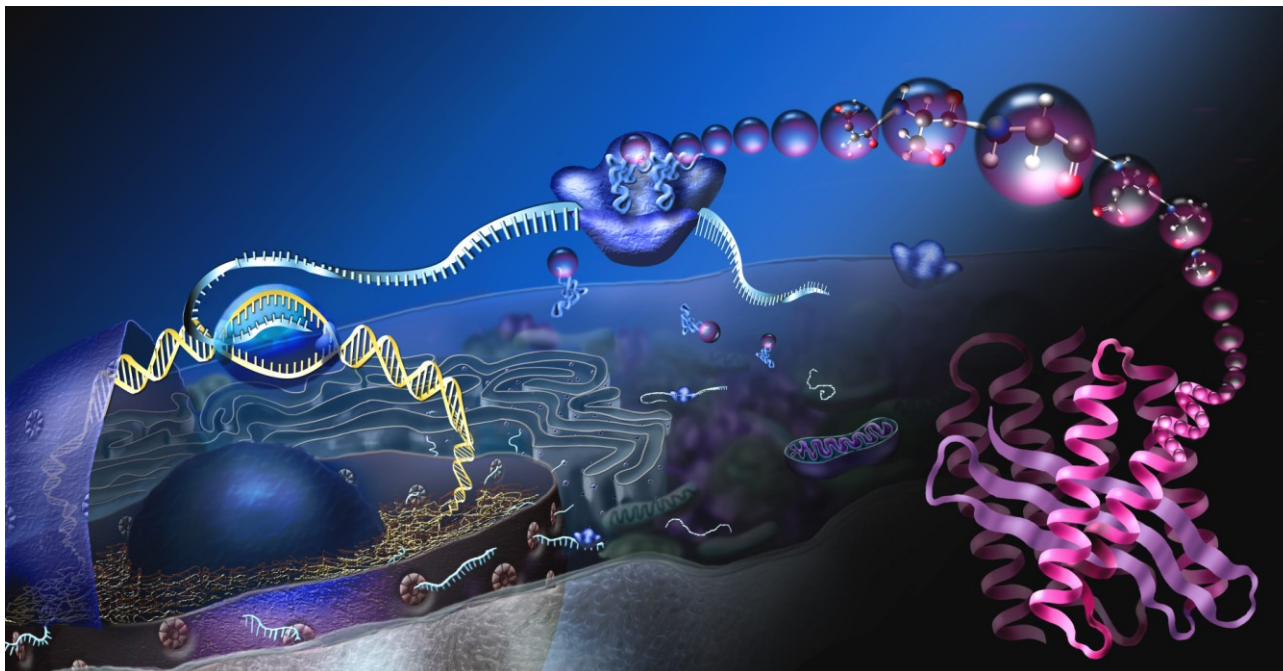


# C7075: Bioanalytická chemie v laboratorní medicíně



**Vitamíny, hormony a  
jejich stanovení stanovení**

# Vitamíny

= nízkomolekulární organické látky, které tělo v přiměřené míře potřebuje pro život

✓ až na výjimky neumí vytvořit a musí být dodávány potravou

výjimky: vitamín A - tvorba v organismu z  $\beta$ -karotenu

vitamín D - biotransformace z cholesterolu

vitamín K - produkce střevními bakteriemi

✓ jsou nezbytné pro fungování základních fyziologických procesů

✓ obvykle jsou vyžadována stopová množství denně ( $\mu\text{g}$  -  $\text{mg}/\text{den}$ )



## Role vitamínů v organismu

✓ slouží zejména jako kofaktory enzymů (B1 - thiamin, B2 - riboflavin, B3 - niacin apod.)

✓ uplatnění v oxidačně - redukčních systémech (NAD -  $\text{NADH}^+$ )

✓ jsou významnými antioxidanty (vitamín C, vitamín E)

**Hypervitaminóza** = předávkování vitamíny, méně častý jev, snižuje efektivitu vstřebávání a využití, běžnější u vitamínů, rozpustných v tucích

**Hypovitaminóza** = nedostatečný příjem, v důsledku vede ke zdravotním potížím

- při poruchách resorpce a při zvýšených nárocích organismu na vitamín

# Vitamíny - dělení

= velmi obtížné, jedná se o zástupce různých chemických skupin, které nelze klasifikovat na základě strukturní podobnosti

