

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Zuzana Wolfová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: B0914P360004 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Zuzana Wolfová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

**SROVNÁNÍ ANALYZÁTORŮ NA STANOVENÍ
KONCENTRACE LAKTÁTU A VLIV NA HODNOCENÍ
LAKTÁTOVÉ KŘIVKY**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Pavel Brož Ph.D.

PLZEŇ 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31.3.2023.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Wolfová Zuzana

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Srovnání analyzátorů na stanovení koncentrace laktátu a vliv na hodnocení laktátové křivky

Vedoucí práce: MUDr. Pavel Brož Ph.D.

Počet stran – číslované: 50

Počet stran – nečíslované: 24

Počet příloh: 2

Počet titulů použité literatury: 36

Klíčová slova: laktát, laktátová křivka, analyzátor laktátu, aerobní práh, anaerobní práh

Souhrn:

Tato práce se zabývá problematikou analýzy laktátu ve sportovní medicíně. Obsahuje teoretickou a praktickou část. V teoretické části je pojednáno o metabolismu a funkci laktátu v lidském organismu, o možnostech stanovení laktátu v laboratoři spolu s preanalytickými vlivy a možnou interferencí. Rozebírána je také úloha laktátu ve sportu a obecný vhled do zátěžových vyšetření. Součástí teoretické části je i shrnutí analytických vlastností a postupů pro porovnávání laboratorních metod. Tyto postupy jsou následně využity v praktické části této bakalářské práce, která se zabývá vyhodnocením výsledků získaných při experimentu v podobě zátěžového vyšetření. Výstupem této práce je porovnání výsledků z POCT analyzátoru laktátu Biosen C-Line firmy EKF Diagnostics a dvou osobních laktátometrů Lactate Scout 4 firmy EKF Diagnostics a Lactate Plus firmy Nova Biomedical s referenční metodou a vliv těchto zjištění na hodnocení laktátové křivky u vytrvalostního sportovce.

Abstract

Surname and name: Wolfová Zuzana

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Comparison of lactate analyzers and influence on lactate curve evaluation

Consultant: MUDr. Pavel Brož Ph.D.

Number of pages – numbered: 50

Number of pages – unnumbered: 24

Number of appendices: 2

Number of literature items used: 36

Keywords: lactate, lactate curve, lactate analyzer, aerobic threshold, anaerobic threshold

Summary:

This thesis deals with the issue of lactate analysis in sports medicine. It contains theoretical and practical part. In the theoretical part, the metabolism and function of lactate in the human body, the possibilities of lactate analysis in the laboratory together with preanalytical influences and possible interference are discussed. The role of lactate in sports and general insight into incremental testing are also discussed. The theoretical section includes a summary of analytical characteristics and procedures for comparing laboratory methods. These procedures are then used in the practical part of this bachelor thesis, which deals with the evaluation of the results obtained in the graded exercise step test. The output of this thesis is a comparison of the results from the EKF Diagnostics Biosen C-Line POCT lactate analyser and two portable blood lactate analysers, the EKF Diagnostics Lactate Scout 4 and Nova Biomedical Lactate Plus, with a reference method and the effect of these findings on the assessment of the lactate curve in an endurance athlete.

Předmluva

Osobní analyzátory laktátu jsou hojně využívány nejen ve sportovní medicíně, česká literatura se zatím příliš nezabývala hodnocením spolehlivosti těchto přístrojů. Účelem této práce je jejich porovnání a zhodnocení, co z výsledků vyplývá pro praxi.

Poděkování

Děkuji MUDr. Pavlu Brožovi za cenné rady a poskytnutí materiálních podkladů pro psaní této bakalářské práce a za organizaci experimentu pro praktickou část této práce. Děkuji také MUDr. Jitce Brožové a Mgr. Danielu Follprechtovi za pomoc při experimentu, bez kterých by jeho realizace nebyla možná. Dále bych chtěla poděkovat vedení Ústavu sportovní medicíny Lékařské Fakulty Univerzity Karlovy, jmenovitě doc. MUDr. Aleši Kroužeckému, za možnost uskutečnění experimentu právě v těchto prostorách. Děkuji rodině a spolužačkám za neúnavnou podporu. Největší dík patří dobrovolníkovi Alešovi za to, že pro tento experiment doslova potil krev.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	16
TEORETICKÁ ČÁST	17
1 LAKTÁT A METABOLISMUS LAKTÁTU	17
1.1 Vznik laktátu	17
1.1.1 Vstup glukózy do buněk	19
1.2 Utilizace laktátu	19
1.3 Laktátová acidóza	20
2 LABORATORNÍ ANALÝZA LAKTÁTU	24
2.1 Ampérometrické stanovení	24
2.2 Fotometrické stanovení	25
2.3 Vliv preanalytické fáze	26
2.4 Vliv interference	27
2.5 Pot	27
3 VLASTNOSTI A POROVNÁNÍ LABORATORNÍCH METOD.....	28
3.1 Variabilita	28
3.2 Analytické vlastnosti metod.....	28
3.3 Porovnání laboratorních metod stanovujících stejný analyt.....	30
3.3.1 Bodový graf s analýzou regrese dle Passing-Bablocka.....	30
3.3.2 Blandův-Altmanův rozdílový graf	31
4 FYZIOLOGIE SPORTU	32
4.1 Energetika svalové práce	32
4.1.1 Energetické krytí zátěže.....	33
4.2 Úloha laktátu.....	36
4.3 Zátěžová vyšetření	39
PRAKTICKÁ ČÁST	40
5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE	40
5.1 Hlavní cíl.....	40
5.2 Dílčí cíle.....	40
6 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	41
7 METODIKA PRÁCE	42
7.1 Příprava.....	42

7.2	Sledované parametry.....	43
7.3	Průběh experimentu	45
7.4	Analýza laktátu	46
7.4.1	Biosen C-Line firmy EKF Diagnostics	46
7.4.2	Lactate Scout 4	47
7.4.3	Lactate Plus firmy Nova biomedical	47
8	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	49
8.1	Analýza dat získaných během zátěžového vyšetření	49
8.1.1	Grafické porovnání jednotlivých metod s analyzátozem Cobas 8000 dle Passing-Bablocka.....	50
8.1.2	Porovnání jednotlivých metod s analyzátozem Cobas 8000 pomocí rozdílových grafů dle Bland-Altmana	52
8.2	Analýza dat získaných opakovaným měřením	55
8.2.1	Výsledky měření stejného alikvotu vzorku získaného na 6. stupni zátěže:...	55
8.2.2	Výsledky měření stejného alikvotu vzorku získaného na 7. stupni zátěže:...	56
8.2.3	Výsledky měření stejného alikvotu vzorku získaného na 9. stupni zátěže:...	57
8.2.4	Vzájemné porovnání metod pomocí rozdílových grafů dle Bland-Altmana.	58
8.2.5	Stanovení aerobního a anaerobního prahu	59
	DISKUZE	61
	ZÁVĚR.....	65
	SEZNAM LITERATURY	66
	SEZNAM PŘÍLOH	70
	PŘÍLOHY	71

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Porovnání výsledků z analyzátoru Biosen z kapilární krve s daty z analyzátoru Cobas 8000	50
Graf 2 Porovnání analyzátoru Biosen s analyzátozem Cobas 8000.....	50
Graf 3 Porovnání výsledků z analyzátoru Biosen z kapilární a periferní krve.....	51
Graf 4 Porovnání výsledků z Lactate Plus s analyzátozem Cobas 8000	51
Graf 5 Porovnání výsledků z Lactate Plus a Cobas 8000.....	52
Graf 6 Znázornění rozdílů výsledků analyzátorů Cobas 8000 z periferní krve a Biosen z kapilární krve v celém rozsahu měření	52
Graf 7 Znázornění rozdílů výsledků analyzátorů Cobas 8000 a Biosen v celém rozsahu měření	53
Graf 8 Znázornění rozdílů výsledků analyzátorů Cobas 8000 a Lactate Scout 4 v celém rzsahu měření.....	53
Graf 11 Znázornění rozdílů výsledků analyzátorů Biosen a Lactate Scout 4 na třech hladinách měření.....	58
Graf 12 Znázornění rozdílů výsledků analyzátorů Biosen a Lactate Plus na třech hladinách měření	58
Graf 13 Znázornění rozdílů výsledků analyzátorů Lactate Scout 4 a Lactate Plus na třech hladinách měření.....	59

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma aerobní a anaerobní glykolýzy	17
Obrázek 2 Zapojení energetických systémů v závislosti na čase	35
Obrázek 3 Znárodnění zón intenzity vzhledem k vývoji koncentrace laktátu.....	37
Obrázek 4 Odběr z kanyly	42
Obrázek 5 Zkumavky popsané čísly 1-9 pro odběry po jednotlivých stupních zátěžového testu.....	43
Obrázek 6 Kalibrace analyzátoru Biosen	43
Obrázek 7 Bezkontaktní zařízení pro sledování hodnoty srdeční frekvence z hrudního pásu	44
Obrázek 8 Běžecský pás s nastavitelnou rychlostí a sklonem	45
Obrázek 9 Biosen C-Line	46
Obrázek 10 Odběr z ušního lalůčku do miniaturní kapiláry.....	46
Obrázek 11 Aplikace vzorku na testovací proužek	47
Obrázek 12 Lactate Scout 4.....	47
Obrázek 13 Lactate Plus	48
Obrázek 14 Cobas 8000 firmy Roche.....	48

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Zisk ATP na 1 mol glukózy	18
Tabulka 2 Referenční rozmezí pro laktát	20
Tabulka 3 Způsoby vzniku laktátové acidózy zapříčiněné léky / toxiny	22
Tabulka 4 Souhrn všech naměřených hodnot během zátěžového testu.....	49
Tabulka 5 Vypočtené parametry pro každý stupeň zátěže a průměrný variační koeficient všech metod	49
Tabulka 6 Hodnoty na 6. stupni zátěže.....	55
Tabulka 7 Nejistoty na 6. stupni zátěže	56
Tabulka 8 Hodnoty na 7. stupni zátěže.....	56
Tabulka 9 Nejistoty na 7. stupni zátěže	56
Tabulka 10 Hodnoty na 9. stupni zátěže.....	57
Tabulka 11 Nejistoty na 9. stupni zátěže	57
Tabulka 12 Průměrné relativní nejistoty jednotlivých analyzátorů.....	57
Tabulka 13 Aerobní (zeleně) a anaerobní (modře) práh testovaného dobrovolníka podle hodnot z jednotlivých analyzátorů.....	60

SEZNAM ZKRATEK

ABR	Acidobazická rovnováha
Acetyl-CoA	Acetyl-Koenzym A
ADP	Adenosindifosfát
ANP	Anaerobní práh
AP	Aerobní práh
AST	Aspartátaminotransferáza
ATP	Adenosintrifosfát
BE	Base exces
CK	Kreatinkináza
CNS	Centrální nervová soustava
COHb	Karbonylhemoglobin
CV	Variační koeficient
EKG	Elektrokardiogram
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
GLUT	Glucose transporter isoforms
H	Hearth
IM	Infarkt myokardu
LDH	Laktátdehydrogenáza
LiHep	Lithium-Heparin
LT	Lactate Threshold
M	Muscle
MetHb	Methemoglobin

NAD.....	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NaF.....	Fluorid sodný
pCO ₂	Parciální tlak oxidu uhličitého
pH.....	Potential of hydrogen
Pi	Inorganický fosfát
pO ₂	Parciální tlak kyslíku
POCT	Point of care testing
SD	Směrodatná odchylka
SGLT	Sodium-dependent glucose transporters
TE.....	Total error
UV.....	Ultra violet
u	Uncertainty
VCO ₂	Objem oxidu uhličitého
V _E	Minutová ventilace
VO ₂ (max).....	Maximální spotřeba kyslíku

ÚVOD

Sport je součástí života lidí od nepaměti, avšak profesionální analýza výkonnosti, tréninku i sportovcova zdraví je záležitost stará několik desetiletí. Dnes je využívání technologií sledujících nejrůznější parametry běžné v různé míře napříč celou populací od hobby sportovců po profesionály.

Tato práce se zabývá především sledováním v posledních letech zájem vzbuzujícího parametru, kterým je laktát. Když se řekne laktát či kyselina mléčná, většina lidí si představí bolest svalů při intenzivním pohybu a případně ztuhlost po jeho skončení. U zdravého člověka je to často opravdu jediná situace, kdy tyto nepříjemné pocity způsobené metabolickou acidózou vyvolanou zvýšenou produkcí laktátu mohou nastat. Vznik laktátu však může doprovázet i řadu patologických stavů, jako například anémie, plicní onemocnění, sepse, nádorová onemocnění, intoxikace a další. V klinické praxi je laktát užitečným diagnostickým prvkem.

Tato práce se zabývá fyziologickým hromaděním laktátu díky intenzivní práci svalů na kyslíkový dluh. Poznatků o vztahu produkce laktátu a výkonnosti sportovce využívá sportovní medicína pro hodnocení aktuální kondice sportovce, predikci vývoje formy, sledování rychlosti zotavení po zátěži a doporučení způsobu tréninku. Pro měření koncentrace laktátu v krvi je již na trhu celá škála přístrojů, díky tomu jimi disponují nejen specializované laboratoře ale často i profesionální sportovní týmy.

V této práci je teoreticky rozebrán metabolismus laktátu v organismu a jeho role při patologickém i fyziologickém vzniku laktátové acidózy. Rozebrána je také problematika využití analýzy laktátu ve sportovní medicíně. Teoreticky jsou rovněž popsány principy stanovení laktátu laboratorními metodami. Praktická část se věnuje analýze dat získaných při experimentu třemi analyzátory pro stanovení laktátu, které jsou hojně využívány v laboratořích sportovní medicíny i trenéry výkonnostních sportovců.

TEORETICKÁ ČÁST

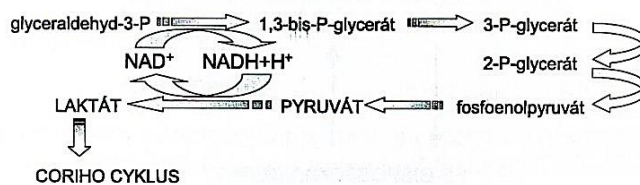
1 LAKTÁT A METABOLISMUS LAKTÁTU

1.1 Vznik laktátu

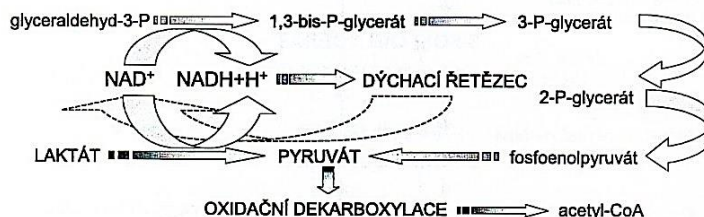
Laktát v lidském organismu vzniká při anaerobní glykolýze, tedy při relativním nebo absolutním nedostatku kyslíku, kdy pyruvát nemůže být oxidačně dekarboxylován na Acetyl-CoA a zpracován v citrátovém cyklu (za vzniku 3 molekul NADH a 1 molekuly FADH, které jsou následně využity v dýchacím řetězci pro vznik energie ve formě ATP) (Murray, a další, 2012). Kumulace NADH vzniklého glykolýzou inhibuje vstup pyruvátu do Krebsova cyklu a glykolýzu (Holeček, 2006). Namísto toho je pyruvát redukován na laktát pomocí enzymu laktátdehydrogenázy, přesněji vzniká kyselina mléčná, která je ale při fyziologickém pH nestabilní a ihned disociuje na H^+ a sůl kyseliny mléčné – laktát (Bielik, 2014). Tato reakce je reverzibilní. Zároveň dochází k reoxidaci koenzymu $NADH+H^+$ na NAD^+ , který je nutný pro zachování průběhu glykolýzy (konkrétně je potřebný pro oxidaci glyceraldehyd-3-fosfátu na 1,3-bisfosfoglycerát katalyzovanou enzymem glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, který je NAD-dependentní) i za nepřítomnosti kyslíku (viz. Obrázek 1). Energetická výtěžnost anaerobního zpracování glukózy je oproti aerobnímu výrazně nižší (viz. Tabulka 1) (Murray, a další, 2012). Po skončení anaerobního stavu je však další energie získána oxidativním metabolismem laktátu (Máček, 2011).

Obrázek 1 Schéma aerobní a anaerobní glykolýzy

1. ZA ANAEROBNÍCH PODMÍNEK



2. ZA AEROBNÍCH PODMÍNEK



Zdroj: (Štern, 2011)

Tabulka 1 Zisk ATP na 1 mol glukózy

	Aerobní cesta	Anaerobní cesta
Glykolýza	7 ATP	2 ATP
Citrátový cyklus	25 ATP	
Celkem	32 ATP	2 ATP

Zdroj: Převzato od (Murray, a další, 2012)

Rovnice shrnující glykolýzu (Ledvina, a další, 2009):



Enzym laktát dehydrogenáza je tetramer vyskytující se ve všech tkáních. Tkáňová specifita je dána kombinací exprese genů H a M v konkrétní tkáni. Skládá se ze dvou typů podjednotek; H (heart) a M (muscle) a vyskytuje se v 5 izoformách; I1 (HHHH, převažuje v srdeční tkáni), I2 (HHHM), I3 (HHMM), I4 (HMMM), I5 (MMMM, převažuje v jaterní tkáni). Jednotlivé izoenzymy LDH lze separovat pomocí elektroforézy a následně vyhodnotit profil jejich zastoupení v séru, což může pomoci v diferenciální diagnostice onemocnění orgánů se specifickou expresí izofrmy LDH (např. vyšší zastoupení izofrmy I5 při onemocnění jater, vyšší zastoupení izofrmy I1 svědčící pro IM) (Murray, a další, 2012). Aktivita LDH (spolu s dalšími enzymy jako například CK, AST) v séru stoupá také po zátěži v důsledku vyplavování bílkovin ze svalů (Racek, a další, 2021).

