



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

**Slovak Society of Clinical Biochemistry
Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií**

Číslo 1-2/2008

Ročník XIII.

**PRICHÁDZA EURO!
ÚLOHA LABORATÓRIA V NEFROLÓGII
RECENZIE KNÍH**

**SÚHRNY VIII. ZJAZDU SLOVENSKEJ
SPOLOČNOSTI KLINICKEJ BIOCHÉMIE
1.-3. JÚNA 2008, BRATISLAVA**

**A
VI. SLOVENSKO-RAKÚSKO-ČESKÉHO
SYMPÓZIA NA TÉMU URGENTNÁ MEDICÍNA
A INTENZÍVNA STAROSTLIVOSŤ
2. JÚNA 2008, BRATISLAVA**



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry

Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1–2/2008

Ročník XIII.

PRESEDA REDAKČNEJ RADY

Katarína Daňová

VÝKONNÝ REDAKTOR

Oliver Rác

ODBORNÝ REDAKTOR

Ján Mocák

REDAKČNÁ RADA

Anna Stecová, bývalá predsedkyňa redakčnej rady

Ján Balla, bývalý výkonný redaktor

Pavol Blažíček, bývalý výkonný redaktor

Roman Alberty

Peter Božek

Ladislav Cebecauer

Jozef Čársky

Ivan Čižmár

Michal Farkaš

Drahošlav Gábor

Ján Lepej

Tomáš Lipšic

Vladimír Kohút

Peter Kubisz

Ivan Pecháň

Hedviga Pivovarníková

Viera Spustová

Dagmar Syrová

Katarína Šebeková

Helena Šeboková

Ivana Šidlíková

Božena Švecová

Rastislav Valko

Juraj Volmut

Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pre SLS

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

ISSN 1335-2644

OBSAH

ORIGINÁLNE VEDECKÉ PRÁCE A PREHLADY

Euro a laboratórna medicína na Slovensku I. Príprava na zavedenie novej meny	7
<i>Balla Ján Sr., Balla Ján Jr.</i>	
Nedostupná dostupnosť.....	20
<i>Lepej Ján, Lepejová Katarína</i>	
Úloha laboratória v nefrologickej diagnostike z pohľadu praktického lekára	26
<i>Derzsiová Katarína, Mydlík Miroslav</i>	
Niektoré aspekty metabolizmu oxidu dusnatého v súvislosti s možnosťou využitia jeho metabolitov ako markerov v klinickej praxi.....	32
<i>Kalnovičová Terézia, Turčáni Peter</i>	
Spektrofotometrická analýza cerebrospinálneho likvoru po subarachnoidálnom krvácaní. Niektoré metodologické a klinické implikácie	38
<i>Ondrkalová Marta, Kalnovičová Terézia, Turčáni Peter</i>	
Využitie prietokovej cytometrie na detekciu donor-špecifických protilátok pred transplantáciou obličky.....	43
<i>Chreňová Silvia</i>	
Apolipoproteín B v terapeutických guideleinoch členských štátov EÚ a realita jeho indikovania v jednej fakultnej nemocnici.....	50
<i>Gáško Rudolf, Barlová Jana</i>	
<i>Raffáč Štefan, Geletková Slávka</i>	

KRÁTKE ORIGINÁLNE ZDELENIA

Epidemiológia diabetes mellitus 2. typu a jeho komplikácií u hospitalizovaných pacientov na internej klinike v období január–august 2006	57
<i>Babčák Marián, Merčiaková Martina, Rácz Oliver, Slivka Marián, Németh František</i>	
Diagnostika diabetes mellitus u dospelých a diagnostika gestačného diabetes mellitus	58
<i>Franečková Jana</i>	
Výsledky štúdie DEPAC – súčasný stav slovenskej diabetológie	60
<i>Michálek Jozef</i>	
Diabetes nie je len o glykémii.....	61
<i>Pecháň Ivan, Daňová Katarína</i>	

SÚHRNY VIII. ZJAZDU SLOVENSKEJ SPOLOČNOSTI KLINICKEJ BIOCHÉMIE 1.–3. JÚNA 2008, BRATISLAVA A VI. SLOVENSKO-RAKÚSKO-ČESKÉHO SYMPÓZIA NA TÉMU URGENTNÁ MEDICÍNA A INTENZÍVNA STAROSTLIVOSŤ 2. JÚNA 2008, BRATISLAVA

Súhrny.....	65
--------------------	-----------

RECENZIE KNÍH

Zuzana Špirková a kolektív: Kardiomarkery	119
<i>(Sedláková Eva)</i>	
Ján Jessenius: O krvi.....	120
<i>(Riemerová Magdaléna)</i>	

**ORIGINÁLNE VEDECKÉ PRÁCE
A PREHĽADY**

BALLA JÁN¹ sr., BALLA JÁN² jr.

¹Analyticko-diagnostické laboratórium, s.r.o., Prešov

²WOOD & Company, Praha, Česká republika

SÚHRN

Euro je mena členských štátov eurozóny, ktoré používajú spoločnú menu. Kým celú Európsku úniu predstavuje 27 štátov, euro je zavedené len v eurozóne, teda len v časti EÚ – momentálne v 14 štátoch. Slovensko sa stane pätnástym členom eurozóny. Prijatím spoločnej meny – eura – sa dajú ešte lepšie využívať výhody spoločného trhu. Spoločný trh, ktorý je charakterizovaný voľným pohybom tovaru, osôb, služieb a kapitálu sa v EÚ postupne zintenzívnal na sklonku minulého storočia. Slovensko zavedie euro súčasne do hotovostného aj bezhotovostného obehu bez prechodného obdobia 1. januára 2009. Ide o tzv. Big-Bang scenár. Zákonným platidlom na území Slovenskej republiky sa od tohto dňa stane euro. Slovenské eurové mince budú platné vo všetkých krajinách eurozóny a taktiež eurové mince ostatných krajín eurozóny budú platným obeživom na Slovensku. Bankovky sú v celej eurozóne rovnaké. V bezhotovostnom styku sa bude od 1. 1. 2009 používať výlučne euro.

1. ÚVOD

V súčasnosti je Euro spoločným platidlom pre viac ako 300 miliónov Európanov. Je výsledkom troch etáp Hospodárskej a menovej únie (1). Na princípe neodvolateľnosti sa stanovili výmenne kurzy národných mien. Od 1. januára 1999 je vykonávaná jednotná menová politika eurosystému. Vznikla Európska centrálna banka (ECB), ktorej hlavným cieľom je udržať cenovú stabilitu eurozóny, ktorej členom sa po zavedení eura v SR stane aj Národná banka Slovenska a do Rady guvernérov ECB pribudne aj guvernér NBS. Hlavným cieľom ECB (sídlo vo Frankfurtu) je udržať cenovú stabilitu, čo znamená, že v strednodobom horizonte by ceny nemali rásť medziročne rýchlejšie ako dvojpercentným tempom. Hlavnými úlohami ECB sú:

- definovať a vykonávať menovú politiku eurozóny prostredníctvom obchodov na finančných trhoch,
- vykonávať devízové operácie, ktoré ovplyvňujú výmenné kurzy a podmienky domácej likvidity,
- viesť a spravovať devízové rezervy krajín eurozóny tak, aby ECB mala dostatok likvidity na výkon devízových operácií. Devízové rezervy ECB sa v súčasnosti spravujú prostredníctvom národných centrálnych bánk, ktoré sa rozhodli podieľať na operatívnom riadení devízových rezerv ECB. Aj keď národné centrálné banky svoje devízové rezervy spravujú nezávisle, ich operácie na devízovom trhu, ktoré presahujú stanovený limit si vyžadujú súhlas ECB, aby bol zabezpečený ich súlad s devízovou a menovou politikou eurosystému,

- podporovať plynulé fungovanie platobných systémov medzi úverovými a inými peňažnými inštitúciami a určujú tiež podmienky a úrokové miery na peňažnom trhu,
- povoľovať vydávanie bankoviek. ECB a národné centrálné banky sú jedinými inštitúciami oprávnenými vydávať bankovky, ktoré sú zákonným platidlom v eurozóne,
- ostatné sprievodné činnosti, napr. dohľad nad finančnou stabilitou v eurozóne. Zahŕňa monitorovanie finančnej stability, ktorého cieľom je nájsť slabé miesta a posúdiť mieru odolnosti finančného systému eurozóny.

Hlavným rozhodovacím orgánom ECB je Rada guvernérov, ktorá vykonáva rozhodnutia o cieľoch menovej politiky, o kľúčových úrokových sadzbách a tvorby menových rezerv a vydáva usmernenia na realizáciu týchto rozhodnutí.

