ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY 1. LF UK

Metabolismus vápníku a fosforu

Praktické cvičení z lékařské biochemie

Všeobecné lékařství

Lenka Fialová, Martin Vejražka

2021/2022

Obsah

1. Kostní tkáň ... 3
2. Vápník ... 3
2.1. Homeostáza vápníku ... 3
2.2. Vápník v séru ... 4
2.3. Vápník v moči ... 7
2.4. Metody stanovení vápníku v séru a v moči ... 7
3. Fosfor ... 8
3.1. Homeostáza fosforu ... 8
3.2. Fosfor v séru ... 9
3.3. Fosfor v moči ... 10
3.4. Metody stanovení fosforu v séru ... 11
3.5 Rozpustnost fosforečnanu vápenatého ... 11
4. Biochemické ukazatele kostní přestavby ... 12
4.1. Základní charakteristika ... 12
4.2. Ukazatelé novotvorby kostí ... 12
4.3. Ukazatele kostní resorpce ... 15
5. Vybraná metabolická onemocnění kostí ... 17
5.1. Osteoporóza ... 17
5.2. Osteomalacie a rachitis ... 18
5.3. Pagetova kostní choroba ... 18

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 kostní matrix** a ze **2/3 minerálem**.

- Hlavní složkou kostní matrix je ***kolagen typu I*** (90 %), minoritními složkami jsou nekolagenní bílkoviny – ***osteokalcin, osteonektin, osteopontin*** a další (10 %).
- Kostní minerál je tvořen malými ***krystalky hydroxyapatitu*** $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, který se nevyskytuje v čisté formě, nýbrž zastoupeny jsou i další složky (např. uhličitan vápenatý, fluorid vápenatý, fosforečnan hořečnatý).

Metabolickou aktivitu kostí zajišťují kostní buňky. K nim patří **osteoblasty,** produkující ***osteoid (kostní matrix)***, do něhož se ukládá minerál. Dalším buněčným typem jsou **osteoklasty**, jejichž hlavní funkce spočívá v kostní resorpci, a **osteocyty,** doplňující funkci osteoblastů jemnou regulací kostní resorpce.

V kostní tkáni se odehrává celoživotní stálá přestavba – **remodelace,** jejíž podstatou je ***osteoklastická resorpce*** a následná ***osteoblastická kostní tvorba.*** 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 mineralizovaných tkání se vápník uvolňuje podle potřeb organismu.

Velmi malé množství se nachází ***v intracelulární tekutině***. Buněčné kalcium je obsaženo především v endoplazmatickém retikulu a mitochondriích. 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).

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-dihydroxycholekalciferolem (kalcitriolem) a kalcitoninem (obr. 2).

Resorpce vápníku ve střevě

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.

Resorpci vápníku ve střevě ovlivňují různé faktory. Kromě hormonálních vlivů (zejména kalcitriol) se na resorpci vápníku významným způsobem podílí i chemická forma vápníku přítomného v potravě a přítomnost dalších složek stravy.

Formy vápníku se liší biologickou využitelností, která je podmíněna zejména ***rozpustností ve vodě***. Většinou platí, že látky dobře rozpustné ve vodě se budou dobře vstřebávat. Ale i ve vodě špatně rozpustné vápenaté soli může organismus využít díky ***kyselému prostředí v žaludku***. Jako příklad si můžeme uvést uhličitan vápenatý, který patří ke špatně rozpustným sloučeninám. Působením kyseliny

chlorovodíkové se $CaCO_3$ v žaludku přemění na dobře rozpustný chlorid vápenatý. Disociované ionty Ca^{2+} mohou být poté ve střevě vstřebány.

$$CaCO_3 + 2H^+ + 2Cl^- \rightarrow Ca^{2+} + 2Cl^- + H_2CO_3 \rightarrow H_2O + CO_2$$

Z tohoto důvodu je zapotřebí uhličitan vápenatý, popř. fosforečnan vápenatý, který je též špatně rozpustný ve vodě, užívat s jídlem. U starších pacientů, u nichž s věkem klesá sekrece žaludeční šťávy, nebo po resekci žaludku může být vstřebatelnost vápníku snížená.

Přehled vybraných vápenatých solí a jejich rozpustnost ve vodě

Sůl	Rozpustnost ve vodě
Uhličitan vápenatý	méně než 0,1 g/l H_2O
Fosforečnan vápenatý	méně než 0,1 g/l H_2O
Citronan vápenatý	0,2 g/l H_2O
Glukonát vápenatý	3,5 g/l H_2O
Laktát vápenatý	12,0 g/l H_2O
Laktoglukonát vápenatý	45,0 g/l H_2O
Chlorid vápenatý	740,0 g/l H_2O

Na využitelnosti vápníku jak v pozitivním, tak negativním smyslu se podílejí i další složky potravy, které jsou s ním současně přijímány. Přítomnost látek, které tvoří s Ca^{2+} nerozpustné sloučeniny, snižují jeho biologickou dostupnost. Mezi ně patří potraviny s vysokým obsahem ***šťavelanů*** (např. špenát, rebarbora), ***fytátů*** (např. cereálie) a ***vláknina.*** Některé součásti čaje také vytvářejí špatně rozpustné vápenaté soli. Proto by vápník v tabletách neměl být zapíjen čajem. Rovněž některé mastné kyseliny reagují s vápníkem za vzniku nerozpustných vápenatých mýdel.

Jiné složky potravy naopak mohou pozitivně ovlivňovat resorpci vápníku. Jedná se o komlexotvorné látky, které udržují vápník v rozpustné formě. Patří mezi ně některé aminokyseliny a sacharidy (viz tabulka). Např. laktosa tvoří s vápníkem komplex v poměru 1:1.

