



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie
Slovak Society of Clinical Biochemistry

Recenzovaný časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1/2019

Ročník XXIV.

Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pri SLS
Povolené Ministerstvom Kultúry SR pod reg. č. 1531/96
ISSN 1335-2644



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry
Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1/2019

Ročník XXIV.

PRESEDA REDAKČNEJ RADY

Oliver Rácz

REDAKČNÁ RADA

Ján Balla
Beáta Bolerázska
Dušan Dobrota
Eva Ďurovcová
Michal Farkaš
Vladimír Heriban
Beáta Hubková
Katarína Lepejová
Angela Molčányová
Katarína Šebeková
Ladislav Turecký
Marek Zálešák

RECENZENTI

MUDr. Eva Ďurovcová, PhD.
Ing. Vladimír Heriban, PhD. MBA, MSc.
RNDr. Katarína Lepejová
MUDr. Daniel Magula, CSc.
Ing. Jana Netriová, PhD.
MUDr. Hedviga Pivovarníková
doc. MUDr. Oliver Rácz, CSs., mim. prof.
MUDr. Peter Sečník, jr.

OBSAH

ČLÁNKY IN EXTENSO

KONEČNÁ, M., SEDLÁK, V., KURUCOVÁ, V., PORÁČOVÁ, J., BOROŇOVÁ, I., MYDLÁROVÁ BLAŠČÁKOVÁ, M., GOGALOVÁ, Z., BABEJOVÁ, A., MAJHEROVÁ, M., VAŠKOVÁ, H.: ROZDIELY V ENZÝMOVEJ AKTIVITE A V LIPIDOVOM PROFILE U PACIENTOV S HYPERTENZIOM V ZÁVISLOSTI OD POHLAVIA.....	7
GAŠKO, R., PAVLOV, P., MINÁRIKOVÁ, Z., LAKATOSOVÁ, K., KOČIKOVÁ, E., PODOBOVÁ, M., GAŠPAR, L.: SPRÁVNOSŤ STANOVENIA LDL CHOLESTEROLU VÝPOČTOM NIE JE OVPLYVNENÁ METABOLIZMOM HORMÓNOM ŠTÍTNEJ ŽLAZY	11
GAŠKO, R., NETRIOVÁ, J., LAKATOSOVÁ, K.: VYPOČÍTANÁ HODNOTA APOLIPOPROTEÍNU B POĎLA HWANGA JE SPOLAHLIVOU NÁHRADOU JEHO SKUTOČNEJ SÉROVEJ HODNOTY.....	16
OČENÁŠ, P., VALKO-ROKYTOVSKÁ, M., SALAYOVÁ, A.: BIOLOGICKÝ VÝZNAM KARNOZÍNU A MOŽNOSTI JEHO STANOVENIA.....	24
ČIŽMÁROVÁ, B., BIRKOVÁ, A., KRAUS, V. ml., HUBKOVÁ, B., BOLERÁZSKA, B., MAREKOVÁ, M., EVINOVÁ, A.: VYUŽITIE MITOCHONDRIÁLNEJ RESPIRÁCIE BIELYCH KRVNÝCH ELEMENTOV V MEDICÍNE.....	31
ŠIMKOVÁ, J., MILKOVIČOVÁ, M., VALKO-ROKYTOVSKÁ, M., KOSTECKÁ, Z.: VYUŽITIE AFINITNEJ CHROMATOGRAFIE V PROTEOMIKE.....	34
GAŠKO, R., BIROŠ HRONSKÁ, D., HORVÁTH, R., LAKATOSOVÁ, K., BERNASOVSKÁ, J., BERNASOVSKÝ, I.: ROC KRIVKY – MOŽNOSTI VYUŽITIA V GENETICKÝCH ASOCIAČNÝCH ŠTÚDIÁCH.....	38
MAŠLANKOVÁ, J., TERNAVSKÝ, O., STUPÁK, M., MAREKOVÁ M.: OBRANNÉ ZLOŽKY SLINY AKO MARKERY PARODONTÁLNYCH OCHORENÍ	46
ČUCHRÁČ, L., ŠIMONOVÁ, J., FIRMENT, J., JANÍKOVÁ, M., KYSEL, R., VAŠKOVÁ, J.: STANOVENIE POPERAČNEJ NEUROMUSKULÁRNEJ BLOKÁDY TOF STIMULAČNÝM VZORCOM.....	51
OGURČÁKOVÁ, D., KOČAN, L., ŠIMONOVÁ, J., MARTULIAK, I., SABOL, F., VAŠKOVÁ, J.: OXIDAČNÝ STRES U PACIENTOV DLHODOBO LIEČENÝCH OPIOIDMI.....	57

SÚHRNY

PASTRNÁKOVÁ, E., LAZÚROVÁ, I.: CHOOSING WISELY ALEBO VYBERAJME ROZUMNE	65
LUKÁČOVÁ, E.: TROMBOFILNÉ STAVY	65
PIVOVARNÍKOVÁ, H.: HARMONIZÁCIA PREANALYTICKEJ FÁZY	65
VASILENKOVÁ, A., KIŠŠOVÁ, M., GEREG, P., ŠEBOVÁ, C.: ÚSKALIA PREANALYTICKEJ A ANALYTICKEJ FÁZY U PEDIATRICKÉHO PACIENTA.....	66
ŠALIGOVÁ, J., POTOČNÁKOVÁ, L.: LYZOSOMÁLNE OCHORENIA – NOVINKY V DIAGNOSTIKE A MONITORINGU	67
STRAKOVÁ, B.: eLAB – POHĽAD LABORATÓRIÍ (LOINC – STRAŠIAK ALEBO DOBRÝ POMOCNÍK?).....	67
HERIBAN, V.: SvALZ – MINULOSŤ, SÚČASNOŠŤ A BUDÚCNOSŤ	68
LEPEJ, J., LEPEJOVÁ, K.: FINANČIE & KVALITA ALEBO: KTO ZÍSKAVA FINANČIE A KTO KVALITU?	68

VITKUS, D.: PARTICIPATION IN EQA: HOW OFTEN IS ENOUGH?	69
FRANEKOVÁ, J., JABOR, A.: INTERNÁ KONTROLA KVALITY V REÁLNEJ PRAXI	70
FLAJŠINGROVÁ, J., DEBSOVÁ, A.: CLINICIAN'S REAL LIFE WITH NEW METHODS IN QUALITY CONTROL AREA ON POCT ANALYZERS PRAKTICKÝ POHLED KLINIKA NA NOVÉ METODY V KONTROLE KVALITY U POCT ANALYZÁTORŮ	70
BALLA, J.: VIEME PRAVDU, CELÚ PRAVDU A NIČ, LEN PRAVDU O KVALITE?	71
ČAMAJOVÁ, J.: KONTROLA KVALITY V MOLEKULÁRNEJ GENETIKE	72
SEČNÍK, P. jr., BABIAK, P.: LC-MS/MS V RUTINNEJ PREVÁDZKE	72
JABOR, A., FRANEKOVÁ, J., KUBÍČEK, Z.: DESET KONCEPTŮ PRO POSTANALYTICKOU FÁZU	73
SCHENKOVÁ, K.: JE VÝSTUP Z ALPHA PROGRAMU VŽDY JEDNOZNAČNÝ?	73
ĎUROVCOVÁ, E.: REPORTOVANIE NÁLEZOV ELEKTROFORÉZY A IMUNOFIXÁCIE BIELKOVÍN - POKUS O ŠTANDARDIZÁCIU	74
OSTROŽLÍKOVÁ, M., GÓROVÁ, R.: ACYLKARNITÍNY V DIAGNOSTIKE DEDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORÚCH: VYUŽITIE V KLINICKEJ PRAXI A OBMEDZENIA	75

ČLÁNKY IN EXTENSO



Laboratórna Diagnostika, XXIV, 1, 2019: 7–10

ROZDIELY V ENZÝMOVEJ AKTIVITE A V LIPIDOVOM PROFILE U PACIENTOV S HYPERTENZIOU V ZÁVISLOSTI OD POHLAVIA

Konečná, M.¹, Sedlák, V.¹, Kurucová, V.¹, Poráčová, J.¹, Boroňová, I.¹, Mydlárová Blaščáková, M.¹
Gogaľová, Z.¹, Babejová, A.¹, Majherová, M.², Vašková, H.¹

¹FHPV PU v Prešove, Katedra biológie, Prešov

²FHPV PU v Prešove, Katedra fyziky, matematiky a techniky, Prešov

e-mail: maria.konecna@unipo.sk

SÚHRN

Arteriálna hypertenzia patrí medzi chronické ochorenie, ktoré sa zhoršuje s narastajúcim vekom. V celosvetovej populácii spôsobuje vysoký krvný tlak vznik cievnej mozgovej príhody a polovicu zo všetkých ochorení myokardu zapríčiňujú zvýšené hodnoty krvného tlaku. Celosvetovo je prevalencia arteriálnej hypertenzie mierne vyššia u mužov v porovnaní so ženami. Cieľom práce bolo zhodnotiť antropometrické parametre, enzýmovú aktivitu AST, ALT, GGT a lipidový profil (cholesterol, HDL-C, LDL-C, TAG) u pacientov s arteriálnou hypertenziou v závislosti od pohlavia. Krvné sérum bolo podrobené analýze s využitím absorpčnej fotometrie a enzýmovej kolorimetrie. Systolický tlak a aktivity ALT, AST, GGT boli signifikantne zvýšené u pacientov mužského pohlavia s arteriálnou hypertenziou v porovnaní s pacientmi ženského pohlavia. Naproti tomu, hodnota celkového cholesterolu bola u žien signifikantne znížená.

Kľúčové slová: hypertenzia; krvný tlak; biochemický skríning; enzýmová aktivita

ABSTRACT

Arterial hypertension is a chronic disease that worsens with increasing age. In the global population, high

blood pressure causes stroke and half of all myocardial diseases are caused by elevated blood pressure. Globally, the prevalence of arterial hypertension is slightly higher in men compared to women. The aim of the study was to evaluate anthropometric parameters, enzyme activity AST, ALT, GGT and lipid profile (cholesterol, HDL-C, LDL-C, TAG) in patients with arterial hypertension depending on gender. Blood serum was analyzed using absorption photometry and enzymatic colorimetry. Systolic blood pressure and ALT, AST, GGT activities were significantly increased in male patients with arterial hypertension compared to female patients. In opposition, total cholesterol was significantly reduced in women.

Keywords: hypertension; blood pressure; biochemical screening; enzyme activity

ÚVOD

Arteriálna hypertenzia je celosvetovým zdravotným problémom predstavujúcim rizikový faktor kardiovaskulárnych ochorení. V mnohých prípadoch zvyšuje riziko vzniku infarktu myokardu, mŕtvice alebo zapríčiňuje zlyhanie obličiek. Frekvencia výskytu hypertenzie postupne a progresívne stúpa so zvyšujúcim sa vekom. Celosvetovo je prevalencia arteriálnej hypertenzie mierne vyššia u mužov v porovnaní so ženami (WHO 2019). Rozdiely

v hladinách krvného tlaku v závislosti od pohlavia sa objavujú už počas dospievania, ale u starších pacientov dochádza k posunu v relatívnej prevalencii hypertenzie (G u d m u n d s d o t t i r a kol., 2012). Predmenopauzálne ženy majú nižšie riziko a incidenciu hypertenzie v porovnaní s mužmi, ale táto výhoda pre ženy postupne mizne po menopauze. Dôvod pohlavného rozdielu v hladinách krvného tlaku je multifaktoriálny a nie úplne jasný. Existuje niekoľko hypotéz, vrátane potenciálnej úlohy pohlavných hormónov, renín-angiotenzínového systému (RAS), oxidačného stresu, endotelínu, prírastku hmotnosti a aktivácie sympatika (Oksuzyan a kol. 2015).

Alanínaminotransferáza (ALT), aspartátaminotransferáza (AST), gamaglutamyltransferáza (GGT) sú pečeňové enzýmy, ktoré sa bežne používajú pri krvných testoch funkcie pečene. Zvýšenie hladín ALT, AST a GGT je indikátorom poruchy hepatálnych funkcií. Štúdie ukázali, že zvýšené hladiny v sére sú spojené so zdravotnými stavmi, ako sú mŕtvica, metabolický syndróm a poškodenie pečene. Kombinácie rizikových faktorov, ako je obezita, hypertenzia a dyslipidémia sú dôležitými prediktormi kardiovaskulárnych ochorení (K i m a H a n, 2018). Abnormality hladín lipidov v sére a lipoproteínov sú považované za hlavné rizikové faktory modifikovateľného kardiovaskulárneho ochorenia a boli identifikované ako nezávislé rizikové faktory esenciálnej hypertenzie, ktoré vedú k vzniku dyslipidemickej hypertenzie (O s u j i a kol., 2012; C h o u d h u r y a kol., 2014).

METÓDA

Štúdia bola uskutočnená v roku 2019 v mesiacoch január–marec a zúčastnilo sa jej 150 pacientov s diagnostikovanou hypertenziou 1. a 2. stupňa. Výskumný súbor

Tabuľka 1. Porovnanie antropometrických parametrov medzi súborom mužov a žien

	MUŽI (n=73) ± SD	ŽENY (n=77) ± SD	p
STK [mmHg]	126,57 ± 14,23	118,32 ± 10,40	0,007**
DTK [mmHg]	80,73 ± 5,64	77,33 ± 9,12	0,106
BMI	28,96 ± 3,30	25,01 ± 5,50	0,065**

STK – systolický tlak krvi; DTK – diastolický tlak krvi; BMI – body mass index; n – počet jedincov; ± SD – smerodajná odchýlka; p – štatistická významnosť (**p < 0,01)

vo veku 29–50 rokov bol rozdelený na základe pohlavia muži (n = 73) a ženy (n = 77). Venózna krv bola odoberaná v objeme 10 mL, krvné sérum bolo získané centrifugáciou 10 min./9000 rpm a zmrazené až do analýzy pri –8 °C. Antropometrické meranie pozostávalo z merania systolického a diastolického tlaku krvi. Absorpčnou fotometriou a enzýmovou kolorimetrickou metódou boli stanovené hladiny AST, ALT, GGT, cholesterolu, triacylglycerolov, HDL-C a LDL-C v krvnom sére (Roche Diagnostics, SRN). Údaje boli vyjadrené ako priemer ± štandardná odchýlka merania (SD), použité boli parametrický t-test pre nezávislé výbery a pre porovnanie parametrov navzájom neparametrický nepárový test Mann-Whitneyov U-test.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Podľa R e c k e l h o f f a (2018) je povedomie o hypertenzii väčšie u žien ako u mužov, prevalencia hypertenzie je však vyššia u mužov ako u žien. Nové štúdie o mechanizmoch zodpovedných za medzipohlavné rozdiely v hypertenzii zahŕňajú úlohu napríklad obličiek, renín-angiotenzínového systému a relaxínu. Ženy majú nižšie hladiny systolického krvného tlaku (STK) ako muži v dospelosti, k zmenám dochádza po šiestej dekáde života. Diastolický krvný tlak (DTK) má mierne nižšiu tendenciu u žien v porovnaní s mužmi. Po piatej dekáde života sa však vyskyt

Tabuľka 2 Porovnanie biochemických parametrov medzi súborom mužov a žien

	MUŽI (n=73) ± SD	ŽENY (n=77) ± SD	p
AST [μkat/L]	0,36 ± 0,10	0,31 ± 0,06	0,008**
ALT [μkat/L]	0,54 ± 0,34	0,35 ± 0,18	0,003**
GGT [μkat/L]	0,38 ± 0,30	0,27 ± 0,12	0,029*
CHOL [mmol/L]	5,64 ± 1,26	5,00 ± 0,97	0,025*
LDL-C [mmol/L]	2,94±0,87	3,15±0,88	0,338
HDL-C [mmol/L]	1,94±1,12	2,01±0,53	0,719
TAG [mmol/L]	1,36±0,73	1,33±0,78	0,896

AST – aspartátaminotransferáza, ALT – alanínaminotransferáza, GGT – gama glutamyltransferáza, CHOL – cholesterol, TAG – triacylglyceroly, HDL-C – s vysokou hustotou, LDL-C – s nízkou hustotou, n – počet jedincov, ± SD – smerodajná odchýlka, p – štatistická významnosť (**p < 0,01; *p < 0,05)

hypertenzie zvyšuje rýchlejšie u žien ako u mužov a dosahuje mieru prevalencie, ktorá sa rovná alebo je vyššia ako u mužov počas šiestej dekády života (O p a r i l, M i l l e r, 2005).

Ako ukázali výsledky antropometrickej analýzy v súbore mužov a žien, hladina systolického krvného tlaku bola signifikantne vyššia (** $p < 0,01$) v súbore mužov $126,57 \pm 14,23$ mmHg v porovnaní so súborom žien $118,32 \pm 10,40$ mmHg (tab. 1). Hodnota diastolického krvného tlaku nebola štatisticky významne vyššia v súbore mužov $80,73 \pm 5,64$ mmHg. Štúdia H e l f e r a a M c C u b b i n a (2001) zameraná na vzťah pohlavia a krvného tlaku preukázala štatisticky významný rozdiel v súvislosti medzi hodnotou systolického krvného tlaku a pohlavia (** $p < 0,001$). Avšak vo vzťahu medzi pohlavím a hodnotou diastolického krvného tlaku štatisticky významná súvislosť nebola potvrdená, podobne ako v našej štúdii.

Hodnota indexu telesnej hmotnosti (BMI) v skupine mužov bola $28,96 \pm 3,30$, čo poukazuje na to, že muži mali nadváhu až obezitu. Nižšiu hodnotu BMI mali ženy $25,01 \pm 5,50$. Hodnota BMI v súbore mužov a žien potvrdila signifikantný rozdiel v závislosti od pohlavia (** $p < 0,01$). D u a a kol. (2014) porovnávali antropometrické parametre vo vzťahu k pohlaviu. Priemerné hodnoty ako výška, hmotnosť, obvod hornej časti ramena, tepová frekvencia, STK a DTK boli vyššie u mužov v porovnaní so ženami, s výnimkou hrúbky kožnej riasy. BMI a percento tuku boli zistené vyššie u žien v porovnaní s mužmi. Bola zaznamenaná významná pozitívna korelácia medzi BMI, percentom tuku a krvným tlakom ako STK, tak aj DTK. Hodnota BMI poukázala, že pacienti s nadváhou až obezitou majú častejšie hypertenziu ako pacienti s normálnou hodnotou BMI.

Ženy majú odlišný lipidový profilov ako muži, ktorý je značne rozdielny v období menopauzy. S h a d i d H a b i b a kol. (2005) uvádzajú, že u žien boli nižšie hodnoty pomeru BMI, TAG a vyššie hladiny HDL ako u mužov. Pohlavie ovplyvňuje parametre lipidov a tento účinok je taktiež závislý od veku a stavu menopauzy. Pravdepodobne tieto rozdiely sú spôsobené rôznymi úrovňami cirkulujúcich pohlavných hormónov (estrogény a androgény) u žien a mužov. Framinghamská štúdia u žien vo veku od 29 do 62 rokov, v ktorej boli sledované v dlhodobej štúdii počas 18 rokov, preukázala výrazný nárast hladín sérového cholesterolu medzi predmenopauzou a postmenopauzou, pričom nárast nastal v krátkom čase od začiatku menopauzy, čo svedčí o kauzálnom účinku. Štatisticky význam-

ný rozdiel ($p = 0,025$) sme zistili pri celkovom cholesterole, kde boli priemerné hodnoty celkového cholesterolu v skupine mužov $5,00 \pm 0,97$ mmol/L v porovnaní so súborom žien $5,64 \pm 1,26$ mmol/L. Vyššiu hladinu celkového cholesterolu v súbore mužov predpokladáme, vzhľadom k tomu, že súbor žien tvorili ženy do 50. roku života a zároveň pred menopauzou. Štatisticky významný rozdiel v priemerných hladinách HDL-C, LDL-C a triacylglycerolov nebol potvrdený. J a l a l i a kol. (2013) sledovali rozdielne hladiny celkového cholesterolu, HDL-C a LDL-C a triacylglycerolov medzi mužmi a ženami v iránskej populácii. Ženy mali nižšie hodnoty celkového cholesterolu ($4,53 \pm 0,96$ mmol/L) v porovnaní s mužmi ($4,58 \pm 1,09$ mmol/L). Medzi hodnotami celkového cholesterolu a pohlavím štatistickú významnosť nepotvrdili. Naopak signifikantný rozdiel potvrdili pri porovnaní medzi hladinou LDL-C u žien ($2,77 \pm 0,91$ mmol/l) a mužov ($2,87 \pm 0,85$ mmol/l). U g w u j a a kol. (2013) potvrdili štatisticky významný rozdiel v rámci pohlaví u celkového cholesterolu (* $p < 0,05$).

Pomocou enzýmovej kolorimetrie sme zistili signifikantné rozdiely v ALT, AST a GGT pri porovnávaní súboru mužov a žien. Priemerná hladina enzýmu ALT v súbore mužov ($0,54 \pm 0,34$ μ kat/l) bola signifikantne vyššia (** $p < 0,01$) ako v súbore žien ($0,35 \pm 0,18$ μ kat/L). Signifikantne vyššia hladina enzýmu AST bola taktiež potvrdená (** $p < 0,01$) v súbore mužov. Priemerné hodnoty AST u mužov boli $0,36 \pm 0,10$ μ kat/L v porovnaní so ženami, u ktorých boli priemerné hodnoty AST nižšie ($0,31 \pm 0,06$ μ kat/L). Štatisticky významný rozdiel sme zistili aj pri GGT, kde boli priemerné hodnoty u mužov $0,38 \pm 0,30$ μ kat/L, u žien $0,27 \pm 12$ μ kat/L signifikantne rozdielne (* $p < 0,05$). Vyššie hodnoty pečeneových enzýmov v súbore mužov môžu pravdepodobne súvisieť s vyššou priemernou hmotnosťou a väčším množstvom viscerálneho tuku. Okrem toho viaceré epidemiologické štúdie naznačujú, že vyššia koncentrácia GGT v sére je spojená s rozvojom rizikových faktorov kardiovaskulárneho ochorenia a nezávislých faktorov pre vznik hypertenzie a dyslipidémie (R u t t m a n n, 2005).

ZÁVER

Vzhľadom k zvyšujúcej sa prevalencii vysokého krvného tlaku, nízkemu povedomiu o hypertenzii, medzipohlavným rozdielom a faktorom prospievajúcim k vzniku ochorenia je potrebné zvýšiť a zlepšiť menežment hyper-

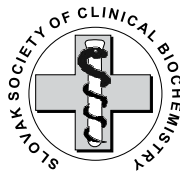
tenzie s cieľom zníženia rizika kardiovaskulárneho ochorenia. Na určenie najlepších možností liečby, ktoré znížia riziko hypertenzie a následných kardiovaskulárnych ochorení u oboch pohlaví, je potrebný ďalší výskum na určenie ako pohlavie moduluje dôležité fyziologické faktory, ktoré ovplyvňujú a kontrolujú hodnoty krvného tlaku.

Podakovanie

Práca vznikla v rámci riešenia projektu *Inovácia metód a foriem výučby predmetu biochémia, KEGA, Projekt č. 018PU-4/2018 a na základe podpory projektov: 001PU-2-1/2018 Rozvoj výskumnej a technickej infraštruktúry Prešovskej univerzity, II. Etapa a APVV-0644-12: Aplikácie „Next generation sequencing“ technológie na molekulárno-genetické analýzy kardiomyopatií v slovenskej populácii so zameraním na rómske etnikum.*

LITERATÚRA

1. **Kim, H. R., Han, M. A. (2018):** Association between Serum Liver Enzymes and Metabolic Syndrome in Korean Adults. *International Journal of Environmental Research and Public Health Article*, 15, p. 1628. doi: 10.3390/ijerph15081658.
2. **Choudhury, K. N. et al. (2014):** Serum lipid profile and its association with hypertension in Bangladesh. *Vascular Health and Risk Management*, 10, pp. 327–332. doi.org/10.2147/VHRM.S61019.
3. **Osuji, CH. U. et al. (2012):** Serum Lipid Profile of Newly Diagnosed Hypertensive Patients in Nnewi, South-East Nigeria. *International Journal of Hypertension*, p.7. doi.org/10.1155/2012/710486
4. **Oksuzyan, A. et al. (2015):** Sex Differences in Biological Markers of Health in the Study of Stress, Aging and Health in Russia. *PLOS ONE*, doi: 10.1371/journal.pone.0131691.
5. **Gudmundsdottir, H. et al. (2012):** Hypertension in women: latest findings and clinical implications. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 3(3) pp. 137–146. doi: 10.1177/2040622312438935,
6. **WHO (2018):** *Global Health Observatory (GHO) data. High blood pressure—Situation and trends.* Dostupné z: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/. (cit: 2019.29.04).
7. **Reckelhoff, J. (2018):** Gender differences in hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 27(3) pp. 176–181, doi: 10.1097/mnh.0000000000000404
8. **Oparil, S., Miller, A. P. (2005):** Gender and Blood Pressure. *The journal of clinical hypertension*, 7 (5) pp. 300–309, doi: 10.1111/j.1524-6175.2005.04087.x
9. **Dua, S. et al. (2014):** Body Mass Index Relates to Blood Pressure Among Adults. In *North American journal of medical sciences*, 6(2) pp. 89–95, doi: 10.4103/1947-2714.127751
10. **Jalali, M. T. et al. (2013):** Reference Ranges for Serum Total Cholesterol, HDL cholesterol, LDL-cholesterol, and VLDL-Cholesterol and Triglycerides in Healthy Iranian Ahvaz Population. *Indian Journal of clinical biochemistry*, 28 (3) pp. 277–282. doi: 10.1007/s12291-012-0268-x
11. **Shadid Habib, S., Aslam, M., Hameed, W. (2005):** Gender differences in lipids and lipoprotein (a) profiles in healthy individuals and patients with type 2 diabetes mellitus. *Pakistan Journal of Physiology*. 1(1–2).
12. **Ruttman, E. et al. (2005):** Health Monitoring and Promotion Program Study Group. Gamma glutamyl transferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiological investigation in a cohort of 163,944 Austrian adults. *Circulation*. 112 (14) pp.2130–7. doi: 10.1161/circulationaha.105.552547.



SPRÁVNOSŤ STANOVENIA LDL CHOLESTEROLU VÝPOČTOM NIE JE OVPLYVNENÁ METABOLIZMOM HORMÓNOV ŠTÍTNEJ ŽĽAZY

Gaško, R.¹, †Pavlov, P.¹, Mináriková, Z.², Lakatosová, K.³, †Kočíková, E.⁴, Podobová, M.⁵, Gašpar, Ľ.²

¹Vysokošpecializovaný odborný ústav geriatrický sv. Lukáša v Košiciach n.o., Košice

²2. interná klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice, Bratislava

³OKB, Nemocnica s poliklinikou n.o., Kráľovský Chlmec

⁴OKB, Regionálna nemocnica Sobrance, n.o., Sobrance

⁵Endokrinologická ambulancia, Endotopmed s.r.o., Bratislava

e-mail: biostatistikakosice@gmail.com

SÚHRN

Cieľom štúdie je zistiť, či hypotyreóza a/alebo hypertyreóza majú vplyv na spoľahlivosť stanovenia LDL-cholesterolu (LDL-C) Friedewaldovým vzorcom a Martinovým vzorcom. V komparatívnej štúdii sa porovnávali odchýlky stanovenia LDL-C vzorcami podľa Friedewalda a Martina v skupinách neliečených pacientov a v skupinách pacientov v stave eutyreózy u 40 novodiagnostikovaných pacientov s autoimunitnou hypotyreózou (36 žien, 4 muži) a 30 novo diagnostikovaných pacientov s autoimunitnou hypertyreózou (25 žien, 5 mužov).

Odchýlky LDL-C podľa Friedewalda ani LDL-C podľa Martina od meraného LDL-C v jednotlivých súboroch nemali systémový charakter. Rozdiely v spoľahlivosti oproti meranému LDL-C medzi jednotlivými súbormi je možné vysvetliť dobre popísanou variabilitou LDL-C podľa Friedewalda v závislosti od koncentrácie TAG a TC. Hodnoty LDL-C podľa Martina boli v 6 súboroch vyššie než hodnoty LDL-C podľa Friedewalda, v jednom súbore boli hodnoty totožné.

Nezistili sme systémové ovplyvnenie presnosti stanovenia LDL-cholesterolu podľa Friedewalda, ani podľa Martina, hypofunkciou ani hyperfunkciou štítnej žľazy.

Kľúčové slová: LDL-cholesterol, Friedewaldova rovnica, Martinova rovnica, reliabilita stanovenia, hypertyreóza, hypotyreóza

ABSTRACT

Objective: The main purpose, intent of the study is to determine whether hypothyroidism and/or hyperthyroidism has any significant effect on the reliability of the LDL-cholesterol (LDL-C) estimation by the Friedewald and the Martin equation.

Design: Comparative Study

Material and Methods: 40 patients with newly diagnosed autoimmune hypothyroidism (36 female, 4 male). Comparison of the deviations of the LDL-C assessments by the Friedewald and the Martin equation in a group of non-treated patients in an euthyreotic state.

Results: The deviations in the LDL-C levels estimated by Friedewald or by Martin showed a non-systematic character. The differences in reliability from the measured LDL-C between the individual groups can be explained with the well-known variability of the LDL-C estimation by Friedewald in dependence on the TAG and TC levels. The LDL-C level estimations calculated by the Martin equation were higher than the estimations calculated by Friedewald in 6 instances, in one instance the values were identical.

Conclusion: Systematic effect on the reliability of LDL-Cholesterol estimated either by the Friedewald or the Martin equation by the hyper- or hypofunction of the thyroid gland was not discovered.

Keywords: LDL-cholesterol, reliability of calculation, Friedewald formula, Martin formula, hyperthyroidism, hypothyroidism

ÚVOD

Pri overovaní správnosti stanovenia apolipoproteínu B (apoB) výpočtom na rôzne definovaných súboroch pacientov (C i b i c k o v a et al., 2016) sme zistili, že validita výpočtu u pacientov s novozistenými poruchami funkcie štítnej žľazy, teda neliečenými hypo- aj hypertyreózami, je podstatne nižšia než u metabolicky kompenzovaných porúch (G a š k o a kol., 2015). Vstupnými meranými parametrami pre výpočet apoB sú hodnoty celkového cholesterolu (TC), HDL-cholesterolu (HDL-C) a triacylglycerolov (TAG). Rovnaké vstupné merané parametre sa používajú na výpočet LDL-cholesterolu podľa Friedewalda (LDL-C Friedewald), ako aj na sofistikovanejší nový výpočet podľa Martina (LDL-C Martin) (M a r t i n et al., 2013). Stanovenie LDL-C výpočtom je aj v súčasnosti, napriek lokálnym snahám o výlučné použitie analytických metód stanovenia, odporúčané v medzinárodných pokynoch (L a n g l o i s et al., 2018) aj autoritami (M e n d e s de C o r d o v a et al., 2018, Q u i s p e et al., 2017). Limity použitia Friedewaldovej rovnice pri niektorých metabolických chorobách, ktoré majú vplyv na manažment liečby (R e i g n e r et al., 2017), sú za vyše 40 rokov jej masového používania dobre popísané (G a š k o, 2011). Tyreopatie sme medzi nimi nezaznamenali. Zaujímalo nás preto, či tyreopatie majú na stanovenie LDL-C výpočtom obdobný vplyv ako na stanovenie ApoB výpočtom.

Súbory pacientov a metodika

Charakteristika pacientov a popis použitých laboratórnych metód sú podrobne uvedené v práci (M i n a r i k o v a et al., 2014). Skrátene, boli vytvorené dve skupiny pacientov. Do prvej skupiny bolo zaradených 40 novodiagnostikovaných pacientov s autoimunitnou hypotyreózou (36 žien, 4 muži). Druhá skupina zahŕňala 30 novo diagnostikovaných pacientov s autoimunitnou hypertyreózou (25 žien, 5 mužov). Pacienti boli klasifikovaní ako hypotyreoidní ak hladina TSH v sére bola > 5 mIU/l alebo hypertyreoidní ak hladina TSH v sére bola $< 0,5$ mIU/l, pričom do úvahy boli brané aj hodnoty FT4. Referenčný rozsah hodnôt v laboratóriu je: TSH (0,55–4,78 mIU/l); FT4 (11,5–22,7 pmol/l). Vylučovacie kritériá pre zaradenie boli:

diabetes mellitus, iné choroby endokrinného systému, familiárna hypercholesterolémia, ochorenie pečene alebo obličiek, tehotné ženy, pacienti po mŕtvici, srdcový infarkt, rakovina, pankreatitída, zneužívanie alkoholu a používanie hypolipidemík.

LDL-C bol meraný selektívnou enzýmovou metódou (Erba-Lachema, Brno). Pre výpočet podľa Friedewalda bolo v menovateli použité číslo 2,19. Pre výpočet podľa Martina boli v menovateli použité čísla uvedené v práci (M a r t i n et al., 2013) prepočítané na jednotky mmol/l.

Porovnávania boli robené na týchto rôzne definovaných súboroch:

1. Súbor všetkých LDL-C, $n = 136$, získaný od 68 pacientov pri prvom odbere krvi pred liečbou a druhom počas liečby.
2. Súbor LDL-C od pacientov s hypertyreózou, $n = 60$, získaný od 30 pacientov pri prvom odbere krvi pred liečbou a druhom počas liečby.
3. Súbor LDL-C od pacientov s hypotyreózou, $n = 76$, získaný od 38 pacientov pri prvom odbere krvi pred liečbou a druhom počas liečby.
4. Súbor LDL-C od pacientov s hypertyreózou, $n = 30$, získaný od 30 pacientov pri prvom odbere krvi pred liečbou (boli vylúčené 2 vzorky s hodnotou TAG nad 4,5 mmol/l).
5. Súbor LDL-C od pacientov s hypertyreózou, $n = 28$, získaný od 28 pacientov pri druhom odbere krvi počas liečby.
6. Súbor LDL-C od pacientov s hypotyreózou, $n = 40$, získaný od 40 pacientov pri prvom odbere krvi pred liečbou.
7. Súbor LDL-C od pacientov s hypotyreózou, $n = 40$, získaný od 40 pacientov pri druhom odbere krvi počas liečby.

Porovnávanie dvoch metód stanovenia bolo vykonané Linovým korelačným koeficientom zhody, Pearsonovým koeficientom poradovej korelácie a metódou podľa B l a n d a a A l t m a n a. Pre non-normálnu distribúciu niektorých súborov bol pre testovanie rozdielov použitý neparametrický Wilcoxonov test.

VÝSLEDKY

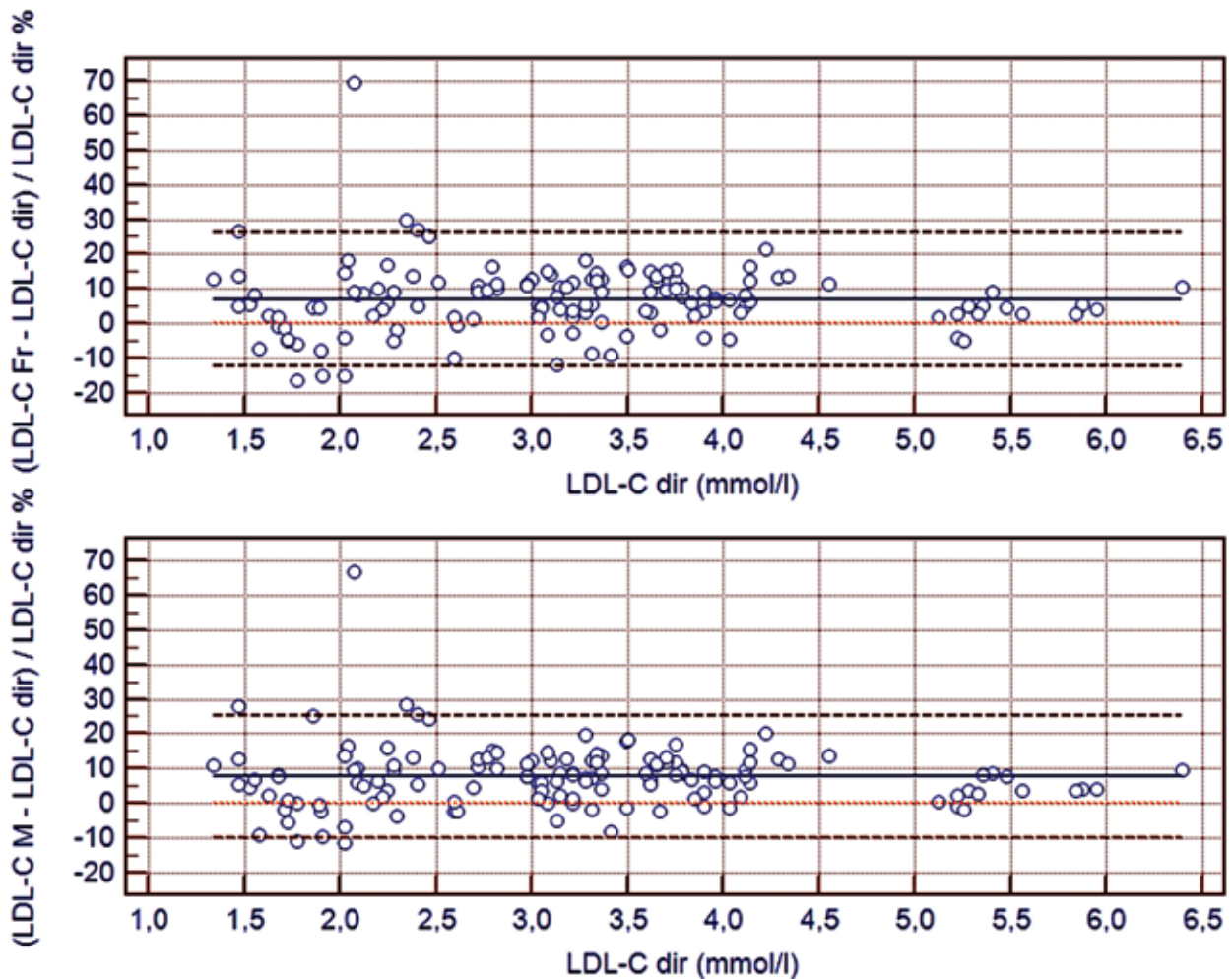
Výsledky sú uvedené v tabuľke 1 a na obrázku 1.

