



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry
Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 2/2015

Ročník XX.

LABKVALITA 2015

PREDNÁŠKY

ABSTRAKTY

IN EXTENSO ČLÁNKY



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry
Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 2/2015

Ročník XX.

PREDSEDA REDAKČNEJ RADY

Oliver Rác

REDAKČNÁ RADA

Ján Balla
Darína Behúlová
Pavel Blažíček
Marta Dobáková
Michal Farkaš
Vladimír Heriban
Marko Kapalla
Katarína Lepejová
Angela Molčányová
Ingrid Schusterová
Július Špaňár
Ladislav Turecký

Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pre SLS

Povolené Ministerstvom Kultúry SR pod reg. č. 1531/96

ISSN 1335-2644

O B S A H

ABSTRAKTY A PREDNÁŠKY LABKVALITA 2015

WANG, W.: N-GLYCAN PROFILING AS A RISK STRATIFICATION BIOMARKER FOR METABOLIC SYNDROME.....	7
WOLFE, O. J.: ASSESSING THE QUALITY OF THE RESULT INTERPRETATION AND THE QUALITY OF THE POSTANALYTICAL PHASE IN THE US LABORATORIES.....	8
ROBERTI DI SARSINA, P., TASSINARI, M.: PATIENT EMPOWERMENT AND EXPERT MEDICAL EDUCATION IN CAM — NEW PERSPECTIVE FROM PERSON-CENTERED HEALTHCARE PARADIGM	9
GOLUBNITSCHAJA, O., COSTIGLIOLA, V., KAPALLA, M.: POTENTIAL FOR COOPERATION BETWEEN EPMA AND SSKB IN PRACTICAL APPLICATION OF SHARED VISIONS OF PPPM IN HEALTH- ORIENTED HEALTHCARE	11
RÁCZ, O., NIŠTIAR, F., MACEKOVÁ, D.: HYPERSUPERGENOMIKA ALEBO SPLASNUTÁ BUBLINA ? KRITICKÁ ANALÝZA POKROKU V GENOMIKE Z HĽADISKA KAŽDODENNEJ LEKÁRSKEJ ČINNOSTI A ETIKY	12
KAPALLA, M., KUBÁŇ, J.: MOLEKULOVEJ BIOLÓGIE ETICKÉ A FILOZOFICKÉ DILEMY A PARADOXY V STAROSTLIVOSTI O ZDRAVIE	18
ALBERTYOVÁ, D.: ETICKO-EKONOMICKO-ODBORNÉ DILEMY Z POHLADU BIOCHEMICKÉHO LEKÁRA V KLINICKEJ PRAXI	20
LEPEJ, J., LEPEJOVÁ, K.: JE EKONOMICKÉ SPRÁVAŤ SA ETICKY V LABORATÓRIU A SYSTÉME ZDRAVOTNEJ STAROSTLIVOSTI?.....	21
HUMENÍK, I.: AKTUÁLNE VÝZVY (A NEDOKONALOSTI) DAŇOVEJ ÚPRAVY V KONTEXTE SÚSTAVNÉHO VZDELÁVANIA ZDRAVOTNÍCKYCH PRACOVNÍKOV (VYBRANÉ UPOZORNENIA NA ZMENY DAŇOVÝCH PREDPISOV PO 1. 1. 2015).....	22
PATOČKA, J.: VŠUDYPŘÍTOMNÉ ENDOKRINNÍ DISRUPTORY	23
HUBKOVÁ, B., LAZÚROVÁ, I., MAREKOVÁ, M., LAZÚROVÁ, Z.: BISFENOL A A JEHO STANOVENIE V MOČI METÓDOU HPLC	24
HORNA, A., HORNOVÁ, M., STEJSKALOVÁ, A.: NOVÉ APLIKAČNÉ MOŽNOSTI CHROMATOGRAFIE, HMOTNOSTNÉ SPEKTROMETRIE A ELEKTROCHEMIE V PREDIKTIVNÉ TOXIKOLOGII	26
KUBÁŇ, J., KAPALLA, M.: RETROSPEKTÍVNA ANALÝZA LIEKOV POŠKODZUJÚCICH ZDRAVIE	27
NOVÁKOVÁ, J., LUKAČINOVÁ, A., LOVÁSOVÁ, E., CIMBOLÁKOVÁ, I., NIŠTIAR, F.: METABOLICKÉ NÁSLEDKY CELOŽIVOTNEJ EXPOZÍCIE MALÝMI DÁVKAMI ŤAŽKÝCH KOVŮ U POTKANOV.....	29
MURÍNOVÁ, E., TRNOVEC, T.: ENVIRONMENTÁLNA EXPOZÍCIA POLYCHLÓROVANÝM BIFENYLOM A VYBRANÉ ZDRAVOTNÉ PARAMETRE OBYVATEĽOV VÝCHODNÉHO SLOVENSKA – VÝSLEDKY A PERSPEKTÍVY 15-ROČNÉHO VÝSKUMU.....	30
WAHLSTEDT, J.: ENSURING AND MEASURING THE QUALITY OF PRE AND POST ANALYTICAL PHASES IN CLINICAL LABORATORIES AND POCT IN FINLAND.....	31
PIVOVARNÍKOVÁ, H.: VPLYV KVALITY PREDANALYTIKY NA POSTANALYTICKÚ INTERPRETÁCIU LABORATÓRNYCH VYŠETRENÍ	32
HELMOVÁ, L., BEČKOVÁ, Z.: NEVYHNUTNOSŤ KVALITNEJ INTERPRETÁCIE SEROLOGICKÝCH VÝSLEDKOV PRI DIAGNOSTIKE NEUROINFEKCIÍ.....	34
BALLA, J.: DEFINOVANIE ANALYTICKÝCH VÝKONNOSTNÝCH CIEĽOV V SR 15 ROKOV PO ŠTOKHOLMSKEJ KONFERENCII.....	35

IN EXTENSO ČLÁNKY

BALLA, J.: ČOMU JE POTREBNÉ VENOVAŤ POZORNOSŤ PRI ZAVÁDZANÍ LABORATÓRNEJ DIAGNOSTIKY NA MIESTE POSKYTOVANIA ZDRAVOTNEJ STAROSTLIVOSTI	39
FIALKOVIČOVÁ V., VELIKÁ B., URDZÍK P., OSTRÓ A., MAREKOVÁ, M., RABAJDOVÁ M.: VYUŽITIE FLUORESCENČNEJ SPEKTROMETRIE PRI DIAGNOSTIKE RAKOVINY KRČKA MATERNICE	50
GAŠKO, R., MINÁRIKOVÁ, Z., PAVLOV, P., GAŠPAR, L., SOROKA, P.: KVALITATÍVNE A KVANTITATÍVNE ZMENY LIPIDOVÝCH SUBFRAKCIÍ PRI TYREOPÁTIÁCH MAJÚ VPLYV NA PRESNOSŤ STANOVENIA APOLIPOPROTEÍNU B VÝPOČTOM PODĽA HWANGA.....	57
ŠŤOVÍČKOVÁ, L., LOGEROVÁ, H., TATARKOVIČ, M., KOCOURKOVÁ, L., VAVŘINEC, J., SETNÍČKA, V.: DIAGNOSTIKA DIABETU 1. TYPU S VYUŽITÍM POKROČILÝCH SPEKTROSKOPICKÝCH METOD	67
VALKO-ROKYTOVSKÁ, M., RABAJDOVÁ, M., MAŠLANKOVÁ, J., MAREKOVÁ, M., STUPÁK, M.: VÝVOJ TEÓRIÍ MINERALIZÁCIE TVRDÝCH TKANÍV	75
HUDÁK, A., DUDOVÁ, M., HUDÁKOVÁ, T.: VPLYV HLINÍKA NA ZDRAVIE ĽUDÍ A MOŽNOSTI JEHO STANOVENIA V BIOLOGICKOM MATERIÁLI	79
FETERIK, Š., RABAJDOVÁ, M., GULAŠOVÁ, Z., VELIKÁ, B., VESELÁ, J.: ZÁPALOVÉ CYTOKÍNY A ISCHEMICKO-REPERFÚZNE POŠKODENIE TENKÉHO ČREVA	88

ABSTRAKTY A PREDNÁŠKY
LABKVALITA 2015

N-GLYCAN PROFILING AS A RISK STRATIFICATION BIOMARKER FOR METABOLIC SYNDROME

WANG, W.^{1, 2, 3}

¹School of Medical Science, Edith Cowan University
Perth, Australia

²Municipal Key Laboratory of Clinical Epidemiology
Capital Medical University, Beijing, China

³Global Health Epidemiology Reference Group
(GHERG)

E-mail: wei.wang[at]ecu.edu.au

ABSTRACT

Background

N-glycans play an essential role in most biological processes and are associated with age, gender, and body mass parameters. They may act as suitable biomarkers of aberrant biological mechanisms that contribute to a suboptimal health status (SHS), a subclinical stage of pre-chronic disease. SHS provides a window of opportunity for early detection and intervention of chronic diseases such as metabolic syndrome (MetS).

Objectives

Screen N-glycan profiling as a risk stratification biomarker for SHS and MetS.

METHODS

A population-based study to validity of SHS-specific N-glycan in plasma as indicators of SHS and MetS progression over 5 years in the established Australian cohort of the Busselton Healthy Ageing Study (BHAS) by comparison with findings from the Chinese SHS cohort, previously established for a similar purpose. The high-throughput method to be used for N-glycan profiling is ultra-performance liquid chromatography (UPLC). In brief, N-glycans are released by digestion with peptide N-glycosidase F (ProZyme, USA), followed by fluorescent labelling with 2-aminobenzamide (LudgerTag 2-AB label-

ling kit, UK) in a 96-well microplate containing 5µl plasma per well. Free label and reducing agent are removed using hydrophilic liquid chromatography-solid phase extraction (HILIC-SPE) on GHPfilter plates (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA), and solvent is removed by application of a vacuum (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Following incubation and washing steps, fluorescently labelled N-glycans can be separated by HILIC-UPLC on a Waters Acquity UPLC instrument (Milford, MA, USA). The system is calibrated using an external standard of hydrolysed and 2-AB labelled glucose oligomers from which the retention times for the individual glycans are converted to glucose units. Data processing is performed using an automatic processing method with a traditional integration algorithm after which each chromatogram is manually corrected to maintain the same intervals of integration for all the samples. The chromatograms are separated into individual glycan peaks with the glycan amount per peak being expressed as a percentage of total integrated area.

RESULTS

The most prominent observation of the study was the consistent, positive correlations between different forms of triantennary glycans and negative correlations between glycans containing core-fucose with MetS components including body mass index (BMI), systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), and fasting plasma glucose (FPG). N-glycan profiles can be applied as real-time indicators of SHS and MetS progression.

REFERENCES

1. Yan, Y.X., et al. (2015): Association of suboptimal health status with psychosocial stress, plasma cortisol and mRNA expression of glucocorticoid receptor in lymphocyte. *Stress*, 2015. doi: 10.3109/10253890.2014.999233.
2. Wang, W., et al.: On behalf of Global Health Epidemiology Reference Group(GHERG) (2014). Traditional Chinese medicine and new concepts of predictive, preventive and personalized medicine in diagnosis and treatment of suboptimal health. *The EPMA Journal*, 2014, 5: 4 doi: 10.1186/1878-5085-5-4.

3. Yan, Y.X., et al. (2012): Association of suboptimal health status and cardiovascular risk factors in urban Chinese workers. *Journal of Urban Health*, 2011, 89(2): 329—338.

4. Lu, J.P., et al. (2011): Screening novel biomarkers for metabolic syndrome by profiling human plasma N-glycans in Chinese Han and Croatian populations. *Journal of Proteome Research*, 10 11 4959—4969.

5. Yan, Y.X., et al. (2009): Development and evaluation of a questionnaire for measuring suboptimal health status in urban Chinese. *Journal of Epidemiology*, doi:10.2188/jea.JE20080086.

ASSESSING THE QUALITY OF THE RESULT INTERPRETATION AND THE QUALITY OF THE POSTANALYTICAL PHASE IN THE US LABORATORIES

WOLFE, O. J.

Clinical Consultants, Inc., Glen Rock, NJ 07452, USA
Board Member, New Jersey AACC, New Jersey, USA

E-mail: clincon1[at]optonline.net

ABSTRACT

Each day clinical laboratory scientists face the daunting task of providing thousands of accurate and timely laboratory test results to enable clinical decisions for patient care. The impact of accurate test results from the laboratory has far-reaching effects beyond the assurance that the correct quality control procedures were implemented.

These test results help determine potential diagnoses and thus the right course of action for patient treatment, alert physicians to potentially critical health issues which may be addressed more quickly, as well as assuring physicians as to whether or not present therapy for a particular patient is having the desired effect.

However, despite the fact that quality control measures as mandated by regulatory guidelines: Clinical Laboratory Improvement Amendment (CLIA), College of American Pathologists (CAP), the Food and Drug Administration (FDA) are implemented to ensure analytic validity of the tests and also validation of patient results to catch pre- and post-analytical errors that may occur before releasing them into the patient records, there is still “room for error”.

The “room for error” is affected by the fact that validation of all these data is carried out manually and painstakingly by the Laboratory Scientists who must apply hundreds of rules to identify these potential errors... a daunting task! Prior to implementation of the tests, the scientists have also run validation procedures on test methods and protocols and have consulted with clinicians to ensure acceptability of the data. Again, a huge undertaking particularly when new procedures are being implemented. Of course, the same holds true when new instrumentation is introduced into the laboratory.

The above is not “new” but is part of the accepted quality control procedures in any laboratory.

Fortunately, auto-validation has now become the “state of the art” tool to greatly facilitate test result acceptance and interpretation. No longer do laboratory scientists need to manually review test data. Auto-validation releases test results into the patient records without need for manual review. Algorithms have been built into the software taking into account the same QC rules as have been used for manual review.

“Middleware technology” takes over the auto-verification process in conjunction with the Laboratory Information System (LIS) combining the analyzer features and functions tailored to the specifications of the manufacturer. Middleware has the advantage of sending rerun and reflex instructions back to the analyzers providing real-time data management. It eliminates the step of transmitting data to the LIS for processing decisions thus allowing for faster reporting.

In one institution, thousands of patient samples and millions of patient test results were run through these systems and reviewed to ensure accuracy and also to familiarize the Staff with the rules and procedures.

PATIENT EMPOWERMENT AND EXPERT MEDICAL EDUCATION IN CAM — NEW PERSPECTIVE FROM PERSON-CENTERED HEALTHCARE PARADIGM

TASSINARI, M.¹

ROBERTI DI SARSINA, P.^{1,2}

¹Charity Association for Person
Centred Medicine — Moral Entity, Bologna, Italy

²Observatory and Methods for Health
Department of Sociology and Social Research
University of Milano-Bicocca, Milano, Italy

E-mail: mariateresa.tassinari[at]medicinacentratasullapersona.org

ABSTRACT

In literature, just as in common debate, the Person-centred Healthcare and Medicine paradigm tends to be evacuated considering its clinical outcome and its implementation [1]. These aspects cover, without doubt, a fundamental and inescapable part of the paradigm in question even though it is necessary to not overlook the patient's centrality in the methodology [2]. Indeed, other than the unanimously recognised standard biases, there are others which, although not formally validated, are, in any case, important and capable of ruining the results obtained in a clinical trial, such as the expert medical education and awareness, therefore the patient's empowerment.

Even if these aspects are generally already decreed and well outlined by what concerns modern biomedicine, we cannot say the same thing regarding Complementary and Alternative Medicine (CAM).

There are, in fact, still many aspects that require regulating, not only regarding an epistemological correctness but, most of all, the patients' safety. It is well known that in CAM, the doctor occupies a fundamentally important central role. This regards not only the attention that s/he dedicates to the patient and the care with which s/he examines him/her but also the competence with which s/he administers the therapy [3].

Concerning the expert medical education, unfortunately there is not an international legislation capable of

severely imposing standards and directives to which the individual States have to obligatorily adhere [4, 5]. In fact, as we can read in the official documents produced by the World Health Organization (WHO), “in order to support countries in establishing systems for the qualification, accreditation or licensing of practitioners of traditional medicine, facilitate better communication between providers of conventional and traditional care, as well as other health professionals, medical students and relevant researchers, through appropriate training programmes and to support integration of traditional medicine into the national health system” [6], benchmarks for training in Ayurveda, Naturopathy, Nuad Thai, Osteopathy, Traditional Chinese Medicine, Tuina and Unani Medicine have been declared.

This legislative void permits unqualified personnel to practice a profession, exposing patients’ safety to serious risk: it’s not a coincidence that in the WHO Traditional Medicine Strategy 2014—2023, the promotion of a safe and effective implementation of Traditional and Complementary and Alternative Medicine is stressed and should necessarily be subject to the regulation of professional competence. Such a regulation is essential for dismantling the old stereotype suggesting that any natural treatment is safe and free of adverse effects or interactions in the patients [7]. Considering these premises, and continuing the reference to Person-Centred Healthcare and Medicine paradigm, the aim of our research with regards to the medical expert, is to highlight the current legislative situation, identify the omissions and study future strategies; from the patients’ perspective, this means understanding their attitude regarding CAM and the methods to which they can contribute, in a context of therapeutic choice and compliance, and to their empowerment.

REFERENCES

1. Roberti di Sarsina, P., Tassinari, M.: Person-centred Healthcare and Medicine Paradigm: it’s time to clarify. *EPMA Journal*, 2015, 6: 11.
2. Lewith George, T., Jonas Wayne, B., Walach, H.: *Clinical research in complementary therapies*. 2 nd edition, Churchill Livingstone Elsevier, 2011. ISBN: 9780443069567.
3. Benedetti, F.: How the doctor’s words affect the patient’s brain. *Eval Health Professm* 2002; 25:369—386.

4. *La formazione nelle medicine tradizionali e non convenzionali in Italia: attualità, esigenze, criticità e prospettive*, a cura di Gensini, G. F., Roberti di Sarsina, P., Tognetti Bordognam M., Milano, Franco Angeli, 2015. ISBN 9788891705945.

5. Wiesener, S., Falkenberg, T., Hegyi, G., Hök, J., Roberti di Sarsina, P., Fønnebo, V.: Legal status and regulation of complementary and alternative medicine in Europe. *Forsch Komplementarmed*, 2012, 19: 29—36.

6. World Health Organization. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. Geneva, Switzerland: World Health Organization; December 2013.

7. Bishop, F. L., Lewith, G. T.: Who uses CAM? A narrative review of demographic characteristics and health factors associated with CAM use. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2010; 7(1): 11—28.

POTENTIAL FOR COOPERATION BETWEEN EPMA AND SSKB IN PRACTICAL APPLICATION OF SHARED VISIONS OF PPPM IN HEALTH- ORIENTED HEALTHCARE

GOLUBNITSCHAJA, O.
COSTIGLIOLA, V., KAPALLA, M.

European Association for Predictive, Preventive and
Personalised Medicine (EPMA), Brussels, Belgium

E-mail: Olga.Golubnitschaja[at]ukb.uni-bonn.de

ABSTRACT

European Association for Predictive, Preventive and Personalized Medicine (EPMA) was found in November 2008 and quickly evolved into progressive, internationally recognized [1, 2] medical professional organization, having its national representatives in 45 countries around the world [3]. EPMA regularly organizes international congresses and meetings, publishes its scientific journal The EPMA Journal (BMC, Springer) which is indexed in recognized scientific databases such as PubMed, Embase, Scopus, publishes book series dedicated to all aspects of PPPM, and exerts great effort to realize its visions in what it is defined as health-oriented healthcare. As the visions of EPMA [4, 5, 6] are undoubtedly far-reaching and have the potential to substantially change the medicine of the 21st century, EPMA is very well aware of the fact that such magnitude of change cannot be achieved by a single professional organization, regardless the visions, the network of experts, publication activities, promotional or education activities.

Therefore, since the very beginning, EPMA started successful cooperation with European Medical Association (EMA), a leading expert organization of medical doctors in Europe and is gradually building contacts with other professional organizations who share EPMA visions and philosophy of PPPM. Among the organizations which has signed Memorandum of Understanding are: European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM), European Society of Predictive Medicine (EUSPM), European Society of Radiology

(ESR), European, Middle-Eastern and African Society for Biopreservation and Biobanking (ESBB), Hungarian Society of Personalized Medicine (HSPM), Italian Society of Pharmacology (SIF), Charity Association for Person Centered Medicine (CHFPCM) [3, 5].

In respect to what is said above, EPMA welcomes and appreciates all professional activities of Slovak Society of Clinical Biochemistry (SSKB) which support development of predictive, preventive and personalized medicine in the Slovak Republic as well as on the global scale via membership of SSKB in the international organizations such as EFLM, and finds cooperation between both organizations mutually beneficial. The potential themes for cooperation may encompass the following:

- Publication activities
- Education activities
- Common meetings
- Web-based promotion activities
- Cooperation in grant schemes
- Cooperation in fund raising
- Research cooperation
- Political activities related to healthcare

EPMA finds it essential that all relevant expert organizations contribute with their expertise and their complementary visions and ideas to PPPM and help create new, perspective and inevitable health-oriented healthcare system which is the only long-term alternative to the current, economically unsustainable, disease-oriented healthcare [6].

REFERENCES

1. Andrews RJ: Global Knowledge, Local Medical Implementation: Predictive, Preventive and Personalised Medicine. In "Too Big to Succeed. Profiteering in American Medicine", 2013, iUniverse, ISBN: 978-1-4759-7128-6 (sc); 978-1-4759-7130-9 (e).
2. Hermosilla, I., Kouskoumvekaki, I., Shublaq, N., López Alonso, V. (2013) Prospective analysis on Biomedical Informatics enabling personalised medicine, INBIOMEDvision, Report, Funded by European Commission under (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 270107. dostupné na <http://www.inbiomedvision.eu/PDF/Prospective.pdf>.

3. <http://www.epmanet.eu>.

4. Golubnitschaja O, Costigliola V, and EPMA: General Report & Recommendations in Predictive, Preventive and Personalised Medicine 2012: White Paper of the European Association for Predictive, Preventive and Personalised Medicine. The EPMA Journal 2012, 3:14.

5. Golubnitschaja O, Watson ID, Topic E, Sandberg S, Ferrari M and Costigliola V: Position paper of the EPMA and EFLM: a global vision of the consolidated promotion of an integrative medical approach to advance health care., EPMA Journal 2013, 4:12, doi:10.1186/1878-5085-4-12.

6. Kapalla, M., Kubán J., Costigliola, V., Golubnitschaja O.: Vision of the first EPMA center for predictive, preventive and personalized medicine in Europe, EPMA Journal, 5 (Suppl 1): A153, 2014, doi:10.1186/1878-5085-5-S1-A153.

HYPERSUPERGENOMIKA ALEBO SPEAS- NUTÁ BUBLINA? KRITICKÁ ANALÝZA POKROKU V GENOMIKE Z HĽADISKA KAŽDODENNEJ LEKÁRSKEJ ČINNOSTI A ETIKY

**RÁCZ, O., NIŠTIAR, F.
MACEKOVÁ, D.**

Ústav patologickej fyziológie UPJŠ LF a Medipark
UPJŠ Košice, Trieda SNP 1, 04001 Košice

E-mail: [oliver.racz\[at\]upjs.sk](mailto:oliver.racz[at]upjs.sk)

KRÁTKA HISTÓRIA KLASICKEJ GENETIKY

Prehistorické obdobie genetiky trvalo viac tisícročí. Poľnohospodári krížením rastlín vypestovali úrodnejšie a odolnejšie druhy ako tie, ktoré rástli v prírode a podobne boli vyšľachtené domáce zvieratá. Základy modernej genetiky objavil opäť brnenského augustiánskeho opátstva, Johann Gregor Mendel v XIX. storočí. Napriek tomu, že svoje výsledky publikoval v uznávanom vedeckom časopise [1], význam jeho objavov si súčasníci nevšimli alebo nepochopili. Ani vtedajšiu medicínu nezaujímalá náuka o dedičnosti chorôb – ľudia zomierali v mladom veku, najčastejšie v dôsledku infekčných chorôb.

Trvalo ďalších sto rokov, kým sa zistilo, že nositeľmi kódu sú nukleové kyseliny. Definitívnu odpoveď materiálnej podstaty dedičnosti poskytol prelomový objav Watsona a Cricka [2], ktorí určili štruktúru kyseliny deoxyribonukleovej (DNA). Dokázali, že ide o dvojité závitnice (double helix), v ktorej nukleotidy podľa jednoduchého pravidla vytvárajú dvojice (A-T, C-G), a dve vlákna závitnice sú komplementárne (jedno vlákno je zrkadlovým obrazom druhého vlákna). V priebehu relatívne krátkeho času sa zistilo, že nukleotidy kódujú jednotlivé aminokyseliny v trojici, vo forme tripletov. Zdalo sa, že na základe štruktúry DNA, pravidiel prepisovania génov na kyselinu ribonukleovú (RNA) a syntézy kódovaných bielkovín na ribozómoch sú vysvetliteľné všetky javy biológie a fyziológie, a bude potrebné objasniť len niekoľko drobných detailov. Genetici a molekuloví biológovia súhrn týchto poznatkov s miernou sebaíroniou nazvali „centrálnou dogmou“ molekulovej biológie (Tab. 1).

**TABUĽKA 1. „CENTRÁLNA DOGMA“
MOLEKULOVEJ BIOLÓGIE**

REPLIKÁCIA. Dva reťazce molekuly DNA sú komplementárne. Na začiatku delenia bunky sa obe vlákna oddeľia a po pridaní zodpovedajúcich nukleotidov vznikajú dvakrát dva reťazce, zhodné s pôvodnou DNA. To je základom každého delenia buniek a reprodukcie.
TRANSKRIPCIA. Jedno vlákno molekuly DNA obsahuje kód primárnej štruktúry bielkovín (poradie aminokyselín). Každú jednu aminokyselinu kóduje trojica nukleotidov (triplet). DNA samozrejme obsahuje aj kódy označujúce začiatok a koniec génu a aj regulačné úseky potrebné pre zapnutie a vypnutie transkripcie. Ak bunka potrebuje syntézu určitej bielkoviny, zodpovedajúce enzýmy prepíšu gén do molekuly poslíčkovej RNA (messenger, mRNA). Princípom prepisu je opäť komplementarita s tým rozdielom, že namiesto nukleotidu T (tymín) sa do molekuly RNA dostane U (uracil), čiže párovanie je A-U a C-G.
TRANSLÁCIA. Poslíčkova RNA syntetizovaná a upravená v jadre bunky sa dostáva do cytoplazmy, viaže sa na ribozómy, a začína sa syntéza kódovanej bielkoviny na základe kódu. Jednotlivé aminokyseliny sú transportované k ribozómu molekulami transferových RNA (pre každú aminokyselinu je jedna tRNA). Ribozómy sú zložené z veľkého počtu špecifických molekúl RNA (ribozómové RNA, rRNA) a bielkovín.

Ďalšie obdobie genetiky bolo charakterizované identifikáciou génov riadiacich funkciu komplexných organizmov a objasnením zložitosti genetickej informácie. Boli objavené a objasnené mnohé monogénové ochorenia (kosáčiková anémia, hemofília, cystická fibróza a mnohé dedičné metabolické poruchy). Genetika najčastejších ochorení (hypertenzia, koronárna choroba srdca, diabetes, Alzheimerova choroba a mnohé iné) ostávala záhadou.

OD GENETIKY KU GENOMIKE

Dnes už nehovoríme len o genetike (náuke o dedičnosti), ale o genomike. Termín genomika sa vzťahuje na to, že gény sú v pozadí všetkých fyziologických javov a skoro všetkých patologických procesov. Popri genomike vznikli aj pridružené vedné odbory ako transkriptomika

(súhrn prepisovaných génov), proteomika (súhrn syntetizovaných bielkovín) a iné.

Tento rýchly vývoj bol docielený v značnej miere využitím nových technológií a to je pravda aj naopak – napredovanie vedy pôsobilo motivačne na vypracovanie a využívanie nových metód v širokom merítke. Významným činiteľom pokroku genomiky a molekulovej biológie bolo široké využitie informačných systémov. Bez nich by bolo nemožné spracovanie obrovského množstva získaných údajov.

Jedným z logických dopadov vývoja bol obrovský projekt, ktorý začali plánovať v 80-tých rokoch v USA. Podstata bola jednoduchá – prečítať poradie všetkých nukleotidov v ľudskom genóme (3×10^9 písmen). Projekt ľudského genómu (Human Genome Project), charakterizovaný ako prechod od „Malej Vedy“ k „Veľkej Vede“ sa začal v roku 1990 za účasti viacerých výskumných ústavov a práce boli naplánované na 15 rokov. Dotácie v plánovanej výške 3 miliárd dolárov boli zabezpečené cez Department of Energy and National Institute of Health a prvým vedúcim projektu bol Watson.

Začatie práce charakterizoval Daniel Koshland v časopise Science takto [3]:

„The benefits to science of the genome project are clear. Illnesses such as manic depression, Alzheimer's, schizophrenia, and heart disease are probably all mutagenic and even more difficult to unravel than cystic fibrosis. Yet these diseases are at the root of many current societal problems. The costs of mental illness, the difficult civil liberties problems they cause, the pain to the individual, all cry out for an early solution that involves prevention, not caretaking...“

V prvých rokoch bol rozvoj pomalý a výsledky boli skromné. Neskôr, vďaka finančnej podpore, lepším technológiám a výkonným informatickým systémom sa tempo zrýchľovalo. Najväčšia stimulácia však prišla z podnikateľskej sféry, ktorá si začala uvedomovať možné využitie výsledkov v diagnostickom a farmakologickom priemysle a začala investovať do výskumu. Príkladom bol Craig Venter a ľudia okolo neho, ktorí odišli z National Health Institute a založili vlastné firmy (TIGR a Celera). Pracovali oveľa rýchlejšie ako byrokraciou preťažené akademické ústavy, používali najmodernejšie prístroje a najlepšie softvér. Konkurencia viedla k zrýchleniu výskumu aj v akademickej sfére a výsledkom bolo, že päť rokov plánovaným termínom 26. júna 2000 Collins (vedúci projektu po Watsonovi) a Venter za účasti B. Clintona a T. Blaira

cez telemosť slávnostne ohlásili, že sa podarilo zmapovať ľudský genóm.

Nebola to celkom pravda, bol to len prvý náčrt genómu a práce pokračovali do roku 2003. Nepriateľstvo medzi Collinsovou skupinou a Venterom však pokračovalo aj po slávnostnej spoločnej tlačovej besede. Výsledky boli publikované separátne v časopise *Science* a *Nature* [4, 5].

Projekt ľudského genómu a následné výskumy nepochybnili mendelovské zákony a „centrálne dogmu“ molekuly biológie, ale poukázali na fakt, že genóm živých organizmov je omnoho zložitejší, ako sa to predpokladalo pred začatím projektu:

1. Podľa názoru genetikov pred začatím projektu mal ľudský genóm obsahovať asi 100 000 génov, ale tento počet po ukončení projektu klesol na 25 000–30 000. Je záhadné, ako je možné pomocou tak malého počtu génov vybudovať a zabezpečiť chod tak komplikovaného organizmu, ako je človek. Odpoveď na to dala informatika: gény totiž nefungujú samostatne a nezávisle na sebe, ale ako obrovská informačná sieť, v ktorom je počet možných kombinácií takmer nekonečný. Zjednodušene, ak každý gén má dva stavy (zapnutý alebo vypnutý), tak počet všetkých možných kombinácií je 230 000.

2. Gény kódujúce bielkoviny predstavujú len 2–3 percentá celkovej sekvencie. Ostatná časť nie je „nekódujúca“, ako sa to občas nesprávne udáva. Ku genóm kódujúcim bielkoviny je potrebné pripočítať regulačné štruktúry, ktoré na základe príslušných signálov zapínajú alebo vypínajú gény a mnohé iné štruktúry (napr. teloméry na konci chromozómov). Napriek tomu, že ešte stále sú v prevahe úseky genómu priamo nekódujúce známe bielkoviny, stále viac údajov svedčí o tom, že mnohé z nich majú významnú biologickú funkciu.

3. Zložitosť genómu dala odpoveď aj na to, ako je možné z veľmi podobných génov vytvoriť úplne odlišné živé systémy. Na druhej strane zložitosť interakcií v genóme a medzi genómom a prostredím výrazne sťažili hodnotenie a správnu interpretáciu získaných výsledkov. Dobrým príkladom je analógia s tranzistormi v rádiu [6]. Ak z rádia vyberieme jeden tranzistor, prestáva hrať a začne písať. Z toho ale nevyplýva, že hlavnou úlohou tranzistoru je antipískanie! Podobne, z dôsledkov vypadnutia alebo mutácie jedného génu (okrem monogénových chorôb) sa nedá odvodiť pôvodná funkcia pôvodne bezchybného génu.

4. Gény samy osebe nie sú schopné žiadnej funkcie. To, že k replikácii, transkripcii a translácii sú potrebné

enzýmy a regulačné komponenty, bolo známe už v rokoch po objavení dvojitej závitnice DNA, ale ich zložitosť objavovali len v posledných rokoch. K replikácii sú potrebné tri rôzne enzýmové komplexy a každý z nich pozostáva z viac ako 30 podjednotiek. K správnej funkcii potrebujú veľké množstvo ďalších činiteľov, ktoré zabezpečujú zahájenie, bezchybný priebeh (vrátane kontroly a opravy chýb) a ukončenie replikácie. Podobne zložitý je aj prepis génu na molekulu RNA. Prvým krokom je rozhodnutie o tom, či je vôbec potrebné „zapnutie“ (expresia) daného génu, alebo nie je. Ak áno, gén sa prepíše na molekulu mRNA. Tento proces je nasledovaný úpravou mRNA (editing alebo splicing), ktorý okrem vystrihnutia nekódujúcich intrónov môže zmeniť štruktúru mRNA. Z jedného génu je takto možné vyrobiť viaceré mRNA (alternative splicing), čo ďalej zvyšuje počet možných kombinácií. Okrem toho, ešte pred prekladom kódu takto upravenej mRNA, sa uskutoční ešte jeden kontrolný proces, o ktorý sa starajú malé molekuly RNA (siRNA, small interfering RNA) [7]. Len potom sa napojí mRNA na ribozómy a začne sa syntéza bielkovín. To znamená, že k tomu, aby bunka vyrobila jednu bielkovinu, potrebuje niekoľko stoviek iných bielkovín a mnohé odlišné molekuly RNA, a každá z nich je kódovaná v genóme.

5. Waddington [8] už v 50-tych rokoch predpokladal, že nemôže existovať toľko génov, ktoré by mohli vysvetliť napríklad fungovanie nervového systému. Aj neskôr vzniklo veľa pozorovaní, ktoré sa nedali vysvetliť mutáciami alebo variáciami génov. Pre nadšenie vyplývajúce z objavu dvojitej závitnice, výsledky molekuly biológie a modernej genetiky sme zabudli, že históny (bielkoviny nachádzajúce sa v chromozómoch) nie sú len pasívne podporné molekuly dvojitej závitnice DNA. Okrem zmien histónov a ich úlohy pri expresii génov aj metylácia nukleotidov patrí k pochodom, ktoré dnes považujeme za epigenetické. Kým metylácie nukleotidov blokujú gény, acetylové skupiny pripojené k histónom ich aktivujú. Epigenetické pochody nemenia genetický kód, ale významne ovplyvňujú expresiu jednotlivých génov. Tieto procesy sú základom diferenciácie buniek vznikajúcich z oplodneného vajíčka a počiatočných multipotentných embryonálnych buniek na jednotlivé tkanivá. To, že tieto epigenetické procesy zaisťujú počas vývinu jedinca dôležitú úlohu je zjavné, ale nedávno sa ukázalo, že existujú také epigenetické znaky, ktoré prejdú do nasledujúcej a dokonca aj do ďalších generácií. Paradox epigenetiky spočíva v tom, že ku každému kroku (metylácia, demetylácia, acetylácia, odstránenie

znakov, účinkov molekúl siRNA atď.) sú potrebné enzýmy, ktorých kódy sa nachádzajú v genóme a naviac aj regulačné komponenty riadiace epigenetické pochody sú kódované v genóme. To znamená, že aj epigenetika je genetika, len nie taká jednoduchá, ako sa to myslelo po objave dvojitej závitnice a prečítaní poradí nukleotidov v ľudskom genóme. Najnovšie výsledky epigenetickej mapy rôznych ľudských tkanív boli publikované nedávno [9, 10].

6. Nie sme sami. To, že v našom tráviacom trakte sa nachádzajú baktérie (napr. laktobacily) už sa vie dávno a bolo zjavné, že zmeny črevnej mikrobioty ovplyvňujú zdravie. V skutočnosti týchto mikroorganizmov je omnoho viac, než sa predtým predpokladalo. Tieto sa nedali preukázať metódami klasickej mikrobiológie, a o ich prítomnosti v našom organizme svedčia ich gény, ktoré sa modernými metódami dajú dokázať. Dnes je už zrejmé aj to, že mikrobióm a jeho zmeny vo významnej miere ovplyvňujú pravdepodobnosť vzniku rôznych chronických chorôb [11].

JE MOŽNÉ VÝSLEDKY GENOMIKY A MOLEKULOVEJ MEDICÍNY VYUŽIŤ V KAŽDODENNEJ PRAXI?

Genetické vyšetrenia, ktoré v minulosti boli využívané skoro výlučne v oblasti vedeckého výskumu, sú stále lacnejšie, dajú sa robiť na automatických analyzátoroch a rýchlo sa dostávajú do bežnej diagnostickej praxe. Tento pochod sa začal už pred ukončením „Projektu ľudského genómu“. V prvom období boli vyvinuté metódy na dôkaz prítomnosti chybných génov napríklad u zdravých nosičov (heterozygotov) chybného génu cystickej fibrózy alebo gény, ktoré majú za následok vysoké riziko vzniku rakoviny prsníka (BRCA1 a BRCA2). Vyhodnotenie a interpretácia výsledkov boli jednoduché. Chybný gén u rodičov znamenal možnosť jeho prenosu do ďalšej generácie (pri cystickej fibróze a dedičných poruchách výmeny látok) alebo zvýšené riziko vzniku malígneho nádoru u daného jedinca. Ďalší dôležitý krok sa týkal farmakogenetiky. Postupne boli identifikované gény (a ich variácie – polymorfizmy) ktoré určovali odpoveď organizmu na danú liečbu. Vývoj novej diagnostickej metódy na daný gén alebo jeho polymorfizmus je v dnešnej dobe biotechnológia otázkou niekoľkých mesiacov.

Od ukončenia „Projektu ľudského genómu“ sa urýchlilo, zjednodušilo a zlacnelo aj čítanie dlhých sekvencií

DNA (next generation sequencing) a cena prečítania celého genómu jedinca sa blíži k sume 1000 US\$. Dnešná technológia umožňuje sekvenovať genóm rôznych buniek rakovinového tkaniva. Nedávno bol uvedený na trh prvý prenosný sekvenátor [13], ktorý síce pracuje s väčším počtom chýb, ako klasické, ale umožňuje analyzovať genóm v teréne – napríklad rôznych typov vírusu Ebola.

Veľké vedecké a výskumné konzorciá od ukončenia „Projektu ľudského genómu“ chrlia výsledky, ktoré by mali objasniť genetické pozadie bežných, častých ochorení, ktoré sa nededia podľa klasických zákonov genetiky. Interpretácia výsledkov týchto projektov je však veľmi komplikovaná.

Teoretický príklad vychádza z predpokladu, že počas obrovského projektu bolo možné vyšetriť genóm 10 000 ľudí s normálnym a taký istý počet ľudí s vysokým krvným tlakom. Medzi dvoma týmito skupinami bolo nájdených 250 rozdielov v genóme. Čo to znamená pre každodennú lekársku prax? Odpoveď je dosť rozčarujúca.

Vysoký krvný tlak nepatrí medzi choroby, ktoré označujeme ako OGD (one gene – one disease). V minulosti sa tieto choroby označovali ako „polygénové“, lepší názov je „komplexné choroby“. Tým sa označuje to, že tieto choroby vznikajú komplikovanými vzájomnými interakciami vonkajších činiteľov a genetického pozadia. Názov je správny, ale samotné pomenovanie nepomáha pri pochopení vzniku a priebehu danej konkrétnej choroby.

Z komplexnosti choroby vyplýva, že skupina 10 000 ľudí s hypertenziou nie je jednotný súbor. Vysoký krvný tlak nie je jednotné ochorenie, ale prejav rôznych pochodov, z ktorých niektoré sú vonkajšie (vysoký príjem kuchynskej soli, nedostatok niektorých mikronutrientov, atď.), čiastočne vonkajšie a vnútorné (obezita, diabetes) a časté sú aj sekundárne formy hypertenzie, napríklad pri chorobách obličiek alebo nadobličiek.

Hypertenzia sa vyvíja pomaly a v kontrolnej skupine môže byť veľa ľudí, ktorí v čase vyšetrenia majú ešte normálny krvný tlak, ale sú to budúci hypertonici. To znamená, že ani kontrolná skupina nie je homogénna. Mnohí z nich môžu mať o pár rokov hypertenziu.

Etnické, pohlavné, vekové a iné rozdiely v jednej a druhej skupine ešte viac komplikujú obraz.

Rozdiely v génoch nehovoria nič o epigenetických rozdieloch medzi dvoma skupinami.

Problémy uvedené v bodoch 1–4 by sa teoreticky mohli eliminovať starostlivým výberom probandov, ale

ani vtedy nebude jasné, ktoré z 250 rozdielov medzi jednou a druhou skupinou sú v príčinnej súvislosti so zmenou krvného tlaku a ktoré nie. Krvný tlak je fyziologický znak, ktorý má obrovský počet determinantov (práca srdca, pružnosť cievnej steny, regulačné mechanizmy, atď.) Nález rozdielov v 250 génoch nehovorí nič o ich fyziologickej funkcii a ani o tom, ako ich varianty vedú k hypertenzii. Navyše mnohé rozdiely z 250 nebudú priamo v génoch, ale v nekódujúcich častiach genómu.

V druhom kroku výskumu pomocou experimentálneho a základného výskumu sa podarí znížiť počet kandidátnych prírodných génov na 30–40. O jednom z nich sa dokáže, že horší variant zvyšuje krvný tlak v priemere o 8 mmHg a druhý o 6 mmHg. Z toho sa nedá určiť, aký bude účinok u ľudí, ktorí zdedili z obidvoch horší variant (určite nie 8+6), pretože gény predstavujú zložitú informačnú sieť a účinok každého z nich závisí od mnohých iných. Vedecské metódy na hodnotenie spoločného účinku 2–3 génov sú k dispozícii, ale výsledok interakcie 30–40 polymorfných génov sa nedá predpovedať.

SPLASNUTIE GENOMICKEJ BUBLINY, ZROD NOVEJ EUGENIKY?

Bežný človek očakáva od výskumníkov v oblasti biomedicínskeho výskumu (a samozrejme aj od lekárov), že ich činnosť bude zameraná výlučne pre dobro ľudí. Nikto nepochybuje o tom, že výsledky dosiahnuté Pasteurom, Kochom, Roentgenom, Flemingom a ostatnými veľikánmi vedy zachránili milióny ľudských životov a zmiernili utrpenie ďalším miliónom. Veda však nikdy nenapredovala priamočiaro, len pri písaní histórie sa na neúspechy – ktorých bolo oveľa viac, ako úspechov – zabúda. Zabúda sa aj na to, že vedci sú takí istí ľudia ako ostatní a ich motivácie nie sú vždy čisto altruistické. Jasným príkladom bolo zneužitie evolučnej teórie a čiastočne aj genetiky na zrod a šírenie eugenickej rasovej teórie.

