

ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE 1. LF UK

Metabolismus vápníku a fosforu

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství

Lenka Fialová, Martin Vejražka



2009/2010

Obsah

1. Kostní tkáň	3
2. Vápník	3
2.1. Homeostáza vápníku	3
2.2. Vápník v séru	5
2.3. Vápník v moči	6
2.4. Metody stanovení vápníku v séru a v moči	7
3. Fosfor	7
3.1. Homeostáza fosforu	7
3.2. Fosfor v séru	8
3.3. Fosfor v moči	9
3.4. Metody stanovení fosforu v séru	10
4. Biochemické ukazatele kostní přestavby	11
4.1. Základní charakteristika	11
4.2. Ukazatelé novotvorby kostí	11
4.3. Ukazatele kostní resorpce	14
5. Vybraná metabolická onemocnění kostí	16
5.1. Osteoporóza	16
5.2. Osteomalacie a rachitis	16
5.3. Pagetova kostní choroba	17

1. Kostní tkáň

Kost slouží jako mechanická opora a ochrana měkkých orgánů, umožňuje pohyb, je sídlem hemopoetické dřeně a je zásobárnou kalcia, fosforu a magnesia.

Kost je tvořena z 1/3 *bílkovinnou matrix* a ze 2/3 *minerálem*.

- Hlavní složkou kostní matrix je [kolagen typu 1](#) (90 %), minoritními složkami jsou další bílkoviny - [osteokalcin](#), [osteonektin](#), [osteopontin](#) a další (10 %).
- Kostní minerál je tvořen malými krystalky [hydroxyapatitu](#) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Nevyskytuje se zcela v čisté formě, nýbrž obsahuje též další složky (např. uhličitán vápenatý, fluorid vápenatý, fosforečnan hořečnatý).

Metabolickou aktivitu kostí zajišťují kostní buňky. Jsou to *osteoblasty*, které tvoří *osteoid* čili *kostní matrix*, do níž se ukládají minerální soli. Dalším buněčným typem jsou [osteoklasty](#), jejichž hlavní funkcí je kostní resorpce, a *osteocyty*, které jemně regulují kostní resorpci a tím doplňují funkci osteoblastů.

V kosti probíhá celoživotní stálá přestavba - [remodelace](#), která spočívá v *osteoklastické resorpci* a následné *osteoblastické kostní tvorbě*. Při resorpci kostí se pomocí osteoklastů rozpouštějí minerální složky a odbourává se kostní matrix. Činnost osteoblastů spočívá v intracelulární syntéze prekursorů složek kostní matrix. Funkční spřažení osteoresorpce a novotvorby zajišťuje obnovu kostí.

Metabolismus kostí je úzce svázán s metabolismem kalcia a fosforu.

2. Vápník

2.1. Homeostáza vápníku

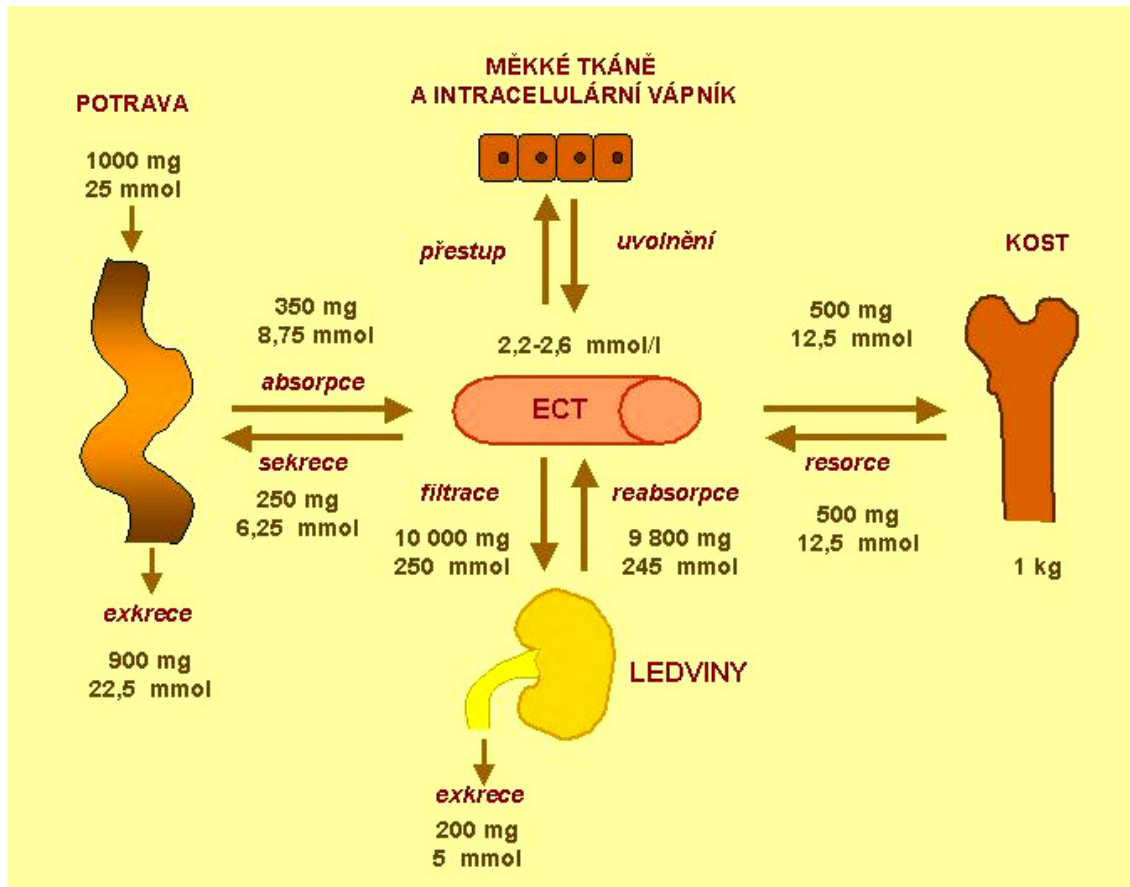
V lidském těle je obsaženo zhruba 1 000 g vápníku. Většina z tohoto množství (98 – 99 %) je zabudována v tvrdých tkáních - kostech a zubech, zbytek je lokalizován extraoseálně, a to většinou extracelulárně. Z tvrdých kalcifikovaných tkání se vápník uvolňuje podle potřeb organismu.

Velmi malé množství se nachází v *intracelulární tekutině*. Buněčné kalcium je obsaženo z 55 % v endoplazmatickém retikulu, zbytek v buněčných organelách. Cytoplazmatická koncentrace Ca^{2+} (10^{-7} mol/l) je řádově nižší než koncentrace v plazmě (10^{-3} mol/l). Na udržení vysokého koncentračního gradientu mezi extracelulární a intracelulární tekutinou se podílí řada membránových transportních mechanismů. Zvýšení Ca^{2+} v cytosolu slouží jako signál pro řadu buněčných procesů (např. svalová kontrakce, přenos nervového vzruchu, sekreční mechanismy, dělení buňky).

