

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Vyšetřování markerů pro diagnostiku metabolického syndromu

Bakalářská práce

Autor práce: Jan Kuneš
Studijní program: B5345 – Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant
Vedoucí práce: prof. MUDr. Miloš Velemínský, CSc., dr.h.c.

Datum odevzdání práce: 13.8.2012

Abstrakt

Ve své bakalářské práci se věnuji problematice vyšetřování biochemických markerů, které se společně s měřením obvodu pasu a výšky krevního tlaku používají pro diagnostiku metabolického syndromu. V teoretické části bakalářské práce je definován pojem metabolický syndrom. Poměrně podrobně jsou popsány kapitoly o vyšetření glukózy a krevních lipidů, včetně metod využívaných pro jejich stanovení. Velká pozornost byla rovněž věnována preanalytickým faktorům, které se významně podílejí na správnosti laboratorního vyšetření.

Praktická část bakalářské práce je zaměřena na získání praktických dovedností při práci s biologickým materiálem v laboratoři klinické biochemie a osvojení principů laboratorních metod. V biochemické laboratoři Laboma s.r.o. v Českých Budějovicích jsem pod odborným dohledem vyšetřil 100 vzorků venózní krve, u kterých jsem stanovoval koncentraci glukózy nalačno, triacylglycerolů a HDL cholesterolu. Vlastní měření vzorků jsem prováděl na biochemickém analyzátoru Cobas Integra 800 metodou absorpční spektrofotometrie. Naměřené laboratorní hodnoty byly statisticky zpracovány a po konzultaci s vedoucím práce byly interpretovány. Laboratorním vyšetřením bylo prokázáno, že kritéria metabolického syndromu splňovalo 21% žen a 15% mužů.

Abstract

In my Bachelor's thesis I dealt with the issue of investigation of biochemical markers, which are used for diagnostics of metabolic syndrome along with measurement of waist circumference and level of blood pressure. In the theoretical part I defined the term metabolic syndrome. Chapters about glucose and blood lipids tests as well as methods used for their determination are described in detail. Great attention was also paid to preanalytical factors, which significantly share of the accuracy of laboratory test.

Practical part of the Bachelor's thesis is focused on acquisition of practical skills in work with biological material in the laboratory of clinical biochemistry and acquisition of principals of laboratory methods. Under professional supervision in the biochemical laboratory Laboma s.r.o. in České Budějovice, I tested 100 samples of venous blood, where I determined concentration of fasting glucose, triglycerides and HDL cholesterol. The measurement was carried out on the biochemical analyzer Cobas Integra 800 by the method of absorption spectrophotometry. Measured laboratory values were statistically processed and they were interpreted after consultation with the supervisor of the Bachelor's thesis. The laboratory tests showed that the criteria of metabolic syndrome applied for 21% of women and 15% of men.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

(podpis)

Poděkování:

Rád bych tímto co nejsrdečněji poděkoval svému školiteli, panu prof. MUDr. Miloši Velemínskému, CSc., za odborné vedení a cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Upřímný dík patří i celému kolektivu biochemicko-hematologické laboratoře Laboma s.r.o. za vstřícnou pomoc při realizaci praktické části bakalářské práce. Zvláštní poděkování patří i mé rodině za všestrannou podporu v průběhu celého studia.

OBSAH

Úvod	12
1. Současný stav	13
1.1 Metabolický syndrom	13
1.2 Glukóza	14
1.2.1 Biochemické testy	15
1.2.1.1 Glykémie	15
1.2.1.2 Glykemický profil	16
1.2.1.3 Orální glukózotoleranční test	17
1.2.1.4 Glykovaný hemoglobin	19
1.2.1.5 Glykosurie	19
1.2.2 Metody stanovení glukózy	20
1.2.2.1 Redukční metody	20
1.2.2.2 Kondenzační metody	20
1.2.2.3 Enzymové metody	21
1.2.2.4 Elektrochemické metody	22
1.2.2.5 Hmotnostní spektrometrie	24
1.3 Krevní lipidy	25
1.3.1 Vyšetření lipidového spektra	27
1.3.1.1 Celkový cholesterol	27
1.3.1.2 HDL cholesterol	28
1.3.1.3 LDL cholesterol	29
1.3.1.4 Triacylglyceroly	29

1.3.2	Metody stanovení cholesterolu	30
1.3.2.1	Metoda dle Abell – Kendalla	30
1.3.2.2	Metoda dle Liebermann – Burcharda	31
1.3.2.3	Enzymová metoda (GOD/PAP)	31
1.3.3	Metody stanovení HDL cholesterolu	32
1.3.3.1	Přímé imunoinhibiční metody	32
1.3.3.2	Metody s maskováním non HDL částic	32
1.3.3.3	Precipitační metody	34
1.3.3.4	Elektroforetické metody	34
1.3.3.5	Ultracentrifugace a kvantitativní stanovení cholesterolu..	34
1.3.4	Metody stanovení LDL cholesterolu	35
1.3.4.1	Metody s maskováním non LDL částic	35
1.3.4.2	Metody s odstraněním non LDL částic	35
1.3.4.3	Turbidimetrické metody	36
1.3.4.4	Elektroforetické metody	37
1.3.4.5	Výpočtové metody	37
1.3.4.6	Ultracentrifugace a kvantitativní stanovení cholesterolu..	37
1.3.5	Metody stanovení triacylglycerolů	38
1.3.5.1	Enzymová metoda (GPO/PAP)	38
1.3.5.2	Enzymová metoda (UV metoda)	38
1.3.5.3	Extrakčně fotometrické metody	39
1.4	Preanalytická fáze (mimolaboratorní)	40
1.4.1	Význam biochemické vyšetření	41

1.4.1.1	Rozdělení biochemických vyšetření	41
1.4.2	Příprava pacienta před odběrem	43
1.4.2.1	Nejčastější chyby při přípravě pacienta	43
1.4.3	Preanalytické faktory neovlivnitelné	44
1.4.3.1	Pohlaví	44
1.4.3.2	Rasa	44
1.4.3.3	Věk	45
1.4.3.4	Gravidita	45
1.4.3.5	Současně probíhající jiná nemoc	46
1.4.3.6	Cyklické variace	46
1.4.4	Preanalytické faktory ovlivnitelné	47
1.4.4.1	Fyzická aktivita	47
1.4.4.2	Psychický stres	47
1.4.4.3	Vliv diety	48
1.4.4.4	Alkohol	48
1.4.4.5	Kouření	49
1.4.4.6	Léky	49
1.4.5	Odběr venózní krve	50
1.4.5.1	Odběrové zkumavky	50
1.4.5.2	Bezpečnostní aspekty při odběru	51
1.4.5.3	Příprava pomůcek k odběru venózní krve	52
1.4.5.4	Pracovní postup odběru venózní krve	53
1.4.5.5	Nejčastější chyby při odběru venózní krve	58

1.4.6	Odběr kapilární krve	59
1.4.6.1	Odběrové nádoby	59
1.4.6.2	Příprava pomůcek k odběru kapilární krve	59
1.4.6.3	Pracovní potup odběru kapilární krve	60
1.4.6.4	Nejčastější chyby při odběru kapilární krve	61
1.4.7	Identifikace biologického materiálu	62
1.4.8	Laboratorní žádanka	62
1.4.9	Transport biologického materiálu do laboratoře	64
1.4.9.1	Nejčastější chyby při transportu	64
1.4.10	Uchovávání biologického materiálu před analýzou	65
2.	Cíl práce	66
3.	Metodika	67
3.1	Preanalytická fáze (laboratorní)	67
3.1.1	Příjem biologického materiálu do laboratoře	68
3.1.1.1	Důvody pro odmítnutí biologického materiálu	69
3.1.2	Vložení identifikačních údajů do LIS	70
3.1.3	Příprava analytického vzorku – centrifugace	71
3.1.4	Makroskopické hodnocení vzhledu séra	73
3.1.5	Vytvoření sekundárních analytických vzorků – aliquotů	74
3.1.6	Vložení analytických vzorků do analyzátoru	74
3.2	Analytická fáze	75
3.2.1	Analyzátor Cobas Integra 800	75
3.2.2	Stanovení glukózy	76

3.2.2.1	Použití a princip testu	76
3.2.2.2	Preanalytické podmínky	76
3.2.2.3	Reagencie	77
3.2.2.4	Kalibrace	77
3.2.2.5	Kontrola kvality	78
3.2.2.6	Referenční meze	78
3.2.2.7	Metrologické parametry	78
3.2.3	Stanovení triacylglycerolů	79
3.2.3.1	Použití a princip testu	79
3.2.3.2	Preanalytické podmínky	80
3.2.3.3	Reagencie	81
3.2.3.4	Kalibrace	81
3.2.3.5	Kontrola kvality	82
3.2.3.6	Referenční meze	82
3.2.3.7	Metrologické parametry	82
3.2.4	Stanovení HDL cholesterolu	83
3.2.4.1	Použití a princip testu	83
3.2.4.2	Preanalytické podmínky	84
3.2.4.3	Reagencie	85
3.2.4.4	Kalibrace	85
3.2.4.5	Kontrola kvality	86
3.2.4.6	Referenční meze	86
3.2.4.7	Metrologické parametry	86

3.3 Postanalytická fáze	87
4. Výsledky	88
4.1 Glukóza	88
4.2 Triglyceridy	92
4.3 HDL cholesterol	95
4.4 Vyhodnocení laboratorních markerů ve vztahu k MS	99
5. Diskuze	103
6. Závěr	106
7. Seznam použitých zdrojů	107
8. Klíčová slova	113
9. Přílohy	114

ÚVOD

V posledních patnácti letech došlo v mnoha rozvinutých zemích zejména v USA a některých evropských státech k významnému snížení kardiovaskulárních chorob na celkové úmrtnosti. Přes veškeré úspěchy a pokroky současné lékařské vědy jsou nemoci oběhové soustavy nejčastější příčinou úmrtí a hlavní příčinou nemocnosti a invalidity světové populace. Základem jejich vzniku je ateroskleróza a její komplikace (především angina pectoris, infarkt myokardu, cévní mozková příhoda, ischemická choroba dolních končetin). Při sledování různých činitelů na vznik aterosklerózy se zjistilo, že některé přispívají k jejímu vzniku a rozvoji, těm říkáme rizikové faktory. Současná preventivní kardiologie se zaměřovala na tři základní neboli standardní rizikové faktory pro kardiovaskulární nemoci, mezi které patří kouření, LDL cholesterol a krevní tlak. Na základě statistických výpočtů bylo zjištěno, že právě tyto rizikové faktory byly zodpovědné za vznik 70 – 80% kardiovaskulárních příhod. V posledních 20 letech se však dostaly do popředí nové rizikové faktory, které se velmi často vyskytují společně a nazýváme je souhrnným pojmem metabolický syndrom.

Lékaře vedou ke stanovení diagnózy metabolického syndromu důležité laboratorní hodnoty hladin krevních tuků a cukru v krvi, které se vyhodnotí společně s obvodem pasu a výškou krevního tlaku. Protože autorem této práce je budoucí zdravotní laborant, bude její těžiště soustředěno na biochemické vyšetření glukózy a krevních tuků a laboratorní metody používané pro jejich stanovení.

1. Současný stav

1.1 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom, též označovaný jako syndrom inzulínové rezistence, představuje soubor typických rizikových faktorů, které se často vyskytují společně a které ve svém důsledku vedou k předčasnému rozvoji aterosklerózy a jejích komplikací a k rozvoji diabetu mellitu 2. typu. Je charakterizovaný hyperinzulinémií, abdominální obezitou, arteriální hypertenzí, poruchou glukózové homeostázy, dyslipidémií, hyperurikémií, poruchou hemokoagulace a endoteliální dysfunkcí. Výskyt tohoto onemocnění celosvětově narůstá, a to zejména v souvislosti s nezdravým životním stylem obyvatelstva (Rosolová, 2011).

Metabolický syndrom má multifaktoriální etiologii. Na jeho vzniku se podílí genetická predispozice v kombinaci s nezdravým životním stylem, pro který je typický sedavý způsob života a přijímání vysoce energetické stravy bohaté na živočišné tuky a jednoduché cukry. Takové životní návyky vedou k hromadění přebytečné energie v podobě tukové tkáně a u jedinců s genetickou predispozicí se hromadí tuk v břiše a břišních orgánech a vytváří se abdominální obezita, které je spojena s vysokým rizikem vzniku aterosklerózy a jejích komplikací na jedné straně, ale i rizikem poruchy glukózového metabolismu až diabetu 2. typu na straně druhé (Rosolová, 2011).

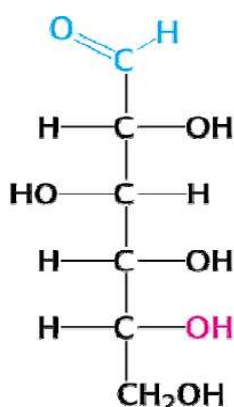
Tabulka 1 Harmonizovaná definice metabolického syndromu

Metabolický syndrom – přítomnost tří a více rizikových faktorů	
Obvod pasu	muži ≥ 102 cm, ženy ≥ 88 cm
Krevní tlak	$\geq 130 / \geq 85$ mm Hg
Glykóza nalačno	$\geq 5,6$ mmol/l
Triglyceridy	$\geq 1,7$ mmol/l
HDL cholesterol	muži $< 1,0$ mmol/l, ženy $< 1,3$ mmol/l

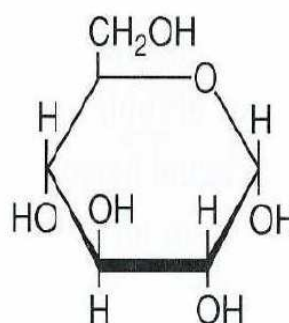
(Zdroj: Rosolová, 2011)

1.2 Glukóza

Cukry jsou nedílnou součástí všech živých organismů. Jde o různorodou skupinu organických látek, které jsou pro naše buňky nejsnáze získatelným a nejpohotovějším zdrojem energie. Jsou také základním stavebním kamenem některých makromolekul (např. glykoproteinů, glykolipidů, nukleových kyselin). V přijaté potravě je nacházíme ve formě polysacharidů (škrobů) a disacharidů. Tyto cukry jsou v zažívacím traktu rozkládány na cukry jednoduché, a to na glukózu, fruktózu a galaktózu. Vzniklé monosacharidy jsou buňkami tenkého střeva resorbovány do krevní sítě střevních vlásečnic, odkud jsou odváděny do vrátnicové žíly a nakonec do jater. Pak podle řízení hladiny glykémie jsou transportovány do tkání, kde probíhá jejich metabolismus. Pro náš organismus má základní fyziologický význam glukóza (Trojan, Schreiber, 2007).



Obr. 1 Fischerův vzorec glukózy



Obr. 2 Haworthův vzorec glukózy

Glukóza je jednoduchý šestiuhlíkatý cukr obsažený v krvi člověka. Je hlavním, nejdůležitějším a nenahraditelným zdrojem energie pro všechny buňky lidského těla. Pro mozek a červené krvinky představuje glukóza prakticky jediný zdroj energie. Za fyziologických okolností organismus získává glukózu těmito způsoby:

- *Přísunem z vnějšího prostředí* – glukóza je přijímána potravou buď jako volná, nebo jako součást disacharidů a polysacharidů. Z trávicího traktu se do krve vstřebává pouze volná glukóza.
- *Glykogenolýzou* – metabolická dráha, při které molekula glukózy vzniká štěpením jaterního glykogenu. Zásoby glykogenu jsou uloženy hlavně v játrech a příčně pruhovaných svalech.
- *Glukoneogenezí* – metabolická dráha syntézy glukózy z necukerných prekurzorů např. z glykogenních aminokyselin (zejména alaninu), kyseliny mléčné, glycerolu atp. Potřebná energie pro tuto syntézu se bere z beta oxidace mastných kyselin s následnou tvorbou ketolátek (*Musil, 1994*).

1.2.1 Biochemické testy

1.2.1.1 Glykémie

Základním biochemickým vyšetřením je stanovení hladiny glukózy v krvi. Toto vyšetření nás informuje o aktuálním stavu glukózové homeostázy. Stanovení glykémie má význam především pro prevenci, diagnostiku a dlouhodobé sledování pacientů s diabetem mellitem. Glykémii můžeme vyšetřit z kapilární krve nebo venózní krve, vlastní stanovení se provádí v plné krvi, séru nebo plazmě. Pro správnou interpretaci glykémie je důležité mít na paměti, že referenční hodnoty se liší podle typu analyzovaného materiálu. Všeobecně je známo, že v celé krvi je koncentrace glukózy fyziologicky nižší než v plazmě (séru), a to v důsledku rozdílných koncentrací vody v obou materiálech (*Ferenčík et al., 2000*).

Z hlediska hodnocení glykémie rozeznáváme:

- **glykémii nalačno** – odběr se provádí minimálně po 8 hodinovém lačnění;
- **glykémii postprandiální** – odběr se provádí 1 hodinu po jídle;
- **náhodnou glykémii** – odběr se provádí kdykoliv během dne nezávisle na příjmu potravy (*Ferenčík et al., 2000*).

1.2.1.2 Glykemický profil

Vzhledem k tomu, že se glykémie může v průběhu dne značně měnit, je užitečné znát její hodnoty i v jinou denní i noční dobu. K tomuto účelu se zavedly glykemické profily, při nichž se vyšetřuje hladina krevního cukru několikrát v průběhu dne a noci, a to obvykle před jídlem nebo jednu hodinu po něm. Vyšetření glykemického profilu má význam pro určení terapie, např. pro výběr vhodného typu inzulínu a určení jeho dávky. Vyšetření se provádí z kapilární krve odebrané do kepu (ependorfských zkumavek) dodávaných do laboratoře, nebo si glykemický profil může měřit sám pacient pomocí glukometru (tzv. selfmonitoring glykémii). Frekvence kontrol glykémii závisí na stavu kompenzace diabetu a určují ji ošetřující lékař (*Zima, 2007*).

Podle počtu měření můžeme glykemický profil rozdělit na:

- **malý glykemický profil** – představuje vyšetření, při němž se stanoví hodnota 3 – 4 glykémii během dne, a to buď před snídaní, obědem, večeří, nebo 2 hodiny po jídlech, doplněné glykémii před spaním.
- **velký glykemický profil** – představuje vyšetření, kterým se stanoví hodnota 6 – 8 glykémii vždy před snídaní a 2 hodiny po snídání, obědě, večeři, doplněných glykemií před spaním a nejlépe kolem 2 hodiny po půlnoci (*Perušičová et al., 1996*).

1.2.1.3 Orální glukózotoleranční test (oGTT)

Jde o zátěžový funkční test, který se používá pro diagnostiku onemocnění diabetes mellitus a porušené glukózové tolerance. Toto vyšetření v podstatě napodobuje reakci organismu na přívod sacharidů v potravě za standardních podmínek. Hodnotí se jím, jak organismus umí udržet hladinu krevní glukózy po zátěži glukózou (*Racek et al., 2006*). Provádí se tehdy, není-li diagnóza jednoznačně potvrzena při hodnotách plazmatické glykémie nalačno vyšších než 7 mmol/l. Patří sem jednak stavy se zvýšenou (hraniční) glykémii nalačno (5,6 – 6,9 mmol/l), jednak situace, kdy jsou hodnoty glykémie nalačno nižší než 5,6 mmol/l, při nichž bylo vysloveno podezření na poruchu glukózové tolerance z předcházejících vyšetření, nebo jedná-li se o jedince se zvýšených rizikem vzniku diabetu (*Rybka, 2007*).

Příprava pacienta

- nejméně 3 dny před vyšetřením přijímá pacient stravu s dostatečným obsahem sacharidů (nejméně 150 g za den) a vykonává obvyklou fyzickou zátěž;
- před vyšetřením má být pacient 10 – 12 hodin lačný (povolena je pouze neslazená voda), neměl by rovněž kouřit ani pít kávu a alkoholické nápoje;
- před vyšetřením by měl pacient vysadit léky, které ovlivňují hladinu cukru v krvi, pokud je to z klinického hlediska možné;
- nejméně 1 hodinu před vyšetřením by neměl pacient vykonávat žádnou fyzickou aktivitu (*Perušičová et al., 1996*).

Průběh vyšetření

- vyšetření se provádí na ošetrovací jednotce nebo v biochemické laboratoři;
- test se provádí ráno v 7 hodin po 10 – 12 hodinovém lačnění, fyzickém klidu, bez alkoholu, kofeinu a nikotinu;
- během vyšetření pacient sedí, nejí, nekouří, měl by být i v duševním klidu;
- nejprve se pacientovi odebere vzorek glykémie nalačno, poté pacient vypije během 5 – 10 minut nápoj, ve kterém je rozpuštěno 75 g glukózy ve 250 – 300 ml vody;
- další odběry krve se provádějí za 1 a za 2 hodinu od vypití glukózového roztoku, současně s glykémii se stanovuje i koncentrace glukózy v moči (*Perušičová et al., 1996*).

Hodnocení

Je-li hodnota glykémie ve 120. minutě testu vyšší než 11 mmol/l, je diagnóza diabetu potvrzena. Je-li nižší než 11,0 mmol/l a vyšší než 7,8 mmol/l jde o porušenou glukózovou toleranci, kdežto u zdravých jedinců je tato hodnota pod 7,8 mmol/l (*Perušičová et al., 1996*).

1.2.1.4 Glykovaný hemoglobin

Stanovení glykovaného hemoglobinu se využívá především k posouzení dlouhodobé kompenzaci diabetu. S jeho pomocí lze prokázat případný výskyt déle trvajících glykémii, a tím i posoudit riziko rozvoje komplikací diabetu. Glykovaný hemoglobin vzniká navázáním glukózy na červené krevní barvivo (hemoglobin). Podle toho, jak vysoká je glykémie, stoupá množství glykovaného hemoglobinu. Jinými slovy řečeno, čím vyšší je hladina glukózy v krvi, tím více se jí váže na molekulu hemoglobinu, a naopak. Při déle trvajících glykémii se glukóza stále více navazuje na hemoglobin a hodnoty glykovaného hemoglobinu tak stoupají. Vytvořená vazba glukózy na hemoglobin je nezvratná, trvá po celou dobu života červených krvinek. Protože červená krvinka, jejíž součástí je hemoglobin, má živost zhruba 120 dní, odráží hodnota glykovaného hemoglobinu přehled všech glykémii, které pacient naměřil za posledních 6 – 8 týdnů (*Jirkovská a kol., 2003*).

1.2.1.5 Glykosurie

Jde o vyšetření, kterým zjišťujeme přítomnost cukru v moči. Za fyziologických podmínek je všechna glukóza, která se přefiltruje do primární moči, vstřebána buňkami proximálního tubulu zpět do krevního oběhu. U zdravého člověka se tedy cukr v moči nevyskytuje. Glukóza se objevuje v moči teprve v okamžiku, kdy koncentrace glukózy v krevní plazmě překročí hodnotu 10 mmol/l, což je ledvinový práh pro glukózu. U některý stavů je ledvinový práh snížen a glukóza se objeví v moči již při normálních hodnotách glykémie (těhotenství, renální diabetes), jindy je ledvinový práh pro glukózu zvýšen a glukóza přestupuje do moči při hodnotách glykémie daleko vyšších než 10 mmol/l (starší diabetici s glomerulosklerózou). Vzhledem k tomu, že cukr v moči nemusí odpovídat současné hladině cukru v krvi, nepatří vyšetření glykosurie mezi základní nástroje diagnostiky diabetu ani sledování stavu pacienta s tímto onemocněním (*Racek at al., 2006*).

1.2.2 Metody stanovení glukózy

1.2.2.1 Redukční metody

Redukční metody patří mezi nejstarší způsoby stanovení glukózy. Tyto metody jsou založeny na využití redukčních vlastností tzv. reduktonů, což jsou organické látky obsahující ve své molekule endiolovou skupinu, která způsobuje jejich silné redukční vlastnosti. Reduktory vznikají z monosacharidů varem v silně alkalickém prostředí, kde reagují s ionty Cu^{2+} nebo Fe^{3+} , případně i kyselinou pikrovou za tvorby Cu^+ , Fe^{2+} nebo kyseliny pikraminové. Pravděpodobně nejstarší a nejdéle používanou byla metoda podle Hagedorna a Jensena, jež se zakládala na redukci známého množství $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Množství zredukovaného Fe^{2+} se stanovuje nepřímou titrací jodometricky. Redukční metody se ukázaly jako zdlouhavé a nespecifické, a proto se v současnosti již nepoužívají (Prokeš *et al.*, 1998).