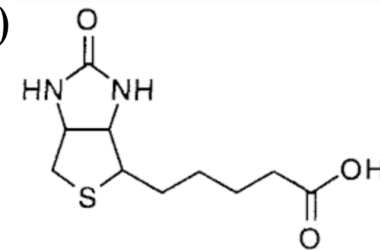
## 1. Vitamíny rozpustné ve vodě

- ✓ vitamíny řady B - B1 (thiamin), B2 (riboflavin), B3 (niacin, kyselina nikotinová), B5 (kyselina pantotenová) B6 (pyridoxin), B7 (biotin), B9 (kyselina listová) B12 (kobalamin)

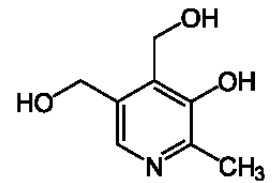
- ✓ vitamín C (kyselina askorbová)

## 2. Vitamíny rozpustné v tucích

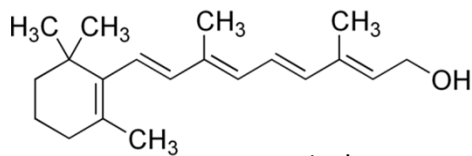
- ✓ vitamíny řady A - A1 (retinol), A2 (3-dehydroretinol)
- ✓ vitamíny řady D - D2 (ergokalciferol), D3 (cholecalciferol)
- ✓ vitamín E ( tokoferoly)
- ✓ vitamíny řady K - K1 (fylochinony), K2 (melachinony)



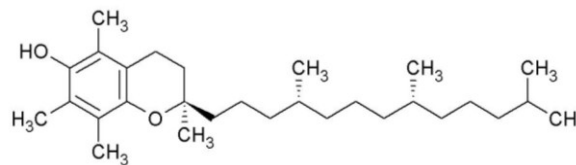
biotin



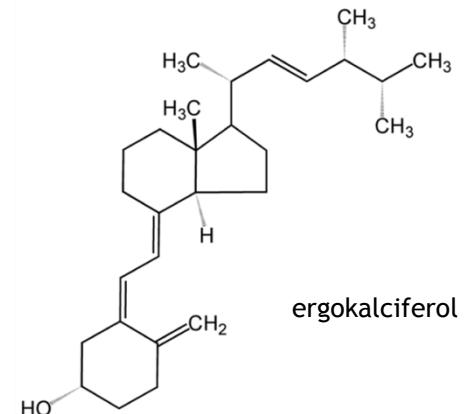
pyridoxin



retinol



tokoferol



ergokalciferol

# Způsoby stanovení vitamínů

## Přímé měření koncentrace vitamínů

- ✓ v krvi - vit E, vit A, B - karoten, vit B12, kyselina listová
- ✓ v moči - vit B1, niacin

## Měření koncentrace specifického metabolitu

- ✓ hromadění metabolitu v séru nebo moči následkem poruchy např. enzymových reakcí, např. zvýšení hladiny kys. methylmalonové při nedostatku vit B12

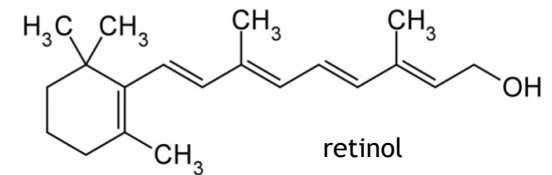
## Měření koncentrace specifického metabolitu po zátěži substrátem

- ✓ např. sledování hladiny homocysteinu odhalí nedostatky vit B6, vit B12 a kyseliny listové, podání methioninu umocní nárůst hladiny homocysteinu, která klesne podáním chybějícího vitamínu





# Vybrané příklady stanovení



## Vitamín A

= retinol - má několik konformací , lze chápat jen 2 aktivní formy

- ✓ v krevním oběhu vázán převážně na RBP (retinol vázající protein) a prealbumin
- ✓ má nezaměnitelný význam při reprodukci, podílí se na správné funkci zraku
- ✓ je fotocitlivý, což stěžuje jeho stanovení
- ✓ při nedostatku nastává šeroslepost, při nadbytku dochází k akumulaci v játrech, což vede k jejich poškození
- ✓ Stanovuje se pro zjištění poruchy trávení a vstřebávání tuků

## Stanovení

### Carr-Price test

= extrakce pomocí chloroformu, acetanhydridu (odstraňuje vlhkost), kdy vznikne nažloutlý roztok, který přidáním chloridu antimonitého  $\text{SbCl}_3$  v přítomnosti vit A zmodrá