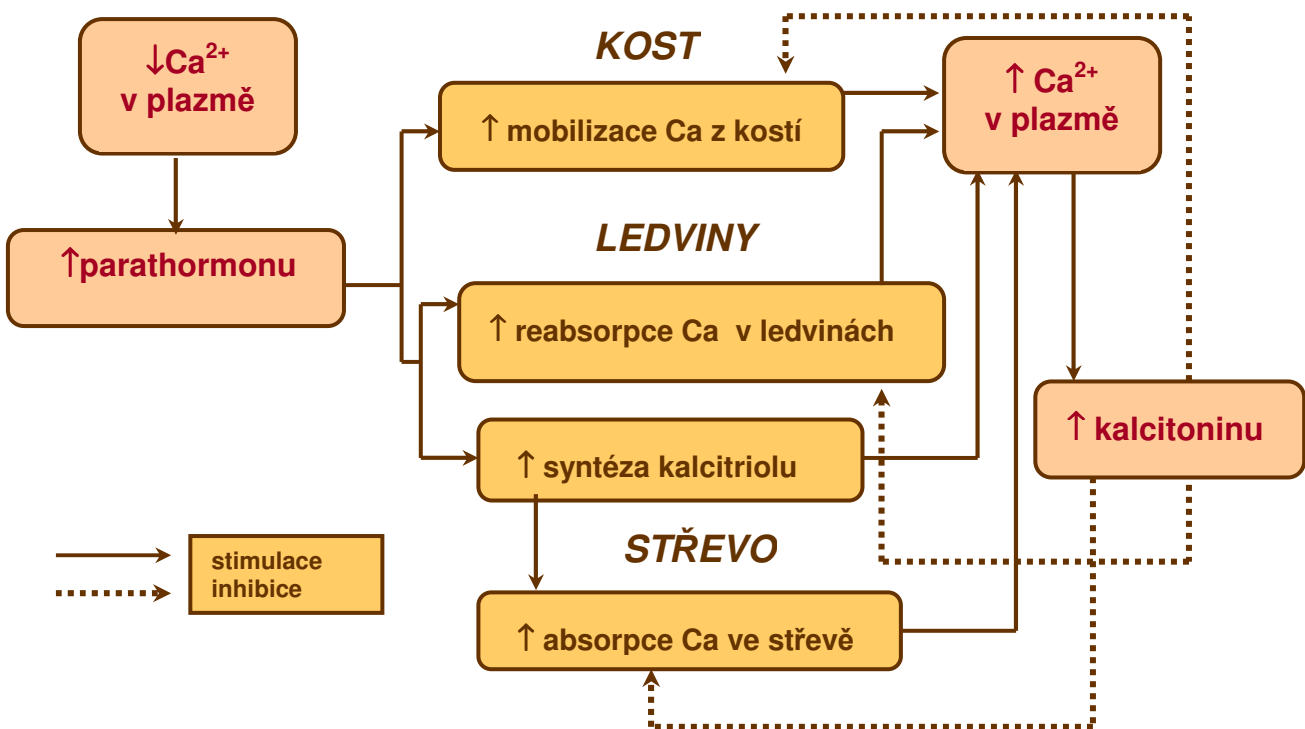
Denní příjem kalcia potravou kolísá kolem 1,0 g denně; v období zvýšené potřeby (růst, gravidita, laktace) může být až 1,5 g. Za fyziologického stavu se ve střevě vstřebává asi 25 – 40 % přijatého vápníku. Z extracelulární tekutiny přechází kalcium hlavně do kostí, kde je podstatnou součástí kostního minerálu. Výměna mezi kostní tkání a extracelulární tekutinou pomáhá vyrovnávat kalcemii. Na vylučování vápníku se podílí střevo (cca 80 %) a ledviny (cca 20 %)(obr. 1). Stolicí odchází především vápník, který se ve střevě neresorboval. Vylučování ledvinami je rozhodujícím mechanismem, který ovlivňuje bilanci kalcia. U dospělých je normálně příjem a vylučování kalcia v rovnováze. Pro období dětství a dospívání je charakteristická pozitivní bilance vápníku. Ve stáří a u žen po menopauze se setkáváme s negativní bilancí.

Hladina vápníku v krvi je regulována [parathormonem](#), [1,25-dihydroxycholecalciferolem](#) ([kalcitriolem](#)) a [kalcitoninem](#) (obr. 2).

Obr. 1 Denní bilance vápníku



Obr. 2 Regulace kalciové homeostázy



2.2. Vápník v séru

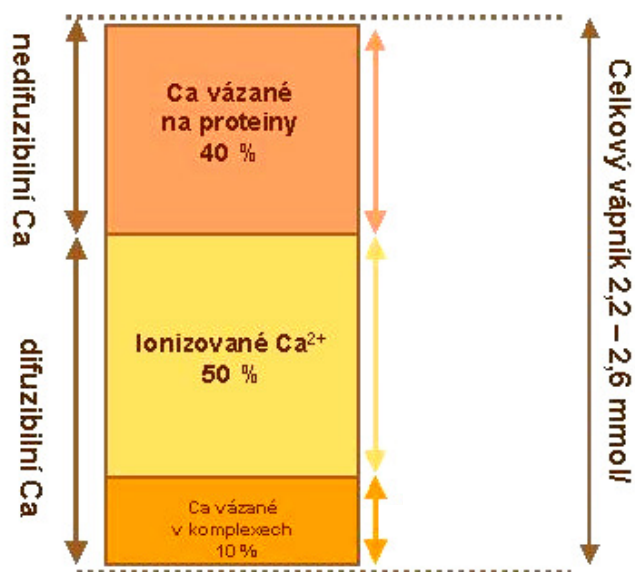
Stanovení koncentrace vápníku v séru je základním vyšetřením pro hodnocení homeostázy vápníku.

Celkový vápník v séru existuje v několika formách (obr. 3):

- 60 % kalcia je **difuzibilní** – tato forma je filtrována ledvinnými glomeruly
 - 50 % vápníku je **volné** neboli **ionizované kalcium** (označuje se Ca^{2+}) a představuje vlastní biologicky **aktivní formu**;
 - 10% vápníku se vyskytuje v **nízkomolekulárních komplexech** s citráty, fosfáty a hydrogenuhličitanu;
- 40 % kalcia je vázáno s plazmatickým bílkovinami (albumin - 90%, globuliny - 10 %). Představuje **nedifuzibilní formu**, která neprochází ledvinnými glomeruly. Vápník vázaný na proteiny není biologicky aktivní, ale představuje **rychle dostupnou rezervu**, ze které se při hypokalcemii může snadno uvolnit.

Při hypoalbuminemii klesá frakce vázaná na albumin. Pokles plazmatického albuminu o 10 g/l je doprovázen snížením celkového kalcia o 0,2 mmol/l, aniž by se změnila koncentrace ionizovaného vápníku. Naopak hyperproteinemie (např. při maligním myelomu) může vést k velkému vzestupu celkové kalcemie, opět beze změny koncentrace ionizovaného vápníku. Z tohoto důvodu je nutné posuzovat oba parametry současně. Množství Ca^{2+} je závislé na pH, klesá při alkalóze a stoupá při acidóze, protože se snižuje schopnost albuminu vázat vápník v důsledku soutěže mezi Ca^{2+} a H^+ o vazebná místa na albuminu.

Obr. 3 Formy vápníku v séru



Referenční hodnoty:

Koncentrace celkového kalcia v séru (S-kalcium):

Normální **koncentrace celkového kalcia v séru** je udržována v úzkém rozmezí **2,2 - 2,6 mmol/l**. Za horní mez kalcemie slučitelné se životem se považuje hodnota 4 - 5 mmol/l. Smrt nastává při hyperkalcemii zástavou srdce. Za dolní hranici ještě slučitelnou se životem se považuje hodnota 1 mmol/l. Těžká hypokalcemie může vést ke **křečím (tetanii)**.