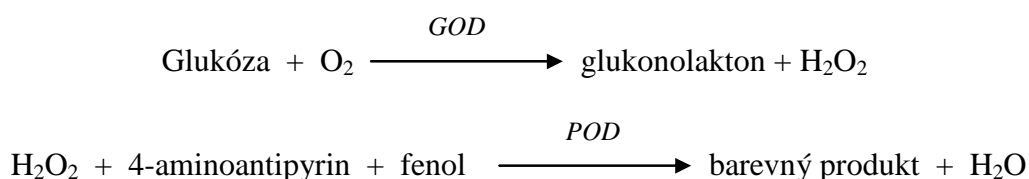
1.2.2.2 Kondenzační metody

Kondenzační metody jsou ve srovnání s metodami redukčními mnohem specifičtější. Jsou založeny na schopnostech glukózy tvořit barevné komplexy s některými činidly. V prvním kroku se glukóza přeměňuje působením koncentrovaných kyselin (H_2SO_4 nebo CH_3COOH) na hydroxymethylfural. Ten se ve druhém kroku kondenzuje s vhodným fenolem (resorcin, naftol) nebo aromatickým primárním aminem (o-toluidin) za vzniku barevného produktu, vhodného pro fotometrické stanovení. Tento princip byl v minulosti rutinně používán před zavedením enzymových metod (Prokeš *et al.*, 1998).

1.2.2.3 Enzymové metody

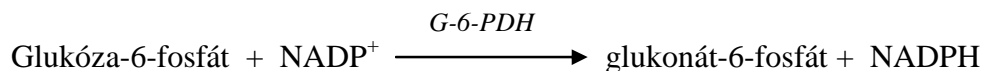
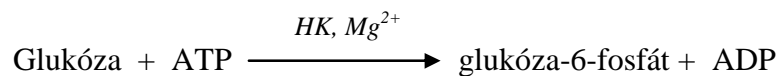
➤ **Metody s glukózaoxidázou (GOD-PAP)**

Jde o nejrozšířenější a v praxi nejčastěji využívanou metodu pro kvantitativní stanovení glukózy. Glukóza přítomná v analyzovaném vzorku je oxidována kyslíkem za katalytického působení enzymu glukózaoxidázy (GOD) na glukonolakton a peroxid vodíku. Uvolněný peroxid vodíku je stanoven barevnou reakcí s fenolem a 4-aminoantipyrinem za přítomnosti enzymu peroxidázy (POD). Vzniká barevný produkt (červený chinonimin), který stanovujeme spektrofotometricky. Intenzita zbarvení vzniklé sloučeniny je přímo úměrná koncentraci glukózy v analyzovaném vzorku (*Kotyza a kol., 2007*).



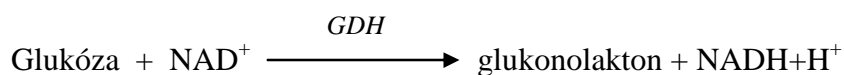
➤ **Metody s hexokinázou (HK/G6PDH)**

Druhou nejčastěji používanou metodou pro kvantitativní stanovení glukózy je hexokinázová metoda. Glukóza přítomná v analyzovaném vzorku je fosforylována v přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP) a hořčnatých iontů za katalytického působení enzymu hexokinázy (HK) na glukóza-6-fosfát a adenosindifosfát (ADP). Glukóza-6-fosfát se v přítomnosti NADP^+ oxiduje na glukonát-6-fosfát, současně dochází k redukci NADP^+ na NADPH pomocí enzymu glukóza-6-fosfátdehydrogenázy (G-6-PDH). Sleduje se nárůst absorbance NADPH při 340 nm, která je přímo úměrná koncentraci glukózy ve vzorku (*Kotyza a kol., 2007*).



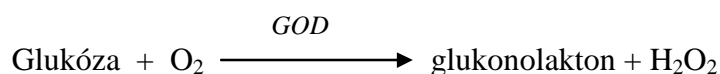
➤ Metody s glukózadehydrogenázou (GDH)

Metoda s glukózadehydrogenázou není v běžné rutinní praxi příliš využívána. Glukóza přítomná v analytickém vzorku je oxidována v přítomnosti NAD^+ za katalytického působení enzymu glukózodehydrogenázy (GDH) na glukonolakton, současně dochází k redukci NAD^+ na NADH . Sleduje se absorbance NADH při 340 nm, která je přímo úměrná množství glukózy v analyzovaném vzorku (*Dastyeh et al., 2008*).



1.2.2.4 Elektrochemické metody

- Elektrochemické metody jsou založeny na enzymatické reakci a amperometrické detekci produktů enzymatické reakce. Používá se Clarkova kyslíková elektroda, která má na svém povrchu připevněnou vrstvu s glukozaoxidázou. Tento enzym katalyzuje oxidaci glukózy vzdušným kyslíkem a vzniká glukonolakton a peroxid vodíku podle rovnice:



Při této reakci měříme úbytek kyslíku spotřebovaného při reakci Clarkovou kyslíkovou elektrodou. Úbytek kyslíku se projeví poklesem elektrického proudu, který je přímo úměrný koncentraci glukózy ve vzorku (*Doležalová a kol., 1995*).

- Na elektrochemickém principu jsou založeny také **glukometry**, což jsou přístroje sloužící k rychlému a poměrně přesnému měření glykémie. Jsou nezbytnou pomůckou pro diabetiky, kteří si tak mohou měřit glykémie v domácím prostředí. Na základě naměřené hodnoty glykémie si mohou upravit dietu, pohybovou aktivitu nebo dávku inzulínu, a tak správným kompenzováním diabetu předcházet pozdějším komplikacím (*Kapounová, 2007*). Nedílnou součástí glukometrů jsou testovací proužky, které se vkládají do glukometru. Testovací proužky mají na svém povrchu imobilizován enzym glukózaoxidázu. Po nanesení kapky krve na testovací proužek dochází k enzymatické reakci. Glukóza přítomná ve vzorku je oxidována kyslíkem za katalytického působení enzymu glukózaoxidázy a vzniká glukonolakton a peroxid vodíku. Uvolněný peroxid vodíku je elektrochemicky redukován na vodu a vzniklý elektrický proud je úměrný koncentraci glukózy ve vzorku (*Dohnal, Štern, 2008*).



Obr. 3 Glukometr

(Zdroj: <http://www.med-service-spb.ru/kat/omron/>)

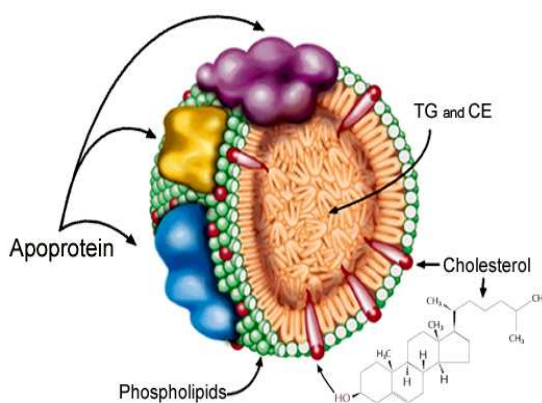
1.2.2.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně – chemická metoda pro určování hmotností atomů a molekul po jejich převedení na ionty, která využívá ke kvantitativnímu stanovení látek rozdílného chování jejich ionizovaných molekul v elektrickém a magnetickém poli. Molekuly se nejčastěji ionizují proudem rychle letících elektronů. Vzniklé ionty procházejí elektrickým proudem, kde se urychlují podle velikosti náboje a kolmo působícím magnetickým polem, kde se vychylují ze své dráhy podle velikosti hmotnosti a dopadají na detektor. Detektor pak následně poskytuje signál úměrný počtu dopadajících iontů. Výsledkem metody zkoumaného vzorku je hmotnostní spektrum, které graficky znázorňuje závislost četnosti iontů na jejich hmotnosti a náboji (*Doležalová a kol., 1995*).

V prvním kroku se k analyzovanému vzorku přidá známe množství glukózy značené izotopem uhlíku ^{14}C . Vzhledem k tomu, že glukózu nelze převést do plynné fáze, je pro účely jejího stanovení plynovou chromatografií nutné převést ji na těkavé deriváty. Tomuto procesu se říkáme obecně derivatizace. Vzniklý těkavý derivát se separuje plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií se určí poměr izotopů glukózy ^{12}C a ^{14}C . Z poměru izotopů a známého přídatku můžeme zjistit koncentraci glukózy v analytickém vzorku (*Štern a kol., 2005*).

1.3 Krevní lipidy

Tuky (lipidy) představují různorodou skupinu přírodních látek, jejichž společným charakteristickým znakem je částečná nebo úplná nerozpustnost ve vodě a naproti tomu velice dobrá rozpustnost v organických rozpouštědlech. Protože jsou tuky nerozpustné ve vodě, nemohou se v krevní plazmě pohybovat jako takové, ale jen navázané na určité bílkovinné molekuly. Touto vazbou vznikají tzv. lipoproteinové částice, mající přibližně kulovitý tvar. Na obrázku č. 4 je zobrazena struktura lipoproteinové částice, jež se skládá z nepolárního jádra a polárního obalu. Jádro je tvořeno triacylglyceroly a estery cholesterolu, zatímco na povrchu nacházíme volný cholesterol, fosfolipidy a bílkoviny, zvané apolipoproteiny (zkráceně apoproteiny). Apoproteiny jsou důležité nejen pro výstavbu lipoproteinových částic, ale zajišťují také aktivaci enzymů metabolismu lipoproteinů a reagují s buněčnými receptory, a tím umožňují vstup lipoproteinů do buněk (*Marshall, Bangert, 2008*).



Obr. 4 Struktura lipoproteinové částice

(Zdroj: <http://waroninsulin.com/nutrition/what-is-cholesterol>)

Plazmatické lipoproteiny lze rozdělit podle jejich denzity (rozdílné sedimentace) a elektroforetické pohyblivosti do pěti hlavních tříd, pro něž existují anglické názvy a zkratky, které se velmi často používají:

- Lipoproteiny o vysoké hustotě (*high density lipoprotein* – **HDL**)
- Lipoproteiny o nízké hustotě (*low high density lipoprotein* – **LDL**)
- Lipoproteiny o střední hustotě (*intermediate density lipoprotein* - **IDL**)
- Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (*very low high density lipoprotein* – **VLDL**)
- Chylomikrony

Jednotlivé lipoproteinové částice se navzájem liší svým obsahem cholesterolu, triacylglycerolů, fosfolipidů a různých proteinů. Z hlediska rizika pro rozvoj aterosklerózy je nutné zdůraznit, že zvýšená hladina LDL cholesterolu vede k urychlení procesu aterosklerózy, kdežto zvýšená hladina HDL cholesterolu snižuje riziko vzniku kornatění tepen (*Adámková, 2011*).

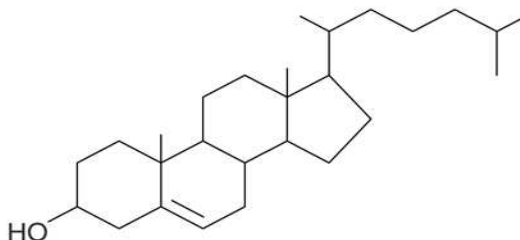
Tuky jsou pro správnou funkci lidského organismu naprosto nepostradatelné. Vedle bílkovin a cukrů patří tuky k základním živinám člověka a jsou nejbohatším zdrojem energie. Jejich energetická pohotovost je sice menší než u sacharidů, ale tuková tkáň je dlouhodobou rezervou energie, která se při nedostatečném přísunu živin v potravě uvolňuje a spotřebovává. Kromě energetické funkce zajišťují tuky i významnou funkci stavební. Jsou nezbytnou součástí buněčných membrán a výchozí látkou při syntéze steroidních hormonů, vitamínu D, žlučových kyselin a jiných biologicky důležitých látek. O tucích je též známo, že jsou špatným vodičem tepla, a proto tvoří izolační (ochrannou) vrstvu řady orgánů, které chrání před tepelnými ztrátami. Jelikož jsou tuky snadno deformovatelné (pružné), chrání některé orgány (např. ledviny) před mechanickým poškozením. Z výše uvedeného je zřejmé, že tuky jsou pro člověka naprosto nezbytnou složkou jeho života, bez nichž se žít jednoduše nedá (*Trojan a kol., 1999*).

1.3.1 Vyšetření lipidového spektra

Vyšetření lipidového metabolismu patří mezi nejžádanější laboratorní vyšetření, neboť lipidy hrají významnou roli v patogenezi aterosklerózy a jejích komplikací. V rámci vyšetření lipidového spektra stanovujeme celkový cholesterol, HDL cholesterol a LDL cholesterol a také triglyceridy.

1.3.1.1 Celkový cholesterol

Cholesterol je látka tukové povahy, která je zcela nezbytná pro všechny buňky našeho těla. Ačkoli se cholesterol oprávněně spojuje s řadou nebezpečných chorob, je v povědomí mnoha lidí hluboce zakořeněn mylný názor, že cholesterol našemu tělu spíše škodí, než-li mu prospívá. Je třeba říci, že cholesterol plní v organismu řadu významných funkcí. Je základním stavebním kamenem buněčných membrán a zároveň důležitou látkou, ze které vznikají hormony v nadledvinách a v pohlavních žlázách. Z cholesterolu vzniká také vitamin D potřebný pro výstavbu našich kostí a v neposlední řadě je cholesterol nezbytný pro tvorbu žlučových kyselin. Na druhé straně je jeho zvýšená hladina prokazatelným rizikovým faktorem, zvyšujícím možnost úmrtí na ischemickou chorobu srdeční (Kolář *et al.*, 2009). Převážná část cholesterolu se tvoří v játrech, část pak přijímáme potravou. Cholesterol je nejvíce obsažen v živočišných tucích, uzeninách, vnitřnostech, vaječném žloutku a tučných mléčných výrobcích. Eliminace cholesterolu probíhá v játrech, kde je využit k tvorbě žlučových kyselin nebo přímo vyloučen do žluče (Murray *et al.*, 2002).



Obr. 5 Vzorec cholesterolu

Hladina cholesterolu se nazývá **cholesterolémie**. Kromě přijaté potravy závisí koncentrace cholesterolu na věku, pohlaví (ženy mají zpravidla nižší hodnoty než muži) a etnickém původu. Koncentrace celkového cholesterolu by se měla pohybovat u osob středního věku v rozmezí 3,5 až 5,5 mmol/l.

- **Hypercholesterolémie** je zvýšená hladina cholesterolu v krvi. Ke zvýšeným hodnotám cholesterolu dochází tehdy, je-li ho těle prokukováno mnoho, popřípadě je příliš malá jeho spotřeba nebo pokud je přijímán ve velkém množství. Zvýšená hladina cholesterolu se velmi často sdružuje s diabetem, nadváhou, nadměrnou konzumací alkoholu, s nemocemi ledvin, jater a žlučníku. Hypercholesterolémie představuje jeden z nejvýznamnějších faktorů pro vznik aterosklerózy (kornatění tepen) a ischemická choroby srdeční.
- **Hypocholesterolémie** je snížená hladina cholesterolu v krvi. Snížené hodnoty cholesterolu nacházíme jen zřídka. Objevují se při nadměrné funkci štítné žlázy (hyperthyreóze), vážném onemocnění jater nebo při hladovění (Levková, 2005).

1.3.1.2 HDL cholesterol

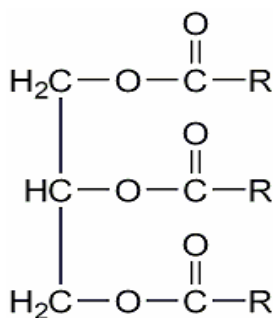
Jde o cholesterol obsažený v lipoproteinech o vysoké hustotě. Tyto lipoproteiny patří k nejmenším lipoproteinům krevní plazmy. Vznikají v játrech a tenkém střevě. Jsou tvořeny dvojvrstvou fosfolipidů a apolipoproteiny A-I, A-II a E. HDL cholesterol odvádí přebytečný cholesterol z periferních tkání zpět do jater, kde dochází k jeho odbourání. Z klinického hlediska je velmi užitečné sledovat hladinu HDL cholesterolu, neboť mezi koncentrací HDL cholesterolu a rizikem aterosklerotického onemocnění existuje vztah nepřímé úměry. Jinými slovy řečeno, čím vyšší je hladina HDL cholesterolu, tím nižší je riziko vzniku aterosklerózy, zatímco nižší hodnoty HDL cholesterolu, především s vyššími triglyceridy, zvyšují riziko vzniku aterosklerózy (Kopáč, 2004).

1.3.1.3 LDL cholesterol

Jde o cholesterol obsažený v lipoproteinech o nízké hustotě. Tyto částice jsou hlavním nositelem cholesterolu v plazmě a jejich nejdůležitější funkcí je zásobovat tkáň cholesterolem. Převážná část vzniká především z lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL), menší část vzniká přímo v játrech. Jádro LDL obsahuje převážně estery cholesterolu, povrch pak tvoří fosfolipidy, volný cholesterol a apolipoprotein B-100. Tyto částice jsou z plazmy odstraňovány pomocí specifických LDL receptorů na buněčné membráně periferních buněk. LDL částice se navážou na membránový receptor prostřednictvím apolipoproteinu B-100, poté vstupují pomocí receptorem zprostředkované endocytózy do buňky, kde jsou následně rozloženy. Zvýšená hladina LDL cholesterolu je spojena se zvýšeným rizikem vzniku aterosklerózy (Kopáč, 2004).

1.3.1.4 Triacylglyceroly

Triacylglyceroly jsou sloučeniny trojsytného alkoholu glycerolu a tři mastných kyselin. Protože jejich molekula se navenek jeví jako neutrální, jsou také známy pod označením neutrální tuky. Pro náš organismus mají velký význam, neboť jsou nejdůležitější zásobní formou energie v organismu. Exogenní triacylglyceroly jsou přijímány potravou. Během trávení jsou rozloženy na monoglyceroly a volné mastné kyseliny. Tyto štěpné produkty přecházejí do epitelových buněk tenkého střeva, kde jsou opět spojeny do nových triacylglycerolů, ty se stávají součástí chylomiker a uvnitř těchto lipoproteinů jsou transportovány krví do tkání. Endogenní triacylglyceroly jsou syntetizovány hlavně v játrech, tukové tkáni a enterocytech. Tvoří podstatnou část VLDL částic a v této podobě jsou transportovány krví do periferních tkání. Zvýšení koncentrace triacylglycerolů v séru je dalším rizikovým faktorem pro vznik aterosklerózy (Marshall, Bangert, 2008).



Obr. 6 Obecný vzorec triacylglycerolu

- **Hypertriacylglycerolémie** je zvýšená hladina triglyceridů v krvi. Ke zvýšeným hodnotám triacylglycerolů dochází po požití tučné stravy, při nadváze, při diabetu, při snížené funkci štítné žlázy, při zděděných poruchách látkové přeměny tuků, jakož i nadměrné konzumaci alkoholu (Levková, 2005).
- **Hypotriacylglycerolémie** je snížená hladina triglyceridů v krvi. Snížení hodnot se může objevit po léčích (Ascorutin, Clofibrat atp.) nebo při zvýšené funkci štítné žlázy (Levková, 2005).

1.3.2 Metody stanovení cholesterolu

1.3.2.1 Metoda dle Abell – Kendalla

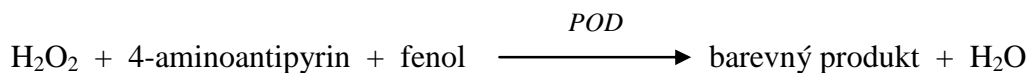
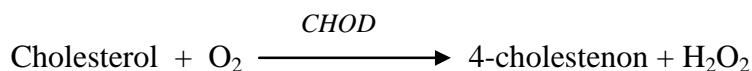
Abell – Kendallová metoda je součástí jedné z referenčních metod stanovení cholesterolu v HDL částicích. Estery cholesterolu jsou hydrolyzovány alkalickým hydroxidem za zvýšené teploty. Interferující látky se odstraní extrakcí cholesterolu do organického rozpouštědla. Cholesterol se stanoví modifikovaným Liebermann – Burchardovým činidlem (Dastyk et al., 2008).

1.3.2.2 Metoda dle Liebermann – Burcharda

Liebermann – Burchardova metoda se v minulosti hojně využívala ke stanovení cholesterolu. Je založena na reakci cholesterolu s acetanhydridem a kyselinou sírovou za vzniku zeleně zbarvené sloučeniny. Intenzita zbarvení vzniklé sloučeniny je přímo úměrná koncentraci cholesterolu ve vzorku. Tato metoda není specifická, a proto není již doporučována (Levková, 2005).

1.3.2.3 Enzymová metoda (GOD/PAP)

Tato metoda se v rutinní praxi nejčastěji používá ke kvantitativnímu stanovení cholesterolu. V prvním kroku jsou estery cholesterolu enzymaticky hydrolyzovány pomocí enzymu cholesterolesterázy (CHES) na cholesterol a volné mastné kyseliny. Cholesterol je v dalším kroku oxidován za katalytického působení enzymu cholesteroxidázy (CHOD) na cholestenon a peroxid vodíku. Vzniklý peroxid vodíku je stanoven barevnou reakcí, při které reaguje s 4-aminoantipyrinem a fenolem za přítomnosti enzymu peroxidázy (POD). Vzniká červeně zbarvený komplex, jehož absorbance je přímo úměrná množství cholesterolu v analyzovaném vzorku (Štern a kol., 2005).



1.3.3 Metody stanovení HDL cholesterolu

1.3.3.1 Přímé imunoinhibiční metody

Tato metoda je jednou z prvních v praxi používaných imunochemických metod stanovení HDL cholesterolu. V první fázi se využívá specifická protilátka proti ApoB, která reaguje s LDL, VLDL a chylomikrony za vzniku komplexu antigen – protilátka. Tím se tyto částice stávají nedostupnými pro další působení enzymů používaných na stanovení cholesterolu. V další fázi jsou estery cholesterolu obsažené v HDL částicích hydrolyzovány pomocí enzymu cholesterolesterázy (CHES). Vzniká cholesterol a volné mastné kyseliny. Cholesterol je poté oxidován za katalytického působení enzymu cholesteroxidázy (CHOD) na cholestenon a peroxid vodíku. Uvolněný peroxid vodíku je opět kvantifikován barevnou reakcí s 4-aminoantipyrinem a fenolem v přítomnosti enzymu peroxidázy (POD) za vzniku barevného produktu, vhodného pro fotometrické stanovení (*Dastych et al., 2008*).

LDL, VLDL, chylomikrony + protilátka proti Apo B \longrightarrow komplex antigen-protilátka

Cholesterol esterifikovaný v HDL + H₂O $\xrightarrow{\text{CHES}}$ cholesterol + mastné kyseliny

Cholesterol HDL + O₂ $\xrightarrow{\text{CHOD}}$ 4-cholestenon + H₂O₂

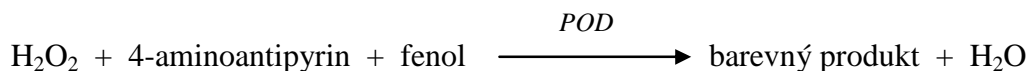
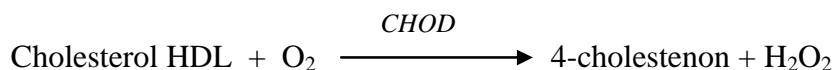
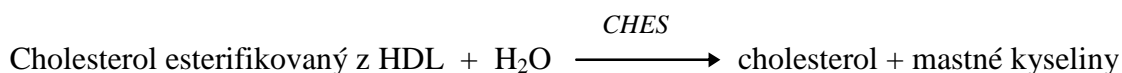
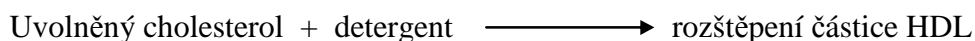
H₂O₂ + 4-aminoantipyrin + fenol $\xrightarrow{\text{POD}}$ barevný produkt + H₂O

1.3.3.2 Metody s maskováním non-HDL částic

- Jde o metodu, která využívá dextransulfát a polyethylglykolem (PEG) modifikované enzymy cholesterolesterázu a cholesteroxidázu. Dextransulfát vytváří

v přítomnosti hořčičných iontů s LDL, VLDL a chylomikrony ve vodě rozpustné komplexy. Tím jsou tyto lipoproteinové částice chráněny vůči PEGem modifikovaným enzymům. Jelikož HDL není komplexován, podléhá v něm obsažený cholesterol enzymatickým reakcím. Estery cholesterolu obsažené v HDL částicích jsou hydrolyzovány pomocí modifikované cholesterolesterázy (CHES) na cholesterol a volné mastné kyseliny. V dalším kroku je cholesterol oxidován v přítomnosti enzymu cholesteroxidázy (CHOD) na cholestenon a peroxid vodíku. Uvolněný cholesterol se stanoví tzv. Trinderovou reakcí, při které reaguje s 4-aminoantipyrinem a fenolem za přítomnosti enzymu peroxidázy (POD). Vzniká modře zbarvený komplex, jehož absorbance je přímo úměrná koncentraci HDL cholesterolu v analyzovaném vzorku (Čermáková a kol., 2005).