Obrovský pokrok genetiky a molekulovej biológie sa líši od výskumu v XIX. a prvej polovici XX. storočia nie len tým, že na výsledkoch sa často podieľajú veľké skupiny vedcov a tým, že tieto metódy sú finančne a metodicky veľmi náročné. Rozdiel je aj v tom, že zneužitie týchto poznatkov, výsledkov a technologických možností sa môže týkať každého z nás. Tvrdú kritiku novej biológie poskytl Hilary a Stephen Rose v knihe „Genes, Cells and Bra-

ins“ [12] s podtitulom „The Promethean Promises of the New Biology“. Ich analýza je zameraná predovšetkým na tieto oblasti:

Prechod od malej genetiky k veľkej genomike. Je pravda, že žiadne laboratórium a žiadny výskumný ústav by nebol schopný za 10–13 rokov sekvenovať celý ľudský genóm, ale práca na projekte ľudského genómu nebola vždy podľa pravidiel „fair play“. Komerčné záujmy sa objavili okamžite po tom, ako bolo jasné, že diagnostický a farmaceutický priemysel môže z výsledkov profitovať. Išlo predovšetkým o otázku, či sa gény dajú patentovať a či výsledky majú byť verejne prístupné alebo nie (a tým blokovať využitie výsledkov pre konkurenciu).

O čo vieme viac o človeku po skončení projektu? Napriek obrovskému nadšeniu z výsledkov projektu ťažko by sme našli lekára prvého kontaktu, ktorý by tieto poznatky vedel využiť v prospech chorých s bežnými ochoreniami. Príčina nie je v tom, že lekári staršej generácie vedeli veľmi málo o genetike (nebolo to pre ich prácu dôležité), ale v tom, že sme nesprávne pochopili význam génov v zdraví a v chorobe. Vychádzali sme z klasickej genetiky monogénových chorôb (mutácia = choroba) a zabudli sme na evolučný aspekt a na to, že DNA bez svojho prostredia je mŕtva, nečinná molekula. Preto vedú do slepej uličky aj cenovo prístupné analýzy celého alebo časti genómu poskytované mnohými firmami. Tieto údaje neposkytujú oveľa viac medicínsky relevantných informácií, ako klasické metódy.

Od štátnej ku konzumnej eugenike. Klasická eugenika bola založená na primitívnom a nevedeckom chápaní evolúcie a dedičnosti. Dnes je samotný výraz eugenika na čiernej listine, ale jeho podstata sa vracia v skrytej podobe. Už aj informácie o nosičstve chybných génov, ktoré môžu znamenať reálne riziko výskytu ťažkej choroby (cystická fibróza, niektoré poruchy metabolizmu) v potomstve alebo pozitívny výsledok prenatalného skríningu prítomnosti chromozómových aberácií (Downova choroba) predstavujú niekedy ťažko riešiteľné problémy pre jednotlivcov. Rozhodnutia o prerušení tehotnosti alebo nemať deti sú ťažké, ale sú tolerované spoločnosťou a legislatívou vo väčšine krajín sveta. Ako je však možné interpretovať informáciu o prítomnosti chybných génov pri ochoreniach s nemendelovskou komplexnou dedičnosťou? V týchto prípadoch (Alzheimerova choroba a iné neurodegeneratívne stavy, nosiči mutácií v génoch chrániacich pred zhubným nádorom) odpovede sú ešte ťažšie.

Konkrétnym príkladom je preventívna amputácia prsníkov u klinicky zdravých nosičov génu BRCA1 (znamená vysoké riziko skorého vzniku rakoviny prsníka). A čo je možné robiť v prípadoch nálezů genetickej predispozície menej závažných, liečiteľných ochoreníach? Je možné pripustiť žiadosť o umelé prerušenie tehotnosti v prípade nálezů génu zvyšujúceho pravdepodobnosť vzniku diabetu alebo astmy? Na tieto a podobné otázky genetika nedáva odpovede a dnešná medicína, spoločnosť a legislatíva nie sú na to pripravené.

Genomická bublina a porušenie ľudských práv.

Z vyššie uvedených príkladů vyplýva, že genetické (a iné „omické“) informácie sú bezcenné, ak nepoznáme ostatné okolnosti určujúce zdravie a chorobu u daného jedinca. Riešenie je na prvý pohľad jednoduché: spojme genetické databázy s údajmi o populácii, ako je vek, pohlavie, výsledky lekárskeho a laboratórneho vyšetrenia do jedného celku, a dôjdeme k vytúženému cieľu využiť genetické informácie v prospech zdravotníctva a zdraviu občanů. Prvý veľký projekt toho typu sa začal na Islande už v roku 1994. Argumenty profesora Stefanssona a jeho kolegov (pôvodne skúmali genetické pozadie mnopočetnej sklerózy) boli to, že populácia Islandu je malá a homogénna a to, že výsledky bude možné využiť v boji proti rakovine a chorobám srdca nie len na Islande, ale na celom svete. V USA založili biotechnologickú firmu DeCode, na Islande genetické laboratórium na sekvenovanie genómu domácej populácie (275 000 ľudí). Druhú časť databázy mali tvoriť údaje z národného zdravotníckeho registra, vedeného s veľkou presnosťou od roku 1915. Stefansson nebol genetik, ale skôr podnikateľ a pre projekt získal obrovské dotácie od farmaceutických firiem a svojou rétorikou („veda je pokrok a nemožno ju zastaviť“) presvedčil aj vládu a parlament tejto malej krajiny o správnosti projektu. Je možné diskutovať o tom, či východiská a ciele projektu boli reálne, alebo nie (skôr nie), ale hlavný problém spočíval v niečom inom. Nikto, vrátane zodpovedných za projekt, a ani ministerstvo zdravotníctva a parlament sa nespýtal občanů Islandu a lekárov poskytujúcich zdravotnícku starostlivosť, či súhlasia s účasťou a poskytovaním svojich údajů pre potreby projektu, z ktorého nebolo možné vystúpiť. Hlasy proti, spočiatku ojedinelé, neskôr stále silnejšie, nakoniec viedli v roku 1998 k bankrotu firmy a celého nezmyselného a neetického projektu. Podobné projekty boli iniciované aj v iných krajinách, ale žiadny z nich nebol dotiahnutý do konca.

Čo vyplýva z pochmúrneho obrazu spľasnutej genomickej bubliny? Kritika nesprávneho smerovania aplikácie výsledků výskumu je opodstatnená a potrebná. Na druhej strane je pravda, že veda a výskum sa naozaj nedajú zastaviť, ale pri ich aplikácii nie je možné zanedbať základné etické a morálne aspekty civilizovaných spoločností.

Je pravda, že lekári prvého kontaktu zatiaľ málo profitujú z modernej genetiky, ale prínos je len otázka času. Onkológia a regeneratívna medicína už dnes jednoznačne čerpajú z týchto poznatkov, ostatné medicínske oblasti musia ešte niekoľko rokov trpezlivo. Pod pokrývkou „pokroku“ nie je možné porušiť základné etické a morálne pravidlá ľudstva. Spájanie genetických a základných medicínskych informácií sa dá robiť aj čestne a transparentne [13].

Momentálny stav charakterizujú autori spomínanej knihy prirovnaním k hangáru, v ktorom sú rozložené všetky časti obrovského dopravného lietadla. Dať dokopy z toho funkčné lietadlo zrejme nie je možné. Tieto lietadlá však premávajú (väčšinou) bez problémů každý deň. Lenže sa ich vývoj nezačal pokusným skladaním častí, ale Ottom Lilienthalom, bratmi Wrightovcami, výskumom aerodynamiky, konštrukciou silných a ľahkých motorů, vývojom počítačových riadiacich systémů. Ak sa moderná genomika a molekulová medicína bude takto vyvíjať, nemáme sa čoho obávať.

LITERATÚRA

1. Mendel, G.: Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verh. Naturforsch. Verein Brünn*, 4, 1866, 3–47.
2. Watson, J. D., Crick, F. H. C.: Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171, 1953, 737–738.
3. Koshland, D.: Sequences and consequences of the human genome. *Science*, 246, 1989, 189.
4. International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of human genome. *Nature* 409, 2001, 860–291.
5. Venter, C. et al.: The sequence of the human genome. *Science* 291 (5507), 2001, 1304–1351.
6. Boldogkői, Z.: Miért vagyunk mindannyian külön-bözőek? *Magyar Tudomány*, 2005, 1255–1241.
7. Elbashir, S. et al.: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411 (6836), 2001: 494–988.

8. Goldberg, A.D., Allis, C.D., Bernstein, E. (2007): Epigenetics: A landscape takes shape. *Cell*, 128, 635–638.

9. Roadmap epigenomics consortium: Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*, 518, 2015, 317–330.

10. Dixon, J. R. et al.: Chromatin architecture reorganization during stem cell differentiation. *Nature*, 518, 2015, 331–336.

11. Hayden, E. C.: Pint-sized DNA sequencer impresses first users. *Nature*, 521, 2015, 15–16.

12. Rose, H., Rose, S.: *Genes, Cells and Brains*. Verso UK & USA, 2013, ISBN 13 978-1-78168-314-9.

13. Ginsburg, G.: Gather and use genetic data in health care. *Nature*, 508, 2014, 451–453.

14. Rose, H., Rose, S.: *Genes, Cells and Brains*. Verso UK & USA, 2013.

ETICKÉ A FILOZOFICKÉ DILEMY A PARADOXY V STAROSTLIVOSTI O ZDRAVIE

KAPALLA, M.

KUBÁŇ, J.

Negentropic Systems, s.r.o.
Murgašova 12, Ružomberok

E-mail: marko.kapalla[at]gmail.com

ABSTRAKT

Z pohľadu etiky a filozofie je inštitucionalizovaná starostlivosť o zdravie veľmi dobrým zdrojom dilem, ktoré sú podľa všeobecnej definície chápané ako situácie, kedy je potrebné sa rozhodovať medzi dvoma, resp. viacerými, obvyčajne nie celkom príjemnými, alternatívami a tiež zdrojom paradoxov, ktoré sú chápané ako protirečivé, takmer protizmyselné tvrdenia, resp. situácie, ktoré zjavne odporujú zdravému rozumu, no napriek tomu sú reálne [1, 2, 3, 4]. Práve tieto dilemy a paradoxy poukazujú na problémy, ktorými sa musíme vo vlastnom záujme zaoberať aj ako odborná spoločnosť aj ako individuálni užívatelia služieb. Vo všeobecnosti môžeme povedať, že práve paradoxné situácie v zdravotníctve najviac zviditeľňujú slabé miesta celého systému zdravotnej starostlivosti, a to nie len u nás, ale v podstate takmer všade na svete, kde inštitucionalizovaná starostlivosť o zdravie existuje. Výsledkom aktuálneho stavu je neudržateľnosť takého systému v dlhodobom horizonte a jeho pravdepodobný kolaps.

Základné dilemy a paradoxy môžeme zhrnúť do nasledujúceho zoznamu, ktorý určite nebude úplný, ale poskytuje aspoň prehľad o najvýraznejších problémoch.

1. Z pohľadu praxe je už samotný názov „zdravotná starostlivosť“ v podstate paradoxný, keďže primárne je starostlivosť zameraná na ľudí, ktorý už trpia nejakou chorobou. Zdravý človek je v danom systéme vlastne nezaujatý, až na niektoré výnimky, týkajúce sa prevencie, ktorá je však z pohľadu komplexnosti veľmi obmedzená. A tu sa práve dostávame k druhému paradoxu a dileme.

2. Ak by sa vykonávali komplexné preventívne prehliadky u „zdravej populácie“, pravdepodobne by sa zistilo, vzhľadom na životný štýl a podmienky, že zdravotný stav obyvateľstva je oveľa horší ako sa predpokladá, čo by výrazne zvýšilo náklady na liečebnú starostlivosť – to vedie naozaj k eticko-ekonomicko-filozofickej dileme: dať peniaze na prevenciu a zvýšiť tým náklady na zdravotnú starostlivosť pre ľudí, ktorí síce ešte nie sú celkom chorí, ale skôr či neskôr budú, alebo peniaze ušetriť pre tých, ktorí už chorí sú, hoci v mnohých prípadoch by tomu bolo možné zabrániť včasnou prevenciou, ktorú práve týmto šetrením znemožníme pre ďalšiu časť populácie?

3. Ekonomika vs. etika – dilema: pomôcť všetkým znamená kolaps systému, pomôcť iba niektorým znamená, že iní môžu „kolabovať“.

4. Solidarita vs. zodpovednosť za vlastné zdravie – do akej miery má byť človek solidárny s niekým, kto si vedome poškodzuje vlastné zdravie? Aká je optimálna miera solidarity v oblasti zdravia? Úplná solidarita, zdá sa, nemotivuje ľudí, aby sa starali o vlastné zdravie. Na druhej strane, nulová solidarita by znamenala, že veľa ľudí by nedostalo potrebnú starostlivosť a ich zdravie by sa výrazne zhoršilo, čo by postupne malo vplyv na celú spoločnosť.

5. Zdravie do vysokého veku vs. kolaps dôchodkového systému v prípade, že by sa ľudia v zdraví dožívali vysokého veku. Paradoxne, pre spoločnosť sa na prvý pohľad zdá, že je „výhodné“, keď sa človek vysokého veku radšej nedožije. Pri reálnej analýze alternatívnych situácií by sme pravdepodobne zistili úplný opak.

6. Liečiť vs. vyliečiť – ekonomické aspekty vývoja liekov a inhibícia spätnou väzbou, kedy sa veľkým firmám neoplatí vyvinúť účinný liek, ktorý by v konečnom dôsledku znamenal zmenšenie trhu, a tým znehodnotil investíciu.

7. Povinné zdravotné poistenie vs. komerčné zdravotné poistenie, kedy by pri súčasných pomeroch vznikla skupina ľudí, ktorú by komerčné poisťovne pravdepodobne neboli ochotné poistiť.

8. Sloboda jednotlivca vs. diktát v zdravotnej starostlivosti je veľmi vážna etická dilema, ktorá môže proti sebe postaviť jednotlivca, ako súčasť, tvoriacu celok, a celok, t.j. spoločnosť, pozostávajúcu z jednotlivcov. Táto dilema sa nedá riešiť bez účasti vedy, v jej pravej podstate, t.j. bez politického a ekonomického ovplyvňovania.

9. Paradoxná situácia nastáva v prípade, keď lekár je zaplatený podľa výkonu. Čím je taký lekár lepší, t.j. čím lepšie sa stará o zdravie svojich pacientov a pravidelne ich

vzdeláva v oblasti starostlivosti o zdravie, tým menej návštev v dlhodobom horizonte bude mať, a teda tým menej peňazí dostane. Jedná sa, samozrejme, iba o hypotetickú situáciu, kedy všetci pacienti budú dostatočne uvedomelí a zároveň ich ekonomický status im dovolí sa o svoje zdravie primerane komplexne starať.

10. Zvýšenie životného štandardu vs. civilizačné ochorenia typu, rakovina, kardiovaskulárne ochorenia, obezita, diabetes.

11. Ľahká dostupnosť zdravotnej starostlivosti, paradoxne, prináša aj problémy – napr. nadužívanie antibiotík vďaka ich štandardnej dostupnosti a z toho vyplývajúci nárast rezistencie rôznych kmeňov patologických mikroorganizmov, zhoršenie epidemiologickej situácie v prípade tzv. prechodených infekčných nákaz, kedy ľahká dostupnosť a relatívny komfort liečby umožňuje chorému chodiť do práce aj v stave, kedy môže nákazu šíriť ďalej. Na druhej strane, väčšina populácie je v takej ekonomickej situácii, že si jednoducho nemôže dovoliť zostať v prípade choroby doma a liečiť sa.

12. Čím je lepšia a rýchlejšia diagnostika, tým viac chorých zistíme, a tým viac finančných prostriedkov sa odčerpá zo systému zdravotnej starostlivosti. Zdá sa, paradoxne, že pre poisťovne je napr. lacnejšie zaplatiť kompletnú liečbu relatívne obmedzenému počtu napríklad onkologických pacientov vo vážnom stave, ako vykonávať pravidelný celoplošný skrining populácie a vzdelávať populáciu v oblasti prevencie.

13. Ekonomická a politická sila kapitálu, ktorý je prítomný v systémoch zdravotnej starostlivosti vs. záujem jednotlivca a celej spoločnosti byť zdravý až do vysokého veku.

Riešenia všetkých týchto, ako aj ďalších dilem a paradoxov je nutné hľadať v kontexte globálnej politickej situácie a v medzinárodnej spolupráci všetkých zainteresovaných zložiek spoločnosti. Nevyhnutný je vedecký prístup, ktorý vychádza z reprodukovateľných výsledkov experimentov, komplexné vzdelávanie celej populácie v oblasti zdravia a úplná zmena životnej filozofie a spôsobu myslenia. Že nepôjde o jednoduchú záležitosť, už len z pohľadu našej malej krajiny, nehovoriac o globálnej zmene, nie je asi nutné zdôrazňovať. Druhou, z pohľadu zdravého rozumu len ťažko akceptovateľnou alternatívou je udržiavať terajší stav až do úplného kolapsu systému.

REFERENCIE

1. <http://www.merriam-webster.com/dictionary/dilemma>, prístup 12. júla 2015.
2. <http://www.merriam-webster.com/dictionary/paradox>, prístup 12. júla 2015.
3. <http://www.oxforddictionaries.com/definition/english/paradox>, prístup 12. júla 2015.
4. Kačala, J., Pisarčíková, M., Považaj, M. a kol.: *Krátky slovník slovenského jazyka*. Veda, Bratislava, 1997, str. 112, 444.

ETICKO-EKONOMICKO-ODBORNÉ DILEMY Z POHLADU BIOCHEMICKÉHO LEKÁRA V KLINICKEJ PRAXI

ALBERTYOVÁ, D.

Centrálny laboratórny komplex
Nemocnica s poliklinikou F. D. Roosevelta
v Banskej Bystrici

E-mail: dalbertyova[at]nspbb.sk

ABSTRAKT

V diagnostickom procese zohrávajú laboratórne vyšetrenia kľúčovú úlohu. Aby mohli laboratóriá túto úlohu naplňať, musia poskytovať kvalitné služby v súlade s najnovšími poznatkami medicíny založenej na dôkazoch. Pri plnení týchto povinností narážajú na určité obmedzenia zo strany poisťovní. Obmedzenia sa týkajú hlavne frekvencie vyšetrení, povolenej odbornosti indikujúceho lekára k vybraným vyšetreniam a zodpovedajúcej diagnóze pacienta. Je otázne, či sú tieto univerzálne obmedzenia zo strany poisťovní vhodné pre všetky typy nemocničných zariadení.

Každoročne rastú finančné náklady na laboratórne vyšetrenia pacientov asi o 10 až 15 %. Súvisí to predovšetkým so zavádzaním nových moderných technologických postupov a prístrojov, s vyššou cenou nových diagnostík a tiež s narastajúcim počtom samotných laboratórnych vyšetrení.

V tomto kontexte je vymedzenie problému celkom jasné:

1) pre zdravotné poisťovne je jednou z úloh hospodárne vynakladanie finančných prostriedkov zo zdravotného poistenia za služby súvisiace s poskytovaním zdravotnej starostlivosti, kým

2) pre ošetrojúceho lekára je prioritou poskytnúť pacientovi kvalitné služby v rámci modernej diagnostiky a liečby, čo samozrejme prináša zvýšené finančné náklady, a nakoniec

3) lekár – klinický biochemik, ktorý nemá priamy kontakt s pacientom, musí častokrát rozhodnúť, či je laboratórne vyšetrenie (aj na základe obmedzení od zdravot-

ných poisťovní) pre pacienta indikované alebo nie, resp. či je ekonomicky únosné vyšetriť neindikované vyšetrenie na základe pravidiel zdravotnej poisťovne, ktoré ale z odborného hľadiska indikované je.

Lekár, klinický biochemik, nielen v nemocnici fakultného typu, musí denne riešiť tieto dilemy, vyplývajúce, na jednej strane, z uplatňovania odporúčaných nariadení zdravotných poisťovní a na strane druhej z jeho odbornosti a nevyhnutného odborného a etického prístupu. Pomoc aj čiastočné riešenie tejto situácie vidíme v spoločnom odbornom dialógu medzi zdravotnými poisťovňami, odbornými lekáorskými spoločnosťami a zákonodarcami, ktorého výsledkom by mala byť prehľadná legislatívna úprava, berúca do úvahy odborné, ekonomické aj etické argumenty.

JE EKONOMICKÉ SPRÁVAŤ SA ETICKY V LABORATÓRIU A SYSTÉME ZDRAVOTNEJ STAROSTLIVOSTI?

LEPEJ, J.^{1, 3}, LEPEJOVÁ, K.²

¹Inštitút nukleárnej a molekulárnej medicíny
(INMM), Košice,

²Cumulus s.r.o., Košice

³UPJŠ LF, Košice

E-mail: lepejova.katarina[at]gmail.com

Podľa literárnych zdrojov [1, 2, 3] je etika, resp. morálka, filozofickým (racionálnym a kritickým) uvažovaním o tom, čo je a čo nie je dobré ľudské konanie. Poskytuje nám súbor kritérií, ktoré umožnia morálne hodnotiť a usmerniť naše konanie. Mali by sme kritickým používaním rozumu odlišiť to, čo je morálne dobré od toho, čo sa takým len javí. Nestačí však len vedieť, čo je morálne dobré, ale podstatné je, aby sme týmto smerom usmernili vlastné konanie.

Na otázku či je ekonomické správať sa eticky v laboratóriu a systéme zdravotnej starostlivosti bude možné odpovedať, až keď si položíme niekoľko ďalších otázok, niektoré aj v opačnom garde. Predovšetkým sa jedná o tieto otázky:

1. Je etické, aby mali zdravotné poisťovne rozdielne postoje voči poistencom a poskytovateľom napr. rôznou povolenou periodicitou vybraných testov, nejasnými pravidlami, neuznávaním výkonov napriek dodržaniu „nepísaných“ pravidiel, atď...?

2. Je etické, aby niekto vlastnil uzavretý kruh: POISŤOVŇA – NEMOCNICE – AMBULANCIE – LABORATÓRIÁ – LEKÁRNE. Je etické, že nie je možné oficiálne sa dopátrať skutočných vlastníkov? Je etické, že to nikomu neprekáža?

3. Je etické, aby sa diskriminovali „cudzí“ laboratóriá znižovaním ceny bodu a limitov a zvyhodňovali „vlastné“ vyššou cenou bodu a vyššími limitmi?

4. Je etické pestovať „laboratórnu turistiku“ naprieč celou republikou, aj s vedomím, že nie sú dodržané pravidlá predanalytickej fázy, čím sa vystavuje nebezpečenstvu lekár a jeho pacient zavádzajúcou interpretáciou výsledkov?

5. Je etická iba snaha o zisk z verejných zdrojov, ktorý sa nevracia späť do zdravotníctva na zlepšovanie jeho úrovne, ale výsledné obmedzenie kvality a dostupnosti ide na úkor zvyšovania neistoty lekárov s následným znížením bezpečnosti pacienta?

6. Je etické, aby zdravotníci postupovali iba podľa obmedzení poisťovní a riskovali záchranu pacienta?

7. Je etické, aby zdravotné poisťovne tlačili na indikujúcich lekárov za cenu nemalých sankcií, aby obmedzovali pomerne lacnú laboratórnu diagnostiku, ktorá je nevyhnutná pre správny terapeutický postup? Je etické, že zdravotné poisťovne na jednej strane šetria na úkor pacienta a na druhej strane vynakladajú nemalé financie na bombastické a často zavádzajúce reklamy na svoju propagáciu?

8. Je etické urobiť zo zdravotnej starostlivosti iba biznis?

A naopak: Je ekonomické šetriť za každú cenu, aj na úkor kvality a dostupnosti zdravotnej starostlivosti? Je ekonomické plytvať obmedzenými zdrojmi v zdravotníctve oneskorenou, resp. nesprávnou a nedostatočnou diagnostikou na základe nekvalitných výsledkov, ktorá škodí chorému a celému zdravotníctvu a spôsobuje následne značné navýšenie nákladov?

Keď zodpovieme na všetky otázky „áno“, potom sa nemáme na čo sťažovať, lebo sme spokojní s terajším stavom v zdravotníctve.

Ak povieme rozhodné „nie“ a zároveň naberieme konečne odvahu hľadať príčiny a následne bojovať za ich odstránenie a nápravu stavu do civilizovaných a ľudských pomerov, potom máme nádej, že raz možno budeme žiť v krajine, kde bude ekonomické správať sa eticky.

REFERENCIE

1. <http://www.merriam-webster.com/dictionary/ethical>, prístup 11. júla 2015.

2. <http://www.oxforddictionaries.com/definition/english/ethical>, prístup 11. júla 2015.

3. <http://skupina15.wall.sk/rocnik1semester2/material/etika/Etika-Brezinsky.doc>, prístup 11. júla 2015.

AKTUÁLNE VÝZVY (A NEDOKONALOSTI) DAŇOVEJ ÚPRAVY V KONTEXTE SÚSTAVNÉHO VZDELÁVANIA ZDRAVOTNÍCKYCH PRACOVNÍKOV (VYBRANÉ UPOZORNENIA NA ZMENY DAŇOVÝCH PREDPISOV PO 1.1. 2015)

HUMENÍK, I.^{1,2}

¹h&h PARTNERS, advokátska kancelária s.r.o.

Košice

²Komora pre medicínske právo – MEDIUS

E-mail: humenik[at]hhpartners.eu

ABSTRAKT

Požiadavka na zabezpečenie nezávislosti odborného názoru zdravotníckeho odborníka pri poskytovaní zdravotnej starostlivosti predstavuje v posledných rokoch pre laickú verejnosť jednu z horúcich tém. Nakoľko je navrhovaná liečba výsledkom slobodného odborného zváženia diagnózy pacienta a nakoľko je ovplyvnená preskripciou limitáciou zo strany zdravotnej poisťovne, či záujmom lekára predpísať lieky, z ktorých má profit on samotný a nie pacient? Tieto otázky zasahujú základné princípy vzťahu medzi pacientom a lekárom. Zásada „Salus aegroti suprema lex“ je tak aj v dnešnej dobe podrobovaná testu dodržiavania jej obsahu. Potreba prečisťovania vzťahov existujúcich v sektore zdravotníctva je viditeľná a snaha o ich „transparentňovanie“ je prítomná aj v praxi prijímania nových compliance regulácií farmaceutických spoločností, ktoré sú neraz prísnejšie ako zákonná úprava platná v rámci Slovenska. Presuny hodnôt zo strany farmaceutického priemyslu na poskytovateľov zdravotnej starostlivosti a jednotlivých zdravotníckych pracovníkov si v posledných rokoch vyžiadali viaceré legislatívne úpravy. Okrem už niekoľko rokov platnej notifikačnej povinnosti zdravotníckych pracovníkov voči Ministerstvu zdravotníctva SR je jedným z recentných bodov úpravy interakcií medzi zdravotníckymi pracovníkmi a (generálne povedané) subjektmi farmaceutického priemyslu v kontexte zákona o dani z príjmov (595/2003 Z.z.) ustanovenie § 8 ods. 1 písm. l/. V zmysle citovaného ustanovenia je ostat-

ným príjmom (cit.): „...peňažné a nepeňažné plnenie, ktoré bolo poskytnuté poskytovateľovi zdravotnej starostlivosti, jeho zamestnancovi alebo zdravotníckemu pracovníkovi od držiteľa registrácie lieku, držiteľa povolenia na veľko-distribúciu liekov, držiteľa povolenia na výrobu liekov, farmaceutickej spoločnosti, výrobcu zdravotníckej pomôcky, výrobcu dietetickej potraviny alebo prostredníctvom tretej osoby,“. Tieto príjmy sú predmetom zrážkovej dane, ktorú v závislosti od povahy príjmu (peňažný – nepeňažný) zráža buď poskytovateľ plnenia, alebo jeho prijímateľ. Ďalšie mantinely kooperácie medzi stakeholdermi sú obsiahnuté aj v zákone č. 362/2011 Z.z. o liekoch a zdravotníckych pomôckach a to predovšetkým v rovine limitácie plnení zo strany subjektov farmaceutického priemyslu v prospech odborníkov oprávnených predpisovať a vydávať lieky. Nakoľko táto úprava predstavuje prijateľné riešenie otázok vzťahov medzi zdravotníckymi pracovníkmi a farmaceutickým priemyslom je predmetom diskusií. S určitosťou je možné vysloviť, že okrem stransparentňovania jednotlivých väzieb výrazne zasahuje doteraz vžitý mechanizmy úhrad nákladov sústavného vzdelávania zdravotníckych pracovníkov. O vhodnosti zákonnej úpravy je preto potrebné naďalej viesť otvorenú diskusiu a uvažovať o riešení ktoré bude rešpektovať špecifiká poskytovania zdravotnej starostlivosti.

VŠUDYPŘÍTOMNÉ ENDOKRINNÍ DISRUPTORY

PATOČKA, J.

Katedra radiologie, toxikologie
a ochrany obyvatelstva
Zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích
Emy Destinové 46, 370 05 České Budějovice

E-mail: prof.patocka[at]toxicology.cz

ABSTRAKT

Druhá polovina 20. století je charakterizována mohutným rozvojem chemie a chemického průmyslu a chemické substance se stávají součástí našeho životního prostředí. Jsou ve vzduchu, ve vodě i v půdě, odkud se dostávají do našeho těla. Jsou všudypřítomné. Ze všech chemikálií, které zamořují naše životní prostředí, jsou z hlediska lidského zdraví nejnebezpečnější tzv. endokrinní disruptory (ED).

Jako ED označujeme skupinu exogenních látek, které účinkují jako hormony a narušují fyziologické funkce endokrinního systému zvířat i člověka tím, že zasahují do syntézy, sekrece, transportu, vazby, působení a vylučování přirozených, organismu vlastních hormonů. Protože endokrinní systém spolu se systémem nervovým a imunitním koordinuje činnost organismu a podílí se na udržování homeostázy, reguluje metabolismus, odezvu organismu na stres a je hlavní regulátorem růstu a reprodukce jedince, mohou ED poškozovat vývoj, neurologické, rozmnožovací a imunitní funkce organismu.

Do skupiny ED se řadí látky přírodního i umělého původu, jako jsou fytofarmaka, léky, pesticidy, suroviny používané při výrobě plastických hmot a konzumních výrobků a průmyslově využívané látky včetně průmyslových a komunálních odpadů.

Mnoho látek působících jako ED se objevuje ve vodě kterou pijeme, v potravinách které jíme, nebo v kosmetice, kterou nanášíme na kůži. Uvolňují se také z různých přípravků, kterými udržujeme v domácnostech čistotu a pocit svěžesti. Staly se nedílnou součástí našeho života. Do lidského organismu pronikají přes GIT, přes plíce

i přes kůži. Jejich množství jsou velmi malá, ale působí na nás dlouhodobě, některé po celý život. Jejich účinky na lidský organismus jsou známy jen nedostatečně. Studie na zvířatech ukazují, že ED mohou vést k poruchám plodnosti, nádorovým onemocněním a vývojovým vadám. Největší riziko představují pro plod v době, kdy dochází k vývoji orgánů a nervového systému. U zvířat byla prokázána feminizace samců a maskulinizace samic. Endokrinní disrupce není pokládána za konečný projev toxického poškození chemickými látkami, ale za funkční změnu, která může vést k dalšímu poškození organismu.

Interval mezi expozicí ED a objevením se příznaků onemocnění, může být velmi dlouhý. Příkladem může být „nechtěný experiment“ s podáváním syntetického estrogenu diethylstilbestrolu v prevenci spontánního potratu a k podpoře vývoje plodu. Teprve v období puberty bylo zjištěno, že tento ED narušuje vývoj pohlavního systému dětí a nese s sebou vyšší riziko vzniku nádorových onemocnění pohlavních orgánů. Lidé a živočichové, kteří jsou vystaveni těmto chemickým látkám každý den, riskují dramatický nárůst chorob ohrožujících jejich zdraví a život. Kvůli ochraně zdraví současných i budoucích generací je třeba proti ED vést důsledný boj. To se neobejde bez účasti analytických chemiků.

Koncentrace ED v životním prostředí jsou velmi nízké, takže jejich měření umožnila až moderní metodologie a instrumentace analytické chemie. Ani v současné době se však nejedná o jednoduchou záležitost a bude třeba dále vyvíjet nové a citlivé metody.

Klíčová slova: ekotoxikologie, endokrinní disruptory, homeostáza, pesticidy

BISFENOL A A JEHO STANOVENIE V MOČI METÓDOU HPLC

HUBKOVÁ, B.¹, LAZÚROVÁ, I.²
MAREKOVÁ, M.¹, LAZÚROVÁ, Z.^{1, 2}

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie
UPJŠ LF v Košiciach, Tr. SNP 1, 040 01 Košice

²I. interná klinika UPJŠ LF v Košiciach,
Tr. SNP 1, 040 01 Košice

Bisfenol A (BPA) je organická chemická zlúčenina so sumárnym vzorcom $C_{15}H_{16}O_2$ produkovaná kondenzáciou fenolu s acetónom. V kombinácii s inými zlúčeninami sa využíva pri výrobe a spracovaní rôznych plastov a živíc, napríklad ako aditívum zabezpečujúce zvýšenie elasticity resp. vytvrdenie plastov, alebo na spomalenie horenia horľavých výrobkov. Pri výrobe polykarbonátov (PC) a epoxidových živíc predstavuje BPA ich najdôležitejšiu stavebnú jednotku. Vďaka svojim vynikajúcim fyzikálnym vlastnostiam – nízka hmotnosť, rozmerová stabilita, optická čírosť, vysoká tepelná odolnosť a elektrický odpor – sa PC vo veľkej miere používa nie len v ťažkom a elektrotechnickom priemysle či polygrafii, ale aj v potravinárskom a vo farmaceutickom priemysle.

Celosvetový objem produkcie BPA sa pohybuje okolo 3 miliónov ton ročne, pričom táto produkcia stúpa medziročne o 7,6 % [1]. Vzhľadom na tieto vysoké čísla sú obavy z nežiadúcich účinkov expozície BPA namieste. Najrizikovejšie emisie BPA pre bežné obyvateľstvo predstavujú emisie z hotových výrobkov: dietetická expozícia pri migrácii BPA do potravín a nápojov z obalov používaných v potravinárskom priemysle; kožná expozícia v prípade kontaminovanej kozmetiky; expozícia zo znečisteného ovzdušia, ale aj zo stomatologických materiálov. Hoci odborníci úradu EFSA (European Food Safety Authority) pristupujú k postupnému znižovaniu hodnoty prípustnej dennej dávky (TDI – tolerable daily intake) pre BPA v potravinách z 50 až na 4 µg/kg telesnej hmotnosti/deň, existuje vysoké riziko akumulácie BPA v ľudskom organizme [2]. Mnohé štúdie poukazujú na riziko vzniku rôznych ochorení v spojení s dlhodobou expozíciou BPA [3]. Vďaka schopnosti napodobňovať prirodzené hormóny endokrinného systému ľudského tela – konkrétne estrogény,

patrí BPA k endokrinným disruptorom schopným vyvolať nepriaznivé vývojové, reprodukčné, nervové a imunitné účinky na človeka. Endokrinné disruptory predstavujú najväčšie nebezpečenstvo počas prenatálneho a ranne postnatálneho vývoja. Jednou z najčastejších porúch hormonálnej regulácie u žien je syndróm polycystických vaječníkov (polycystic ovary syndrome - PCOS). Okrem toho zvyšuje expozícia BPA riziko karcinómu prsníka, obezity, diabetes mellitus 2. typu, ako aj porúch reprodukcie a zmien v sexuálnom správaní. Taktiež zvyšuje riziko karcinómu testes a prostaty. Ojedinelé práce potvrdzujú aj vzťah BPA k riziku kardiovaskulárnych a autoimunitných ochorení [4].

Doposiaľ publikované štúdie sú prevažne experimentálne, ďalšie klinické a epidemiologické štúdie sú teda viac než potrebné. Táto skutočnosť, ako aj vysoký výskyt (až 7 %) mladých žien s PCOS [5] nás inšpirovala hľadať metódy merania hladín BPA v biologických tekutinách. Keďže moderná medicína uprednostňuje neinvazívne metódy odberu vzoriek, zamerali sme sa na stanovenie BPA v moči. Metódu vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) sme zvolili na základe dostupného prístrojového vybavenia nášho pracoviska, ako aj vďaka flexibilitě využitia rôznych princípov separácie pri stanovení metabolitov pomocou HPLC.

METODIKA

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia bola vykonaná na modulárnom prístroji s obrátenou fázou (RP-HPLC, Shimadzu, Japonsko) na kolóne Nucleosil expert column (Macherey – Nagel, Nemecko). Vzorky moču s predpokladom zvýšených hladín BPA ako aj kontrolných vzoriek boli manuálne dávkované v objeme 40 ml v izokratických podmienkach: mobilná fáza: 30 % acetonitril; prietok: 0.9 ml/min; teplota kolóny: 35°C, dĺžka analýzy: 10 min. Z dôvodu potvrdenia správnosti odberu moču a určení stavu hydratácie organizmu bola hladina BPA prepočítaná na množstvo kreatinínu u každého jednotlivca zvlášť. Metabolity boli detegované UV/Vis detektorom pri vlnových dĺžkach 280 a 220 nm ako aj fluorescenčným detektorom s xenónovou výbojkou: vlnová dĺžka excitácie: 225 nm a vlnová dĺžka snímania emisie žiarenia 310 nm. Účinnosť metódy bola vyhodnotená v zmysle linearít, presnosti a limitu detekcie.

U žien vo veku 32 ± 5 rokov ($n=23$), u ktorých sa nepredpokladal zvýšený výskyt hladín BPA sme namerali hladiny BPA v moči s mediánom $0,0 \mu\text{g/g}$ kreatinínu a medzikvartilovým rozpätím $9,9 \mu\text{g} / \text{g}$ kreatinínu ($0,0$ až $9,9 \mu\text{g/g}$ kreatinínu). Ženy so syndrómom polycystických ovárií (priemerný vek 29 ± 5 , $n=71$) mali medián hladín skúmaného metabolitu $5,2 \mu\text{g/g}$ kreatinínu s medzikvartilovým rozpätím $9,6 \mu\text{g/g}$ kreatinínu ($0,2$ až $9,8 \mu\text{g/g}$ kreatinínu).

REFERENCIE

- Groshart, C. P., Okkerman, P. C., Pijnenburg, A. M. C. M., 2001:** *Chemical study on Bisphenol A*. Den Haag: RIKZ. 2001. 91 s. [online]. [cit. 2015-07-10]. Dostupné na internete: <<http://publicaties.minienm.nl>>.
- European Food Safety Authority, 2015:** No consumer health risk from bisphenol A exposure: tlačová správa. [online]. [cit. 2015-07-12]. Dostupné na internete: <<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/150121.htm>>.
- Lazúrová, Z., Lazúrová, I., 2013:** Environmentálny estrogén bisfenol A a jeho účinky na organizmus človeka. In: *Vnitřní Lékarství*. ISSN 0042-773X. 2013, Roč. 59, č. 6, s. 466–471.
- Lazúrová, Z., Tkáč, I., 2015:** Bisfenol A a jeho vplyv na kardiovaskulárny systém. In: *Interná medicína*. ISSN 1335-8359. 2015. roč. 15, č. 2, s. 62–64.
- Krajčovič, P., Tomáš, S., Žúbor, P., 2005:** Nové aspekty v diagnostike a patofyziológii syndrómu polycystických ovárií. In: *Praktická gynekológia*. ISSN 1335-4221. 2005. roč. 12, č. 1, s. 5–9. [online]. [cit. 2015-07-13]. Dostupné na internete: <http://www.prolekare.cz/pdf?id=pg_06_05_09.pdf>.

Práca vznikla pri riešení projektu VEGA 1/0115/14.

**NOVÉ APLIKAČNÍ MOŽNOSTI
CHROMATOGRFIE, HMOTNOSTNÍ
SPEKTROMETRIE A ELEKTROCHEMIE
V PREDIKTIVNÍ TOXIKOLOGII**

**NEW APPLICATIONS OF CHROMATO-
GRAPHY, MASS SPECTROMETRY
AND ELECTROCHEMISTRY
IN PREDICTIVE TOXICOLOGY**

**HORNA, A., HORNOVÁ, M.
STEJSKALOVÁ, A.**

Institute of Nutrition and Diagnostics, RADANAL s.r.o.
530 03 Pardubice, Czech Republic

E-mail: [horna\[at\]radanal.cz](mailto:horna[at]radanal.cz)

ABSTRACT

Predictive toxicology can be defined as a mixture of strategies used to forecast the interaction between chemical structures and biological systems. Toxicology research focuses on the elucidation of the cellular and molecular mechanism of toxicity and the application of these models in safety evaluation and risk assessment. Toxicology can be defined as the art of identifying the unexpected. Predictive toxicology can use genomics, proteomics and metabolomics information from known toxicants to predict the toxicological classification of an unknown agent.

LC/EC/MS and EC/LC/MS techniques developed in the last decade have many possible applications, such as study and mimicking of *in vivo* oxidation and metabolism of natural compounds and drugs, or enhancing the efficiency of ionization of analytes for various mass spectrometry techniques. Several studies, utilizing EC flow cells coupled to MS, have demonstrated that electrochemically derived products can often accurately predict biological metabolites and chemical degradation products. Various scientific areas of application for this EC/(LC/) MS hybrid method include drug metabolism studies, peptide, protein and DNA research and quantification strategies. Promising future applications comprise the fields of

toxicology and forensics, targeted product synthesis and environmental analysis [3].

Electrochemical cells as a part of HPLC instrumentation commonly used in clinical labs can be used to mimic Cytochrome P450 action. Detoxification mechanism is based on transforming xenobiotics into more water soluble compounds to be removed from the living organism. Problem is that the oxidation of some xenobiotics may lead to highly reactive intermediates. These intermediates may severely damage their chemical environment if glutathione is not able to saturate their reactive sites. The understanding of reactive mechanism of xenobiotics oxidation is very important in the understanding of their toxicity and EC/LC/MS instrumentation seems to be very useful and promising tool of modern toxicology.

RETROSPEKTÍVNA ANALÝZA LIEKOV POŠKODZUJÚCICH ZDRAVIE

KUBÁŇ, J., KAPALLA, M.

Negentropic Systems, s.r.o.
Murgašova 12, Ružomberok

E-mail: juraj.kuban[at]gmail.com

ABSTRAKT

Hoci primárnym účelom liekov je pomôcť pacientovi získať späť zdravie, pri pohľade na dostupné štatistiky za posledné roky sa človek neubráni pochybnostiam. Od roku 1975 do 2014 bolo celosvetovo registrovaných 886 nových molekúl [1, 2] a zároveň 79 z nich (8,9%) bolo stiahnutých z predaja po uvedení na trh, a to z dôvodu ohrozenia pacienta, nezriedka aj s následkom smrti [1, 3]. Vedľajšie účinky liekov patria medzi hlavné príčiny úmrtí v celosvetových štatistikách [4]. Len v USA je viac ako 20 miliónov pacientov (7,2% populácie), ktorí užívali aspoň 1 z 5 liekov, stiahnutých v priebehu roku 1998 [5].