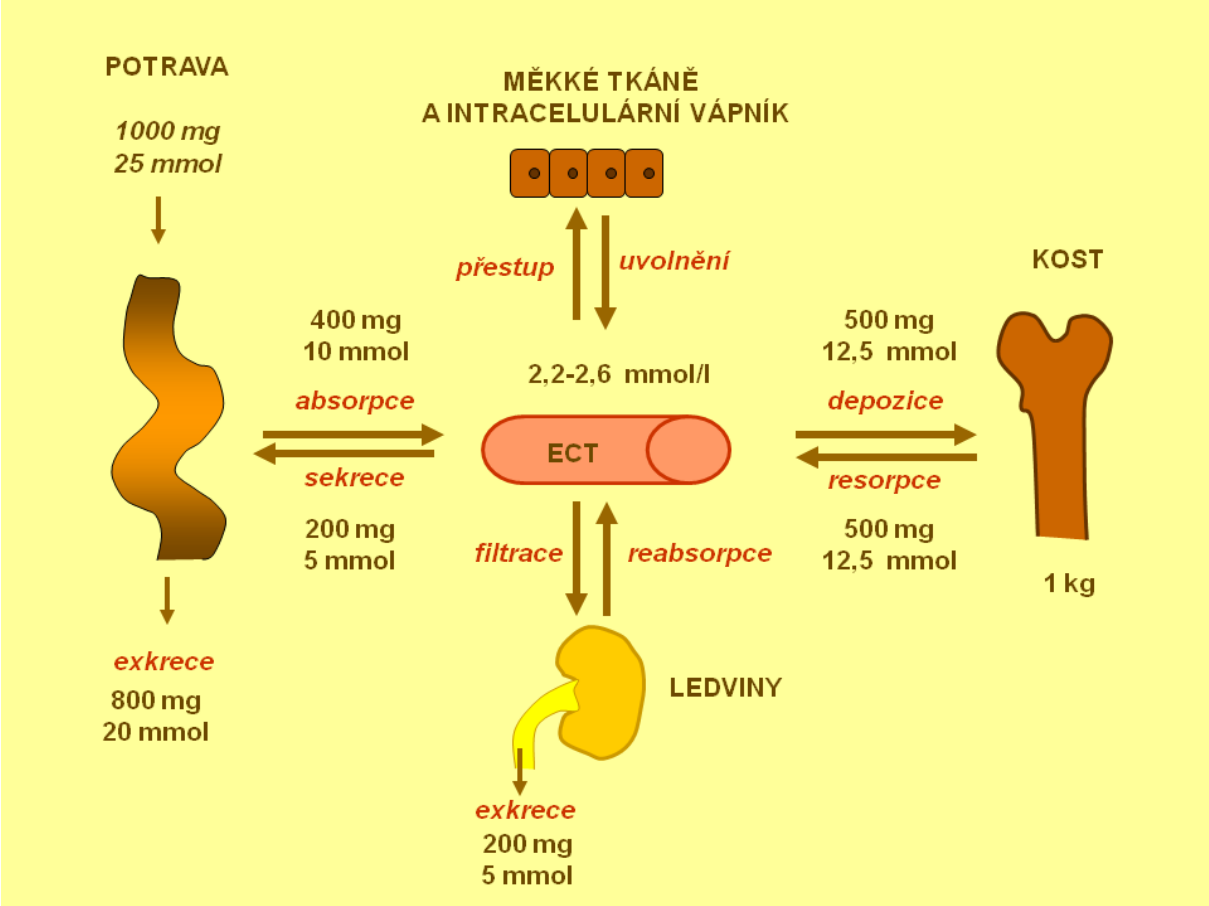
2.2. Vápník v séru

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

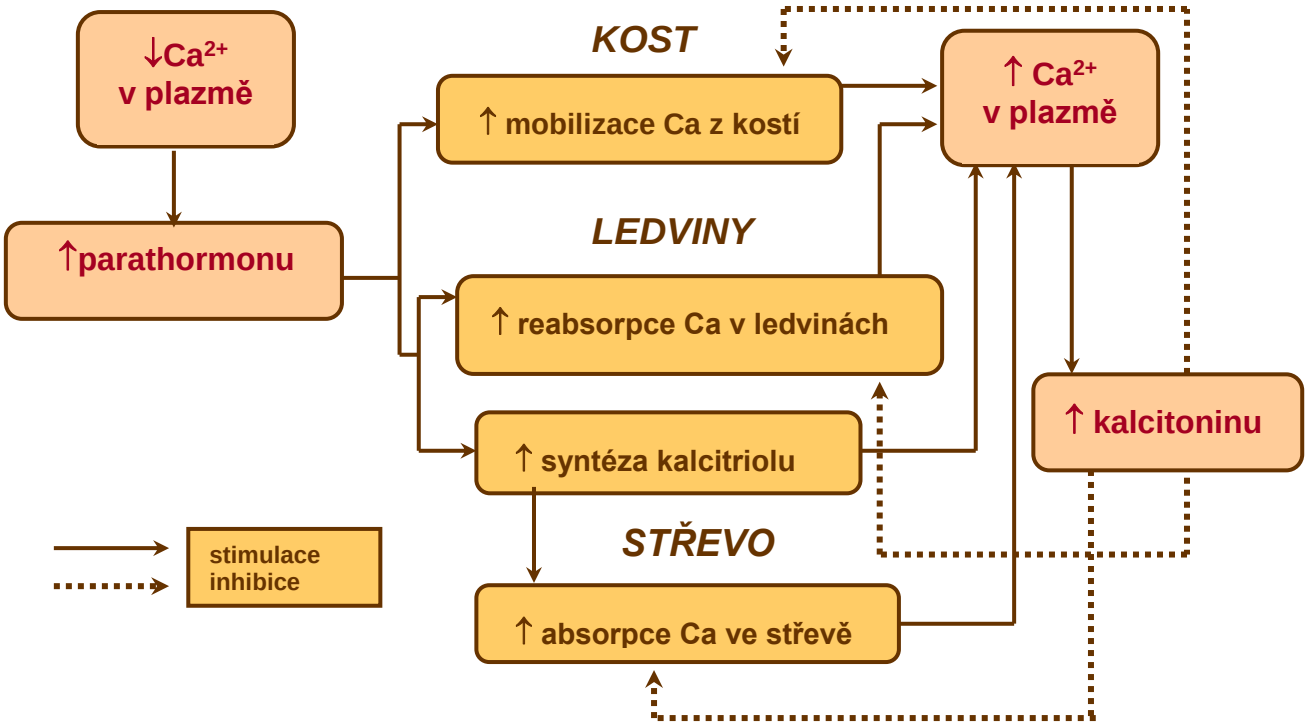
Celkový vápník v séru existuje v několika formách (obr. 3):

- 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 hydrogenuhličitany;
- 40 % kalcia je vázáno s plazmatickými 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.