Ionizované kalcium: **1,1 – 1,3 mmol/l**

Některé příčiny zvýšených a snížených koncentrací kalcia v séru jsou uvedeny v tabulce 1 a 2.

Tab. 1 Některé příčiny hyperkalcemie

Příčina	Mechanismus
Nádory příštítných tělísek – primární hyperparatyreóza	zvýšené hladiny parathormonu
Některé maligní nádory a metastázy do kostí	aktivace osteoklastů - převaha resorpce kostního minerálu
Hyperproteinemie	zvýšení neionizovaného vápníku
Předávkování vitamínem D	zvýšená střevní absorpce kalcia

Tab. 2 Některé příčiny hypokalcemie

Příčina	Mechanismus
Odstranění nebo poškození příštítných tělísek – hypoparatyreóza	snížené hladiny parathormonu
Gastrointestinální onemocnění	porucha absorpce vápníku ve střevě
Hypovitaminóza vitamínu D <ul style="list-style-type: none"> • porucha absorpce vitamínu D • nedostatečný přívod vitamínu D v potravě • nedostatečná přeměna vitamínu D na aktivní metabolity v důsledku např. onemocnění ledvin a jater 	snížení absorpce vápníku ve střevě
Porucha tubulární resorpce vápníku v ledvinách	zvýšené ztráty vápníku ledvinami
Nadměrný přívod fosfátů	kompenzační pokles kalcia

2.3. Vápník v moči

Difuzibilní Ca se v glomerulech ledvin přefiltruje do primární moči, v ledvinných tubulech se z 98 – 99 % reabsorbuje a zbytek se vylučuje močí.

Množství vápníku v moči (kalciurie) závisí:

- na obsahu vápníku v potravě a jeho resorpci ve střevě;
- na stupni osteoresorpce;
- na funkci ledvinných tubulů.

Vápník v moči můžeme zjišťovat v moči sbírané 24 hodin, jejíž objem změříme. Ve vzorku moči z celodenního sběru stanovíme koncentraci vápníku. Na základě těchto údajů vypočteme množství vyloučeného kalcia močí a vyjádříme v mmol/24 hodin – **ztráty Ca močí/24 hodin (dU-kalcium)**.

$$\text{dU-kalcium (mmol/24 h)} = \text{U-kalcium (mmol/l)} \times \text{objem moči (l/24 h)}$$

Výsledek je závislý na přesném sběru moči, proto se současně s vápníkem stanovuje v moči i kreatinin.

Hyperkalciurie se zjišťuje u 50 % nemocných s **uroliúazou**.

Referenční hodnoty:

Ztráty kalcia močí za 24 h (dU-kalcium): **2,5 - 7,5 mmol/24 hodin.**

2.4. Metody stanovení vápníku v séru a v moči

Referenční metodou pro stanovení *celkového kalcia* je [atomová absorpční spektrofotometrie](#). Pro rutinní stanovení jsou doporučovány metody založené na *spektrofotometrickém měření barevných komplexů*, které vznikají reakcí komplexotvorných látek s kalcie. Jako komplexotvorné látky se používá [o-kresolftalexon](#), který v alkalickém prostředí s vápenatými ionty poskytuje fialově zbarvený komplex, jehož intenzita zbarvení je úměrná koncentraci vápenatých iontů. Jiným používaným komplexotvorným činidlem je metalochromogen [arsenaso III](#). Stanovení celkového vápníku v krvi patří mezi metody často zatížené poměrně velkou chybou měření. To je dáno tím, že komplexotvorné činidlo použité pro měření nevyváže z krve veškerý vápník – soutěží o něj s plasmatickými bílkovinami a ostatními chelátory vápníku v krvi. Výraznější odchylky ve složení krve (např. těžší dysproteinemie) může proto vést k falešně nižším či naopak vyšším hodnotám.

Volné (ionizované) kalcium můžeme stanovit [potenciometricky pomocí iontově selektivních elektrod](#). Výhodou této techniky je její rychlost. Podstatná je rovněž skutečnost, že nás informuje o koncentraci biologicky aktivní formy kalcia bez ohledu na další vlivy, které mění koncentraci celkového vápníku (např. těžká hypoproteinemie, výrazná porucha acidobazické rovnováhy apod.). Obtíže naopak přináší nutnost zpracovávat zcela čerstvou krev – pokud vzorek není okamžitě zpracován, rychle se mění jeho pH, což míru ionizace vápníku rychle mění.

3. Fosfor**3.1. Homeostáza fosforu**

Fosfor je důležitou *strukturální součástí buněk* (nukleové kyseliny, fosfolipidy) a *kostní tkáň* (hydroxyapatit), významně se uplatňuje při *uchování energie* ve formě makroergních sloučenin (ATP, kreatinfosfát), plní funkci *při regulaci enzymové aktivity* (fosforylace, defosforylace enzymů) a v krvi a v moči se ve formě hydrogenfosforečnanů a dihydrogenfosforečnanů uplatňuje jako *pufr*.

Člověk denně ve stravě přijímá zhruba 1000 mg fosforu. V tenkém střevě se z dietních zdrojů resorbuje asi 70 – 80 %. Absorpce fosforu je proporcionální jeho obsahu ve potravě, částečně je regulována kalcitriolem. Kromě absorpce probíhá ve střevě i sekrece fosforu (kolem 100 mg denně). Větší podíl fosforu je vylučován ledvinami (viz níže) a množství fosforu vyloučeného ledvinami je pod kontrolou parathormonu, které regulují homeostázu fosforu (obr. 4).

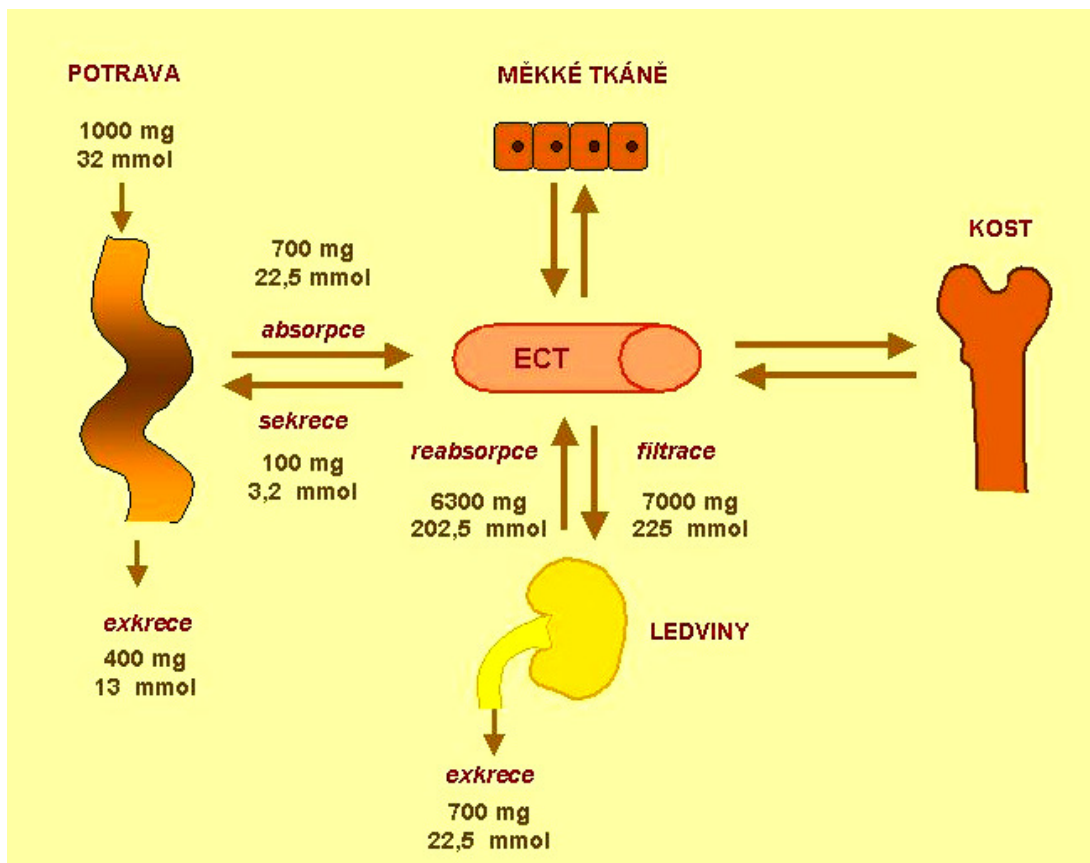
V těle dospělého člověka je obsaženo přibližně 700 g fosforu.