Všetky krajiny, ktoré vstupovali do EÚ sa zaviazali prijať Euro po splnení konvergenčných (Maastrichtských) kritérií (2). Týkajú sa vývoja:

1. cien
2. rozpočtovej oblasti
3. verejného dlhu
4. výmenných kurzov
5. dlhodobých úrokových mier

Kritérium inflácie

Od krajiny vstupujúcej do EMÚ sa vyžaduje dosiahnutie vysokého stupňa cenovej stability, ktorý vychádza z miery inflácie, ktorá sa približuje k miere inflácie najviac troch členských štátov, ktoré v cenovej stabilite dosahujú najlepšie výsledky. Toto kritérium znamená, že členský štát si musí udržiavať dlhodobú cenovú stabilitu a priemernú mieru inflácie vykazovanú v priebehu roka pred skúmaním, ktorá neprekračuje za posledných 12 mesiacov viac ako o 1,5 % miery inflácie maximálne troch členských štátov, ktoré dosiahli v oblasti cenovej stability najlepšie výsledky na základe meraní harmonizovaného indexu spotrebiteľských cien (HCIP). Je to najťažší z cieľov, ktoré muselo Slovensko splniť pri vstupe do eurozóny, pretože je závislý od mnohých faktorov (napr. ceny energií vo svete) a je najťažšie ovplyvniteľný. Slovensko v marci 2008 splnilo inflačné kritérium, ktoré sa považuje za najdôležitejšie a najťažšie kritérium na prijatie eura. Európsky štatistický úrad Eurostat zverejnil 16. 4. 2008 mieru inflácie na Slovensku, meranú podľa metódy EÚ. Podľa nej dosiahol 12-mesačný (za obdobie marec 2007 až marec 2008) priemer harmonizovanej inflácie na Slovensku 2,2 percenta, čo je výrazne pod referenčnou hodnotou inflačného kritéria, ktorá predstavovala v marci 3,2 percenta. Medziročná miera inflácie na Slovensku bola na rovnakej úrovni ako v eurozóne (3). Udržať infláciu na nízkej úrovni sa považuje za nevyhnutú podmienku prijatia eura, pretože tvorcovia menovej politiky budú mať obmedzený priestor pre korekciu rastu cien. Štát, ktorý prijme spoločnú európsku menu, sa totiž vzdáva samostatnej menovej politiky a deleguje ju do rúk Európskej centrálnej banky (ECB). Podľa niektorých ekonómov by Slovensko malo svoju korunu ešte pred fixáciou výmenného kurzu revalvo-

vať, čo by znížilo inflačné tlaky v budúcnosti. Na splnenie inflačného kritéria reagovala aj známa ratingová agentúra Standard & Poor's Ratings Services (S & P). Podľa nej vstup Slovenska do eurozóny podporí zvýšenie úverovej bonity krajiny. Tá podľa svojej najnovšej správy revidovala výhľad ratingov Slovenska zo stabilného na pozitívny.

Deficit verejných financií

Deficit štátneho rozpočtu k hrubému domácomu produktu nesmie prekročiť 3%. Vláda musí vykonávať rozumnú rozpočtovú politiku a nedovoliť zvýšiť deficit verejných financií nad túto hranicu.

Verejný dlh

Pomer štátneho dlhu k hrubému domácomu produktu nesmie prekročiť referenčnú hodnotu 60 % HDP. Slovensko by so splnením tohto kritéria nemalo mať žiadne problémy.

Výmenné kurzy

ECB v zmysle zmluvy hodnotí, či sa krajina zúčastňuje v ERM II minimálne dva predchádzajúce roky pred skúmaním. Jej mena sa musí pohybovať v rozmedzí fluktuálneho pásma na $\pm 15\%$ od určenej centrálnej parity. Dôraz sa kladie na stabilitu výmenného kurzu bez nutnosti výrazných zásahov národnej centrálnej banky.

Úrokové miery

Kritérium konvergencie úrokových sadzieb znamená, že v priebehu jedného roka pred preskúmaním neprekročila priemerná dlhodobá nominálna úroková sadzba členského štátu viac ako o dva percentuálne body úrokovú sadzbu tých troch štátov, ktoré v oblasti cenovej stability dosiahli najlepšie výsledky. V Tab. 1 sú uvedené predbežné výsledky plnenia kritérií Slovenskom v marci 2008 (4). Všetky kritéria sú posudzované nielen zo statického hľadiska pohľadu za hodnotené obdobie, ale predovšetkým z hľadiska schopnosti ich dlhodobej udržateľnosti.

Tab. 1. Ako Slovensko plní kritériá pre euro

Kritérium	Očakávaná hodnota	Referenčná hodnota	Plnenie
Verejný deficit	2,16 % *HDP	3 % HDP	√
Verejný dlh	30,4 % HDP	60 % HDP	√
Miera inflácie	2,2 % **	3,2 %	√
Úrokové sadzby	4,5 %	6,4 %	√
Výmenný kurz	Účasť v ERM II Od 28.11.2005	Účasť v ERM II aspoň dva roky	√

* - predbežný údaj MF SR za rok 2007

** - priemerná 12-mesačná inflácia podľa Eurostat (marec 2008)

V návrhu konvergenčnej správy, ktorú mal Brusel zverejniť 7.mája 2008 sa uvádzalo, že Európska komisia odporučí vstup Slovenska do eurozóny k 1. januáru 2009. Slovensko podľa komisie udržateľne spĺňalo podmienky inflácie, deficitu verejných financií, stability dlhodobých úrokových sadzieb a stability výmenného kurzu. Hoci údaje Európskeho štatistického úradu Eurostat potvrdili, že Slovensko nominálne splnilo kritérium deficitu, ako aj najproblematickejšie kritérium inflácie, Brusel v predchádzajúcom období opakovane spochybňoval schopnosť Slovenska plniť kritériá aj dlhodobo. Lotyšská národná banka, ktorá bola jednou z 27 centrálnych bánk členských štátov Európskej únie, ktoré dostali návrh hodnotenia ECB týkajúceho sa slovenskej žiadosti, kritizovala Európsku centrálnu banku za jej správu o pripravenosti Slovenska na prijatie eura. Lotyšská národná banka tvrdila, že hodnotenie Slovenska v návrhu ECB bolo nespravodlivé (5). ECB totiž v návrhu vyjadrovala „vážne obavy“ ohľadom budúcej inflácie. Banka sa bála, že sa inflácia na Slovensku po vstupe do eurozóny zrýchli, pretože sa odstráni pozitívny efekt posilňovania meny. Vlády a centrálné banky naprieč východnou Európou kritizujú ECB a Európsku komisiu (EK) za to, že hodnotia ich žiadosti o prijatie spoločnej európskej meny prísnejšie ako žiadosti západných krajín, ktoré už vstúpili do eurozóny. Niektoré z nich po prijatí eura začali porušovať Maastrichtské kritériá. Počas prípravy konvergenčnej správy kolovalo niekoľko návrhov, aby sa k nim vyjadrili centrálné banky EÚ. Podľa tlačovej agentúry Reuters niektoré centrálné banky členských krajín EÚ vyjadrili námietky proti rétorike hodnotiaceho návrhu ECB a požadovali stlmenie obáv, týkajúcich sa budúceho výhľadu inflácie na Slovensku (6). Konečná verzia mala byť zverejnená 7. mája, teda v deň, keď Európska komisia mala povedať, či je Slovensko pripravené prijať spoločnú európsku menu. Komisár pre ekonomické a finančné otázky Joaquín Almunia ešte pri prezentácii jarných hospodárskych prognóz pre krajiny EÚ upozornil na očakávaný rastúci trend pri inflácii a zdôraznil, že nejde len o dôsledok vonkajších vplyvov - rastu cien potravín a energií – ktorým čelia všetky štáty. Almunia vyzval slovenskú vládu na ambicióznejšiu fiškálnu konsolidáciu, ktorá má pomôcť úspešnejšie bojovať proti inflácii. Návrh konvergenčnej správy však predpokladá udržateľné plnenie kritérií. Európska komisia v nej konštatovala, že „rozpočtový deficit Slovenska zaznamenal dôveryhodný a udržateľný pokles pod povolené tri percentá HDP, a preto možno odporučiť Rade EÚ, aby ukončila disciplinárne konanie voči Slovensku za nadmerný deficit (7). Stať by sa tak malo 3. júna, keď sa konvergenčnou správou mali zaoberať ministri financií štátov Únie. „Na základe zhodnotenia právneho súladu a plnenia konvergenčných kritérií, ako aj dodatočných faktorov, a za predpokladu, že členské krajiny schvália rozhodnutie o ukončení procedúry nadmerného deficitu, Slovensko spĺňa požadované podmienky pre prijatie eura,“ konštatovalo sa v návrhu odporúčania komisie. Konvergenčnou správou sa po jej oficiálnom zverejnení mali potom zaoberať členské krajiny Európskej únie na zasadnutí ministrov financií (ECOFIN), ktoré sa malo konať 3. júna v Luxemburgu. Vstup Slovenska do eurozóny museli podporiť všetky členské štáty EÚ. Najväčšie výhrady sa pritom

ozývali zo strany Nemecka a Francúzska. Ak ECOFIN vstup Slovenska do eurozóny odobrí k 1. januáru 2009, následne sa čaká formálna podpora zo strany európskych lídrov na júnovom summite. Výmenný kurz slovenskej koruny voči euru sa stanoví začiatkom júla na zasadnutí ministrov financií. (Príloha 1)

2. POSTUP PRI ZAVEDENÍ EURA NA SLOVENSKU

Prípravy na zavedenie eura na Slovensku sa začali ešte pred vstupom Slovenskej republiky do Európskej únie (8). Podpisom Prístupovej zmluvy k Európskej únii sa v r. 2003 Slovenská republika zaviazala k vstupu do Hospodárskej a menovej únie a k zavedeniu spoločnej meny – eura. V tom istom roku Vláda SR schválila Stratéziu prijatia eura v SR a spoločný postup Vlády SR a Národnej banky Slovenska pri vstupe Slovenskej republiky do eurozóny. V roku 2005 Banková rada NBS a Vláda SR schválili Národný plán zavedenia eura v Slovenskej republike. Národný plán zavedenia eura predstavuje plán jednotlivých krokov, ktoré je potrebné uskutočniť pre bezproblémové a úspešné zavedenie eura v celom hospodárstve SR. 28. novembra 2005 vstúpila slovenská koruna do mechanizmu výmenných kurzov ERM II. Centrálna parita koruny voči euru bola stanovená na úrovni trhového kurzu 38,4550 SKK/EUR. Slovenská koruna neustále posilňovala a preto 19. marca 2007 bola stanovená nová centrálna parita koruny voči euru na úrovni 1 euro = 35,4424 Sk. Spodná hranica fluktuáčného pásma je tak 30,1260 SKK/EUR a horná hranica 40,7588 SKK/EUR.