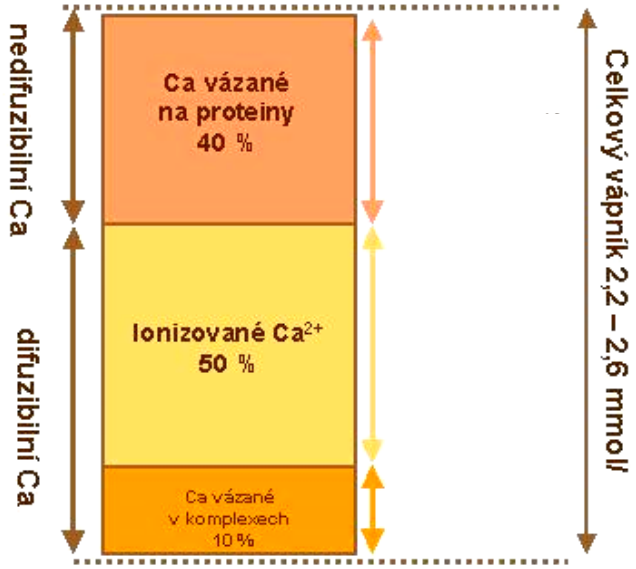
Obr. 1 Přibližná denní bilance vápníku



Obr. 2 Regulace kalciové homeostázy



Obr. 3 Formy vápníku v séru



Referenční hodnoty:

Koncentrace celkového kalcia v séru (S-kalcium):

Koncentrace celkového kalcia v séru je udržována v úzkém rozmezí **2,2 – 2,6 mmol/l.** Hodnota 4 – 5 mmol/l je pokládána za horní mez kalcemie slučitelné se životem. Smrt nastává při hyperkalcemii zástavou srdce. Za dolní hranici ještě slučitelnou se životem se uvádí koncentrace 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 vitaminem 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 vitaminu D • porucha absorpce vitaminu D • nedostatečný přívod vitaminu D v potravě • nedostatečná přeměna vitaminu 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)***.

dU-kalcium (mmol/24 h) = U-kalcium (mmol/l) × objem moči (l/24 h)

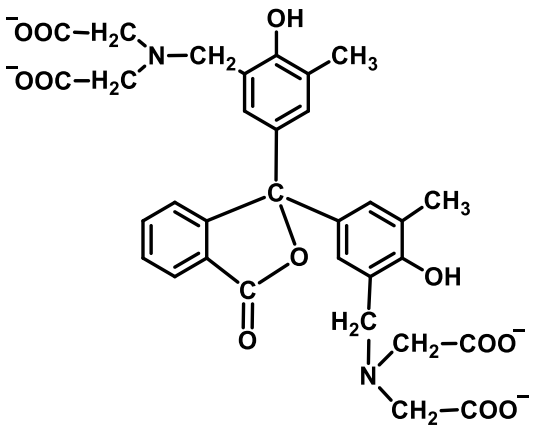
Výsledek je závislý na přesném sběru moči, proto se současně s vápníkem stanovuje v moči i kreatinin.

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

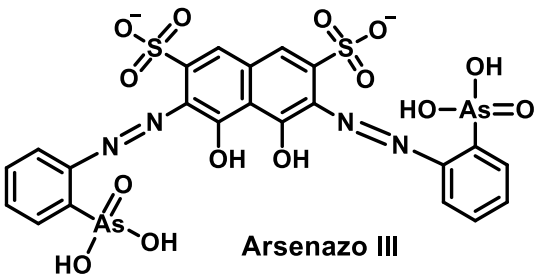
Referenční hodnoty:
Ztráty kalcia močí za 24 h (dU-kalcium): **2,4 – 7,2 mmol/24 hod**

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 kalciem. 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 arsenaso III.



o-kresolftalein komplexon



Arsenazo 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 plazmatickými 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 hypoproteinémie, 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*** (fosfolipidy) a ***kostní tkáně*** (hydroxyapatit). Významně se uplatňuje při ***uchovávání energie*** ve formě makroergních sloučenin (ATP, kreatinfosfát) a přenosu ***genetické informace*** jako součást nukleových kyselin, plní funkci ***při regulaci enzymové aktivity*** (fosforylace, defosforylace enzymů) a v krvi, moči a ve slinách se ve formě hydrogenfosforečnanů a dihydrogenfosforečnanů uplatňuje jako ***pufr.***

Člověk denně ve stravě přijímá obvykle více než 1000 mg fosforu. V tenkém střevě se z dietních zdrojů resorbuje asi 70 – 80 %. Absorpce fosforu je proporcionální jeho obsahu v potravě, částečně je regulována kalcitriolem. Kromě absorpce probíhá ve střevě i sekrece fosforu. Větší podíl fosforu je vylučován ledvinami (viz níže) a množství fosforu vyloučeného ledvinami je pod kontrolou parathormonu a fibroblastového růstového faktoru 23 (FGF-23) (obr. 4).