- měří se spektrofotometricky při 550 nm

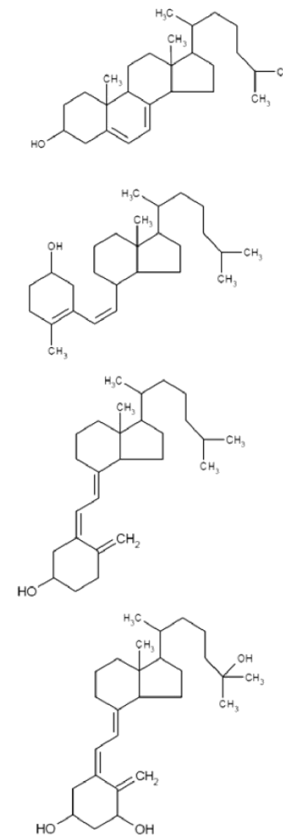
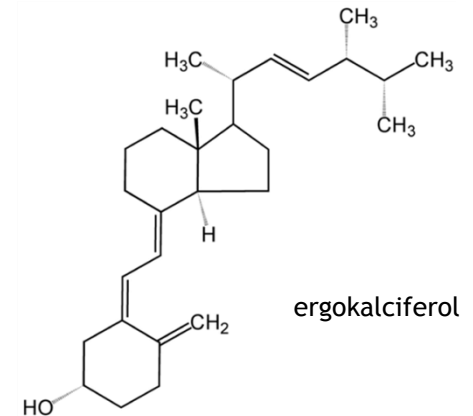
- jednotlivé formy vitamínu A se stanovují pomocí HPLC

# Vybrané příklady stanovení

## Vitamín D

= cholekalciferol (D3) a ergokalciferol (D2)

- ✓ aktivní formou je 1,25-dihydroxycholekalciferol
- ✓ cholekalciferol je částečně syntetizován v těle ze 7-dehydrocholesterolu
- ✓ hraje zásadní roli v metabolismu vápníku a fosforu - stimuluje tvorbu vazebného proteinu
- ✓ nedostatek vede k poruše mineralizace kostí - osteoporóza, křivice
- ✓ nadbytek bez většího významu
- ✓ je mu přikládán význam také v souvislosti s aktivitou imunitního systému

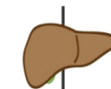


7- dehydrocholesterol

ozáření v kůži

prekalciferol

cholekalciferol  
(neaktivní vitamín D<sub>3</sub>)



játra, ledviny

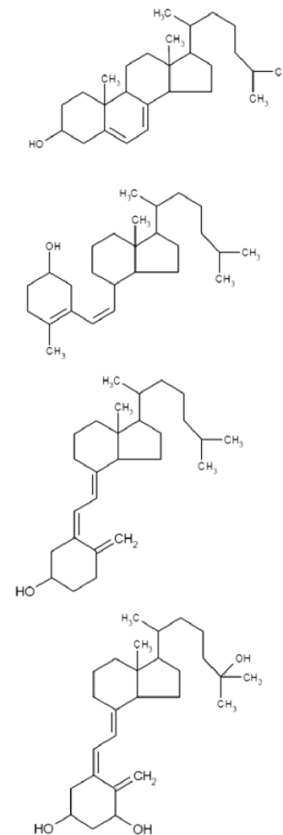
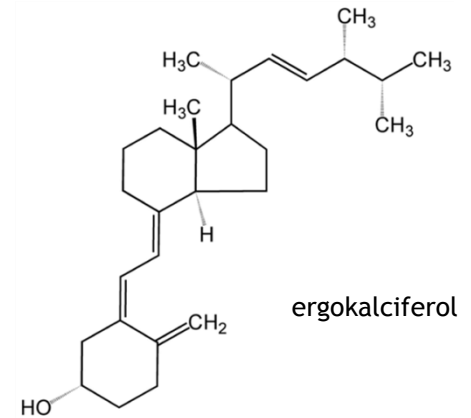
1,25-dihydrocholekalciferol  
(kalcitriol, aktivní vitamín D<sub>3</sub>)

# Vybrané příklady stanovení

## Vitamín D

### Stanovení

- ✓ nejčastěji RIA metody
- ✓ kombinace HPLC a fotometrie, MS
- ✓ chemiluminiscenční imunochemické techniky
- ✓ koncentrace v krvi je závislá na ročním období a době vystavení organismu slunečního světla
- ✓ v poslední době narůstá v klinické diagnostice význam stanovení 1,25-dihydroxycholecalciferolu