Slovensko zrejme ako prvé z V4 prijme euro

Slovensko, rovnako ako ostatných 11 nových členov Únie, sa pri vstupných rokovaníach zaviazalo, že vlastnú menu, slovenskú korunu, nahradí eurom a že nebude napodobňovať tých starých členov Únie - Dánsko, Švédsko a Veľkú Britániu, ktorí sa svojich korún, resp. libry nevzdali. Slovensko si mohlo samo zvoliť čas svojho vstupu do eurozóny tak, aby to bolo preňho výhodné a vhodné. Pravdaže po splnení osobitných podmienok Maastrichtských kritérií. Slovensko sa poponáhľalo a už v novembri 2005 vstúpilo do ERM II (Exchange Rate Mechanism II). Pripomeňme si, že ERM II je vlastne mechanizmus výmenných kurzov, na ktorom sa musí podieľať mena každej krajiny minimálne dva roky pred hodnotením konvergencie. Cieľom tohto mechanizmu je pripraviť hospodárstvo danej krajiny na fungovanie v menovej únii. Pre menej informovaného čitateľa stojí za zmienku informácia, že do ERM II zatiaľ, s výnimkou Slovenska, nevstúpila žiadna s krajín Višegrádskej štvorky (Česká republika, Maďarsko ani Poľsko) a ani sa nezdá, že by sa tam veľmi ponáhľali (9). Bez zaujímavosti nie je ani fakt, že spomínané krajiny, ktoré ešte neoznámili dátum svojho vstupu do ERM II, sa ujmu predsedníctva v Únii už na budúci rok (v r. 2009 - Česká republika, v r. 2011 - Maďarsko a Poľsko) a naopak, Slovensko, ktoré je už jednou nohou v eurozóne, sa predsedníctva v Únii ujme až o 10 rokov. Estónsku a Litvu sa pokusy o prijatie eura nevydarili. Estónsko stiahlo svoju žiadosť dobrovoľne a litovská žiadosť

bola zamietnutá v máji 2006, pretože krajina nespĺnila inflačné kritérium. Dokonca ani Švédsko a Veľká Británia do ERM II zatiaľ nevstúpili. Naopak, Slovensko už pred tromi rokmi absolvovalo prístupové procedúry na vstup do mechanizmu výmenných kurzov ERM II a v r. 2005 splnilo tzv. prvú etapu. 28. 11. 2005 vstúpilo do ERM II. V máji 2008 očakáva Slovensko zverejnenie tzv. konvergenčných správ Európskej komisie a Európskej centrálnej banky (ECB). Následne v máji a júni 2008 budú prebiehať hodnotiace procedúry v európskych inštitúciách a konzultácie s Európskym parlamentom. V júni 2008 môže Rada EÚ vydať Rozhodnutie o zrušení výnimky a stanoviť konverzný kurz SKK/EUR. Ak sa tak stane, začnú sa na Slovensku v júli až decembri raziť euromince a zabezpečovať eurové bankovky pre hotovostný obeh.

Diskusia o zavedení eura na Slovensku

Odborná diskusia na tému zavedenia eura na Slovensku je vágna. Podľa niektorých odborníkov sa vlastne ani nezachala, hoci euro je predo dvermi. To, čoho sme svedkami, je iba kampaň, nie diskusia. V jednom sa všetci zhodujú: pesimisti aj optimisti hovoria o výhodách aj nevýhodách zavedenia eura (10). Ak o nich hovoria jedni aj druhí, potom reálne existujú. V stredu 7. mája sa Európska komisia (EK) definitívne rozhodne, či sa Slovensko stane od 1. januára budúceho roku ďalšou krajinou eurozóny a či sa euro stane oficiálnou menou. Podľa Európskej komisie vznik eura ako jednotnej európskej meny priniesol množstvo predností a výhod. Euro nielenže odstraňuje riziká kolísania cien, zmenárenské poplatky a posilňuje jednotný trh, ale predstavuje kľúč k užšej spolupráci členských štátov na poli stabilnej meny a hospodárstva v prospech všetkých. Výhody eura sú rôznorodé a majú rôzne uplatnenie, či už ide o jednotlivcov a firmy alebo celé hospodárstva. Spoločná mena okrem iného umožňuje väčší výber a stabilné ceny pre spotrebiteľov a občanov, väčšiu bezpečnosť a viac príležitostí pre firmy a trhy, lepšiu hospodársku stabilitu a rast. K ďalším výhodám patria integrovanejšie finančné trhy, výraznejšia prítomnosť EÚ vo svetovom hospodárstve a v neposlednom rade hmotný symbol európskej identity.

Nevýhody

Zánik slovenskej koruny priniesie aj stratu niektorých možností. Vlastná mena umožňuje centrálnej banke menovou politikou korigovať niektoré dopady rozpočtovej politiky štátu. Jedným z najdôležitejších Maastrichtských kritérií je rozpočtový dlh verejného sektoru, ktorý nesmie prekročiť 3% HDP. Ak sa tri percentá prekročia, čakajú Slovensko nemalé sankcie. Skúsenosť, že „veľkým“ sa to v Európe doteraz „prepieklo“ aj bez väčších sankcií nech nikoho nezvádza k podceňovaniu tejto hrozby. Obzvlášť nie slovenské zdravotníctvo. Toho sa to týka veľmi vážne. Maastricht nevyhnutne povedie k hľadaniu úspor, teda aj k škrtaniu rozpočtových výdavkov na zdravotníctvo. Stratou voľnosti v nakladaní rozpočtových výdavkov príde štát aj o niektoré ďalšie možnosti.

V malých ale prudko sa rozvíjajúcich ekonomikách sa po zavedení EURA dá právoplatne očakávať nárast inflácie.

Empiricky dokázaným príkladom je Slovinsko, ktorému rok po zavedení EURA znamenito narástla inflácia. Je to spôsobené prekalkulovaním (zaokrúhlením cien nahor) tovaru a služieb, ale aj hlavne inflačným očakávaním. Národná banka na to nebude môcť reagovať menovou politikou na devízovom trhu resp. upravovať devízové rezervy potrebným smerom. Centrálna banka stratí možnosť korigovať kurzové riziká pri obchodoch so štátmi, ktoré používajú iné meny a pri obchodoch, kde sa ako zúčtovací nástroj používa americký dolár. Ekonomika v rôznych európskych štátoch funguje odlišne a optimálna menová zóna je zatiaľ viac snom ako reálnou skutočnosťou. Veľká Británia, Švédsko a Dánsko sú aktuálnym dôkazom. Rýchly vstup do eurozóny tieto riziká zvyšuje. V čase najlepšieho ekonomického rozvoja samostatného štátu Slovákov skracuje rýchly nástup eura občanom možnosť ďalšieho kontinuálneho zhodnocovania (posilňovania) sa koruny a použitia výhodnejšieho kurzu pri jej definitívnom prepočte na euro. Pre ľudí zijúcich z plátov a dôchodkov je výhoda posilňovania koruny vítaná. U veľkých vývozcov je to naopak, oni potrebujú slabú korunu.

Používanie jednotnej meny prinesie na trh viac konkurencie v podnikateľskej činnosti. To by síce malo pre konečného zákazníka (spotrebiteľa) priniesť výhody: kvalitný tovar alebo služby za nižšiu cenu, resp. službu navyše. Všetko bude závisieť od podnikateľov ako sa dokážu vysporiadať s novou konkurenciou na trhu, ako prilákajú, resp. presvedčia zákazníka (napr. aká bude podpora slovenských výrobkov, služieb a tovarov).

Výhody

Odstránením menových obmedzení je vďaka euru ešte jednoduchšie využívať výhody spoločného trhu. V prvom rade v zjednodušení pohybu Slovákov v rámci EÚ, resp. mimo nej. Spoločná mena odbúra nutnosť výmeny slovenských korún na eurá vždy, keď prekročíme hranice našej vlasti. Slováci budú používať tie isté peniaze, ako Nemci, Taliani, Rakúšania.

Slovinsko je relatívne malá a veľmi otvorená ekonomika. Už dnes realizuje viac ako polovicu zahraničného obchodu v eure. Elimináciou výkyvov výmenných kurzov by sa mala dosiahnuť lepšia stabilizácia podnikateľského prostredia a ľahšie sa budú plánovať investície v rámci podnikania. Hlavné výhody sa najčastejšie spomínajú v úspore z kurzových rozdielov (u exportérov) a v úspore za poplatky za zmenu meny. Hospodárska stabilita a stabilita cien znižujú riziká a umožňujú podnikom dlhodobé plánovanie, čím sa podporujú investície a zamestnanosť.

Transparentnosť cien v rámci jednotného trhu umožňuje tiež jednoduché porovnanie. V podnikaní nastane väčšia konkurencia a z toho vyplývajúce nižšie ceny v dôsledku jednoduchšieho porovnávania cien medzi jednotlivými krajinami. Euro môže prispieť ku intenzívnejšej obchodnej výmene, čo sa prejaví v lepšom hospodárskom raste. Výhody úspor z kurzových rozdielov, stabilného prostredia a rozvoja obchodnej výmeny sa prejaví v konečnom dôsledku v lepšej životnej úrovni občanov. O tvrdení, že veľkosť a sila eurozóny chránia euro pred otrasmi zvonku a vďaka tomu

je rovnako ako americký dolár príťažlivou medzinárodnou menou pre medzinárodný obchod a pôžičky, možno pri súčasnej recesii v Amerike pochybovať.

