

SLEDOVÁNÍ LÁTKOVÉ PŘEMĚNY A FUNKCE ORGÁNŮ

POMOCÍ RA IZOTOPŮ I ALTERNATIVNÍCH METOD

PROF. RNDr Richard PETRÁSEK, CSc.

**Přírodovědecká fakulta MU
Brno
2006**

I. ÚVOD

Sledování přeměny látkové, její úrovně a jejích změn pod vlivem nejrůznějších fyziologických (věk, pohlaví, teplota, výživa, a pod.) i patofyziologických (např. různá onemocnění) podmínek představuje jednu z nejdůležitějších otázek srovnávací fyziologie.

Pokud chceme sledovat funkci orgánů a v nich probíhající přeměnu látkovou, stojí před námi poměrně složitý úkol, vyžadující většinou porušení integrity organismu.

Pro sledování přeměny látkové můžeme předně použít výsledného, celkového ukazatele - např. přibývání množství bílkovin, stejně množství glykogénu či tuku v těle a pod. Uvedený přístup je v experimentu možný tím způsobem, že po určité době či v určitých časových intervalech sledujeme hladinu určité látky. Tato metoda je omezena možnostmi stanovení - vážkovým stanovením, fotometrickým stanovením a podobně.

Pokrok představuje stanovování určitých výchozích látek resp. konečných produktů v jednom oddíle těla, který je přístupný i opakovaným odběrům, tj. v krvi. Tímto způsobem je možné nejen na zvířecích modelech, ale i u člověka, stanovovat hladinu různých látek - např. glukózy, bílkovin a jejich frakcí, podobně různých lipidových látek. Stále však zůstáváme na úrovni sledování výsledků, ale nikoliv jednotlivých kroků těchto přeměn, většinou v omezené míře můžeme sledovat skutečně dynamiku dějů. Tento přístup má však stále svoji důležitost, např. dusíková bilance, tj. analýza přívodu dusíku a jeho vylučování.

Dalším rozvojem fyziologických a biochemických metodik se můžeme od úrovně celého organismu dostávat na úroveň orgánovou (studium izolovaných orgánů), buněčnou (tkáňové kultury) až subbuněčnou, tj. až ke studiu reakcí v buněčných orgánech a jednotlivých enzymových systémech.

Stále však setrváváme ve stadiu, kdy sice známe vstup a výstup, neznáme ale celý děj. Nemáme možnost se podívat, bez porušení integrity organismu, pod povrch - podívat se na činnost jednotlivých orgánů a na průběh jednotlivých přeměnných pochodů v nich.

Proto bylo vždy cílem vědců označit si nějakým způsobem určitý metabolický děj a potom, podle tohoto značkovače, sledovat další osud této látky, sledovat v dynamice i činnost a celkový stav jednotlivých orgánů a pod. Tento požadavek dokonale splnily neradioaktivní a zejména radioaktivní izotopy prvků, které se účastní v metabolických pochodech a sloučeniny těmito izotopy označené.

Stejného principu lze použít i pro sledování velikosti a funkce orgánů.

V našich skriptech chceme podat informaci o užití zejména radioaktivně značených látek pro sledování přeměny látkové a její dynamiky, pro metabolismus důležitých látek či pro činnost jednotlivých orgánů. Užití radioaktivních či stabilních izotopů však není jedinou

možností volby pro tyto účely, proto vždy uvádíme i hlavní alternativní metodiky.

Vzhledem k tomu, že specialisté ve srovnávací fyziologii často pracují i ve zdravotnických zařízeních, jsou uváděny v různých částech skript i pasáže týkající se možnosti stanovování různých parametrů látkové přeměny u člověka.

Předpokládáme alespoň bazální znalosti o radiochemii, proto jsou příslušné teoretické pasáže krátké a někdy úmyslně zjednodušené. Stejně tak skripta předpokládají určité znalosti z biochemie a fyziologie resp. patofyziologie.

Ve skriptech si postupně probereme:

- základy o stavbě atomů
- izotopy stabilní a radioaktivní
- druhy a podstata jednotlivých typů radioaktivního záření,
- přirozené a umělé jaderné přeměny
- principy metod se stabilními a radioaktivními izotopy a malá historie jejich vývoje
- základní podmínky pro užití RA izotopů - (výroba těchto izotopů a příprava značených sloučenin)
- možnosti měření rozpadu RA izotopů (hlavní typy přístrojů pro měření RA izotopů včetně vyhodnocovacích postupů)
- v dalších částech skript si v kostce probereme možnosti metodik využívajících RA izotopy pro sledování činnosti jednotlivých důležitých orgánů a funkcí v organismu a to přístupy in vitro a in vivo
- podrobněji si pak řekneme o RIA metodikách a o hlavních metodách ke sledování metabolismu
- nakonec si probereme příklady toho, jak lze pomocí značených látek sledovat určité problémy přeměny látkové

II. ZÁKLADY PRÁCE S IZOTOPY - RADIOAKTIVNÍMI I STABILNÍMI

Dříve, než si podrobněji uvedeme jednotlivé možnosti sledování funkce orgánů a přeměny látkové, je třeba si krátce zopakovat některé údaje o stavbě atomů, stabilních i radioaktivních izotopech a o jaderných přeměnách. Pak si můžeme již říci o principech přípravy takových látek, které nám umožní sledovat, a to v průběhu času (v určité časové dynamice) sledovat pochody látkové přeměny resp. funkce jednotlivých orgánů. Nakonec pak zbývá probrání možnosti měření pochodů, které to stanovení umožňují.

Nezbytné je rovněž říci si něco o hygienických problémech, spjatých zejména s užitím radioaktivních (RA) izotopů.

II.1. Základní údaje o stavbě atomů a jaderných přeměnách

II.1.1. Základní pojmy

Úvodem si probereme či zopakujeme některé základní pojmy:

MOLEKULY - nejmenší částice látky, které zachovávají její složení a chemické vlastnosti.

ATOMY - částice, z nichž se skládají molekuly. Původně se předpokládalo, že jsou dále nedělitelné, postupně se prokázalo, že mají řadu dalších částic.

Pro začátek - pro pochopení látky, kterou budeme probírat, stačí 3 základní (zájemci o podrobnější a také správnější údaje o stavbě atomů odkazují na speciální skripta či učebnice, např. Navrátil (1988). Zjednodušenou představu o stavbě atomu viz obr. č. 1.

Množství elektronů = množství protonů = protonové číslo - Z (dříve atomové číslo).

Množství protonů + neutronů = hmotnostní číslo - A (dříve atomová váha).

Příklady: vodík 1H1 1 P + 1 E
helium 4He2 2 P(+ 2 N) + 2 E
lithium 7Li3 3 P(+ 4 N) + 3 E
P.... proton, E.... elektron, N.... neutron

Chemické vlastnosti neurčuje hmotnostní číslo, ale protonové číslo. Stejně chemické vlastnosti mají tedy i atomy se stejným počtem elektronů (a tedy i protonů), ale odlišným počtem neutronů.

Atomy, které mají rozdílné hmotnostní číslo, ale stejné protonové číslo, nazýváme - izotopy.

Příklady: vodík se vyskytuje ve 3 izotopech:

1H1 2H1 3H1
deuterium tritium

podobně uhlík - ^{12}C , ^{13}C , ^{14}C

Uvidíme později, jak se tyto izotopy dále dělí podle toho, zda podléhají radioaktivnímu rozpadu či nikoliv, tj. zda jsou stabilní či radioaktivní (tj. takové, v jejichž jádře dochází k přeměnám).

Velice brzy po sobě byly koncem 19. tého století učiněny dva velké objevy: v r. 1895 byly objeveny tzv. Rontgenovy paprsky, v r. 1896 pak Becquerelem radioaktivita. Becquerel zjistil, že uranové soli vyzařují zvláštní paprsky, pronikající černým papírem chránícím fotografickou desku před světlem. Učení o radioaktivních prvcích bylo dále rozpracováno slavnou Marií Curie – Skłodowskou a jejím manželem, Pierrem Curie, kteří izolovali z uranových solí dva nové prvky - radium a polonium.

Při studiu nového záření si položili otázku : je toto záření jednotné a jaká je jeho povaha - viz obr. č. 2.

Pronikavost jednotlivých typů záření:

alfa - záření : zachyceno papírem

beta - záření : olovem o síle 1 mm či hliníkem o síle 4 mm zachyceno

gama - záření : proniká dále přes tuto překážku

Povaha jednotlivých typů záření:

alfa - záření : jsou to částice mající protonové číslo 2 a hmotnostní číslo 4 (jádra helia) - potvrzeno Rutherfordem

beta - záření : jsou to elektrony (záporný náboj 1, hmota 1840 krát menší než jádro vodíku)

gama - záření : jsou to elektromagnetické vlny, fotony (atomy zářivé energie, liší se navzájem obsahem energie)

II.1.2 Přirozené jaderné přeměny

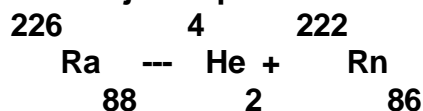
Přirozené jaderné přeměny patří do přeměn, kterým podlé-

hají jádra atomů. Jádro podléhající přeměně může být radioaktivní buď přirozeně nebo uměle. Jako přirozenou radioaktivitu bereme jaderné reakce, které se odehrávají bez zásahu člověka.

Pro jednotlivé základní typy jaderných přeměn uvádíme následující příklady :

a) alfa - rozpad

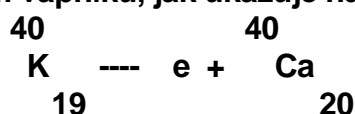
Radium, uzavřené v hermetické nádobě tam vytvářelo dva prvky, a to částice helia a radonu. Jde tedy o alfa - rozpad, který lze zapsat následujícím způsobem:



Můžeme udělat závěr, že při alfa - rozpadu z jádra izotopu vzniká jádro jiného izotopu, jehož protonové číslo Z bude menší o dvě jednotky a hmotnostní číslo A o 4 jednotky nižší než výchozí prvek.

b) beta - rozpad

Draslík (K) se rozpadá odlišně, než radium, a to na elektron a na atom vápníku, jak ukazuje následující vzorec:



Z tohoto příkladu můžeme vidět, jak probíhá beta - rozpad: když jádro s protonovým číslem Z a hmotnostním číslem A vyvrhne elektron, vzniká nový izotop, jehož Z je o 1 jednotku větší a A je stejné jako u výchozího prvku.

c) gama - rozpad

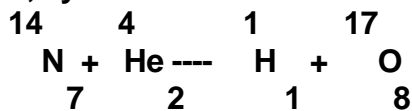
Částice (kvanta) vlnění nejsou nabita a jejich hmota je malá, proto jádro při vyzáření nemění ani protonové číslo Z ani hmotnostní číslo A. Nedochozí tedy - na rozdíl od rozpadu alfa či beta - vlastně k jaderné přeměně. Jádro, aby uvolnilo kvanta, musí být v excitovaném stavu a návrat k normálnímu stavu je doprovázen zářením gama. Zmenšuje se přitom energie jádra.

V excitovaném stavu jsou jádra obvykle po alfa či beta rozpadu, proto gama - záření většinou doprovází alfa či beta rozpad.

II.1.3 Umělé jaderné přeměny

Již jsme si uvedli, že v přírodě se vyskytují izotopy s nestálými jádry samovolně se rozpadajícími. Pokusy o umělou jadernou přeměnu přirozeně stálých jader byly neúspěšné až do r. 1919, kdy Rutherford po bombardování jádra dusíku částicemi alfa dosáhl rozštěpení jádra tohoto prvku a jeho přeměny na

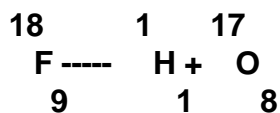
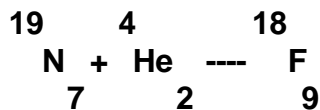
jiný prvek, kyslík.



Zdrojem alfa částic bylo polonium, tedy radioaktivní prvek, tyto částice vyzařující. Později byla obdobně jako dusík užita jiná lehká jádra prvků, např. F, Si, S či K.

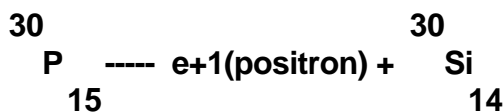
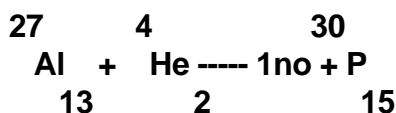
Všechny umělé jaderné reakce probíhají ve dvou etapách:

- do jádra proniknou částice alfa a tím vznikne nové přechodné jádro
- přechodné jádro uvolňuje proton (či jinou částici) a mění se v nové jádro



Vznik umělých radioaktivních jader

Problém přeměny neradioaktivních jader na radioaktivní vyřešili až v r. 1934 Frederic a Irene Joliot - Curie (dcera a zeť Marie Curie).



(positrony se liší od elektronů pouze znaménkem náboje, positron není obsažen v jádře, vzniká přeměnou protonů na neutron).

Uměle bylo získáno postupně asi 300 stabilních izotopů a 700 radioaktivních.

II.1.4 Princip užití metod s radioaktivními a stabilními izotopy

Po chemické stránce existují stejné vlastnosti stálých i radioaktivních izotopů (mají stejné protonové číslo!!). Chování radioaktivního (RA) izotopu se tedy neliší, jeho pohyb v organismu však lze stopovat tím, že zachycujeme záření vzniklé při jejich jaderných přeměnách. Proto nám RA izotopy umožňují zkoumat přeměnu látek, jejich zadržování v organismu (léky!) a pod.

Obdobně je užíváno v některých studiích i izotopů stabilních, jejich detekce se však děje na základě jejich odlišné hmotnosti (hmotové spektrografy).

I.1.5 Historie užití RA izotopů v biologii a lékařství

Izotopová (značkovácí) metoda, která později umožnila podrobně a citlivě sledovat metabolické pochody, pochází již ze začátku 20. století, ještě před I. světovou válkou. Tato metoda je spojena s Ústavem pro anorganickou a fyzikální chemii ve Vídni (při prvním jejím užití šlo o rychlost výměny atomů mezi pevnými látkami a solemi) a se jménem Hevesyho.

Až v r. 1923 byla metodika užita ke sledování živých systémů, opět Hevesyho, který studoval přijímání olova rostlinami. Hevesy se i v dalších letech se svými spolupracovníky a jinými autory soustředil na metabolismus olova, vizmutu, polonia a thoria - tedy prvků s přirozenými RA izotopy.

Abychom neupřeli prioritu, pokud jde o sledování živých organismů pomocí RA izotopů, tak již v r. 1904 byly prováděny pokusy se zvířaty pokud jde o ukládání polonia a radia (např. London), tyto studie měly však toxikologický ráz, nešlo tedy o sledování metabolismu těchto látek. Hevesy tedy má skutečný primát pokud jde o metabolická sledování.

Další rozvoj značkovácí izotopové metody nastal v polovině třicátých let - umožnil to objev deuteria a zejména objev umělé radioaktivity. Tím bylo umožněno rozšířit studium z těžších RA izotopů na lehčí, zapojené přímo do metabolických pochodů - H, C, S atd. Je příznačné, že opět se uplatnil jako první Hevesy - jde o práce s tzv. těžkým vodíkem, deuteriem, pak následovaly práce s fosforem.

Pravý rozvoj izotopové metodiky nastal po II. světové válce. Jaderný reaktor a cyklotrony umožňovaly produkci levných radionuklidů, zdokonalují se měřicí aparatury - od jednoduchých Geiger-Müllerových trubec se vyvíjejí v polovině padesátých let až scintigrafické kamery.

V této době, tj. v padesátých letech, se rozbíhá také užívání izotopů u nás - v r. 1951-60 vznikají první biologická a lékařská pracoviště užívající izotopy - na ČSAV, na VŠ, zejm. LF a jinde. V současné době se dělá cekem, včetně vyšetření in vitro, více než 1 milion vyšetření za rok pouze na lékařských ústavech, další vyšetření pak probíhají na biologických, zemědělských či veterinárních pracovištích.

II.1.6 Radioaktivní rozpad

Rozpadem se množství RA atomů stále zmenšuje. Množství aktivních atomů ubývá podle rozpadové rovnice:

$$N_t = N_0 \cdot e^{-\lambda t}$$

N ... počet atomů (N_t v čase t , N_0 v čase 0)

λ ... změna

λ ... konstanta rozpadu v sekundách

e ... základ přirozených logaritmů

Rychlost radioaktivní přeměny je tedy dána změnou počtu atomů, resp. množství atomů rozpadlých za určitou dobu (sekundu) je úměrné množství daných aktivních atomů. Smysl pravidla je takový, že jestliže se z 10 000 atomů rozpadne za 1 sekundu 100, tj. 1%, pak z 5 000 atomů je to také 1%, tj. 50 atomů.

Pro každý RA izotop má konstanta rozpadu jinou hodnotu, např. za 1 sekundu se rozpadá 1.35×10^{11} na 11 atomů radia, 5.6×10^7 na 7 atomů fosforu či 1.29×10^5 na 5 atomů sodíku.

Je nutno říci si něco o pojmech, které RA rozpad charakterizují :

Aktivita - počet rozpadů za 1 sekundu; je tím větší, čím k většímu počtu rozpadů za sekundu dochází. Aktivita (A) závisí na množství látky (N) a na konstantě rozpadu:

$$A = N \cdot \lambda$$

Jako jednotka aktivity se užívá 1 curie (Ci), v preparátu, který má tuto aktivitu, dochází za sekundu k $3,7 \times 10^{10}$ rozpadům jader. V praxi biomedicíny se užívají jednotky menší a to :

$$1 \text{ m Ci} = 1/1000 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^7 \text{ /sek.}$$

$$1 \text{ u Ci} = 1/1000 \text{ 000 Ci} = 3,7 \times 10^4 \text{ /sek.}$$

V naší literatuře se používá jednotka Becquerel (Bq).

V preparátu, který má tuto aktivitu dochází k 1 rozpadu jádra za sekundu. To by bylo zase příliš malá jednotka, proto se užívají jednotky o 3, 6 až 9 řádů vyšší :

$$1 \text{ Bq} = 10^0 \text{ rozpadů}$$

$$1 \text{ kBq} = 10^3 \text{ rozpadů}$$

$$1 \text{ MBq} = 10^6 \text{ rozpadů}$$

$$1 \text{ GBq} = 10^9 \text{ rozpadů}$$

$$\text{Přepočet: } 1 \text{ u Ci} = 37 \text{ kBq}$$

$$1 \text{ m Ci} = 37 \text{ MBq}$$

$$1 \text{ Ci} = 37 \text{ GBq}$$

Specifická aktivita = aktivita 1 g RA látky, měří se počtem rozpadů za 1 sekundu v 1 g RA látky nebo počtem Ci (Bq) v 1 g RA látky.

Poločas rozpadu = časový interval, ve kterém se aktivita RA prvku zmenší na 1/2 - viz obr. č. 3.

Vztah mezi konstantou rozpadu a poločasem rozpadu : Čím větší je konstanta rozpadu, tím kratší je poločas rozpadu a naopak.

II.2 Příprava RA izotopů a sloučenin

Pro jakoukoliv práci s RA izotopy je základní podmínkou předně získání potřebného RA izotopu a dále pak výroba RA značené sloučeniny vhodné pro sledování určitého pochodu v organismu.

II.2.1 Příprava značených izotopů

**Radioaktivní izotopy můžeme připravovat trojím způsobem (Di-
enstbier a sp., 1989):**

- v jaderném reaktoru**
- v cyklotronu**
- v generátorech**

a) V jaderném reaktoru (viz obr. č. 4) probíhá řízená jaderná reakce z jader přirozených RA izotopů (uran, plutonium).

Uvolňují se při tom neutrony. Těmi se pak bombardují jádra přirozených stabilních izotopů a získávají se tak RA izotopy, např. ^{59}Fe , ^{60}Co , ^{75}Se , ^{125}Xe , ^{169}Yb , ^{198}Au .

Nebo dochází k emisi β či alfa částice a získává se prvek o 1 či 2 místa vlevo v soustavě, tak získávají ^{14}C , ^{32}S , ^{32}P , ^{35}Cl , ^{35}S .

Konečně izotopy vznikají štěpením uranu, tak vzniká na příklad ^{131}I , ^{133}Xe .

Výhody : možno připravit větší množství, proto levné.

Nevýhody: nelze takto připravit všechny izotopy, u řady prvků je nízká specifická aktivita.

b) V urychlovačích částic (cyklotron) - jaderným částicím se uděluje vysoká kinetická energie (viz obr. č. 5).

Získává se tak ^{67}Ga , ^{201}Tl , ^{123}I , ^{111}In .

Výhoda : vysoká spec. aktivita.

Nevýhoda: zpracovává se menší množství prvku a výsledné produkty jsou proto drahé.

c) V generátorech - v nejpoužívanější formě jde o malou chromatografickou kolonku, kde je na vhodném sorbentu mateřský radionuklid a z něj se produkuje dceřinný (viz obr. č. 6).

Takto se získává např. ^{99}Mo , ^{99}Tc (10-15 dnů možno užívat), ^{113}Sn , ^{113}In (1/2 roku).

II.2.2 Příprava značených sloučenin

Připravené radionuklidy jsou pak užívány ke sledování stavu orgánů a přeměny látkové ve formě vhodných značených sloučenin. Tyto sloučeniny mají nahrazen buď jednotlivý atom radioaktivním atomem (podobně to mohou být skupiny atomů) nebo se tvoří komplexy některých kationtů RA prvků s různými sloučeninami. Stejně jako látka bez RA izotopů se takto označená látka chová pouze tehdy, když při jejím značení nedochází ke změně struktury sloučeniny.

V jiném případě vzniká sloučenina, jejíž chování může být dost podobné chování neznačené sloučeniny, existují však určité rozdíly, které musíme brát v úvahu.

Nejčastějším způsobem přípravy značených sloučenin je chemická syntéza, při čemž jedna z komponent reakční směsi je radioaktivní. Pro dosažení co nejvyššího výtěžku, omezení ztrát radioaktivity i z hlediska bezpečnosti práce je nejvýhodnější, aby radioaktivní látka byla použita co možná ke konci reakce. Výhodné rovněž je, aby syntéza probíhala jednostupňově.

Tímto způsobem se připravují zejména sloučeniny obsahující RA izotopy ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{75}Se , ^{99}Tc , 113 (či $^{111})\text{In}$.

Další možností je izotopová výměnná reakce, při které dochází k výměně radioaktivního atomu či celé skupiny obsahující radioaktivní atom za neradioaktivní část molekuly sloučeniny. Probíhá vždy v jednom reakčním stupni a získané produkty jsou také proto připravovány ve vysoké čistotě, zpracovává se přitom i minimální množství látky. Nevznikají též vedlejší produkty. Této metody se užívá především u halogénů - tj. ^{77}Br a ^{131}I - podobně je užívána i pro přípravu karboxylových sloučenin značených 13 (či $^{14})\text{C}$.

V některých případech je jedinou metodou volby biochemická syntéza, v úvahu pochopitelně připadá pouze u látek vyskytujících se v živých organismech.

Může jít buď o enzymovou syntézu či o celkovou biosyntézu. V prvním případě se užívá enzymů jako katalyzátorů reakcí přivádějících RA látku do molekuly. V druhém je RA látka podána živému organismu a izolují se pak značené látky vzniklé metabolickými pochody.

Může jít např. o mikroorganismy, které mají potřebný RA izotop v živné půdě, či je izotop resp. jeho sloučenina aplikována jiným způsobem (např. perorálně spolu s potravou či injekčně). Při celkové biosyntéze je specifická aktivita vzniklých RA značených sloučenin většinou poměrně nízká, protože bočními reakcemi vzniká řada vedlejších nepotřebných sloučenin.

Způsobem biochemické syntézy jsou připravovány zejména ^{57}Co či ^{60}Co - kobalamin, ^{75}Se - methionin ale i univerzálně

značená ^{14}C - glukóza, mastné kyseliny a podobně.

II.3 Měřící a vyhodnocovací postupy

Snad největší rozvoj v oblasti studií s pomocí RA izotopů zaznamenaly v posledních desetiletích právě přístroje měřící (ať již *in vivo* či v extraktech tkání či tělních tekutin) rozpad radioaktivních jader. Účinnost měření takových přístrojů se zvětšila z původního cca 1% na hodnoty blízké se takřka 100%.

Nedílnou součástí měřících aparatur (detektorů) se staly počítače, které měření zkvalitňují a velice rychle vypočtou nejen výsledek, ale provedou řadu statistických propočtů a hodnocení kvality stanovení.

Detekcí jaderného záření se zabývá dosimetrie. Ta vychází prakticky pouze buď z ionizačního nebo excitačního účinku záření. Podle Navrátila (1989) patří k jejím hlavním úkolům měření aktivity radioaktivních preparátů (radiometrie) a měření dávky ionizujícího záření (vlastní dozimetrie).

V zásadě mohou detekční metody zahrnovat:

- tzv. proudové metody (např. ionizační komory, GM trubice)
- scintilační metody (zejm. scintilační detektory)
- vizuální metody (fotografické emulze).

II.3.1 Historický úvod

Detektory záření, které byly nejdříve užívány, byly na základě využití ionizačního účinku záření:

a) Ionizační komory jsou zkonstruovány tak, že ve vzduchovém prostředí jsou 2 elektrody, nabité určitým nábojem. Působením RA záření se vzduch stává vodivým a dochází k vybíjení kondenzátoru. Rychlost vybíjení (jiná možnost : velikost ionizačního proudu) je úměrná intenzitě záření a celkový úbytek je úměrný dávce záření, která prošla prostorem ionizační komory.

Na principu ionizační komory jsou založeny přístroje na určení osobní dávky záření u pracovníků, na měření intenzity záření za stínícími kryty. Dále jsou ionizační komory užívány při kontrole aplikovaných dávek RA izotopů a konečně ke měření aktivity radonu a jiných plynných zářičů - viz obr.č.7.

b) U Geiger-Müllerovy trubice (GMT) tvoří obal jednu elektrodu a drát uvnitř této trubice druhou elektrodu. Trubice je evakuována a naplněna inertním plynem o nízkém tlaku. Mezi elektrodami je napětí několika set až tisíc voltů. Když vnikne částice při záření do do trubice, dojde ke vzniku napěťového impulsu, který je dále registrován - viz obr. č. 8.

G-M trubice se liší podle toho, jaký typ záření mají registrovat. Pro většinu zářičů jsou to silnostěnné trubice (aby jimi neprošlo záření beta !) - kovové či celoskleněné, tloušťka stěn je několik mm. Pro měkčí gama záření (např. ^{131}J) mají GMT obalovou elektrodu tvořenou nánosem těžkého kovu.

GMT pro měření beta - záření mají část povrchu zeslabenou – mají okénko ze slídy - tak do trubice přicházejí částice beta bez podstatného oslabení. Pro měření aktivity beta - zářičů v tekutinách se užívá nálevkovitých GMT. Tloušťka okénka je v každém případě odlišná u tvrdých a měkkých (např. ^{14}C , ^{35}S) beta – zářičů. Značně vyšší účinnost mají bezokénkové GMT, ve kterých se preparát, jehož velikost záření máme určit, dává přímo do trubice, která je proplachována inertním plynem.

c) Scintilační detektor je pak založen na jevu, že záření (zvláště gama) při průchodu krystalem NaJ se stopovou příměsí TI vyvolává slaboučké záblesky viditelného světla - viz obr. č. 9. Ty se zachytávají katodou fotonásobiče, na jeho výstupu se mění na elektrické impulsy. Scintilační detektory mají účinnost řádově desítky % pro záření gama a jejich různě zdokonalené formy jsou základem dnešních gama měřičů.

Pro beta záření mají účinnost řádově menší, na srovnatelnou či dokonce vyšší účinnost ve srovnání se zářiči gama se u beta zářičů dostaneme pomocí tzv. scintilačních tekutin, které mají za základ organické scintilátory (antracen, toluén, dioxan). Používá se jich zejména pro měkké beta zářiče, jako je ^{14}C či ^3H a to tak, že se přidávají k měřeným vzorkům do měřících nádobek.

Scintilační detektory se dají použít i pro detekci alfa záření, obdobně jako pro gama zářiče se používá ale scintilátor, v případě alfa zářičů jde o ZnS s příměsí Ag.

d) Fotografická detekce je založena na zčernání filmové emulze při průchodu ionizujícího záření, při čemž stupeň zčernání je závislý na intenzitě záření. O několik řádů je přitom hustota zčernání vyšší při záření D . Tato metoda je užívána ke sledování dávky záření, kterou pracovník používající D - zářiče obdržel při práci s RA látkami.

Speciálním užitím této metody je tzv. autoradiografie, kterou zjišťujeme např. distribuci radioaktivity ve tkáni. Rozlišujeme přitom makroautoradiografii a mikroautoradiografii. Např. při zjišťování distribuce RA zlata v peritoneální dutině podložíme na několik hodin pod nemocného RTG film, obdobně zjišťujeme takto aktivitu štítné žlázy po tyroidektomii - v obou případech jde o makroautoradiografii.

Při mikroautoradiografii (tzv. histoautoradiografii) jsou histologické řezy tkání, které obsahují RA látku, překryty vrstvou fotografické emulze. Po několika dnech až týdnech je preparát s emulzí vyvolán. Pozorování preparátu pod mikroskopem nás pak informuje o stupni nahromadění aktivity v jednotlivých strukturách řezu.

II.3.2 Některé metodické problémy měření aktivity

Nejdříve je třeba si probrat některé základní pojmy spojené s měřením RA záření (podrobněji viz Dienstbier, 1989):

Pozadí - četnost impulsů, které detekční zařízení zaznamenává i bez přítomnosti radioaktivního zářiče.

Dáno zejména :

- přirozenou RA materiálů, z nichž detektory a jeho stínění zhotoveny

- dále dáno radiační složkou:

-- radioaktivitou vzduchu (R_n)

-- zářením z povrchu země, ze zdí laboratoří

-- kosmickým zářením

Podstatného snížení pozadí lze dosáhnout obklopením stíni-

cím materiálem - olovem, železem, betonem - lze ho takto snížit až na 1/10.

Nežádoucí impulsy je možno omezit též tzv. diskriminací (výběr impulsů, které mají být zaznamenány!). Pozor na umístění detekčních aparatur v blízkosti uložení vysokých aktivit či práce s nimi (týká se i aparatur s RTG zářením, betatronů a pod.).