- Jiný způsob stanovení probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku se polyanionty selektivně vážou na povrch LDL, VLDL a chylomikronů. Vznikají komplexy, které jsou chráněny proti účinku enzymů používaných na stanovení cholesterolu a přítomným detergentům. Ve druhém kroku přítomné detergenty rozštěpí HDL částice a uvolněný cholesterol se stanoví enzymovou metodou CHOD-PAP (Štern a kol., 2005).



1.3.3.3 Precipitační metody

Nejprve je nutné z analytického vzorku separovat HDL cholesterol tím, že se vysrážejí (precipitují) lipoproteiny LDL, VLDL a chylomikrony přidávkem selektivního precipitačního činidla (směsi kyseliny wolframové s $MgCl_2$) a sraženina se oddělí centrifugací. Poté se stanovení v supernatantu koncentrace cholesterolu enzymovou metodou CHOD-PAP. Precipitační metody jsou v rutinní praxi používány minimálně (Levková, 2005).

1.3.3.4 Elektroforetické metody

Lipoproteinové částice lze rozdělit na základě jejich elektroforetické pohyblivosti na čtyři základní třídy: chylomikrony (zůstávají na startu), beta – lipoproteiny (LDL), prebeta – lipoproteiny (VLDL) a alfa – lipoproteiny (HDL). Jednotlivé lipoproteinové částice se vybarví specifickou reakcí na cholesterol (CHOD-PAP reakce) a vyhodnotí denzitometricky (Schneiderka a kol., 1998).

1.3.3.5 Ultracentrifugace a kvantitativní stanovení cholesterolu (CDC metoda)

V prvním kroku je nutné odstranit z krevního séra ultracentrifugací VLDL částice, případně chylomikrony. Poté se ze supernatantu odstraní centrifugací částice LDL, IDL a Lp(a) precipitací selektivním činidlem, a to obvykle směsí heparinu a $MnCl_2$. V závěrečné fázi se cholesterol přítomný v supernatantu stanoví referenční metodou podle Abell – Kendalla (Dastych et al., 2008).

1.3.4 Metody stanovení LDL cholesterolu

1.3.4.1 Metody s maskováním non-LDL částic

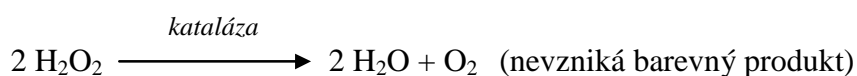
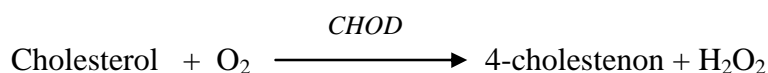
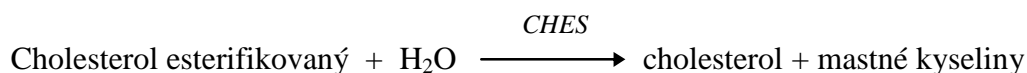
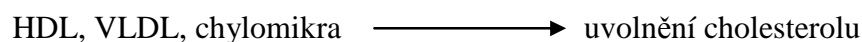
Tato metoda využívá selektivního činidla (např. cyklodextrinsulfát), který blokuje cholesterol obsažený v non-LDL částicích (HDL, VLDL a chylomikrony). Tím jsou tyto částice chráněny proti působení enzymů používaných na stanovení cholesterolu. Ve druhém kroku přítomné detergenty rozštěpí HDL částice a uvolněný cholesterol se stanoví enzymatickou metodou stejnou jako při stanovení celkového cholesterolu (*Dastych et al., 2008*).

1.3.4.2 Metody s odstraněním non-LDL částic

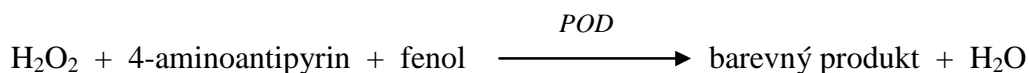
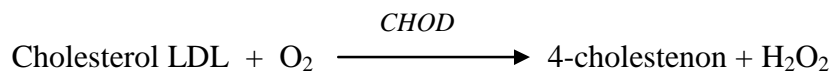
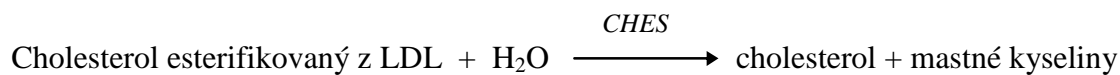
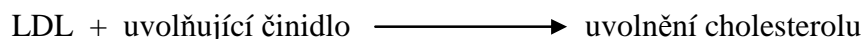
Stanovení LDL cholesterolu probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku je cholesterol uvolněn z non-LDL částic za přítomnosti detergentu a polyaniontu. LDL částice jsou rezistentní (odolné) vůči působení enzymů cholesterolesterázy (CHES) a cholesteroxidázy (CHOD). Tyto enzymy však reagují s cholesterolem v rozložených non-LDL částicích za současného vzniku peroxidu vodíku. Vzniklý peroxid vodíku je rozložen enzymem katalázou na kyslík a vodu. Během této reakce nevzniká žádný barevný produkt, neboť první reagentie neobsahuje všechny potřebné reagentie pro vznik chinonmonoiminového barviva.

Ve druhém kroku, po přidání druhého činidla, dochází za přítomnosti detergentu k uvolnění cholesterolu z LDL částic, inhibici katalázy a stanovení cholesterolu stejným postupem jako při enzymovém stanovení cholesterolu (*Dastych et al., 2008*).

Reagencie 1



Reagencie 2



1.3.4.3 Turbidimetrické metody

Principem metody je selektivní precipitace LDL částic pomocí polyvinylsulfátu, dextransulfátu a polycyklických anionů a turbidimetrické stanovení suspenze precipitátu LDL částic. Tato metoda se již pro kvantitativní stanovení cholesterolu prakticky nepoužívá (Dastych et al., 2008).

1.3.4.4 Elektroforetické metody

Lipoproteinové částice se elektroforeticky rozdělí na jednotlivé frakce, které se vybarví specifickou reakcí na cholesterol (CHOD-PAP reakce) a vyhodnotí denzitometricky (*Schneiderka a kol., 1998*)

1.3.4.5 Výpočtové metody

Známe-li koncentraci celkového cholesterolu, triacylglycerolů a HDL cholesterolu, lze koncentraci LDL cholesterolu snadno vypočítat Friedelwaldovou rovnicí:

$$\text{Cholesterol LDL} = \text{cholesterol celkový} - \text{cholesterol HDL} - (\text{triacylglyceroly}/2,22)$$

Pozn.: Tento výpočet není vhodné použít pro vzorky s koncentrací triacylglycerolů větší než 4,5 mmol/l a přítomností chylomikrů (*Čermáková a kol., 2005*).

1.3.4.6 Ultracentrifugace a kvantitativní stanovení cholesterolu (CDC metoda)

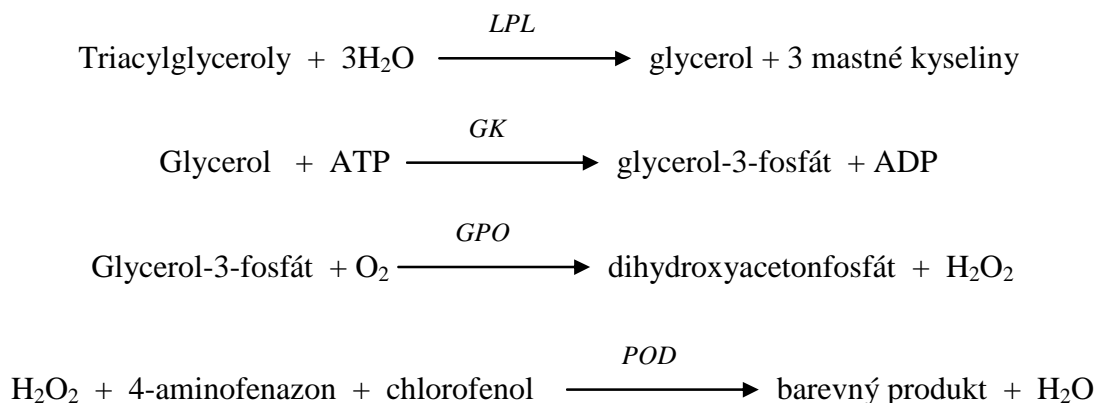
Tato metoda je též známa jako beta-kvantifikace. V první fázi je nutné odstranit z krevního séra ultracentrifugací VLDL částice a chylomikrony. V supernatantu se nachází směs LDL a HDL cholesterolu o hustotě $> 1,006 \text{ kg/l}$. Ve druhé fázi se stanoví cholesterol přítomný v HDL a LDL částicích metodou dle Abell-Kendalla. Poté se ze supernatantu odstraní centrifugací LDL částice precipitací selektivním činidlem, obvykle směsí heparinu a MnCl_2 . V závěrečné fázi se cholesterol obsažený v HDL částicích stanoví uvedenou metodou podle Abell-Kendalla. Cholesterol LDL se vypočítá podle níže uvedeného vzorce (*Dastych et al., 2008*).

$$\text{Cholesterol LDL} = \text{cholesterol (LDL + HDL)} - \text{cholesterol HDL}$$

1.3.5 Metody stanovení triacylglycerolů

1.3.5.1 Enzymová metoda (GPO/PAP)

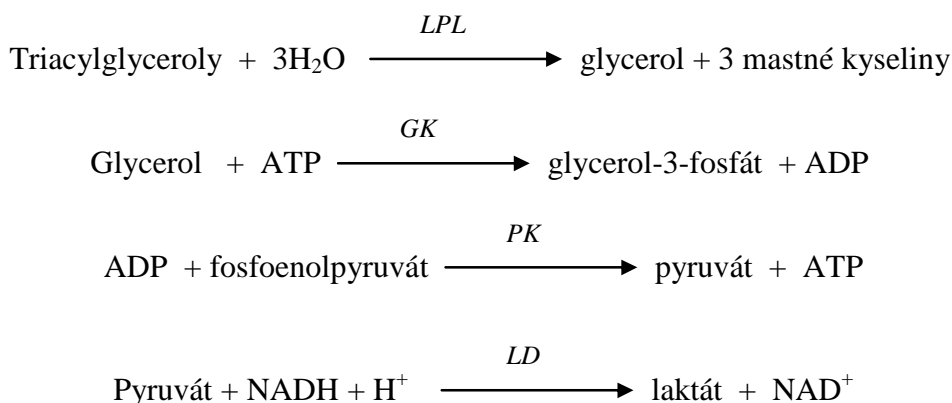
Triacylglyceroly jsou štěpeny pomocí lipoproteinové lipázy (LPL) na glycerol a volné mastné kyseliny. Glycerol je v přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP) za katalytického působení enzymu glycerolkinázy (GK) fosforylován na glycerol-3-fosfát. Ten je oxidován enzymem glycerolfosfát oxidázy (GPO) na dihydroxyacetonfosfát za vzniku peroxidu vodíku. Uvolněný peroxid vodíku se stanoví barevnou reakcí s 4-aminofenazonem a 4-chlorofenolem za přítomnosti enzymu peroxidázy (POD) a vzniká červeně zbarvený produkt. Intenzita zbarvení vzniklé sloučeniny je přímo úměrná koncentraci triacylglycerolů a analyzovaném vzorku (*Schneiderka a kol., 1998*).



1.3.5.2 Enzymová metoda (UV metoda)

Triacylglyceroly jsou enzymaticky hydrolyzovány lipoproteinovou lipázou (LPL) na glycerol a volné mastné kyseliny. Následně je glycerol v přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP) fosforylován za katalytického působení enzymu glycerolkinázy (GK) na glycerol-3-fosfát a adenosindifosfát (ADP). Poté adenosindifosfát reaguje s fosfoenolpyruvátem (PEP) v přítomnosti enzymu

pyruvátkinázy (PK) za tvorby pyruvátu a ATP. Vzniklý pyruvát je redukován účinkem laktátdehydrogenázy (LD) na laktát. Současně dochází k oxidaci NADH na NAD⁺. Koncentrace triacylglycerolů je pak přímo úměrná úbytku koncentrace NADH v průběhu reakce, jehož absorbance je měřena při 340 nm (*Čermáková a kol., 2005*).



1.3.5.3 Extrakčně – fotometrické metody

Tyto metody se v současnosti již nepoužívají a jsou zde uvedeny pro zajímavost. Nejprve se triacylglyceroly extrahují ze vzorku organickými rozpouštědly, a to především směsí heptanu, izopropanolu a koncentrované kyseliny sírové. Při extrakci se interferující látky (fosfolipidy a volný cholesterol) odstraňují adsorpcí na aktivovaný oxid hlinitý. Triacylglyceroly přítomné v supernatantu se zmýdelní hydroxidem draselným na glycerol. Uvolněný glycerol se poté stanoví reakcí s acetylacetonem a amonnými ionty za vzniku žlutě zbarveného produktu, vhodného pro fotometrické stanovení (*Levková, 2005*).

1.4 Preanalytická fáze (mimolaboratorní)

Preanalytická fáze laboratorního vyšetření zahrnuje soubor všech postupů a operací, probíhajících před vlastním vyšetřením. Toto období začíná kvalifikovaným rozhodnutím ošetřujícího lékaře o indikaci laboratorního vyšetření a končí vložení vzorku do analytického přístroje (*Dastych et al., 2008*). Preanalytickou fázi můžeme dále rozdělit na část mimolaboratorní a laboratorní.

Mimolaboratorní preanalytickou fází se rozumí veškeré postupy a činnosti, které probíhají mimo laboratoř, zpravidla na lůžkových či ambulantních zařízeních. Lze do ní počítat v širším slova smyslu přípravu pacienta k odběru biologického materiálu, vlastní odběr, identifikaci biologického materiálu včetně dalších povinných údajů, jeho uchování a transport do laboratoře (*Racek et al., 2006*).

Preanalytické období může významným způsobem ovlivnit výsledek laboratorního vyšetření. Zajímavým poznatkem je to, že mnohé studie potvrzují, že minimálně 60% všech chyb při laboratorních vyšetřeních vzniká právě v preanalytické fázi. Zdaleka nejvíce chyb vzniká mimo zdravotnické laboratoře – na odděleních, v ambulancích a ordinacích. Nedostatky a chyby vznikající v této části jsou nebezpečné, protože vedou k chybným výsledkům nebo jejich nesprávné interpretaci. Ve svých důsledcích mohou vést k opakovaným vyšetřením a tím k prodloužení hospitalizace, v některých případech dokonce až k poškození pacienta (*Čermáková, Štěpánová, 2003*). Ke snížení těchto chyb přispívají zdravotnické laboratoře tím, že vydávají soubor přesných instrukcí, které poskytují informace o správných postupech při přípravě pacienta, chybách při samotném odběru a důležitých zásadách o transportu biologického materiálu do laboratoře (*Jabor, Zámečník, 2005*).

Působením mnohých faktorů ovlivňuje sestra svou činností v souvislosti s odběrem biologického materiálu na vyšetření a jeho transportem, proto zde musí existovat neustálá kontrola ze strany laboratoře, která je za všechny kroky preanalytické fáze zodpovědná (*Dastych et al., 2008*).

1.4.1 Význam biochemického vyšetření

Biochemické vyšetření patří mezi základní laboratorní metody. Jde o vyšetření, kterým zjišťujeme obsah a množství chemických látek, obsažených v biologickém materiálu. Slouží ke stanovení bílkovin, cukrů, tuků, enzymů, hormonů a celé řady dalších látek (Mikšová, Froňková, Zajíčková, 2006). Biochemické vyšetření nás informuje o metabolických funkcích vnitřního prostředí, jejichž postižení je podkladem většiny chorob. Umožňuje zachytit změny ve funkci jednotlivých orgánů, ale také změny ve složení vnitřního prostředí (pH, osmolarita, hydratace, minerály v krvi atd.). Biochemická vyšetření jsou využita především pro prevenci a diagnostiku onemocnění, sledování průběhu terapie a určení prognózy vývoje nemoci (Zima, 2007).

1.4.1.1 Rozdělení biochemických vyšetření

Biochemická vyšetření můžeme rozdělit z hlediska indikace na:

- **základní** – umožňují základní hodnocení zdravotního stavu, pomáhají potvrdit nebo vyloučit diagnózu, stanovit vhodnou léčbu i sledovat její účinek (Čermáková, Štěpánová, 2003).
- **speciální** – pomáhají v situacích, kdy má pacient příznaky společné více nemocem; jde o podrobnější vyšetření, kterými hodnotíme metabolické funkce jednotlivých orgánů, sledujeme účinnost léčby, monitorujeme určité klinické situace např. stav vnitřního prostředí, aktuální metabolické a energetické situace, stav výživy atd. (Masopust, 1998).
- **vysoce speciální** – jsou vyšetření, která pomáhají stanovit vzácné či neobvyklé diagnózy; jde o složitá funkční vyšetření, monitorování metabolických funkcí a sledování hladiny speciálních léků; takováto vyšetření se provádí na speciálně vybavených pracovištích s technologií zajišťující nejkvalitnější dostupnou analýzu (Masopust, 1998).

Podle informačního obsahu dělíme všechna vyšetření na:

- **určující** (determinující) – mají zásadní význam při stanovení diagnózy nebo sledování účinnosti léčení.
- **doplňková** – pomáhají upřesnit informaci o zdravotním stavu.
- **funkční** – jsou ta vyšetření, při kterých se sledují změny určitého analytu při stimulaci (zátěži) určité metabolické funkce, obvykle v časovém sledu.

(Masopust, 1998).

Z hlediska rychlosti provedení dělíme vyšetření na:

- **rutinní** – tvoří podstatnou část všech laboratorních vyšetření; zpracovávají se průběžně během dne; jsou dostupná do 4 hodin od příjmu materiálu do laboratoře (*Čermáková, Štěpánová, 2003*).
- **statimová** – provádějí se v akutních případech, kdy výsledek laboratorního vyšetření může zásadním způsobem ovlivnit rozhodování v další péči o nemocného; vyšetřují se vždy přednostně před ostatními vzorky; vyšetření mají být provedena do 1 hodiny od dodání vzorku (*Masopust, 1998*).
- **z vitální indikace** – jsou ordinována v situaci spojené s ohrožením života, kdy výsledek vyšetření má vliv na přežití pacienta; musí být provedena neprodleně bez odkladu; vzorky mají absolutní přednost před ostatními; výsledky těchto vyšetření mají být známy do 30 minut od příjmu do laboratoře (*Klener et al., 2006*).

Z hlediska rychlé dostupnosti výsledků je někdy výhodné provádět vybraná základní vyšetření na místě – tzv. **POCT** (**point of care testing**). Jde o vyšetření, která jsou prováděna pomocí přístrojů přímo u nemocného – na operačním sále, jednotce intenzivní péče, při výjezdu záchranné služby. V některých případech si může vyšetření provést pacient sám doma (self-monitoring). Hlavní výhodou je pohodlí pacienta a okamžitý výsledek laboratorního vyšetření (*Klener et al., 2006*).

1.4.2 Příprava pacienta před odběrem

Poučení pacienta před odběrem biologické materiálu hraje klíčovou roli v celém procesu laboratorního vyšetření a je nezbytné pro správnost vyšetření. Spolupráce začíná informací o plánovaném odběru. Je důležité, aby pacient věděl, proč se mu bude krev odebírat a jaká opatření má před odběrem dodržet (*Rozsypalová, Haladová, Šafránková, 2002*).

Krev se odebírá pacientům ráno, obvykle nalačno. Pacienta je důležité poučit, aby odpoledne a večer před odběrem nejedl tučná jídla, neměl by kouřit ani pít kávu a alkoholické nápoje. Pacient by však neměl trpět pocitem žízně. Je vhodné, napije-li se před odběrem neslazeného čaje nebo čisté vody bez oxidu uhličitého i bez cukru (*Masopust, 1998*). Před odběrem je nutné, aby pacient byl v relativním klidu. Měl by se vyvarovat fyzicky náročné práci (kupř. nejel k lékaři na kole nebo nešel větší kus pěšky). Tři dny před odběrem je nutné po dohodě s lékařem vysadit všechny léky, které nejsou naprosto nezbytné. Informace o užití léků nebo léčbě zaznamenáme za žádanku. V době odběru nebo těsně před odběrem by neměly být pacientovi aplikovány infuze a transfuze (*Čermáková, Štěpánová, 2003*). Pro některá speciální vyšetření nebo funkční testy je nutné dodržet dostatečně dlouhou dobu před odběrem předepsanou dietu. Známým příkladem je nutnost vyloučení masa před vyšetřením okultního krvácení (*Racek et al., 2006*).

1.4.2.1 Nejčastější chyby při přípravě pacienta

- Pacient nebyl nalačno;
- V době odběru nebo těsně před ním dostal pacient infuzi;
- Odběr byl proveden po zvýšené tělesné námaze;
- Nemocný před odběrem dlouho nepil, výsledky mohou být ovlivněny dehydratací;
- Pacient nevynechal před odběrem léky.

(Šamáková et al., 2006)

1.4.3 Preanalytické faktory neovlivnitelné

Je nutné si uvědomit, že výsledky laboratorních vyšetření, které klinické laboratoře poskytují klinikám a oddělením, jsou ovlivněny řadou preanalytických faktorů. Některé z nich se dají do určité míry minimalizovat určením podmínek přípravy pacienta (dodržení určitého denního režimu před laboratorním vyšetřením), jiné nemůžeme ovlivnit ani v laboratoři, ani na oddělení (*Bunešová, Skalická, 2008*). Na tomto místě je vhodné uvést, jak mohou preanalytické faktory ovlivnit výsledek laboratorního vyšetření.

1.4.3.1 Pohlaví

Výsledky biochemických testů jsou ve většině případů, ne však vždy, závislé na věku a pohlaví. Uvádí se, že před nástupem puberty jsou minimální rozdíly hodnot mezi chlapci a děvčaty. Maximální rozdíly v koncentracích analytů se projevují především od nástupu puberty. Týkají se nejenom pohlavních hormonů, ale jsou popisovány rozdíly v aktivitě kreatinkinázy, koncentraci kyseliny močové, močoviny, kreatinu, plazmatického železa, ferritinu, hemoglobinu, atd. Obecně lze říci, že muži mají o něco vyšší normální hodnoty než ženy vzhledem k jejich větší svalové hmotě a vyššímu vzrůstu (*Klener et al., 2006*).

1.4.3.2 Rasa

Etnický původ podmiňuje řadu odlišností ve výsledcích některých laboratorních vyšetřeních. Nemalé rozdíly můžeme pozorovat v hodnotách granulocytů u černochů, které se u nich vyskytují v daleko menším počtu než u bělochů. Rozdílné hodnoty jsou také v aktivitě některých enzymů. Uvádí se, že černoši mají dvojnásobnou aktivitu kreatinkinázy, Asiaté vyšší aktivitu slinné amylázy. Odlišné hodnoty mohou být ovlivněny i stravovacími návyky typickými pro určitou etnickou či sociální skupinu obyvatel (*Racek et al., 2006*).

1.4.3.3 Věk

Koncentrace řady analytů se významně mění s věkem pacienta, což má velký význam pro správnou interpretaci laboratorních výsledků. Řada biochemických testů je vázána na určité vývojové období. Většina parametrů má v dětském věku jiné referenční rozmezí. Děti mají především v období růstu několikanásobně vyšší aktivitu kyselé fosfatázy, hladina kreatininu je u dětí naopak nižší. Se vzrůstajícím věkem stoupá hladina cholesterolu. Dalším příkladem je hladina kyseliny močové, která je u žen vyšší než u mužů, se po menopauze zvyšuje a dosahuje stejné hodnoty jako mají muži atp. (Zima, 2008).