Glykolýza probíhá v cytosolu všech buněk, vzniklý pyruvát je za aerobních podmínek protonovým symportem přenesen do mitochondrie, kde je oxidativně dekarboxylován na acetyl-CoA, následně zde probíhá citrátový cyklus i dýchací řetězec. Buňky postrádající mitochondrie (např. erytrocyty) metabolizují glukózu jen anaerobní cestou (Murray, a další, 2012) (Racek, a další, 2021). Pro slabě vaskularizované tkáně jako jsou např. enterocyty, buňky dřeně ledvin, sítnice a kůže je rovněž dominantní cestou tvorby energie metabolizace pyruvátu jeho redukcí na laktát (Abali, a další, 2022). Stejně tak CNS je producentem laktátu v klidu, také jej může využít jako substrát pro glukoneogenezi (Racek, a další, 2021).

V některých případech může docházet k tvorbě laktátu i za dostatku kyslíku, a to například při inhibici metabolismu pyruvátu (ionty rtuti a arsenu inhibují

pyruvátdehydrogenázu) nebo při dědičném defektu enzymu pyruvátdehydrogenázy. K nadměrné tvorbě laktátu dochází také při septických stavech a nádorové kachexii (Murray, a další, 2012).

1.1.1 Vstup glukózy do buněk

Glukóza má polární charakter, její vstup do buněk je zprostředkován bílkovinnými přenašeči – GLUT transportéry (glucose transporter isoforms), jedná se o usnadněnou difuzi po koncentračním spádu (Paulová, 2021). Jednotlivé izoformy glukózového transportéru jsou tkáňově specifické. GLUT1 zodpovídá za transport glukózy do erytrocytů a do mozku (v mozku se nachází i GLUT3) a není závislý na insulinu. GLUT2 se nachází v játrech a o přenosu glukózy do jaterní buňky rozhoduje poměr koncentrace glukózy vně a uvnitř buňky, na insulinu je rovněž nezávislý. Přenos glukózy do svalů (kosterních, hladkých i srdečního) a tukových buněk zprostředkovává GLUT4, který je na insulinu závislý (Ledvina, a další, 2009).

V tenkém střevě je glukóza vzniklá štěpením disacharidů z potravy pomocí enzymů disacharidáz lokalizovaných v kartáčovém lemu střevního epitelu transportována do enterocytů symportem s Na^+ (Ledvina, a další, 2009) (Paulová, 2021). Jedná se o aktivní transport zprostředkovaný SGLT transportéry (sodium-dependent glucose transporters), které pomocí Na^+K^+ ATP-ázy tvoří koncentrační gradient sodíku mezi extracelulárním a intracelulárním prostředím. Díky tomu může transport probíhat i proti koncentračnímu spádu. SGLT se nachází ve tkáních, kde je potřeba dosáhnout téměř nulové koncentrace glukózy; ve střevním lumen (SGLT1) a proximálních tubulech ledvin (SGLT1, SGLT2) (Holeček, 2006).

1.2 Užití laktátu

Laktát vznikající při anaerobní glykolýze v kosterním svalu, případně jiné hypoxické tkáni, je krví transportován do orgánů umožňujících jeho užití (především játra, ale i ledviny, tenké střevo a myokard). Zde dochází k oxidaci laktátu zpět na pyruvát pomocí enzymu laktátdehydrogenázy. Jak již bylo zmíněno výše, tato reakce je reverzibilní a směr jejího průběhu záleží na relativních intracelulárních koncentracích laktátu a pyruvátu a na poměru NADH/NAD^+ (tento poměr je vyšší v pracujícím svalu než v játrech a srdci). V srdečním svalu je jediná cesta metabolizace pyruvátu jeho přeměna na Acetyl-CoA a oxidace v citrátovém cyklu (Abali, a další, 2022). V játrech (a v menší míře i v ledvinách a tenkém střevě) je pyruvát přeměněn glukoneogenezí na glukóza-6-fosfát, který může být v játrech využit k syntéze glykogenu (je-li v organismu dostatek energie), nebo je přeměněn

na glukózu za pomoci specifické glukóza-6-fosfatázy. Tento enzym se nachází pouze v játrech, ledvinách a střevním endotelu (Holeček, 2006). Vzniklá glukóza je krví dopravena do tkání a využita pro tvorbu energie. Tento proces utilizace laktátu se nazývá Coriho (laktátový) cyklus (Štern, 2011).

Tento cyklus také umožňuje využít glukózu vzniklou ze svalového glykogenu v jiných tkáních (především CNS). Ve svalech není přítomen enzym glukóza-6-fosfatáza a nemohou uvolňovat glukózu do krve. Vzniklý laktát však uvolnit do krve lze a v játrech je využit pro tvorbu glukózy, která následně může být distribuována pro potřeby celého organismu (Holeček, 2006).

Zvýšené nároky tohoto procesu na kyslík nazýváme kyslíkový dluh po zátěži (Murray, a další, 2012). Práci na kyslíkový dluh lze vykonávat pouze po omezenou dobu, která závisí mj. na trénovanosti jedince. Hromadění laktátu uvnitř buněk a jeho následný přesun do krve způsobí acidózu projevující se únavou a bolestí svalů (Paulová, 2021). Za fyziologických podmínek by játra měla zvýšenou koncentraci laktátu v krvi normalizovat do 1-2 hodin po skončení intenzivní svalové práce (Racek, a další, 2021).

Tabulka 2 Referenční rozmezí pro laktát

	Fyziologicky – arteriální a kapilární krev	Fyziologicky – venózní a smíšená krev	Hyperlaktatémie	Těžká hyperlaktatémie
c laktátu (mmol/l)	0,5-1,8	<2,2	2-5	>5

Zdroj: Převzato od (Racek, a další, 2021)

1.3 Laktátová acidóza

Laktátová acidóza je typ metabolické acidózy, která je charakterizována vychýlením pH mimo referenční rozmezí (7,36-7,44) a snížením pod hodnotu 7,22, sníženou hodnotou BE (Base Exces) pod -18 mmol/l, snížením koncentrace HCO_3^- a jako důsledek kompenzace metabolické acidózy hyperventilací později i poklesem pCO_2 (Racek, a další, 2021). Laktátová acidóza jako taková je definována současně zvýšenou koncentrací laktátu nad 5,0 mmol/l a acidémií ($\text{pH} < 7,35$) (Jabor, 2008). Nastává při anaerobní glykolýze, kdy množství vznikajícího laktátu přesahuje kapacitu Coriho cyklu (schopnost jater

metabolizovat laktát) a dochází ke zvýšení jeho koncentrace v krvi i tkáních (Štern, 2011). (Racek, a další, 2021) uvádí, že příčinou laktátové acidózy není vznik laktátu jako takového, ale nižší spotřeba vodíkových kationtů v Krebsově cyklu při snížené oxidativní fosforylaci a tedy jejich hromadění způsobující snížení pH.

Dle způsobu vzniku laktátové acidózy ji lze dělit na typ A zapříčiněný hypoxií a na typ B bez hypoxie. Při laktátové acidóze typu A dochází k hypoxii tkání, která může být příčinou laktátové acidózy sama o sobě (při snížení pO_2 ve vdechovaném vzduchu, hypoventilaci, plicních onemocněních, alveolokapilárním bloku) nebo nastává jako důsledek při anémii (z důvodu nedostatečné kapacity pro dopravu kyslíku do tkání), dyshemoglobinemii (zvýšené koncentraci derivátů hemoglobinu, které nejsou schopné přenášet kyslík, jako jsou například COHb při otravě CO nebo MetHb při otravě dusičnany), defektech erytrocytů nebo hemoglobinopatiích, při poškození buněčných enzymových systémů (radiací, teplem, infekcí) či při snížené perfuzi tkání, jejíž příčinou může být například selhání srdce, snížení krevního objemu, trombóza, šokový stav nebo sepse (Racek, a další, 2021) (Jabor, 2008).

Laktátová acidóza typu B může být způsobena selháním jater (kdy dochází ke sníženému odbourávání laktátu) nebo některými léky či toxiny (viz. Tabulka 3). V nádorových buňkách je energie získávána převážně cestou anaerobní glykolýzy, z toho důvodu rovněž dochází k vyšší produkci laktátu a případně i k laktátové acidóze u hematologických onemocnění a také u některých solidních nádorů (Racek, a další, 2021). Hyperlaktatémie, potažmo laktátová acidóza, může být způsobena také anaerobní glykolýzou stimulujícím účinkem adrenalinu nebo noradrenalinu při jejich aplikaci či zvýšené produkci (například u feochromocytomu – nádoru chromafinních buněk dřeně nadledvin produkujícího katecholaminy) (Zelinka, a další, 2009), přičemž k laktátové acidóze přispívá i ischemie tkání způsobená vazokonstrikcí navozenou účinkem katecholaminů (Racek, a další, 2021) (Jabor, 2008). Další příčinou laktátové acidózy typu B může být nedostatek thiaminu (vit. B₁) jakožto kofaktoru pyruvátdehydrogenázy u malnutrice a alkoholismu (Racek, a další, 2021). Laktátovou acidózu typu B nalézáme téměř vždy u diabetu mellitu spolu s diabetickou ketoacidózou a u onemocnění ledvin či renálního selhání doprovázeného poruchou odbourávání laktátu. Může být také způsobena vrozenou poruchou některého z klíčových enzymů (Jabor, 2008).

Tabulka 3 Způsoby vzniku laktátové acidózy zapříčiněné léky / toxiny

Lék / toxin:	Způsob ovlivnění metabolismu laktátu:
Alkoholy (methanol, ethylenglykol) Salicyláty Propofol (anestetikum) Kyanidy	Inhibice oxidativní fosforylace
Metformin (perorální antidiabetikum)	Inhibice komplexu I mitochondriálního respiračního řetězce, inhibice jaterní glukoneogeneze (odbourávání laktátu)
Kokain Adrenalin Salbutamol Terbutalin (β₂-agonisté)	Stimulace anaerobní glykolýzy

Zdroj: Převzato od (Racek, a další, 2021)

S kombinací laktátové acidózy typu A i B se můžeme setkat u septických stavů, kdy dochází k hypoxii tkání vlivem nedostatečné perfuze při hypotenzi, zároveň se díky multiorgánovému selhání snižuje schopnost jater a ledvin metabolizovat laktát. Adrenalin podmiňuje zvýšení nároků na činnost sodíkové pumpy (Jabor, 2008), a způsobuje tak zvýšení glykolýzy a vyšší produkci pyruvátu a laktátu. Bývá snižená aktivita pyruvátdehydrogenázy. Vliv má i laktát ze svalů produkovaný při sepsi (Racek, a další, 2021).

V krvi se většina laktátu vyskytuje v L-formě. Fyziologicky se v lidském těle může nacházet i D-laktát ve velmi nízkých koncentracích (5-20 μmol/l) jakožto produkt střevních bakterií (konvertují glukózu na D-laktát přes reaktivní meziprodukt metylglyoxal). D-laktát je odbouráván jen omezeně, proto může poměrně snadno vzniknout D-laktátová acidóza (c D-laktátu > 3 mmol/l). Jelikož se D-laktát na rozdíl od L-laktátu rutinně nestanovuje, diagnostika je založena na klinických příznacích (neurologická dysfunkce, encefalopatie),

přítomnosti acidémie a zvýšení anion gap bez jiné zjištěné příčiny. D-laktátová acidóza nastává u syndromu krátkého střeva, kdy dochází k malabsorpci sacharidů a přemnožení bakterií produkujících D-laktát, který se následně vstřebává do krve. Často nacházíme D-laktátovou acidózu doprovázející diabetickou ketoacidózu (Racek, a další, 2021) (Jabor, 2008).

Jak již bylo zmíněno výše, laktátovou acidózu si lze přivodit i fyziologicky intenzivní prací svalů na kyslíkový dluh. Kromě zvýšené tvorby laktátu je vznikající acidóza potencionována oxidem uhličitým uvolňovaným bikarbonátovým pufrovací systémem z H_2CO_3 . Snižující se pH vede ke stimulaci inspirační oblasti dechového centra prodloužené míchy. Výsledkem kompenzačních mechanismů je zvýšená ventilace. Zároveň se projevuje svalová únava způsobená okyselením sarkoplazmy, kdy zvýšená koncentrace H^+ iontů snižuje svalovou kontrakci (Kittnar, 2020) (Pastucha, 2014).

2 LABORATORNÍ ANALÝZA LAKTÁTU

Při stanovení koncentrace laktátu v krvi lze využít specifických enzymů katalyzujících reakce, jejichž produkty dokážeme měřit. Nejčastěji se setkáme s laktátdehydrogenázou katalyzující přeměnu laktátu na pyruvát za vzniku NADH+H⁺ nebo laktát oxidázou, která katalyzuje reakci, při které vzniká kromě pyruvátu také pro detekci dobře využitelný peroxid vodíku.

2.1 Ampérometrické stanovení

Ampérometrie je elektrochemická metoda založená na principu detekce změn proudu mezi dvěma elektrodami s konstantním potenciálem (napětím) způsobených změnami v reakční směsi (Králová, 2001). Ampérometrie se vždy skládá z měrné elektrody (polarizovatelná platinová anoda) a z referenční elektrody (argentochloridová katoda tvořena Ag tyčinkou pokrytou vrstvou AgCl). Protékající proud je měřen galvanometrem (Prokop, 2022).

Pro ampérometrickou analýzu laktátu se používají enzymové elektrody s imobilizovaným enzymem na povrchu, případně s membránou. Jako imobilizovaný enzym se nejčastěji využívá laktát oxidáza, laktátdehydrogenáza, laktátmonooxygenáza a flavocytochrom b₂ (Králová, 2001).

Při nejpoužívanějším uspořádání s laktát oxidázou navázanou na membráně je za přítomnosti kyslíku laktát oxidován a vznikající peroxid vodíku je oxidován na anodě: $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}^+ + 2\text{e}^-$, přičemž při této reakci vznikající kyslík je znovu využit při oxidaci laktátu. Na katodě dochází k redukci Ag⁺ na stříbro: $2\text{Ag}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{Ag}$ (Prokop, 2022). Výhodou tohoto uspořádání je pevná vazba kofaktoru FAD na laktát oxidázu, není třeba jej koimobilizovat či přidávat zvlášť. Naproti tomu při použití metody s imobilizovanou laktátdehydrogenázou, jejíž kofaktor NAD není na apoenzym vázán dostatečně pevně (purifikací dochází k rozpojení vazby), je potřeba koenzym do reakčního pufru dodat, u novějších uspořádání této metody je možná koimobilizace NAD na elektrodu (Králová, 2001).

Způsobů měření je několik; při použití uhlíkové elektrody s imobilizovanou laktátdehydrogenázou je redukováná forma NADH reoxidována za vzniku proudu odpovídajícího koncentraci analytu, lze ale také některými chemikáliemi (např.: fenzazinethosulfát, fenzazinmethosulfát, mendolová modř, vše za přítomnosti diaforázy) docílit vzniku peroxidu vodíku, který lze měřit obdobně jako u předchozí metody (Králová, 2001).

Enzym flavocytochrom b_2 není závislý na NAD a zprostředkovává reakci předání elektronů ze substrátu na akceptor. Proud vzniká následnou reoxidací akceptoru na platinové elektrodě a je přímo úměrný množství substrátu. Akceptorem elektronů vratnou reakcí může být například hexakynoželezitan, který je přeměněn na hexakynoželeznatan. Enzym laktátmonooxygenáza oxidativně dekarboxyluje laktát a dává tak vzniknout acetátu. Uspořádání metody tkví v imobilizaci laktátmonooxygenázy na nylonové síťce či acetátcelulóznové membráně (Králová, 2001).

Enzymové elektrody můžeme označit za elektrochemické biosenzory. Biosenzor je typ chemického senzoru skládající se z bioreceptoru (biologického indikačního prvku), kterým je v případě enzymových elektrod enzymatická reakce probíhající na membráně se zakotveným enzymem a z fyzikálně-chemického převodníku, který v tomto případě představuje ampérometrická detekce (Dastych, 2007) (Prokop, 2017/2018).

Ampérometrické stanovení laktátu bývá součástí POCT analyzátorů krevních plynů, nejběžněji využívaná je metoda s imobilizovanou laktátdehydrogeázou na povrchu elektrody. Na odděleních jsou časté například přístroje GEM s kazetovým systémem (Racek, a další, 2021). Na principu biosenzorů pracují i malé laktátometry. Testovací proužky v podstatě představují enzymatické elektrody na jedno použití (Prokop, 2017/2018).

Mezi výhody ampérometrického stanovení patří možnost využití plné krve, jelikož tato metoda nevyužívá optické vlastnosti vzorku. Výhodou malých osobních laktátometrů je potřeba minimálního množství krve (v řádech μl) (Prokop, 2017/2018).

2.2 Fotometrické stanovení

Nejčastěji se při fotometrickém stanovení laktátu využívá reakce katalyzovaná laktátdehydrogenázou, při které vzniká pyruvát a zároveň dochází k redukci NAD^+ na NADH. Využívá se zde jevu rozdílných absorpčních spekter v UV oblasti mezi redukovanou a oxidovanou formou koenzymu, v tomto případě dochází k nárůstu absorbance (tzv. Warburgův optický test) (Králová, 2001).