Detekční účinnost - poměr impulsů zaregistrovaných a skutečně dopadlých na detektor. Vyjadřuje se v procentech, závisí na energii částic, na rozměrech a tvaru krystalu, na geometrickém uspořádání a pod. Při scintilačním měření může dosahovat až 90%, u GMT je účinnost o jeden až dva řády nižší (1-2%).

Časová rozlišovací schopnost je charakterizována tzv. mrtvou dobou, tj. intervalem po průchodu jednoho impulsu, kdy detektor není schopen zaznamenat další impuls. To znamená, že při vysoké četnosti impulsů detektor zaznamenává méně impulsů, než jich ve skutečnosti detektorem prošlo. Za sekundu je detektor schopen zaznamenat max. 10 na 4 impulsů, tj. 10 000 impulsů.

Energetická rozlišovací schopnost charakterizuje schopnost detektoru odlišit od sebe záření dvou energeticky blízkých záření, pohybuje se od 6 do 8%.

Geometrie měření - celková účinnost měření aktivity je dána též vzájemným uspořádáním vzorku a detektoru. Při *in vivo* měření dopadá na detektor pouze část vysílaných fotonů, s rostoucí velikostí krystalů je jich zachyceno více, ale zároveň se zhoršuje energetická rozlišovací schopnost detektoru. Ve studnovém detektoru lze dosáhnout až 90% účinnosti, při rozptýlení v kapalném scintilátoru je účinnost měření již téměř 100%.

Chyba měření: každé měření je zatíženo chybou, danou jednak statistickým charakterem RA přeměn, jednak nestabilitou měřiče.

směrodatná odchylka = druhá odmocnina N
N ... počet impulsů

Chybu měření můžeme snížit buď prodloužením doby měření anebo snížením pozadí. Statistická chyba měření by měla být cca 1-2%, vzhledem k nestabilitě přístroje a pod. se celková chyba měření však pohybuje kolem 5%.

Bližší poučení o výpočtu směrodatné odchylky, variačních koeficientů a pod. naleznete ve speciálních učebnicích, např. Roth a sp. (1962) či pokud jde přímo o oblast nukleární medicíny, pak např. v Dienstbier a sp. (1989).

Vyhodnocení údajů GMT či scintilačních detektorů se provádí takto:

- spočítáním impulsů za určitou dobu zjistíme relativní aktivitu, kterou porovnáváme s údaji standard, aplikované aktivity, se zjištěnou aktivitou v jiných tkáních a orgánech a pod.
- impulsy se integrují - tj. četnost impulsů převádíme na stejnoměrné napětí a velikost aktivity posuzujeme podle výchylky měřidla, resp. jeho zápisu

Automaticky lze nastavit buď dobu, po jakou má být vzorek měřen, či naopak počet impulsů, který má být změřen a přístroj zaznamená dobu, za jakou se to stane. Je možné přístroji předepsat, že měření se bude dít každé 2 minuty či jiný interval. Takto je možné registrovat průběh plynule probíhajícího děje, ať již ho sledujeme v roztoku - in vitro - či v celistvém organismu, tj. in vivo.

Poněkud odlišné problémy představuje měření aktivity v célemtěle a v jeho částech nebo tzv. v roztoku, tj. v tekutinách izolovaných z tkání, krve a pod. Proto si je probereme zvlášť - nejdříve měření in vitro.

II.3.2.1 Měření in vitro

Měření aktivity tekutých preparátů (např. krev, moč) se provádí výhradně v nálevkové GMT. Tento způsob se používá pro beta zářiče s vyšším energetickým obsahem, tj. např. pro ^{32}P , ^{42}K , ^{86}Rb .

U částic s nižším energetickým obsahem (tzv. měkké beta zářiče) se značně uplatňuje absorpce ve stěně počítače. Proto se užívají okénkové či bezokénkové GMT resp. ještě více scintilační detekce se scintilačními roztoky, do kterých se měřený vzorek přidává. Platí to především pro měření vzorků obsahujících ^{14}C a ^3H . Pro ^3H - tritium - je to prakticky jediný způsob detekce.

Záření gama je detekováno s maximální účinností ve scintilačním přístroji s krystalem z NaJ a Tl. U kapalných vzorků se užívá tzv. dutého krystalu, který má vyhloubenu dutinu, do které se zasunuje zkumavka se vzorkem - viz obr. č. 10.

Tekutý vzorek může být proměřován i pevným krystalem bez dutiny, vzorek je pak umístěn v určité vzdálenosti od krystalu.

Účinnost měření je v takovém případě pochopitelně nižší, než

když vzorek je umístěn přímo v krystalu. Pro měření velkých objemů tekutin, ale i pevných vzorků (např. stolice), je možno k měření celého objemu najednou použít klece ze 6 či většího počtu GMT na měření záření. Všechny GMT měří najednou a jejich výsledky se sčítají. Účinnost měření je pak srovnatelná s dutým krystalem – viz obr. č. 11.

Pro měření kapalinových vzorků se používá též automatický vzorkoměnič, který má kromě stíněného studnového detektoru s krystalem NaJ (TI) a elektronické aparatury navíc elektronické obvody, které umožňují předvolit určitý režim měření vzorků.

řetězový

Vzorky se před měřením umísťují do zásobníku viz obr.č.12

kazetový

viz obr.č.13

on line
K přístroji je připojen počítač (tj.přímo u přístroje)
off line
(jinde, pak je nutné
výsledky měření pře-
nášet k počítači, např.
na disketách)

Vícedetektorový systém - viz obr. č. 14.

Skládá se z určitého počtu stejných detektorů (12-16 či více), tvořených studnovými scintilačními krystaly, a fotonásobičů. Na jednou se měří např. 12 vzorků, zpracování výsledků zajišťuje počítač, který také koriguje rozdílnou účinnost jednotlivých detektorů (může se lišit až o 10%!).

Detektory s kapalnými scintilátory pro měření beta – zářičů,
- viz obr. č. 15.

Vzorek se přimíchává do kapalného scintilátoru, ten podobně jako jiné scintilátory (např.scintilační krystal NaJ-Tl) převádí energii ionizujícího záření na záblesky viditelného světla, které se registrují fotonásobiči. Fotonásobiče detekují pouze impulsy od pozorovaného zářiče, záznam o nich je veden do analyzátoru a do počítače. Přístroj má, obdobně jako gama-měřiče, řetězové či kazetové zásobníky, umožňující automatickou výměnu vzorků.

U nás jsou nejpoužívanější následující scintilační tekutiny :

- na bázi toluénu - např. SLT 31 či SLT 41 - hodí se pro měření vzorků rozpuštěných v organických rozpustidlech (tedy např. vzorků lipidů)

- na bázi dioxanu (případně ve směsi s dalšími látkami) pro měření vodných vzorků, tyto scintilační tekutiny pojmu až 5-10% vodné fáze, speciální roztoky (Brayův) jí pojmu ještě více, a to až 25%

Pro speciální druhy měření užívány roztoky:

- schopné pojmout ještě větší množství vody (na bázi TRITONU X)

- scintilační gely (obsahující polymetylkrylát či polyakrylamid, které užívány pro práškové vzorky)

II.3.2.2 Měření in vivo

Měření aktivity beta zářičů se provádí (např. po aplikaci ³²P) pomocí GMT na měření beta, zejména tzv. okénkovými trubkami. Tyto detektory mohou mít případně i hodně malé rozměry (např. pro měření aktivity v očním bulbu), či jsou dokonce jehlové, které lze do tkáně zabodávat (např. pro měření aktivity v mozkové tkáni).

Aktivita gamažáříčů se může měřit buď celotělově či nad jednotlivými orgány:

s kapalnými scintilátory

- Celotělové počítače

pacient leží
není posouván

s více zapojenými GMT

viz obr. č. 16

se scint. detektory -

(s velkými NaJ krystaly)

pacient se

posouvá

V každém případě je nutné, aby celotělový počítač byl stíněn od zevního záření, dále je třeba připojení řady fotonásobičů. Organová měření jsou prováděna převážně scintilačními detektory s NaJ krystaly. Detektor je obložen asi 5 cm olova s otvorem umístěným proti krystalu. Uspořádání otvoru určuje směrový účinek detektoru, toto směrové stínění se nazývá kolimací.

Typy kolimátorů - viz obr. č. 17.

- válcový - měření probíhá ve válcovém prostoru, daném stěnami otvoru, po stranách je polostínový prostor (ten lze zmenšit)
- složený kolimátor - se zmenšováním průměru otvoru či s prodlužováním délky kolimátoru klesá citlivost detektoru
- kónický kolimátor - umožňuje citlivější detekci určité roviny dané sklonem otvoru

Při detekci aktivity nad velkými orgány se užívá otevřených kolimátorů, které měří široký prostor. Topografické zjišťování rozložení aktivity se provádí naopak úzce směrovanými kolimátory. Úzce směrovaný detektor se přitom pohybuje rovnoměrně v řádcích nad sledovanou oblastí - přístroji se pak říká gamagraf - viz obr. č. 18.

Impulsy z detektoru jsou v určitém daném poměru redukovány a tištěny jako čárky, jejichž hustota podává informaci o rozložení aktivity v různých místech, příklad vidíme na obr. č. 19.

Při hodnocení gamagramu je nutno brát v úvahu, že kromě aktivity sledovaného orgánu se měří zároveň aktivita orgánů nad i pod sledovaným orgánem.

U většiny in vivo stanovení RA jde zejména o detekci záření vycházejícího z těla po aplikaci RA látky a sledují:

- buď časový průběh aktivity radiofarmaka (či jím označených metabolických zplodin)
- nebo zobrazení distribuce radiofarmaka v orgánu či celém těle (scintigrafické vyšetření)

a) Pohybový scintigraf

Skládá se z:

- detektoru s kolimátorem
- mechanického zařízení, zajišťujícího pohyb detektoru nad tělem
- elektronické aparatury
- záznamového zařízení

Kolimátory se používají o různé rozlišovací schopnosti pro různé orgány.

Od pohybových scintilátorů se v současné době ve světě již ustupuje, důvodem je jejich omezená citlivost a skutečnost, že mohou pouze staticky zobrazovat.

b) Scintilační kamera - viz obr. č. 20.

detektor: elektronická aparatura: zobrazovací aparatura:

osciloskop (počítač, analyzátor) - NaJ krystal s kolimátorem	displej záznam se snímá Pola- roidem nebo běžným fotoaparátem; (mož- nosti záznamu na RTG film - micro dot
fotonásobiče (dříve 19, nyní i více než 75)	

(Kolimátor mnohaotvorový: desítky tisíc
otvorů s paralelními otvory)
Kolimátor konvergentní : má vyšší účinnost
a umožňuje zvětšení menší plochy

divergentní : zachycuje velkou
plochu, např. obě plíce
s jedním otvorem (pin hole)

Celotělová scintigrafie - je možná:

- postupným zhotovováním snímků (např. kosti)
- s přídatným zařízením - hýbe se detektor
- hýbe se lůžko

Připojení počítačů umožnilo lepší dynamické sledování i hodnocení scintigrafických záznamů. Umožnilo také zcela nové principy zobrazování, např. ECT (Emission Computed Tomomograph), která umožňuje zobrazit rozložení radiofarmaka ve 3 rovinách.

Vyskytuje se na dvou modifikacích:

- SPECT s běžnými zářiči
- PET s pozitronovými zářiči

Počítače se v současné době staly nedílnou součástí měřících aparatur při užití RA látek in vivo i in vitro. V rámci daných skript skript není možné se podrobněji zabývat popisem funkce počítače a jeho jednotlivých součástí. Pro podrobnější seznámení se s touto problematikou odkazujeme na speciální monografie, např. Ludvík (1991).

Pro potřeby pracovníků, kteří užívají RA látky ke sledování látkové přeměny, je velice instruktivní přehled obsažen v monografii Dienstbier a sp. (1989).

- Co umožňuje počítač ve spojení s detektory záření :
- odpočet pozadí a "odřezání" jiných impulsů podobných izotopů
 - přepočet tzv. cpm (zaznamenaných rozpadů) na skutečný počet rozpadů (dpm); tedy přepočet s ohledem na účinnost měření
 - propočet průměrů vzorků s upozorněním na rozptyl či chybné výsledky
 - sestavení standardní křivky a výpočet hodnot s ohledem na ředění a pod.
 - statistický výpočet skupiny výsledků, výpočet chyby měření atd.

II.4 Základní údaje o riziku práce s RA izotopy a možnosti ochrany proti němu

Při práci s RA izotopy existují v zásadě dvě možnosti ohrožení (Dienstbier a sp., 1989, Blažek a Hupka, 1989):

- vnější kontaminace- ozáření vnějším zdrojem záření RA
- vnitřní kontaminace (vnitřní ozáření)
 - + vdechnutím
 - + s potravou či pitím
 - + vniknutí poraněnou kůží a pod.

Důsledkem zevního ozáření i vnitřní kontaminace je absorbovaná dávka. Ta je definována jako energie záření absorbovaná v objemu látky o jednotkové hmotnosti.

Jednotka absorbované dávky je 1 Gray (Gy) , tj. 1 joul v 1 kg hmotnosti.

Záleží na expozici, resp. dávce záření (ta se udává v Sievertch - Sv). Nejvíce jsou zevním ozářením ohroženy gonády a kostní dřeň, nejméně ruce, nohy (asi 15x méně). Pracovníci s izotopy mají povoleny 10x vyšší dávky - viz tab. č. 1 - proto rizikový příplatek a dodatková dovolená.

Měření osobních radiačních dávek

Ke zjištění osobních radiačních dávek se užívají alfa, beta a RTG filmové dozimetry, které obsahují 2 filmy:

- vysoce citlivý
- málo citlivý (havarijní)

V důsledku radiace může dojít:

- ke vnitřní kontaminaci (zejm. RA jodem, méně pak techneciem)
- ke kontaminaci povrchů

Pokud je radioaktivita přítomna na povrchu pracovních ploch, na nekrytých částech těla, na šatstvu a pod, jde o kontaminaci povrchů. Z povrchů se pak může radioaktivní látka dostat do organismu, ať již cestou dýchacího ústrojí, zažívacího traktu či poraněními v kůži - pak dochází ke kontaminaci vnitřní.

Existuje dvojí možnost, jak povrchovou kontaminaci měřit:

- metodou stěru - plocha se otře např. vatou namočenou ve vodě (příp. jiné tekutině či rozpustidle, podle toho, v čem je RA látka rozpuštěna). Pokud je povrch obtížně omyvatelný, může dojít k velkému zkreslení; jinak jde o metodu velmi citlivou.
- přímým měřením, tj. pomocí měřičů kontaminace. Tento způsob je nevýhodný pro záření beta a pro měkké záření. Citlivost u gama zářičů je možno zvýšit scintilačním krystalem.

Existuje i možnost přímého proměření kontaminace rukou, což je v řadě laboratoří důležité.

Radiační ochrana

Abychom zabránili či snížili možnost kontaminace, existuje řada prostředků:

- užívání ochranných oděvů
- užívání gumových rukavic při práci
- zákaz pití, jídla či kouření nejen při práci ale i v místnosti, kde se s RA látkami pracuje
- ochrana vzdáleností - např. nebrat ampule se zářiči do rukou ale zásadně do peánů, manipulátorů a pod.
- ochrana časem - omezit dobu, po kterou se s RA zářením pracuje - vše si předem připravit resp. procvičit bez RA zářiče
- ochrana stíněním - u záření, zejm. se užívá olovo o různé síle podle toho, o jaký zářič jde
- ochrana prací v digestoři (zde např. umístěny metabolické klece či respirometr se zvířaty) - odsávání je kombinováno případně s prací s pomocí manipulátorů příp. se stíněním

Speciální problém představuje ochrana pacientů, kteří se podrobují in vivo vyšetření s pomocí RA látek. Obdobně jako u RTG vyšetření jde o to, aby se snížily dávky, které pacient přijímá,

aniž by byla ohrožena přesnost stanovení.

Následující tab. č. 2 ukazuje limity záření, které pacient může přijmout.

Vývoj v nukleární medicíně jde směrem k takovým metodám, které snižují velikost dávky, již je pacient vystaven.

Přehled hlavních izotopů užívaných při sledování přeměny látkové viz tab. č. 3.

Další tabulky obsahují rozdělení látek podle jejich RA nebezpečnosti (uvádí tab.č. 4) ; resp. dělení radioisotopových pracovišť podle užívaných množství těchto látek (viz tab.č.5).

Nebezpečnost určitého RA prvku záleží na jeho:

- poločase rozpadu
- typu a energii záření
- tendenci hromadit se v některém orgánu

Je třeba rozeznávat biologický a radiochemický poločas. Uvedme si např. ^{22}Na a ^{24}Na . Tyto izotopy sodíku mají rozdílné radiochemické poločasy (^{22}Na má poločas dlouhodobý) - ale jejich biologický poločas je u obou krátký v důsledku vylučování močí.

Biologický poločas třeba RA olova, stroncia, radia ale i vápníku, je naproti tomu dlouhý, ukládají se v kostech a působí tam až vznik nádorů. Plutonium se usazuje přímo v kostní dřeni a z toho vyplývá i jeho mimořádně nepříznivé působení.

Pracovníci, kteří dlouhodobě pracují s RA látkami, se musí podrobovat pravidelným preventivním lékařským prohlídkám (nejméně 1x ročně), při kterých jsou zejména posuzovány stav krvetvorby a také imunitního systému. Při některých onemocněních je práce s izotopy přímo zakázána; rozhoduje o tom příslušný odborný lékař zdravotního zařízení.

II.3.3.8 Komerční RIA soupravy (kity)

Jsou dodávány jako souprava, obsahující všechny potřebné součásti.

Výhoda: rychlé zavedení dané metody do praxe, možnost porovnání s hodnotami jiných pracovišť.

Nevýhoda: vyšší náklady; proto se někdy kupují pouze některé součásti kitů, dodávané zvlášť, a část soupravy si pracoviště vyrábí samo.

Kity obsahují soubor potřebných substancí a reagensů na určitý počet analýz (většinou 100-200 stanovení). Je přiložen podrobný popis metody, kit obsahuje i kontrolní vzorky. Doba použitelnosti je omezena; jde o týdny - měsíce, podle RA izotopu, který je radioindikátorem i podle stability dalších součástí kitu. Výroba komerčních souprav přispěla k velkému rozšíření RIA metodik a také k jejich standardizaci.

Ani komerční soupravy nemusí však být zcela kvalitní - snižená může být kvalita jednotlivých jejích složek; třeba pouze u určitých šarží. Proto je nutné i u nich provádět pravidelné kontroly, ať již centrální či lokální.

II.3.4 Popis nejužívanějších RIA metodik

V praxi jsou užívány zejména RIA metodiky pro stanovení hladiny důležitých léků, hormonů a dalších biologicky důležitých látek. Cílem je co možná nejrychlejší stanovení těchto látek, aby se získaly podklady pro urychlené zahájení či změnu terapie. Stejně důležité je, aby se doplnila diagnóza určité patologické poruchy v organismu, na kterou již poukazovaly některé ukazatele stavu (subjektivní a objektivní klinické projevy, vyšetření biochemická a klinická a pod.).

Proto je ideálním požadavkem, aby výsledek RIA stanovení obdržel lékař tentýž den; dle možnosti pouze za několik hodin. Většina současných RIA metodik tuto podmínku splňuje, protože potřebná inkubační doba je pouze 1-3 hodiny, takže celková doba zpracování vzorků od případného zpracování krve až po vyhodnocení výsledků nepřesahuje 6-7 hodin. To je důležité pro případnou změnu terapie ještě tentýž den.

V konkurenci s některými alternativními metodikami má RIA nevýhodu poněkud delšího zpracování; výhodou naopak je větší přesnost stanovení. Proto se i v nejbližších letech s RIA metodikami počítá; není náhodou, že se s nimi u nás počítá jak v koncepci nukleární medicíny, tak i v koncepci klinické biochemie.

Obdobně to platí i v jiných státech, ať již v Evropě či jinde ve světě.

Důležitou otázkou, která o uplatnění určitých metod ve zdravotnictví, ale i v zemědělství a pod., bude rozhodovat, je, kolik dané vyšetření stojí. Proto je důležité, kolik stojí kit na provedení určitého počtu stanovení a jaké další výdaje je nutné do ceny

vyšetření započítat (zkumavky či špičky na dávkovače, další potřebné chemikálie či roztoky, přístroje a pod.). Z tohoto hlediska má značný význam, zda jde o kit s beta zářičem, který pro měření vyžaduje ještě přidání relativně drahé scintilační tekutiny či nikoliv. Vzhledem k platům pracovníků u nás položka výdajů na mzdy je prozatím méně důležitá.

Ekonomické důvody však nemohou být jediným rozhodujícím fakorem; pokud je jednoznačně přesnější stanovení s pomocí beta zářiče (který nenarušuje strukturu dané látky), pak je mu nutno dát přednost.

Ještě je nutno se zmínit o tom, do jaké míry může být pro pracovníka, který s RIA metodikou pracuje, nebezpečné záření RA látky. Je nutno říci, že nebezpečí je zcela malé, protože užitá aktivita je minimální, prakticky na hranici hodnoty pro RA zářič.

Postupně si probereme některé hlavní typy RIA stanovení a to nejprve pro stanovení hladiny důležitých léků, dále pak pro stanovení vybraných patologických stavů. Podrobněji budeme probírat vždy poprvé určitý postup, u dalších pak pouze odlišnosti. Podrobné návody pak nalezneme v příloze.

II.3.4.1 Hladiny léků

II.3.4.1.1 Hladina cyklosporinu A (CyA)

Cyklosporin je v současné době nejúčinnější imunosupresivum (lék potlačující imunitu), které je užíváno především při transplantaci orgánů a při řadě tzv. autoimunitních onemocnění.

Ve všech těchto případech je důležité znát průběžně hladinu cyklosporinu v krvi, aby podle jeho aktuální hladiny bylo možné v případě potřeby urychleně upravit dávkování tohoto léku.

Zpočátku byla stanovována hladina celkového cyklosporinu, tj. jednak vlastního cyklosporinu, jednak jeho metabolitů. Toto stanovení celkového množství bylo umožňováno tehdejším stavem výroby protilátek, které byly polyklonální. S vývojem monoklonálních protilátek byla pak vyvinuta metodika stanovující jen samotný cyklosporin. Tento způsob stanovení v současné době převládá, proto ho uvádíme podrobněji jako jediný - v příloze je pak obsažena i metodika na stanovení celkového cyklosporinu spolu s metabolity.

CyA-kit firmy INCSTAR, znač. 3H (125I)

Odběr krve :

Odběr se provádí do zkumavek s EDTA jako antikoagulantem. Je lépe stanovovat v celé krvi, než v plasmě. Vzorky, které ne-

jsou zpracovávány ihned, mohou být uschovávány ve 4 stupních do 1 týdne, při -18 stupních Celsia do 6 měsíců.

Složení kitu:

- koncentrovaný pufr- je třeba doplnit destilovanou vodou do 150 ml (pufr A) a přidá se 10% objemu plasmy kontrolní osoby, která nepřijímá cyklosporin
- aktivní uhlí - je třeba přidat 60 ml pufru A a dále 0,7 ml plasmy bez cyklosporinu, promíchat a ochladit
- standardy obsahují 16 ng CyA v 1 ml 70 % vodného etanolu
- monoklonální protilátky jsou lyofilizované - specifické
- nespecifické

k oběma se vždy přidá 10 ml pufru A

- kontrolní vzorky - jsou rozpuštěné v 1 ml celé krve, jejich hodnoty dosahují cca 100 ug/ml a 400 ng/ml pro CyA s metabolity
- značkovač - k 1 ml 3 H - CyA se přidá 9 ml pufru

Příprava standard:

Standardy se ředí kontrolní krví ze základního roztoku:

100 ul koncentrované standardy + 0,9 krev = 1600 ng/ml

z toho 0,5 + 0,5 krev = 800 ng/ml

z toho 0,5 + 0,5 krev = 400 ng/ml

z toho 0,5 + 0,5 krev = 200 ng/ml

z toho 0,5 + 0,5 krev = 100 ng/ml

z toho 0,5 + 0,5 krev = 50 ng/ml

z toho 0,5 + 0,5 krev = 25 ng/ml

samotná krev = 0 ng/ml

Předpříprava standard, kontrol a vzorků:

50 ul + 950 ul metanolu, pak centrifugovat 5 minut při 1600 g. Dále pipetovat 50 ul supernatantu.

Pipetace:

Celková aktivita (CA):

standarda 0 50 ul + značkovač 100 ul + pufr B 1050 ul

Nespecifická vazba (NSB):

standarda 0 50 ul + značkovač 100 ul + pufr B 550 ul

Další standardy :

totéž s tím, že 50 ul příslušné standardy, pufr B do 1600 ul + 50 ul protilátky

Kontrolní séra a vzorky :

totéž s tím, že uijeme 50 ul kontrolního séra či vzorku

Inkubace:

Trvá 2 hodiny při 40C (v chladničce), pak 15 minut při 0-20 C (miska s vodou a ledem). Pak se přidá do všech zkumavek (s výjimkou CA) 500 ul aktivního uhlí. Další inkubace probíhá v ledové lázni 12-15 minut.

Centrifugace:

Probíhá 5 minut při 1600 g ve chlazené centrifuze.

Měření aktivity:

Ze supernatantu se odebere 1 ml a přidá se 9 ml scintilační tekutiny SLD. Měřit na beta-měřiči 1 minutu.

Výpočet:

- udělat průměr duplikátů
 - odečíst od vzorků, standard a kontrol hodnotu NSB
 - vypočítat vazebnost nulového vzorku (Bo)
 - udělat poměry % vazebnosti proti Bo
-
- vynést na semilogaritmický papír
 - odečíst hodnotu kontrolních a neznámých vzorků

Hodnoty:

(doporučené rozmezí)

U transplantace ledvin : 100 - 300 ng/ml pro hladinu samotného CyA (specifické protilátky) resp. 400 - 600 ng/ml pro hladinu cyklosporinu s metabolity (nespecifické protilátky).

U transplantace pankreatu, jater a srdce se hladina CyA udržuje o něco vyšší; u pankreatu a jater kolem 200-300 resp. 800 ng/ml, u srdce 400 ug/ml pro samotný CyA a kolem 1200 ug/ml pro CyA spolu s metabolity.

Pokud stanovována hladina v plasmě, jsou hodnoty 2,5-3x nižší.

Pozn. Recentně vyrábí firma INCSTAR prakticky pouze kity se značkovačem 125J. Stanovení je levnější o to, že není třeba přidávat scintilační tekutiny, což vzhledem k jejich vysoké ceně není zanedbatelné.

V současné době je také v praxi prozkoušován stejně kvalitní kit firmy IMMUNOTECH z ČR, který je o dost levnější.

II.3.4.1.2 Hladina digoxinu

(kit HUMA-LAB Košice, SR ; značený 125J)

Mezi nejužívanější léky při kardiovaskulárních nemocech patří digitalisové preparáty (Digoxin, Digitoxin, Lanatosid). Nebezpečím pro činnost myokardu je možnost předigitalizace, ke které dochází u 20% pacientů a umírá celkem 4-5% pacientů. Pokud se předigitalisace nepozná, tak úmrtnost pacientů je značně vyšší a dosahuje je 50-100 %!

Potřebné by bylo měřit koncentraci digoxinu přímo v srdečním svalu, ta však koreluje s plasmatickými hladinami. Proto se u nemocných provádí toto nepřímé měření hladiny digoxinu.

Stabilita:

Při 2-8 oC vydrží kit 6 týdnů; po rozpuštění 1 týden při 2-8 o C. Vzorky se vzhledem k rozptylu doporučuje dělat v triplikátech. Nestanovuje se nespecificky vázaná aktivita.

Pipetace:

1 - 3 CA: 0,1 ml značkovače

4 - 6 NSB: 0.1 nulového séra + 0,1 pufr + 0,1 ml značk.
+ 0,1 protilátka

7 - 24 standardy : 0.1 standardy + 0,1 pufr + 0,1 ml
značkovače + 0,1 protilátka

25- 27 kontrola : 0,1 kontrolního vzorku + 0,1 pufr
+ 0,1 ml značkovač + 0,1 protilátka

28-100 vzorky (24 vzorků!) : + 0,1 pufr + 0,1 ml značk.
+ 0,1 protilátka

Inkubace:

Probíhá 60 minut při pokojové teplotě.

Centrifugace:

Probíhá 10 minut při 2000 g. Po centrifugaci následuje odsátí supernatantu a nakonec měření aktivity v sedimentu.

Hodnocení výsledků:

Možnost předávkování při hodnotách nad 2,0 umol.l-1.*

II.3.4.2 Hladiny thyreoidálních hormonů

II.3.4.2.1 Funkce štítné žlázy; její regulace a poruchy

Tvorbou hormonů ve štítné žláze se většinou myslí tvorba jodthyroninových hormonů, v tomto orgánu se však vytváří i kalcitonin, o tom však nebudeme hovořit na tomto místě, ale při probírání kalciofosfátového metabolismu.

Tyroidální buňka produkuje bílkovinný nosič - prethyreoglobulin - ten se mění na thyreoglobulin nejodovaný (TG). V přítomnosti dostatečného množství jodu se TG jodiduje a vznikají z něj postupně vlastní hormony. K tomu je potřebný denní přívod určitého množství jodu s potravou (kolem 200 ug); část jodu se získává také dejodací thyreoidálních hormonů v periferní tkáni.

Jod z plasmu je jodidovou pumpou do tkáně štítné žlázy aktivně koncentrován (koncentrace jodu je ve štítné žláze proti plasmě 30x i více zvýšena!).

Vznikají napřed monojodtyrozin, pak dijodthyrozin, v další fázi se tvoří vlastní hormony. Jde o thyroxin (T4), trijodthyronin (T3) a reversní T3. Ve štítné žláze vzniká převážně T4, T3 je vytvářen v malém (asi 1-2 %) a r-T3 ve zcela zanedbatelném množství.

Hormony štítné žlázy se váží z převážné míry na transportní bílkoviny, zejména globuliny (thyroxin binding globulin- TBG)-pouze asi 0,5 % T4 resp. 0,3% T3 jsou volné.