Už Paracelsus (1492–1541) tvrdil, že každá chemická látka je potenciálny jed, závisí len na podanom množstve. Je nutné si uvedomiť, že aj lieky sú len chemické zlúčeniny a tenkú hranicu medzi liekom a jedom, z pohľadu dávky, určuje terapeutický index (TI), pričom lieky s $TI > 13$ sú považované za bezpečné.

Z pohľadu pacienta, v závislosti na závažnosti nežiaducich účinkov môžeme rozlíšiť nasledujúce prípady:

1. Životu nebezpečné lieky stiahnuté z trhu, kde môžeme zaradiť, všetky lieky, ktorých ďalšie používanie pod váhou faktov a dôkazov nebolo možné. Postupom času sa zistili fatálne dôsledky pre pacienta, užívajúceho daný liek a následne došlo k trvalému stiahnutiu (angl. „withdrawal“) z trhu, či už dobrovoľne samotným výrobcom, alebo z rozhodnutia štátneho kontrolného orgánu, ktorý zároveň zrušil aj registráciu lieku. Najznámejší, priam učebnicový, je príklad racemického thalidomidu (obch. názov Contergan), vyvinutý firmou Grünenthal v šesťdesiatych rokoch 20. storočia. Z novších liekov sa relatívne nedávno (r. 2004) z trhu sťahoval Rofecoxib (Vioxx, fa. Merck & Co) pre nežiadúce

účinky na srdce. Smutným rekordérom je temafloxacin z roku 1992 (Omniflox, fa. Abbott), ktorý sa udržal na trhu len 3 mesiace od uvedenia. Posledným liekom, sťahovaným z trhu v roku 2013 je zatiaľ tetrazepam (Myolastan, fa. Sanofi). Menej závažné ohrozenie pacienta, predstavujú procesné chyby pri výrobe, kedy sa na základe reklamácie zistí pochybenie výrobcu. Zväčša ide o nedodržanie technologických postupov alebo podmienok skladovania, nevyhovujúci vstupný materiál, krížovú kontamináciu, či chybné označenie obalov. V takomto prípade sa sťahuje len šarža, ktorej sa problém týka (angl. „recall“). V roku 2008 došlo v USA k stiahnutiu heparínu (fa. Baxter), ktorý bol kontaminovaný nežiaducimi prísadami. V roku 2010 sa sťahoval epoetín alfa (Epogen/Procrit, fa. Amgen) v dôsledku interakcie roztoku so sklom ampulky.

2. Škodlivé lieky stále dostupné na trhu, kde sa jedná o lieky s publikovanými nežiaducimi účinkami, oficiálne však neakceptovanými, ktoré sa vplyvom rôznych okolností darí držať v predaji. Príkladom lieku v tejto skupine môže byť známy paracetamol (obch. značky Tylenol/Panadol), u nás dostupný aj ako Paralen (fa. Zentiva), ktorý je mimo svoju indikáciu ako analgetikum a antipyretikum aj dobe zdokumentovaný pečenný jed. Podľa štatistik FDA mal v 90-tych rokoch na svedomí 56 tisíc návštev pohotovosti, 26 tisíc hospitalizácií a 458 úmrtí. FDA v roku 2011 vydalo nariadenie aktualizovať všetky štítky a obaly o tomto nežiaducom účinku, napriek tomu je paracetamol dostupný ako voľne predajný liek. Hepatotoxicity paracetamolu je najčastejšou príčinou akútneho zlyhania pečene v USA aj Veľkej Británii. Bohužiaľ, ani zďaleka to nie je jediný škodlivý liek na trhu. K tejto rizikovej skupine patria aj lieky s úzkym terapeutickým indexom ($TI < 13$), spomínanom v úvode, ako sú warfarín, digoxín, alebo tiež antibiotiká, ako vankomycín či gentamicín.

3. Interakcie existujúcich liekov s inými látkami, sú najviac podceňovanou a nepreskúmanou oblasťou. Takéto interakcie s inými liekmi, alebo s jedlom (napr. ovocné džúsy, liečivé bylinky, korenie) zásadne menia farmakokinetiku podávaného lieku, teda jeho biologickú dostupnosť, či už synergickým alebo antagonistickým spôsobom. Najlepšie zdokumentovaný je prípad grapefruitového džúsu, ktorý interaguje s viac než 85 liekmi. Prvýkrát bol jeho účinok pozorovaný na felodipín (Plendil, fa. Astra Zeneca), kedy výsledkom účinku bolo dočasné zvýšenie koncentrácie lieku v ľudskom tele až na toxickú hranicu. Podobne na tom sú aj statíny, napr. atorvastatín (Lipitor, fa. Pfizer) pri súčasnom podaní s 200 ml džúsu vykazuje 3 až 5 ná-

sobný (lovastatín až 12 až 15-násobný) nárast koncentrácie lieku v ľudskom tele, čím sa, samozrejme, zvyšuje riziko prejavu vedľajších účinkov.

Napriek tomu, že bezpečnosťou liekov sa na medzinárodnej úrovni zaoberá farmakovigilancia [6], ktorá je zameraná na zhromažďovanie nežiaducich účinkov liekov (NÚL, angl. Adverse Effect Reactions, ADRs), stále nám uniká podstata, a to, že možné vedľajšie účinky lieku sa neberú do úvahy už pri jeho vývoji, ale iba metódou „pokus – omyl“ ich zisťujeme dodatočne pozorovaním, až po uvedení lieku na trh pre širokú populáciu.

Z pohľadu starostlivosti o zdravie je nevyhnutné si tieto súvislosti uvedomiť a vopred analyzovať možné nežiaduce vplyvy a interakcie liekov s cieľom ich minimalizovania. Rozvoj a praktická aplikácia prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny sa nevyhnutne musí zaoberať aj touto oblasťou a využiť všetky moderné technológie [7] a vedecké poznatky aj pri predikcii potenciálnych vplyvov konkrétneho lieku u konkrétneho pacienta a následnom navrhovaní preventívnych opatrení, ktoré by nežiaduce účinky úplne vylúčili, alebo potlačili na úroveň akceptovateľnú pre daného pacienta.

REFERENCIE

1. Ninan, B., Wertheimer, A. I.: *Withdrawing Drugs in the U.S. versus Other Countries Innovations in Pharmacy*, 2012, 3, 1–5.
2. Novel New Drugs 2014 Summary. FDA, 2015, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/UCM430299.pdf>.
3. McNaughton, R., Huet, G., Shakir, S.: An Investigation into Drug Products Withdrawn from EU Market between 2002 and 2011. *Br. Med. J. Open*, 2014, 4, 1–6.
4. Lasser, K. E., Allen, P. D., Woolhandler, S. J., Himmelstein, D. U., Wolfe, S. M., Bor, D. H.: Timing of New Black Box Warnings and Withdrawals for Prescription Medications. *J. Am. Med. Assoc.*, 2002, 287, 2215–2220.
5. Wood, A. J. J.: The Safety of New Medicines: The Importance of Asking the Right Questions. *J. Am. Med. Assoc.*, 1999, 281, 1753–1754.
6. The Importance of Pharmacovigilance, Safety Monitoring of Medicinal Products, WHO 2002, <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4893e/s4893e.pdf>.
7. Keiser, M. J., Setola, V., Irwin, J. J., Laggner, C., Abbas, A. I., Hufeisen, S. J., Jensen, N. H., Kuijter, M. B., Matos, R. C., Tran, T. B., Whaley, R., Glennon, R. A., Hert, J., Thomas, K. L., Edwards, D. D., Shoichet, B. K., Roth, B. L.: Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature*, 2009, 462: 175–181 (doi: 10.1038/nature08506).

METABOLICKÉ NÁSLEDKY CELOŽIVOTNEJ EXPOZÍCIE MALÝMI DÁVKAMI ŤAŽKÝCH KOVŮ U POTKANOV

NOVÁKOVÁ, J.¹, LUKAČÍNOVÁ, A.²
LOVÁSOVÁ, E.¹, CIMBOLÁKOVÁ, I.¹
NIŠTIAR, F.¹

¹Ústav patologickej fyziológie, UPJŠ LF
Trieda SNP1, Košice

²Ústav fyziológie, UPJŠ LF
Trieda SNP1, Košice

E-mail: jaroslava.novakova[at]upjs.sk

Ťažké kovy a ich účinok na organizmus, či už živočíšny alebo ľudský, je dlhodobo sledovaný problém. Akútny účinok ťažkých kovov je už vcelku dobre odsledovaný a účinky takpovediac „klasických“ ťažkých kovov sú podrobne popísané. Akútne otravy sa prejavujú v pomerne krátkom čase a majú dosť typické príznaky. Ak sú doplnené toxikologickým vyšetrením, záver je jednoznačný a diagnózu nie je problém stanoviť.

Zaujímavejšou oblasťou u všetkých ťažkých kovov je sledovanie chronických účinkov kovov pri dlhodobejšom príjme nízkych alebo prahových dávok.

Náš tím sa venuje sledovaniu dlhodobých účinkov nízkych dávok kovov (kadmium [Cd], olovo [Pb], ortuť [Hg]) na organizmus modelových zvierat (*Tetrahymena pyriformis*, potkan obyčajný) a využitie poznatkov pre potrebu detekcie problematických environmentálnych oblastí alebo pre možnú aplikáciu v diagnostike pre ľudskú populáciu.

Čo sa týka dlhodobej expozície modelových zvierat, boli sledované expozície celoživotné (cca 156 týždňov), ročné a polročné. Zachytili sme široké rozpätie života potkana, od štádia obdobia odrašteného mláďaťa (52 dní) cez obdobie dospelosti až po vysokú starobu. Tieto obdobia je možné extrapolovať na životné etapy/obdobia človeka.

Dávky nízkej expozície boli pri sledovaniach stanovené ako 500-násobok a 200-násobok MAC (maximum allowed concentration). Tieto sú však rádovo nižšie, ako toxické dávky vedúce k akútnej otrave.

Ciele by sme mohli rozdeliť na dve hlavné skupiny. Sledovanie biochemických a hematologických parametrov a reprodukčné ukazovatele. Tiež sme sledovali akumuláciu kovov vo vybraných orgánoch a krvnej plazme.

Počas pozorovaného obdobia došlo k zaujímavým zmenám sledovaných parametrov. Sú to napríklad zmeny v antioxidantných parametroch pri dlhodobej expozícii.

Zistené poznatky sa dajú aplikovať aj v ľudskej medicíne. Aj na Slovensku máme oblasti, ktoré sú kontaminované ťažkými kovmi a nie je dôvod predpokladať, že sa v nízkych koncentráciách nemôžu dostať do potravinového reťazca obyvateľov (studne, lesné plody, domáca produkcia a pod.).

ENVIRONMENTÁLNA EXPOZÍCIA POLYCHLÓROVANÝM BIFENYLOM A VYBRANÉ ZDRAVOTNÉ PARAMETRE OBYVATEĽOV VÝCHODNÉHO SLOVENSKA – VÝSLEDKY A PERSPEKTÍVY 15-ROČNÉHO VÝSKUMU

MURÍNOVÁ, L., TRNOVEC, T.

Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave
Fakulta verejného zdravotníctva
Oddelenie environmentálnej medicíny

E-mail: lubica.palkovicova[at]szu.sk

Polychlórované bifenyly (PCBs) patria medzi perzistentné organické zlúčeniny (POPs). Sú to látky rozpustné v tukoch, ktoré sa bioakumulujú v potravinovom reťazci a v minulosti sa používali ako dielektrické kvapaliny v transformátoroch a kondenzátoroch, adhezíva, nátery, spomaľovače horenia a pod. Vo väčšine krajín bolo použitie PCB zakázané pred viac ako 20-imi rokmi, ale vďaka svojej stabilite sú dodnes všadeprítomné v životnom prostredí.

PCB sú toxické látky pomerne ľahko prechádzajúce placentárnou bariérou, vylučované aj do materského mlieka. Ako následok expozície PCB môžu vzniknúť poruchy endokrinného, imunitného, nervového a reprodukčného systému a poškodenie kognitívneho vývoja. Environmentálna expozícia ľudí PCB sa uskutočňuje hlavne prostredníctvom potravy, a to predovšetkým potravy živočíšneho pôvodu, ako napríklad ryby, mäso, vajcia a mliečne výrobky.

Východné Slovensko a predovšetkým okres Michalovce, patria celosvetovo medzi oblasti s vysokým stupňom znečistenia životného prostredia PCB, ktoré je následkom priemyselnej produkcie týchto látok v závode Chemko-Strážske v rokoch 1959–1984. Odpadový kanál z Chemka, ústiaci do rieky Laborec, predstavuje stály zdroj znečistenia prostredia PCB a následnej expozície obyvateľov.

Od roku 2001 prebieha v okrese Michalovce a okolitých regiónoch intenzívny výskum zdravotných následkov chronickej environmentálnej PCB expozície človeka. Výskum je realizovaný prostredníctvom medzinárodných (EÚ a USA-SR) a národných projektov (Agentúra pre pod-

poru vedy a výskumu a a Ministerstvo zdravotníctva SR) a zaoberá sa zdravotným stavom dospelých i detskej populácie v danej oblasti. V dospelých populácii sme sa zamerali hlavne na funkciu štítnej žľazy a homeostázu glukózy. Študie v detskej populácii sa sústreďujú na narušenie imunitného systému, neurobehaviorálne poškodenie, sluchové funkcie, poškodenie zubnej skloviny, funkciu štítnej žľazy, obezitu a rast a vývoj všeobecne, vo vzťahu k prenatálnej a postnatálnej expozícii PCB.

Napriek klesajúcej kontaminácii životného prostredia PCB a s tým súvisiacej expozícii obyvateľstva, zdravotné dopady PCB expozície sú v populácii stále prítomné a je zjavné, že bez priamej intervencie v prostredí a následnej remediácie nemôžeme očakávať zníženie zdravotného rizika spojeného s expozíciou PCB.

ENSURING AND MEASURING THE QUALITY OF PRE- AND POST- ANALYTICAL PHASES IN CLINICAL LABORATORIES AND POCT IN FINLAND

WAHLSTEDT, J.

Association of Biomedical Laboratory
Scientists in Finland
Helsinki, Finland
<http://www.bioanalytikkoliitto.fi>

E-mail: [juha.wahlstedt\[at\]gmail.com](mailto:juha.wahlstedt[at]gmail.com)

ABSTRACT

The quality of pre and post analytical phases is one of the hot topics in Europe at the moment. We all know that the majority of errors in laboratory investigation process take place in pre analytical and post analytical phases [1], but how can we ensure and improve our processes? Especially in a situation where Laboratory analytics is strongly centralized and sample collection is done by non-laboratory trained personnel. Who has the responsibility to train and ensure the quality of phlebotomy and point-of-care testing? It is not only the question of wasted money to wrong requests or haemolyzed samples but also the patient safety. The ISO 15189:2012 standard requires that appropriate pre and post examination processes are implemented. [2]

To be able to plan and improve our processes, we need measured data. Laboratories can collect data of pre analytical and post analytical errors manually or use some external software like HaiPro [3], designed for reporting patient safety incidents.

Another approach is to use external quality assessment programs to evaluate and record pre and post analytical errors. At the moment there are three different types of EQA programs available [4] for pre analytical phase and few programs for post analytical phase. Collecting data and analyzing findings can be an efficient tool to improve processes and quality in pre and post analytical phases.

In Finland we have taken several steps to improve the quality in pre and post analytical phases. Here are

some examples: National recommendation for point-of-care testing, eLearning package for POCT users (POCT certificate), Best practices in phlebotomy (recommendation), automated data collection from LIS [5], pre and post analytical EQA program development and specialization training of biomedical laboratory scientists for POCT and phlebotomy.

For medical laboratories the challenge is to train and evaluate all the people who are involved in specimen collection, preparing and transportation and point-of-care testing. All personnel involved should have an appropriate basic training and continuous professional development program like eLearning modules to maintain skills and knowledge. Laboratories should have an automated way of collecting and reporting pre and post analytical process errors. Pre and post analytical phases should be integrated to current external quality assessment programs for laboratory professionals and for phases done outside laboratory, there should be a separate pre and post analytical EQA schemes.

REFERENCES

1. **Plebani M.:** Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006; 44(6): 750–9.
2. **ISO/TC 212:** Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems.
3. **ISO15189:2012:** Medical laboratories - Requirements for quality and competence. 5.6.1. General requirements for ensuring the quality of examination results.
4. **Awanic Ltd:** HaiPro — Reporting System for Safety Incidents in Health Care Organizations, 2015. <http://awanic.com/haipro/eng/>.
5. **Kristensen et al.:** How to conduct External Quality Assessment Schemes for the pre-analytical phase? *Biochem. Med. (Zagreb)*. 2014 Feb; 24(1): 114–122. Mylab Ltd: Mylab way and System integration, 2015 http://www.mylab.fi/en/services/integration_1/mylabway_1/.

VPLYV KVALITY PREDANALYTIKY NA POSTANALYTICKÚ INTERPRETÁCIU LABORÁTORNYCH VYŠETRENÍ

PIVOVARNÍKOVÁ, H.

Synlab Slovakia, s.r.o.
Sládkovičova 25, 080 01 Prešov
www.synlab.sk

E-mail: hedviga.pivovarnikova[at]synlab.sk

ABSTRAKT

Laboratórna diagnostika, významná časť klinického rozhodovania, je rozdelená do niekoľkých fáz, ktoré pozostávajú z objednávanie vyšetrení-testov (pre-preanalytická fáza), z odberu vzoriek (preanalytická fáza), analýzy vzoriek (analytická fáza), hlásenia, vydávania výsledkov (postanalytická fáza) a interpretácie (post-postanalytická fáza). Aj keď sa zdá laboratórna medicína menej zraniteľná než iné klinické a diagnostické oblasti, výskyt chýb nie je zanedbateľný a môže mať nepriaznivý dopad na kvalitu analýz a pacientovu bezpečnosť. V mnohých prácach sa potvrdzuje, že veľká väčšina laboratórnych chýb vychádza z vplyvu manuálnej intenzívnej aktivity v preanalytickej fáze, súvisiacich najmä s odberom, manipuláciou, transportom, prípravou a uskladnením vzoriek. Frekvencia analytických chýb je nižšia, pripisovaná najmä poruchám analyzátorov, nesprávnej kalibrácii, nedodržaní pravidiel kontroly kvality a analytickým interferenciám. Frekvencia postanalytických chýb je niekde v strede medzi preanalytickými a analytickými chybami a obsahuje väčšinou nesprávne interpretácie výsledkov vyšetrení a omeškanie hlásenia výsledkov v kritických intervaloch.

Podľa publikovaných prehľadov frekvencií chýb bola pre-preanalytická fáza ovplyvnená v 46,0–68,2 %, preanalytická fáza v 3,0–5,3 %, analytická fáza 12,5–20,0 % a post-postanalytická fáza v 25,0–45,5 % zo všetkých sa vyskytujúcich chýb.

Aj keď laboratórna medicína zaznamenala neobyčajné vývojové trendy v poslednej dekáde, celkový benefit týchto zmien na kvalitu zdravotnej starostlivosti nedosiahne svoj plný potenciál, ak obe pre- aj postanalytická

fáza v celkovom procese testovania nebudú harmonizované. EFLM (Európska federácia pre klinickú chémiu a laboratórnu medicínu) má vedúcu úlohu v harmonizácii preanalytickej fázy laboratórnych skúšok. EFLM prostredníctvom svojej pracovnej skupiny pre preanalytickú fázu špecifikuje preanalytické otázky a problémy, akými sú výber vhodných testov, optimalizácia školení, manipulácia so vzorkami a aplikácia indikátorov kvality. EFLM je presvedčená, že harmonizácia všetkých týchto sporných otázok a problémov môže významne redukovať potenciálne riziko preanalytických chýb a podstatne zlepšiť pacientovu bezpečnosť. EFLM vyzýva k spoločnej činnosti laboratórnych profesionálov, praktických lekárov na podporu definície univerzálne aplikovateľných štandardov pre preanalytickú fázu a ich celosvetovú implementáciu. Indikátory kvality (QIs) by mali merať a monitorovať všetky kritické aktivity v pre-pre- (mimo laboratória) a pre-analytickej (v rámci laboratória) fáze. Predovšetkým by mali byť považované za užitočné nástroje pre identifikáciu, dokumentáciu a monitorovanie nasledovného:

- kvality požiadavkových formulárov, (napr. elektronické alebo papierové) a spôsob komunikácie požiadaviek s laboratóriom,
- identifikácie pacienta v režime POCT so stále vysokým rizikom chýb,
- kvality biologických vzoriek, zvlášť počas a po transporte od odberu do laboratória.

Indikátory pre laboratórnu činnosť v celom procese testovania (TTP) dovoľujú merať a zlepšovať kvalitu služieb. Podľa súčasnej definície „chyba v laboratórnej medicíne“ všetky kroky v preanalytickej fáze, vrátane vhodnosti žiadaných testov a požiadavkových formulárov, identifikácie pacienta a vzorky a kvality transportu vzoriek musia byť vyhodnotené a monitorované. Na identifikácii a stanovení cieľových hodnôt indikátorov kvality sa podieľa pracovná skupina IFCC (Working Group: Laboratory Errors and Patient Safety).

Zlepšovanie preanalytickej kvality, snaha EFLM o harmonizáciu diskutuje v súčasnosti tieto aktuálne témy:

- Nevhodné alebo nepotrebné laboratórne testy.
- Manažment požiadaviek testov – praktické skúsenosti.
- Implementácia smernice EU o prevencii poranenia ihlou pri odbere.
- Harmonizácia požiadaviek hladovania pred odberom krvi.

- Vplyv fyzickej aktivity a kontrastných látok na *in vitro* analýzy.
- Súčasné odporúčané poradie odberov.
- Najlepšie nástroje na monitorovanie podmienok času a teploty počas transportu vzoriek.
- Popis problémov vyplývajúcich z nevhodnej centrifugácie vzoriek.
- Preanalytické indikátory kvality.
- Externá kontrola kvality (EQAS) pre preanalytickú fázu.

Manažment kvality v preanalytickej laboratórnej praxi je vyzývajúcou iniciatívou, ktorá vyžaduje koordináciu úsilia oboch, univerzálneho aj lokálneho stanoviska. Po mnohých rokoch výskumu v oblasti kvality laboratórnej diagnostiky, poznajúc ľadovec laboratórnych chýb s vedomím, že extra-analytická kvalita je aspoň taká dôležitá ako kvalita analytická, je dôležité dosiahnuť významné zlepšenie laboratórnej diagnostiky a ochrany pacienta. Podľa publikovaných údajov je dopad preanalytických chýb na pacienta v 75,6 % bez poškodenia jeho zdravia a zachytené sú laboratóriom alebo lekárom, v 0,6 % je to nevhodná liečba s možnosťou fatálnych následkov, v 5,6 % oddialenie alebo zdržanie terapie s dôsledkom pre zdravie aj ekonomiku a v 16,9 % opakované vyšetrenia, v dnešnej ekonomickej situácii veľmi nevhodné.

Problém bezpečnosti pacientov pri poskytovaní zdravotnej starostlivosti sa stal veľmi aktuálnym po uverejnení štúdie IOM (Institute of Medicine, US) „To err is human” v roku 2000.

Bezpečnosť zdravia sa môže dosiahnuť relatívne malým počtom parametrov, ktoré sú zvolené vhodným výberom. Ak sa hľadajú parametre, tak parameter (požiadavka) by mal dať odpoveď, ak je jasne definovaná otázka. Pri interpretácii výsledkov je potrebné vziať do úvahy mnoho neanalytických faktorov, inak budú interpretované ako patologické, čo vedie k nesprávnym záverom. Nevhodná príprava pacienta pre určité analýzy a nerešpektovanie pravidiel k príprave a analýze vzorky majú za následok významný rozdiel od reálnych hodnôt.

Efektívnejšia integrácia automatizácie a informačných technológií umožní laboratóriám identifikovať, kontrolovať a znižovať množstvo chýb v celkovom vyšetrovacom procese (TTP), ale medziodborová spolupráca a komunikácia s lekármi a ďalšími partnermi je základom pre zlepšovanie bezpečnosti pacienta.

Prednáška sa zaoberá aj jednotlivými kazuistikami a interpretáciou laboratórnych výsledkov.

REFERENCIE

1. **Plebani, M.:** Errors in laboratory medicine and patient safety: the road ahead. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 45, 2007, 700–707.
2. **Lippi, G., Simundic, A. M., Mattiuzzi, C.:** Overview on patient safety in healthcare and laboratory diagnostics. *Biochimica Medica*, 2010; 20(2): 131–43.
3. **Hammerling, J. A.:** A Review of Medical Errors in Laboratory Diagnostics and Where We Are Today. *LAB-MEDICINE*, 2012, Volume 43, (2), 41–44.
4. **Plebani, M., Sciacovelli, L., Marinova, M., Marcuccitti, J., Chiozza, M. L.:** Quality indicators in laboratory medicine: a fundamental tool for quality and patient safety. *Clin. Biochem.*, 2013; 46: 1170–1174.
5. **Lippi, G., Banfi, G., Church, S., Cornes, M., De Carli, G., Grankvist, K., Kristensen, G. B., Ibarz, M., Panteghini, M., Plebani, M., Nybo, M., Smellie, S., Zaninotto, M., Simundic, A. M., European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group for Preanalytical Phase:** Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2015 Feb; 53(3): 357–70.

NEVYHNUTNOSŤ KVALITNEJ INTERPRETÁCIE SEROLOGICKÝCH VÝSLEDKOV PRI DIAGNOSTIKE NEUROINFEKCIÍ

HELMOVÁ, L. BEČKOVÁ, Z.

Pracovisko klinickej mikrobiológie CLK
Fakultná nemocnica s poliklinikou F.D. Roosevelta
Banská Bystrica

E-mail: lhelmova[at]gmail.com

ABSTRAKT

Kvalita laboratória spočíva nielen v používaní certifikovaných diagnostických setov, dodržiavaní štandardných postupov a podmienok a absolvovaní interných a externých kontrol kvality, ale aj v správnom vyhodnotení a interpretácii nálezov. Nesprávne interpretovaný výsledok môže mať pre pacienta negatívne následky, nakoľko nasmeruje klinika nesprávnou diagnostickou cestou a oneskorí začiatok kauzálnej terapie.

Predkladané kazuistiky poukazujú na dôležitosť správnej interpretácie sérologických výsledkov pri diagnostike neuroinfekcií. Upozorňujú na výhodu spolupráce s biochemickým a cytologickým laboratóriom, ako aj s klinikom, ktorá umožňuje správnu interpretáciu nálezov. To v konečnom dôsledku znamená pre kliniku relevantnú informáciu, ktorú od laboratória očakáva.

Prvá kazuistika sa týka 59 ročnej pacientky hospitalizovanej na neurologickej klinike ako suspektnú náhlucievnu mozgovú príhodu (NCMP) pri novozistenej hypertenzii. Vyšetrenie likvoru biochemicky a cytologicky naznačuje prebiehajúcu seróznú neuroinfekciu. U pacientky bola v ELISA teste zaznamenaná pozitivita protilátok triedy IgG proti herpetickým vírusom a boréliám, s negatívnym nálezom protilátok proti kliešťovej encefalitíde (TBE) v likvore aj v sére. Po zohľadnení biochemických parametrov, prepočte protilátkového indexu (AI) a po vylúčení poruchy hematolikorovej bariéry boli positivity protilátok proti herpetickým vírusom interpretované ako negatívne (AI=0,6 pre HSV, AI=1,1 pre VZV) a proti borélii ako pozitívne (AI>85). Zároveň bolo vykonané PCR

vyšetrenie z tej istej vzorky likvoru s pozitívnym nálezom borélievej nukleovej kyseliny. Pacientka bola úspešne liečená na neuroboréliózu.

Druhá kazuistika prináša prípad 33 ročného pacienta s anamnézou mnohopočetného zaklieštenia. Pre klinické prejavy postihnutia CNS bola u pacienta indikovaná lumbálna punkcia. Vzorka likvoru s paralelne odobratou vzorkou krvi boli odoslané do centralneho laboratórneho komplexu na diagnostiku. Pri sérologickom vyšetrení bola zaznamenaná pozitivita protilátok triedy IgG proti herpetickým vírusom, borélii a kliešťovej encefalitíde vo vzorke séra aj likvoru a pozitivita protilátok triedy IgM proti kliešťovej encefalitíde vo vzorke séra aj likvoru. Bol vykonaný prepočet protilátkového indexu s nálezom zvýšeného indexu v rozsahu od 4,5 (VZV) do 7,8 (EBV) a 53,6 (TBE). Pri absencii informácií o výsledkoch biochemických parametrov a cytologickom náleze by to bola pre kliniku zavádzajúca resp. zmätočná informácia. Po zohľadnení biochemických parametrov a identifikácii poruchy hematolikorovej bariéry ťažkého stupňa bolo možné interpretovať nálezy pozitívnych protilátkových indexov proti herpetickým vírusom a borélii ako negatívne. Autori mali prístup výsledkom vyšetrenia séra spred 2 týždňov, ktoré potvrdili dynamiku tvorby protilátok proti TBE, rovnako mali prístup anamnestickým údajom pacienta. Bolo tak možné interpretovať výsledky ako svedčiace pre prebiehajúcu kliešťovú encefalitídu.

Tretia kazuistika sa týka pacienta, hospitalizovaného na neurologickej JIS s prvotnou diagnózou epilepsie. V rámci diferenciálnej diagnostiky boli odobraté vzorky séra a likvoru na sérologické vyšetrenie. Výsledky vyšetrenia na protilátky proti herpetickým vírusom, borélii a kliešťovej encefalitíde boli negatívne v likvore, v sére detekovaná prítomnosť protilátok triedy IgG proti herpetickým vírusom. Pacientovi bolo vykonané CT hlavy s negatívnym nálezom. Biochemické výsledky likvoru naznačujú prebiehajúcu neuroinfekciu. Pacientovi je do terapie nasadený amoksiklav, herpesin a isoprinosin. O tri týždne bol opakovaný odber séra aj likvoru s nálezom signifikantného vzostupu hladiny protilátok triedy IgG proti HSV a VZV v sére a pozitívnym nálezom intratekálnej tvorby protilátok proti HSV (AI=103). Pre potvrdenie diagnostiky bola vzorka likvoru vyšetrená metódou PCR. Nakoľko sa jednalo o vírusové ochorenie CNS, pri ktorom v čase pozitívneho záchytu protilátok už nie je možné detegovať nukleovú kyselinu vo vzorke, na vyšetrenie prí-

tomnosti nukleovej kyseliny sa použila prvá vzorka likvoru, v ktorej ešte neboli detegované protilátky. Výsledok PCR vyšetrenia bol pozitívny pre HSV 1.

Ako bolo poukázané na uvedených kazuistikách, potreba kvalitnej interpretácie výsledkov a potreba súčinnosti jednotlivých zložiek laboratórnej diagnostiky vyplýva z požiadaviek rutínnej praxe laboratória. Nemenej potrebná je spolupráca laboratórneho a klinického pracoviska, a to v zmysle edukačnej aj konzultačnej činnosti laboratórnych klinických diagnostikov. Laboratórium je totiž neoddeliteľnou súčasťou liečebného procesu.

DEFINOVANIE ANALYTICKÝCH VÝKONNOSTNÝCH CIEĽOV V SR 15 ROKOV PO ŠTOKHOLMSKEJ KONFERENCII

BALLA, J.

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie (SSKB)
Slovenská spoločnosť laboratórnej medicíny (SSLM)
Prešov, Slovakia

Email: jan.balla[at]mail.t-com.sk

ABSTRAKT

Klinickým laboratóriám sa prisudzuje veľmi dôležitá úloha v prevencii, diagnostike, monitorovaní, prognóze a liečbe ochorení. Klinickí lekári spoliehajú na včasné a kvalitné výsledky laboratórnych testov. Pojem dobrá kvalita laboratórnych výsledkov často používa klinika a laboratórium bez toho, aby ju konkrétne špecifikovali, preukazovali, merali a zlepšovali podľa záväzných štandardov kvality. Presnosť, správnosť, neistota výsledkov merania, medza detekcie a stanovenia a ďalšie charakteristiky laboratórnych výsledkov patria k základným indikátorom analytickej kvality. Špecifikácia analytických výkonnostných cieľov laboratórnych testov je žiaduca na zabezpečenie a internú kontrolu kvality, validáciu a verifikáciu metód, prístrojov, diagnostických súprav a externé hodnotenie kvality. Bez jasnej špecifikácie kvality sa nedá vykonať akreditačný, resp. certifikačný audit, benchmarking ani merať six sigma metriku.

Historicky sa analytické kritériá odvodzovali od rozsahu referenčných intervalov, požiadaviek klinických lekárov, najmodernejšieho stavu technológií, dát medzi laboratórneho porovnávaním a názorov odborníkov a odborných skupín. Novšie prístupy sú založené na biologickej variabilite alebo definícii cieľov pre jednotlivé klinické situácie. Všetky majú svoje výhody a nevýhody a ich výber v rôznych krajinách sa prispôsobuje regulačným špecifikám a legislatíve. Európska federácia externého hodnotenia kvality (EQALM) akceptuje národné modely analytických kritérií kvality laboratórneho výkonu. SR však regulačné analytické výkonnostné ciele nemá. Bez kri-

tického odôvodnenia a uvedomenia si odlišnej legislatívy klinické laboratória v SR 25 rokov preberajú zahraničné modely. Od vyhlásenia samostatnej SR žiadna organizačná zložka Slovenskej lekárskej spoločnosti, s výnimkou SSKB, nezverejnila predstavu svojho modelu požiadaviek analytických kritérií kvality a preto a priori nemohlo ani dôjsť k zjednoteniu ich koncepcií.

Štokholmská konferencia v roku 1999 bola medzníkom v snahe dosiahnuť konsenzus v tom, ako by sa mali stanoviť požiadavky na kvalitu a súčasne systematizovať hierarchia modelov. Na sklonku minulého roka sa v Miláne konala Prvá strategická konferencia Európskej federácie klinickej chémie a laboratórnej medicíny (EFLM) pod názvom „Definovanie analytickej špecifikácie kvality 15 rokov po štokholmskej konferencii“. Primárnym cieľom bolo preskúmať, do akej miery stále platí Štokholmský konsenzus a či by sa hierarchia Štokholmského protokolu nemala zjednodušiť. Výsledkom konferencie je zjednodušená hierarchia, ktorú reprezentujú tri hlavné modely na odvodenie a definovanie prijateľnej úrovne analytickej kvality laboratórnych testov. Potvrdila sa názorová zhoda, že neexistuje univerzálny protokol ale niektoré modely sú pre určité analyty vhodné a užitočné a že podstata Štokholmskej hierarchie je stále platná. Na posilnenie a pokračovanie aktivít, ktoré vyplynuli z rokovania konferencie, EFLM ustanovila osobitnú operačnú skupinu pre „Výkonnostné ciele v laboratórnej medicíne“ (TF-PG). Táto osobitná skupina sa skladá z 5 pracovných skupín Task Finishing Groups: (1) Modely výkonnostných kritérií na konkrétne laboratórne testy; (2) Harmonizácia prípustných medzí v externom hodnotení kvality; (3) Určenie celkovej chyby; (4) Výkonnostné kritériá na pred a post analytickú fázu; (5) Databáza biologickej variácie.

Prednáška sa zaoberá jednotlivými modelmi, výhodami a nevýhodami a zdôrazňuje model, ktorý by bol z praktického hľadiska pre SR najvhodnejší.

REFERENCIE

1. Balla, J., Kováč, G., Blažíček, P., Farkaš, M., Varmusová, E., Homozová, K., Balla, B., (2003): Kritériá analytickej kvality. Požiadavky na národné štandardy akosti v laboratórnej medicíne. *Laboratórna diagnostika*, 2–3, 45–60.

2. Sandberg, S., Fraser, C. G., Horvath, A. R., Jansen, R., Jones, G., Oosterhuis, W., Petersen, P. H., Schimmel,

H., Sikaris, K., Panteghini, M., (2015): Defining analytical performance specifications: Consensus Statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.*; aop, DOI 10.1515/cclm-2015-0067.

IN EXTENSO
ČLÁNKY

ČOMU JE POTREBNÉ VENOVAŤ POZORNOSŤ PRI ZAVÁDZANÍ LABORATÓRNEJ DIAGNOSTIKY NA MIESTE POSKYTOVANIA ZDRAVOTNEJ STAROSTLIVOSTI

BALLA, J.

Prešov

jan.balla[at]mail.t-com.sk

Point-of-care Testing (POCT) je diagnostický proces, ktorý sa realizuje na mieste prvotného ošetrenia pacienta. Rýchlosť laboratórnej analýzy bez časových a priestorových obmedzení predstavuje hlavnú výhodu POC testov. Krátky čas analýzy optimalizuje úvodné vyšetrenie pacienta. Lekárovi umožňuje rýchlo určiť diagnózu, promptne reagovať na zmenu zdravotného stavu pacienta a bez čakania na výsledok laboratórneho vyšetrenia začať liečbu alebo monitorovanie jeho vitálnych funkcií. Analyzuje sa plná krv a na testovanie postačuje malé množstvo. Laboratórne testovanie na mieste poskytovania zdravotnej starostlivosti redukuje preanalytické chyby a odstraňuje riziko zámeny vzoriek alebo nesprávnych odberov. Nie je potrebná doprava vzoriek do laboratória a súčasne sa redukuje riziko ich znehodnotenia počas transportu. Nový trend presúva laboratórne vyšetrenie z centrálného laboratória na miesto starostlivosti o pacienta, ako sú lôžkové oddelenia nemocníc, jednotky intenzívnej starostlivosti, operačné sály, zdravotné strediská, polikliniky, ambulancie pediatriov, špecialistov a všeobecných lekárov, rýchlu záchrannú službu a inde. Na rozdiel od centrálnej laboratórnej diagnos-

tiky, kde rast predstavuje približne 6 až 7 % ročne, sa odhaduje, že ročný nárast POCT predstavuje 10 až 15 %, pričom v niektorých oblastiach dosahuje medziročný nárast až 30 %.

Rýchle výsledky majú obrovský potenciál zlepšiť zdravotnú starostlivosť. Je však rýchlejší výsledok vždy aj kvalitným výsledkom? Nekvalitný výsledok nielenže nepomôže, ale môže viesť k nesprávnej interpretácii a dokonca pacientovi uškodiť. Analytický výkon, jednoduchosť obsluhy a užívateľská prívetivosť POCT neznamena automaticky pravdivý a presný výsledok a jeho zhodu s konvenčným laboratórnym testom s vyhovujúcou analytickou kvalitou. Ak sa pri meraní ignorujú zásady dobrej laboratórnej praxe, výsledky nie sú ani presné ani správne a dochádza k nezhodám pri porovnaní s výsledkami testov vykonaných v centrálnom laboratóriu. K nevýhodám POCT patrí absencia laboratórnej kvalifikácie a nedostatok zručnosti obsluhy a často aj nedostatočná údržba prístrojov. S POCT prístrojmi pracuje prevažne personál, ktorý nie je primárne vzdelaný a kvalifikovaný pre laboratórnú prácu. Keďže výsledky namerané POCT prístrojmi sa používajú k závažným medicínskym rozhodnutiam, sú požiadavky kladené

na ich kvalitu rovnaké, ako u laboratórnych testov. Obavy o kvalitu POCT vyšetrení vyústili v mnohých krajinách po celom svete v hierarchiu predpisov, ktoré definujú vzťahy medzi laboratóriom a POCT a obsahujú minimálne analytické požiadavky na zabezpečenie porovnateľnosti výsledkov POCT s klinickými laboratóriami. Bol zavedený štatút „spolupracujúceho laboratória“, ktoré dohliada na kvalitu POCT. Vyžaduje sa kvalifikované vzdelávanie a tréning osôb, ktoré POCT prístroje obsluhujú. Organizujú sa edukačné kurzy pre užívateľov POCT a ustanovuje sa akreditácia pracovísk. Uvedené faktory a ďalšie aspekty kvality sú pre Slovensko výzvou vybudovať rovnakú kultúru manažérstva POCT, výberu a selekcie POCT zariadení, vhodnosti ich umiestnenia, regulácie a správneho financovania, školiaceho programu, zabezpečenia a kontroly kvality, preventívnej údržby a pracovnej príručky. Zámer by mal obsahovať aspoň, ale nielen:

- **Organizáciu a manažment** POCT má zabezpečovať autorizovaný tím, ktorý musí mať nielen kompetenciu na zavádzanie inštitucionálnych zmien, ale aj prostriedky na ich uskutočnenie. Manažérsky tím musí plniť minimálne dve funkcie – supervíznu a koordinačnú.
- **Školiaci program** má mať inštitucionálnu povahu a zahrňovať všetkých zdravotníckych pracovníkov, ktorí sa na POCT testovaní podieľajú: lekári, sestry, farmaceuti, zdravotníci a farmaceutickí laboranti, zdravotnícki záchranári, zdravotnícki asistenti, laboratórni diagnostici, technici laboratórnej medicíny, medicínsko-technickí laboranti a iní zdravotnícki pracovníci. Školiaci program by mal mať charakter sústavného vzdelávania, jeho priebežného obnovovania a udržiavania získanej odbornej spôsobilosti v súlade s rozvojom POCT testovania.

Užívateľ POCT musí ovládať kalibráciu prístroja a prácu s kontrolnými vzorkami. Má viesť záznamy o zabezpečení a kontrole kvality,

o zistených nedostatkoch a ich odstránení. Musí participovať na externom hodnotení kvality a vyhovieť požadovaným štandardom kvality.

Personál má mať zručnosti v obsluhu a preventívnej údržbe prístrojov. Má rozpoznať aktuálnu chybnú funkciu prístroja a vedieť, ako sa s ňou vyrovnáť. Má mať zručnosti nevyhnuté v oblasti preventívnej údržby na užívateľskej úrovni, vedieť skontrolovať prístroj pred použitím a po meraní zanechať v stave potrebnom pre ďalšiu prácu s ním.

Cieľom tohto úsilia je zavedenie takej kultúry POCT v SR, ktorá je obvyklá vo vyspelých krajinách. Významnú úlohu v tejto oblasti zohrávajú odporúčania Medzinárodnej federácie klinickej chémie a laboratórnej medicíny (IFCC). Predmetom tohto príspevku je voľný preklad IFCC dokumentu „Thinking of Introducing PoCT – Things to Consider“, zverejneným IFCC 20.3.2014.

DEFINÍCIA PoCT

Point of Care Testing (PoCT) znamená laboratórne vyšetrenie vykonávané na mieste poskytovania zdravotnej starostlivosti.

PoCT je známe pod názvami:

- Bedside testing (Diagnostika pri lôžku pacienta)
- Near patient testing (Testovanie pri pacientovi)
- Ancillary testing (Doplnkové testovanie)
- Home testing (Testovanie doma)
- Satellite testing (Satelitné testovanie)
- Remote testing (Vzdialené testovanie)
- Physician's office laboratory testing (Laboratórne vyšetrenie v ambulancii)
- Patient self-management (Sebakontrola pacientom)

ORGANIZÁCIA A MANAŽMENT

V súčasnej dobe je k dispozícii široké spektrum PoCT prístrojov, ktoré sa používajú

v mnohých oblastiach medicíny. Na zabezpečenie spoľahlivých výsledkov musí byť pacient na vyšetrenie správne pripravený a použitý prístroj musí byť vhodný na dané použitie. Veľká rozmanitosť PoCT prístrojov, ktoré sú v súčasnosti dostupné, je pre neodborníkov mätúca a nevhodný výber PoCT prístroja môže ohroziť starostlivosť o pacienta. Ak sa PoCT využije zodpovedajúcim spôsobom, môže skrátiť čas liečby a poskytnúť potenciál na zlepšenie zdravotnej starostlivosti o pacienta. Pri selekcii prístroja je potrebné vziať do úvahy miestne a medzinárodné odporúčanie na kvalitu výkonu. Pred výberom akéhokoľvek PoCT prístroja sa najprv majú posúdiť klinické potreby. Pri posudzovaní klinických potrieb treba brať do úvahy požiadavky zdravotnej starostlivosti a analýzy, ktoré identifikujú medzery diagnostického testovania v nemocnici, na pohotovosti a počas živelných pohrôm.