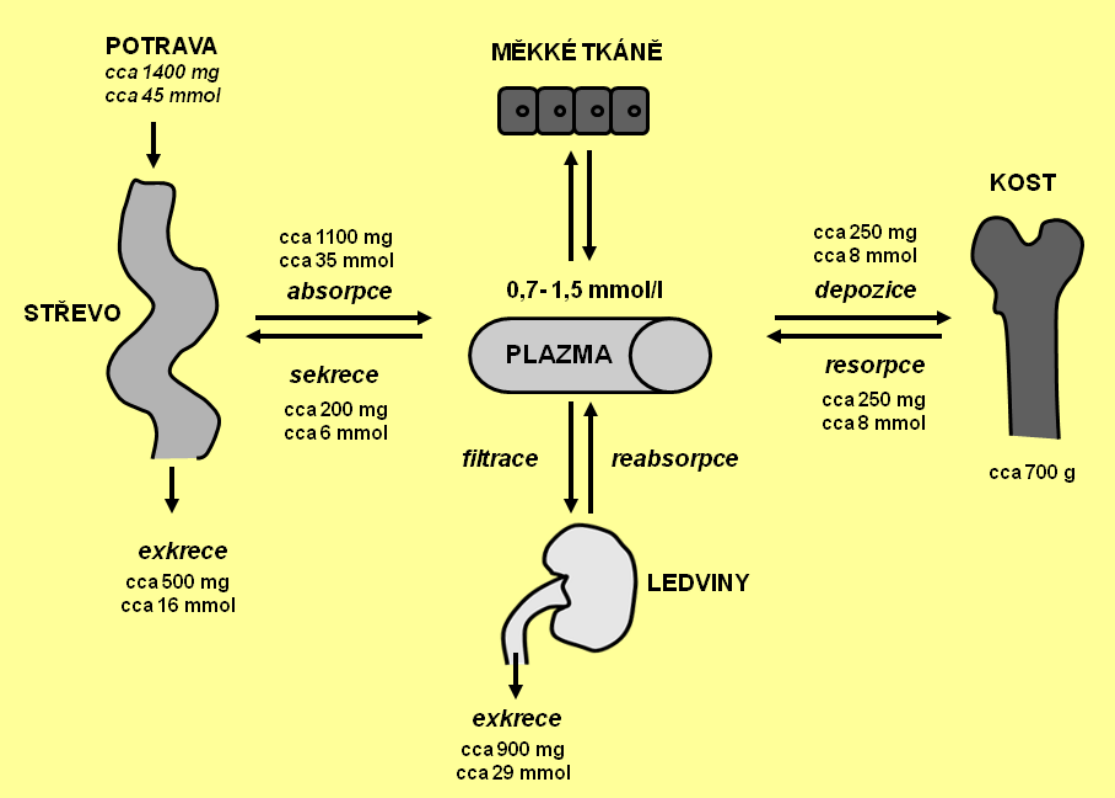
V těle dospělého člověka je obsaženo přibližně 700 g fosforu.
Fosfor se nachází:

- 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 (meziprodukty v metabolismu sacharidů, lipidů), včetně ATP, 2,3-difosfoglycerátu a cAMP. Fosfáty jsou nejzastoupenějšími intracelulárními anionty.

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 Přibližná denní bilance fosforu



3.2. Fosfor v séru

V séru je fosfor přítomen ve dvou hlavních formách:

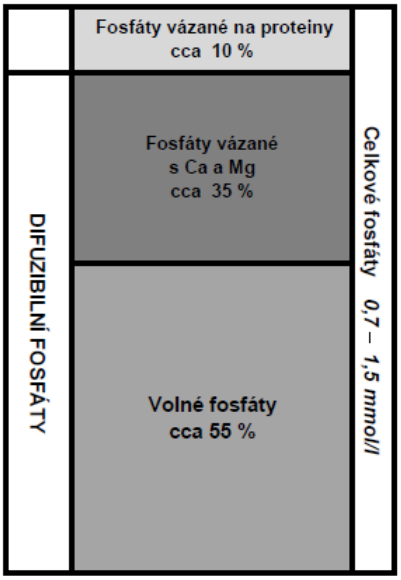
- organický fosfor (cca 70 %), který je součástí především fosfolipidů;
- anorganický fosfor (cca 30 %), který je většinou volný (ionizovaný) nebo vázaný s vápníkem a hořčíkem. Menší část fosfátů je vázaná na bílkoviny (rozdíl proti vápníku) (obr. 5). Pouze anorganický fosfát je běžně stanovován v klinicko-biochemických 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 kalciem. Těžká hyperfosfatemie 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 hyperfosfatemie 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.

Obr. 5 Formy fosforu v séru



Referenční hodnoty:
Koncentrace anorganických fosfátů v séru (S-anorganické fosfáty): **0,65 – 1,61 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 fosfát*** (TRP). Pro stanovení TRP není potřeba sbírat moč v přesně stanoveném období. Hodnoty TRP se snižují při hyperparatyreóze, při hypoparatyreóze stoupají.

Denní ztráty fosfátů moči, clearance fosfátů a tubulární resorpci fosfátů vypočteme podle následujících vzorců:

Ztráty anorganických fosfátů moči za 24 h:

dU-anorganické fosfáty (mmol/24 h) = U-anorganické fosfáty (mmol/l) x objem moči (l/24 h)

Clearance fosfátů

$$Cp = \frac{U_P \times V}{S_P}$$

U_P koncentrace fosfátů v moči
S_P koncentrace fosfátů v séru
V diuréza v ml/s

Tubulární resorpce fosfátů

$$TRP = 1 - \frac{U_P \times S_{Kr}}{S_P \times U_{Kr}}$$

S_{Kr} koncentrace kreatininu v séru
U_{Kr} 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: **16 – 64 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 molybdenanem amonným v kyselém prostředí,*** při níž vzniká bezbarvý fosfomolybdenanový komplex. Lze ho měřit přímo v UV oblasti nebo po přeměně na molybdenovou modř. Další modifikací je reakce fosfátů s molybdenanem amonným a vanadičnanem amonným. V tomto případě se vytváří žlutá kyselina molybdátovanadáto-fosforečná.

3.5 Rozpustnost fosforečnanu vápenatého

Rozpustnost fosforečnanu vápenatého je velmi důležitou vlastností, kterou musíme brát v úvahu u parenterální výživy. Při nevhodně připravené směsi hrozí vznik precipitátů fosforečnanu vápenatého, jehož přítomnost může vážně ohrozit pacienta. Stabilita roztoků obsahujících vápenaté a fosfátové soli závisí mimo jiné ***na hodnotě pH, na koncentracích fosfátů a kalcia a volbě solí vápníku a fosforu*** použitých v parenterální výživě.