Odchýlky LDL-C Friedewald ani LDL-C Martin od meraného LDL-C v jednotlivých súboroch nemali systémový cha-

Tabuľka 1. Porovnanie troch metód stanovenia LDL-cholesterolu

Skupina	Metóda	Priemer/95% CI [mmol/L]	rozdiel *	pc/95% CI	r	Wilcoxon test**	Wilcoxon test***
Celý súbor n = 136	LDL-C dir	3,20/3,01–3,39	0,00%				
	LDL-C Friedewald	3,43/3,22–3,63	7,19%	0,955/0,939–0,967	0,976	p < 0,001	
	LDL-C Martin	3,45/3,24–3,65	7,81%	0,957/0,942–0,968	0,981	p < 0,001	p = 0,301
Hypertyreóza n = 60	LDL-C dir	2,66/2,43–2,88	0,00%				
	LDL-C Friedewald	2,90/2,64–3,17	9,02%	0,936/0,906–0,957	0,982	p < 0,001	
	LDL-C Martin	2,90/2,64–3,16	9,02%	0,940/0,911–0,960	0,984	p < 0,001	p = 0,379
Hypotyreóza n = 76	LDL-C dir	3,64/3,84–3,89	0,00%				
	LDL-C Friedewald	3,84/3,58–4,11	5,49%	0,952/0,927–0,968	0,969	p < 0,001	
	LDL-C Martin	3,88/3,61–4,14	6,59%	0,952/0,928–0,968	0,975	p < 0,001	p = 0,036
Hypertyreóza pred liečbou n = 30	LDL-C dir	2,05/1,89–2,20	0,00%				
	LDL-C Friedewald	2,17/1,96–2,38	5,85%	0,834/0,712–0,907	0,897	p = 0,019	
	LDL-C Martin	2,18/1,99–2,37	6,34%	0,846/0,724–0,917	0,900	p = 0,006	p = 0,975
Hypertyreóza v stave eutyreózy n = 30	LDL-C dir	3,26/2,98–3,55	0,00%				
	LDL-C Friedewald	3,63/3,31–3,95	11,35%	0,891/0,821–0,934	0,990	p < 0,000	
	LDL-C Martin	3,62/3,30–3,94	11,04%	0,895/0,827–0,937	0,990	p < 0,000	p = 0,285
Hypotyreóza pred liečbou n = 38	LDL-C dir	3,86/3,45–4,28	0,00%				
	LDL-C Friedewald	4,06/3,61–4,50	5,18%	0,954/0,915–0,975	0,966	p = 0,002	
	LDL-C Martin	4,12/3,68–4,55	6,74%	0,953/0,915–0,974	0,973	p < 0,001	p = 0,004
Hypotyreóza v stave eutyreózy n = 38	LDL-C dir	3,41/3,13–3,69	0,00%				
	LDL-C Friedewald	3,63/3,32–3,93	6,45%	0,942/0,898–0,967	0,973	p < 0,001	
	LDL-C Martin	3,64/3,41–3,93	6,74%	0,944/0,903–0,968	0,978	p < 0,001	p = 0,890

LDL-C dir – LDL-cholesterol meraný selektívnou enzýmovou metódou (Erba-Lachema, Brno); CI – interval spoľahlivosti; pc – Linov korelačný koeficient zhody; r – Pearsonov korelačný koeficient *Rozdiel v priemere oproti LDL-C dir, pričom LDL-C dir = 100%; **Wilcoxonov test oproti LDL-C dir; ***Wilcoxonov test LDL-C Friedewald proti LDL-C Martin; Ak je výsledná hodnota P < 0,05, potom je možné akceptovať, že medián rozdielov medzi párovými pozorovaniami je štatisticky významne odlišný od 0



Obrázok 1. Bland-Altmanove grafy pre celý súbor, 136 meraní

Horný graf – porovnanie meraného LDL-C (LDL-C dir) a LDL-C vypočítaného podľa Friedewalda (LDL-C Fr).

Dolný graf – porovnanie meraného LDL-C a LDL-C vypočítaného podľa Martina (LDL-C M).

Bodkovaná čiara = čiara dokonalej zhody metód (rozdiel = 0). Plná hrubá čiara = priemer rozdielov.

Hrubé čiarkované čiary = hodnoty 1,96 SD na obe strany

rakter. Rozdiely v reliabilite oproti meranému LDL-C medzi jednotlivými súborami je možné vysvetliť dobre popísanou variabilitou LDL-C Friedewald v závislosti od výšky TAG a TC (Martin et al., 2013, Nauck et al., 2002).

Hodnoty LDL-C Martin boli v 6 súboroch vyššie než hodnoty LDL-C Friedewald, v jednom súbore boli hodnoty totožné. To je v súlade so zisteniami pri meraní LDL-C referenčnou metódou (Martin et al., 2013).

ZÁVER

Nezistili sme systémové ovplyvnenie presnosti stanovenia LDL-C podľa Friedewald, ani LDL-C Martin, hypo- ani hyperfunkciou štítnej žľazy.

LITERATÚRA

1. Cibickova, L. et al. (2016): The determination of apolipoprotein B by calculation and by measurement on set of dyslipidemic patients. *Atherosclerosis*. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.577.
2. Gaško, R. (2011): Systematický prehľad: Porovnanie priamych a nepriamych metód stanovenia LDL-cholesterolu. *Laboratórna Diagnostika*, 2011, 16(1–2): 37–65.
3. Gaško, R. a kol. (2015): Kvalitatívne a kvantitatívne zmeny lipidových subfrakcií pri tyreopatiách majú vplyv na presnosť stanovenia apolipoproteínu B výpočtom podľa Hwanga. *Laboratórna Diagnostika*, 2015, 20(2): 57–66.
4. Langlois, M.R. et al. (2018): Quantifying Atherogenic Lipoproteins: Current and Future Challenges in the Era of Per-

- sonalized Medicine and Very Low Concentrations of LDL Cholesterol. A Consensus Statement from EAS and EFLM. *Clinical Chemistry*, 2018, 64(7): 1006–1033. doi: 10.1373/clinchem.2018.287037.
5. **Martin, S.S. et al. (2013):** Friedewald-estimated versus directly measured low-density lipoprotein cholesterol and treatment implications. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62: 732–9. doi: 10.1016/j.jacc.2013.01.079.
 6. **Mendes de Cordova, C.M. et al. (2018):** Evaluation of a new equation for LDL-c estimation and prediction of death by cardiovascular related events in a German population-based study cohort. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2018, 78(3): 187–196. doi: 10.1080/00365513.2018.1432070.
 7. **Minarikova, Z. et al. (2014):** The effects of treatment on lipoprotein subfractions evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis in patients with autoimmune hypothyroidism and hyperthyroidism. *Lipids in health and disease*, 2014, 13(1), 158. doi: 10.1186/1476-511X-13-158.
 8. **Nauck, M., Warnick, G.R., Rifai, N. (2002):** Methods for Measurement of LDL-Cholesterol: A Critical Assessment of Direct Measurement by Homogeneous Assays versus Calculation. *Clinical Chemistry*, 2002, 48(2): 236–254.
 9. **Quispe, R. et al. (2017):** Accuracy of low-density lipoprotein cholesterol estimation at very low levels. *BMC Medicine*, 2017, 15: 83. doi: 10.1186/s12916-017-0852-2.
 10. **Reignier, A. et al. (2014):** Comparison of calculated LDL cholesterol (LDL-C) versus measured LDL cholesterol (LDL-M) and potential impact in terms of therapeutic management. *Annales de biologie clinique*, 2014, 72(5): 593–598. doi: 10.1684/abc.2014.0990.
-



Laboratórna Diagnostika, XXIV, 1, 2019: 16–23

VYPOČÍTANÁ HODNOTA APOLIPOPROTEÍNU B PODĽA HWANGA JE SPOĽAHLIVOU NÁHRADOU JEHO SKUTOČNEJ SÉROVEJ HODNOTY

Gaško. R.¹, Netriová, J.^{2,3}, Lakatosová, K.⁴

¹Klinická epidemiológia a bioštatistika, EduStat, s. r. o., Košice

²Nemocnica sv. Michala, a. s., Bratislava

³Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín

⁴OKB, Nemocnica s poliklinikou n. o., Kráľovský Chlmec

e-mail: biostatistikakosice@gmail.com

SÚHRN

Nová metóda stanovenia apolipoproteínu B100 výpočtom podľa Hwanga vyžaduje verifikáciu.

V analytickej observačnej prierezovej štúdií sme porovnali meraný ApoB (ApoBdir) s rovnicou na výpočet ApoB autorov Hwang a kol. (ApoBhwang) na dvoch vzájomne nezávislých súboroch dát, súbor Bratislava2, n = 163 a súbor Tbilisi, n = 1519.

Korelačný koeficient zhody pre súbor Bratislava2 bol 0,9624 (95 % CI 0,9501 až 0,9718). Rovnica Passing-Bablokovej regresie bola nasledovná: $y = 0,0864 + 0,923x$, pričom $x = \text{ApoBdir}$. Korelačný koeficient zhody pre súbor Tbilisi bol 0,6370 (95 % CI 0,6094 až 0,6631). Rovnica Passing-Bablokovej regresie pre tento súbor: $y = 0,173 + 0,771x$. Pre závažné metodické nedostatky súboru Tbilisi však nie je možné výsledky pre tento súbor vyhodnocovať.

Upravená rovnica podľa Hwanga sa zdá byť vhodná pre odhad apolipoproteínu B v epidemiológii a v klinickej praxi.

Kľúčové slová: apolipoproteín B, imunoturbidimetrické meranie, stanovenie výpočtom, rovnica podľa Hwanga

ABSTRACT

Introduction: A new method for determination of apolipoprotein B100 calculation according to Hwang requires verification in various clinical situations. We evaluate an agreement between estimated apolipoprotein B-100 concentration and apolipoprotein B-100 concentration measured by immunoturbidimetric method.

Methods: This study was an analytical observational cross sectional design. We compared the measured ApoB (ApoBdir) with the equation according Hwang et al (ApoBhwang). The study was conducted on two interdependent sets of data. Bratislava2, n = 163 and Tbilisi, n = 1519.

Results: Concordance correlation coefficient (CCC) for dataset Bratislava (95 % CI 0,9501 to 0,9718). Passing-Bablok equation $y = 0,0864 + 0,923x$, for ApoBdir as x. CCC for dataset Tbilisi 0,6370 (95 % CI 0,6094 to 0,6631). Passing-Bablok equation $y = 0,173 + 0,771x$. However, it is not possible to evaluate the results for this file for the serious methodological deficiencies of the Tbilisi file.

Conclusion: The modified equation by Hwang seems to be suitable for use in clinical epidemiology and routine clinical practice.

Keywords: Apolipoprotein B, immunoturbidimetric measurement, calculation, equation by Hwang

ÚVOD

Dôkazy o tom, že stanovenie apolipoproteínu B100 (ApoB) má pri odhade kardiovaskulárneho rizika porovnateľnú až vyššiu výpovednú hodnotu ako LDL-cholesterol a/alebo non-HDL cholesterol, neustále pribúdajú (P e n c i n a et al., 2015, S a n d h u et al., 2016, S n i d e r m a n et al., 2016). ApoB sa v nových verziách pokynov stáva súčasťou liečebných cieľov (C a t a p a n o et al., 2016, F e r e n c e et al., 2017, G a r b e r et al., 2017). Občas je mu dokonca ako primárnemu cieľu liečby predpovedaná lepšia budúcnosť než LDL-cholesterolu: „Hodnoty a preferencie. Pretože lekári sú najviac oboznámení s LDL-C, naďalej odporúčame jeho použitie ako primárneho cieľa, ale v budúcnosti očakávame posun k prednostnému používaniu iných ako napríklad non-HDL-C alebo apoB“ (A n d e r s o n et al., 2016). Napriek tomu je ApoB v klinickej praxi, aj na Slovensku, iba zriedkavo meraný spolu so štandardnými lipidmi pri hodnotení dyslipidémie.

Rovnako ako poznatky o klinickom význame, aj poznatky o možných metódach stanovenia ApoB intenzívne pribúdajú. V ostatných 6 rokoch bolo publikovaných a overovaných niekoľko rovníc na výpočet ApoB zo štandardných lipidov. Z nich najvalidejšia podľa našich predošlých zistení bola rovnica podľa H w a n g a (G a š k o, 2015, H w a n g et al., 2012, H w a n g et al., 2017), v našej modifikácii (G a š k o et al., 2017).

Cieľom tejto práce bolo validácia stanovenia ApoB Hwangovou rovnicou v našej modifikácii na ďalších dvoch nezávislých súboroch.

Súbory pacientov

Súbor Bratislava 2 (upresnenie číslicou 2 pre zabránenie omylu; jedná sa o iný súbor než súbor Bratislava v našej predošlej práci G a š k o et al., 2017)

Súbor tvorilo 51 dobrovoľných darcov krvi a 112 pacientov zo všeobecnej ambulancie v rámci preventívnej prehliadky, spolu 163 probandov. Celý súbor pozostával zo 63 žien (38,7 %) a 100 mužov (61,3 %). Ich vek sa pohyboval v rozmedzí 21–74 rokov (priemerný vek 45,9 rokov). Odbery krvi ráno nalačno, analýza krvných vzoriek sa uskutočnila v priebehu júla 2014 až decembra 2014 na Oddelení klinickej biochémie a hematológie Nemocnice svätého Michala v Bratislave (OKBH nSM).

Biologický materiál bol analyzovaný prostredníctvom prístroja Olympus AU400. Použité boli fotometrické a imunoturbidimetrické metódy. Na stanovenie lipidových para-

metrov boli použité reagenty firmy Randox. Podrobnejší popis súboru a metód je v uvedených prácach (K u l i c h o v á, N e t r i o v á, 2017).

Súbor Tbilisi

Súbor tvorilo 1519 Gruzíncov kaukazského pôvodu, ktorí boli vyšetrení v National Institute of Endocrinology (Tbilisi State University Affiliated Clinic) a „Medicore“ Ltd. (Tbilisi State Medical University Affiliated Clinic) v rokoch 2012–2013. Boli to muži a netehotné ženy vo veku medzi 18 až 80 rokov (653 žien, 866 mužov). Ďalšími exklúznymi kritériami bol *diabetes mellitus* a/alebo hodnota glukózy nalačno ≥ 7 mmol/L a/alebo postprandiálne ≥ 11.1 mmol/L.

ApoB bol meraný imunoturbidimetrickým setom Roche na analyzátoch Roche/Hitachi C311. Ostatné lipidové parametre boli merané diagnostickými setmi firmy HUMAN Diagnostics (Nemecko) na analyzátoch HUMALYZER 2000. Podrobný popis súboru a metód je v uvedených prácach (M a k a r i d z e et al., 2014). Z pôvodného súboru 1522 pacientov boli vylúčené 3 vzorky s extrémnymi hodnotami TAG viac než 5,5 mmol/L.

METÓDY

Porovnali sme meraný ApoB (ApoB) s rovnicou na výpočet ApoB autorov Hwang a spol. (H w a n g et al., 2012; ApoB_{Hwang}) v našej úprave (G a š k o et al., 2017).

Rovnica Hwang je vlastne sústavou 2 rovníc, ktoré používajú na výpočet ApoB namerané hodnoty celkového cholesterolu (TC), triacylglycerolov (TAG) a HDL-cholesterolu (HDL).

Modifikované rovnice Hwang (ApoB_{Hwang} korig) majú takýto tvar:

$$\text{ApoB (g/L)} = ((25,1\text{TC} - 22,8\text{HDL} + 0,88\text{TAG}))/100 + K, \text{ ak TAG} \leq 3,05 \text{ mmol/L}$$

$$\text{ApoB (g/L)} = ((25,6 + 22,4\text{TC} - 14,7\text{HDL} - 5,3\text{TAG}))/100 + K, \text{ ak TAG} > 3,05 \text{ mmol/L}$$

Konštanta K sa získava v každom laboratóriu individuálne kalibrovaním po porovnaní 20 nameraných a vypočítaných ApoB.

Porovnávanie dvoch metód stanovenia bolo vykonané metódou podľa P a s s i n g a a B a b l o k a, s vykreslením 95%-ných intervalov spoľahlivosti (konfidenčných intervalov CI) pre regresnú priamku (M i k u l e c k ý, 2004). Ako

ďalší spôsob vyhodnocovania bol zvolený Lin-ov korelačný koeficient zhody (concordance correlation coefficient, CCC; Lin, 1989). Podľa našich vedomostí tento spôsob vyhodnocovania bol doteraz v slovenskom písomníctve použitý iba raz (Gašková et al., 2015), a to napriek tomu, že pri štúdiách porovnávajúcich dve metódy má podstatne vyššiu výpovednú hodnotu než bežne používaný Pearsonov korelačný koeficient (King, Chinchilli, 2001). CCC pc obsahuje meranie presnosti (precision) ρ a meranie správnosti (accuracy) C_b . Písmeno ρ (grécke písmeno ró; r) je Pearsonov korelačný koeficient, ktorý meria ako ďaleko je každé meranie vzdialené od priamky zhody, čo je miera presnosti. C_b je korekčný faktor na bias, teda systémová odchýlka ktorá vyjadruje, ako ďaleko je priamka zhody odchýlená od ideálnej priamky zhody, ktorá prechádza nulovými hodnotami osí x a y a zvierá s osou x uhol 45 stupňov. Pre vyhodnocovanie CCC navrhol McBride (McBride et al., 2005) nasledovnú deskriptívnu stupnicu: hodnota $pc < 0,90$ znamená zlý stupeň zhody, $0,90$ až $0,95$ mierny stupeň, $0,95$ až $0,99$ výborný (v originále substantial) stupeň, $> 0,99$ takmer dokonalý. V reálnych podmienkach rutínnej laboratórnej práce sa u meraného apolipoproteínu B medzilaboratórne dosahujú hodnoty $0,90$ až $0,95$ (Marcovina, Packard, 2006).

Výpočty a grafy boli vykonané v programe MedCalc Statistical Software verzia 17.6 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgicko).

VÝSLEDKY

V tabuľke 1 sú uvedené základné charakteristiky meraných a vypočítaných lipidových a apolipoproteínových parametrov oboch súborov.

CCC pre súbor Bratislava2 má hodnotu $0,9624$, čo je výborný stupeň zhody. CCC pre súbor Tbilisi má hodnotu $0,6370$, čo je zlý stupeň zhody.

Na obrázku 1 je vykreslená Passing-Bablokova regresia. Na obrázku 2 je vykreslený graf rezíduí pre Passing-Bablokovu regresiu s rovnicou regresnej priamky. Na obrázku 3 je vykreslený horský graf. Všetky 3 obrázky pre súbor Bratislava2.

Na obrázkoch 4, 5 a 6 sú obdobne vykreslené grafy pre súbor Tbilisi.

K obrázku 2 je pre súbor Bratislava2 zostatková smerodajná odchýlka (residual standard deviation, RSD) = $0,05732$, $\pm 1,96$ RSD interval $-0,1123$ to $0,1123$. Ku obráz-

Tabuľka 1. Základné charakteristiky meraných a vypočítaných lipidových a apolipoproteínových parametrov oboch súborov pacientov

Parameter	Súbor	
	Bratislava2	Tbilisi
n =	163	1519
Cholesterol [mmol/L]	$5,89 \pm 1,16$	$4,70 \pm 0,79$
HDL-cholesterol [mmol/L]	$1,49 \pm 0,37$	$1,29 \pm 0,25$
Triacylglyceroly [mmol/L]	$1,77 \pm 1,30$	$1,95 \pm 0,48$
ApoB [g/L]	$1,19 \pm 0,33$	$0,81 \pm 0,34$
ApoBHWangkorig [g/L]	$1,19 \pm 0,30$	$0,81 \pm 0,24$
CCC ApoB vs ApoBHWangkorig	0,9624	0,6370
95% CI	0,9501 až 0,9718	0,6094 až 0,6631
konštanta K [g/L]	0,041	0,092

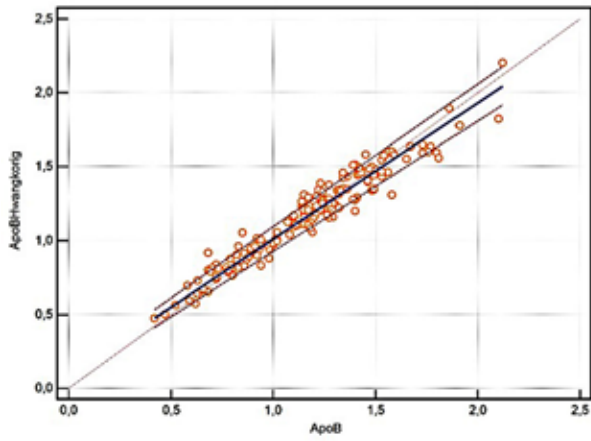
Hodnoty sú uvedené ako aritmetický priemer \pm smerodajná odchýlka.

ku 5 je pre súbor Tbilisi RSD = $0,2024$, $\pm 1,96$ RSD interval $-0,3966$ až $+0,3966$. Hodnoty RSD pre Bratislava2 sú blízke nule, pre Tbilisi sú vyššie.

Na horských grafoch oboch súborov je jasne viditeľný podstatný rozdiel medzi súbormi: Obidva súbory majú 50. percentil na hodnote rozdielu medzi ApoB a ApoBHWangkorig 0 mmol/L, čo je spôsobené korekciou pridaním konštanty K ku vzorcu. Avšak rozptýl rozdielov, vyjadrený hodnotami 10. a 90. percentilu, je v súbore Bratislava2 veľmi nízky, $-0,11$ mmol/L a $+0,12$ mmol/L, zatiaľ čo v súbore Tbilisi je vysoký, $-0,30$ mmol/L a $+0,29$ mmol/L. Ešte výraznejší rozdiel je na úrovni 5. a 95. percentilu, v súbore Bratislava2 $-0,12$ mmol/L a $+0,14$ mmol/L, v súbore Tbilisi $-0,39$ mmol/L a $+0,50$ mmol/L.

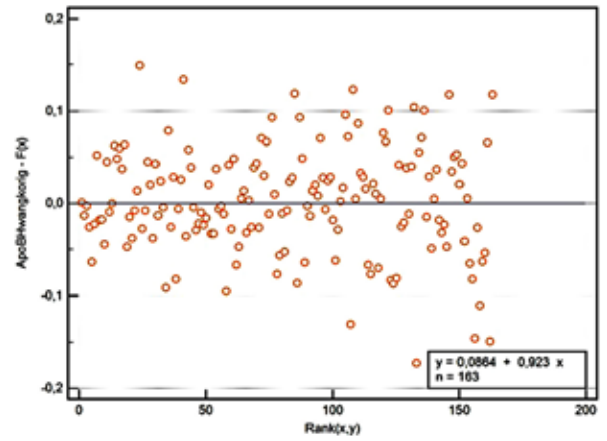
Pomocnou grafickou metódou, ktorá umožňuje opticky odhadnúť proporcionalitu rozloženia hodnôt meraných lipidových parametrov, je dvojrozmerný bodový graf dvojitých parametrov.

Na obrázku 7 sú dve trojice dvojrozmerných bodových grafov pre vzájomný vzťah hodnôt TC a HDL-C, TC a TAG, HDL-C a TAG. V prvom stĺpci sú hodnoty z celého súboru Tbilisi, $n = 1519$. Na grafoch sa nejasne črtajú dve krivky s vyššou hustotou bodov. V druhom stĺpci je výrez, súbor

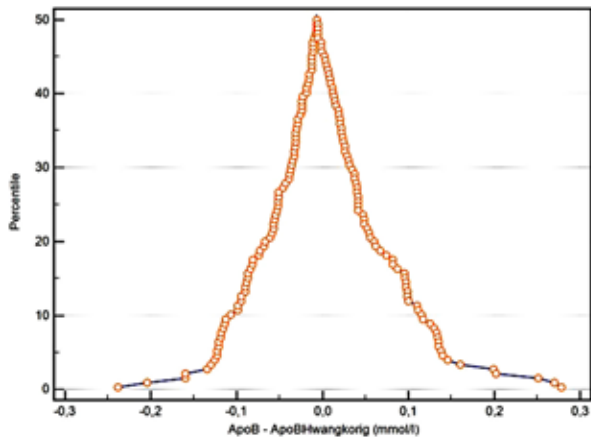


Obrázok 1. Súbor Bratislava2, bodový graf a vykreslenie Passing-Bablokovej regresnej priamky pre porovnanie dvoch metód stanovenia ApoB [g/L], priamym meraním a výpočtom podľa modifikovanej Hwangovej rovnice

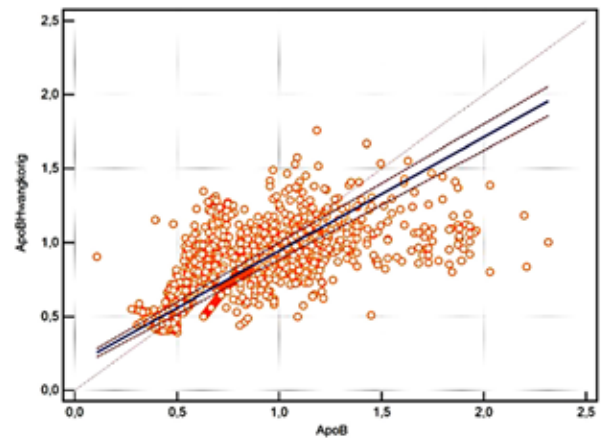
Bodkovaná čiara = línia identity, hrubá plná modrá čiara = regresná priamka, čiarkované hnedé čiary = 95 %-né konfidénčné intervaly pre regresnú priamku



Obrázok 2. Súbor Bratislava2, graf rezíduí pre Passing-Bablokovu regresiu s rovnicou regresnej priamky

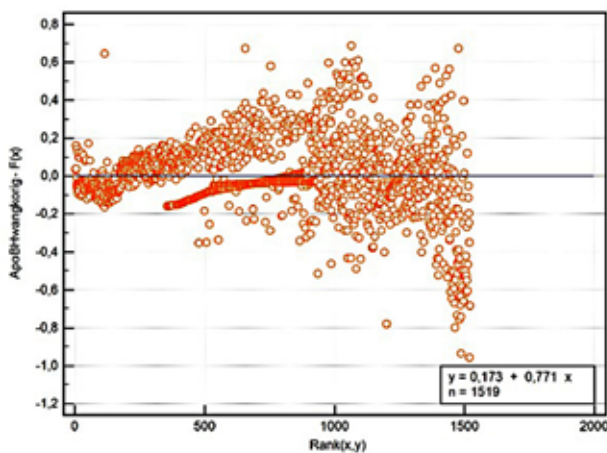


Obrázok 3. Súbor Bratislava 2, horský graf

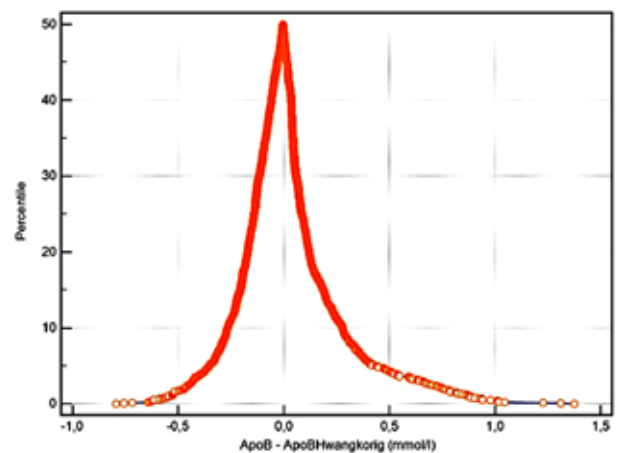


Obrázok 4. Súbor Tbilisi, bodový graf a vykreslenie Passing a Bablokovej regresnej priamky pre porovnanie dvoch metód stanovenia ApoB [g/L], priamym meraním a výpočtom podľa modifikovanej Hwangovej rovnice

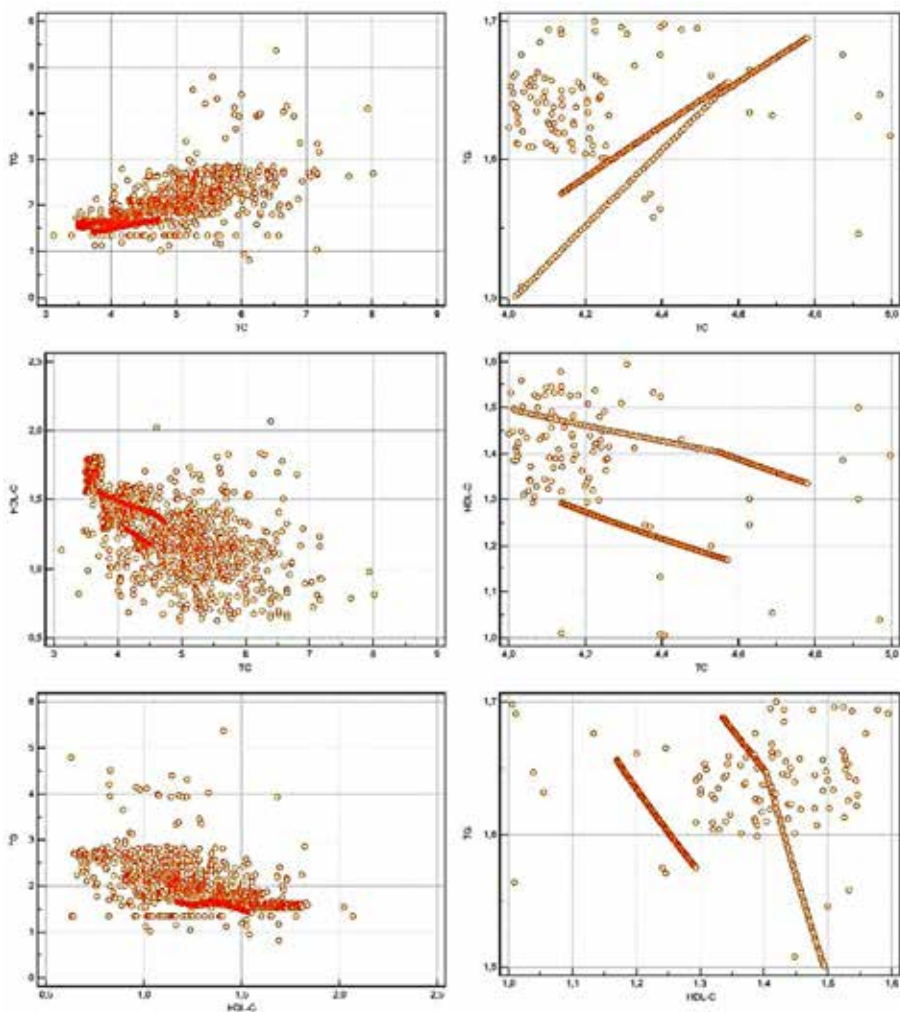
Bodkovaná čiara = línia identity, hrubá plná čiara = regresná priamka, čiarkované čiary = 95%-né konfidénčné intervaly pre regresnú priamku



Obrázok 5. Súbor Tbilisi, graf rezíduí pre Passing-Bablokovu regresiu s rovnicou regresnej priamky



Obrázok 6. Súbor Tbilisi, horský graf.



Obrázok 7. Súbor Tbilisi, dvojrozmerné bodové grafy pre vzájomný vzťah hodnôt TC a HDL-C, TC a TAG, HDL-C a TAG

V prvom stĺpci sú hodnoty z celého súboru, n = 1519. V druhom stĺpci je výrez, centrovanej na dva podozrivé útvary, redukovaný o okrajové hodnoty, n = 318

Tbilisi redukovaný o okrajové hodnoty, n = 318. Zviditeľnili sa dve krivky dvojíc hodnôt, ktoré nemôžu mať prirodzený pôvod. Ide o približne 220 hodnôt, ktoré sú vzájomne zoskupené príliš rovnomerne na to, aby boli dôveryhodné. Tým pádom je málo dôveryhodný celý súbor, a následne, podľa princípu GIGO (garbage in, garbage out) aj výpočet ApoB.

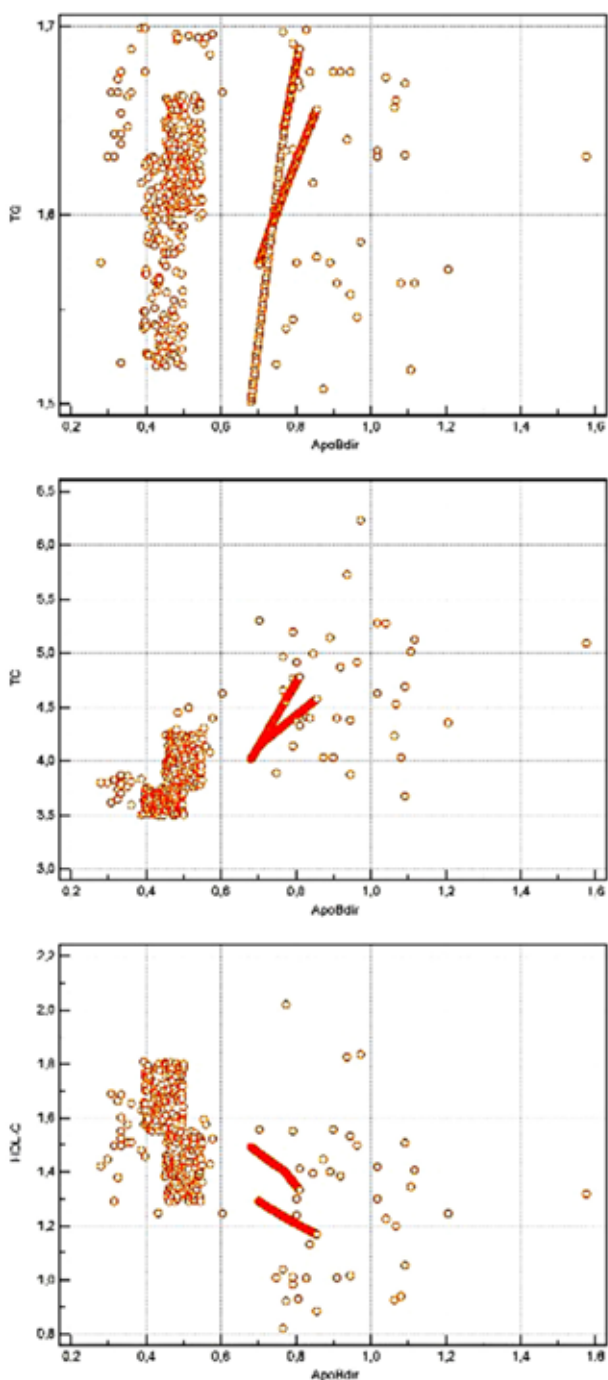
Na obrázku 8 prezentujeme dvojice hodnôt meraného ApoB a lipidov. V grafoch je vykreslený výrez pre hodnoty TAG 1,5 až 1,7 mmol/L, n = 583.

Na obrázku 9 sú krabicovými grafmi znázornené rozsahy hodnôt meraného ApoB, ktoré sme overovali v tejto a predošlej (G a š k o et al., 2017) práci. Krabicové grafy sú konštruované tak, že v krabici leží 50 % hodnôt 2. a 3. kvartilu, úsečka v krabici predstavuje medián hodnôt, vertikálne úsečky nad a pod krabicou predstavujú všetky hodno-

ty 1. a 4. kvartilu. Posledný obdĺžnik je, pre porovnanie, zostrojený z dostupných údajov pôvodnej práce Hwanga (H w a n g et al., 2012) a predstavuje rovnako hodnoty 2. a 3. kvartilu jeho validačného súboru. Celý rozsah hodnôt ApoB v súbore nebol uvedený. Validácia stanovenia ApoB-Hwangkorig je platná pre rozsah 0,25 až 2,30 mmol/L. Extrapolácia mimo tohto rozsahu je neprípustná.

DISKUSIA

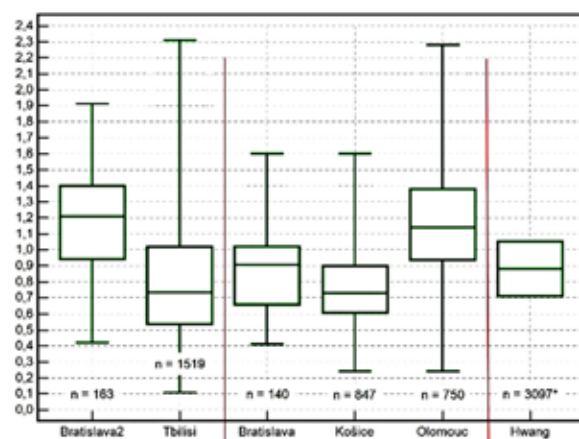
Aké sú dôvody pre používanie, a teda skúmanie validity výpočtom stanovených lipidových parametrov (ale všeobecne akýchkoľvek laboratórnych parametrov)? Môžeme charakterizovať tri, vzájomne sa prelínajúce a viac alebo menej súvisiace dôvody:



Obrázok 8. Súbor Tbilisi, dvojrozmerné bodové grafy pre vzájomný vzťah hodnôt meraného ApoB a TAG, TC a HDL-C

Výrez pre hodnoty TAG 1,5 až 1,7 mmol/L, n = 583

1. Neexistencia (dostatočne) presnej analytickej metódy na stanovenie laboratórneho parametra, použiteľnej v rutinnej diagnostike. Príkladom je parameter LDL cholesterol – v našej klinickobiochemickej komunite prevláda opačný názor, avšak ani najnovšie sety na stanovenie LDL cholesterolu nie sú dostatočne presné – viď jasné stanovisko preventívnych kardiológov v práci (Q u i s p e et al.,



Obrázok 9. Krabicové grafy rozsahu hodnôt meraného ApoB v súborech z tejto práce a našej predošlej práce (G a š k o et al., 2011)

Posledná krabica pre porovnanie zostrojená z dostupných údajov z pôvodnej práce Hwanga a spol (G a š k o, 2015)

2017), alebo štúdia potvrdzujúca veľmi vysokú mieru variability pri meraní LDL cholesterolu v slovenských a českých laboratóriách (G a š k o et al., 2011) – preto sa stále využíva jeho stanovenie výpočtom. Toto však nie je prípad ApoB, ktorého analytika je (už) harmonizovaná (C l o u e t - F o r a i s o n et al., 2017).

2. Snaha o znižovanie nákladov na stanovenie laboratórneho parametra. Každý výpočet je podstatne lacnejší ako akokoľvek lacný meraný parameter. To sa vzťahuje, aj v našom zdravotníckom prostredí, aj na ApoB.
3. Potreba, alebo niekedy možno iba akademický záujem, získania laboratórných parametrov, použiteľných v režime POCT (P e c o r a r o et al., 2017). Výpočet ApoB je použiteľný v režime POCT (B e r n á t a kol., 2011).

Úlohou porovnávania dvoch metód stanovenia toho istého analytu je určiť, či výsledky získané novou metódou sú, v priemere, také isté ako výsledky získané inou, presnou metódou. Porovnanie predstavuje skúmanie klinickej ekvivalencie týchto dvoch metód (N o e, 2001). Klinicky ekvivalentné metódy môžu byť navzájom voľne nahradené. Nahradenie metódy za inú, s ktorou nie je klinicky ekvivalentná, si vyžaduje stanovenie nového referenčného intervalu pre meraný (laboratórny) parameter a vývoj konverzných rovníc, ktorá sa môže použiť na porovnanie výsledkov testov zo starého postupu s výsledkami testov novou metódou. V praxi to znamená, že klinická ekviva-

lencia znamená dve veci: že výsledky oboch spôsobov vykazujú vysoký stupeň súladu a že referenčné rozsahy pre meraný parameter, stanovené pomocou obidvoch metód, sú v podstate identické.

Pri našom predošlom overovaní Hwangovej rovnice na troch rozsiahlych, dobre klinicky definovaných súboroch pacientov, ktorých merania lipidových parametrov vykonali 3 rôzne rutinné laboratória, všetky pod úspešnou kontrolou EQA, sme zistili, že referenčné rozsahy ApoB Hwang sa môžu líšiť od referenčných rozsahov ApoB meraných v niektorých laboratóriách, pričom však porovnanie oboch metód vykazuje vysoký stupeň súladu – vyjadrený pomocou CCC. Po dodaní konštanty K ku rovnici sa referenčné rozsahy takmer zhodovali.