Rovnaká mena predovšetkým umožní jednoduché porovnanie cien a plátov a ich rozdiely. Uvidíme, ako sa budú vyrovnávať jedny s druhými. *Milan Lasica, herec a režisér, vidí výhody zavedenia eura aj v tom, že na Slovensku ubudne milionárov.*

3. AKO SA REZORT ZDRAVOTNÍCTVA PRIPRAVUJE NA EURO?

Gestorom zavádzania eura v rezorte je sekcia financovania Ministerstva zdravotníctva SR. Vláda 6. júla 2005 schválila Národný plán zavedenia eura, kde v bode 6.7 uložila ministrom zdravotníctva plniť úlohy vyplývajúce zo schváleného dokumentu (11). Sekcia financovania ako gestor zavádzania eura za kapitolu Ministerstva zdravotníctva SR v spolupráci s príslušnými útvarmi ministerstva a ďalšími inštitúciami v zdravotníctve vypracovala a do gremiálnej porady ministra zdravotníctva predložila materiál Akčný plán a rámcové plány zavedenia eura za kapitolu MZ SR 2005–2009, ktorý bol schválený 17. októbra 2005. Obsahoval plán prechodu na euro aj za štatistický zdravotnícky informačný systém (ŠTAZIS), prevádzkovaný v Národnom centre zdravotníckych informácií (NCZI), ktorý spracoval odbor informatiky MZ SR v spolupráci s NCZI. Odbor informatiky predložil na rokovanie gremiálnej porady ministra 26. februára 2007 Informáciu o plnení úloh akčného plánu a rámcových plánov zavedenia eura v SR za kapitolu MZ SR na roky 2005–2009, ktorá obsahovala aktuálne informácie o plnení a zabezpečovaní úloh. Podľa hovorkyne MZ SR venoval odbor informatiky problematike a plneniu úloh, súvisiacich so zavedením eura, od samotného začiatku osobitnú pozornosť a plnil všetky úlohy v pracovnom výbore pre informatiku a štatistiku. Odbor informatiky v spolupráci s NCZI zabezpečil revíziu Štatistického zdravotníckeho informačného systému a identifikáciu potrieb jeho úpravy na podmienky prijatia eura, zároveň vypracoval časový a vecný plán konverzie a úpravy finančných ukazovateľov ŠTAZIS podľa metodického usmernenia ŠÚ SR na postup konverzných prác s historickými údajmi. „Problémy, ktoré sa v procese zabezpečovania zámeru prejaví, sa budú riešiť operatívne po ich zistení a špecifikácie príslušným spôsobom a formou za účasti zainteresovaných subjektov,“ uviedla hovorkyňa ministra 16. 8. 2007 pre Zdravotnícke noviny (č. 30/2007). Ako dodala, po schválení tzv. generálneho zákona a jeho účinnosti, plánovanej od 1. januára 2008, sa vyhodnotí stav plnenia úloh Akčného plánu a rámcových plánov zavedenia eura za kapitolu MZ SR 2005 až 2009 a prijímú sa opatrenia na ďalší postup, aby sa tento zámer od 1. januára 2009 úspešne splnil.

Aký bude mať dosah zavedenie spoločnej európskej meny na zdravotníctvo?

MZ SR vydalo 27. februára 2008 tlačovú správu, že pripravuje návrh Vyhlášky MZ SR, ktorá ustanoví postupy

a pravidlá vykazovania, prepočtu, zaokrúhľovania a duálneho zobrazovania peňažných údajov v súvislosti s prechodom na euro pre oblasť zdravotného poistenia, oblasť poskytovania zdravotnej starostlivosti a služieb súvisiacich s poskytovaním zdravotnej starostlivosti vrátane lekárenskej starostlivosti a cien výrobkov, služieb a výkonov v zdravotníctve a v oblasti cien nájmu nebytových priestorov v zdravotníckych zariadeniach (12). Táto vyhláška určí oblasť zaokrúhľovania (počty desatinných miest) a pravidlá duálneho zobrazovania cien a tiež postupy vykazovania údajov súvislosti s prechodom na euro.

Generálny zákon

Návrh generálneho zákona o zavedení meny euro na území SR (Zákon č. 659/2007 Z.z. z 28. novembra 2007 o zavedení meny euro v Slovenskej republike a o zmene a doplnení niektorých zákonov), ktorý legislatívne zastrešuje prechod z koruny na spoločnú európsku menu pripravilo Ministerstvo financií SR (13). Zákon rieši právne, technické, organizačné a ďalšie aspekty, prináša riešenia administratívnych, organizačných a technických úloh, ktoré je potrebné na celonárodnej úrovni a na úrovni jednotlivých inštitúcií zabezpečiť, aby bolo zavedenie eura hladké a bezproblémové. Zákon nadobudol účinnosť 1. januára 2008, niektoré ustanovenia budú platiť odo dňa zavedenia eura, teda od 1. januára 2009. Podľa názoru I. Baráta, vládneho splnomocnenca pre zavedenie eura na Slovensku, si prechod na novú menu si vyžiada nemalé úsilie i náklady, celkovo však budú prínosy prevažovať nad niektorými nevýhodami alebo rizikami. „Aby boli náklady čo najnižšie, je treba začať s prípravou v každej oblasti, vrátane zdravotníctva, čo najskôr a venovať sa jej zodpovedne. Každý odklad zvyšuje riziko vzniku nečakaných problémov, ktoré sa môžu objaviť na poslednú chvíľu a jednoznačne zvyšuje aj cenu, ktorú bude treba za prípravu zaplatiť“ (14). Keď euro uvádzali do života koncom deväťdesiatych rokov minulého storočia, projekt spoločnej meny rátal s trojročným prechodným obdobím. Slovensko si zvolilo cestu tzv. „veľkého tresku“ – euro začne platiť v prvej sekunde roku 2009 v hotovostnom aj bezhotovostnom styku súčasne. „Od tohto okamihu budú bezhotovostné operácie možné iba v eurách, euro bude platnou menou aj v hotovostnom styku. Každý podnik, každá inštitúcia - teda aj zdravotné poisťovne, zdravotnícke zariadenie, poskytovatelia zdravotnej starostlivosti, musia byť pripravení na to, že účtovanie, fakturácia, platby a všetky ostatné finančné operácie s korunou prestanú v tomto okamihu existovať,“ povedal vládny splnomocnenec. Jedinou výnimkou ostane prvých 16 dní roka 2009, keď bude možné postupné sťahovanie slovenských bankoviek a mincí z obehu hotovostnými platbami. Pri platbe za tovar a služby v hotovosti bude možné do 16. januára 2009 použiť korunové bankovky a mince. Napr. v lekárnach či pri platbách za pohotovostné služby, dopravné služby, u stomatólogov budú povinní prijímatelia prijívať platbu v korunách, rozdiel medzi platbou a zaplatenou sumou však už budú musieť vydať v eurách. Toto obdobie bude náročné, bude sa pracovať s dvomi menami, spravovať väčší objem hotovosti. Vzhľadom na náročnosť celého procesu a obrovský počet slovenských peňazí v hoto-

vostnom obehu – takmer 150 mld. Sk, bude najmä v prvých dňoch po zavedení novej meny jednoznačne najpohodlnejším spôsobom bezhotovostná platba platobnou kartou. Pre firmy pracujúce s hotovosťou bude podľa I. Baráta situácia možno zložitejšia, úmerne rozsahu hotovostných operácií, ktoré vykonávajú. Aj tu je však veľmi dôležité dobre odhadnúť potrebu hotovosti na prvé dni po zavedení eura, včas komunikovať s bankami a nájsť najvhodnejší spôsob, ako si dostatočnú zásobu peňazí pripraviť. Dôležitým princípom, uplatneným pri prechode na novú menu, je pokračovanie platných zmluvných vzťahov, inak povedané kontinuita kontraktov. V prípade zdravotníctva ide predovšetkým o zmluvy medzi zdravotnými poisťovňami a poskytovateľmi zdravotnej starostlivosti, či medzi zdravotníckymi zariadeniami a poskytovateľmi služieb (15). „Tento princíp dáva všetkým istotu, že zmluvne zakotvené vzťahy, ich trvanie a podmienky plnenia nebudú prechodom z koruny na euro dotknuté. Všetky zmluvné vzťahy sa budú musieť naplňať presne v tých podmienkach, aké sú v nich upravené, s jedinou zmenou v mene ich plnenia. Ak zmluva uvádza údaje v korunách, budú sa po 1. januári 2009 automaticky považovať za hodnoty v eurách, prepočítané presne podľa konverzného kurzu. Zánik koruny a nahradenie eurom nebude dôvod na vypovedanie zmluvného vzťahu. Veľkou pomocou pri riešení problémov a pri zodpovedaní konkrétnych otázok by mali byť rôzne stavovské združenia, zväzy a odvetvové komory. Mali by zhromažďovať potrebné informácie a v prípade nejasností komunikovať s centrálnymi orgánmi, Národnou bankou Slovenska a ministerstvami.“ Žiaľ doteraz, s výnimkou jednotlivcov, sme nezaznamenali takmer žiadny záujem zo strany Lekárskej komory alebo Slovenskej komory iných zdravotníckych pracovníkov, ako najvyššie profesiové združenia v danej oblasti, ktoré by sa o nejakým vážnejším spôsobom zaujímali o monitorovanie situácie pri zavádzaní eura v oblasti poskytovaných zdravotných výkonov klinickými laboratóriami.

Ustanovenia Generálneho zákona, ktoré sa týkajú zdravotníctva

Zákon z 28. novembra 2007 o zavedení meny euro v Slovenskej republike a o zmene a doplnení niektorých zákonov vo svojej štvrtjej časti definuje postup pri premene majetkových hodnôt a peňažných súm a kontinuitu právnych vzťahov. V § 16, odseku (2) Prepočty peňažných údajov na osobitné účely, okrem iného hovorí „Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky vydá všeobecne záväzný právny predpis, ktorý musí zohľadňovať princípy a zásady podľa § 2 a ktorý ustanoví podrobné pravidlá, rozsah a postup pri vykazovaní a prepočtoch peňažných údajov vrátane pravidiel vykazovania peňažných údajov na účely zdravotného poistenia v súvislosti s prechodom na euro.“ V šiestej hlave nazvanej Duálne zobrazovanie, § 18, odsek (10) dikcia zákona vraví, že „metódy, postupy a spôsoby duálneho zobrazovania a ďalšie podrobné pravidlá pre duálne zobrazovanie a tiež pre prepočty a zaokrúhľovanie cien, jednotkových cien, platieb a iných hodnôt pri prechode na euro, ďalej rozsah cien, jednotkových cien, platieb a iných hodnôt podliehajúcich duálnemu zobrazovaniu, ceny, jednotkové ceny, platby a iné hodnoty uvádzané,

prepočítavané a zaokrúhľované s osobitným počtom desiatinných miest a počet týchto desiatinných miest, ako aj ceny, platby a iné hodnoty výnimočne vyňaté z duálneho zobrazovania a tiež ostatné podrobnosti o duálnom zobrazovaní, prepočítavaní a zaokrúhľovaní cien, jednotkových cien, platieb a iných hodnôt ustanoví všeobecne záväzný predpis, ktorý musí zohľadňovať princípy a zásady podľa § 2 a ktorý a) vydá 4. Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky pre oblasť zdravotného poistenia a oblasť poskytovania zdravotnej starostlivosti a služieb súvisiacich s poskytovaním zdravotnej starostlivosti vrátane lekárenskej starostlivosti a cien výrobkov, služieb a výkonov v zdravotníctve a v oblasti cien nájmu nebytových priestorov v zdravotníckych zariadeniach“.