Měření je prováděno bichromaticky při 340 a 383 nm a zvýšení absorbance je úměrné koncentraci laktátu ve vzorku. Tuto metodu lze provést jako kinetickou i end-point (Štern, 2011). Dvoubodová kinetická varianta této metody je lineární pouze do hodnot 5 mmol/l laktátu v krvi, při vyšších hodnotách musí být vzorek ředěn. Vznikající NADH lze detekovat také fluorimetricky při 450 nm (Jabor, 2008). Další možností detekce množství vzniklého

NADH je jeho oxidace tetrazoliovou solí a fenazinmethosulfátem v přítomnosti diaforázy zpět na NAD⁺ za vzniku barevného produktu formazanu, jehož absorbanci měříme již ve viditelné oblasti a je rovněž úměrná koncentraci analytu ve vzorku (Králová, 2001).

Dalším způsobem stanovení laktátu je jeho oxidace vzdušným kyslíkem katalyzovaná laktát oxidázou za vzniku pyruvátu a peroxidu vodíku. V následující reakci katalyzované peroxidázou reaguje peroxid vodíku s 4-aminoantipyrinem a 1,7-dihydroxynaftalenem (Jabor, 2008) nebo THB (2,4,6-tribrom-3-hydroxybenzoovou kyselinou) (Štern, 2011) za vzniku červeného chinonmonoiminového barviva (tzv. Trinderova reakce). Intenzita zabarvení měřená fotometricky při 540 nm nebo 522 nm je přímo úměrná koncentraci laktátu (Jabor, 2008). Měření je formou end-point (Štern, 2011).

Spektrofotometrická metoda stanovení je často využívána velkými automatickými laboratorními analyzátory (například firmy Beckman Coulter, Roche). V této práci jsme provedli měření konkrétně na analyzátoru Cobas 8000 firmy Roche využívající pro stanovení laktátu z nesrážlivé krve enzymovou metodu s laktát oxidázou a peroxidázou následovanou Trinderovou reakcí se spektrofotometrickou detekcí (Bernášková, 2022).

2.3 Vliv preanalytické fáze

Pokud je laktát stanovován spolu s parametry ABR na analyzátoru krevních plynů, je potřeba dodržovat preanalytické postupy specifické pro tuto metodu, tedy anaerobní odběr arteriální, či arterializované krve do odběrové stříkačky s pístem nebo skleněné kapiláry s protisrážlivým činidlem na bázi heparinu. Není potřeba stabilizační činidlo, jelikož stanovení probíhá brzy po odběru. Je nutné zamezit vzniku bublin, které by mohly ovlivnit výsledek stanovení parciálních tlaků krevních plynů. Krev je po odběru potřeba promíchat s protisrážlivým činidlem (za pomoci kovového drátku uvnitř kapiláry a magnetu). Transport by měl být co nejrychlejší, především s ohledem na stanovení krevních plynů (ideální je stanovení pO₂ během prvních 15 minut po odběru, pH a pCO₂ do 30 minut po odběru), vzorek by měl být po celou dobu transportu ve vodorovné poloze a umístěn na tajícím ledu (Racek, a další, 2021) (Bernášková, 2022).

Stanovení na biochemických analyzátoch je obdobné jako stanovení glukózy. Žilní krev musí být odebrána do zkumavky obsahující protisrážlivé činidlo a fluorid sodný jakožto inhibitor glykolýzy zajišťující stabilitu vzorku po následujících 24 hodin. Případně je možné krev okyselit citrátovým pufrem, který způsobí okamžité zastavení glykolýzy, na rozdíl

od NaF, který inhibuje enolázu uplatňující se až ke konci glykolýzy (Racek, a další, 2021) (Bernášková, 2022).

Odběr venózní krve (nejčastěji z loketní žíly) by měl probíhat v sedě, stažení paže by nemělo být zbytečně dlouhé a měli bychom se vyhnout „cvičení“. Mohlo by dojít k anaerobnímu metabolismu vlivem zaškrcení a k lokální acidóze, hodnota laktátu (ale i draslíku nebo aktivita CK) se může zvýšit až o 20 % (Racek, a další, 2021).

2.4 Vliv interference

U otravy ethylenglykolem můžeme naměřit falešně zvýšené hodnoty laktátu. Důvodem je interferující glykolát, který je jedním z produktů vznikajících metabolickou přeměnou ethylenglykolu v organismu. K této interferenci dochází u metod s laktát oxidázou u POCT analyzátorů krevních plynů. Při porovnání výsledků s biochemickým analyzátozem využívajícím jinou metodu měření lze interferenci využít pro diagnostiku otravy ethylenglykolem, kdy významný rozdíl v naměřených hodnotách laktátu (tzv. lactate gap) svědčí právě pro vznik intoxikace (Racek, a další, 2021) (Racek, a další, 2017).

2.5 Pot

V potu lze rovněž stanovit laktát. Pro diagnostiku se využívá pot z ekrinních žláz. Laktát se zde vyskytuje ve vyšších koncentracích než v plazmě, rozpětí hodnot je široké; 14-42 mmol/l (Jabor, 2008). Interpretace však není vždy jednoznačná, hodnota může být ovlivněna fyziologickými i biochemickými faktory, jako jsou například katecholaminy, acetylcholin, pohlaví, věk, fyzická kondice, ale i místo odběru potu nebo vysoká teplota okolního prostředí spolu s fyzickou zátěží způsobující vyšší produkci potu a jeho naředění. Koncentrace laktátu v potu nemusí vždy odrážet hodnotu laktátu v plazmě (Bielik, 2014).

3 VLASTNOSTI A POROVNÁNÍ LABORATORNÍCH METOD

Každé laboratorní měření je zatíženo určitou chybou. K chybě může dojít již v preanalytické fázi například nesprávným odběrem nebo transportem, tyto chyby je potřeba brát v potaz při interpretaci výsledku. Další chyba může vzniknout nezohledněním přirozené variability při interpretaci výsledné hodnoty. Chyby vznikající přímo v laboratoři lze rozdělit na systematické nebo náhodné. V ideálním případě by k žádným těmto chybám docházet nemělo, avšak s určitou mírou nejistoty se setkáváme u každé metody.

3.1 Variabilita

V ideálním případě by interpretace laboratorních výsledků spočívala v porovnání naměřené hodnoty s referenčním rozmezím daného analytu a následné potvrzení či vyvrácení domněnky o momentálním (chorobném) stavu organismu. V populaci se však výsledky zdravých a nemocných jedinců mohou překrývat. Důvodem je biologická variabilita, která je definovaná jako rozptyl hodnot u jednoho pacienta (intraindividuální variabilita) nebo mezi jedinci v populaci (interindividuální variabilita). Intraindividuální variabilita je výrazná zejména u stanovení těch analytů, jejichž koncentrace je v rámci jednoho organismu ovlivněna cirkadiálními rytmy, příjmem potravy nebo fyzickou aktivitou. Interindividuální variabilitu pozorujeme u stanovení analytů, které jsou ovlivněny pohlavím, věkem, rasou, tělesným složením či zdatností (Racek, a další, 2021).

3.2 Analytické vlastnosti metod

Mezi analytické vlastnosti metod patří preciznost a pravdivost. Udávají informaci o míře náhodných a systematických chyb metod a také o celkové chybě, potažmo nejistotě.

Preciznost je definována jako těsnost shody výsledků získaných při měření stejného vzorku danou metodou za určitých podmínek. Je určena variačním koeficientem (CV), jehož hodnotu v procentech získáme podílem směrodatné odchylky (SD) průměrem hodnot a vynásobením 100. Směrodatnou odchylku získáme jako druhou odmocninu z rozptylu opakovaně naměřených hodnot. V ideálním případě by variační koeficient měl být menší než 10 %. Nízká preciznost metody poukazuje na náhodnou chybu. Lze rozeznat různé míry preciznosti. Nejjednodušší míra preciznosti je opakovatelnost, což je míra shody výsledků měření mezi alikvoty provedeného v krátkém časovém odstupu, stejným postupem, na stejném přístroji, stejným personálem, se stejnou šarží reagentů. Pro zjištění míry nepreciznosti dané

metody se v praxi nejvíce používá mezilehlá preciznost, která vypovídá o míře shody mezi sériemi měření. Pro porovnání výsledků mezi laboratořemi lze využít reprodukovatelnost, což je míra preciznosti daná výší shody výsledků měření v různých laboratořích, odlišným personálem a měřicími systémy (Racek, a další, 2021) (Ing. Senf, 2018).

Pravdivost vyjadřuje míru shody výsledků měření s výsledky získanými referenční (nejpravdivější) metodou. Míru nepravdivosti vyjadřuje bias (velikost odchylky od „skutečné hodnoty“) a poukazuje na velikost systematické chyby měření. Hodnota bias je získávána opakovaným měřením vzorků o známé koncentraci (minimálně 10krát, za dodržení podmínek opakovatelnosti) a následně je od průměru získaných hodnot odečtena skutečná koncentrace (target value) získaná referenční metodou. Bias vychází kladné i záporné značící pozitivní či negativní systematickou chybu. Pro získání hodnoty bias v procentech je výsledek vydělen hodnotou skutečné koncentrace a vynásoben 100. Bias může být i náhodná způsobená interferencí nebo nedostatečnou analytickou specifitou metody a lze ji zjistit porovnáním výsledků měření stejného vzorku vícero metodami (Racek, a další, 2021).

Přesnost je kombinace preciznosti a pravdivosti a matematicky je vyjádřena celkovou chybou měření TE (total error). Představuje součet náhodné a systematické chyby a je definována jako rozdíl mezi naměřenou a referenční hodnotou dané veličiny. Určuje se pro 95% interval spolehlivosti (v extrémně nízkých nebo naopak vysokých koncentracích může být přesnost metody nižší). Výpočet celkové chyby zahrnuje proměnnou náhodné chyby (CV nebo SD) i systematické chyby (bias) a statistický násobek (z), který má pro 95% konfidenční interval hodnotu 1,96, pro 90% konfidenční interval hodnotu 1,645 (Friedecký, a další, 2019) (Racek, a další, 2021).

Výpočet vypadá následovně: $TE = z \cdot SD + |\text{bias}|$

Pro získání výsledku v procentech: $TE = z \cdot CV + |\text{bias}|$

Další analytickou vlastností metod je nejistota měření (u – uncertainty), jejíž velikost je dána intervalem obklopujícím skutečnou hodnotu, ve kterém se s určitou pravděpodobností výsledek nachází. Nejistota doprovází každý laboratorní výsledek a zahrnuje mnoho složek; kromě nepřeciznosti a bias také nejistotu v preanalytické a postanalytické fázi, biologickou variabilitu a nejistotu kalibrátoru, tedy faktory, které nejsou statisticky dobře uchopitelné a proto se v praxi často jedná spíše o optimistický odhad nejistot založený na preciznosti a bias (Friedecký, a další, 2019) (Racek, a další, 2021).

Standardní nejistota (u) udává nejistoty jednotlivých složek formou směrodatné odchylky nebo variačního koeficientu. Kombinovaná standardní nejistota (u_c) zahrnuje významné standardní nejistoty (mezilehlou preciznost, bias, případně nejistotu kalibrátoru). Hodnotu vypočítáme odmocněním součtu čtverců směrodatné odchylky a bias, případně variačního koeficientu a bias v procetech. Nejčastěji používané vyjádření nejistoty metody rozšířenou kombinovanou standardní nejistotu (U_c) získáme vynásobením u_c koeficientem rozšíření pro daný interval spolehlivosti (Ing. Senf, 2018). V praxi nejvyužívanější koeficient rozšíření pro 95% interval spolehlivosti odpovídá hodnotě 2. Pokud nemáme údaj o mezilehlé preciznosti a velikosti bias, kombinovaná nejistota se rovná standardní nejistotě (Friedecký, a další, 2019).

Hodnota nejistoty je udávána v jednotkách měření daného analytu (absolutní nejistota), nebo v procetech (relativní nejistota). Při interpretaci výsledků je potřeba velikost nejistoty brát v potaz, především nachází-li se výsledek například v blízkosti cut-off hodnoty či rozhodovací meze (Bartoš, a další, 2014).

Hodnota nejistoty může kolísat v průběhu rozsahu měření. Z toho důvodu je doporučováno provést výpočet velikosti nejistoty minimálně na třech hladinách, ideálně v klinicky významných oblastech (nízká, střední a vysoká hodnota). Pro získání průměrné hodnoty nejistoty pro celý rozsah měření musíme znát mezilehlou preciznost. Variační koeficienty jednotlivých sérií měření vzorků odpovídají relativním nejistotám. Následnou početní úpravou odmocněním sumy čtverců CV pro jednotlivé hladiny výsledků vydělené počtem měřených hladin získáme průměrnou hodnotu nejistoty, potažmo variačního koeficientu pro celý rozsah metody (Bartoš, a další, 2014).

3.3 Porovnání laboratorních metod stanovujících stejný analyt

K číselnému porovnání laboratorních metod je potřeba změřit dostatečně velký soubor vzorků oběma metodami. Koncentrace analytu v testovaných vzorcích by měly být na více hladinách (nízká, normální a vysoká koncentrace) pro lepší vypovídající hodnotu srovnání. Cílem je porovnání náhodných i systematických chyb metod. K vyhodnocení výsledků lze využít následující typy grafů (Racek, a další, 2021).

3.3.1 Bodový graf s analýzou regrese dle Passing-Bablocka

Hodnoty získané původní (referenční) metodou jsou vyneseny na osu x a hodnoty získané srovnávanou metodou na osu y. Rozptylem hodnot identifikujeme náhodnou chybu, případné odlehlé hodnoty musíme zhodnotit zvlášť (zda byly zapříčiněny chybou,

interferencí). Hodnotíme regresní přímku shody obou metod, která by v ideálním případě měla mít sklon 45° . Odklon od tohoto úhlu poukazuje na proporcionální systematickou chybu (velikost chyby se mění s rostoucí koncentrací). Posun na ose y směrem ke kladným či záporným hodnotám dává informaci o vzniku konstantní systematické chyby (chyba o stejné velikosti v celém rozsahu koncentrací) (Racek, a další, 2021).

Z regresní rovnice lze vyčíst intercept charakterizující konstantní část systematické chyby, který by se pro 95% interval spolehlivosti neměl významně lišit od nuly a směrnici charakterizující proporcionální část systematické chyby, která by se pro 95% interval spolehlivosti neměla příliš vzdalovat od jedničky (Ing. Senf, 2018). Mírou lineární závislosti výsledků je korelační koeficient, který by se v ideálním případě měl blížit 1 nebo -1 (Dohnal, 2008).

3.3.2 Blandův-Altmanův rozdílový graf

Jedná se o grafické znázornění závislosti rozdílu výsledků jednotlivých metod na jejich průměru. Na osu x vyneseme průměr naměřených hodnot oběma metodami a na osu y rozdíl těchto hodnot (pro každý pár měření). Na první pohled je z grafu patrný rozptyl hodnot odrážející velikost náhodné chyby. Systematickou chybu můžeme pozorovat jako různé rozložení hodnot v různých koncentracích rozsahu metody. V ideálním případě by se průměr rozdílů měl blížit nule (nula na ose y představuje přímku shody) a měl by ležet uvnitř 95% intervalu spolehlivosti průměru rozdílů ($\pm 1,96$ SD) (Ing. Senf, 2018) (Racek, a další, 2021) (Plzák, 2012).

Pokud je střední hodnota rozdílů významně odlišná od nuly a nenachází-li se nula ani v intervalu spolehlivosti, jedná se o statisticky významný rozdíl. Pro lepší znázornění mohou sloužit krabicové grafy sestavené z hodnot naměřených jednotlivými metodami. Statisticky významný rozdíl nemusí vždy znamenat i klinicky významný rozdíl (Dohnal, 2008).

4 FYZIOLOGIE SPORTU

4.1 Energetika svalové práce

Základní nosič energie ATP je potřebný pro vzájemný pohyb aktinových a myozinových filament, přičemž dochází k jeho hydrolýze na ADP. Jelikož aktinomyozinový komplex vykazuje v přítomnosti Mg^{2+} ATP-ázovou aktivitu, může být za katalýzy tohoto komplexu ATP navázané na myozinu hydrolyticky rozštěpeno za vzniku ADP a fosfátu. To vede ke změně konformace myozinu, vzájemnému posunu aktinových a myozinových filament, tedy ke zkrácení sarkomery o přibližně 10 nm a v konečném důsledku ke svalové kontrakci (Holeček, 2006). Dále je ATP spotřebováváno na udržení potřebných potenciálů na membráně pomocí Na^+/K^+ ATPázy a na transport Ca^{2+} iontů kalciovou pumpou (antiportem s Mg^{2+}) ze sarkoplazmy do sarkoplazmatického retikula a do extracelulární matrix (Kittnar, 2020).

Zásoba ATP vystačí na první 1-2 sekundy svalové kontrakce. K udržení svalové kontrakce je potřeba ADP refosforylovat za pomoci různých zdrojů energie. V následujících 10 sekundách je využita energie z fosfátové makroergní vazby kreatinfosfátu za vzniku ATP a kreatinu. Následně je jako zdroj energie štěpena glukóza ze svalového glykogenu, která je použita pro obnovu kreatinfosfátu a pro tvorbu ATP (Kittnar, 2020). Díky kreatinkináze je udržována rovnováha koncentrací ATP a kreatinfosfátu (Holeček, 2006).