Pri terajšom overovaní na ďalších dvoch súboroch, z ďalších dvoch rutinných laboratórií, sme u oboch dosiahli približne rovnaký referenčný rozsah ApoBHwangko-rig a ApoB. V súbore Bratislava2 bol zároveň dosiahnutý aj veľmi vysoký stupeň súladu, hodnota CCC 0,9624 je dokonca vyššia ako ktorákoľvek z predošlých troch súborov.

V súbore Tbilisi bola hodnota CCC 0,6370, čo je veľmi nepriaznivá hodnota, ktorá spochybňuje vzájomnú ekvivalenciu oboch metód. Zistili sme však, že časť zdrojových údajov troch lipidových parametrov, približne 250 z celkových 1519, čo je viac než 16%, nie je prirodzeného pôvodu. Produkcia a degradácia ApoB je natoľko komplexná a závislá od toľkých faktorov (Fisher et al., 2014), že distribúcia ktorú sme popísali, sa nemôže v žiadnom súbore konsekutívne, ani náhodne vybraných pacientov, vyskytnúť. V tejto práci nemáme ambíciu tento súbor ďalej skúmať. Z porovnania dvoch metód stanovenia apolipoproteínu B na tomto súbore však na základe uvedeného zrejme nie je možné robiť žiadne závery.

Naše zistenia podporujú predošlé správy o spoľahlivosti náhrady stanovenia ApoB meraním nami modifikovaným výpočtom podľa Hwanga.

Podakovanie

Zaza Makaridze, MD, „Medicore“ Ltd., Tbilisi State Medical University Affiliated Clinic, Tbilisi, Gruzínsko, poskytol zdrojové údaje z práce (Makaridze et al., 2014). MUDr. Janka Franeková, PhD, a prof. MUDr. Antonín Jabor, PhD, IKEM, Praha, poskytli cenné a zásadné rady, ktoré viedli ku korekciám textu.

LITERATÚRA

1. **Anderson, T. J. et al. (2016):** 2016 Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Management of Dyslipidemia for the Prevention of Cardiovascular Disease in the Adult. *Canadian Journal of Cardiology*, 2016; 32: 1263–1282. doi: 10.1016/j.cjca.2016.07.510.
2. **Bernát, I., Müllerová, D. (2011):** Využitie POCT v ambulancii všeobecného lekára pre dospelých. *Via practica*, 2011; 8: 5–6.
3. **Catapano, A. L. et al. (2016):** ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis*, 2016; 253: 281–344.
4. **Clouet-Foraison, N. et al. (2017):** Advanced lipoprotein testing for cardiovascular diseases risk assessment: a review of the novel approaches in lipoprotein profiling. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2017; doi: 10.1515/cclm-2017-0091.
5. **Ference, B. A. et al. (2017):** Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal*, 2017; 0: 1–14. doi: 10.1093/eurheartj/ehx144.
6. **Fisher, E., Lake, E., McLeod, R. S. (2014):** Apolipoprotein B100 quality control and the regulation of hepatic very low density lipoprotein secretion. *Journal of Biomedical Research*, 2014; 28: 3: 178–193. doi: 10.7555/JBR.28.20140019.
7. **Garber, A. J. et al. (2017):** Consensus statement by the American Association of Clinical Endocrinologist and American College of Endocrinology on the comprehensive type 2 diabetes management algorithm – 2017 executive summary. *Endocrine Practice*, 2017; 23: 207–238.
8. **Gaško, R. et al. (2011):** V akej zhode sú výsledky priameho a vypočítaného stanovenia LDL cholesterolu v hraničných hodnotách podľa Európskych odporúčaní (2007)? *Cardiology Letters*, 2011; 20(6): 468–475.
9. **Gaško, R. (2015):** *Laboratory method comparison studies. Nový prístup ku porovnávaniam s použitím umelého súboru.* 2. doplnené vydanie. EduStat, Košice, 2015, ISBN 978-80-972005-5-8.

10. Gaško, R. et al. (2015): Kvalitatívne a kvantitatívne zmeny lipidových subfrakcií pri tyreopátiách majú vplyv na presnosť stanovenia apolipoproteínu B výpočtom podľa Hwanga. *Laboratórna Diagnostika*, 2015; 20(2): 57–66.
11. Gaško, R. et al. (2017): Je vypočítaná hodnota apolipoproteínu B spoľahlivou náhradou jeho skutočnej sérovej hodnoty? Porovnanie štyroch rovníc. *Lekársky Obzor*, 2017; 66(3): 91–99.
12. Hwang, Y. et al. (2012): An Equation to Estimate the Concentration of Serum Apolipoprotein B. *PLoS One*, 2012; e51607. doi: 10.1371/journal.pone.0051607.
13. Hwang, Y. et al. (2017): Prediction of future cardiovascular disease with an equation to estimate apolipoprotein B in patients with high cardiovascular risk: an analysis from the TNT and IDEAL study. *Lipids in Health and Disease*, 2017; 16: 158.
14. King, T.S., Chinchilli, V.M. (2001): A generalized concordance correlation coefficient for continuous and categorical data. *Statistics in Medicine*, 2001; 20: 2131–2147. doi: 10.1002/sim.845.
15. Kulichová, K., Netriová, J. (2017): Štúdium markerov kardiovaskulárneho rizika vo vzťahu k lipoproteínom. *Zdravotnícke listy*, 2017; 5(1): 19–25.
16. Lin L. (1989): A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*, 1989; 45: 255–268. doi: 10.2307/2532051.
17. Makaridze, Z. et al. (2014): Association of the Apolipoprotein B/Apolipoprotein A-I Ratio, Metabolic Syndrome Components, Total Cholesterol, and Low-Density Lipoprotein Cholesterol with Insulin Resistance in the Population of Georgia. *International Journal of Endocrinology*, 2014; 2014: 925650
18. Marcovina, S., Packard, C. J. (2006): Measurement and meaning of apolipoprotein AI and apolipoprotein B plasma levels. *Journal of Internal Medicine*, 2006; 259: 437–446. doi: 10.1111/j.1365-2796.2006.01648.x.
19. McBride, G. et al. (2005): A proposal for strength-of-agreement criteria for Lin's Concordance Correlation Coefficient. 2005, *NIWA Client Report: HAM2005-062*. doi: 10.2307/2532051.
20. Mikulecký, M. (2004): Confidence and tolerance intervals—a tool for biomedical data analysis aimed at clear evidence. *Cardiology*, 2004; 13(4): 211–215.
21. Noe, D.A. (2001): *The Logic of Laboratory Medicine*. 2nd edition, 2001. Chapter 2 Laboratory methods.
22. Pencina, M.J. et al. (2015): Apolipoprotein B improves risk assessment of future coronary heart disease in the Framingham Heart Study beyond LDL-C and non-HDL-C. *European Journal of Preventive Cardiology*, 2015; 10: 1321–1327. doi: 10.1177/2047487315569411.
23. Pecoraro, V. et al. (2017): A systematic evaluation of immunoassay point-of-care-testing to define impact on patients outcomes. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2017; 54(4): 420–431. doi: 10.1177/0004563217694377.
24. Quispe, R. et al. (2017): Accuracy of low-density lipoprotein cholesterol estimation at very low levels. *BMC Medicine*, 2017; 15: 83. doi: 10.1186/s12916-017-0852-2.
25. Sandhu, P.K. et al. (2016): Lipoprotein Biomarkers and Risk of Cardiovascular Disease: A Laboratory Medicine Best Practices (LMBP) Systematic Review. *The Journal of Applied Laboratory Medicine: An AACC Publication*, 2016; 1(2): 214–229. doi: 10.1373/jalm.2016.021006.
26. Sniderman, A. D. et al. (2016): Age and Cardiovascular Risk Attributable to Apolipoprotein B, Low-Density Lipoprotein Cholesterol or Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Journal of the American Heart Association*, 2016; 5: e003665. doi: 10.1161/JAHA.116.003665.



Laboratórna Diagnostika, XXIV, 1, 2019: 24–30

BIOLOGICKÝ VÝZNAM KARNOZÍNU A MOŽNOSTI JEHO STANOVENIA

Očenáš, P., Valko-Rokytovská, M., Salayová, A.

Katedra chémie, biochémie a biofyziky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

e-mail: peter.ocenas@uvlf.sk

SÚHRN

Karnozín je vďaka svojim rôznorodým chemickým a biologickým vlastnostiam vhodným aditívom pri vývoji nových liečiv. Terapeutický potenciál tohto dipeptidu ako výživového doplnku bol odrazovým mostíkom pre uskutočnenie klinických testov v terapii rôznych ochorení. Táto biomolekula vykazuje ochrannú funkciu pri cukrovke, aplikuje sa pri liečbe nádorov na mozgu ako antineoplastikum, spája sa s liečbou neurologických porúch, ako sú Alzheimerova, Parkinsonova choroba alebo autizmus, v neposlednom rade sa využíva lokálne vo forme krémov kvôli jeho pozoruhodným schopnostiam omladzovať bunky. Dipeptid karnozín má pleiotropné účinky, ktoré kladú veľké nároky na výskumníkov pri detekcii a terapeutickom využití tejto molekuly.

Kľúčové slová: karnozín; biologická aktivita; analýza

ABSTRACT

Carnosine is a suitable additive in the development of new drugs due to its diverse chemical and biological properties. The therapeutic potential of this dipeptide as a nutritional supplement was a stepping stone for carrying out clinical trials in the treatment of various diseases. This biomolecule exhibits protective function in dia-

betes, is applied in the treatment of brain tumors as an antineoplastic agent, is associated with the treatment of neurological disorders such as Alzheimer's, Parkinson's disease or autism, and used locally in the form of creams because it has remarkable cell rejuvenation capabilities. The dipeptide carnosine has pleiotropic effects, that imposes great challenges to the researchers in detection and therapeutic utilizing of this molecule.

Keywords: carnosine; biological activity; analysis

ÚVOD

V súčasnosti je veľký dopyt po nových výživových doplnkoch, ktoré sú distribuované na náš trh viacerými farmaceutickými spoločnosťami. Sú to predovšetkým prípravky s významným obsahom bioaktívnych látok (vitamíny, minerály, stopové prvky, aminokyseliny, antioxidanty alebo špecifické mastné kyseliny). Najznámejšími a zároveň aj najpredávanejšími prídavnými látkami sú vitamín C, ginko, zinok, a taktiež karnozín.

Karnozín bol objavený v roku 1900 ako nebielkovinová, dusík obsahujúca zložka mäsa. Ide o látku telu vlastnú, ktorá sa v najväčšom množstve tvorí v svalstve, mozgu a srdci. U väčšiny zvierat sa tvoria aj jeho metylované deriváty, anserín alebo balenín (B o l d y r e v a kol., 2013). Tieto a mnohé ďalšie deriváty zaradujeme do skupiny

histidínové dipeptidy vykazujúce bohaté biologické vlastnosti. Na úrovni organel a tkanív majú silný a špecifický antioxidantný účinok (Quinn a kol., 1992). Terapeutický potenciál karnozínu ako výživového doplnku bol odrazovým mostíkom pre uskutočnenie klinických testov v terapii rôznych ochorení.

Karnozín a jeho deriváty

Karnozín je prekursorom skupiny analógov prirodzene sa vyskytujúcich v organizme. Ide o dipeptid zložený z β -alanínu a L-histidínu. Jeho najbežnejšie analógy sú metylované, anserín a balení, v štruktúre ktorých je imidazolový kruh L-histidínu substituovaný metylovou skupinou. Ďalší karnozínový analóg je homokarnozín, v molekule ktorého je β -alanín nahradený kyselinou γ -aminomaslovou (GABA). Známy je tiež acetylkarnozín, u ktorého je acetylovaná β -alanínová časť karnozínu a karcinín, kde je L-histidínový zvyšok nahradený histamínom (Obrázok č. 1). V prípade neproteínovej dusíkatej frakcie sú karnozín a anserín dve najbohatšie zložky vo svalovom tkanive stavovcov, a teda aj ľudí (Bolderová kol., 2013).

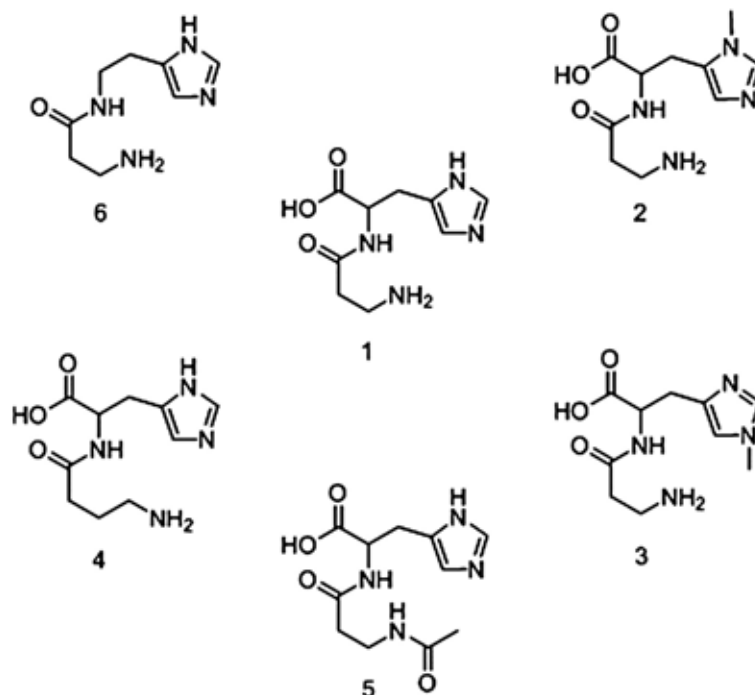
Biosyntéza a degradácia karnozínu a jeho analógov je enzýmovo riadená. Syntéza karnozínu prebieha za prítomnosti karnozínsyntázy. Karnozín-N-metyltransferáza zodpovedá za vznik metylovaných analógov, anserínu

a balení. Karnozín a jeho deriváty nie sú degradované bežnými dipeptidázami, ale ich metabolizmus prebieha pomocou vlastných hydrolytických enzýmov, karnozináz. Transport karnozínu cez bunkové membrány je zabezpečený množstvom POT-transportérov (transportéry peptidov závislé od protónu) (Bella a kol., 2014).

Karnozín a jeho využitie pri rôznych ochoreniach

Extrapolácia zvieracích ochorení na človeka

Väčšina výskumov terapeutického potenciálu karnozínu sa uskutočňuje na zvieracích modeloch, najmä na hlodavcoch. Výnimku tvorí obmedzený počet malých klinických pokusov, ktoré neboli samostatne potvrdené, ako napr. v prípade pacientov s Parkinsonovou chorobou, schizofréniou, autistickou poruchou a zrakovou chorobou. Problémom však stále ostáva aplikácia výsledkov klinických testov na ľudí. Obmedzenie vyplýva z nízkych hladín sérovej aktivity karnozinázy u hlodavcov v porovnaní s vysokou hladinou aktivity karnozinázy u ľudí. Metabolická nestabilita v ľudskom sére spôsobená prítomnosťou karnozinázy vyvolala veľký záujem o dizajn a chemickú syntézu nových karnozínových derivátov, ako aj o výskum terapeutického potenciálu prírodných derivátov karnozínu, ako je anserín. Tieto zlúčeniny sú odolnejšie voči karnozináze tým, že udržiavajú, a dokonca zlepšujú účinky pôvodnej zlúčeniny, ako



Obrázok č. 1. Štruktúry karnozínu (1), anserínu (2), balení (3), homokarnozínu (4), acetylkarnozínu (5) a karcinínu (6)

napr. antioxidačnú a chelačnú schopnosť alebo aktivitu s reaktívnymi formami uhlíka (B o l d y r e v a kol., 2013).

Diabetes mellitus

Rastúci počet dôkazov naznačuje ochrannú funkciu karnozínu voči cukrovke. Táto funkcia vyplýva zo schopnosti ovplyvniť glykemickú hladinu a zabrániť diabetickým komplikáciám, ako je nefropatia a oftalmopatia. Aktivita karnozínu na diabetických zvieracích modeloch bol prvýkrát publikovaný L e e o m a kol. (2005) s použitím Balb/cA (kmene inbredných myší) (B i s p o a kol., 2006). Perorálnou aplikáciou karnozínu počas štyroch týždňov došlo k zníženiu hladiny glukózy a fibronektínu v plazme, k zvýšeniu hladiny inzulínu a k zníženiu oxidačného poškodenia (L e e a kol., 2005). Schopnosť karnozínu kontrolovať hladiny glukózy v krvi bola dôkladne preskúmaná N a g a i o m a kol., ktorí navrhli, že takýto účinok nastáva vďaka schopnosti karnozínu, ktorý je zdrojom histamínu po dekarboxylácii histidínu, regulovať autonómnu látku nervového systému prostredníctvom H3-receptora. Presnejšie, tento dipeptid znižuje neurónovú aktivitu sympatických nervov a umožňuje tak zvyšovať aktivitu parasympatických nervov. Touto aktivitou dochádza k zvyšovaniu sekrécie inzulínu a potlačeniu sekrécie glukagónu z pankreasu, čo vedie k hypoglykemickému účinku (N a g a i a kol., 2003).

Je známe, že karnozín je účinný v inhibícii vývoja diabetických komplikácií, vrátane oftalmopatie a nefropatie. Jeho účinkom sa redukuje diabetická nefropatia a dochádza najmä k zníženiu glomerulárnej apoptózy. Taktiež sa zistilo, že karnozín zlepšuje diabetické neuropatie, najmä abnormálne sensorické vnímanie. Základný mechanizmus bol čiastočne zameraný na jeho schopnosť zvrátiť glykácie proteínov za inhibície tvorby koncových produktov pokročilej glykácie (AGE) (B o l d y r e v a kol., 2013).

Ischemické-reperfúzne poškodenie

Od roku 1990 niekoľko *in vivo* štúdií uvádza schopnosť karnozínu znížiť ischemické-reperfúzne (I/R) poškodenia na rôznych modeloch zvierat a orgánov, vrátane mozgu, pečene, obličiek a semenníkov. Ako prvá bola pozorovaná efektívna redukcia mortality u potkanov s ischémiou. Odôvodnením použitia karnozínu ako ochranného činidla pri I/R poškodeniach na zvieracích modeloch, bola jeho antioxidačná aktivita, keďže oxidačný stres indukovaný I/R je zapojený do poškodenia buniek.

Takýto racionálny prístup bol potvrdený niekoľkými štúdiami, ktoré dokazujú, že ochrana poskytnutá karnozí-

nom proti I/R poškodeniu tkaniva je paralelná so znížením tkanivového oxidačného poškodenia a so schopnosťou regenerácie enzýmových a neenzýmových antioxidantov (B o l d y r e v a kol., 2013).

Okrem antioxidačného účinku boli navrhnuté ďalšie možnosti k vysvetleniu antiischemickej aktivity karnozínu. Jednou z nich je aktivácia H3-receptorov a následný inhibičný účinok na nervovú aktivitu renálneho sympatického nervu. Takýto histamínom sprostredkovaný mechanizmus je podložený chýbajúcou aktivitou N-acetylkarnozínu (derivát karnozínu stabilný voči karnozinázam) a potlačením aktivity karnozínu H3-antagonistickým tioperamidom (F u j i i a kol., 2005).

Rakovina

V súčasnosti vyvolalo veľký záujem použiť karnozín aj ako antineoplastikum, najmä na liečbu malígnych nádorov mozgu (G a u n i t z, H i p k i s s, 2012). Prvá správa o antineoplastickom účinku bola opísaná v roku 1986 N a g a i o m a S u d o m, ktorí zistili, že liečba karnozínom (50 mg/kg na deň) inhibovala rast nádoru a mortalitu u myší. O desať rokov neskôr, H o l l i d a y a M c F a r l a n d (1996) uviedli, že ľudské fibroblasty rástli za prítomnosti karnozínu normálne, kým rast neoplastických bunkových línií bol selektívne inhibovaný. Následne bola navrhnutá prvá hypotéza o mechanizme jeho účinku, ktorá je založená na schopnosti karnozínu eliminovať medzi produkty glykolýzy (glyceraldehydfosfát a dihydroxyacetónfosfát), a tak znížiť tvorbu adenosíntrifosfátu (ATP). Takýto mechanizmus súhlasí s metabolickými rozdielmi týchto dvoch bunkových typov (Warburgov efekt). Väčšina nádorových buniek je predovšetkým glykolytická, zatiaľ čo v diferencovaných fibroblastoch je syntéza ATP prevažne aeróbna, mitochondriálna. C a r t w r i g h t a kol. (2012) dokázali, že kým sú kvasinkové bunky pre získanie energie závislé na glykolýze, L-karnozín spomaľuje ich rast a zvyšuje zánik buniek, ale v prípade oxidačnej fosforylácie sa stávajú odolnými voči inhibičným účinkom L-karnozínu (B o l d y r e v a kol., 2013).

Neurologické poruchy

Alzheimerova choroba

Koncom deväťdesiatych rokov 20. storočia bol prvýkrát navrhnutý možný ochranný účinok karnozínu v súvislosti s Alzheimerovou chorobou (AD). Štúdie *in vitro* preukázali schopnosť tohto dipeptidu inhibovať na jednej strane β -amyloidnú polymerizáciu a na druhej strane bunkovú

toxicitu. Preston a kol. uviedli, že karnozín poskytuje istú ochranu proti účinku neurotoxín-amyloidného peptidu (A β 25-35) na cievnych endotelových bunkách mozgu potkana. Bunkový ochranný účinok karnozínu proti β -amyloidmi sprostredkovanej toxicite bol potvrdený aj v prípade iných bunkových modelov (P r e s t o n a kol., 1998).

Iba niekoľko *in vivo* štúdií bolo doteraz publikovaných o účinku karnozínu na zvieracích modeloch s AD. Niektoré podporné dôkazy u ľudí pochádzajú z metabolomickej štúdie skríningu zmien voľných koncentrácií aminokyselín a dipeptidov u pacientov s AD v porovnaní s kontrolnými skupinami. Zistilo sa, že hladiny karnozínu boli výrazne nižšie v plazme pacientov s AD (F o n t e h a kol., 2007).

V prípade mechanizmu terapeutického účinku karnozínu pri AD, karnozín-histidín-histamínová dráha bola vylúčená použitím antagonistov histamínových receptorov a inhibítorov histidíndekarboxylázy. Podobne, antioxidantná aktivita karnozínu je nepravdepodobná, keďže β -amyloidom indukované bunkové poškodenie nie je vyvolané generovaním reaktívnej formy kyslíka (RFK). Ostatné hypotézy boli navrhnuté s ohľadom na antiglykačnú aktivitu, účasť na regulácii uvoľňovania glutamátu a prenose N-metyl-D-aspartátových receptorov. Štúdie *in vitro* a *in vivo* tiež naznačujú, že možný mechanizmus neuroprotektie karnozínom je sprostredkovaný jeho chelačnou aktivitou (H i p k i s s, 2007). Pri AD bola potvrdená zvýšená koncentrácia zinku. Zistilo sa, že Zn(II) môže indukovať agregáciu a oligomerizáciu β -amyloidov, a tak tiež aj bunkovú toxicitu. Cytoprotektívny účinok bol potvrdený štúdiou H o r n i n g a a kol. (2000), ktorí zistili, že fyziologicky relevantné koncentrácie karnozínu poskytujú ochranný účinok proti toxicite vyvolanej zinkom a medou v kultivovaných neurónoch (B o l d y r e v a kol., 2013).

Parkinsonova choroba

Aplikácia neuropeptidu, karnozínu ako doplnku pri liečbe Parkinsonovej choroby vyústilo k značnému zlepšeniu neurologických symptómov (F u j i i a kol., 2005). Zistilo sa, že karnozín inhibuje oligomerizáciu α -synukleínu v modelových systémoch a potláča niektoré zmeny v zvieracích modeloch s Parkinsonovou chorobou. V klinickej štúdii Boldyrev a kol. potvrdili, že pri liečbe karnozínom (1,5 g/deň) v kombinácii s L-DOPA sa pacientom výrazne zlepšili neurologické príznaky, znížila sa stuhnutosť a zvýšila pohyblivosť končatín (G a u n i t z, H i p k i s s, 2012). Na biochemickej úrovni došlo k poklesu proteínových kar-

bonylov v krvnej plazme a pozoroval sa nárast superoxid-dismutázy (SOD) (B o l d y r e v a kol., 2013).

Autizmus

Ďalšou klinickou štúdiou účinku karnozínu na neurologické poruchy bol placebom kontrolovaný výskum u 31 detí s autizmom. Po ôsmich týždňoch liečby karnozínom (800 mg/deň) deti prejavili štatisticky významné zlepšenie na Gilliamovej autistickej stupnici a aj v teste Receptive One-Word Picture Vocabulary. Zaujímavosťou je, že metabolická štúdia potvrdila pokles hladiny karnozínu, alanínu a L-histidínu v moči detí (M i n g a kol., 2012).

Schizofrénia

Biologický účinok karnozínu (2 g denne počas 3 mesiacov) bol tiež monitorovaný u dospelých pacientov s chronickou schizofréniou. Zistilo sa, že karnozín zlepšuje niektoré kognitívne testy, napr. test strategického zisťovania cieľa. Z výsledkov štúdií vyplýva, že karnozín si zaslúži ďalšie klinické posúdenie ako doplnok liečby pri tomto type ochorenia (C h e n g a p p a a kol., 2012). Mierne pozitívne účinky liečby karnozínom (1,5 g denne počas 12 týždňov) na kognitívne funkcie boli tiež sledované počas štúdie s účasťou veteránov z vojny v Perzskom zálive postihnutých kognitívnou dysfunkciou označovanou ako syndróm Perzského zálivu (B a r a n i u k a kol., 2013).

Oftalmopatia

Je známe, že karnozín pozitívne ovplyvňuje niektoré očné choroby súvisiace s vekom, a tiež s cukrovkou. Štúdie *in vitro* potvrdili schopnosť karnozínu inhibovať metylglyoxalom indukovanú agregáciu α -kryštalínu, ako aj disagregáciu glykovaného α -kryštalínu. Ďalším účinkom karnozínu je zvýšenie mobility peptidového reťazca, ktoré vedie k rozloženiu glykovaného proteínu (S e i d l e r a kol., 2004).

Účinok N-acetylkarnozínu bol študovaný aj pri katarakte oka. Topická aplikácia N-acetylkarnozínu do oka údajne viedla k lepšej akumulácii karnozínu v porovnaní s jeho priamou aplikáciou. U dobrovoľníkov so senilným kataraktom po liečbe s N-acetylkarnozínom bolo preukázané vizuálne zlepšenie oka, a predovšetkým zlepšenie zrakovej ostrosti a citlivosti na svetlo (B a b i z h a y e v a kol., 2002).

Starnutie

Karnozín je látka s účinkom proti starnutiu, ktorá ovplyvňuje širokú škálu procesov a funkcií súvisia-

Tabuľka č. 1. Možné protistarnúce účinky karnozínu

Dokázané vlastnosti karnozínu	Možné protistarnúce účinky
Pomáha udržiavať dĺžku telomér	Udržiava funkciu/integritu DNA
Vychytáva RFK a RNS	Potláča makromolekulárnu modifikáciu/dysfunkciu
Vychytáva reaktívne karbonylové druhy	Spomaľuje syntézu proteínov (vrátane aberantných foriem)
Inhibuje iniciačný faktor fosforylácie	Znižuje hladinu toxických metabolitov
Inhibuje glykolýzu	Znižuje hladinu RFK
Stimuluje mitochondriálnu aktivitu	Redukuje hladinu aberantných polypeptidov
Aktivuje proteolýzu	Udržiava bunkovú životaschopnosť
Obnovuje senescentné bunky	Redukuje tvorbu nádoru
Inhibuje rast transformovaných buniek	Znižuje tvorbu metylglyoxalu

cich s vekom (Tabuľka 1). V roku 1994 McFarland a Holliday (1999) prvýkrát opísali schopnosť karnozínu predĺžiť maximálnu bunkovú deliacu kapacitu kultivovaných ľudských fibroblastov transformáciou senescentných buniek na juvenilné fenotypy. O niekoľko rokov neskôr sa potvrdili tieto údaje aj s pridaním karnozínu do fibroblastového média za súčasnej zmeny ich fenotypu zo senescentného na juvenilný a rovnako dokázali, že tento účinok bol potlačený po odstránení peptidu (McFarland, Holliday, 1999).

Niektoré štúdie pripisujú účinok karnozínu proti starnutiu jeho antioxidantnej aktivite, alebo jeho schopnosti zabrániť karbonylácii proteínov a modulovať degradáciu starých proteínov (Hipkiss a kol., 2016; Hipkiss a kol., 2009; Hipkiss a kol., 2006).

Možnosti stanovenia karnozínu

Prítomnosť karnozínu a anserínu v mäsových výrobkoch, vo vzorkách moču a v biologických materiáloch možno stanoviť rôznymi metódami, ako napríklad prostredníctvom kapilárnej elektroforézy s UV detekciou (Huang a kol., 2006; Huang a kol., 2007; Zinellu a kol., 2011), laserom indukovanou fluorescenciou (LIF) (Huang a kol., 2005), detekciou elektro-sprejovou hmotnostnou spektrometriou (Stanova a kol., 2011) a mikročipovou elektroforézou s chemiluminiscenčnou detekciou (Zhao a kol., 2009).

Najviac využívanými spôsobmi stanovenia histidínových dipeptidov prítomných v mäsových výrobkoch, bio-

logických materiáloch sú chromatografické metódy. Najčastejšie používanou analýzou histidínových dipeptidov je vysoko účinná kvapalinová chromatografia (HPLC). Medzi takéto techniky patrí:

- HPLC s UV/VIS (Kantha a kol., 2000) alebo fluorescenčnou detekciou (Huang a kol., 2005),
- HPLC-HILIC (hydrofilná interakčná chromatografia) (Mora a kol., 2007),
- nová metóda HPLC-RP (gradientová reverzná fáza) (Khalikova a kol., 2014),
- HPLC-ESI-MS (reverzná fáza s použitím elektro-sprejovej ionizačnej hmotnostnej spektrometrie) (Sztarka a kol., 2014),
- vysokovýkonná anión-výmenná chromatografia (HPAEC) s integrovanou amperometrickou detekciou pulzov (Nardillo a kol., 2014)
- micelárna kvapalinová chromatografia (MLC) s UV detekciou (Gill-Agustía a kol., 2008).

ZÁVER

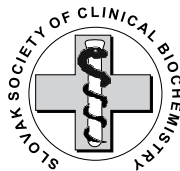
Karnozín a jeho deriváty, ktoré sa prirodzene vyskytujú v organizme zvierat a ľudí, majú zaujímavý farmakoterapeutický potenciál. Vďaka tomu sa využíva pri liečbe rôznych ochorení. V tomto článku boli opísané poznatky o jeho bioaktivite pri terapii cukrovky, neurologických ochoreniach, rakovine a ďalších. Bližšie bol popísaný aj účinok proti starnutiu a možnosti jeho mechanizmu účin-

ku. Diagnostika rôznych ochorení, štúdium možností analýzy a identifikácie nových biomolekúl je motiváciou pre vývoj ďalšieho výskumu biologicky aktívnych látok.

LITERATÚRA

1. Babizhayev, M. A. a kol. (2002): Efficacy of N-acetylcarnosine in the treatment of cataracts. *Drugs in R&D*, 3(2), s. 87–103.
2. Baraniuk, J. N. a kol. (2013): Carnosine treatment for gulf war illness: a randomized controlled trial. *Global Journal of Health Science*, 5(3), s. 69–81.
3. Bellia, F., Vecchio, G., Rizzarelli, E. (2014): Carnosinases, their substrates and diseases. *Molecules*, február 2014, Zv. 19, 2, s. 2299–2329.
4. Bispo, V. S. a kol. (2016): Structural elucidation of a carnosine-acrolein adduct and its quantification in human urine samples. *Scientific Reports*, 6, s. 19348.
5. Boldyrev, A., Aldini, G., Derave, W. (2013): Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological Reviews* [online], 93(4), s. 1803–1845.
6. Cartwright, S. P., Bill, R. M., Hipkiss, A. R. (2012): L-Carnosine affects the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a metabolism-dependent manner. *PLoS One*, 7, e45006.
7. Fonteh, A. N. a kol. (2007): Free amino acid and dipeptide changes in the body fluids from Alzheimer's disease subjects. *Amino Acids*, 32(2), s. 213–224.
8. Fujii, T. a kol. (2005): Dietary supplementation of L-carnosine prevents ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(2), s. 361–363.
9. Gaunitz, F., Hipkiss, A. (2012): Carnosine and cancer: a perspective. *Amino Acids*, 43(1), s. 135–142.
10. Gil-Agustí, M., Esteve-Romero, J., Carda-Broch, S. (2008): Anserine and carnosine determination in meat samples by pure micellar liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1189(1–2), s. 444–450.
11. Hipkiss, A., Baye, E., Courten, B. (2016): Carnosine and the processes of aging. *Maturitas*, 93(2), s. 28–33.
12. Hipkiss, A. R. a kol. (2007): Could carnosine or related structures suppress Alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's Disease*, 11, s. 229–240.
13. Hipkiss, A. R. a kol. (2006): Accumulation of altered proteins and ageing: causes and effects. *Experimental Gerontology*, 41(5), s. 464–473.
14. Hipkiss, A. R. a kol. (2009): On the enigma of carnosine's anti-ageing actions. *Experimental Gerontology*, 44(4), s. 237–242.
15. Holliday, R., McFarland, G. A. (1996): Inhibition of the growth of transformed and neoplastic cells by the dipeptide carnosine. *British Journal of Cancer*, 73, s. 966–971.
16. Horning, M. S., Blakemore, L. J., Trombley, P. Q. (2000): Endogenous mechanisms of neuroprotection: role of zinc, copper, and carnosine. *Brain Research*, 852, s. 56–61.
17. Huang, Y. a kol. (2005): Separation and determination of carnosine-related peptides using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 26(3), s. 593–599.
18. Huang, Y. a kol. (2006): Field-amplified on-line sample stacking for determination of carnosine-related peptides by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 29(7), s. 1026–1030.
19. Huang, Y. a kol. (2007): Online sample stacking for determination of carnosine-related peptides by capillary electrophoresis. *Chinese Journal of Chromatography*, 25(3), s. 326–332.
20. Chengappa, K. N. a kol. (2012): A preliminary, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of l-carnosine to improve cognition in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 142(1–3), s. 145–152.
21. Kantha, S. S. a kol. (2000): HPLC determination of carnosine in commercial canned soups and natural meat extracts. *LWT—Food Science and Technology*, 33(1), s. 60–62.
22. Khalikova, M. A. a kol. (2014): A high-performance liquid chromatography method with pre-column derivatization for the simultaneous determination of reduced glutathione, carnosine and taurine. *Analytical Methods*, 6(5), s. 1475–1481.
23. Lee, Y. T. a kol. (2005): Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *European Journal of Pharmacology*, 513(1–2), s. 145–150.
24. McFarland, G., Holliday, R. (1999): Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine on cultured human diploid fibroblasts. *Experimental Gerontology*, 34(1), s. 35–45.
25. Ming, X. a kol. (2012): Metabolic perturbation in autism spectrum disorders: a metabolomics study. *Journal of Proteome Research*, 11(12), s. 5856–5862.
26. Mora, L., Sentandreu, M., Toldrá, F. (2007): Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (12), s. 4664–4669.
27. Nagai, K. a kol. (2003): Possible role of L-carnosine in the regulation of blood glucose through controlling autonomic nerves. *Experimental Biology and Medicine*, 228(10), s. 1138–1145.

28. Nardiello, D., Cataldi, T. R. I. (2004): Determination of carnosine in feed and meat by high-performance anionexchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1035, s. 285–289.
29. Preston, J. E. a kol. (1998): Toxic effects of beta-amyloid (25–35) on immortalised rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and beta-alanine. *Neuroscience Letters*, 242(2), s. 105–108.
30. Quinn, P., Boldyrev, A., Formazuyk, V. (1992): Carnosine: Its properties, functions and potential therapeutic applications. *Molecular Aspects of Medicine*, 13(5), s. 379–444.
31. Seidler, N. W. a kol. (2004): Carnosine disaggregates glycosylated alpha-crystallin: an *in vitro* study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 427(1), s. 110–115.
32. Stanová, A. a kol. (2011): Analysis of therapeutic peptides in human urine by combination of capillary zone electrophoresis–electrospray mass spectrometry with preparative capillary isotachopheresis sample pretreatment. *Journal of Chromatography A*, 1218(48), s. 8701–8707.
33. Szterk, A., Roszko, M. (2014): Simultaneous determination of free amino acids, l-carnosine, purine, pyrimidine, and nucleosides in meat by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*, 37(5), s. 664–680.
34. Zinellu, A. a kol. (2011): Measurement of carnosine, homocarnosine and anserine by FASI capillary electrophoresis UV detection: applications on biological samples. *Talanta*, 84(3), s. 931–935.
35. Zhao, S. et al. (2009): Quantification of carnosine-related peptides by microchip electrophoresis with chemiluminescence detection. *Analytical Biochemistry*. doi: 10.1016/j.ab.2009.06.012.



Laboratórna Diagnostika, XXIV, 1, 2019: 31–33

VYUŽITIE MITOCHONDRIÁLNEJ RESPIRÁCIE BIELYCH KRVNÝCH ELEMENTOV V MEDICÍNE

Čižmárová, B.¹, Birková A.¹, Kraus, V. ml.², Hubková, B.¹, Bolerázska, B.³
Mareková, M.¹, Evinová, A.⁴

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ, LF

²Gynekologicko-pôrodná klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice

³Medirex a.s., Košice

⁴Divízia neurovedy, BioMED Martin, UK, JLF v Martine

e-mail: andrea.evinova@jfmed.uniba.sk

SÚHRN

Mitochondrie sú bunkové organely nevyhnutné pre život, ktoré sú hlavnými producentmi energie v organizme. Veľké množstvo štúdií poukazuje na to, že mitochondrie nie sú len statické, pasívne bunkové organely produkujúce energiu vo forme adenozin 5'-trifosfátu (ATP), ale že interagujú s meniacim sa bunkovým prostredím a stresom. Mitochondriálna dysfunkcia sa podieľa na patofyziológii rôznych ochorení akými sú napríklad neurodegeneratívne ochorenia, vrátane Alzheimerovej choroby a Parkinsonovej choroby, metabolické poruchy, ako je diabetes a obezita, rakovina, a dokonca aj na normálnom bunkovom starnutí. Mitochondrie zohrávajú kľúčovú úlohu v bunkovej bioenergetike a apoptóze, a reakcie prebiehajúce v mitochondriách sú významným zdrojom reaktívnych foriem kyslíka. Periférna krv poskytuje ľahko dostupný zdroj primárnych ľudských buniek, konkrétne mononukleárných buniek periférnej krvi (peripheral blood mononuclear cells—PBMC) a krvných doštičiek (platelets—PLT), ktoré môžu byť použité ako senzitívny biomarker, odrážajúci systémové zmeny v organizme v zdraví aj v chorobe. Mononukleárne bunky periférnej krvi a krvné doštičky predstavujú významné bunkové modely pre stanovenie mitochondriálnej respiračnej

funkcie a dysfunkcie získané minimálne invazívnym prístupom v porovnaní s tkanivovými biopsiami.