Fosfor se nachází:

- v kostech (cca 80 %), kde je součástí hydroxyapatitu;
- ve svalech a viscerálních orgánech (cca 10 – 20 %);
- v extracelulární tekutině (cca 1,0 %).

Intracelulární fosfor je převážně ve formě organických esterů kyseliny fosforečné (meziproducty v metabolismu sacharidů, lipidů), včetně ATP, 2,3-difosfoglycerátu a cAMP. Fosfáty jsou nejzastoupenějšími intracelulárními anionty. *Extracelulární fosfor* se vyskytuje hlavně v anorganické podobě. Mezi extracelulárním a intracelulárním prostorem probíhá výměna fosfátů, která může ovlivňovat jejich sérové koncentrace (viz níže). Do intracelulárního prostoru se fosfáty přesouvají zejména při jejich zapojení do metabolismu glukosy, při němž vznikají různé estery s glukosou. Alkalóza rovněž podporuje vstup fosfátů do buňky.

Obr. 4 Denní bilance fosforu



3.2. Fosfor v séru

V séru je fosfor přítomen ve dvou hlavních formách:

- organický fosfor (cca 70 %), který je součástí především fosfolipidů;
- anorganický fosfor (cca 30 %), který je většinou volný a pouze menší část je vázaná na bílkoviny (rozdíl proti vápníku) nebo s vápníkem a hořčíkem (obr. 5). Pouze anorganický fosfát je běžně stanovován v klinicko-biochemických laboratořích. Při fyziologickém pH 7,4 je v séru směs hydrogenfosforečnanů a dihydrogenfosforečnanů v poměru 4:1.

Koncentrace fosfátů v séru závisí zejména na funkčním stavu příštítných tělísek a na funkci ledvin (na glomerulární filtraci i na zpětné resorpci v tubulech). Parathormon snižuje zpětnou resorpci fosfátů ledvinami. Při nedostatečné činnosti ledvin stoupá koncentrace fosfátů v krvi. Koncentrace v séru je dále výrazem rovnováhy mezi příjmem fosfátů potravou a pohybem zásob v kostní tkáni.

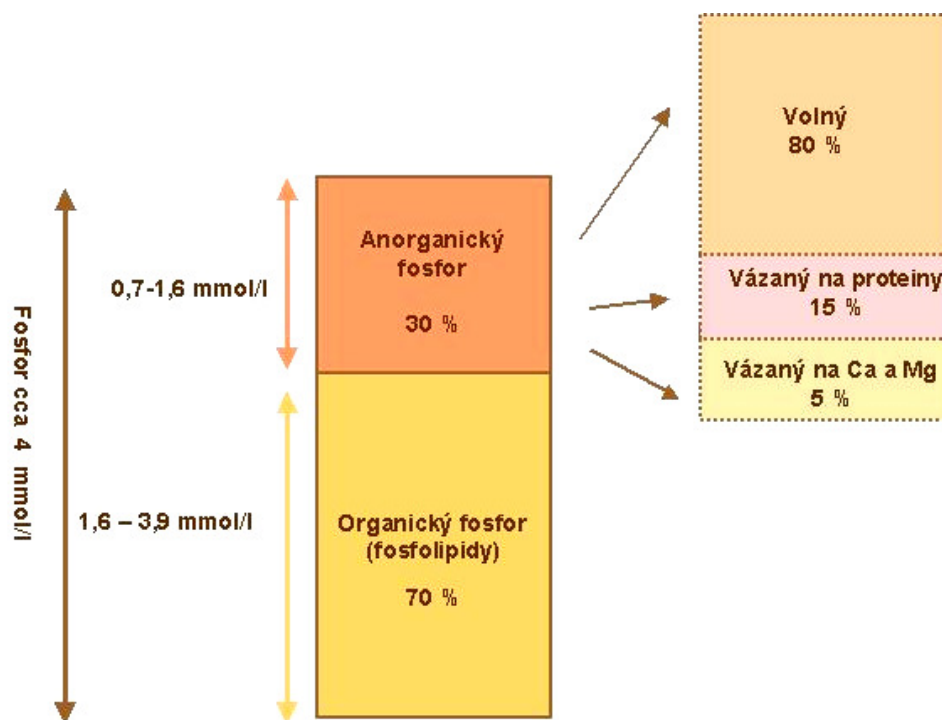
Změny hladin fosfátů často doprovázejí změny hladiny kalcia. Obvykle existuje inverzní vztah mezi koncentrací kalcia a fosfátů, např. u primární hyperparatyreózy se zvyšuje kalcium a fosfáty klesají, ale při předávkování vitaminem D se společně se zvýšením kalcia zvyšují i fosfáty. Je potřeba si uvědomit, že volný fosfát může bezprostředně reagovat s ionizovaným kalcíem. Těžká hyperfosfatémie tak může přímo vést k závažnému poklesu koncentrace ionizovaného kalcia. Významný je také iontový součin plazmatických koncentrací kalciových a fosfátových iontů (kalciofosfátový produkt). Obecně platí, že už za fyziologických podmínek je vyšší, než je nutné pro tvorbu nerozpustného fosforečnanu vápenatého (krev je tedy z tohoto hlediska přesycený roztok). Při vzestupu tohoto součinu (nejčastěji při selhání ledvin) se fosforečnan vápenatý může začít srážet v měkkých tkáních, nejčastěji v medii tepen – vytvářejí se tzv. metastatické kalcifikace.

Sérové koncentrace fosfátů neodrážejí vždy spolehlivě množství intracelulárního fosforu. Do buněk fosfor vstupuje pro potřebu metabolických a energetických procesů. Naopak při katabolických dějích se fosfor přesouvá z intracelulárního do extracelulárního prostoru. To může být příčinou hyperfosfatémie u těžkých katabolických stavů. Při přechodu do anabolické fáze se v buňce výrazně

zvyšuje potřeba fosforu pro obnovení ATP a dalších fosforylovaných substrátů a hladina fosforu v séru klesá. Aby se zabránilo výrazné hypofosfatemii, je zapotřebí při těchto stavech dodávat fosfor.

U primární hyperparatyreózy klesají fosfáty a zvyšuje se kalcium, ale při předávkování vitamínem D se společně se zvýšením kalcia zvyšují i fosfáty.