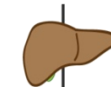


7- dehydrocholesterol

ozáření v kůži

prekalciferol

cholecalciferol  
(neaktivní vitamín D<sub>3</sub>)



játra, ledviny

1,25-dihydrocholecalciferol  
(kalcitriol, aktivní vitamín D<sub>3</sub>)



# Vybrané příklady stanovení

## Vitamín C

= kyselina askorbová, oxidovaná forma dehydroaskorbová

- ✓ součástí kofaktorů, podílí se na vstřebávání železa, má silnou antioxidační aktivitu
- ✓ nedostatek způsobuje náchylnost k infekcím, kurděje, přebytek je vylučován močí
- ✓ stanovuje se převážně v séru, méně v moči

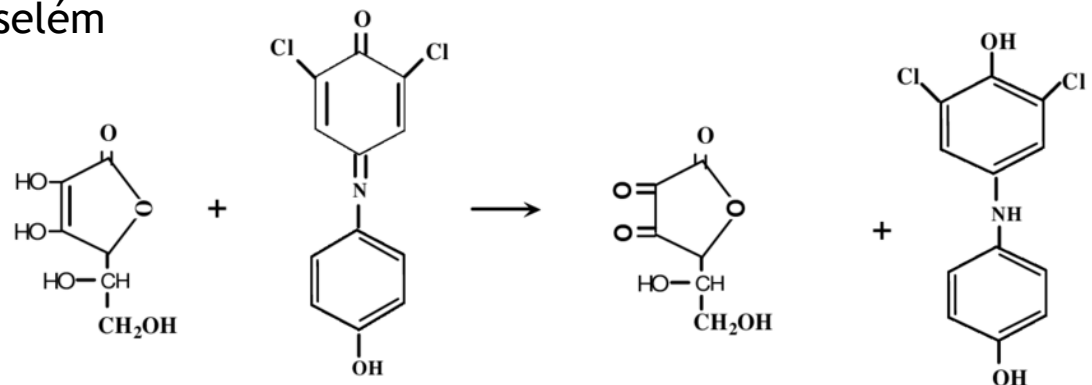
## Stanovení

- nejčastěji HPLC nebo fluorescenční stanovení
- využití redukčních vlastností vitamínu C (spektrofotometrie, titrace - jodometrie)

## Stanovení Tillmanovým činidlem

= kyselina askorbová redukuje v kyselém prostředí růžový roztok

2,4-dichlorfenolindofenolu do vzniku bezbarvé leukobáze



# Hormony

- = látky chemické povahy, které působí na specifické receptory cílových buněk a orgánů
- ✓ stimulují a regulují látkovou výměnu (pochody, vedoucí k tvorbě a využití energie)
- ✓ podílí se na rozmnožování a růstu, ovlivňují vývoj organismů
- ✓ slouží k adaptaci organismu a k regulaci vnitřního prostředí (homeostázy)
- ✓ řídí reakce organismu v souvislosti s vnějšími podněty a biorytmy
- ✓ jsou tvořeny výlučně organismem a nelze je tělu dodávat (např. potravou)