Pred realizáciou PoCT treba starostlivo zvážiť nasledujúce aspekty:

- Identifikovať klinické potreby
- Náklady, prínosy a nevýhody
- Vykonať rešerš vhodných prístrojov
- Preveriť dostupnosť vhodného kontrolného materiálu (QC, EHK)
- Zaisťovať dostupnosť školenia a priebežnej technickej podpory
- Overiť životnosť spotrebného materiálu – bude dátum použiteľnosti stačiť na použitie pomôcok pred jeho expiráciou?
- Zistiť, či si spotrebný materiál vyžaduje chladenie? Ak áno, je v potrebnej miere dostupné chladiace zariadenie?
- Máme zamestnanca, ktorý môže plniť úlohy spojené s implementáciou zamýšľanej PoCT technológie?

PoCT implementácia vyžaduje systematický prístup, ktorý zahŕňa všetky zainteresované strany. Všeobecne platí, že jedna osoba z organizácie preberá zodpovednosť za výkony PoCT. Táto osoba má byť identifikovaná pred začatím procesu tak, aby mohla viesť úspešnú realizáciu.

Súčasťou procesu implementácie PoCT majú byť nasledujúce požiadavky:

- Identifikovať vhodný prístroj, ktorý spĺňa miestne pokyny a regulačné požiadavky
- Všetci pracovníci, ktorí budú vykonávať skúšky, musia podstúpiť vhodný výcvik a musia mať Osvedčenie o spôsobilosti
- Na všetky aspekty PoCT musia existovať písomné postupy a politiky
- Pracovné postupy PoCT musia obsahovať pokyny výrobcu prístroja
- Zabezpečiť optimálny chod prístroja a jeho kontrolu
- Požadovať archiváciu výsledkov. Všade tam, kde je to možné, používať elektronický prenos a archiváciu výsledkov.

VOĽBA VHODNÉHO ANALYZÁTORA

Výber vhodného PoCT prístroja je dôležitý proces, ktorý má zaručiť, aby vybraný prístroj bol najvhodnejší pre danú populáciu a starostlivosť o pacientov na danom mieste. Rozmanitosť dostupných prístrojov môže u neskúsených používateľov viesť k nesprávnej voľbe, ktorá bude mať za následok plytvanie peňazí a neschopnosť dosiahnuť očakávanú lepšiu starostlivosť o pacienta.

Pri rozhodovaní o zriadení PoCT miesta je potrebné zodpovedať na nasledujúce otázky:

- Aké testy sa požadujú?
- Aká je charakteristika patientskej populácie – budú mať jej vzorky jedinečné vlastnosti, ktoré je potrebné vziať do úvahy?
- Poskytne PoCT také výsledky, ktoré zodpovedajú klinickým potrebám?
- Aká je predpokladaná frekvencia testovania?
- Koľko operátorov musí byť vyškolených?
- Kto sa ujme vedenia pri zavádzaní PoCT?
- Vyžaduje sa liečba, poradenstvo alebo doplnujúce vyšetrenie, ktoré bude dostupné (napr. vyžaduje pozitívny výsledok konzultácie)?

- Sú k dispozícii zodpovedajúce zdravotnícke, finančné, pracovné a IT kapacity?

Výber PoCT prístroja ovplyvňuje jeho kaudencia. Pri posudzovaní PoCT prístrojov sa do úvahy berie sedem kritérií:

1. Robustnosť a vhodnosť použitia v teréne, vrátane:
 - Elektrickej prípojky
 - Chladienia
 - Prenosnosti
 - Vhodnosti pre vlhké prostredie
 - Odolnosti prachu a dostatočnej pevnosti pri doprave
 - Vhodnej životnosti
2. Jednoduché použitie:
 - Minimálna údržba
 - Minimálna príprava pacienta
 - Typ vzorky
 - Plnenie požadovaných predpisov
3. Vzdelávanie a odborná príprava:
 - Aké školenia a odborná príprava je k dispozícii a kto ich poskytuje?
 - Pomáha dodávateľ pri výcviku obsluhy?
4. Správnosť:
 - Bude bezpečný na manažment pacienta?
5. Náklady:
 - Prevádzkové náklady
 - Zvážiť fixné i variabilné náklady
 - Zvýši zavedenie PoCT prístroja finančné alebo administratívne náklady, alebo zvýši spokojnosť pacientov?
6. Pripojenie:
 - Môže byť zariadenie pripojené k lokálnej databáze na elektronický prenos výsledkov?
 - Môže sa aktualizácia softvéru vykonávať elektronicky?
7. Sú dostupné vhodné kontrolné materiály na internú kontrolu kvality (QC) a na externé hodnotenie kvality (EHK)?
 - Zaistenie správnosti a presnosti výkonu prístroja

Pri posudzovaní nákupu pri zavádzaní PoCT je dôležité, aby sa procesu rozhodovania a plá-

novania zúčastnili všetky zainteresované strany tak, aby prijaté rozhodnutia boli v súlade s klinickou praxou. Konečné rozhodnutie by sa malo prijať až vtedy, keď boli zvážené všetky vyššie uvedené otázky. Pri výbere sa odporúča navrhnúť dôležité vlastností prístroja, ktoré sú vhodné pre dané zdravotnícke zariadenie a vypracovať tabuľku, ktoré prístroje z užšieho výberu spĺňajú väčšinu žiadaných vlastností.

Odborná príprava personálu a jeho spôsobilosť

Hlavným cieľom školenia PoCT personálu je zabezpečiť dostatočný počet kvalifikovaných pracovníkov so zodpovedajúcim zdokumentovaným výcvikom a skúsenosťami. Väčšina PoCT prístrojov bola skonštruovaná tak, aby ich použitie bolo ľahko pochopiteľné a požiadavky na školenie relatívne ľahko zvládnuteľné netechnickým personálom. Avšak táto úloha sa stáva náročnou, keď sa na PoCT predpokladá veľký počet zamestnancov. Dobrá odborná príprava pracovníkov je základným stavebným kameňom systému manažerstva kvality a dobre zdokumentovaný školiaci program je jeho základňou.

Plán odbornej prípravy

Tento dokument má upriamiť pozornosť na rôzne aspekty školenia a musí obsahovať:

- Posúdenie zručností a spôsobilosti všetkých pracovníkov, ktorí budú zaradení na výkon činností PoCT, ich základnej kvalifikácie, zručnosti a skúseností.
- Posúdenie zručností a spôsobilosti personálu, ktorý bude poverený výcvikom a prípravou operátorov.
- Štandardný pracovný postup odbornej prípravy PoCT, ktorý bude požadovaný pre nových pracovníkov. Zvážiť:
 - Zdravie a bezpečnosť operátora a pacienta
 - Postarať sa, aby si pracovníci boli vedomí súčasných právnych predpisov a pokynov, vrátane medicínskych a právnych dôsledkov prenosu infekcie

v dôsledku nedostatočne bezpečnej manipulácie so vzorkami alebo ich rozliatia či vytečenia.

- Odber a manipulácia so vzorkami, vrátane osobitných požiadaviek. Postarať sa, aby boli pracovníci plne vyškolení v technike odberu, vrátane výberu vhodných odberových pomôcok a vyhýbali sa preanalytickým chybám.
- Pozitívne ID pacienta a ID pracovníka
- Poučiť pracovníkov o význame presného záznamu totožnosti operátora a pacienta aby sa zabránilo zámene a identity operátora pri nadväznosti procesu.
- Ukážka vzorkovania na PoCT a správnej obsluhy.
- Bezpečná likvidácia použitých vzoriek a odberových pomôcok.
- Včasné doručenie výsledkov ošetrovúcemu lekárovi a správna reakcia pracovníka analyzujúceho vzorky na výsledky mimo definovaných medzí vrátane archivácie výsledkov v patientských záznamoch.
- Zvýrazniť nesprávne techniky a ako sa vyhnúť chybám. Zabezpečiť, aby zamestnanci boli informovaní o typických chybách, nesprávnych technikách a výsledkoch. Poukázať na chybové hlásenia prístrojov a ich význam, čo robiť, ak zariadenia generujú chybu. Zamestnanci majú byť informovaní, že všetky nežiaduce incidenty je potrebné zaznamenávať a hlásiť.
- Kontrolu kvality, údržbu, skladovanie a manipulácia so spotrebným materiálom
- Na koho sa obrátiť, ak sa vyskytne problém so zariadením alebo doplnením spotrebného materiálu
- Určiť, ako najlepšie vykonať školenie. Najlepší prospech majú účastníci zvyčajne z kombinácie samoštúdia a praktickej demonštrácie. Samoštúdium by malo zahŕňať kontext a klinickú užitočnosť výsledkov, teoretické aspekty meracieho

systému a pokyny pre dobrú PoCT prax na použitie a údržbu zariadenia.

- Definovať, ako bude odborná príprava zdokumentovaná.
- Stanoviť frekvenciu preškolenia alebo dobu na overenie spôsobilosti. Pravidelné preškolenie je dôležité aj u skúsených prevádzkovateľov, aby sa zabránilo zlým návykom. Odporúča sa preškolenie pracovníkov alebo posúdenie spôsobilosti všetkých prevádzkovateľov na ročnej báze.
- Nakoniec sa musí venovať náležitá pozornosť tomu, ako sa bude odborná príprava vyhodnocovať a monitorovať a aké nápravné opatrenia by mali byť prijaté, ak sa nedodrží vytýčený štandard.

Odborná príprava školiteľa

- Určiť, kto bude školenia viesť.
- Zabezpečiť, aby táto osoba (tieto osoby) mali potrebnú kvalifikáciu, skúsenosti a schopnosti na školenie iných osôb a aby to bolo zdokumentované v ich záznamoch.
- Určiť vedenie odbornej prípravy školiteľov a hodnotenie ich spôsobilosti.
- Viesť dokumentáciu o vzdelávaní a posudzovaní spôsobilosti.

Odborná príprava operátorov (prevádzkovateľov)

- Vypracovať Plán školení pre príslušný počet zamestnancov.
- Zabezpečiť, aby operátori mali predpísanú kvalifikáciu a skúsenosti a aby tieto boli zdokumentované v záznamoch o ich vzdelávaní.
- Zabezpečiť preštudovanie materiálu pred školením.
- Určiť vedenie odbornej prípravy operátorov (prevádzkovateľov) a hodnotenie ich spôsobilosti.
- Viesť dokumentáciu o vzdelávaní a posudzovaní spôsobilosti.

POCT KOORDINÁTOR

Zavádzanie laboratórnej diagnostiky na mieste poskytovania zdravotnej starostlivosti by malo byť systematickým procesom, na ktorom participujú všetky zainteresované strany. Ad hoc prístupy sú potenciálne nákladné a ohrozujú bezpečnosť pacientov. Aby sa predišlo takejto situácii, mal by byť menovaný PoCT koordinátor. PoCT koordinátor by mal byť skúsený zdravotnícky pracovník z nemocnice alebo laboratória alebo špecialista na PoCT služby. Povinnosti PoCT koordinátora zahŕňajú celkový dohľad a riadenie laboratórneho testovania na mieste poskytovania zdravotnej starostlivosti, zabezpečujúce súlad s politikami a štandardami kvality predovšetkým vo vzťahu k výberu a hodnoteniu prístrojov, školenia zamestnancov a posudzovania spôsobilosti, dohľadu nad celým procesom skúšania (testovania), kontroly a zabezpečenia kvality a riešenie technických problémov.

V spolupráci so zdravotnými sestrami a lekármí predstavuje PoCT koordinátor veľmi dôležitú funkciu. Organizácie by si mali zriadiť Komisie pre PoCT aby dohliadali na služby laboratórneho testovania na mieste poskytovania zdravotnej starostlivosti. PoCT komisia ma byť zodpovedná za hodnotenie a stanovenie priorít nových testov a racionálne využívanie obmedzených zdrojov. Pri veľkom počte PoCT testov, ktoré každý rok narastajú a ktoré sa vyvíjajú na ďalšie nové ochorenia (napr. vtáčia chrípka, H1N9 v Číne; koronavírus [nazvaný podľa toho, že vizuálne pripomína slnečnú korónu] blízkovýchodného respiračného syndrómu v Saudskej Arábii – MERS CoV [ktorý spôsobuje dýchacie ťažkosti a zlyhanie obličiek]), PoCT komisia pozorne definuje klinické indikácie, skupiny testov a odôvodnené programy pred schválením laboratórnej diagnostiky na mieste poskytovania zdravotnej starostlivosti.

Nadväznosť meraní

Prínos vyšetrenia u pacienta pre zdravotnícke organizácie je dobre zdokumentovaný, ale riziká

a komplikácie vyplývajúce zo zle zavedeného laboratórneho testovania na mieste poskytovania zdravotnej starostlivosti sa nesmú podceňovať. Preto za účelom zníženia rizika pre pacientov a zdravotnícke zariadenie na prijateľnú úroveň, laboratórne testovanie na mieste poskytovania zdravotnej starostlivosti má byť vykonávané v súlade s robustným Systémom manažérstva kvality (SMK).

Kľúčom k realizácii SMK je dobre premyslený a zdokumentovaný plán, ktorého cieľom je zabezpečiť dodržiavanie radu politík a v neposlednom rade zodpovednosť a preskúmanie manažmentom.

1. Zvážiť použitie ISO 22870: 2006. „PoCT. Vyšetrenie pri pacientovi. Požiadavky na kvalitu a spôsobilosť“ ako základ na stanovenie formálneho SMK.
2. Zvážiť získanie akreditácie pre testovanie u pacienta príslušným orgánom, ktorý uznáva a berie do úvahy špecifické požiadavky PoCT.
3. Obvyklá technika, ktorú externí audítori používajú, je náhodný výber jedného alebo viacerých výsledkov a preskúmať ich súlad v každom kroku s SMK:
 - Dá sa výsledok testu presne vystopovať k pacientovi?
 - Bol výsledok stanovený kvalifikovanou osobou?
 - Vyskytli sa nejaké chybové kódy alebo podmienky mimo povolené rozmedzie?
 - Dá sa výsledok testu presne vystopovať k osobe, ktorá test vykonala?
 - Bol prevádzkovateľ oprávnený vykonať skúšku v daný čas?
 - Bol prístroj náležite udržiavaný, kalibrovaný, kontrolovaný a v čase skúšky prevádzkovaný v normálnom režime?
 - Bol spotrebný materiál, použitý pri skúške, v rámci doby použiteľnosti?
 - Bol spotrebný materiál skladovaný podľa pokynov výrobcu pri vhodnej teplote, vlhkosti, na tmavom mieste, atď.?
 - Je na mieste výkonu dostupný Štandardný pracovný postup(ŠPP), ktorý podrobne

popisuje uvedené aspekty? Je to platný riadený dokument?

4. Oddiel 3 nie je vyčerpávajúci zoznam a odpovede na všetky otázky musia byť ÁNO. Je veľmi dôležité, že všetky tvrdenia ÁNO musia byť podopreté písomnými dôkazmi. Treba mať teda systémy, ktoré sú založené na dôkazoch.

KONTROLA KVALITY

Na riadenie a hodnotenie analytickej kvality používajú laboratória internú kontrolu kvality (IQC) a externé hodnotenie kvality (EHK). Tieto nástroje hodnotenia kvality by sa mali aplikovať tiež na PoCT a mali by sa vykonávať prevádzkovateľmi na všetkých PoCT prístrojoch. Vhodné odporúčania na kontrolu kvality sú najlepšie schopní pripraviť laboratórni špecialisti, ktorí vedú prispôbiť programy kontroly kvality bez zbytočnej komplikovanosti tak, že správne vykonávať ich budú vedieť aj nelaboratórni pracovníci (prevádzkovatelia PoCT) v nelaboratórnom prostredí. Do úvahy je pritom potrebné vziať stupeň technologickej vyspelosti PoCT, úroveň pripojenia a objem vyšetrovaných pacientov.

Cieľom kontroly kvality je zabezpečiť, aby prevádzkovateľ PoCT vykonával vyšetrenia správne, aby testovanie bolo spoľahlivé a rutinná práca kvalitná, a aby výsledky odpovedali očakávaným (cieľovým) hodnotám kontrolného materiálu. Kontrolný proces zahŕňa testovanie kontrolného materiálu, okamžité vyhodnocovanie výsledkov a identifikáciu chýb na prípravu a prijatie nápravných opatrení. Ak výsledky kontrolných meraní zlyhajú, vyšetrenie pacientov sa nemá vykonávať dovtedy kým sa problém neodstráni.

Externé hodnotenie kvality (EHK), vo svete tiež známe aj ako Skúšky spôsobilosti (PT), je testovanie neznámych vzoriek z externého programu rovnakým spôsobom ako vzorky pacientov. Kontrolné vzorky sú posielané niekoľkokrát za rok a výsledky sú vyhodnotené

prevádzkovateľom EHK programu (EHK organizáciou) a porovnané s výsledkami ostatných účastníkov.

Voľby programov, uchovávanie vzoriek, postup písania pracovných postupov, zaškolenie obsluhy a prehľad výsledkov a nápravných opatrení sú hlavné prvky, ktoré je potrebné zvládnuť pri zavádzaní vnútornej (internej) kontroly kvality (IQC) alebo externého hodnotenia kvality (EHK). Prevádzkovatelia by mali v evidencii dokumentovať všetky prijaté nápravné opatrenia, keď IQC alebo EHK zlyhá.

Programy kontroly kvality PoCT

Na laboratórnych typoch prístrojov sa vykonáva denná kontrola pomocou kontrolných materiálov s rôznymi koncentračnými hladinami. Na druhej strane mnoho PoCT prístrojov nie je prispôbených tradičným laboratórnym kontrolným systémom (prístroje využívajúce prúžky alebo kazety) a nové generácie PoCT prístrojov majú zabudovanú (elektronickú) kontrolu kvality, ktorá automaticky kontroluje zariadenie. U týchto prístrojov by laboratórni špecialisti mali zvážiť o aký typ prístroja ide a na akých častiach prístroja bude vykonávaná kontrola kvality (frekvencia a povaha kontrolných materiálov). Univerzálny návod neexistuje a na kontrolu kvality sa musia použiť odporúčania výrobcu podľa typu prístroja a miesta použitia. Okrem toho, keď bol prístroj fyzicky poškodený alebo mal poruchu, keď bola vykonaná kritická údržba alebo sa vymenilo veľa spotrebného materiálu a reagensov, alebo vznikla pochybnosť o nameranom patientskom výsledku, je potrebné vykonať ďalšie kontrolné testovanie. Kontrolu kvality majú vykonávať všetci pracovníci, pretože jej cieľom je vyhodnotiť aj výkon rutinnej obsluhy. Hodnotenie výsledkov v rutine by mali vykonávať samotní operátori aby v prípade potreby vedeli sami prijať okamžité nápravné opatrenie. Dokumentáciu kontroly kvality a posúdenie, či sú operátori dostatočne kvalifikovaní na kontrolu kvality, skúšanie a interpretáciu, by mali pravidelne preskúmať laboratórni špecialisti.

Externé hodnotenie kvality (EHK)

Účast' v EHK sa odporúča pre každý analyzovaný parameter a každý prístroj. Môže byť povinná v závislosti od miestnych a národných predpisov, čo je tiež požiadavka normy ISO 22870. Ak v ponuke nie je dostupný žiadny program EHK, môžu sa namiesto kontrolných vzoriek rozposlať medzi laboratóriá alikvotné objemy patientskych vzoriek. Avšak paralelné meranie patientskych vzoriek prístrojmi PoCT a centrálnym laboratóriom (korelácie) nie je k EHK programu alternatívou. Testovanie v EHK má byť vykonané PoCT operátormi, ale preskúmanie výsledkov musia vykonať laboratórni špecialisti. Spätnú väzbu musia vykonať PoCT prevádzkovatelia.

PREANALYTICKÉ CHYBY

Chyby v preanalytickej fáze obvykle spadajú do dvoch kategórií:

- Problémy identifikácie.
- Problémy vzorkovania.

Je veľmi dôležité, aby počas vyšetrenia PoCT boli preanalytické chyby pod kontrolou. PoCT vyšetrenia sa zúčastňuje viac pracovníkov ako pri tradičnom vyšetrení a preto existuje aj vyššie riziko vzniku chyby.

Identifikácia vzoriek

Nesprávne alebo chýbajúce ID môže byť jedným z najkritickejších chýb pri vyšetrení PoCT. ID chyby môžu viesť k nezhode s miestnymi a národnými regulačnými požiadavkami, k chybnéj diagnóze, nesprávnej liečbe pacienta, potrebe nového odberu a strate príležitosti vykázať test, ktorý nemôže byť vyúčtovaný.

ID chyby sú zvyčajne spôsobené:

- Chýbajúcou identifikáciou pacienta alebo štítku vzorky
- Prepisom chyby spôsobenej manuálnym zadávaním dát
- Chýbajúcim pracovným postupom na identifikáciu pacientov a vzoriek.

Možné spôsoby, ako zabrániť týmto chybám:

- Použiť aspoň dva identifikátory pacienta pri odbere vzoriek, napr. meno a dátum narodenia pacienta alebo prírastkové číslo
- Použiť odberovú súpravu s čiarovým kódom, ak je taká k dispozícii
- Overiť, že vzorka je opatrená štítkom ID pacienta ešte pred jej odoslaním
- Zadávať identifikátor pacienta do analyzátora vždy pred analýzou
- Používať čítačku čiarových kódov, ak je k dispozícii, a to ako pre identifikáciu pri lôžku pacienta tak aj pri analyzátore a tak sa vyhnúť prepisovým chybám.

Ukážky problémov

Príklady problémov vzorkovania sú:

- Nesprávny typ vzorky
- Hemolyzovaná vzorka
- Zrazená vzorka
- Nesprávne objem naplnenia vzorky
- Málo vzorky
- Nedostatočné premiešanie vzorky
- Kontaminovaná vzorka
- Nesprávne uchovávanie (skladovanie) vzorky a/alebo jej transport.

Prostriedky ako zabrániť týmto typom chýb sú závislé na type analytu, odberovej súprave a samotnom analyzátore. Rozhodujúce je, aby sa striktne dodržiavali štandardné pracovné postupy. Dodávatelia sú schopní poskytnúť návod, ako sa vopred vyhnúť preanalytickým chybám.

Post analytické chyby

Zďaleka najbežnejšie post analytické chyby vznikajú pre prepisovanie. Tie sa môžu ďalej deliť na jednoduché číslicové chyby, nesprávne zaokrúhlenie alebo náhodné blikanie číslic. Niekedy nie je výsledok zapísaný v zázname pacienta alebo denníku buď z dôvodu urgentnej starostlivosti o pacienta, alebo rozhodnutím ignorovať dáta, ktoré neprispeli ku klinickému rozhodnutiu. Chybná interpretácia výsledku, najmä pokiaľ ide o zmenu farby, ktoré musia byť spárované v niekoľkých rôznych odtieňoch, je tiež obyčajná post analytická chyba.

ODBER VZORIEK

Je známe, že kvalita vzorky má významný vplyv na platnosť výsledku. Preto je výcvik techniky kapilárneho odberu, ako napr. vpich do prsta, odber žilovej alebo artériovej krvi, kľúčový. Aj keď PoCT prebieha v blízkosti pacienta a vzorky nevyžadujú dopravu do laboratória, musia byť dodržané rovnaké požiadavky na odber vzoriek ako pri akomkoľvek inom diagnostickom testovaní.

Očistenie pokožky

Miesto vpichu sa má očistiť tampónom s alkoholom. Dohliadnuť na to, aby oblasť vpichu bola dôkladne suchá, aby sa minimalizovalo štipanie v mieste vpichu a aby sa znížilo riziko hemolýzy. Je potrebné sa vyhnúť tampónom s alkoholom, ktorý obsahuje glycerínové prídavné látky, pretože tieto môžu pri vyšetrení interferovať.

Kapilárny vpich

Ak chceme zvýšiť kapilárny prietok aby sa získal dostatočný objem krvi už s prvou lancetkou, pacienti si môžu umyť ruky pod teplou vodou, energicky si trieť ruky alebo použiť tepelný zábal. U dospelých pacientov sa na vpich zvyčajne preferuje prostredník alebo prstenník. Do malíčka sa vzhľadom k nedostatočnej hĺbke tkaniva nepichá, vpich do ukazováka môže spôsobiť jeho znecitlivenie. Treba sa vyhnúť nadmernému stláčaniu prsta, pretože vedie k hemolýze vzorky a prieniku tkanivovej tekutiny do vzorky. Na vpich sa majú používať iba jednorazové odberové pomôcky.

Venepunkcia

Na odber žilovej krvi (ale nie artériovej) treba pevne utiahnuť škrtidlo. Na odber krvi sa obvykle používa stredná laktová žila (*vena mediana cubiti*), bazilárna žila (*vena basilica*) alebo hlavová žila (*vena cephalica*). Výber lokality závisí od niekoľkých faktorov ako je vek pacienta, celkový zdravotný stav pacienta, predchádzajúce odbory a stav žíl, odbornosť a zručnosť odberového pracovníka a poža-

dovaný objem krvi. Na zastavenie krvácania po skončení odberu sa na odberové miesto má vyvinúť dostatočný tlak. Pri odbere nezrážavej krvi sa vzorka musí dostatočne premiešať jemným otáčaním 8–10 krát.

Artériová punkcia

Artériové vzorky sa získavajú perkutánnou punkciou vretenovej tepny (*arteria radialis*), pažnej tepny (*arteria brachialis*) alebo stehennej tepny (*arteria femoralis*). Vzorky artériovej krvi na vyšetrenie krvných plynov sa odoberajú do plastových striekačiek, ktoré sú heparinizované aby sa zabránilo zrážaniu krvi. Injekčná striekačka nesmie obsahovať vzduchové bubliny a mala by sa predkláňať dopredu a dozadu, aby sa heparín premiešal so vzorkou, a až do analýzy krútiť na valci vo vodorovnej polohe aby sa zabránilo oddeleniu plazmy. Po odbere sa odberové miesto musí silne stlačiť po dobu najmenej piatich minút, u pacientov s predĺženou dobou zrážania 10–15 minút.

Kontrola infekcie

Úspešná prevencia a kontrola infekcie zahŕňa dvojstupňové pracovné postupy, ktorými sa predchádza prenosu infekčných agens. Jedná sa o štandardné bezpečnostné opatrenie, ktorá zahŕňa použitie Osobných ochranných prostriedkov (OOP) ako sú rukavice, okuliare, masky, zástery a bezpečné používanie ostrých predmetov a ďalšie preventívne bezpečnostné opatrenia na zábranu prenosu infekcií.

Pripojenie

Najjednoduchšie povedané, pripojenie PoCT prístroja sa v podstate vzťahuje na schopnosť nastavenia, ktoré umožňuje PoCT prístroju byť pripojený k počítaču, ktorý má vyhradený špecifický softvér pre správu dát, ktoré dostáva z prístroja. Softvér, ktorý umožňuje prepojiť softvérové komponenty a aplikácie v distribuovanom prostredí, sa nazýva „middleware“. Jedná sa o integračný nástroj, ktorý zaisťuje prenos dát medzi rôznymi komponentmi technickej časti informačného systému.

Pojem „Správa zariadenia“ (dátový manažér) zahŕňa vstup pre diaľkový prenos informácií do PoCT prístroja, ktoré predtým bolo treba zadávať ručne priamo do prístroja. To sa dosiahne zadáním PoCT špecifických položiek do dátového manažéra alebo naskenovaním čiarových kódov a potom nahraním informácií do PoCT prístroja.

Tieto položky zahŕňajú:

- Rozmedzia kontrolných limitov
- Kritické referenčné rozmedzia
- Reagencie/prúžky/čísla šarží
- Expiračné dátumy
- Zoznamy oprávnených pracovníkov
- Identifikátory pacientov (napr. číslo zdravotného záznamu, prírastkové číslo, dátum narodenia, miesto)
- Vymazanie údajov z pamäte prístroja.

Správa dát (dátový manažér) znamená zhromažďovanie, prenos a spracovanie informácií z PoCT prístroja. Do dátového manažéra sa môžu zadať pokyny a tie sa potom prenášajú do PoCT prístroja. Dátový manažér vyhodnocuje výsledky a akceptuje len tie, ktoré neporušujú zadané pravidlá, v opačnom prípade sú výsledky prenášané do chybového zoznamu. Napríklad, je zadaný písomný pokyn, že jeden z identifikátorov pacienta má byť 6-miestne číslo zdravotného záznamu (chorobopisu). Ak je zadaných menej alebo viac číslíc potom je výsledok prenesený do chybového zoznamu a je tam držaný dovtedy, kým ho operátor preskúma a potom ručne prenesie do výsledkovej databázy. Správa dát umožňuje sledovanie verifikácie výsledkov operátorom a môže generovať grafy, takže údaje o pacientovi a kontrole kvality sa dajú monitorovať.

V nemocniciach aj poliklinikách sú správy dát (dátové manažére) čoraz častejšie prepojené s laboratórnymi a nemocničnými informačnými systémami, takže výsledky pacientov môžu byť priamo prevedené do lekárskej dokumentácie pacienta. Toto vyžadujú zdravotnícke zákony v USA, Európe a niektorých ďalších rozvinutých krajinách, ktoré podmieňujú dokumen-

tačnú trasu spájajúcu výsledok pacienta s jeho identifikáciou a poskytovateľom zdravotníckej starostlivosti, ktorý vykonal skúšku, a jeho kvalifikáciu s použitým prístrojom a záznamami o činidlách a kontrolách použitých pri skúške.

Existuje celý rad dodávateľov, ktorí ponúkajú middleware a správu dát pre PoCT prístroje. Ich rozdiely spočívajú v type PoCT prístrojov, ktoré sa môžu pripojiť, nákladoch na vybavenie a licenčných poplatkoch, užívateľskej prívetivosti a technickej podpore pokrytia. Posledné dve položky sú obzvlášť dôležité pri výbere dátového manažéra, pretože užívateľská prívetivosť a prístupný tím technickej podpory garantujú, že dáta možno získať rýchlo a upraviť tak, aby sa dali analyzovať trendy a problémové prístroje.

BEZPEČNOSŤ A LIKVIDÁCIA ODPADOV

Výšetrenie PoCT má byť vykonávané tak, aby neohrozilo bezpečnosť prevádzkovateľa ani pacienta. Požadujú sa štandardné opatrenia starostlivosti a zaobchádzania s pacientmi bez ohľadu na vnímané infekčné riziká všade tam, kde dochádza ku akémukoľvek kontaktu s krvou, telesnými tekutinami, poranenou pokožkou a sliznicou.

Umývanie rúk je všeobecne považované za najdôležitejšie opatrenie proti šíreniu infekcie. Ruky by sa mali umývať pred kontaktom s pacientom, po kontakte s pacientom a po kontakte s telesnou tekutinou bez ohľadu na to, či sa používajú ochranné rukavice.

Pre PoCT platia:

- Praktiky osobnej hygieny, najmä hygieny rúk
- Používanie osobných ochranných prostriedkov
- Bezpečná manipulácia a likvidácia lanciet a ihlíc a iných klinických odpadov. Používať sa majú iba jednorazové odberové pomôcky
- PoCT prístroj a okolitá pracovná plocha má

byť denne očistená. Rozliata krv a všetky rozliate telesné tekutiny majú byť vyčistené ihneď.

Všetky odberové lancetky a ihly, prúžky a kazety sa majú považovať za nebezpečný odpad a likvidovať v kontajneri na to určenom. Ďalší odpad, vrátane tkanív alebo tampónov, ktoré sú kontaminované krvou alebo telesnými tekutinami, musia byť uložené do plastového vrečka a spálené.

LITERATÚRA

1. **Kost, G. J.:** Goals, guidelines and principles for point-of-care testing. In: Kost, G. J., ed.: *Principles and practice of point-of-care testing*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2002, Chapter 1, pp. 3–12.

2. **Lewandrowski, K., Gregory, K., Macmillan, D.:** Assuring quality in Point-Of-Care testing. Evolution of technologies, informatics, and program management. *Arch. Pathol. Lab. med.*, 2011; 135: 1405–1414.

3. **Gill, J. P., Shephard M. D. S.:** The conduct of quality control and quality assurance testing for POCT outside the laboratory. *Clin. Biochem. Rev.*, 2010; 31: 85–88.

4. **Martin, C. L.:** Quality Control issues in point of care testing. *Clin. Biochem. Rev.*, 2008; 29 Suppl (i): S79–S82.

5. **Ng, V. L.:** QC for the future: laboratory issues – POCT and POL concerns. *Labmedicine*, 2005; 36: 621–625.

6. International Organization for Standardization (ISO). Point-of-care testing (POCT). Requirements for quality and competence. *Document ISO 22870: 2006*, Geneva.

7. **ISO 22870: 2006.** PoCT. Vyšetrenie pri pacientovi. Požiadavky na kvalitu a spôsobilosť.

8. **ISO 15189: 2012.** Medicínske laboratória. Požiadavky na kvalitu a spôsobilosť.

9. **ISO 22870: 2006.** Vyšetrenie pri pacientovi (POCT). Požiadavky na kvalitu a spôsobilosť.

10. **ISO 15189: 2012.** Medicínske laboratória. Požiadavky na kvalitu a spôsobilosť.

UŽITOČNÉ ZDROJE

1. www.acutecaretesting.org
2. <http://labtestsonline.org>
3. <http://www.pointofcare.net>
4. <http://www.specimencare.com>
5. www.appn.net.au
6. <https://www.aacc.org/members/divisions/cpoc/pages/default.aspx>
7. <http://www.cap.org/apps/cap.portal>
8. Preamalytika krvných plynov. Aplikácie pre iPhone, iPad, Android a Windows telefón. (Vedecký obsah sponzorovaný Radiometrom).

REFERENCIE

1. **Balla, J.:** Why we should pay attention to near patient testing. 16. výročná konferencia Slovenskej spoločnosti pre laboratórnu medicínu. Martin, 2014.

2. **Springer, D.:** Omezení a možnosti spolupráce uživatelů POCT systémů a laboratoře, kontrola kvality a výběr nejvhodnějšího systému. 16. výročná konferencia Slovenskej spoločnosti pre laboratórnu medicínu. Martin, 2014.

3. **Wahlstedt, J.:** How is Point-of-Care Testing Organized in Finland. Laboratórna medicína 2014. 16. výročná konferencia Slovenskej spoločnosti pre laboratórnu medicínu. Martin, 2014.

4. **Balla, J.:** Kontrola kvality v klinickom laboratóriu a POCT. XI. kongres Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie. Martin, 2014.

5. **Vindiš, J., Strigáčová, J.:** Máme sa obávať decentralizácie v klinickom laboratóriu? XI. kongres Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie. Martin, 2014.

6. **Vasilenková A., Behúlová D., Václavíková M., Brenner M., Kováčiková L.:** POCT a pediatrické laboratórium. XI. kongres Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie. Martin, 2014.

7. **Lipták, D.:** POCT v ambulancii všeobecného lekára. XI. kongres Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie. Martin, 2014.

8. **Balla, J.:** Point of care testing. Diagnostika a zabezpečenie kvality. VIII. kongres Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie. Bratislava, 2008.

VYUŽITIE FLUORESCENČNEJ SPEKTROMETRIE PRI DIAGNOSTIKE RAKOVINY KRČKA MATERNICE

FIALKOVIČOVÁ V.¹, VELIKÁ B.², URDZÍK P.¹, OSTRÓ A.¹
MAREKOVÁ, M., RABAJDOVÁ M.^{2*}

¹Gynekologicko-pôrodná klinika UNLPKošice a UPJŠ LF v Košiciach

²Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF v Košiciach

*corresponding autor: mrabajdova[at]gmail.com

SÚHRN

Rakovina krčka maternice je celosvetovo druhým najčastejším onkologickým ochorením postihujúcim ženskú populáciu. Predstavuje približne 10 % všetkých nádorových ochorení u žien a je tretím najčastejším onkogynekologickým ochorením žien, pričom u žien vo veku 15–44 rokov je najčastejším rakovinovým ochorením. Krčok maternice predstavuje anatomickú štruktúru ľahko dostupnú rôznym klinickým vyšetreniam, čo vytvára predpoklad pre včasnú detekciu karcinómu cervixu, avšak napriek tomu toto ochorenie predstavuje aj naďalej veľký zdravotnícky problém. Včasná diagnostika umožňuje aj skorší terapeutický zásah, a tým aj vyššiu šancu na vyliečenie. Je všeobecne známe, že nádorové bunky majú v porovnaní so zdravými odlišný metabolizmus, vďaka čomu dochádza aj k zmene zastúpenia jednotlivých metabolitov, vrátane autofluorescenčných. Práve kvôli tejto ich vlastnosti sa v oblasti výskumu do popredia dostávajú moderné techniky fluorescenčnej spektrometrie, ktorých výhodou je nielen vysoká citlivosť pre širokú paletu potenciálnych ana-

lytov, opakovateľnosť meraní, jednoduchosť, ale aj vyššia selektivita v porovnaní s inými spektrometrickými metódami.

Kľúčové slová: rakovina krčka maternice, fluorescenčná spektrometria, autofluorescencia

SUMMARY

Cervical cancer is a malignant disease, which is part of everyday oncological practice. Cervical cancer is the second most common oncological worldwide disease affecting the female population. It represents approximately 10 % of all cancer in women, it is the third most common cancer in women, and the most common cancer in women in the age 15–44 years. The cervix represents easily accessible anatomical structure for clinical examinations, which creates conditions for early detection of cervical cancer, but nevertheless, the disease remains a major health problem. Early diagnosis allows an earlier therapeutic intervention and a higher chance of recovery. It is well known that the cancer cells in com-

parison with healthy cells showed differences in metabolism, what caused different distribution of individual metabolites, including autofluorescent metabolites. Because of this characteristics modern techniques of fluorescence spectrometry come to the foreground in the research, the advantage of this method is high sensitivity for a wide range of potential analytes, reproducibility, simplicity, but also a higher selectivity in comparison with other spectrometric techniques.

Key words: cervix uteri cancer, fluorescence spectrometry, autofluorescence

ÚVOD

Karcinóm krčka maternice je celosvetovo druhým najčastejším malígnym nádorom ženských pohlavných orgánov a tretím najčastejším nádorom postihujúcim ženskú populáciu. Ročne sa vo svete diagnostikuje približne 500 000 nových prípadov tohto ochorenia (Ferlay et al., 2010). Základným etiologickým faktorom rakoviny krčka maternice je ľudský papilloma vírus (HPV) (Redecha, 2007; Garland a Smith, 2010). HPV sú malé DNA vírusy patriace do čelade *Papillomaviridae* (Weismanová et al., 2008). Z celkového počtu 118 dodnes objavených rôznych genotypov má 13 genotypov vysoké karcinogénne riziko (HR HPV). Infekcia HPV je chronický proces a väčšinou prebieha bezpríznakovo, v 90 % infekcia HPV počas života úplne vymizne (Rotterová, 2008). Samotná infekcia je základnou, nie však dostatočujúcou podmienkou vzniku karcinómu, nevyhnutné sú kofaktory, ktoré umožnia DNA (deoxyribonukleová kyselina) vírusu uplatniť sa v hostiteľskej bunke (Berg et al., 2005). Ide predovšetkým o procesy súvisiace so supresiou celkovej alebo lokálnej imunity. Mnohonásobne častejšie sú karcinómom krčka postihnuté ženy s AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) alebo po dlhodobej imunosupresívnej liečbe. Častejšie sa v praxi stretávame s ovplyvnením

lokálnej imunity pri neustále sa opakujúcich alebo chronických vaginálnych infekciách vírusového, či bakteriálneho pôvodu (Stern et al., 2005).

Rakovina krčka maternice je pomerne rôznorodá skupina zhubných nádorov. Najčastejším typom je rohovatejúci a nerohovatejúci epidermoidný karcinóm (80–85 % prípadov), ktorý vychádza z dlaždicového epitelu. Na druhom mieste sa nachádzajú adenokarcinómy, vychádzajúce zo žľazových buniek krčka maternice, ktoré tvoria 10–15 % (Jenkins, 2007; Chovanec a Dostálová, 2008). Ostatné histopatologické typy nádoru krčka maternice sa objavujú veľmi zriedkavo (Špaček et al., 2011).

Zavedením skriningových programov do praxe, následného včasného zachytávania a liečby prekanceróz je výskyt rakoviny krčka maternice v porovnaní s minulosťou nižší o viac ako polovicu, no aj napriek tomu toto ochorenie predstavuje aj naďalej veľký zdravotnícky problém (Redecha et al., 2004; Ondrušová a Pšenková, 2013). Viac ako 45 % tohto ochorenia sa u nás diagnostikuje v začiatočnom štádiu. Zarážajúci však zostáva výskyt 20–29 % ochorení v II. štádiu, 17–21 % v III. štádiu a vyše 5 % výskytu v IV. štádiu (Redecha et al., 2006).

Dôležitú úlohu pri odhaľovaní perzistencie či recidívy onkologického ochorenia okrem klasickej diagnostiky (napr. ultrasonografia –USG, magnetická rezonancia – MR, počítačová tomografia – CT, pozitronová emisná tomografia – PET) zohrávajú aj rôzne analytické metódy, pričom stále väčší význam získavajú spektrálne metódy umožňujúce jednoduchú, rýchlu a cenovo dostupnú analýzu (Tóthová a Sádecká, 2010; Šteffeková a kol., 2015). V oblasti výskumu sa do popredia dostávajú moderné techniky fluorescenčnej spektrometrie, ktorých výhodou je nielen vysoká citlivosť pre širokú paletu potenciálnych analytov, opakovateľnosť meraní, ale aj vyššia selektivita v porovnaní s inými spektrofotometrickými metódami (Zvarík a Šikurová, 2013; Birková et al., 2014). Analýza mnohozložkových vzoriek sa uskutočňuje pomocou trojrozmerných luminescenčných spektier, ktoré sa získavajú meraním

emisných spektier pri rôznych excitačných vlnových dĺžkach. Výsledkom je emisno-excitačná dátová matica (EEM). EEM zobrazuje celkový profil intenzít fluorescence vzorky v rozsahu skenovaných excitačných a emisných vlnových dĺžok, a tým aj umožňuje vyššiu selektivitu. Druhým typom spektra, ktoré sa využíva na analýzu mnohozložkových vzoriek je trojrozmerný synchronný fluorescenčný fingerprint (SFF). Tento typ spektra sa využíva napr. na sledovanie fluorescenčných zmien krvnej plazmy a krvného séra pacientov s diagnostikovanými rakovinovými ochoreniami (Madhuria Aruna, 1997; Guľašová et al., 2014).