Kľúčové slová: mitochondria; krvné bunky; mitochondriálna respirácia

ABSTRACT

Mitochondria are cellular organelles essential for life, which are considered to be the major energy producers in the body. A large number of studies suggest that mitochondria are not simply static, passive organelles producing energy in the form of adenosine 5'-triphosphate (ATP), but that they perceive and respond to changing cellular environment and stress. Mitochondrial dysfunction is involved in the pathophysiology of various diseases such as neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease and Parkinson's disease, metabolic disorders such as diabetes and obesity, cancer, and even in cell aging. Mitochondria play a key role in cellular bioenergetics and apoptosis and are also producers of reactive oxygen species. Peripheral blood provides an easily accessible source of primary human cells, namely peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and platelets (PLT), which can be used as a sensitive biomarker,

reflecting systemic changes in the body in health and disease. Peripheral blood mononuclear cells and platelets represent important models determining mitochondrial respiratory function and dysfunction offering a minimally invasive approach compared to tissue biopsies.

Keywords: mitochondrion; blood cells; mitochondrial respiration

ÚVOD

Záujem o mitochondrie ako také a zároveň o mitochondriálne respiračné funkcie sa neustále zvyšuje vzhľadom na ich význam vo fyziológii a patofyziológii celého organizmu. Mitochondrie sú semi-autonómne organely, s rozhodujúcou úlohou pri tvorbe energie v bunkách. Okrem bunkovej bioenergetiky však zohrávajú veľmi dôležitú úlohu aj pri apoptóze a tým, že sú významnými producentmi reaktívnych foriem kyslíka (ROS) zasahujú do redoxnej rovnováhy. Dysfunkcie mitochondrií zohrávajú ústrednú úlohu pri starnutí, v patofyziológii rôznych chorôb, napr. pri degeneratívnych ochoreniach alebo rakovine. Napriek dôležitosti mitochondrií v ľudskom zdraví a chorobách neexistujú žiadne schválené lieky, ktoré by sa zameriavali priamo na ovplyvňovanie funkcií mitochondrií (W a n g a kol., 2016). Mitochondriálne ochorenia predstavujú klinicky heterogénnu skupinu, sú spájané s dysfunkciou mitochondriálneho respiračného reťazca, čo môže byť spôsobené mutáciou génov kódovaných buď nukleárnou DNA alebo mitochondriálnou DNA (mtDNA). Zatiaľ čo niektoré mitochondriálne ochorenia postihujú len jeden orgán napríklad oko pri Leberovej hereditárnej optickej neuropatii (LHON), mnohé iné zasahujú viaceré orgánové systémy a často sa vyskytujú s prominentnými neurologickými a myopatickými znakmi (C h i n n e r y, 2000).

Mononukleárne bunky periférnej krvi a krvné doštičky

Hodnotenie mitochondriálnej funkcie je dôležitým aspektom v patogenéze rôznych ochorení. Kvôli klinickej heterogenite je identifikácia pacientov s mitochondriálnym ochorením a následné stanovenie diagnózy jednou z výziev v mitochondriálnej medicíne (K o e n e a kol., 2011). A to je aj dôvod ďalšieho zavádzania rôznych biologických vzoriek v oblasti mitochondriálneho výskumu. Mononukleárne bunky periférnej krvi a krvné doštičky predstavujú

sľubný materiál pre stanovenie mitochondriálnej respirácie (fyziologických aj patologických vzoriek), odrážajúci systémové zmeny organizmu v zdraví aj v chorobe, a zároveň ponúkajú oveľa menej invazívny prístup získania buniek v porovnaní napríklad s tkanivovými biopsiami.

Mononukleárne bunky periférnej krvi (PBMC) predstavujú heterogénnu populáciu buniek vrátane monocytov, lymfocytov (T- a B-bunky, NK bunky) a dendritických buniek, na rozdiel od relatívne homogénnej populácie krvných doštičiek (PLT) (Č i ž m á r o v á a kol., 2017). Sledovanie respirácie krvných buniek sa v poslednom období dostáva do popredia, jednak kvôli tomu, že odber krvi predstavuje jeden z menej invazívnych prístupov odberu vzorky, a zároveň zmeny respirácie krvných buniek majú potenciál stať sa citlivým markerom mitochondriálnej dysfunkcie v širokom spektre patologických stavov.

Respirácia krvných buniek v patogenéze chorôb

K a r a b a t s i a k i s a kol. (2014) sa vo svojej štúdií venoval porovnaniu základných respiračných funkcií PBMC v skupine depresívnych ľudí oproti kontrolnej skupine. Depresia sa vyznačuje nedostatkom energie, problémami s koncentráciou a únavou. V skupine pacientov s diagnostikovanou depresiou boli preukázané výrazne nižšie respiračné funkcie mitochondrií v porovnaní s kontrolnou skupinou. Depresívne symptómy tak môžu byť čiastočne vysvetlené redukciami dostupnosti ATP následkom zhoršeného fungovania mitochondrií (K a r a b a t s i a k i s a kol., 2014). P a r k e r a kol. (1990) testovali aktivitu cytochróm c oxidázy a iných komplexov dýchacieho reťazca v mitochondriách krvných doštičiek izolovaných od pacientov s Alzheimerovou chorobou (AD). Pozorovali zníženú aktivitu cytochróm c oxidázy v skupine pacientov s AD v porovnaní s kontrolnou skupinou. Aj v štúdií M o s c o n i h o a spol. (2011) boli na identifikáciu defektov cytochróm c oxidázy u pacientov s Alzheimerovou chorobou použité krvné doštičky (M o s c o n i a kol., 2011).

Štúdiá J a p i a s s u a kol. (2011) poukazuje na to, že mitochondriálna dysfunkcia monocytov koreluje s mortalitou následkom septického šoku. Podľa ich výsledkov mitochondriálna dysfunkcia prítomná v imunitných bunkách pacientov so septickým šokom je charakterizovaná poklesom respirácie a je spojená so zníženou syntézou ATP. Molekulárny základ tohto fenotypu zahŕňa redukcii aktivity F1Fo ATP syntázy, ktorá pravdepodobne prispieva k energetickému zlyhaniu počas sepsy (J a p i a s s u a kol., 2011).

Vo svojej práci Li a kol. (2016) stanovili respiráciu PBMC u pacientov s ranným štádiom srdcového zlyhania v porovnaní s kontrolnou skupinou. Pozorovali signifikantne znížené hodnoty respiračných funkcií mitochondrií u pacientov so srdcovým zlyhaním. Pozorované mitochondriálne funkcie korelovali so zápalom a anti-oxidačnou kapacitou v jednotlivých skupinách. Zároveň aj kardiometabolické rizikové faktory, ako je príjem soli a hypertenzia, súviseli s mitochondriálnymi respiračnými dysfunkciami, čo bolo ďalej potvrdené experimentami *in vitro* (Li a kol., 2016). Widlansky a kol. (2010) zistili, že relatívna mitochondriálna hyperpolarizácia sprevádza nižšiu mitochondriálnu hmotnosť a v morfológii mitochondrií cirkulujúcich mononukleárných krvných buniek získaných od pacientov s *diabetes mellitus* typu 2 sú v porovnaní s nediabetickými kontrolami významné zmeny (Widlansky a kol., 2010).

ZÁVER

Oblasť mitochondriálnej medicíny zaznamenala v posledných rokoch rýchly pokrok, čo by mohlo priniesť mnoho príležitostí preniesť nové poznatky do klinickej medicíny. Počet patologických stavov u ľudí, ktoré sa spájajú s mitochondriálnou dysfunkciou neustále narastá. Počas posledných niekoľkých rokov sa krvné bunky, ako sú mononukleárne bunky periférnej krvi (PBMC) a krvné doštičky, stali cieľovými modelmi vo výskume mitochondriálnych funkcií v súvislosti s rôznym typom patológií. Stále však chýbajú štandardné operačné postupy pre stanovenie mitochondriálnej respirácie krvných buniek. Rôznorodosť použitých antikoagulancií, aplikácia rôznych metód izolácie, skladovania a rôznych respiračných protokolov znemožňujú porovnanie výsledkov na kvantitatívnom základe. Štandardizácia metód pre izoláciu a podmienky pre respirometrické merania by poskytla základ pre porovnatelnosť výsledkov v translačnom výskume.

LITERATÚRA

1. Čizmárová, B. et al. (2017): *Optimization of cryopreservation of human peripheral blood mononuclear cells and platelets for high-resolution respirometry*. Dostupné na: http://www.bioblast.at/index.php/Cizmarova_2017_Abstract_MITOEAGLE_Barcelona
2. Chinnery, P. F. (2000): Mitochondrial Disorders Overview. Synonyms: Mitochondrial Encephalomyopathies, Mitochondrial Myopathies, Oxidative Phosphorylation Disorders, Respiratory Chain Disorders [Updated 2014 Aug 14]. In Adam M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A. et al., editors: *Gene Reviews® Seattle (WA)*, University of Washington, Seattle; 1993–2019.
3. Japiassu, A. M. et al. (2011): Bioenergetic failure of human peripheral blood monocytes in patients with septic shock is mediated by reduced F1Fo adenosine-5'-triphosphate synthase activity. *Critical Care Medicine*, 39(5): 1056–1063, doi: 10.1097/CCM.0b013e31820eda5c.
4. Karabatsiakos, A. et al. (2014): Mitochondrial respiration in peripheral blood mononuclear cells correlates with depressive subsymptoms and severity of major depression. *Translational Psychiatry*, 4(6): e397, doi: 10.1038/tp.2014.44.
5. Mosconi, L. et al. (2011): Reduced mitochondria cytochrome oxidase activity in adult children of mothers with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 27(3): 483–490, doi: 10.3233/JAD-2011-110866.
6. Parker, W. D. Jr, Filley, C. M., Parks, J. K. (1990): Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology*, 40(8): 1302–3.
7. Li, P. et al. (2015): Mitochondrial respiratory dysfunctions of blood mononuclear cells link with cardiac disturbance in patients with early-stage heart failure. *Scientific Reports*, 5(10229), doi:10.1038/srep10229.
8. Koene, S., Smeitink, J. (2011): Mitochondrial medicine. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34: 247–248, doi:10.1007/s10545-011-9292-x.
9. Wang, W., Karamanlidis G., Tian, R. (2016): Novel targets for mitochondrial medicine. *Science Translational Medicine*, 8(326): 326rv3, doi:10.1126/scitranslmed.aac7410.
10. Widlansky, M. E. et al. (2010): Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. *Translational Research*, 156(1): 15–25, doi: 10.1016/j.trsl.2010.04.00.



Laboratórna Diagnostika, XXIV, 1, 2019: 34–37

VYUŽITIE AFINITNEJ CHROMATOGRAFIE V PROTEOMIKE

Šimková, J., Milkovičová, M., Valko-Rokytovská, M., Kostecká, Z.

Ústav biochémie, Katedra chémie, biochémie a biofyziky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

e-mail: jana.simkova@uvlf.sk

SÚHRN

Najväčšou výzvou na začiatku proteomického výskumu je separácia a prečistenie proteínov. Afinity chromatografia je metóda separácie bioorganických látok na základe vysokej špecifickej interakcie biologických makromolekúl, ako sú antigén a protilátka, enzým a substrát, receptor a ligand alebo proteín a nukleová kyselina. Táto metóda využíva naviazanie proteínov prostredníctvom reverzibilnej interakcie na špecifický ligand, ktorý je naviazaný na pevný chromatografický nosič. Neviazaný, nešpecifický materiál sa vymýva a študované proteíny sú z pevnej fázy eluované zmenou podmienok tlmivého roztoku. Zdokonalenie afinity chromatografie umožní výskumníkovi získať množstvo proteínov s vysokou čistotou pre rôzne analytické techniky. Môže sa aplikovať pre čistenie histidínom značených proteínov, prirodzených kovy-viažucich proteínov a protilátok. Zvyčajne sa využíva v spojení s hmotnostnou spektroskopiou.

Kľúčové slová: afinity chromatografia; proteín; proteomika; purifikácia

ABSTRACT

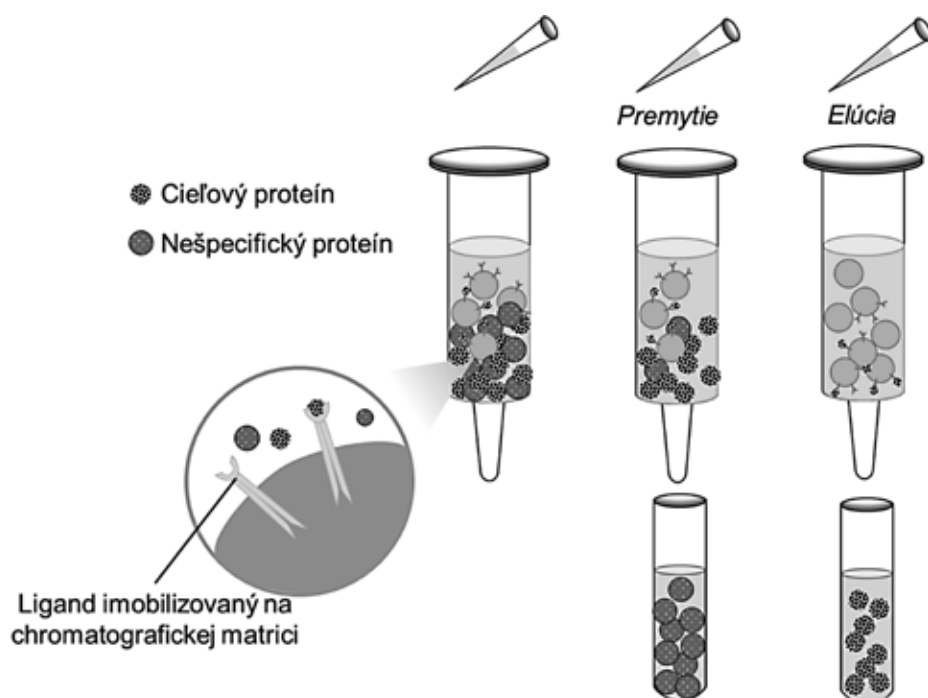
The biggest challenge at the beginning of proteomic research is protein separation and purification. Affinity

chromatography is a method of separating biochemical mixture based on the highly specific interaction between biological macromolecules such as antigen and antibody, enzyme and substrate, receptor and ligand, or protein and nucleic acid. The method utilizes protein binding by reversible interactions with a specific ligand that is bound to a solid chromatographic matrix. Unbound, nonspecific material is washed out and the proteins studied are eluted from the solid phase by changing the buffer conditions. Improvement of affinity chromatography will allow researchers to obtain a number of high purity proteins for various analytical techniques. It can be applied for purification of histidine-tagged proteins, natural metal-binding proteins and antibodies and is usually followed by mass spectroscopy.

Keywords: affinity chromatography; protein; proteomics; purification

ÚVOD

Proteíny sú vysokomolekulové látky, ktoré patria k základným organickým zlúčeninám živých sústav. Väčšinu bunkových funkcií plnia viazané v makromolekulových komplexoch, pričom rovnaký proteín často participuje v rôznych komplexoch a vykazuje rozličné funkcie (K o s t e c k á a kol., 2013; J a i n et al., 2012).



Obrázok 1. Postup pri afinitnej purifikácii.

Na čistenie skúmaných proteínov od ďalších proteínov a iných komponentov vzoriek sa používajú rôzne purifikačné metódy. Najviac využívanou je afinitná chromatografia, tiež nazývaná afinitná purifikácia, založená na špecifickej interakcii medzi imobilizovanými ligandmi a cieľovými proteínmi. Schopnosť tejto metódy selektívne viazať a čistiť cieľové komponenty je založená na špecifických, reverzibilných interakciách prítomných v mnohých biologických systémoch, ako je viazanie hormónov na receptory alebo protilátok na antigén (Walters, 1985; Puig et al., 2001; Wen-Chien, Kelvin, 2004; Hage, Ruhn, 2005; Thermofisher, n. d.).

Afinitná chromatografia je typ kvapalinovej chromatografie, kde jeden z párov interakcie je imobilizovaný na pevnom nosiči, ako sú agarózové guľôčky alebo silikagélové častice. Imobilizovaná častica, nazývaná afinitný ligand, pôsobí ako stacionárna fáza. Druhá interagujúca zložka je aplikovaná priamo do afinitnej kolóny alebo aplikovaná v tlmivom roztoku, ktorý umožní naviazanie cieľového proteínu na imobilizovaný ligand. Nena viazané zložky vzorky sa z kolóny vymyjú a zachytený cieľový analyt sa uvoľní v prítomnosti elučného tlmivého roztoku (Turkova, 1978; Walters, 1985; Hage, Ruhn, 2005; Hage et al., 2005).

Afinitná purifikácia všeobecne zahŕňa nasledujúce kroky (Obrázok 1):

- inkubácia vzorky (napr. bunkový lyzát, sérum) s chromatografickou maticou, čo umožní naviazanie cieľových molekúl vo vzorke na imobilizovaný ligand;
- premytie nena viazaných komponentov vzorky z nosiča použitím vhodných tlmivých roztokov;
- elúcia (disociácia) cieľovej molekuly z imobilizovaného ligandu zmenou podmienok tlmivého roztoku, čím sa zrušia väzobné interakcie.

V závislosti od cieľov, ktoré je potrebné dosiahnuť pri prečistení proteínov sa vyvinulo niekoľko typov purifikačných systémov. Medzi najbežnejšie patrí purifikácia protilátok, imunoprecipitácia a ko-immunoprecipitácia, metóda „pull-down“, imobilizovaná kovy-viažuca afinitná chromatografia, avidín-biotín systém a iné.

Imobilizovaná kovy-viažuca afinitná chromatografia (Metal Ion Affinity Chromatography—IMAC) predstavuje relatívne novú separačnú techniku vhodnú predovšetkým na purifikáciu proteínov s prirodzene sa vyskytujúcimi rezíduami histidínu na povrchu a pre rekombinantné proteíny s včlenenými zvyškami histidínu alebo histidínovými zhlukmi (Wen-Chien, Kelvin, 2004). IMAC je založená na interakcii medzi špecifickým bočným reťaz-

com aminokyseliny (najčastejšie hexa-histidín) v proteínoch a prechodným kovovým iónom (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} a Fe^{2+}), ktorý je imobilizovaný na matici.

V poslednej dobe sa IMAC využíva vo zvýšenej miere v oblasti predprípravy vzoriek na detekciu liečiv ako tetracyklíny, chinolóny, makrolidy, β -laktámy a aminoglykozidy (T a k e d a et al., 2010) a biomarkerov v sére, moči a tkanivách v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou v klinicko-biochemickej diagnostike ochorení (F e l i x et al., 2011; W u et al., 2009).

Pull-down assay je *in vitro* metóda používaná na stanovenie fyzikálnych interakcií medzi dvoma a viac proteínmi. Vychytávaný proteín je značený a zachytený na imobilizovaný afinitný ligand špecifickým voľným koncom, čím vytvára základ pre purifikáciu iných proteínov, ktoré interagujú s vychytávaným proteínom. Zdroj vychytávaného proteínu v tomto kroku závisí od toho, či bola konfirmovaná predchádzajúca suspektná interakcia proteín-proteín, alebo bola identifikovaná neznáma interakcia. Používa sa aj na konfirmáciu výskytu proteín-proteín interakcií detegovaných inými technikami (napr. ko-immunoprecipitácia) a ako úvodná skriningová metóda pre identifikáciu predtým neznámych proteín-proteín interakcií. Táto metóda môže odhaliť koľko proteínov a akého druhu je prítomných v *in vivo* komplexe v biologických dráhach. Zároveň umožní bez ďalšej prípravy rýchlo a citlivo analyzovať veľkú množinu proteínov biochemického výskumu bez ďalšej prípravy (J a i n et al., 2012; Thermofisher, n. d.).

ZÁVER

Metódy afinitnej chromatografie (t. j. afinitnej purifikácie) zvyšujú rýchlosť a efektivitu proteínovej purifikácie a simultánne poskytujú technologickú platformu na uskutočnenie pull-down alebo ko-purifikácie potenciálne viažucich proteínov (Thermofisher, n. d.).

Afinitná chromatografia bola od svojho objavenia aplikovaná v mnohých aspektoch biologického výskumu. Využíva sa na identifikáciu proteínov a interakcií proteín-proteín, ktoré hrajú dôležité úlohy v biologických procesoch. Prostredníctvom využitia peptidovo-špecifického ligandu môžu byť efektívne separované aj peptidy (L e r m a n, 1953; F i g e y s et al., 2001; W e n - C h i e n, K e l v i n 2004).

Dvojdimenziálna elektroforéza (Two-dimensional Gel Electrophoresis—2-DE), a tiež proteomika, ktorá nie

je založená na dvojdimenziálnej elektroforéze, využíva benefity aplikácie afinitnej chromatografie. Pred proteínovou separáciou pomocou 2-DE sa primárne využíva afinitná separácia na zakoncentrovanie a úpravu vzorky. Afinitná purifikácia proteínových komplexov nasledovaná identifikáciou proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie slúži ako nástroj tvorby mapovania interakcií proteín-proteín a bunkovej lokalizácie komplexov. Objavenie interakcií medzi proteínmi umožnia objasniť ich funkcie a zmeny v interakciách proteín-proteín môžu poskytnúť cenné informácie o mechanizme ochorení (W e n - C h i e n, K e l v i n, 2004; B o n e t t a, 2010).

LITERATÚRA

1. **Bonetta, L. (2010):** Interactome under construction. Protein-Protein interactions technology. *Nature* 468, 851–854.
2. **Felix, K. et al. (2011):** Identification of serum proteins involved in pancreatic cancer chexia. *LifeSci* 88:218–225. doi: 10.1016/j.lfs.2010.11.011.
3. **Figeys, D., McBroom, L. D., Moran, M. F. (2001):** Mass Spectrometry for the Study of Protein-Protein Interactions. *Methods*, 24, 230–239. doi:10.1006/meth.2001.1184.
4. **Hage, D. S., Ruhn, P. F. (2005):** An introduction to affinity chromatography. In **Hage, D. S., editor: Handbook of Affinity chromatography**, 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2005, p. 3–13.
5. **Hage, D. S., Xuan, H., Nelson, M. A. (2005):** Application and elution in affinity chromatography. In **Hage, D. S., editor: Handbook of Affinity Chromatography**, 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2005. p. 79–97.
6. **Jain, A., et al. (2012):** Probing cellular protein complexes using single-molecule pull-down. *Nature*, 473: 484–488. doi: 10.1038/nature10016.
7. **Kostecká, Z. a kol. (2013):** *Návody na praktické cvičenia z biochémie pre študijný program farmácia*, Košice: UVLE, p. 108.
8. **Lerman, L. S. (1953):** A Biochemically Specific Method for Enzyme. *Isolation*, 39 (4) 232–236; <https://doi.org/10.1073/pnas.39.4.232>
9. **Puig, O. et al. (2001):** The tandem affinity purification (tap) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, 24, 218–229.
10. **Takeda, N., Matsuoka, T., Gotoh, M. (2010):** Potentiality of IMAC as sample pretreatment tool in food analysis for veterinary drugs. *Chromatographia*, 72: 127–131. doi: 10.1365/s10337-010-1631-9.

11. **ThermoFisher (n.d.):** *Overview of Affinity Purification*. Protein Biology Resource Library. Pierce Protein Methods. Dostupné na: <https://www.thermoFisher.com/sk/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-affinity-purification.html>.
12. **Turkova, J. (1978):** *Affinity chromatography*. Amsterdam: Elsevier.
13. **Walters, R. R. (1985):** *Affinity chromatography*. *AnalChem*, 57: 1099Ae114A.
14. **Wen-Chien, L., Kelvin, H. L. (2004):** Applications of affinity chromatography in proteomics. *Analytical Biochemistry*, 324:1–10.
15. **Wu, C. et al. (2009):** Surface enhanced laser desorption/ionization profiling: new diagnostic method of HBV-related hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 24: 55–62. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05580.x.



Laboratórna Diagnostika, XXIV, 1, 2019: 38–45

ROC KRIVKY – MOŽNOSTI VYUŽITIA V GENETICKÝCH ASOCIAČNÝCH ŠTÚDIÁCH

Gaško, R.^{1,2}, Biroš Hronská, D.³, Horváth, R.⁴, Lakatosová, K.⁵, Bernasovská, J.³, Bernasovský, I.⁶

¹Klinická epidemiológia a bioštatistika, EduStat, s.r.o., Košice

²Vysokošpecializovaný odborný ústav geriatrický sv. Lukáša v Košiciach n.o., Košice

³Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita v Prešove

⁴Pedagogická fakulta, Prešovská univerzita v Prešove

⁵OKB, Nemocnica s poliklinikou n.o. Kráľovský Chlmec

⁶Centrum jazykov a kultúr národnostných menšín
Ústav rómskych štúdií, Prešovská univerzita v Prešove

e-mail: biostatistikakosice@gmail.com

SÚHRN

Genetické asociačné štúdie predstavujú zvláštny typ genetického, v súčasnosti najmä molekulárno-genetického výskumu, pri ktorom majú podstatnú úlohu matematicko-štatistické metódy skúmania. Prezentujeme naše skúsenosti s výpočtom ROC kriviek a plochy pod krivkou (AUC) v testovaní dvoch polymorfizmov podľa literatúry asociovaných s vytrvalostným a rýchlostným profilom (ACTN3 R577X (rs1815739); HIF1A P582S (rs11549465)) u dospelých aj detských výkonnostných športovcov. Potvrdili sme v literatúre popisované možné rozdielne výsledky, získané pri genetických asociačných štúdiách vyhodnocovaním nepárovým t-testom a ROC krivkami, hlavne v hraničných stavoch. ROC krivky a AUC pokladáme za vhodné štatisticko-analytické inštrumenty (aj) v týchto typoch výskumu.

Kľúčové slová: genetické asociačné štúdie, štatistické metódy, ROC krivka, plocha pod krivkou

ABSTRACT

Genetic association studies represent a special type of genetic, currently mainly molecular genetic research in which play an essential role mathematical-statistical methods of investigation. We present our experience

with the calculation of receiver operator curves and area under the curve for genotyping two polymorphisms previously associated with an endurance or speed profile (ACTN3 R577X (rs1815739); HIF1A P582S (rs11549465)) in adult and children's performance athletes. We confirmed that the previously described, different results may be obtained for genetic association studies in the evaluation with the unpaired t-test and the ROC, especially in the borderline states. ROC's and AUC seems appropriate for statistical and analytical instruments even in these types of research.

Keywords: genetic association studies, statistical methods, receiver operator characteristic curve, area under the curve

DEDIKÁCIA

„8. februára 1865 Mendel prečítal prácu s názvom *Versuche über Pflanzen-Hybriden* (Pokusy s rastlinnými hybridmi) pred *Naturforschender Verein* (Prírodovedným spolkom) v Brne. Poslucháčov bolo okolo štyridsať; nikto nediskutoval. Na nasledujúcom stretnutí 8. marca Mendel diskutoval interpretáciu svojich výsledkov a ich význam. Nie je príliš odvážne tvrdiť, že tieto prednášky, ktoré boli základom vedy genetiky, a matematika a teória pravdepodobnosti nimi vstúpili do štúdia dedičnosti, predstavujú

pokrok vo vedomostiach v oblasti biologických vied veľkou porovnateľný s tým o evolúcii prirodzeným výberom.“ Úvodné vety práce (de B e e r et al., 1964).

„Matematika má dlhú tradíciu v biológii a medicíne, počnúc prácou Gregora Mendela v genetike a prácou Theodora Boveriho o podstate chromozómov.“ Úvodná veta práce (C a s t r o et al., 2016).

„Najvýznamnejším Mendelovým prínosom v biológii je to, že ako prvý biológ začal tvrdiť, že popis genetického chovania sa je v základe pravdepodobnostný, a že napriek zložitosti, ktorá biológiu charakterizuje, pravdepodobnostný fenomén možno skutočne opísať s pozoruhodnou presnosťou.“ (B o l f, B a r t a, 1988)

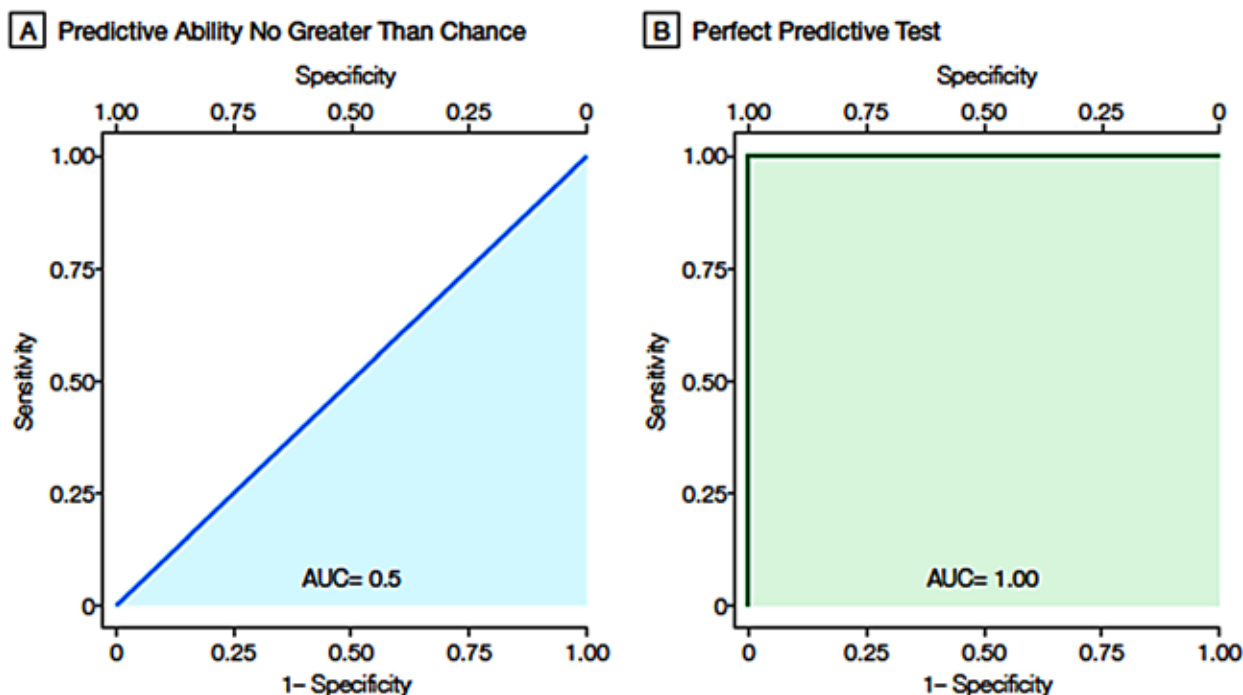
„Mendelove zákony boli znovuobjavené nezávisle tromi rôznymi botanikmi, ktorí sa zaoberali štúdiom rastlinných hybridov – de Vries, Correns a Tschermak – v roku 1900.“ (C a s t l e, 1903)

Touto prácou si pripomínáme Gregora Johanna Mendela (1822–1884), zakladateľa genetiky a jedného zo zakladateľov bioštatistiky – náuky o použití matematicko-štatistických výskumných metód v biologických vedách. Pred 4 rokmi si vedecký svet pripomenul 150. výročie zverejnenia jeho genetických objavov, onedlho o 3 roky si pripomenie 200. výročie jeho narodenia.

Mendelova práca *Pokusy s rastlinnými hybridmi*, písomne zverejnená v roku 1866, je k dispozícii v modernom českom preklade v knihe (S n u s t a d, S i m m o n s, 2017a), ako apendix českého prekladu svetoznámej učebnice genetiky. V slovenčine je popis tejto práce uverejnený v knihe (T o m á š k a et al., 2015), ktorá bola dôstojným slovenským vedeckým príspevkom ku oslave 150 rokov Mendelových prednášok.

ÚVOD

Naše chápanie genetického vplyvu na rôzne fyzické danosti človeka, ktoré v minulosti mohli byť výhodou v boji o potravu a prežitie, a dneska môžu byť výhodou pri podávaní vrcholového výkonu v rôznych športových odvetviach, sa intenzívne rozvíja v ostatných necelých dvoch desaťročiach. Tento výskum je v podstate obdobný ako výskum, zameraný na objasňovanie genetického základu ochorení, ktorý sa vykonáva o niekoľko desaťročí dlhšie. Pri meraní genetického vplyvu na ochorenia, alebo športový výkon, nazývanom genetické asociačné štúdie, hrajú podstatnú úlohu matematicko-štatistické metódy skúmania.



Obrázok 1. A. Príklad ROC krivky pre test, ktorý nemá žiadnu výpovednú hodnotu. B. Príklad ROC krivky s absolútnou prediktívnou schopnosťou (senzitivita = 100 %, špecifita = 100 %). Prevzaté z Th a n a b a l a s i n g h a m et al. (2013)

Základnými, a ďaleko najčastejšie používanými v asociačných štúdiách sú testy hypotéz, predovšetkým chí-kvadrát test (jeho elegantný popis je uvedený v knihe – S n u s t a d, S i m m o n s, 2017b) a príslušná varianta t-testu (pre testovanie štatistickej významnosti rozdielov medzi frekvenciou prítomnosti a neprítomnosti sledovaného ochorenia, resp. dosiahnutia alebo nedosiahnutia vrcholového športového výkonu, a nosičstvom konkrétnej alely u sledovaného génu, alebo konkrétnych alel u kombinácie viacerých génov).

Možnosti použitia správnej metódy sú však podstatne bohatšie. Vo výstižnom prehľade (W i t t e et al., 2014) autori popisujú 5 rôznych metodických postupov pri piatich rôzne postavených výskumných otázkach. Jednou z nich je metóda ROC krivky (receiver operating characteristic curve, do slovenčiny aj češtiny sa výraz prekladá ako ROC krivka) s meraním plochy pod krivkou (area under the curve, AUC). Táto metóda je pre asociačné štúdie rozobraná aj v prácach A t t i a a kol. (2009), J a k o b s d o t t i r a kol. (2009), W r a y a kol. (2010).

Podľa našich vedomostí, slovenskí autori, zaoberajúci sa asociačnými štúdiami, vo svojich časopiseckých publikáciách – ktoré sú, z logiky významu výskumu, publikované hlavne v angličtine a hlavne v medzinárodných časopisoch – doteraz nepoužili metódu ROC krivky. V zriedkavých prípadoch boli členmi medzinárodných tímov, ktorých publikácie touto krivkou svoje merania vyhodnocovali (T h a n a b a l a s i n g h a m et al., 2013). Tým, samozrejme, nechceme generalizovať, že slovenskí autori nepoužívajú iné sofistikovanejšie štatistické metódy.

V tomto príspevku chceme poukázať na možnosti, ktoré ROC krivka ponúka, a zároveň demonštrovať, že rôzne metódy spracovania môžu vyústiť do rôznych výsledkov, ktoré môžu priniesť rozdielnu interpretáciu.

METODIKA

Športová výkonnosť je multifaktoriálny polygénový znak ovplyvňovaný tréningom, environmentálnou a genetickou predispozíciou. Špičkoví športovci sú viacmenej extrémnymi produktami genetickej variability a ich výnimčnosť spočíva v tom, že sa výrazne odlišujú od bežného priemeru. Otázkou je, či, a ak áno, s akou pravdepodobnosťou, je možné už v detskom veku medzi športovými nádejami identifikovať tých, ktorí sú svojou genetickou výbavou vhodnejší ku rýchlostným alebo vytrvalostným

športovým disciplinám. Vo výberových súboroch mužov triatlonistov (ďalej MT), priemerný vek $33,32 \pm 5,56$ rokov, $n = 97$; chlapcov športovcov triatlonistov (ďalej CHS), priemerný vek $10,4 \pm 0,40$ rokov, $n = 87$; a chlapcov hádzanárov (ďalej CHH), priemerný vek $10,6 \pm 0,88$ rokov, $n = 77$, sme vykonali testovanie ich fyzickej výkonnosti sadami štandardizovaných motorických testov. Probandi boli členmi viacerých športových oddielov z územia celého Slovenska. Mali vyšetrené polymorfizmy R577, rs1818739, ACTN3 génu a P582S, rs 11549465, HIF1A génu (E y n o n et al., 2010; M c K a y et al., 2016). Pre rs1815739 je genotyp TT pokladaný za „vytrvalostný“. Pre rs11549465 je genotyp CC kandidátsky „vytrvalostný“ (zatiaľ nebolo overené). Presné charakteristiky vyšetovaných súborov, popisy metodiky molekulovo-genetického testovania, ako aj popisy vykonávania motorických testov nie sú pre túto prácu podstatné, sú uvedené v práci (H o r v á t h et al., 2010).

Výskumné otázky: „Je rozdiel medzi nositeľmi rýchlostného genotypu pre rs1815739 a nositeľmi ostatných genotypov vo výsledkoch motorických testov SKOK, LS, CBEH, VBEH, HODzem a HODvys, a to v skupine chlapcov hádzanárov, štatisticky významný?“; „Je rozdiel medzi nositeľmi vytrvalostného genotypu pre rs1815739 a nositeľmi ostatných genotypov vo výsledkoch motorických testov PLAVANIE, VBEH, SKOK, LS, TAP, a to v skupine dospelých triatlonistov aj v skupine chlapcov športovcov, štatisticky významný?“ Rozloženie hodnotených dát bolo normálne. Primárne testovanie bolo vykonané nepárovým t-testom, $p < 0,05$ bolo zvolené za hranicu štatistickej významnosti.

Použitie ROC kriviek a AUC

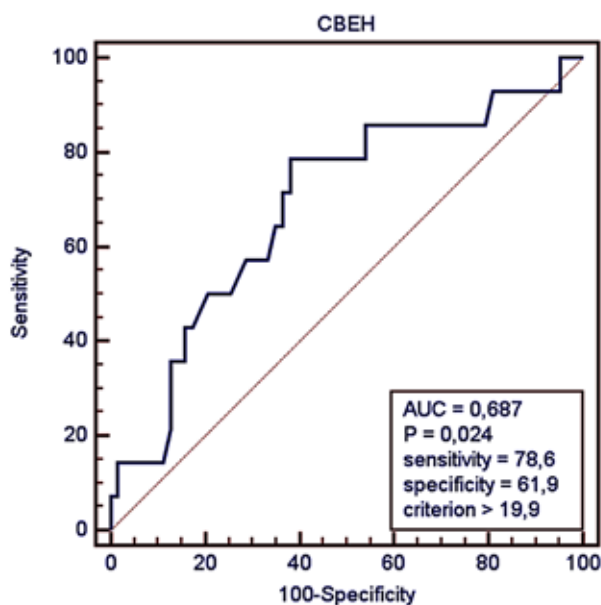
V súbore CHH, boli hodnotené výsledky 6 motorických testov v asociácii na gén rs1815739, u nositeľov genotypu TT oproti nositeľom genotypov CC a TC. (Genotyp TT je „vytrvalostný“.) Štatisticky významný rozdiel bol zistený pre test CBEH.

Vykreslili sme teraz ROC krivky pre motorický test CBEH a pre všetkých 6 motorických testov.