## Produkce hormonů

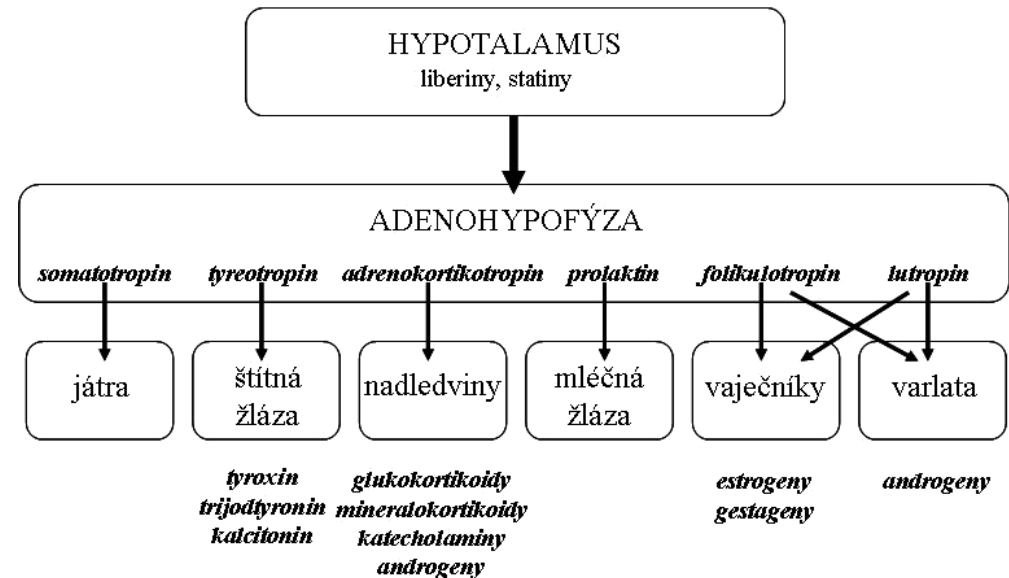
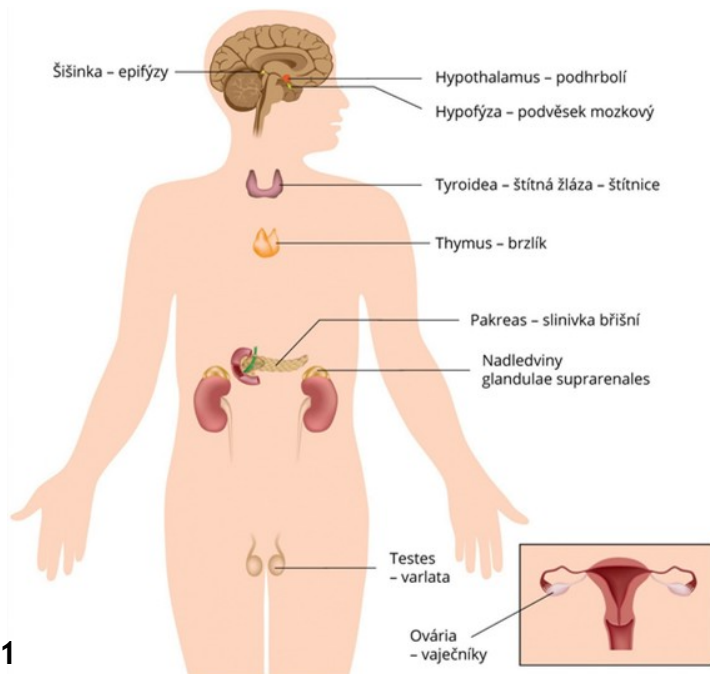
- ✓ nejčastěji jsou pomocí žláz s vnitřní sekrecí vylučovány přímo do krevního oběhu
- ✓ tvoří se také v buňkách různých tkání a orgánů (játra, ledviny, CNS) = tkáňové hormony

## Účinky hormonů

- **endokrinní** - účinek na vzdálenou tkáň, přenos krevním řečištěm -
- **parakrinní** - účinek v blízkém okolí buňky - např. růstové hormony
- **autokrinní** - účinek přímo v buňce, která hormon vytvořila
- **exokrinní** - v různých vzdálenostech od místa vzniku, např. buňky podél střeva

# Hormony

- ✓ většina hormonů se tvoří ve žlázách s vnitřní sekrecí
- ✓ produkce hormonů je úzce spjata s celou CNS, jejíž působení je nadřazeno stimulaci endokrinních žláz
- ✓ zásadní propojení celého systému spočívá v podmíněné činnosti jedné žlázy účinky hormonů, vytvořených žlázou jinou, např. tvorba kortikoliberinu (v hypothalamu) spustí tvorbu adrenokortikotropinu (v adenohipofýze), který následně v kůře nadledvinek stimuluje produkci kortikosteroidů, zejména kortizolu



# Hormony - dělení

= hormony jsou velmi rozdílné látky a lze je dělit podle několika kritérií

✓ liší se fyzikálně-chemickými vlastnostmi, mechanismem a rychlostí působení, transportem ...