Glykolýza může probíhat i za neadekvátní oxygenace svalové tkáně za vzniku pyruvátu a kyseliny mléčné. Vlivem hromadění laktátu dochází k acidifikaci sarkoplazmy. Laktát difunduje do krevního oběhu a je dopraven do orgánů umožňujících jeho utilizaci, zároveň je snižující se pH vyrovnáváno buněčnými nárazníkovými systémy. Při překročení této kapacity dojde k acidóze, kdy nadbytek H^+ iontů kompetuje s Ca^{2+} a dojde tak ke zhoršení funkce kalciové pumpy, snížení vazby Ca^{2+} na troponin a tedy i narušení tvorby aktinomyozinových komplexů. V konečném důsledku dochází ke snížení svalové kontrakce (Kittnar, 2020).

Po skončení anaerobní zátěže je laktát nahromaděný ve svalech oxidativně metabolizován a zároveň dochází k obnově ATP a kreatinfosfátu. Tyto děje vyžadují dostatek kyslíku, jehož množství odpovídá takovému objemu O_2 , který by byl spotřebován, kdyby byla energie od začátku výkonu tvořena oxidativním způsobem. Tento objem kyslíku, který je potřeba po zátěži dodat navíc ke klidové spotřebě kyslíku, se nazývá kyslíkový dluh (Kittnar,

2020) (Máček, 2011). (Kittnar, 2020) uvádí: „Celkové množství dodatečného O₂ tak úměrně závisí na energii, o kterou byla během zátěže překročena aerobní kapacita svalu.“ Velikost kyslíkového deficitu je závislá na intenzitě a délce trvání anaerobního výkonu. Je pozorována také interindividuální variabilita, kdy důležitými proměnnými jsou trénovanost a věk. Nižší kyslíkový dluh vzniká u osob nižšího věku a vyšší tělesné zdatnosti (Máček, 2011).

4.1.1 Energetické krytí zátěže

V iniciační fázi svalové práce jsou využity tři základní systémy zisku energie, nastupují postupně a doplňují se. Poměrné zastoupení jednotlivých systémů a časové rozložení závisí na intenzitě a trvání zátěže. Samotná iniciační fáze trvá několik málo minut, konkrétně přibližně 2 minuty při nízké intenzitě zatížení a 3 minuty při střední intenzitě. Následně se při zachování nízké či střední intenzity organismus dostává do stavu, který bychom mohli považovat za rovnovážný (Máček, 2011).

Nejprve nastupuje anaerobní fosfátový systém, kdy je energie pro počáteční svalovou kontrakci získávána štěpením vysokoenergetických fosfátových vazeb ATP a kreatinofosfátu. Jak již bylo zmíněno výše, tento systém může poskytovat energii jen po velmi omezenou dobu, asi 10-15 sekund. Při získávání energie tímto systémem již může vznikat malé množství laktátu. Obnova tohoto energetického systému je poměrně rychlá; v řádu jednotek minut, s trénovaností doba potřebná pro resyntézu klesá (Pastucha, 2014).

Spolu s fosfátovým systémem nastupuje od prvních vteřin svalového zatížení i anaerobní glykolytický laktátový systém, který získává energii z glukózy a glykogenu za vzniku laktátu. Tento systém je schopný energeticky pokrýt prvních 45-120 sekund svalové zátěže v závislosti na intenzitě. Obnova tohoto systému je delší; trvá 1-2 hodiny, přičemž může být až dvojnásobně urychlena díky tzv. aktivnímu zotavení ve formě zachování aktivity nízké intenzity po vysokointenzivní zátěži, kdy při zachování vyššího prokrvení a metabolismu oproti pasivnímu zotavení dochází k rychlejšímu vyplavení a utilizaci laktátu (Máček, 2011) (Pastucha, 2014).

První dva systémy se uplatňují při maximální a submaximální krátkodobé zátěži trvajících zhruba do 2 minut (sprinty a střední tratě, silová výbušnost). K těmto dějům dochází především v rychlých glykolytických vláknech typu IIB (Pastucha, 2014). Pokud pokračuje intenzivní zátěž (60-70% maxima) i nadále, glykolytický systém zůstává v součinnosti s nastupujícím aerobním systémem (Máček, 2011).

Aerobní systém nastupuje pozvolna již od začátku svalové práce a v období kolem 2 minut od počátku zátěže začíná přebírat úlohu hlavního metabolického systému pro tvorbu energie. Následně je tento systém dlouhodobě udržitelný pro aktivity v mírné a střední intenzitě (vytrvalostní aktivity). Energie je získávána oxidativní fosforylací, ději probíhajícími za dostatku kyslíku. Zdrojem energie může být jak glukóza z glykogenu, tak i mastné kyseliny uvolněné z tukových zásob, případně z myocytů, přičemž se za fyziologických podmínek oba zdroje doplňují. Mastné kyseliny jsou jako zdroj energie výhodné, jelikož energie v tukových zásobách je poměrně koncentrovaná a prakticky téměř „neomezená“ a zároveň čerpání energie z tukových zásob pomáhá během výkonu ušetřit svalový glykogen. Méně efektivním zdrojem energie jsou aminokyseliny (Pastucha, 2014) (Máček, 2011).

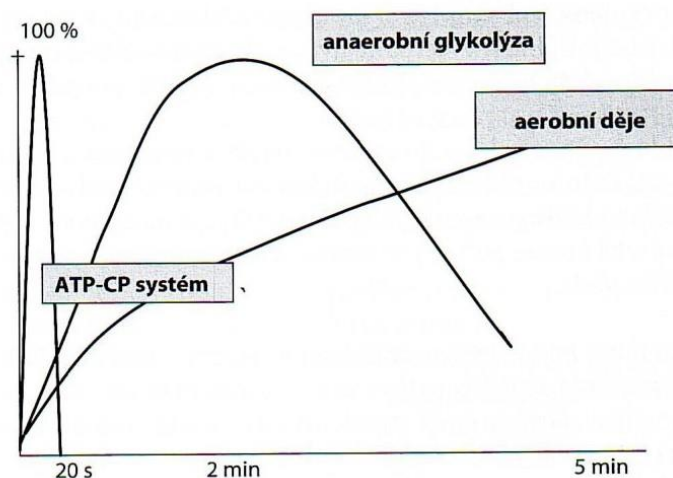
Déletrvající pohybová aktivita klade zvýšené nároky na transportní systém. Během zátěže je potřeba dodávat dostatek kyslíku a energetických substrátů do svalů, a naopak odvádět vzniklé metabolity (např. laktát), aby se oddálil nástup únavy, a teplo, které se tvoří při práci svalů a mohlo by způsobit přehřátí organismu. Vzhledem k zvýšené potřebě kyslíku a vyšší tvorbě oxidu uhličitého ve svalech je při zátěži nutná vyšší výměna dýchacích plynů v plicích. Efektivita aerobního systému je závislá na výkonnosti dýchacího a oběhového systému sportovce, kde nemalou roli hraje adaptace na zátěž (Kittnar, 2020).

Aerobní systém je, co se produkce energie týče, nejpomalejší, zato dlouhodobý. Probíhá v pomalých oxidativních svalových vláknech typu I. Pokud dojde k úplnému vyčerpání svalového glykogenu (k tomu může dojít při dlouhotrvajícím intenzivním zatížení probíhající v řádu hodin), obnova tohoto systému může trvat až 48 hodin (Pastucha, 2014). (Máček, 2011) prezentuje v posledních letech rozvíjející se názor na uplatnění aerobního systému při kratších aktivitách vyšší intenzity (s převahou glykolytického laktátového systému získávání energie), kdy díky vyšší aktivitě laktátdehydrogenázy je možné zároveň oxidovat laktát na pyruvát, umožnit jeho utilizaci a využití pro získání rychlé energie již během výkonu.

Uplatnění jednotlivých systémů v iniciální fázi zátěže do dosažení rovnovážného stavu prezentuje Obrázek 2. Rovnovážný stav je pro potřeby zátěžové fyziologie popisován jako zátěž (mírně či středně intenzivní), při které je převládající část energie získávána oxidativní fosforylací. Nejde o rovnovážný stav v pravém slova smyslu, neboť neustále dochází k malým změnám, které nejsou ale tak výrazné, jako u vysokointenzivní aktivity (Máček,

2011). S trénovaností jedince roste také intenzita, při které dosáhne ustáleného stavu (Pastucha, 2014).

Obrázek 2 Zapojení energetických systémů v závislosti na čase



Zdroj: (Pastucha, 2014)

Hospodaření s energetickými zdroji je řízeno hormonálně. Na počátku svalové práce je aktivován sympatikus a vyplaven adrenalin. Adrenalin způsobí stimulaci glukoneogeneze a glykogenolýzy v játrech zvýšení glykémie, která není následně snížena působením inzulínu, neboť sympatikus působí inhibičně na β -buňky Langerhansových ostrůvků. Naopak α -buňky Langerhansových ostrůvků pankreatu jsou sympatikem stimulovány k produkci glukagonu, což má za následek další uvolňování glukózy do krve. Zároveň působení adrenalinu a zvýšená sekrece glukagonu oproti inzulínu vede ke zvýšení koncentrace volných mastných kyselin v plazmě (Kittnar, 2020).

Volba substrátu pro získávání energie během vytrvalostního výkonu závisí na několika faktorech; momentální zásoba daného substrátu v organismu (dostatek glukózy a glykogenu anebo vyčerpané zásoby glykogenu či lačnění), míra adaptace jedince na pohybovou aktivitu a intenzita a délka trvání zátěže (Máček, 2011).

Vytrvalostní zátěž je charakterizována jako 20-30 minut cyklicky vykonávané aktivity většinou ve střední intenzitě, čím je intenzita vyšší, tím dříve dojde k vyčerpání a ukončení aktivity. Od iniciální fáze svalové práce je glykogen hlavním zdrojem energie, pokračuje-li zátěž nízké a střední intenzity, glykogen se prvních cca 20 minut podílí na energetickém metabolismu zhruba z 50 %, přičemž zbývající část hradí mastné kyseliny. Čím nižší

intenzitou a čím déle zátěž trvá, tím se poměr substrátů pro tvorbu energie mění ve prospěch tuků (Máček, 2011). (Máček, 2011) také uvádí jako hranici převahy glykolýzy nad lipolýzou intenzitu zátěže nad 50 % VO_2 max (maximální spotřeba kyslíku). Tato hranice ale není fixní a může být ovlivněna zejména adaptací na trénink. Zároveň u méně trénovaných jedinců dochází k vyšší produkci laktátu již od iniciální fáze, který ve vyšší koncentraci inhibuje lipolýzu.

4.2 Úloha laktátu

Hodnocení hladiny laktátu během zatížení je přínosné zejména pro výkonnostní sportovce jakožto jeden z ukazatelů výkonnosti, tréninkové intenzity, zotavení a také pro určení tréninkových zón (Fernandes, a další, 2015).

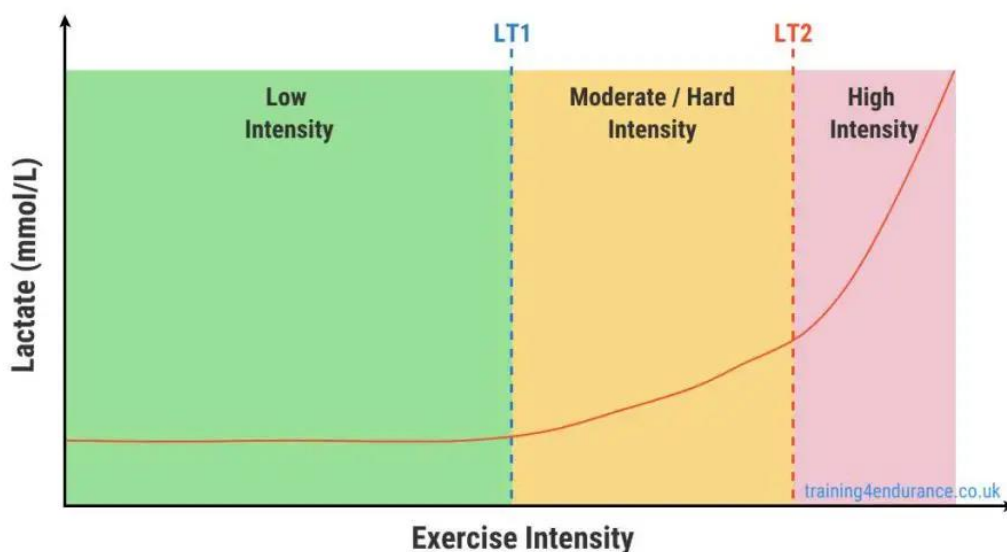
Dle vývoje koncentrace laktátu během zátěže lze identifikovat přechody mezi jednotlivými zónami intenzity, kdy a jak se zapojují které metabolické systémy tvorby energie. Obecně lze zátěž dle intenzity rozdělit do 3 zón; zóna 1 je charakterizována krytím energetických potřeb převážně oxidací mastných kyselin s minimálním zapojením glykolýzy. Produkce laktátu je nízká a rovnoměrná. Tato zóna je ideální pro dlouhotrvající aktivity v nízké intenzitě. V zóně 2 se v krytí energetických nároků uplatňuje již s převahou glykolytický systém a koncentrace laktátu v krvi roste lineárně spolu se zvyšující se intenzitou zátěže. Při této intenzitě je za dostatečného okysličení organismus schopen vznikající laktát zároveň využít; při rovnoměrném udržování dané intenzity zůstává příslušná hodnota laktátu konstantní. Díky tomu je možné v této zóně setrvat po delší dobu (například v podobě tempových tréninků), avšak je doprovázena vyšší mírou diskomfortu oproti zóně 1 a také větší stresovou zátěží organismu. V zóně 3 již transportní systém není schopen přivádět dostatečné množství kyslíku, které by bylo potřeba v pracujících svalech a produkce laktátu začíná převyšovat odbourávání; jeho koncentrace v krvi stoupá exponenciálně. Proto je v této zóně obtížné setrvat po delší dobu (interval, sprinty). (Willkins, a další, 2023).

Pro získání informací o intenzitách, ve kterých se sportovec pohybuje během různých typů tréninku, lze stanovit koncentrace laktátu během daných tréninkových zatížení. Pro takovéto měření je ideální rovnoměrná zátěž. Pro sestavení laktátové křivky vizualizující dynamiku produkce laktátu je potřeba provést měření při zvyšujícím se zatížení sportovce. Z křivky lze určit hodnotu aerobního a anaerobního prahu (Máček, 2011).

Na laktátové křivce získané při stupňovaném testu lze určit bod aerobního prahu (AP, nebo také LT1 – Lactate Threshold 1) charakterizovaný přechodem z téměř konstantního

průběhu křivky do lineárního narůstání koncentrace laktátu. Představuje přechod mezi zónami 1 a 2. Na přechodu od lineárního vývoje křivky do exponenciálního zvyšování hladiny

Obrázek 3 Znárodnění zón intenzity vzhledem k vývoji koncentrace laktátu



Zdroj: (training4endurance.co.uk, 2023)

laktátu se nachází bod anaerobního prahu (ANP, nebo také LT2 – Lactate Threshold 2), určuje přechod mezi zónami 2 a 3 (Willkins, a další, 2023).

Anaerobní práh (ANP) je dle (Pastucha, 2014) „nejvyšší dosažená úroveň rovnovážného stavu a je definován jako intenzita zatížení, při které je nastolena dynamická rovnováha mezi tvorbou a utilizací laktátu.“ Průměrně nastává při 55-65 % VO_2 max, adaptace sportovce na zátěž procentuální hodnotu VO_2 max při anaerobním prahu zvyšuje.

Lze využít neinvazivní metody zjištění anaerobního prahu, a to například sledováním minutové ventilace (V_E) a výdeje oxidu uhličitého (VCO_2) při ventilačně respiračním testu se zvyšující se zátěží, kdy tyto parametry stoupají lineárně, dokud nedojde k přechodu na anaerobní způsob tvorby energie s produkcí laktátu, který způsobí acidózu vedoucí k vyšší ventilaci (stimulací dechového centra v prodloužené míše). Anaerobní práh pak můžeme odhadnout jako zlom v křivce V_E i VCO_2 (bod respirační kompenzace při nástupu acidózy či respirační práh). Další možností je měření srdeční frekvence v krátkých časových rozestupech během stupňované zátěže, kdy zlom na výsledné křivce lze interpretovat jako anaerobní práh (tzv. Conconiho test) (Pastucha, 2014).

Nepřesnější je invazivní metoda měření laktátu v arterializované krvi v průběhu rovnoměrně stupňovaného testu. Následně je sestaveno grafické znázornění výsledku testu ve formě laktátové křivky, kdy na ose x je vynesena intenzita práce (dle charakteru protokolu testu, nejčastěji je použita rychlost běhu na běžecím pásu nebo výkon při šlapání na bicyklovém ergometru) v jednotlivých stupních zátěžového testu a na ose y je vynesena naměřená koncentrace laktátu v příslušných stupních zátěže (Pastucha, 2014) (Fernandes, a další, 2015). Laktátová křivka může zohledňovat i VO_2 (Keir, a další, 2022).