Obr. 5 Formy fosforu v séru



Referenční hodnoty:

Konzace anorganických fosfátů v séru (S-anorganické fosfáty): **0,7 - 1,6 mmol/l**

V krvi jsou fosfáty fyziologicky zvýšeny u dětí, což souvisí s růstem kostí.

3.3. Fosfor v moči

Ledviny se významně uplatňují v udržení homeostázy fosforu. Fosfor filtrovaný glomeruly je přibližně z 80 % reabsorbován v proximálním tubulu a z 10 % v distálním tubulu; zbytek je vyloučen moči. Při zvýšeném příjmu fosfátů potravou se zvyšuje jejich renální exkrece a naopak.

U zdravých osob množství fosfátů vyloučených močí kolísá v širokém rozmezí. Izolované stanovení fosfátů v moči je na posouzení metabolismu fosforu nedostatečné, protože při dobré funkci ledvin se mění v závislosti na příjmu fosfátů potravou.

Přesnější informaci poskytuje stanovení některých indexů, pro jejichž výpočet je zapotřebí ještě stanovit kreatinin v séru a v moči. Hodnotí se *clearance fosfátů* a *tubulární resorpce fosfátů*

(TRP). Pro stanovení TRP není potřeba sbírat moč v přesně stanoveném období. Hodnoty TRP se snižují při hyperparatyreóze, při hypoparatyreóze stoupají.

Denní ztráty fosfátů močí, clearance fosfátů a tubulární resorpce fosfátů vypočteme podle následujících vzorců:

Ztráty anorganických fosfátů moči za 24 h:

$$dU\text{-anorganické fosfáty (mmol/24 h)} = U\text{-anorganické fosfáty (mmol/l)} \times \text{objem moči (l/24 h)}$$

Clearance fosfátů

$$C_p = \frac{U_p \times V}{S_p}$$

U_p koncentrace fosfátů v moči

S_p koncentrace fosfátů v séru

V diuréza v ml/s

Tubulární resorpce fosfátů

$$TRP = 1 - \frac{U_p \times S_{K_r}}{S_p \times U_{K_r}}$$

S_{K_r} koncentrace kreatininu v séru

U_{K_r} koncentrace kreatininu v moči

Koncentrace fosfátů v moči a v séru, stejně jako koncentrace kreatininu v moči a v séru musí být dosazeny ve stejných jednotkách.

Referenční hodnoty:

Denní renální ztráty fosfátů: **15 – 90 mmol/24 h**

Clearance fosfátů: **0,135 – 0,225 ml/s**

Tubulární resorpce fosfátů: **0,85 – 0,95**

3.4. Metody stanovení fosforu v séru

Stanovení fosforu je založeno na reakci fosfátů *s molybdenem amonným v kyselém prostředí*, při níž vzniká bezbarvý fosfomolybdenanový komplex. Lze ho měřit přímo v UV oblasti nebo po přeměně na fosfomolybdenanovou modř. Další modifikací je reakce fosfátů s molybdenem amonným a vanadičnanem amonným. V tomto případě se vytváří žlutá kyselina molybdátovanadátofosforečná.

4. Biochemické ukazatele kostní přestavby

4.1. Základní charakteristika

Biochemické ukazatele kostní přestavby nejsou specifické pro určité kostní onemocnění, ale vypovídají o metabolickém stavu skeletu. Posuzujeme je společně s nálezy metabolismu kalcia a fosforu.

Jejich stanovení je vhodné pro:

- určení stupně osteoresorpce a kostní novotvorby;
- odlišení různých onemocnění skeletu;
- pro sledování účinnosti léčby.

Jako biochemické ukazatele kostní přestavby využíváme:

- degradační produkty kostní matrix, které se z ní uvolňují při odbourávání kosti;
- proteiny kostní matrix a kostní enzymy syntetizované v osteoblastech nebo osteoklastech a uvolňované do cirkulace nebo do moči.

4.2. Ukazatelé novotvorby kostí

K ukazatelům novotvorby kostí patří tyto produkty osteoblastů v séru:

- *osteokalcin*;
- *alkalická fosfatasa a její kostní izoforma*;
- *propeptidy prokolagenu typu I*.

Osteokalcin

[Osteokalcin](#) je nejhojněji zastoupený nekolagenní kostní polypeptid, někdy označovaný jako BGP (bone gla protein)¹. Má vysokou afinitu k hydroxyapatitu. Je syntetizován v *osteoblastech*, zčásti se ukládá do extracelulární kostní matrix, zčásti přechází do oběhu. Je specifický pro kostní tkáň, je však značně labilní a jeho stanovení je spojeno s některými problémy.

Alkalická fosfatasa (ALP) a její izoformy

[Alkalická fosfatasa](#) (EC 3.1.3.1) je enzym katalyzující hydrolýzu monoesterů kyseliny fosforečné v alkalickém prostředí. ALP se nachází ve všech buňkách těla, kde je vázaná na membránách prostřednictvím glykosyl-fosfatidyl-inozitolové kotvy. Existuje v několika izoformách, které jsou kódovány čtyřmi geny. Produktem tkáňově nespecifického genu jsou *jaterní, kostní a ledvinová izoforma*. Ostatní tři geny kódují *placentární, střevní a další izoenzymy*. Rozdíly mezi těmito mnohočetnými formami vznikají posttranslační modifikací sacharidové složky molekuly enzymů. U zdravých dospělých jedinců převládá v cirkulaci ALP jaterního původu, zatímco u dětí v období růstu je mnohem vyšší podíl kostní ALP, produkované *osteoblasty*. Stanovení ALP a izoenzymů ALP se uplatňuje především u onemocnění jater, žlučových cest a kostních onemocnění (tab. 3).

¹ Gla je zkratka pro γ -karboxyglutamovou kyselinu, jež je obsažena v osteokalcinu a váže kalcium.

Tab. 3 Izoformy a izoenzymy alkalické fosfatasy

Izoforma ALP	Původ	Zvýšení katalytické koncentrace v séru - příklady	Poznámka
kostní	osteoblasty	<ul style="list-style-type: none"> • primární kostní nádory (osteosarkom) • sekundární kostní nádory (metastázy do kostí u karcinomu prostaty, prsu) • hojení kostních zlomenin • rachitis • hyperparatyreóza 	<ul style="list-style-type: none"> • zvýšení je projevem zvýšené činnosti osteoblastů • u dospělého jedince tvoří méně než polovinu celkové aktivity • u dětí především v růstovém období je podíl kostní ALP mnohem vyšší
jaterní	membrána hepatocytu, epitelie žlučových cest	<ul style="list-style-type: none"> • překážka odtoku žluči - obstrukce žlučových cest na podkladě cholelitiázy nebo nádoru • poškození hepatocytů • nádory jater 	<ul style="list-style-type: none"> • při vysokých katalytických koncentracích jaterního izoenzymu se může prokázat další izoforma s odlišnou elektroforetickou pohyblivostí
střevní	enterocyty	<ul style="list-style-type: none"> • některá zánětlivá onemocnění střev 	<ul style="list-style-type: none"> • střevní izoenzym souvisí s určitými krevními skupinami - fyziologicky se vyskytuje u lidí se skupinou B a O, u skupin A a AB je za normálního stavu neprokazatelný • fyziologicky se zvyšuje po jídle
placentární	trofoblast		<ul style="list-style-type: none"> • fyziologicky ve 3. trimestru těhotenství • je termostabilní
atypické	některé nádory		<ul style="list-style-type: none"> • např. Reaganův izoenzym

Princip stanovení alkalické fosfatasy

Fosfatasy mohou katalyzovat *hydrolýzu* různých typů organických fosfomonoesterů na fosforečnanový anion a příslušný alkohol nebo fenol. Vedle hydrolýzy zprostředkuje ALP i *transfosforylační reakci*, při níž je fosfátová skupina přenesena na vhodný akceptor.