MATERIÁL

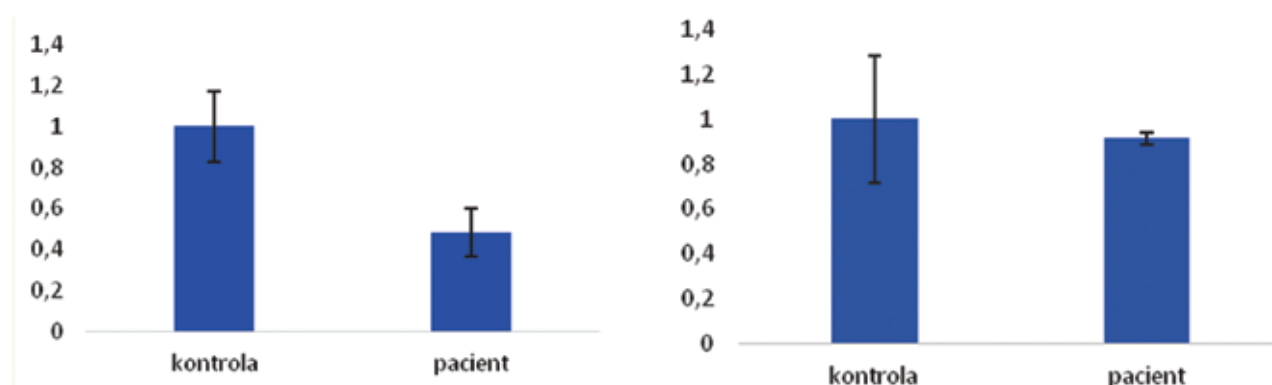
Študijnú skupinu tvorilo 15 pacientok s diagnostikovaným nádorom krčka matrice a kontrolnú skupinu 10 žien. Pacientky boli oboznámené s experimentálnym zámerom a podpísali informovaný súhlas. Odber bol realizovaný kvôli potrebným klinickým vyšetreniam a na analýzu bola odobratá časť krvi pacientiek Gynekologicko-pôrodnicej kliniky UPJŠ LF a UNLPA Gynekologického odd. VOÚ v Košiciach. Krv bola po odbere centrifugovaná 5 minút pri 3 500 otáčkach. Všetky získané vzorky krvného séra a krvnej plazmy boli zmrazené a uskladnené pri teplote -80°C .

METÓDY

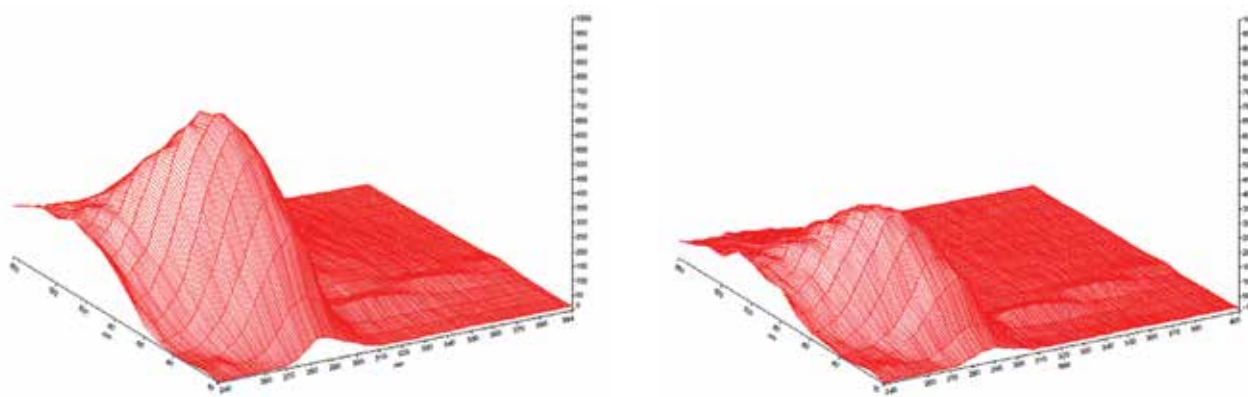
Autofluorescencia vzoriek krvnej plazmy bola meraná vo fosfátovom tlmivom roztoku (PBS) s výsledným pH = 7,4. PBS pozostával z K_2HPO_4 (ITES a. s., Vranov nad Topľou), $c = 0,2 \text{ mol/l}$ a KH_2PO_4 (ITES a. s., Vranov nad Topľou), $c = 0,2 \text{ mol/l}$. Vzorky krvnej plazmy boli tesne pred meraním nariadené v PBS (pH = 7,4). Autofluorescencia vzoriek krvnej plazmy pomocou synchronných fluorescenčných fingerprintov (SFF) bola meraná v kremennej kyvete so šírkou 1 cm, pri izbovej teplote na spektrofotometri Perkin-Elmer LS 55 (Perkin-Elmer, USA). SFF každej vzorky boli merané v rozsahu vlnových dĺžok $\lambda = 240 - 400 \text{ nm}$, s rýchlosťou merania 1200 nm/s , a veľkosťou excitačnej a emisnej štrbiny 5 nm. Výsledky fluorescenčných meraní jednotlivých vzoriek vo forme SFF boli zhotovené z 15 skenov umiestnených vo vzdialenosti $\text{Dl} = 10 \text{ nm}$ (inkrement) a vyhodnotené pomocou softvéru FL WinLab (verzia 4, 2001).

Štatistická analýza nameraných SFF bola spracovaná pomocou programu GraphPadInSTAT. Štatistická významnosť medzi priemernými hodnotami kontrolnej skupiny a experimentálnej skupiny bola vyhodnotená ANOVA testom.

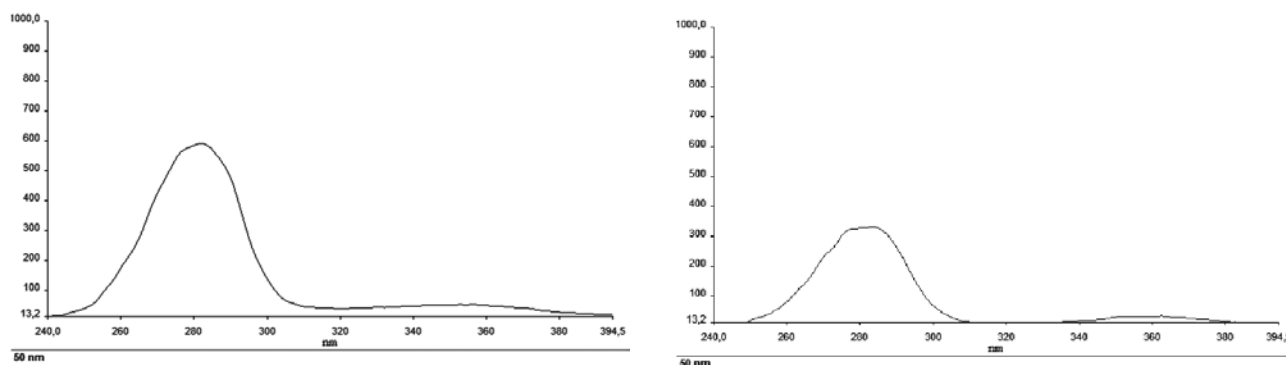
VÝSLEDKY



Graf 1: A) Porovnanie autofluorescencie proteínov ($\lambda = 280 \text{ nm}$) krvnej plazmy v kontrolnej skupine a v skupine pacientok s diagnostikovanou rakovinou krčka matrice. Intenzita autofluorescencie proteínov krvnej plazmy v skupine pacientiek bola signifikantne znížená ($p < 0,001$) o $52\% \pm 12\%$ oproti kontrole. B) Porovnanie autofluorescencie redukovaného koenzýmu $\text{NADH} + \text{H}^+$ ($\lambda = 350 \text{ nm}$) krvnej plazmy v kontrolnej skupine a v skupine pacientok s karcinómom krčka matrice. Pozorovali sme nesignifikantné ($p > 0,05$) zníženie intenzity autofluorescencie redukovaného nikotínamidadenínindinukleotidu $\text{NADH} + \text{H}^+$ v krvnej plazme skupiny pacientiek oproti kontrolnej skupine o $9\% \pm 3\%$.



Graf 2: A, SFF – vzorové trojdimenzionálne zobrazenie fluorescence krvnej plazmy vybranej z kontrolnej skupiny a B, SFF – vzorové trojdimenzionálne zobrazenie fluorescence krvnej plazmy pacientky s diagnostikovanou rakovinou krčka maternice.



Graf 3: A) jednoduché synchronné spektrum ($\Delta\lambda = 50$) krvnej plazmy vybranej z kontrolnej skupiny a B) jednoduché synchronné spektrum ($\Delta\lambda = 50$) krvnej plazmy pacientky s diagnostikovanou rakovinou krčka maternice

DISKUSIA

Fluorescencia je jav, pri ktorom pohltitím excitačného svetla danej vlnovej dĺžky molekulou s fluorescenčnými vlastnosťami dochádza následne k emisii svetla s charakteristickou vlnovou dĺžkou. Je to druh luminiscencie, tzv. s krátkym doznievaním – k fluorescencii dochádza na úrovni piko- až nanosekúnd. Je všeobecne známe že nádorové bunky majú v porovnaní so zdravými odlišný metabolizmus, vďaka čomu dochádza aj k zmene zastúpenia jednotlivých metabolitov v nádorových bunkách v porovnaní so zdravými. Tým sa menia aj fluorescenčné vlastnosti tkaniva a telesných tekutín (Šteffeková et al., 2014). Prvé výskumy v oblasti fluorescence ľudského séra uskutočnili Wolfbeis a Leiner v roku

1985. Fluorescenciu séra prezentovali vo forme topografických máp– excitačno-emisných matíc (EEM). Identifikovali rôzne fluorofóry, medzi ktoré patria hlavne tryptofán, NAD(P)H, kyselina 4-pyridoxínová, pyridoxal-5-fosfát a bilirubín, ktoré sú viazané na proteíny. Xu a kolektív v roku 1998 pracovali na výskume, ktorý bol založený na dôkazoch, že abnormálne molekuly z rakovinových bunkách prestupujú do krvi. Na základe tejto skutočnosti a hľadali rozdiely medzi fluorescenciou krvného séra zdravých pacientov a pacientov s rakovinou. V roku 1997 použil Madhuri a kolektív natívnu fluorescenčnú spektroskopiu pri študovaní krvnej plazmy a s jej pomocou popísali a rozlíšili rakovinové a normálne vzorky krvi.

Vzájomné ovplyvňovanie endogénnych fluorofórov v zmesi študovali aj Liu a kol. (2010).

Ich modelová zmes obsahovala tryptofán, FAD a NADH. Tieto fluorofóry sú významné pri diagnostike tkanív. Ich výsledky ukázali, že vzájomné ovplyvňovanie fluorofórov závisí od ich koncentrácie. Tryptofán je aminokyselina, ktorej zmeny fluorescence môžu byť užitočné pre odlíšenie malígnych metastazujúcich nádorových buniek od nemetastazujúcich buniek a zápalu od rakoviny (Pradhan et al., 1995; Heintzelman et al., 2000). Fluorescencia NADH a FAD môže byť použitá pri stanovení redoxného stavu buniek. Predchádzajúce štúdie poukazujú na využitie NADH fluorescence v rámci epitelu s progresiou neoplázie, a v priebehu ischémie (Ince et al., 1994; Pavlova et al., 2003; Tomečková et al., 2011).

V našej práci sme sledovali zmeny fluorescence krvnej plazmy v skupine pacientok s diagnostikovaným nádorom krčka maternice ($n=15$) v porovnaní s kontrolnou skupinou ($n=10$). Krvná plazma je vysoko organizovaný, multiautofluorescenčný systém endogénnych fluorescenčných molekúl, aktívne sa meniacich v závislosti od aktuálneho stavu organizmu. Je všeobecne známe, že pri patologických procesoch dochádza ku kvalitatívnym aj kvantitatívnym zmenám v štruktúre, usporiadaní, ale aj v množstve fluorofórov. Súčasne teda dochádza k zmenám optických vlastností tkanív a biologických tekutín. Tieto zmeny v kvantite a kvalite molekúl pri patologických procesoch je možné sledovať na fluorescenčných spektrách. Môžu slúžiť ako markery pri diagnostike rôznych patologických procesov. V práci sme na zaznamenanie fluorescenčných zmien krvnej plazmy pacientok a kontrolnej skupiny použili synchrónny fluorescenčný fingerprint SFF (Graf 2). Výhodou SFF je to, že pomerne rýchlo a citlivo zobrazia komplexné informácie o fluorescencii meranej vzorky. Po nameraní SFF sme vytvorili horizontálne rezy v oblasti $\Delta\lambda = 50$ (Graf 3), čím sme získali jednoduché synchrónne spektrum a sledovali sme zmeny na úrovni proteínov ($\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm) a v oblasti 340–360 nm, v ktorej fluoreskuje aj redukovaný koenzým NADH + H⁺ ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm).

Pri porovnaní fluorescence krvnej plazmy pacientiek s diagnostikovanou rakovinou krčka maternice a kontrolnou skupinou sme pozorovali signifikantné zníženie fluorescence ($p < 0,001$) v oblasti proteínov ($\lambda = 280$ nm) v skupine pacientiek s rakovinou krčka maternice oproti kontrolnej skupine (Graf 1A). To potvrdzujú aj výsledky Mattleyho z roku 2014. Pretože pre proteíny v tumorových bunkách s excitačným maximom pri $\lambda = 280$ nm platí, že intenzita ich autofluorescence sa znižuje v dôsledku rozbalenia (degradácie) plazmatických bielkovín (Mattley, 2014). Tieto fluorescenčné zmeny na úrovni proteínov nás môžu informovať o patologických stavoch v organizme a o zmenách na úrovni biochemických mechanizmov.

V práci sme sledovali aj fluorescenčné zmeny v oblasti $\lambda = 340\text{--}360$ nm, v ktorej excituje zmes nikotínamidadenín dinukleotidu (NADH), flavínov, porfyrínov a kolagénov. NADH patrí k endogénnym fluorofórom, a vďaka svojim fluorescenčným vlastnostiam sa využíva ako jeden z nádorových markerov (Masilamani, 2013; Madhuri et al., 2003; Madhuri a Aruna, 1997). Niektoré vedecké štúdie poukazujú na to, že presné stanovenie NADH je zložité, pretože táto molekula signifikantne mení svoje spektrálne vlastnosti podľa toho, či sa nachádza v oxidovanom, alebo v redukovanom stave. Ak je v bunke dostatok kyslíka, poklesne koncentrácia redukovaného NADH + H⁺, čo sa prejaví zníženou fluorescenciou (Koenig a Schneckenburger, 1994; Rigacci et al., 2000). Pokles intenzity fluorescence pre NADH + H⁺ môže byť spôsobený kombináciou niekoľkých faktorov. Jedným z dôvodov môže byť možná reabsorpcia hemoglobínom, keďže intenzita fluorescence NADH + H⁺ sa tesne zhoduje s absorpčným maximom hemoglobínu, zvýšenie koncentrácie hemoglobínu v nádorovom tkanive súvisí s neovaskularizáciou, a teda aj so zvýšením koncentrácie kyslíka (reoxigenáciou) v nádorovom tkanive (Diagaradjane et al., 2005; Zeng et al., 2004; DeVeld et al., 2005).

Koncentrácia redukovaného NADH+H⁺ sa líši počas normoxie, hyperoxie a hypoxie bunky, ktoré môžeme sledovať pomocou merania intenzity fluorescence tohto endogénneho fluorofóru (Mayevsky, 2007). Naše výsledky poukazujú na nesignifikantné ($p > 0,05$) (Graf 1B) zníženie fluorescence v oblasti charakteristickej pre redukovaný NADH+H⁺ ($\lambda = 350$ nm).

ZÁVER

Stále aktuálnou problematikou v oblasti medicíny je včasná diagnostika nádorových ochorení. Na rozdiel od iných techník je využitie fluorescenčných vlastností molekúl preferované predovšetkým pre rýchlosť a vysokú senzitivitu získaných výsledkov, ktoré nás informujú nielen o prípadných zmenách štruktúry, ale aj o dynamike a o chemických interakciách kľúčových molekúl v bunkách. Potenciál fluorescenčných techník je v tom, že využívajú vlastnosti tumorového tkaniva, pre ktoré je na rozdiel od zdravého tkaniva charakteristická akumulácia určitých chemických látok, ktoré majú aj špecifické fluorescenčné vlastnosti využiteľné v diagnostike. Pomocou fluorescenčnej analýzy je možné detegovať molekulové zmeny počas patologických stavov a zachytiť tak aj veľmi nízke koncentrácie metabolitov.

Práca vznikla pri realizácii projektu Diagonko ITMS: 26220220153; aktivita 2.4.

LITERATÚRA:

1. **BERG, M. et al., 2005:** Viable adenovirus vaccine prototypes: high-level production of a papillomavirus capsid antigen from the major late transcriptional unit. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, p. 102.
2. **BIRKOVÁ, A. et al., 2014:** Changes in urine autofluorescence in ovarian cancer patients. In *Neoplasma*, 2014, Vol. 61, p. 724–731.
3. **DE VELD, D. C. G. et al., 2005:** Autofluo-

rescence and Raman microspectroscopy of tissue sections of oral lesions. In *Lasers Med. Sci.*, 2005, Vol. 19, p. 203–209.

4. **DIAGARADJANE, P. et al., 2005:** Autofluorescence characterization in mouse skin for the early detection of tissue transformation. In *Proc. SPIE*, 2005, Vol. 5686, p. 41–50.

5. **FERLAY, J. et al., 2010:** Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. *International Agency for Research on Cancer*, 2010, p. 10.

6. **FERLAY, J. et al., 2010:** Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. In *Eur. J. Cancer*, Vol. 2010, 4, p. 765–781.

7. **GARLAND, S. M., SMITH, J. S., 2010:** Human papillomavirus vaccines: current status and future prospects. In *Drugs*, 2010, Vol. 70, p. 1079–98.

8. **GUEŠOVÁ, Z. et al., 2014:** Detekcia stenózy aortálnej chlopne synchronným fluorescenčným fingerprintom. In *Ateroskleróza: metabolizmus, klinika, liečba*, 2014, Vol. 18, p. 630–635.

9. **HEINTZELMAN L. D. et al., 2000:** Characterization of the autofluorescence of polymorphonuclear leukocytes, mononuclear leukocytes and cervical epithelial cancer cells for improved spectroscopic discrimination of inflammation from dysplasia. In *Photochem. Photobiol.*, 2000, Vol. 71, p. 327–332.

10. **CHOVANEK, J., DOSTÁTOVÁ, Z., 2008:** Karcinóm hrdla dŕoŕního. In *Zdravotnícké noviny: Lékařské listy*, 2008, Vol. 57, p. 30–33.

11. **INCE, C. et al., 1994:** Intestinal ischemia during hypoxia and experimental sepsis as observed by NADH vide of luorimetry and quenching of Pd-porphine phosphorescence. In *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1994, Vol. 361, p. 105–110.

12. **JENKINS, D.:** Histopathology and cytopathology of cervical cancer. In *Dis Markers*, 2007, Vol. 23, p. 199–212.

13. **KOENIG, K., SCHNECKENBURGER, H., 1994:** Laser-induced fluorescence for medical diagnosis. In *J. Fluoresc.*, 1994, Vol. 4, p. 521–529.

14. **LIU, Q. et al., 2010:** Investigation of Synchronous Fluorescence Method in Multicomponent Analysis in Tissue. In *Ieee Journal of selected topics in quantum electronics*, 2010, Vol. 16, 4.

15. **MADHURI, S., ARUNA, P. et al., 1997:** Ultraviolet fluorescence spectroscopy of blood

plasma in the discrimination of cancer from normal. In *Proceedings of SPIE*, 1997, Vol. 2982, p. 41–45.

16. MADHURI, N. et al., 2003: Native Fluorescence Spectroscopy of Blood Plasma in the Characterization of Oral Malignancy. In *Photochemistry and Photobiology*, 2003, Vol. 78, 2, p. 197–201.

17. MASILAMANI V. et al., 2013: Spectral features of the body fluids of patients with benign and malignant prostate tumours. In *Laser Phys.*, 2013, Vol. 23, p. 4.

18. MATTLEY, Y., 2014: Modular spectroscopy tools for measuring intrinsic protein fluorescence. In *Advances in Spectroscopy & Materials Analysis*, 2014, p. 30.

19. MAYEVSKY, A., 2007: Mitochondrial function *in vivo* evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. In *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 2007, Vol. 292, p. 615–40.

20. ONDRUŠOVÁ, M., PŠENKOVÁ, M., 2013: Epidemiológia vybraných ženských pohlavných orgánov. In *Onkológia* (Bratisl.), 2013, Vol. 8, p. 350–354.

21. PAVLOVA, I. et al., 2003: Microanatomical and biochemical origins of normal and precancerous cervical autofluorescence using laser-scanning fluorescence confocal microscopy. In *Photochem. Photobiol.*, 2003, Vol. 77, p. 550–555.

22. PRADHAN, A. et al., 1995: Steady state and time-resolved fluorescence properties of metastatic and non-metastatic malignant cells from different species. In *Photochem. Photobiol.*, 1995, Vol. 31, p. 101–112.

23. REDECHA, M. et al., 2004: Výskyt karcinómu maternicového krčka na Slovensku v rokoch 1990–2000. In *Gynekol. Prax*, 2004, Vol. 2, p. 118–124.

24. REDECHA, M. et al., 2007: Karcinóm krčka maternice a HPV infekcia. In *Ambulantná terapia*, 2007, Vol. 5, p. 176–180.

25. RIGACCI, L. et al., 2000: Multispectral imaging autofluorescence microscopy for the analysis of lymph-nodetissues. In *Photochem. Photobiol.*, 2000, Vol. 71, p. 737–742.

26. ROTTEROVÁ, P. et al., 2008: Poruchy regulácie bunčného cyklu v dyspláziách a karcinomech děložního hrdla, jejich význam a možnosti využití k včasné a přesné diagnostice cervikálních lézí. Brno, 2008, p. 81.

27. STERN, P. L., 2005: Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. In *J. Clin. Virol.*, 2005, Vol. 32, p. 72–81.

28. ŠPAČEK, J. et al., 2011: Jaké jsou zásady racionálního přístupu u pacientek s karcinomem děložního hrdla? In *Postgraduální medicína*, 2011, Vol. 13, p. 149–154.

29. ŠTEFFEKOVÁ, Z. et al., 2014: Early diagnosis of colorectal cancer in rats with DMH induced carcinogenesis by means of urine autofluorescence analysis. In *Photochemistry and Photobiology*, 2014, Vol. 90, p. 682–685.

30. ŠTEFFEKOVÁ, Z. et al., 2015: Analýza natívnej fluorescence pri diagnostike nádorových ochorení. In *Laboratórna diagnostika*, 2015, Vol. 20, p. 155–160.

31. TOMEČKOVÁ, V. et al., 2011: A novel method for the detection of liver damage using fluorescence of hepatic mitochondria in a rat model following ischaemia/reperfusion injury of the small intestine. In *Spectroscopy-Biomedical Applications*, 2011, Vol. 26, p. 237–243.

32. TÓTHOVÁ, J., SÁDECKÁ, J., 2010: Princípy a využitie synchrónnej fluorescence pri analýze mnohozložkových vzoriek. In *Chem. Listy*, 2010, Vol. 104, p. 778–783.

33. WEISMANOVÁ, E. et al., 2008: HPV a karcinóm krčka maternice: Genetická podstata malignej transformácie. In *Onkológia* (Bratisl.), 2008, Vol. 3, p. 389–392.

34. WOLBEIS, O., LEINER, M., 1985: Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization. In *Analytica Chimica Acta*, 1985, Vol. 167, p. 305–315.

35. XU, Y. et al., 1998: Lysophosphatidic Acid as a Potential Bi-omarker for Ovarian and Other Gynecologic Cancers. In *Journal of the American Medical Association*, 1998, Vol. 280, p. 719–723.

36. ZENG, H. et al., 2004: Optical spectroscopy and imaging early lung cancer detection. In *A review – Photodiagnosis Photodyn.*, 2004, Vol. 1, p. 111–122.

37. ZVARÍK, M., ŠIKUROVÁ, L., 2013: Autofluorescencia tekutín pre možný skrining nádorových ochorení. In *Biologia, Ekologia, Chémia*, 2013, Vol. 17, p. 41–44.

KVALITATÍVNE A KVANTITATÍVNE ZMENY LIPIDOVÝCH SUBFRAKCIÍ PRI TYREOPÁTIÁCH MAJÚ VPLYV NA PRESNOŠŤ STANOVENIA APOLIPOPROTEÍNU B VÝPOČTOM PODĽA HWANGA

GAŠKO, R.¹, MINÁRIKOVÁ, Z.², PAVLOV, P.¹
GAŠPAR, L.², SOROKA, P.³

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

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

³Psychiatrická nemocnica Michalovce, n.o., Michalovce

SÚHRN

Úvod: Nová metóda stanovenia apolipoproteínu B100 výpočtom podľa Hwanga vyžaduje verifikáciu v rôznych klinických situáciách. Cieľom tejto práce je zistenie, ako na porovnanie dvoch metód, meraného a vypočítaného ApoB, vplývajú poruchy činnosti štítnej žľazy, jej hyper a hypofunkcia. Pri týchto poruchách boli dobre dokumentované kvantitatívne aj kvalitatívne zmeny v metabolizme lipidov aj lipoproteínov.

Metodika: Porovnali sme meraný ApoB (ApoB) s apolipoproteínom B vypočítaným rovnicou podľa Hwanga v našej modifikácii (ApoB_{Hwangkorig}) na súbore 30 pacientov s autoimunitnou hypertyreózou a na súbore 40 pacientov s autoimunitnou hypotyreózou. U oboch súborov boli urobené odbery krvi pred nasadením liečby a následne počas liečby.

Výsledky: Rozdiel v priemere hodnôt ApoB a ApoB_{Hwangkorig} u hypertyreózy pred liečbou je -15,21 % ($p < 0,0001$, Wilcoxonov test pre párové hodnoty) a počas liečby +0,34 % ($p = 0,9263$). U hypotyreózy je rozdiel pred liečbou +6,70 % ($p = 0,2064$) a počas liečby -0,22 % ($p = 0,8507$).

Concordance correlation coefficient (CCC) bol pre všetkých 7 klinických situácií nižší než 0,9.

Záver: Hypertyreóza aj hypotyreóza výrazne ovplyvňujú výsledky vypočítaného ApoB.

Kľúčové slová: Apolipoproteín B, imunoturbidimetrické meranie, stanovenie výpočtom, rovnica podľa Hwanga, hypertyreóza, hypotyreóza

SUMMARY

Introduction: A new method for determination of apolipoprotein B100 calculation according to Hwang requires verification in various clinical situations. The aim of this work is to find out how thyroid affects dysfunction, its hyper- and hypofunction to compare the two methods of measurement and calculated ApoB. Quantitative and qualitative changes have been well documented in the metabolism of lipids and lipoproteins in these disorders.

Methods: We compared the measured Apo B (ApoB) to apolipoprotein B calculated using the equation by Hwang in our modification

(ApoB/Hwangkorig) on a set of 30 patients with autoimmune hyperthyroidism and on a set of 40 patients with autoimmune hypothyroidism. For both sets the blood sampling were performed before the initiation of therapy and during treatment in clinical and laboratory euthyroidism.

Results: The difference in the mean of the values of ApoB and ApoB/Hwangkorig in hyperthyroidism prior to treatment -15.21% ($p < 0,0001$, Wilcoxon test for paired values) and during treatment $+0.34\%$ ($p = 0,9263$). The difference in hypothyroidism before treatment is $+6.70\%$ ($p = 0,2064$) and during treatment -0.22% ($p = 0,8507$). Concordance correlation coefficient (CCC) was for all seven clinical situations less than 0,9.

Conclusion: Hyperthyroidism and hypothyroidism significantly affect the results of calculated ApoB.

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

ÚVOD

Lipidy zohrávajú kľúčovú úlohu vo vývoji aterosklerózy a jej klinických manifestácií. Najvýznamnejšiu úlohu má nepochybne cholesterol, a preto stanovenie celkového cholesterolu hralo spočiatku významnú úlohu nielen v hodnotení rizika KV ochorenia, ale aj v hodnotení úspešnosti hypolipidemickej liečby. Zavedením Fredricksonovej klasifikácie hyperlipoproteinémií sa pozornosť obrátila k jednotlivým lipoproteínovým triedam transportujúcim lipidy v krvi a cholesterol lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL-C) sa stal hlavným cieľom a ukazovateľom úspešnosti hypolipidemickej liečby. To predstavovalo istý pokrok, pretože LDL-C odráža lepšie patogénny mechanizmus vedúci k poškodeniu cievnej steny ako cel-

kový cholesterol (TC). Avšak prediktívna sila LDL-C z hľadiska rizika kardiovaskulárnych (KV) ochorení nie je o veľa väčšia ako sila celkového cholesterolu. Celkový cholesterol je preto aj naďalej používaný vo skórovacích systémoch spoločne s HDL-cholesterolom (HDL-C) a ďalšími konvenčnými rizikovými faktormi pre odhad rizika KV ochorení [17, 19].

Nové možnosti, ako presnejšie identifikovať riziko a stanoviť spoľahlivý cieľ liečby, sú stále skúmané. Z tohto hľadiska je hojne diskutovaný význam stanovenia apolipoproteínu B. Početné intervenčné štúdie (najmä statínové) preukázali, že zníženie LDL-C vedie ku zníženiu kardiovaskulárnych príhod. Avšak viacero týchto štúdií sledujúcich ako LDL-C, tak ApoB ukázala, že hladina LDL-C pri liečbe má malú prognostickú silu, zatiaľ čo ApoB lepšie predikuje klinické príhody [9, 21, a iné]. ApoB a non-HDL-cholesterol sú odporúčané ako komplementárne markery ku LDL-cholesterolu [1]. Rovnako v štúdiách porovnávajúcich menej a viac agresívnu liečbu statínmi (Treating to New Targets [TNT] a Incremental Decrease in End Points through Aggressive Lipid lowering [IDEAL]) boli non-HDL-C a ApoB tesnejšie asociované s klinickými KV príhodami ako LDL-C. Vysvetlením môže byť skutočnosť, že statíny znižujú LDL-C a non-HDL-C viac než ApoB. V analýze siedmich hypolipidemických statínových štúdií bol LDL-C znížený o 42 %, non-HDL-C o 40 % a ApoB o 33 %. Tieto tri parametre tak boli znížené na 21., 29. a 55. percentil americkej populácie [22]. Z toho je zrejmé, že počet aterogénnych častíc (a teda koncentrácia ApoB) nebol v týchto štúdiách dostatočne znížený a môže predstavovať významné reziduálne riziko.

Lepší prognostický parameter ako koncentrácia LDL-C je počet cirkulujúcich častíc LDL. Ten môže byť stanovovaný buď priamo ako sérová koncentrácia Apo B, alebo nepriamo nukleárnou magneticko rezonančnou spektroskopiou (LDL-P). Zásadnou recentnou správou American Association of Clinical Chemistry je, že pri vzájomnom porovnaní LDL-P a Apo B je Apo B preferovaným biomarkerom pre budúce –

nové guideliney [2]. Tento prístup je už použitý v guidelineoch pre diabetes mellitus [7].

Dôkazy o tom, že stanovenie apolipoproteínu B100 (ApoB) má vyššiu výpovednú hodnotu ako non-HDL-cholesterol aj ako LDL-cholesterol pri odhade kardiovaskulárneho rizika neustále pribúdajú [16]. Napriek tomu je Apo B v klinickej praxi 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 4 rokoch bolo publikovaných a overovaných niekoľko rovníc na výpočet ApoB zo štandardných lipidov [6]. Z nich najvalidnejšia podľa našich predošlých zistení bola rovnica podľa Hwanga [4, 8], nami upravená [5].

Cieľom tejto práce je zistenie, ako na porovnanie dvoch metód, meraného a vypočítaného Apo B, vplyvajú poruchy činnosti štítnej žľazy, jej hyper a hypofunkcia. Pri týchto poruchách boli dobre dokumentované zmeny v metabolizme lipidov aj lipoproteínov, a to kvantitatívne aj kvalitatívne [3, 15].

Súbor pacientov

Charakteristika pacientov a popis použitých laboratórnych metód sú podrobne uvedené v práci [15]. 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 hypercholesterolemia, ochorenie pečene alebo obličiek, tehotné ženy, pacienti po mŕtvici, srdcový

infarkt, rakovina, pankreatitída, zneužívanie alkoholu a používanie hypolipidémik. Všetci pacienti boli prijatí do štúdie dobrovoľne po podpísaní informovaného súhlasu. Základná charakteristika súboru pacientov je uvedená v tabuľke 1.

METÓDY

Porovnali sme meraný ApoB (ApoB) s rovnicou na výpočet ApoB autorov Hwang a spol (9; ApoBHwang) v našej úprave [5].

Modifikované rovnice Hwang majú takýto tvar:

$$\text{ApoB (g/l)} = \frac{(25,1 \text{ TC} - 22,8 \text{ HDL} + 0,88 \text{ TG})}{10 + K}$$

ak TAG $\leq 3,05$ mmol/l

$$\text{ApoB (g/l)} = \frac{(25,6 + 22,4 \text{ TC} - 14,7 \text{ HDL} - 5,3 \text{ TG})}{100 + K}$$

ak TAG $> 3,05$ mmol/l

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

ApoB bol meraný imunoturbidimetrickou metódou (Roche, Nemecko). Rovnica Hwang je vlastne sústavou 2 rovníc, ktoré používajú na výpočet ApoB namerané hodnoty celkového cholesterolu, triacylglycerolov (TAG) a HDL-cholesterolu.

Porovnávania boli robené na týchto rôzne definovaných súboroch:

1. Súbor všetkých ApoB, $n = 140$, získaný zo všetkých 70 pacientov pri prvom odbere krvi pred liečbou a druhom počas liečby.

2. Súbor ApoB od pacientov s hypertyreózou, $n = 60$, získaný od 30 pacientov pri prvom odbere krvi pred liečbou a druhom počas liečby.

3. Súbor ApoB od pacientov s hypotyreózou, $n = 80$, získaný od 40 pacientov pri prvom odbere krvi pred liečbou a druhom počas liečby.

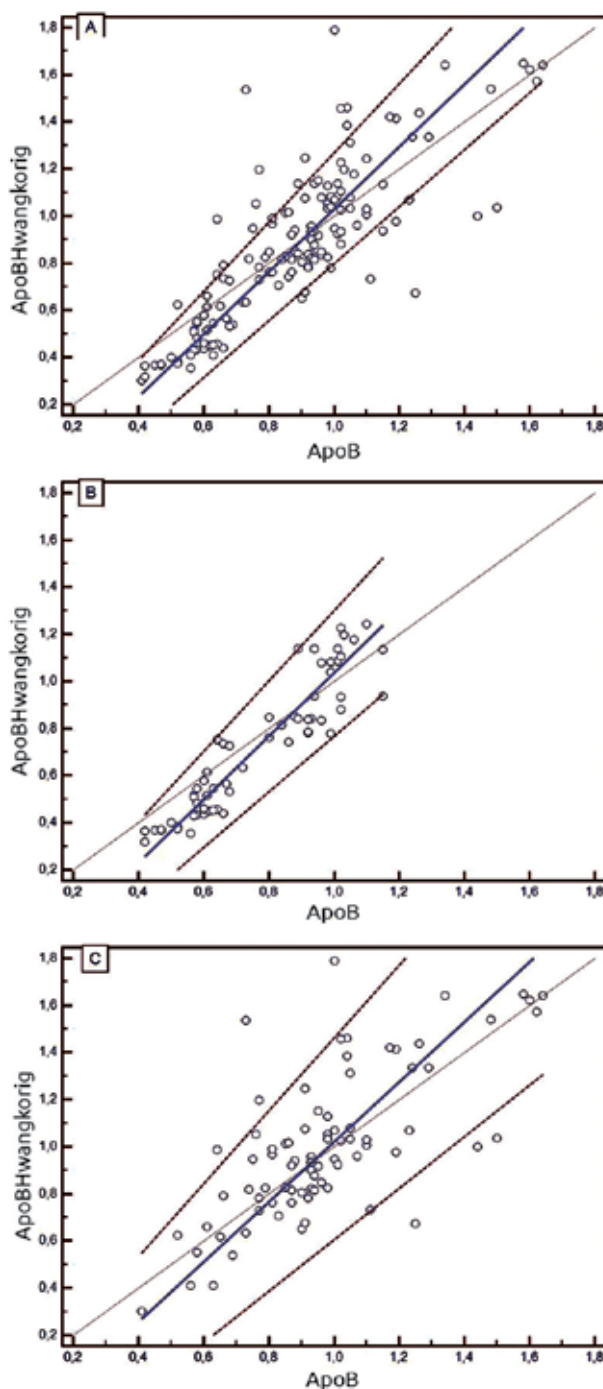
Tabuľka 1. Základná charakteristika súboru pacientov

Počet pacientov	70*
Pomer pohlaví M/Ž	9/61
Vek (roky)	54,1 ± 14**
TC [mmol/l]	5,27 ± 1,45
LDL dir [mmol/l]	3,21 ± 1,11
LDL Friedewald [mmol/l]	3,39 ± 1,21
HDL [mmol/l]	1,22 ± 0,30
TG [mmol/l]	1,43 ± 1,01
ApoA1 [g/l]	1,76 ± 0,40
ApoB100 [g/l]	0,88 ± 0,26
BMI [kg/m ²]	26,1 ± 3,9
Metabolický sy [%]	0

LDL dir – nízkodenzitné lipoproteíny merané priamou metódou, LDL Friedewald – vypočítané podľa Friedewalda, HDL – vysokodenzitné lipoproteíny, TC – celkový cholesterol, TG – triacylglyceroly, ApoA – apolipoproteín A, ApoB100 – apolipoproteín B100, BMI – body mass index

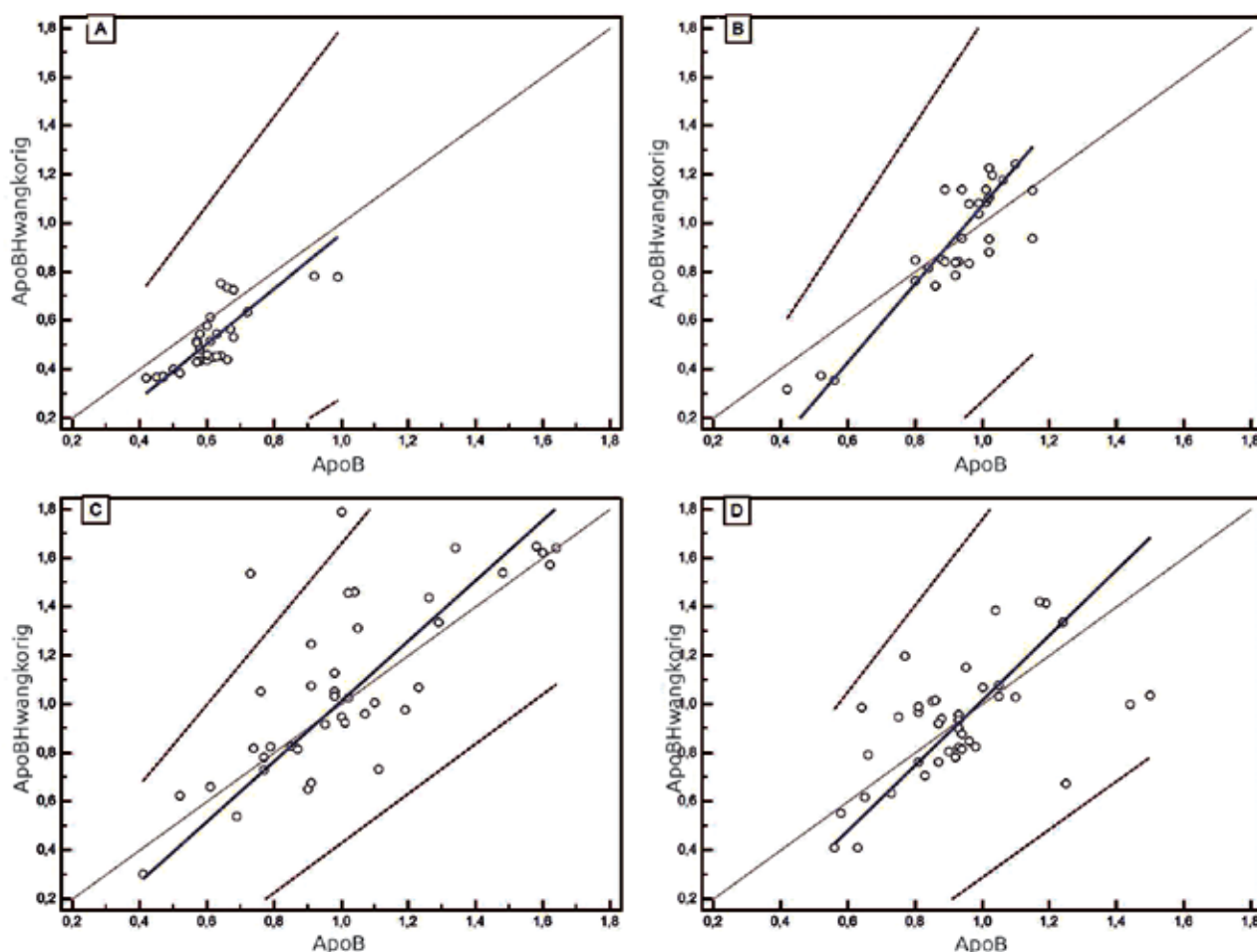
* – každý pacient mal merané dve vzorky, pred liečbou a počas liečby, analyzovaných bolo 140 vzoriek

** – údaje predstavujú aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka



Obrázok 1. Bodové grafy a vykreslenia Passing a Bablokovy regresnej priamky pre porovnanie dvoch metód stanovenia ApoB, priamym meraním a výpočtom podľa modifikovanej Hwangovej rovnice, pre súbory: A – celý súbor, n = 140; B – hypertyreóza, n = 60, C – hypotyreóza, n = 80

Pre lepšie porovnanie majú všetky grafy rovnaké mierky. Bodkovaná čiara = línia identity, hrubá plná modrá čiara = regresná priamka, čiarkované hnedé čiary = 95%-né konfidenčné intervaly pre regresnú priamku



Obrázok 2. Bodové grafy a vykreslenia Passing a Bablokovej regresnej priamky pre porovnanie dvoch metód stanovenia ApoB, priamym meraním a výpočtom podľa modifikovanej Hwangovej rovnice, pre 4 súbory: A – hypertyreóza pred liečbou; B – hypertyreóza počas liečby; C – hypotyreóza pred liečbou; D – hypotyreóza počas liečby. Pre lepšie porovnanie majú všetky grafy rovnaké mierky. Popis ako v obrázku 1

4. Súbory ApoB od pacientov s hypertyreózou, $n = 30$, získaný od 30 pacientov pri prvom odbere krvi pred liečbou.

5. Súbory ApoB od pacientov s hypertyreózou, $n = 30$, získaný od 30 pacientov pri druhom odbere krvi počas liečby.

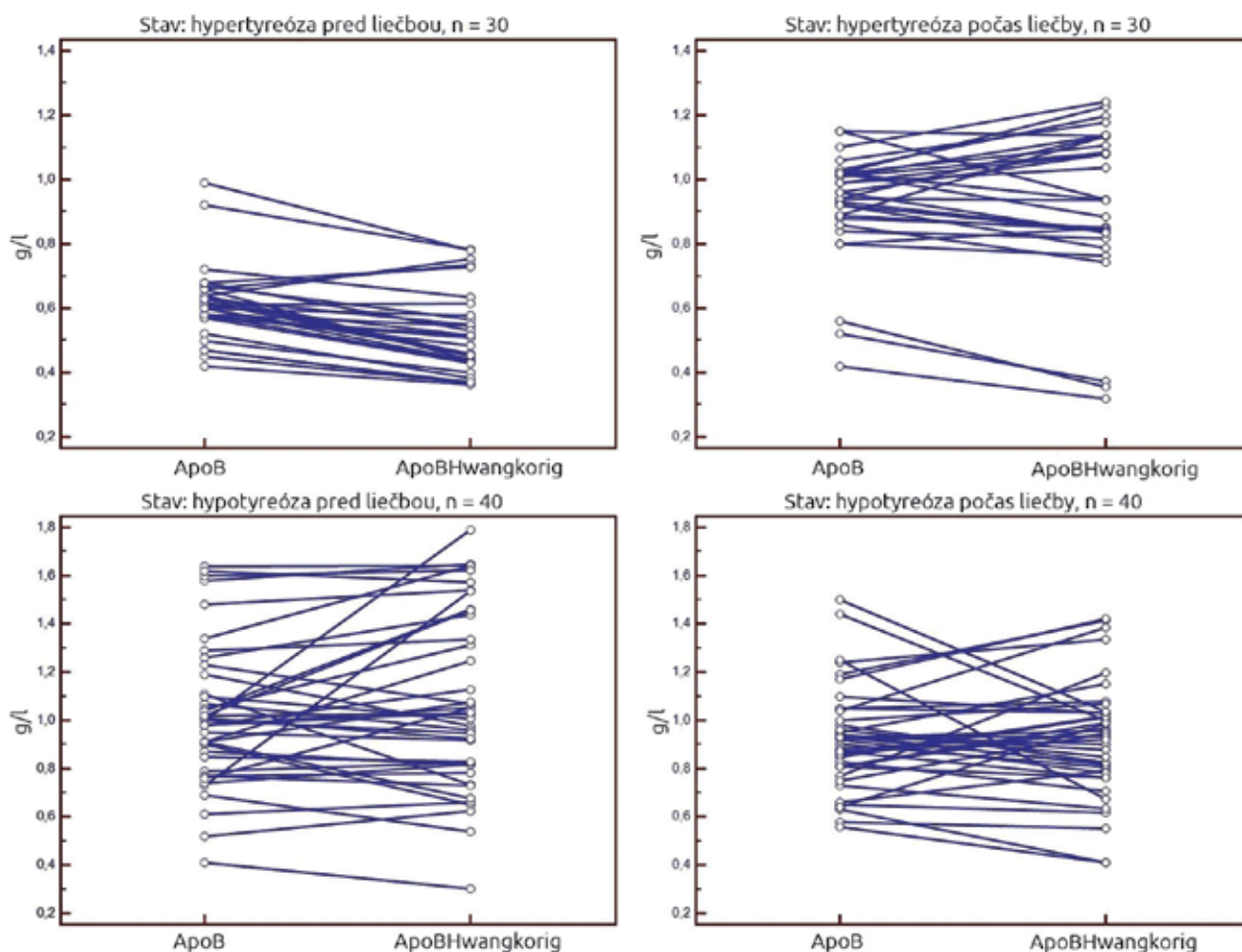
6. Súbory ApoB od pacientov s hypotyreózou, $n = 40$, získaný od 40 pacientov pri prvom odbere krvi pred liečbou.