Dvojité (duálne) oceňovanie a poradie mien

Generálny zákon stanovuje poradie mien v období duálneho zobrazovania. Návrh Vyhlášky Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky, ktorou sa ustanovujú *postupy a pravidlá vykazovania, prepočtu, zaokrúhľovania a duálneho zobrazovania peňažných údajov v súvislosti s prechodom na menu euro pre oblasť zdravotného poistenia a oblasť poskytovania zdravotnej starostlivosti a služieb súvisiacich s poskytovaním zdravotnej starostlivosti vrátane lekárenskej starostlivosti a cien výrobkov, služieb a výkonov v zdravotníctve a v oblasti cien nájmu nebytových priestorov v zdravotníckych zariadeniach* stanovuje, ako sa duálna cena vyráta (16). V § 3 (Postupy a spôsoby duálneho zobrazovania) dikcia textu hovorí, že „Duálne zobrazovanie sa vyžaduje len pri peňažných údajoch. Duálne zobrazovanie možno vykonať v písomnej forme alebo v elektronickej forme. Zo spôsobu duálneho zobrazenia musí byť jasne rozlíšiteľné označenie sumy v slovenských korunách vrátane halierov a ceny v eurách vrátane eurocentov. Zobrazenie konverzného kurzu a konverznej tabuľky je potrebné vykonať takým spôsobom, ktorý zabezpečí jednoznačné, prehľadné, zrozumiteľné, ľahko prístupné a dobre čitateľné zobrazenie. Hlavnou menou – pred dňom zavedenia meny euro v Slovenskej republike je slovenská koruna a odo dňa zavedenia eura mena euro. Informatívnou menou je pred dňom zavedenia eura mena euro a odo dňa zavedenia eura slovenská koruna. Za konverznú tabuľku sa považuje zostupné alebo vzostupné zobrazenie cien všetkých poskytovaných výrobkov, služieb a výkonov v slovenských korunách a v eurách a zobrazenie konverzného kurzu poskytovateľom zdravotnej starostlivosti alebo zdravotníckym pracovníkom. Za jednotkovú cenu zdravotného výkonu sa považuje cena bodu výkonu, ktorý je ohodnotený počtom bodov a ocenený cenou bodu.

§ 5 definuje *Postupy a spôsoby duálneho zobrazovania pre oblasť poskytovania zdravotnej starostlivosti, cien výrobkov, služieb a výkonov v zdravotníctve, cien nájmu nebytových priestorov* nasledovne:

(1) Ak sa výrobok, služba alebo výkon poskytujú osobe za úhradu alebo čiastočnú úhradu, táto cena sa zobrazuje duálne v Zoznamoch, cenníkoch alebo na iných informačných prostriedkoch a technických zariadeniach, kde sa obvykle uvádzajú informácie o cenách na základe osobitného predpisu (Zákon č. 18/1996 Z. z. o cenách v znení neskorších predpisov)

(2) Duálne zobrazovanie v oboch menách sa nevyžaduje pri:

- a) jednotkových cenách zdravotných výkonov, kde je dostačujúce uvádzať jednotkovú cenu len v hlavnej mene,
- b) sumách uvedených na digitálnych prostriedkoch zobrazovania cien, kde je dostačujúce uvádzať predajnú cenu v hlavnej mene,
- c) označovaní cien na cenovkách umiestnených priamo na výrobkoch, kde je dostačujúce uvádzať ceny v hlavnej mene, ak sú ceny týchto výrobkov inak vhodne duálne zobrazené na viditeľnom mieste v blízkosti tohto výrobku,
- d) označovaní cien výrobkov predávaných na jednotky, na ktoré sa vzťahuje zľava, kde je dostačujúce duálne zobraziť v letákoch, pútačoch a iných marketingových materiáloch len predajnú cenu po zľave spolu s konverzným kurzom,
- e) označovaní cien výrobkov predávaných na množstvo, na ktoré sa vzťahuje zľava, kde je dostačujúce duálne zobraziť v letákoch, pútačoch a iných marketingových materiáloch len jednotkovú cenu po zľave spolu s konverzným kurzom,
- f) označovaní cien individuálne pripravovaných výrobkov, kde je dostačujúce uvádzať cenu v hlavnej mene.

§ 14 definuje *Pravidlá zaokrúhľovania a určenie počtu desiatinných miest pre oblasť poskytovania zdravotnej starostlivosti, cien výrobkov, služieb a výkonov v zdravotníctve a cien nájmu nebytových priestorov*. Osobitné pravidlá pre zaokrúhľovanie pri prechode na euro platia pre jednotkové ceny výkonov zdravotnej starostlivosti, kde sa jednotková cena za jeden bod výkonu zobrazí v peňažných jednotkách hlavnej meny, prepočítaná na peňažné jednotky informatívnej meny konverzným kurzom, so zaokrúhlením na šesť desiatinných miest tak, že suma v informatívnej mene do 0,0000005 sa zaokrúhli na šesť desiatinných miest nadol a suma v informatívnej mene od 0,0000005 vrátane sa zaokrúhli na šesť desiatinných miest nahor.

Na prvom mieste je vždy platná mena. To znamená, že dokonca roka 2008 to bude slovenská koruna, od 1. 1. 2009 to bude euro. Ak sa cena tovaru alebo služby, vyráтанá podľa zákona a do jedného mesiaca od uverejnenia konverzného kurzu duálne zobrazená v slovenských korunách a eurách nezmení na začiatku roka 2009, nie je potrebné opakovať výpočet ceny, tento krát z eura na slovenskú korunu pre potreby duálneho zobrazovania. Toto ustanovenie je veľmi dôležité, pretože v dôsledku zaokrúhľovania môže dôjsť k tomu, že sa ceny budú mierne líšiť. Určujúcou cenou v tomto prípade bude cena v eurách, ako bola vyráтанá na začiatku duálneho zobrazenia. Aby sa ceny výkonov, ktorých hodnota sa počas obdobia duálneho zobrazovania nezmenila nemuseli meniť kvôli zaokrúhľovaniu za primárnu cenu sa do konca roku 2008 bude považovať cena v slovenských korunách a po 1. januári 2009 cena v eurách, tá istá cena, ktorá do tohto obdobia pôsobila iba vo forme duálne zobrazenej ceny.

Duálne zobrazovanie cien sa musí začať najneskôr mesiac po oficiálnom stanovení konverzného kurzu. Stanove-

nie konverzného kurzu očakávame začiatkom júla 2008. Stanoví ho Rada EÚ na úrovni ministrov financií EÚ. Duálne oceňovanie sa podľa Generálneho zákona nesmie začať pred oficiálnym oznámením konverzného kurzu. Zobrazenie cien v SKK a eurách pred momentom zverejnenia konverzného kurzu sa nepovažuje za duálne oceňovanie ale iba za zobrazovanie nejakej ceny v dvoch menách. Na takéto zobrazovanie sa používa výlučne trhový kurz. Povinné duálne zobrazovanie bude trvať až do konca roka 2009. Po tomto období bude na dobrovoľnom princípe možné ceny i naďalej duálne zobrazovať, ale zo zákona to už nebude povinné. Odporúča sa do júla 2010.

Šesť desatinných miest nadol a suma v informatívnej mene od 0,0000005 vo vyhláske MZ SR tromfla aj Vyhlášku Ministerstva hospodárstva Slovenskej republiky z 12. marca 2008, ktorá hovorí o *podrobnostiach duálneho zobrazovania pre oblasť ochrany spotrebiteľov* v § 5, odseku (1): Jednotkové ceny elektronických komunikačných služieb na základe sekundovej tarifácie za prevolané sekundy v eurách sa zaokrúhľujú matematicky najmenej na štyri desatinné miesta. V odseku (2): Jednotkové ceny vodného a stočného, jednotkové ceny tepla a jednotkové ceny elektriny a plynu v eurách sa zaokrúhľujú matematicky najmenej na štyri desatinné miesta (17).