Při použití substrátu 4-nitrofenylfosfátu katalyzuje alkalická fosfatasa tyto reakce:

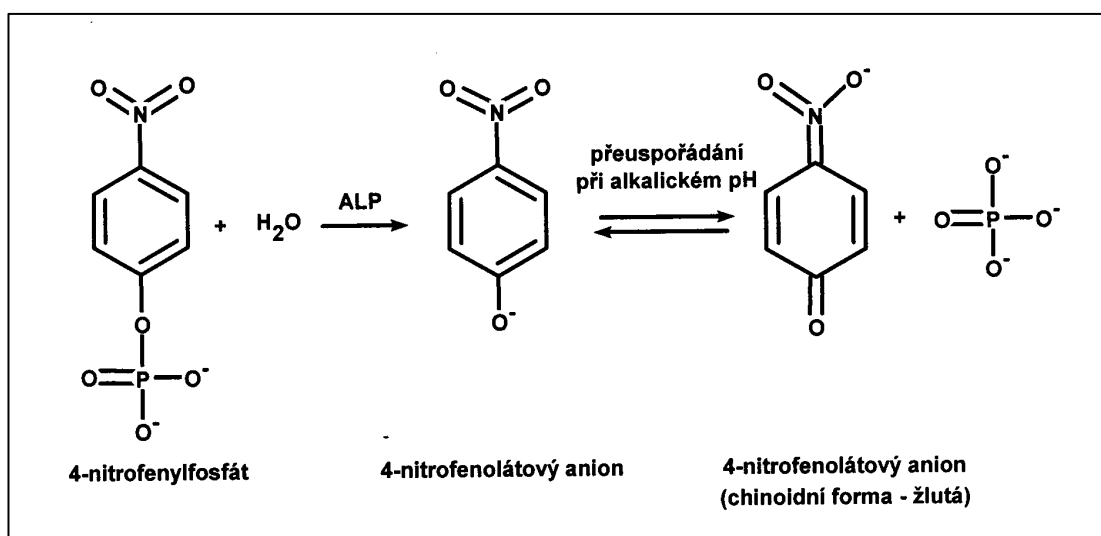
1. hydrolýza



2. transfosforylace (přenos fosfátové skupiny)



Obr. 6 Princip stanovení katalytické aktivity alkalické fosfatasy



V první reakci se ze substrátu hydrolyticky odštěpuje fosforečnan. (obr. 6). Ve druhé reakci se uplatní transfosforylační aktivita ALP, kdy N-methyl-D-glukamin působí jako akceptor fosforečnanových aniontů a zároveň jako pufr. Tímto způsobem je urychlován průběh reakce. Enzymová reakce je startována substrátem.

Substrát **4-nitrofenylfosfát** je v alkalickém prostředí téměř **bezbarvý**. Produkt jeho hydrolyzy vznikající působením ALP **4-nitrofenolátový ion** má při alkalickém pH chinoidní formu, charakterizovanou **žlutým** zbarvením. Množství uvolněného 4-nitrofenolu, které je mírou aktivity ALP, se stanovuje fotometricky buď kinetickým způsobem nebo metodou konstantního času po zastavení enzymové reakce inhibitorem. ALP je aktivována chloridem sodným.

Stanovení izoenzymů alkalické fosfatasy

Izoenzymy ALP mohou být rozlišovány na základě fyzikálních, chemických, imunologických a elektroforetických vlastností

Metody stanovení izoenzymů ALP využívají selektivní inaktivace některých izoenzymů (odlišná citlivost na teplo, inhibice fenylalaninem, leucinem nebo močovinou) nebo rozdílů v elektroforetické pohyblivosti. Problémem je někdy úplné oddělení jaterní a kostní ALP. Nověji je možno kostní ALP stanovit pomocí imunochemických metod nebo vazbou kostní ALP na specifický lektin v kombinaci s elektroforézou.

Referenční hodnoty:

Celková katalytická koncentrace ALP v séru $\mu\text{kat/l}$ (S-ALP):

- muži **0,9 – 2,3 $\mu\text{kat/l}$**
- ženy **0,74 – 2,1 $\mu\text{kat/l}$**
- děti **1,2 – 6,3 $\mu\text{kat/l}$**

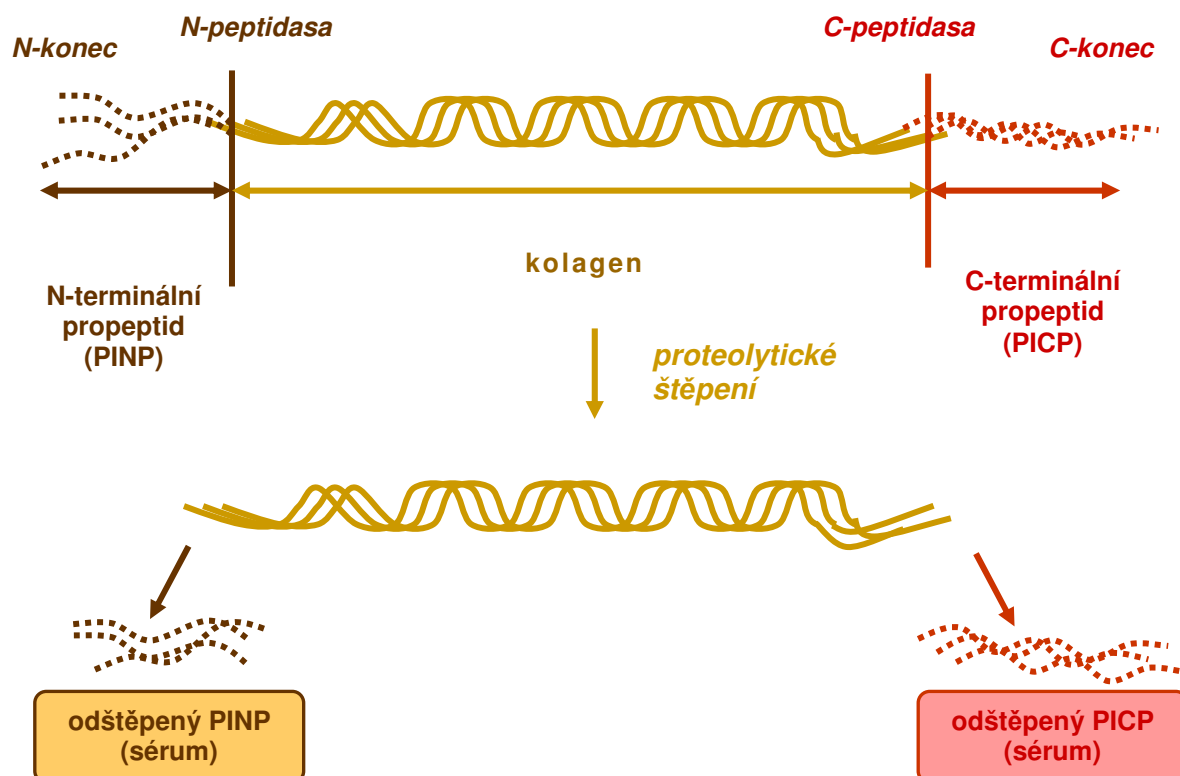
Kostní izoenzym ALP:

- muži **< 0,83 $\mu\text{kat/l}$**
- ženy **< 1,0 $\mu\text{kat/l}$**

Propeptidy prokolagenu typu I

Kolagen je v *osteoblastech* syntetizován jako prokolagen. Před zabudováním do kostní matrix se proteolyticky odštěpují oba konce, které vznikají v ekvimolárním poměru k syntéze kostního kolagenu. Z každé molekuly kolagenu, která je vestavována do kolagenní fibrily, se uvolňuje jeden **C-terminální propeptid (PICP – prokolagen-I-C-terminální propeptid)** a jeden **N-terminální propeptid (PINP – prokolagen-I-N-terminální propeptid)** (obr. 7).