Pro určení anaerobního prahu z laktátové křivky existuje několik metod. (Pastucha, 2014) prezentuje numerickou metodu nejmenších čtverců pro výpočet ANP. (Fernandes, a další, 2015) srovnával další tři metody pro určení bodu anaerobního prahu z laktátové křivky získané měřením při stupňovitém zátěžovém testu. První byla metoda vzestupu laktátu o 1 mmol/l (DT1), kdy bod intenzity zatížení předcházející vzestupu koncentrace laktátu mezi jednotlivými stupni zátěže o více než 1 mmol/l odpovídá anaerobního prahu. Dále byla využita poměrně obecná metoda absolutní hodnoty 4 mmol/l, kdy dosažení této koncentrace znamená rovněž dosažení anaerobního prahu. Třetí byla semi-logaritmičká metoda (semi-log metoda), kdy je laktátová křivka s exponenciálním průběhem rozdělena na dvě křivky s lineárním průběhem; průsečík těchto dvou křivek je považován za anaerobní práh. Jako nejméně přesná se jevila metoda absolutní hodnoty 4 mmol/l, jelikož nebere v potaz intraindividuální rozdíly (jak mezi trénovanými a netrénovanými, tak mezi sportovci s různým typem tréninku), zbývající dvě metody byly srovnatelné. Existenci značných rozdílů hodnot laktátu v bodě anaerobního prahu mezi různě trénujícími jedinci dokládá také (Pastucha, 2014); například vytrvalci mohou dosáhnout ANP při koncentracích laktátu okolo 2,5 mmol/l, kdežto hodnoty laktátu sprinterů se v bodě ANP mohou pohybovat až okolo 5-6 mmol/l.

Pro určení aerobního prahu je často využívána metoda rozdílu 0,4 mmol/l mezi dvěma po sobě jdoucími stupni zátěže, přičemž za aerobní práh je považován bod předcházející tomuto rozdílu (Baumgart, a další, 2018) (Buckley, a další, 2003).

Pro orientační odhad laktátových prahů existují obecné empiricky vyzkoušené výpočty z maximální tepové frekvence pomocí koeficientů. Stejně tak je na základě zkušeností uváděn rozdíl hodnot tepové frekvence při AP a ANP asi 20 tepů za minutu.

Určení aerobního a anaerobního prahu odhaluje způsob energetického krytí zátěže v různých intenzitách, lze zhodnotit aktuální stav kondice sportovce a na základě toho

stanovit optimální tréninkové zóny pro zlepšení výkonnosti. Sledováním poklesu koncentrace laktátu v krvi po zátěži lze pozorovat míru a rychlost zotavení (Fernandes, a další, 2015).

4.3 Zátěžová vyšetření

Jedná se o funkční zkoušky fyzické zdatnosti jedince a vlivu pohybové aktivity na organismus. Indikovány jsou jak zdravým jedincům za účelem posouzení fyzické kondice, kontroly účinnosti tréninkového procesu či predikce růstu výkonnosti a plánování tréninku, tak nemocným s kardiovaskulárními onemocněními či nemocemi dýchacího systému jako diagnostický nebo prognostický test za účelem sledování tolerance zátěže (Pastucha, 2014).

Dle účelu vyšetření je zvolen příslušný protokol testu a sledované parametry. Kromě klinického hodnocení stavu pacienta (cyanóza, blednutí, míra pocení) a subjektivního hodnocení testovaného (hodnocení stupně zátěže na škále 6-20 dle Borga) jsou sledovány také měřené parametry: EKG, krevní tlak, tepová a dechová frekvence, respirační parametry (příjem kyslíku VO_2 a výdej oxidu uhličitého VCO_2 a od nich odvozené další vypočtené parametry, případně arteriální parciální tlaky O_2 a CO_2 , saturace arteriální krve O_2) či koncentrace laktátu (Pastucha, 2014).

Pro potřeby konkrétního testu je zvolen optimální protokol. Zátěžové vyšetření může probíhat jako jednostupňový test po daný časový úsek, jako rampový test s plynulým zvyšováním zátěže do maxima nebo jako stupňovaný test (ve variantě s přestávkami nebo bez), kdy je zátěž zvyšována postupně po určitých časových intervalech. Nejčastěji se zátěžová vyšetření provádějí na běhacím pásu nebo bicyklovém ergometru, kde je míra zátěže dobře kvantifikovatelná (snadné nastavení rychlosti na běhacím pásu nebo odporu šlapání odpovídajícímu výkonu testovaného na bicyklovém ergometru), případně je možné test provést na ergometrech pro specifické sporty (veslařský či plavecký trenažér), s omezenými možnostmi sledovaných parametrů i v terénu (Pastucha, 2014).

PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

5.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem této bakalářské práce je srovnání analyzátorů na stanovení laktátu a aplikace získaných výsledků ve sportovní medicíně.

5.2 Dílčí cíle

Prvním dílčím cílem je porovnání dvou osobních laktátometrů na laboratorní úrovni se zhodnocením běžných analytických parametrů.

Druhým výzkumným cílem je porovnání dat získaných testovanými laktátometry při určení aerobního a anaerobního prahu.

6 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Pro potřeby této bakalářské práce sledovaný soubor tvoří vytrvalostní sportovec. Pro získání potřebných dat podstoupil zátěžový test dobrovolník. Muž, 32 let, bývalý profesionální cyklista (tréninkové pensum v době aktivní kariéry představovalo > 40 hodin / týden, momentálně 4 roky po ukončení profesionální kariéry činí tréninkový objem 10-15 hodin / týden). Pro účely tohoto experimentu je stěžejní fyzická zdatnost testované osoby zaručující schopnost zvládnutí absolvování celého zátěžového testu a zároveň ochota k opakovaným odběrům krve. Tento dobrovolník byl informován o průběhu zátěžového vyšetření a o možnosti kdykoliv z pokusu odstoupit, souhlasil s odběry krve během zátěžového vyšetření a s nakládáním se získaným materiálem podle potřeb této bakalářské práce a rovněž souhlasil s uvedením základních dat v souhrnné číselné podobě, která neumožní identifikaci jeho osoby. Dokument s názvem Informovaný souhlas pro zařazení do studie „Analytické možnosti zátěžového vyšetření“ je přiložen k této bakalářské práci (Příloha 2).

7 METODIKA PRÁCE

Pro získání dat potřebných k dosažení hlavního cíle této bakalářské práce jsme provedli měření při zátěžovém vyšetření na Ústavu sportovní medicíny Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Experiment proběhl na základě schválené žádosti o povolení výzkumného šetření na zmíněné instituci. Dokument je přiložen k této bakalářské práci (Příloha 1). Experiment schválila regionální Etická komise pod jednacím číslem 59/23.

7.1 Příprava

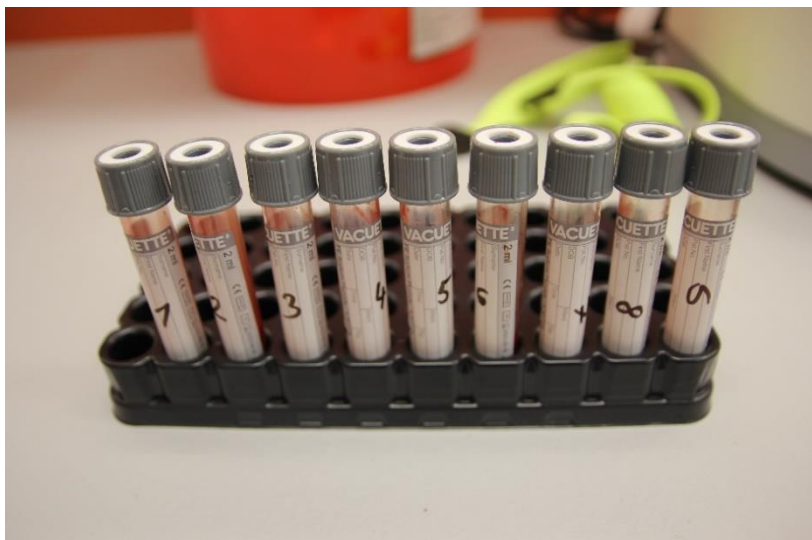
Před započítím samotného zátěžového vyšetření bylo potřeba připravit veškerý potřebný materiál. Testovanému sportovci byla zavedena do pravého předloktí kanyla s kohoutovou výpustí pro možnost opakovaných odběrů (Obrázek 4). Byly připraveny zkumavky pro odběr laktátu (s LiHep a NaF) a popsány čísla 1-9 značící stupeň zátěže, při kterém bude vzorek odebrán (Obrázek 5). Na POCT analyzátoru laktátu a glukózy Biosen C-Line firmy EKF Diagnostics byla provedena kalibrace za pomoci jednoho kalibrátoru o známe koncentraci (Obrázek 6). Byla zkontrolována doba expirace testovacích proužků pro osobní laktatometry a jejich dostatečné množství odpovídající šarže pro provedení všech potřebných vyšetření.

Obrázek 4 Odběr z kanyly



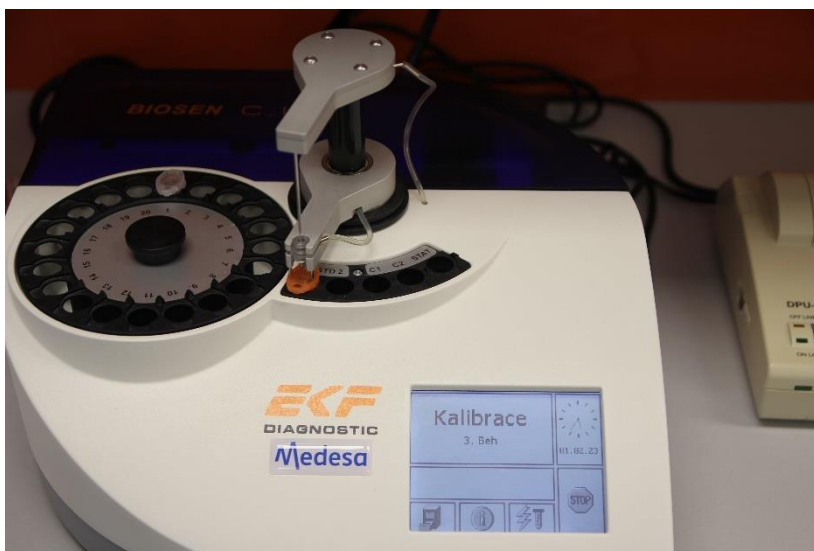
Zdroj: vlastní

Obrázek 5 Zkumavky popsané čísly 1-9 pro odběry po jednotlivých stupních zátěžového testu



Zdroj: vlastní

Obrázek 6 Kalibrace analyzátoru Biosen



Zdroj: vlastní

7.2 Sledované parametry

Během zátěžového testu byla kontinuálně monitorována srdeční frekvence testovaného sportovce pomocí hrudního pásu (značky Garmin). Informace o aktuální srdeční frekvenci (v tepech za minutu) jsme mohli během testu sledovat na bezkontaktním zařízení (Obrázek 7).

Dalším sledovaným údajem byla rychlost běžeckého pásu, nastavení rychlosti se zvyšovalo při každém stupni zátěžového testu. Rychlost běžeckého pásu reprezentuje velikost zátěže, k jednotlivým stupňům zátěže jsou následně vztaženy hodnoty laktátu.

Pro tuto bakalářskou práci bylo stěžejní sledování hladin laktátu při každé úrovni zátěže. Vždy po ukončení intervalu stupňované zátěže jsme provedli odběr arterializované krve z ušního lalůčku do malé kapiláry pro stanovení laktátu na POCT analyzátoru Biosen C-Line a zároveň byl proveden odběr venózní krve do stříkačky ze zavedené kanyly, která byla použita pro stanovení laktátu na dvou osobních laktátometrech a následně přemístěna do patřičně popsané zkumavky a promíchána.

Důvod zavedení kanyly pro celý průběh testu je potřeba odběru většího množství krve (cca 2 ml na každém stupni zátěže) v krátkém čase během přestávky mezi jednotlivými intervaly. Stabilita laktátu je ve zkumavkách s LiHep a NaF zaručena díky inhibici glykolýzy. Patřičný objem vzorků je potřebný pro následné stanovení laktátu na velkém automatickém analyzátoru Cobas 8000 firmy Roche (který považujeme za referenční metodu) a také pro provedení opakovaných měření osobními laktátometry na vybraných hladinách pro zjištění preciznosti.

Obrázek 7 Bezkontaktní zařízení pro sledování hodnoty srdeční frekvence z hrudního pásu



Zdroj: vlastní

7.3 Průběh experimentu

Před započítím experimentu byl odebrán vzorek kapilární krve z ušního lalůčku a vzorek venózní krve ze zavedené kanyly pomocí stříkačky a byla stanovena koncentrace laktátu v klidu. Zároveň byl zaznamenán údaj o klidové tepové frekvenci.

Pro experiment byl zvolen následující protokol zátěžového vyšetření:

- Zátěžový test proběhl na běžeckém pásu s nastavitelnou rychlostí a sklonem (Obrázek 8)
- Sklon byl nastaven na 1 %
- Zátěžový test byl stupňovaný s přestávkami
- Intervaly zátěže trvaly 4 minuty, přestávka 1 minutu
- Zátěž ve formě rychlosti byla stupňována pro každý interval o 1,5 km/h
- Počáteční rychlost byla nastavena na 8 km/h

Několik vteřin před koncem každého čtyřminutového intervalu byla zaznamenána aktuální tepová frekvence. Po uplynutí 4 minut na daném stupni zátěže se testovaný sportovec posadil a byla mu neprodleně odebrána arterializovaná krev z ušního lalůčku do malé kapiláry a zároveň s tím proběhl odběr cca 2 ml venózní krve z kanyly do stříkačky. Vzorky byly okamžitě analyzovány. Během přestávky sportovec odpočíval, mezitím byla

Obrázek 8 Běžecký pás s nastavitelnou rychlostí a sklonem



Zdroj: vlastní

na běžeckém pásu nastavena vyšší rychlost. Po uplynutí doby vyhrazené pro přestávku sportovec započal další čtyřminutový interval v rychlosti o 1,5 km/h vyšší než v předchozím stupni. Test stupňovanou zátěží takto pokračoval do subjektivního vyčerpání testovaného (byl ukončen při dosažení nejvyšší možné rychlosti, kterou byl sportovec schopen udržet po celou dobu 4 minut).

Po skončení samotného zátěžového testu jsme provedli opakovaná měření vzorků krve ze zkumavek s LiHep a NaF na třech vybraných hladinách laktátu (konkrétně vzorky krve odebrané po 6., 7. a 9. intervalu). Měření jsme opakovali 7krát pro každou hladinu všemi třemi analyzátory.

7.4 Analýza laktátu

Pro stanovení hladin laktátu jsme v tomto experimentu využili POCT analyzátor a dva osobní laktátometry, jako referenční hodnoty jsme použili výsledky z automatického analyzátoru Cobas 8000 firmy Roche na Ústavu klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice Plzeň.

7.4.1 Biosen C-Line firmy EKF Diagnostics

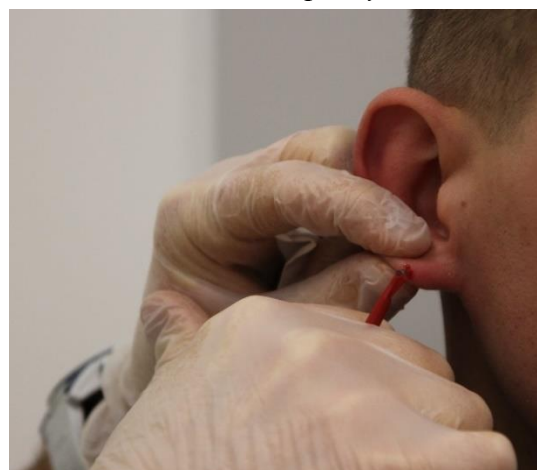
Jedná se o POCT analyzátor na měření koncentrace laktátu a glukózy. Funguje na principu enzymaticko-ampérometrického biosenzoru (biočipu). Ovládání je jednoduché, instrukce jsou přehledně zobrazovány na displeji. Kalibrace je automatická, lze zvolit ze tří módů, výrobce rovněž poskytuje roztok standardu. Odběr je potřeba provést do miniaturní kapiláry (2 cm) s vyvarováním se vzduchových bublin, potřebný objem vzorku je 20 μ l. Kapilára je následně umístěna do přednaplněného (1000 μ l) reakčního cupu od výrobce.

Obrázek 9 Biosen C-Line



Zdroj: vlastní

Obrázek 10 Odběr z ušního lalůčku do miniaturní kapiláry



Zdroj: vlastní

Tento systém eliminuje možnost vzniku chyby při manuálním ředění. Po promíchání je cup umístěn do přístroje a spuštěno měření, které trvá 20-45 sekund (EKF-diagnostics, 2019).

7.4.2 Lactate Scout 4

Malý analyzátor laktátu pracující na principu enzymaticko-ampérometrického biosenzoru, přičemž tento enzymový biosenzor představují testovací proužky (stripy) na jedno použití. Testovací proužky jsou již předkalibrované, při použití nové šarže je vždy potřeba zadat příslušný kód uvedený na obalu. Použití je velmi jednoduché, po zavedení stripu do analyzátoru je aplikován vzorek krve, přičemž potřebný objem je velmi malý (0,2 μ l / kapka krve). Výsledek se zobrazí na displeji zhruba do 10 sekund (EKF-diagnostics).

Obrázek 12 Lactate Scout 4



Zdroj: vlastní

Obrázek 11 Aplikace vzorku na testovací proužek

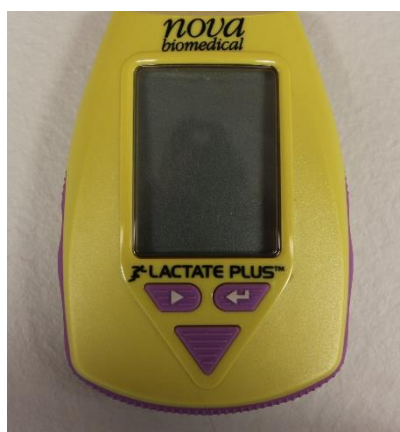


Zdroj: vlastní

7.4.3 Lactate Plus firmy Nova biomedical

Principu enzymaticko-ampérometrického biosenzoru využívá také přístroj Lactate Plus, kdy testovací proužky (StarStrip Multi-Well) rovněž představují enzymatické elektrody na jedno použití. Použití tohoto přístroje nevyžaduje zadávání kódů šarže na obalu stripů pro kalibraci, což by mělo napomáhat snížení chybovosti. Potřebný objem vzorku pro provedení analýzy je malý (0,7 μ l / kapka krve) a po nanesení vzorku na strip zavedený v analyzátoru trvá měření cca 13 sekund (Novabiomedical).