Čo už, telefonovať budeme za „milicenty“ a laboratórne vyšetrenia poskytovať tiež za „milicenty“. V laboratórnej medicíne nič neobvyklé, veď používame aj menšie násobky základných jednotiek, napr. „mikrogramy“ alebo „nanomoly“. Exaktné vyjadrovanie nie je teda to, čo by nám mohlo prípadne robiť problém. Klinickým laboratóriám hrozí väčšie nebezpečenstvo zo zneužitia širokého „intervalu“ týchto jednotiek. Kým doteraz poniektorí poskytovatelia „handlovali“ pri zmluvných vzťahoch so zdravotnými poisťovňami pri cene bodu o haliere, teraz sa tam bude môcť „využívať“ široký diapazón „milicentov“. Ktože to dohliadne? Národný plán zavedenia eura v Slovenskej republike vymenúva síce aj potrebu postupu pri ochrane spotrebiteľov a občanov pri zavedení eura a ochranu ekonomických záujmov spotrebiteľov pri zavádzaní eura. Národný plán ďalej zdôrazňuje, že z hľadiska ochrany ekonomických záujmov spotrebiteľov je potrebné okrem iného sa zamerať aj na **zdravotnú starostlivosť**. Budú však postačovať na ochranu vzťahu *zdravotná poisťovňa - poskytovateľ (medicínske laboratórium) iba odporúčania Národného plánu zavedenia eura v Slovenskej republike?*

Cena bodu vs cena laboratórneho vyšetrenia

Dnes, keď ešte nepoznáme konverzný kurz SKK/Euro, nemôžeme vyjadriť presnú cenu bodu v eurách. Podľa ERM II sa od 19.3.2007 slovenská koruna pohybuje v koridore $\pm 15\%$ okolo centrálnej parity 35,4424 SKK/EUR. 15% pri centrálnej parite predstavuje 5,3164 SKK, takže kurz slovenskej koruny môže nadobúdať hodnoty od krajných medzi 40,7588 až po 30,1260 SKK/Euro. Oproti februáru 2008 analytici predpovedali v apríli 2008 opäť silnejší konverzný kurz, pri ktorom by sa mohli zamieňať koruny za eurá (18). Priemer odhadov štrnástich analytikov vyšiel v apríli na 32,34 SKK/EUR. Odhady sa pohybovali v rozpätí od 32,00 SKK/EUR do 33,00 SKK/EUR. Ak prijme

pracovnú hypotézu, že konverzný kurz bude stanovený na hodnotu okolo 32,00 SKK/Euro, potom cena 1 bodu by v klinickej biochémií mala byť pre medicínske laboratóriá tzv. „poliklinického“ typu na úrovni 0,0059375 eur, čo je 0,5938 eurocentov alebo 593,8 „milieurocentov“. Pri rovnakom kurze bude cena bodu pre medicínske laboratóriá pre klinickú biochémiu tzv. „nemocničného“ typu 0,0065625 eur, čiže 0,6563 eurocentov a teda vlastne 656,3 milieurocentov. Imunológia a mikrobiológia by mala mať cenu bodu 0,0065625 eur, čiže 0,6563 eurocentov čo je v prepočte 656,3 milieurocentov.

Už na prvý pohľad je zrejmé, že rozdiely v milieurocentoch budú nominálne zrejmejšie a rýchlo potlačia zdanlivo nevýznamný efekt halierovej redukcie ceny bodu, k akej dochádzalo doteraz. Toto zistenie lepšie dokumentuje odhad ceny bodu od jednotlivých zdravotných poisťovní v SR vyjadrený v eurocentoch, ktorý je uvedený v Tab. č. 2.

Z údajov, ktoré sú uvedené v Tab. č.3 možno usudzovať, že cena bodu, ktorú za laboratórne vyšetrenia uhrádzajú rôzne zdravotné poisťovne v SR, sa bude nominálne líšiť radovo až do dvesto milieurocentov. Efekt zdania malých čísel, ku ktorému dochádzalo pri vyjadrovaní ceny bodu v halieroch sa môže tak v krátkej budúcnosti nahradiť opačným efektom veľkých čísel. V krátkom období duálneho vyjadrovania cien bodu to však bude stále iba ten istý relatívny (percentuálny) rozdiel. K skutočným rozdielom začne dochádzať až vtedy, keď zdravotné poisťovne začnú cenu bodu reálne meniť.

Tab. 2. Odhad ceny bodu od zdravotných poisťovní v SR v eurách pre medicínske laboratóriá pri hypotéze konverzného kurzu 32 SKK/Euro

Zdravotná poisťovňa	Odbor	Cena bodu v SKK	Cena bodu v €uro	Cena bodu v milieurocentoch
VšZP	Poliklinický typ	0,19	0,0059375	593,8
	Nemocničný typ	0,21	0,0065625	656,3
SZP	Bez rozlíšenia	0,22	0,006875	687,5
Union	Bez rozlíšenia	0,23	0,0071875	718,8
Apollo	Bez rozlíšenia	0,23	0,0071875	718,8
Európska ZP	Bez rozlíšenia	0,25	0,0078125	781,3

Tab. 3. Odhad ceny bodu od VŠZP v eurách pre medicínske laboratóriá podľa ich typu pri hypotéze konverzného kurzu 32SKK/Euro

Odbor	Typ laboratória	Cena bodu v SKK	Cena bodu v €uro	Cena bodu v milicentoch
Klinická biochémia	Poliklinický typ	0,19	0,0059375	593,8
Klinická biochémia	Nemocničný typ	0,21	0,0065625	656,3
Imunológia, mikrobiológia	Zmiešaný typ	0,21	0,0065625	656,3

Porovnanie cien niektorých laboratórných vyšetrení

Jedným zo základných efektov zavedenia meny euro na Slovensku, ktorí zhodne uvádzajú všetci – kvalifikovaní odborníci i laici, je očakávanie lepšej transparentnosti cien v rámci jednotného trhu. Rovnaká mena bude umožňovať jednoduché a priame porovnanie cien rovnakých výrobkov, tovarov a služieb. Bude tomu tak aj v laboratórnej medicíne na Slovensku. V tejto súvislosti predkladáme predbežné porovnanie vybraných laboratórných vyšetrení, ktoré majú najväčšiu frekvenciu v laboratórnej medicíne na Slovensku s cenami rovnakých laboratórných vyšetrení v Únii. Na porovnanie sme použili cenník laboratórných vyšetrení poskytovateľa, ktorý spravuje vlastnú sieť klinických laboratórií v tarých členských štátoch EÚ a zároveň aj na Slovensku (19). Príloha 2 uvádza porovnanie niektorých cien laboratórných vyšetrení podľa cenníka, ktorý je dostupný na webe s cenami laboratórných vyšetrení, aké za ne uhrádza VŠZP.

Na zaostávanie cenových hladín laboratórných vyšetrení na Slovensku za okolitými štátmi sme poukázali na základe porovnania českého a slovenského Zoznamu zdravotných výkonov už pred dvoma rokmi. Priemerná cena biochemického laboratórneho vyšetrenia v českom Sezname je **139 Kč = 186 Sk**. Priemerná cena biochemického laboratórneho vyšetrenia v slovenskom Katalógu je **83 Sk**. Priemerný cenový normatív biochemického laboratórneho vyšetrenia je v ČR viac ako o **300 %** vyšší ako v SR. Priemerná cena imunochemického laboratórneho vyšetrenia v českom Sezname je **414 Kč = 553 Sk**. Priemerná cena imunochemického laboratórneho vyšetrenia v slovenskom Katalógu je **136 Sk**. Priemerný cenový normatív imunochemického laboratórneho vyšetrenia je v ČR o **350 %** vyšší ako v SR. Ceny niektorých laboratórných vyšetrení sú v ČR viac ako o **1000 %** vyššie.

Na základe terajšieho (zatiaľ tiež predbežného a orientačného) porovnania je možné konštatovať, že cenové hladiny rovnakých zdravotných výkonov na Slovensku výrazne zaostávajú za cenami tých istých výkonov v eurozóne. Stručnou analýzou údajov z Prílohy 2 môžeme konštatovať, že pri porovnaní s eurozónou existujú ešte väčšie cenové rozdiely, aké sme zistili porovnaním s ČR. Zistenia uvádzame v Tab. č. 4

Tab 4. Porovnanie cenových hladín vybraných druhov laboratórných vyšetrení v SR a Rakúsku

Priemerná cenová hladina	Cena v SR	Cena v Rakúsku	Cenový rozdiel
Virologické vyšetrenia	7,53 €	20,7 €	170 %
Tumorové markery	7,44 €	28,0 €	332 %
Hormóny	4,69 €	22,1 €	388 %
Imunochemické vyšetrenia	3,33 €	22,8 €	638 %
Sérologické vyšetrenia	3,12 €	19,1 €	639 %
Hematologické a hemostazeologické vyšetrenia	4,05 €	16,3 €	811 %
Biochemické vyšetrenia	0,59 €	4,76 €	852 %
Imunologické vyšetrenia	3,12 €	23,8 €	1101 %

ZÁVER

Z týchto predbežných porovnaní vyplýva priepastný rozdiel v cenových reláciách za rovnaké laboratórne vyšetrenia, ktoré poskytujú medicínske laboratóriá na Slovensku a v eurozóne (Slovensko – nový člen eurozóny, Rakúsko – „starý“ člen eurozóny). Tento obrovský rozdiel nie je spôsobený zavedením meny Euro na Slovensku, ale má hlbšie korene. Je otázne, či a kedy ho nová mena na Slovensku pomôže vyriešiť.

POZNÁMKA

V čase, keď autori predložili rukopis článku do tlače, vrcholil záverečný proces hodnotenia pripravenosti Slovenska na zavedenie meny Euro Európskou komisiou a Európskou centrálnou bankou. Rozhodnutie nebolo ešte známe a mnoho informácií bolo dostupných iba s masovokomunikačných prostriedkov.

LITERATÚRA

1. **Postup európskej integrácie.** Európska centrálna banka. EI 01/2007.
2. **Maastrichtské kritériá.** <http://www.euro.gov.sk/index.php>
3. **Slovensko splnilo inflačné kritérium,** o eure sa rozhodne v máji. Euromena, 16. 04. 2008.
4. **Slovensko podmienky pre euro plní.** Brusel posúdi, či udržateľne. Pravda, Príloha str. III, 22. 4. 2008.