1.4.3.4 Gravidita

Těhotenství představuje výrazný zásah do biochemických dějů, které vedou ke změnám koncentrace látek. Během těhotenství se v krvi, event. moči matky objevují bílkoviny a jiné látky produkované trofoblastem (hCG, α_1 fetoprotein, placentární alkalická fosfatáza, estrogeny a jejich metabolity atd.). Množství krve v těhotenství stoupá, na konci gravidity je objem cirkulující krve o 1500 – 1600 ml větší než na začátku. Množství plazmy stoupá rychleji než množství erytrocytů, a proto výsledkem těchto změn je hemodiluce čili zředění krve. V důsledku hemodiluce klesá osmolarita, koncentrace plazmatických bílkovin a rozvíjí se tzv. těhotenská anémie, která běžně po porodu odezní. Podáváme-li v těhotenství preparáty s obsahem železa, jeho hodnota v krvi stoupá. Vysoký objem cirkulující krve vede ke zvýšení srdečního výdeje o 30 – 40%. Ten je podmíněn nárůstem jak tepového objemu, tak srdeční frekvence. Zvyšuje se tak průtok krve dělohou, placentou, kůží, prsními žlázami, ale i ledvinami. Z tohoto důvodu se zvyšuje glomerulární filtrace a v krvi klesá koncentrace močoviny a kreatininu. V průběhu těhotenství dochází také k intenzivnější proteosyntéze – zvyšuje se produkce transportních bílkovin (např. transferin, ceruloplazmin, albumin aj.). Během těhotenství se zvyšuje srážlivost krve. Těhotné ženy jsou tak více ohroženy vznikem krevních sraženin (Racek et al., 2006).

1.4.3.5 Současně probíhající jiná nemoc

V případě, že chybí informace o pacientovi, což bývá zejména u akutních stavů, může se lékař setkat s výsledky, které jsou ovlivněny jinou současně probíhající chorobou, než pro kterou je nemocný vyšetřován. Namátkou lze uvést, že u pacienta s chronickou aktivní hepatopatií je poměr aminotransferáz jako u infarktu myokardu, u pacienta s aktivní revmatoidní artritidou je zvýšená hodnota C-reaktivního proteinu atd. Bude-li takový pacient vyšetřován pro bolest na hrudi, resp. s podezřením na infekční komplikaci, může pozitivita uvedených testů při neznalosti základního onemocnění vést k nesprávným závěrům (*Racek et al., 2006*).

1.4.3.6 Cyklické variace

Řada laboratorních parametrů v lidském organismu podléhá cyklickým změnám jak v průběhu dne, tak v průběhu týdnů, i v průběhu roku (sezónní variace).

- *Cirkadinní variace* – mají periodu 24 hodin. Těmto změnám podléhají nejen hormony (např. kortizol), ale také běžné analyty, jako jsou železo (změna o 50%), draselné ionty, urea, kreatinin a řada dalších.
- *Ultradiánní cykly* – mají periodu kratší než jeden den. Vyznačují se nárazovými změnami zejména kortikosteroidů, somatotropinu a inzulínu.
- *Infradiánní cykly* – mají periodu změn delší jak 24 hodin. Patří sem menstruační cyklus s typickým ovlivněním fertlím hormonů.
- *Cirkanuální cykly* – mají periodu změn přibližně 1 rok. Známým příkladem je vitamin D, který je vyšší v létě.

(*Bunešová, Skalická, 2008*).

1.4.4 Preanalytické faktory ovlivnitelné

1.4.4.1 Fyzická aktivita

Jak již bylo zmíněno, před každým odběrem by měl být pacient alespoň 20 minut v klidu. Je potřeba vědět, že zvýšená fyzická námaha ovlivňuje složení tělních tekutin a závisí vždy na intenzitě a délce zátěže. Během fyzického výkonu dochází ke změnám koncentrace všech látek, které se bezprostředně podílejí na energetickém metabolismu tj. laktátu, glukózy, mastných kyselin aj. Zvýšená fyzická zátěž vede rovněž k uvolnění svalových bílkovin do oběhu, proto stoupá aktivita CK, AST, LD a koncentrace myoglobinu. Pracují-li svaly na kyslíkový dluh, stoupá v krvi koncentrace kyseliny mléčné. Dochází také k metabolickým změnám lipidů, kdy klesá sérová koncentrace triacylglycerolů, stoupá HDL cholesterol a volné mastné kyseliny (*Masopust, 1998*).

1.4.4.2 Psychický stres

Odběr krve je pro většinu pacientů nepříjemný výkon, proto musíme počítat s tím, že každý nemocný je před odběrem více či méně rozrušen. Psychický stres se projevuje zejména u dětí, ale i u některých dospělých jedinců. Proto je vhodné, aby byl pacient před odběrem náležitě uklidněn. Je třeba si uvědomit, že i krátkodobý stres může vyústit ve změnu koncentrace některých analytů. Na stresovou reakci organismus reaguje vyplavením hormonů kůry i dřeně nadledvin, které vyvolávají hyperglykémii a vzestup volných mastných kyselin apod. (*Racek et al., 2006*). Významným stresem je také probuzení, proto např. odběr krve na vyšetření koncentrace prolaktinu je možné provést 3 hodiny po probuzení (*Bunešová, Skalická, 2008*).

1.4.4.3 Vliv diety

Pro většinu biochemických vyšetření se doporučuje lačnění v délce 10 – 12 hodin. Déle trvající lačnění je nevhodné, naopak krátké lačnění je nedostačující. Nedodržením dietních zásad vznikají změny v sacharidovém a lipidovém spektru. Bezprostřední příjem potravy zvyšuje nejenom koncentraci glukózy, ale také dochází k vyplavení řady hormonů a enzymů před jídlem a během jídla (inzulín, kalcitonin, lipáza, amyláza aj.). Dochází též ke zvýšení koncentrace triacylglycerolů, vzniká tzv. hypertriacylglycerolémie – díky ní je krevní sérum chylózní (zkalené). V krvi také stoupá hladina volných mastných kyselin a dochází ke změnám spektra lipoproteinů. Hladina cholesterolu se obvykle nemění. V potravě, jak víme, jsou obsažené živiny, které jsou v organismu metabolizovány až na konečné produkty, jejichž koncentrace se v krvi může rovněž zvýšit. Je známo, že např. po příjmu masité potravy se zvyšuje kreatinin, strava bohatá na proteiny vede ke zvýšení kyseliny močové a amoniaku atd. Některé změny mohou vznikat sekundárně v důsledku vyplavení hormonů. Klasickým příkladem je pokles draselného kationtu a fosfátu vlivem vyplaveného inzulínu (*Jabor, Zámečník, 2005*).

1.4.4.4 Alkohol

Před biochemických vyšetření by pacient neměl pít alkohol, a to nejméně 24 hodin před odběrem. Alkohol ovlivňuje výsledky laboratorních vyšetření podle toho, zda se jedná o akutní či chronický abúzus. Při akutním abúzu se obvykle zvyšuje koncentrace triacylglycerolů, aldosteronu a klesá koncentrace prolaktinu, antidiuretického hormonu a kortizonu. Při chronickém abúzu dochází ke zvýšení koncentrace jaterních testů (AST, ALT, GMT), kortizolu, adrenalinu a estradiolu. Dlouhodobý abúzus vede k hypoglykémii a ketoacidóze, zvyšuje se koncentrace laktátu a kyseliny močové (*Racek et al., 2006*).

1.4.4.5 Kouření

Kouření významně ovlivňuje výsledky řady analytů. Uvádí se, že kouření zvyšuje podíl karboxylhemoglobinu a koncentraci thiokyanatanů v séru. Vlivem nikotinu se zvyšuje sekrece žaludečních šťáv, zvyšuje se hladina cholesterolu, triacylglycerolů, karcinoembryonálního antigenu, kortizolu, naopak se snižuje koncentrace imunoglobulinu a vitamínu B12 (Zima, 2008).

1.4.4.6 Léky

Léky působí na výsledky biochemických vyšetření dvojím způsobem:

- *Ovlivňují metabolismus stanovované látky* (mění jeho rychlost např. indukci syntézy či naopak inhibicí enzymů, ovlivňují vazbu na transportní bílkovinu atp.);
- *Ruší (interferují) při vlastní chemické reakci* – např. kyselina askorbová může makovat přítomnost glukózy či krve v moči při vyšetření diagnostickým proužkem.

Je proto vhodné pacienta upozornit, aby léky, pokud je to možné, před odběrem vynechal. Není-li to možné, je nutné uvést požití léky na žádanku. Jako léky se pacientům mohou podat látky, které chceme v krvi stanovit. Typickým příkladem je infuze roztoku glukózy. V tomto případě může být při nepřiměřené rychlosti infúze ovlivněna glukóza v krvi, i kdybychom provedli odběr z jiné žíly, vždyť např. koncentrace glukózy jen v izotonickém roztoku je 278 mmol/l (Racek et al., 2006).

1.4.5 Odběr venózní krve

Žilní krev patří mezi nejčastěji vyšetřovaný materiál, který hraje významnou roli pro správné stanovení diagnózy a následné léčby pacienta. Dospělým a větším dětem se krev odebírá nejčastěji z povrchových žil horních končetin. Nejčastěji provádíme venepunkci v oblasti předloktí. Vhodné jsou zejména kubitální žíla ve fossa antebrachii nebo žíly v loketním ohbí. Odběr krve patří k základním a klíčovým dovednostem sester, které jsou za jeho kvalitu přímo zodpovědné (Šamánková et al., 2006).

1.4.5.1 Odběrové zkumavky

V současné době se na většině zdravotnických zařízení používá k odběru krve uzavřený vakuový systém. Tento systém zajišťuje odběr krve do jednorázových vzduchotěsných zkumavek vyrobených z plastu. Jednotlivé zkumavky jsou od sebe odlišeny barevnými víčky podle druhu uvnitř přítomné preparační látky. V praxi jsou běžně dostupné odběrové systémy např. Vacuette, Vacutainer aj. (Mikšová, Froňková, Zajíčková, 2006).



Obr. 7 Odběrové zkumavky Vacuette

(Zdroj: www.vacurette.com)

Pro biochemické vyšetření se odebírá **srážlivá krev**. Odebírá se do zkumavek bez příměsi protisrážlivého prostředku. Takto odebraná krev se po krátké době začne srážet, v důsledku přeměny rozpustného fibrinogenu na vláknitý fibrin. Proto je vhodné umístit zkumavky do stojanu a nechat je dostatečnou dobu srazit. V laboratoři se pomocí centrifugy docílí oddělení krevního séra a krevních elementů. Kdybychom vzorky odstředili příliš brzo, obvykle dojde k hemolýze. Většinu biochemických vyšetření provádíme ze séra, které bylo získáno ze srážlivé krve (Šamánková *et al.*, 2006). Některé zkumavky obsahují separační gel, který po odstředění vytvoří rozhraní mezi krvinkami a vrstvou séra. Je tak umožněno dlouhodobé uložení séra v primární zkumavce, aniž by docházelo ke kontaktu mezi sérem a krvinkami (Racek *et al.*, 2006).

Pro některá vyšetření je zapotřebí získat **nesrážlivou krev**. V tomto případě se do odběrové zkumavky přidávají látky zabraňující srážení krve. Protisrážlivé prostředky mohou být ve zkumavce v tekuté nebo krystalické formě. Mezi nejčastěji užívané protisrážlivé prostředky patří heparin, citrát sodný, šťavelan draselný nebo K₃ EDTA. S výjimkou heparinu brání protisrážlivé prostředky krevnímu srážení tím, že váží vápenaté ionty, které jsou pro srážení krve nezbytné. Po odběru je nutné krev s protisrážlivým činidlem promíchat opakovaným šetrným otáčením zkumavky. K vyšetření glykémie se využívají zkumavky s obsahem fluoridu sodného, který zde působí jako inhibitor glykolýzy (Racek *et al.*, 2006).

1.4.5.2 Bezpečnostní aspekty při odběru

- Každý vzorek biologického materiálu je nutné považovat za potenciálně infekční. Je zapotřebí zabránit zbytečným manipulacím s krví, které by mohly vést ke kontaminaci pokožky odebírající osoby, veškerých zařízeních používaných při odběru nebo vzniku infekčního aerosolu.
- Odběr biologického materiálu provádíme vždy zásadně v ochranných rukavicích, a to ke každému pacientovi zvlášť. Tím chráníme nemocné i sebe před vznikem infekce.

- Před každým odběrem i po něm si důkladně umyjeme ruce.
- Je nutné zajistit lékaře u případných zdravotních komplikacích při odběru.
- U pacientů s poruchami vědomí nebo u malých dětí je nutné zabránit případnému poranění. Je třeba potřebovat očekávat nenadále pohyby nebo reakce na vpich. O komplikacích musí být informován ošetřující lékař.
- Veškeré manipulace s odběrovými jehlami se musí provádět s maximální opatrností. Bezprostředně po odběru se musí jehly bezpečně zneškodnit odložením do silnostěnné nádoby (kontejneru). S použitými jehlami se již nesmí jinak manipulovat.
- Pro zabránění vzniku hematomu v místě vpichu je nutné dodržet tyto pravidla: maximální opatrnost při punkci (proniknutí jehly jen horní žilní stěnou), včasné uvolnění turniketu před odstraněním jehly ze žíly, používání jen větších povrchových žil, zajištění dostatečného tlaku na místo vpichu při ošetřování rány po odběru).

(Šamánková et al., 2006)

1.4.5.3 Příprava pomůcek k odběru venózní krve

- Vzduchotěsné vakuové zkumavky;
- Sterilní jehly na jedno použití;
- Umělohmotné nástavce na jehlu;
- Ochranné rukavice na jedno použití;
- Desinfekční prostředek;
- Rouška z PVC;
- Popruh k zatažení paže;
- Kontejner na odkládání použitých jehel;
- Tampony z buničiny;
- Náplast.

(Rozsypalová, Haladová, Šafránková, 2002)

1.4.5.4 Pracovní postup odběru venózní krve

- **Příprava pomůcek a příslušné dokumentace.**
 - na podnos si připravíme všechny potřebné pomůcky;
 - odběrové zkumavky vybereme podle typu požadované vyšetření;
 - před odběrem si pečlivě označíme zkumavky štítkem se jménem a příjmením pacienta, rodným číslem, datumem odběru, oddělením ze kterého se vzorek posílá (*Šamánková, et al., 2006*).
- **Kontrola identifikace pacienta.**

Komunikující pacient

- pacienta pozdravíme;
- zeptáme se ho na jeho jméno, příjmení a rodné číslo (datum narození);
- zkontrolujeme, zda údaje uvedené na odběrové zkumavce souhlasí s údaji na žádance.

Nekomunikující pacient (bezvědomí, děti, psychiatričtí pacienti, cizinci)

- identifikaci pacienta provede zdravotnický personál, popř. příbuzná osoba (*Šamánková et al., 2006*).

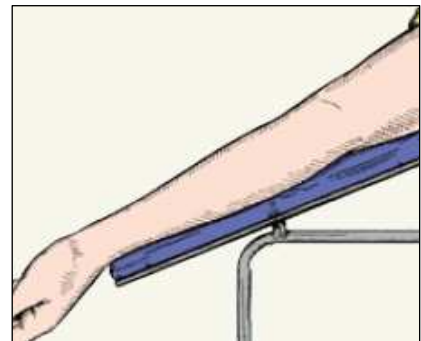
- **Informování pacienta o postupu při odběru.**
 - pacienta seznámíme s výkonem, trpělivým a ochotným způsobem mu zodpovíme jeho případné otázky;
 - dotazem se přesvědčíme, zda pacient dodržel potřebná dietní opatření;
 - zjistíme, zda se mu při odběru nedělá špatně (*Rozsypalová, Haladová, Šafránková, 2002*).

- **Výběr vhodné polohy při odběru.**

- krev odebíráme pacientům standardně vsedě, pokud to stav pacienta nedovolí, tak vleže;
- poloha pacienta je velmi významná a může ovlivnit celou řadu analytů, tak např. ve vzpřímené pozici stoupá hydrostatický tlak a tak dochází k přesunům vody a iontů z plazmy do intersticia – tím se zvyšuje cca o 10% koncentrace přítomných proteinů a krevních elementů, které přes kapilární stěnu neprocházejí. Výsledkem je nejen zahuštění plazmy, ale také dochází k posturálnímu stresu, díky němuž se aktivuje sympatikus, který spouští osu renin – angiotenzin – aldosteron s příslušnou fyziologickou odpovědí. Koncentrace těchto hormonů je vstoje vyšší až o 50% (*Jabor, Zámečník, 2005*).

- **Zajištění vhodné polohy paže.**

- u sedícím pacientů doporučíme vhodnou polohu paže, tj. v natažené pozici bez pokrčení v lokti;
- u ležících nemocných zajistíme přiměřenou polohu paže s vyloučením flexe v lokti (*Šamánková et al., 2006*).



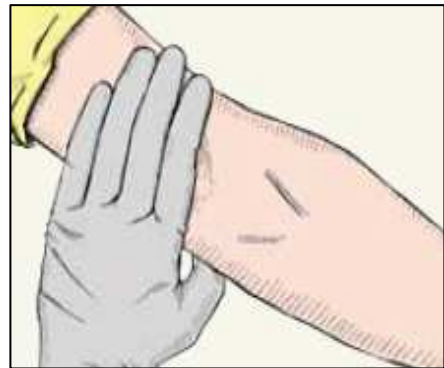
Obr. 8 Vhodná poloha paže

(Zdroj: www.vacquette.com)

- **Posouzení kvality žilního systému.**

- odběr provádíme nejčastěji z loketní žíly (veny cubite);
- abychom odběr provedli napoprvé, je zapotřebí vybrat co nejlepší žílu;
- dobré žíly poznáme tak, že jsou na pohmat měkké a pružné;

- málo zřetelné žíly je možné zviditelnit např. masáží paže od zápěstí k loktu či krátkými poklepy ukazovákem na místo odběru;
- k odběru by neměla být využita paže, na které jsou jizvy, hematom nebo u žen na straně po provedené mastektomii;
- paži s vybranou žílou podložíme rouškou z PVC (Šamánková et al., 2006).



Obr. 9 Výběr místa vpichu
(Zdroj: www.vacurette.com)

- **Aplikace turniketu.**

- nad místem vpichu zatáhneme paži vhodným škrtidlem;
- škrtidlo by však nemělo být použito déle jak 1 minutu, v opačném případě dochází k přesunu tekutiny z cévního prostředí do intersticia, a tím ke zvýšení koncentrace vysokomolekulárních látek v odebrané krvi až o 10 – 30%;
- u pacientů s dobře viditelnými žilami je vhodné provést odběr z nezatažené paže;
- pacient by neměl s paží cvičit, protože může dojít k ovlivnění některých analytů, např. laktátu;
- oblékneme si ochranné rukavice (Klener et al., 2006).



Obr. 10 Aplikace turniketu
(Zdroj: www.vacurette.com)

- **Desinfekce místa vpichu.**

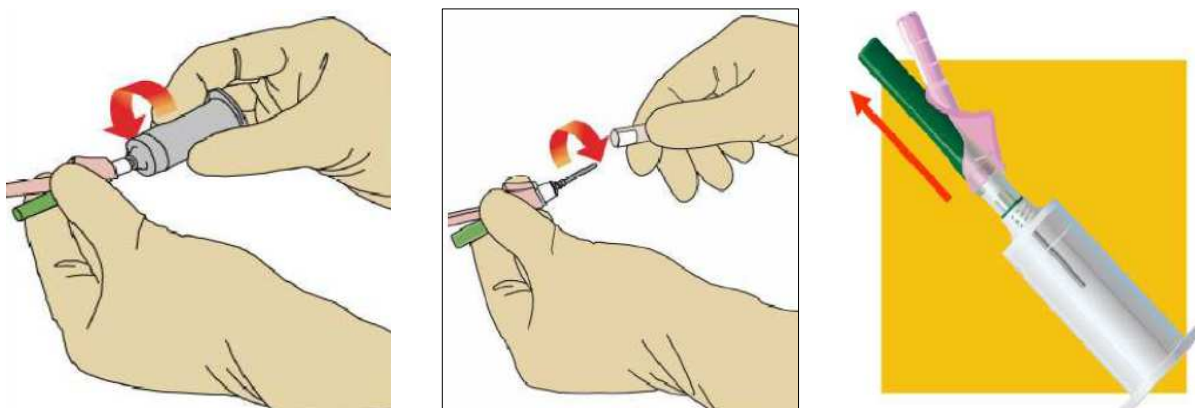
- místo vpichu desinfikujeme;
- desinfekci je nutné nechat zaschnout, aby se zabránilo případné kontaminaci vzorku při odběru, hemolýze vzorku a pocitu pálení v místě vpichu;
- výběr vhodného desinfekčního prostředku může také ovlivnit výsledek laboratorního vyšetření;
- pokud použijeme alkoholický prostředek (Zdroj: www.vacurette.com) před odběrem krve na stanovení koncentrace alkoholu v krvi, můžeme dostat falešně pozitivní výsledek;
- po desinfekci se už nesmí na místo vpichu sahat (Racek et al., 2006).



Obr. 11 Desinfekce místa vpichu

- **Příprava jehly.**

- podle kvality žil si vybereme jehlu vhodného průsvitu;
- odstraníme dolní kryt jehly;
- jehlu přišroubujeme do plastového držáku;
- opatrně sejmeme horní kryt jehly.



Obr. 12 Příprava jehly (Zdroj: www.vacurette.com)

- **Provedení venepunkce.**

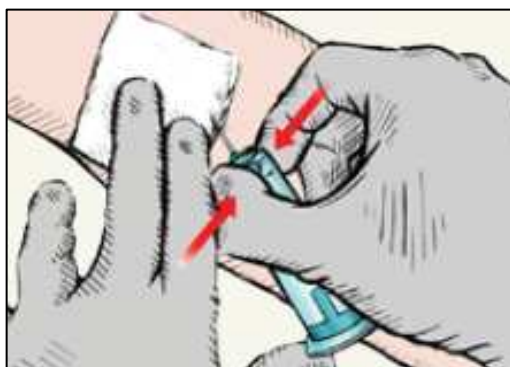
- pevně uchopíme pacientovi paži;
- palcem přimáčkneme žílu cca 2-5 cm pod místem vpichu;
- jehlu opatrně zavedeme do žíly;
- poté vybereme zkumavku pro požadovaný odběr a vložíme ji do nástavce tak, aby krátká jehla s gumovým ventilem pronikla zátkou zkumavky;



Obr. 13 Provedení venepunkce

(Zdroj: www.vacurette.com)

- zkumavka se samovolně naplní potřebným množstvím krve;
- jakmile se ve zkumavce objeví krev, uvolníme škrtidlo;
- odebíráme-li krev do více zkumavek, je nutné dodržet jejich správné pořadí:
 1. odběr na hemokulturu
 2. zkumavky bez přísad
 3. zkumavky na hemokoagulaci
 4. ostatní zkumavky s přísadami
- u pacientů se zavedenou infuzí se odběr provádí zásadně z druhé ruky nebo místa pod intravenózní linkou, ovšem ideální je, když není infuze momentálně aplikována;
- chceme-li odběr ukončit, místo vpichu i s jehlou zakryjeme buničitým čtvercem;
- na čtvereček se jemně zatlačí a pomalým tahem se odstraní jehla ze žíly;
- po odběru je nutné zkumavky s protisrážlivým prostředkem šetrně převrátit (Šamánková et al., 2006).



Obr. 14 Ukončení venepunkce

(Zdroj: www.vacurette.com)

- **Ošetření po výkonu.**

- po běžném odběru očistíme okolí místa vpichu čtverečkem buničiny;
- na místo vpichu přiložíme tampon a po chvíli přiložíme náplast;
- pacientovi doporučíme, aby si místo vpichu tiskl prsty cca 2 – 3 minuty a ponechal náplast alespoň 15 minut po odběru (*Bunešová, Skalická, 2008*).

Komplikace při odběru:

- hematom (propíchnutí žíly, případně po vyjmutí jehly);
- flebitida (u opakovaných odběrů);
- omezená pohyblivost končetiny (při narušení nervu);
- krvácení z místa vpichu;
- nevolnost pacienta, mdloby, kolaps.