Denně je produkováno asi 100 ug T4; stejné množství je ho za normálních podmínek v průběhu 24 hodin destruováno.

Regulace funkce štítné žlázy (viz Dienstbier a sp. 1989)

V regulaci thyreoidální funkce se uplatňují 3 základní mechanismy :

- a) osa hypotalamus --- hypofýza --- štítná žláza
- b) thyroïdní autoregulace adaptací na přísun jodidu
- c) periferní dejodační systém

ad a) Funkce štítné žlázy je přímo regulována hladinou hypofyzárního thyreostimulačního hormonu - TSH. Proto je hladina TSH citlivým ukazatelem funkce štítné žlázy. Syntéza a uvolnění TSH je stimulována thyreotropin - relasing hormonem - TRH (thyreoliberin); který vzniká v hypotalamu a portálním oběhem hypofýzy se dostává do tohoto orgánu. Zpětným regulátorem je hladina thyreoidálních hormonů.

ad b) Vliv jodu je patrný při deficitu jodu; zvyšuje se aktivita jodové pumpy a dochází k hyperplasii žlázy (vle u alpských kreténů!). Do jisté míry může nedostatek jodu kompenzovat i zvýšená tvorba T₃ na úkor T₄.

ad c) Vliv periferní dejodace se uplatňuje např. při omezení příjmu potravy, zejm. sacharidů (pokles T₃, vzestup rT₃); uplatňovat se mohou i léky - např. betablokátory, které vedou k poklesu hladin T₃.

Účinek thyroïdních hormonů

Účinek těchto hormonů je zprostředkován vazbou na receptory, uloženými intracelulárně (zejm. v jádru buněk). Receptory reagují hlavně s T₃, méně až vůbec ne s T₄; proto T₄ bývá některými autory považována pouze za prohormon. Část účinků thyreoidálních hormonů je zprostředkována adrenergně - tato část je inhibována blokátory beta-adrenergních receptorů.

Ve vzácných případech existuje na hormony štítné žlázy rezistence, tj. ani dostatečná hladina hormonů nevyvolává plnou odpověď; pozorujeme přitom zvýšenou hladinu T₄, T₃ i TSH.

II.3.4.2.2 Hladina T₄

Hladina celkového thyroxinu (T₄) je základním parametrem pro hodnocení funkce štítné žlázy, i když vlastním účinným hormonem je pouze jeho volná frakce. Hladina T₄ je určována jeho sekrecí, transportem, metabolizací a exkrecí.

Pokud jde o sekreci thyroxinu, zvyšuje se hladina při thyreotoxikóze a snižuje se u většiny hypothyreóz. V úvahu je nutno vzít kolísání hladiny transportních bílkovin, což vede ke zvýšení hladiny T₄, aniž by byla zvýšena činnost štítné žlázy, např. u kongenitálního nadbytku TBG (transport bílkovin), v těhotenství, při jaterních lézích, v důsledku perorální antikoncepce atd. Naopak

snížené hladiny T4 v důsledku snížení úrovně TBG nacházíme při kongenitálním snížení hladiny TBG, při nefrotickém syndromu, při podávání androgénů či kortikoidů a pod.

Variabilita hodnot T4 je dále zvyšována variacemi denními či sezónními. Proto je třeba hladiny T4 vždy korelovat s klinickým obrazem.

Stabilita součástí kitu

V 2-8 oC 6 týdnů, po rozpuštění 1 týden v 2-8 oC, 4 týdny v v -20 oC.

Hodnocení výsledků

Hodnoty pod 45 umol.l⁻¹ naznačují velkou pravděpodobnost hypothyreózy, nad 150 umol.l⁻¹ pak naznačují velkou pravděpodobnost thyreotoxikózy (euthyreosa při hodnotách v rozmezí cca 50-130 umol.l⁻¹, hraniční hodnoty, tj. 30- 45 resp. 130-150 umol.l⁻¹ jsou suspektní).

Platí však, že 15-25 % thyreotoxikóz má normální hladinu T4
10-20 % hypothyreózy "- "-
5 % euthyreózy má hodnoty patologické.

Pozn. Kromě RIA metody se stanovuje hladina T4 (i dalších tyroidálních hormonů) fluorometricky, na přístroji ABBOTT.

II.3.4.2.3 Hladina T3 (trijodthyronin)

Štítná žláza produkuje dva hormony, jejich stanovení neznamená duplicitu stanovení (viz úvod o činnosti štítné žlázy). Denně je produkováno 80-100 ug T4, ten se z 8-90 % mění na účinný T3.

T3 je 3.5x účinnější než T4. Určování T3 má svůj význam při diagnóze hyperthyreózy; při ní se hladina T3 zvyšuje a to nejen v důsledku zvýšené produkce ve štítné žláze, ale i při periferní přeměně T4→T3. Proto nezvýšená (nejen snížená, ale i normální) hodnota T3 prakticky vylučuje hyperthyreózu (za zvýšené hodnoty považujeme více než 3,5 umol/ml).

Jinak vliv změněných hladin TBG, variací a pod. jako u T4.

II.3.4.2.4 Hladina TSH

Thyreotropin (thyroid stimulating hormon - TSH) je glykoprotein produkovaný předním lalokem hypofýzy; jeho uvolňování je regulováno hormonem hypothalamu TRH (viz úvod o funkci štítné žlázy!).

Ve zvýšené míře je TSH produkován za primární hypothyreózy, kdy v séru jsou nízké hodnoty thyreoidálních hormonů T4 (thyroxinu) a T3 (trijodthyroninu).

Hodnoty - u zdravých (euthyroidních) 0-6 mU/l.

Pozn. RIA metodiky pro stanovení thyreoidálních hormonů začínají být v poslední době vytlačovány alternativní fluorometrickou

metodikou (IMX), která má výhodu v rychlém stanovení. U menších počtů vzorků umožňuje stanovit za dopoledne naráz všechny tři (případně i další) thyreoidální hormony, zatím co RIA metodika TSH vyžaduje tři dny.

Rozdíl v ceně stanovení sice existuje ve prospěch RIA metody, rychlost stanovení však většinou převažuje ve prospěch metodiky na IMx.

II.3.4.2.5 Závěry o funkční diagnostice štítné žlázy

Zásadně je třeba vycházet z klinického stavu pacienta. Obvyklý postup vyšetření je následující (viz Dienstbier a sp. 1989):

- anamnéza + klinický obraz
- periferní parametry:
 - tepová frekvence
 - měření systolických intervalů
 - časového průběhu reflexu Achillovy šlachy

Pak až následují:

- cílená laboratorní vyšetření

1) Když základním testem je T₄

- u hraničních hodnot - u hodnot na vyšší hranici se stanovuje navíc i T₃
- u hodnot na dolní hranici se stanovuje navíc i TSH

2) Když základním vyšetřením je test TRH

- normální výsledek vyloučí poruchu
- při patologických hodnotách pak stanovení T₄ - T₃ - TSH

3) Když zákl. vyšetřením je TSH

- pokud nízký : thyreotoxikóza
- pokud vysoký: primární hypothyreóza

Doporučené diagnostické postupy pro stanovení funkce a poruch štítné žlázy:

Pro thyreotokikózu (hyperthyreoózu) svědčí hladiny:

- T₄ : když hladina zvýšená (nad 150 umol/l)
- T₃ : když hladina zvýšená (nad 3,5 umol/l)
- TRH test (aplikace 200 ug TRH jako bolu - naráz; perorálně podáváme vzhledem k malé resorbci 400 mg); pak v případě patologických hodnot sledujeme hladiny TSH, příp. T₄ - když nestoupá za 20-30 minut či dokonce klesá, jde o thyreotoxikózu

K diferenciální diagnóze se pak provádí akumulační testy radiojodem či scintigrafie štítné žlázy.

Podezření na hypothyreózu je třeba vidět tam, kde probíhá léčba radiojodem či byla provedena strumektomie, nebo u starších lidí (te-

dy za situací, kdy se dá očekávat snížená funkce štítné žlázy).

Jednotlivé parametry nasvědčující hypothyreóze:

- TSH : když nalézáme vysoké hodnoty (časově předbíhá pokles T 4!)
- T 4 : když nalézáme nízké hodnoty
- TRH : stimulační test může potvrdit hypothyreózu i tam, kde samotné nestimulované hodnoty TSH jsou v normálu. TRH test může diagnostikovat i hypofyzární deficit TSH (vrozený či po zásazích na hypofýze)

Euthyreóza

Pokud je klinicky jasné, že štítná žláza je bez poruchy, není nutné tento stav diagnostikovat. Stanovení euthyreózy se provádí pouze z důvodů posudkových, před operacemi a pod.

Užití RIA testů ke screeningovým vyšetřením funkce štítné žlázy:

Laboratorní testy (T 4, T 3, TSH) nejsou určeny ke screeningovým vyšetřením - jedinou výjimkou je screening kongenitální (vrozené) hypothyreózy.

K tomu účelu se vyšetření provádí mezi 1-7 dnem po porodu (někdy i z pupečnickové krve) stanovení hladiny T4 mikrometodou; pokud je zachycena nízká hladina T4, je na spádovém pracovišti provedeno další doplňující vyšetření.

Význam tohoto screeningového vyšetření je v tom, že včas zahájená léčba hypothyreózy thyroidálními hormony zajistí normální vývoj CNS a předejde se tak těžkým mentálním postižením v průběhu dalšího vývoje.

II.3.4.3 Hladina hormonů hypofýzy

II.3.4.3.1 Přední lalok hypofýzy

a) Stanovení TSH - již bylo probíráno u poruch štítné žlázy.

b) Kit na stanovení prolaktinu
(kit Imunotech Praha)

Stanovení hladiny prolaktinu se provádí zejména při diagnostice poruch menstruačního cyklu, neplodnosti; dále v diferenciální diagnostice nádorů hypofýzy.

V plazmě je prolaktin v koncentracích pod 20 ng/ml; vyšší je hladina v těhotenství a při laktaci za fyziologických podmínek; patologicky jsou zvýšené hodnoty u některých hypothyreóz, typicky při adenomech hypofýzy (sterilita, impotence).

Pozor na zvýšení v důsledku hypoglykémie (inzulin!) a dále při testu TRH (viz obr. č.40).

**c) Kit na stanovení růstového hormonu (GH, STH)
(výrobce Imunotech Praha)**

Fyziologické hladiny jsou do 5 ng/ml. Ke stimulaci GH můžeme použít např. hypoglykémie vyvolané inzulínem, argininem, glukagonem. Snížení zvýšených hodnot pak můžeme dosáhnout naopak hyperglykemií po podání glukózy per os.)

Zvýšené hodnoty nalézáme u dětí, u dospělých při akromegalii. Snížení při poklesu funkce hypofýzy (resp. jejího předního laloku) či při poruchách růstu - viz obr. č.41.

**d) Kity na stanovení hormonu stimulujícího folikuly (FSH)
a luteinizačního hormonu (LH)
(výrobce Imunotech Praha)**

Jejich stanovení se uplatňuje zejména v gynekologické diagnostice. Nemá diagnostickou cenu dělat jednotlivá stanovení; vyšetření provádět buď opakovaně v 15-30 denních intervalech nebo provést stimulační test.

Hodnoty v období před pubertou jsou nízké. V dospělosti kolísají u žen s menstruačním cyklem; nejvyšší jsou při ovulaci.

U mužů nalézáme hodnoty 5-25 FSH

6-30 LH -viz obr. č.42.

e) Kit na stanovení hladiny ACTH

Jde o velmi složité stanovení, proto zajištěn celostátní servis na III. interně VFN v Praze 2.

Normální hodnoty jsou 12-55 pg/ml.

II.3.4.3.2 Zadní lalok hypofýzy

Hladina vasopresinu a oxytocinu se stanovuje pouze ojediněle. Hladiny - viz obr. č.43.

II.3.4.4 Hladina hormonů nadledvin

II.3.4.4.1 Kůra nadledvin

- Kortizol - normální hladina 160-550 umol/l ráno, výrazný pokles odpoledne (24 hod. rytmicita). Průkaz nižších hodnot kortizolu v plazmě ukazuje na hypokortikalismus (pro průkaz hyperkortikalismu jiná metoda než RIA, měření odpadu kortizolu močí, odpad by neměl přesáhnout 170 umol/den).

- Aldosteron- kit ALDO-steron 125J - Imunotech Praha. Stanovení se provádí v séru a v moči. Ráno vleže hodnota okolo 200 pmol na jeden litr, ve stoje se hodnoty zvyšují - viz obr. č. 44.

II.3.4.4.2 Dřeň nadledvin

Stanovení katecholaminů pomocí kitu CATECHOLA 3H REA kit či pro stanovení v moči CATECHOLA 14C - oba kity dodává Imunotech Praha.

Stanovení adrenalinu a noradrenalinu se provádí zřídka RIA metodou, spíše metodou HPLC a pod.

II.3.4.5 Hladina hormonů pohlavních orgánů

- **Testosteron:** Tento hormon se tvoří ve varleti, v menším množství též v kůře nadledvin a ve vaječníku. Denně se ho tvoří 4-9 mg; v plazmě je testosteron vázán na transportní bílkovinu.

Ke stanovení se užívá např. kit dodávaný Imunotech Praha.

Hodnoty: 1-3 nmol/l u žen, 10-30 nmol/l u mužů.

- **Estriol** -(RIA GHOST Estriol - free Behring)

Tento hormon je produkován placentou i plodem; pokles hladiny indikuje komplikace gravidity.

Hodnoty: od 4 do 13 ng/ml - viz obr. č.45.

- **Choriogonadotropní hormon (HCG)**

Tento hormon vzniká zejména v placentě, jeho hladina se prudce zvyšuje v průběhu gravidity, zejména v prvním trimestru.

Hodnoty stoupají od cca 800 mU/ml až na 100-150 000 mU/ml, po prvním trimestru pak opětovný pokles na cca 15 000 mU/ml.

II.3.4.6 Plasmatická reninová aktivita (PRA)

(výrobce Imunotech Praha - značeno 125 J)

Systém renin - angiotensin představuje jeden z důležitých hormonálních regulačních systémů pro homeostázu elektrolytů, objemu a tlaku krve.

Základem je hormon renin, uvolňovaný ledvinami. Ten způsobuje přeměnu angiotensinogenu na angiotensin I.; mění se na účinný angiotensin II. - viz obr. č. 46.

Vlastní účinná látka - angiotensin II.-působí vasokonstrikci, stimulaci tvorby a sekrece aldosteronu v kůře nadledvinek a stimulaci sympatiku.

Stanovení vlastního účinného angiotensinu II. je obtížné, proto se určuje snadněji přístupný angiotensin I; tj. jeho množství vzniklé in vitro v průběhu inkubace z angiotensinogenu ve vzorku plasmy. Množství vzniklého angiotensinu I. je přímo úměrné množství reninu v plasmě.

Stanovení PRA (z periferní či ledvinové krve) lze užít ke studiu účasti renin - angiotensinového systému v patogenezi hypertenze, v diagnostice poruch elektrolytové, objemové a tlakové homeostázy, v diferenční diagnostice různých druhů hypertenze, k rozlišení primárního a sekundárního aldosteronismu. Podmínkou správné interpretace výsledků jsou zejména standardní podmínky odběru krve.

Pozn.: Odběry krve do vychlazených zkumavek, obsahující EDTA (200 ul 4 % na 10 ml). Během celého zpracování nesmí teplota vzorků přesáhnout 2-4 o C; na tuto teplotu vychlázovat i ostatní součásti kitu.

Normální hodnoty do 2,0 ug/ml.

II.3.4.7 In vitro (RIA) diagnostika nádorů

RIA diagnostika nádorů se zakládá na průkazu látek produkovaných nádorem v séru nemocných. Vzhledem k nepatrným koncentracím těchto látek umožnila jejich stanovení právě až RIA metodika.

Z nádorových produktů se diagnosticky nejvíce využívá lidský choriový gonadotropin (HCG), alfa-fetoprotein (AFP) a karcinoembryonální antigen (CEA).

HCG

Fyziologicky produkován pouze v průběhu těhotenství. Pokud se HCG prokáže u muže, jde o jednoznačný projev maligního nádoru varlat, u netěhotné ženy pak o projev nádoru dělohy (nalézáme také značně zvýšené hodnoty, nad 150 000 mU/ml).

AFP, CEA (alfafetoprotein a carcinoembryonic antigen)

Kity fy Behring - RIAGNOST AFP resp. CEA; dále fy BIOMEDICA - viz obr. č. 47.

Jsou přítomné v organismu pouze v období embryonálního života a po porodu rychle vymizí. V dospělosti pak nacházíme v krvi pouze nepatrné stopy CEA. AFP se v dospělosti objevuje u primárních karcinomů jater, obdobně u nádorů varlat. Hodnoty CEA stoupají zase u karcinomu žaludku a střev.

Využití AFP a CEA stanovení v onkologické diagnostice
Hlavní využití RIA metodik není v základní diagnostice ale spíše při zjišťování účinku léčby; pokud i po léčbě (operační či ozáření) je hladina nádorových produktů stále zvýšena, jsou přítomny metastázy (projevení této změny diagnostikované RIA metodou předchází jiné zjistitelné změny a proto má vyšetření značný význam!).

Pro diagnostiku a monitorování léčby nádorů prostaty je určen PSA 125J - RIA kit ADICO - viz obr. č. 48.

Pozn. V poslední době se na specializovaných pracovištích užívají k diagnostice nádorů receptory a to jednak progesteronové jednak estrogenové.

II.3.4.8 Poruchy glycidového metabolismu

Poruchy glycidového metabolismu v organismu jsou spjaty s poruchou funkce pankreatu a to jeho části endokrinní. Endokrinní pankreas se skládá ze shluků buněk, vytvářejících tzv. Langerhansovy ostrůvky.

Tyto ostrůvky vytvářejí převážně (u člověka z 60-75%) hormon insulin (tvoří se v tzv. B-buňkách), z 15-30 % glukagon

(vytváří se v tzv. A-buňkách). Asi desetina buněk L. ostrůvků vytváří hormon somatostatin - viz obr. č. 49.

Insulin je jedním ze životně důležitých hormonů, který zasahuje do intermediárního metabolismu všech živin, nejvýrazněji však do přeměny glycidů, resp. do regulace stálé hladiny krevního cukru (glykémie).

Insulin se vytváří za přítomnosti příslušného enzymu z tzv. proinsulinu. Spolu s insulinem se v ekvimolárním množství uvolňuje z proinsulinu i tzv. spojovací peptid-C-peptid. V případech, kdy by vzhledem k podávanému exogennímu insulinu bylo obtížné stanovit hladinu insulinu, stanovujeme raději právě hladinu C-peptidu.

Obdobně to platí pro případ, že by množství stanoveného insulinu bylo zkresleno přítomností cirkulujících protilátek proti insulinu.

Fyziologickým antagonistou (protihráčem) insulinu je druhý pankreatický hormon - glukagon. Zatímco insulin hladinu krevního cukru snižuje, glukagon ji naopak zvyšuje; má tedy hyperglykemický účinek. Hlavními podněty pro zvýšenou tvorbu glukagonu jsou hypoglykémie (pokles hladiny krevního cukru), hladovění a také přívod aminokyselin.

Poslední uvedený faktor - přívod aminokyselin - působí stimulačně jak na uvolňování insulinu, tak glukagonu; proto je např. přívod 10 % argininu infuzí užíván u obou hormonů jako stimulační test. Obdobně jako jsme uváděli v případě jiných poruch, ať již jde o myokard či štítnou žlázu, nemusí totiž stanovování bazálních hodnot insulinu či glukagonu dát informaci o případné poruše orgánu. Až když orgán vystavíme určité zátěži, která ho donutí ke zvýšené činnosti, může se tato porucha projevit.

Insulin působí na celou řadu metabolických pochodů – ovlivňuje transport látek (nejen glukózy resp. dalších monosacharidů), jejich oxidaci i ukládání, ale také syntézu ribonukleové kyseliny (RNK) v jádru buněk či hladinu cyklického adenosinmonofosfátu (c-AMP).

Onemocnění diabetes mellitus (DM) lze charakterizovat jako relativní deficit insulinu, který nestačí zajistit utilizaci glukózy a dalších metabolitů ve tkáních. I když se stále užívá jeden název –

diabetes mellitus - a odlišují se pouze jeho dva typy - I. a II. – - dohodli se recentně diabetologové na světovém kongresu, že ve skutečnosti jde o dvě onemocnění, odlišná jak pokud jde o patogenezi tak o léčbu.

Tak zvaný DM I. typu je vždy závislý na dodávce exogenního insulinu (IDDM), protože za tohoto stavu organismus nedokáže produkovat buď prakticky žádné nebo velmi malé (nedostatečné) množství insulinu. Pankreas také není schopen odpovědět zvýšenou produkcí insulinu na glukózovou zátěž.

Naproti tomu u DM II. typu (NIDDM) závislost na vnějším insulinu nenacházíme a v odpověď na glukózovou zátěž můžeme najít dokonce i vyšší produkci insulinu. Tento hyperinsulinismus však nevede k poklesu glykémie v krvi. Uvedený stav může být způsoben buď menší periferní citlivostí na insulin, ale uvažována je naopak i zvýšená citlivost buněk L. ostrůvků na glukózu; pochopitelně v kombinaci s dříve uvedenou sníženou citlivostí periferních tkání na insulin.

Diabetes mellitus může vzniknout i druhotně a to při akromegalii, Cushingově chorobě, při feochromocytomu a také, jako sekundární efekt imunosupresivní léčby, při transplantacích orgánů. Primární defekt v sacharidovém metabolismu může být vyvolán v těchto případech růstovým hormonem, kortikoidy či katecholaminy. Hyperinsulinemie pak je vlastně kompenzačním mechanismem na těmito působky vzniklou glukózovou zátěž. Důsledkem hyperinsulinemie se tak může stát až vyčerpání rezerv L. ostrůvků a následné selhání jejich funkce.

Při diabetu mellitu (DM) vzniká hyperglykémie jako výsledek zhoršeného transportu a vychytávání glukózy ve svalech a tukové tkáni. Současně také poklesá transport a vychytávání ve tkáních u aminokyselin, zvyšuje se hladina aminokyselin v krvi a následně dochází k novotvorbě glukózy z aminokyselin v játrech (glukoneogeneze).

Metabolické poměry při DM je možno pozorovat na následujících obrázcích č. 50 a č. 51.

Vidíme poměry za fyziologických podmínek, kdy se po přívodu glycidů zesílí všechny cesty utilizace glukózy a naopak situaci při diabetu mellitu.

Pomocí RIA metodik můžeme stanovit prakticky všechny parametry potřebné pro diagnostiku poruchy metabolismu glycidů.

II.3.4.8.1 Hladina celkového insulinu

Stanovení hladiny insulinu pomáhá diagnostikovat hypo-resp. hyperinsulinémii. Spíše než bazální hodnoty, mají význam stimulovalé testy (za 30-60 a 120 minut po podání glukózy, jídel různého složení a pod.).

Tzv.clamp představuje zvláštní stimulaci po i.v. podané glukóze. Sledují se časy např. 4-6-10-20-30-40-60 min.případně i za delší dobu (10-ti hodinový clamp).

Po jiné stimulaci (např. p.o.glukózou) hladina insulinu stoupá asi na cca 50-60 uU/ml za 30-60 minut a pak opět poklesá. Při clampu je možné pozorovat hodnoty insulinu až 1500-4000 ul/ml. Při insulinomu většinou nacházíme vysoké hodnoty insulinu při nízkých hodnotách glykémie. Hyperinsulinemie může být i při předávkování insulinu, v pokročilém těhotenství, při akromegalii, Cushingově syndromu a pod.

Ke stanovení hladiny insulinu je možné používat několik kitů - anglického, polského a českého. Kvalita polského kitu se značně pohoršila. Anglický kit fy AMERSHAM je velice kvalitní, ale vzhledem k ceně je spíše používán kit český. Používáno je i stanovení fluorometrické na přístroji ABBOTT.

Normální hodnoty

Normální bazální hodnoty 0-25 uU/ml. Po zátěži p.o. (např. glukosou) se dostávají zvýšené hodnoty po 30 resp.60 minutách (na 60-100 uU/ml) a pak opět hodnoty poklesají přibližně k výchozí úrovni.

Při diabetu se objevuje vrchol hladiny insulinu později, ale je vyšší než u zdravých osob. Hyperinsulinemie bez hypoglykémie nacházíme u insulinomu či při předávkování insulinu. Může se také projevit v pokročilém těhotenství, při akromegalii, Cushingově chorobě a pod.

II.3.4.8.2 Hladina volného insulinu

Pro některá onemocnění je důležité znát nikoliv celkovou hladinu insulinu, ale jeho volnou frakci. Jeho hladina se stanovuje stejným kitem jako insulin celkový, rozdíl je pouze v tom, že k 0,2 ml vzorku krve přidáme 0,2 ml PEGu (5g PEG do 15 ml pufru). Dosažené výsledky pak násobíme 2x vzhledem k uvedenému ředění.

Některé dodávané kity pak stanovují přímo volný insulin.

II.3.4.8.3 Hladina protilátek proti insulinu

V krvi je přítomno- zejména za určitých stavů - i určité množ-

ství protilátek proti insulinu, které mohou část insulinu vázat v komplexu. Množství protilátek se kvantifikuje jako vazebnost, resp. se stanovuje množství protilátek (relativní kvantitativní odpověď pacienta na insulin; komplikace značeného a neznačeného insulinu nastává jen u pacientů léčených insulinem).

II.3.4.8.4 Hladina C-peptidu

Insulin se vytváří z tzv. proinsulinu. Účinkem specifických enzymů se zároveň s insulinem uvolňuje ekvimolární množství C-peptidu (jednoduchý polypeptid tvořený řetězcem 31 aminokyselinových zbytků).

Insulin je vylučován do v. portae (vrátnicový oběh), játra vstřebávají asi polovinu insulinu přicházejícího v. portae. Toto množství je závislé na koncentraci insulinu a glukózy. Protože C-peptid je v játrech vychytáván v konstantním množství (asi 12 %), poskytuje sledování C-peptidu spolehlivější informaci o sekreci beta buněk, než samotný insulin.

Výpočet

Stanovuje se buď bazální hodnota (na lačno)
nebo stimulovaná hodnota

- po orálně podané glukóze za 0-30-60-120 minut
- po i.v. podané glukóze (clamp) - např. za 0-4-6-10-20-30-40-60-100-110-120 sekund
- po i.v. podaném glukagonu ve stejných časech

II.3.4.9 Poruchy kalciofosfátového metabolismu

II.3.4.9.1 Regulace hladiny vápníku v plasmě

Na regulaci hladiny vápníku v plasmě se podílejí svými hormony zejména dvě endokrinní žlázy a to příštítná tělíska (produkují parathormon) a štítná žláza (produkuje kalcitonin). Kromě nich působí na metabolismus vápníku nadledvinkové kortikoidy (glukokortikoidy) a také růstový hormon předního laloku hypofýzy.

Vápník je v těle obsažen hlavně v kostech, kde se nachází ve dvou formách:

- snadno směnitelná zásoba
- pool stabilního (pomalu směnitelného) vápníku

V plasmě je normálně obsaženo asi 5 mekv/l vápníku, který je zčásti vázán na protein a zčásti je difusibilní. Vápník plasmy je v rovnováze se snadno směnitelným vápníkem kostí.

Volný (ionizovaný) vápník v tělesných tekutinách je nezbytný pro normální kontrakce svalů kosterních a myokardu, pro přenos nervového vzruchu i pro srážení krve. Vzhledem k vazbě vápníku na plasmatické bílkoviny je důležité stanovovat vedle hladiny vápníku i hladinu plasmatických bílkovin.

Vápník je aktivně transportován ze střeva; tento pochod je stimulován vysokoproteinovou dietou a také působením vit. D.

V kůži vzniká z provitaminu D vlivem slunečního světla vit. D 3. Ten se transportuje do jater, kde se mění na 25-OH vit. D 3 a po transportu do ledviny na vlastní fyziologicky aktivní 1,25 dihydroxy vit. D 3. Ten prostřednictvím stimulace tvorby RNA působí zvýšení transportu vápníku. Při deficitu vit. D tak dochází k hypokalcémii a poruchám mineralizace kostí.

Při nedostatečné funkci ledvin není tento orgán rovněž schopen vyrábět potřebné množství 1,25 - dihydroxy vit. D 3, což se projevuje poruchou mineralizace. Naopak podávání velkých dávek vit. D 3 zvyšuje hladinu vápníku v plasmě natolik, že to přispívá k léčbě nedostatečné funkce příštitných tělísek.

Existují vzájemné vztahy mezi hladinou vápníku, tvorbou 1,25 dihydroxy vit. D 3 a hladinou PTH - tvorba vit.D se zvyšuje při poklesu vápníku volného; tento účinek je zprostředkován PTH.

Řada onemocnění se vyznačuje poruchou kalciofosfátového metabolismu a následnými kostními změnami. Při osteoskleróze, která se vyskytuje u nemocných s hypoparathyreosou, či při metastazujících tumorech, nacházíme zvýšené množství kalcifikované kosti. Naopak při osteoporóze, která se vyskytuje u nemocných s velkým omezením pohybu či při nadměrné sekreci glukokortikoidů, nacházíme snížené množství kalcifikace kostí. Jako o osteomalacii hovoříme v případech poruchy přirůstání kostního minerálu (křivice).

Po vynětí příštitných tělísek (parathyreoidektomii), ať již záměrné (při tumorech tělísek nebo při hyperparathyreoze) či nechtěné (při operacích štítné žlázy), dochází k poklesu hladiny vápníku v plasmě; obvykle naopak stoupá hladina fosfátů. Velmi nebezpečná je hypokalcemická tetanie (spasmus kosterních svalů, zejm. končetin a laryngu). Tetanie mizí po injekci PTH resp. po podání velkých dávek vit. D. Při hypersekreci parathyroidálního tumoru dochází k hyperkalcémii a hyperkalciurii, současně dochází na jedné straně k demineralizaci kostí, na druhé pak k vytváření mnohočetných kostních cyst (osteitis fibrosa cystica).