5. **Lotyšsko kritizuje** Európsku centrálnu banku za hodnotenie Slovenska. Euromena, 8. 04. 2008.
6. **Európska centrálna banka** má zlepšiť hodnotenie Slovenska. Euromena, 25. 04. 2008.
7. **Európska komisia pustí euro na Slovensko.** Euromena, 29. 04. 2008.
8. **I. Štefanec:** *Euro na Slovensku.* Marec 2007.
9. **Česko zatiaľ eurokritériá plní,** ale o termíne prijatia eura mlčí. Euromena, 20. 02. 2008.
10. **Euro – viac výhod ako nevýhod.** Euromena, 5. 5. 2008.
11. **Národný plán zavedenia eura v Slovenskej republike.** Národná banka Slovenska, Ministerstvo financií Slovenskej Republiky, Marec 2007.
12. **Ako sa rezort zdravotníctva pripravuje na euro?** <http://www.health.gov.sk/redsys/rsi.nsf/0/4A79EA251F4378-F9C12573FC004A552D?OpenDocument>.
13. **Zákon z 28. novembra 2007** o zavedení meny euro v Slovenskej republike a o zmene a doplnení niektorých zákonov.
14. **Igor Barát,** splnomocnenec vlády SR pre zavedenie eura. Zdravotnícke noviny č. 30/2007, str. 10, 16. 8. 2007
15. **Aký bude mať dosah zavedenie spoločnej európskej meny na zdravotníctvo?** Zdravotnícke noviny č. 30/2007, str. 10.
16. **Návrh Vyhlášky Ministerstva zdravotníctva** Slovenskej republiky, ktorou sa ustanovujú postupy a pravidlá vykazovania, prepočtu, zaokrúhľovania a duálneho zobrazovania peňažných údajov v súvislosti s prechodom na menu euro pre oblasť zdravotného poistenia a oblasť poskytovania zdravotnej starostlivosti a služieb súvisiacich s poskytovaním zdravotnej starostlivosti vrátane lekárenskej starostlivosti a cien výrobkov, služieb a výkonov v zdravotníctve a v oblasti cien nájmu nebytových priestorov v zdravotníckych zariadeniach.
17. **Vyhláška Ministerstva hospodárstva** Slovenskej republiky z 12. marca 2008 o podrobnostiach duálneho zobrazovania pre oblasť ochrany spotrebiteľov.
18. **Analytici euru naďalej veria.** Euromena, 05. 02. 2008.
19. <http://www.imcl.at/patienten/leistungen>

PROCES ZAVEDENIA EURA NA SLOVENSKU PODĽA NÁRODNÉHO PLÁNU

1. etapa - po vstup do ERM II - splnená	
2005	Absolvovanie prístupových procedúr na vstup do mechanizmu výmenných kurzov ERM II
2. etapa - od vstupu do ERM II až do rozhodnutia o vstupe SR do eurozóny	
28. 11. 2005	Vstup do ERM II
Máj 2008	Konvergenčné správy Európskej komisie a ECB
Máj - jún 2008	Hodnotiaci procedúra v európskych inštitúciách
Jún 2008	Rozhodnutie Rady EÚ o zrušení výnimky
Jún 2008	Stanovenie konverzného kurzu SKK/EUR Radou EÚ
3. etapa - od rozhodnutia o vstupe SR do eurozóny až do vstupu do eurozóny	
júl - december 2008	Zabezpečenie potrebného množstva eurových bankoviek a razba mincí pre hotovostný obeh SR
september - december 2008	Zásobenie NBS a komerčných bánk eurovými bankovkami a mincami
december 2008	Zásobenie maloobchodného sektora eurovými bankovkami a mincami
júl 2008 - december 2009	Povinné duálne oceňovanie - všetky maloobchodné ceny, výplatné pásky, dôchodkové šeky a pod. budú povinne uvádzané v korunách aj eurách
do 31. decembra 2008	Konverzia bankomatov, automatov a iných zariadení fungujúcich na mince alebo bankovky

4. etapa - po vstupe do eurozóny	
1. január 2009	Euro sa na Slovensku pravdepodobne zavedie 1. 1. 2009 súčasne do hotovostného aj bezhotovostného obehu bez prechodného obdobia spôsobom, tzv. Veľkého tresku („Big-Bang Scenario“) a stane sa zákonným platidlom na území Slovenskej republiky. Koruna sa stane čiastkovou jednotkou eura v konverznom kurze stanovenom Radou EÚ.
Do 16. januára 2009	Duálny obeh - počas krátko obdobia duálneho obehu sa na území Slovenskej republiky bude platiť eurom, ale aj korunovými bankovkami a mincami. Tie sa však už nebudú vydávať späť do peňažného obehu, ale budú sa postupne sťahovať, spracovávať a likvidovať.
Od 17. januára 2009	Pokračovanie výmeny korunového obeživa za eurové bankovky a mince v komerčných bankách a NBS. Slovenské obehové eurové mince budú platné vo všetkých krajinách eurozóny a obehové mince ostatných krajín eurozóny budú platným obeživom aj na Slovensku. Bankovky sú v celej eurozóne rovnaké.
do 31. decembra 2009	Povinné duálne oceňovanie
do júna 2010	Odporúčané duálne oceňovanie

**POROVNANIE CIEN NIEKTORÝCH LABORATÓRNYCH VYŠETRENÍ V MENE EURO
V RAKÚSKU A NA SLOVENSKU**

Kód	Body	Názov skúšky	Cena v SKK	Cena v Euro SR	Cena v Euro Rakúsko	Cenový rozdiel v %
Biochemické vyšetrenia						
3671	40	Glukóza	7,60 Sk	0,24 €	2,67 €	1024%
3672	40	Celkový bilirubín	7,60 Sk	0,24 €	2,67 €	1024%
3673	40	Bilirubín priamy	7,60 Sk	0,24 €	2,83 €	1092%
3674a	180	Celkový cholesterol	34,20 Sk	1,07 €	2,51 €	135%
3675	55	HDL cholesterol	10,45 Sk	0,33 €	4,60 €	1309%
3676a	180	LDL cholesterol	34,20 Sk	1,07 €	3,45 €	223%
3677a	180	Triacylglyceroly	34,20 Sk	1,07 €	2,76 €	158%
3678	60	Kyselina močová	11,40 Sk	0,36 €	3,45 €	868%
3678a	180	Kyselina močová	34,20 Sk	1,07 €	5,75 €	438%
3679	60	Kreatinín	11,40 Sk	0,36 €	2,51 €	605%
3680	50	Močovina	9,50 Sk	0,30 €	2,51 €	745%
3681	50	Albumín	9,50 Sk	0,30 €	2,88 €	870%
3690	60	Alkalická fosfatáza	11,40 Sk	0,36 €	2,67 €	649%
3691	60	AST	11,40 Sk	0,36 €	2,51 €	605%
3692	60	ALT	11,40 Sk	0,36 €	2,51 €	605%
3693	60	GMT	11,40 Sk	0,36 €	2,51 €	605%
3694	90	AMS	17,10 Sk	0,53 €	3,84 €	619%
3695b	120	Lipáza UV	22,80 Sk	0,71 €	4,03 €	466%
3696	90	CK	17,10 Sk	0,53 €	4,60 €	761%
3697	75	Pankreatická amyláza	14,25 Sk	0,45 €	4,03 €	805%
3698	70	LD	13,30 Sk	0,42 €	2,85 €	586%
3699	100	GLDH	19,00 Sk	0,59 €	17,25 €	2805%
3700	60	HBD	11,40 Sk	0,36 €	5,75 €	1514%
3701	180	Cholinesteráza	34,20 Sk	1,07 €	2,85 €	167%
3702	90	Kyslá fosfatáza	17,10 Sk	0,53 €	5,75 €	976%
3704	50	Draslik	9,50 Sk	0,30 €	4,60 €	1449%

Kód	Body	Názov skúšky	Cena v SKK	Cena v Euro SR	Cena v Euro Rakúsko	Cenový rozdiel v %
3705	50	Vápnik	9,50 Sk	0,30 €	3,68 €	1140%
3706	50	Sodík	9,50 Sk	0,30 €	3,45 €	1062%
3707	50	Chloridy	9,50 Sk	0,30 €	3,68 €	1140%
3708	90	Železo	17,10 Sk	0,53 €	2,67 €	400%
3709	60	Horčík	11,40 Sk	0,36 €	2,85 €	700%
3710	60	Anorganický fosfor	11,40 Sk	0,36 €	2,85 €	700%
3711	80	Lítium	15,20 Sk	0,48 €	4,60 €	868%
3712	240	Meď fotometricky	45,60 Sk	1,43 €	18,40 €	1191%
3715	120	Zinok fotometricky	22,80 Sk	0,71 €	16,10 €	2160%
3741	480	CK-MB	91,20 Sk	2,85 €	8,83 €	210%
Hematologické a hemostazeologické vyšetrenia						
3783	120	Krvný obraz	22,80 Sk	0,71 €	5,52 €	675%
3947	1600	Antitrombín III	304,00 Sk	9,50 €	4,60 €	-52%
3950	320	Protein S-antigén	60,80 Sk	1,90 €	32,20 €	1595%
3951	1600	Protein C-aktivita	304,00 Sk	9,50 €	32,20 €	239%
3955	200	Agregácia trombocytov	38,00 Sk	1,19 €	5,75 €	384%
Hormóny						
4301	500	T3 celkový	95,00 Sk	2,97 €	16,10 €	442%
4382	600	Voľný T3	114,00 Sk	3,56 €	16,10 €	352%
4312	800	C-peptid	152,00 Sk	4,75 €	32,94 €	593%
4313	500	Voľný estriol	95,00 Sk	2,97 €	20,70 €	597%
4318	600	FSH	114,00 Sk	3,56 €	16,10 €	352%
4320	800	HCG špecifický	152,00 Sk	4,75 €	23,00 €	384%
4322	1 000	Kortizol	190,00 Sk	5,94 €	16,33 €	175%
4328	850	Digoxín	161,50 Sk	5,05 €	18,88 €	274%
4330	600	Tyroxín voľný	114,00 Sk	3,56 €	16,10 €	352%
4357	700	Testosterón	133,00 Sk	4,16 €	16,10 €	287%
4378	600	SHBG	114,00 Sk	3,56 €	26,08 €	632%