7. Súbory ApoB od pacientov s hypotyreózou, $n = 40$, získaný od 40 pacientov pri druhom odbere krvi počas liečby.

Porovnávanie dvoch metód stanovenia bolo vykonané metódou podľa Passinga a Babloka, s vykreslením 95%-ných intervalov spoľahlivosti (konfidenčných intervalov CI) pre regresnú

priamku [14]. Ako ďalší spôsob vyhodnocovania bol zvolený Lin-ov korelačný koeficient zhody, concordance correlation coefficient, CCC [11]. Podľa našich vedomostí tento spôsob vyhodnocovania doteraz nebol v slovenskom písomníctve použitý, a to napriek tomu, že pri štúdiách porovnávajúcich dve metódy má podstatne vyššiu výpovednú hodnotu než bežne používaný Pearsonov korelačný koeficient [10].

CCC ρ_c 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 systémovú odchýlku ktorá vyjad-



Obrázok 3. Bodové a spojnicové grafy, porovnanie hodnôt ApoB stanoveného priamym meraním a výpočtom podľa modifikovanej Hwangovej rovnice, pre 4 súbory: Hypertyreóza pred liečbou; hypertyreóza počas liečby; hypotyreóza pred liečbou; hypotyreóza počas

ruje, ako ďaleko je priamka zhody odchylená od ideálnej priamky zhody, ktorá prechádza nulovými hodnotami osí x aj y a zvierá s osou x uhol 45 stupňov. Pre vyhodnocovanie CCC navrhol McBride [13] nasledovnú deskriptívnu stupnicu: hodnota $pc < 0,90$ znamená zlý stupeň zhody, $0,90$ až $0,95$ mierny stupeň, $0,95$ až $0,99$ podstatný stupeň, $> 0,99$ takmer dokonalý. Toto hodnotenie bolo všeobecne akceptované, s poznáním, že v reálnych podmienkach rutínnej laboratórnej práce sa u apolipoproteínu B medzilaboratórne dosahujú hodnoty $0,90$ až $0,95$ [12].

Niektoré súbory mali testovaním D'Agostino-Pearsonovým testom vylúčenú normálnu

distribúciu hodnôt, preto bol pre všetky testovania rozdielov priemerov hodnôt použitý neparametrický Wilcoxonov test [23].

Výpočty a grafy boli vykonané v programe MedCalc Statistical Software version 15.8 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgicko; <https://www.medcalc.org>; 2015).

VÝSLEDKY

Na obrázku 1 je vykreslená Passing-Bablokova regresia pre celý súbor, $n = 140$, a pre súbory hypertyreóza a hypotyreóza.

Na obrázku 2 je vykreslená Passing-Bablokova regresia pre súbory hypertyreóza pred

Tabuľka 2. Porovnanie rozdielov medzi hodnotami ApoB získanými priamym meraním a výpočtom podľa Hwangovej modifikovanej rovnice, pre rôzne definované súbory

Diagnóza	Metóda stanovenia	Počet vzoriek [n]	Aritmetický priemer [g/l]	95 % CI	Korekcia [g/l]	Rozdiel medzi priemerami*	CCC	95 % CI	Korelačný koeficient (Pearson)	Wilcoxonov test
Celý súbor	ApoB	140	0,8826	0,8391 to 0,9261						
	ApoBHwang-korig	140	0,8826	0,8269 to 0,9382	-0,1706	0,0 %	0,7912	0,7269 to 0,8418	0,8167	p= 0,3181
Hypertyreóza (Hyper)	ApoB	60	0,7673	0,7129 to 0,8218						
	ApoBHwang-korig	60	0,7222		-0,1706	-5,87 %	0,8762	0,8188 to 0,9162	0,9281	p= 0,0039
Hypotyreóza (Hypo)	ApoB	80	0,9698	0,9123 to 1,0272						
	ApoBHwang-korig	80	1,0028		-0,1706	3,40 %	0,6837	0,5542 to 0,7808	0,7037	p= 0,3472
Hyper, pred liečbou	ApoB	30	0,6147	0,5707 to 0,6586						
	ApoBHwang-korig	30	0,5212		-0,1706	-15,21 %	0,6129	0,4057 to 0,7603	0,7975	p< 0,0001
Hyper, počas liečby	ApoB	30	0,9200	0,8571 to 0,9829						
	ApoBHwang-korig	30	0,9232		-0,1706	0,34 %	0,8167	0,6956 to 0,8927	0,8765	p= 0,9263
Hypo, pred liečbou	ApoB	40	1,0170	0,9233 to 1,1107						
	ApoBHwang-korig	40	1,0852		-0,1706	6,70 %	0,7143	0,5372 to 0,8310	0,7490	p= 0,2064
Hypo, počas liečby	ApoB	40	0,9225	0,8549 to 0,9901						
	ApoBHwang-korig	40	0,9205		-0,1706	-0,22 %	0,5654	0,3149 to 0,7422	0,5694	p= 0,8507

* - ApoB = 100 %

liečbou, počas liečby, hypotyreóza pred liečbou a počas liečby. Smernice regresnej priamky majú v rôznych súboroch rôzny sklon. Čiary 95%-ných konfidenčných intervalov pre regresnú priamku sú od seba veľmi vzdialené, čo znamená veľký rozptyl a malú zhodu porovnávaných metód.

Na obrázku 3 sú bodové a spojnicové grafy porovnania hodnôt ApoB a ApoB_{Hwangkorrig} pre tie isté súbory. Vypočítané hodnoty ApoB sú vyššie než merané hodnoty ApoB v 4; 9; 11; 7 prípadoch, v ostatných prípadoch sú vypočítané hodnoty nižšie alebo rovnaké než merané. Rozdiel v počtoch vyšších, resp. nižších hodnôt pri porovnaní všetkých 4 súborov, nie je štatisticky významný na hladine 0,05 ($p = 0,3092$, chí-kvadrát test).

V tabuľke 2 je kľúčový údaj o rozdieloch medzi aritmetickými priemerami meraného a vypočítaného ApoB v jednotlivých skupinách. Rozdiel bol konštantou K nastavený tak, že v celom súbore, $n = 140$, je nulový. V celom súbore hypertyreózy je záporný, $-5,87\%$. V celom súbore hypotyreózy je kladný, $+3,40\%$. Zásadné rozdiely sa však ukázali pri porovnávaní – opakujeme, že párovom porovnávaní u tých istých pacientov – stavu pred liečbou a počas liečby: u hypertyreózy sú rozdiely $-15,21\%$ ($p < 0,0001$, Wilcoxonov test pre párové vzorky – platí aj pre nasledovné hodnoty p) a $+0,34\%$ ($p = 0,9263$), u hypotyreózy sú rozdiely $+6,70\%$ ($p = 0,2064$) a $-0,22\%$ ($p = 0,8507$). U liečených pacientov, v stave eutyreózy, sú rozdiely blízke nule. U pacientov pred liečbou sú rozdiely v súčte absolútnych hodnôt takmer 22% .

Pre celý súbor je hodnota $CCC = 0,7912$. Pre súbory hypertyreózy a hypotyreózy pred liečbou a počas liečby sú hodnoty CCC v rozpätí od $0,5654$ do $0,8167$. Pri bodovom hodnotení ani jedna hodnota CCC nedosiahla hranicu $0,90$. Pri pravdepodobnostnom hodnotení CCC , horná hranica 95% intervalu spoľahlivosti bola vyššia než $0,90$ iba v jednom prípade zo siedmich.

DISKUSIA

Limity pri výpočte LDL-cholesterolu Friedewaldovou rovnicou, ktoré vplyvajú na správnosť výpočtu, sú dobre známe: pečénové poškodenie, chronické renálne poškodenie, diabetes mellitus, vplyv vysokého TG [18]. Tieto vplyvy na stanovenie ApoB výpočtom neboli doteraz skúmané.

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. Výsledky porovnania sú závislé od štruktúry súboru, na ktorom sú merania vykonávané (inkluzívne a exkluzívne kritériá pre pacientov je výber pacientov „s neprítomnou jednou alebo viacerými taxatívne vymenovanými chorobami“, alebo „s prítomnou [najčastejšie] jednou konkrétnou chorobou“; počet vzoriek, najnižšia a najvyššia hodnota, medián, atď.) [4]. V tejto práci boli porovnávané dve metódy na veľmi precízne definovaných súboroch pacientov s jednoznačne definovanou tyreopatiou, v dvoch klinických štádiách – pred nasadením liečby a počas účinnej liečby v stabilizovanom stave, a zároveň s neprítomnými inými známymi metabolickými chorobami alebo stavmi, ktoré môžu ovplyvňovať lipidový a lipoproteínový metabolizmus. V tejto súvislosti je vhodné pripomenúť, že chronická autoimunitná tyreoiditída, veľmi často nepoznaná a neliečená, sa vyskytuje ako koincidencia u 40 až 50% pacientov s diabetes mellitus 1. aj 2. typu (20).

U neliečenej autoimunitnej hypertyreózy a autoimunitnej hypotyreózy sú hodnoty apolipoproteínu B stanovené výpočtom podstatne odlišné od hodnôt nameraných imunoturbidimetrickou metódou. U liečenej hypertyreózy aj hypotyreózy sú rozdiely hodnôt minimálne.

V literatúre sme nenašli žiadnu publikáciu, ktorá by sa venovala tej istej problematike, preto nemáme možnosť naše výsledky konfrontovať s inými.

ZÁVER

U pacientov s tyreopatiami, ktoré nie sú liečbou upravené do eutyreózy, je výpočet apolipoproteínu B zaťažený veľkou chybou. Je potrebné vykonať multicentrické štúdie zamerané na preskúmanie vplyvov iných metabolických ochorení na validitu výpočtu.

LITERATÚRA

1. **BJORNSTAD, P. et al.:** Relation of combined non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B with atherosclerosis in adults with type 1 diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.*, 2015, article in press.

2. **Cole, T. G. et al.:** Resonance Spectroscopy-Derived LDL Particle Number with Outcomes in 25 Clinical Studies: Assessment by the AACC Lipoprotein and Vascular Diseases Division Working Group Best Practices. *Clin. Chem.*, 2013; 59: 752–770.

3. **DUNTAS, L.H., BRENTA, G.:** The Effect of Thyroid Disorders on Lipid Levels and Metabolism. *Med. Clin. N. Am.*, 2012, 269–281.

4. **Gaško, R.:** *Laboratory method comparison studies. Nový prístup ku porovnávaniu s použitím umelého súboru.* 2. doplnené vydanie. EduStat, Košice, 2015, ISBN 978-80-972005-5-8.

5. **Gaško, R. et al.:** Stanovenie apolipoproteínu B-100 výpočtom – overenie rovnice podľa Hwanga na dvoch nezávislých súboroch. *Slov. lekár*, 2015; 25(39): 2–6.

6. **HADISISWOYO, P. et al.:** Agreement between estimated apolipoprotein B-100 concentration and apolipoprotein B-100 concentration measured by immunoturbidimetric method. *Fol. Med. Indonesiana*, 2014, 50(1), 10–14.

7. **HANDELSMAN, Y. et al.:** American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology – Clinical practice guidelines for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan – 2015. *Endocrine Practice*, 2015, 21, Issue supplement 1, 1–87.

8. **HWANG, Y. et al.:** An Equation to Estimate

the Concentration of Serum Apolipoprotein B. *PLoS One*, 2012; e51607.

9. **Kastelein, J. J. P. et al.:** TNT Study Group. IDEAL Study Group. Lipids, apolipoproteins, and their ratios in relation to cardiovascular events with statin treatment. *Circulation*, 2008; 117: 3002–3009.

10. **KING, T. S., CHINCHILLI, T. A.:** generalized concordance correlation coefficient for continuous and categorical data. *Stat. Medicine* 2001; 20: 2131–2147.

11. **Lin L.:** A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 1989; 45: 255–268.

12. **MARCOVINA, S., PACKARD, C. J.:** Measurement and meaning of apolipoprotein AI and apolipoprotein B plasma levels. *J. Int. Med.* 2006; 259: 437–446.

13. **McBride, G. B.:** A proposal for strength-of-agreement criteria for Lin's Concordance Correlation Coefficient. 2005, *NIWA Client Report: HAM*, 2005–062.

14. **MIKULECKÝ, M.:** Confidence and tolerance intervals — a tool for biomedical data analysis aimed at clear evidence. *Cardiology*, 2004, 13(4), 211–215.

15. **MINARIKOVA, Z. et al.:** 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.

16. **Pencina, M. J. et al.:** Apolipoprotein B improves risk assessment of future coronary heart disease in the Framingham Heart Study beyond LDL-C and non-HDL-C. *Eur. J. Prev. Cardiol.*, 2015; Jan 29. pii: 2047487315569411. [Epub ahead of print]

17. **Perk, J. et al.:** European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012); The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited ex-perts). *Eur. Heart J.*, 2012; 33: 1635–1701.

18. **RÁCZ, O. et al.:** Lipid and lipoprotein abnormalities in chronic renal insufficiency: Review. Chapter 19, pp. 349–365. In: **Carpi, A., Donadio, C. and Tramonti, G. (Ed.):** *Progress in Hemodialysis* —

From Emergent Biotechnology to Clinical Practice, InTech Vienna, 2011, ISBN: 978-953-307-377-4.

19. Reiner, Z. et al.: ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur. Heart J.*, 2011; 32: 1769–1818.

20. SCHRÖNER, Z. et al.: Autoimmune thyroid diseases in patients with diabetes mellitus. *Bratisl. Lek. Listy*, 2008; 109: 125–129.

21. Simes, R. J. et al.: LIPID Study Investigators. Relationship between lipid levels and clinical

outcomes in the Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Trial: to what extent is the reduction in coronary events with pravastatin explained by on-study lipid levels? *Circulation*, 2002; 105: 1162–1169.

22. Sniderman, A. D.: Differential response of cholesterol and particle measures of atherogenic lipoproteins to LDL-lowering therapy: implications to clinical practice. *J. Clin. Lipidol*, 2008; 2: 36–42.

23. WACZULÍKOVÁ, I., SLEZÁK, P.: *Introductory biostatistics*. Univerzita Komenského, Bratislava, 2015, v tlači.

DIAGNOSTIKA DIABETU 1. TYPU S VYUŽITÍM POKROČILÝCH SPEKTROSKOPICKÝCH METOD

ŠTOVÍČKOVÁ, L.¹, LOGEROVÁ, H.², TATARKOVIČ, M.¹
KOCOURKOVÁ, L.¹, VAVŘINEC, J.³, SETNIČKA, V.¹

¹Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika

²Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie, 3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Ruská 87, 100 00 Praha 10, Česká republika

³Klinika dětí a dorostu, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
Šrobárova 50, 100 34 Praha 10, Česká republika

Kontakt: Lucie1.Stovickova[at]vscht.cz

SOUHRN

Současné diagnostické postupy pro diabetes mellitus 1. typu jsou zaměřeny především na určení koncentrace krevní glukózy a glykovaného hemoglobinu. Z pohledu včasné diagnostiky tohoto závažného autoimunitního onemocnění mají však tyto postupy svá omezení. Diabetes 1. typu se klinicky manifestuje zvýšenou hladinou glukózy a změnami hladin dalších biomarkerů. Již v preklinické fázi onemocnění však dochází ke změnám v prostorovém uspořádání plazmatických proteinů a dalších biomolekul spojených s patogenezí diabetu, které však nejsou klasickými klinickými postupy zaznamenatelné. Naproti tomu, pokročilé spektroskopické metody jsou citlivé na prostorové uspořádání chirálních molekul, a jsou tudíž potenciálně schopny tyto strukturní změny identifikovat. Krevní plazma diabetiků a kontrolních jedinců byla analyzována pomocí pokročilých spektroskopických metod (elektronový cirkulární dichroismus a Ramanova optická aktivita) doplněných o konvenční metody molekulové spektroskopie (infračervená a Ramanova spektroskopie). Získaná spekt-

rální data byla chemometricky vyhodnocena vícerozměrnými statistickými metodami se zaměřením na spektrální oblasti odpovídající struktuře a konformaci proteinů a dalších biomolekul krevní plazmy. Dosažené výsledky naznačují, že chiroptická spektroskopie v kombinaci s infračervenou a Ramanovou spektroskopii je schopna zaznamenat patologické změny ve struktuře molekul plazmatických proteinů provázejících diabetes a může tedy být slibným podpůrným nástrojem ke konvenčním diagnostickým postupům.

Klíčová slova: diabetes mellitus 1. typu, chiroptická spektroskopie, krevní plazma, spektrální biomarker, diagnostika

SUMMARY

The current procedures to diagnose type 1 diabetes mellitus are focused mainly on determining levels of blood glucose and glycated hemoglobin. However, these diagnostic tools are limited for the early diagnosis of this severe autoimmune disease. Type 1 diabetes is accompanied not only by the elevated blood glucose

level and changes in other biomarker levels, but also by changes in the spatial arrangement of plasma proteins and other biomolecules that are associated with the pathogenesis of diabetes. These structural changes occur before the disease onset, but unfortunately; the conventional clinical procedures are not able to detect them. In contrast, advanced spectroscopic methods are inherently sensitive to the spatial arrangement of chiral molecules, and thus; potentially able to identify any possible structural changes. Blood plasma from diabetic patients and healthy controls was analyzed by advanced spectroscopic methods (electronic circular dichroism and Raman optical activity). The measurements were supplemented by conventional methods of molecular spectroscopy, i.e. infrared and Raman spectroscopy. The obtained spectral data sets were evaluated by multivariate statistical methods focusing on the spectral ranges that correspond to the structure and conformation of proteins and other plasma biomolecules. The achieved results suggest that chiroptical spectroscopy in combination with infrared and Raman spectroscopies is able to detect the pathological changes in molecular structure that are caused by diabetes, and therefore; may be a promising complement to conventional diagnostic methods.

Key words: type 1 diabetes mellitus, chiroptical spectroscopy, blood plasma, spectral biomarker, diagnostics

ÚVOD

V současnosti je jednou z přijímaných hypotéz patogeneze diabetu mellitu 1. typu (T1DM) teorie, která předpokládá, že β -buňky pankreatu jsou napadeny virem, což vede k produkci odlišných signálních molekul (antigenů) na jejich povrchu. Tyto odlišné antigeny jsou imunitním systémem rozpoznávány jako „cizí“ a dochází k autoimunitní destrukci postižených β -buněk, což má za následek nedostatečnou

produkci inzulínu a zvyšování hladiny glukózy v krevním oběhu (hyperglykémie) [1, 2]. Zvýšená glykémie spolu s narušením acidobazické rovnováhy, která je způsobena zvýšenou ketogenezí, je hlavním indikátorem diabetického stavu. V důsledku změněné antigenicity β -buněk dochází u diabetu, stejně jako u dalších onemocnění, ke změnám ve struktuře plazmatických biomolekul. Tyto změny se objevují ještě před propuknutím onemocnění, tedy před tím, než je možné zaznamenat zvýšenou hladinu glukózy v krvi [1, 3]. Detekce těchto časných změn by tedy mohla sloužit jako podpůrný nástroj pro včasnou diagnostiku a léčebný zásah u jedinců s rozvíjejícím se diabetem 1. typu.

Změny ve stereochemii biomolekul však nemohou být jednoduše zaznamenány konvenčními diagnostickými postupy, případně klasickými metodami molekulové spektroskopie. A jelikož jsou mnohé biomolekuly v lidském organismu chirální, přicházejí v tomto případě v úvahu pokročilé spektroskopické metody, jakými je chiroptická spektroskopie.⁴ Jejich principem je interakce kruhově polarizovaného záření s chirálními molekulami, z čehož vyplývá jejich citlivost k trojrozměrné struktuře chirálních molekul. [4] I přes svou schopnost identifikovat jakékoliv spektrální změny nebyly prozatím chiroptické metody systematicky využity k analýze tělních tekutin (s výjimkou našich předchozích studií) [5, 6, 7, 8, 9, 10].

V této pilotní studii se zabýváme možnostmi využití elektronového cirkulárního dichroismu (ECD) a Ramanovy optické aktivity (ROA) spolu s infračervenou (IČ) a Ramanovou spektroskopií vzorků lidské krevní plazmy pro diagnostiku T1DM. Věříme, že zaměření se na pre-diabetické strukturní změny proteinů, sacharidů a dalších esenciálních biomolekul v krevní plazmě povede k diagnostice dost včasné na to, aby bylo možné u dětí a adolescentů předcházet život ohrožujícím náhlým kolapsům a těžkým komplikacím, které jsou obvykle spjaté s propuknutím T1DM.

MATERIÁL A METODY

Krevní plazma

Do této studie bylo zařazeno 12 pacientů s diabetem 1. typu, kteří byli vybráni na Klinice dětí a dorostu, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV) v Praze. Skupinu kontrolních jedinců tvořilo 8 studentů 1. ročníku 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy (3.LF UK) v Praze. Průměrný věk pacientů a kontrol byl 15,1; resp. 19,7 let. U všech testovaných subjektů byly určeny základní fyziologické a biochemické parametry související s T1DM a zároveň byla provedena elektroforéza plazmatických proteinů (Tab. 1). Vzhledem k tomu, že kontrolní skupina nevykazovala zvýšenou hladinu krevní glukózy, nebyly u ní systematicky určeny hodnoty glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}) ani sérového albuminu (HSA), případně dalších parametrů souvisejících s diabetem.

Na Klinice dětí a dorostu FNKV v Praze bylo každému pacientovi/kontrolnímu jedinci odebráno 9 ml krve do sterilních zkumavek Vacuette® (Greiner Bio-One GmbH, Rakousko) obsahujících antikoagulant K_3EDTA (draselná sůl kyseliny ethylendiammintetraoctové). Vzorky byly poté odstředěny při 1500g a 25 °C po dobu 10 minut na Ústavu biochemie, buněčné a molekulární biologie 3. LF UK v Praze. Získané frakce plazmy byly okamžitě zmrazeny a uchovány při teplotě -75 °C. Před každým měřením byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě a zfiltrovány pomocí membránových filtrů s porozitou 0,45 μm (Grace, USA) při 13 000 g a 15 °C po dobu 10 minut.

Tato studie byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací a byla schválena Etickou komisí 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Od všech účastníků studie byl zajištěn písemný informovaný souhlas, u nezletilých potvrzený i souhlasem zákonného zástupce.

Spektroskopické metody

Ramanova spektra a spektra Ramanovy optické aktivity byla naměřena simultánně na spektrometru ChiralRAMAN-2X™ (BioTools Inc., USA), který je vybaven systémem OPUS 2 W/mpc6000 (Laser Quantum, Velká Británie) s excitační vlnovou délkou 532 nm. Zfiltrované vzorky plazmy (100 μl) byly v oblasti 2500–90 cm^{-1} analyzovány v kyvetě o rozměrech 4 $\times$ 4 $\times$ 10 mm s antireflexní povrchovou úpravou, která byla umístěna do držáku s Peltierovým chlazením pro kontrolu teploty vzorků (15 °C).

Pro záznam spekter ve střední infračervené oblasti (4000–400 cm^{-1}) byl použit IČ spektrometr s Fourierovou transformací Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) vybavený ZnSe krystalem pro techniku zeslabeného úplného odrazu (ATR, Attenuated Total Reflectance). Zfiltrované vzorky plazmy (20 μl) byly měřeny přímo bez další úpravy.

Měření ECD byla prováděna na spektrometru J-815 (Jasco, Japonsko) při teplotě 23 °C (kontrolováno Peltierovým článkem). Pro analýzu v oblasti 185–280 nm byly všechny zfiltrované vzorky naředěny sterilním fosfátovým pufrům (pH = 7,4) v poměru 1:3 v/v. Takto zředěné vzorky (25 μl) byly měřeny v křemenné kyvetě s optickou dráhou 0,01 mm (Hellma, Německo).

TAB. 1 PRŮMĚRNÉ HODNOTY VYBRANÝCH FYZIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ PRO PACIENTY S T1DM A KONTROLNÍ JEDINCE

parametr	BMI	glykémie [mmol·l ⁻¹]	HbA _{1c} [mmol·mol ⁻¹]	HSA [%]	α -globuliny [%]
pacienti s T1DM	19,6	10,9–11,9	75,9	52,6	23,5
kontrolní jedinci	22,7	4,0–4,5	neurčeno	55,4	18,8

Před a po spektrálních měřeních byly všechny kyvety a ATR krystal vyčištěny roztokem Starna CellClean (Starna Scientific Ltd., Velká Británie), opakovaně propláchnuty demineralizovanou vodou a methanolem a vysušeny.

Statistické vyhodnocení dat

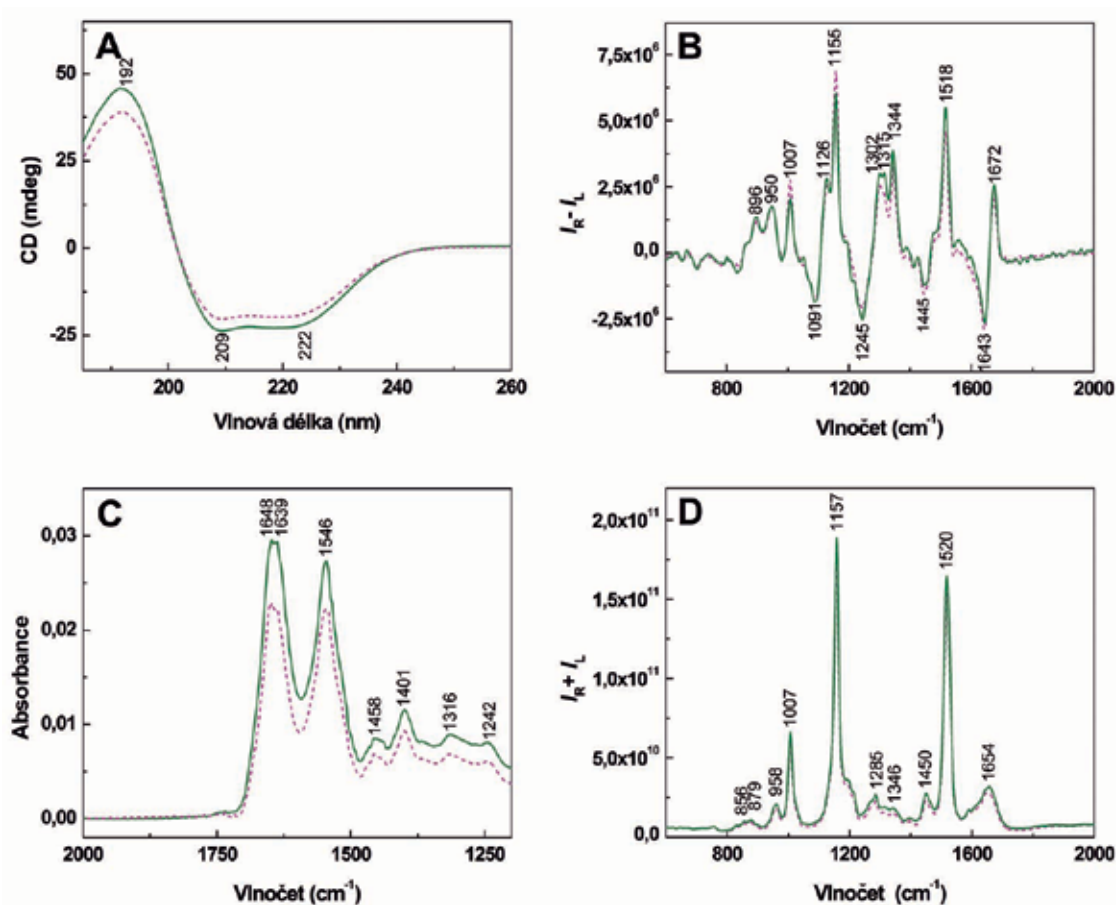
Získaná spektrální data byla vyhodnocena metodou lineární diskriminační analýzy (LDA) [11] v programu XLSTAT (Addinsoft, Francie). Pro vybrané pásy, které mohou nést klíčové informace o molekulární struktuře proteinů a dalších plazmatických biomolekul i jejich možných změnách, byl vytvořen statistický model. Výběr spektrálních pásů byl proveden s využitím korelačních a kovariančních matic. Pro statistický model byla rovněž určena jeho

specifita a senzitivita a pro ověření jeho kvality byla provedena křížová validace [12].

VÝSLEDKY

Elektronový cirkulární dichroismus

Spektra ECD (Obr. 1A) se vyznačují třemi dominantními pásy charakteristickými pro sekundární strukturu proteinů [4, 13]. Spektrální průběh odpovídá proteinům s vysokým obsahem α -helixu [4, 14], které jsou v krvi zastoupeny převážně lidským sérovým albuminem. Pozitivní pás 192 nm a dva částečně se překrývající negativní pásy 209 a 222 nm jsou výsledkem elektronových přechodů amidové skupiny peptidové vazby. Intenzita a tvar těchto



Obr. 1. Průměrná spektra ECD (A), ROA (B), IC (C) a Ramanovy (D) spektroskopie krevní plazmy z názorující rozdíly mezi pacienty s T1DM (čárkovaná čára) a kontrolními jedinci (plná čára)

pásů se mění v závislosti na geometrii peptidového řetězce [6, 15]. Je patrné, že v případě pacientů s T1DM dochází ke snížení intenzity všech tří výše zmíněných spektrálních pásů, což může mít dvě možné příčiny. Zaprvé, hodnoty celkového proteinu v plazmě se snižují s progresí onemocnění, zatímco proteiny si zachovávají svou nativní chirální strukturu. Nebo zadruhé, albumin jako negativní protein akutní fáze rozvinuje svou strukturu a je štěpen na achirální struktury či méně uspořádané struktury. To vede ke zvýšené produkci pozitivních protizánětlivých proteinů (α_1 - a α_2 -globulinů) s cílem udržet normální hodnoty ostatních plazmatických proteinů, což je v souladu s patofyziologií T1DM [1, 2].

Ramanova optická aktivita

V průměrných spektrech Ramanovy optické aktivity (Obr. 1B) můžeme zaznamenat skupinu pásů proteinů v oblastech amidu I a amidu III, které jsou typické pro proteiny s vysokým obsahem α -helikálních struktur [6, 16]. Ve spektrech vzorků pacientů byla pozorována změna intenzity negativního pásu 1245 cm^{-1} značící vyšší obsah β -struktur [17], což může být vysvětleno větší mírou rozvinutí struktury albuminu a/nebo jeho štěpením v průběhu onemocnění T1DM. Pozitivní pásy 1302 , 1344 cm^{-1} a raménko 1315 cm^{-1} představují proteiny s převažující α -helikální konformací [17]. Změny v intenzitách zmíněných pásů mohou být vysvětleny jako důsledek degradace albuminu na blíže nespecifikované intermediáty, které jsou využity pro syntézu dalších plazmatických proteinů nezbytných pro udržení homeostázy organismu během T1DM [1, 2]. Výrazné pozitivní pásy 1007 , 1155 a 1518 cm^{-1} mohou být přiřazeny karotenoidům, přičemž některé z nich se překrývají s pásy aromatických aminokyselinových zbytků [6].

Infračervená spektroskopie

Na Obr. 1C jsou zobrazena průměrná infračervená spektra se dvěma významnými pásy,

jejich maxima leží okolo 1648 a 1546 cm^{-1} , t. j. v oblastech amidu I, resp. amidu II, které odpovídají vibracím peptidové vazby. [18] V tomto případě mohou oba tyto pásy a jejich relativní intenzity odrážet změny v sekundární struktuře plazmatických proteinů. Ve výsledných IČ spektrech pacientů byl pozorován významný pokles intenzit pásů a zároveň změna poměru intenzit pásů amid I/amid II v porovnání s kontrolními jedinci. Navíc změny ve tvaru pásu amidu I mohou indikovat změny v sekundární struktuře plazmatických proteinů, ke kterým dochází v průběhu T1DM v důsledku dehydratačních procesů. Pokles v intenzitách byl rovněž pozorován pro pásy 1458 a 1401 cm^{-1} , které odpovídají vibracím funkčních skupin alifatických postranních řetězců.

Ramanova spektroskopie

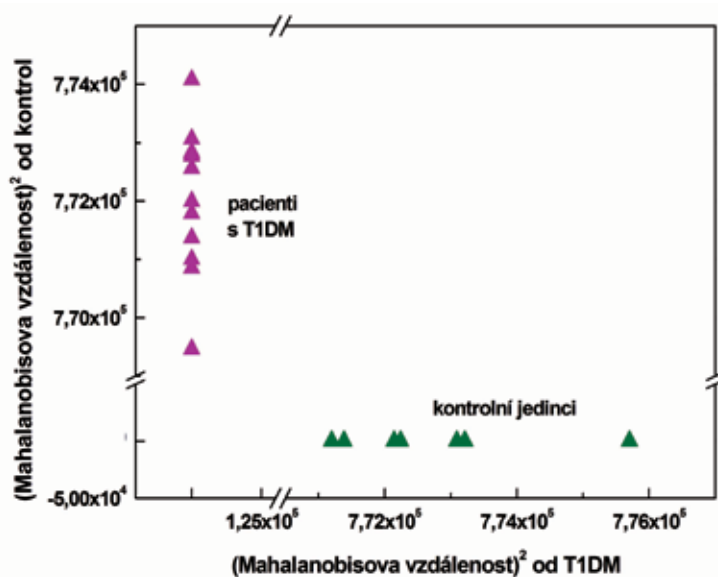
V průměrných Ramanových spektrech pacientů s T1DM a kontrolních jedinců (Obr. 1D) jsou patrné tři intenzivní pásy pocházející především od vibrací karotenoidů (1007 , 1157 a 1520 cm^{-1}), které jsou přítomny v plazmě v nízkých koncentracích. Jejich vysoká intenzita v Ramanově spektru je zapříčiněna rezonančním zesílením po excitaci ve viditelné oblasti (532 nm) [13, 19]. Spektra vykazují změny v intenzitách pásů typických pro proteiny s vysokým obsahem α -helikální struktury, zejména pásy 1654 cm^{-1} v oblasti amidu I a 1285 a 1346 cm^{-1} v oblasti rozšířeného amidu III, odpovídající vibracím peptidové vazby [6, 20]. Méně strukturovaný pás 1654 cm^{-1} a výrazně zvýšená intenzita pásu okolo 1642 cm^{-1} v oblasti amidu I ve spektrech pacientů indikuje změnu obsahu α -helixu, což je konzistentní s degradací sérového albuminu při vývoji T1DM [1, 2]. Sacharidy a lipidy přítomné v krvi jsou zastoupeny pásy 958 , resp. 1450 cm^{-1} [6]. Jejich mírně snížené intenzity pravděpodobně odpovídají narušení metabolismu těchto látek u diabetiků.

Lineární diskriminační analýza

Vzhledem k tomu, že některé spektrální změny mezi pacienty s T1DM a kontrolními jedinci jsou pouhým okem obtížně postřehnutelné, byla získaná spektrální data vyhodnocena vícerozměrnými statistickými metodami. Cílem bylo odlišit pacienty od kontrol na základě spektrálních vzorů (spectral pattern recognition), dále určit senzitivitu a specifitu po-

užitých spektroskopických metod a prokázat spolehlivost matematického modelu.

Výsledkem vyhodnocení bylo zjištění, že jednotlivé spektroskopické metody využívané samostatně nedosahují uspokojivých hodnot senzitivity ani specifity (Tab. 2). Na základě tohoto poznatku a skutečnosti, že vybrané metody poskytují navzájem komplementární informace, byl vytvořen souhrnný matematický model kombinující data ze všech čtyř použitých



Obr. 2 Grafické znázornění výsledku LDA pro kombinaci chiroptických (ECD, ROA) a konvenčních (Raman, IČ) spektroskopických metod v analýze krevní plazmy pacientů s T1DM a kontrolních jedinců

TAB. 2. HODNOTY SENZITIVITY, SPECIFICITY A CELKOVÉ SPRÁVNOSTI MODELU LDA A JEHO KŘÍŽOVÉ VALIDACE PRO DISKRIMINACI VZORKŮ KREVNÍ PLAZMY PACIENTŮ S T1DM A KONTROLNÍCH JEDINCŮ

metoda	model			křížová validace modelu		
	specifita [%]	senzitivita [%]	správnost [%]	specifita [%]	senzitivita [%]	správnost [%]
ECD	75	92	85	38	75	60
ROA	75	92	85	63	75	70
IČ	88	92	90	88	92	90
Raman	62	83	75	25	58	45
kombinace	100	100	100	100	92	95

metod (Obr. 2). Nyní již byla pozorována úplná separace skupin pacientů s T1DM a kontrolních jedinců, přičemž celková správnost přiřazení jednotlivých vzorků do příslušných skupin činila 100 %. Specificita a senzitivita vytvořeného modelu dosahovaly vysokých hodnot i po provedení křížové validace, a to 100 %, resp. 92 % (Tab. 2).

ZÁVĚR

Na základě analýzy krevní plazmy pomocí ECD a ROA v kombinaci s IČ a Ramanovou spektroskopií byly určeny spektrální oblasti nejvíce ovlivněné T1DM. Podle dosažených výsledků je možné konstatovat, že nejvýznamnější změny mezi pacienty s T1DM a kontrolními jedinci jsou partneré především v oblastech vibrací a elektronových přechodů peptidových vazeb, které odrážejí změny sekundární struktury proteinů v průběhu onemocnění. Následná multivariační analýza spektrálních dat prokázala, že chiroptické metody jsou schopny spolehlivě detekovat komplexní signály plazmatických biomolekul. Navíc, kombinací ROA a ECD s Ramanovou a IČ spektroskopií bylo dosaženo 100% specificity a 92% senzitivity v rozlišení vzorků po křížové validaci. Získané výsledky naznačují, že chiroptická spektroskopie může poskytnout odpovídající doplňující informace k již zavedeným klinickým postupům a může se tak stát užitečným podpůrným nástrojem v klinické diagnostice a screeningu T1DM.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla financována z účelové podpory MŠMT 20/2015 (A1_FCHI_2015_003 a A2_FCHI_2015_001) a Grantovou agenturou České republiky (projekt č. P208/11/0105). Autoři rovněž děkují „Operačnímu programu Praha – konkurenceschopnost“ (CZ.2.16/3.1.00/22/197) a „Národnímu programu udržitelnosti“ (NPU I (LO) MŠMT – 34870/2013). Metodologie měření

krevních vzorků a statistického zpracování dat byla vyvinuta za podpory grantu č. NT13259-3 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

LITERATURA

1. LEVY, D., 2011: Type 1 diabetes. Oxford University Press, Oxford, ISBN 978-0-199-55321-1.
2. LEROITH, D. et al., 2004: Diabetes mellitus: A fundamental and clinical text. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, ISBN 978-0-781-74097-5.
3. SCHIPPER, H. M. et al., 2008: Spectroscopy of human plasma for diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. In *Biomarkers Med.*, Vol. 2, No. 3, pp. 229–238.
4. BEROVA, N. et al., 2012: Comprehensive chiroptical spectroscopy. John Wiley & Sons Inc., New Jersey, ISBN 978-1-118-01292-5.
5. TATARKOVIČ, M. et al., 2015: The minimizing of fluorescence background in Raman optical activity and Raman spectra of human blood plasma. In *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 407, No. 5, pp. 1335–1342.
6. SYNYTSYA, A. et al., 2013: Analysis of human blood plasma and hen egg-white by chiroptical spectroscopic methods (ecd, vcd, roa). In *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 405, No. 16, pp. 5441–5453.
7. TATARKOVIČ, M. et al., 2012: Can chiroptical spectroscopy be used for the analysis of blood plasma? In *Chirality*, Vol. 24, No. 11, pp. 951–955.
8. PIECKOVÁ, L. et al., 2014: Metody chiroptické spektroskopie – nástroj v diagnostice degenerativních onemocnění? In *Chem. Listy*, Vol. 108, No. S4, pp. s255–s258.
9. ŠTOVÍČKOVÁ, L. et al., 2015: Identification of spectral biomarkers for type 1 diabetes mellitus using the combination of chiroptical and vibrational spectroscopy. In *Analyst*, Vol. 140, No. 7, pp. 2266–2272.
10. TATARKOVIČ, M. et al., 2015: The potential of chiroptical and vibrational spectroscopy of blood plasma for the discrimination between colon cancer patients and the control group. In *Analyst*, Vol. 140, No. 7, pp. 2287–2293.