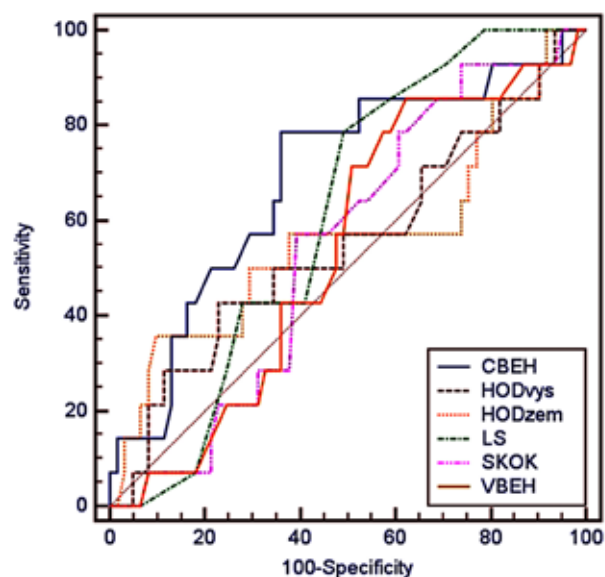
Hodnota p (resp. P podľa anglického úzusu) je pravdepodobnosť, že hodnota AUC je rozdielna od hodnoty 0,5. Ak je $p < 0,05$, je nameraná hodnota AUC štatisticky významne rozdielna od 0,5, teda od testu so žiadnou výpovednou hodnotou (pozri Obrázok 1). Pre AUC sú zároveň vypočítané 95 % CI, v tomto prípade majú hodnotu 0,571–0,787. Dolná hodnota je vyššia než 0,5, čo potvrdzuje rozdiel od tejto hodnoty. Hodnoty senzitivity a špe-

Tabuľka 1. Súbor CHH, gén 1815739, genotyp TT vs CC + TC, hodnotenie výkonov nepárovým t-testom

	t-testová štatistika	stupne voľnosti	p
CBEH	-2,305	75	0,0239
HODvys	0,798	74	0,4273
HODzem	0,888	75	0,3776
LS	-0,873	75	0,3853
SKOK	-0,334	75	0,7390
VBEH	0,558	73	0,5785



Obrázok 2. ROC krivka pre motorický test CBEH s hodnotami AUC, senzitivity, špecifity a hraničnej hodnoty, pre ktorú senzitivity a špecifita platia



Obrázok 3. Porovnanie všetkých 6 ROC kriviek

cificity platia pre hraničnú hodnotu (criterion) dosiahnutú pri CBEH 19,9 (v tomto prípade jednotkou sú sekundy).

Opticky sa zdá, že aj ROC krivka pre motorický test LS môže byť významne odlišná od hodnoty 0,5, a to pri t-testom dosiahnutej hodnote $p = 0,3853$. Skutočne, jej hodnota $AUC = 0,609$, avšak s 95 % CI 0,489–0,702 a $p = 0,073$. Nebol dokázaný štatisticky významný rozdiel od hodnoty 0,5.

V súbore CHS, boli hodnotené výsledky 5 motorických testov v asociácii na gén rs11549465, nositelia genotypu CC oproti nositeľom genotypov TT a CT. (Genotyp CC je kandidátsky „vytrvalostný“, zatiaľ nebolo overené.)

Opticky sa zdá, že aj ROC krivka pre motorický test LS môže byť významne odlišná od hodnoty 0,5, a to pri

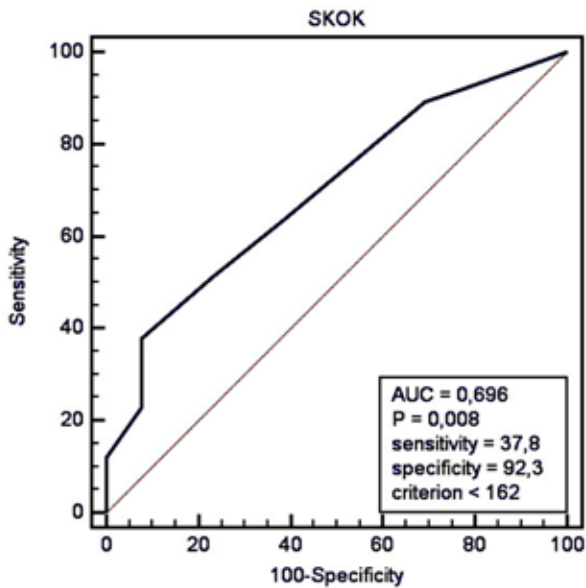
t-testom dosiahnutej hodnote $p = 0,0647$. Jej hodnota $AUC = 0,661$, s 95 % CI 0,551–0,759, avšak $p = 0,071$. Nebol dokázaný štatisticky významný rozdiel od hodnoty 0,5.

V súbore MT, rovnako ako v súbore CHS, boli hodnotené výsledky 5 motorických testov v asociácii na gén rs11549465, nositelia genotypu CC oproti nositeľom genotypov TT a CT. (Genotyp CC je kandidátsky „vytrvalostný“, zatiaľ nebolo overené.)

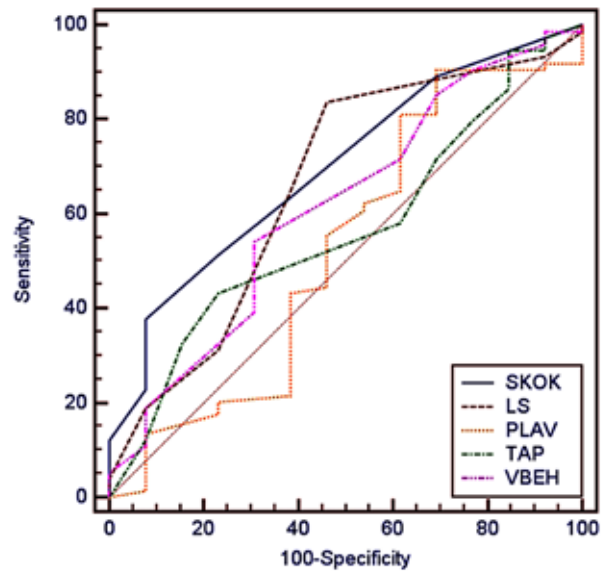
Opticky sa zdá, že aj ROC krivka pre motorický test VBEH môže byť významne odlišná od hodnoty 0,5, a to pri t-testom dosiahnutej hodnote $p = 0,1208$. Jej hodnota $AUC = 0,616$, s 95 % CI 0,512–0,713, avšak $p = 0,063$. Nebol dokázaný štatisticky významný rozdiel od hodnoty 0,5.

Tabuľka 2. Súbor CHS, gén rs11549465, genotyp CC vs TT + CT, hodnotenie výkonov nepárovým t-testom

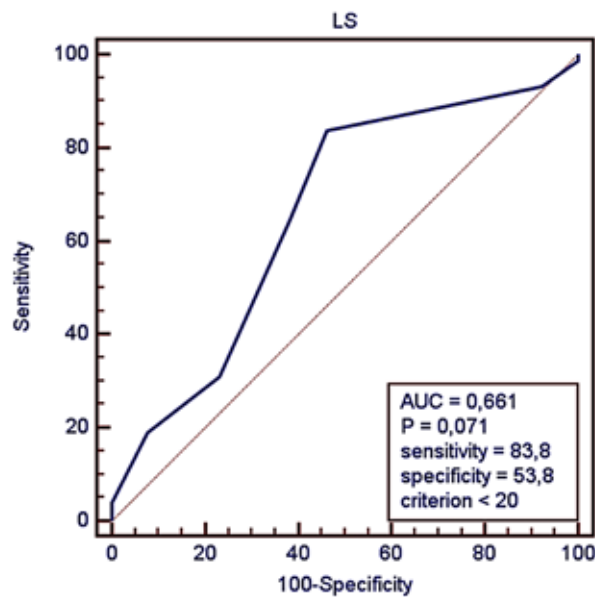
	t-testová štatistika	stupne voľnosti	p
LS	1,871	85	0,0647
PLAV	0,151	85	0,8804
SKOK	2,273	85	0,0256
TAP	0,798	85	0,4273
VBEH	1,427	85	0,1572



Obrázok 4. ROC krivka pre motorický test SKOK s hodnotami AUC, senzitivity, špecifity a hraničnej hodnoty, pre ktorú senzitivity a špecifita platia



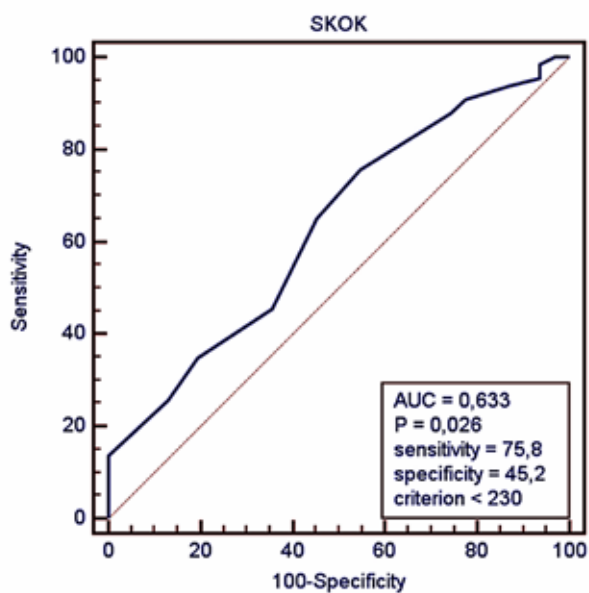
Obrázok 5. Porovnanie všetkých 5 ROC kriviek



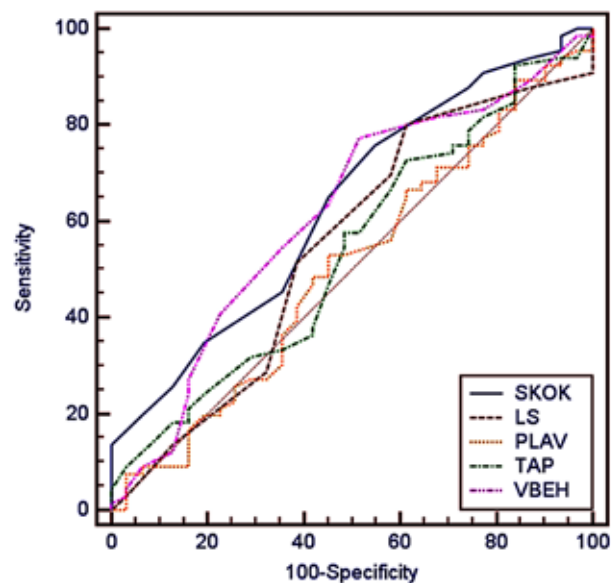
Obrázok 6. ROC krivka pre motorický test LS s hodnotami AUC, senzitivity, špecifity a hraničnej hodnoty, pre ktorú senzitivity a špecifita platia

Tabuľka 3. Súbor MT, gén rs11549465, genotyp CC vs TT + CT, hodnotenie výkonov nepárovým t-testom

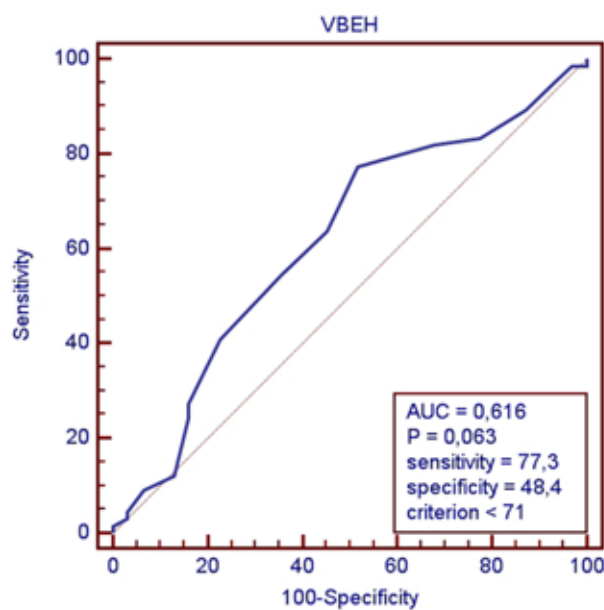
	t-testová štatistika	stupne voľnosti	p
LS	0,620	95	0,5366
PLAV	0,042	95	0,9664
SKOK	2,464	95	0,0155
TAP	0,637	95	0,5255
VBEH	1,565	95	0,1208



Obrázok 7. ROC krivka pre motorický test SKOK s hodnotami AUC, senzitivity, špecifity a hraničnej hodnoty, pre ktorú senzitivity a špecifita platia



Obrázok 8. Porovnanie všetkých 5 ROC kriviek.



Obrázok 9. ROC krivka pre motorický test VBEH s hodnotami AUC, senzitivity, špecifity a hraničnej hodnoty, pre ktorú senzitivity a špecifita platia

DISKUSIA

ROC krivky sa vo vedeckom výskume v laboratórnej a čiastočne aj klinickej medicíne štandardne využívajú. Klasické prehľadové články o ROC Hanley-ho a McNeila (1982) a Zweiga a Campbella (1993) majú podľa Scholar Google citovanosť vyše 17300, resp. vyše 6300-krát.

V asociačných štúdiách, zameraných na identifikáciu „športových génov“ sa ROC krivky s výhodou použili napr. na porovnanie pri polygénomnom profilovaní (G r e a l y et al., 2015; C o n t r o et al., 2018).

Vypočítané hodnoty senzitivity a špecificity, pri optimálnej (programom) určenej hraničnej hodnote – tu označenej ako criterion – môžu byť v niektorých typoch štúdií tiež prínosnou informáciou.

Pokladáme za potrebné zdôrazniť, v zhode s W r a y et al. (2010), že ani silná asociácia, nech je doložená akokoľvek štatistickou metódou, a je akokoľvek cenná pre posúdenie etiologických hypotéz, nezaručuje efektívnu diskrimináciu medzi pacientmi a kontrolami, resp. medzi dvoma výkonnostnými skupinami športovcov. Vzletne povedané, svätý grál biológie prelomu tisícročia v podobe osekvenovaného ľudského genómu obrátil nádeje biológov v prach a biedu tým, že ukázal, že namiesto pohodlného zoznamu štruktúrnych génov na nás čaká frustrujúca húština regulačných sietí, kde všetko súvisí so všetkým.

Matematicko-štatistické inštrumentárium je stále vo vývoji. Nové štatistické metódy sú všeobecne, celosvetovo, v medicínskej literatúre málo využívané a používané (P u l l e n a y e g u m et al., 2016; K a l i n a, Z v á r o v á, 2017). Týmto príspevkom by sme chceli skromne prispieť ku zlepšeniu tohto stavu.

ZÁVER

Potvrdili sme v literatúre popisovanú možnosť rozdielných výsledkov, získaných pri genetických asociačných štúdiách vyhodnocovaním nepárovým t-testom a ROC krivkami, hlavne v hraničných stavoch. ROC krivky a AUC pokladáme za vhodné štatisticko-analytické inštrumenty (aj) v týchto typoch výskumu.

LITERATÚRA

1. **de Beer, G., Mendel, Darwin, Fisher (1865–1965)(1964):** *Notes and Records of the Royal Society of London*, 1964, 19(2), 192–226.
2. **Castro, M. et al. (2016):** Mathematics in modern immunology. *Interface Focus*, 2016, 6: 20150093. doi: 10.1098/rsfs.2015.0093.
3. **Bolf, J., Barta, E. (1988):** *Metodologické problémy biologického experimentu*. Bratislava: VEDA – vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, 1988, s. 176.
4. **Castle, W. E. (1903):** Mendel's Law of Heredity. *Science*, 1903, 18(456), 396–406.
5. **Snustad, D. P., Simmons, J. M. (2017a):** *Genetika – Druhé, aktualizované vydanie*. Brno: Nakladateľství Masarykovy univerzity, 2017, 864 s.
6. **Tomáška, L. et al. (2015):** Klasické experimenty v genetike. Bratislava. *Create Space Independent Publishing Platform*, 2015, 242 s.
7. **Snustad, D. P., Simmons, J. M. (2017b):** Mendelismus. In *Genetika – Druhé, aktualizované vydanie*. Brno: Nakladateľství Masarykovy univerzity, 2017, s. 52–55.
8. **Witte, J. S., Visscher, P. M., Wray, N. R. (2014):** The contribution of genetic variants to disease depends on the ruler. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(11), 765–776.
9. **Attia, J. et al. (2009):** How to use an article about genetic association: C: What are the results and will they help me in caring for my patients? *JAMA*, 2009, 301(3): 304–308.
10. **Jakobsdottir, J. et al. (2009):** Interpretation of genetic association studies: markers with replicated highly significant odds ratios may be poor classifiers. *PLoS Genet.*, 2009, 5(2), e1000337.
11. **Wray, N. R. et al. (2010):** The genetic interpretation of area under the ROC curve in genomic profiling. *PLoS Genet.*, 2010, 6(2), e1000864.
12. **Thanabalasingham, G. et al. (2013):** Mutations in HNF1A result in marked alterations of plasma glycan profile. *Diabetes*, 2013, 62(4), 1329–1337.
13. **Eynon, N. et al. (2010):** Is the interaction between HIF1A P582S and ACTN3 R577X determinant for power/sprint performance? *Metabolism*, 2010, 59(6), 861–865.
14. **McKay, M. et al. (2016):** 1000 Norms Project: protocol of a cross-sectional study cataloging human variation. *Physiotherapy*, 2016, 102(1): 50–56.

15. **Horváth, R. et al. (2010):** *Diagnostika motorickej výkonnosti a genetických predpokladov pre šport*. Prešov: Vydavateľstvo Prešovskej university, 2010, 227 s.
16. **Hanley, J. A., McNeil, B. J. (1982):** The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*, 1982, 143: 29–36.
17. **Zweig, M. H., Campbell, G. (1993):** Receiver-operating characteristics (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem.*, 1993, 39(4): 561–577.
18. **Grealy, R. et al. (2015):** Evaluation of a 7-Gene Genetic Profile for Athletic Endurance Phenotype in Ironman Championship Triathletes. *PLoS One*, DOI:10.1371/journal.pone.0145171, December 30, 2015.
19. **Contro, V. et al. (2018):** An innovative way to highlight the power of each polymorphism on elite athletes phenotype expression. *Eur. J. Transl. Myol.*, 2018, 28(1): 87–92.
20. **Pullenayegum, E. M. et al. (2016):** Knowledge translation in biostatistics: a survey of current practices, preferences, and barriers to the dissemination and uptake of new statistical methods. *Statistics in medicine*, 2016, 35(6), 805–818.
21. **Kalina, J., Zvárová, J. (2017):** Analýza dat: výzvy a špecifika v neurovýchádzach a psychiatrii. *Čas. Lék. čes.*, 2017, 156(8): 430–436.



Laboratórna Diagnostika, XXIV, 1, 2019: 46–50

OBRANNÉ ZLOŽKY SLINY AKO MARKERY PARODONTÁLNYCH OCHORENÍ

Mašlanková, J., Ternavský, O., Stupák, M., Mareková M.
Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ LF, Košice

jana.maslankova@upjs.sk

SÚHRN

Výskum chorôb ústnej dutiny je v posledných dvoch desaťročiach cielene sústredený a metodicky orientovaný k odhaleniu špecifických biomarkerov vhodných pre skorú a účinnú diagnostiku parodontálnych ochorení. Sliny, pre neinvazívny odber ľahko dostupná a na proteíny bohatá telová tekutina, predstavujú vynikajúci monitorovací materiál a potenciálne miesto, či už tvorby alebo metabolickej premeny pravdepodobných proteínových biomarkerov. Tieto markery by mali spĺňať kritériá kladené na látky vhodné pri monitorovaní terapeutickje odpovede alebo predikcii moźnej progresie ochorenia parodontu v budúcnosti.

Kľúčové slová: parodontitída, slina, markery

ABSTRACT

Research in oral cavity diseases has been focused and methodically oriented to detect specific biomarkers suitable for early and effective diagnosis of periodontal diseases over the last two decades. Saliva, an easily available and protein-rich body fluid for non-invasive harvesting, is an excellent monitoring material and a potential site for both the formation or metabolic conversion of probable protein biomarkers. These markers should meet the

criteria for the substances useful in monitoring the therapeutic response or predicting the possible progression of periodontal disease in the future.

Keywords: periodontitis, saliva, markers

ÚVOD

Parodontálne ochorenia sú celosvetovo výrazne rozšírené a môžu postihnúť až 90 % celosvetovej populácie. Predstavujú multifaktoriálne chronické zápalové ochorenie postihujúce tkanivá obklopujúce zuby (M e g h i l et al., 2019). Patria medzi najčastejšiu príčinu straty trvalých zubov. Z parodontálnych ochorení je klinicky najvýznamnejšia gingivitída a parodontitída. Parodontitída časom spôsobuje ireverzibilné poškodenie závesného aparátu zuba. Okrem toho má parodontitída negatívny vplyv na množstvo iných orgánov a tkanív. Prítomnosť parodontitídy pozitívne koreluje so zvýšenou prevalenciou kardiovaskulárnych ochorení, cukrovky, zápalov dýchacieho traktu, reumatoidnou artritídou, predčasným pôrodom novorodencov, zníženou pôrodnou hmotnosťou novorodencov, osteoporózou, chronickým ochorením obličiek, kognitívnym poškodením a niektorých druhov rakovín. Pre priaznivý terapeutický výsledok je najdôležitejšia skorá diagnostika a terapia tohto ochorenia. Na dosiahnutie tohto cieľa môžeme použiť špecifické a citlivé biomarke-

ry, ktoré môžu určovať druh a stupeň ochorenia a reakciu pacienta na danú liečbu. Jeden z ľahko dostupných diagnostických nástrojov predstavujú sliny, ktoré reprezentujú stále vonkajšie prostredie pre tkanivá ústnej dutiny. Poznanie prirodzených obranných systémov slín významne determinuje cieľnú fokusáciu výskumných snáh.

OBRANNÉ ZLOŽKY SLINY

Slinné mucíny

Klasické sekrečné mucíny tvoria už pri nízkych koncentráciách hydrofilné viskoelastické gély. Tieto gély fungujú ako bariéry, chránia základný epitel pred mechanickým poškodením a zabraňujú priamemu vniknutiu škodlivých čínidiel, vrátane baktérií a vírusov, do základného zraniteľného epitelu. Ľudské sliny obsahujú dva geneticky odlišné typy mucínu, oligoméren glykoproteín MG1 s molekulovou hmotnosťou 1 MDa a monoméren glykoproteín MG2 s molekulovou hmotnosťou 200–250 kDa. Zistilo sa, že MG2 existuje najmenej v dvoch glykoformách, MG2a a MG2b. Slinný MG1 existuje v najmenej troch rôznych glykoformách, ktoré sa líšia v obsahu kyseliny sialovej a síranov. Dokonca aj v rámci jednej žľazy boli rozpoznané rôzne glykoformy MG1, ktoré ukazujú na extrémnu inter- a intra- molekulárnu heterogenitu tejto triedy glykoproteínov v slinách. MG1 patrí funkčne a štruktúrne ku klasickým mucínom, ktoré sú hlavnými zložkami slizových vrstiev. Pokrývajú sliznicové epitely v celom tele, napr. v gastrointestinálnom trakte, urogenitálnom trakte a dýchacích cestách (Ukkonen et al., 2017). V ústnej dutine je MG1 prítomný v proteínových filmoch (pelikulách) pokrývajúcich povrchy skloviny a epitely, chráni ich pred účinkom kyselín a moduluje mikrobiálnu kolonizáciu týchto povrchov (K h o, 2018).

Aglutiníny

Slinný aglutinín (SAG) je glykoproteín s molekulovou hmotnosťou približne 340 kDa a extrémne lepivými vlastnosťami, ktorý je exprimovaný v serózných bunkách submandibulárnych, sublingválnych a labiálnych žliaz. Slinný aglutinín sa na rozdiel od MG1 syntetizuje aj v seróznej príušnej žľaze. V prípade príušnej žľazy bol aglutinín lokalizovaný iba v duktálnych bunkách, zatiaľ čo v submandibulárnej žľaze bol aglutinín detegovaný v serózných acinárnych bunkách a v serózných demilunových bunkách zakrývajúcich sliznicu acínov. V slinách sa SAG viaže

na široké spektrum orálnych patogénov vrátane baktérií a vírusov a taktiež na slinné proteíny, vrátane IgA a mucínu MG1. Tento slinný glykoproteín je tiež zložkou slinnej pelikuly na povrchu zubov (Z h a n g et al., 2019). Okrem účinných antibakteriálnych a antivírusových vlastností, aglutinín v slinách vykazuje aj určité aktivity imunitného aktivátora/modulátora.

Cystatíny

V slinách sa vylučuje najmenej desať izoformami cystatínov, zahŕňajúc neutrálny cystatín SN, mierne aniónové izoformy cystatínu SA, 4 izoformy aniónového cystatínu S, cystatín C, kationový cystatín a cystatín D (M a n c o n i et al., 2017). Existujú experimentálne dôkazy, ktoré naznačujú, že cystatín C, aj keď predstavuje malú časť celkovej populácie perorálnych cystatínov, najviac prispieva k cysteínovej inhibičnej aktivite sliny. Zo všetkých slinných cystatínov, cystatín C vykazuje najsilnejšiu inhibíciu cysteínových proteínáz (katepsíny a papaín). Slinné cystatíny sú u ľudí vylučované konštitutívne, ale bolo dokázané, že hladiny cystatínu C sú zvýšené pri ťažkom zápale parodontu. Ukázalo sa, že cystatíny môžu upregulovať aj sekréciu cytokínov v gingiválnych fibroblastoch (I w a s v a k i et al., 2016).

VEGH

VEGH (lipocalin from the human Von Ebner's gland of the tongue) je slinný proteín vylučovaný Von Ebnerovými žľazami. VEGH patrí do lipokalínovej superrodiny, ktorej členovia majú veľmi podobné štruktúrne črty napriek takmer úplnej absencii sekvenčnej homológie. VEGH môže pôsobiť ako inhibítor cysteínových proteáz. Táto aktivita bola pripísaná prítomnosti inhibičnej domény na jeho N-konci. Zistilo sa tiež, že VEGH vykazuje peroxidáčnu schopnosť indukovanú oxidačným stresom. VEGH má tiež endonukleázovú aktivitu, ktorou inhibuje replikáciu RNA a DNA vírusov (O l s o n et al., 2019).

Sekrečný inhibítor leukocytovej proteázy

Sekrečný inhibítor leukocytovej proteázy (SLPI) je inhibítor serínovej proteázy 117 kDa (107 aminokyselín), ktorý riadi nadmernú proteolýzu spôsobenú proteázami (t. j. elastázou, katepsínom G) neutrofilných granulocytov. Exprimuje sa v rôznych sekrečných tkanivách, vrátane submandibulárnych, sublingválnych, príušných a malých slinných žľazách. Okrem inhibičných vlastností proteínov má SLPI antimikrobiálne a antivírusové vlastnosti. Zaujímavé

je, že myši bez génu kódujúceho SLPI vykazujú zhoršené hojenie kožných poranení so zvýšenou aktivitou zápalu a elastázy, čo ukazuje na kľúčovú úlohu SLPI v procese hojenia (X i e et al., 2019).

Tkanivové inhibítory metaloproteináz

V sekrétoch, ktoré sú produkované príušnými a submandikulárnymi žľazami bol identifikovaný TIMP-1, ktorý je členom rodiny tkanivových inhibítorov matrixových metaloproteináz (MMP). Vzhľadom na ich silný inhibičný účinok na MMP, vrátane kolagenázy, gelatinázy a stromelyzínu sa predpokladá, že TIMP hrajú dôležitú úlohu pri obnove a remodelácii extracelulárnej matrix. Hladiny TIMP v slinách pacientov s parodontitídou, ktoré majú zvýšenú aktivitu kolagenázy, sú nižšie v porovnaní s hladinami v zdravých kontrolách. Boli však publikované aj ďalšie unikátne funkcie TIMP vrátane erytroidnej potenciačnej aktivity, aktivity podporujúcej bunkový rast a stimuláciu osteoklastickej kostnej resorpcie (F r e i t a s et al., 2018).

Extraparotidový glykoproteín (EP-GP)

EP-GP je proteín, ktorý sa podieľa na tvorbe zubnej pelikuly, pretože má vysokú afinitu k hydroxyapatitu. Proteín EP-GP je prítomný aj v niekoľkých iných telesných tekutinách, vrátane potu, semena a sĺz a je takmer totožný so sekrečným proteínom viažúcim aktín (SABP) a s glykoproteínom (GCDFP-15). Prítomnosť v mukózných sekrétoch poukázala na všeobecnejšiu ochrannú úlohu pre EP-GP, ktorý bol podporený poznatkom, že tento proteín sa viaže na mikroorganizmy, rovnako ako na receptor CD4 na monocytoch. Za fyziologických podmienok môže byť EP-GP zapojený do výmeny slizníc buniek prostredníctvom uľahčenia odlúčenia epiteliálnych buniek (B h a t, B h a t, 2019).

Laktoferín

Laktoferín je antimikrobiálny glykoproteín zo skupiny transferínov. Prítomnosť laktoferínu v sekrétoch, ako sú slzy, mlieko a sliny je zvyčajne spojená so schopnosťou viazať železo. Bakteriostatické účinky laktoferínu sú výsledkom jeho účinkov, ktoré vytvárajú nepriaznivé podmienky pre rast škodlivých mikroorganizmov, ktoré potrebujú pre svoj rast železo. Okrem toho ľudský laktoferín obsahuje skrytú antimikrobiálnu doménu, ktorá sa uvoľňuje z molekuly po proteolytickom štiepení pepsínom. Jedným z cieľových mikroorganizmov laktoferínu je baktéria *A. actinomycetemcomitans*. U pacientov s paro-

odontitídou, u ktorých sa vyskytuje *A. actinomycetemcomitans* existuje negatívna korelácia medzi množstvom subgingiválnych *A. actinomycetemcomitans* a koncentráciou laktoferínu v sline. Predpokladá sa, že antimikrobiálne domény sa uvoľnia počas trávenia laktoferínu v gastrointestinálnom trakte. To by podporilo myšlienku, že slinné proteíny sa okrem úst zapájajú do ochrany organizmu aj v distálnejších častiach gastrointestinálneho traktu. Laktoferín je multifunkčný proteín s bakteriostatickými, baktericídnyimi, fungicídnyimi, protivírusovými, protizápalovými a imunomodulačnými vlastnosťami (G i a n s a n t i et al., 2018).

Peroxidázy

Peroxidázovú aktivitu v slinách vykazujú 2 enzýmy: ľudská slinná laktoperoxidáza (HS-LPO) syntetizovaná a vylučovaná slinnými žľazami a myeloperoxidáza (MPO) pochádzajúca z polymorfonukleárných leukocytov (PMN), ktoré migrujú do ústnej dutiny v oblasti lymfatických štrbín. Podiel MPO na celkovej peroxidázovej aktivite sa môže pohybovať medzi 30 a 75 %, čo závisí na ústnom zdraví pacientov. Slinné peroxidázy katalyzujú tvorbu bakteriálnych zlúčenín, napr. hypothiokyanátu. Kvôli týmto antimikrobiálnym účinkom sa laktoperoxidázy pridávajú do niektorých prípravkov na čistenie zubov, ktoré podporujú endogénnu aktivitu slinnej laktoperoxidázy (S a r r et al., 2018).

Lyozým

Lyozým je prítomný vo väčšine telesných tekutín, vrátane slín, sĺz, bronchiálneho hlienu a potu. Známa antimikrobiálna aktivita lyozýmu je vo všeobecnosti spojená s jeho lytickým pôsobením na baktérie. Lyozým vyказuje aktivitu muramidázy hydrolýzou β -(1→4)-glykozidových väzieb medzi kyselinou N-acetylmurámovou a N-acetyl-D-glukozamínom bakteriálnej bunkovej steny peptidoglykánu. Lyozým zabíja hlavne grampozitívne baktérie. Lyozým sa viaže aj na bakteriálny lipopolysacharid (LPS), bakteriálnu povrchovú štruktúru a bakteriálny toxín, ktoré sú často zodpovedné za zápalové reakcie poškodzujúce tkanivo. Očakáva sa tiež, že lyozým môže ovplyvniť funkciu ľudských granulocytov a lymfocytov a môže inaktivovať vírusy (H o n g et al., 2019).

Chitináza

Nedávno sa preukázalo, že chitináza, ktorá katalyzuje hydrolytické štiepenie β -(1→4) glykozidovej väzby chití-

nu (GlcNAc) je prítomná nielen v sére, ale aj v slinách. Je tvorená v parotidových, submandibulárnych, sublingválnych a palatinálnych žľazách. Keďže chitín je zložkou kvasinkových bunkových stien, chitinázová aktivita hrá úlohu pri kolonizácii orálnych epiteliálnych slizníc kvasinkami. Zaujímavé je, že v slinách pacientov s parodontitídou sú hladiny chitinázy signifikantne zvýšené v porovnaní so zdravými kontrolnými skupinami. Po parodontálnej liečbe sa zistilo zníženie aktivity chitinázy, čo poukazuje na zápalovými mediátormi regulovanú expresiu (Z i a t a b a r et al., 2018).

Histatíny

Histatíny sú vylučované príušnou žľazou, ako aj sublingválnymi a submandibulárnymi žľazami. Existuje asi 12 histatínov (HRP), z ktorých najdôležitejšie sú: histatín-1, histatín-2, histatín-3 a histatín-5 (tento posledný je proteolytickým štiepnym derivátom histatínu-3). Histatíny majú širokospektrálne antibakteriálne aj protiplesňové vlastnosti a tiež vykazujú antivírusové vlastnosti. Ako kationové peptidy sa histatíny adsorbujú prostredníctvom elektrostatických síl na negatívne nabitú membránu bakteriálnych buniek, čo vedie k následnej agregácii histatínu, po ktorej nasleduje ich integrácia do lipidovej dvojvrstvy. Ich integrácia do bakteriálnej membrány pravdepodobne vedie k tvorbe iónových kanálov, transmembránových pórov, presakovaniu membrán a prasknutiu membrány, čo spôsobí deštrukciu baktérií. Histatíny sa viažu a vytvárajú komplexy s iónmi Cu^{2+} a Ni^{2+} , čo vedie k eliminácii iónov kovov a následnej inhibícii enzýmov, ich kofaktorov a mikrobiálneho rastu. Histatín 5 sa okrem usmrčovania baktérií, ako je *S. mutans* a kvasiniek, podieľa na rôznych procesoch, vrátane tvorby pelikúl, neutralizácie potenciálne škodlivých látok, napr. polyfenolov, chelatacie kovových iónov, inhibície indukcie tvorby zápalových cytokínov a inhibície hostiteľských a bakteriálnych proteínáz, vrátane metaloproteináz a cysteínových proteínáz.

Molekula histatínu 5 má flexibilnú štruktúru: vo vode má štruktúru náhodného kĺbka, zatiaľ čo v nepolárnych médiách môže získať α -helikálnu štruktúru. Neprítomnosť striktnej sekundárnej štruktúry je pravdepodobne kľúčom k multiviažúcim sa schopnostiam histatínov (K h u r s h i d et al., 2018).

Defenzíny

Defenzíny sú antimikrobiálne kationové peptidy, ktoré sú indukované v epiteliálnych tkanivách pri zápale a tiež

exprimované v bunkových vývodoch slinných žliaz. Boli popísané 2 rodiny defenzínov – α -defenzíny (HNP1, HNP2, HNP3, HNP4), ktoré sú produkované neutrofilnými granulocytmi a β -defenzíny (hBD1, hBD2, hBD3, hBD4), produkované mukóznymi bunkami. Tieto peptidy sú súčasťou vrodeneho imunitného systému, majú antibakteriálnu a protiplesňovú aktivitu. Defenzíny vykazujú aj rôzne imunoaktívne a modulačné aktivity, vrátane indukcie určitých cytokínov a chemoatraktivity pre nezrelé dendritické a pamäťové T-bunky (H a n c o c k et al., 2016).

Kalprotektín

Kalprotektín je dimérom kalgranulínu-A a kalgranulínu-B s väzbovými vlastnosťami kovových iónov, hlavne vápnika a zinku. Hlavným zdrojom slinného kalprotektínu je gingiválna sulkulárna tekutina a orálny povrchový epitel. Keďže koncentrácia kalprotektínu významne vzrastie pri niektorých zápalových ochoreniach, považuje sa tento proteín za marker zápalového ochorenia. Pri parodontitíde sa kalprotektín objavuje v gingiválnej sulkulárnej tekutine a v iných vzorkách z ústnych slinných žliaz vo vzostupnej koncentrácii (B e s o l d et al., 2018).

Chromogranín A

Chromogranín A je hlavný proteín v bunkách nadobličiek a adrenergických neurónov. V submandibulárnych žľazách sa chromogranín A uchováva v exokrinných bunkách a vylučuje sa do slín stimuláciou noradrenalínu a acetylcholínu. Voči gram-pozitívnym baktériám vykazuje antibakteriálnu aktivitu aj v nižších koncentráciách a je tiež schopný zabiť veľké množstvo filamentózných húb a kvasiniek (M i z u h a s h i et al., 2016).

ZÁVER

Súčasná medicína orientuje nemalú časť svojho výskumu na včasnú a čo najpresnejšiu diagnostiku rozličných chorôb a poškodení, ako aj identifikáciu a racionálnu selekciu rizikových pacientov s cieľom minimalizovať prípadné neskoršie následky ochorení. Nie ináč je tomu i v dentálnej medicíne, ktorej výrazné percento výskumu sa zameriava na skoré rozpoznanie parodontálnych ochorení. Cieľom aktuálneho výskumu je preto selekcia vhodných proteínových markerov v skríningu rozmanitých ochorení parodontu.