(*Šamánková et al., 2006*)

1.4.5.5 Nejčastější chyby při odběru venózní krve

- záměna zkumavek;
- použití jehly s malým průsvitem;
- nevhodná odběrová nádobka (např. s nevhodnými aditivy);
- prudké třepání odebrané krve ve zkumavce;
- dlouhodobé stažení paže turniketem nebo intenzivní cvičení před odběrem;
- desinfekce místa vpichu nevhodným desinfekčním prostředkem;
- nedostatečné uschnutí desinfekce;
- odběr ze stejné ruky nebo nevhodného místa při zavedené infuzi.

(*Bunešová, Skalická, 2008*)

1.4.6 Odběr kapilární krve

Kapilární krev se odebírá větším dětem a dospělým nejčastěji z bříška prstů horní končetiny nebo z ušního lalůčku. Z kapilární krve nejčastěji vyšetřujeme hladinu glykémie a parametry acidobazické rovnováhy (kapilární astrup). Novorozencům, kojencům a malým dětem odebíráme kapilární krev z patičky, a to především na stanovení krevního obrazu (*Šamánková et al., 2006*).

1.4.6.1 Odběrové nádoby

Kapilární krev na vyšetření glykémie se odebírá do plastových mikrozkušavek pomocí kapiláry. Mikrozkušavky obsahují příměs fluoridu sodného, který zde působí jako inhibitor glykolýzy (*Mikšová, Froňková, Zajíčková, 2006*).

1.4.6.2 Příprava pomůcek k odběru kapilární krve

- eppendorfky se šedým uzávěrem;
- stojánek na eppendorfky;
- kapiláry o objemu 20 μ l;
- držák na kapiláry;
- jehla s malým průsvitem či sterilní lanceta;
- ochranné rukavice;
- desinfekční prostředek;
- emitní miska;
- rouška z PVC;
- čtverečky buničité vaty;
- náplast.

(*Šamánková et al., 2006*).

1.4.6.3 Pracovní postup odběru kapilární krve

- **Příprava pomůcek a příslušné dokumentace.**
 - na podnos si připravíme všechny potřebné pomůcky;
 - před odběrem opatříme eppendorfky štítkem se jménem a příjmením pacienta, rodným číslem, datumem odběru, oddělením ze kterého se vzorek posílá (*Šamánková, et al., 2006*).
- **Kontrola identifikace pacienta.**
 - pacienta pozdravíme;
 - zeptáme se ho na jeho jméno, příjmení a rodné číslo (datum narození);
 - zkontrolujeme, zda údaje uvedené na odběrové zkumavce souhlasí s údaji na žádance.
- **Informování pacienta o postupu při odběru.**
 - pacienta seznámíme s výkonem, trpělivým a ochotným způsobem mu zodpovíme jeho případné otázky;
 - dotazem se přesvědčíme, zda pacient dodržel potřebná dietní opatření (*Rozsypalová, Haladová, Šafránková, 2002*).
- **Výběr místa vpichu.**
 - kapilární krev na vyšetření glykémie odebíráme z prstů horních končetin;
 - vybíráme zásadně prsty ruky nedominantní (u praváka levou, u leváka pravou);
 - k odběru si vybíráme nejčastěji prostředníček a prsteníček, snažíme se vynechat palec a ukazovák, které pacient nejvíce používá;
 - místo vpichu musí být dobře prokrvené, proto se doporučuje prsty zahřát v teplé vodě;
 - podložíme ruku rouškou z PVC;
 - oblékneme si ochranné rukavice (*Šafránková, Nejedlá, 2006*).

- **Desinfekce místa vpichu.**
 - provedeme desinfekce zvoleného bříška prstu;
 - desinfekci je nutné nechat zaschnout, aby nedošlo k hemolýze;
 - po desinfekci se už nesmí na místo vpichu sahat (*Šamánková, et al., 2006*).

- **Provedení vpichu.**
 - rychlým, ale šetrným způsobem provedeme vpich do bříška prstu ze strany, kde je lepší prokrvení než ve středu prstu;
 - první kapku otřeme, poněvadž obsahuje příměs tkáňového moku;
 - další tvorbu kapek podpoříme lehkým tlakem na prst, poté přiložíme koncem kapiláru, která se vlivem kapilárních sil naplní samovolně krví;
 - kapilární krev bychom neměli nabírat příliš velkým vymačkáváním prstu, aby nedocházelo ke kontaktu krve a tkáňového moku;
 - kapilára musí být rovněž přesně naplněna krví a nemají v ní být přítomny vzduchové bubliny, v opačném případě naměříme zkreslené výsledky;
 - naplněnou kapiláru vhodíme do předem označené eppendorfky, eppendorfku zavřeme a důkladně ji protřepeme;
 - místo vpichu ošetříme čtverečkem buničiny (*Levková, 2005*).

1.4.6.4 Nejčastější chyby při odběru kapilární krve

- nedostatečné prokrvení místa vpichu;
- nadměrné vymačkávání krve z prstu;
- první kapka krve se použije k odběru;
- nedostatečné oschnutí desinfekce;
- nedostatečné naplnění kapiláry;
- v kapiláře jsou přítomné vzduchové bubliny;
- nedokonalé promíchání.

(Bunešová, Skalická, 2008)

1.4.7 Identifikace biologického materiálu

K obecným zásadám při odběru patří především přesná a jednoznačná identifikace vzorku. Vždy by měla platit zásada, že sestra by si nejprve měla označit všechny zkumavky daného pacienta jménem a teprve do nich by měla nabrat krev. Je to důležité především proto, aby nedošlo k záměně biologického materiálu. Mezi základní identifikační údaje, které jsou nezbytné pro přijetí a následné zpracování vzorku do laboratoře patří:

- Jméno a příjmení pacienta
- Rodní číslo
- Datum odběru

Ideální je identifikace pomocí štítků, které lze vytisknout z nemocničního informačního systému. Na tomto štítku jsou uvedené všechny požadované identifikační údaje pacienta vytištěné z počítače, což do jisté míry eliminuje případy nečitelného popisu údajů pacienta na zkumavkách. Nedostatečně označené vzorky nemohou být v laboratoři vyšetřovány, protože by mohlo dojít k poškození pacienta v důsledku záměny vzorku (*Zahradníková, 2010*).

1.4.8 Laboratorní žádanka

Jak již bylo zmíněno, celý laboratorně diagnostický proces je zahájen úsudkem ošetřujícího lékaře o provedení laboratorního vyšetření. Základním předpokladem pro jeho realizaci je nezbytné, aby lékař vyplnil laboratorní žádanku. V zásadě rozlišujeme dvě formy žádanek, a to tištěnou a elektronickou verzi (*Dastych et al., 2008*).

Tištěná žádanka představuje formulář, který obsahuje již předtištěné metody, jejichž provedení vyznačí lékař zaškrtnutím příslušné rubriky. Na žádance musí být uvedeny tyto údaje:

- Jméno a příjmení pacienta;
- Rodné číslo;
- Adresu místa pobytu vyšetřované osoby;
- Kód pojišťovny;
- Číslo diagnózy;
- Druh biologického materiálu, datum a hodina odběru;
- Razítko a podpis ošetřujícího lékaře;
- Adresu odesílatele (název nemocnice, popř. klinického pracoviště);
- Požadavky na laboratorní vyšetření.

Pokud je požadováno rychlé vyšetření vzorku, žádanku označíme „Statim“. Statimová vyšetření se provádí v urgentních případech, laboratoř je musí provést co nejdříve a výsledek neprodleně ohlásit na oddělení (*Čermáková, Štěpánová, 2003*).

Elektronická žádanka je součástí nemocničního informačního systému, který využívají pracoviště jednotlivých nemocnic. Ze strukturované nabídky si lékař navolí požadovaná vyšetření. Všechny ostatní potřebné údaje se pro konkrétního pacienta vygenerují automaticky z databáze nemocničního informačního systému. Po vystavení elektronické žádanky systém vygeneruje identifikační čárové kódy, které vytiskne čárová tiskárna na samolepící štítky k označení zkumavek s biologickým materiálem. Na vytisknutém štítku je kromě čárového a numerického kódu uvedeno jméno a příjmení pacienta, rodní číslo, případně i označení typu odběrové zkumavky, do které má být odběr biologického materiálu proveden (*Dastych et al., 2008*).

1.4.9 Transport biologického materiálu do laboratoře

Odebrané vzorky v řádně označených zkumavkách a se správně vyplněnými žádankami by měly být co nejrychleji dopraveny do příslušné laboratoře. Transport by měl být dostatečně rychlý. Vzorky krve by měly být nejpozději do 2 hodin dopraveny do laboratoře, aby mohlo být včas odděleno sérum od krevních elementů. Po odběru srážlivé krve je vhodné, aby vzorek nebyl transportován okamžitě, ale aby se srazil na místě odběru během 5 – 10 minut. Příliš rychlý transport a předčasné odstředění obvykle vedou hemolýze (*Racek et al., 2006*).

Pro okamžitý transport biologického materiálu postačuje pokojová teplota transportu. Extrémní teplota je příčinou inaktivace enzymů a také rychleji klesá koncentrace glukózy. Naopak mráz může způsobit hemolýzu vzorku. Vzorky bychom měli rovněž chránit před přímým světlem. Účinkem světla dochází k urychlení oxidace bilirubinu na biliverdin a tím ke zkreslení výsledku (*Zahradníková, 2010*).

V rámci zdravotnických zařízení je zajišťována doprava biologického materiálu do laboratoře prostřednictvím pověřených pracovníků, obvykle sanitářů a sanitářek. K transportu vzorů z odlehlých pracovišť nebo od praktických lékařů je používán centrální svoz.auta svozové služby jsou vybavena chladicími boxy, ve kterých je udržována a pravidelně kontrolována teplota. V některých velkých zdravotnických zařízeních se používá k transportu materiálu potrubní pošta. Při tomto způsobu transportu je zapotřebí vzorky uložit do spolehlivě uzavřených kontejnerů (*Dastych et al., 2008*).

1.4.9.1 Nejčastější chyby při transportu

- pozdní dodání vzorku do laboratoře;
- pozdní oddělení séra od krevního koláče;
- vzorky byly vystaveny nevhodné teplotě nebo přímému slunečnímu světlu;
- uskladnění plné krve v lednici bezprostředně po odběru;
- zkumavky s materiálem byly potřísněny krví.

(Bunešová, Skalická, 2008)

1.4.10 Uchovávání biologického materiálu před analýzou

Určitě nikoho nepřekvapí, že nejsprávnějších výsledků se dosáhne ze zcela čerstvě odebraného materiálu. Pokud nemůžeme biologický materiál zpracovat ihned, zkumavky nejprve odstředíme, vizuálně se přesvědčíme, zda nedošlo k hemolýze a poté je umístíme do lednice při 4°C, kde koncentrace většiny analytů zůstávají beze změny alespoň 24 hodin. Krevní sérum je též možno zmrazit na teplotu -20°C. Při této teplotě se koncentrace řady analytů nemění i po řadu týdnů. Rovněž při uchovávání je nutné chránit vzorky před teplem a světlem (*Zahradníková, 2010*).

Je dobré mít na paměti, že při delším stání krve dochází k vyčerpání energetických zdrojů erytrocytů (glukózy). Červené krvinky pak nemohou udržet základní metabolické děje, k nimž patří funkce membrány zajišťující transport draslíku do buňky a sodíku opačným směrem. Z tohoto důvodu dochází k úniku draslíku z erytrocytů a následně pak naměříme hyperkalemii, aniž současně dojde k hemolýze. Při stanovení glykémie se do zkumavek přidává fluorid sodný, který inhibuje glykolýzu až po dobu 24 hodin. Bez přídavku fluoridu sodného klesá glykémie činností erytrocytů.

Budou-li vzorky uchovávány v teple, leukocyty spotřebovávají kyslík, zároveň vzniká oxid uhličitý a vlivem anaerobní glykolýzy v erythrocytech klesá pH krve. Proto se krev na vyšetření acidobazické rovnováhy a krevních plynů musí uchovávat na ledu, a to nejméně dvě hodiny (*Racek et al., 2006*).

2. Cíl práce

Tato bakalářská práce si klade dva cíle:

- 1) Definovat biochemické markery (glukózu, triacylglyceroly, HDL cholesterol) používané pro diagnostiku metabolického syndromu;
- 2) Ovládat techniku vyšetření těchto markerů včetně jejich principu stanovení.

3. Metodika

V praktické části bakalářské práce uvedu způsob, jakým jsem vzorky biologického materiálu vyšetřoval. Bude zde popsán postup zpracování biologického materiálu včetně jeho přípravy k vlastní analýze a charakterizován princip metody, která byla k analýze použita. Vyšetřil jsem 100 vzorků venózní krve na oddělení klinické biochemie v laboratoři Laboma s.r.o. v Českých Budějovicích. Jména vyšetřovaných pacientů jsou z důvodu povinné mlčenlivosti utajena a nahrazena čísly.

3.1 Preanalytická fáze (laboratorní)

Laboratorní preanalytická fáze začíná příjmem biologického materiálu do laboratoře a končí vložením analytických vzorků do příslušného analyzátoru. Toto období zahrnuje následující kroky:

- Příjem a identifikaci biologického materiálu;
- Vložení identifikačních údajů do LIS;
- Označení analytického vzorku čárovým kódem;
- Příprava analytické vzorku – centrifugace;
- Vytvoření sekundárních analytických vzorků – aliquotů a jejich označení čárovým kódem;
- Roztřídění analytických vzorků pro jednotlivá cílová pracoviště;
- Vložení analytického vzorku do analyzátoru.

(Dastyh et al., 2008)

3.1.1 Příjem biologického materiálu do laboratoře

Pro příjem a prvotní zpracování biologického materiálu má většina laboratoří vyčleněné příjmové pracoviště. Za příjem biologického materiálu je odpovědná příjmová laborantka určená denním rozpisem pracovišť. Laboratorní práce na příjmovém pracovišti je velmi zodpovědná. Jde často o soubor manuálních, často stereotypních činností, které je nutné provádět vždy pečlivě a zodpovědně. Asi nejzávažnější a také nejobávanější chybou je záměna vzorků, nebo chyba při identifikaci. Obě tyto chyby mohou v konečném důsledku ohrozit pacienta.



Obr. 15 Příjmové pracoviště

(Zdroj: vlastní foto)

Biologický materiál je dopraven do laboratoře prostřednictvím svozových vozidel. Auta svozové služby jsou vybavena chladícími boxy, ve kterých je udržována a pravidelně kontrolována teplota. Řidič vozidla dopraví transportní boxy do laboratoře. V laboratoři převezmeme transportní boxy, ze kterých vyjmeme biologický materiál společně se žádankami. Transportní boxy pak vrátíme řidiči k dalšímu použití.

Vzorky biologického materiálu nejprve přiřadíme k jejich laboratorním žádankám. Poté provedeme pečlivou kontrolu shody údajů uvedených na žádance s údaji na zkumavce materiálu. Identifikační údaje pacienta na žádance a na zkumavce musí být jednoznačně shodné. Neshledáme-li shodné jméno, příjmení a rodné číslo, nemůžeme materiál dále zpracovat, neboť hrozí záměna a poškození pacientů. Velkou pozornost věnujeme laboratorní žádance. Musíme pečlivě zkontrolovat, zda obsahuje všechny potřebné údaje, které obsahovat má. Je to nutné pro úhradu vyšetření, kterou následně vyžadujeme od zdravotní pojišťovny.

Rovněž zkontrolujeme druh odběrové zkumavky a množství odebrané krve vzhledem k požadovaným vyšetřením. Pokud je odběr proveden do nesprávné zkumavky, laboratoř materiál nezpracuje a do výsledkového listu uvede poznámku „chybný odběr“. Je-li vzorku málo, vyšetření nelze provést a požádá se o nový odběr. Vizually se ujistíme, zda nedošlo k poškození zkumavek během transportu a zkontrolujeme čistotu odběrové zkumavky. Žádanka ani vnější stěna zkumavky nesmí být kontaminována biologickým materiálem, v opačném případě může být vzorek odmítnut.

3.1.1.1 Důvody pro odmítnutí biologického materiálu v laboratoři

- na žádance nebo na odběrové zkumavce nejsou uvedeny nebo jsou nečitelné údaje důležité pro identifikaci vzorku a pro styk se zdravotní pojišťovnou (číslo pojištěnce, jméno a příjmení, typ zdravotní pojišťovny, IČZ odesílajícího lékaře, základní diagnóza) a pokud není možné tyto údaje doplnit telefonickým kontaktováním ordinace lékaře;
- odběrová zkumavka není dostatečně označena nebo údaje jsou nečitelné;
- nesouhlasí-li údaje uvedené na žádance a na odběrové zkumavce (za závazné jsou vždy považovány údaje uvedené na odběrové zkumavce);

- materiál, u něž zjevně došlo k porušení zásad při odběru, transportu či uložení a je znehodnocen natolik, že jej nelze vyšetřit;
- došlo-li ke kontaminaci žádanky nebo odběrové zkumavky biologickým materiálem
- laboratoř požadovaná vyšetření neprovádí.

V případech dodání biologického materiálu bez žádanky je možné požadovaná vyšetření po telefonické domluvě s ošetřujícím lékařem vypsát žádanku náhradní a požadovaná vyšetření provést. Lékař musí v těchto případech zaslat do laboratoře dodatečnou žádanku (*Zahradníková, 2008*).

3.1.2 Vložení identifikačních údajů do laboratorního informačního systému

S neustálým rozvojem informační technologie se do většiny laboratoří zavedl tzv. laboratorní informační systém. Tento systém nám pomáhá shromáždit a zpracovat laboratorní data, vytvořit laboratorní výsledky a v tištěné podobě je předat ošetřujícímu lékaři (*Dastych, 2007*). Práce s laboratorním informačním systémem je poměrně jednoduchá a dá se jí za krátkou dobu naučit. Laboratoř Laboma s.r.o. využívá laboratorní informační systém firmy PROMED.

Po kontrole přijatého materiálu vložíme údaje ze žádanky do laboratorního informačního systému. Ten každému pacientovi přidělí laboratorní číslo a současně zaznamená datum a čas zápisu. Do systému vložíme jméno a příjmení, rodné číslo, název klinického pracoviště, číselný kód diagnózy, kód pojišťovny a identifikační číslo ordinujícího lékaře. Poté navolíme požadovaná vyšetření, která vkládáme do systému prostřednictvím zkratk názvů jednotlivých vyšetření. Je zapotřebí si uvědomit, že při ručním zadávání dat do počítače mohou vzniknout nechtěné překlepy či dokonce chyby, které musíme minimalizovat pravidelnými kontrolami všech vložených údajů.



Obr. 16 Tiskárna čárových kódů
(Zdroj: vlastní foto)

Teprve po důkladné kontrole ručně zadaných údajů vytiskneme z laboratorního informačního systému samolepící štítky s identifikací pacienta a čárovým kódem. Na štítku je kromě čárového kódu uvedeno jméno a příjmení pacienta, rodné číslo, denní pořadové číslo a druh biologického materiálu. Zkumavku s biologickým materiálem opatříme identifikačním štítkem a připravíme ji k dalšímu zpracování.

3.1.3 Příprava analytického vzorku – centrifugace

Centrifuga je jednoduché laboratorní zařízení, které slouží k oddělení látek s různou specifickou hustotou působením odstředivé síly. Základem každé centrifugy je elektromotor s možností plynulé regulace otáček. Běžné typy centrifug určené k centrifugaci krevních vzorků mají rozsah do 5 000 ptáček za minutu. Nedílnou součástí moderních centrifug je možnost nastavení počtu otáček za minutu a dobu centrifugace v minutách (Zima, 2007).

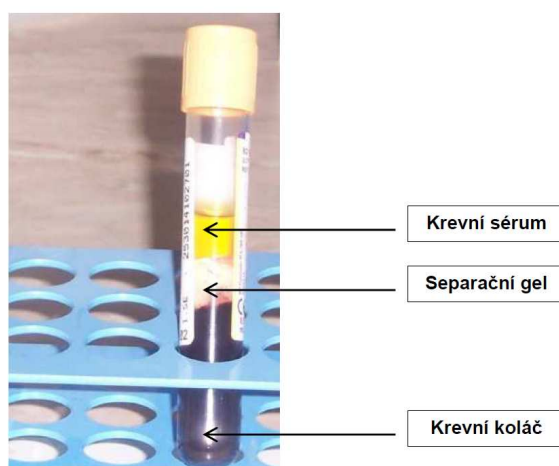


Obr. 17 Centrifuga
(Zdroj: vlastní foto)

Zkumavky s biologickým materiálem vkládáme do válcových otvorů rotoru tak, aby bylo jejich rozložení přibližně symetrické. V laboratorní praxi se běžně k vyvážení centrifugy používají obyčejné zkumavky naplněné vodou. Některé tyty centrifug dovedou provést vyvážení automaticky. Při nedostatečném vyvážení dochází k vibracím, při kterých se rotor centrifugy automaticky vypne a zabrání tak poškození centrifugovaných zkumavek i samotnému rotoru centrifugy (*Dastych et al., 2008*).

Jsou-li zkumavky v rotoru centrifugy dostatečně vyváženy, lehkým přitlačením horního krytu centrifugu uzavřeme. Při uzávěru uslyšíme cvaknutí bezpečnostního zámku, který zabraňuje otevření krytu při centrifugaci. Na digitálním displeji nastavíme počet otáček za minutu a dobu centrifugace v minutách. Krevní vzorky centrifugujeme 10 minut při 3 000 otáčkách za minutu. Po nastavení všech parametrů uvedeme centrifugu do chodu.

Po skončení centrifugace se automaticky aktivuje brzda, která urychlí zastavení pohybu rotoru. Zkumavky vyjmeme z rotoru centrifugy. Po odstředění srážlivé krve můžeme pozorovat v horní části zkumavky čiré sérum, v mezivrstvě vidíme separační gel a ve spodní části zkumavky nacházíme sraženou krev, obvykle označovanou jako krevní koláč.



Obr. 18 Zkumavka po odstředění

(Zdroj: vlastní foto)

3.1.4 Makroskopické hodnocení vzhledu séra

Po odstředění zkontrolujeme barvu a množství séra. Rozlišujeme sérum fyziologické, hemolytické, ikterické a chylózní. Do laboratorního informačního systému je nutné uvést poznámku s popisem vzhledu vzorku.

- *Fyziologické sérum* je slámově žluté, průhledné.
- *Hemolytické sérum* má růžovou až malinově červenou barvu. Vzniká na podkladě rozpadu červených krvinek, při kterém dochází nejprve k porušení buněčné membrány erytrocytu a následnému vyplavení jejich obsahu do séra. V séru se zvyšují hodnoty těch analytů, jejichž koncentrace v erytrocytech je vyšší než v séru (kupř. koncentrace draslíku je v erytrocytech 20x vyšší a aktivita enzymu laktátdehydrogenázy až 160 x vyšší než v séru). Pro většinu biochemických vyšetření je použití hemolytického séra nepřijatelné.
- *Ikterické sérum* se vyznačuje tmavě žlutým až oranžovým zabarvením, k němuž dochází při zvýšení hladiny bilirubinu v séru (hyperbilirubinémii). Zvýšená hladina bilirubinu se objevuje při onemocnění jater, obstrukci žlučových cest anebo při zvýšeném rozpadu červených krvinek.
- *Chylózní sérum* je mléčně zakalené. Bělavý zákal je způsoben nejčastěji zvýšenou koncentrací triacylglycerolů v séru. To může být způsobeno nedodržením dietních zásad před odběrem, poruchou metabolismu lipoproteinů nebo infúzí lipidů (Čermáková, Štěpánová, 2003).

3.1.5 Vytvoření sekundárních analytických vzorků – aliquotů

Primární zkumavku opatřenou čárovým kódem přiložíme k laserové čtečce, tím dojde k načtení všech požadovaných metod zapsaných v laboratorním informačním systému. Současně systém vygeneruje a vytiskne potřebný počet sekundárních štítků s čárovými kódy. Těmito štítky opatříme prázdné zkumavky, do kterých odpipetujeme část séra a vytvoří se tak sekundární vzorky (aliquoty).



Obr. 19 Aliquoty

(Zdroj: vlastní foto)

3.1.6 Vložení analytických vzorků do analyzátoru

Zkumavky s aliquoty, označené čárovým kódem, umístíme do speciálních stojánků. Stojánky vložíme do pracovní části analyzátoru Cobas Integra 800. Pokud je analyzátor ve stavu STANDBY, stiskneme tlačítko START, a tím se zahájí vlastní analýza. Na vstupu stojánku do pracovní části analyzátoru dochází k načtení identifikačního čárového kódu a následně k přenosu informace o požadovaných analýzách z laboratorního informačního systému. Další zpracování a doprava analytického vzorku je zajištěna robotizovanými prvky uvnitř analyzátoru až do přenesení použitých pomocných součástek do odpadu. Výsledek analýzy je opět automaticky přenesen do laboratorního informačního systému a následně vytisknut v podobě laboratorního výsledku.