- 11. DUNNE, R. A., 2006:** Linear discriminant analysis. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, ISBN 978-0-470-14815-0.
- 12. SAMMUT, C., Webb, G. I., 2010:** Encyclopedia of machine learning. Springer, New York, ISBN 978-0-387-30768-8.
- 13. PARKER, S. F. et al., 1999:** Raman spectrum of beta-carotene using laser lines from green (514.5 nm) to near-infrared (1064 nm): Implications for the characterization of conjugated polyenes. In *Appl. Spectrosc.*, Vol. 53, No. 1, pp. 86–91.
- 14. HIRST, J. D. et al., 2003:** Electronic circular dichroism of proteins from first-principles calculations. In *J. Phys. Chem. B*, Vol. 107, No. pp. 11813–11819.
- 15. WHITMORE, L., WALLACE B. A., 2008:** Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. In *Biopolymers*, Vol. 89, No. 5, pp. 392–400.
- 16. ZHU, F. et al., 2005:** Raman optical activity: A tool for protein structure analysis. In *Structure*, Vol. 13, No. 10, pp. 1409–1419.
- 17. BARRON, L. D. et al., 2007:** Raman optical activity: An incisive probe of molecular chirality and biomolecular structure. In *J. Mol. Struct.*, Vol. 834-836, No. pp. 7–16.
- 18. DAIDONE, I. et al., 2010:** On the origin of ir spectral changes upon protein folding. In *Chem. Phys. Lett.*, Vol. 488, No. 4–6, pp. 213–218.
- 19. WITHNALL, R. et al., 2003:** Raman spectra of carotenoids in natural products. In *Spectrochim. Acta, Part A*, Vol. 59, No. 10, pp. 2207–2212.
- 20. KINALWA, M. N. et al., 2010:** Accurate determination of protein secondary structure content from Raman and Raman optical activity spectra. In *Anal. Chem.*, Vol. 82, No. 15, pp. 6347–6349.

VÝVOJ TEÓRIÍ MINERALIZÁCIE TVRDÝCH TKANÍV

VALKO-ROKYTOVSKÁ, M.¹, RABAJDOVÁ, M.²
MAŠLANKOVÁ, J.², MAREKOVÁ, M.², STUPÁK, M.^{2*}

¹Katedra chémie, biochémie a biofyziky UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

²Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF v Košiciach, Tr. SNP1, 040 01 Košice

*marek.stupak[at]upjs.sk

SÚHRN

Napriek tomu, že od prvých publikovaných teórií vysvetľujúcich proces mineralizácie uplynulo už takmer 100 rokov, nie je tento dej stále spoľahlivo vysvetlený a pochopený. Každým dňom pribúdajú vo vedeckých databázach publikácie a štúdie, ktoré sa odhalením čiastkových krokov a jednotlivých faktorov snažia tento proces bližšie popísať a ozrejmiť. Je však veľmi zaujímavé vrátiť sa na chvíľu do histórie, hoci len niekoľkými vetami a pozrieť sa na to, ako sa pohľad na mineralizáciu tvoril a vyvíjal.

Kľúčové slová: mineralizácia, tvrdé tkanivá, vápnik, vitamín D

SUMMARY

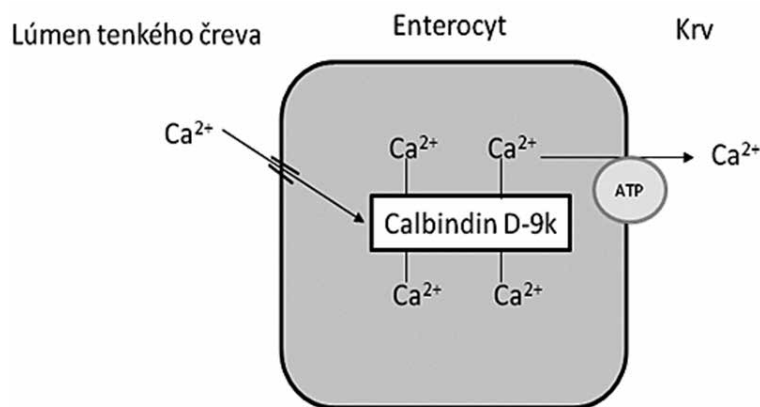
Although it has been almost 100 years since the first theories explaining the process of mineralization have been published, this process is still not reliably explained and understood. The number of publications and studies trying to describe and clarify this process through the revealing of intermediate steps and many

factors increases in scientific databases every day. But it is very interesting to return back in a history for a moment, even in few sentences and look how the view on mineralization have been formed and evolved.

Key words: mineralization, hard tissues, calcium, vitamin D

Ukladanie fosfátových solí vápnika v kostiach a zuboch predstavuje základný proces odohrávajúci sa v tvrdých tkanivách. Týmto procesom sa vytvára minerálna časť tvrdých tkanív, ktorá rozhodujúcim spôsobom prispieva k ich tvrdosti a pevnosti. Celý tento dej je neustále regulovaný, čím sa vytvára dokonalá rovnováha v činnosti jednotlivých buniek tvrdých tkanív.

Hlavnú zložku kostí predstavuje kolagén typu I (asi 90,75 %) a na vápnik bohaté kryštály hydroxyapatitu ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$), ktoré sú uložené v rámci alebo medzi vláknami kolagénu. Ukladanie hydroxyapatitu ku kolagénu je kontrolované prítomnosťou glykoproteínov a proteoglykánov. Kolagénové vlákna sú usporiadané do vrstiev a orientované tak, aby mali čo najväčšiu hustotu na jednotku objemu.



Obr. 1. Zvýšenie absorpcie vápnika vplyvom kalbindínu D-9k, ktorý je prítomný v ľudských enterocytoch

Posttranslačnými modifikáciami kolagénu sa vytvárajú intra- a intermolekulové pyridínolínové a pyrolové priečne väzby medzi vláknami, ktoré prispievajú k pevnosti kolagénových vlákien. Táto mikroarchitektúra dovoľuje kostiam byť hlavným rezervoárom vápnika v tele. Až 99 % vápnika prítomného v organizme je totiž viazaného v tvrdých tkanivách, v kostiach a zuboch. Metabolizmus vápnika je úzko spojený s vitamínom D. Tento vitamín tak predstavuje dôležitý faktor v procese tvorby kostí.

Vitamín D je dostupný buď ako ergokalciferol (vitamín D2) alebo ako cholekalciferol (vitamín D3). Ergokalciferol je v pečeni hydroxylovaný v polohe 25 na 25-hydroxyvitamín D2 a následne v obličkách na 1,25-dihydroxyvitamín D2. Podobne cholekalciferol, ktorého dobrým zdrojom sú napr. ryby, je konvertovaný na 25-hydroxyvitamín D3 a potom na 1,25-dihydroxyvitamín D3 (Holick 2007). Okrem toho je v koži prítomný 7-dehydrocholesterol, v ktorom sa účinkom UV-svetla, napr. zo slnečného svetla, prerušuje väzba medzi C9 a C10 steroidového kruhu, pričom sa tvorí provitamín D3, ktorý potom spontánne izomerizuje a dvojité väzby medzi C5 a C6 prechádza z konformácie cis na trans, čím sa vytvára cholekalciferol. Ten je v pečeni enzymaticky hydroxylovaný v polohe C25 účinkom pečeneového mikrozomálneho enzýmu. Takto hydroxylovaný prechádza do obličiek, kde

za katalýzy α 1-hydroxylázy prechádza na aktívnu (1,25-dihydroxycholekalciferol) formu vitamínu D (Mašlanková a kol. 2015). Vitamín D môže interagovať so svojím špecifickým receptorom, tzv. vitamín D viažúcim receptorom (vitamin D receptor, VDR). Po aktivácii vitamínom D VDR vytvára heterodimér, viaže sa na špecifické časti DNA a ovplyvňuje tak expresiu okrem iného napr. kalbindínu. Tento proteín zvyšuje absorpciu vápnika z tenkého čreva (Hong a Jeung 2013), (Obr. 1).

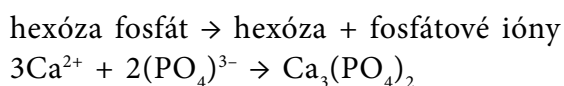
Organická matrix kostí, známa pod menom osteoid, podlieha mineralizačnému procesu.

Proces mineralizácie – v niektorých odborných článkoch možno nie úplne správne označovaný tiež pojmom odvodeným od slova kalcium – kalcifikácia, nakoľko sa na tvorbe tvrdých tkanív zúčastňujú okrem kalcia aj iné ióny – dodnes nie je spoľahlivo vysvetlený. Je definovaný ako proces, v rámci ktorého je organická hmota impregnovaná hmotou anorganickou (Vert a kol., 2012).

Prvá teória, ktorej cieľom bolo objasniť tento dej sa objavila v prvej polovi minulého storočia (Robison, 1923). Táto, tzv. fosfatázová teória osifikácie súvisela so samotným objavením enzýmu zodpovedného za celý proces, alkalické fosfatázy. Alkalická fosfatáza (EC 3.1.3.1.) je membránovo viazaný glykoproteín. Patrí do rodiny alkalických fosfatáz, dimérnych enzýmov, ktoré sú široko distribuované

v prírode, vrátane prokaryotov a vyšších eukaryotov (S a d e g h i r i s h i a Y a z d a n p a r a s t, 2007), s výnimkou niektorých vyšších rastlín (S h i g e n a r i a kol., 1998). Funkciou alkalické fosfatázy je hydrolýza rozličných monofosfátových esterov v prostredí zvýšeného pH spojená s uvoľnením anorganického fosfátu (W e i s s a kol., 1986, S h a r m a a kol., 2012). Cicavčie alkalické fosfatázy predstavujú zinok-obsahujúce metaloenzýmy, ktoré majú v aktívnom mieste dva atómy zinku (a jeden atóm horčíka). Tieto kovové ióny okrem esenciálneho vplyvu na katalytickú aktivitu významne prispievajú ku konformácii monoméru alkalické fosfatázy a tak zároveň nepriamo ovplyvňujú interpodjednotkové interakcie v rámci enzýmu (H o y l a e r t s a kol., 1997).

Podstatou fosfatázovej teórie je, že alkalická fosfatáza v mineralizujúcich tkanivách uvoľňuje anorganický fosfát z organických fosfátov (napr. z hexóza fosfátu), čím lokálne zvyšuje koncentráciu fosfátových iónov. Tie následne reagujú s kalciovými iónmi, čo vedie k vzniku nerozpustného kalcium fosfátu. Proces je možné zapísať rovnicami:



Veľmi skoro so zverejnením tejto teórie však bolo zrejmé, že je nedostatočná:

a) aktivita alkalické fosfatázy bola stanovená v tkanivách, ktoré za normálnych okolností nekalcifikujú,

b) boli objavené určité enzýmové inhibítory, ktoré neovplyvňovali aktivitu fosfatázy, avšak inhibovali mineralizáciu *in vitro*,

c) kalcifikácia *in vitro* sa odohrávala v roztokoch obsahujúcich vápnikové ióny a anorganický fosfát, t. z. bez prítomnosti organického fosfátu a tak pravdepodobne bez účasti alkalické fosfatázy. V týchto roztokoch nedochádzalo ku kalcifikácii, ak boli pridané enzymatické inhibítory, čo znamenalo, že utilizácia anorganického fosfátu vyžaduje prítomnosť určitých enzýmov. Robisonova teória tak nebola akceptovaná.

V druhej polovici minulého storočia predstavil svoju teóriu Cartier (1950, Cartier a Picard, 1955). Podľa tejto teórie má alkalická fosfatáza veľmi malú úlohu v procese mineralizácie. Naproti tomu, teória pripisuje podstatnú rolu ATPáze v procese indukcie mineralizácie. Podľa tejto teórie, pyrofosfát (PPi) uvoľnený z ATP vstupuje do kosti, kde činnosťou pyrofosfatázy lokálne zvyšuje koncentráciu fosfátu jeho uvoľnením z pyrofosfátu, čo v kombinácii s vápnikovými iónmi vedie ku kalcifikácii. Táto teória tiež nenašla širšie uplatnenie.

Jeden z návrhov pre vysvetlenie mechanizmu mineralizácie bol postavený na rozdielnej hodnote pH tekutiny prítomnej v chrupavkách a pH ostatných tkanív, čo podľa tejto teórie vedie k precipitácii kalcium fosfátu. pH chrupavkovej tekutiny bolo stanovené na 7.58 ± 0.05 oproti pH arteriálnej krvi 7.38 ± 0.04 (C u e r v o a kol., 1971).

Všetky vyššie spomínané teórie vychádzali z tzv. „booster“ mechanizmu mineralizácie, kde enzymatickou aktivitou dochádza k zvyšovaniu koncentrácie fosfátových alebo vápnikových iónov, ktorá podľa zákona o aktívnom pôsobení hmoty vedie k precipitácii.

Iný, tzv. „seeding“ mechanizmus mineralizácie predpokladá prítomnosť určitého „zárodku“, ktorý účinkuje ako templát, na ktorom sa ukladajú novo vytvorené kryštály a kryštalizácia tak automaticky pokračuje. Tento proces je známy aj ako epitaxia. Ako templáty boli navrhnuté: kolagén (G l i m c h e r a kol., 1957), chondroitín sulfát, lipidy (I r v i n g, 1960, 1973) a fosfoproteíny.

V 70-tych rokoch minulého storočia Bonucci a Anderson s Reynoldsom simultánne predstavili teóriu matrixových vezikúl (B o n u c c i, 1971, A n d e r s o n a R e y n o l d s, 1973). V rámci organického matrixu odsúdeného stať sa kosťou, ako aj v pre-dentíne a v pre-kalcifikujúcej zóne chrupaviek boli nájdené membránovo-viazané vezikuly s rozmerom približne 100 nm v priemere bohaté na kyslé fosfolipidy s vysokou afinitou k vápniku. Tieto fosfolipidy neviažu

len vápnik, ale rovnako dobre aj anorganický fosfát, čím sa vytvára kyslý fosfolipidovo-vápnikovo-fosfátový komplex (APL-Ca-P). Úloha týchto vezikúl v procese mineralizácie je dodnes v literatúre diskutovaná a mnohými považovaná za kontroverznú. Akceptuje sa, že vezikuly predstavujú iniciačné miesto v tvorbe minerálu, ale že dôležitejšia je činnosť špecifických enzýmov v procese biomineralizácie (Golub, 2009).

Detailný popis mechanizmu mineralizácie tak ostáva už takmer 100 rokov naďalej zahalený miernym rúškom tajomstva.

LITERATÚRA

1. ANDERSON, H. C., REYNOLDS, J. J. (1973): Pyrophosphate stimulation of calcium uptake into cultured embryonic bones. Fine structure of matrix vesicles and their role in calcification. *Dev. Biol.*, 34, 211–227.
2. BONUCCI, E. (1971): The locus of initial calcification in cartilage and bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 78, 108–139.
3. CARTIER, P. (1950): Biochemistry of ossification. Phosphorylation and calcification. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, 144, 331–333.
4. CARTIER, P., PICARD, J. (1955): Mineralization of ossifiable cartilage. II. The ATPase system of cartilage. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*, 37, 661–675.
5. CUERVO, L. A., PITA, J. C., HOWELL, D. S. (1971): Ultramicroanalysis of pH, pCO₂ and carbonic anhydrase activity at calcifying sites in cartilage. *Calcif. Tissue Res.*, 7, 220–231.
6. GLIMCHER, M. J., HODGE, A. J., SCHMITT, F. O. (1957): Macromolecular aggregation states in relation to mineralization: The collagen-hydroxyapatite system as studied *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 43, 860–867.
7. GOLUB, E. E. (2009): Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790, 1592–1598.
8. HOLICK, M. F. (2007): Vitamin D deficiency. *N. Eng. J. Med.*, 357, 266–281.

9. HONG, E. J., JEUNG, E. B. (2013): Biological significance of calbindin-D9k within duodenal epithelium. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 23330–23340.

10. HOYLAERTS, M. F., MANES, T., MILLAN, J. L. (1997): Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J. Biol. Chem.*, 272, 22781–22787.

11. IRVING, J. T. (1960): Histochemical changes in the early stages of calcification. *Clin. Orthopaed.*, 17, 92.

12. IRVING, J. T., WUTHIER, R. E. (1968): Histochemistry and biochemistry of calcification with special reference to the role of lipids. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 56, 237–260.

13. MAŠLANKOVÁ, J., STUPÁK, M., HUBKOVÁ, B., MAREKOVÁ, M. (2015): Metabolizmus a biologické účinky vitamínu D. *Lab. Diagnostika*, 1, 133–137.

14. ROBISON, R. (1923): The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.*, 17, 286–293.

15. SADEGHIRISHI, A., YAZDANPARAST, R. (2007): Plasma membrane homing of tissue non-specific alkaline phosphatase under the influence of 3-hydrogenkwadaphnin, an anti-proliferative agent from *Dendrostella lessertii*. *Acta Biochim. Pol.*, 54, 323–329.

16. SHARMA, U., SINGH, S. K., PAL, D., KHAJURIA, R., MANDAL, A. K., PRASAD, R. (2012): Implication of BBM lipid composition and fluidity in mitigated alkaline phosphatase activity in renal cell carcinoma. *Mol. Cell Biochem.*, 369, 287–293.

17. SHIGENARI, A., ANDO, A., BABA, R., VANIAMOTI, T., KATSUOKA, Y., INOKO, H. (1998): Characterization of alkaline phosphatase genes expressed in seminoma by cDNA cloning. *Cancer Res.*, 58, 5079–5082.

18. VERT, M., DOI, Y., HELLWICH, K.-H., HESS, M., HODGE, P., KUBISA, P., RINAUDO, M., SCHUE, F. (2012): Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012) *Pure. Appl. Chem.*, 84, 377–410.

19. WEISS, M. J., HENTHORN, P. S., LAFFERTY, M. A., SLAUGHTER, C., RADUCHA, M., HARRIS, H. (1986): Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 7182–7186.

VPLYV HLINÍKA NA ZDRAVIE ĽUDÍ A MOŽNOSTI JEHO STANOVENIA V BIOLOGICKOM MATERIÁLI

HUDÁK, A.¹, DUDOVÁ, M.², HUDÁKOVÁ, T.³

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Katedra chémie, biochémie a biofyziky, Komenského 73, 041 81 Košice

²Technická univerzita v Košiciach, Hutnícka fakulta, Katedra chémie, Letná 9, 042 00 Košice

³Univerzita P. J. Šafárika, Ústav lekárskej biológie, Trieda SNP1, 040 11 Košice

alexander.hudak@uvlf.sk

ABSTRAKT

Hliník a jeho zlúčeniny majú široké uplatnenie v každodennom živote. Do ľudského organizmu sa dostávajú najmä prostredníctvom potravín obsahujúcich prídavné látky, kozmetických výrobkov, farmaceutických prípravkov a dialyzačných roztokov. Hliník bol označený za potenciálne neurotoxický prvok. Je zaradený do skupiny predpokladaných rizikových faktorov vzniku Alzheimerovej choroby. Otrava hliníkom je charakteristická vznikom osteomalatických zmien s rezistenciou na liečbu vitamínom D, prípadne vznikom mikrocytárnej anémie alebo encefalopatie. Jeho fyziologické účinky na ľudský organizmus ešte nie sú dostatočne preskúmané. Pri štúdiu vplyvu hliníka a jeho zlúčenín na ľudský organizmus je dôležité mať k dispozícii spoľahlivé analytické metódy na stanovenie hliníka v rôznych druhoch vzoriek. Preto táto práca je zameraná na stručný prehľad toxických účinkov hliníka na ľudský organizmus a najmä metód využívaných v súčasnosti na stanovenie hliníka vo vzorkách biologického materiálu.

ABSTRACT

Aluminum and its compounds are widely used in everyday life. The human body is receiving them mainly by additives contained in food, cosmetic products, pharmaceutical preparations and solutions for a dialysis. Aluminum has been identified as potentially neurotoxic element. Aluminum was assigned to the group of predictive risk factors of Alzheimer's disease. Aluminum toxicity is characterized by the emergence of bone structure changes with resistance to treatment with vitamin D, the development of microcytic anemia or encephalopathy. Its physiological effects on the human body are not yet well understood.

It is important to have reliable analytical methods for the determination of aluminum in different types of samples in studying the effects of aluminum and aluminum compounds on the human body. Therefore, this article is focused on a brief overview of the toxic effects of aluminum on the human body and in particular the methods employed in the determination of aluminum presented in samples of biological material.

ÚVOD

Hliník je tretím najrozšírenejším prvkom v zemskej kôre. Pôvodne sa v životnom prostredí vyskytoval najmä vo forme stabilných zlúčenín, ktoré boli pre živé organizmy ťažko prístupné. Rôzne fyziologické ligandy, najmä fosfáty, chránia organizmus pred zvýšeným príjmom hliníka [1]. Preto jeho zastúpenie v biologických materiáloch je veľmi nízke. Na zvyšovanie koncentrácie hliníka v životnom prostredí významne vplývajú kyslé dažde, ktoré uvoľňujú množstvo tohto kovu z pôdy a hornín. Odtiaľ sa dostáva do povrchových a podzemných vôd.

Hlavným zdrojom príjmu hliníka u ľudí sú najmä potraviny, do ktorých sa dostáva v procese výroby (výroba syrov, piva, mrazených potravín), vo forme prídavných látok, ale aj z obalových materiálov. V potravinách rastlinného pôvodu sa vyskytuje vo vyšších koncentráciách ako v potravinách živočíšneho pôvodu. Soli hliníka sa používajú na úpravu pitnej vody, v kozmetike (antiperspiranty – AlCl_3), zubných pastách, vakcínach, antacidách, ako súčasť fosforečnanových viazačov, parenterálnej výživy a dialyzačných tekutín [2]. Hliník je vo forme $\text{Al}(\text{OH})_3$ súčasťou vakcín ako tzv. adjuvans, teda látka zvyšujúca imunitnú odpoveď na očkovanie. Európsky liekopis určuje maximálne povolené množstvo hliníka v jednej dávke vakcíny na 1,25 mg. [3]. Podľa Globálneho výboru pre bezpečnosť vakcín (GACVS) v súčasnej dobe neexistuje žiadny dôkaz o zdravotnom riziku z vakcín obsahujúcich hliník. Výskum sa zameriava najmä na zistenie, či existuje spojenie medzi syndrómom zápalu svalov (makrofágovou myofascitídou, MMF) a vakcínami obsahujúcimi hliník [4].

Hliník bol dlho považovaný za netoxický prvok. Na základe mnohých štúdií bola jeho toxicita dôkladne zhodnotená svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO) a Americkým úradom pre zdravie a ľudské služby. Bol definovaný ako potenciálne neurotoxický prvok pre ľudí [5]. Analytická chémia hliníka bola

detailne zhrnutá v materiáloch IPCS a ATSDR [6, 7]. Vzhľadom na to, že mnohé aspekty interakcie hliníka so živým organizmom ešte nie sú dostatočne preskúmané, stanovenie jeho obsahu vo vzorkách liečiv, výživových doplnkov, potravinách a rôznych druhoch biologického materiálu je neustále aktuálne.

ÚČINKY HLINÍKA NA ĽUDSKÝ ORGANIZMUS

Hliník nemá v živom organizme žiadnu biologickú funkciu. Jeho celkové množstvo v tele zdravého človeka je okolo 35 mg [8]. Ukladá sa najmä v kostre a to najprv vo forme tenkej vrstvy na povrchu kostí a potom sa postupne presúva z povrchu do vnútra kosti [9]. Biochémia hliníka je do značnej miery určená jeho oxidačným stupňom, veľkosťou iónov a redukčnými chemickými vlastnosťami. Je podobný Ca^{2+} a Fe^{3+} , s ktorými sa môže dostať do kostí.

Hliník môže vstupovať do organizmu inhalčne (pracovné prostredie), orálne, transdermálne a intravenózne. Najvýznamnejším spôsobom prenikania je orálna cesta. Perorálna biologická dostupnosť hliníka zo stravy sa odhaduje na 0,1–0,3 %. Zvýšená orálna absorpcia bola diagnostikovaná u Alzheimerovej choroby a Downovom syndróme [10]. Mechanizmus vstrebávania nie je zatiaľ celkom objasnený, najmä z dôvodu veľmi špecifických chemických vlastností tohto kovu, vplyvu pH a prítomnosti komplexotvorných látok v čreve [5]. Biologickú dostupnosť hliníka zvyšuje kyslé pH a prítomnosť organických kyselín (napr. kyseliny citrónovej), ktoré s ním tvoria komplexy. Môže to viesť k toxickému účinku hliníka u pacientov s poruchou vylučovania, najmä pri nedostatočnej funkcii obličiek [8]. Dostupnosť hliníka sa znižuje v prítomnosti zlúčenín obsahujúcich kremík [6].

Hlinité katióny veľmi dobre reagujú s fosforečnanovými aniónmi, čo následne umožňuje ich väzbu s DNA a ATP [9]. Hliník pri fyziologickej

hodnote pH tvorí s fluórom tetrafluorohlinitanový anión $[AlF_4]^-$, ktorý sa svojimi vlastnosťami veľmi podobá na anión fosforečnanový PO_4^{3-} . Pretože fosforečnany zohrávajú významnú úlohu v mnohých biochemických procesoch, môže ich náhrada aniónmi $[AlF_4]^-$ nepriaznivo ovplyvniť mnohé fyziologické funkcie [1]. Aj keď človek má v tele prirodzenú účinnú hematencefalickú bariéru na zníženie koncentrácie hliníka v centrálnej nervovej sústave (CNS), v niektorých prípadoch táto bariéra zlyháva. Možným mechanizmom prenikania Al do mozgu je prienik sprostredkovaný transferínom. Dôkazov o neurotoxických účinkoch hliníka u ľudí existuje veľké množstvo, napriek tomu je jeho nebezpečenstvo doteraz podceňované. Neurotoxická hliníka bola popísaná napr. u pacientov s chronickým zlyhávaním funkcie obličiek. Ak sa pri liečení týchto pacientov hemodialýzou použije dialyzačná tekutina s vyšším obsahom hliníka, môže sa vyvinúť otrava týmto kovom [11]. Otrava je charakteristická vznikom osteomalatických zmien s rezistenciou na liečbu vitamínom D, pri závažnejších stavoch vznikom mikrocytárnej anémie alebo encefalopatie [12]. Bezriziková koncentrácia hliníka pri výskyte osteomalácie bola odhadnutá na menej ako 30 mg/l. V prípade pacientov s encefalopatiou bol nájdený zvýšený obsah hliníka v mozgu, svaloch a kostnom tkanive. Presný mechanizmus vzniku encefalopatie z nadbytku hliníka zatiaľ nie je objasnený. Štúdie ukázali, že encefalopatie indukované hliníkom sa nevyskytli v dialyzačných centrách používajúcich vodu s koncentraciou hliníka menšou ako 50 mg/l [13]. Pri koncentráciách vyšších ako 80 mg/l došlo k výraznému zvýšeniu porúch spojených s encefalopatiou [10].

V 70. rokoch minulého storočia bola vyslovená hypotéza, že hliník je rizikovým faktorom pre vznik Alzheimerovej demencie (AD). Zistilo sa, že v mozgu osôb, ktoré zomreli na toto ochorenie prekročil obsah hliníka normálnu hornú hranicu jeho obsahu v mozgoch zdravých ľudí [1]. Najvyšší obsah hliníka sa zistil v hipokampe a jeho zvýšená hladina bola aj

v čelovej a spánkovej mozgovej kôre [2]. Ďalšie štúdie nepotvrdili úlohu hliníka pri vzniku AD, skôr poukázali na jeho sekundárne ukladanie v už poškodenom nervovom tkanive [3]. Demencia Alzheimerovho typu patrí k najčastejším degeneratívnym ochoreniam mozgu. Je to chronické ochorenie, ktorého podstatou je zánik neurónov mozgu, s tvorbou plakov a neurofibrilárnych kľbiek, čo sa v klinickom obraze prejavuje syndrómom demencie. AD je charakterizovaná difúznou atrofiou mozgovej kôry, ktorá je podmienená jednak absenciou a zmenami neurónov a neurofibril v kôre, jednak sekundárnou demyelinizáciou v podkôrových oblastiach. Aj keď klinický obraz ochorenia je výrazný, doteraz sa zistilo iba málo biochemických zmien. Sú nimi napr. redukcia aktivity cholín-acetyl-transferázy v kôre a hipokampe alebo redukcia neuropeptidu CRF (corticotropin releasing factor) a somatostatínu v degenerujúcich neuritoch. Súčasné štúdie poukazujú na to, že otázka patogenézy AD nie je jednoduchá a na jej objasnenie existuje niekoľko hypotéz [14]. Hliník je z hľadiska dnešných poznatkov zaradený do skupiny predpokladaných rizikových faktorov vzniku AD, spolu s konzumáciou alkoholu a manuálnym zamestnaním [15].

METÓDY STANOVENIA HLINÍKA

Odber a spracovanie vzoriek

Hliník a jeho zlúčeniny sa vyskytujú všade okolo nás, takže pri odbere vzorky alebo pri jej analýze môže veľmi ľahko dôjsť ku kontaminácii. Veľký dôraz sa preto kladie na zvolenie správneho postupu pri odbere vzorky, jej skladovaní, manipulácii a príprave na analýzu. Nesprávny postup môže viesť k významnému ovplyvneniu výsledku analýzy najmä v oblasti nízkych koncentrácií (≤ 1 mmol/l alebo ≤ 1 mmol/kg) pri všetkých metódach používaných na analýzu, okrem metódy AMS (Accelerator Mass Spectroscopy), ktorá využíva rádioaktívny izotop ^{26}Al [16]. Pre odber všetkých druhov vzoriek

na stanovenie hliníka sa odporúča používať polyetylénové, polypropylénové a teflonové vzorkovnice, ktoré musia byť dokonale čisté, premyté zriedenou HNO_3 a dôkladne umyté destilovanou vodou. Laboratórne sklo, ktoré sa má pri analýze použiť je nutné dokonale premyť teplou zriedenou HNO_3 a následne destilovanou vodou. Všetky reagenty použité pri analýze sa musia testovať na prítomnosť hliníka.

Vzorky krvi sa odoberajú najčastejšie do plastových skúmaviek Vacutainer Becton Dickinson alebo Monovete Sarstedt s prídavkom antikoagulantu [17]. Pri stanovení nízkych koncentrácií je potrebné otestovať na prítomnosť Al aj prídavané koagulačné činidlo. Odobrané vzorky sa pred analýzou skladujú v chladničke pri 4°C najviac 5 dní. Dlhodobejšie sa vzorky skladujú v uzavretých skúmavkách v mrazničke pri -20°C .

Na odber vzoriek moču sa používajú polyetylénové nádoby, premyté roztokom HNO_3 (10 % hmot.) a dokonale prepláchnuté deionizovanou vodou. Podmienky skladovania sú rovnaké ako pri vzorkách krvi.

Vzorky uchovávané v mrazničke sa pred analýzou nechajú voľne rozmraziť a vytemperovať na laboratórnu teplotu. Rovnako sa postupuje v prípade vodných roztokov uchovávaných v chladničke.

Jednou z najzložitejších vzoriek biologického materiálu sú vlasy. Rôzne časti vlasov môžu byť vystavené rôzne dlhý čas vplyvu vonkajších faktorov a tiež odrážať vnútorný stav organizmu. Odber vzoriek vlasov a ich spracovanie podrobne popísali Ch a t t a K a t z [18]. Autori odporúčajú, aby sa vzorky vlasov odoberali v temnej časti hlavy vo vzdialenosti 5 cm od hlavy v množstve 0,5–1 g. Pri odbere a skladovaní vzoriek sa musí zabezpečiť, aby nedošlo k ich kontaminácii. Na čistenie vzoriek vlasov sa ako najvýhodnejší uvádza postup, pri ktorom sa vlasy umývajú acetónom (p. a.), trikrát deionizovanou vodou a opäť acetónom. Pri každom čízení sa vzorka vlasov dekantuje 10 minút, pričom vlasy musia byť úplne po-

norené v kvapaline. Po dokonalom vysušení sa vlasy mineralizujú.

Pri analýze vzoriek biologického materiálu je potrebné používať ultračistú vodu a reagenty vysokej čistoty. Stanovenie hliníka môžeme v niektorých matriciach uskutočniť priamo bez mineralizácie (krv, moč). Ak je potrebné vzorku mineralizovať, môžeme použiť mineralizáciu mokrou cestou alebo suchou cestou. V súčasnosti sa často využívajú zariadenia na mikrovlnový rozklad zmesou kyselín a oxidačných činidiel [19].

Spektrofotometrické stanovenie

Pre stanovenie hliníka existuje mnoho analytických postupov, ktorých použitie závisí od možností laboratória, prístrojového vybavenia a typu vzorky. Z hľadiska požiadaviek na prístrojové vybavenie laboratória sú najjednoduchšie klasické fotometrické metódy stanovenia Al^{3+} vo vodných roztokoch. Jednou z týchto metód je stanovenie pomocou Aluminonu, ktorý pri pH cca 4 vytvára s Al^{3+} červený lak [20]. Pre stanovenie je dôležitý reakčný čas a temperovanie roztokov. Meranie sa uskutočňuje pri 525 nm v 1 cm sklenenej kyvete, pričom sa absorbanca musí zmerať do 25 minút od pridania Aluminonu. Koncentrácia hliníka sa určí z kalibračnej závislosti. Koncentračný rozsah stanovenia je 0,005–1 mg/l. Pre stanovenie hliníka vo vodných roztokoch sa odporúča tiež využitie fotometrickej metódy založenej na reakcii Al^{3+} s pyrokatecholovou violetou, s absorpčným maximom pri 581 nm. Vzorku je potrebné pufrovať hexametyléntetramínom na pH = 6,1. Meranie sa uskutočňuje v polyetylénových kyvetách. Koncentračný rozsah stanovenia je 0,05–0,3 mg/l. Stanovenie môže byť ovplyvnené prítomnosťou fluoridov [21, 22].

Autori práce [23] uvádzajú možnosť extrakčno-spektrofotometrického stanovenia hliníka metódou vzniku komplexov s rôznymi ligandami typu iónových asociátov, ktoré obsahujú dve chromoforné činidlá, ligand a zásadité farbivo.

Táto metóda však nie je vhodná na rýchle a spoľahlivé stanovenie hliníka.

Na stanovenie hliníka v biologickom materiáli sa v súčasnosti používajú rôzne prístrojové metódy, najmä metódy atómovej absorpčnej spektrometrie, s plameňovou atomizáciou (FAAS) alebo elektrotermickou atomizáciou (ETAAS) [24].

FAAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry)

Pri metóde FAAS je vodný roztok vzorky s prídavkom konc. HNO_3 (suprapur) nasávaný do plameňa acetylén – N_2O spektrometra, kde nastáva atomizácia. Koncentrácia hliníka vo vzorke sa stanoví pomocou kalibračnej závislosti. Táto technika bola použitá pri stanovení hliníka v mozgu, mozgovomiešnom moku, moči, srdcovom svalu, plazme a tkanivách. Širšie využitie vzhľadom na nutnosť pracovať s plameňom acetylén – N_2O však nezaznamenala [25].

ETAAS (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry)

Je to najpoužívanější technika na stanovenie nízkych koncentrácií hliníka (mg/l, ppb) v sére, plazme, celej krvi, moči a biologických tkanivách. Výhodou metódy je dostatočná citlivosť, špecifickosť, malé množstvo analyzovanej vzorky a tolerancia k prítomnosti rozpustených solí vo vzorke. Nevýhodou môže byť dostupnosť prístrojového vybavenia, vyššia časová náročnosť, menší rozsah lineárnej kalibrácie. Pri analýze sa používajú kyvety z pyrolyticky upraveného grafitu s platformou, ktorá zabezpečuje rovnomerné odparovanie vzorky, zlepšuje podmienky atomizácie a zároveň znižuje vplyv matrice. Pri stanovení nízkych koncentrácií kovov v biologickom materiáli sa zvyšuje vplyv matrice na stanovenie. Rušivé vplyvy bývajú najčastejšie spôsobené prítomnosťou nedisociovaných molekúl a vysokých koncentrácií solí (chloridov, fosforečnanov). Preto sú prístroje AAS vybavené korektormi

(deutériovou výbojkou, halogénovou žiarovkou s vláknom z volfrámu), alebo sa využíva Zeemanova korekcia pozadia.

Výsledky stanovenia stopových prvkov (teda aj Al) v krvi, moči a vo vlasoch sa často porovnávajú v medzinárodnom meradle, preto bolo potrebné zosúladiť postupy pre odber, prípravu a analýzu vzoriek a zabezpečenie kontroly kvality výsledkov stanovenia kovov. Cornelis a kol. tieto poznatky zosumarizovali v správe publikovanej v roku 1995 [26].

Vzorky krvi majú z hľadiska zloženia matrice konštantné zloženie. Môžu sa analyzovať priamo, alebo po mineralizácii. Pri priamom stanovení sa vzorka riedi 0,2 % roztokom Tritonu X-100 a pridá sa modifikátor $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ alebo NH_4HPO_4 . Problémom pri priamom stanovení môže byť vznik uhlíkových zvyškov, ktoré sa usadzujú v grafitovej kyvete. Tento jav sa môže eliminovať prídavkom kyslíka alebo vzduchu pri pyrolýze vzorky, čím sa dosiahne dokonalejší rozklad organickej matrice [19]. Niekedy stačí urobiť čiastočnú mineralizáciu – deproteináciu vzorky zahriatím v HNO_3 .

Stanovenie hliníka vo vzorkách moču je komplikovanejšie vzhľadom na zložitosť matrice a variabilitu jej zloženia. Moč má vysoký obsah rozpustených solí a preto sa pri analýze používa viacnásobné riedenie deionizovanou vodou s prídavkom HNO_3 . Pre vzájomné porovnávanie výsledkov analýz sa v moči stanovuje kreatinín a zistená koncentrácia hliníka sa prepočíta na jeho obsah [24].

Vzorky vlasov sa pred analýzou mineralizujú najčastejšie kyselinou dusičnou [27] alebo jej zmesou s kyselinou chloristou, peroxidom vodíka, prípadne kyselinou sírovou [28].

Pri analýze tkanív sa vzorky mineralizujú väčšinou mokrou cestou alebo kombináciou mokrej a suchej cesty [29, 30]. Problémom týchto vzoriek je ich heterogenita, takže sa musia homogenizovať, čo predstavuje riziko kontaminácie vzorky. Mineralizácia kostí sa uskutočňuje najčastejšie zmesou kyseliny dusičnej a chlorovodíkovej [31].

V odbornej literatúre nachádzame množstvo

článkov zameraných na stanovenie hliníka metódou ETAAS v rôznych vzorkách biologického materiálu, najmä v krvi a moči. Jednoduchý a nákladovo efektívny spôsob stanovenia v sére u hemodialyzovaných pacientov a zdravých jedincov popisujú Qadiri a kol. [32]. Vzorka séra sa rozpušťa v 0,2 % $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, pridá sa roztok 0,01 mol/l EDTA a 0,1 % Triton X-100. Citlivosť metódy pre hliník pri čiare 309,3 nm bola 74 pg, medza detekcie 2,2 ug/l resp. 4,4 ug/l.

ICP-AES (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy)

Atomová emisná spektroskopia s indukčne viazanou plazmou (ICP-AES) je silnou alternatívou k metóde EAAS pre stanovenie hliníka v biologických materiáloch. Označuje sa aj ako ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry), (ICP- optická emisná spektroskopia) [33]. Je to multiprvková metóda, pri ktorej sa prakticky neprejavujú chemické interferencie. Vplyv matrice známy pri metóde AAS je pri ICP-AES minimalizovaný vysokou excitačnou teplotou. Metóda je vysoko citlivá, s limitom detekcie hliníka v krvi 1 mg/l a v moči 4 mg/l. Problémom pri stanovení hliníka touto metódou je intenzívny a široký pás vápnika, ktorý zvyšuje pozadie a môže zvýšiť aj detekčný limit stanovenia hliníka [16]. Metóda ICP-AES sa čoraz viac využíva pri stanovení stopových prvkov, avšak pre bežné použitie je technicky náročná a finančne nákladná.

ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry)

Indukčne viazaná plazma s hmotnostnou spektrometriou je metóda, využívajúca indukčne viazanú plazmu ako zdroj iónov a hmotnostný spektrometer ako analyzátor iónov. Touto metódou je možné stanoviť v jednej vzorke viac ako 75 prvkov naraz. Detekčné limity sú dva až trikrát nižšie ako pri metóde ICP-AES. V moči a slinách boli pomocou ICP-MS detekované hladiny hliníka menšie ako 0,02 ug/ml a v krvnom

sére na úrovni 0,001 ug/ml. Špeciálne štúdie využili ICP-MS ako detektor pre hliník v tkanivových frakciách oddelených vylučovacou chromatografiou (SEC) s detekčnými limitmi 0,04 ug/g v stehennej kosti, obličkách a mozgu. Metóda bola použitá pre určenie koncentrácie hliníka v materskom mlieku, kravskom mlieku a dojčenskej výžive [16].

ĎALŠIE METÓDY

Na lokalizáciu hliníka v tkanivách sa namiesto histochemického farbenia za použitia Aluminonu začala používať energo-disperzná mikroanalýza (Energy Dispersive X-ray Analysis: EDX) a mikroanalýza elektrónovou sondou (Electron-Probe Microanalysis: EPMA). V roku 1985 Verbueken a kol. uverejnili štúdiu, ktorá skúmala lokalizáciu hliníka v histologických rezoch použitím mikroanalýzy elektrónovou sondou, hmotnostnej spektrometrie s laserovou mikrosondou (Laser Microprobe Mass Analysis: LAMMA) a hmotnostnej spektrometrie sekundárnych iónov (SIMS: Secondary Ion Mass Spectrometry) [34]. Najväčšiu citlivosť z uvedených metód poskytuje metóda LAMMA, ktorá bola použitá pre analýzu hliníka v mozgovom tkanive pacientov postihnutých Alzheimerovou chorobou [16]. Táto metóda môže súčasne zobrazovať a analyzovať rysy v nezafarbených a neošetrených častiach tkanív a teda sa vyhnúť problémom s kontamináciou.

Hmotnostná spektrometria sekundárneho iónu (Secondary Ion Mass Spectrometry-SIMS) je analytická metóda, ktorá sa môže použiť pre zobrazovanie hliníka a iných kovov v rôznych materiáloch alebo biologických vzorkách. Táto technika používa primárne zväzok iónov za vzniku sekundárnych iónov zo vzorky, ktoré sú potom analyzované hmotnostnou spektrometriou. Priestorové rozlíšenie je porovnateľné s rozlíšením v elektrónovej mikroskopii [16].

Metódy LAMMA a SIMS sa používajú v spojení so snímacou elektrónovou mikroskopiou (Scanning Electron Microscopy: SEM)

alebo transmisnou elektrónovou mikroskopiou (Transmission Electron Microscopy: TEM). Bližšie informácie o týchto mikroanalytických metódach nájdeme v práci Ortnera a kol. [35].

Pri štúdiu interakcie implantovanej titánovej dosťičky obsahujúcej 6 % hliníka sa metódou energetickej disperznej röntgenovej spektroskopie (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy: EDXS) v spojení so snímacou elektrónovou mikroskopiou (SEM: Scanning Electron Microscopy) zistila akumulácia hliníka v novovytvorenej lamelárnej kosti. Podobne použitím mikrolúčového protónmi indukovaného rtg. žiarenia (Micro-beam Proton Induced X-ray Emission: microPIXE or PIXEmbeam), sa zistila difúzia hliníka (na rozdiel od vanádu) z Ti-Al-V zliatiny zubného implantátu do okolitej kosti [36]. Metódy SEM, TEM a SEM v spojení s EDXS umožňujú stanovenie častíc hliníka s mikrometrovou veľkosťou [35].