- **Nižší pH** brání precipitaci fosforečnanu vápenatého. Úpravou pH k nižším hodnotám lze zvýšit zastoupení $Ca(H_2PO_4)_2$, který je dobře rozpustný ve vodě (18 g/l), na rozdíl od špatně rozpustného $CaHPO_4$ (300 mg/l). Okyselením je možné rozpustit již vytvořený precipitát. Naopak přidání hydrogenuhličitanu zvyšuje náchylnost k precipitaci.
- **Koncentraci fosfátů a Ca^{2+}** je třeba volit s ohledem na kalcium-fosfátový součin, který by neměl překročit hodnotu 75 (c^0 = mmol/l):

  Ca^{2+} (mmol/l) x fosfáty (mmol/l) < 75

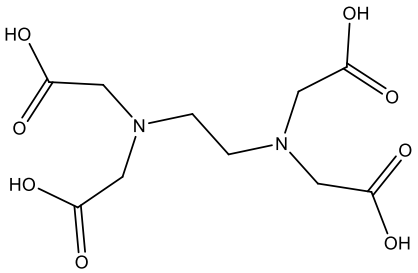
- Z hlediska druhu solí jsou jako zdroj monohydrogenfosforečnanů a dihydrogenfosforečnanů používány sodné nebo draselné soli. Nejméně náchylné k precipitaci jsou organické soli fosforu (např. glukosa-1-fosfát nebo glycerolfosfát). Zdrojem vápenatých iontů může být chlorid vápenatý. Podobně jako u fosfátů je ke kombinaci s fosfáty vhodnější zvolit také organickou sůl ve formě glukonátu vápenatého. Ca^{2+} v organické soli méně disociuje, a proto je nebezpečí vzniku precipitátu fosforečnanu vápenatého nižší.

Soli vápníku a tvrdost vody

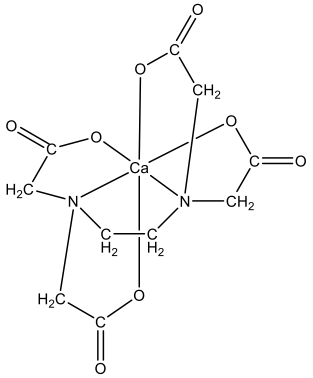
Celkový obsah vícemocných iontů kovů alkalických zemin rozpuštěných ve vodě se označuje jako tvrdost vody. Podílí se na ní především vápenaté a hořečnaté ionty. U pitné vody je vysoká tvrdost nežádoucí hlavně z technických důvodů – vede k usazování tzv. vodního nebo kotelního kamene na stěnách nádob a zařízení. Hlavně při zahřívání tvrdé vody se totiž vylučuje prakticky nerozpustný uhličitan vápenatý:

$$Ca^{2+} + 2HCO_3^- \rightarrow CaCO_3 + CO_2 + H_2O\ .$$

Tvorbě vodního kamene se často brání přídavkem kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA) do drogistických a kosmetických přípravků. EDTA působí jako chelátor, s vápenatými ionty vytváří velmi dobře rozpustné sloučeniny. Vápník je v nich pevně vázaný šesti koordinačně kovalentními vazbami, takže není dostupný pro tvorbu nerozpustného uhličitanu.



Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA)



Komplex EDTA s vápníkem

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;
- pro sledování účinnosti léčby;
- odlišení různých onemocnění skeletu.

.

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

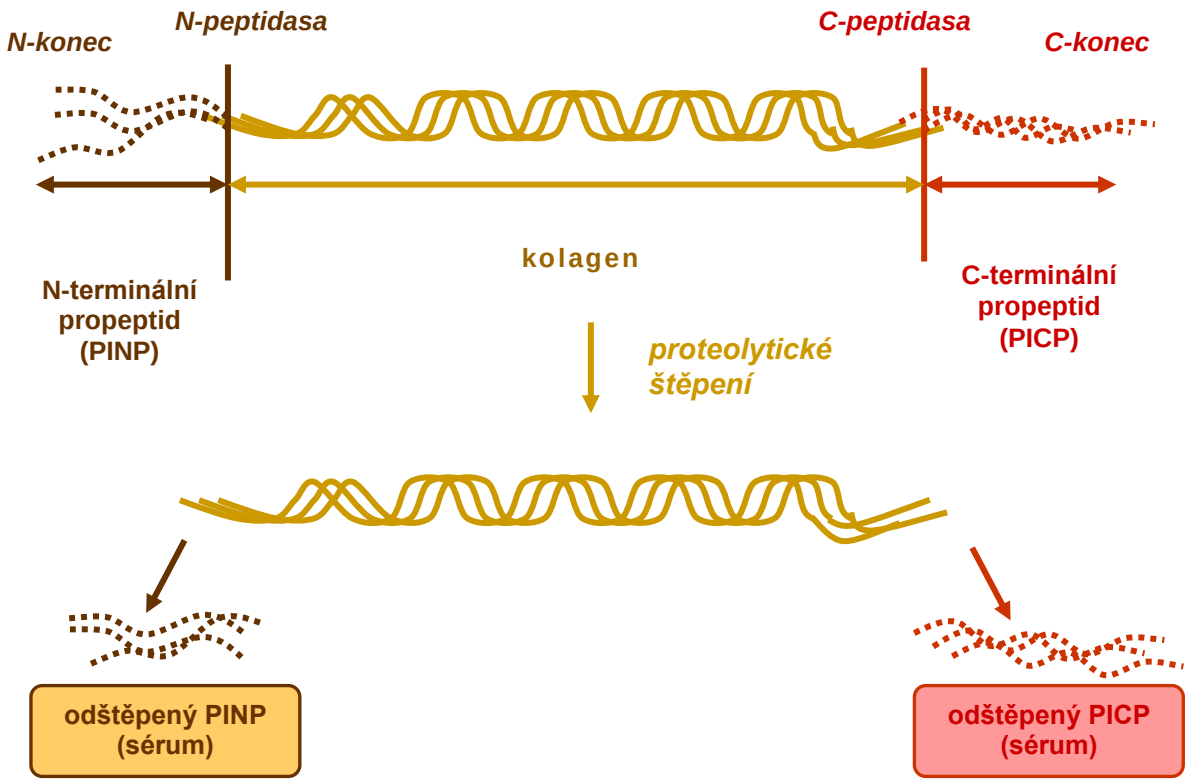
K ukazatelům novotvorby kostí patří tyto produkty osteoblastů v séru:

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

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). PINP lépe odráží aktivitu osteoblastů. V krvi se propeptidy prokolagenu PINP vyskytují ve dvou formách – jako intaktní PINP ve formě trimerů, které jsou vychytávány játry, nebo jako monomery, které jsou vylučovány ledvinami.

