny patologické hodnoty, nemusí se bezpodmínečně jednat o jaterní poruchu. Některé parametry mají cirkadiální rytmus a mohou během dne značně kolísat. Rozdílné hodnoty mohou být naměřeny také s ohledem na fyzickou konstituci pacientů, po fyzické námaze, u různých věkových skupin a pohlaví. Proto je stanovení celkové diagnózy nezbytné provádět na základě celkového posouzení stavu nemocného a rodinné anamnézy. Díky biochemickým laboratorním testům rozšířeným o další moderní vyšetřovací metody, jako jsou nové zobrazovací techniky, speciální vyšetřovací metody z oblasti hematologie, imunologie, serologie i virologie, a je-li potřeba, i provedením cílené biopsie a histologického vyšetření, získává klinika dostatečně vypovídající výsledky o správné funkci jater nebo jejich poruchách.

7 LITERATURA

- 1) Benjamin Wedro, *Anatomy and Function of the Liver*, [online] © 1996 – 2014 MedicineNet, Inc., 2014, [cit. 19. 4. 2014], Dostupné na:
<http://www.medicinenet.com/liver_anatomy_and_function/article.htm>
- 2) Doležalová, Věra a kol., *Principy biochemických vyšetřovacích metod*, Druhé vydání, Brno, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, ISBN 80-7013-206-X
- 3) Caitlin Kelly, *About Liver Functions in the Human Body*, [online], © 1999 – 2014 Demand Media, Inc., eHow UK, 2008, [cit. 16. 4. 2014], Dostupné na:
<http://www.ehow.com/about_4795077_liver-functions-human-body.html>
- 4) Čihák, Radomír, *Anatomie 2*, Druhé vydání, Praha: Grada Publishing, s.r.o., 2002, ISBN 80-247-0143-X
- 5) Fialová, Lenka, *Metabolismus lipidů*, [online], poslední revize 14. 2. 2009, Praha: Ústav lékařské biochemie 1. lékařské fakulty UK, 2005, [cit. 25. 4. 2014], Dostupné na:
<http://che1.lf1.cuni.cz/html/Syntesa_MK_3sm.pdf>
- 6) Fialová, Lenka; Vejražka, Martin. *Játra a vybraná biochemická vyšetření u jaterních onemocnění* [online]. Praha: Ústav lékařské biochemie 1. lékařské fakulty UK, 2005, [18. 4. 2014], Dostupné na: <<https://el.lf1.cuni.cz/p54776075/>>
- 7) FONS/ Příručka laboratorních vyšetření, *rejstřík vyšetření – BIOCHEMIE*, [online], [cit. 30. 4. 2014], Dostupné na:
<<http://www.katalogfons.cz/Produkty/B2B0F786-B576-47F4-B598-07A390A4572D>>
- 8) Hilary Cable, *About Liver Function Blood Tests*, [online], © 1999-2014 Demand Media, Inc., eHow UK, 2008, [cit. 18. 4. 2014], Dostupné na:
<http://www.ehow.com/facts_4812259_liver-function-blood-tests.html>
- 9) *Produktová dokumentace ALT, AST, ALP, GGT, GLDH, LDH, TP, ALB, PALB, CHE, BIL*, Immunotech a Beckman Coulter Company, [online], © 2000-2014, [cit. 25. 4. 2014], Dostupné na: <http://www.immunotech.cz/products_klinbio_menu.htm>

- 10) Junqueira, Carlos, L, *Základy histologie*, Sedmé vydání, Praha: Nakladatelství H&H, s.r.o., 1997, ISBN 80-85-787-37-7
- 11) Konrádová, Václava, *Funkční histologie*, Druhé vydání, Praha: Nakladatelství H&H, s.r.o., 2000, ISBN 80-86022-80-3
- 12) Lothar Thomas, *Clinical Laboratory diagnostics Use and Assesment of Clinical Laboratory Results*, English Edition, 1998, ISBN 3-9805215-4-0.
- 13) Masopust, Jaroslav a Průša Richard, *Patobiochemie metabolických drah*, První vydání, Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta: Fakultní nemocnice v Motole, 1999, ISBN 80-238-4589-6
- 14) Páč, Libor, *Anatomie člověka II: Splanchnologie, kardiiovaskulární systém, žlázy s vnitřní sekrecí*, Druhý dotisk, První vydání, Brno: Nakladatelství Masarykova Universita, 2012.; ISBN 978-80-210-4291-9.
- 15) Pecka, Miroslav, *Laboratorní hematologie v přehledu*, Český Těšín, Tiskárna Finidr, s.r.o., 2004, ISBN 80-86682-03-X
- 16) Ptáček Vladimír, *Organologie: Soustava trávicí*, [online], Poslední revize 17. 2. 2010, [cit. 19. 4. 2014], Dostupné na:
<<http://www.sci.muni.cz/ptacek/ORGANOLOGIE-a.htm#travici>>
- 17) Racek, Jaroslav, *Klinická biochemie*, Druhé vydání, Praha, Galén, s.r.o., 2006, ISBN 80-7262-324-9
- 18) *Produktová dokumentace ALT, AST, ALP, GGT, GLDH, LDH, TP, ALB, PALB, CHE, BIL, NH₃*, Roche Diagnostics, s.r.o., [online], © 1996-2014, [cit. 25. 4. 2014], Dostupné na: <http://roche-diagnostics.cz/Products/Stranky/Laboratorni_diagnostika/cobas_4000.aspx>
- 19) Skoumalová, Alice, *Biochemie jater*, [online], Poslední revize 16. 6. 2012, Praha: 2. lékařská fakulta, 2009, [cit. 26. 4. 2014], Dostupné na:
<<https://www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/jatra.ppt>>
- 20) Soreq, Hermona, Zakut, Haim, *Human cholinesterases and anticholinesterases*, První vydání, San Diego, Academic Press, 1993, ISBN 0-12-655290-8

- 21) Štern, Petr a kol., *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*, První vydání, Praha, Karolinum, 2005, ISBN 978-80-246-1025-2

- 22) Wilhelm, Zdeněk a Hegyi, Peter, *Fyziologie jater*, [online], © 1996-2014, Masaryk University, 2007, [cit. 15. 4. 2014], Dostupné na:
<<http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2007/05/15.pdf>>

- 23) Zima, Tomáš, *Laboratorní diagnostika*, První vydání, Praha, Galén, s.r.o., 2002, ISBN 80-7262-201-3

- 24) Šturm, František, *Ústní sdělení*, Laboratorní a diagnostické centrum Medila, Pardubice, Štrossova 239, 530 03, [cit. 18. 4. 2014]