Při vysoké hladině vápníku v plasmě se inhibuje sekrece PTH a vápník se ukládá v kostech. Při nízké hladině se sekrece PTH zvyšuje a dochází k mobilizaci vápníku z kostí. Za stavů s chronickým snížením hladiny plasmatického vápníku (např. chronická nefropatie) dochází tak k sekundární hyperparathyreose. Vylučování kalcitoninu se naopak zvětšuje při vyšších hladinách vápníku (viz obr. č. 52), což je přirozené vzhledem ke skutečnosti, že kalcitonin je, pokud jde o hladinu vápníku, antagonistou PTH.

Zájemce o podrobnější informace o patogeneze i terapii poruch kalciofosfátového metabolismu odkazují na monografie z této oblasti, zejména Sotorník a sp. (1992).

Z RIA resp. ostatních RSA metod jsou při diagnóze poruch kalciofosfátového metabolismu užívány zejména následující:

- stanovení PTH

a) IRMA metoda dvou protilátek, pro stanovení celého aminokyselinového řetězce PTH; umožňuje při současném stanovení hladiny vápníku odlišit hypo-, eu- i hyperparathyroidismus, změny při renální nedostatečnosti i při obezitě.

b) C-terminal PTH - pro stanovení 65-84 aminokyseliny řetězce PTH, odliší hypo-, eu- i hyperparathyroidismus.

- stanovení kalcitoninu - užíván zejména jako marker tumoru postihujícího C-buňky štítné žlázy; jeho zvýšené hladiny byly nalezeny i u jiných nádorů

- hladina 25 - OH vit. D 3 - pro zjištění, zda nalezené hodnoty uvedené formy D3 patří ještě do normálního rozmezí zásobení organismu tímto vitamínem či nikoliv

- hladina 1,25 - (OH)² vit. D 3 - pro zjištění, zda nalezené hodnoty tohoto biologicky účinného vitamínu patří ještě do normálního rozmezí; dále se užívá ke kontrole účinnosti podávaných preparátů pokud jde o hladinu vápníku a fosforu

- hladina osteokalcinu - vzhledem k tomu, že hladina tohoto specifického kostního proteinu koreluje s aktuálním stavem kostního metabolismu, je osteokalcin citlivým ukazatelem kostních onemocnění

Postupně probereme všechny tyto in vitro metodiky; zvláštní pozornost bude přitom věnována dvěma metodikám, které znamenají poněkud odlišný metodický postup a to stanovení PTH a 1,25-(OH)² vit. D 3.

II.3.4.9.2 Hladina PTH

a) PTH (parathyroid hormon ALEGRO

Nichols Inst. Diagnostics, San Juan Capistrano, Ca., USA

Imunoassay pro kvantitativní stanovení lidského parathormonu v séru. Kit vystačí na 100 zkumavek, tj. 18 zkumavek na celkovou aktivitu, nespecifickou vazbu, standardy a kontroly a 82 na 41 vzorků v duplikátech.

Princip metody

Jde o imunoradiometrickou metodu - IRMA - pro stanovení celého aminokyselinového řetězce PTH. Metoda užívá dvě protilátky (kozi) proti lidskému PTH, které jsou specifické pro dvě definované oblasti molekuly PTH. Jedna z nich váže pouze prostřední část a C-terminální PTH (39-84); tato protilátka je navázána na plastické kuličky. Druhá protilátka váže pouze N-terminal PTH (1-34); tato protilátka je označena 125J pro detekci.

Vzorek obsahující PTH je inkubován současně s kuličkou obsahující protilátku a s protilátkou obsahující 125J. PTH přítomný ve

vzorku je navázán na obě protilátky a vytváří "sendvičový" komplex, protilátka kuličková (39-84) --- PTH (1-84) ---125J -protilátka (1-34). Pro detekci je potřebné vytvoření tohoto komplexu s vlastními PTH, i když kuličková protilátka váže také střední a C-terminální fragmenty. Kapacita kuličkové (imobilizované) protilátky je nastavena tak, aby nedošlo k interferenci s neaktivními fragmenty a to i při jejich vysoké koncentraci.

Na konci inkubace se kulička obsahující protilátku promyje, aby se odstranily nenavázané komponenty a měří se pomocí gamaměřiče aktivita navázaná na pevné fázi. Protože k vytvoření tak zvaného "sendvičového" komplexu dochází pouze v přítomnosti vlastní intaktní molekuly PTH, je aktivita komplexu přímo úměrná množství PTH ve vzorku.

Křivka závislosti radioaktivity na koncentraci se připraví pomocí standardních vzorků, které jsou zpracovány spolu s neznámými - koncentrace neznámých vzorků se přitom přímo odečítá z této kalibrační křivky.

Sběr resp. příprava vzorků

Stanovení PTH se dělá v séru; přijatelné je i stanovení v EDTA plasmě. Pro stanovení duplikátu je potřebné 400 ul séra. Vzorky je třeba centrifugovat (nejlépe v chlazené centrifuze); ihned dát zmrazit do -20o C (při pokojové teplotě vydrží pouze 2 hodiny; při 4o C 8 hodin; při -20o C 4 měsíce a při -70 o C 11 měsíců).

Poznámky:

Je nutné pořádně promíchat všechny reagenty jemným třepáním či vířením.

Všechny složky kitu je třeba skladovat při 2 - 8o C až do doby užití.

Standardy a kontroly po rekonstituci je třeba dát nejprve do ledové lázně na dobu 10 minut. Stejně jako vzorky je pak udržovat v ledu až do doby stanovení.

Standardy a kontroly užít ihned po jejich přípravě; zbývající skladovat při -20 o C; zde vydrží po dobu 6 týdnů (s maximálně třemi cykly roztátí x zmražení).

Promývací roztok může být skladován v pokojové teplotě.

Postup:

- pipetovat 200 ul standardu (C-H), kontrol (J-K) či vzorků
 - + 100 ul značené protilátky (B) a promíchat na Vortexu
 - + vždy 1 kuličku s protilátkou (A) do zkumavky
 - pokrýt stojan se zkumavkami parafilmem a pod.
 - inkubovat při pokojové teplotě 22o C cca 22 hodiny
-
- přidat 2 ml promývacího roztoku a odsát či dekantovat supernatant
 - totéž opakovat ještě jednou
 - změřit aktivitu na gamaměřiči 1 minutu

Limitace metody

Nejvyšší stanovitelné množství PTH je 1500 pg/ml, nejnižší je

I pg/ml. Variace v obsahu bílkovin cca 25 % mají malý až žádný vliv na hodnoty PTH. Ředit je možné vzorky mezi I 500 - 100 000 pg/ml.

Očekávané hodnoty

Hodnota u 253 zdravých osob byla zjištěna v rozmezí 10-65 pg/ml.

U primárního hyperparathyreoidismu jsou zvýšené hodnoty 53-1180 pg/ml (celkový vápník byl od 10,5 do 16,3 mg/100 ml).

Při hyperkalcemii maligní jsou hodnoty větší než 1 pg/ml až 22 pg/ml, hodnoty kalcemie přitom 10,5 - 17,6 mg/100 ml. Při hypoparathyreoidismu hodnoty 1-21 pg/ml; kalcium přitom je mezi 6,3 - 8,5 mg/100 ml.

U chronické renální nedostatečnosti a osteitis fibrosa pokročilé jsou hodnoty zvýšeny v průměru na více než 1033 pg/ml.

b) C - terminal PTH 125J RIA kit

INCSTAR Corp., Stillwater, Min., USA) - na 65 stanovení

Jde o metodiku se zpožděným přidáním značkovače, což zvyšuje sensitivitu metody. Protilátka byla vypracována proti hovězímu PTH a reaguje na 65-84 sekvenci molekuly PTH. Při této RIA metodě se vzorek a první protilátka inkubují po 16-24 hodin při 2-8 o C. Pak se přidá značkovač a znovu je inkubace 16-24 hodin při 2-8 o C. Separace se dosáhne pomocí druhé protilátky s PEG; pak následuje opět 2 hodinová inkubace. Hladina PTH (stejně jako standardy) se vyjadřuje v ng/ml.

Očekávané hodnoty

Normální hodnoty: 0,44

Hyperparathyreoidismus: zvýšené hodnoty PTH.

Hypoparathyreoidismus - snížené (až neměřitelné) hodnoty.

Poznámky:

Pokud je to možné, stanovujeme raději metodikou Allegro celou molekulu PTH.

Hladina PTH je základním ukazatelem u postižení poruch kalciofosfátového metabolismu, proto je nezbytné tento hormon u každého nemocného, u kterého se objevují určité poruchy, skutečně stanovit. Stejně tak stanovovat jeho hladinu opakovaně v průběhu určité terapie, ať již operativní či konzervativní.

II.3.4.9.3. Hladina kalcitoninu

Calcitonin-Radioimmunoassay kit - Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, USA

Kalcitonin, polypeptidický hormon s 32 aminokyselinami, je secerňován především C-buňkami štítné žlázy (původně se předpoklá-

dalo, že je secernován v parathyroidní tkáni!); z určité části i mimo štítnou žlázu.

Účinkem kalcitoninu je snížení hladiny kalcia; inhibice resorpce v kosti. Také podporuje clearance kalcia a fosfátu močí – pokud jde o fosfor, je synergistou parathormonu, účinek na kost a na vápník v moči je naopak antagonistický PTH. Fyziologický význam jeho funkce v homeostáze vápníku v savčích buňkách není doposud dobře prokázán, zejména u člověka.

Přesto je RIA stanovení kalcitoninu považováno většinou badatelů za nejvhodnější metodu pro určení diagnózy medullárního karcinomu štítné žlázy (MTC). Tento karcinom postihuje C-buňky štítné žlázy a tvoří 5-10% všech thyroidálních karcinomů; může být buďto familiární či nikoliv. U familiárních MTC je možná časná diagnóza: koncentrace kalcitoninu na lačno jsou zvýšeny, enormně se zvýší jeho hladina po podání kalcia či pentagastrinu. Tyto změny hladiny kalcitoninu se projevují dříve než klinické příznaky (když nikoliv basální hodnoty, tak zcela určitě hodnoty po stimulaci!).

Zvýšené hladiny kalcitoninu byly také nalezeny u jiných nádorů, např. plicních či mamárních.

Na rozdíl od jiných RIA kitů užívá kit fy Nichols vysoce citlivé a specifické protilátky a tak umožňuje stanovovat i nízké hodnoty (3 pg/ml u normálních osob).

Očekávané hodnoty u normálních osob

Laboratoř výrobce určila 3-26 pg/ml u mužů (u 41 mužů), resp. 2-17 pg/ml u žen (u 56 žen).

Po stimulaci

pohlaví čas infúze pentagast. kalcia a pentagast.

ženy	1 min.	2 - 26	6 - 82
	2 min.	3 - 29	4 - 94
	5 min.	3 - 23	5 - 76

muži	1 min.	6 - 90	26 - 350
	2 min.	10 - 84	32 - 350
	5 min.	7 - 106	24 - 244

II.3.4.9.4 Hladina 25-hydroxy vitaminu D3

Kit na stanovení 25-hydroxy vitaminu D3 (značeno 3H)
(Nichols Inst. Diagnostics, San Juan Capistrano, USA)

Princip

Alkoholové extrakty 100 ul séra jsou inkubovány se specifickou protilátkou (vaznou bílkovinou) na vit. D a se značeným 25-hydroxy vitaminem D3. Inkubace trvá 3 hodiny a probíhá při 4 o C. Pak se přidá charcoal (aktivní uhlí) a následuje další 20 min. inkubace.

Pak jsou zkumavky centrifugovány při 4o C po dobu 20 min.

při 1500 g. Supernatant se dekantuje, do scintilačních lahvíček se scintilačním koktejlem. Měření probíhá na beta měřiči, hodnoty neznámých vzorků se porovnávají s hodnotami standard. Výsledky se vyjadřují v ng/ml séra.

Průměrné hodnoty

Výrobce byly stanoveny hodnoty kontrol (americké!) a to 45 ng/ml (16-74 ng/ml). Je však nutné udělat si kontroly vlastní.

Nejmenší změřitelná hodnota: 2 ng/ml

II.3.4.9.5 Hladina 1,25 dihydroxy vitaminu D3 (Nichols Institute San Juan, Capistrano, USA)

Kit postačí na 65 zkumavek. K označení je užit 3H (trícium). Při metodě je nutné oddělit 1,25 - (OH)₂ D od ostatních lipidických látek (dříve byly potřebné opakované extrakce a přečišťování).

V metodě s užitím kitu je zapotřebí modifikovaná extrakce na C18 OH koloně; k 1 ml extraktu se přidá specifický vazný protein, po 1 hod. inkubace pak označený 3H - 1,25 (OH)₂ D3. Pak je opět 1 hod. inkubace a přidá se charcoal. Po 30 min. inkubaci při 2-8 o C se zkumavky zcentrifugují 20 min. v chlazené centrifuze. K supernatantu se přidá scintilační koktejl a změří se aktivita. Výsledky se vyjadřují jako pg/ml. Je třeba korekce na krok sloupcové chromatografie.

Provedení

A) Extrakce

- 1 ml (séra či kontroly) do zkumavek 13x100 mm + 50 ul reag. K (značkovač)
- 2x promíchat v průběhu 10 minut
(po 50 ul také napipetovat do 2 scintilačních lahvíček, přidat 10 ml scint. koktejlu = základ pro stanovení recovery!)
- + 1 ml acetonitrilu, 30 sekund intenzivně míchat
- centrifugovat 15 minut v chlazené centrifuze při 1300-1500g
- supernatant slít do zkumavek 13x100 mm, kde již připraveno 0,4 ml fosfátového pufru o pH 10,5, promíchat
- centrifugovat 10 minut při 2-8 o C
- dekantovat do připravených C18 OH kolonek

B) Příprava kolonek před použitím a vlastní extrakce

Postupně proplachovat následujícím způsobem:

a) 5 ml hexanu

5 ml isopropanolu

5 ml metanolu

5 ml destilované vody

b) zapnout vývěvu a rychlostí 1 kapka/min. nechat protéci vzorky

c) vypnout vývěvu a promýt kolonu 5 ml vody

5 ml 70% metanolu ve vodě

5 ml 10% metylchloridu v he-

xanu
5 ml 1% isopropylalkoholu
v hexanu

- d) vymýt 1,25 (OH)₂ D 5 ml 5% isopropanolu v hexanu (pokud se užívají stejné kolony, promýt 5 ml isopropanolu a pak B-A)
e) vysušit eluáty N2 (30-45 minut) - eluáty mohou být skladovány 1 týden při -20 °C
f) vysušené eluáty rekonstituovat 200 ul reagence D (standarda 0); promíchat, dvakrát po 5 minutách - rekonstituované vzorky je nutno dále zpracovávat do 30 min.
C) RIA provedení

Hodnoty zdravých osob: 18-62 pg/ml, průměr = 39 pg/ml.

II.3.4.9.6 Hladina osteokalcinu

(RIA kit OSTEOCALCIN 125J INCSTAR Corp. - Stillwater, USA - Sorin Fueter, Bruxelles, Belgie)

Osteokalcin - protein závislý na vit. K - je jeden z nejdůležitějších nekolagenních proteinů v kosti. Nalézá se pouze v kosti a pravděpodobně je produkován osteoblasty. Předpokládá se, že hraje roli v mineralizačním procesu a že je pod vlivem ostatních látek regulujících metabolismus vápníku, tj. kalcitoninu, PTH a vit. D.

Hladina osteokalcinu při různých kostních onemocněních je specifickějším ukazatelem než alkalická fosfatáza (ta reaguje i na změny v zažívacím ústrojí, v játrech či v nádorech). Proto je osteokalcin specifickým ukazatelem kostních onemocnění.

Normální hodnoty

Výrobce uvádí rozmezí 1,8 - 6,6 ug/ml; je však třeba si udělat vlastní kontroly!

Citlivost metody: 0,2 ug/ml.

Poznámky:

- je lépe stanovovat celý komplex výše uvedených regulačních látek kalciofosfátového metabolismu, protože to umožňuje jemně diferencovat jak patologické změny, tak i výsledek terapie
- v současné době se počet stanovovaných látek ještě dále rozšířil o alkalickou kostní fosfatázu

II.3.4.9.7 TANDEM-R-OSTASE (HYBRITECH EUROPE S.A., Belgium) IRMA pro měření kostní alkalické fosfatázy (kostní ALP v séru

Lidské alkalické fosfatázy (ALP) katalyzují hydrolyzu fosfátových esterů při alkalickém pH. V séru jde především o ALP kostní a jaterní.

O hladině kostní ALP se předpokládá, že odráží metabolický stav osteoblastů. Přesné zjištění kostního metabolismu je důležité

pro určení závažnosti kostního onemocnění a reakce na terapii. Užívá se např. pro hodnocení osteomalácie, primárního hyperparathyroidismu, renální osteodystrofie, osteoporózy a kostních metastáz.

Princip metody

Jde o imunoradiometrickou metodu (IRMA), ve které vzorky obsahující kostní ALP reagují jednak na monoklonální protilátku, kterou jsou potaženy plastické kuličky, jednak na monoklonální protilátku označenou RA značkovačem. Vytvoří se komplex (sendvič) tvořený protilátkou na pevné fázi - kostní nenavázanou značenou protilátkou a aktivitu komplexu měříme na gamaměřiči. Z kalibrační křivky pak odečteme koncentraci ALP, která je přímo úměrná naměřené radioaktivitě.

Souprava je pro stanovení ve 100 zkumavkách, tj. 43 vzorků !

Poznámky:

- pokud vzorky mají více než 120 ug/l je nutné je naředit nulovým standardem a znovu stanovit
- promytí kuliček je velmi důležité pro přesnost stanovení !
- pro pipetování značené protilátky a promývacího roztoku možno užít pipetoru, ostatní složky pipetovat s vyměnitelnými špičkami, ty měnit po každém vzorku !
- rozsah stanovení je limitován počtem vzorků, které mohou být na-pipetovány za 20 minut
- nepoužívat skleněné zkumavky !
- nejlepší vazba na protilátky při teplotě inkubace 2-4 o C !

Interference

NEVADÍ: Hemoglobin a bilirubin do 500 mg/100 ml resp. 25 mg/100 ml
Triglyceridy do 1420 mg/100 ml
Proteiny v rozmezí 6-15,6 mg/100 ml
léky

Minimální změřitelné množství 2 ug/l

Závěr o RIA metodách

Bylo by možné říkat ještě řadu příkladů o užití RIA metod, kterými můžeme stanovovat řadu dalších důležitých látek (např. C-AMP, vitaminy, hladiny železa atd.). Odkazuji však na specializované publikace, informativní letáky jednotlivých výrobců a pod. Roční informace vydává rovněž referenční RIA laboratoř v Ostravě.

Pokud jde o příklady jednotlivých kitů pro RIA či ostatní RSA stanovení, jde skutečně pouze o příklady - v současné době je na trhu celá řada kitů a pro jejich výběr je nutné uvážit jak jejich citlivost, tak i pracovní a ekonomickou náročnost.

III. METODY S UŽITÍM RA LÁTEK

V zásadě lze pomocí RA látek provádět následující vyšetření a sledování:

- lokalizační gamagrafii
- funkční orgánovou diagnostiku
- stanovení biologických objemů a metabolických zásob
- stanovení koncentrací biologicky účinných látek (zejm. pomocí RIA a dalších in vitro metodik)
- vlastní metabolická sledování, tj. sledování určitých pochodů přeměny látkové za podmínek fyziologických i patofyziologických

Postupně si probereme tyto přístupy, při čemž hlavní pozornost budeme věnovat přístupům užívaným ve fyziologii, tj. od stanovení biologických objemů počínaje a vlastními metabolickými sledováními konče. Příklady užití těchto metodik pro metabolické studie budou probrány podrobněji, v poslední části skript.

III.1 Lokalizační gamagrafie a funkční orgánová diagnostika

Tyto metodiky jsou užívány zejména v lékařství, biologové fyziologického zaměření je budou s největší pravděpodobností používat spíše výjimečně. Proto se o nich zmíníme jen krátce a pro podrobnější informace odkazují na učebnice nukleární medicíny, např. Dienstbier a sp. (1989) či Blažek a Hupka (1989).

III.1.1 Lokalizační gamagrafie

Pokud se vybraná značená látka selektivně hromadí v určitém orgánu, lze tento orgán zobrazit záznamem gama záření nad povrchem těla. Tento způsob zobrazení se nazývá gamagrafie nebo scintigrafie.

Z gamagramu lze hodnotit velikost, tvar, uložení a případné změny struktury orgánů.

Toto zobrazení je odlišné od rentgenového zobrazení. Zatím co rentgenový snímek vzniká na základě rozdílné absorpce paprsků vysílaných RTG lampou, při gamagrafii v sobě vyšetřovaný orgán hromadí více či méně radioaktivní látku.

Pokud změny v orgánu nemění absorpci RTG paprsků, ale mění funkci orgánů, dává gamagrafie přesnější výsledky. Totéž pochopitelně platí naopak, obě metodiky se navzájem doplňují (vidíme to z jejich porovnání za stejných stavů organismu).

Lokalizační gamagrafie se uplatňuje při sledování funkce různých orgánů, ale zvláštní uplatnění nalézá v onkologii (umožňuje najít ohraničené nádorové ložisko).

III.1.1.1 Lokalizační gamagrafie ledvin

Jako značená sloučenina se využívá např. merkaheptonát či dimerkaptosukcinát, jako radioindikátor v obou případech ^{99}Tc . Tyto sloučeniny se podají i.v. (aktivita cca 100 MBq), sleduje se hromadění v parenchymu ledvin. Při narušení funkce ledvin kumulace probíhá delší dobu (2-4 hodiny).

Při normální funkci je distribuce radioaktivity v ledvinách homogenní. Pokud nalezneme místa s nižší aktivitou, nasvědčují ložiskovým procesům (viz obr. č.21). Pomocí gamagramu můžeme hodnotit i velikost orgánu.

III.1.1.2 Lokalizační diagnostika jater

Ke statickému zobrazení jater pomocí značených sloučenin se využívají buňky retikuloendotelového systému (RES), které jsou ve tkáni jater rovnoměrně rozloženy. Pro RES je vhodný jako značená sloučenina nejspíše radiokoloid, např. sulfurkoloid, opět značený ^{99}Tc . Ten se asi z 90% nahromadí v játrech a zbytek nalézáme ve slezině.

Ke zpomalení vychytávání dochází při těžších poruchách jater, kdy se také zvyšuje kumulace ve slezině, u velmi těžkých poruch nacházíme aktivitu i v kostní dřeni (viz obr. č. 22).

Podaná aktivita je cca 50 MBq . Výpadky radioaktivity (tzn.

menší aktivitu) nalézáme při různých ložiscích, včetně onkologických.

III.1.1.3 Lokalizační diagnostika patologických ložisek v myokardu

Jako radiofarmakon se podává chlorid thalný, značený ^{201}Tl . Většinou se vyšetřuje myokard po zátěži (např. bicyklolový ergometr), podává se cca 80 MBq chloridu ^{201}Tl . Zobrazení se provádí 15-30 minut po aplikaci, potom za 2 a 4 hodiny (viz obr. č. 23).

III.1.1.4 Lokalizační thyreologická diagnostika

Původně byl ke sledování štítné žlázy užíván prakticky výhradně tzv. akumulární test, při kterém se sledovala aktivita nad štítnou žlázou za 8-24-48 hodin po podání radiojodu - tj. jodidu značeného ^{131}J (viz obr. č. 24).

Gamagraficky se dá štítná žláza zobrazit ve vrcholu křivky při akumulárním testu, nebo po i.v. podání 20-40 MBq per-
per-technátu ^{99}Tc .

Tento způsob vyšetření je pro pacienta výhodnější, sleduje se hromadění po 30 minutách. Izotop má krátký poločas, takže radiační zátěž je malá. Ze stejného důvodu se v současné době k zobrazení užívá i krátkodobý izotop jodu – ^{123}J .

Příklad zobrazení - viz obr.č. 25.

III.1.1.5 Lokalizační diagnostika nádorů skeletu

Po podání metylendifosfonátu – ^{99}Tc se tato značená látka za několik hodin nakumuluje v celém skeletu. Jako ložiska vyznačující se zvýšeným hromaděním aktivity (pozitivní ložiska, horká místa) se zobrazují osteogenní nádory.

Při gamagrafickém zobrazení se i.v. podává cca 500 MBq uvedené značené látky a po 3-4 hodinách se provede zobrazení (viz obr. č. 26).

III.1.1.6 Lokalizační diagnostika nádorů mozku

Zatímco zdravá mozková tkáň má velice omezený přestup z krve do mozku, je tato bariéra porušena v nádorové tkáni. Tu se také radiofarmakon může hromadit v intracelulárních prostorech, zatímco normální mozková tkáň ji prakticky nevyčytává.

Jako nejvhodnější radiofarmakon se používá pertechnát – ^{99}Tc a to v dávce cca 300 MBq, měří se po 1 hodině. Protože pertechnát se vyčytává také ve štítné žláze, jak již bylo uvedeno, blokuje se její činnost chloridem. Zobrazení mozku viz obr. č. 27.

III.1.1.7 Lokalizační diagnostika nádorů pomocí ^{67}Ga

I když se pomocí ^{67}Ga pozitivně zobrazují ložiska různé etiologie, používá se uvedená metodika se značeným galiem v některých případech, zejm. u lymfomů a bronchogenních karcinomů, jako jedna z hlavních metod.

Aplikuje se i.v. cca 1 MBq citrátu - ^{67}Ga /kg hmotnosti, gamagrafie se provádí za 48 hodin.

Příklad viz obr. č. 28.

Vedle lokalizačních gamagrafických metod se RA sloučenin v klinice užívá i v jiných metodikách; odkazují na speciální publikace jako Dienstbier a spol.(1989) "Diagnostika metodami nukleární medicíny" či Blažek a sp. (1989) "Radiologie a nukleární medicína".

III.1.1.8 Alternativní zobrazovací metody

Kromě rentgenologických metod jsou při zobrazování orgánů hlavními konkurenty sonografie, výpočetní tomografie a magnetická rezonance.

a) Ultrazvukové vyšetření (ultrasonografie, echografie)

Ultrazvukové vyšetření snad ani není třeba podrobně vysvětlovat, přesto ale alespoň něco o principu této metody. K diagnostice se užívá ultrazvuku o frekvenci 1-10 MHz. S výjimkou Dopplerovské metody trvá impuls 1-100 ms. Zdrojem ultrazvuku jsou tzv. piezomateriály, které působením střídavého proudu vysílají ultrazvukové vlny. Při dopadu ultrazvukových vln slouží piezomateriály jako přijímač.

Ultrazvuk prochází hmotou a je jí rozptylován, absorbován i odrážen zpět. Síla odrazu závisí na rychlosti ultrazvukových vln a na hustotě tkáně. Tato metodika se velmi rychle ujala při vyšetřování kardiovaskulárních poruch, dále při zjišťování poruch funkce ledvin a gastrointestinální trubice. Zvláštní použití má v gynekologii a porodnictví, kde umožňuje vyšetřování i v průběhu gravidity, bez nebezpečí ohrožení plodu, jaké přichází v úvahu při rentgenových vyšetřeních či při užití RA látek.

Např. v kardiologii nás informuje echokardiografie v různých aspektech lépe než RTG vyšetření. Pomocí ultrazvuku však můžeme vyšetřovat i mozek (echoencefalografie), s užitím ultrasonotografie orgány břicha a pánve, štítnou žlázu, prsy a p.

Ultrazvukové přístroje jsou vyráběny v řadě typů, odlišných i podle orgánů, jejichž činnost mají sledovat. Příklad takového přístroje viz obr. č. 29.

b) Výpočetní tomografie (Computer tomography - CT)

Tento způsob rentgenové diagnostiky spojuje diagnostiku pomocí Rentgenova záření, schopnou zhotovení řezu příslušným orgánem přibližně za 5 sekund s počítačovým zpracováním těchto řezů do komplexního zobrazení (autor CT Hounsfield byl za její objev vyznamenán Nobelovou cenou v roce 1979). Tímto způsobem zobrazuje CT i měkké tkáně, jako je mozek, slinivka, slezina, ale také játra, ledviny či svalstvo.

Výpočetní tomograf (viz obr. č. 30) má následující hlavní části:

- posunovatelný vyšetřovací stůl
- vlastní přístroj s vysoce výkonnou rentgenovou lampou a detektory (vše opět pohyblivé)
- rentgenový generátor
- stoly operátora a vyhodnocovací, napojené na počítač

Zobrazení CT je možné zaznamenat buď na disketu nebo jako fotografie na plochem filmu (obrázky z monitoru lze přefotografovat na RTG filmy).

Indikace CT jsou velmi široké, protože při tomto vyšetření lze zjistit takové patologické procesy, které se liší svojí denzitou od okolí.

c) Magnetická rezonance (MR)

Stručně o principu magnetické rezonance : Atomová jádra s lichým počtem protonů (nebo neutronů) mají tzv. spin, tj. otáčejí se kolem vlastní osy. Nejjednodušší jádro, které se takto chová, je jádro vodíku. Jádro se otáčí podél své osy nejrůznějšími směry; to se však mění, když se jádra atomu nacházejí v silném magnetickém poli. V tomto případě probíhají totiž osy otáčení ve směru magnetického pole, tedy rovnoběžně. Čím je magnetické pole silnější, tím je rovnoběžné uspořádání os dokonalejší.

Když na tuto rovnováhu působíme střídavým magnetickým polem a to vysokofrekvenčním, dojde k tzv. precesi, tj. osa otáčení se vychýlí a pohybuje se jakoby po plášti pomyslného kužele (jádro i osa se tedy pohybují jako dětská káča). Když přestane vysokofrekvenční impuls působit, vrací se jádro do rovnovážného stavu. Na cívce, která předtím byla zdrojem vysokofrekvenčního impulsu napětí, se vytváří rezonanční signál.

Doba, po kterou se obnovuje rovnovážný stav, tj. kdy se osy otáčení vracejí z vychýleného stavu, se nazývá relaxační doba. Skládá se z T2 - tj. interval od vypnutí impulsu k začátku navrácení se os otáčení jader a T1 - interval, kdy se osy vracejí z vychýleného do rovnovážného stavu. T2 je vždy kratší než T1 a oba časy charakterizují vyšetřovanou tkáň.

Tak např. pankreas má T1 290 ms, T2 60 ms - játra T1380 ms a T2 40 ms. Tyto orgány s nádorovými metastázemi zvyšují hodnotu T1 - pankreas na 840 ms a játra na 570 ms.