Obr. 7 Propeptidy prokolagenu



Osteokalcin

Osteokalcin představuje nejhojněji zastoupený nekolagenní kostní polypeptid, někdy označovaný jako BGP (bone gla protein)[1]. Má vysokou afinitu k hydroxyapatitu, jehož tvar a rozměry ovlivňuje. Syntéza osteokalcinu probíhá ***v osteoblastech***, zčásti se ukládá do extracelulární kostní matrix, zčásti přechází do oběhu. Je považován spíše za ukazatel celkového kostního obratu. Molekula je značně labilní a jeho stanovení je spojeno s některými problémy.

Alkalická fosfatáza (ALP) a její izoformy

Alkalická fosfatáza (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. Syntéza ALP je kódována čtyřmi různými geny. Produktem tkáňově nespecifického genu jsou *jaterní, kostní a ledvinová izoforma*. Ostatní tři geny kódují *placentární, střevní a další izoenzymy*. U zdravých dospělých jedinců tvoří kostní ALP, která je produkována ***osteoblasty,*** přibližně polovinu aktivity v séru, zatímco u dětí v období růstu je její podíl mnohem vyšší**.** 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 fosfatázy

Izoforma, popř. izoenzym ALP	Původ	Zvýšení katalytické koncentrace v séru - příklady	Poznámka
kostní	osteoblasty	• primární kostní nádory (osteosarkom) • sekundární kostní nádory (metastázy do kostí u karcinomu prostaty, prsu) • hojení kostních zlomenin • rachitis a osteomalacie • Pagetova choroba • hyperparatyreóza	• zvýšení je projevem zvýšené činnosti osteoblastů • u dospělého jedince tvoří zhruba polovinu celkové aktivity • u dětí především v růstovém období je podíl kostní ALP mnohem vyšší
jaterní	membrána hepatocytu, epitelie žlučových cest	• překážka odtoku žluči - obstrukce žlučových cest na podkladě cholelitiázy nebo nádoru • poškození hepatocytů • nádory jater	• při vysokých katalytických koncentracích jaterní izoformy se může prokázat další izoforma s odlišnou elektroforetickou pohyblivostí
střevní	enterocyty	• některá zánětlivá onemocnění střev	• 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		• fyziologicky ve 3. trimestru těhotenství • je termostabilní
atypické	některé nádory		• např. Reaganův izoenzym

Princip stanovení alkalické fosfatázy

Fosfatázy 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 fosfatáza tyto reakce:

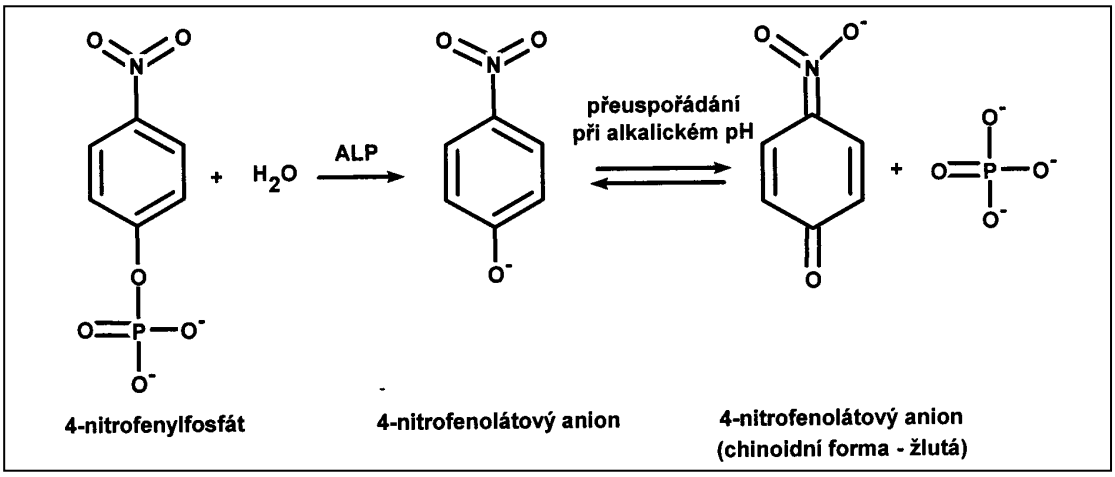
1. hydrolýza

4-nitrofenylfosfát + H_2O $\rightleftharpoons$ 4-nitrofenol + fosforečnan

2. transfosforylace (přenos fosfátové skupiny)

4-nitrofenylfosfát + N-methyl-D-glukamin $\rightleftharpoons$ 4-nitrofenol + N-methyl-D-glukaminfosfát

Obr. 6 Princip stanovení katalytické aktivity alkalické fosfatázy



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 hydrolýzy 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 fosfatázy

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

Metody stanovení izoenzymů ALP využívají rozdílů v elektroforetické pohyblivosti nebo selektivní inaktivace některých izoenzymů (odlišná citlivost na teplo, inhibice fenylalaninem, leucinem nebo močovinou).

Dále 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 µkat/l (S-ALP):

dospělí **0,66 – 2,2 µkat/l**

Kostní izoenzym ALP:

dospělí **< 1,1 µkat/l**

děti **< 7,5 µkat/l**

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;***
- ***kostní izoenzym kyselé fosfatázy;***
- ***hydroxyprolin v moči.***