3.2 Analytická fáze

Jde o tu část laboratorního vyšetření, která zahrnuje vlastní analytické stanovení vzorku. Je zajišťována analytickými technikami, biochemiky a zdravotními laboranty a je prováděna v souladu s postupy správné laboratorní praxe. Za nejpodstatnější je třeba zmínit nutnost vypracovaného systému vnitřní kontroly kvality a zapojení laboratoře do systému externí kontroly kvality, které by měly minimalizovat chyby analytického procesu (Dastyk et al., 2008).

3.2.1 Analyzátor Cobas Integra 800

Vlastní měření vzorků bylo provedeno na biochemickém analyzátoru Cobas Integra 800 od společnosti Roche Diagnostics (obr. 20). Jedná se o plně automatický biochemický analyzátor, který je opatřen měřicími moduly pro absorpční spektrofotometrii, fluorescenční polarizaci, turbidimetrii a potenciometrické měření iontově selektivními elektrodami (ISE). Umožňuje automatické provedení analýz výběrem z palety 72 různých biochemických metod s výkonem až 855 testů za hodinu. Nedílnou součástí analyzátoru je datová stanice, která se skládá z PC, LCD monitoru, klávesnice, myši, tiskárny a software. Bližší informace jsou dostupné na webové adrese: www.roche-diagnostics.cz.



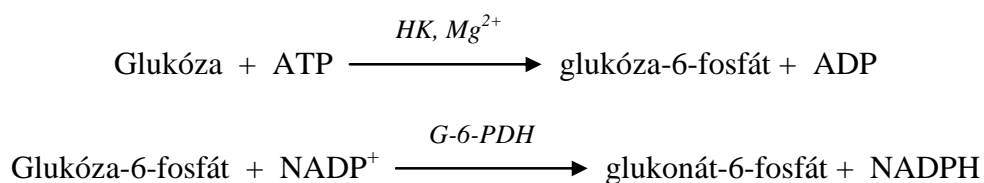
Obr. 20 Biochemický analyzátor Cobas Integra 800

(Zdroj: <http://www.elk-spb.ru/catalogue/?id=23&lev=21&view=6>)

3.2.2 Stanovení glukózy

3.2.2.1 Použití a princip testu

- Jde o in vitro test pro kvantitativní stanovení glukózy v lidském séru, plazmě, moči a mozkomíšním moku (CSF) na systémech Cobas Integra.
- Glukóza přítomná v analyzovaném vzorku je fosforylována hexokinázou (HK) za přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP) a hořčičných iontů. Vzniká glukóza-6-fosfát a adenosindifosfát (ADP). V následné reakci se glukóza-6-fosfát v přítomnosti NADP^+ oxiduje na glukonát-6-fosfát, současně dochází k redukci NADP^+ na NADPH za katalytického působení enzymu glukóza-6-fosfátdehydrogenázy. Sleduje se nárůst absorpance NADPH při 340 nm, která je přímo úměrná koncentraci glukózy v analytickém vzorku.



3.2.2.2 Preanalytické podmínky

Odběr vzorku krve ke stanovení glykémie se provádí minimálně po 8 hodinovém lačnění. Před odběrem je nutné vyloučit jakoukoliv fyzickou námahu a kouření. Pacient má být při odběru v klidové poloze (v sedě). Vzorek žilní krve se odebírá do odběrové nádoby s obsahem inhibitoru glykolýzy. Obvyklou kombinací pro získání plazmy s dostatečnou stabilitou glukózy je směs fluoridu sodného a EDTA. Krev je nutné po odběru promíchat opakovaným převrácením zkumavky. Plazma musí být oddělena od krevních elementů do 60 minut (*Janssen, Delanghe, 2010*).

3.2.2.3 Reagencie

- Reagencie jsou připraveny přímo k použití, skladují se při 2-8°C, po otevření jsou stabilní po dobu 8 týdnů.
- Reagencie R1 obsahuje: MES pufr (pH 6), ATP, Mg²⁺, NADP a konzervační prostředek.
- Reagencie R2 obsahuje: Mg²⁺, HEPES pufr (pH 8), HK (kvasinky), G6PHD (mikrob.), konzervační prostředek.

3.2.2.4 Kalibrace

- Pro analýzu byl použit kalibrátor *Calibrator for automated systems* dodávaný firmou Roche Diagnostics. Jde o lyofilizovaný kalibrační materiál připravený na bázi lidského séra se známou koncentrací glukózy pro daný princip reakce. Kalibrátor je navázán na referenční metodu ID-MS.
- Lahvičku obsahující lyofilizované kontrolní sérum opatrně otevřeme, aby nedošlo ke ztrátě lyofilizátu a nepipetujeme do ní 3 ml deionizované nebo destilované vody. Poté lahvičku zavřeme a necháme celý obsah rozpustit během 30 minut, za občasného míchaní kroužením lahvičky tak, aby se zabránilo napěnění. Takto rozpuštěný kontrolní materiál je stabilní nejméně 8 hodin při pokojové teplotě, 2 dny při 2-8°C a 1 měsíc při -20°C.
- Kalibrace je lineární, dvoubodová (prvním bodem je fyziologický roztok, druhým bodem je kalibrátor o koncentraci 10,7 mmol/l).

3.2.2.5 Kontrola kvality

- Ke kontrole kvality byly použity kontrolní materiály *Precinorm U* a *Precipath U*. Jde opět o lyofilizovaná séra připravená na bázi lidského séra, které je nutné před použitím rozpustit stejným způsobem jako kalibrační materiál. *Precinorm U* má koncentraci glukózy rovnou 5,06 mmol/l (normální hodnota) a *Precipath U* má koncentraci glukózy rovnou 13,4 mmol/l (patologická hodnota).
- Kontrolní materiál se skladuje v lednici při 2-8°C, kde je stabilní do doby vyznačené na každé lahvičce. Po rozpuštění v deionizované vodě je stabilní 2 dny při 2-8°C nebo 4 týdny při -20°C.

3.2.2.6 Referenční meze

dospělí	3,6 – 5,9 mmol/l
---------	------------------

3.2.2.7 Metrologické parametry

- Rozsah měření: 0,24 – 40 mmol/l
- Mez detekce: 0,24 mmol/l
- Výtěžnost: $\pm 10\%$
- Interference:
 - a) hemolýza – bez významných interferencí do hodnoty hemoglobinu 774 $\mu\text{mol/l}$
 - b) ikterus – bez významných interferencí do hodnoty bilirubinu 1 026 $\mu\text{mol/l}$
 - c) lipémie – bez významných interferencí do hodnoty L indexu 1 900

- **Přesnost:**

Opakovatelnost

	Průměr (mmol/l)	SD	CV (%)
Precinorm U	4,04	0,01	0,35
Precipath U	10,35	0,03	0,32

Mezilehlá přesnost

	Průměr (mmol/l)	SD	CV (%)
Vzorek A	4,80	0,13	2,63
Vzorek B	13,20	0,31	2,34

- **Kombinovaná nejistota stanovení:**

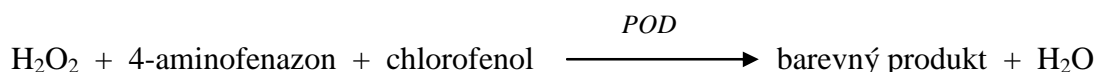
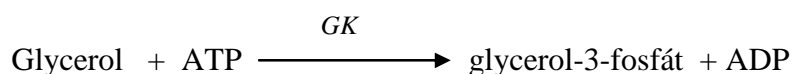
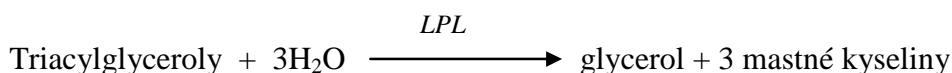
	Nejistota měření (%)	Hladina (mmol/l)
Vzorek A	6,8	4,3
Vzorek B	6,4	11,01

3.2.3 Stanovení triacylglycerolů

3.2.3.1 Použití a princip testu

- Jde o in vitro test pro kvantitativní stanovení koncentrace triglyceridů v lidském séru a plazmě na systémech Cobas Integra.
- V první fázi jsou triglyceridy enzymaticky hydrolyzovány lipoproteinovou lipázou (LPL) na glycerol a volné mastné kyseliny. Glycerol je v přítomnosti adenosintrifosfátu fosforylován na glycerol-3-fosfát. Ten je oxidován enzymem

glycerolfosfát oxidázou (GPO) na dihydroxyacetonfosfát za vzniku peroxidu vodíku. Vzniklý peroxid vodíku se stanoví tzv. Trinderovou reakcí, při které reaguje s 4-aminofenazonem a 4-chlorofenolem za katalytického působení peroxidázy (POD) a vzniká červeně zbarvený komplex, jehož absorbance je přímo úměrná množství triglyceridů v analyzovaném vzorku.



3.2.3.2 Preanalytické podmínky

Pro stanovení hladiny se odebírá nejčastěji venózní srážlivá krev, lze použít i krev odebranou do EDTA. Odběr se provádí po celonočním lačnění (12-14 hodin), zpravidla mezi 7 a 8 hodnou ránní. Pacient by měl přijímat dostatečné množství tekutin, povoleny jsou však pouze neslazené a nealkoholické nápoje (voda, minerálka, hořký čaj). Rovněž se doporučuje nekouřit. Při plánovaném odběru krve pacient nemá zásadně měnit svůj životní styl stravování, změna hmotnosti). Před odběrem je nutné, aby byl pacient alespoň 10 minut v klidu. Odběr krve se provádí vsedě bez dlouhé venostázy. Vzorky by měly být nejpozději do 2 hodin dopraveny do laboratoře, aby mohlo být včas odděleno sérum od krevních elementů (Kopáč, 2004).

3.2.3.3 Reagencie

- Reagencie jsou připraveny přímo k použití, skladují se při 2-8°C, po otevření jsou stabilní po dobu 8 týdnů.
- Reagencie R1 obsahuje: PIPES pufr (pH 6,8), Mg²⁺, 4-aminofenazon, cholát sodný, 4-chlorofenol, polyglykoether, LPL, GK, GPO, POD, ATP, konzervační prostředek.

3.2.3.4 Kalibrace

- Pro analýzu byl použit kalibrátor *Calibrator for automated systems* dodávaný firmou Roche Diagnostics. Jde o lyofilizovaný kalibrační materiál připravený na bázi lidského séra se známou koncentrací triglyceridů pro daný princip reakce. Kalibrátor je navázán na referenční metodu ID-MS.
- Lahvičku obsahující lyofilizované kontrolní sérum opatrně otevřeme, aby se zabránilo jakékoliv ztrátě lyofilizátu a nepipetujeme do ní 3 ml deionizované vody nebo destilované vody. Lahvičku pečlivě uzavřeme a necháme celý obsah rozpustit po dobu 30 minut, za občasného promíchání kroužením lahvičky tak, aby se zabránilo napěnění. Takto rozpuštěný kontrolní materiál je stabilní nejméně 8 hodin při pokojové teplotě, 2 dny při 2-8°C a 1 měsíc při -20°C.
- Kalibrace je lineární, dvoubodová (1. bod je fyziologický roztok, 2. bod je kalibrátor o koncentraci 1,48 mmol/l).

3.2.3.5 Kontrola kvality

- Ke kontrole kvality byly použity kontrolní materiály *Precinorm U* a *Precipath U*. Jde opět o lyofilizovaná séra připravená na bázi lidského séra, které je nutné před použitím rozpustit stejným způsobem jako kalibrační materiál. *Precinorm U* má koncentraci triglyceridů rovnou 1,03 mmol/l (normální hodnota) a *Precipath U* má koncentraci triglyceridů rovnou 2,04 mmol/l (patologická hodnota).
- Kontrolní materiál se skladuje v lednici při 2-8°C, kde je stabilní do doby vyznačené na každé lahvičce. Po rozpuštění v deionizované vodě nebo destilované je stabilní 2 dny při 2-8°C nebo 4 týdny při -15°C až -20°C.

3.2.3.6 Referenční meze

dospělí	< 1,7 mmol/l
---------	--------------

3.2.3.7 Metrologické parametry

- Rozsah měření: 0,1 - 10 mmol/l
- Mez detekce: 0,1 mmol/l
- Výtěžnost: $\pm 10\%$
- Interference:
 - a) hemolýza – bez významných interferencí do hodnoty hemoglobinu 0,36 mmol/l
 - b) ikterus – bez významných interferencí do hodnoty bilirubinu 86 $\mu\text{mol/l}$
 - c) kyselina askorbová – při koncentracích vyšších než 114 $\mu\text{mol/l}$ významně snižuje koncentraci triglyceridů.

- **Přesnost:**

Opakovatelnost

	Průměr (mmol/l)	SD	CV (%)
Precinorm U	1,41	0,01	0,9
Precipath U	2,40	0,02	0,8

Mezilehlá přesnost

	Průměr (mmol/l)	SD	CV (%)
Vzorek A	1,01	0,02	1,8
Vzorek B	2,01	0,04	1,9

- **Kombinovaná nejistota stanovení:**

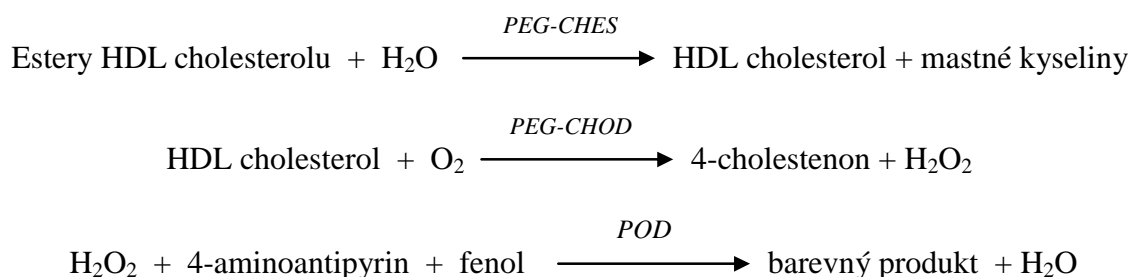
	Nejistota měření (%)	Hladina (mmol/l)
Vzorek A	4,32	0,79
Vzorek B	3,32	1,82

3.2.4 Stanovení HDL cholesterolu

3.2.4.1 Použití a princip testu

- Jde o in vitro test pro kvantitativní stanovení koncentrace HDL cholesterolu v lidském séru a plazmě na systémech Cobas Integra.
- Tento test využívá dextransulfát a polyethylglykolem (PEG) modifikované enzymy cholesterolesterázu a cholesteroxidázu. Dextransulfát vytváří v přítomnosti hořčičných iontů s LDL, VLDL a chylomikrony ve vodě rozpustné komplexy. Tím jsou tyto lipoproteinové částice chráněny vůči PEGem modifikovaným enzymům. Jelikož HDL není komplexován, podléhá v něm obsažený cholesterol enzymatickým reakcím. Estery cholesterolu obsažené v HDL částicích jsou

hydrolyzovány pomocí modifikované cholesterolesterázy (CHES) na cholesterol a volné mastné kyseliny. V dalším kroku je cholesterol oxidován v přítomnosti enzymu cholesteroxidázy (CHOD) na cholestenon a peroxid vodíku. Uvolněný cholesterol se stanoví tzv. Trinderovou reakcí, při které reaguje s 4-aminoantipyrinem a fenolem za přítomnosti enzymu peroxidázy (POD). Vzniká modře zbarvený komplex, jehož absorbance je přímo úměrná koncentraci HDL cholesterolu v analyzovaném vzorku.



3.2.4.2 Preanalytické podmínky

Pro stanovení hladiny HDL cholesterolu se odebírá srážlivá venózní krev po předchozím 12-ti hodinovém lačnění. Pacient by neměl před odběrem kouřit, pít kávu a alkoholické nápoje. Měl by však mít dostatečný příjem tekutin, povoleny jsou neslazené a nekalorické nápoje (voda, minerálka, hořký čaj). Před odběrem má být pacient alespoň 10 minut v klidu. Odběr se provádí vsedě bez dlouhé venostázy. Vzorky by měly být nejpozději do 2 hodin dopraveny do laboratoře, aby mohlo být včas odděleno sérum od krevních elementů (Kopáč, 2004).

3.2.4.3 Reagencie

- Reagencie jsou připraveny přímo k použití, skladují se při 2-8°C, po otevření jsou stabilní po dobu 12 týdnů.
- Reagencie R1 obsahuje: HEPES pufr (pH 7,4), CHES, dextransulfát, hexahydrát dusičnanu hořečnatého, HSDA, POD, konzervační prostředek.
- Reagencie R2 obsahuje: HEPES pufr (pH 7), PEG-CHES, PEG-CHOD, POD, 4-aminoantipyrin, konzervační prostředek.

3.2.4.4 Kalibrace

- Pro analýzu byl použit kalibrátor *C.f.a.s. Lipids* dodávaný firmou Roche Diagnostics. Jde o lyofilizovaný kalibrační materiál připravený na bázi lidského séra se známou koncentrací HDL cholesterolu pro daný princip reakce. Kalibrátor je navázán na referenční metodu CDC.
- Lahvičku obsahující lyofilizované kontrolní sérum opatrně otevřeme, aby nedošlo ke ztrátě lyofilizátu a nepipetujeme do ní 3 ml deionizované vody nebo destilované vody. Poté lahvičku pečlivě uzavřeme a necháme celý obsah rozpustit během 30 minut, za občasného promíchání kroužením lahvičky tak, aby se zabránilo napěnění. Takto rozpuštěný kontrolní materiál je stabilní nejméně 8 hodin při pokojové teplotě, 5 dny při 4°C a 1 měsíc při -20°C.
- Kalibrace je lineární, dvoubodová (1.bod je fyziologický roztok, 2.bod je kalibrátor o koncentraci 1,68 mmol/l).

3.2.4.5 Kontrola kvality

- Ke kontrole kvality byly použity kontrolní materiály *Precinorm L* a *Precipath HDL/LDL-C*. Jde opět o lyofilizovaná séra připravená na bázi lidského séra, které je nutné před použitím rozpustit stejným způsobem jako kalibrační materiál. *Precinorm L* má koncentraci HDL cholesterolu rovnou 1,23 mmol/l (normální hodnota) a *Precipath HDL/LDL-C* má koncentraci HDL cholesterolu rovnou 0,75 mmol/l (patologická hodnota).
- Kontrolní materiál se skladuje v lednici při 2-8°C, kde je stabilní do doby vyznačené na každé lahvičce. Po rozpuštění v deionizované vodě nebo destilované je stabilní 1 den při 25°C, 5 dní při 4°C až -20°C nebo 1 měsíc při -20°C.

3.2.4.6 Referenční meze

dospělí	1,2 – 1,6 mmol/l
---------	------------------

3.2.4.7 Metrologické parametry

- Rozsah měření: 0,08 – 3,10 mmol/l
- Mez detekce: 0,08 mmol/l
- Výtěžnost: ± 10%
- Interference:
 - a) hemolýza – bez významných interferencí do hodnoty hemoglobinu 745 µmol/l
 - b) ikterus – bez významných interferencí do hodnoty bilirubinu 1026 µmol/l
 - c) lipémie – při koncentracích triacylglycerolů nad 13,6 mmol/l se zvyšuje hodnota HDL cholesterolu
 - d) kyselina askorbová – bez významných interferencí do hodnoty 2,84 mmol/l

- **Přesnost:**

Opakovatelnost

	Průměr (mmol/l)	SD	CV (%)
Precinorm L	1,27	0,01	1,2
Precipath HDL/LDL-C	0,89	0,01	1,1

Mezilehlá přesnost

	Průměr (mmol/l)	SD	CV (%)
Vzorek A	1,19	0,03	2,5
Vzorek B	0,75	0,02	2,7

- **Kombinovaná nejistota stanovení:**

	Nejistota měření (%)	Hladina (mmol/l)
Vzorek A	5,65	1,27
Vzorek B	6,45	0,87

3.3 Postanalytická fáze

Postanalytickou fází rozumíme správné vyhodnocení výsledku vyšetření a jeho interpretaci. Zahrnuje lékařskou kontrolu a interpretaci výsledku stanovení ve vztahu k fyziologickým hodnotám a příslušné diagnóze. Laboratorní výsledky jsou k dispozici druhý den od příjmu biologického materiálu do laboratoře.

4. Výsledky

Naměřené laboratorní hodnoty glukózy, triglyceridů a HDL cholesterolu byly zpracovány do přehledných tabulek a barevných grafů v počítačovém programu Microsoft Excel 2003. Tabulku s naměřenými výsledky nebylo možné vzhledem k jejímu rozsahu zahrnout přímo do textu, proto je uvedena v příloze č. 1. Ze získaných dat byly vypočítány základní statistické parametry (aritmetický průměr, směrodatná odchylka, střední chyba průměru, medián, maximum a minimum). Poté byly koncentrace glukózy, triglyceridů a HDL cholesterolu vyhodnoceny v závislosti na pohlaví a věku pacientů. Na závěr je vyhodnocen výskyt metabolického syndromu dle věku a pohlaví pacientů. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí chí kvadrát testu v kontingenční tabulce. Hranice pro zamítnutí nulové hypotézy o neexistenci vztahu mezi srovnávanými proměnnými byla stanovena na 5 %.

4.1 Glukóza

Tabulka 1 Popisná statistika souboru dat [mmol/l]

Průměr	5,58
Směrodatná odchylka	1,30
Střední chyba průměru	0,13
Medián	5,3
Minimum	3,5
Maximum	8,6

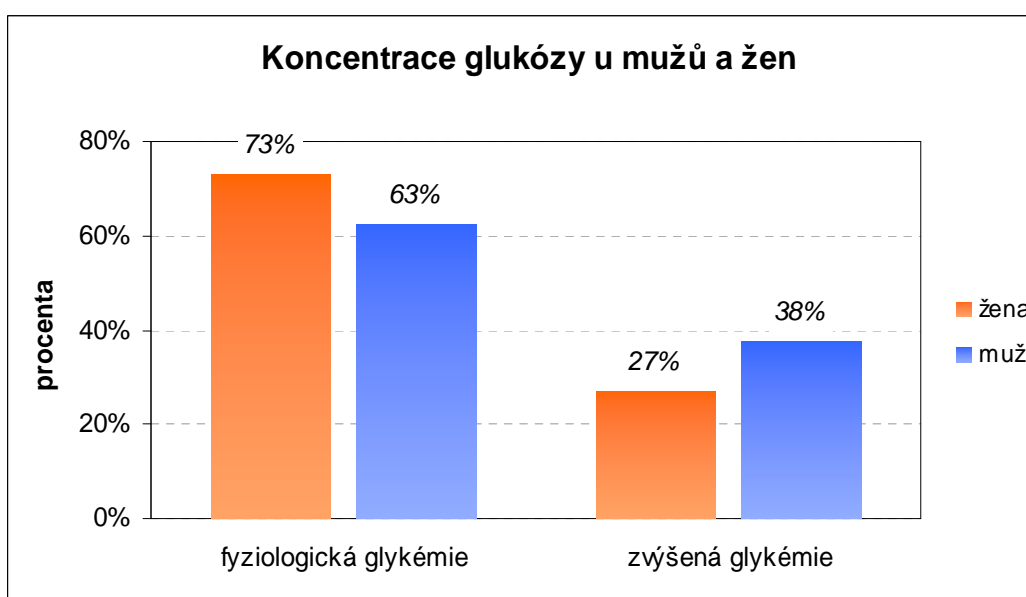
Tabulka 2 Závislost hladiny glukózy na pohlaví

Pohlaví	Glykémie		Celkem
	<i>fyziologická</i>	<i>zvýšená</i>	
žena	38	14	52
muž	30	18	48
Celkem	68	32	100

(Zdroj: Vlastní výzkum)

Tabulka č. 2 dokumentuje závislost hladiny glykémie na pohlaví. Je z ní patrné, že u 38 žen a 30 mužů byla zjištěna fyziologická hladina glykémie, zatímco u 14 žen a 18 mužů byla zjištěna zvýšená glykémie nalačno.