V praxi se užívá při MR zjišťování právě T1 a T2. K tomu, aby se rezonance z určité vrstvy těla, z určitého orgánu zobrazila, slouží tzv. gradientové cívky, které vyvolají vzestup magnetické-

ho pole ve směru os x, y a z. Při zapojení gradientové cívky dojde k precesi vždy pouze v jedné rovině. Kromě zjišťování T1 a T2 se dále měří hustota jader, zejména vodíku.

Přístroj MR může zhotovit obrázky buď T1 a T2 či hustoty protonů, nebo komplexní obrázek. Čím vícekrát se měření opakuje, tím je výsledný obrázek dokonalejší; proto jedno vyšetření na MR trvá desítky minut až hodinu.

Geometrická rozlišovací schopnost MR je horší než se docíluje u modernějších výpočtových tomografií (CT). Lepší výsledky než CT dává naproti tomu magnetická rezonance u vyšetření lebky, ať již zadní jámy lebeční či spodiny lebeční. Velkým přínosem magnetické rezonance je, že bez podání kontrastní látky je vidět tepny a jednotlivé oddíly myokardu. Další výhodou MR je, že beze změny polohy nemocného je možné měřit ve třech rovinách lidského těla. Pomocí NMR lze také měřit i rychlost krevního proudu.

Zařízení MR tvoří magnet, v něm je tunel pro vyšetřovaného, dále vodivé cívky pro homogenizaci statického magnetického pole, dále cívky gradientové a vysokofrekvenční. Cívky jsou chlazeny vodou či vzduchem, magnet tekutým heliem a dusíkem. K zařízením dále patří vysoce výkonný řídicí počítač, obrazový počítač a kamera (viz obr. č. 31).

Magnet sám o sobě váží kolem 10 tun, stínění kolem něj - ze železných plátů - přes 20 tun. Stěna, strop a podlaha vlastní vyšetřovny mají další stínění, z měděných desek. Pořizovací náklady jsou velice vysoké - několik desítek miliónů, drahý je i provoz (zkapalněné plyny!).

Nebyl prokázán žádný škodlivý vliv tohoto vyšetření, pouze prohrátí jako u diatermie; je možné opakovat vyšetření. Nelze vyšetřovat nemocné, kteří mají kov v těle (kardiostimulátory, hřeby v kostech, ale i kov v zubních protézech). Pro vyšetření kostí není MR příliš vhodná, protože kosti obsahují málo vodíku.

Toto vše se týká MR jako zobrazovací metody, kromě toho se začíná využívat i jako spektroskopické vyšetření např. sodíku, fosfo-

ru či uhlíku. Po dalším rozvoji těchto spektroskopických vyšetření mohou být obohaceny i dynamické metabolické studie, pro které prozatím jsou jediným metodickým přístupem RA látky. Již v současné době se tohoto způsobu užívá ke sledování životnosti transplantedovaného štěpu.

III.2 Stanovení biologických objemů

Principem metod, pomocí nichž stanovujeme biologické objemy, je to, že různé látky zaujmají v organismu vždy určitý prostor. Pro některé látky je prostorem celý organismus (např. pro vodu), u jiných je to určitý orgán, u dalších např. intravazální prostor a podobně.

I když užíváme obecnější pojem látka, většinou jde o metabolit, tj. o produkt látkové přeměny. Takovou látku označíme vhodným RA izotopem, při čemž pro stanovení objemu je důležité, aby se v určovaném prostoru rychle rozptýlil. Nutnou podmínkou je pochopitelně i to, že v průběhu stanovení se označená látka ani nerozkládá ani nepřechází do jiného prostoru.

V zásadě jde o tzv. princip zředovací analýzy (viz obr. č. 32) Neznámý objem - V na obrázku - určujeme pomocí porovnání koncentrace (= radioaktivity) značeného indikátoru před podáním do organismu a po rozptýlení v určovaném prostoru. Platí, že součin objemu a koncentrace v obou těchto situacích je shodný. Potom také musí platit, že neznámý objem - V - se vypočte znásobením objemu indikátoru podílem původní a nalezené radioaktivity.

III.2.1. Studie tělesných tekutin

Více než 60% tělesné váhy tvoří voda, která je obsažena ve dvou oddílech:

- intracelulární tekutina - vnitřní prostředí buňky

- extracelulární tekutina - z toho menší část tvoří krev, největší část pak intersticiální tekutina

III.2.1.1 Stanovení celkové tělesné vody

Původně bylo užíváno ke stanovení celkové tělesné vody tzv. těžké vody, tj. vody se stabilním izotopem vodíku, deuteriem.

V současné době se výhodněji užívá tritiové vody ($3\text{ H}_2\text{O}$), tj. vody, ve které je obsažen RA izotop vodíku, tritium. Stanovení je jednoduché - vyšetřované osobě se podá 1 ml této vody a za 24 hodin se z diluce tricia v plasmě určí volum celkové tělesné vody.

Není nutno zavádět korekci na ztráty vody močí a její příjem, protože se voda z těla vyloučí spolu s tritiovou vodou ve stejné koncentraci, jako je ve všech ostatních tekutinách.

III.2.1.2 Množství extracelulární tekutiny (ECT)

Pod pojem ECT řadíme tu část tělesné vody, která není v buňkách, ale mimo ně, tj. v plasmě, v interstitiu, v pojivové tkáni, cerebrospinnální tekutině, v trávicím ústrojí a pod.

Původně se užívalo k jejímu stanovení velkých molekul inulinu, který se distribuuje prakticky jen v plasmatické a intersticiální tekutině.

Z radioaktivních prvků se užíval RA izotop sodíku - ^{24}Na . Toto vyšetření se provádí tak, že se perorálně podá 1 MBq NaCl a za 24 hodin se odebere 20 ml heparinové krve. Během této doby se sbírá moč a v případě průjmů i stolice.

Vzorky krve a moče se pak proměřují buď jako D - záření v nálevkovitých GMT či ve studnicovém scintilačním krystalu jako gama záření (převážně se používá měření jako gama záření!).

Vypočítává se napřed množství ^{24}Na v těle po 24 hodinách jako specifická aktivita podaného roztoku \times jeho objem bez specifické aktivity moči \times její objem.

Dále můžeme vypočítat tzv. distribuční sodíkový prostor. Ten vypočteme následujícím způsobem :

$$\text{distribuční sodíkový prostor} = \frac{\text{množství } ^{24}\text{Na v těle po 24 hod.}}{\text{specif.aktivita } ^{24}\text{Na v plasmě}}$$

Výsledkem je objem tekutiny v ml, ve kterém je sodík v těle distribuován. Pomocí ^{24}Na jsou zjišťovány objemy o něco vyšší, než je skutečnost, vzhledem k tomu, že sodík zčásti proniká přes buněčnou membránu.

Proto se ve stejném uspořádání užívá stanovení tzv. chloridového prostoru, zjištěného pomocí RA izotopu ^{82}Br . Dosažený

výsledek pak násobíme faktorem 0.9 (tím korigujeme výsledek o tu část bromidů, která proniká do erytrocytů resp. se váže na plasmatické bílkoviny).

Vyšetřované osobě je možné podat najednou 3 H₂O a Na ⁸²Br a stanovit tak vedle sebe celkovou vodu i ECT.

III.2.1.3 Stanovení objemu krve

Při určování objemu tělesných tekutin je důležitou složkou rovněž určení objemu cirkulující krve. To provádíme zejména pomocí radioaktivním jodem značeného (¹²⁵J i ¹³¹J) albuminu.

Příprava izotopu

Značený sérový albumin (o aktivitě 1 MBq) se rozpustí ve 100 ml fyziologického roztoku. Z toho se odebere 10 ml, přidá se 1990 ml deionizované vody. Dále se odebere 5 ml = STANDARD. Aktivitu standardu pak změříme ve studnicovém krystalu.

Stanovení objemu krve

Dalších 10 ml připraveného izotopu je i.v. injikováno pacientovi. Po 15 min. provedeme odběr 8 ml krve z druhé ruky (do odběrové zkumavky přidáváme heparin!), odpipetujeme 5 ml této krve a měříme na studnicovém krystalu 5 minut = VZOREK.

Ve zbývajícím vzorku krve určíme hematokrit.

Výpočet

$$\text{objem krve v ml} = \frac{\text{aktivita standardy} \times 200}{\text{aktivita vzorku krve}}$$

masa červených krvinek = objem krve x hematokrit

objem plasmy = objem krve x masa červených krvinek.

III.2.1.4 Množství intracelulární tekutiny

Množství intracelulární tekutiny (ICT) není izotopovými ani jinými metodikami postižitelné a volum ICT se stanoví odečtem ECT od celkové tělesné vody.

III.2.2 Vyšetření poruch tvorby červených krvinek

Toto vyšetření provádíme pomocí chloridu či citrátu s RA izotopem ⁵⁹Fe; jeho poločas rozpadu je 45 dnů.

Provedení

Vyšetřovanému se odebere krev v množství cca 50 ml; centrifugací se získá asi 25 ml plasmy.

Odebereme 3 ml ke stanovení plasmatického železa; ke zby-

ku plasmy se přidá 700 kB ^{59}Fe . Plasma se inkubuje 30 minut při pokojové teplotě; během této doby se železo naváže na volnou kapacitu transferinu. Pokud by vyšetřovaná osoba měla tuto kapacitu plně obsazenou, např. při intenzivní terapii preparáty železa, je potřebné užít plasmu zdravého dárce.

Intravenózně se pak vyšetřované osobě podá tato značená plasma a v intervalech 10-20-30-45-60 a 90 minut se odebírají vzorky krve. Tak se získá obraz o rychlosti obratu plasmatického železa.

Z křivky na semilogaritmickém papíře v závislosti na čase pak je možné odečíst poločas úniku železa z plazmy (je 60-120 minut). Při stavech charakterizovaných zvýšenou poptávkou po železe (anemie z nedostatku železa) se tento poločas zkracuje; při snížení tvorby erytrocytů v kostní dřeni se poločas naopak prodlužuje.

Za 24 hodin je možno začít měřit *in vivo* a to nad křížovou kostí, játry a slezinou a to po dobu několika dnů.

Nad křížovou kostí je maximum mezi prvním a druhým dnem u zdravých jedinců po počátečním prudkém zvýšení; nad játry či slezinou je toto maximum méně výrazné. Pokud tvorba erytrocytů je v křížové kosti snížena, může zvýšení nad játry či slezinou naopak převažovat.

Dalším užívaným parametrem je sledování vzrůstu radioaktivity v červených krvinkách po dobu 12-14 dnů; po této době již aktivita dále nestoupá. Protože je známa podaná dávka železa, je možné hodnotit, kolik z podané radioaktivity se inkorporovalo do krvinek.

Koeficient utilizace železa u zdravého jedince dosahuje až 95% - poruchy krvetvorby se projevují snížením tohoto indexu.

III.3 Radioimunoanalýza (RIA) a další obdobná stanovení *in vitro*

III.3.1 Radioimunoanalýza (RIA)

Předpokladem RIA stanovení je, že sledovaná substance má antigenní vlastnosti. Imunizací vhodného zvířete se připraví proti dané substanci protilátka. Když k ní přidáme sérum se substancí, dojde k reakci a vytvoření komplexu antigen (substance) + protilátka (specifický vazebný reagens). Vztah antigen x protilátka je definován vazebnou kapacitou protilátky; ta je konstantní - viz obr. č. 33. V případě radioimunoanalýzy soutěží o vazná místa na protilátce jednak neznačený antigen Ag, jednak značený antigen Ag+.

RIA metodika je řazena do širšího pojmu radiosaturační analýzy (RSA), tj. souboru mikroanalytických metod, kterými je možné stanovovat s pomocí RA izotopů řadu biologicky účinných látek

(např. hormonů, ale i léků a pod.). Z metod RSA je RIA historicky nejstarší ale také stále nejužívanější.

První práce s RIA metodikou jsou z konce padesátých a začátku šedesátých let - Dr. Yallowová dostala v roce 1977 za tyto práce Nobelovu cenu. Začátek je v pracích Bersona a Erskina spolu s Yallowovou. Berson v r. 1959 popsal tuto metodiku pro stanovení inzulínu, Erskin v r. 1960 pro stanovení thyroxinu.

Dnes je stanovováno metodikou RIA více než 500 látek, počet vzorků jen v medicíně je na světě stovky milionů za rok.

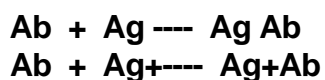
Ve srovnání s jinými postupy, dříve používanými pro stanovení biologicky účinných látek má RIA metodika následující výhody:

- vysoká specifita; umožňuje stanovení i v komplexu látek
- velká citlivost - 10-12 ug i méně
- vysoká přesnost
- možnost polo- či větší automatizace; možnost zpracování velkých sérií vzorků

Základem RIA je imunochemická reakce antigenu se specifickou protilátkou či protilátkami, probíhající in vitro v přítomnosti radioindikátoru.

Jde tedy o reakci specifická protilátka---neznačený antigen
--- značený antigen.

Čím je větší koncentrace přirozeného (neznačeného) antigenu v analyzovaném vzorku, tím menší koncentrace značeného antigenu může být navázána na vazebných místech specifické protilátky a naopak. Klasický způsob Yallowové a Bersona je založen na principu kompetice značeného antigenu (Ag+) a neznačeného antigenu (Ag) o vazebná místa omezeného množství protilátky (Ab):



Po dosažení rovnováhy této konkurenční (kompetitivní) reakce zůstává část antigenu volná, nenavázaná na protilátku. Pomocí vhodné separační metody se oddělí tento volný antigen od komplexu Ag-Ab a změří se aktivita jedné případně obou frakcí.

Při optimální volbě koncentrací základních substancí a reakčních podmínek klesá podíl vázané radioaktivity s rostoucím obsahem neaktivního antigenu (tj. určované látky) ve směsi. Kalibrační závislost získáme pomocí sady standardních roztoků o známých koncentracích určované látky.

Za předpokladu identické imunoreaktivity radioindikátoru a určované látky lze pak z kalibrační křivky stanovit koncentraci určované látky - viz obr. č. 34.

III.3.2 Další analytické metody, jejichž základem je kompetiční princip

Kromě radioimunoesejí je kompetiční princip základem několika dalších RSA analytických metod:

- Kompetiční vazba na proteiny (CPBA) využívá specifické vazby ligandu (analyzované látky) na proteiny; tato vazba nemá antigenní povahu; nejde tedy o imunochemickou reakci.

Tímto způsobem se stanovovala a zčásti stále stanovuje hladina thyroxinu či steroidních hormonů. Jako radioligand se užívají plasmatické proteiny, např. globulin. Ve srovnání s RIA má CPBA horší specifitost a menší citlivost.

- Radioenzymová analýza (REA) - jako vazné činidlo ke stanovení biologicky účinných látek se užívá enzym; značená biologicky účinná látka je radioindikátorem. Užívá se méně než RIA metody; užití např. pro stanovení katecholaminů (kit Catechola - Imunotech Praha).

- Radioreceptorová analýza (RRA) - využívá jako specifické vazné činidlo tkáňové receptory (membránové či cytoplasmatické) a jako radioindikátor je využita značená sledovaná látka (ligand). Výhodou je skutečnost, že touto metodou je určována skutečná biologická aktivita, tj. pouze vlastní látky, nikoliv jejich metabolity či prekurzory.

Tato metoda je proto vysoce specifická a citlivá. Nevýhodou je technická náročnost. Užívá se však i ke stanovení přítomnosti (ano-ne) a koncentrace receptorů (steroidní receptory při nádorech, např. ca mammy).

- Imunoradiometrická analýza (IRMA) - na rozdíl od RIA je RA látkou označena protilátka. Rozvoj této metody je spjat s použitím pevných nosičů, na které jsou protilátky navázány a s použitím tzv. monoklonálních protilátek.

Nejčastěji je užívána tzv. dvoumístná (two site) IRMA, s dvěma protilátkami proti různým antigenním variantám téhož antigenu. Jedna protilátka je vázána na pevnou fázi, druhá slouží jako radioindikátor. Obě protilátky jsou v nadbytku, po proběhnutí reakce se jejich přebytek odstraní promytím.

Výsledkem reakce je "sendvič" tvořený antigénem obklopeným oběma protilátkami. Radioaktivita sendviče je přímo úměrná obsahu určované látky v reakční směsi. Koncentrace se určuje pomocí sady standardních vzorků (vzestupné kalibrační křivky).

Metoda 3 protilátek (two site sandwich): protilátka mezi dvěma antigény - viz obr. č. 35.

Výhodou IRMA je vysoká specifická a citlivost, kratší inkubační časy. Značení protilátek je méně choulostivé než značení antigenů; protilátky jsou v nadbytku, takže ani nižší imunoreaktivita či aktivita neohroží spolehlivost metody.

IRMA se užívá zejména ke stanovování antigenů a protilátek u hepatitid, ke sledování nádorových antigenů a dalších biologicky důležitých látek (např. PTH, inzulin a pod.).

III.3.3. Základní podmínky RIA metod

K tomu, aby příslušná RIA metoda dávala adekvátní výsledky, je zapotřebí splnění několika podmínek:

1) Je nezbytné, aby odpovídala chemická čistota, zejména hlavních komponentů RIA reakce, tj. protilátek (ty navíc musí být co možná i maximálně specifické), standard a značené látky. Nutná je pochopitelně dobrá kvalita všech užitých substancí, ne pouze hlavních.

Pokud je k RIA stanovení užitá firemně vyráběná souprava (kit) či její součásti, měla by tato podmínka být splněna bez problémů. V případě, že je vyvíjena vlastní RIA metoda, je tomuto aspektu nezbytné věnovat maximální pozornost jako primární podmínce úspěšnosti RIA metody.

2) Je třeba stanovit optimální koncentrace jednotlivých substancí i přesné podmínky jednotlivých kroků daného stanovení. V případě firemně dodávaných kitů by měla být splněna i tato podmínka. Dříve než přikročíme k sériovému stanovování, je však třeba prozkoušet, zda výrobcem udávané podmínky i kontrolní hodnoty odpovídají.

Na druhé straně není možné bezdůvodně měnit poměry mezi substancemi, inkubační dobu a další udávané (a ověřené!) podmín-

ky; vedlo by to ke zkreslení výsledků. Proto případné změny děláme až po dohovoru s výrobcem kitu.

3) Velice podstatnou složkou je separace volné a vázané frakce ; chyba v tomto kroku metodiky může zcela znehodnotit výsledky.

Tak jako v jiných činnostech, vyžaduje i práce při RIA metodách jednak určitou zručnost, jednak zkušenost s biochemickou a laboratorní prací vůbec a s touto metodikou zvláště. Některé metody jsou přitom jednodušší, tj. mají menší počet úkonů, resp. nemají složité mezistupně (např. stanovení digoxinu), jiné jsou složitější a vyžadují různé metodické kroky.

Postupně si probereme jednotlivé podmínky úspěšnosti RIA stanovení, které je nezbytné dodržovat v zájmu správných výsledků a tím dobré diagnózy resp. kontroly odpovídající léčby.

III.3.3.1 Protilátky

Jsou to vysokomolekulární sérové bílkoviny, patřící obvykle do imunoglobulinů - IgG. Jejich molekulová váha je cca 160 000. Tvoří se v lymfocytech jako odpověď organismu na podání určitých látek, vyvolávajících imunologickou odpověď imunogénů. Vhodnými imunogény jsou polypeptidy s molekulovou vahou nad 4 000.

Z toho vyplývá, že nízkomolekulární látky a látky nebílkovinné povahy je nutno navázat na vhodné nosné bílkoviny (albumin, tyreoglobulin a pod.). Tyto konjugáty se pak užívají k imunizaci a k přípravě protilátek. Po úspěšné imunizaci se získají antiséra, obsahující řadu různých protilátek. Je nutno provést kontrolu kvality získaných protilátek, jejich případné přečištění a konečně testování jejich afinity, specificity, titru.

Afinita protilátky k antigénu se vyjadřuje pomocí konstanty K; tato konstanta ukazuje reaktivitu protilátky s antigénem případně stabilizaci komplexu antigen-protilátka. Velikost konstanty je důležitá pro citlivost RIA metodiky; čím vyšší je hodnota K, tím citlivější je příslušná RIA metoda.

Specifičnost - schopnost minimálně interferovat s jinými látkami. Je závislá na heterogenitě:

antiséra	vzorku
	(příbuzné látky, prekuzory, metabolity, fragmenty)
je třeba:	
izolovat vlastní látku	izolovat interferující látky

Titration antiséra - je takové ředění, při kterém je antisérum schopno vázat jisté množství určované látky, případně značené látky.

Antisérum připravené imunizací obsahuje protilátky proti všem antigenním determinantám daného antigénu, ale bohužel také včetně nežádoucích kontaminant. Afinita antiséra je tedy součet afinit jednotlivých protilátek a afinita proti nežádoucím příměsím může být vysoká a tak výrazně zkreslovat výsledky. Podle způsobu přípravy mohou protilátky být:

- polyklonální - značně heterogenní, i když je užito čistých imunogénů; jejich příprava není zcela reprodukovatelná;
- monoklonální - homogenní, v identické kvalitě (jednotlivé klony v mediu rostoucích buněk produkují stejné protilátky!) jich je možné připravovat neomezené množství.

Dosud připravené monoklonální protilátky mají ve srovnání s polyklonálními zpravidla nižší afinitní konstanty, jsou však velmi čisté a proto vhodné i pro IRMA metodu.

III.3.3.2 Radioindikátory

Látka, která je označena RA izotopem, musí splňovat následující požadavky:

- vysoká specifická aktivita
- vyhovující radiochemická čistota
- dobrá schopnost vazby na protilátku (stejná jako u nezařazeného substrátu)
- neměnnost během stanovení

Nejčastěji užívanými radionuklidy jsou ^{125}J , ^3H , ^{14}C .

Postup při přípravě RA indikátoru:

- označení (např. jodace ^{125}J)
- izolace ze směsi - zejm. chromatografickými metodami příp. repurifikace po skladování
- testování vlastností
- kontrola kvality

Radiochemická čistota - charakterizuje obsah radioaktivních nečistot (např. poškozené molekuly, volný jod anorganický a pod.). Ke stanovení se používají chromatografie, elektroforéza atd.

Imunoreaktivita - nejdůležitější charakteristika radioindikátoru pro RIA; vyjadřuje jeho schopnost vázat se na specifickou protilátku. Zkouší se stanovením podílu vázané aktivity ve vzorcích s nadbytkem specifické protilátky a s nulovou koncentrací nezařazené určované látky.

Podíl vazby kvalitního radioindikátoru by neměl být příliš nižší než 100% (nevýhodou tohoto způsobu stanovení je velká potřeba protilátky!). Pro účely IRMA se jako radioindikátory užívají

velmi čisté specifické protilátky, zejména IgG, značené ^{125}J . Tyto molekuly jsou většinou značně větší, než antigény užívané v RIA.

Lze do nich zavést několik atomů ^{125}J a tím dosáhnout vysoké měrné aktivity, což je hlavní předpoklad vysoké citlivosti IR-MA metody.

Pro úplnost je třeba dodat, že kromě radioindikátorů se ke stanovení biologicky účinných látek používají i neradioaktivní (stabilní) izotopy. Ty jsou základem řady důležitých metod jako enzymoimunoanalýzy (ELISA), fluoroanalýzy (TDx), luminiscenční analýzy, metaloimunoanalýzy. Tyto metody mohou mít rovněž vysokou citlivost, a umožňují také automatizaci.

Dá se očekávat, že tyto alternativní metody se budou postupně rozvíjet a do určité míry budou vytlačovat RIA metody. Zatím je však jejich určitou nevýhodou ve srovnání s RIA metodami větší finanční náročnost (tj. ceny potřebných přístrojů i kitů) a také většinou menší citlivost.

U jednotlivých skupin metodik, se ještě o některých alternativních metodikách zmíníme.

III.3.3.3 Standardy

Předpokladem pro užití standardu v dané RIA metodě je jeho identita s určenou látkou, zejména pokud jde o imunologické vlastnosti. Na tom je založeno RIA stanovení resp. výpočet hladiny určované látky (porovnání efektu za identických podmínek u vzorků a u standardů o známé koncentraci, např. na aktivitu komplexu a pod.). Jako standard je užíván velmi čistý, homogenní a stabilní substrát určované látky. Jednodušší biologicky aktivní látky (např. hormony štítné žlázy, steroidy či různé léky) jsou dostupné v čisté formě, výsledky lze proto vyjadřovat v jednotkách hmotnostních či v jejich látkové koncentraci.

Komplikovanější je situace u látek složitějších, např. u polypeptidových hormonů. Ty bývají méně čisté (obsahují příměsi prekurzorů, metabolitů, látek příbuzných a pod.). Vlastní jejich stanovení je potom zatíženo větší chybou, zejména při současné heterogenitě polyklonálních protilátek. Proto je nutná kontrola metodik u těchto látek, včetně užívání referenčních (např. WHO) standardů. Množství těchto složitějších látek je vyjadřováno v mezinárodních jednotkách aktivity, tak jako je užíváno doposud někdy např. u inzulínu.

Je třeba určovat imunologickou identitu standardu a určované látky; zkoumá se u standardu i vzorku při několika koncentracích (dosaženo ředěním!). Pokud existuje imunologická identita, pak koncentrační závislosti standard a vzorků jsou obdobné; svědčí

pro ni i shodné výsledky po různém ředění po přepočtu - viz obr. č. 36.

III.3.3.4 Optimalizace podmínek stanovení

Předně je nutná standardizace podmínek odběru; jinak je obtížné až nemožné porovnávat výsledky. Tato standardizace zahrnuje zejména následující faktory:

- příprava pacienta - dieta před odběrem,
 - klid na lůžku určité období před odběrem
- doba odběru v závislosti na denním rytmu vylučování určované látky (většinou ráno)
- technika vlastního odběru - nejčastěji se užívá venózní krev; pokud neprovádíme stanovení v celé krvi je třeba oddělit před vlastním stanovením, např. centrifugací, plasmu

Při většině stanovení vadí hemolýza. Může docházet také k enzymové destrukci látek - zejména při skladování - pak je nutné užití vhodných antikoagulancií (heparin, EDTA a pod.).

Lipemická (ikterická) séra rovněž mohou komplikovat stanovení (zákal zhoršuje účinnost měření). Aby se zabránilo zkreslení výsledků, je někdy nutné přidání inhibitorů rozkladu; zpracovávání v chladu a pod.

Pokud není možné okamžité či rychlé zpracování vzorků a je nutné delší skladování, pak je nejlepší při teplotách kolem -18 C. Stejně je však potřebné počítat s tím, že je omezena doba, po kterou je možné určité látky přesně stanovit; tato doba je u různých látek rozdílná a je udávána u každé metodiky.

Vhodnější než zjišťování bazálních hladin určitého hormonu jednorázově je stanovování více hodnot po různé době po zátěži (např. u inzulínu, plasmatické reninové aktivity aj.).

Kontrolní vzorky - ke kontrole kvality výsledků:

- intralaboratorní
- mezilaboratorní.

Kontrolní vzorky mají být svými vlastnostmi co nejbližší analyzovaným vzorkům; proto se připravují smícháním vhodných již

stanovených vzorků směsná séra (rozpipetovávají se na objemy pro jedno použití). Je možno je připravit i z nulových sér přidáním známého množství dané látky. Kromě toho jsou k dostání i komerční kontrolní séra s deklarovanými koncentracemi. Při počátečním testování (a pak průběžně) je třeba určovat průměrnou hodnotu a rozptyl těchto kontrolních vzorků, stejně jako jejich dobu stability.

Ostatní používané chemikálie nesmí vyvolávat zkřížené reakce či nespecifické efekty a tím zkreslit výsledky analýzy. Proto záleží také - a to výrazně - na čistotě užívaných chemikálií.

Je třeba vybrat optimální kombinaci a koncentrace potřebných substancí, vhodných metod a uspořádání. Cílem je dosažení maximální správnosti a přesnosti výsledků, v požadovaném rozsahu koncentrací, za minimální dobu a s minimálními náklady.

Přesnost a citlivost stanovení závisí na následujících faktorech:

- sklon kalibrační závislosti
- přesnost měření RA
- koncentrace určované látky (profily přesnosti)

Pro optimalizaci podmínek RIA metodiky je tedy třeba zajistit kromě optimalizace objemů a složení reakční směsi (především koncentrací specifické protilátky a radioindikátoru) také vhodnou volbu podmínek inkubace. Především jde o její dobu a teplotu.

Teplota: inkubace při nižších teplotách snižuje velikost inkubačního poškození radioindikátoru a umožňuje dosažení vyšší citlivosti. Delší inkubací se naopak zvyšuje možnost poškození radioindikátoru. Mezi teplotou a délkou inkubace existuje nepřímý vztah : ve vyšších teplotách je doba analýzy zkrácena.

Někdy je používána i tzv. sekvenční technika - napřed preinkubace neznačeného antigénu s protilátkou, pak až přidání radioindikátoru. Tento postup má vliv na tvar kalibrační křivky i na citlivost metody - viz obr. č. 37.

III.3.3.5 Metody separace

V zásadě je při RIA metodě nutné od sebe oddělit volnou a vázanou frakci, tak aby mohla být měřena radioaktivita jedné z nich či separovaně mohly být měřeny obě tyto frakce.

Separace by měla:

- být kvantitativní a dávat reprodukovatelné výsledky
- mít stejnou účinnost pro standardy a analyzované vzorky
- být rychlá, jednoduchá a levná

Nejstarším způsobem separace je chromatoelektroforéza, která byla použita již Yalowovou a jejími spolupracovníky při prvních RIA sledováních.

Nejčastěji je však užívána metoda vychytávání či vysrážení s následnou centrifugací. Jedna z frakcí se převede do pevné fáze, např. volný antigén pomocí vhodného sorbentu - aktivní uhlí - a pevná a kapalná váže se pak oddělí centrifugací. Obvykle je po centrifugaci měřena aktivita kapalně fáze, tj. vázané frakce. Metoda vychytávání na sorbent je však časově závislá a proto může být zdrojem chyby.

Někdy se do pevné fáze převádí komplex antigén - protilátka; používá se přitom nespecifické precipitace přítomných proteinů či gamaglobulinů. K tomu účelu jsou užívány anorganické soli (např. síran amonný či sodný), organická rozpustidla (etanol, aceton). Nejčastěji je však užíván tzv. PEG (polyetylénglykol); měří se pak aktivita precipitátu uvedeného komplexu. Je třeba dávat pozor na možnost zkreslení výsledků v důsledku vysoké nespecifické vazby!