Obr. 7 Propeptidy prokolagenu



4.3. Ukazatele kostní resorpce

Během kostní resorpce se rozpouští minerální složka a odbourává se kostní matrix. To je doprovázeno vyplavením vápníku, fosforu, mnoha enzymů a degradačních produktů matrix do krve a do moči.

Mezi ukazatele kostní resorpce patří:

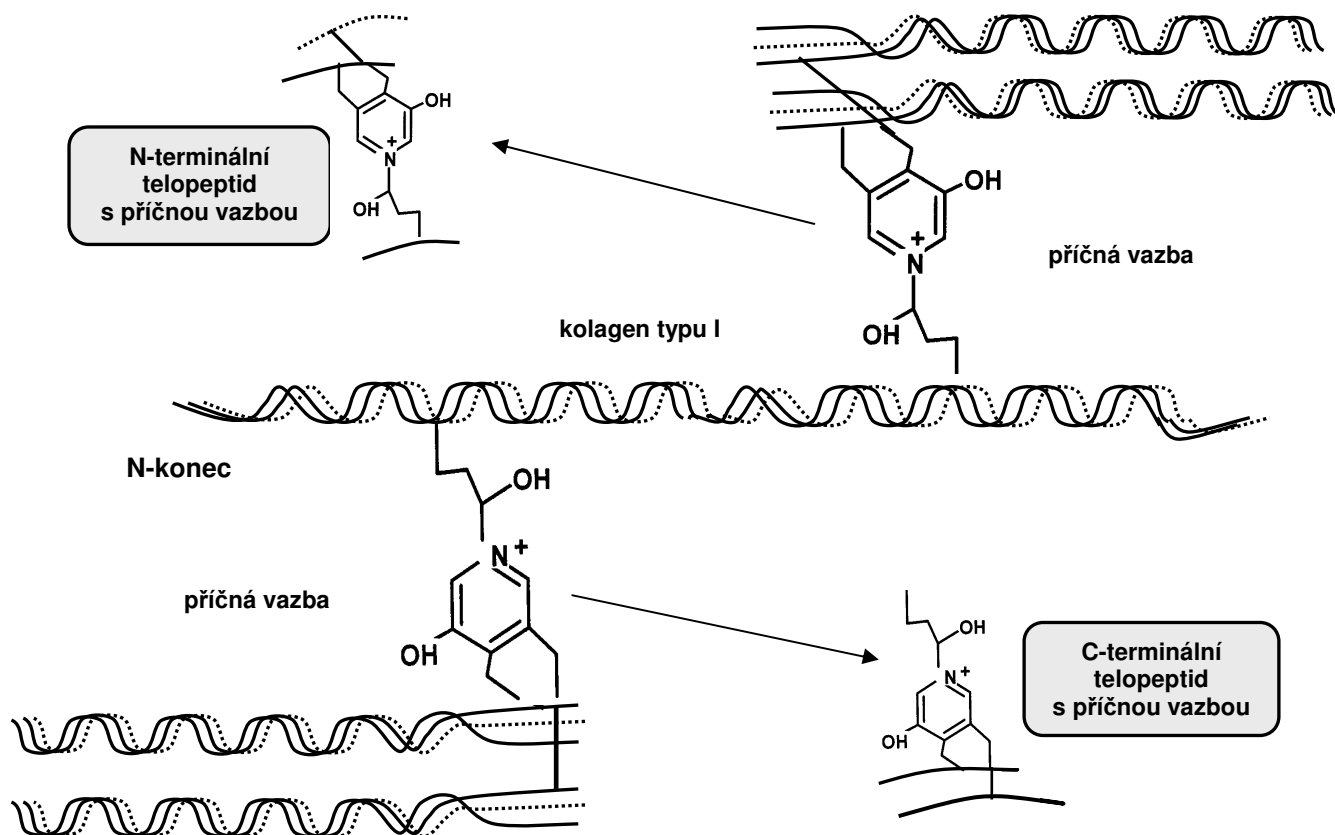
- *pyridinolin a deoxypyridinolin v moči;*
- *N- a C-telopeptidy kolagenu typu I;*
- *hydroxyprolin v moči;*
- *kostní izoenzym kyselé fosfatasy.*

Pyridinolin a deoxypyridinolin (Pyr a Dpyr) a N- a C-telopeptidy kolagenu typu I

[Pyridinoliny](#) a [deoxypyridinoliny](#), tzv. cross-links (příčné spojky) vznikají ve zralém kolagenu intermolekulárním propojením 3 lysinových nebo hydroxylysinových zbytků kolagenních fibril. Pyridinolin je tvořen spojením 3 hydroxylysinových zbytků, deoxypyridinolin 2 hydroxylysinových a 1 lysinového zbytku postranního řetězce. Při degradaci kolagenu se příčné spojky uvolňují do krevního oběhu a přestupují do moči, kde se stanovují. Množství pyridinolinů a deoxypyridinolinů odráží intenzitu kostní resorpce. Jejich koncentrace nezávisí na přítomnosti kolagenu v potravě. V oběhu jsou pyridinoliny a deoxypyridinoliny přítomné *volné* nebo jsou *součástí koncových úseků kolagenu* a označovány jako *C-telopeptid* (ICTP - C koncový teloepetid kolagenu typu I) a *N-telopeptid* (INTP - N koncový teloepetid kolagenu typu I) (obr. 8). Stanovení těchto parametrů je poměrně náročné. Využívá se buď [vysokoučinná kapalinová chromatografie](#) (HPLC) nebo imunochemické metody.

Obr. 8 Telopeptidy kolagenu typu I

(upraveno podle Calvo et al., Endocrine Review, 17, 333 – 366, 1996)

**Hydroxyprolin**

Kolagen obsahuje velké množství [hydroxyprolinu](#). Při degradaci kolagenu se hydroxyprolin uvolňuje do cirkulace a je vylučován močí, zbytek je metabolizován játry. Hydroxyprolin v moči se zvyšuje při zvýšené kostní resorpci (např. osteoporóza, hyperparatyreóza). Patří mezi méně specifické markery osteroresorpce, neboť může vznikat i ze složek komplementu a při odbourávání propeptidů kolagenu. Hydroxyprolinurie je ovlivněna dietním příjmem kolagenu (maso, vývary z masa, želatina). Proto je nutné, aby pacient alespoň 1 den před vyšetřením dodržoval dietu s vyloučením výše uvedených potravin.