Graf 1 Koncentrace glukózy u mužů a žen



(Zdroj: Vlastní výzkum)

Graf č. 1 zobrazuje koncentraci glukózy u mužů a žen. Zde je patrné, že fyziologická hladina glukózy byla prokázána u 73 % žen a 63 % mužů. Zvýšené hodnoty glukózy > 5,6 mmol/l byly zjištěny u 27 % žen a 38 % mužů.

Zastoupení glykemických skupin v závislosti na pohlaví bylo testováno chí kvadrát testem. Dosažená hladina významnosti $p = 25,7\%$ znamená, že obě pohlaví jsou zastoupena stejně, zjištěné rozdíly nejsou statisticky významné.

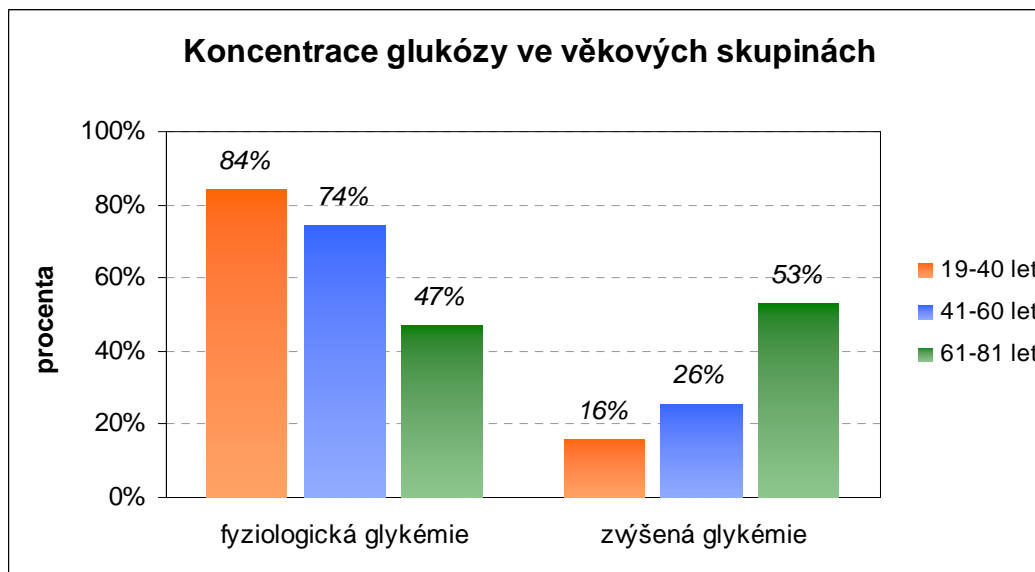
Tabulka 3 Závislost hladiny glykémie na věku

Věkové kategorie	Glykémie		Celkem
	<i>fyziologická</i>	<i>zvýšená</i>	
19-40 let	21	4	25
41-60 let	32	11	43
61-81 let	15	17	32
Celkem	68	32	100

(Zdroj: Vlastní výzkum)

Tabulka č. 3 dokumentuje závislost glykémie na věku. Je z ní patrné, že ve věkové kategorii 19-40 let byla zjištěna u 21 pacientů fyziologická hladina glykémie a u 4 pacientů byla prokázána zvýšená glykémie nalačno. Ve věkové kategorii 41-60 let byla zjištěna u 32 pacientů fyziologická hladina glykémie a u 11 pacientů byla prokázána zvýšená glykémie nalačno. Ve věkové kategorii 61-81 let byla zjištěna u 15 pacientů fyziologická hladina glykémie a u 17 pacientů byla prokázána zvýšená glykémie nalačno.

Graf 2 Koncentrace glukózy ve věkových skupinách



(Zdroj: Vlastní výzkum)

Graf č. 2 znázorňuje koncentraci glukózy ve věkových skupinách. Zde je patrné, že věkové kategorii 19-40 let byla zjištěna u 84 % pacientů fyziologická hladina glykémie a pouze u 16 % pacientů byla prokázána zvýšená glykémie nalačno. Ve věkové kategorii 41-60 let byla zjištěna fyziologická hladina glykémie u 74 % pacientů a u 26 % pacientů byla prokázána zvýšená glykémie nalačno. Ve věkové kategorii 61-81 let byla zjištěna fyziologická hladina glykémie u 47% pacientů a u 53% pacientů byla prokázána zvýšená glykémie nalačno.

Zastoupení glykemických kategorií v závislosti na věku bylo testováno chí kvadrát testem. Dosažená hladina významnosti $p = 0,6 \%$ znamená statisticky významný rozdíl v glykémii srovnávaných věkových skupin – s rostoucím věkem roste podíl zaznamenané zvýšené glykémie.

4.2 Triglyceridy

Tabulka 4 Popisná statistika souboru dat [mmol/l]

Průměr	1,77
Směrodatná odchylka	0,98
Střední chyba průměru	0,10
Medián	1,46
Minimum	0,28
Maximum	4,51

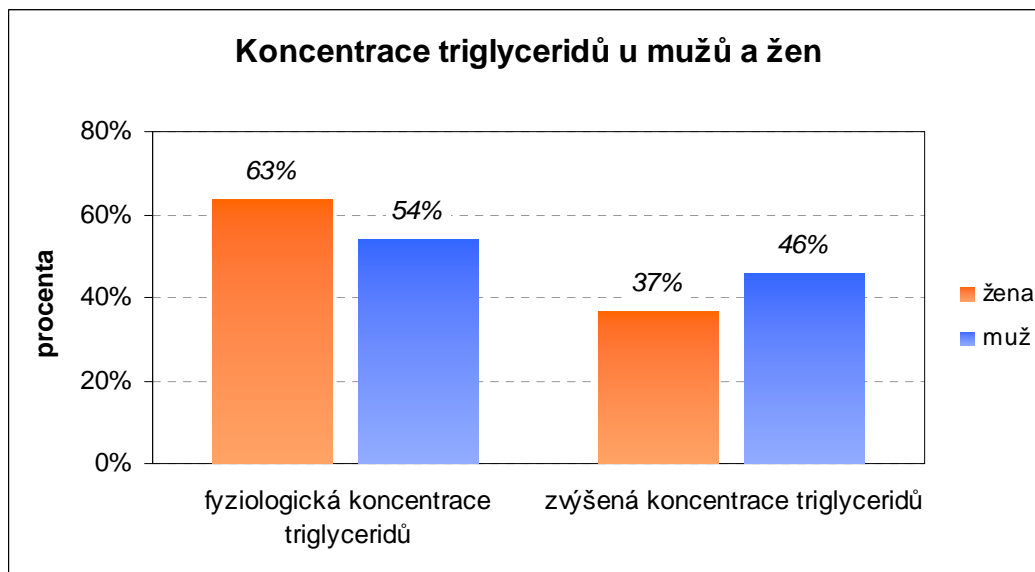
Tabulka 5 Závislost koncentrace triglyceridů na pohlaví

Pohlaví	Glykémie		Celkem
	<i>fyziologická</i>	<i>zvýšená</i>	
žena	33	19	52
muž	26	22	48
Celkem	59	41	100

(Zdroj: Vlastní výzkum)

Tabulka č. 5 dokumentuje závislost koncentrace triglyceridů na pohlaví. Je z ní patrné, že u 33 žen a 26 mužů byla zjištěna fyziologická koncentrace triglyceridů, zatímco u 19 žen a 22 mužů byla zjištěna zvýšená hladina triglyceridů.

Graf 3 Koncentrace triglyceridů u mužů a žen



(Zdroj: Vlastní výzkum)

Graf č. 3 dokumentuje koncentraci triglyceridů u mužů a u žen. Zde je patrné, že fyziologická hladina triglyceridů byla prokázána u 63 % žen a 54 % mužů. Zvýšené hodnoty triglyceridů $> 1,7$ mmol/l byly zjištěny u 37 % žen a 46 % mužů.

Zastoupení skupin fyziologické a zvýšené koncentrace triglyceridů v závislosti na pohlaví bylo testováno chí kvadrát testem. Dosažená hladina významnosti $p = 34,5$ % znamená, že obě pohlaví jsou zastoupena stejně, zjištěné rozdíly nejsou statisticky významné.

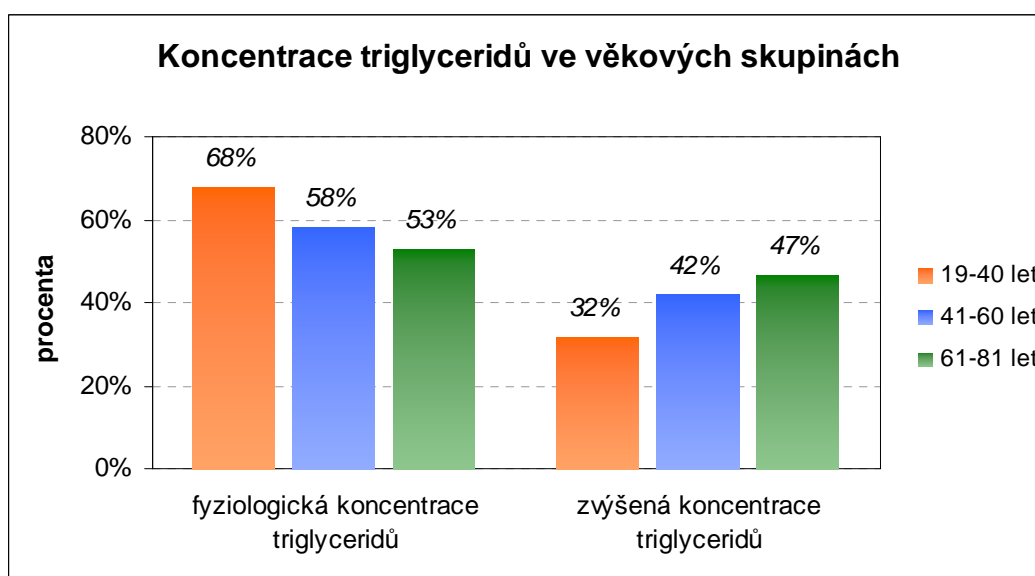
Tabulka 6 Závislost koncentrace triglyceridů na věku

Věkové kategorie	Glykémie		Celkem
	<i>fyziologická</i>	<i>zvýšená</i>	
19-40 let	17	8	25
41-60 let	25	18	43
61-81 let	17	15	32
Celkem	59	41	100

(Zdroj: Vlastní výzkum)

Tabulka č. 6 dokumentuje závislost koncentrace triglyceridů na věku. Je z ní patrné, že ve věkové kategorii 19-40 let byla zjištěna u 17 pacientů fyziologická hladina triglyceridů a pouze u 8 pacientů byla prokázána zvýšená hladina triglyceridů. Ve věkové kategorii 41-60 let byla zjištěna u 25 pacientů fyziologická koncentrace triglyceridů a u 18 pacientů byla prokázána zvýšená koncentrace triglyceridů. Ve věkové kategorii 61-81 let byla zjištěna u 17 pacientů fyziologická koncentrace triglyceridů a u 15 pacientů byla prokázána zvýšená hladina triglyceridů.

Graf 4 Koncentrace triglyceridů ve věkových skupinách



(Zdroj: Vlastní výzkum)

Graf č. 4 zobrazuje koncentraci triglyceridů ve věkových skupinách. Zde je patrné, že ve věkové kategorii 19-40 let byla zjištěna u 68 % pacientů fyziologická koncentrace triglyceridů a u 32 % pacientů byla prokázána zvýšená koncentrace triglyceridů. Ve věkové kategorii 41-60 let byla zjištěna u 58 % pacientů fyziologická hladina triglyceridů a u 42 % pacientů byla prokázána zvýšená koncentrace triglyceridů. Ve věkové kategorii 61-81 let byla zjištěna fyziologická koncentrace triglyceridů u 53 % pacientů a u 47 % pacientů byla prokázána zvýšená koncentrace triglyceridů.

Zastoupení skupin fyziologické a zvýšené koncentrace triglyceridů v závislosti na věku bylo testováno chí kvadrát testem. Dosažená hladina významnosti $p = 52\%$ znamená, že věkové kategorie jsou zastoupeny stejně, rostoucí zastoupení skupiny se zvýšenou koncentrací triglyceridů v závislosti na věku není statisticky významné.

4.3 HDL cholesterol

Tabulka 7 Popisná statistika souboru dat [mmol/l]

Průměr	1,29
Směrodatná odchylka	0,40
Střední chyba průměru	0,04
Medián	1,22
Minimum	0,74
Maximum	2,8

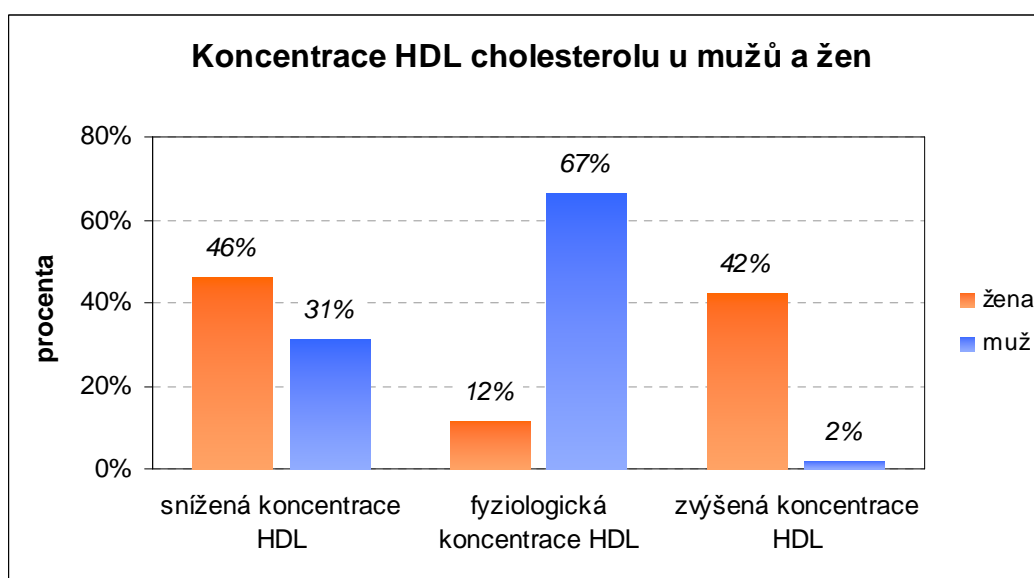
Tabulka 8 Závislost koncentrace HDL cholesterolu na pohlaví

Pohlaví	Koncentrace HDL cholesterolu			Celkem
	<i>snížená</i>	<i>fyziologická</i>	<i>zvýšená</i>	
žena	24	6	22	52
muž	15	32	1	48
Celkem	39	28	23	100

(Zdroj: Vlastní výzkum)

Tabulka č. 8 dokumentuje závislost koncentrace HDL cholesterolu na pohlaví. Je z ní patrné, že u 24 žen a 15 mužů byla zjištěna snížená hladina HDL cholesterolu, u 6 žen a 32 mužů byla zjištěna fyziologická hladina cholesterolu, u 22 žen a 1 muže byla zjištěna zvýšená koncentrace HDL cholesterolu.

Graf 5 Koncentrace HDL cholesterolu u mužů a žen



(Zdroj: Vlastní výzkum)

Graf č. 5 znázorňuje koncentraci HDL cholesterolu u mužů a u žen. Zde je patrné, že snížená koncentrace HDL cholesterolu < 1,3 mmol/l byla zjištěna u 46 % žen a snížená koncentrace HDL cholesterolu < 1 mmol/l byla prokázána u 31 % mužů. Fyziologická hladina HDL cholesterolu byla zjištěna pouze u 12 % žen a 67 % mužů. Zvýšené hodnoty HDL cholesterolu byly prokázány u 42 % žen a pouze u 2 % mužů.

Závislost koncentrace HDL cholesterolu na pohlaví byla testována chí kvadrát testem. Dosažená hladina významnosti $p < 0,1$ % svědčí o velkém rozdílu mezi porovnávanými skupinami – ženy měly mnohem častěji nefyziologickou (sníženou nebo zvýšenou) koncentraci HDL cholesterolu (dohromady 88 %), kdežto u mužů naopak převládala fyziologická koncentrace (67 %).

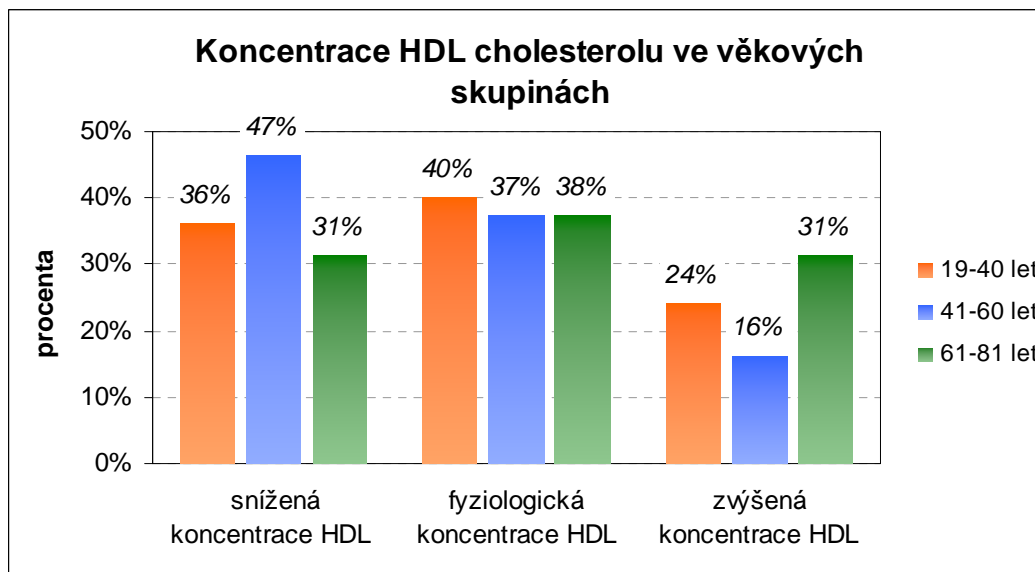
Tabulka 9 Závislost koncentrace HDL cholesterolu na pohlaví

Věkové kategorie	Koncentrace HDL cholesterolu			Celkem
	<i>snížená</i>	<i>fyziologická</i>	<i>zvýšená</i>	
19-40 let	9	10	6	25
41-60 let	20	16	7	43
61-81 let	10	12	10	32
Celkem	39	38	23	100

(Zdroj: Vlastní výzkum)

Tabulka č. 9 dokumentuje závislost koncentrace HDL cholesterolu na věku. Je z ní patrné, že věkové kategorii 19-40 let byla zjištěna hladina HDL cholesterolu u 9 pacientů snížená, u 10 pacientů fyziologická a u 6 pacientů zvýšená. Ve věkové kategorii 41-60 let byla zjištěna hladina HDL cholesterolu u 20 pacientů snížená, u 16 pacientů fyziologická a u 7 pacientů zvýšená. Ve věkové kategorii 61-81 let byla zjištěna hladina HDL cholesterolu u 10 pacientů snížená, u 12 pacientů fyziologická a u 10 pacientů zvýšená.

Graf 6 Koncentrace HDL cholesterolu ve věkových skupinách



(Zdroj: Vlastní výzkum)

Graf č. 6 zobrazuje koncentraci HDL cholesterolu ve věkových skupinách. Zde je patrné, že ve věkové kategorii 19-40 let byla zjištěna hladina HDL cholesterolu u 26 % snížená, u 40 % pacientů fyziologická a u 24 % pacientů zvýšená. Ve věkové kategorii 41-60 let byla prokázána koncentrace HDL cholesterolu u 47 % snížená, u 37 % pacientů fyziologická a u 16% zvýšená. Ve věkové kategorii 61-81 let byla zjištěna hladina HDL cholesterolu u 31 % pacientů snížená, u 38 % pacientů fyziologická a u 31 % pacientů zvýšená.

Zastoupení skupin fyziologické, snížené a zvýšené koncentrace HDL cholesterolu v závislosti na věku bylo testováno chí kvadrát testem. Dosažená hladina významnosti $p = 55,6 \%$ znamená, že koncentrace HDL cholesterolu se v závislosti na věku nemění, rozdíly nejsou statisticky významné.

4.4 Vyhodnocení laboratorních parametrů ve vztahu k metabolickému syndromu

Na tomto místě je vhodné připomenout, že lékaře vedou ke stanovení diagnózy metabolického syndromu důležité laboratorní hodnoty hladiny tuků a cukru v krvi, které se vyhodnotí společně s obvodem pasu a výškou krevního tlaku. V rámci této práce však nebylo možné vyhodnotit výskyt metabolického syndromu s přihlédnutím ke všem rizikovým faktorům, neboť údaje o výšce krevního tlaku a velikosti obvodu pasu nejsou v laboratoři dostupné. Pro účely této práce byl tedy výskyt metabolického syndromu vyhodnocen na základě přítomnosti tří rizikových faktorů, které byly známy, tj. plazmatická glukóza $\geq 5,6$ mmol/l, sérová koncentrace triglyceridů $\geq 1,7$ mmol/l a HDL cholesterol < 1 mmol/l u mužů nebo $< 1,3$ mmol/l u žen.

Tabulka 10 Zastoupení jednotlivých rizikových hodnot ve vzorku

Faktor	Počet
Zvýšená glykémie	32
Zvýšená koncentrace triglyceridů	41
Snížená koncentrace HDL cholesterolu	62
Metabolický syndrom	18

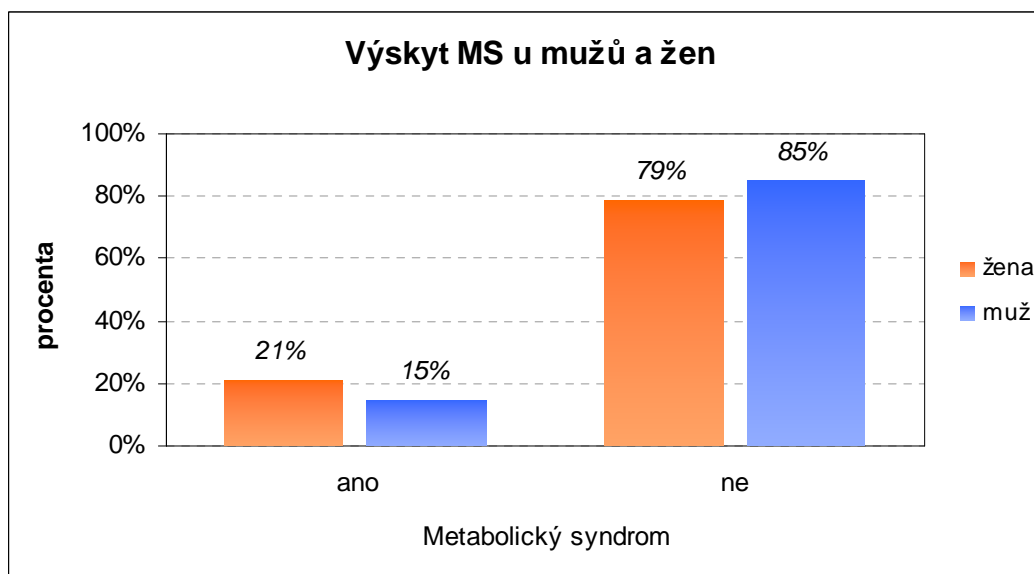
Tabulka 11 Závislost výskytu metabolického syndromu na pohlaví

Pohlaví	Metabolický syndrom		Celkem
	<i>ano</i>	<i>ne</i>	
žena	11	41	52
muž	7	41	48
Celkem	18	82	100

(Zdroj: Vlastní výzkum)

Tabulka č. 11 dokumentuje závislost výskytu metabolického syndromu na pohlaví. Je z ní patrné, že z vyšetřovaného souboru sta pacientů splňovalo kritéria pro vznik metabolického syndromu pouze 18 pacientů, z toho 11 žen a 7 mužů.

Graf 7 Výskyt metabolického syndromu u mužů a žen



(Zdroj: Vlastní výzkum)

Graf. č. 7 znázorňuje výskyt metabolického syndromu u mužů a žen. Zde je patrné, že kritéria metabolického syndromu splňovalo 21 % žen a 15 % mužů.

Výskyt metabolického syndromu v závislosti na pohlaví byl hodnocen chí kvadrát testem. Dosažená hladina významnosti $p = 39,3 \%$ znamená, že metabolický syndrom je u obou pohlaví zastoupen stejně, zjištěné rozdíly nejsou statisticky významné.