LITERATÚRA

1. **Besold, A. N. et al. (2018):** Antimicrobial action of calprotectin that does not involve metal withholding. *Metallomics*, 10(12), pp. 1728–1742.
2. **Bhat, M., Bhat, D. (2019):** Salivary Diagnostics in Oral Diseases. In *Saliva*. IntechOpen.
3. **Freitas, V. S. et al. (2018):** Expression of matrix metalloproteinases (MMPs-2, -7, -9) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs-1 and -2) in pleomorphic adenomas and adenoid cystic carcinomas. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 275(12), pp. 3075–3082.
4. **Giansanti, F. et al. (2018):** Nutraceutical Peptides from Lactoferrin. *Journal of advances in dairy research*, 6(1).
5. **Hancock, R. E., Haney, E. F. and Gill, E. E. (2016):** The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nature Reviews Immunology*, 16(5), p. 321. doi: 10.1038/nri.2016.29.
6. **Hong, J. Y. et al. (2019):** A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study for evaluating the effects of fixed-dose combinations of vitamin C, vitamin E, lysozyme, and carbazochrome on gingival inflammation in chronic periodontitis patients. *BMC oral health*, 19(1), 40. doi: 10.1186/s12903-019-0728-2.
7. **Iwasaki, M. et al. (2016):** Cystatin C-based estimated glomerular filtration rate and periodontitis. *Gerodontology*, 33(3), 328–334. doi: 10.1111/ger.12159.
8. **Kho, H. S. (2018):** Oral epithelial MUC 1 and oral health. *Oral diseases*, 24(1–2), pp.19–21. doi: 10.1111/odi.12713.
9. **Khurshid, Z. et al. (2018):** Human oral defensins antimicrobial peptides: a future promising antimicrobial drug. *Current pharmaceutical design*, 24(10), pp. 1130–1137. doi: 10.2174/1381612824666180403114615.
10. **Manconi, B. et al. (2017):** Salivary Cystatins: Exploring New Post-Translational Modifications and Polymorphisms by Top-Down High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.*, 16(11): 4196–4207. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00567.
11. **Meghil, M. M. et al. (2019):** The influence of vitamin D supplementation on local and systemic inflammatory markers in periodontitis patients: A pilot study. *Oral Dis.*, 25(5): 1403–1413. doi: 10.1111/odi.13097.
12. **Mizuhashi, F. et al. (2016):** Salivary level of antimicrobial protein chromogranin A in relation to the salivary flow rate and swallowing function. *Medical Research Archives*, 4(7).
13. **Olson, J. et al. (2019):** *Lipocalin fusion partners*. U. S. Patent Application 16/216,625.
14. **Sarr, D. et al. (2018):** Antimicrobial actions of dual oxidases and lactoperoxidase. *Journal of Microbiology*, 56(6), pp. 373–386. doi: 10.1007/s12275-018-7545-1.
15. **Ukkonen, H. et al. (2017):** Oral mucosal epithelial cells express the membrane anchored mucin MUC1. *Archives of oral biology*, 73, pp .269–273. doi:10.1016/j.archoralbio.2016.10.019.
16. **Xie, W. et al. (2019):** The expression and clinical significance of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) in mammary carcinoma using bioinformatics analysis. *Gene*. doi: 10.1016/j.gene.2019.144088.
17. **Zhang, S. et al. (2019):** The association of PM2. 5 with airway innate antimicrobial activities of salivary agglutinin and surfactant protein D. *Chemosphere*. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.04.032.
18. **Ziatar, S. et al. (2018):** Chitin, chitinases, and chitin lectins: Emerging roles in human pathophysiology. *Pathophysiology*, 25(4), pp. 253–262., doi: 10.1016/j.pathophys.2018.02.005.



Laboratórna Diagnostika, XXIV, 1, 2019: 51–56

STANOVENIE POOPERAČNEJ NEUROMUSKULÁRNEJ BLOKÁDY TOF STIMULAČNÝM VZORCOM

Čuchráč, L.¹, Šimonová, J.¹, Firment, J.¹, Janíková, M.¹, Kysel', R.¹, Vašková, J.²

¹1. Klinika anestéziológie a intenzívnej medicíny, Univerzitná nemocnica Louisa Pasteura, Košice

²Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

e-mail: janka.vaskova@upjs.sk

SÚHRN

Prítomnosť pooperačnej reziduálnej kurarizácie po použití nedepolarizujúcich neuromuskulárnych blokátorov je spojená s pooperačnými komplikáciami ako sú slabosť, hypoxia a respiračné ťažkosti. Vzhľadom na potenciálne problémy je použitie neuromuskulárneho monitora svalovej blokady opodstatnené a malo by viesť k zábrane či jej účinnej reverzii. V práci sme sa na vzorke 150 pacientov zaoberali zisťovaním reálneho výskytu reziduálnej kurarizácie v zotavovacej miestnosti v závislosti od rizikových faktorov ako sú vek, pohlavie, súvislosť s pridruženými ochoreniami a dĺžkou trvania operačného výkonu.

Kľúčové slová: pooperačná reziduálna kurarizácia, svalové relaxanciá, monitorovanie nervovosvalovej blokady

ABSTRACT

The presence of postoperative residual curarization following the use of non-depolarizing neuromuscular blockers is associated with postoperative complications such as weakness, hypoxia and respiratory distress. Given the potential problems, the use of a neuromuscular block monitoring is justified and should lead to its inhi-

bition or effective reversion. In a study of 150 patients we examined the real occurrence of residual curarization in the recovery room depending on risk factors such as age, sex, associated diseases and duration of surgery.

Keywords: post-operative residual curarization, muscle relaxants, monitoring of neuromuscular blockade

ÚVOD

Pooperačná reziduálna kurarizácia (PORC, Post-Operative Residual Curarization) je charakterizovaná prítomnosťou svalovej únavy, vyčerpania alebo nedostatočnosti následkom použitia svalových relaxancií s predĺženým pooperačným účinkom. Mechanizmus pôsobenia spočíva v obsadení nikotínových acetylcholíkových receptorov molekulami NMBA (NeuroMuscular Blocking Agent). NMBA, v závislosti od mechanizmu účinku, sú delené na depolarizujúce a nedepolarizujúce. Molekuly NMBA, ktoré sú dnes bežne používané, majú štruktúrnú podobnosť s neurosvalovým transmitterom, acetylcholínom (Ach).

Aplikáciou nedepolarizačných relaxancií (NDMR) dochádza formou kompetitívnej blokady k obsadeniu receptora. Podľa chemickej štruktúry sú steroidy alebo benzylocholinolíny. Medzi krátkodobo pôsobiace patrí mivacurium (Mivacron) s dĺžkou účinku intubačnej dávky

cca 15–20 min. Ďalšie sú intermediárne pôsobiace ako napríklad atracurium (Tracrium), vecuronium (Norcuron) a rocuronium (Esmeron) a dlhodobé pôsobiace NMBA – pipecuronium (Arduan) a pancuronium (Pavulon). Vplyv na pôsobenie svalových myorelaxancií majú rôzne činitele. Osobitná skupina sú liekové interakcie a tiež komorbidity a kondičný stav organizmu pacienta podstupujúceho anestéziu. Ako antidóta pre NDMR sa používajú inhibítory acetylcholinesterázy (AChE) v zastúpení neostigminom. Dochádza k spomaleniu aktivity AChE a spomaleniu hydrolýzy ACh s jeho nadbytkom. Neostigmin sa podáva v kombinácii s atropínom (parasimpatikolytikum), aby sa predišlo bradykardii aktivovanej muskarínovými receptormi v srdci (F i r m e n t a kol., 2009). Vecuronium a rocuronium sú eliminované biliárnym systémom. Pancuronium a pipecuronium sú z väčšej časti vylučované močom a ich pôsobenie účinku sa u pacientov s renálnym postihnutím predlžuje (M o r g a n a kol., 2006). Jedným zo spôsobov degradácie atracuria je hydrolýza, ktorú katalyzuje nešpecifická esteráza. Druhou cestou je Hofmannova eliminácia, čo je spontánna degradácia prebiehajúca v plazme a tkanivách pod vplyvom stáleho vnútorného prostredia predovšetkým konštantnej teploty a stabilnej acidobázickej rovnováhy (F i s h e r a kol., 1986). Menej ako 10 % atracuria je vylúčeného v nezmenenej forme renálnou a hepatálnou cestou.

Dôvodov prečo monitorovať hĺbku svalovej blokády je niekoľko. Po podaní NMBA dochádza k iatrogénne navodenému zlyhaniu životne dôležitej funkcie – dýchania. Efekt svalových relaxancií je niekedy, aj napriek skúsenostiam a vedomostiam anestéziológa, obtiažne predpovedať z dôvodu veľkej interindividuálnej citlivosti jednotlivých pacientov. Ani dostatočne dlhý čas po podaní samostatnej dávky NDMR nie je garanciou k odozneniu svalovej blokády a plnej rekonvalescencie svalovej sily. Klinické vyšetrenie častokrát nie je postačujúce k objektívnemu určeniu času, kedy boli NMBA zmetabolizované a ich účinok nebol ďalej prítomný (A d a m u s, 2013). Prenos elektrickej stimulácie prostredníctvom elektród umiestnených na koži pozdĺž priebehu periférnych nervov vyvoláva svalovú odpoveď a zrýchlenie, ktoré je možné merať. Odpoveď vyvolaná stimuláciou závisí na použítom prúde, trvaní stimulu, polohy elektródy, stavu kože (suchá alebo navlhčená) a od kondície stimulovaných svalov. Obnova neuromuskulárnej funkcie závisí na type použitého svalového relaxačného agens, opakovanej aplikácie a individuálnej variabilite pacienta (C a s t a g n o l i a kol., 2012). K stimulácii je

používaný jednosmerný prúd supramaximálnej intenzity, čo znamená, že pri nerelaxovanom svale, napriek zvyšovaniu prúdu nad danú hodnotu, sila svalovej kontrakcie už ďalej nerastie. Medzi najčastejšie stimulované nervy patrí ulnáry nerv, zadný tibiálny nerv a faciálny nerv. Z praktického hľadiska neexistuje žiadny rozdiel v citlivosti medzi rukou (*m. adductor pollicis*) a nohou (*m. flexor hallucis brevis*).

Pri použití prístroja na objektívne stanovenie neuromuskulárnej blokády sú k dispozícii viaceré režimy alebo vzorce. Tie najčastejšie sú: jednotlivý impulz (single twitch), tetanická stimulácia, posttetanický počet (PTC, Post Tetanic Count), séria štyroch (TOF, Train Of Four) a stimulácia dvojitým výbojom (DBS, Double Burst Stimulation) (19). V mnohých článkoch publikovaných na danú tému je TOF stimulačný vzorec považovaný za zlatý štandard v monitore účinku NMBA na nervovosvalový prenos (A d a m u s, 2013; C a s t a g n o l i a kol., 2012). Zároveň táto metóda je najrozšírenejšou spomedzi všetkých ostatných režimov. Táto technika zaznamenáva odpoveď svalu na elektrický stimul a číselne kvantifikuje stupeň svalovej relaxácie. Frekvenciou 2 Hz sú podané štyri supramaximálne impulzy v trvaní 0,2 ms, s výstupmi T1 -T2 -T3 -T4. Sekvenciu je možné aplikovať v pravidelných intervaloch s prestávkou niekoľko desiatok sekúnd až minút. Touto metódou je možné získať tri výstupy, z ktorých každý má svoj osobitný význam. Sú to tieto parametre T1, TOF-count a TOF-ratio. T1 veľkosť znázorňuje percentuálne zníženie muskulárnej odpovede na prvý stimul TOF v porovnaní s reakciou určenou pred podaním NMBA. TOF-count môže nadobúdať hodnoty 0, 1, 2, 3, 4. Postupne ako dochádza k nástupu účinku NMBA a vytvára sa nedepolarizačná blokáda, svalová reakcia postupne vymizne na všetky štyri stimuly. Ak na svale nie je možné vybaviť ani jednu odpoveď zo štyroch stimulov, ide o hlbokú svalovú relaxáciu. Pri vybavení jednej odozvy zo štyroch pretrváva stále dostatočná paralýza. Pri odozve dvoch stimulov je indikované podanie novej dávky relaxancia, v závislosti od fázy operácie. Ak sú prítomné tri odpovede, postupne prichádzame do štádia zotavovania z účinku blokády a pri prebúdzaní je možné podanie anticholinesterázy ako antidóta NDMR. Štyri odpovede zo štyroch evokujú signál, že pacient sa nachádza v pokročilom štádiu zotavovania a dekurarizácie. Keď sú prítomné všetky štyri odpovede, je možný prepočet pomeru T4/T1, čím dostávame hodnotu TOF-ratio.

V odbornej literatúre je výskyt PORC jednoznačne pre-

ukázaný. Cieľom tejto práce bolo zistiť výskyt pooperačnej kurarizácie v zotavovacej miestnosti na našom pracovisku.

MATERIÁL A METÓDY

Štúdiu môžeme kategorizovať ako prospektívnu, nerandomizovanú a observačnú. Ide o vzorku populácie zo spádovej oblasti UNLP Košice. Štúdia bola schválená Etickou komisiou UNLP Košice po číslom 115/EK/18. Všetci účastníci museli spĺňať nasledujúce podmienky. Podstúpili operačný výkon v celkovej anestézii s použitím NDMR. Bol vytvorený zápisný list, do ktorého lekár pridelený na zotavovaciu izbu, zaznamenal všetky namerané hodnoty. Všetci účastníci boli extubovaní na operačnej sále a v doprovide anestéziológa a anestéziologickej sestry transportovaní do zotavovacej izby. Tu boli pacienti ihneď napojení na monitor vitálnych funkcií. Bol im aplikovaný kyslík tvárovou maskou v rámci oxygenoterapie a na predlaktie, podľa platných odporúčaní, pripevnený monitor svalovej relaxácie TOF-Watch (Organon, Swords Co., Dublin, Írsko). TOF stimuláciou bol stimulovaný ulnáry nerv (4 pulzy v trvaní 0,2 ms a s frekvenciou 2 Hz). Tri po sebe idúce merania TOF boli vykonané s odstupom 15 sekúnd. Následne boli tieto merania spriemerované.

Do protokolu boli zapísané základné informácie o pacientovi. Bola zaznamenaná operačná sála, respektíve nákladové stredisko. Nezaoberali sme sa operačným výkonom, lebo z hľadiska našich sledovaných údajov, to nebola relevantná informácia. Zapísané boli ďalej pohlavie pacienta, vek a ASA (American Society of Anaesthesiologist physical status classification). Z informácií z predanestéziologického vyšetrenia (váha a výška) bolo vypočítané BMI. Na našom pracovisku v danom období boli využívané

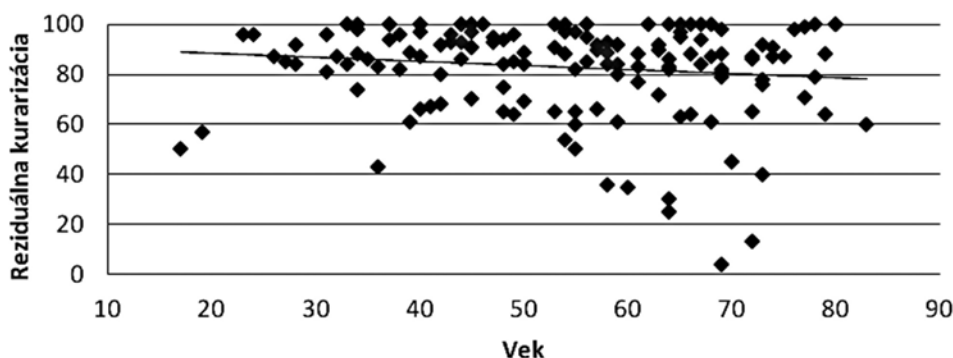
dve nedepolarizujúce myorelaxanciá – *rocuronium* a *atracurium*. Obidve intermediárne pôsobiace z hľadiska dĺžky účinku. Bola zaznamenaná informácia, ktoré relaxans bolo použité, či bolo použité iba jednorazovo pri úvode do anestézie alebo opakovane v priebehu výkonu. Ďalej nás zaujímala dĺžka operačného výkonu a telesná teplota. Do protokolu sa zaznamenali informácie aj o dekurarizácii pacienta, či mu bola podaná iba takzvaná „malá dekurarizácia“, alebo „veľká dekurarizácia“. Zaznamenali sme aj podanie sugammadexu. Samozrejme, posledná informácia bola informácia TOF-ratio. Pri nízkych hodnotách zistených v zotavovacej miestnosti boli pacienti dlhodobejšie sledovaní. Bol monitorovaný ich klinický stav a až po dosiahnutí hodnôt TOF-ratio $\geq 0,9$ boli prepustení zo zotavovacej miestnosti.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tabuľka č. 1 zobrazuje celkový počet 150 pacientov rozdelených podľa pohlavia, ktorí boli zaradení do našich meraní. 37 % pacientov podstúpilo operačný výkon na chirurgickej operačnej sále, neurochirurgickú intervenciu 34 %, urologicko-gynekologickú operáciu 16 % a zvyšných 23 % operačný výkon na ďalších pracoviskách UNLP. Z toho bolo 71 mužov (47 %) a 79 žien (53 %).

Tabuľka č. 1. Výskyt PORC v závislosti od pohlavia

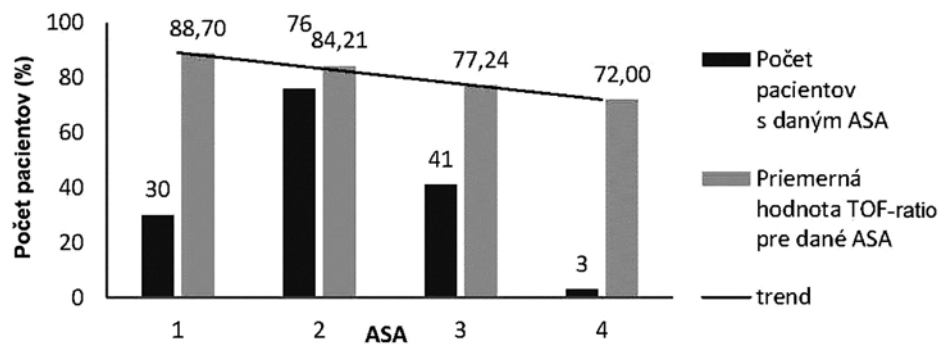
	počet	%	TOF-ratio < 0,9
Ženy	79	52,7	60,8
Muži	71	47,3	50,7
spolu/ priemer	150	100	55,3



Graf č. 1. Závislosť reziduálnej kurarizácie od veku pacienta

Tabuľka č. 2. Výskyt PORC v závislosti od použitého NDMR

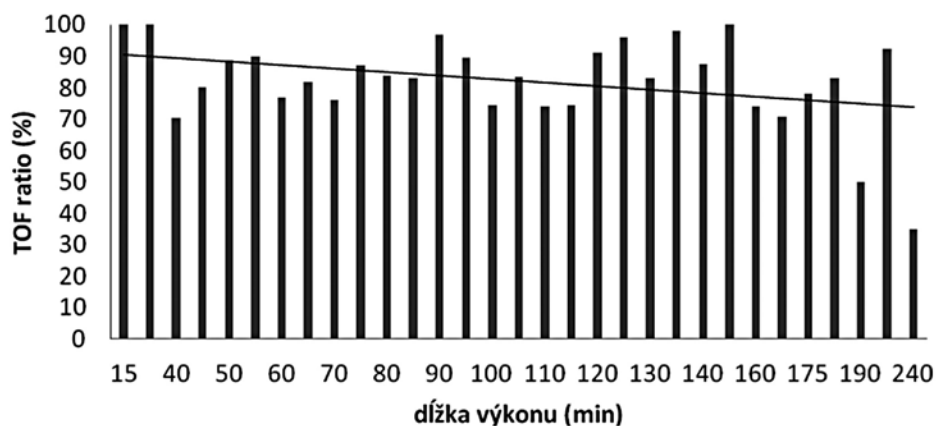
NDMR	počet	TOF-ratio < 0,9 [počet]	TOF-ratio < 0,9 [%]
Atracurium	40	25	62,5
Rocuronium	110	50	45,5



Graf č. 2. Počet pacientov v skupinách podľa ASA klasifikácie a priemerné hodnoty TOF ratio, ktoré dosahovali

Tabuľka č. 3: Farmakologická dekurarizácia

	počet	TOF-ratio < 0,9 [počet]	TOF-ratio < 0,9 [%]	TOF-ratio < 0,7 [počet]	TOF-ratio < 0,7 [%]
neostigmin 1,5 mg	12	3	25	5	41,6
neostigmin 2,5 mg	30	10	33,3	9	30
neostigmin > 2,5 mg	3	1	33,3	1	33,3
sugammadex	2	0	0	0	0



Graf č. 3. Závislosť PORC od dĺžky výkonu

Vek pacienta bol ďalší zo sledovaných parametrov. V literatúre sa popisuje priama úmera medzi PORC a vekom. To sme preukázali aj v našom súbore pacientov (lineárna trendová spojnica v grafe č. 1). Súvisí to s pomalším metabolizmom a teda dlhšou elimináciou NDMR.

Na tomto grafe sú znázornené výsledky troch pacientov, ktorí sa odchyľujú od normy. Dvaja mali primárne nízke hodnoty TOF-ratio, no s dobrou svalovou silou. Títo pacienti boli podrobnejšie sledovaní a s odstupom 5 minút im už boli namerané hodnoty TOF-ratio 0,85–0,87 (85–87 %) aj bez farmakologického zásahu. Jeden pacient mal však aj klinické prejavy PORC a bol farmakologicky dekurarizovaný, no aj napriek tomu boli pretrvávajúce nízke hodnoty TOF-ratio aj s odstupom času. U neho bolo indikované podanie sugammadexu s dobrou odozvou. Išlo o 17-ročného pacienta, najmladšieho zo vzorky. V jeho prípade mohlo ísť o narušenú funkciu enzýmu cholínesterázy.

Na grafe č. 2 je porovnanie pacientov s rozdielnymi komorbiditami, ktorí boli pri predanesteziologickom vyšetrení zaradení do ASA klasifikácie. Na základe našich zistení (podľa lineárnej trendovej spojnice) môžeme tvrdiť, že s prídruženými ochoreniami je väčší predpoklad pre PORC. Tabuľka č. 2 zobrazuje prehľad použitých relaxancií počas operačných výkonov. V danom čase boli na našom pracovisku k dispozícii atracurium a rocuronium. Podľa týchto výsledkov sa zdá, že väčšina lekárov používa rocuronium v pomere takmer 3 : 1. Hlavné nežiaduce účinky atracuria sú uvoľňovanie histamínu, bronchospazmus, kožný výsev a v neposlednom rade nemožnosť využiť sugammadex na reverziu blokády. Naše merania preukázali aj častejší výskyt TOF-ratio pod 0,9 u pacientov relaxovaných práve atracuriom.

Graf č. 3 znázorňuje výskyt PORC v závislosti od dĺžky trvania operačného výkonu. Trendová krivka naznačuje nižšie hodnoty nameraných hodnôt TOF pri dlhšie trvajúcich operáciách.

Ďalšia tabuľka č. 3 informuje o početnosti farmakologickej dekurarizácie v tejto vzorke pacientov. Na našom pracovisku sa aplikujú dve formy dekurarizácie. Takzvaná „malá dekurarizácia“, ktorá pozostáva z 1,5 mg neostigminu a 0,5 mg atropínu. Ďalej „veľká dekurarizácia“ obsahuje 2,5 mg neostigminu a 1 mg atropínu. Podľa odporúčaní, dávky neostigminu by nemali byť nižšie ako 2,5 mg ale je to zvyklosť nášho pracoviska.

Nižšie dávky neostigminu sa neodporúčajú pre nedostatočný efekt na rekonvalescenciu nervovosvalového

prenosu. To sme preukázali aj na našej skupine. Skutočne väčšina pacientov s PORC vyžaduje dávku 2,5 mg neostigminu na reverziu bloku. Napriek tomu aj v tomto prípade bolo až 9 pacientov s TOF-ratio < 0,7, s odstupom času cca 10–15 min bol zaznamenaný výstup k normálnym hodnotám.

Na základe našich meraní sme preukázali, že výskyt PORC je reálny a nezanedbateľný. Nasledujúci graf znázorňuje percentuálne vyjadrenie PORC na zotavovacej izbe. V našej vzorke bola reziduálna kurarizácia prítomná až v 57 % prípadov. Tieto výsledky sme porovnali s údajmi z roku 2010, kde bol v skupine 157 pacientov výskyt PORC v 51 % prípadoch na zotavovacej izbe (F i r m e n t, 2013). Pacienti boli rozdelení podľa výkonu na brušnú operatívu a inú. Podobne sledoval závislosť PORC od veku, dĺžky operačného výkonu. V našej skupine pacientov sme mali iba jeden prípad pooperačnej hypotermie s potrebou aktívneho zohrievania pacienta, preto sme tento sledovaný parameter nezaradili do štatistiky. Z pozorovaní vyčlenil pacientov s hepato- a nefropatiou a tiež dekurarizovaných na operačnej sále. V našich meraniach sme ponechali aj týchto pacientov, lebo aj oni sú ohrození komplikáciami PORC. Reálne bola dekurarizácia použitá celkovo v 45 prípadoch. Prevažne na operačnej sále (lekári boli oboznámení o prebiehajúcich meraniach na zotavovacej izbe a aj preto pristupovali k farmakologickej dekurarizácii), ale aj v zotavovacej miestnosti. Oba prípady podania sugammadexu boli aplikované na rekonvalescenčnej izbe. Relaxometria nie je povinnou výbavou anestéziologického prístroja. Napriek tomu, že sú na našom pracovisku k dispozícii celkovo dva samostatné prístroje na monitor relaxometrie a jeden modul, v priebehu tejto štúdie nebola relaxometria počas výkonu použitá ani v jednom prípade.

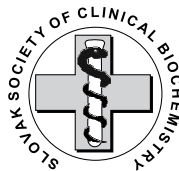
Svalové relaxanciá majú svoje pevné postavenie v anestéziológii. Ani v najbližšej budúcnosti sa tento fakt nebude meniť. Nie je dôvod sa ich obávať, treba sa na nich dívať komplexne. S ich výhodami i nežiaducimi účinkami. V našej práci sme preukázali skutočne znepokojivé výsledky. Výskyt PORC na zotavovacej izbe sa pohybuje až v okolo 57 % (predošlý výskum na našom pracovisku preukázal 51 %). Stále sme v rozmedzí, ktoré sa uvádza v odbornej literatúre, ale žiaľ pri hornej hranici. Faktorov, prečo je tomu tak, je viacero. Od ľudskej chyby zo strany anestéziológa, cez nedostatočnú komunikáciu v rámci operačného tímu, až po nedostatočné technické vybavenie.

ZÁVER

Komplikácia pretrvávajúcej kurarizácie, ako pneumónia vzniknutá niekoľko dní po operačnom výkone, sa málokedy dáva do súvislosti s PORC. Jediným spôsobom ako tomu predísť je monitorovanie svalovej relaxácie. Anestéziológ má indície, ktorí pacienti predisponujú k prolongovanému účinku svalových relaxancií. Vek, klasifikácia ASA, dĺžka operácie, nízka telesná teplota sú rizikové faktory výskytu PORC. Ale ani v prípadoch mladého pacienta bez komorbidít nie je možné objektívne vylúčiť reziduálnu kurarizáciu bez merania TOF. Ak tento monitor nie je možné aplikovať, je vhodné podanie dekurarizácie. V závere je nutné povedať, že súčasná medicína založená na dôkazoch sa skrátka nezaobíde bez monitoringu svalovej relaxácie a bez promptnej a adekvátnej liečby pooperačnej reziduálnej kurarizácie.

LITERATÚRA

1. **Adamus, M. (2013):** *Monitorování svalové relaxace*. V. kurs CEEA 2013.
2. **Castagnoli, A. et al. (2012):** Post-Operative Residual Curarization (PORC). A Big Issue for Patients' Safety. In *Risk Management for the Future—Theory and Cases*. doi: 10.5772/33952.
3. **Firment, J. a kol. (2009):** *Anestéziológia a intenzívna medicína*. Knihy Hanzlúvka.
4. **Firment, P. (2013):** *Monitorovanie svalovej relaxácie a reziduálna kurarizácia*, Špecializačná práca, UPJŠ Košice
5. **Fisher, D. M. et al. (1986):** Elimination of atracurium in humans: Contribution of Hofmann elimination and ester hydrolysis versus organ-based elimination. *Anesthesiology*. doi: 10.1097/00000542-198607000-00002.
6. **Morgan, Jr. G. E., Mikhail, M. S., Murray, M. J. (eds) (2005):** *Clinical Anesthesiology*. 4th edn. McGraw-Hill Medical.



OXIDAČNÝ STRES U PACIENTOV DLHODOBO LIEČENÝCH OPIOIDMI

Ogurčáková, D.¹, Kočan, L.², Šimonová, J.³, Martuliak, I.⁴, Sabol, F.⁵, Vašková, J.¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

²Klinika anestéziológie a intenzívnej medicíny

Východoslovenský ústav srdcových a cievnych chorôb, a.s., Košice

³1. Klinika anestéziológie a intenzívnej medicíny, Univerzitná nemocnica Louisa Pasteura, Košice

⁴Algeziologická klinika Slovenskej zdravotníckej univerzity

Fakultná nemocnica s poliklinikou F. D. Roosevelta, Banská Bystrica

⁵Kardiochirurgia, Východoslovenský ústav srdcových a cievnych chorôb, a.s., Košice

e-mail: janka.vaskova@upjs.sk

SÚHRN

Bolesť je závažným socioekonomickým problémom. Liečba bolesti silnými opioidmi je vhodná a bezpečná u pacientov s nádorovou aj nenádorovou chronickou bolesťou. Dlhodobá liečba opioidmi sa však môže podieľať na vzniku oxidačného stresu, ktorý je závažným patologickým problémom nakoľko má kľúčové postavenie v patogenéze mnohých ochorení. Cieľom štúdie je monitorovať klinický stav pacientov, zmeny aktivít anti-oxidačných enzýmov po začatí liečby opioidmi pre silnú bolesť a v priebehu ich užívania. Cieľom tohto príspevku je priniesť prvé výsledky z meraní antioxidantných kapacít pacientov v priebehu pol roka od začiatku užívania opioidov. Hodnotenie po šiestich mesiacoch užívania opioidov pre silnú bolesť bolo možné vykonať na 36 pacientoch. Títo patrili do skupiny s podávaným morfiénom, hydromorfónom alebo oxykodónom a skupiny s transdermálne podávaným fentanylom. Na základe zmien v aktivitách sledovaných antioxidantných enzýmov a koncentrácii redukovaného glutatiónu v plazme boli po pol roku od začiatku liečby zistené podmienky oxidačného stresu u pacientov liečených morfiénom, hydromorfónom alebo oxykodónom.

Kľúčové slová: antioxidantné enzýmy, bolesť, glutatión, silné opioidy, oxidačný stres

ABSTRACT

Pain is a serious socio-economic problem. Strong opioid pain management is appropriate and safe in patients with both cancer and non-cancerous chronic pain. However, long-term opioid treatment can contribute to the formation of oxidative stress, which is a serious pathological problem, as it has a key role in the pathogenesis of many diseases. The aim of the study is to monitor patients' clinical status, changes in antioxidant enzyme activities after initiation of opioid therapy for severe pain and during their use. The aim of this paper is to bring the initial results from the measurement of antioxidant capacities of patients within half a year from the start of opioid use. Six months of opioid use for severe pain was evaluated in 36 patients. These belonged to the morphine, hydromorphone or oxycodone treated group and the transdermally applied fentanyl group. Based on the changes in the activities of the antioxidant enzymes and the concentration of reduced glutathione in plasma, conditions of oxidative stress in patients treated with morphine, hydromorphone or oxycodone were found after half a year of treatment.

Keywords: antioxidant enzymes, pain, glutathione, opioids, oxidative stress

ÚVOD

Chronická bolesť nádorová aj nenádorová je závažným problémom verejného zdravia (B r e i v i k et al., 2006; R i p a m o n t i, 2012). V Európskej únii nie sú k dispozícii jednoznačné epidemiologické štúdie, chronická bolesť je veľmi rozšíreným ochorením. Približne polovica dospelých trpí jednou alebo viacerými chronickými bolesťami. Výskyt stredne silnej až silnej bolesti je u európskej populácii 20 %. Až 70 % pacientov je v aktívnom veku, 11 % pacientov je neliečených a 50 % nemá dostatočne liečenú bolesť. Prevalencia je vyššia u žien. Vekom sa zvyšuje počet pacientov, v skupine geriatrických pacientov je to až 80 %. Nezanedbateľným sú ekonomické náklady a to nepriame (praceneschopnosť, invalidita) a priame (náklady na liečbu). Najrozšírenejšie chronické bolesti (bolesti chrbta, artrózy, bolesti hlavy, neuralgie) sú často považované za normálnu súčasť života. Cieľom liečby chronickej bolesti je odstránenie bolesti a obnova všetkých funkcií (pohybových, psychických, sociálnych) v optimálnom prípade možnosť opätovného návratu do pracovného procesu (B r e i v i k et al., 2006; 2013). Montrealská deklarácia uvádza, že liečba bolesti takmer na celom svete je nedostatočná (IASP, 2012).

Voľba a vedenie analgetickej liečby vychádza z pacientovho údaja o intenzite a charaktere bolesti a z konkrétneho klinického stavu. Nerozhoduje pôvod bolesti (nádorová, nenádorová), ale u chronickej bolesti: postup „zdola–hore“ (step up). U intenzívnej akútnej bolesti je namieste parenterálne podanie analgetika eventuálne aj opioidu (angina pectoris, srdcový infarkt, obličková a žlčníková kolika), inak má prednosť neinvazívne podávanie analgetík (p. os., transdermálne, p. r.). Z hľadiska časového faktoru sú pri akútnej bolesti najvýhodnejšie analgetiká s rýchlym nástupom účinku, pri chronickej bolesti sa analgetiká podávajú „podľa hodín“ a predchádza sa tak rozvoju bolesti.

Opioidné analgetiká sú nevyhnutné pre manažment bolesti (G i l s o n et al., 2011), sú vysoko účinné a bezpečné pri liečbe vedenej kompetentnými lekármi. Pri zvažovaní začatia alebo pokračovanie podávania opioidov u neterminálne chorého s chronickou bolesťou by mali lekári vziať do úvahy biopsychosociálny status pacienta a určiť liečebný plán motivujúci chorého na stanovenie a dosiahnutie funkčných cieľov (V o n K o r f f et al., 2011; K a l s o et al., 2004). Za zlatý štandard opioidnej liečby sa považuje morfín, od jeho vlastností sú odvodené vlastnosti ostatných opioidov.

Mnohé vedľajšie účinky liečby opioidmi sú dôkladne preskúmané. Novšie poznatky naznačujú, že dlhodobá liečba opioidmi sa môže podieľať na vzniku oxidačného stresu, ktorý je závažným patologickým problémom nakoľko má kľúčové postavenie v patogenéze mnohých ochorení (C a c c i a p u o t i, 2016). Nedávne štúdie odhalili aj nové úlohy oxidačného stresu alebo zníženej anti-oxidačnej obrany v patogenéze migrény, ktorá čiastočne súvisí s mitochondriálnou dysfunkciou (F e r r o n i et al., 2018). Klinické sledovania so zameraním na sledovanie redoxného stavu pacientov s chronickou bolesťou užívajúcich opioidy zatiaľ chýbajú.

Z dôvodu nejasných dôkazov o intenzite oxidačného stresu u pacientov s chronickou bolesťou liečených opioidmi pre silnú bolesť bola navrhnutá realizácia prospektívnej observačnej multicentrickej klinickej štúdie. Cieľom štúdie je monitorovať klinický stav pacientov, zmeny aktívít antioxidantných enzýmov po začatí liečby opioidmi pre silnú bolesť a v priebehu ich užívania a cieľom tohto príspevku je priniesť prvé výsledky z meraní antioxidantných kapacít pacientov v priebehu pol roka od začiatku užívania opioidov.

MATERIÁL A METÓDY

Štúdia je realizovaná v spolupráci s Klinikou algeziológie Fakultnej nemocnice s poliklinikou F. D. Roosevelta v Banskej Bystrici, Ambulanciou bolesti Algmed v Košiciach, Ústavom lekárskej biochémie Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach a Východoslovenským ústavom srdcovocievnych chorôb a. s. v Košiciach. Štúdia bola schválená príslušnými etickými komisiami (EK LF UPJŠ č. 1N/2017, EK SZU Banská Bystrica, EK VÚSCH a. s. Košice) a zaregistrovaná v medzinárodnej databáze U.S. National Institutes of Health Clinical Trials.gov. NCT03105232.

Potenciálni účastníci štúdie sú pred zaradením do štúdie podrobne oboznámení s priebehom výskumu a po podpísaní informovaného súhlasu sú vyšetrení algeziológom. Sledované klinické parametre: doterajšia spotreba analgetík, vyšetrenie typu bolesti (nociceptívna vs. neuropatická – vyplnenie dotazníkov pre PainDetect, DN4, a Numerickej stupnice bolesti), antropometrické údaje (váha, výška, vek). Vyšetrenie biochemických parametrov: (ALT, AST, GMT, bilirubín, močovina, kreatinín, albumín), klírens kreatinínu, pacientom je odoberatá venózna krv za účelom vyšetrenia antioxidantných enzýmov a glutatiónu. Na zák-

lade štatistickej analýzy aktivít týchto enzýmov je stanovený interval spoľahlivosti 95 %. Pacienti, ktorých vstupné hodnoty sa nachádzajú v tomto intervale pokračujú v štúdiu, ostatní mimo CI 95 % sú zo štúdie vylúčení. Pacienti zaradení do štúdie sú rozdelení do 4 skupín:

skupina 1: pacienti s chronickou bolesťou užívajúci (Morfín, Hydromorfón, Oxykodón);

skupina 2: pacienti s chronickou bolesťou užívajúci transdermálnu náplasť (Buprenorfín);

skupina 3: pacienti s chronickou bolesťou užívajúci transdermálnu náplasť (Fentanyl);

skupina 4: kontrolná skupina – zdraví ľudia.

Prvé kontrolné vyšetrenie (I) nasleduje po 6 mesiacoch od začiatku užívania opioidov pre silnú bolesť. V priebehu vyšetrenia budú zaznamenávané klinické parametre ako aj biochemické parametre podobne ako pri prvom vyšetrení pacienta. Pacient vyplní dotazníky PainDetect, DN4, a LANSS Pain škály. Druhé kontrolné vyšetrenie (II) je vykonané po 12 mesiacoch od začiatku užívania opioidov pre silnú bolesť. V priebehu vyšetrenia sú zaznamenávané klinické parametre ako aj biochemické parametre podobne ako pri predošlých dvoch vyšetreniach pacienta. Pacient vyplní dotazníky PainDetect, DN4, a LANSS Pain škály.

V krvnej plazme je stanovená koncentrácia proteínov kyselinou bicinchoninovou. Aktivity glutatiónperoxidázy (GPx, E.C. 1.19.1.9), glutatiónreduktázy (GR, E.C. 1.8.1.7) a glutatión-S-transferázy (GST, E.C. 2.5.1.18) sú stanovované podľa postupov uvedených výrobcom kitov (Sigma-aldrich, Nemecko). Aktivity superoxidizmutázy (SOD, E.C. 1.15.1.1) sú stanovené kitom SOD-Assay Kit-WST (Fluka, Japonsko). Koncentrácia redukovaného glutatiónu (GSH) je stanovená metódou podľa Floreani a kol. (1997).