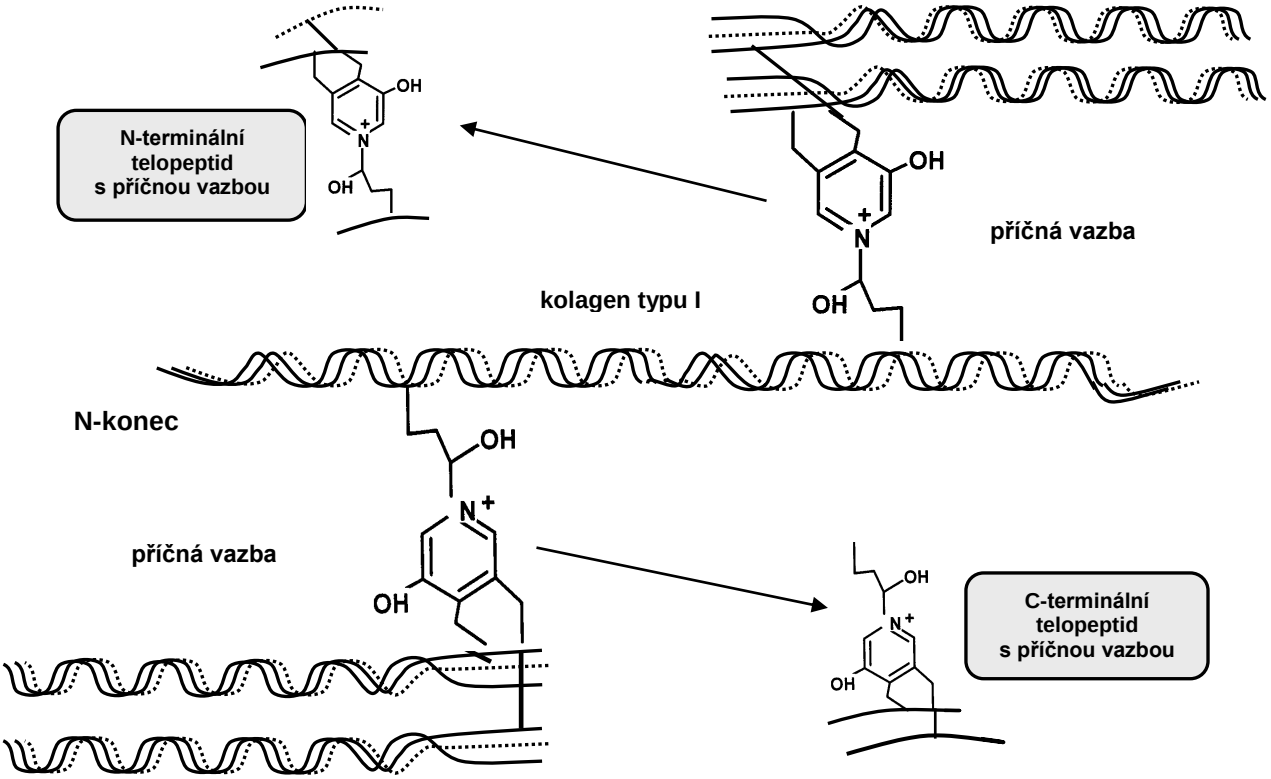
Pyridinolin a deoxypyridinolin (Pyr a Dpyr) a degradační fragmenty kolagenu typu I

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. Deoxypyridinolin je považován za specifický produkt odbourávání kolagen typu I v kostech. Při degradaci kolagenu se příčné spojky uvolňují do krevního oběhu a přestupují do moči. V oběhu jsou pyridinoliny a deoxypyridinoliny přítomné jako ***součásti koncových úseků kolagenu*** nebo ***jsou volné.***

Produktem štěpení v C-koncové oblasti kolagenu typu I je ***karboxyterminální cross-links kolagenu typu I (CTX-I)*** nebo ***C-terminální telopeptid kolagenu typu I*** (ICTP). CTX-I vzniká odbouráváním kolagenu pomocí katepsinu K, naopak ICTP se z kolagenu odštěpuje působením jiných proteolytických enzymů, které patří k matrixových metaloproteinázám. Podobné produkty se uvolňují i při degradaci N-koncové části kolagenu typu I a označují se jako ***aminoterminální cross-links kolagenu typu I (NTX-I)*** a ***aminoterminální telopeptid kolagenu typu I*** (INTP) (obr. 8). Dalším odbouráváním telopeptidů se mohou uvolňovat samotné pyridinoliny a deopyridinoliny. Jejich koncentrace nezávisí na přítomnosti kolagenu v potravě.

Ke stanovení těchto parametrů v séru, plazmě popř. moči jsou využívány buď imunochemické metody nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Obr. 8 Telopeptidy kolagenu typu I
(upraveno podle Calvo et al., Endocrine Review,17, 333 – 366, 1996)



Kyselá fosfatáza (ACP) a její kostní izoenzym

Kyselá fosfatáza (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 lyzosomálního enzymu, který je secernován do oběhu během kostní

resorpce. Na rozdíl od výše uvedených ukazatelů kostní resorpce se nevylučuje ledvinami, takže stanovení kostního izoenzymu je cenné u pacientů s poškozením ledvin.

- ***Prostatický*** – není normálně přítomen, objevuje se při karcinomu či hyperplasii prostaty, je citlivý vůči vInanu.
- ***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 fosfatáza na fosfát a 4-nitrofenol. Pro stanovení kostního izoenzymu ACP jsou k dispozici diagnostické soupravy využívající imunochemické metody.

Referenční hodnoty:
Celková katalytická koncentrace ACP v plazmě:
muži: **0 – 108 nkat/l**
ženy: **0 – 92 nkat/l**
Prostatický (tartarát-labilní) izoenzym ACP: muži **0 – 43 nkat/l**

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 dále ovlivněna dietním příjmem kolagenu (maso, vývary z masa, želatina). Z těchto důvodů se hydroxyprolin dnes již jako ukazatel odbourávání kosti neužívá, upřednostňují se výše uvedené markery.

Odborné společností doporučují jako základní ukazatel kostní novotvorby stanovovat PINP – N-terminální propeptid prokolagenu typu I a jako základní ukazatel kostní resorpce CTX-I – C-terminální cross-links kolagenu typu I.

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 systémové metabolické onemocnění skeletu. 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 kterou se setkáváme zejména v průmyslově vyspělých zemích. 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), který nekalcifikuje nebo jen zvolna. ***Rachitis (křivice)*** je termín označující osteomalacii u dětí, neboť rozvoj křivice je podmíněn růstem kostí.

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

Pro osteomalacii je typický laboratorní nález:

- ***nízká kalcemie;***
- ***nízká fosfatemie;***
- ***vysoká katalytická koncentrace alkalické fosfatázy, 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 strukturně neplnohodnotná kost. Je zvýšen počet osteoklastů i osteoblastů. Postižena může být jedna nebo více kostí. V biochemickém nálezu dominuje ***zvýšená hodnota alkalické fosfatázy (především kostní izoformy).*** Užitečné je i stanovení markerů kostní remodelace.