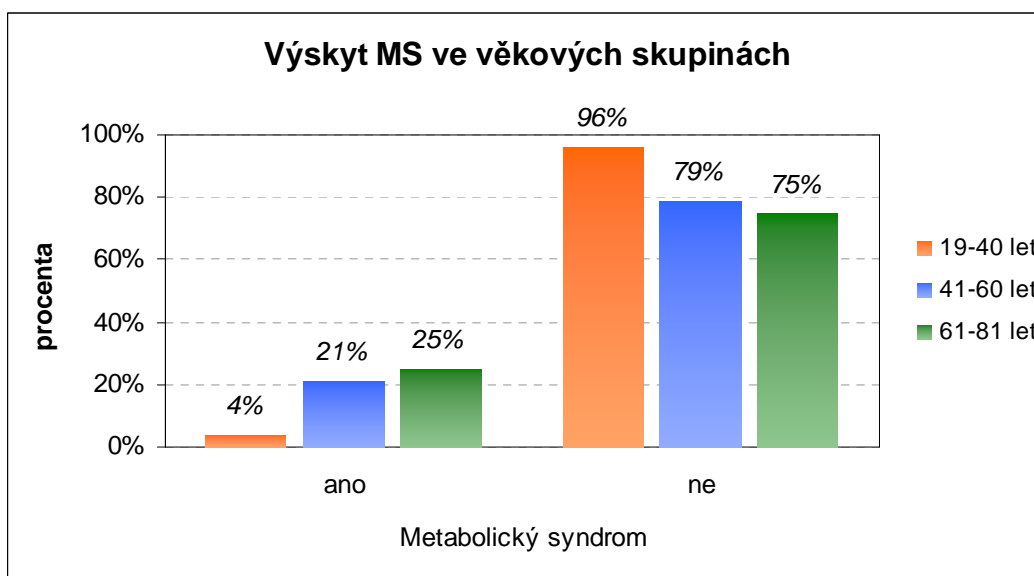
Tabulka 12 Závislost výskytu metabolického syndromu na věku

Věkové kategorie	Metabolický syndrom		Celkem
	<i>ano</i>	<i>ne</i>	
19-40 let	1	24	25
41-60 let	9	34	43
61-81 let	8	24	32
Celkem	18	82	100

(Zdroj: Vlastní výzkum)

Tabulka č. 12 dokumentuje závislost výskytu metabolického syndromu na věku. Je z ní patrné, že kritéria pro vznik metabolického syndromu splňovalo celkem 18 pacientů, z toho 1 pacient ve věkové kategorii 19-40 let, 9 pacientů ve věkové kategorii 41-60 let a 8 pacientů ve věkové kategorii 61-81 let.

Graf 8 Výskyt metabolického syndromu ve věkových skupinách



(Zdroj: Vlastní výzkum)

Graf. č. 8 zobrazuje výskyt metabolického syndromu ve věkových skupinách. Zde je patrné, že kritéria pro vznik metabolického syndromu splňovala 4 % pacientů ve věkové kategorii 19-40 let, 21 % pacientů ve věkové kategorii 41-60 let a 25 % pacientů ve věkové kategorii 61-81 let.

Výskyt metabolického syndromu v závislosti na věku byl hodnocen chí kvadrát testem. Dosažená hladina významnosti $p = 9,9 \%$ znamená, že metabolický syndrom je v porovnávaných věkových kategoriích zastoupen stejně, zjištěné rozdíly nejsou statisticky významné.

5. Diskuze

Pro diagnostiku metabolického syndromu je nutné provést jednak klinické vyšetření, které zahrnuje měření obvodu pasu a měření hodnoty krevního tlaku, jednak vyšetření laboratorní, zahrnující vyšetření glukózy, triacylglycerolů a HDL cholesterolu. Jsou-li přítomny kterékoliv tři a více rizikových faktorů z uvedených pěti, jedná se o metabolický syndrom. Podle dostupných literárních údajů se v naší populaci metabolický syndrom vyskytuje ve věkové kategorii 24 – 65 let přibližně u 32% mužů a u 24% žen (*Rosolová, 2011*). Je nutné přiznat, že v rámci této práce nebylo možné vyhodnotit výskyt metabolického syndromu s přihlédnutím ke všem rizikovým faktorům, neboť údaje o výšce krevního tlaku a velikosti obvodu pasu nejsou v laboratoři dostupné. Pro účely této práce byl tedy výskyt metabolického syndromu vyhodnocen na základě přítomnosti tří rizikových faktorů, které byly známy, tj. plazmatická glukóza $\geq 5,6$ mmol/l, sérová koncentrace triglyceridů $\geq 1,7$ mmol/l a HDL cholesterol < 1 mmol/l u mužů nebo $< 1,3$ mmol/l u žen. Laboratorním vyšetřením se prokázalo, že kritéria metabolického syndromu splňovalo 21% žen a 15% mužů. Tyto údaje jsou však nepřesné z důvodu nedostatku všech potřebných dat.

Zvýšená hladina glykémie je typickou součástí metabolického syndromu a je také jedním z jeho diagnostických kritérií. Pacienti s metabolickým syndromem mohou mít porušenou lačnou glykémii, porušenou glukózovou toleranci nebo diabetes mellitus 2. typu (*Pelikánová, 2007*). V posledních letech je velká pozornost soustředěna na význam postprandiální glykémie, která byla rozpoznána jako významný a nezávislý ukazatel kardiovaskulárního rizika. Na základě výsledků klinických studií bylo prokázáno, že zvýšení postprandiální glykémie o pouhý 1 mmol/l zdvojnásobuje relativní riziko úmrtí z kardiovaskulárních příčin. Osoby s lačnou glykémii v rozmezí normálních hodnot a postprandiální glykémii vysokou, mají stejné relativní riziko smrti jako osoby s hodnotami lačné glykémie nad 7 mmol/l a vysokou postprandiální glykémii (*Kvapil, Doležalová, 2007*).

Pro získání spolehlivého výsledku je nezbytně nutné dodržet zásady preanalytické fáze. Jednou z nejdůležitějších zásad je, aby pacient byl před odběrem minimálně 8 hodin lačný. Pacient by rovněž měl vyloučit jakoukoliv fyzickou námahu a kouření. Vzorek žilní krve se odebírá do zkumavky s protisrážlivým prostředkem a fluoridem sodným, který zde působí jako inhibitor glykolýzy. Plazma by měla být oddělena od krevních elementů do 60 minut (*Friedecký, 2006*).

Z praxe však víme, že ne všechny preanalytické podmínky jsou dodržovány tak, jak by měly. Glykémie musí být pro účely diagnostiky metabolického syndromu stanovena výlučně v krevní plazmě (*Racek et al., 2006*). Velmi častou chybou je odběr srážlivé krve bez příměsi protisrážlivého prostředku a fluoridu sodného. Glykémie tedy není stanovena v plazmě, ale v séru. Je třeba si uvědomit, že množství glukózy v neošetřeném vzorku velmi rychle klesá činností erytrocytů. V případě pozdního dodání vzorků do laboratoře můžeme naměřit falešně nízké hodnoty glukózy. Setkáme se i s případy, kdy je odběr kontaminován infúzí roztoku glukózy. V tomto případě můžeme naměřit naopak falešně vysoké hodnoty glukózy. Netřeba zdůrazňovat, že ke zkresleným výsledkům dochází při nedodržení dietních zásad před odběrem (*Jabor, Zámečník, 2005*).

Existuje poměrně široká paleta metod pro stanovení krevního cukru. Poté, co byly oxidoredukční metody opuštěny jako zdlouhavé a nepřesné, a barevné reakce jako nevhodné z toxikologického hlediska, zůstávají metodou první volby metody enzymové a elektrochemické (*Kotyza a kol., 2005*). Nelze zapomínat ani na glukometry, které jsou určeny především pro diabetiky k domácímu měření glykémie. Je však nutné mít na paměti, že výsledky naměřené glukometrem bývají pouze orientační, přesnějších výsledků se docílí měřením glykémie v laboratoři (*Lebl, Průhová a kol., 2004*).

Vyšetřením krevních lipidů rovněž přispívá k diagnostice metabolického syndromu. Typický lipidogram u metabolického syndromu představuje především zvýšená hladina triglyceridů a snížení hladiny HDL cholesterolu za současného výskytu

malých denzních LDL částic. Právě tyto částice mají velký aterogenní potenciál (Svačina, Owen, 2003). Vzhledem k tomu, že u pacientů s metabolickým syndromem jsou v krvi často přítomny atypické lipoproteinové částice, nemusí hladina HDL cholesterolu vždy správně informovat o výši kardiovaskulárního rizika a může být užitečné doplnění o stanovení koncentrace apolipoproteinu B, které odráží počet všech aterogenních lipoproteinových částic v krvi. Analytické stanovení apolipoproteinu B je ale finančně náročné ve srovnání se stanovením krevních lipidů, je proto vhodné je indikovat pouze cíleně, a to zejména u osob s hypertriglyceridemií, metabolickým syndromem a diabetes mellitus, u nichž lze předpokládat zmožení malých denzních LDL částic. Zejména u těchto osob je apolipoprotein B lepším prediktorem rizika než LDL cholesterol (Veverková et al., 2007).

V současné době přibývá důkazů o tom, že apolipoproteiny, zejména snížení koncentrace apolipoproteinu A-I a zvýšená hladina apolipoproteinu B jsou lepšími a přesnějšími markery rizika předčasného rozvoje ischemické choroby srdeční než „základní“ parametry tukového metabolismu jako celkový cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol a triglyceridy (Češka a kol., 2005). V laboratorní praxi je velmi důležité věnovat zvýšenou pozornost chylozitě séra. Bělavý zákal nemusí být vždy zapříčiněn poruchou metabolismu lipidů, ale může být způsoben chybou v preanalytické fázi, např. nedodržení dietních zásad před odběrem či po infuzích tukových emulzí (Zima, 2007).

6. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo definovat biochemické markery používané pro diagnostiku metabolického syndromu a ovládat techniku vyšetření těchto markerů včetně jejich principu stanovení.

Vyšetření glykémie a krevních tuků patří mezi rutinní vyšetření v klinické biochemii. Zásadní význam pro získání správného a spolehlivého výsledku má však preanalytická fáze. Nerespektování pravidel preanalytické fáze může vést k výsledku biochemických analýz, které neodpovídají skutečnosti a ve svém důsledku mohou vést chybné diagnóze diabetu a dyslipidémie a následně k chybnému postupu v rozhodování o léčbě těchto nemocných. Ačkoli tato práce nabízí ucelený přehled analytických metod stanovení glukózy a krevních lipidů, v laboratorní praxi se pro rutinní stanovení těchto markerů používají výhradně metody enzymové, vhodné pro běžné typy biochemických analyzátorů.

V průběhu laboratorní praxe k bakalářské práci jsem si osvojil praktické dovednosti při manipulaci s biologickým materiálem od jeho příjmu až po jeho vložení do analyzátoru. Rovněž jsem se naučil metodiku stanovení glukózy, triacylglycerolů a HDL cholesterolu, čímž jsem cíl této práce splnil.

7. Seznam použitých zdrojů

1. ADÁMKOVÁ, V. Tuky a jejich vliv na kardiovaskulární aparát. *Medicína pro praxi* [online]. 2011, roč. 8, č. 1, s. 6-9 [cit. 2012-08-06].
Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/01/02.pdf>
2. BUNEŠOVÁ, M., SKALICKÁ, A. *Pracovní postup - preanalytická fáze laboratorního vyšetření*. 1. vydání. Praha: Galen, 2008, s. 5-10; 14-22. ISBN 978-80-7262-574-1.
3. ČERMÁKOVÁ, M., ŠTĚPÁNOVÁ, I. *Klinická biochemie 1. díl*. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2003, s. 18-21. ISBN 978-80-210-4572-9.
4. ČERMÁKOVÁ, M. a kol. *Klinická biochemie 2.díl*. 1. vydání. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2005, s. 43; 47-48. ISBN 80-7013-424-0.
5. ČEŠKA, R. a kol. *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*. 1. vydání. Praha: Triton, 2005, s. 19. ISBN 80-7254-738-0.
6. DASTYCH, M., BREINEK, P. a kol. *Klinická biochemie*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2008, s. 20-21; 171; 177-179. ISBN 978-80-210-4572-9.
7. DOHNAL, L. ŠTERN, P. Stanovení glukózy glukometrem – mýty a skutečnost, Informační bulletin FONS. Pardubice: 2008, č. 3/2008, s. 36-38. ISSN 1211-7137.

8. DOLEŽALOVÁ, V. a kol. Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. 4. přeprac. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 86; 244. ISBN 80-7013-198-5.
9. FERENČÍK, M. et al. *Biochémiá*. 1.vydání. Bratislava: Slovak Academic Press, 2000, s. 807-808. ISBN 80-88908-58-2.
10. FRIEDECKÝ, B. Laboratorní diagnostika a sledování stavu diabetes mellitus. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2006, roč. 14, č. 1, s. 56-57 [cit. 2012-08-07]. Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/kbm/Bio_01_06_54-65_dop.DM.pdf
11. JABOR, A., ZÁMEČNÍK, M. *Preanalytická fáze 2005*. 1. vydání. Praha: ČSKB a SEKK, 2005, s. 10-19. ISBN 80-239-5198-X.
12. JANSSEN, K., DELANGHE, J. Importance of the pre-analytical phase in blood glucose analysis. *Acta Clinica Belgica*. 2010; 65 (5): 311-318.
13. JIRKOVSKÁ, A. a kol. *Jak (si) léčit a kontrolovat diabetes: Manuál pro edukaci diabetiků*. Praha: Svaz diabetiků ČR, 2003, s. 35-36. ISBN 80-902126-6-2.
14. KAPOUNOVÁ, G. Ošetrovatelství v intenzivní péči. 1. vydání. Praha: Grada, 2007, s. 149. ISBN 978-80-247-1830-9.
15. KLENER, P. et al. *Vnitřní lékařství*. 3. vydání. Praha : Galen, 2006, s. 1081-1084. ISBN 80-7262-430-X
16. KOLÁŘ, J. et al. *Kardiologie pro sestry intenzivní péče*. 4.vydání. Praha: Galen, 2009, s. 114-115. ISBN 978-80-7262-604-5.

17. KOPÁČ, J. *Lékařská laboratorní diagnostika*. Turnov: Lékařská laboratoř, 2004, s. 276-278.
18. KOTYZA, J. et al. Úvod do klinické biochemie a enzymologie pro studující lékařství. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2007, s. 23-24. ISBN 978-80-246-1350-5.
19. KVAPIL, M., DOLEŽALOVÁ, L. Léčba inzulinem ve vyšším věku. *Medicína pro praxi* [online]. 2007, roč. 4, č. 12, s. 497 [cit. 2012-08-08].
Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/12/03.pdf>
20. LEBL, J., PRŮHOVÁ, Š. a kol. *Abeceda diabetu*. 2.vydání. Praha: Maxdorf, 2004, s. 36-37. ISBN 80-7345-022-4.
21. LEVKOVÁ, T. *Cvičení z klinické biochemie I*. Plzeň: Střední zdravotnická škola a Vyšší zdravotnická škola v Plzni, 2005, s. 12-13; 50-51.
22. LEVKOVÁ, T. *Cvičení z klinické biochemie II*. Plzeň: Střední zdravotnická škola a Vyšší zdravotnická škola v Plzni, 2005, s. 9; 13; 16.
23. MARSHALL, W., BANGERT, S. *Clinical chemistry*. 6. vydání. Edinburgh: Mosby, 2008, s. 271-272. ISBN 978-0-7234-3455-9.
24. MASOPUST, J. *Klinická biochemie - požadování a hodnocení biochemických vyšetření I. část*. Praha : Karolinum, 1998. s. 63-66. ISBN 80-7184-648-1.
25. MIKŠOVÁ, Z., FROŇKOVÁ, M., ZAJÍČKOVÁ, M. *Kapitoly z ošetrovatelské péče II*. 1. vydání. Praha : Grada, 2006, s. 16-17. ISBN 80-247-1443-4.
26. MURRAY, R.K. et al. *Harperova biochemie*. 4. vydání. Praha: H & H, 2002, s. 283. ISBN 80-7319-013-3.

27. MUSIL, J. *Molekulové základy klinické biochemie*. 1. vydání. Praha: Grada, 1994, s. 30-31. ISBN 80-7169-056-2.
28. PELIKÁNOVÁ, T. Metabolický syndrom a diabetes mellitus. *Postgraduální medicína*. 2007, č. 8 , s. 32-41.
29. PERUŠIČOVÁ, J. et al. *Diabetes mellitus 2. typu*. 1. vydání. Praha: Galén, 1996, s. 28-29. ISBN 80-85824-33-7.
30. PROKEŠ, J. et al. *Chemické principy metod klinické biochemie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 1998, s. 36-37. ISBN 80-7184-449-7.
31. RACEK, J. et al. *Klinická biochemie*. 2. vydání. Praha: Galen, 2006. s. 23-29; 164; 166; 281-282. ISBN 80-7262-324-9.
32. Roche Diagnostics [online]. 2011 [cit. 2012-08-06]. Glucose HK Gen.3.
Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/04404483pi.pdf>
33. Roche Diagnostics [online]. 2008 [cit. 2012-08-06] HDL – cholesterol.
Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/04399803pi.pdf>
34. Roche Diagnostics [online]. 2010 [cit. 2012-08-06]. Triglycerides.
Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/20767107pi.pdf>
35. ROSLOVÁ, H. Metabolický syndrom a jeho význam v primární prevenci nemocí s častým výskytem v populaci. *Cor Vasa* [online]. 2011, roč. 53, č. 4-5, s. 249-252 [cit. 2012-08-08]. Dostupné z: http://www.e-coretvasa.cz/casopis/data_view?id=3998
36. ROZSYPALOVÁ, M., HALADOVÁ, E., ŠAFRÁNKOVÁ, A. *Ošetrovatelství II*. 1. vydání. Praha : Informatorium, 2002, s. 126-130. ISBN 80-86073-97-1.

37. RYBKA, J. *Diabetes mellitus - komplikace a přidružená onemocnění: diagnostické a léčebné postupy*. 1. vydání. Praha: Grada, 2007, s. 15. ISBN 978-80-247-1671.
38. SCHNEIDERKA, P. a kol. *Stanovení analytů v klinické biochemii: praktická cvičení pro studenty 1. LFUK a FPBT VŠCHT*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 1998, s. 120-122. ISBN 80-7184-761-5.
39. SVAČINA, Š., OWEN, K. *Syndrom inzulínové rezistence*. 1. vydání. Praha: Triton, 2003, s. 56-57. ISBN 80-7254-353-9.
40. ŠAFRÁNKOVÁ, A., NEJEDLÁ, M. *Interní ošetřovatelství II*. 1. vydání. Praha: Grada, 2006, s. 65-66. ISBN 80-247-1148-6.
41. ŠAMÁNKOVÁ, M. et al. *Základy ošetřovatelství*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2006, s. 162-169. ISBN 80-246-1091-4.
42. ŠTERN, P. a kol. *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, s. 183-184; 171. ISBN 80-246-1025-6.
43. TROJAN, S., SCHREIBER, M. *Atlas biologie člověka*. 2.vyd. Praha: Scientia, 2007, s. 32. ISBN 978-80-86960-11-1.
44. TROJAN, S. a kol. *Lékařská fyziologie*. 3. vydání. Praha: Grada, 1999. s. 280-281. ISBN 80-7169-788-5.
45. VEVERKOVÁ, H. Doporučení pro diagnostiku a léčbu dyslipidemií v dospělosti, vypracované výborem České společnosti pro aterosklerózu. *Cor Vasa*. 2007, roč. 49, č. 3, s. 73-86.

46. ZAHRADNÍKOVÁ, H. Příručka pro odběr primárních vzorků. Verze 03. České Budějovice: Laboma, 2008, s. 5-8.
47. ZIMA, T. Zásady přípravy pacienta k odběru a preanalytická část laboratorního vyšetření. *Medicína pro praxi* [online]. 2008, roč. 5, č. 9, s. 335-338 [cit. 2012-08-08]. Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2008/09/14.pdf>
48. ZIMA, T. *Laboratorní diagnostika*. 2. vydání : Galen, 2007, s. 1; 141-142; 782. ISBN 978-80-7262-372-3.

Použité obrázky (převzaté z internetu) :

49. Obrázek lipoproteinové částice: <http://waroninsulin.com/nutrition/what-is-cholesterol>
50. Obrázky popisující odběr krve: <http://www.vacurette.com>
51. Obrázek glukometru: <http://www.med-service-spb.ru/kat/omron/>
52. Obrázek Cobas Integra 800: <http://www.elk-spb.ru/catalogue/?id=23&lev=21&view=6>

8. Klíčová slova

Metabolický syndrom

Biochemické vyšetření

Glukóza

Krevní lipidy

Preanalytická fáze

Principy biochemických metod

9. Přílohy

Příloha č. 1 Tabulka naměřených výsledků [mmol/l]

Vzorek č.	glukóza	triglyceridy	HDL cholesterol
1.	5,3	1,01	2,09
2.	6,1	3,07	1,31
3.	4,3	1,49	1,05
4.	5,4	0,92	0,9
5.	8,1	3,66	0,88
6.	3,6	0,78	1,57
7.	4,4	3,51	1,01
8.	5,5	3,62	1
9.	4,3	0,48	1,75
10.	4,9	1,4	1,42
11.	6,5	2,69	0,91
12.	5	1,33	1,01
13.	5,3	4,51	0,74
14.	8,4	2,15	1,13
15.	5,3	0,86	1,87
16.	6,1	1,49	1
17.	4	0,65	1,84
18.	4,8	0,97	1,82
19.	8,3	1,58	1,4
20.	5	1,26	1,81
21.	3,5	2,73	0,8
22.	4,4	0,6	1,96
23.	4,1	0,72	1,49
24.	4,9	0,28	2,8
25.	4,9	0,66	1,57
26.	4,2	1,09	1,92
27.	5	0,81	1,45
28.	5,2	1,9	1,28
29.	5,3	2,92	1,4
30.	5,4	1,98	0,94

31.	4	1,7	1,56
32.	4	0,89	1,99
33.	4,5	0,74	1,06
34.	7,3	1,14	1,06
35.	7,1	1,4	1,23
36.	5,6	0,97	1,22
37.	4,5	1,32	1,75
38.	5,4	1,76	1,51
39.	5,4	0,97	1,31
40.	5,3	0,87	1,51
41.	6,7	2,01	1,08
42.	8,1	4,35	0,93
43.	4,8	0,87	1,31
44.	5,6	1,1	1,3
45.	4,5	0,98	0,85
46.	7,4	2,75	0,94
47.	4,9	3,46	0,84
48.	4,1	2,13	1
49.	6,8	3,85	0,76
50.	4,9	1,43	1,77
51.	3,6	0,79	1,39
52.	4,1	1,26	0,96
53.	7,3	2,54	0,94
54.	5,1	1,06	1,64
55.	5,2	1,18	1,03
56.	3,7	0,76	1,45
57.	5,5	1,47	2,14
58.	4,5	1,39	1,79
59.	4,6	1,49	1,29
60.	5	1,41	1,77
61.	7,1	2,26	0,92
62.	5,2	1,14	1,28
63.	7	1,1	1,4
64.	8,6	2,83	0,97
65.	4,9	1,19	1,77
66.	5,7	1,32	1,23

67.	5	1,1	1,63
68.	5,2	0,81	1,37
69.	7,7	3,64	0,82
70.	4,6	1,83	1,21
71.	4,8	0,38	1,22
72.	6	1,02	1,19
73.	8,5	3,31	0,81
74.	6,7	2,24	0,93
75.	4,1	0,82	0,91
76.	5,3	1,33	1,68
77.	4,8	3,03	1,22
78.	5,6	1,8	1,18
79.	4,9	2,43	1,16
80.	5,9	3,19	1,33
81.	6,2	1,31	1,83
82.	7,5	3,29	0,85
83.	5,6	1,51	1,06
84.	5,2	2,22	0,82
85.	5,3	1,22	0,99
86.	5,3	1,74	0,96
87.	7,9	2,75	0,9
88.	7,3	2,17	1,07
89.	8,2	2,89	0,84
90.	6	0,99	1,64
91.	5,4	2,68	0,82
92.	5,1	1,5	2,3
93.	8	3,5	0,89
94.	4,5	1,45	1,38
95.	7,5	2	0,98
96.	5,5	1,1	1,93
97.	4,6	1,55	1,24
98.	6	1,71	1,15
99.	3,9	2,03	1,1
100.	8	3,45	0,87