Kyselá fosfatasa (ACP) a její kostní izoenzym

[Kyselá fosfatasa](#) (EC 3.1.3.2) hydrolyzuje různé fosforečnanové estery při pH nižším než 7. Vyskytuje se v řadě tkání (prostata, kosti, játra, ledviny, slezina, krevní elementy). V cirkulaci rozlišujeme několika izoenzymů:

- **Kostní tzv. tartarát-rezistentní** (TRACP) - je specifický pro kostní tkáň. **Osteoklasty** obsahují velké množství tohoto lyzozomálního enzymu, který je secernován do oběhu během kostní resorpce. Na rozdíl od výše uvedených ukazatelů kostní resorpce se nevyklučuje ledvinami, takže stanovení kostního izoenzymu je cenné u pacientů s poškozením ledvin.
- **Prostatický** - není normálně přítomen, objevuje se při karcinomu či hyperplazii prostaty, je citlivý vůči vínanu.
- **Trombocytový** - uvolňuje se při srážení krve, proto jsou v séru vyšší hodnoty než v plazmě.
- **Erytrocytový** - uplatňuje se v hemolytickém séru.

Biochemické stanovení využívá štěpení syntetických esterů kyseliny fosforečné. Jedním z používaných substrátů je 4-nitrofenylfosfát (podobně jako ALP), který v kyselém prostředí štěpí kyselá fosfatasa na fosfát a 4-nitrofenol.

Referenční hodnoty:

Celková katalytická koncentrace ACP v plazmě: < 250 (nkat/l)

Prostatický (tartarát-labilní) izoenzym ACP: < 70 nkat/l)

5. Vybraná metabolická onemocnění kostí

Metabolická onemocnění kostí se většinou týkají kostí jako celku. Může být postižena buď organická složka kostní tkáně nebo kostní minerál nebo obojího. Na prvním místě stojí osteoporóza, ale k častým metabolicky podmíněným chorobám patří i osteomalacie a Pagetova kostní choroba.

5.1. Osteoporóza

Osteoporóza je charakterizována **úbytkem kostní hmoty (rovnoměrným úbytkem organické i anorganické matrix)** a poruchami mikroarchitektury kostní tkáně s následným zvýšením fragility kostí a tendencí ke zlomeninám. Úbytek kostní hmoty je větší než odpovídá věku, pohlaví nebo rase určitého jedince.

Osteoporóza je dnes pokládána za „civilizační chorobu“ s vysokým výskytem v průmyslově vyspělých zemích. Předpokládá se, že osteoporóza se vyskytuje zhruba u 6 – 7 % našeho obyvatelstva. Je onemocněním především starších žen. Vzniká z nepoměru mezi vystupňovanou kostní resorpcí a normální nebo sníženou novotvorbou kostí. Až do 50 let se obsah i denzita kostního minerálu u dospělých žen a mužů téměř nemění. Později začne u žen po menopauze převládat kostní osteoresorpce nad novotvorbou kostí v souvislosti s vyhasínáním ovariálních funkcí a tento trend pak pokračuje po celý život. I u mužů ubývá s postupujícím věkem kostní hmoty, ale tento proces probíhá mnohem pomaleji, a proto jsou muži osteoporózou a zlomeninami ohroženi mnohem méně.

Diagnóza osteoporózy se vyslovuje **na základě měření kostní hmoty pomocí zobrazovacích technik. Laboratorní vyšetření** mohou být také cenným přínosem při jejím zjišťování, při posuzování stupně a prognózy rozvoje onemocnění. Vyšetřují se parametry metabolismu vápníku a fosforu a ukazatele kostní přestavby. U žen po menopauze zvýšeně ohrožených osteoporózou se zjišťují **vyšší hodnoty ukazatelů osteoresorpce**, které nejsou kompenzovány zvýšením novotvorby kostí.

5.2. Osteomalacie a rachitis

Osteomalacie je charakterizována **snížením minerální komponenty následkem porušené mineralizace nově vytvořené kosti**. Nalézáme zvýšené množství osteoidu (nemineralizované organické matrix) v kostní matrix, která nekalcifikuje nebo jen zvolna. **Rachitis (křivice)** je termín označující osteomalacii u dětí, neboť rozvoj křivice je podmíněn růstem kostí.

Nejčastější příčinou osteomalacie je **nedostatek vitamínu D** v důsledku jeho nedostatečného obsahu v potravě, poruch trávení a vstřebávání. Rovněž nedostatek slunečního záření, jaterní a ledvinové choroby, spojené s narušenou přeměnou vitamínu D na aktivní metabolity, mohou být příčinou osteomalacie.

Pro osteomalacii je typický laboratorní nález:

- **nízká kalcemie;**
- **nízká fosfatemie;**
- **vysoká katalytická koncentrace alkalické fosfatasy, zvláště její kostní izoformy.**

5.3. Pagetova kostní choroba

Pro Pagetovu kostní nemoc je typické postižení pouze určitých částí skeletu. Je důsledkem místní nekontrolované kostní resorpce, která je doprovázenou nadměrnou a neuspořádanou novotvorbou kosti. Vzniká strukturálně neplnohodnotná kost. Je zvýšen počet osteoklastů i osteoblastů. Postižena může být jedna nebo více kostí. V biochemickém nálezu dominuje **zvýšená hodnota alkalické fosfatasy (především kostní izoformy)**. Užitečné je i stanovení markerů kostní remodelace.

Použitá literatura:

1. *Broulík P.*: Poruchy kalciofosfátového metabolismus. Grada Publishing, Praha
2. *Bubnová E., Buděšínská A., Křemen J., Stříbrná J.*: Praktická cvičení z lékařské chemie a biochemie, část III. Karolinum, Praha 1998.
3. *Burtis C.A., Ashwood E.R.*: Tietz Textbook of Clinical Biochemistry, 2nd edition. W.B.Saunders Company, Philadelphia 1994.
4. *Doležalová V. a kolektiv*: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. IDVPZ, Brno 1995.
5. *Dzúrik R. a kolektiv*: Štandardná klinickobiochemická diagnostika. Osveta, Martin 1996.
6. *Chromý V., Fischer J.*: Analytické metody v klinické biochemii. Masarykova universita, Brno 2000.
7. *Kaplan L.A., Pesce A.J.*: Clinical Chemistry. Theory, Analysis, Correlation. 3rd edition. Mosby 1996.
8. *Kolektiv autorů*: Lékařská chemie a biochemie. Praktikum. Avicenum, Osveta, Praha 1991.
9. *Kraml J. a kolektiv*: Návod k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie. Karolinum, Praha 1991.
10. *Masopust J.*: Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření I. a II. část. Karolinum, Praha 1998.
11. *Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.*: Harperova biochemie. H+H, Praha 1998.
12. *Racek J. a kolektiv*: Klinická biochemie. Galén-Karolinum, Praha 1999.
13. *Schneiderka P. a kolektiv*: Stanovení analytů v klinické biochemii 1. část. Karolinum, Praha 1998.
14. *Schneiderka P. a kolektiv*: Vybrané kapitoly z klinické biochemie. Karolinum, Praha 1998.
15. *Táborská E. a kolektiv*: Návod ke cvičením z biochemie. Masarykova universita, Brno 1993.
16. *Teplan V. a kol.*: Praktická nefrologie. Grada Publishing 2006.
17. *Thomas L.*: Clinical laboratory diagnostics. TH-Books, Frankfurt/Main, Germany 1998.
18. *Tichý V.*: Stanovení aktivity kostní frakce alkalické fosfatasy pomocí termoinaktivace. Klin. Biochem. Metab. 6, 194 – 195, 1998.
19. *Voet D., Voetová J. G.*: Biochemie. Victoria Publishing, Praha 1995.
20. *Zima T. a kolektiv*: Laboratorní diagnostika. Galén, Praha 2002.