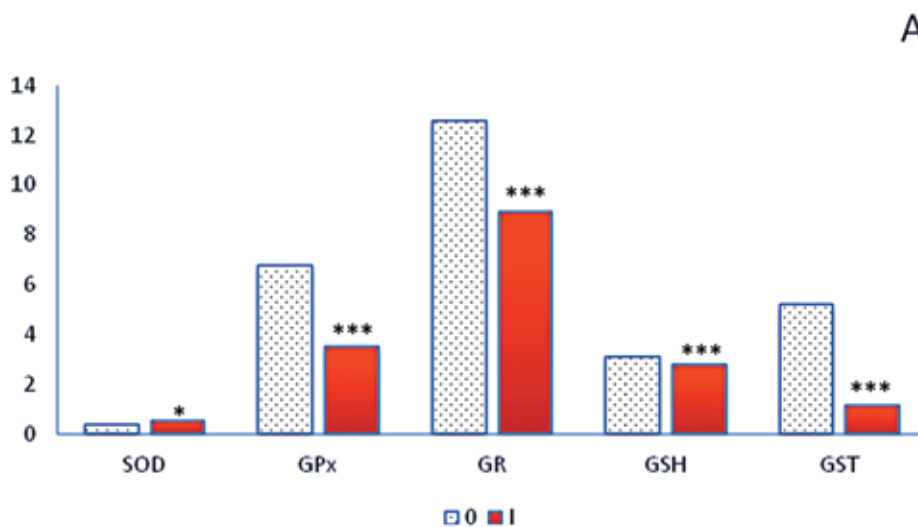
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Do štúdie bolo dosiaľ v skupinách 1 a 3 zaradených celkovo 36 pacientov, ktorí podstúpili aj prvé kontrolné vyšetrenie po šiestich mesiacoch. Z výsledkov uvedených v tabuľke č. 1 vyplýva, že pri začiatku liečby boli rozdiely medzi skupinami pacientov 1 a 3 iba v koncentráciách redukovaného glutatiónu. V skupine 3 bola priemerná hodnota signifikantne nižšia ako u pacientov v skupine 1. Šesť mesiacov po zahájení liečby už sú rozdiely medzi skupinami vo všetkých sledovaných parametroch, dokonca pri SOD, GR, GSH aj GST pri $p < 0,001$. Aktivita SOD bola znížená a aktivity GPx, GR, GST, aj koncentrácia GSH bola vyššia v skupine 3, kde bol podávaný fentanyl v porovnaní so skupinou 1, kde bol pacientom podávaný morfín, hydromorfón alebo oxykodón. Vzhľadom k charakteru reakcií, ktoré tieto enzýmy katalyzujú je zrejme, že v skupine 1 sú po šiestich mesiacoch vyššie podmienky oxidačného stresu.

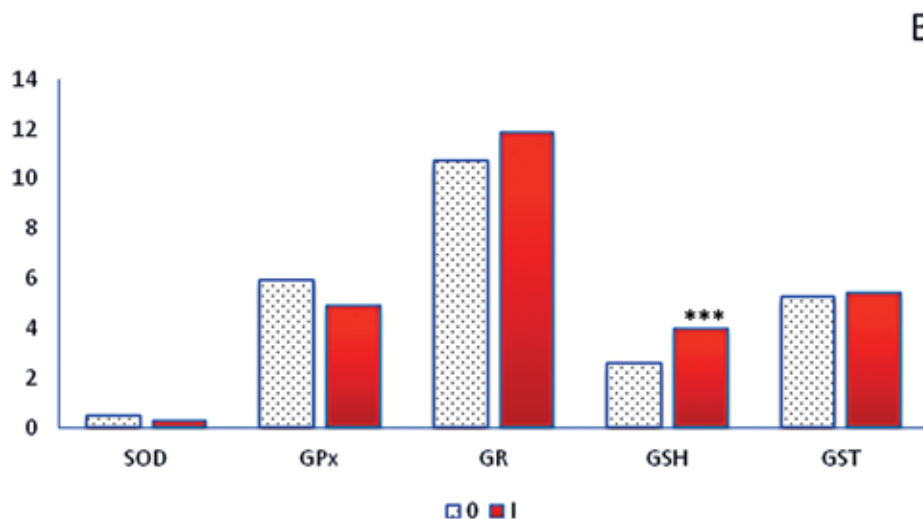
Na rozdiel od iných opioidov je morfín viac spájaný s indukciou oxidačného stresu. Vo všeobecnosti existujú dva možné spôsoby, ako by sa mohol podieľať na rozvoji oxidačného stresu. Môže buď podporovať tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (ROS) alebo znížiť aktivitu rôznych zložiek antioxidantných systémov, pričom oba tieto spôsoby pôsobenia sa môžu kombinovať (Skraablová et al., 2013). Niekoľko štúdií preukázalo, že akútna aj chronická expozícia morfínu môže viesť k významnému zníženiu hladín GSH v mozgu hlodavcov a ľudí, ako aj v myšej pečeni (Guzmán et al., 2006; Payabvash et al., 2006; Ozmen et al., 2007; Abdel-Zaher et al., 2010; Sumathi et al., 2011). Tiež sa ukázalo, že chronická liečba morfínom ovplyvňuje enzýmové aktivity en-

Tabuľka č. 1: Aktivity antioxidantných enzýmov a koncentrácia glutatiónu u pacientov liečených silnými opioidmi v skupinách 1 a 3 pred (0) a 6 mesiacov po začiatku liečby (I). Štatistická významnosť pri ** $p < 0,01$ a ** $p < 0,001$**

Čas	Sk	SOD [μkat/mg prot]	GPx [μkat/mg prot]	GR [μkat/mg prot]	GSH [nmol SH/mg prot]	GST [μkat/mg prot]
0	1	0,3656 ± 0,195	6,7505 ± 1,910	12,555 ± 3,316	3,078 ± 0,171	5,190 ± 1,027
	3	0,4253 ± 0,210	5,9309 ± 1,763	10,678 ± 2,917	2,542 ± 0,161***	5,251 ± 0,570
I	1	0,5230 ± 0,288	3,4820 ± 0,985	8,906 ± 0,798	2,775 ± 0,270	1,120 ± 0,326
	3	0,2450 ± 0,135***	4,884 ± 1,447**	11,838 ± 2,541***	3,945 ± 0,015***	5,434 ± 0,465***



Obrázok č. 1. Znáročenie rozdielov v aktivitách antioxidačných enzýmov a koncentrácie redukovaného glutatiónu na začiatku (0) a po šiestich mesiacoch liečby (I) v skupine 1 (A) a v skupine 3 (B)



dogénnych antioxidantov ako SOD, CAT a GPx. Aj keď sa zistilo, že makaky rhesus závislé od morfínu majú po 20 týždňoch liečby morfínom zvýšené hladiny SOD a GPx (P é r e z- C a s a n o v a et al., 2008), z v iných štúdií vyplynulo, že aktivity týchto enzýmov sa po expozícii morfínom znižujú (P a y a b v a s h et al., 2006; S u m a t h i et al., 2011; Z h o u et al., 2011; R o z i s k y et al., 2013) Zdá sa, že účinok morfínu na antioxidačné enzýmy môže ovplyvniť mnoho rôznych faktorov ako dávkovanie, čas expozície a exponovaný druh.

Z porovnania aktivít antioxidačných enzýmov a koncentrácie redukovaného glutatiónu vyplýva, že v skupi-

ne 1, kde bol pacientom podávaný morfín, hydromorfón alebo oxykodón došlo po šiestich mesiacoch k výrazným zmenám, zväčšia pri hladine významnosti $p < 0,001$ (Graf č. 1A). Aktivity enzýmov, okrem SOD ako aj koncentrácia GSH boli znížené. Avšak v skupine 3, kde bol podávaný vo forme transdermálnej náplaste fentanyl, sme pozorovali výrazné zmeny ($p < 0,001$) iba v koncentráciách redukovaného glutatiónu (Graf č. 1B), ktoré boli zvýšené v porovnaní so začiatkom liečby.

V samotnej skupine 1 po šiestich mesiacoch zodpovedajú aktivity enzýmov a znížené koncentrácie GSH podmienkam vyššieho oxidačného stresu. Tvorba ROS bola

pozorovaná po krátkodobej alebo dlhodobej liečbe, aj pri nízkych dávkach morfinu v ľudských alebo myších vasculárných endotelových bunkách (H s i a o et al., 2009). Tvorba superoxidového radikálu (O_2^-) indukovaná morfinom bola zistená aj v makrofágoch (B h a t et al., 2004).

V zásade môže tvorba ROS v súvislosti s užívaním morfinu prebiehať aktiváciou syntázy oxidu dusnatého (NOS). Aktivácia NADPH-oxidázy indukovaná morfinom vedie k zvýšenej tvorbe O_2^- . Aktivácia NOS vedie k zvýšenej tvorbe NO, a následnej nitrácii SOD. Inaktivácia SOD má za následok tvorbu peroxinitritu v reakcii O_2^- a NO. Aj keď O_2^- je iniciátorom tvorby iných ROS, škodlivé účinky na tkanivá a ich funkcie má peroxinitrit a nedostatok NO (V a š k o v á et al., 2016). Za zmienku stojí, že všetky tieto molekuly sa podieľajú na rozvoji bolesti, hyperalgézii vyvolanej opiátmi a opiátovej antinociceptívnej tolerancii (S a l v e m i n i et al., 2009). Inaktiváciou NOS alebo inhibíciou nitrácie a inaktivácie SOD bolo možné zabrániť vzniku morfinom indukovanej antinociceptívnej tolerancie (M u s c o l i et al., 2007).

ZÁVER

Čiastočné výsledky štúdie získané zo vzorky 36 pacientov, ktorým boli podávané opioidy pre silnú bolesť potvrdzujú indukciu podmienok oxidačného stresu u pacientov liečených morfinom, hydromorfónom alebo oxykodónom.

LITERATÚRA

1. **Abdel-Zaher, A. O., Abdel-Rahman, M. S., ELwasei, F. M. (2010):** Blockade of nitric oxide overproduction and oxidative stress by *Nigella sativa* oil attenuates morphine-induced tolerance and dependence in mice. *Neurochemical Research*, 35(10), 1557–1565. doi: 10.1007/s11064-010-0215-2.
2. **Bhat, R. S. et al. (2004):** Morphine-induced macrophage apoptosis oxidative stress and strategies for modulation. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(6), 1131–1138. doi: 10.1189/jlb.1203639.
3. **Breivik, H. et al. (2006):** Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life and treatment. *European Journal of Pain*, 10(4), 287–333. doi: 10.1016/j.ejpain.2005.06.009.
4. **Breivik, H. et al. (2013):** The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care. *BMC Public Health*, 13, 1229. doi: 10.1186/1471-2458-13-1229.
5. **Cacciapuoti, F. (2016):** Oxidative stress as “mother” of many human diseases at strong clinical impact. *Journal of Cardiovascular Medicine and Cardiology*, 3(1), 001–006. doi: 10.17352/2455-2976.000020.
6. **Ferroni, P. et al. (2018):** Redox mechanisms in migraine: Novel therapeutics and dietary interventions. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(12), 1144–1183. doi: 10.1089/ars.2017.7260.
7. **Floreani, M. et al. (1997):** A comparison between different methods for the determination of reduced and oxidized glutathione in mammalian tissues. *Free Radical Research*, 26(5), 449–455. doi: 10.3109/10715769709084481.
8. **Gilson, A. M. et al. (2011):** Ensuring patient access to essential medicines while minimising harmful use: A revised World Health Organization tool to improve national drug control policy. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy*, 25(3), 246–251. doi: 10.3109/15360288.2011.599485.
9. **Guzmán, D. C. et al. (2006):** Assessment of oxidative damage induced by acute doses of morphine sulfate in postnatal and adult rat brain. *Neurochemical Research*, 31(4), 549–554. doi: 10.1007/s11064-006-9053-7.
10. **Hsiao, P. N. et al. (2009):** Morphine induces apoptosis of human endothelial cells through nitric oxide and reactive oxygen species pathways. *Toxicology*, 256(1–2), 83–91. doi: 10.1016/j.tox.2008.11.015.
11. **IASP 2012: IASP 2012: 2012 Annual report by the International Association for the Study of Pain.** Dostupné na: <https://s3.amazonaws.com/rdcms-iasp/files/production/public/Content/ContentFolders/AboutIASP/IASPAnnualReport-Print2012.pdf>
12. **Kalso, E. et al. (2004):** Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. *Pain*, 112(3), 372–380. doi: 10.1016/j.pain.2004.09.019.
13. **Muscoli, C. et al. (2007):** Therapeutic manipulation of peroxynitrite attenuates the development of opiate-induced antinociceptive tolerance in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 117(11), 3530–3539. doi: 10.1172/JCI32420.
14. **Ozmen, I. et al. (2007):** Spinal morphine administration reduces the fatty acid contents in spinal cord and brain by increasing oxidative stress. *Neurochemical Research*, 32(1), 19–25. doi: 10.1007/s11064-006-9217-5.
15. **Payabvash, S. et al. (2006):** Chronic morphine treatment induces oxidant and apoptotic damage in the mice liver. *Life Sciences*, 79(10), 972–980. doi: 10.1016/j.lfs.2006.05.008.

16. Pérez-Casanova, A. et al. (2008): Interaction of SIV/SHIV infection and morphine on plasma oxidant/antioxidant balance in macaque. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 308 (1–2), 169–175. doi: 10.1007/s11010-007-9625-0.
17. Ripamonti, C. I. et al. (2012): Management of cancer pain: ESMO clinical practice guidelines. *Annals of Oncology*, 23(Suppl 7), vii139–154. doi:10.1093/annonc/mds233
18. Rozisky, J. R. et al. (2013): Neonatal morphine administration leads to changes in hippocampal BDNF levels and antioxidant enzyme activity in the adult life of rats. *Neurochemical Research*, 38(3), 494–503. doi: 10.1007/s11064-012-0941-8.
19. Salvemini, D., Neumann, W. L. (2009): Peroxynitrite: a strategic linchpin of opioid analgesic tolerance. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(4), 194–202. doi: 10.1016/j.tips.2008.12.005.
20. Skrabalova, J., Drastichova, Z., Novotny, J. (2013): Morphine as a Potential Oxidative Stress-Causing Agent. *Mini Reviews in Organic Chemistry*, 10(4), 367–372. doi: 10.2174/1570193X113106660031.
21. Sumathi, T., Nathiya, V. C., Sakthikumar, M. (2011): Protective effect of bacoside-A against morphine-induced oxidative stress in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(4), 409–415. doi: 10.4103/0250-474X.95624.
22. Vašková, J., Kočan, L., Vaško, L. (2016): Oxidative Stress and Opioids. *Global Journal of Anesthesiology*, 3(1), 020–029. doi: 10.17352/2455-3476.000027.
23. Von Korff, M. et al. (2011): Long-term opioid therapy reconsidered. *Annals of Internal Medicine*, 155(5), 325–328. doi: 10.1059/0003-4819-155-5-201109060-00011.
24. Zhou, J. et al. (2011): Protective role of taurine against morphine induced neurotoxicity in C6 cells via inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicity Research*, 2011;20(4), 334–342. doi: 10.1007/s12640-011-9247-x.

SÚHRNY

CHOOSING WISELY ALEBO VYBERAJME ROZUMNE

Pastrnáková, E.¹, Lazúrová, I.²

¹IV. Interná klinika UNLP Košice

²I. Interná klinika UNLP a LF UPJŠ Košice

Prednáška v krátkosti predstavuje globálnu kampaň Choosing wisely alebo Vyberajme rozumne, ktorá sa začala v roku 2012 v Spojených štátoch amerických a v nasledujúcich rokoch sa pripájajú postupne štáty rozvinutého sveta. Ku vzniku iniciatívy viedol mohutný rozvoj vedy a techniky, ktorý v oblasti medicíny so sebou priniesol veľké množstvo vyšetrovacích možností. Ich prehnané využívanie však okrem mimoriadnej finančnej náročnosti pre pacienta nemusí byť prínosné a môže ho až poškodiť. Aj Slovenská internistická spoločnosť (SIS) Slovenskej lekárskej spoločnosti si uvedomuje závažnosť problematiky a od r. 2017 sa pripája do tohto projektu organizovaného Európskou federáciou internej medicíny. Výbor SIS s pomocou odborníkov na krajskej a okresnej úrovni vypracoval TOP 7 odporúčaní pre diagnostiku a liečbu s cieľom nevykonávať nadbytočné a zbytočné vyšetrenia a nepoškodzovať pacienta. Tieto odporúčania budú uvedené a komentované v prednáške.

* * *

TROMBOFILNÉ STAVY

Lukáčová, Ľ.

Oddelenie klinickej hematológie, FNŠP J. A. Reimana Prešov

Trombofilné stavy sú vrodené a získané ochorenia spôsobené poruchou funkcie hemostázy na viacerých úrovniach. Vo všeobecnosti predstavujú veľmi variabilnú skupinu stavov, ktorá sa klinicky prejavuje trombotickými prejavmi v rozličných častiach krvného riečiska.

V súčasnosti sa stalo vyšetrenie na trombofilné stavy veľmi populárnym, vyšetrujú sa všetci pacienti bez ohľadu na vek, okolnosti vzniku trombotickej príhody, bez ohľadu na faktory, ktoré ovplyvňujú konečný výsledok a jeho interpretáciu. V prednáške sa zaoberám indikáciami na vyšetrenie trombofilných stavov podľa odporúčaní medzinárodných odborných spoločností aj vplyvmi predanalytických faktorov na výsledky vyšetrení.

HARMONIZÁCIA PREANALYTICKEJ FÁZY

Pivovarníková, H.

synlab slovakia s.r.o., Prešov

Prednáška sa zaoberá preanalytickými výzvami a časom na ich riešenie z poslednej konferencie preanalytickej fázy v Záhrebe v marci 2019, harmonizáciou preanalytickej fázy; novými odporúčaniami EFLM a rôznymi formami edukácie klinických partnerov.

Pri správnej indikácii testov je potrebné a možné využiť odporúčania z kampane Choosing wisely alebo napr. aj publikáciu Laboratory diagnostic pathways (Hofman et al., 2016). Až v 14,7 % laboratórnych testov lekári uvádzajú, že im neboli jasné indikácie a v 8,3 % nevedeli interpretovať výsledky. Na indikácie laboratórnych testov majú vplyv odborné odporúčania, ceny a zdravotné poisťovne. Ďalším najčastejším zdrojom problémov je pomalá akceptácia abnormálnych laboratórnych výsledkov, z čoho rezultuje aj kľúčový problém a potreba laboratórnej medicíny - neustála edukácia klinických partnerov. Dôležité je maximálne sústredenie na medicínu, požadovanie vyššej kvalifikácie laboratórneho personálu, ktoré výrazne súvisí s nižšou chybovosťou, sledovanie aktualizácií odborných odporúčaní (napr. oGTT u gravidných z r. 2019 od autora Friedecký a kol., 2019) ktorých počet je vysoký, vystúpenie z laboratórií a aktívna a intenzívna komunikácia s lekármi a sestrami a v neposlednej miere stať sa v očiach iných skutočným, rešpektovaným expertom.

V prednáške sa zdôrazňuje potreba vysvetliť klinickým partnerom dôležitosť znalosti presného času odberu. Vyžaduje to STN EN ISO 15189:2012 a je to aj jeden z dôležitých indikátorov kvality v systéme manažérstva kvality. Presný čas odberu je potrebné poznať kvôli stabilite niektorých parametrov, ďalej pre časovo závislé referenčné intervaly a pre terapeutické monitorovanie liečiv (TDM) a ich interpretáciu. Situácia v Európe ukazuje, že iba v malom percente je známy čas odberu, napr. u hospitalizovaných pacientov je uvedený čas odberu pre všetky vzorky v 49 % a u ambulantných pacientov iba v 36 %. Medzi najčastejšie chyby v preanalytickej fáze patrí hemolýza vzoriek, ktorá sa podieľa na všetkých preanalytických chybách až v 60 %. Hemolýza je najviac sa vyskytujúcou preanalytickou chybou, ovplyvňujúcou mnoho analytov, postupy s hemolytickou vzorkou sú heterogénne a neštandardizované, vytvára to riziko na report nesprávnych výsledkov, čo je príležitosť na diag-

nostické chyby (chýbajúca, oneskorená alebo nesprávna diagnóza).

O prehľade znalostí preanalytickej fázy pojednáva analýza získaná z dotazníkov ambulancií praktických lekárov a zo špecializovaných ambulancií.

Odborné spoločnosti vyzývajú podporiť štandardizované kritériá podľa nových odporúčaní: Practical recommendations for managing hemolyzed samples in clinical chemistry testing (Lippi et al., 2018a) a Local quality assurance of serum or plasma (HIL) indices (Lippi et al., 2018b).

1. **Friedecký, B. a kol. (2019):** *Diabetes mellitus – laboratórni diagnostika a sledování stavu pacientů. Klinická biochemie a metabolismus*, 2019, roč. 27, č. 1, s. 32–47, ISSN 1210-7921.
2. **Hofmann, W. et al. (2016):** *Laboratory Diagnostic Pathways*. 2nd edn. Edited by **Hofmann, W., Aufenanger, J., Hoffmann**. Berlin Germany, Walter de Gruyter GmbH.
3. **Lippi, G. et al. (2018a):** Practical recommendations for managing hemolyzed samples in clinical chemistry testing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, doi: 10.1515/cclm-2017-1104.
4. **Lippi, G. et al. (2018b):** Local quality assurance of serum or plasma (HIL) indices. *Clinical Biochemistry*, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.02.018.

* * *

ÚSKALIA PREANALYTICKEJ A ANALYTICKEJ FÁZY U PEDIATRICKÉHO PACIENTA

Vasilenková, A., Kiššová, M., Gereg, P., Šebová, C.

Oddelenie laboratórnej medicíny

Národný ústav detských chorôb, Bratislava

OLM NÚDCH sa za posledných 20 rokov vyprofilovalo na vysoko špecializované pediatrické pracovisko s dvomi diagnostickými centrami. Laboratórna medicína v pediatrii sa líši od laboratórnej medicíny dospelých. V laboratórnom testovaní sa musia potom zohľadňovať špecifiká pediatrického veku. Z dôvodu imunologickej nezrelosti a metabolickej nestability majú deti vysokú akútnosť ochorení (60–70 % urgentných vyšetrení). Cieľom prednášky je objasniť úskalia a definovať možné riešenia preanalytickej a analytickej fázy u pediatrického pacienta s cieľom získať maximálnu spoľahlivosť výsledku.

Preanalytická fáza je fázou s najväčším podielom chyby v celom laboratórnom testovaní. Najčastejšie preana-

lytické chyby u detí vznikajú samotným odberom. Odber vzorky u novorodencov a malých detí je problémový, vyžaduje zručnosť pre odbery zo žíl na hlave a krku. Nesprávna technika pri flebotómii je hlavnou príčinou *in vitro* hemolýzy. Pre malé deti neexistuje ideálny odberový systém, objem krvi pri odberoch je limitovaný, malé objemy sa pri transporte rýchlo znehodnocujú. Vzhľadom k veľmi častým chybám v preanalytickej fáze sa u novorodencov, dojčiat a kriticky chorých detí preferuje analýza z kapilárnej krvi pri lôžku pacienta. POCT analýzy prinášajú viaceré známe úskalia, napriek tomu v podmienkach špecializovaného pediatrického pracoviska prevažujú benefity, ktoré vedú k lepšej starostlivosti o pacientov. Systém POCT analýz sa používa v NÚDCH od roku 2001, odvtedy sa neustále rozširuje a zdokonaľuje. V súčasnosti garantujeme päť analyzátorov krvných plynov, elektrolytov, Ca²⁺, glukózy, laktátu a celkového bilirubínu, tri analyzátory na stanovenie CRP z kapilárnej krvi, desať glukomerov s pripojením do LIS na stanovenie glukózy z kapilárnej krvi. V štádiu prípravy je POCT monitorovanie ketolátok (β -hydroxybutyrátu). Vo všeobecnosti platí, že analytická fáza má najmenší podiel chyby na celkovom laboratórnom testovaní. V pediatrii to vždy neplatí, lebo analytické interferencie u novorodencov a dojčiat sa vyskytujú častejšie ako u dospelých. Vo vzorkách novorodencov sú prítomné vysoké koncentrácie bilirubínu, lipidov a fetálneho hemoglobínu. Bilirubín absorbuje svetlo pri vlnových dĺžkach, pri ktorých sa merajú mnohé spektrofotometrické metódy – možnosť falošných výsledkov, dojčenie a intravenózna výživa tukmi ovplyvňuje turbiditu vzorky, ktorá interferuje so spektrofotometrickými a turbidimetrickými metódami. Otázka výberu biochemického analyzátora je v pediatrickom laboratóriu kľúčová. Je potrebné, aby analyzátor eliminoval vplyv interferentov pred analýzou, aby pri každej vzorke pomocou indexov vyhodnocoval hladinu hemolýzy, turbidity a ikteru, aby používal metódy, pri ktorých neinterferuje fetálny hemoglobín. Analyzátory suchej chémie spĺňajú najnáročnejšie požiadavky na pediatrické laboratórne testovanie: krátky čas analýzy, malé pipetovacie a mŕtve objemy, elimináciu endogénnych interferentov a vyhodnocovanie hemolýzy, lipémie a ikteru pomocou indexov.

Pediatrická laboratórna medicína rieši problémy, ktoré prináša detský vek. Využíva prístroje a metódy, ktoré eliminujú chyby spojené s preanalytickou a analytickou fázou, a to aj napriek vyšším finančným nákladom na prevádzku.

* * *

LYZOSOMÁLNE OCHORENIA – NOVINKY V DIAGNOSTIKE A MONITORINGU

Šaligová, J., Potočnáková, Ľ.

Detská fakultná nemocnica Košice

Lysozomálne poruchy (Lysosomal storage disorders – LSD) tvoria širokú skupinu ochorení, spôsobených geneticky podmieneným deficitom niektorého z lysozomálnych enzýmov, podieľajúcich sa na degradácii zložitých zlúčenín, alebo zriedkavejšie deficitom transportných proteínov. Dôsledkom je hromadenie látok nad enzymatickým blokom, čo sa prejaví hromadením v bunkách, často s charakteristickým obrazom, následne hromadením v orgánoch a vyústením do multiorgánového postihnutia.

Autori prezentujú svoje skúsenosti a poukazujú na aktuálnu situáciu v diagnostike a liečbe tejto skupiny dedičných metabolických porúch.

VÝSKYT LSD: Jednotlivé choroby sú zriedkavé, ale ich sumárny výskyt je pomerne vysoký, v našej populácii je odhadovaný na 1 : 8 – 9000 novorodencov.

KLINICKÉ PRÍZNAKY LSD: Prvé klinické prejavy sa odvíjajú od orgánu, ktorý je najviac postihnutý. Prvé príznaky sa môžu objaviť kedykoľvek od novorodeneckého obdobia až do neskej dospelosti. Klinický obraz je variabilný, od ľahších foriem po ťažké s infaustnou prognózou. Postihnutie je zvyčajne multisystémové a ochorenie má progresívny charakter, donedávna bez možností kausálnej liečby.

DIAGNOSTIKA: LSD je potrebné zvažovať pri multisystémovom postihu s progresívnym charakterom. Niektoré LSD (mukopolysacharidózy, oligosacharidózy) sú sprevádzané charakteristickým vylučovaním metabolitov či zvýšením typických biomarkerov. Sledovanie ich dynamiky sa uplatňuje aj v následnom monitoringu pacienta. Diagnózu potvrdí dôkaz zníženej aktivity konkrétneho enzýmu a definitívne analýza DNA. Významným prínosom je dostupnosť stanovenia aktivity enzýmu v suchej kvapke krvi, čo významne zlepšilo možnosti skríningu LSD a následnej terapeutickej intervencie.

LIEČBA: V súčasnosti je viacero ochorení terapeuticky ovplyvniteľných, či už enzýmovou substitučnou liečbou, substrát redukčnou terapiou alebo liečbou chaperónmi.

Počet liečiteľných ochorení významne narastá. Kvalitná a včasná diagnostika je základným predpokladom úspešnej liečby LSD.

* * *

eLAB – POHĽAD LABORATÓRIÍ (LOINC – STRAŠIAK ALEBO DOBRÝ POMOCNÍK ?)

Straková, B.

Alpha medical s.r.o., Martin

LOINC (Logical Observation Identifiers, Names, and Codes) je systém identifikácie laboratórnych vyšetrení a ďalších diagnostických položiek. LOINC založil v roku 1994 Regenstrief Institute, nezisková organizácia pre lekárske výskum na univerzite v štáte Indiana v USA. Z dôvodu veľkej variability vtedajších informačných systémov bolo náročné identifikovať vyšetované parametre medzi jednotlivými subjektami. Na vyriešenie tejto rôznorodosti Regenstrief zorganizoval výbor LOINC s cieľom vyvinúť spoločnú terminológiu pre laboratórne a klinické vyšetrenia.

Hlavným cieľom LOINC je poskytovať identifikátory a názvy pre laboratórne parametre, klinické merania a rádiologické výkony. Regenstrief pravidelne dvakrát ročne publikuje nové vydania katalógu. Aktuálna verzia 2.66 bola vydaná v júni 2019. Obsahuje 91 388 termínov pokrývajúcich široký rozsah laboratórnych testov (chémia, mikrobiológia, molekulárna patológia, atď.) a širokú škálu klinických meraní (napr. vitálne znaky, EKG, atď.). Do systému LOINC sa pripája stále viac krajín (momentálne je zapojených 175 štátov), ktoré môžu aktívne spolupracovať na tvorbe katalógu. Od roku 2017 pribudlo takmer 7000 nových položiek.

Z dôvodu prípravy jednotného katalógu laboratórnych vyšetrení vznikla po dohode zdravotných poisťovní a laboratórií združených v Asociácii laboratórií pracovná skupina, ktorá vytvorila prvú verziu takéhoto katalógu. Pracovná skupina ako najvhodnejší prístup vyhodnotila adaptáciu medzinárodnej systematiky LOINC do podmienok slovenskej laboratórnej praxe. V procese tvorby katalógu boli mapované všetky vyšetrenia štyroch najväčších súkromných poskytovateľov laboratórnych služieb – Alpha medical, Medirex, Klinická biochémia a Synlab. Katalóg sa bude postupne rozširovať o vyšetrenia, ktoré poskytujú iné laboratórne zariadenia, ktoré sa zaradia do systému.

* * *

SVaLZ – MINULOSŤ, SÚČASNOSŤ A BUDÚCNOSŤ

Heriban, V.

Všeobecná zdravotná poisťovňa, a. s.

Laboratórna diagnostika v ostatných rokoch získava čoraz viac na význame, pretože dnes už dokáže nielen diagnostikovať chorobu, ale svoju nezastupiteľnú úlohu má aj v prevencii, monitorovaní liečby, určovaní adherencie pacienta k liečbe či pri budovaní odvetvia, ktorému sa medzinárodne hovorí „companion diagnostic“. Silné pozície na seba preberá integrácia, konsolidácia, automatizácia a elektronizácia celého segmentu a nastupujú nové formy organizácie práce. Tým sa v medicíne otvára nespočetné množstvo nových možností. Časy ručného spracovania materiálu v laboratóriách sú nenávratne preč. Súčasne dynamicky vzrastajú požiadavky na rýchlosť vyšetrení, ich komplexnosť a pridanú hodnotu. To všetko však kladie mimoriadne nároky aj na informácie o pacientovi, čo sa nezaobíde bez patričného stupňa elektronizácie celého procesu. Sofistikovaná elektronizácia zdravotníctva v širšom zmysle tohto slova sa preto už aj u nás stala aktuálnym trendom. Jej technologickým prejavom v súčasnosti je aj projekt eLab rozvíjaný pod gesciou NCZI. Jeho cieľom je nielen zefektívniť prácu laboratórií, ale priniesť benefit aj nákupcom zdravotnej starostlivosti a v nemalej miere pomôcť aj samotnému pacientovi, a to v rôznych praktických formách.

Ešte pred jeho prvým nasadením do praxe je potrebné po všetkých stránkach ho dôkladne a multidisciplinárne pripraviť. V tejto etape rozvoja projektu sa práve nachádzame. Základom elektronizácie laboratórnej činnosti bude spoločný komunikačný jazyk, teda jednotné, presné a nezameniteľné, softvérovo spracovateľné označovanie jednotlivých výkonov (LOINC). Samotný eLab potom bude prinášať mnoho výhod rozmanitého druhu pre všetkých stakeholderov procesu:

- elektronickú žiadamku a komunikáciu lekár – laboratórium;
- históriu pacienta pre indikujúceho lekára;
- nižšiu mieru subjektívnych chýb;
- jednoznačné vykazovanie;
- predschvaľovanie indikovaného výkonu poisťovňou;
- zamedzenie neuhrádzania duplicitných vyšetrení;
- precízne nastavenie indikačných, frekvenčných a ďalších medicínskych obmedzení;

- vyššiu mieru automatizácie revíznej činnosti zdravotnej poisťovne;
- presné, transparentné a objektívne pravidlá nielen úhrad;
- exaktné štatistické výstupy;
- rýchlosť, ...

Zavedenie systému eLab si však vyžaduje hlboké pochopenie problematiky a aktívnu spoluprácu pri tvorbe komunikačného jazyka, žiadanky, pravidiel uznávania výkonov ako aj iných zložiek systému aj od samotných laboratórií ako budúcich užívateľov systému a v neposlednom rade tiež odborných spoločností ako profesionálnej garancie zmien tak, aby bol eLab v konečnom dôsledku (pre laboratóriá) pomocou, nie príťažou. Aby sa na jeho tvorbe aktívne podieľali aj tí, ktorí ho budú používať a výzvy, ktoré nesporne prináša, sa spoľahlivo premieňali na jeho budúce benefity. Pre všetkých zainteresovaných. Príspevok mapuje konkrétne nástroje, ciele a etapy, ktorými sa projekt bude rozvíjať, jeho výhody aj výzvy, aby bolo každému zainteresovanému zrejmé, čo sa od neho očakáva a ako môže priložiť svoju ruku k dielu, ktoré osoží všetkým. Zároveň naznačuje trendy, ktoré bude štátna zdravotná poisťovňa presadzovať v najbližšej budúcnosti vo svojich zmluvných vzťahoch s poskytovateľmi laboratórnych služieb, a to nielen v oblasti úhradových mechanizmov, ale aj kvalitatívnych štandardov segmentu. To všetko pri aktívnej spolupráci s odbornou verejnosťou a mienkotvornými odborníkmi.

* * *

FINANCIE & KVALITA

ALEBO: KTO ZÍSKAVA FINANCIE A KTO KVALITU?

Lepej, J.¹, Lepejová, K.²

¹Klinika nukleárnej medicíny LF UPJŠ a INMM, Košice

²Oddelenie klinickej biochémie, hematológie a imunológie - Cumulus s.r.o., Košice

Správa z 11. 9. 2019 (Bratislava, TASR): Zdravotnícke organizácie aj poisťovne požadujú od vlády SR dofinancovanie zdravotnej starostlivosti (ZS) o 150 mil. Eur. Prídava sa aj ministerka zdravotníctva, ale minister financií komentuje: „...ja sa nemôžem opierať o cifry vycucané z prsta“.

Ako je to teda s financovaním zdravotníctva v SR!? Je dobré si pripomenúť a zhodnotiť objektívne a dostupné

zdroje. Prečo? Pretože problémy zdravotníctva sú výborná marketingová téma, ktorú využívajú vo svoj prospech mnohí, často nekompetentní. Na manipulovaní verejnosti poloprávdami až klamstvami získavajú politici voličské hlasy a masmédiá peniaze popularitu a slávu. Otázka je, čo získava pacient?

Autori v príspevku poukazujú na skutočnosť, ako sa financovanie zdravotníctva menilo za desaťročia demokracie. Vyhodnotia trendy vývoja a pokúsia sa zodpovedať na otázky:

Koľko bolo peňazí? Kde a v akom pomere sa zdroje využívali? Kto si z verejných zdrojov ukrajoval najväčší balík? Ako vznikol v rezorte zisk a na čo sa používal? Aká je situácia vo financovaní u nás a v porovnateľných aj neporovnateľných krajinách? Prečo je dobré alebo zlé pozerať na zdravotníctvo ako na ekonomickú kategóriu? Prečo má alebo nemá byť pacient klient a zdravotnícky pracovník poskytovateľ (provider)? Ako situácia s financovaním zdravotníctva v SR súvisí s jeho kvalitou?

Dynamika vývoja zdravotníctva vyplýva nielen z možností ekonomiky, nastavených parametrov odvodovej povinnosti, ale hlavne od systému prerozdelenia zdrojov a z chovania sa jednotlivých subjektov v tomto rezorte. Ako sa financovanie a kvalita menili v uplynulých rokoch, nebolo dané len našimi schopnosťami a želaniami. Žiaľ, podieľali sa na tom mnohí „silní hráči“, politici a ich stranické záujmy, finančné skupiny, medzinárodný biznis.

Autori z dostupných údajov dochádzajú k záveru, že dostatok finančných zdrojov v zdravotníctve nebude NIKDY. Je to len relatívny pojem. Výška zdrojov do zdravotníctva u nás a v porovnateľných krajinách nie je veľmi rozdielna. Problém je štruktúra a rozdelenie existujúcich zdrojov a príliš široká miera zisku respektíve straty, ktorá mnohokrát nezodpovedá dosahovanej kvalite. Autori poukazujú na podstatu a rozsah takzvanej „čiernej diery“, kde miznú finančné zdroje v zdravotníctve.

Za posledných 30 rokov experimentovania, transformácie vlastníctva výrobných prostriedkov a snahy čo najlepšie zarobiť, sa zmenila podstata práce zdravotníckych pracovníkov. Peniaze sa z prostriedku stali cieľom. Dôsledkom sú rozbité štruktúralne vzťahy vo vnútri systému, čo viedlo k strate kompetencií a nedosahuje sa primeraná hodnota za peniaze.

* * *

PARTICIPATION IN EQA: HOW OFTEN IS ENOUGH?

Assoc. prof. Dalius Vitkus, PhD

Institute of Biomedical Sciences of the Faculty of Medicine, Vilnius University, Lithuania

International Standard EN ISO 15189:2012 “Medical laboratories—Requirements for quality and competence” states that “the laboratory shall participate in an inter-laboratory comparison programme(s) (such as an external quality assessment programme or proficiency testing programme) appropriate to the examination and interpretation of examination results. There shall be a defined means of comparing procedures, equipment and methods used and establishing the comparability of results for patient samples throughout the clinically appropriate intervals”.

The optimal frequency of EQA schemes is often debated and the evidence for it is difficult to find. Looking through the catalogues of different EQA providers the frequency of EQA surveys varies, and the scientific reason for this is not given.

There are different approaches to clarify requirements of the Standard by competent authorities. European co-operation on Accreditation in 2010 has published an Advisory Document EA-4/18 “Guidance on the level and frequency of proficiency testing participation”. The general idea of the Guidance is that the laboratory should define its level and frequency of participation after careful analysis of the level of risk presented by the laboratory. According to WHO the number of PT rounds per year depends on many factors. Generally, a higher number of PT rounds will provide more data points and enable better understanding of the performance of a testing site. In a typical PT programme, challenge samples are provided at regular intervals with 2 to 24 times yearly. Some programmes use single sample, some—up to 8 samples per round.

A high quality scheme with commutable material and reference target values and thoroughly elaborated and understandable feedback reports are much more important than schemes with a high number of surveys. The theoretical reason for this opinion is that EQA should not be a substitute for internal quality control, but should concentrate on finding systematic deviations of measurement procedures preferably from a true target value. Pro-

grammes with commutable material and values assigned by reference methods allow laboratories to evaluate whether laboratory tests fit-for-purpose.

It is common that EQA providers are paid by each survey they circulate. An alternative approach could be that the EQA providers are paid for the expertise they provide so that professional reasons could determine the optimal frequency of surveys and the content of the feedback reports.

* * *

INTERNÁ KONTROLA KVALITY V REÁLNEJ PRAXI

Franeková, J.^{1,2}, Jabor, A.^{1,2}

1Pracoviště laboratorních metod, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha, ČR

²Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Praha, ČR

Interní kontrola kvality není v ISO15189 (5.6.2 Řízení kvality) zmíněna explicitně, je uvedena nutnost navrhnout postupy řízení kvality, které ověří dosažení zamýšlené kvality výsledků a v poznámce je zmínka, že tímto se mívá interní řízení kvality (s národní poznámkou o termínu Vnitřní kontrola kvality, VKK). Norma dále zmiňuje Materiály pro řízení kvality (5.6.2.2) a Výstupy řízení kvality (5.6.2.3). Co zmíněno není vůbec, je systém VKK, jeho implementace, používání, prověřování a zlepšování. Norma tedy ponechává velký prostor pro erudici laboratorních pracovníků.