## 1. Hormony odvozené od aminokyselin

hormony štítné žlázy, adrenalin, melatonin

## 2. Hormony odvozené od mastných kyselin

prostaglandiny

## 3. Hormony steroidní povahy

testosteron, progesteron, hormony kůry nadledvin

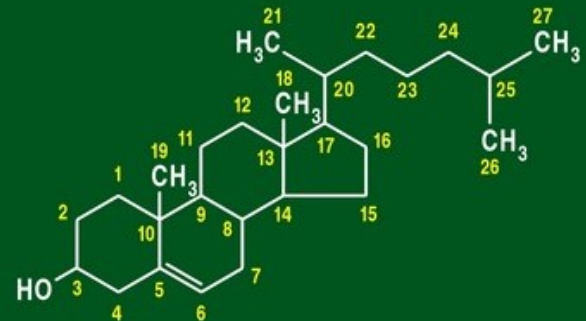
## 4. Hormony peptidové a bílkovinné povahy

většina ostatních hormonů

## 5. Ostatní látky

růstové hormony apod.

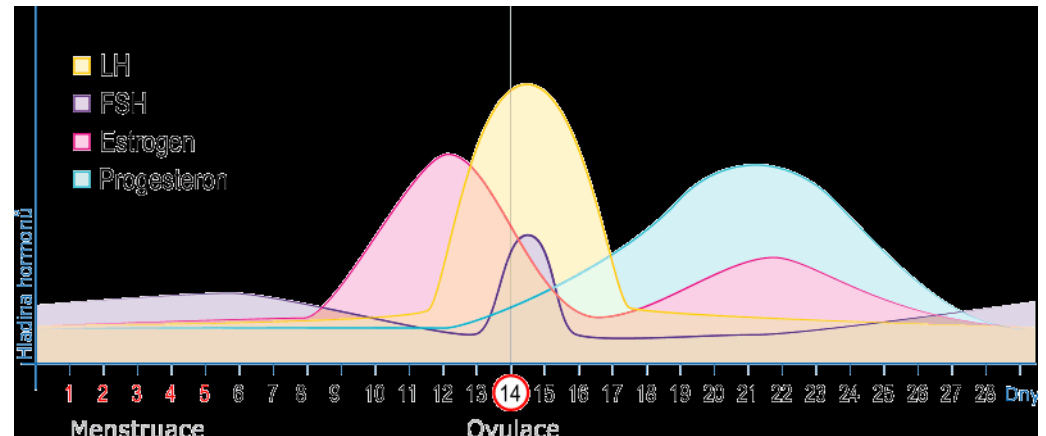
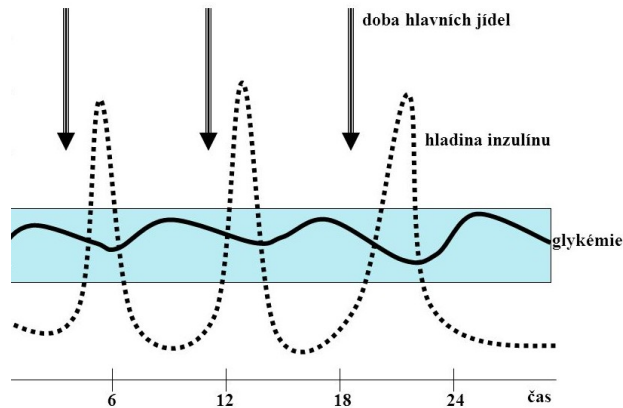
*Cholesterol je prekurzorem celé řady steroidních sloučenin.*



# Hormony a jejich hladiny

## Hladinu hormonů v krevní plazmě ovlivňují:

- ✓ biorytmy (cirkadiální)
- ✓ onemocnění, např. zánět, trauma, nádor
- ✓ nedostatek transportních bílkovin, např. albuminu
- ✓ jaterní nedostatečnost či porucha vylučování ledvinami
- ✓ přítomnost jiných látek - hormonální agonisté a antagonisté
- ✓ porucha receptorů - snížený až žádný účinek
- ✓ skladování odebraného vzorku, např. u hormonů štítné žlázy
- ✓ špatná konverze jednotlivých forem, např. tyroxin - trijódtyronin
- ✓ přítomnost protilátek, např. snížení účinku inzulínu



# Způsoby stanovení hormonů

## Nepřímé měření koncentrace hormonů v krvi

- ✓ účinky hormonů se posuzují na základě přítomných metabolitů

## Stanovení hormonů a jejich metabolitů v moči

- ✓ běžnější, avšak ne všechny hormony se močí vylučují

## Přímé stanovení v krvi

- ✓ nejčastější využití v souvislosti s velmi nízkými koncentracemi
- ✓ využívají se komerčně dostupné diagnostické soupravy