Ellis a kol. použili na *in vivo* monitoring záťaž kostry hliníkom u pacientov so zlyhaním obličiek neutrónovú aktivačnú analýzu (NAA: Neutron Activation Analysis) [37]. Metóda sa využíva na určenie nízkej hladiny hliníka v biologických tkanivách a moči. NAA zahŕňa bombardovanie vzorky neutrónmi, ktoré transformujú niektoré zo stabilných ^{27}Al atómov na niekoľko rádioaktívnych izotopov hliníka, počnúc ^{28}Al a meranie indukovanej rádioaktivity. Výhodou NAA je dobrá citlivosť a relatívna nezávislosť od matrice (alebo média). Nevýhodou metódy pri stanovení hliníka je interferencia fosforu a kremíka, ktoré produkujú rovnaké rádioizotopy (^{28}Al), ďalej vysoká cena, obmedzená dostupnosť jadrových reaktorov pre NAA analýzu, krátky polčas rozpadu ^{28}Al (2,25 min.) a problémy s rádioaktívnym odpadom.

Na presné stanovenie hliníka v niekoľkých miligramoch biologického materiálu sa môže použiť aj akceleračná hmotnostná spektrometria (AMS: Accelerator Mass Spectrometry). Metóda kombinuje urýchľovač častíc s iónovými zdrojmi, veľkými magnetmi a detektormi a je schopná dosiahnuť detekčný limit jedného

atómu v 1015 (1 diel na kvadrilion – ppq). Táto metóda má biomedicínsku aplikáciu, pri stanovení hliníka v tele, ale je závislá na dostupnosti rádioaktívneho izotópu ^{26}Al [16].

ZÁVER

Vzhľadom na to, že vplyv hliníka a jeho zlúčenín na ľudský organizmus ešte nie je úplne zmapovaný, je problematika jeho stanovenia v biologickom materiáli stále aktuálnou. V súčasnosti je k dispozícii množstvo metód, ktoré umožňujú stanovenie aj stopových množstiev tohto kovu a tým možnosť získať odpovede na otázky jeho toxicity, distribúcie v organizme, špecifických interakciách s rôznymi druhmi tkanív a súvislosti s prejavmi rôznych druhov ochorení.

LITERATÚRA

1. STRUNECKÁ, A., PATOČKA, J.: Nové poznatky o toxických účincích fluoru a hliníku. *Interní medicína pro praxi*, 2001; 5, p. 205–208.
2. BECARIA, A., CAMPBELL, A., BONDY, S.C.: Aluminium as a toxicant. *Toxicology and Industrial Health*, 2002; 18, p. 309–320.
3. <http://www.sprievodcaockovanim.sk/myty-a-famy-o-ockovani/vakciny-obsahuju-nebezpecne-latky.html>.
4. http://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/aluminium/statement_112002/en/.
5. WHO: Environmental Health Criteria 194, Aluminium. Geneva 1997. ISBN 92-4-157194-2.
6. IPCS; (International Programme on Chemical Safety): Aluminum Environmental Health Criteria 194. Geneva: World Health Organization; 1997.
7. ATSDR; (Agency for Toxic Substances and Disease Registry): A Toxicological Profile for Aluminum. Atlanta, GA.: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 1999.
8. SHIRLEY, D.G., LOTE, C.J: Renal Handling of Aluminium. *Nephron Physiology*, 2005; 101, 99–103.

9. CABALLERO, B., ALLEN, L., PRENKICE, A.: Aluminium. *Encyklopedia of Human Nutrition*, 2006. ISBN 0-12-150110-8.
10. MARCHANTE-GAYON, J. M., MUNIZ, C. S., ALONSON, J. I., SANZ-MEDEL, A., 1999: Multielemental trace analysis of biological materials using double focusing inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Analyt. Chim. Acta*, 1999; 400, p. 307–320.
11. ALFREY, A. C., LE GENDRE, G. R., KACHNY, W. D.: The dialysis encephalopathy syndrome; possible aluminium intoxication. *N. Engl. J. Med.*, 1976; 294, p. 184–188.
12. BUCHANCOVÁ, J.: *Pracovné lékařstvo toxikológia*. Martin, Osveta, 2003; p.288-291.
13. WINSHIP, K. A.: Toxicity of Aluminium. *Toxicology revue*, 1993; 12(3), p. 177–211.
14. BARTKO, D., ČOMBOR, I., MADARASZ, Š., LULIAK, M.: Demencia Alzheimerovho typu. *Via pract.*, 2008; 5(10), p. 398–402.
15. STRUNECKÁ, A., PATOČKA, J.: Přehodnocení účasti hliníku na vzniku Alzheimerovy nemoci. *Čs. fyziol.*, 1999; 48 (1), p. 9–15.
16. **Analytical methods.** <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp22-c7.pdf>
17. SPĚVÁČKOVÁ, V., KNOTKOVÁ, J.: Prvková analýza klinických materiálů – aplikace elektrotermické atomové absorpční spektrometrie. *Chem. Listy*, 1998; 92, p. 287–293.
18. CHATT, A., KATZ, S. A.: *Hair Analysis*. VCH Publishers, New York. 1988.
19. MADER, P., ČURDOVÁ, E.: Metódy rozkladu biologických materiálů pro stanovení stopových prvků. *Chem. Listy*, 1997; 91, p. 227.
20. <http://old.vscht.cz/ktt/studium/predmety/lav/lav-218-06.pdf>
21. DOUGAN, W. K. and WILSON, A. L.: The absorptiometric determination of aluminium in water. A comparison of some chromogenic reagents and the development of an improved method. *Analyst*, 1974; 99, p. 413–430.
22. www.blatna.cuni.cz/prirucka.rtf.
23. BAZEL, Y., ANDRUCH, V.: Spektrofotometrické metódy stanovenia prvkov zásaditými farbivami-súčasný stav a trendy. *Chem. Listy*, 2006; 100, p. 784–789.
24. ELINDER, C. G., FRIBERG, L., KJELLSTRON, T., NORDBERG, G., OBERDOERSTER, G.: *Biological Monitoring of Metals. WHO/EHG/94*, 2. 1992.
25. GITELMAN, H. J.: *Aluminium and Health*. Marcel Dekker. Inc., New York, 1989, p.11.
26. CORNELIS, R., HEINZOW, B., HERBER, R. F. M., MOLIN CHRISTENSEN, J., PAULSE, O. M., SABBIONI, E., TEMPLETON, D. M., THOMASSEN, Y., VAHTER, M., VESTERBERG, O.: *Pure Appl. Chem.*, 1995; 67, p. 1557.
27. BOSQUE, M. A., DOMINGO, J. L., LLOBET, J., CORBELLÀ, M.: Cadmium in hair of school children living in Taragona Province, Spain. Relation to age, sex and environmental factors. *Biol. Trace Elem. Res.*, 1991; 28, p.147.
28. REVICH, B. A.: Lead in hair and urine of children and adults from industrialized areas. *Arch. Environ. Health*, 1994; 49(1), p. 59.
29. SZÁKOVÁ, J., MADER, P.: Metódy stanovení arzenu v biologickém materiálu. *Chem. Listy*, 1994; 88, p. 164.
30. CHARVÁT, B., MALÍŠ, J., BÉBAROVÁ, H., PODSTATOVÁ, H., KUBAČKOVÁ, J., MUDRÁ, R., BYSTROŇOVÁ, D., VOJKOVSKÝ, D.: *Česko-Slov. Hyg.*, 1993; 38, p. 289.
31. KOTULÁN, J., TOTUŠEK, J., ŠEFFLOVÁ, A., POLÁCH, J.: Lead in bone from south moravian autopsies. *Centr. Eur. J. Publ. Health*, 1994; 2(1), p. 42.
32. QADIR, M. A., AHMED, M., SHAHZAD, S.: Determination of Aluminium by Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry in Serum to Characterize Hemodialysis Toxicity. *Analytical Letters*, 2015; 48(1), p. 147–153.
33. TRENTINI, P. L., ASCANELLI, M., ZANFORLINI, B., VENTURINI, F., BUCI, G., FAGIOLI, F., 1993: Determination of aluminium by inductively coupled plasma mass spectrometry in serum of patients treated by haemodialysis, dialysis solutions and tapwater, and a comparison with atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993; 8: p. 905–909.
34. VERBUEKEN, A. H., VAN DE VYVER, F. L., VAN GRIEKEN, R. E., DE BROE M. E., 1985: *Microanalysis in biology and medicine*

ultrastructural localization of aluminum. *Clin. Nephrol.*, 1985; 24, S58–S77.

35. ORTNER, H. M., HOFFMAN, P., STADERMANN, F. J., WEINBRUCH, S., WENTZEL, M.: Chemical characterization of environmental and industrial particulate samples. *Analyst*, 1998; 123, p. 833–842.

36. KREWSKI, D., YOKEL, R. A., NIEBOER, E., BORCHLET, D., COHEN, J., HARRY, J.,

KCEV, S., LINDSAY, J., MAHFOUZ, A. M., RONDEAU, V.: Human Health Risk Assessment for Aluminium, Aluminium oxide, and Aluminium hydroxide. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, 2007; 10(Suppl 1). p. 1–269.

37. ELLIS, K. J., KELEHER, S., RACITI, A., SAVORY, J., WILLS, M.: *In vivo* monitoring of skeletal aluminum burden in patients with renal failure. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 1988; 124, p.85–95.

ZÁPALOVÉ CYTOKÍNY A ISCHEMICKO-REPERFÚZNE POŠKODENIE TENKÉHO ČREVA

FETERIK, Š.¹, RABAJDOVÁ, M.², GULAŠOVÁ, Z.²
VELIKÁ, B.², VESELÁ, J.^{1*}

¹Ústav histológie a embryológie, UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta, Šrobárova 2, 041 80 Košice

²Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta, Tr. SNP1, 040 11, Košice

*korešpondujúci autor: jarmila.vesela[at]upjs.sk

SÚHRN

Ischemicko-reperfúzne poškodenie tenkého čreva sa veľmi často vyskytuje pri rôznych chirurgických zákrokoch, transplantácie nevynímajúc. Tento stav prispieva k zvýšenej morbidite a mortalite pacientov. Poškodenie podmieňuje početné biologické mechanizmy, ktoré zapríčiňujú poškodenie tkaniva, respektíve orgánov. Počas tohto procesu dochádza k štrukturálnym a molekulovým zmenám v postihnutom tkanive. Spomedzi vnútorných orgánov je tenké črevo najcitlivejšie na ischemicko-reperfúzne poškodenie. Sliznica tenkého čreva počas ischemicko-reperfúzneho procesu syntetizuje rôzne proteíny akútnej fázy, črevné hormóny a cytokíny, ktoré majú vplyv nielen na črevo samotné, ale ovplyvňujú aj funkciu a integritu vzdialených orgánov. Cytokíny, produkované bunkami imunitného systému, z hľadiska kofaktorov pôsobiacich v prostredí vznikajúceho zápalu radíme k pro- a anti-inflamtným. Už len mierne narušenie rovnováhy medzi týmito skupinami môže viesť k hyperinflamácii, ktorá môže mať za následok až multiorganové zlyhanie. Intenzívny výskum systémovej zápalovej

odpovede na ischemicko-reperfúzne ataky má dopad na postransplantačnú regeneráciu tenkého čreva a následne ovplyvniť zdravotný stav jedinca.

Kľúčové slová: ichémia-reperfúzia, cytokíny, tenké črevo

SUMMARY

Ischemia-reperfusion injury is a phenomenon that is very common in a many surgical operations, not excluding transplantation. This phenomenon contributed to increased morbidity and mortality of patients. IRI determines numerous biological mechanisms that could cause tissue damage, respectively organ damage. During this process, there are structural as well as molecular changes caused in the affected tissue. From among internal organs, the small intestine is the most sensitive to ischemia-reperfusion injury. The mucosa of small intestine is during IRI the site of synthesis of various acute phase proteins, intestinal hormones, and cytokines, which affect not only the colon, but it can also affect

the function and integrity of distant organs. Cytokines produced by the different cells, mostly the cells of the immune system, in particular, are with regard to the inflammation divided into two groups: pro-inflammatory and anti-inflammatory. Only small impairment of equilibrium between these groups can lead to hyperinflammation, systemic inflammatory response syndrom (SIRS), leading to multi-organ failure. Therefore, it is important to continually search for opportunities how to prevent IRI, or reduce the consequences of this process. An intensive research in this area research can have a great effect on post-transplantation regeneration of the intestine and the finally on the actual health of an individual.

Key words: ischemia-reperfusion, cytokines, small intestine

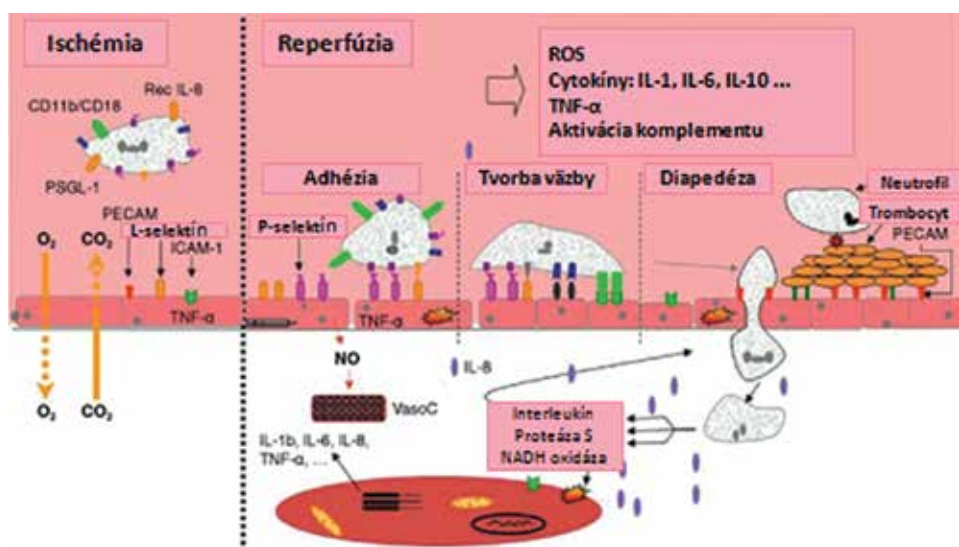
ÚVOD

Ischemicko-reperfúzne poškodenie a tenké črevo

Ischemicko-reperfúzne poškodenie (IRI, Ischemia/Reperfusion Injury) je často sa vyskytujúci stav pri chirurgických zákrokoch, ako aj transplantáciách. Ischémiia predstavuje obmedzenie prívodu krvi a živín do určitých častí organizmu, kým pri reperfúzii dochádza k obnoveniu toku krvi a živín do ischemizovaného tkaniva, čím dôjde k obnoveniu funkcií daného tkaniva alebo orgánu. Pri týchto procesoch dochádza v postihnutom tkanive k viacerým štruktúrnym a molekulovým zmenám. Ide najmä o biologické mechanizmy ako sú napr. aktivácia transkripčných faktorov, tvorba reaktívnych foriem kyslíka (ROS, Reactive Oxygen Species), produkcia cytokínov, eikozanoidov, adhézných molekúl, poškodenie vnútornej výstelky krvných ciev, infiltrácia neutrofilov, adhézia krvných doštičiek (obr. 1) a v konečnom dôsledku môže dôjsť až k apoptóze (Deitch, 1992). Počas reperfúzie je akumulované veľké

množstvo voľných radikálov. Reaktívne kyslíkové radikály ako napr. superoxidový radikál, peroxid vodíka, hydroxylový radikál a iné, majú schopnosť reagovať s väčšinou bunkových komponentov. Peroxidácia lipidov v rámci bunkovej membrány aktivuje fosfolipázy, ktoré stimulujú aktiváciu, migráciu a diapedézu leukocytov tým, že spôsobujú priame zmeny v ich povrchovej štruktúre, zmenu permeability, selektivity a iónového transportu. Oxidatívny stres taktiež reguluje bunkovú adhéziu prostredníctvom transkripčných faktorov, aby umožnil priebežne rolovanie, adhéziu a diapedézu leukocytov (Toyokuni, 1999). Migrácia leukocytov zahŕňa zhromažďovanie sa na stene ciev, rolovanie pozdĺž endotelu a pevné prichytenie sa pred samotným prestupom cez endotel (Xia a kol., 2003). Aktívne neutrofily prichytené na endotel spôsobujú ďalšie lokálne poškodenia vylučovaním voľných radikálov a proteolytických enzýmov. Tieto mechanizmy zohrávajú dôležitú úlohu pri IRI, čo je považované za základný spúšťač faktor systémovej zápalovej odpovede (SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome). SIRS vo väčšine prípadov vyúsťuje do multiorганového zlyhania (MODS, Multiple Organ Dysfunction Syndrome), vyznačujúceho sa až 80 % mortalitou (Mallick a kol., 2004; Bileciová - Rabajdová a kol., 2010).

K ischemicko-reperfúznemu poškodeniu často dochádza aj po transplantácii tenkého čreva, keďže tento orgán vyžaduje vysoký prísun krvi a živín (Deitch, 1992). Tenké črevo sa okrem svojej základnej funkcie vstrebávania živín vyznačuje aj imunologickou aktivitou, obsahuje množstvo imunologicky aktívnych molekúl a je jedným z orgánov reagujúcich na IRI. Sliznica tenkého čreva je tvorená epitelovými bunkami, ktoré majú schopnosť kontinuálnej regenerácie. Pri mechanizme IRI sa naruší črevná bariéra, čím sa stáva priepustnou pre baktérie a lipopolysacharidy. Lokálna akumulácia baktérií vedie k zápalovému procesu, k hromadeniu a zvýšenej expresii zápalových cytokínov. Tieto procesy vedú k systémovej



Obr. 1 Metabolizmus ischemicko-reperfúzneho poškodenia

Tab.1. Prehľad niektorých základných cytokínov

CYTOKÍN	MIESTO VZNIKU	PÔSOBENIE
IL-1	Monocyty/Makrofágy	aktivácia T-lymfocytov a makrofágov, horúčka
IL-2	T-lymfocyty	rast a aktivácia lymfocytov
IL-4	T-lymfocyty, mastocyty	diferenciácia a aktivácia lymfocytov, inhibícia funkcie makrofágov
IL-5	T-lymfocyty, mastocyty	rast a diferenciácia eozinofilných buniek
IL-6	Makrofágy, T-lymfocyty	rast a diferenciácia T-lymfocytov a beta-buniek, produkcia proteínov akútnej fázy, horúčka
IL-10	Makrofágy, T-lymfocyty	protizápalový účinok, indukcia diferenciácie B-lymfocytov
IL-13	T-lymfocyty	proliferácia, diferenciácia a aktivácia B lymfocytov
TNF-α (tumor nekrotizujúci faktor α)	Monocyty/Makrofágy, T-lymfocyty	indukcia lokálnych a systémových zápalových procesov, aktivácia endotelu
TGF-β (transformujúci rastový faktor β)	Monocyty, T-lymfocyty	protizápalový účinok

zápalovej odpovedi vedúcej až k multiorgánovému zlyhaniu (Deitch, 1992). Multiorgánové zlyhanie (syndróm multiorgánového zlyhania) je špecifický a komplexný proces, pri ktorom dochádza k dysfunkcii, teda zlyhaniu orgánu. V počiatočnej fáze tohto procesu dochádza

k nadprodukcii zápalových mediátorov, čo vedie k aktivácii a migrácii leukocytov a k produkcii pro-zápalových cytokínov (IL-1β, TNF-α). K multiorgánovému zlyhaniu môže dôjsť aj translokáciou baktérií do krvného obehu. Krvou sú baktérie transportované k vzdiale-

nejším orgánom, kde zápalové procesy môžu byť príčinou patologických zmien a indukcie apoptózy (Gregová a kol., 2013).

Pôsobenie cytokínov pri IRI

Dôležitú úlohu pri ischemicko-reperfúznom poškodení zohrávajú cytokíny. Tieto zápalové mediátory s polypeptidovou štruktúrou predstavujú skupinu signalizačných molekúl produkovaných širokou škálou buniek, ktorá zahŕňa aj bunky imunitného systému, ako sú makrofágy, B a T lymfocyty, mastocyty. Z hľadiska zápalu sú cytokíny rozdelené do dvoch skupín, a to pro-zápalové (IL-1 β , IL-2, TNF- α) a proti-zápalové cytokíny (IL-4, IL-10, TGF- β) (Gregová a kol., 2013). Pro-zápalové cytokíny, podieľajúce sa na regulácii zápalového procesu, sú vylučované najmä aktivovanými makrofágmi, kým proti-zápalové cytokíny, znižujúce zápal, pochádzajú najmä z T lymfocytov (Male a kol., 2006; Hulin, 2009). V tabuľke 1 je prehľad účinku vybraných cytokínov. Najčastejšie sledovanými sú hladiny TNF- α , IL-1 a IL-2, ktoré sú zaraďované medzi pro-zápalové a z proti-zápalových sú to najmä: IL-10, IL-4 (Fujino, 2002).

Keďže obidve skupiny cytokínov zohrávajú dôležitú úlohu pri zachovávaní homeostázy organizmu, je potrebné udržanie rovnováhy medzi týmito skupinami. Aj mierne narušenie tejto rovnováhy môže viesť k hyperinflamácii a následne až k multiorgánovému zlyhaniu.

V mnohých štúdiách boli sledované hladiny expresie mRNA rôznych cytokínov po následnom poškodení tenkého čreva. Najviac skúmanými cytokínmi pri IRI sú pro-zápalový TNF- α a proti-zápalový IL-10 (Carden a kol., 2000; Varga a kol., 2012). Hlavným zdrojom IL-10 sú makrofágy, T lymfocyty a polymorfonukleárne leukocyty. IL-10 inhibuje aktivitu T lymfocytov, ale aj funkciu makrofágov, nukleových kyselín buniek a zároveň blokuje syntézu cytokínov TNF, IL-1 a IL-6. Prispieva k indukcii diferenciácie B lymfocytov

na plazmocytárne bunky (Maruna, 2004). TNF- α je polypeptidový cytokín produkovaný najmä monocytmi a makrofágmi. Aktivuje neutrofile a endotel, na druhej strane inhibuje aktivitu lipoproteínovej lipázy. Zúčastňuje sa na aktivácii B lymfocytov, stimuluje proliferáciu väziva a aktivuje syntézu APP (proteínov akútnej fázy). TNF- α je dôležitým faktorom pre optimálny priebeh zápalovej odpovede, ale môže sa aj uplatniť v patogenéze niektorých metabolických a zápalových ochorení (Maruna, 2004).

Celková homeostáza daného organizmu, stupeň poškodenia tkaniva a úmrtnosť experimentálnych zvierat sú ovplyvnené rovnováhou medzi a proti-zápalovým cytokínom IL-10, ktorí pôsobia ako antagonisti. TNF- α sa zúčastňuje primárnych úloh v skorých fázach prozápalových procesov. TNF- α stimuluje bunky k apoptóze aktiváciou komplexu TNF- α + Fas ligand + Fas receptor, ovplyvňuje zápalovú reakciu a rovnako sa podieľa na potlačení tumorigenézy (Urban a kol., 2012). Štúdie popisujú, že vysoká hladina TNF- α vedie k septickému šoku a výrazným prozápalovým reakciám. Na druhej strane produkcia protizápalových cytokínov – IL10 môže zabrániť rozšíreniu IRI do vzdialených orgánov (Yamamoto, 2001). Prítomnosť IL-10 v organizme je dôležitá aj z hľadiska inhibície účinku prozápalových cytokínov tým, že zabraňuje produkcii TNF- α makrofágmi a potláča schopnosť antigén prezentujúcich buniek prezentovať na svojom povrchu antigén.

Pri viacerých experimentálnych štúdiách boli vytvorené početné testovacie skupiny zvierat na základe doby trvania reperfúzie. Na základe týchto skupín (1 hod., 6 hod., 24 hod. a 30 dňová skupina), boli sledované rôzne indikácie a interakcie cytokínov. Z početných výskumov je zrejmé, že aj keď došlo k signifikantnému zvýšeniu hladiny IL-10 po 1-hodinovej reperfúzii, hladina TNF- α bola približne o jednu tretinu vyššia ako hladina IL-10, čo je dôkazom prebiehajúcej zápalovej reakcie (Grotz a kol., 1995), v Stallionovej štúdii (Stallion a kol., 2002) neboli pozorované rozdiely medzi

IL-10. Po 24-hodinovej reperfúzii, kedy je predpoklad začínajúceho sa reparačného procesu organizmu, došlo k signifikantnému poklesu hladín TNF- α aj IL-10 oproti kontrolným skupinám, po 30-dňovej reperfúzii je hladina mRNA TNF- α nižšia u experimentálnej skupiny v porovnaní s kontrolnou skupinou, z čoho môžeme predpokladať, že došlo k inhibícii zápalu v dôsledku reparačných mechanizmov (Toth a kol., 2012).

Pro- aj proti-zápalovými vlastnosťami sa vyznačuje cytokín IL-6, ktorý sa podieľa na regulácii imunitných a zápalových procesov v organizme. Stimuluje proliferáciu a funkčnú aktivitu B a T lymfocytov, indukuje tvorbu IL-2 a expresiu jeho receptorov, súčasne zvyšuje hematopoetický účinok IL-3 na pluripotentné kmeňové bunky a má stimulačný účinok na proces maturácie megakaryocytov. K abnormálnej produkcii IL-6 dochádza pri patogenéze nádorových ochorení (mnohopočetný myelóm), chronických zápalových chorôb na imunopatologickom podklade (reumatoidná artritída), v priebehu AIDS a iných ochorení. Tento mediátor je produkovaný rôznymi typmi buniek ako dôsledok zvýšenia hladín cytokínov IL-1 a TNF- α a iných metabolitov. V experimentálnych štúdiách, kde bol exogénne podaný IL-6 pokusným zvieratám pri transplantácii tenkého čreva, bolo zaznamenané zníženie intenzity poškodenia vzdialených orgánov, ako napr. pľúca (Souza a kol., 2005).

Počas IRI dochádza aj k aktivácii monocytov, ktoré produkujú najmä IL-1 a TNF- α . Aktiváciou monocytov dochádza však aj k hemodynamickým zmenám a poškodeniu črevnej sliznice (Souza a kol., 2005; Pinho - Apezato a kol., 2011). Práve tieto poruchy v štruktúre sliznice čreva zapríčiňujú aj zvýšenie priepustnosti intestinálnej bariéry a možnú translokáciu baktérií a endotoxínov (Pinho - Apezato a kol., 2011).

Jedným z mediátorov vylučovaných po IRI je aj kyselina mliečna, ktorá slúži ako indikátor zlej prognózy po IRI čreva (Hulin a kol., 2009; Kimizuka a kol., 2004). Kyselina

mliečna je produkovaná počas anaerobných podmienok, ako je ischémia, keď pyruvát nie je transformovaný na acetyl-CoA, ale je premenený na kyselinu mliečnu. Tento mediátor nie je len markerom anaeróbného stavu, ale sa podieľa aj na zvyšovaní hladín cytokínov IL-1 β , IL-6 a TNF- α (Kimizuka a kol., 2004; Male a kol., 2006; Fujishiro a kol., 2010).

ZÁVER

Štúdium ischemicko-reperfúzneho poškodenia má veľmi veľký význam pri urgentných operačných zákrokoch, počas ktorých dochádza k prerušeniu prívodu krvi, pri transplantáciách, ale aj pri reparačných operáciách hernií alebo pri entero-kolitídach. V rámci brušnej chirurgie patrí tenké črevo ku najcitlivejším orgánom na ischemicko-reperfúzne poškodenie. Z hľadiska obnovy toku krvi je dôležitá reperfúzia ischemizovaného tkaniva, ktorá ale paradoxne iniciuje kaskádu pochodov vedúcich k dodatočnému poškodeniu tkaniva. Práve z tohto hľadiska je nesmierne dôležité štúdium nových možností predchádzania ischemicko-reperfúznemu poškodeniu, s cieľom zníženia následkov tohto procesu a k zlepšeniu terapeutickej intervencie, a tým celkových prognostických ukazovateľov u pacientov.

Práca vynikla pri riešení projektu VEGA 1/0115/14.

LITERATÚRA

1. BILECOVÁ-RABAJDOVÁ, M., URBAN, P., MAŠLANKOVÁ, J., VESELÁ, J., MAREKOVÁ, M., 2010: Analysis of changes in pro (Gadd153) and antiapoptotic (Grp78) gene expression after ischemic-reperfusion injury of the small intestine. *Prague Medical Report*, 2010; 111(4): 249–256.
2. CARDEN, D.L., GRANGER, D.N., 2000: Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J. Pathol.*, 2000; 190(3): 255–266.

3. DEITCH, E.A., 1992: Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann. Surg.*, 1992; 216(2): 117–34.
4. FUJISHIRO, J., PECH, T. C., FINGER, T. F., PRAKTINJO, M., STOFFELS, B., STANDOP, J., ABU-ELMAGD, K., TUERLER, A., HIRNER, A., KALFF, J. C., SCHAEFER, N. 2010: Influence of immunosuppression on alloresponse, inflammation and contractile function of graft after intestinal transplantation. *Am. J. Transplant.*, 2010; 10(7): 1545–1555.
5. GREGOVÁ, K., ČIKOŠ, Š., CZIKKOVÁ, S., BILECOVÁ-RABAJDOVÁ, M., URBAN, P., VESELÁ, J., 2013: Effects of intestinal ischemia reperfusion injury on the level of specific genes in rats. *J. Ecol. Health.*, 2013; 17(3): 141–146.
6. GROTZ, M. R., DING, J., GUO, W., HUANG, Q., DEITCH, E. A., 1995: Comparison of plasma cytokine levels in rats subjected to superior mesenteric artery occlusion of hemorrhagic shock. *Shock*, 1995; 3(5): 362–368.
7. HULÍN, I., 2009: *Patofyziológia*. 7th edition, SAP, 2009. ISBN: 978-80-8095-043-9.
8. KIMIZUKA K., NAKAO A., NALESNIK M.A., DEMETRIS A.J., UCHIYAMA T., RUPPERT K., FINK M.P., STOLZ, D. B, MURASE, N., 2004: Exogenous IL-6 inhibits acute inflammatory responses and prevents ischemia/reperfusion injury after intestinal transplantation. *Am. J. Transplant.*, 2004; 4(4): 482–494.
9. Male, D., BROSTOFF, J., ROTH, D. B., ROITT, I., 2006: *Immunology*. 7th edition, Mosby, 2006. ISBN: 978-0323033992.
10. MALLICK, I. H., YANG, W., WINSLET, M. C., SEIFALIAN, A. M., 2004: Ischemia-Reperfusion Injury of the Intestine and protective strategies against injury. *Dig. Dis. Sci.*, 2004; 49(9): 1359–1377.
11. MARUNA, P., 2004: *Proteiny akutní fáze. Fyziologie, diagnostika, klinika*. MAXDORF, 2004; ISBN: 80-85912-05-8.
12. DE PINHO-APEZZATO, M. L., MAKSOUD-FILHO, J. G., VALINETTI, E. A., SANTOS, M. M., TANNURI, A. C. A., MELLO, E. S., SILVA, L. F., DE MENDONCA COELHO, M. C., GIBELLI, N. E. M., ROCHA, R. M., NONOGAKI, S., GUIMARÃES, R. R. N., TANNURI, U., 2011: The role of interleukin-6, endothelins, and apoptotic genes in small bowel transplantation, in a swine model of ischemia and reperfusion injury. *Pediatric transplant*, 2011; 15(6): 617–627.
13. SOUZA, D. G., TEIXEIRA, M. M., 2005: The balance between the production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 determines tissue injury and lethality during intestinal ischemia and reperfusion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2005; 100(1): 59–66.
14. STALLION, A., KOU, T. D., MILLER, K. A., 2002: IL-10 is not protective in ischemia reperfusion injury. *J. Surg. Res.*, 2002; 105: 145–152.
15. TÓTH, Š., JONECOVÁ, Z., VARGA, J., STAŠKO, P., KOVALČINOVÁ, B., MARETTA, M., VESELÁ, J., 2012: Mesenteric ischemia-reperfusion injury: Specific impact on different cell populations within the jejunal wall of the rats. *Acta Histochemica*, 2012; 114, 276–284.
16. TOYOKUNI, S., 1999: Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int.*, 1999; 49(2): 91–102.
17. URBAN, P., BILECOVÁ-RABAJDOVÁ, M., MAREKOVÁ, M., VESELÁ, J., 2012: Progression of apoptic signaling from mesenteric ischemia-reperfusion injury to lungs: correlation in the level of ER chaperones expression. *Mol. Cel. Biochem.*, 2012; 362(1–2): 133–140.
18. VARGA, J., TÓTH, Š., STAŠKO, P., TÓTH, Š. Jr., BILECOVÁ-RABAJDOVÁ, M., OSTRÓ, A., VESELÁ, J., 2012: Intestinal ischemia-reperfusion injury – the histopathological status of remote vital organs in acute and subacute phases. *Ann Transplant.*, 2012; 17(1): 11–20.
19. XIA, J., LEE, D. H., TAYLOR, J., VANDELFT M., TRUANT, R. R., 2003: Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum. Mol. Gen.*, 2003; 12(12): 1393–1403.
20. YAMAMOTO, S., TANABE, M., WAKABAYASHI, G., SHIMAZU, M., MATSUMOTO, K., KITAJIMA, M., 2001: The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *J. Surg. Res.*, 2001; 99(1): 134–141.

Váš partner

ASSISTA

v laboratóriu

**Klinická chémia
Imunológia
Infekčná sérológia**



Ortho Clinical Diagnostics



**Automatizovaná
mikrobiológia**



**Laboratórne
Informačné systémy**



Assista Slovakia, spol. s r.o.

www.assista.at

Prealanalytical EQA Schemes

- Control the most error-prone laboratory testing phase
- Align your processes with the requirements of the ISO 15189 standard
- Four separate schemes: **Clinical Chemistry, Phlebotomy and POCT units, Microbiology & Blood gas analyzers**
- Preanalytical EQA schemes suit all laboratory professionals
- Free trial case available

... pre komplexne dokonalé laboratórium sú dôležité aj detaily



Osmomat 030 osmometer
roční preverená kvalita



SUPER GL 2
najpoužívanéjšie glukóзовé analyzátory



ADAMS A1c
HPLC analyzátor glykovaného hemoglobínu

Eurolab Lambda a.s.

Špecialista na

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



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 25 inštalácií močových systémov v SR
- rôzne princípy vyšetrenia močového sedimentu:
 - prietoková cytometria
 - snímanie častíc v usmernenom toku kvapaliny v planárnej prietokovej kyvete
 - snímanie častíc v kyvete po centrifugácii

HOMOCYSTEIN 2R 200

Souprava pro enzymatické
stanovení homocysteinu

Hlavní charakteristiky

- Enzymatické stanovení
- Stabilita on board 30 dnů
- Sérum & plasma
- Výborná korelace s HPLC a immunoassays
- 2 - bodová kalibrace
- Vysoká přesnost
- Lineární do 90 $\mu\text{mol/l}$



World Leader in Acute Care Testing



ABL800 FLEX



ABL90 FLEX

AQT90 FLEX

TCM CombiM/400/Tosca



ABL

AQT

TCM

pH	cCl ⁻	cGlu	ctHb
cH ⁺	cCa ²⁺	cLac	sO ₂
pCO ₂	cK ⁺	cCrea	FO ₂ Hb
pO ₂	cNa ⁺	ctBil	FCO ₂ Hb
			FMetHb
			FHHb
			FHbF

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

tcpO₂
tcpCO₂
SpO₂
Pulse rate

RADIOMETER s.r.o.

zastoupení pro ČR a SR

Křenova 3, 162 00 Praha 6, Tel.: +420 220 400 300
Email: office@radiometer.cz, Web: www.radiometer.cz



RANDOX
QUALITY CONTROL

Výsledky, ktorým môžete veriť

Nezávislé kontroly **Acusera**, externá kontrola kvality **RIQAS** alebo **Acusera 24•7** medzilaboratórny manažment dát, kvalita a istota v správnosti sú ich podstatou.



ACUSERA @



ACUSERA 24•7



RIQAS

Randox s.r.o., Vilová 2, 851 01 Bratislava

☎ + 421 2 6381 3324 ☎ + 421 2 6381 2482

✉ acusera@randox.com 🌐 randoxqc.com





CORE LAB TRANSFUSION MOLECULAR POINT OF CARE INFORMATICS

ARCHITECT *i2000*SR

High-speed immunoassay testing uniquely designed for you

- STATs prioritized fast
- Advanced CHEMIFLEX technology
- Equivalent results across all ARCHITECT *i*Systems



Abbott Laboratories, s.r.
Diagnostic Division
Karadžičova 10, CBC II
821 08 Bratislava 2
Slovenská republika
tel.: +421 2 44 454 176
www.abbottdiagnostics.sk

CHOOSE TRANSFORMATION



NOW I CAN

Increase my lab's productivity »



Introducing the DxN VERIS Molecular Diagnostics System.*

DxN VERIS enhances laboratory productivity through a simplified, flexible LEAN workflow and true single sample random access. It's the ultimate in ease of use, so you choose how to best optimize your team to do the work you want, when you want — you decide.

See us at the 18th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV) in Edinburgh, 9-12 September

Solidify your choice for productivity at
www.beckmancoulter.com/moleculardiagnosics

*Not for sale or distribution in the U.S.; not available in all markets.

©2015 Beckman Coulter, Inc. Beckman Coulter and the stylized logo are registered trademarks of Beckman Coulter, Inc.



MOVE YOUR LAB FORWARD beckmancoulter.com

20 rokov sme BiOG



SIEMENS

Siemens Medical Solutions Diagnostics

BIO-RAD

DiaSys

Diagnostic Systems

EKF
DIAGNOSTIC

 **INTERLAB**

EUROLyser 

 **TECAN.**

Auto Coagulation Analyzer



Automatický koagulační analyzátor:

- Koagulační, chromogenní a imunologické metody měření
- Jednoduchý, snadno ovladatelný pomocí dotekové obrazovky
- Úsporný, jednoduše programovatelný
- Otevřený reagenční systém



Technické specifikace:

- Výkon: max. 60 testů/hodinu pro PT
- Testy: PT, APTT, TT, FIB, AT, PLG, D-Dimer, FDP, aj.
- Princip měření:
Koagulační testy: „Scattered Light“ detekce
Chromogenní testy: Kolorimetrie 405nm
Imunologické testy: Turbidimetrie 575nm

- Databáze:
10 000 výsledků testů a 10 000 reakčních křivek
- Kontrola kvality: 12 QC souborů
- Kalibrace: max. 6 bodová
- STATIM vzorky
- Volba automatického přeřazení a opakování testu
- Čtečka čárového kódu

Pozice pro vzorky:

- Stojany pro vzorky: 27 pozic (3x9)

Pozice pro reagenzie:

- Reagenční podnos: 23 pozic
- Chlazení reagensů: <16°C

Pozice pro květy:

- V přístroji: 72
- Minimální reakční objem: 150ul
- Reakční teplota: 37±0.5°C

Pipetovací jehla:

- Automatické předehřátí
- Automatické promytí
- Ochrana proti kolizi, detekce hladiny
- Kontrola objemu reagensů

Tisk

- Zabudovaná termotiskárna
- možnost připojení externí tiskárny

Ostatní specifikace:

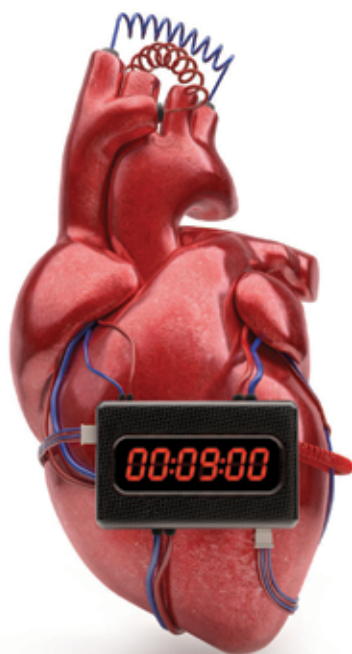
- Světelný zdroj: LED
- Napájení: AC 110/240V, 50-60±1Hz
- Provozní teplota: 10°C-30°C, vlhkost <85%
- Spotřeba destilované vody: <0.5L/hodinu
- Rozměry: LxWxH (mm): 660x580x510
- Hmotnost: 53Kg



7 Detekčních kanálů

- 5 pro koagulační metody
- 1 x chromogenní metody
- 1 x imunologické metody





*Testovať včas.
Liečiť správne.
Zachrániť život.*

Keď sa počíta každá minúta

*Včasná diagnostika
zachraňuje životy
pri akútnom koro-
nárnym syndróme*

Testovať včas

Každých 30 minút omeškania medzi symptómami a liečbou u pacientov s akútnym infarktom myokardu (AIM) zvyšuje relatívne riziko úmrtia do jedného roku o 7,5 %. ¹

Liečiť správne

Kardiálny Troponín hrá kľúčovú úlohu pri diagnostike u pacientov bez ST elevácie (NSTEMI). Zvýšené hladiny Troponínu pomáhajú pri rozhodovaní procese medzi skorou (< 24 h) alebo neinvazívnou terapiou. ²

Zachrániť život

Troponín T test podstatne zlepšuje diagnostiku AIM a pomáha pri adekvátnej intervencii zachraňujúcej život.

Elecsys® Troponín T high-senzitívny test a Point of Care (PoC) Troponín T test umožňujú získať rýchle a štandardizované výsledky do 18 minút a skôr. PoC riešenie pomáha všetkým zdravotníckym zložkám dodržať odporúčania NACB* o dodaní výsledku testu v 60 minútovom intervale. ³

¹ De Luca, G. et al. (2004). *Circulation*. 109(10), 1223-5.
² Windecker, S. et al. (2014). *Eur Heart J* 35(37), 2541-619.
³ Wu, A.H. et al. (1999). *Clin Chem*. 45(7), 1104-21.

* National Academy of Clinical Biochemistry





SIEMENS

Testujte lepšie. Pracujte rýchlejšie

Zlepšite klinické testy a pracovné procesy pomocou systémov Siemens.

www.siemens.sk/diagnostics

Klinická diagnostika nie je iba veda. Inými slovami úspešnosť laboratória závisí nielen od výsledkov testov, ale aj od pracovných postupov a ich organizácie. Siemens Healthcare Diagnostics vám vie pomôcť s oboma. Naše efektívne riešenia kombinujú široké portfólio testov, ktoré chcete, a špičkovú technológiu, ktorú pri testovaní potrebujete. Dodávame nielen testy pre klinickú diagnostiku, ale tiež know-how pre rozvoj a inovatívne

riešenia. Navyše ponúkame vzdelávanie, servis a podporu, aby ste svoje možnosti využili na maximum. Môžete tak svojim pacientom poskytnúť starostlivosť najvyššej kvality.

Viac informácií, ako vám spolupráca so spoločnosťou Siemens môže pomôcť, nájdete na stránke www.siemens.com/test-smarter.

Answers for life.



SARSTEDT

Reagent & centrifuge tubes

Liquid Handling

Screw cap micro tubes & reaction tubes

Microbiology

Cell & tissue culture

General laboratory products

Forensic

Racks & storage boxes

Environmental technology

Centrifuges

Mixers

Sarstedt, spol s.r.o.
Údernícka 11, 851 01 Bratislava Slovakia
Tel:00421 2 68 245 933 Fax:00421 2 68 245 934
e-mail: sarstedt@sarstedt.sk, www.sarstedt.com