Použitá literatura:

1. *Blahoš, J.:* Osteoporóza. Galén, Praha, 1. vydání 1995
2. *Broulík P.*: Poruchy kalciofosfátového metabolismus. Grada Publishing, Praha 2003.
3. *Bubnová E., Buděšínská A., Křemen J., Stříbrná J.:* Praktická cvičení z lékařské chemie a biochemie, část III. Karolinum, Praha 1998.
4. *Burtis C.A., Ashwood E.R.*: Tietz Textbook of Clinical Biochemistry, 2nd edition. W.B.Saunders Company, Philadelphia 1994.
5. *Doležalová V. a kolektiv*: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. IDVPZ, Brno 1995.
6. *Dzúrik R. a kolektiv*: Štandardná klinickobiochemická diagnostika. Osveta, Martin 1996.
7. *Chromý V., Fischer J.:* Analytické metody v klinické biochemii. Masarykova universita, Brno 2002.
8. *Jabor A. a kolektiv*: Vnitřní prostředí. Grada, Praha, 1. vydání, 2008.
9. *Kaplan L.A, Pesce A.J.*: Clinical Chemistry. Theory, Analysis, Correlation. 3rd edition. Mosby 1996.
10. *Kolektiv autorů*: Lékařská chemie a biochemie. Praktikum. Avicenum, Osveta, Praha 1991.
11. *Kraml J. a kolektiv*: Návody k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie. Karolinum, Praha 1991.
12. *Masopust J.:* Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření I. a II. část. Karolinum, Praha 1998.
13. *Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.*: Harperova biochemie. H+H, Praha 1998.
14. *Pikner R et al*. Markery kostního obratu u osteoporózy: společné stanovisko k jejich využití SMOS ČLS JEP a ČSKB ČLS JEP, Klin. Biochem. Metab., 28 (49), 2020, No. 2, p. 48–63.
15. *Racek J. a kolektiv:* Klinická biochemie. Galén-Karolinum, Praha 1999, 2021.
16. *Schneiderka P. a kolektiv*: Stanovení analytů v klinické biochemii 1. část. Karolinum, Praha 1998.
17. *Schneiderka P. a kolektiv*: Vybrané kapitoly z klinické biochemie. Karolinum, Praha 1998.
18. *Táborská E. a kolektiv:* Návody ke cvičením z biochemie. Masarykova universita, Brno 1993.
19. *Teplan V.* a kol.: Praktická nefrologie. Grada Publishing 2006.
20. *Thomas L.*: Clinical laboratory diagnostics. TH-Books, Frankfurt/Main, Germany 1998.
21. *Tichý V.*: Stanovení aktivity kostní frakce alkalické fosfatasy pomocí termoinaktivace. Klin. Biochem. Metab. 6, 194 – 195,1998.
22. *Voet D., Voetová J. G.*: Biochemie.Victoria Publishing, Praha 1995.
23. *Zadák Z.*: Výživa v intenzivní péči. GRADA Publishing, Praha 2002.
24. *Zima T. a kolektiv*: Laboratorní diagnostika. Galén, Praha 3. vydání 2013.

Metodická poznámka ke stanovení ALP

Stanovení koncentrace katalytické aktivity enzymů

Při stanovení katalytické koncentrace aktivity enzymu je nezbytné, aby v reakční směsi byl nadbytek substrátu, popř. koenzymu. Tomu zpravidla odpovídá přibližně deseti- až dvacetinásobek hodnoty Michaelisovy konstanty pro daný substrát. Za této podmínky je veškerý enzym nasycen substrátem a rychlost reakce nezávisí na koncentraci substrátu, ale pouze na koncentraci enzymu. Enzymově katalyzovaná reakce probíhá kinetikou nultého řádu. Koncentrace produktu roste lineárně.

Rychlost přeměny substrátu na produkt můžeme sledovat **kinetickým měřením.** Jinou méně vhodnou možností je měření přírůstku produktu až po uplynutí určitého konstantního času – **stanovení v konstantním čase (fixed time).**

Je možno monitorovat i koncentraci koenzymu. V případě měření změny koncentrace NAD^+/NADH hovoříme o optickém testu (viz stanovení laktátdehydrogenasy nebo aminotransferas).

Kinetické stanovení

Kinetický způsob měření katalytické koncentrace enzymu je v klinicko-biochemických laboratořích využíván nejčastěji.

Při tomto způsobu sledujeme rychlost enzymové reakce kontinuálním měřením absorbance nebo měřením absorbance za časovou jednotku. Tomu odpovídá přírůstek produktu (produktů) nebo úbytek reaktantu (reaktantů). V případě manuálního provedení hodnotíme změnu absorbance v několika pravidelných časových intervalech, obvykle jednominutových. Na začátku enzymové reakce nemusí být rychlost konstantní – mluvíme o lag fázi. Proto měření zahajujeme až po uplynutí lag fáze, tedy v čase, kdy rychlost reakce je již konstantní.

Kontinuální sledování katalytické aktivity enzymu umožní včas zaznamenat odchylku od lineárního průběhu reakce. Tato situace může nastat u vzorků s vysokou aktivitou enzymu, kdy hrozí vyčerpání substrátu, popř. koenzymu v reakční směsi.

Stanovení v konstantním čase (fixed time)

Při stanovení koncentrace katalytické aktivity v konstantním čase necháme enzymovou reakci probíhat definovanou dobu a poté reakci zastavíme inhibitorem, změnou pH popř. jiným způsobem. Automatické analyzátory v klinicko-biochemických laboratořích umožňují přesné dodržení potřebné reakční doby, takže není zapotřebí reakci zastavovat. Poté je určena koncentrace produktu vytvořeného v průběhu dané reakce. Spolehlivost metody předpokládá, že rychlost tvorby produktu je v průběhu inkubace konstantní. Nevýhodou je, že při tomto způsobu měření není možné ověřit linearitu průběhu. Proto se pro stanovení enzymů dává přednost kinetickým stanovením.