## Využití imunoanalytických metod

**RIA** - radioimunoanalýza, kdy izotopem značíme analyt jako antigen

**IRMA** - imunoradiometrická analýza, kdy je radioaktivně značená protilátka

**EIA** - enzymová imunoanalýza

**IEMA** - imunoenzymometrická analýza

nejčastěji **ELISA** - *enzyme-linked immunosorbent assay*

## Funkční testy

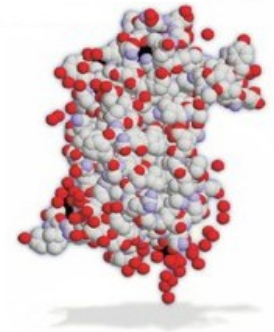
- ✓ např. orální glukózový toleranční test OGTT- diagnostika diabetu

# Vybrané příklady stanovení

## Somatotropin

= růstový hormon (STH, GH)

- ✓ jedná se o peptidový hormon, stimulující růst kostí a proteosyntézu
- ✓ jde o druhově specifický hormon, tj. nelze užít zvířecí hormon k terapii lidí
- ✓ ovlivňuje také hladinu cukru v krvi a působí jako antagonistu inzulínu
- ✓ snížená produkce STH způsobuje nanismus (zakrnění), zvýšená gigantismus (akromegalií)



## Klinické vyšetření STH

- ✓ provádí se při netypických fyziologických změnách podáváním inzulínu, kdy se stimuluje vylučování STH sníženou koncentrací glukózy v krvi
- ✓ metody stanovení jsou na bázi imunochemie
- ✓ dopingové kontroly - STH patří na seznam dopingových látek v oboru bodybuildingu a kulturistiky, kdy jeho podávání vede ke změně váhového poměru tuku ve prospěch svalů
- ✓ jedna injekce stojí cca 25,- USD

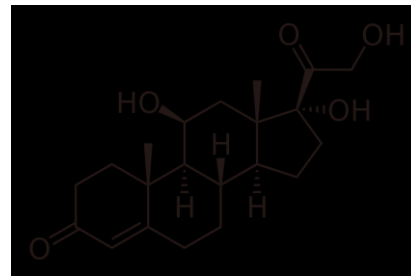


# Vybrané příklady stanovení

## Kortizol

= hormon kůry nadledvin, tzv. glukokortikoid

- ✓ steroidní hormon, který se neukládá, ale je vždy čerstvě syntetizován a vyslán do oběhu
- ✓ podílí se na regulaci glukózy a ukládání glykogenu v játrech
- ✓ jeho sekrece je řízena hypofyzálním adrenokortikotropinem (ACTH)
- ✓ zvýšená i snížená produkce vede k nádorům hypofýzy a hyperglykémii (Cushingův syndrom)



## Klinické vyšetření STH

- ✓ zvýšená produkce se sleduje v séru, ve slinách nebo v moči
- ✓ funkční testy slouží ke zjištění místa poškození

## Dexamethazonová suprese

= založena na podání dexamethazonu jako syntetického glukokortikoidu, který potlačí tvorbu ACTH a sníží tvorbu kortizolu - ukazuje na poškození hypofýzy

## ACTH stimulace

= měření hladiny kortizolu před a po podání injekce ACTH





# Vybrané příklady stanovení

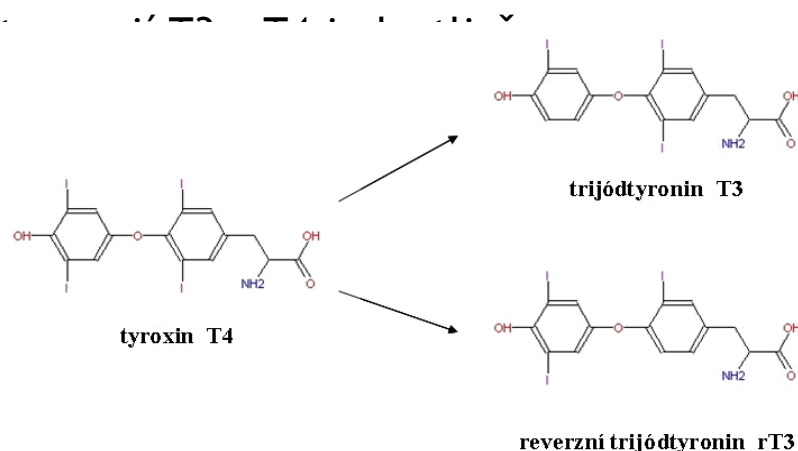
## Hormony štítné žlázy

= tyroxin (T4), trijódtyronin (T3 - neúčinnější) a reverzní trijódtyronin (rT3 - neúčinný)