Obrázek 13 Lactate Plus



Zdroj: vlastní

Obrázek 14 Cobas 8000 firmy Roche



Zdroj: vlastní

8 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Zpracování dat a početní operace byly provedeny pomocí programu Microsoft Excel.

8.1 Analýza dat získaných během zátěžového vyšetření

Veškeré hodnoty získané měřením v průběhu zátěžového testu prezentuje Tabulka 4.

Tabulka 4 Souhrn všech naměřených hodnot během zátěžového testu

Stupeň zátěže	Rychlost (km/h)	Tep	Naměřená koncentrace laktátu (mmol/l)				
			Biosen (kapi-lární)	Biosen (LiHep + NaF)	Lactate Scout 4 (LiHep + NaF)	Lactate Plus (LiHep + NaF)	Cobas 8000 (LiHep+ NaF)
1.	Klid	65	0,91	0,88	0,6	1	1,23
2.	8	125	0,63	0,81	0,5	0,6	1,13
3.	9,5	127	0,79	0,84	0,5	0,5	1,12
4.	11	140	0,85	0,97	0,5	0,7	1,3
5.	12,5	149	1,12	1,12	0,6	1	1,58
6.	14	158	1,65	1,66	1,3	1,6	1,69
7.	15,5	169	2,86	3,08	3,2	2,7	3,88
8.	17	176	4,58	4,62	4,4	4,6	6,16
9.	18,5	177	6,25	5,97	7,3	5,5	7,87

Zdroj: vlastní měření

Měření na všech přístrojích proběhla cca do 2 minut od odběru, stanovení na analyzátoru Cobas 8000 firmy Roche proběhlo do hodiny od posledního odběru.

Tabulka 5 Vypočtené parametry pro každý stupeň zátěže a průměrný variační koeficient všech metod

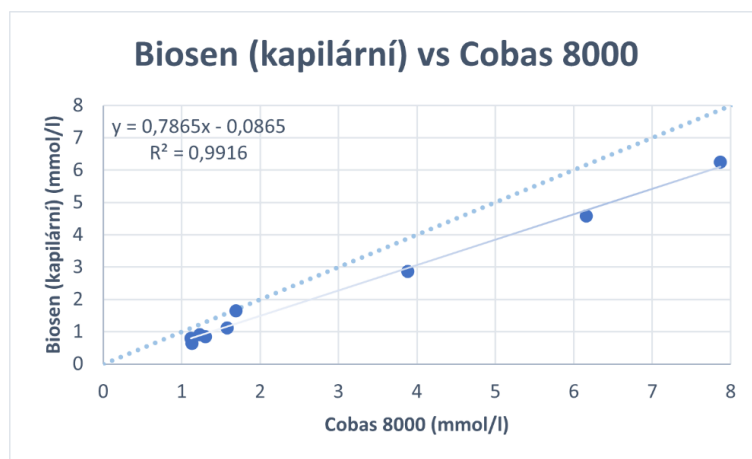
Stupeň zátěže	Průměr (mmol/l)	SD (mmol/l)	CV (%)
1.	0,924	0,2032	22,00
2.	0,734	0,2219	30,23
3.	0,75	0,2331	31,08
4.	0,864	0,2687	31,10
5.	1,084	0,3130	28,88
6.	1,58	0,1430	9,05

7.	3,144	0,4066	12,93
8.	4,872	0,6488	13,32
9.	6,578	0,8752	13,30
Průměr CV (%):			21,32

Pro účely této práce je laboratorní automatický analyzátor Cobas 8000 firmy Roche považován za referenční metodu. Následují grafická znázornění dle Passing-Bablocka a dle Bland-Altmana porovnávající jednotlivé metody právě s analyzátozem Cobas 8000.

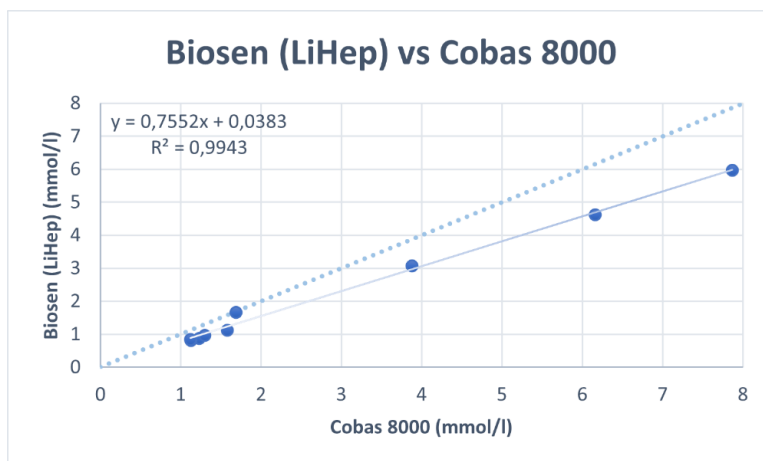
8.1.1 Grafické porovnání jednotlivých metod s analyzátozem Cobas 8000 dle Passing-Bablocka

Graf 1 Porovnání výsledků z analyzátoru Biosen z kapilární krve s daty z analyzátoru Cobas 8000



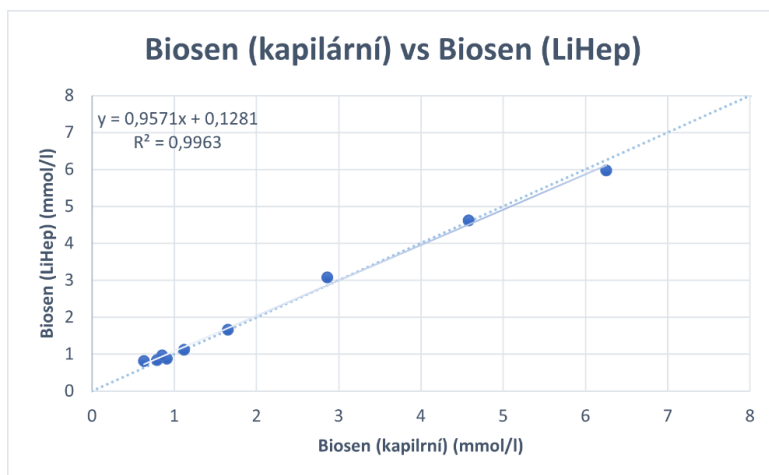
Zdroj: vlastní měření

Graf 2 Porovnání analyzátoru Biosen s analyzátozem Cobas 8000



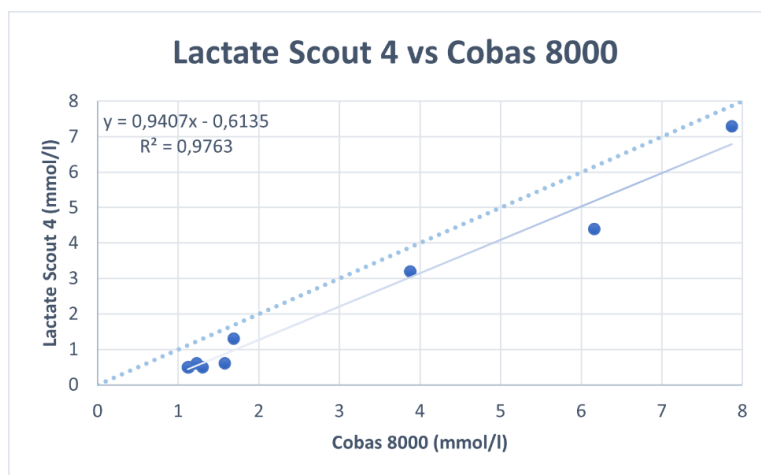
Zdroj: vlastní měření

Graf 4 Porovnání výsledků z analyzátoru Biosen z kapilární a periferní krve



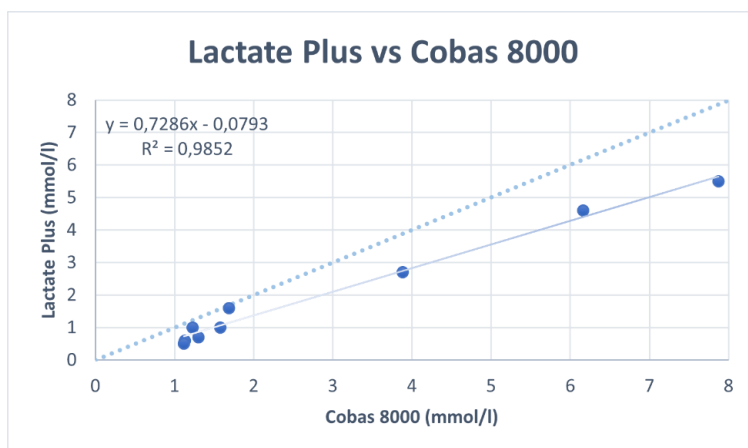
Zdroj: vlastní měření

Graf 3 Porovnání výsledků z Lactate Scout 4 s analyzátořem Cobas 8000



Zdroj: vlastní měření

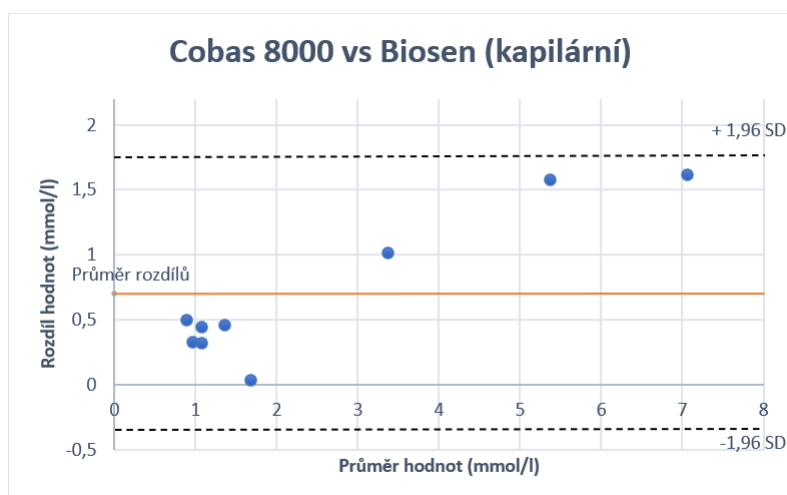
Graf 5 Porovnání výsledků z Lactate Plus a Cobas 8000



Zdroj: vlastní měření

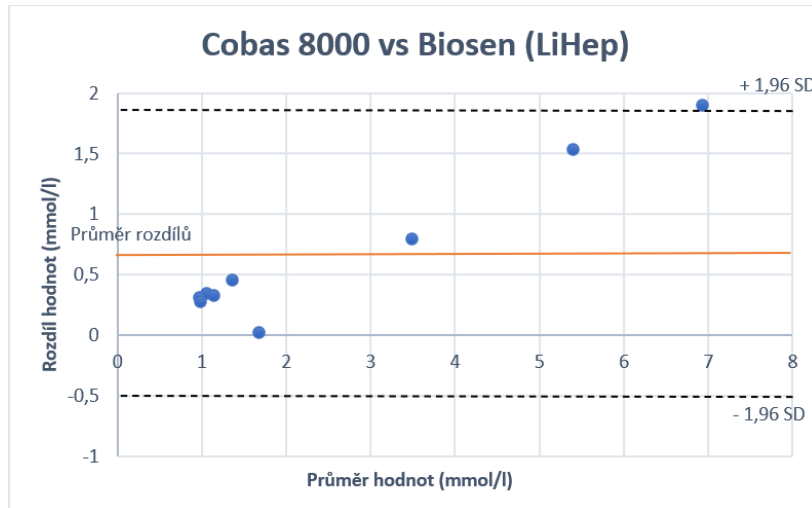
8.1.2 Porovnání jednotlivých metod s analyzátelem Cobas 8000 pomocí rozdílových grafů dle Bland-Altmana

Graf 6 Znázornění rozdílů výsledků analyzátorů Cobas 8000 z periferní krve a Biosen z kapilární krve v celém rozsahu měření



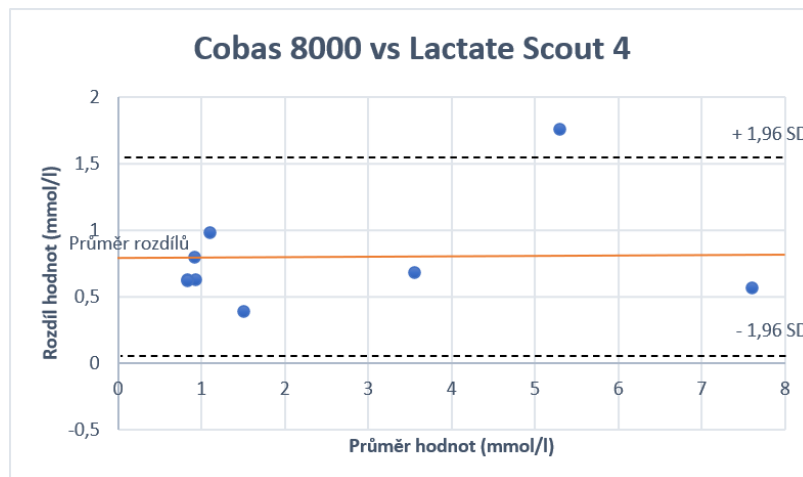
Zdroj: vlastní měření

Graf 7 Znáornění rozdílů výsledků analyzátorů Cobas 8000 a Biosen v celém rozsahu měření



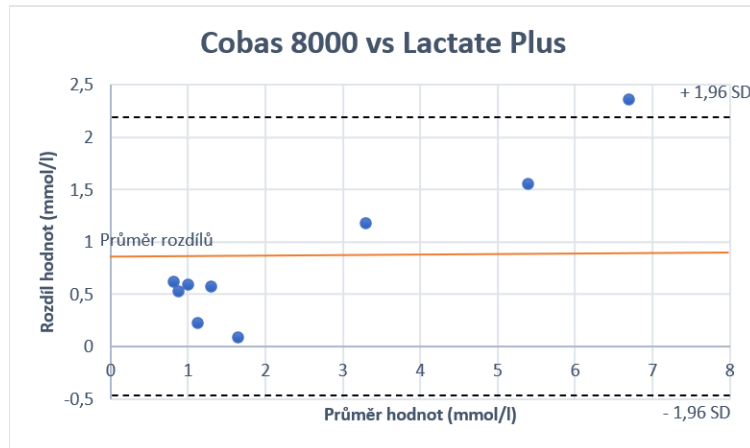
Zdroj: vlastní měření

Graf 8 Znáornění rozdílů výsledků analyzátorů Cobas 8000 a Lactate Scout 4 v celém rzsahu měření



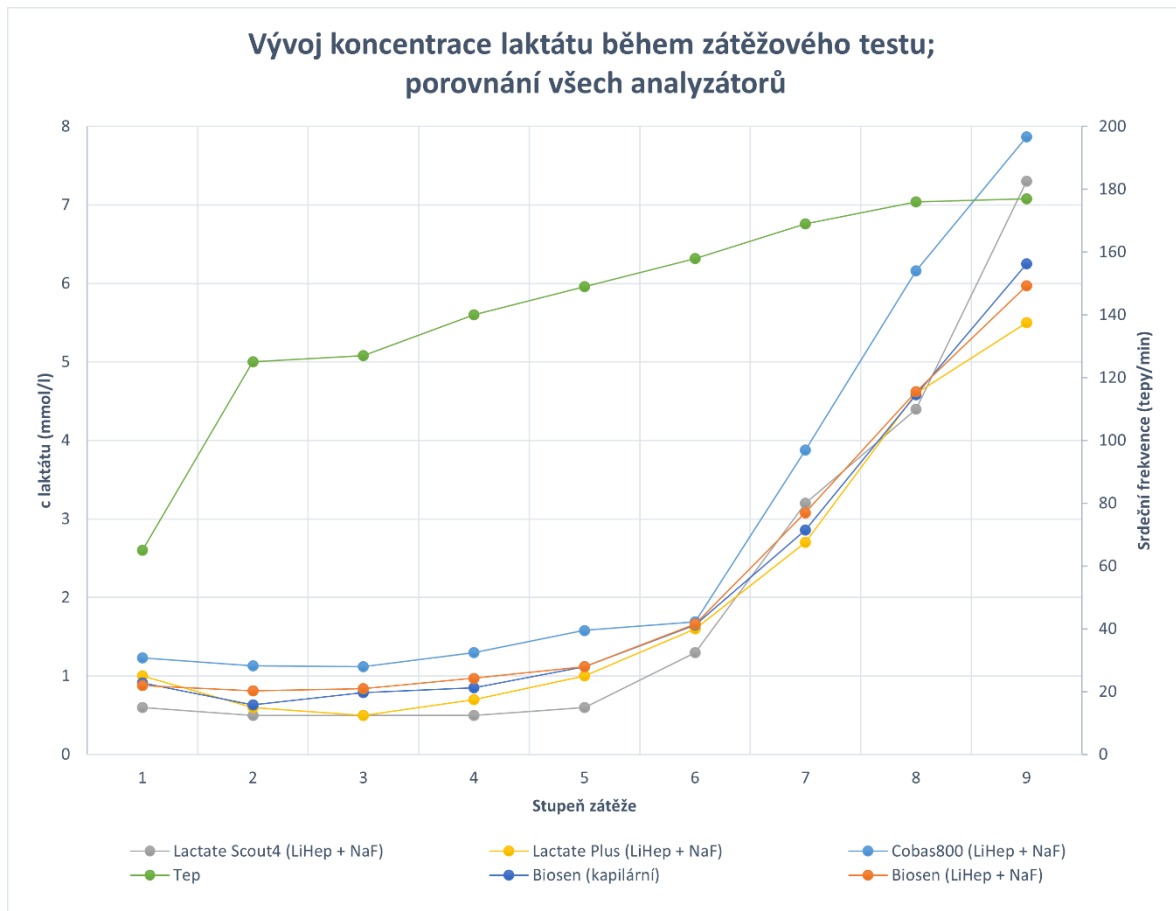
Zdroj: vlastní měření

Graf 9 Znárodnění rozdílů výsledků analyzátorů Cobas 8000 a Lactate Plus v celém rozsahu měření



Zdroj: vlastní měření

Graf 10 Porovnání naměřených hodnot všemi metodami v průběhu celého měření se zahrnutím vývoje tepové frekvence



Zdroj: vlastní měření

8.2 Analýza dat získaných opakovaným měřením

Provedli jsme opakovaná měření (7) přístroji Lactate Scout 4, Lactate Plus a Biosen tří vzorků s různými hladinami laktátu získaných na 6., 7. a 9. stupni zátěže. Provedli jsme výpočet průměru, směrodatné odchylky a variačního koeficientu pro každou sérii měření.