Hodně se používá specifické precipitace pomocí druhé (precipitační) protilátky, ta se váže na komplex antigén - protilátka a tím ho sráží. Opět se měří radioaktivita sraženiny. Může být použito ve variantě, že komplex první a druhé protilátky je přidáván v suspenzi, či že druhá protilátka je vázána na pevných nosičích. Výhodou je větší citlivost metodiky, nevýhodou jsou naopak vyšší náklady a větší časová náročnost metodiky.

Perspektivní jsou imunosorbenty a separace na pevné fázi (na ni může být vázán antigén, protilátka i druhá protilátka); tento přístup umožňuje lepší separaci a automatizaci. Výhodou je nízká nespecifická vazba a tím menší možnost zkreslení výsledků, nevýhodou je pomalejší průběh reakcí a náročná příprava imunosorbentů.

V současné době jsou kromě sorbentů ve formě zkumavek, kuliček, mikročástic užívány magnetické mikročástice jako imunosorbenty; separace pak probíhá v magnetickém poli.

III.3.3.6 RIA analýza - provedení

Postup při RIA metodě lze tedy shrnout takto:

- a) odběr, zpracování a skladování vzorků
- b) příprava roztoků resp. úprava vzorků před stanovením

- c) dávkování roztoků a vzorků do zkumavek
- d) inkubace (případně opakované)
- e) separace - viz předešlou stránku
- f) měření radioaktivity
- g) výpočet a vyhodnocení vzorků.

Pokud jde o odběr a další zpracování vzorků, resp. další přípravu reagensů, liší se u jednotlivých metod a proto tyto údaje uvádíme přímo u popisu těchto metodik.

ad c) Dávkování reagensů

Problémem je provedení velkého množství - většinou několika set - pipetací malých objemů; převážně 50-100 ul (ale i menších objemů) do reakčních zkumavek. Toto je hlavní zdroj chyb; přitom není nutné pipetovat absolutně správné množství ale pipetovat s co možná nejmenší chybou stále stejné množství.

K tomuto účelu se užívá:

- skleněných pipet (ale přes hadičku!)
- stříkaček
- mikropipet s měnitelnými (či nastavitelnými) nástavci
- ruční i automatické dávkovače

Užívaná dávkovací zařízení je třeba kontrolovat:

- vizuálně
- kontrolou přesnosti

Nejvýhodnější k tomuto účelu je gravimetrická metoda (s destilovanou vodou; její určitý objem vážíme na analytických vahách), fotometrická či s užitím RA látek. Správnost by se měla pohybovat v rozmezí 1-2%, přesnost cca 1%.

ad d) Inkubace

Inkubace v nižších teplotách se provádí v chladničkách či chlazených boxech; ve vyšších teplotách v termostatech průtokových či třepacích lázních s regulací teploty. Při řadě metod se užívá tzv. laboratorní teploty, tj. kolem 25 stupňů Celsia.

ad f) Měření radioaktivity

Principem je měření RA za stejných podmínek. Jako detektory se užívají:

- pro měření gama zářičů studnové detektory (125 J) či vícedetektorové měřiče pro 12-16 či více vzorků najednou
- pro beta zářiče v současné době prakticky pouze automaty s možností měřit větší počet vzorků (řetězový či kazetový zásobník)

Mikroprocesory při tom v obou případech umožňují řízení procesu měření a automatizaci výpočtu i hodnocení výsledků.

Kontrolu stability měření provádíme měřením za pomoci kontrolního zdroje záření (etalon 129 J). Provádí se nejméně 1x denně

a rovněž během měření každé série vzorků.

Přesnost měření závisí na počtu naměřených impulsů. Proto relativní chyba klesá se zvýšeným množstvím impulsů a naopak přesnost měření za těchto podmínek vzrůstá. Důležitá je tedy i doba měření; měla by být taková, aby naměřený počet impulsů se pohyboval od 1 000 do 10 000 impulsů (pak je statistická chyba měření mezi 1-3%).

ad g) Vyhodnocování výsledků

Původně byly užívány pouze manuální (ruční) grafické metody, při kterých se sestrojovala kalibrační křivka z jednotlivých kalibračních bodů; z křivky se pak odečítaly hodnoty analyzovaných vzorků - viz str. xx . Je to poměrně pracný způsob, znemožňující přitom vypočítávat některé parametry, důležité pro kontrolu stability metodiky, stejně jako užívat statistické metody zpracování výsledků.

Proto je v současné době prakticky výhradně užíváno počítačové vyhodnocování, které optimálně proloží kalibrační závislost, vyloučí chybné výsledky, provede kontrolu kvality a validity výsledků a přesně vypočte hledanou koncentraci.

III.3.3.7 Kontrola kvality RIA metodik

Podle Závady a sp. (1989) má kontrola kvality RIA metodik splňovat následující hlavní úkoly:

- výběr optimálních metodik a komerčních výrobků; naopak eliminaci metod nekvalitních - tuto úlohu splňuje výběrová kontrola
- unifikaci a standardizaci užívaných metodik, v síti RIA laboratoří - centrální garanční kontrola (tyto oba úkoly má na starosti referenční RIA a RSA laboratoř pro ČR).
- kontrola rutinních stanovení a kritické posouzení výsledků analýz se v každé laboratoři provádí individuálně

Úkoly referenční laboratoře:

- centrální výběrová kontrola
- ověření nových postupů
- doporučení k zavedení metody do praxe; zkouší se vždy nejméně 3 šarže; několik laboratoří najednou provádí zkoušení (centrální garanční kontrola pro vybrané metodiky
- průběžná a dlouhodobá kontrola kvality práce laboratoří v síti RIA pracovišť

Referenční laboratoř je v Ostravě; vede ji Dr.Bartoš. V novém uspořádání českého zdravotnictví tato laboratoř funguje za finanční náhradu, kterou jednotlivé laboratoře platí.

Lokální kontrola, to je kontrola, která by měla probíhat v rámci každé laboratoře. Zahrnuje dvě hlavní složky:

- a) lokální ověřovací kontrola je určena k ověření nové metodiky, k určení normálních a patologických hodnot
- b) lokální rutinní kontrola reprezentuje průběžné každodenní a dlouhodobé sledování spolehlivosti výsledků

Pro provádění lokální kontroly vyšel metodický pokyn, kterým by se měly všechny laboratoře provádějící RIA metody řídit.

Sledované parametry při lokální kontrole

Při RIA metodikách jsou sledovány následující parametry:

- celková RA vzorku: je základem pro výpočet dalších parametrů
- podíl specifické vazby : blank (samostatné rozpustidlo, např. plasma) bez přídavku určované látky
- podíl nespecifické vazby : blank bez specifické protilátky
- tvar kalibrační křivky: možno sledovat vizuálně, pomocí směrnice křivky či podle interceptů - nejčastěji se užívá I50 (snížení množství radioaktivity o 50%)
- citlivost: nejmenší detekovatelné množství odlišitelné od nulového standardu
- přesnost stanovení: souhlas výsledků souběžně zpracovávaných replikátů (du-tri-tetra-penta atd.); většinou se vyjadřují v % variačních koeficientů; čím jsou vyšší, tím je přesnost menší
- sledování hodnot kontrolních vzorků: zpravidla 3 kontrolní vzorky at' již komerční nebo vlastní připravené
- validita : souhlas s klinickým stavem a s údaji v literatuře

Otázky každodenní kontroly přesnosti laboratorní práce jsou pravidelnou součástí práce každé laboratoře, stanovující hladiny látek důležitých pro organismus. Předně proto, že pouze za předpokladu správnosti výsledků může laboratoř přispět k diagnostice i kontrole léčby pacientů. Dalším důvodem je i to, že takové laboratoře, které dodávají nestandardní výsledky, se v současné konkurenci laboratoří stanou málo seriózní a proto bude klesat počet vzorků, které budou dostávat ke zpracování.

V současné době dochází k tomu, že sice stoupá počet různých laboratorních vyšetření, stoupají však také kapacitní možnosti laboratoří v důsledku modernizace techniky. Proto je také pravděpodobně nutné považovat současný vzestup počtu laboratoří provádějících tatáž stanovení pouze za dočasný.

To povede - a tento proces již také začal - ke zvýšení konkurence a ke tlaku na tato laboratorní pracoviště, aby se od ostatních odlišila, zejména kvalitou výsledků a cenou. Je nutné zdůraznit obě tato hlediska, protože snížení ceny vyšetření při snížení jejich přesnosti a kvality by vedla k opačnému výsledku, tj. ke snížení poptávky po službách takovéto laboratoře.

Proto je tak důležité, aby v laboratořích zpracovávajících klinické vzorky byla důsledně a trvale dodržována určitá pravidla, zajišťující dobrou kvalitu výsledků. To jsou právě zásady SLP, jejichž neustálé dodržování k zajištění trvalé kvality výsledků vede. Jejich principem je několikastupňová kontrola práce jednotlivých pracovníků i pracovních postupů. Stejně důležitá je i pravidelná kontrola funkce přístrojů a dokumentace (nejlépe přímo zápis jednotlivých přístrojů!) všech výsledků. Pro každou prováděnou metodu je nutné mít tzv. SOP, tj. závazný standardní operační postup.

Celý proces zavádění SLP do všech našich laboratoří je zatím na samém začátku. V nejbližší době se však dá očekávat, že laboratoře RIA budou musit mít (obdobně jako na odd. klinické biochemie, hematologie, pro kontrolu léků a pod.) akreditaci. Prvním krokem k jejímu získání je udělení certifikátu správné laboratorní praxe (SLP, anglicky GLP), který je vždy udělen pro určitý typ práce, např. klinická biochemie či hematologie, zkoušení léků, laboratorní nukleární medicíny a pod.

Napřed (první 2 roky) je vydán na omezenou dobu (např. na dva roky). Po další kontrole pak je vydán certifikát na neomezenou dobu, který je platný pro všechny země OECD.

III. UŽITÍ IZOTOPŮ PŘI SLEDOVÁNÍ METABOLICKÝCH POCHODŮ

Aplikace izotopů při sledování činnosti orgánů či jejich užití v RIA metodách, pro určení hladiny látek, jinými metodami obtížně či méně přesně zjistitelných, přináší nesporně mnoho přínosného. Pravá doména izotopů leží však jinde. Zobrazování orgánů umožňují též některé další metodiky - od rentgenových, NMR (nukleární magnetická rezonance) až po ultrazvukové. Stejně to platí o RIA (a podobných dalších metodách s užitím izotopů)-ty rovněž mají konkurenci v alternativních metodikách - od chromatografie až po ELISA atd.

Zatím však nejsou izotopové metody srovnatelně nahraditelné pokud jde o možnost sledování metabolických pochodů a jejich dynamiky, a to na všech úrovních - od úrovně celého organismu, přes orgánovou, tkáňovou, buněčnou úroveň až na úroveň jednotlivých enzymových soustav. Prozatím neexistuje alternativní metoda tohoto sledování, a to dynamického, schopná tohoto sledování na stejně dobré úrovni. Dá se však předpokládat, že takovouto metodou bude perspektivně schopná se stát, alespoň v některých oblastech, NMR spektroskopie.

Bylo by škoda zůstat při užití izotopů ve fyziologii pouze při sledování funkce orgánů či stanovení hladin důležitých látek, i když se tak, bohužel, v praxi v podstatné míře doposud děje.

Proto si postupně probereme principy metabolických studií a hlavní příklady možností přístupu sledování přeměny látkové hlavních živin pomocí značených RA látek. Nejprve tuto problematiku probereme obecněji, tj. uvedeme příklady možností sledování jednotlivých metabolických cest, potom přistoupíme k možnostem studia větších problémů pomocí značených sloučenin.

III.1 Kinetika dějů v živých organismech

Ještě koncem třicátých let se věřilo, že látky v buňce se vytvoří během jejího růstu a až do té doby, než je buňka poškozena či zničena, v ní uvedené látky setrvávají nezměněné. Od počátku 40-tých let se ale začalo prokazovat, že složky živého organismu jsou v dynamickém stavu, tzn. že např. sacharidy, tuky, ale i enzymy a p. jsou průběžně odbourávány a nahražovány jinými, nově vytvořenými. Dochází tedy k metabolickému obratu (turnover), který je možné sledovat pouze pomocí indikátorů, tj. látek označenými radioaktivními, v některých případech i stabilními izotopy.

Rychlost obratu není ve všech orgánech a u všech látek stejná - obecně platí, že u metabolicky aktivních komponent je rychlý obrat, strukturální složky pak mají obrat pomalý.

Nejjednodušší případ je, když radioaktivní indikátor lze do organismu vpravit najednou (v jednom okamžiku) - jde o tzv. bolus.

Příklad: značená glukóza, i.v. podaná, se smísí s neznačenou glukózou v organismu a její specifická aktivita stále klesá; tento pokles je exponenciální s časem a poločas obratu se pak dá vypočítat jako poločas rozpadu RA izotopu.

Někdy se musí indikátor "vyrobit" v jiném organismu - izolovat ho a pak až podat dalšímu organismu.

Příklad: Psům byl podán cystein znač. ^{35}S a lysin značený ^{14}C , za 24 hodin jim byla izolována krev. Z krve jsou separovány bílkoviny a dalšímu psu je podána dvojitě značená bílkovina - viz obr. č.52.

V časových intervalech je odebírána krev resp. plasma, je provedena izolace gamaglobulinu a aktivity ^{35}S i ^{14}C jsou sledovány v průběhu 0-60 dnů. Pokud nebyla podána vlastní značená látka, ale její prekursor, má tento děj jiný průběh - viz obr. č. 53.

Napřed se z prekursoru vybudovává daná látka; dochází k vzestupu aktivity. Pak je prekursor spotřebován a značená látka se postupně odbourává; v této fázi dochází k poklesu aktivity.

Je možné studovat i otázku, zda nějaká látka je či není prekursorem určitého produktu. Pokus uděláme tak, že sledujeme jednak časovou křivku látky, o které předpokládáme, že je prekursorem, jednak předpokládaného produktu - viz obr. č. 54.

Vidíme, že u prekursoru je napřed patrný vzestup, pak pokles, zatím co u produktu se projevuje pozdější vzestup a pokles od okamžiku, kdy se obě křivky protínají.

III.1.1 Izotopové metabolické studie; základní údaje

Izotopové metabolické studie jsou pro užití izotopů v biologii a biochemii nejpříznačnější, protože zde je tato metoda zatím nenahraditelná. Postup těchto studií je takový, že do organismu aplikujeme látku, jejíž metabolismus hodláme studovat, ve značené formě. Po určité době pak izolujeme metabolity této látky a měříme jejich radioaktivitu.

Označení může probíhat delší dobu, případně se přívod značené látky opakuje. Pokud označení probíhá kratší dobu, tak musí mít aplikovaný značkovací preparát vyšší specifickou aktivitu. Mohou být použity i molekuly látek dvojitě značených (např. ^{14}C a ^3H , ^{14}C a ^{32}P či ^3H a ^{32}P). Kombinovat je možné i radioaktivní a stabilní izotopy.

Ukončení značení se dosahuje v případě buněk či tkání fixačními roztoky či zmrazením (příp. v kombinaci s odstraněním přístupu RA izotopu - tj. nahrazení kultivačního media se značeným izotopem novým neaktivním mediem). V pokusech in vivo se značení neukončí usmrcením zvířat; tkáně i po smrti organismu zůstávají určitou dobu ještě živé. Proto je třeba urychleně provést také preparaci a fixaci (zmrazení) tkání; jinak by výsledky byly ve větší či menší míře zkresleny.

Podávání RA látek zvířatům

Pro sledování absorpce se užívá následujících způsobů:

- perorálně (p.o.)
 - s potravou (potravu slabě navlhčit, aby nedošlo k jejímu rozprášení!)
 - s vodou
 - v kapslích
 - žaludeční sondou (méně fyziologické ale přesnější!)
- intraperitoneální (i.p.) aplikace

- nitrožilní (i.v.) aplikace
- subkutánní (s.c.) aplikace.

III.1.1.1 Radiorespirometrie

Sleduje se vydechování $^{14}\text{CO}_2$ ze značeného prekursoru označeného ^{14}C . Jak vypadá zařízení pro větší zvířata (zejm. savce), viz obr.č. 55.

III.1.1.2 Metabolický obrat (turnover)

Veškeré složky organismu jsou v dynamickém stavu, to znamená, že v různých tkáních jsou tyto látky stále nově vytvářeny, zatímco jiné molekuly stejných látek jsou odbourávány.

Metabolicky aktivní komponenty tkání mají rychlý obrat, komponenty strukturální mají obrat pomalý.

Sledování obratu látek je možné buď pomocí vlastní značené sloučeniny (např. ^{14}C -glukózy či bílkovin značených ^{14}C , ^{35}S a pod.) či jejího prekursoru. V tomto případě pozorujeme napřed vzestup aktivity (to se vytváří vlastní látka) a pak případně po nějaké době konstantní úroveň její pokles.

Z časových změn specifické aktivity můžeme určit, zda určitá látka je či není prekursorem druhé látky. Tuto problematiku ještě budeme podrobněji probírat v dalších částech skript.

III.1.1.3 Vyšetření resorbce tuků a mastných kyselin

K vyšetření resorbce tuků se používá tuků s nenasycenými mastnými kyselinami (nejčastěji triglycerid s kys. olejovou–triolein), které mají navázán v místě dvojně vazby radiaktivní ^{131}J (resp. ^{125}J). Pokud jde o vyšetření resorbce mastných kyselin, užívá se obdobně značená olejová kyselina.

Značený triolein se podává perorálně (u lidí spolu se šlehačkou či mlékem, u zvířat s tukem, který je součástí jejich stravy, např. s lojem).

Před vyšetřením je třeba standardizovat po několik dnů příjem tuků (u lidí na 100 g tuků denně, u zvířat úměrně jejich normálnímu příjmu). K eliminaci případných regulačních zásahů

štitné žlázy je podáván Lugolův roztok (roztok jodu), který činnost thyreoidey zablokuje. V průběhu několika dnů se pak sleduje jednak neresorbovaný zbytek ve stolici, jednak resorbovaná část v krvi.

Provedení u pacientů

Vyšetřovaný pacient vypije nalačno emulsi trioleinu, která obsahuje 370 kBq ¹³¹J. Stolice se sbírá 3 dny a změřená aktivita se přepočte na % podané dávky (nad 3% je výsledek suspektní, nad 4,5% již je prokázána porucha resorbce tuků). Pokud jsou sledovány změny v krvi, pak se po dobu 8 hodin odbírá krev a stanovuje se v ní aktivita.

Zpomalený růst aktivity v krvi indikuje poruchu resorbce, proto se aktivita objevuje pomaleji v krvi - viz obr. č. 56.

Stejným postupem se provádí i stanovení resorbce ¹³¹J – kyseliny olejové. Toto vyšetření může odlišit primární poruchu resorbce (stejně postihuje triglyceridy jako mastné kyseliny) a poruchu sekrece pankreatu (proto jsou neutrální lipidy většinou neresorbovány, zatím co volné mastné kyseliny se vstřebávají normálně). V tomto případě stanovujeme aktivitu spíše v krvi než ve stolici.

III.1.1.4 Vyšetření bílkovinného metabolismu

A. Resorbce bílkovin

Obdobně jako resorbci tuků je možné sledovat i resorbci bílkovin a to pomocí sérového albuminu, značeného ¹²⁵J, ¹³¹J (příp. aminokyselin či jiných bílkovin či jejich frakcí). Metoda je zatížena poměrně značnou chybou, zejména v důsledku možnosti odštěpování volného značeného jodu z bílkovinné molekuly. Problémem se může rovněž stát porušení molekuly bílkovin při jodaci.

B. Obrat bílkovin

O poruchách tvorby bílkovin v těle a o jejich ztrátách můžeme získat základní informaci z vyšetření hladin krevních bílkovin a také z relativního poměru bílkovinných frakcí (zejm. albu-

min a globulin). Snížená koncentrace bílkoviny v krvi však ještě nemusí nutně znamenat poruchu v její tvorbě či její zvýšené ztráty. Je třeba získat informace o přeměně bílkovin, např. o směnitelném množství bílkovin, o jejich distribučním prostoru, obratu a pod.

Snížená produkce bílkovin se vyskytuje při jaterních poruchách (snížení syntézy v jaterním parenchymu) a při nedostačném přívodu aminokyselin.

Zvýšení produkce bílkovin přichází při myelomu, zvýšené ztráty bílkovin u nefrózy a u enteropatií.

Obrat bílkovin je sledován pomocí ^{131}J -albuminu. Je nutné používat albuminu čerstvého a jodace provádět tak, aby molekula albuminu obsahovala maximálně 2 atomy jodu (jinak není zaručen stejný metabolismus značeného albuminu a albuminu v organismu).

Provedení:

Je aplikováno i.v. 1500 kBq ^{131}J lidského albuminu, za 20 minut se provede první odběr a pak dalších 8-10 dnů je sledována aktivita v krvi. Z křivky je možné odečíst poločas mizení albuminu (u zdravých lidí je to 18-22 dnů, při poruše metabolismu bílkovin pouze 3-5 dnů) - viz obr. č. 57.

Zároveň je možné shromažďovat stolici a moč a zjišťovat v nich vyloučenou aktivitu. Z rozdílu podané dávky a vyloučené aktivity je možno určit retenci bílkovin.

Poměr aktivity v plasmě a aktivity retinované bílkoviny vnesené do grafu nám pak ukáže vyrovnání koncentrace albuminu mezi intravaskulárním prostorem a celkovým distribučním prostorem. Z toho je možno vypočítat celkový distribuční prostor, po vynásobení zjištěnou koncentrací albuminu pak i celkové množství výměnného albuminu v těle - viz obr. č. 58.

Z poměru denních ztrát albuminu značeného a jeho denní reten-
ce je možné vypočítat jeho denní obrat.

Pozn.: Aby se zabránilo zpětné resorbci odštěpeného RA jodu ve
střevě, podává se vyšetřovaným osobám či zvířatům několik dnů
po 5 ti hodinách určité množství iontoměniče. Na něj se odštěpený
jod naváže a nemůže pak zkreslovat výsledky.

C. Ztráty bílkovin stolicí (porucha střevní stěny)

Provádí se pomocí ^{51}Cr - albuminu. Chromát sodný značený
 ^{51}Cr je pevně navázán na albumin. Za normálních podmínek pouze
malé množství ^{51}Cr albuminu prostupuje cévními cestami do gas-
trointestinálního traktu. Proto test, při němž se i.v. aplikuje ^{51}Cr
albumin a po 4 dny se sleduje aktivita ve stolicí, odliší nefyziologic-
ké (patologické) ztráty albuminu stolicí.

Provedení:

- udělat kontrolní odběr stolice před aplikací (24 hodinový vzorek)
- injikovat i.v. ^{51}Cr albumin o aktivitě 1500 kBq (1000x naředěnou
aktivitu užít jako standard)
- odebrat 24 hodinové vzorky stolice za 24-48-72-96 hodin
- změřit buď homogenní alikvot nebo na celotělovém měřiči ce-
lé vzorky

Výpočet:

$$\% \text{ exkrece} = \frac{\text{akt. stolice} - \text{pozadí}}{\text{standarda} - \text{pozadí}}$$

Hodnocení:

Exkrece menší než 1% znamená fyziologické ztráty.

III.1.1.5 Sledování přeměny glycidů

Pro sledování přeměny uhlovodanů se užívá zejména glukóza,
značená ^{14}C či ^3H . Při značení ^{14}C je glukóza značena na prv-
ním, resp. šestém uhlíku nebo je značena na všech uhlících, tj. uni-
verzálně (připravená in vivo označením). Sleduje se přitom jak pře-
měna glukózy na její metabolity (laktát, glycerol, alanin atd.), tak je-
jí oxidace. V případě značení ^3H se užívá zejména glukózy znače-
né na prvním, třetím, čtvrtém a šestém uhlíku.

Jako příklad užití značené glukózy ke sledování mechanismu
hypoglykémie je možno uvést práci Chenga a Kalanta (1970) - viz
obr. č. 59.

Pro určení turnoveru glukózy s užitím značených substrátů
existuje řada modelů, vycházející jak z jednoduché bezkompartmentové
analýzy, tak z 2 či více kompartmentových modelů.

Pro doplnění ještě informací, že izotopová technika, např. s tri-
ciem značenou glukózou, může být užita i v kombinaci s euglyke-

mickým klempem při sledování metabolizace glukózy za stavů normo- a hyperinsulinémie.

Několik slov k tomuto pokusu: Skupinu tvořilo 45 zdravých osob ve stáří cca 40 let (23 m , 22 ž). Hladověli přes noc, před vlastním stanovením 1/2 hodiny leželi v klidu. Pak podána značená glukóza (označená na šestém uhlíku) do infuze; podaná radioaktivita odpovídá množství cca 10 uCi na osobu, za dalších 15 minut přidána do infuze 1-14C - palmitová kyselina, navázaná na lidský albumin. Po 75 minutách se pak odebíraly v 5-ti minutových intervalech vzorky krve.

Ke stanovení objemu plasmy se do infuze přidal za 60 sekund 125 J - lidský albumin a za 15-25- a 35 minut se odebíraly vzorky krve. Ke sledování vlivu růstového hormonu či insulinu se po 5ti odběrech 5ti minutových - tj. za 95 min.- přidal jeden ze sledovaných hormonů.

Na obr. č. 60 vidíme vliv stoupajícího množství insulinu na přítokovou a odtokovou rychlost plasmatické glukózy - přítok se stoupající dávkou poklesá a narůstá její odtok. Zatím ponecháme stranou pravou část obrázku, k té se ještě vrátíme.

Na dalším obr. č. 61 vidíme vliv podaného insulinu - 0,05 U na kg hmotnosti - na inkorporaci glukózo-6-fosfátu značeného 14 C do glycerolu (spodní část obrázku) - resp. 14 C - palmitové kyseliny do mastných kyselin. Nepřerušované čáry ukazují vliv insulinu.

Pouze o něco mladší je švýcarská práce na 9 pacientech z Curyšské nemocnice (Kelter a Frosch, 1972). Opět šlo o pacienty cca 40 let staré. Intravenózně do kubitální žíly byly injikovány ^{14}C xylylit - ^{14}C sorbit - resp. ^{14}C fruktóza - v dávce 0,5 g a 1,5 $\mu\text{C}/\text{kg}$. Po 5- 10-15-20-30-45-60-90-120 a 180 min. byly provedeny odběry krve. Následující obr. č. 62 ukazuje křivky u xylylitu a sorbitu.

U metabolismu glycidů (stejně jako proteinů) se při studiu jejich přeměny užívá vedle radioizotopů i stabilních izotopů, např. ^2H , ^{13}C , ^{15}N ; ke stanovení je v tomto případě potřebný hmotový spektrograf, tj. zařízení dostupné pouze na malém počtu pracovišť u nás, přesto odkazují např. na práci Veiva a sp.(r. 1977), která se touto problematikou zabývá.

III.1.1.6 Sledování tukového metabolismu

Mastné kyseliny značené ^{14}C byly používány ke sledování tukového metabolismu již od šedesátých let. V práci Chenga a Kalanta (1970), kterou jsem již citoval pokud jde o sledování metabolismu glukózy (viz obr. č. 61), byl sledován zároveň metabolismus palmitové kyseliny, značené ^{14}C , která byla přidána do infuze za 15 minut po glukóze. Sledovány byly jednak koncentrace jednak specifické aktivity volných mastných kyselin a mastných kyselin v plasmatických triglyceridech.

Složitou otázkou je sledování in vivo syntézy lipidů, ať již mastných kyselin či cholesterolu. K tomuto účelu se užívala řada značených prekurzorů, ať již jde o acetát, mevalonát, ale i o pyruvát či glukózu označené ^{14}C .

Problémem je zde otázka poolu uvedených substrátů v těles-

ných prostorech a tím i otázka velikosti diluce značkovače v různých kompartmentech organismu. Tyto problémy nejsou pouze s triciovanou vodou, jak již bylo popsáno Dietschem (1953), při užití velkých dávek aktivity $^3\text{H}_2\text{O}$ však vyvstávají jiné problémy a to s exspirací značené vody a pod.

Kinetická data o cholesterolu mohou být získána po aplikaci značeného cholesterolu. Příklad můžeme vidět např. v práci Goodmana a sp. (1983), kteří sledovali křivky specifické aktivity po i.v. aplikaci ^{14}C -cholesterolu (cca 1800 kBq). Obrat cholesterolu je pak sledován po dobu 30-40 týdnů. Autoři užíli tří kompartmentového modelu, v jiných studiích jsou tyto modely ještě složitější.

Na následujících dvou obrázcích č. 63 a č. 64 můžeme vidět křivky obratu (turnoveru) cholesterolu. Pokusy byly prováděny v Izraeli u dvou dobrovolníků, kteří se vyznačovali poruchami přeměny lipoproteinů - konkrétně u nich chyběly betalipoproteiny.

Každý z obou dobrovolníků dostal i.v. cca 900 kBq ^{14}C - cholesterolu a v časových intervalech až do 30-40 dnů po podání se odebírala krev a stanovovala se v ní aktivita. Výsledky studie se porovnávaly s výsledky dosaženými u 82 osob - zčásti normolipidemických, zčásti hyperlipidemických (buď zvýšena hladina cholesterolu, nebo triglyceridů či obou frakcí najednou).

U obou osob byl nalezen pokles specifické aktivity cholesterolu na 1% za 140-190 dnů (osa x - dny), zatímco u normálních osob v průměru až za 254 dnů. Touto metodou je tedy možné stanovit denní obrat cholesterolu přesněji a snáze než stanovováním produktů degradace cholesterolu, tj. neutrálních steroidů a žlučových kyselin ve stolici.

Po i.v. aplikaci ^{14}C - palmitátu se označí po jaterních triglyceridech (TG) také lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL), jejichž metabolizaci je možné analyzovat pomocí multikompartmentového modelu. Je možné i označení VLDL pomocí kontinuální infuzí podaného ^3H - glycerolu, což pro sledování kinetiky představuje interpretačně menší problém.