IMPLEMENTACE: Prvním krokem efektivní VKK je analýza současné kvality vyšetřování (např. studium materiálů výrobce, vlastní verifikace metod, výsledky dosavadní VKK a výsledky externího hodnocení kvality (EHK)). Druhým krokem je stanovení analytických cílů, ideálně s respektováním hierarchie modelů podle první strategické konference EFLM. Často je potřebné hledat rovnováhu mezi kritérii state-of-the-art a požadavky vyplývajícími z biologické variability, vhodná je konfrontace s národními nebo mezinárodními doporučeními. Třetím krokem je volba modelu ve vlastní laboratoři tak, aby bylo možné získat spolehlivé statistické údaje (počet kontrolních materiálů, počet hladin, volba pravidel, volba software pro hodnocení). Čtvrtým krokem je sledování průběhu VKK a dílčí adaptace. Posledním krokem je pravidelné vyhodnocení efektivity VKK, např. v rámci přezkoumávání systému kvality.

PROBLÉMY: Laboratoře nestanovují analytické cíle, ignorují statistickou povahu VKK, nastavují široká kritéria podle rozmezí výrobce, nerespektují doporučení odborných společností, nepoužívají kontrolu s každou analytickou sérií, zaměňují proces kalibrace a kontroly, nepoužívají kontrolní materiály třetích stran, nereagují správně na signály z VKK, nepoužívají korektně vhodné nástroje, nezabývají se příčinou problému a nevyhodnocují VKK komplexně s ohledem na EHK, data pacientů a další údaje.

Přes dostupnost kontrolních materiálů, vyhodnocovacích nástrojů a edukačních zdrojů se VKK v řadě případů neprovádí korektně. Přitom jde ve skutečnosti o jeden z mála rutinních a denně dostupných systémů pro zajištění kvality výsledků.

* * *

CLINICIAN'S REAL LIFE WITH NEW METHODS IN QUALITY CONTROL AREA ON POCT ANALYZERS

PRAKTICKÝ POHLED KLINIKA NA NOVÉ METODY V KONTROLE KVALITY U POCT ANALYZÁTORŮ

Flajšingrová, J.¹, Debsová, A.^{2,3}

¹Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Brno, ČR

²Oddělení klinické biochemie a hematologie, Psychiatrická nemocnice Brno, ČR

³Oddělení biochemie, imunologie a alergologie, AKI spol.s.r.o., Brno, ČR

A diagnostics of blood gases, ions and oximetry is one of the most problematic areas in bedside monitoring in terms of preanalytical and postanalytical factors. Current analytic systems can only measure state of sample without subsequent result validation. State of sample without specific evaluation and result validation has no significance for clinician's feedback. Preanalytic and postanalytic process can significantly affect analytic way of the each sample, which does have continuity to result, or to results of next samples. A traditional model of Quality Control (QC) with Level-Jennings chart is not sufficient in process of real time evaluation and validation of each result. The traditional model of QC is only monitoring of a quality of an analytical instrument, but it does not monitor a real time analytical way and an analysis of a sample.

Problematic sample with no response in Quality Control and evaluation of supervisor at real time can lead to failed result with a succession to next samples, e.g. Transient Sample Error (TSE). An increase of frequency of quality control without any biochemical management and continuity after each sample at real time cannot influence an interpretation of sample result, or a validation. However, it can significantly affect economic and time matters. A subsequent intervention of a biochemist is not a true "real time validation" of critical decision, it is delayed and speculative in process of validation and clinician's decision. Real time Quality Control before, during and after each sample analysis, with implemented Quality Management (QM) of Westgard rules can influence sample result interpretation (in critical decision) with using of sample evaluation and automatic validation of result. All this provides real time rules to clinicians with no compromises and no speculations about each specific result. All analytical processes during measurement of each sample are constantly monitored by an autonomic real-time quality management of Total Analytic Error (TAE) with a succession to each sample evaluation. Supervisor's assistance and specific biochemical interventions during critical results are eliminated almost to zero. The real time quality management helps clinicians to decrease a risk of incorrect results in a real time process of sample assessment without TSE and latter laboratory consultation. The autonomic intelligent quality management (iQM) in real time can detect problem of each sample using specific interpretation, which can help clinicians in education related to preanalytical phases.

5. Westgard, J. O., Fallon, K. D. and Mansouri, S. (2003): Validation of iQM Active Process Control Technology, Point of Care. *The Journal of Near-Patient Testing & Technology*. doi: 10.1097/00134384-200303000-00001.
6. Toffaletti, J. G. et al. (2007): Validation of a quality assessment system for blood gas and electrolyte testing. *Clinica Chimica Acta*. doi: 10.1016/j.cca.2007.03.021.
7. Šálek, T. et al. (2016): Postanalytická fáza a interpretace laboratorního testu (post-postanalytická fáza), *Klinická Biochemie a Metabolismus*.

* * *

VIEME PRAVDU, CELÚ PRAVDU A NIČ, LEN PRAVDU O KVALITE ?

Balla, J.

Národný reprezentant Slovenskej spoločnosti klinickej biochemie v EFLM a IFCC

Aj keď slovo roka 2016 „post-truth“ (postpravdivá, postfaktuálna doba) vyjadruje podľa britského Oxford Dictionaries skôr politický fenomén, keď „pravda už nie je pravda“, možno sa odôvodnene domnievať, že sa netýka len politiky, ale všetkých oblastí života. Kvality v laboratórnej medicíne nevynímajúc. J. O. Westgard vo svojej knihe *Nothing but the Truth about Quality* napísal, že v dobách „nepravdy“ sa obáva, že kvalita v klinických laboratóriách trpí tiež, pretože kvalita sa v mnohých aspektoch vzťahuje k pravde. Aplikovať pravdu, celú pravdu a nič len pravdu v preklade do klinického laboratória znamená, že laboratórna skúška musí mať definovanú požiadavku na kvalitu (pravda), ktorá spĺňa špecifikácie správnosti a presnosti analytickej metódy (celá pravda) a je zaručená postupom kontroly kvality (nič iné ako pravdivý dôkaz kvality).

Základnou úlohou klinického laboratória je poskytovať informácie, ktoré spoľahlivo pomôžu riešiť otázky diagnostiky a liečby pacientov. Pokrok a vývoj meracích systémov, činidiel a metodológie v posledných desaťročiach viedol k mylnému názoru, že zníženie analytických chýb dosiahlo takú úroveň, že analytická fáza laboratorneho vyšetrenia už nevyžaduje toľko pozornosti ako v minulosti. V teoretickej rovine je dosť poznatkov o zásadách riadenia kontroly kvality analytickej fázy, ale ich prenos a realizácia v praxi nie je jednoduchá. V internej kontrole kvality sa kladie prílišná spoľahlivosť na výrobcov a automatické štatistické programy, pritom pre zabezpečenie kvality sú rozhodujúce odborné znalosti, zručnosti a osobný postoj. Nedoceňuje sa optimalizácia pravidiel internej kontroly kvality, počet kontrolných meraní a správna frekvencia QC. Organizácie, vykonávajúce externé hodnotenie kvality, používajú pri posudzovaní kvality značne rozdielne špecifikácie kvality a národný akreditačný orgán rozhoduje pri auditoch podľa týchto kritérií, hoci ISO norma 15189 jasne vyžaduje, aby laboratória používali skúšobné postupy, ktoré sú vhodné na zamýšľané použitie (čo slúži pacientovi). Či spomenuté špecifikácie kvality spĺňajú túto požiadavku normy, nikoho nezaujíma. Nevytvárame a neimplementujeme národné štandardy kvality.

Zachovanie alebo zlepšenie kvality predstavuje zvýšené náklady na klinické laboratóriá. Finančné reštrikcie zo strany poisťovní a tlaky na obmedzovanie moderných laboratórnych testov sú primárne zamerané na zisky inštitúcií, nie na dosahovanie kvality. Zdravotné poistenie je povinné a verejné, prostriedky verejného zdravotného poistenia sú určené na úhradu nákladov na poskytnutú zdravotnú starostlivosť a nie na vlastné príjmy či zisky.

* * *

KONTROLA KVALITY V MOLEKULÁRNEJ GENETIKE

Čamajová, J.

Klinická biochémia s. r. o., Žilina

Neustále napredujúci pokrok v molekulárno-genetickej diagnostike je umožnený rýchlym rozvojom technológií, bioinformatickým spracovaním genomických dát ako aj získavaním nových medicínskych poznatkov ako je molekulárny podklad ochorení, možnosti variabilnej liečby i možnosti detekcie širokého spektra patogénov. Tento mimoriadny progres je potrebné zároveň prepojiť s dôkladnou kontrolou kvality práce a postupov pri vykonávanej diagnostike.

Molekulárno-genetické vyšetrenia môžu byť zamerané na vyšetovanie humánneho genómu ako i extrahumánneho genómu. Pri humánnom genóme pacientov môže ísť o vyšetovanie patologických variantov podmieňujúcich dedičné ochorenia a predispozície, patologických zmien pri onkologických ochoreniach, sledovanie vývoja ochorenia, sledovanie genetického pozadia ovplyvňujúce reakciu pacientov na liečbu a i. Pri extrahumánnom genóme ide o detekciu, kvantifikáciu alebo genotypizáciu infekčných patogénov.

Diagnostika na molekulárno-genetickej úrovni má niektoré unikátne črty, ktorými sa odlišuje od iných diagnostických testovaní. Pri vyšetovaní humánneho genómu sa jednak genetická výbava pacienta v dedične podmienených znakoch počas života nemení, takže vyšetrenie humánnej DNA pacienta pre daný patologický variant/ochorenie sa neopakuje a tvorí permanentnú súčasť zdravotnej dokumentácie pacienta. Keďže ide o citlivé údaje, je potrebný informovaný súhlas pacienta a osobné informácie o genóme pacienta musia byť chránené. Okrem toho výsledky genetických testov môžu mať následky nielen

pre osobu, ktorá je vyšetovaná, ale aj pre jej rodinných príslušníkov. Tieto všetky fakty ešte podčiarkujú nutnosť dôslednej kontroly kvality v tejto diagnostike na všetkých úrovniach.

V súčasnosti má práca v molekulárno-genetickej diagnostike zároveň veľmi špecifickú metodologickú črtu, nakoľko je založená na PCR reakciách a ich aplikáciách. PCR reakcia umožňuje vysoký stupeň amplifikácie DNA – z jednej molekuly môžu byť vytvorené milióny až miliardy DNA molekúl/ kópií. Citlivá povaha PCR práce si vyžaduje špeciálny prístup, aby sa zabránilo kontaminácii inými molekulami DNA, ich zmnoženiu a tým vzniku nesprávnych výsledkov. Preto je pre zabezpečenie kontroly potrebné okrem všeobecne používaných prostriedkov implementovať, kontrolovať a sledovať špeciálne prístupy a postupy.

* * *

LC-MS/MS V RUTINNEJ PREVÁDZKE

Sečník, P. jr., Babiak, P.

SK-Lab s.r.o. – klinické laboratórium, Lučenec

Princíp kvapalinovej chromatografie kombinovanej s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS) je známy približne 40 rokov. Praktické použitie tejto analytickej metódy však bolo až do nedávnej doby viazané takmer výlučne na výskumné pracoviská. Dôvodom je určitá náročnosť po odbornej, finančnej a personálnej stránke a tiež „vrodená“ obtiažna automatizovateľnosť. Uvedené problémy však LC-MS/MS viac než vyvažuje bezprecedentnou analytickou kvalitou, ktorá ťaží z kombinácie separačnej sily LC a detekčnej sily MS.

V poslednom desaťročí LC-MS/MS postupne prechádza aj do bežnej praxe klinických laboratórií. Uplatnenie nachádza predovšetkým pri stanovení problémových analytov, kde limity klasických biochemických a imunochemických metód nedovoľujú dosiahnutie potrebnej analytickej senzitivity a špecificity. Jedná sa napríklad o terapeutické monitorovanie koncentrácie liečiv, stanovenie katecholamínov a ich metabolitov, vitamínu D a jeho foriem, prípadne steroidných hormónov. Špeciálne uplatnenie má LC-MS/MS v screeningu vrodenej metabolických väd a v toxikologických analýzach.

V laboratóriu SK-Lab Lučenec bola metodika LC-MS/MS uvedená do prevádzky približne pred jedným rokom. Inštalácia zariadenia vyžadovala zaistenie technologické-

ho zázemia pre podporné zariadenia (generátor dusíka, vákuová pumpa) a pretreatment vzoriek (digestor, vákuový desikátor). LC-MS/MS aktuálne využívame pre stanovenie 25-OH cholekalciferolu (D3) a 25-OH ergokalciferolu (D2). Jedná sa o in-house metódy, ktoré boli navrhnuté na základe publikovaných dát a doladené v SK-Lab. Zavedeniu metód do klinickej praxe predchádzala validácia ich analytických charakteristík a porovnanie s predchádzajúcou používanou imunochemickou metódou.

Podľa predpokladov sa metódy LC-MS/MS pre stanovenie (25-OH)-D2 a (25-OH)-D3 vyznačujú vysokou medziľahlou precíznosťou (CV = 2,5 %, 22 hodnôt, 30 dní) a pravdivosťou (bias = 1 %, EHK cyklus RfB, hodnotená náväznosť). Celková (kombinovaná, rozšírená) neistota výsledkov ($U_{k,c,r} = 6,05\%$) je výrazne nižšia, než cieľová neistota odvodená z biologickej variability (TMU = 19,7 %).

LC-MS/MS má v portfóliu analytických metód SK-Lab pevné miesto. V blízkej budúcnosti plánujeme zaviesť do klinickej praxe LC-MS/MS metódy pre diagnostiku endokrinopatií, na ktorých vývoji v súčasnosti pracujeme

* * *

DESET KONCEPTŮ PRO POSTANALYTICKOU FÁZI

Jabor, A.^{1,2}, Franeková, J.^{1,2}, Kubíček, Z.¹

¹Pracoviště laboratorních metod, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha, ČR

²Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Praha, ČR

Změna paradigmatu laboratorní medicíny ve smyslu přesunu od „patient-centered medicine“ k medicíně, kde se pacient zúčastňuje některých rozhodovacích procesů, vyžaduje individuální přístup v postanalytické fázi. Pozorost vyžadují nástroje, které to umožňují.

Koncepty postanalytické fáze a jejich význam pro medicínu příštího desetiletí:

1. Referenční meze: mají význam pro popis laboratorního testu, nejsou rozhodující pro individuum. Význam roste při nedostatečné harmonizaci testů a klesá při existenci klinických cut-off hodnot.
2. Cut-off hodnoty mohou být určené exaktně (a s nejistotou), intuitivně, konsenzem, s možným politickým nebo ekonomickým pozadím. Mají vyšší klinický význam než referenční meze, výtěžnost zvyšuje použití více cut-off hodnot.

3. Poločas eliminace se týká jen speciálních situací, ve kterých ale hraje významnou roli (monitorování léčiv, použití tumormarkerů po radikálních výkonech, ovlivnění biomarkerů externími krátkodobými vlivy), zakládá možnost individuálního hodnocení.
4. Biologická variabilita reprezentuje velký prostor pro zlepšení postanalytické fáze, výsledky v databázi EFLM <https://biologicalvariation.eu/> zatím bohužel nenaplnily očekávání, řada problémů není vyřešena (individualizace, změny v patologii).
5. Kritická diference (reference change value) vychází z intraindividuální biologické a analytické variability, má vyšší podíl individualizace, není vhodná pro všechny analyty a klinické situace, využití pro delta check je omezené.
6. Index individuality naznačuje potřebnost individuálního hodnocení výsledků, než jejich porovnání s referenčními intervaly. Pro konkrétního pacienta má omezený význam.
7. Kritické hodnoty při správném nastavení umožňují individualizaci v extrémních situacích.
8. Senzitivita a specifita charakterizují test v jedné klinické situaci, individualizaci postanalytické fáze neumožňují.
9. Pozitivní a negativní prediktivní hodnoty jsou pravděpodobnosti jedné klinické situace podle výsledku analýzy, klíčem je individuální apriorní pravděpodobnost choroby.
10. Posledním konceptem je použití erudice, zkušenosti a zdravého rozumu.

Uvedené koncepty přispívají k individualizaci postanalytické fáze různou měrou a význam se může měnit podle konkrétní klinické situace...

* * *

JE VÝSTUP Z ALPHA PROGRAMU VŽDY JEDNOZNAČNÝ?

Schenkova, K.

Medirex a.s., Bratislava

Prenatální biochemický skrining vrozených vývojových chýb umožňuje na základe koncentrácie biochemických, prípadne ultrazvukových markerov I. a II. trimestra výpočet rizika postihnutia plodu Downovým syndrómom

(DS), trizómiou 18, 13 a rázštepovou poruchou. Na Slovensku sa najčastejšie na vyhodnotenie prenatalného skríningu využíva program Alpha.

Je dôležité si uvedomiť, že ide o skríninový program, ktorý má určitú mieru falošnej pozitivity a negativity. V závislosti od použitej skríninovej stratégie môže byť záchytnosť (DR) pre Downov syndróm pri 5% falošnej pozitivite (FPR) od 74% pri triple teste až po 92% pri integrovanom teste s nuchálnou translucenciou (NT). V praxi to znamená, že sa môžu vyskytnúť plody s DS, ktoré budú mať skrínin negatívny a na druhej strane, len každý 9. plod s pozitívnym skríninom na DS pri integrovanom teste, resp. každý 49. plod s pozitívnym skríninom pri triple teste bude postihnutý touto trizómiou.

Pre zvýšenie záchytnosti prenatalného skríningu je dôležitá skúsenosť hodnotiaceho. Extrémne hodnoty jedného markera (na našom pracovisku PAPP-A < 0,3 MoM, hCG > 3,5 MoM, AFP < 0,4 MoM) pri negatívnom skríningu by mali byť dôvodom na genetickú konzultáciu tehotnej. Rovnako je potrebné zvážiť genetickú konzultáciu pri hraničnom skríningu (riziko 1 : 250–1 : 350), ak je prítomný iný rizikový faktor (vek tehotnej, nízky MoM PAPP-A).

Na druhej strane, niektoré iné chromozómové aberácie (monozómia X, triploidia), prípadne iné VVCH plodu môžu mať v biochemickom prenatalnom skríningu relatívne typický obraz. Rovnako patológie gravidity (zamlčaný potrat, mŕtvy plod, intrauterinná rastová retardácia plodu, patológie placenty) môžu výrazne ovplyvniť hodnoty biochemických markerov ako aj výsledné hodnotenie prenatalného skríningu.

Výsledok prenatalného skríningu teda určite nie jednoznačný. Vyžaduje skúsenosti a komplexný pohľad tak hodnotiaceho biochemika ako aj ordinujúceho gynekológa.

* * *

REPORTOVANIE NÁLEZOV ELEKTROFORÉZY A IMUNOFIXÁCIE BIELKOVÍN – POKUS O ŠTANDARDIZÁCIU

Đurovcová, E.^{1,2}

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF v Košiciach

²Medirex, a.s., Košice

Elektroforéza (ELFO) a imunofixácia (IFE) bielkovín je príkladom vyšetrenia v klinickej biochémii, ktoré sa lekárovi oznamuje spolu s interpretačným komentárom.

Nedostatok publikovaných odporúčaní vedie k veľkej variabilite reportovaných nálezov pochádzajúcich z rôznych laboratórií alebo aj od rôznych vyhodnocujúcich osôb, čo bolo opakovane potvrdené aj v systémoch medzilaboratórneho porovnávania kvality. Nedostatočná štandardizácia v reportovaní výsledkov ELFO a IFE je v kontraste s pokrokom, ktorý sa dosiahol v oblasti diagnostických kritérií a postupov, hodnotenia liečebnej odpovede a prognózovania pacientov s monoklonovými gamapatiami a najmä s mnohopočetným myelómom. V niektorých krajinách (Nový Zéland, Austrália, Taliansko, Holandsko, Kanada) už vykonali pokus o štandardizáciu v tejto oblasti a presadzujú tzv. synoptické, čiže prehľadné reportovanie výsledkov. Jej cieľom je poskytnúť kompletnú a konzistentnú informáciu v rovnakej štruktúrovanej forme, ktorá klinikom umožní efektívne rozpoznať dôležité informácie a detaily vo výsledkových správach z rôznych zdrojov a interpretátorov. Sekundárnym cieľom navrhovanej štandardizácie interpretačného komentára je používanie pre kliniku zrozumiteľného, podľa možnosti jednoznačného a jednotného slovníka.

Navrhovaný formát popisu výsledku ELFO a IFE obsahuje určité povinné aj nepovinné informácie – prítomnosť neprítomnosť monoklonového proteínu, popis jeho lokalizácie, kvantity a izotypu, údaj o imunosupresii polyklonových Ig, porovnanie s predchádzajúcim nálezom, interpretácia nálezu, odporúčanie ďalšieho alebo opakovaného vyšetrenia (ak je to vhodné) a identifikácia interpretátora výsledku.

Podobne ako v iných oblastiach laboratórnej medicíny prináša štandardizácia a harmonizácia interpretačných komentárov príležitosť zlepšiť porovnateľnosť, logickosť a zrozumiteľnosť laboratórnych nálezov. Súčasne zjednodušuje vyhľadávanie údajov pre potreby výskumu alebo štatistik a je nevyhnutnou podmienkou pre elektronický prenos, uchovávanie a prehľadávanie nálezov v medicínskych databázach.

* * *

ACYLKARNITÍNY V DIAGNOSTIKE DEDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORÚCH: VYUŽITIE V KLINICKEJ PRAXI A OBMEDZENIA

Ostrožlíková, M.¹, Górová, R.²

¹Pracovisko klinickej biochémie a Centra dedičných metabolických porúch, Narodný ústav detských chorôb

²Experimentálne laboratórium metabolomických analýz (ELMA), Chemický ústav, Prírodovedská fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

Malá molekula karnitínu vytvára v organizme estery s acylmi pochádzajúcimi z CoA-dependentných metabolických procesov a vzniknuté acylkarnitíny sú uvoľňované do obehu. Vyspelá technológia tandemovej hmotnostnej spektrometrie umožňuje stanovovať ich koncentrácie v biologických tekutinách (v suchej kvapke krvi – SKK, v plazme, menej v moči, žlči, pupočníkovej krvi a v kultúre fibroblastov).

Väčšina acylkarnitínov s krátkym reťazcom (ACC, C2 až C5) v ľudskom organizme vzniká počas beta-oxidácie mastných kyselín (C2-acylkarnitíny), niektoré však pochádzajú aj z iných esterov koenzýmu A, napr. ketolátok (C4-3OH-karnitín), degradačných produktov aminokyselín lyzínu, tryptofánu, valínu, leucínu, izoleucínu (C5-karnitín, C3-karnitín a iné) a atómov uhlíka glukózy (C2-karnitín). Vytvorenie acylkarnitínov chráni organizmus pred stratami koenzýmu A. Poruchy beta-oxidácie mastných kyselín a tiež

niektoré organické acidúrie vedú k hromadeniu molekúl príslušného acylkarnitínu. Profil ACC sa v týchto prípadoch stáva pre určenie dedičnej metabolickej poruchy (DMP) diagnostickým. Indikácie na vyšetrenie acylkarnitínov v krvi sú: hypoglykémia, encefalopatia, kardiomyopatia, rbdomyolýza, myopatia, metabolická acidóza, hepatopatia, hyperamonémia, náhla smrť dojčiat, zaostávanie vo vývoji, akútne stavy so zvracaním, poruchou vedomia a záchvatmi. Vyšetrenie ACC v SKK v simultánnom multianalytovom stanovení s aminokyselinami je metódou identifikácie DMP v rozšírenom novorodeneckom skríningu (RNS). Analýza ACC v rôznych materiáloch, najčastejšie v krvi (SKK alebo plazma), je špecifické vyšetrenie, existujú však viaceré príčiny falošne pozitívnych (liekové artefakty, izomerické metabolity, klinicky nevýznamný polymorfizmus) a falošne negatívnych výsledkov (deficit karnitínu, veková variabilita, hemodialýza). Ani negatívny nález v profile acylkarnitínov úplne nevylučuje poruchu, pretože mierne formy môžu prebiehať s intermitentným zvýšením metabolitov.

Pre definitívnu diagnózu DMP pri rešpektovaní uvedených obmedzení musí byť nález charakteristického profilu ACC podporený klinickým obrazom, molekulovo-genetickým vyšetrením alebo meraním aktivity príslušného enzýmu.

Práca bola finančne podporená v rámci OP Výskum a vývoj ITMS 26240220007 a Agentúrou pre vedu a výskum z projektu APVV-0840-1.

* * *

INTELIGENTNÝ MANAŽMENT VZORIEK

KVALITNEJŠIE A RÝCHLEJŠIE KLINICKÉ ROZHODOVANIA



Automatizovaná linka DxA 5000 a klinické IT znižujú variabilitu výsledkov a zrýchľujú TAT.

Prispievajú k efektívnejšiemu poskytovaniu kritických informácií klinikom. Uľahčujú klinické rozhodovanie a zlepšujú manažment pacientov v dynamickom prostredí zdravotnej starostlivosti.



Integrované riešenia cobas® pro

V jednoduchosti je dokonalosť



01 Vzorková riadiaca jednotka

Výkon až **1 000** testov za hodinu a súčasne **300** vzoriek na vstupe a **300** vzoriek na výstupe podávača, alebo dvojsmerné spojenie s laboratórnou automatizáciou.

02 ISE analytická jednotka

Do **900** testov za hodinu.

03 Analytická jednotka cobas c 503

Výkon až **1 000** testov za hodinu a **60** reagenčných pozícií.

04 Analytická jednotka cobas e 801

Výkon **300** testov za hodinu a **48** reagenčných pozícií.



Roche Remote CareGiver

Predchádzajte neočakávaným prestojom. **Využite** Váš čas efektívnejšie.

Predstavujeme Vám novú, bezpečnejšiu a rýchlejšiu formu zdieľaného pripojenia pre vzdialenú zákaznícku podporu.

Roche Remote CareGiver beží na zabezpečenej digitálnej infraštruktúre a poskytuje maximálnu ochranu siete, osobných údajov a mnoho iných funkcií, o ktorých Vám radi povedia naši špecialisti.



Online požiadavka
na podporu



Vzdialený
prístup



Digitálna
aktualizácia



Proaktívna údržba
a oprava

Atellica® Solution

Nové diagnostické portfólio s viac ako 175 metódami navrhnuté so zameraním na kontrolu, jednoduchosť a lepšie výsledky.



Zažite silu Atellica!

Flexibilné, škálovateľné a automatizované analyzátory Atellica Solution prinášajú širokú paletu biochemických a imunochemických testov vrátane vysokocitlivého troponínu I či 12 nových metód pre stanovenie vírusovej hepatitídy, HIV či onkologických ochorení.

Vďaka revolučnému manažmentu vzoriek poskytuje Atellica Solution diagnostikovaným pacientom ako aj klinickým pracovníkom rýchle a spoľahlivé laboratórne výsledky.

Viac informácií o rozsiahlom Atellica portfóliu môžete nájsť na

[siemens-healthineers.com/sk/
laboratorna-diagnostika/atellica-portfolio](https://www.siemens-healthineers.com/sk/laboratorna-diagnostika/atellica-portfolio)

SIEMENS
Healthineers



... pre komplexne dokonalé laboratórium sú dôležité aj detaily



SPOĽAHLIVÉ STANOVENIE KALPROTEKTÍNU PRE KAŽDÉ LABORATÓRIUM

CalFast®XT

Calprest®NG

Calprest®Turbo

metóda	kvantitatívny rýchly test	ELISA	imunoturbidimetria
rozsah merania (µg/g alebo mg/kg)	0 – 1 005	0 – 3 000	0 – 8 000
čas stanovenia	20 min	< 105 min	< 10 min
počet testov v balení	20	96	200
možnosť automatizácie	nie	áno	áno
kalibrátory a kontroly	ľudský rekombinantný kalprotektín (vyššia stabilita, reprodukovateľnosť a spoľahlivosť)		



SUPER GL 2

najpoužívanejšie glukóзовé analyzátory



automatizovaná močová analýza

- močové linky a integrované systémy pre chemické a mikroskopické vyšetrenie moča od renomovaných svetových výrobcov
- nové aj repasované systémy
- aplikačná a servisná podpora s dlhoročnými skúsenosťami
- viac ako 20 inštalácií močových systémov v SR



Thunder Bolt

automatický ELISA analyzátor
infekčná serológia • autoimunita

Eurolab Lambda a.s.

- Špecialista na
- automatizovanú močovú analýzu
 - glukóзовé analyzátory
 - osmometriu
 - analýzu glykovaného hemoglobínu (HPLC)
 - kalprotektín
 - okultné krvácanie

STE SI ISTÝ SPRÁVNOSŤOU VÝSLEDKU HIV, HEPATITÍDY A SYFILISU?

PRE VYŠŠIU DÔVERU VO VÝSLEDOK PACIENTA VENUJTE PROSÍM POZORNOSŤ NOVÝM NEZÁVISLÝM SEROLOGICKÝM KONTROLNÝM MATERIÁLOM

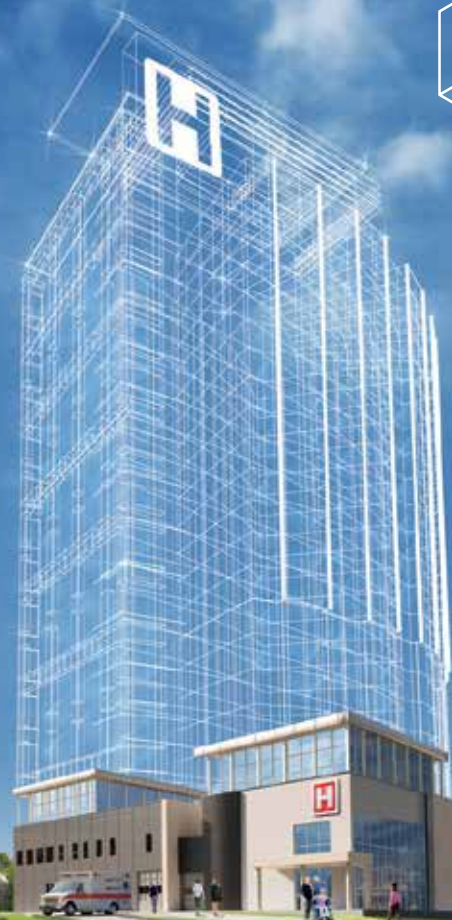
Kontroly infekčných chorôb Acusera (Serology) poskytujú efektívne a vysoko kvalitné riešenie pre analýzu infekčných chorôb a súčasne zabezpečujú spoľahlivé výsledky. Nezávislé kontroly – “3rd party control” pokrývajú široké spektrum infekčných chorôb vrátane HIV, hepatitídy, EBV, ToRCH a Lymfkej Boreliózy, sú kompatibilné s najpopulárnejšími metódami a systémami, medzi ktoré patria Roche, Abbott, Siemens a Beckman.

Likvidný materiál je pripravený na okamžité použitie s vynikajúcou 60-dňovou stabilitou po otvorení, čo zaisťuje efektívne využitie objemu materiálu, je kompatibilný na použitie so softvérom spravovania dát kontroly kvality Acusera 24•7.



Alinity

ALINITY: INOVÁCIA V INTEGRACII LABORATÓRIA NA DOSAH VĎAKA RODINE HARMONIZOVANÝCH SYSTÉMOV NOVEJ GENERÁCIE



Spoločnosť Abbott si plne uvedomuje narastajúcu komplexnosť zdravotnej starostlivosti, aj výzvy týkajúce sa klinickej diagnostiky a preto prichádzame s riešeniami prispôbenými na mieru potrebám Vašeho laboratória. Alinity je ucelená rodina systémov novej generácie spoločnosti Abbott navrhnutá tak, aby zjednodušila diagnostiku a umožnila inovatívne prepojenie laboratórných disciplín.

Alinity ci-series je naša nová generácia systémov pre klinickú biochémiu a imunochémiu, ktorá je navrhnutá tak, aby umožnila zvýšiť výkonnosť a efektivitu Vašeho konsolidovaného laboratória. Vďaka tomu bude možné dosiahnuť merateľne lepšie výsledky poskytovanej zdravotnej starostlivosti.

Pre ďalšie informácie navštívte stránky Alinity.com alebo kontaktujte svojho Abbott Ambadora, prípadne pošlite e-mail na: wired@abbott.com



CHOOSE TRANSFORMATION

ALINITY | Clinical Chemistry | Immunoassay | Hematology | Transfusion | Molecular | Point of Care



**RYCHLÁ
A EFEKTIVNÍ
ANALÝZA MOČE**



**ROZŠÍŘENÝ
SYSTEM ŘÍZENÍ QC**



**AUTOMATICKÉ
ROZPOZNÁVÁNÍ
TYPU PROUŽKU**



**KOMPLEXNÍ
DATABÁZE
VÝSLEDKŮ**



**OVĚŘENÝ
SYSTEM PROUŽKŮ
PHAN LAURA**

LAURA

**POLOAUTOMATICKÝ ANALYZÁTOR
MOČOVÝCH PROUŽKŮ**

Erba Lachema s.r.o., Karásek 2219/1d, 621 00 Brno, Česká republika, www.eralachema.com

CZ: Mgr. Martin Pátek
Tel.: +420 770 180 151
m.patek@erbamannheim.com

SK: Mgr. Ivana Knapčíková
Tel.: +421 903 728 120
i.knapcikova@erbamannheim.com



POCT & CRITICAL CARE



ACIDOBÁZE A KREVNÍ PLYNY GEM5000

pH, pO₂, pCO₂, Na⁺, K⁺, iCa⁺⁺, Cl⁻, Glu, Lac, Hct, tHb, sO₂, O₂Hb, COHb, MetHb, HHb, Total Bill

17 měřených parametrů,
45 sekund,
65 µL,
Real-Time QC

KOAGULACE ROTEM sigma

fibrinogen, krevní destičky,
koagulační faktory,
fibrinolýza, heparin, NOACs, ad.
akutní diagnostika hemostázy za 10minut,
ROTROL QC



BIOCHEMIE AFIAS-1, AFIAS-6

TnI, CK-MB, Myo, NT-proBNP,
D-Dimer, CRP, PCTplus,
HBsAg, HIV, Zika.....ad.

33 měřených parametrů,
3-10 minut,
10-100 µL,
Multi-Level QC



SYSTÉM NEMOCNIČNÍCH GLUKOMETRŮ ARKRAY POCKETCHEM BG

vestavěná čtečka barkódů
oblužný software **SMBG Viewer**
systém kontroly kvality **POCKETCHEM BG Control**



GEMweb[®] Plus⁵⁰⁰

CUSTOM CONNECTIVITY

Centrální SW pro správu všech
POCT přístrojů z centrální
laboratoře

...KDE ROZHODUJE KVALITA A RYCHLOST...

MEDISTA, spol. s r.o.
Dělnická 12
Praha 7, 170 00
Czech Republic
www.medista.cz



Tel: 241 444 525
241 444 637
241 444 668
Fax: 241 445 980
medista@medista.cz

ABL800 FLEX, VERZE PLUS | **AQT90 FLEX**

WORLD LEADER IN ACUTE CARE TESTING



**NAJVIAC PARAMETROV | NAJMENŠÍ OBJEM VZORKY
NAJRÝCHLEJŠIA ANALÝZA | AUTOMATICKÝ SYSTÉM KVALITY
NAJVIAC INŠTALÁCIÍ V ČESKEJ A SLOVENSKEJ REPUBLIKE**

pH
pCO₂
pO₂
cCl⁻
cCa²⁺
cK⁺
cNa⁺
cGlu
cLac
cUrea
cCrea
ctBil
ctHb
sO₂
FO₂Hb
FCOHb
FMetHb
FHHb
FHbF

Troponin I
Troponin T
CK-MB
Myoglobin
NT-proBNP
CRP
βhCG
D-dimer
PCT



*Váš partner v oblasti medicíny,
vedy a výskumu.*

www.sarstedt.com

info.sk@sarstedt.com

Tel: 02/68 245 933

Fax: 02/ 68 245 934

Diagnostika



Rozsiahle predanalytické produktové portfólio zahŕňa produkty na odber vzoriek a na transport a uskladnenie diagnostických vzoriek. Ponúkame širokú škálu systémov odberu vzoriek pre najrôznejšie vzorkové materiály (krv, sliny, moč, stolica). Systém S-Monovette® je prvý systém, s pomocou ktorého je možné odobrať krv pomocou dvoch techník v jednom systéme – aspiračne, alebo vákuovo.

Laboratórium



Ponúkame riešenia šité na mieru pre najrozmanitejšie oblasti použitia vrátane molekulárnej biológie, biochémie a bunkovej biológie. Naše certifikované štandardy kvality „PCR Performance Tested“, „Biosphere® plus“ a „Cryo Performance Tested zaručujú najvyššiu kvalitu a ochranu pred kontamináciou.

Klinika



V SARSTEDT sa zameriavame na klinickú starostlivosť v oblasti regionálnej anestézie a drenážnych systémov.

Transfúzia



Ponúkame komplexný sortiment výrobkov pre oblasť transfúznej medicíny s užívateľsky priaznivým, efektívnym a bezpečným spôsobom používania. Máme k dispozícii zariadenia na váženie a miešanie krvi, Strippers a zatavovačky krvných segmentov, transportné a skladovacie produkty, inkubátory a agitátory, zariadenia na bezpečný ohrev zmrazenej krvi.

Laboratórna automatizácia



Spoločnosť SARSTEDT rozvíja laboratórne automatizačné systémy s cieľom rozšíriť našu odbornosť ako poskytovateľa systémových riešení a podporiť našich zákazníkov a partnerov pri vývoji procesov v laboratóriu. Naša ponuka zahŕňa modulárne automatizačné riešenia pre inteligentné triedenie, distribúciu, alikvotáciu atď. pre preanalytické a post-analytické procesy v klinických a mikrobiologických oblastiach.



UCELENÉ ŘEŠENÍ PRO LABORATORNÍ KOMPLEMENT

- ▶ Zvýšení efektivity laboratorního provozu
- ▶ Integrace všech laboratorních odborností v jednom systému
- ▶ Kompletní podpora všech laboratorních procesů
- ▶ Splnění požadavků SUKL a ISO 15189
- ▶ Propojení s nejmodernějšími laboratorními technologiemi
- ▶ Řešení pro řetězce laboratoří a detašovaná pracoviště
- ▶ Dokonalé sledování nákladů a nadstandardní statistiky
- ▶ Flexibilní přizpůsobení provozním zvyklostem
- ▶ Automatizace centrálního příjmu včetně skladu žádanek
- ▶ Zajištění požadované dostupnosti systému a snadná správa IS

STAPRO s. r. o. | Pernštýnské nám. 51, 530 02 Pardubice | tel.: +420 467 003 111
fax: +420 467 003 119 | e-mail: stapro@stapro.cz | www.stapro.cz