Pro každou sérii měření jsme stanovili kombinovanou nejistotu (u_c) absolutní a relativní.

Hodnoty získané opakovaným měřením jsou vyhodnoceny Bland-Altmanovým rozdílovým grafem.

8.2.1 Výsledky měření stejného alikvotu vzorku získaného na 6. stupni zátěže:

Tabulka 6 Hodnoty na 6. stupni zátěže

Měření	c laktátu (mmol/l)		
	Biosen (LiHep + NaF)	Lactate Scout 4 (LiHep + NaF)	Lactate Plus (LiHep + NaF)
1	1,66	2,3	1,8
2	1,77	1,5	1,7
3	1,82	1,2	1,7
4	1,76	1,7	1,6
5	1,8	1,7	1,7
6	1,68	1,7	1,5
7	1,79	1,7	1,6
Průměr:	1,75	1,69	1,66
SD:	0,0565	0,3044	0,0904
CV (%):	3,22	18,06	5,45

Zdroj: vlastní měření

Tabulka 7 Nejistoty na 6. stupni zátěže

	Biosen	Lactate Scout 4	Lactate Plus
uc (abs)	0,06	0,30	0,09
uc (rel)	3,22	18,06	5,45
Uc (abs)	0,11	0,61	0,18
Uc (rel)	6,45	36,11	10,90

Zdroj: vlastní měření

8.2.2 Výsledky měření stejného alikvotu vzorku získaného na 7. stupni zátěže:

Tabulka 8 Hodnoty na 7. stupni zátěže

Měření	c laktátu (mmol/l)		
	Biosen (LiHep + NaF)	Lactate Scout 4 (LiHep + NaF)	Lactate Plus (LiHep + NaF)
1	3,25	4,2	3,1
2	3,25	3,8	3,2
3	3,19	3,8	3,1
4	3,13	4,1	2,9
5	3,13	3,8	3,2
6	3,18	3,2	3
7	3,29	3,7	3,1
Průměr:	3,20	3,80	3,09
SD:	0,0577	0,2976	0,0990
CV (%):	1,80	7,83	3,21

Zdroj: vlastní měření

Tabulka 9 Nejistoty na 7. stupni zátěže

	Biosen	Lactate Scout 4	Lactate Plus
uc (abs)	0,06	0,30	0,10
uc (rel)	1,80	7,83	3,21
Uc (abs)	0,12	0,60	0,20
Uc (rel)	3,61	15,66	6,42

Zdroj: vlastní měření

8.2.3 Výsledky měření stejného alikvotu vzorku získaného na 9. stupni zátěže:

Tabulka 10 Hodnoty na 9. stupni zátěže

Měření	c laktátu (mmol/l)		
	Biosen (LiHep + NaF)	Lactate Scout 4 (LiHep + NaF)	Lactate Plus (LiHep + NaF)
1	6,53	6,4	6,2
2	6,32	7,4	6,4
3	6,29	8	6,5
4	6,28	6,8	5,7
5	6,51	7,2	5,7
6	6,59	7,9	6
7	6,07	6,7	6,4
Průměr:	6,37	7,20	6,13
SD:	0,1693	0,5632	0,3104
CV (%):	2,66	7,82	5,06

Zdroj: vlastní měření

Tabulka 11 Nejistoty na 9. stupni zátěže

	Biosen	Lactate Scout 4	Lactate Plus
uc (abs)	0,17	0,56	0,31
uc (rel)	2,66	7,82	5,06
Uc (abs)	0,34	1,13	0,62
Uc (rel)	5,32	15,64	10,13

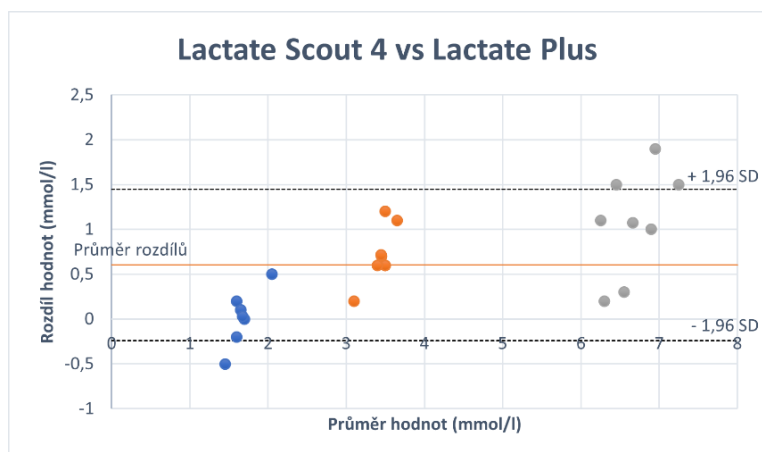
Zdroj: vlastní měření

Tabulka 12 Průměrné relativní nejistoty jednotlivých analyzátorů

Biosen	Lactate Scout 4	Lactate Plus
2,63 %	12,23 %	4,68 %

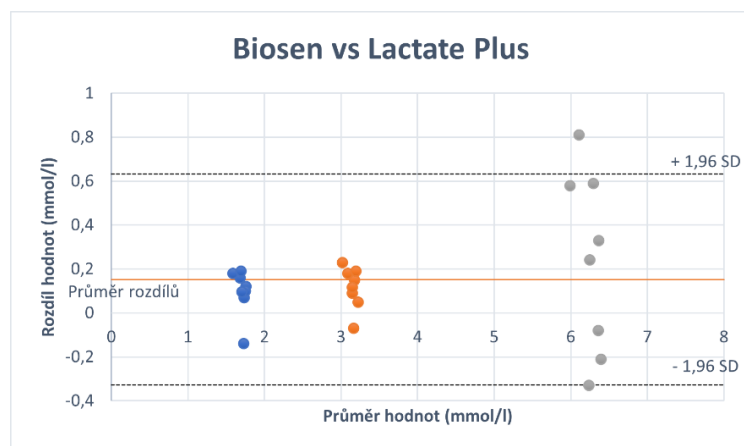
8.2.4 Vzájemné porovnání metod pomocí rozdílových grafů dle Bland-Altmana

Graf 9 Znáznornění rozdílů výsledků analyzátorů Lactate Scout 4 a Lactate Plus na třech hladinách měření



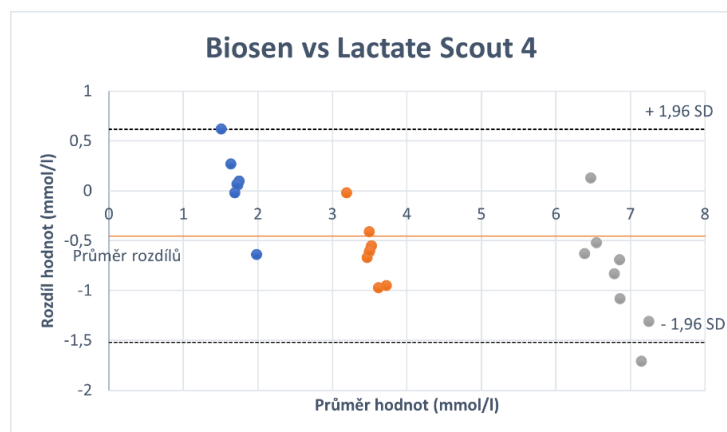
Zdroj: vlastní

Graf 10 Znáznornění rozdílů výsledků analyzátorů Biosen a Lactate Plus na třech hladinách měření



Zdroj: vlastní

Graf 11 Znáornění rozdílů výsledků analyzátorů Biosen a Lactate Scout 4 na třech hladinách měření



Zdroj: vlastní

8.2.5 Stanovení aerobního a anaerobního prahu

Pro stanovení aerobní prahu byla využita metoda rozdílu 0,4 mmol/l laktátu mezi dvěma po sobě jdoucími stupni, přičemž hodnota předcházející tomuto zvýšení odpovídá aerobnímu prahu (Baumgart, a další, 2018).

Pro stanovení anaerobního prahu byla využita metoda rozdílu 1 mmol/l laktátu mezi dvěma následujícími stupni, kdy hodnota předcházející tomuto zvýšení symbolizuje anaerobní práh (Baumgart, a další, 2018) (Fernandes, a další, 2015).

Tabulka 13 Aerobní (zeleně) a anaerobní (modře) práh testovaného dobrovolníka podle hodnot z jednotlivých analyzátorů

Tep	Naměřená koncentrace laktátu (mmol/l)				
	Biosen (kapilární)	Biosen (Li-Hep + NaF)	Lactate Scout 4 (LiHep + NaF)	Lactate Plus (LiHep + NaF)	Cobas 8000 (LiHep+ NaF)
65	0,91	0,88	0,6	1	1,23
125	0,63	0,81	0,5	0,6	1,13
127	0,79	0,84	0,5	0,5	1,12
140	0,85	0,97	0,5	0,7	1,3
149	1,12	1,12	0,6	1	1,58
158	1,65	1,66	1,3	1,6	1,69
169	2,86	3,08	3,2	2,7	3,88
176	4,58	4,62	4,4	4,6	6,16
177	6,25	5,97	7,3	5,5	7,87

Zdroj: vlastní měření

Výpočet aerobního a anaerobního práhu z maximální tepové frekvence rozdílem 20 tepů mezi prahy:

ANP: $177-20=167$ tepů/min

AP: $167-20=147$ tepů/min

DISKUZE

V teoretické části této práce byl nejprve obecně představen metabolismus laktátu v lidském organismu a také principy metod pro stanovení laktátu v laboratoři, jakožto úvod do tématu a základ pro hlubší zkoumání dané problematiky. Následující kapitoly se již specificky věnují poznatkům o úloze stanovení laktátu ve sportovní medicíně a o postupech pro porovnávání laboratorních metod později využitým v praktické části. Informace byly čerpány z českých i ze zahraničních odborných publikací.

Praktická část byla provedena formou zátěžového stupňovaného testu na Ústavu sportovní medicíny Lékařské Fakulty Univerzity Karlovy v Plzni za účelem získání dostatečného množství dat pro zhodnocení preciznosti a přesnosti testovaných analyzátorů. Průběh experimentu včetně detailního popisu postupu a informací o jednotlivých analyzátorech je součástí metodiky v praktické části této práce. Postup pro výpočty parametrů a konstrukci grafů je uveden v teoretické části této práce.

Testování se týkalo dvou dostupných a ve sportovní medicíně i v trenérské praxi hojně využívaných ručních analyzátorů laktátu Lactate Plus firmy Nova Biomedical a Lactate Scout 4 firmy EKF Diagnostics a jednoho POCT analyzátoru Biosen C-Line rovněž firmy EKF Diagnostics, který je rozšířen v laboratořích sportovní medicíny v České republice i v zahraničí. Jako referenční metoda byl pro účely této práce zvolen automatický laboratorní analyzátor Cobas 8000 firmy Roche v laboratoři klinické biochemie na Ústavu klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice v Plzni. Nejedná se o referenční metodu v pravém slova smyslu, nicméně podléhá pravidelným externím kontrolám kvality a jeho výsledky můžeme považovat za dostatečně precizní a pravdivé pro naše účely.

Již z Tabulky 4 shrnující veškeré naměřené hodnoty během zátěžového testu je patrná pozitivní bias v případě analyzátoru Cobas 8000 oproti ostatním analyzátorům na všech stupních zátěže. Tento fakt prezentuje Graf 10, ze kterého lze dále vyčíst také vyšší rozptyl hodnot všech analyzátorů na nejvyšším stupni zátěže s velmi vysokou koncentrací laktátu. V těchto vysokých koncentracích může být význam signifikantní v případech, kdy bychom hodnotili laktátovou křivku s využitím maximální koncentrace laktátu. Jako důvod pro odlišné výsledky analyzátoru Cobas 8000 oproti ostatním metodám lze vyloučit nedodržení preanalytické fáze, neboť vzorky krve byly z kanyly odebírány do zkumavek s protisrážlivým a glykolýzu inhibujícím činidlem zaručující stabilitu analytu, zároveň bylo stanovení

provedeno ze stejného alikvotu vzorku, ze kterého byl laktát stanoven i na ostatních přístrojích (kromě analýzy kapilárního odběru na přístroji Biosen).

Průměrná hodnota variačního koeficientu všech měření v Tabulce 5 přesahující 20 % není příliš přívětivá, alarmující je zejména hodnota na hladinách 2.-5., kde se pohybuje až okolo 30 %.

Z Grafů 1 a 2 je patrné, že analyzátor Cobas 8000 dává při vyšších koncentracích vyšší hodnoty než přístroj Biosen. Lze se domnívat o existenci proporcionální systematické chyby analyzátoru Biosen. Stejně výsledky vykazuje i porovnání těchto dvou metod rozdílovými Grafy 6 a 7.

Zajímavé porovnání analýzy laktátu na přístroji Biosen z kapilární a periferní krve prezentuje Graf 3, kde hodnoty téměř kopírují 45°sklon přímky shody a hodnota korelačního koeficientu (0,99814) je blízká 1. Z toho lze vyvodit, že hladina laktátu na jednotlivých stupních zátěže měřena na stejném analyzátoru v kapilární krvi koreluje s hladinou laktátu v periferní krvi.

Analyzátor Lactate Scout 4 vykazuje v porovnání s referenční metodou v Grafech 4 a 8 konstantní chybu. Z porovnání analyzátoru Lactate Plus s analyzátozem Cobas 8000 na Grafech 5 a 9 lze dle zvyšujícího se trendu rozptylu hodnot se zvyšující se koncentrací usuzovat na proporcionální chybu.

Následně byla zpracována formou rozdílových Bland-Altmanových grafů data získaná opakovaným měřením. Z Grafu 11 vyplynulo, že v nižších koncentracích dává vyšší výsledky přístroj Lactate Plus oproti přístroji Lactate Scout 4 a na vyšších hladinách laktátu naopak dává vyšší výsledky analyzátor Lactate Scout 4. Podobně lze interpretovat Graf 13, Lactate Scout 4 dává vyšší hodnoty oproti analyzátoru Biosen se zvyšující se koncentrací analytu. Zároveň analyzátor Lactate Scout 4 přispívá konstantní chybou, projevující se téměř stejně velkým rozptylem na všech hladinách. Graf 12 potvrzuje domněnku o proporcionálních chybách analyzátorů Biosen a Lactate Plus. Všechny tři grafy zároveň dokládají vyšší rozptyl hodnot na nejvyšší hladině měření koncentrace laktátu (v rozmezí hodnot od 6 do 8 mmol/l).

Výsledky studie provedené na pěti ručních analyzátozech laktátu a jednom POCT analyzátoru ukazují, že ani jeden z analyzátorů nedosahuje zároveň požadované přesnosti a pravdivosti, avšak většina párů analyzátorů dosáhla ve vzájemném porovnání vysoké míry

shody výsledků. Autor Bonaventura (Bonaventura, a další, 2015) konstatuje, že jsou použitelné pro praxi ve sportovní medicíně. Dílčím výstupem z této studie je zhodnocení dvou přístrojů (Edge firmy Transatlantic Science a Xpress firmy Nova Biomedical) jako vhodnějších pro stanovení laktátu v nižších koncentracích do 15 mmol/l (dosáhly celkové chyby v rozmezí 0 - 2 mmol/l) a dva přístroje (Edge a Lactate Pro 2 firmy Arkray KDK) se jeví jako vhodnější pro použití při stanovení vyšší koncentrace laktátu (>15 mmol/l). Takové rozdělení však ve sportovní praxi přílišný význam nemá, protože hodnot laktátu >15 mmol/l je dosaženo v minimálním procentu případů. Největší oblast zájmu je obvykle rozmezí 1 - 5 mmol/l.

V Tabulce 13 je znázorněn odhad hodnot aerobního a anaerobního prahu testovaného jedince z dat získaných jednotlivými analyzátory. V určení anaerobního prahu se srovnávané metody víceméně shodují, v určení aerobního prahu již vznikají rozdíly způsobené vyšší hodnotou CV právě na nižších hladinách laktátu. Přitom tyto koncentrace laktátu (okolo 2 mmol/l) jsou kritické pro stanovení aerobního prahu i v klinické praxi (např. pro diagnostiku sepse) (Sauer, a další, 2021).