III.2 Experimenty in vivo

Experimenty na celém zvířeti mají pochopitelně výhodu v porovnání s experimenty in vitro a to v tom, že nejsou nijak ovlivněny možnými artefakty při přežívání tkání. Naproti tomu je ale interpretace získaných výsledků mnohem složitější, protože kromě sledovaných resp. kontrolovaných dějů se může uplatnit celá řada dalších faktorů.

Nevýhodou stopovacích experimentů in vivo u člověka či zvířete se však může stát jejich značná nákladnost, protože potřebná aktivita značeného metabolitu, kterou aplikujeme, je vždy řádově či o několik řádů vyšší než v experimentech in vitro.

Pokusy na malých laboratorních zvířatech, kdy se podávají až kBq (tj. stovky μCi), jsou ještě cenově přijatelné, neumožňují však většinou opakované odběry vzorků krve, což je při dynamických sledováních podstatné. Tento problém se proto obvykle řeší tak, že se vždy použijí jednotlivá zvířata (nebo skupiny dvou až šesti zvířat) v různých sledovaných časových intervalech.

III.2.1 Způsob aplikace značené sloučeniny

Stopovací látka může být v pokusech in vivo podávána (viz i str. 00) perorálně, intravenózně nebo intraperitoneálně. V prvních sledováních byla značená sloučenina homogenně rozptýlena v potravě experimentálních zvířat. Tento jednoduchý způsob však nedovoluje změřit celkovou podanou aktivitu s dostatečnou přesností.

Proto se v současné době často podává značená aktivita perorálně sondou do žaludku v přesně stanoveném volumu. Nefyziologický způsob podávání je tak vyrovnán přesností stanovení přívodu izotopů.

Aplikace intraperitoneální je velmi častá zejména u malých laboratorních zvířat. Její provedení je velmi jednoduché, je si ale nutné uvědomit určité omezení této aplikace. Intraperitoneální cestou je totiž možné podávat pouze sloučeniny velmi malé molekulové váhy, které se z peritonea vstřebávají rychle a objevují se v krevním řečišti s velmi malým zpožděním.

Intraperitoneální aplikace se často používá pro preferenční označení epididymální tukové tkáně nebo bránice. Uvedme zde příklad užití této aplikace:

Porovnali jsme intraperitoneální podání značeného acetátu-1-C14 s jeho intravenózní aplikací a to tak, že jsme měřili aktivitu exspirovaného CO₂ (vzniklého z 14 C - acetátem označeného acetylCoA a následnou oxidací v Krebsově cyklu). Z obr. č. 65 je patrné, že při intravenózní aplikaci je aktivita CO₂ maximální v nejkratším měřeném čase (v intervalu 0-5 minut) a pak klesá.

Naproti tomu při intraperitoneální aplikaci dosahuje aktivita CO₂ maxima až ve druhém intervalu (5-10. minut) a pak až klesá podobně jako po podání intravenózním.

Časový rozdíl a posun křivek CO₂ při i.p. aplikaci vyjadřuje zpoždění způsobené přesunem značeného acetátu z peritonea a dosažení homogenní distribuce v extracelulární tekutině.

Aplikace intravenózní je u malých laboratorních zvířat technicky poměrně náročným úkolem. Je ale zároveň nejvýhodnějším způsobem, protože zaručuje nejpřesněji definované podmínky pro označení metabolitu v přesně vymezeném prostoru.

Podáme-li zvířeti značenou sloučeninu jednorázově, máme během několika vteřin zajištěnou homogenní distribuci v krevním řečišti a můžeme tedy považovat v čase nula podanou aktivitu skutečně za stoprocentně obsaženou v krevním řečišti.

Jiným příkladem jednorázové intravenózní (i.v.) aplikace je označení plasmatických volných mastných kyselin palmitátem-C14, kdy pokles aktivity značeného palmitátu v čase je možné analyzovat multikompartmentální analýzou. O tomto případě budeme ještě podrobněji hovořit.

Intravenózní aplikace značené sloučeniny může být také kontinuální a zvýšením konstantní rychlosti infuze lze docílit rovnováhy mezi odsunem a přísunem značeného metabolitu do krevního řečiště.

III.2.2 Značení syntézy acetátem

Jako příklad experimentu s jednorázovým intraperitoneálním podáním acetátu značeného RA izotopem ^{14}C lze uvést měření rychlosti syntézy řetězce mastné kyseliny s použitím acetátu- $1\text{-}^{14}\text{C}$. Acetát, který se z peritonea dostane do krevního řečiště, se ve velmi krátké době rovnoměrně distribuuje v extracelulární tekutině. Odtud pak vstupuje do buněk všech orgánů, kde dochází k syntéze mastných kyselin.

V pokuse in vivo jsme nejdříve chtěli zjistit, po jak dlouhou dobu je acetát- ^{14}C k dispozici ke značení všech metabolických cest.

Sledovali jsme dynamiku vydýchaného C^{14}O_2 v krátkých časových intervalech po jednorázové aplikaci stopového množství acetátu- $1\text{-}^{14}\text{C}$.

Jak je vidět z obrázku č. 66, poklesá aktivita expirovaného CO_2 exponenciálně s časem a to ve dvou fázích. Obě fáze jsou v semilogaritmickém vyjádření lineární, průsečík obou přímek je asi ve 40. minutě, přičemž poměr rychlostních konstant je 4:1.

Tomuto obrazu odpovídá aktivita acetátu v celkovém plasmatickém volumu, kterou jsme zjišťovali jako aktivitu všech ve vodě rozpustných metabolitů. Aktivita acetátu v séru klesá rovněž exponenciálně až do 30.-40. minuty. V této době se mění rychlost mizení aktivity z krevního řečiště.

Z obou výsledků lze uzavřít, že podaný značený prekursor je k dispozici pro značení poolu acetyl CoA do 30.-40. minuty po i.p. aplikaci. V dalším čase se pool (hotovost) dvouuhlíkatých fragmentů pro značení acetyl CoA mění pouze nepatrně a je doplňován katabolismem dříve označených metabolitů.

V souhlase s touto představou vymizení podaného acetátu z extracelulární tekutiny je průběh aktivity celkových mastných kyselin jater. Tento orgán je kvantitativně nejdůležitější pro de novo syntézu mastných kyselin (viz obr. č. 67).

Aktivita dosahuje svého maxima ve 30. minutě po aplikaci; podaný značený acetát je tedy k dispozici 30-40 minut po i.p. podání ke značení syntézy mastných kyselin. Pro měření rychlosti jejich syntézy s použitím značeného acetátu in vivo je třeba užívat zvířata cca v tomto intervalu. Pokud není tato podmínka dodržena, jsou výsledky měření syntézy mastných kyselin ovlivněny jednak katabolismem značených mastných kyselin, jednak přesunem značených mastných kyselin mezi orgány.

Přesun značených mastných kyselin z jater do tukové tkáně je patrný z obr. č. 68. Značené mastné kyseliny vzniklé v játrech jsou ve formě lipoproteinů odsouvány do depotní tukové tkáně. Kvantitativně odpovídá pokles aktivity jaterních lipidů mezi 30. - 120. minutou zhruba přírůstku v tukové tkáni. Rovněž skutečnost, že aktivita plasmatických lipidů je nejvyšší ve 30. minutě, odpovídá naší představě o redistribuci mastných kyselin krevním řečištěm v tomto čase.

III.2.3 Utilizace glukózy 14C

Glukóza, jejíž molekulová váha je podstatně vyšší než molekulová váha acetátu, a která má mnohem komplikovanější transport z extracelulárního do intracelulárního prostoru, nemůže být podávána intraperitoneálně. Nejvhodnějším způsobem aplikace je její perorální podání sondou do žaludku.

Při sledování osudu takto podané glukózy je nejlepší informací sledování dynamiky vydýchaného CO₂. Jeho aktivita se prudce zvyšuje v krátkém čase po podání sondou a pak dosahuje maxima mezi 60. a 120. minutou po aplikaci, pak klesá až do 4. hodiny (viz obr. č.69).

V dalším čase je pokles podstatně pomalejší. Značená glukóza,

kteřá je po podání transportována složitou cestou až k místu oxidace (event. stopování anabolických cest), je dostupná v intervalu 0-4 hodiny. V tomto intervalu je také oxidováno 80% z celkově oxidované glukózy z 8 hodinového intervalu. Po intervalu 4. hodiny je expirován značený CO₂ vzniklý především oxidací dříve označených metabolitů a značení CO₂ je podstatně nižší než v předešlém intervalu do 4. hodiny.

Pro měření poměru mezi oxidací glukózy a její užitice jako netukového prekursoru pro syntézu mastných kyselin jsme zvolili právě tento interval a zabíjeli proto zvířata 4 hodiny po aplikaci glukózy-C 14. Měřili jsme jednak aktivitu expirovaného CO₂, jednak aktivitu mastných kyselin v celkovém karkasu, v játrech a epididymální tukové tkáni.

III.3 Experimenty in vitro

Při pokusech in vitro inkubujeme části tkáni v inkubačním mediu, ve kterém je obsažena kromě inkubačního roztoku (např. Krebs-Ringer fosfátový pufr - KRF) radioaktivně značená látka. Značená látka je pochopitelně různá podle toho, jaké metabolické pochody sledujeme; jde např. o glukózu 14 C, acetát-14 C, nebo mastné kyseliny značené 14C a pod.

U některých tkání můžeme použít přímo její extirpovaný kousek, dostatečně tenký (aby byl zaručen homogenní přísun živného media do tkáně) a přitom natolik kompaktní, aby se v průběhu inkubace neporušil. V jiných případech děláme pomocí žiletky v držáku tenké tkáňové řezy. První z uvedených způsobů můžeme např. použít u bránice, epididymální či perirenální tukové tkáně, řezy tkáni děláme např. u jater.

Příklady in vitro experimentů:

- Ke sledování tvorby mastných kyselin a dalších lipidových frakcí se užívá acetát-1-14C, přidávaný do inkubačních baniček (viz obr. č. 70 v množství 2 uC na vzorek. Inkubační doba je 60sekund, inkubace probíhá při 37oC a s O₂ jako plynnou fází.

Po skončené inkubaci jsou kousky tkáně z media vybrány, opláchnuty, osušeny na filtračním papíru, pak jsou homogenizovány.

Z homogenátu jsou pak extrahovány lipidy metodou dle Folcha (1957) dvacetinásobkem chloroform - metanolu v poměru 2:1. Pak se k tomuto extraktu přidají 2 díly 2% KH₂PO₄ na 10 dílů extraktu.

Alikvot chloroformové části extraktu je potom pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na silikagelu rozdělen na fosfolipidy, mono-, di- a triglyceridy, cholesterol a volné mastné kyseliny. Tyto frakce byly pak metodou kapalné scintilace změřeny.

-Oxidace acetátu-1-¹⁴C byla sledována při inkubaci tkáňových (na příklad jaterních řízků) v KRF, při 37°C, po dobu 60 minut. Vydýchaný CO₂ byl vychytáván v 50% alkoholickém roztoku monoethylaminu. Aktivita byla měřena po rozpuštění alikvotu roztoku ve scintilační tekutině.

- Esterifikace mastných kyselin je sledována s palmitát-1-¹⁴C v jaterních řezech.

Závěr: Je si třeba uvědomit, že in vitro sledování nemusí odrážet poměry v intaktním organismu, kde existuje regulace pomocí hormonů i CNS. Spíše je testována možnost reakce organismu v daném pochodu než její skutečná velikost.

III.4 Metabolické problémy a způsob jejich řešení

Použitím značených sloučenin se řada biologických disciplin posunula na zcela jinou kvalitativní úroveň. Zejména v posledních cca 30 letech má jak kvalita tak kvantita získaných experimentálních dat vzestupnou tendenci. To je způsobeno jednak rozšířením palety komerčně vyráběných sloučenin, dále pak rutinním použitím dokonalých automatů pro scintilační detekci měkkého beta záření C 14 a H 3.

Hlavním důvodem pak je objevení řady nových separačních metod.

Použití značených metod skrývá však v sobě úskalí spočívající v tom, že aplikací RA značené sloučeniny, izolací sledovaného metabolitu a změřením jeho aktivity u jakéhokoliv vzorku lze získat poměrně jednoduše řadu experimentálních čísel. To vede k tomu, že kvantita výsledků ze stopovacích experimentů vzrůstá závratnou rychlostí, ne vždy jde ale o kvalitativně nové informace.

III.4.1 Porovnání rychlosti stejné metabolické reakce u různých skupin zvířat

	a1	
A		B
	a2	

Měřili jsme rychlost syntézy triglyceridů a fosfolipidů v játrech. Jak triglyceridy tak fosfolipidy vznikají esterifikací volných mastných kyselin transportovaných z krevního řečiště do hepatocytu. Po přechodu celulární a mitochondriální membránou a aktivaci mastných kyselin na acyl-CoA může být mastná kyselina využívána dvěma alternativními cestami a to jednak oxidací, jednak esterifikací - viz obr. č. 71.

Je známo, že utilizace mastných kyselin beta oxidací je akcentována hladověním. Položili jsme si otázku, zda současně s oxidací mastných kyselin není změněna i jejich rychlost esterifikace.

Syté a 48 hodin hladovějící krysí samice byly dekapitovány a z jejich jater byly připraveny tkáňové řezy. Řezy byly inkubovány 10 minut v Krebs-Ringerově fosfátovém pufru bez vápníku v kyslíkové atmosféře do ustavení rovnováhy. Pak byl postranním raménkem inkubační baničky (Warburgovy) injikován značený palmitát-1-C 14 v komplexu s albuminem. Finální koncentrace volných mastných kyselin pak byla 0,2 umol/ml a poměr mastné kyseliny:albumin byl 7:1.

Po 60 minutách inkubace byl metabolismus tkáňového řezu zastaven přidáním 1 ml 5N H₂SO₄ a do vloženého kalíšku s monoetanolaminem byl vychytáván expirovaný CO₂. Po 40 minutách byla jaterní tkáň homogenizována a směsí chloroform-metanol 2:1 byly extrahovány celkové jaterní lipidy. Pro rozdělení na tenké vrstvě kyseliny křemičité (TLC) byla pak stanovena aktivita volných mastných kyselin, triglyceridů a fosfolipidů.

Změřená aktivita v CO₂ a ve všech lipidových frakcích (na 1 g) byla vydělena specifickou aktivitou palmitátu-1-C₁₄ v mediu a výsledné hodnoty jsou pak vyjádřeny v mumol mastné kyseliny oxidované na CO₂ resp. esterifikované na triglyceridy či fosfolipidy.

Z obrázku č. 72 je vidět, že kromě potvrzené zvýšené oxidace mastných kyselin za hladovění ve srovnání s kontrolními sytými zvířaty, poklesla i rychlost syntézy triglyceridů po 48 hodinách hladovění a to o 40%.

III.4.2. Porovnání rychlosti dvou metabolických cest

Na křižovatce dvou metabolických cest lze pomocí značené sloučeniny sledovat poměr rychlosti mezi těmito dvěma cestami (A→B resp. A→C).

Případ je jednodušší, pokud známe alespoň přibližně velikost poolu A a pokud značená molekula při přeměně na finální metabolit B nebo C neprodělává několik řadění v poolích, jejichž velikost je značně variabilní a experimentálně nepřístupná měření. V takovém případě lze obě tyto reakční rychlosti vyjádřit v absolutních hodnotách a vypočítat jejich poměr.

Jako příklad může sloužit sledování poměru oxidace a esterifikace mastných kyselin v játrech. Vzhledem k tomu, že známe velikost extracelulárního poolu volných mastných kyselin a jeho specifickou aktivitu, můžeme ji položit rovnou specifické aktivitě intracelulárního poolu palmityl-CoA.

Předpokladem ovšem je, že transport mastných kyselin do intracelulárního prostoru není limitující, a také, že aktivita palmityl CoA syntetázy není limitována.

III.4.3 Sledování vztahu dvou metabolických rychlostí

Při změně nutričního stavu organismu či při jiné změně nedochází k jedné ale k celé řadě metabolických změn současně. Vystává otázka, která z těchto změn je primární a které jsou z této prvotní změny odvozeny.

Jako příklad lze uvést sledování vztahu esterifikace k oxidaci mastných kyselin. Za hladovění dochází k vzrůstu koncentrace volných mastných kyselin, jejich zvýšenému vychytávání v játrech a ke zvýšené jejich oxidaci na CO₂ a také ke zvýšení produkce ketolátek. Předpokládá se, že zvýšená tvorba ketolátek je regulována prostřednictvím zvýšené intracelulární koncentrace acetyl CoA, citrátu nebo hormonálně.

Alternativní cestou oxidace mastných kyselin v játrech je jejich esterifikace na triglyceridy a fosfolipidy a za hladovění do-

cháží současně se zvýšením oxidace i ke snížení esterifikace mastných kyselin.

V následujícím pokuse jsme se snažili zjistit, zda esterifikace nehraje regulační úlohu v oxidaci mastných kyselin a produkci ketolátek. Předpokládali jsme, že by snížená rychlost esterifikace za hladovění mohla umožnit zvýšenou dostupnost mastných kyselin pro oxidaci.

Sledovali jsme proto časový rozvoj obou rychlostí po hladovění a následné realimentaci. Metodou inkubace jaterních řezů s palmitátem-I-C 14 jsme měřili rychlost esterifikace a současně také rychlost produkce acetoctanu.

Jak je patrné z obrázku č. 73, je produkce ketolátek po 12 hodinovém hladovění signifikantně zvýšena, ačkoliv nedochází ještě ke zřetelné změně rychlosti syntézy TG resp. PL. Po 24 hodinách hladovění dochází k dalšímu zvýšení produkce ketolátek a současně ke změně rychlosti esterifikace. Po delším hladovění se již ani produkce ketolátek ani rychlost esterifikace nemění. Ke změně oxidace dochází tedy dříve než ke změně esterifikace.

Podobný obraz jsme viděli při porovnání obou metabolických rychlostí po realimentaci 24 hodin hladovějících zvířat sondou podanou glukózou (4 g na 1 kg váhy). Již 30 minut po realimentaci dochází ke snížení produkce acetoctanu na hodnoty, které se blíží kontrolním zvířatům.

Rychlost syntézy triglyceridů se ve 30. minutě po realimentaci ještě nemění a je signifikantně vyšší až 90 minut po realimentaci. Ani tehdy se ještě nemění rychlost syntézy fosfolipidů.

Z časového zpoždění změn esterifikace za oxidací lze tedy uzavřít, že esterifikace nemůže hrát regulační úlohu v produkci ketolátek.

III.4.4 Určení rychlosti limitujícího kroku

Změna rychlosti syntézy (nebo štěpení) finálního produktu, jako výsledek podnětu působícího na organismus, zahrnuje v sobě řadu změn v rychlosti tvorby intermediárních metabolitů.

Při změně rychlosti syntézy triglyceridů je možno očekávat změny rychlosti ve všech krocích, kterými molekula mastných kyselin projde:

volné mastné kyseliny ----- acylCoA ----- kys. fosfatidová
----- 1,2 diglycerid ----- triglycerid

Je důležité zjistit, který krok je regulační, tedy rychlost limitující. K řešení této otázky jsme uspořádali pokus a to tak, že jsme měřili rychlost syntézy všech intermediárních a finálních metabolitů u skupin kontrolních a 18 hodin hladovějících potkanů. Tuto dobu hladovění jsme považovali na základě našich dřívějších výsledků za takový časový interval, kdy může dojít k prvním změnám rychlosti syntézy triglyceridů - viz obr. č. 74.

Po 18 hodinách hladovění došlo u zvířat k minimálnímu snížení rychlosti syntézy triglyceridů. Tento pokles je statisticky nevýznamný. Rovněž pokles rychlosti syntézy 1,2 diglyceridů je statisticky nevýznamný.

Porovnáme-li rychlost syntézy hlavních frakcí fosfolipidů, vidíme, že není významného rozdílu v rychlosti syntézy fosfatidylcholinu (lecitinu - FCH - a fosfatidylethanolaminu - FE), které jsou finálními produkty.

Naproti tomu snížení rychlosti syntézy kyseliny fosfatidové (KF), která je prvním krokem syntézy triglyceridů, je vysoce statisticky významné. Aktivita kroku aktivujícího mastnou kyselinu na acyl CoA nemůže být rychlost limitující, neboť aktivita acyl-CoA syntézy je naopak za hladovění akcentována.

Rychlost limitujícím krokem esterifikace je tedy právě reakce regulovaná alfa-GP acyltransferázou (přenesení dvou řetězců mastných kyselin na molekulu alfa-GP), vedoucí ke vzniku kyseliny fosfatidové.

III.4.5 Nehomogenita metabolického poolu

Zvyšování rozlišovací úrovně, která je důsledkem používání nových experimentálních přístupů, vede někdy k nutnosti zásadní změny názoru na studovaný metabolický systém. Interpretace nových experimentálních dat si často vynucuje předpoklad, že studovaný systém má mnohem složitější strukturu, než jaká byla dosud předpokládána.

Vyskytuje se zejména situace, při které dochází k nálezům

svědčícím pro skutečnost, že místo původně jednoho předpokládaného poolu existuje poolů několik, navzájem od sebe oddělených.

Příkladem je pool zásobních triglyceridů v adipocyty (tukové buňce), který byl dříve považován za homogenní. Výsledky Vaughanové (1959) se ale ukázaly v naprostém nesouhlase s touto představou. Vaughanová inkubovala epididymální tukovou tkáň krysy se značeným palmitátem a označila tak triglyceridy tukové buňky a pak měřila uvolňování mastných kyselin z takto označených triglyceridů.

Uvedená autorka zjistila, že specifická aktivita uvolněných mastných kyselin (aktivita uvolněných mastných kyselin dělená množstvím uvolněných mastných kyselin) je podstatně vyšší než průměrná specifická aktivita mastných kyselin v celé tukové tkáni. Tento fakt lze vysvětlit pouze tak, že triglyceridy v tukové tkáni jsou ve dvou poolech, z nichž pool A komunikuje s extracelulárním prostorem, kdežto pool B prakticky pouze s poolem A - viz obr. č. 75.

To, že s plasmou komunikuje pouze pool A, je jistě zjednodušená představa; i pool B by mohl rovněž komunikovat s plasmou, ale rychlostí podstatně nižší než pool A.

Palmitátem-C14 označíme triglyceridy v poolu A a měříme specifickou aktivitu mastných kyselin uvolněných z tohoto poolu. Pool B se značí postupně přesunem značených mastných kyselin z A do B.

Zavedeme-li nyní předpoklady, že:

a) systém je v rovnovážném stavu

b) rychlosti r_{BO} , r_{AB} a r_{BA} jsou zanedbatelné vzhledem k r_{OA} a r_{AO} ,

pak můžeme předpokládat, že měříme specifickou aktivitu volných mastných kyselin uvolněných do media. Ta se rovná specifické aktivitě mastných kyselin v A, protože pool B se neoznačí významně a specifická aktivita v B bude proto téměř rovna 0. Pak rovnice:

specif. akt. v celé tuk. tkáni (A+B)

specif. akt. uvolněných MK x 100%

udává velikost poolu A z celkových triglyceridů tukové tkáně.

Porovnali jsme tímto způsobem tukovou tkáň u zvířat mladých (2 měsíčních) a dospělých (8 měsíčních). Epididymální tukovou tkáň jsme inkubovali 30 minut se značeným palmitátem C14 a pak po dobu 60 minut jsme inkubovali tuto tukovou tkáň v 3% albuminu (měření uvolňování volných mastných kyselin) - viz obr. č. 76.

Obě skupiny se liší v množství uvolněných mastných kyselin a také v jejich specifické aktivitě. Rovněž specifická aktivita triglyceridů v tukové tkáni po inkubaci palmitátem je u starších jedinců nižší, protože rychlost esterifikace je snížena.

Vypočteme-li nyní poměr specifické aktivity, zjistíme, že pool A (aktivnější, s rychlým obratem) činí 3,7% celkových triglyceridů u mladších zvířat, kdežto u starších zvířat je pouze 1,2%. Velikost aktivního poolu se tedy stářím snižuje.

III.4.6 Distribuce značeného metabolitu

Pokusy sledující distribuci jsou ve svém principu velmi jednoduché. Konečným vyjádřením distribuce je procentuální část podaného značeného metabolitu lokalizovaná ve stanoveném čase ve vymezeném prostoru (celém orgánu, v určitém druhu buněk nebo subcelulárních částic). Velmi často není ani nutné analyzovat, v jaké formě je značený atom podaného metabolitu ve studovaném prostoru. Takto stavěné experimenty jsou obvykle prvním stupněm řešení otázek z oblasti výživy, farmakologie a pod.

Jako příklad uvádíme vychytávání plasmatických volných mastných kyselin v ischemickém kosterním svalu. Ischemie pravé zadní končetiny krysa bylo dosaženo přetěním pravé ilické tepny bez přerušení žíly a inervace. Pokusným a kontrolním zvířatům byl i.v. injikován komplex albuminu s kyselinou palmitovou C 14 (3 uC) a Rb86 Cl (5 uC). V 90.-té sekundě po aplikaci, kdy je převážná část mastných kyselin vychytána extravaskulárně, byla zvířata dekapitována. Aktivita v bérčovém svalu byla vyjádřena v procentech z podané aktivity mastné kyseliny. Procento vychyteného rubidia ukazuje přitom změnu rychlosti průtoku - viz obr. č. 77.

Jak je z něj patrné, je do ischemického krysího svalu inkorporováno méně mastných kyselin. Protože jsme v témže experimentu měřili změnu průtoku, mohli jsme distribuci mastné kyseliny porovnat se změnou průtoku. Je vidět, že jak distribuce C14, tak distribuce RA rubidia je v ischemickém svalu snížena asi o 60% v porovnání s kontrolní skupinou. Snížení inkorporace mastné kyseliny do ischemického svalu je tedy zřejmě dáno sníženou rychlostí průtoku krve svalem.

III.4.7 Měření přítoku (inflow)

Změření distribuce metabolitu, které jsme probrali v předchozí části, nemusí být vždy postačující pro řešení některých otázek přeměny ve tkáních. Distribuce jednorázově podané značené látky v organismu dává dostatečnou informaci při porovnání dvou skupin pouze v případě, že obrat tohoto metabolitu je u obou skupin stejný.

Jako příklad si můžeme uvést experiment zčásti již popsáný v minulých odstavcích. Zvířatům trenovaným zvýšenou fyzickou zátěží, omezeným v pohybu a kontrolním byla opět podána 14 C-kyselina palmitová. Zvířata dekapitovaná v 5 a 10 minutě po aplikaci, kdy je již aktivita v krevním řečišti minimální (tzn. že podstatná část podaného značeného palmitátu je již distribuována do tkání), byla shrnuta do jedné skupiny. U této skupiny byla změřena aktivita v epididymální tukové tkáni a v musculus soleus - viz obr. č. 78.

Distribuce palmitátu-C14 u všech sledovaných skupin je vy-

jádřena jako procento z podané aktivity. Tento ukazatel podává dobrou informaci při porovnání skupiny kontrolní a trénované, protože odtok se mezi oběma skupinami neliší. Trénovaná zvířata distribuují větší procento aktivity do svalu a méně do depotního tuku. Naopak při porovnání skupiny kontrolní a omezené je toto procentuelní vyjádření zcela zkreslující.

Obě skupiny se zásadně liší v hodnotě odtoku (outflow) plasmatických mastných kyselin. Chceme-li tyto skupiny zvířat porovnat, musíme měřit přítok (inflow) mastných kyselin

do svalu a epididymální tukové tkáně v absolutních hodnotách. To znamená vyjádřit ho v umolech mastných kyselin transportovaných do celého svalu či epididymálního tukového tělesa za časový interval.

Tento výpočet je velmi jednoduchý.:

$$I = \frac{D \cdot R}{100} \%$$

I inflow mastné kyseliny do orgánu

D je procento, které ze 100% podané aktivity bylo distribuováno do tohoto orgánu

R je hodnota odtokové míry (outflow rate).

Je pochopitelné, že hodnota přítoku mastných kyselin do svalu nebo depotní tukové tkáně je závislá na rychlosti obratu plasmatických volných mastných kyselin. Čím je rychlost obratu větší, tím více přitéká mastných kyselin do sledovaného orgánu, i když se procentuelní distribuce nemění - viz obr. č. 79.

Na tomto obrázku jsou uvedeny hodnoty přítoku mastných kyselin u sledovaných skupin. Do svalu kontrolních a pohybově omezených zvířat přitéká podobné množství mastných kyselin za 1 minutu.

Toto množství je pravděpodobně nutné pro minimální krytí energetických výdajů z lipidů u sytého organismu. Naproti tomu zvířata trénovaná zásobují kosterní sval větším množstvím mastných kyselin.

Dlouhotrvající trénink na fyzické zatížení vede k adaptaci kosterního svalu na vyšší produkci energie z mastných kyselin i ve stavu klidu. Naopak kontrolní zvířata distribuují větší množství mastných kyselin, které nebyly použity ve tkáních pro utilizaci, zpět do depotní tukové tkáně.

III.4.8 Multikompartmentální model metabolismu mastných kyselin a lipoproteinů

V této kapitole uvedeme příklad analýzy experimentálních dat s použitím počítače. Přístup analýzy experimentálních dat s užitím počítače umožňuje nejen zobecnit a interpretovat experimentální údaje, ale i vypočítat údaje přímému měření nepřístupné. V uplynulých létech se objevilo několik prací, které problém metabolických regulací lipidů studují s použitím značených mastných kyselin a multikompartmentální analýzou.

Provedli jsme pokus, ve kterém jsme pro označení metabolické cesty použili kyselinu palmitovou-C14 v komplexu s albuminem i.v. aplikovanou do ocasní žíly neanestezovaných krys. Absolutní chemické množství mastné kyseliny bylo velmi malé, prakticky šlo o stopové množství.

V časových intervalech od 10 sekund do 40 minut jsme jednotlivá zvířata utráceli a stanovili u nich aktivitu volných mastných kyselin a triglyceridů (ve frakci velmi nízké denzity lipoproteinů - VLDL) v séru a dále aktivitu celkových lipidů jater. Aktivita všech frakcí byla měřena po extrakci lipidů a jejich rozdělení tenkovrstevnou chromatografií (TCL) na beta měřiči s užitím kapalného scintilátoru.

Osud intravenózně podané značené mastné kyseliny bude patrnější ze základního kompartmentového schematu - viz obr.č. 80.