- ✓ prekurzorem syntézy je tyrosin jako AMK
- ✓ tvorba tyreoidálních hormonů je spjata s tyreotropinem, pocházejícím z hypothalamu
- ✓ poruchy funkce štítné žlázy ovlivňují mitochondriální metabolismy, oxidační fosforylaci, metabolismy cukrů, tuků i bílkovin
- ✓ hyperfunkce štítné žlázy - Gravesova - Basedowova choroba
- ✓ hypofunkce štítné žlázy - mentální retardace (kretenismus)

## Klinické vyšetření T3 a T4

- ✓ základním testem je stanovení tyreotropinu (TSH), což je glykoprotein, který zajišťuje transport jodidů do štítné žlázy, teprve poté se s
- ✓ nejčastěji RIA nebo ELISA metodou
- ✓ řada komerčních testů pro různé analyzáto



# Vybrané příklady stanovení

## Pohlavní hormony

= steroidní hormony, produkované pohlavními žlázami a/nebo nadledvinami

- ✓ produkce je řízena spouštěcími hormony hypothalamu a hypofýzy (gonadoliberin, folikulotropin)

**ANDROGENY** - testosteron, dihydrotestosteron

**ESTROGENY** - estron, estriol, estradiol (účinek v poměru 5 : 1 : 10)

**GESTAGENY** - progesteron

## Testosteron

- ✓ tvoří se v Leydigových buňkách varlat mužů, reguluje spermiogenezi
- ✓ podílí se na vývoji primárních a sekundárních pohlavních znaků
- ✓ produkce je regulována gonadoliberinem, vlastní účinnou formou je 5 $\alpha$  - dihydrotestosteron
- ✓ vylučován je do plazmy, kde je specificky vázán na transportní protein (SHBG, albumin)
- ✓ odbourává se v játrech a je vylučován ve vazbě na kyselinu glukuronovou
- ✓ stanovuje se metodami RIA či vazebnými testy

# Vybrané příklady stanovení

## Pohlavní hormony

### Progesteron

= hormon žlutého tělíska

- ✓ přetváří děložní sliznici a v případě těhotenství inhibuje tvorbu gonadoliberinu (zastaví zrání folikulů)
- ✓ odbourávání probíhá v játrech, metabolickým produktem je pregnandiol
- ✓ stanovení - RIA, TLC, ELISA, EIA
- ✓ sledování hladiny progesteronu - při kontrole menstruačního cyklu a v průběhu těhotenství

### Estradiol

= nejúčinnější z estrogenů

- ✓ podílí se na sekundárních znacích ženy, působí na děložní sliznici a řídí menses

### Lutropin

- ✓ produktem adenohipofýzy, společně s folikulotropinem řídí menstruační cyklus ženy

# Tkáňové hormony

= tvoří se mimo žlázy s vnitřní sekrecí, jejich analytické stanovení není zatím zavedeno

**Angiotensin** - stimuluje tvorbu aldosteronu a vazokonstrikci

**Renin** - tvoří se v ledvinách, zajišťuje přívod krve do glomerulů

**Sekretin** - tvoří se ve sliznici tenkého střeva a reguluje hladinu HCl v žaludku

**Gastrin** - stimuluje sekreci žaludečních šťáv

**Bradykinin** - reguluje vazodilataci a tím krevní tlak

... prostaglandiny, endorfiny, dopamin...

U rostlin se jedná o **fytohormony**

- ✓ regulují stárnutí a opadávání listů, podporují růst rostlinných buněk, např. auxiny, cytokiny

U živočichů se jedná o **feromony**

- ✓ přenášejí informace mezi jedinci jednoho druhu, lákají k páření, upozorňují na potravu např. terpeny, alkoholy, estery



# Literatura a zdroje informací

- Chromý, Vratislav a kol.: Bioanalytika - Analytické metody v klinické chemii a laboratorní medicíně, Ústav chemie PŘF MU, Brno, 2011.
- Dastych, M. a Breinek, P.: Klinická biochemie - bakalářský obor Zdravotní laborant skripta LF MU, Brno 2015
- Racek a kol.: Klinická biochemie, Galén / UK v Praze, nakladatelství Karolinum 1999

<https://www.labtestsonline.cz>