Na způsob určení aerobního a anaerobního prahu z laktátové křivky lze v literatuře nalézt rozmanité názory. V této práci jsme použili empiricky ověřený odhad metodou rozdílu 0,4 mmol/l pro aerobní práh a 1 mmol/l rozdíl nad koncentrací 4 mmol/l laktátu pro anaerobní práh uváděný také autorem (Baumgart, a další, 2018) a také orientační výpočet tepové frekvence pro AP a ANP jako podíl z maximální dosažené tepové frekvence. Vyhodnocení AP a ANP získané z naměřených hodnot laktátu splňuje také praxi ověřenou obecnou podmínku, že by se rozdíl tepových frekvencí na úrovni AP a ANP měl pohybovat okolo 20 tepů za minutu. Aplikací těchto poznatků jsme došli k hodnotám tepové frekvence při aerobním prahu odpovídající 145-149 tepů za minutu a při anaerobním prahu odpovídající hodnotě 165-169 tepů za minutu. Ačkoliv se hodnoty získané z hodnot laktátu liší od hodnot vypočtených, větší váha je přisouzena právě hodnotám laktátu, jelikož výpočty slouží pouze jako orientační. Zároveň je důležitý vždy individuální přístup ke sportovci, jeho dosavadní tréninkové specializaci, vedení tréninku a v neposlední řadě subjektivní vnímání a jeho vzhled v průběhu zátěžového testování.

Po využití tohoto postupu určení prahů z Tabulky 13 vyplývá, že analyzátor Lactate Scout 4 poskytuje nižší hodnoty na úrovni aerobního prahu, což by při stanovení prahu pouze za použití tohoto analyzátoru mělo za následek nadhodnocení hodnoty tepové frekvence pro

aerobní práh a tedy i zlepšení výkonnosti sportovce oproti realitě. Pokud by tomuto jedinci bylo doporučeno absolvovat déletrvající tréninky v aerobní zóně na vyšší úrovni tepové frekvence (v tomto konkrétním případě o 10 tepů za minutu více než jaká je reálná potřeba), mělo by to v dlouhodobém měřítku za následek přetrénování sportovce vedoucí ke snížení výkonnosti a potenciálně i k větší pravděpodobnosti zranění. Pokud by naopak došlo k podhodnocení prahové tepové frekvence, následek tréninku nastaveného dle těchto výsledků by byla stagnace či dokonce až úpadek výkonnosti sportovce.

K podobnému zjištění dospěl také autor studie zabývající se srovnáním tří analyzátorů laktátu (Buckley, a další, 2003), kdy se míra shody naměřených hodnot snižovala se zvyšující se koncentrací laktátu ve vzorcích, vliv na hodnocení laktátové křivky byl však minimální.

ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsme se věnovali problematice stanovení laktátu při zátěžových vyšetření a vliv použití různých analyzátorů na výstup hodnocení laktátové křivky u vytrvalostního sportovce. Data byla získána při experimentu, který proběhl formou stupňovaného zátěžového testu. Výsledky byly následně vyhodnoceny a graficky znázorněny.

Ze srovnání uvedených v praktické části vyplývá, že automatický laboratorní analyzátor Cobas 8000, námi považován za referenční metodu, dává ve vyšších hodnotách vyšší výsledky než ostatní metody. U analyzátorů Biosen a Lactate Plus se jedná o proporcionální systematickou chybu, tedy o odchylku od referenční metody, jejíž hodnota se zvyšuje se zvyšující se koncentrací. Grafické porovnání analyzátoru Lactate Scout 4 poukázalo spíše na konstantní systematickou chybu, kdy odchylka od referenční metody byla konstantní v celém rozsahu měření.

V další části jsme hodnotili preciznost přístrojů na základě sedmi opakovaných měření na vybraných třech hladinách. Z dat uvedených v Tabulkách 6, 8 a 10 je zřejmé, že nejpřesnější metodou je analyzátor Biosen, jehož variační koeficient nepřekročil 4 %. Velmi přesný se také jeví analyzátor Lactate Plus, jehož variační koeficient se nedostal přes 6 %. Lactate Scout 4 jeví menší preciznost, variační koeficient opakovaných měření po 6. stupni zátěže byl významně vyšší, nepřekročil však 20 %, která jsou obecně považována za hranici použitelnosti metody.

Co se týče vlivu na hodnocení laktátové křivky, jako relevantní se jeví výsledky přístrojů Biosen a Lactate Plus, přístroj Lactate Scout 4 podával na nižších hladinách menší koncentrace laktátu, čímž nadhodnocoval bod aerobního prahu a hodnotu tepové frekvence pro tréninkovou zónu v aerobní oblasti, což může v dlouhodobém měřítku způsobit přetrénování.

SEZNAM LITERATURY

Abali, Emine Ercikan, a další. 2022. *Biochemistry*. Eighth edition. Philadelphia : Wolters Kluwer, 2022. ISBN 978-1-975155-06-3.

Bartoš, Vladimír, a další. 2014. *Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativích výsledků měření v klinických laboratořích*. místo neznámé : EUROPEAN FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE, 11. 11 2014.

Baumgart, a další. 2018. Examination of gas exchange and blood lactate thresholds in Paralympic athletes during upper-body poling. *PLoS ONE*. 2018, 13(10).

Bernášková, Hana. 2022. Ústav klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice Plzeň. *Metody: Laktát (B,P)*. [Online] 29. 04 2022. [Citace: 20. 03 2023.] <https://ukbh.fnplzen.cz/cs/node/988>.

Bielik, Viktor. 2014. *Laktát v športovom tréningu*. Prvé vydanie. Senec, Slovenská republika : Sportdiag team, .o.z., v spolupráci so Slovenskou vedeckou spoločnosťou pre telesnú výchovu a šport, 2014. ISBN 978-80-970342-2-1.

Bonaventura, Jacinta, M, a další. 2015. Reliability and Accuracy of Six Hand-Held Blood Lactate Analysers. *Journal of Sports Science and Medicine*. 01. 03 2015, 14, stránky 203-214.

Buckley, JD, Bourdon, PC a Woolford, SM. 2003. Effect of measuring blood lactate concentrations using different automated lactate analysers on blood lactate transition thresholds. *Journal of Science and Medicine in Sport*. 2003, 6 (4), stránky 408-421.

Dastyh, Milan. 2007. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. 1. vyd. Brno : Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4226-1.

Dohnal, Luděk. 2008. Desatero pro porovnávání výsledků dvou metod. [autor knihy] Rudolf a kolektiv Gaško. *Štatistické metódy pre klinickú epidemiológiu a laboratórnu prax*. Košice : APRILLA, 2008, stránky 21-26.

EKF-diagnostics. 2019. *Biosen C-Line*. [Data Sheet] 5.2-02, Barleben, Germany : HaB direct, 2019.

—. *Lactate Scout 4*. [Product Sheet] 0.0-09.18, Leipzig, Germany : HaB direct.

Fernandes, Tiago Lazzaretti, a další. 2015. Post-analysis methods for lactate threshold depend on training intensity and aerobic capacity in runners. An experimental laboratory study. *Sao Paulo Medical Journal*. 134, 13. 11 2015, 3, stránky 193-198.

Friedecký, B. a Kratochvíla, J. 2019. Nejistota a chyba měření ve zdravotnických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus*. 27 (48), 01 2019, 1, stránky 25-31.

Holeček, Milan. 2006. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vyd. Praha : Grada, 2006. ISBN 978-80-247-1562-9.

Ing. Senf, Václav. 2018. Analytické vlastnosti metody 2017. *PO>STUDIUM*. [Online] 07. 02 2018. [Citace: 08. 03 2022.] <https://postudium.cz/course/view.php?id=404>. ISSN 1803-8999.

Jabor, Antonín. 2008. *Vnitřní prostředí*. 1. vyd. Praha : Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1221-5.

Keir, Daniel, D., a další. 2022. Identification of Non-Invasive Exercise Thresholds: Methods, Strategies, and an Online App. *Sports Medicine*. 52, 02 2022, 2, stránky 237-255.

Kittnar, Otomar. 2020. *Lékařská fyziologie*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha : Grada Publishing, 2020. ISBN 978-80-247-1963-4.

Králová, Blanka. 2001. *Bioanalytické metody*. 3. přepracované vydání. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, 2001. ISBN 978-80-7080-449-0.

Ledvina, Miroslav, Stoklasová, Alena a Cerman, Jaroslav. 2009. *Biochemie pro studující medicíny*. 2. vydání. V Praze : Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1416-8.

Máček, Miloš. 2011. *Fyziologie a klinické aspekty pohybové aktivity*. První vydání. Praha : Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-695-3.

Murray, Robert, K. a Matouš, Bohuslav. 2012. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Praha : Galén, 2012. ISBN 978-80-7262-907-7.

Novabiomedical. lactate-plus. *novabiomedical.com*. [Online] [Citace: 20. 3 2023.] <http://novameters.com/lactate-plus/>.

Pastucha, Dalibor. 2014. *Tělovýchovné lékařství: vybrané kapitoly*. 1. vyd. Praha : Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4837-5.

Paulová, Hana. 2021. *Biochemie pro nelékařské zdravotnické obory*. Brno : Masarykova univerzita, 2021. ISBN 978-80-210-9858-9.

Płoszczyca, Kamila, a další. 2020. Comparison of maximal lactate steady state with anaerobic threshold determined by various methods based on graded exercise test with 3-minute stages in elite cyclists. *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation*. 12, 12 2020, 1, str. 70.

Plzák, Zbyněk. 2012. Metodický list 10 Porovnání výsledků analytických metod. *Eurachem*. [Online] 2012. [Citace: 23. 03 2023.] <http://www.eurachem.cz/wp-content/uploads/2022/07/metodicky-list-10-2018.pdf>.

Prokop, Pavel. 2022. *ABR. Ústav klinické biochemie a hematologie, Fakultní nemocnice. Plzeň* : autor neznámý, 2022. Přednáška.

—. **2017/2018.** *Stanovení glukózy. Ústav klinické biochemie a hematologie, Fakultní nemocnice. Plzeň* : autor neznámý, 2017/2018. Cvičení z klinické biochemie.

Racek, J., a další. 2017. Otrava ethylenglykolem a falešně vysoká hladina laktátu. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2017, Sv. No.1, 25 (46), stránky 32-35.

Racek, Jaroslav a Rajdl, Daniel. 2021. *Klinická biochemie*. Třetí, přepracované a rozšířené vydání. Praha : Galén, 2021. ISBN 978-80-7492-545-0.

Sauer, Christopher M., a další. 2021. Understanding critically ill sepsis patients with normal serum lactate levels: results from U.S. and European ICU cohorts. *Scientific Reports*. 11, 08. 10 2021, 1, str. 20076.

Štern, Petr. 2011. *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. 2., upr. vyd. Praha : Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1979-8.

traininf4endurance.co.uk. 2023. Lactate Threshold Training: The Definitive Guide. *TRAINING4ENDURANCE*. [Online] 2023. [Citace: 24. 03 2023.] <https://training4endurance.co.uk/improve-endurance/lactate-threshold-training/>.

Willkins, Emma a Bell, Tom. 2023. Lactate Testing For Cyclists Explained. *HIGHNORTH*. [Online] 2023. [Citace: 24. 03 2023.] <https://www.highnorth.co.uk/articles/lactate-testing-cycling?rq=using%20lactate%20>.

Zelinka, Tomáš, Turková, Hana a Widimský, Jiří. 2009. Feochromocytom. *Onkologie*. 2009, stránky 343-347.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Žádost o povolení výzkumného šetření	71
Příloha 2 Informovaný souhlas.....	73

PŘÍLOHY

Příloha 1 Žádost o povolení výzkumného šetření



FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ
ZÁPADOČESKÉ UNIVERZITY
V PLZNI

Jméno a příjmení studenta: Zuzana Wolfová
Studijní program/ročník: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví /3.
Akademický rok: 2022/2023

Věc: Žádost o povolení výzkumného šetření na Ústavu sportovní medicíny LF UK v Plzni

Odůvodnění žádosti:

Souhlas s výzkumným šetřením je požadován aktuálně platnou Metodikou zpracování kvalifikačních prací Fakulty zdravotnických studií Západočeské univerzity v Plzni. Metodika ukládá studentům povinnost přiložit do své kvalifikační práce souhlas s výzkumným šetřením, realizovaným v rámci instituce.

¹ BERÁNEK, V., MARTINEK, L., PFEFFEROVÁ, E., KROCOVÁ, J., FIRÝTOVÁ, R. Metodika zpracování kvalifikačních prací. 2. vyd. Plzeň : Fakulta zdravotnických studií Západočeské univerzity v Plzni, 2019, 113 s. ISBN: 978-80-261-0760-6

Vyjádření vedoucího práce k žádosti pro oslovenou instituci:

- Souhlasím
 Nesouhlasím

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Plzni
Ústav sportovní medicíny
a aktivního zdraví
323 00 Plzeň, alej Svobody 76

Datum: 1.2.2023

Podpis: 

Žádost pro oslovenou instituci

Vážený pane docente Kroužecký,

Dovolujeme si Vás požádat o povolení výzkumného šetření na Ústavu sportovní medicíny LF UK v Plzni, jež je součástí závěrečné bakalářské práce studentky Zuzany Wolfové / Srovnání analyzátorů na stavení koncentrace laktátu a vliv na hodnocení laktátové křivky, posluchače/ky bakalářského studijního programu Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, Fakulty zdravotnických studií, Západočeské univerzity v Plzni.

Hlavním cílem této práce je srovnání analyzátorů na stanovení laktátu a aplikace v praxi ve sportovní medicíně.

Sledovaný soubor tvoří vytrvalci (nejpravděpodobněji cyklisté), jedná se o skupinu jedinců běžně testovaných ve sportovní medicíně.

Sběr dat bude proveden měřením koncentrace laktátu na přístroji.

Výzkumné šetření bude provedeno s použitím postupů **anonymizace dat**, plně v souladu s etickými zásadami, aktuálně platnou *Metodikou zpracování kvalifikačních prací* fakulty a standardy akademického psaní.

Závěrečná práce je zpracována pod odborným vedením MUDr. Pavla Brože, Ph.D.

Výsledky šetření Vám po dokončení práce rádi poskytneme.

Prosíme o sdělení Vašeho rozhodnutí:

- Souhlasím
 Nesouhlasím

V Plzni dne 1. 2. 2023

UNIVERZITA KARLOVA -1-
Lékařská fakulta v Plzni
Ústav sportovní medicíny
a aktivního zdraví
323 00 Plzeň, alej Svobody 76

Doc. MUDr. Aleš Kroužecký, Ph.D.

.....
Razítko a podpis zástupce instituce

Příloha 2 Informovaný souhlas

Informovaný souhlas pro zařazení do studie „Analytické možnosti zátěžového vyšetření“

Provedení zátěžového vyšetření se stanovením koncentrací laktátu patří mezi jedno ze základních vyšetření prováděné v rámci zátěžové diagnostiky. Jedná se o zhotovení a následné zhodnocení závislosti koncentrace laktátu na absolvovaném výkonu ve většině případů na bicyklovém nebo běhacím ergometru. Běžně je v této indikaci užívána celá paleta analyzátorů schopných stanovit koncentrace laktátu, nejčastěji se jedná o malé laboratorní, nebo kapesní, tzv. point of care testing (POCT) analyzátory běžně užívané nejen ve sportovní zátěžové laboratoři, ale též v obecné medicíně.

Cílem této studie je provést zhodnocení vyšetřovaných zátěžových parametrů, zejména koncentrací laktátu, v průběhu zátěžového vyšetření, dostupnými metodami.

V průběhu studie podstoupíte zátěžové vyšetření na běhacím nebo bicyklovém ergometru. Před zátěžovým testem Vám bude za aseptických podmínek zavedena kanylka na předloktí k odběru venózní krve k zajištění odběru materiálu během zátěžového testu.

Odběr krve (cca 2 ml) bude probíhat vždy vsedě mezi jednotlivými stupni zátěžového vyšetření. Zátěžový test bude mít cca 5-7 schodů s postupně se zvyšujícími zátěžemi. Celkový objem krve odebrané během testu nepřekročí 30 ml. Odebrané vzorky budou následně testovány pomocí dostupných analyzátorů (stanovení koncentrace laktátu, případně dalších parametrů souvisejících s metabolismem v průběhu zátěže).

V průběhu vyšetření můžete kdykoli ze studie odstoupit.

Prohlášení účastníka ve studii „Analytické možnosti zátěžového vyšetření“

Prohlašuji, že jsem byl seznámen se zátěžovým protokolem a že na své otázky jsem obdržel srozumitelné a jasné odpovědi. Souhlasím s odběry krve během zátěžového vyšetření.

Souhlasím, aby s odebraným materiálem bylo nakládáno podle potřeb studie. Byl jsem ujištěn, že získaná data nebudou postoupena třetím stranám v podobě, která by umožnila mou identifikaci a v případně vědeckých publikací se objeví pouze v podobě souhrnných čísel.

Beru na vědomí, že pokud to budou okolnosti vyžadovat, mohu být ze studie vyřazen. Rovněž jsem pochopil, že mohu kdykoliv ze studie bez udání důvodu odstoupit.

Alex Grossberger 04/06/90

Jméno a datum narození účastníka studie

[Podpis]

podpis

01/02/23

datum

MUDr. Petr Hájek

Vyšetřující lékař

[Podpis]

podpis

1.2.2023

datum