Mastné kyseliny mizí z plasmy (kompartiment 1) jednak do jater (kompartiment 2 + 5), jednak do extrahepatálního prostoru (kompartiment 4 + 6), reprezentovaného především tukovou tkání. V játrech je část mastných kyselin uložena a další část uvolněna z jater ve formě plazmatických triglyceridů velmi nízké denzity (VLDL je kompartiment 3). Ty jsou dále štěpeny a utilizovány.

Literární údaje a naše předchozí zkušenosti s analýzou podobných systémů nás vedly k tomu, že jsme zavedli předpoklad rozdělení hepatálního i extrahepatálního prostoru na dva pooly, z nichž jeden je labilní a komunikuje s plazmou, kdežto druhý je stabilní a komunikuje pouze s labilním polem. Dále jsme počítali s jistým dopravním zpožděním vzniklým při syntéze triglyceridů v hepatocytu a navázání triglyceridů do komplexu lipoproteinů.

Z vypočítaných hodnot rychlostních konstant je patrné, že k_{14} je větší než k_{12} , takže mastné kyseliny jsou vychytávány více v extrahepatálních tkáních než v hepatálním prostoru. Zpětný tok extrahepatálního prostoru však vrací mastné kyseliny zpět do plazmy.

Fyziologický význam těchto toků je asi takový, že značené mastné kyseliny, které se dostanou na povrch celulárních membrán adipocytů, se zde míchají s nezačenými mastnými kyselinami uvolňovanými z tukové tkáně. Vracejí se pak do vaskulárního prostoru, aby mohly být vychytávány dále v játrech. Toky mezi labilním a stabilním polem jsou v játrech i extrahepatálním prostoru vyznačeny jako jednosměrné, což pochopitelně ve fyziologických podmínkách organismu neplatí.

Vzhledem ke krátké době sledování však specifická aktivita stabilního poolu nedosáhne takové hodnoty, aby bylo nutno se zpětným tokem kalkulovat, při dlouhodobějším experimentu by to bylo nutné.

Shoda mezi experimentálními daty (jednotlivé body jsou hodnoty y_1 , y_2 a y_3) a vypočtenými hodnotami aktivit v kompartmentu 1 $= y_1$, $2 + 5 = y_2$ a $3 = y_3$ je patrné z horní části obrázku č. 81. Z průběhu křivky 3 je vidět i časové zpoždění T_d . Vypočtený průběh aktivit dalších kompartmentů (experimentálně nepřístupných měření) je na dolní části obrázku.

Řešení multikompartmentálního modelu je jednoznačné a lineární (typické pro experimenty s podáním značené látky ve stopovém chemickém množství).

III.5. Příklady užití RA látek ke sledování metabolických problémů

III.5.1. Hladina a tvorba cholesterolu resp. mastných kyselin ve vztahu k věku u krys

Ateroskleróza se u lidí i některých živočišných druhů (např. prase) spontánně vyskytuje ve vyšším procentu s postupujícím věkem. Proto jsme chtěli vědět, jak se u krys různého stáří mění aterogenní látky, jak se liší hladina a tvorba mastných kyselin a cholesterolu. Pokusy jsme prováděli na zvířatech přesně definovaného věku.

Výsledky jednoznačně prokázaly, že zatím co hladina mastných kyselin stejně jako cholesterolu se ve tkáních resp. v séru s věkem zvyšuje, klesá naopak jejich tvorba ve tkáních. Stejně výsledky jsme dostali v pokusech in vivo jako in vitro - viz tab. č. 6.

V literatuře je překvapivě málo prací, které by systematicky studovaly tento problém, pouze ojediněle nacházíme porovnání hladin buď v séru či v jedné tkáni u mladých ve srovnání se starými jedinci. Z našich výsledků jasně vyplývá, že na kumulaci aterogenních lipidů s věkem ve tkáních, včetně aorty, se neprojevuje zvýšení jejich tvorby ale naopak snížení jejich odbourávání.

III.5.2 Hladina a tvorba cholesterolu resp. mastných kyselin ve vztahu ke změnám pohybové aktivity u krys

Při zvýšeném ukládání lipidů ve tkáních s věkem se nesporně uplatňuje i pokles v pohybové aktivitě, ke kterému u starších jedinců dochází. Proto jsme podrobněji sledovali, jakým způsobem se snížená či naopak zvýšená pohybová aktivita odráží v lipidovém metabolismu. Důležitým stimulem pro náš výzkum byla skutečnost, že pro člověka naší doby se omezení pohybové aktivity v pracovní i mimopracovní činnosti projevuje čím dále tím výrazněji.

V řadě dřívějších prací jsme ukázali, že se s hyperaktivitou snižuje množství celkových lipidů v těle a to při zvýšené jejich tvorbě. Daleko méně jasná je však situace, pokud jde o hladiny cholesterolu v séru a tkáních. Např. u cholesterolemie dosáhli různí autoři na prostě odlišných výsledků, což je dáno především velkými metodickými rozdíly (stáří pokusných modelů, velikost a délka změny pohybové aktivity) - přehled viz Pařízková (1977).

V našich pokusech, na krysách definovaného stáří (těsně po odstavu), při užití střední intenzity nucené fyzické aktivity (18 m/min. po dobu 3 hodin denně) jsme našli jasně vyjádřené snížení cholesterolemie i kumulace cholesterolu ve tkáních po 60 i 120 dnech adaptace - viz obr. č. 82 - horní část. U zvířat hypokinetických byl obraz zrcadlový - hodnoty byly zvýšené proti kontrolním zvířatům.

Situace pokud jde o tvorbu cholesterolu - viz obr. č. 82, dolní část, je naopak taková, že při dlouhodobě zvýšeném pohybu je nejvyšší tvorba, při dlouhodobém omezení pohybu pak nižší. Zcela stejně je tomu i pokud jde o tvorbu mastných kyselin.

III.5.3 Hladina a tvorba lipidových frakcí při změnách spontánní aktivity u krys

V dalších pokusech jsme prokázali, že kvalitativně stejné změny jako nucená fyzická aktivita v metabolismu mastných kyselin vyvolává i dlouhodobá změna ve fyzické aktivitě spontánní, způsobená nutričním zásahem v rané ontogenezi. Zvýšením počtu mláďat ve hnízdě na 12 oproti kontrolním 6 mláďatům byly vyvolány následné změny ve spontánní fyzické aktivitě. Mláďata z těchto velkých vrhů se vyznačovala sníženými hodnotami pokud jde o mastné kyseliny v karkase, zatímco tvorba mastných kyselin je výrazně zvýšena - viz obr.č. 83.

Naproti tomu pokud jde o cholesterol, nevyvolávají změny ve spontánní aktivitě žádnou či velmi malou odezvu v metabolismu cholesterolu. V každém případě však naše nálezy přispívají k hypotéze, předpokládané i Kannelem a Dawlerem (1972), že rané vlivy se mohou odrazit ve změnách lipidového metabolismu a mohou tak přispět i k vývinu ateromatózních změn.

III.5.4. Vliv cvičení matek a vlastního cvičení na lipidovou přeměnu jejich potomků

Některé údaje (Szabo a sp. 1975, Dancis 1975) svědčí o tom, že metabolické změny, ke kterým pod vlivem různých podnětů dochá-

zí v organismu gravidních matek, se mohou odrážet i u jejich potomků. Sami jsme již ve svých dřívějších pokusech prokázali, že pokud jde o mikrostrukturu srdce potomků, má pozitivní vliv zvýšená fyzická aktivita gravidních matek.

Proto jsme se pokusili prokázat i případný vliv na lipidovou přeměnu potomků, a to jednak bez ovlivnění jejich vlastní zvýšenou či sníženou fyzickou aktivitou, jednak s ovlivněním (toto vlastní ovlivnění fyzické aktivity probíhalo od odstavu mláďat, tj. od 35dnů věku).

Jak v případě gravidních matek, tak i jejich potomků, byla aplikována nižší úroveň běhání na koberečku (15 m/min. v trvání 1 hodiny denně). Ve věku 90 dnů se vyznačují potomci hyperkinetických matek zvýšenými hodnotami celkových lipidů a mastných kyselin (u samičích potomků) a cholesterolu v játrech (u obou pohlaví). Úroveň lipogeneze v játrech je přitom u samičích potomků snížena, změny u samčích potomků jsou malé - viz obr.č. 84.

Při vlastní zvýšené fyzické aktivitě pozorujeme rovněž změny u potomků matek vystavených fyzické aktivitě a to odlišné od potomků necvičících matek - výrazné jsou tyto změny zejména u samičích potomků. Po 60 dnech vlivu hyperaktivity reagovali samičí potomci aktivních matek odlišně od potomků matek kontrolních (viz obr.č. 85), jak pokud jde o hladiny tak i o tvorbu lipidových frakcí.

Výklad těchto změn, které probíhají poněkud odlišně než v dříve uvedených pokusech (možná i v důsledku poněkud změněné intenzity pohybové zátěže), je dosti obtížný. V každém případě však výsledky dávají podnět k dalšímu studiu vlivu pohybové aktivity na následující generace.

III.5.5 Hladiny lipidů v séru a tkáních a jejich syntéza u miniprasat v průběhu experimentální aterosklerózy vyvolané cholesterolovým žírem

U miniprasátek po 2 resp. 10 měsících přívodu vysokotukové diety s 2% cholesterolu byly sledovány změny hladiny cholesterolu, triglyceridů a volných mastných kyselin - viz obr. č. 86. Zatímco hladina triglyceridů se v průběhu uvedených časových intervalů prakticky neměnila, cholesterolemie se zvýšila již po prvních 3 dnech a maxima zvýšení dosáhla cca po 2 měsících uvedeného žíru.

Je zajímavé, že hladina volných mastných kyselin stoupala u obou skupin zřejmě v důsledku zvýšeného obsahu lipidů v dietě. Hladina cholesterolu přitom stoupala u skupiny s vysokým přívodem cholesterolu jak v játrech, tak ve svalu i aortě. U zvířat s vysokým přívodem tuků a cholesterolu v dietě je možné pozorovat snížení endogenní syntézy cholesterolu v játrech i intimě aorty, což svědčí o zpětné kontrole syntézy cholesterolu ve tkáních - viz následující obr. č. 86.

Naproti tomu endogenní syntéza mastných kyselin v intimomediální části aorty je jak u zvířat po 1 tak po 10 měsících zvýšena. Je ale zajímavé, že v případě syntézy cholesterolu i mastných kyselin jsou hodnoty tvorby po 10 měsících nižší u kontrolních i pokusných zvířat, ve srovnání s 2 měsíčními prasaty. To nasvědčuje tomu, že úroveň obou pochodů se s věkem snižuje (jak jsme již v jiných pokusech na jiném zvířecím modelu - kryse - zjistili).

III.5.6 Transport cholesterolu plasmatických lipoproteinů do aorty miniprasat v průběhu experimentální aterosklerózy

Úroveň hladiny cholesterolu v aortě a stupeň jejího aterosklerotického poškození je ve vztahu ke hladině cholesterolu v plasmě. Permeabilita endotheliální vrstvy intimy je změněna velmi brzy po dietním navození hypercholesterolemie. Proto jsme měřili velikost kost in vitro transportu cholesterolu lipoproteinů z plasmy do hrudní aorty a to pomocí homologně biologicky značených 3 H lipoproteinů. Velikost transportu byla vypočtena ze specifické aktivity cholesterolu v inkubovaném mediu a z aktivity v inkubovaném vzorku aorty.

Ukázalo se, že již po 2 měsících pokusu se zvyšuje velikost transportu hypercholesterolemických zvířat cca o 50% - viz obr. č. 87. Tento rozdíl setrvává i po 10 měsících pokusu, i když absolutní hodnota transportu poklesá u obou skupin. Důvodem tohoto jevu je zřejmě opět již dříve zmíněný pokles obecné metabolické úrovně u starších jedinců.

III.5.7 Závěry o výsledcích pokusů zaměřených na problematiku patogeneze aterosklerózy

Změny lipidového metabolismu, především cholesterolu, jsou uváděny ve vztahu k vzniku a průběhu aterosklerotických procesů v organismu. Je přirozené, že faktory, které vedou k zvýšenému ukládání tzv. rizikových lipidů v organismu (zejm. LDL cholesterol), se mohou v tomto ději uplatnit.

V první řadě mezi tyto faktory patří vyšší věk, který obecně vede k poklesu celkové úrovně přeměny látkové, jak o tom svědčí i naše výsledky, pokud jde o velikost lipogenetických a cholesterogene- netických pochodů ve tkáních u krys. Nejde přitom pouze o rozdíl mezi mláďaty a dospělými zvířaty, jak je někdy uváděno (Lockwood a sp. 1970), ale o patrný postupný pokles se stoupajícím věkem, který se uplatňuje jak v pokusech in vivo tak ve sledováních in vitro.

Kumulace lipidů ve tkáních, která se v průběhu ontogeneze projevuje, musí být tedy dána relativně vyšším poklesem odbourávání lipidů s věkem proti jejich syntéze. Důvodů poklesu úrovně přeměny látkové s věkem je celá řada, mezi jiným se však nesporně uplatňuje i pokles fyzické aktivity u starších jedinců. Svědčí o tom skutečnost, že stejné výsledky - nižší tvorba a vyšší kumulace lipidů včetně cholesterolu - jsme našli u zvířat adaptovaných na omezení pohybu. Naopak zvířata hyperaktivní se vyznačují podobnými parametry jako zvířata biologicky mladší.

V našich pokusech došlo u těchto zvířat k výraznému snížení cholesterolémie, ve shodě s některými epidemiologickými a klinickými nálezy (přehled viz Pařízková 1977). Užili jsme střední intenzitu fyzické aktivity, po 60-ti a více dnech byly zjištěny nižší hodnoty krevních i tkáňových lipidů, zejm. cholesterolu.

Zdaleka tak jednoznačně nedopadly naše pokusy s vlivem zvýšení

spontánní aktivity, zřejmě proto, že rozdíly v počtu mlád'at a tím i v dalších parametrech, nebyly tak velké, aby se projevily výrazněji. Avšak podobně jako v případech, kdy jsme sledovali vliv vlastního zvýšení fyzické aktivity na potomky kontrolních a hyperaktivních matek (kdy byl užit slabší podnět - 15 m/min. po dobu 1 hodiny denně), byly výsledky poněkud překvapivé.

Tyto pokusy přispěly k představě, že obdobně jako jiné vlivy (Knittle a Hirsch 1968, Johnson a sp. 1973, etc.), i vliv fyzické aktivity působící na matku se uplatňuje v ovlivnění organismu potomků. Výsledky jsou velice zajímavé, ale jejich interpretace je značně obtížná. Detailnější studium této otázky by si vyžádalo spolupráce genetiků a sledování i dalších generací pokusných zvířat, než bezprostředně následující. Pouze tak by se jednoznačně prokázalo, že pohyb může působit příznivě nejen na strukturu srdečního svalu (Pařízková a Petrásek 1976) ale i pokud jde o vznik či průběh aterosklerotických procesů.

Krasy, které jsme užívali ke studiu vlivu různých aterogenních činitelů na lipidový metabolismus, se vyznačují poměrně značnou rezistencí pokud jde o vznik aterosklerózy. Naproti tomu prase – podobně jako člověk - patří mezi několik živočišných druhů, u kterých se ateroskleróza vyskytuje i spontánně s postupujícím věkem. U tohoto druhu je rovněž možné vyvolat experimentální aterosklerózu v podstatě fyziologickým zásahem - nutričním přívodem vysokého podílu saturovaných tuků a cholesterolu (Florentin a sp. 1968).

Průběh morfoloogických změn u tohoto druhu je velice obdobný poměrům u počínajícího a rozvíjejícího se onemocnění u člověka. Ateroskleróza postihuje u obou druhů především aortu, koronární a intrakraniální arterie (Jones a Lugühl, 1965, Lumb a Hardy 1968).

Tuto schopnost nutričního vyvolání aterosklerózy jsme si proto ověřili na čs. nukleolu tzv. miniprasete, které je z důvodů ekonomických i pokud jde o manipulaci výhodnější, než větší odrůdy.

Zjistili jsme, že i u této odrůdy již při přívodu 2% cholesterolu po 10 měsících působení ve spojení se zvýšeným přívodem lipidů lze vyvolat hypercholesterolémii. Stejně tak i následné změny až k morfoloogickému obrazu počátečních stádií tvorby ateromatózních plátů (markantní ztluštění intimy s častým výskytem makrofágů obsahujících velké množství lipidů).

Již po krátké době několika měsíců stoupá významně obsah cholesterolu v intimě hrudní aorty, po cca 10 měsíčním pokusném krmení stoupá tento rozdíl až na dvojnásobek úrovně u kontrolní skupiny. Za zajímavý považujeme nále z zvýšení koncentrace plasmatických mastných kyselin, který dosud u prasete za obdobných pokusných podmínek nebyl popsán a který zřejmě přispívá ke vzniku pozorovaných změn v cévách.

Ve shodě s předchozími nálezy (Constantinides 1965) jsme prokázali zpětnovazebnou regulaci tvorby cholesterolu v játrech. Naproti tomu nebyla dosud v literatuře popsána feed - back kontrola syntézy cholesterolu v intimě aorty, jak jsme ji v našich pokusech zjistili. Tím je i potvrzena důležitost endogenní syntézy cholesterolu v cévě, jak bylo prokázáno již v prvních pracech Spitzera a sp. (1951); řada autorů však relativně nízké hodnoty tvorby cholesterolu v cévě považovala spíše za artefakt (např. Hashimoto a sp. 1974) a změnám cholesterogeneze proto nepřikládala význam.

Již před více než 50 lety bylo prokázáno, že stěna aorty je schopna syntetizovat mastné kyseliny (Chernick a sp. 1949). Somer a sp. (1974) prokázali u prasečí aorty, že k vyšší syntéze mastných kyselin dochází v oblastech sensitivnějších na ateromatózní změny. V soulase s tím jsou i naše nálezy, že u hypercholesterolemických prasat je asi 5x zvýšena úroveň lipogeneze právě v aortální stěně.

Některé nálezy z posledních cca 25-30 let (např. Florentin a sp. 1969, Adams a sp. 1970, Day a Proudlock 1974 atd.) prokazují, že permeabilita endotheliální vrstvy intimy, hrající v transportu plasmatického cholesterolu důležitou roli, je změněna záhy po vývinu hypercholesterolemie.

S pomocí homologních biologicky značených lipoproteinů jsme zjistili, že podobně jako bylo zjištěno u králíka (Constantinides a Wiggers 1974), i u prasete dochází ke zvýšení transportu cholesterolu z lumen cévy do cévní stěny. V dříve uvedené práci se tento výsledek připisoval zvýšenému gradientu cholesterolu u hypercholesterolemických zvířat. Použili jsme proto ke měření transportu cholesterolu in vitro shodného normo - cholesterolemického séra u obou porovnávaných skupin. Zjistili jsme přitom, a to již po 2 měsících, zřetelný vzrůst transportu cholesterolu u pokusných mini-prasat i za těchto podmínek.

Celkově je možno říci, že naše výsledky přispěly k podpoře představy o důležité roli změn lipidové přeměny při vývoji aterosklerotických změn a přinesly některé výklady mechanismů, jakými se tyto změny v patogenetickém řetězci uplatňují.

III.6 Užití RA izotopů při určení složení těla **(poměr tukové a netukové složky)**

Zejména při sledování vlivu různých výživových podnětů, ale i vlivů dalších (intenzita cvičení, teplota a p.) je důležité znát, jakou odpověď tyto změny vyvolaly v organismu. Zejména jde o změnu poměru svalové a tukové složky těla, neboť případný úbytek svalové složky a naopak přírůstek celkových tuků v těle signalizuje nepříznivou odezvu.

Především to platí u pacientů, u nichž poměr hmotnosti a jejich výšky ukazuje na nutnost přebytečný tuk redukovat. Ukazatelem jsou i tzv. kožní řasy, jejichž tloušťka vypovídá o množství tuku podkožního, který je v konstantním poměru s celkovým množstvím tuku v těle.

S rozvojem izotopových technik se postupně objevovaly metody, které ke zjištění poměru tukové a netukové složky použily některé RA izotopy. V zásadě byl možný dvojí přístup:

- buď pomocí RA izotopů stanovit kvantitu tukové složky a netukovou složku vypočítat po odečtení tuků od celkové hmotnosti těla
- nebo stanovit naopak složku netukovou a podíl připadající na tuky zjistit po odečtení netukové složky od celkové hmotnosti těla

Obě tyto metodiky vznikly na přelomu 60-70 let; zdá se, že postupně převládla spíše metoda zjišťování složky netukové.

III.6.1 Zjišťování množství tuků v těle pomocí ^{85}Kr

Tato metoda (viz např. Hytten a sp., 1966) využívá dilučního principu a zjišťuje absorpci RA značkovače v tukové tkáni. Jako značkovač se užívá plynný ^{85}Kr , který cirkuluje v uzavřeném okruhu (viz obr. č.103). Vyšetřovaný objekt dýchá pomocí masky plynou směs s ^{85}Kr (aktivita cca 5 uCi). Ze změny aktivity ^{85}Kr za 90-120 minut se vypočte tzv. kryptonový prostor.

Je známo, že krypton se distribuuje v různých částech těla různě, podle své absorpce v nich. Nejvíce je rozpustný v lipidech, podstatně méně ve vodě a nejméně v proteinech. Pak je možné vypočítat množství celkových lipidů v těle a to za splnění předpokladu, že současně je stanoveno množství tělesné vody (deuteriovou či triciovou vodou), plynný objem plic (helium). Takto zjištěné množství tuku v těle dává srovnatelné výsledky s jinými způsoby určení tukového podílu na hmotnosti.

III.6.2 Zjišťování podílu netukové složky těla pomocí ^{40}K

Draslík je nejdůležitější intracelulární kationt u všech živých organismů. V extracelulární tekutině je pouze zanedbatelné množství draslíku, v kostech a jiných obdobných tkáních není draslík vůbec obsažen, stejně tak v tukové tkáni. Proto je možné použít stanovení jeho množství pro určení kvantity metabolicky aktivní části těla.

Metodika využívá skutečnosti, že všechen draslík v přírodě je přirozeně radioaktivní, protože obsahuje 0,012% ^{40}K , který má velice dlouhý poločas a to $1,25 \times 10^9$ let. Ke zjištění celkového množství draslíku v těle pak stačí zaznamenat rozpad ^{40}K na vhodném přístroji.

Novak (1972) popisuje metodiku s užitím celotělového počítače s 10 detektory - 6 pohyblivých je umístěno nahoře a 4 stabilní jsou umístěny dole, tj. pod vyšetřovaným objektem (viz obr. č. 104).

Aktivita ^{40}K byla měřena dvakrát 5 minut. Ze zjištěného množství celkového tělesného draslíku se pak určí množství netukové složky těla podle vzorce Forbese a Hursha (1963), kteří chemickou analýzou určili konstantní množství draslíku v 1 kg netukové hmoty na 68,1 mEkv draslíku (toto množství je platné pro člověka i různé živočišné druhy).

III.6.3 Alternativní metody pro zjišťování složení těla

Izotopové metody mají, pokud jde o zjišťování podílu tukové a netukové složky velkou konkurenci v jiných metodikách, které je

možné shrnout do několika základních typů:

a) Stanovení denzity těla - Tato metoda, využívající Archimedova zákona, vychází z metody Behnkeho a sp. (1942). Při tomto způsobu, nazývaném také vážení pod vodou, se denzita těla (D) vypočítává podle vzorce Keyse a Brožka (1953) takto:

$$D = \frac{H_s \times D_v}{H_s - H_v - RPO}$$

H_s : hmotnost na vzduchu , H_v : hmotnost ve vodě, D_v : denzita vody (za standardních podmínek je rovna prakticky 1,0), RPO: reziduální plicní objem (zjišťuje se po propláchnutí plic 60 litry kyslíku na analyzátoru plynů)

Procento tuku v těle (% T) se vypočte podle Brožka a sp. (1955) - Keyse a Brožka (1953) takto:

$$a) \% T = 100 \cdot \frac{4570 - 4142}{D}$$

$$b) \% T = 100 \cdot \frac{4201 - 3813}{D}$$

Zařízení pro vážení pod vodou viz obr.č.105. Tato metoda je pravděpodobně z užívaných metod nejpřesnější - její nevýhodou je jednak delší doba potřebná pro stanovení denzity, jednak nutné prostorové a přístrojové vybavení (v ČR v současné době proto jsou pouze asi 3 zařízení pro vážení pod vodou).

b) Stanovení celkového množství tuku v těle zjišťováním podkožního tuku kaliperem

Při této metodě se vychází ze zjištění, že podkožní tuk tvoří konstantní část celkového tuku v těle. Proto se měří tloušťka kožních řas na různých místech těla, při tom se u různých autorů liší počet (a také lokalizace) těchto měřených míst.

Ve většině studií se však užívá měření alespoň na 4-5 místech a to na tricepsu, na zádech pod lopatkou, vpředu hrudníku u podpažní jamky, na bříše a případně na stehně. Jak uvádí Pařízková (1977), pro podrobnější studie je doporučeno měření na 10 místech dle Alena a sp. (1956)- viz obr. 106.

Měření pomocí kaliperu je na první pohled nejvhodnější pro terénní studie, protože měřicí zařízení - kaliper - je možné přenést do jakýchkoliv - třeba polních - podmínek.

Obtíže vznikají především z toho, že různí autoři používají různé typy kaliperů (viz obr. č.107 a obr. č.108), lišících se silou stisku. Výsledky měření jsou také do značné míry ovlivněny tloušťkou a kvalitou kůže. Konečně, jako u každé obdobné metodiky, záleží na zkušenosti a praxi pracovníka, který s kaliperem měření provádí.

V některých pracech se proto hodnotí tukové vrstvy ultrazvukovým zařízením, rentgenogrammetricky, nebo na základě elektrické vodivosti; tyto metody jsou však užívány spíše ojediněle.

IV. ZÁVĚR

Oblast sledování fyziologie látkové přeměny a jejich regulací je nemyslitelná v současné době bez využití radioaktivních izotopů. Jejich přínos je nesporný - umožňují sledovat nejen jednotlivé stupně této přeměny, ale stopovat celý řetěz reakcí a to v jejich dynamice.

Radioizotopy resp. sloučeniny, které je obsahují, dávají i možnost zjišťovat koncentrace nejrůznějších biologicky účinných látek, ať již metabolitů, hormonů či vitaminů a to s daleko větší přesností a citlivostí, než klasické metody vážkové či fotometrické (ve srovnání s obdobně citlivými přístupy, jako je HPLC, přitom ve větších seriích i rychleji a levněji).

Metody využívající RA izotopy se kombinují i s jinými přístupy, např. imunochemickými, což jejich citlivost dále zvyšuje. Proto by bylo velkou chybou, aby ti, kteří se fyziologií v celé šíři a přeměnou látkovou zvláště zabývají, neznali možnost využití radioizotopových metod pro své výzkumy.

Skripta si nekladou tak vysoký cíl, jako by si kladla monografie pro tuto oblast (mimořádně řečeno, de facto nejen u nás, ale i ve světové literatuře podobná komplexní monografie stále chybí!). Jejich cílem je pouze informovat o hlavních principech RA metodik a podrobně pak ukázat možnosti využití při výzkumu přeměny látkové u živočichů i u člověka.

V jednotlivých kapitolách a podkapitolách skript jsou uvedeny publikace, ve kterých je možné nalézt podrobnější údaje o jednotlivých částech probírané problematiky.

Pokud nejsou u obrázků či tabulek uvedeny žádné prameny, byly udělány pouze pro potřeby této knihy (jinak i u našich vlastních nálezů uvádíme publikace, ze kterých pocházejí). Pokusili jsme se vždy uvádět takovou dokumentaci, aby dobře ilustrovala probíranou tematiku - ne vždy se to asi povedlo - to však musí posoudit uživatelé skript sami.

Není správná představa, že užití RA izotopů je vzhledem k finanční náročnosti těchto metod vyhrazeno jen pro úzký okruh pracovišť. Pokud jde o vybavení laboratoře, ve které je možné provádět většinu in vitro stanovení, nevyžaduje žádné zvláštní podmínky; zcela stačí běžná fyziologická či biochemická laboratoř s digestoří.

Jedinou dražší položkou je aparatura na měření aktivity (ať již beta či gama záření); její cena je však téměř srovnatelná s cenou chlazené centrifugy či podobných přístrojů. Často existuje také možnost využití měřičů v blízkém okolí, ať již na odděleních nukleární medicíny či klinické biochemie. Rovněž cena RA značených sloučenin či RIA kitů je

prakticky srovnatelná (většinou je ale levnější!) s cenou chemikálií potřebných pro chemická stanovení.

Rovněž není třeba se obávat následků záření při užití metod s RA izotopy - i při in vivo pokusech jde o dávky, které jsou srovnatelné se zářením, které přijímáme při sledování televize v jednom pořadu. Při metodách in vitro, zejména při RIA metodách, jsou dávky RA tak malé, že ani nejsou uváděny jako zářič.

Jde tedy pouze o to, aby v případech, kde užití RA izotopů může dát nové informace, k užití tohoto metodického přístupu skutečně došlo.

Jak jde rozvoj našich znalostí a tím i metodických možností stále dopředu, je však třeba někdy uvážit, zda kromě radioizotopových metod by nebylo možné či vhodné užít i jiného přístupu. Proto také v jednotlivých kapitolách, ať již jde o zobrazování orgánů, stanovení koncentrací, složení těla a pod., uvádím v těchto případech i alternativní neizotopové metodiky. I ty se postupně rozvíjejí, takže na př.spektroskopie magnetické rezonance dává rovněž možnost posouzení metabolické aktivity transplantovaných štěpů.

Ten, kde se s látkou obsaženou ve skriptech seznámí, by měl dostat základní informace o tom, jak by mu při studiu přeměny látkové - ať již u živočichů či člověka - mohly pomoci metody s RA izotopy i metodiky alternativní. Pro podrobnější informace se pak může obrátit do literatury, ať již do té, která je přímo ve skriptech uvedena, či do aktuálního bohatého písemnictví.

Snad ale tato skripta napomohou, jako "první čítanka", k bližšímu seznámení s problematikou a přispějí tak nepřímě i k dalšímu rozvoji studia fyziologie přeměny látkové.