Kód	Body	Názov skúšky	Cena v SKK	Cena v Euro SR	Cena v Euro Rakúsko	Cenový rozdiel v %
4386	600	DHEAS	114,00 Sk	3,56 €	16,12 €	352%
4438	1 100	ACTH	209,00 Sk	6,53 €	36,62 €	461%
4440	1 100	HCG alfa, beta	209,00 Sk	6,53 €	23,00 €	252%
4471	1 500	Parathormón	285,00 Sk	8,91 €	36,80 €	313%
4463	1 100	17-hydroxyprogesterón	209,00 Sk	6,53 €	36,80 €	463%
Tumorové markery						
4350	600	Ferritín	114,00 Sk	3,56 €	7,77 €	118%
4353	900	CEA	171,00 Sk	5,34 €	14,38 €	169%
4355	1 500	PSA	285,00 Sk	8,91 €	13,80 €	55%
4381	600	Vitamin B12	114,00 Sk	3,56 €	20,70 €	481%
4424	900	Antilipoprotein (a)	171,00 Sk	5,34 €	19,55 €	266%
4443	1 100	TPA	209,00 Sk	6,53 €	25,30 €	287%
4444	1 800	CA 125	342,00 Sk	10,69 €	23,90 €	124%
4445	1 800	CA 15-3	342,00 Sk	10,69 €	23,90 €	124%
4446	1 800	CA 19-9	342,00 Sk	10,69 €	23,90 €	124%
4447	1 100	CA 195	209,00 Sk	6,53 €	23,90 €	266%
4448	1 100	CA 50	209,00 Sk	6,53 €	23,90 €	266%
4470	2 400	CA 72-4	456,00 Sk	14,25 €	23,90 €	68%
4480	2 100	CYFRA 21-1	399,00 Sk	12,47 €	24,15 €	94%
4451	1 800	NSE	342,00 Sk	10,69 €	25,30 €	137%
4452	1 100	TNF	209,00 Sk	6,53 €	34,50 €	428%
Markery kostného metabolizmu a iné analyty						
4454	1 200	Osteokalcín	228,00 Sk	7,13 €	29,90 €	320%
4459	1 100	25-hydroxycholecalciferol	209,00 Sk	6,53 €	34,50 €	428%
4460	2 100	1,25-dihydroxycholecalciferol	399,00 Sk	12,47 €	17,31 €	39%
4465	800	Beta-CrossLaps	152,00 Sk	4,75 €	23,00 €	384%
4465b	1 000	N-terminálny kostný kolagénový telopeptid	190,00 Sk	5,94 €	16,68 €	181%
4466	1 000	Chromografín A	190,00 Sk	5,94 €	71,65 €	1107%
4473	1 500	Interleukíny	285,00 Sk	8,91 €	74,75 €	739%

Kód	Body	Názov skúšky	Cena v SKK	Cena v Euro SR	Cena v Euro Rakúsko	Cenový rozdiel v %
4474	1 500	Cytokíny (IL-1, IL-6, IL-2, a pod)	285,00 Sk	8,91 €	74,75 €	739%
4477	1 000	Homocysteín	190,00 Sk	5,94 €	17,25 €	191%
4485	2 450	Troponín	465,50 Sk	14,55 €	19,55 €	34%
Imunochemické vyšetrenia						
4530	240	IgG	45,60 Sk	1,43 €	5,52 €	287%
4531	240	IgA	45,60 Sk	1,43 €	5,52 €	287%
4532	240	IgM	45,60 Sk	1,43 €	5,52 €	287%
4533	240	IgD	45,60 Sk	1,43 €	20,90 €	1367%
4352	600	Imunoglobulín E	114,00 Sk	3,56 €	11,50 €	223%
4534	1 200	Lahké refazce kapa	228,00 Sk	7,13 €	18,39 €	158%
4535	1 200	Lahké refazce lamda	228,00 Sk	7,13 €	18,39 €	158%
4536	240	C3 komplement	45,60 Sk	1,43 €	7,18 €	404%
4537	240	C4 komplement	45,60 Sk	1,43 €	7,18 €	404%
4541	300	Alfa-1-anti-trypsin	57,00 Sk	1,78 €	10,86 €	510%
4542	600	Alfa-2-makroglobulín	114,00 Sk	3,56 €	10,86 €	205%
4543	300	Ceruloplazmín	57,00 Sk	1,78 €	14,95 €	739%
4544	480	Haptoglobín	91,20 Sk	2,85 €	16,10 €	465%
4548	360	C-reaktívny proteín (CRP)	68,40 Sk	2,14 €	23,00 €	976%
4549	360	Reumatoidný faktor	68,40 Sk	2,14 €	3,68 €	72%
4563	360	C1q inaktívator	68,40 Sk	2,14 €	32,89 €	1439%
4566	1 100	Apolipoprotein A I	209,00 Sk	6,53 €	14,21 €	118%
4569	1 100	Lipoprotein (a)	209,00 Sk	6,53 €	19,55 €	199%
4570	1 100	Apoprotein B	209,00 Sk	6,53 €	7,11 €	9%
4572	380	ASO (ASLO)	72,20 Sk	2,26 €	4,00 €	77%
4575	700	IgG1	133,00 Sk	4,16 €	66,86 €	1509%
4576	700	IgG2	133,00 Sk	4,16 €	66,86 €	1509%
4577	700	IgG3	133,00 Sk	4,16 €	66,86 €	1509%
4578	700	IgG4	133,00 Sk	4,16 €	66,86 €	1509%

Kód	Body	Názov skúšky	Cena v SKK	Cena v Euro SR	Cena v Euro Rakúsko	Cenový rozdiel v %
4579	500	IgA1	95,00 Sk	2,97 €	34,13 €	1050%
4580	500	IgA2	95,00 Sk	2,97 €	34,13 €	1050%
4587a	500	Imunologické vyšetrenie HbA1c	95,00 Sk	2,97 €	11,52 €	288%
4354	900	Beta-2 mikroglobulín	171,00 Sk	5,34 €	23,90 €	347%
Imunologické vyšetrenia						
4597	1 100	pANCA, cANCA	209,00 Sk	6,53 €	29,26 €	348%
4598	200	Anti-dsDNA	38,00 Sk	1,19 €	23,94 €	1916%
4599	200	Antiperi-nukleárne protilátky	38,00 Sk	1,19 €	20,72 €	1645%
4600	600	Antimito-chondriálne protilátky	114,00 Sk	3,56 €	21,23 €	496%
Sérologické a virologické vyšetrenia						
4769	300	anti HIV	57,00 Sk	1,78 €	13,80 €	675%
4772	320	Anti HAV-IgG	60,80 Sk	1,90 €	16,12 €	748%
4773	500	anti HAV IgM	95,00 Sk	2,97 €	18,40 €	520%
4777	800	anti-HBc IgM	152,00 Sk	4,75 €	23,00 €	384%
4778b	900	anti HBc IgM	171,00 Sk	5,34 €	23,00 €	330%
4779	600	HbeAg	114,00 Sk	3,56 €	23,00 €	546%
4780	600	anti-Hbe	114,00 Sk	3,56 €	23,00 €	546%
4781	500	HbsAg	95,00 Sk	2,97 €	9,43 €	218%
4784	450	Anti HCV	85,50 Sk	2,67 €	18,40 €	589%
4423	900	Anti-kardiolipín	171,00 Sk	5,34 €	25,07 €	369%
4789d	250	Helicobacter pylori	47,50 Sk	1,48 €	24,04 €	1520%

Kód	Body	Názov skúšky	Cena v SKK	Cena v Euro SR	Cena v Euro Rakúsko	Cenový rozdiel v %
4789j	1 200	Borelia burgdorferi IgG alebo IgM	228,00 Sk	7,13 €	12,03 €	69%
4789k	350	Chlamýdia pneumonie IgA-G-M	66,50 Sk	2,08 €	22,36 €	976%
4789l	400	Chlamýdia pneumonie IgM, IgG	76,00 Sk	2,38 €	22,36 €	841%
4789o	350	Chlamýdia trachomatis IgG, IgM	66,50 Sk	2,08 €	19,02 €	815%
4789p	350	Chlamýdia trachomatis IgG, IgM	66,50 Sk	2,08 €	19,02 €	815%
4891	450	Anti-CMV IgG	85,50 Sk	2,67 €	6,90 €	158%
4891a	800	Anti-CMV IgM	152,00 Sk	4,75 €	6,90 €	45%
4892	1 200	Anti-EBV IgG	228,00 Sk	7,13 €	22,36 €	214%
4892a	1 200	Anti-EBV IgM	228,00 Sk	7,13 €	22,36 €	214%
4892b	1 200	Anti-EBV IgA	228,00 Sk	7,13 €	22,36 €	214%
4892c	1 750	Anti-EBNA	332,50 Sk	10,39 €	57,50 €	453%
4893	1 100	Anti-HSV IgG	209,00 Sk	6,53 €	19,55 €	199%
4893a	1 500	Anti-HSV IgM	285,00 Sk	8,91 €	19,55 €	120%
4895	1 250	Anti-Parotitis virus IgG	237,50 Sk	7,42 €	19,55 €	163%
4895a	1 375	Anti-Parotitis virus IgM	261,25 Sk	8,16 €	19,55 €	139%
4898	1 500	Toxoplazma gondii IgG	285,00 Sk	8,91 €	13,80 €	55%
4898a	1 900	Toxoplazma gondii IgM	361,00 Sk	11,28 €	18,40 €	63%

LEPEJ JÁN^{1,3}, LEPEJOVÁ KATARÍNA²

¹Inštitút nukleárnej a molekulárnej medicíny Košice

²Roche Slovensko, s.r.o., Bratislava

³Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce

sv. Alžbety n.o. – Bratislava

ÚVOD

Úvodom nášho článku sa ospravedľujeme všetkým kolegom, ktorých sa nasledujúce riadky môžu akýmkoľvek spôsobom dotknúť. Nie sme spoluautormi súčasnej, ani obhajcami predchádzajúcej reformy zdravotníctva a nami prezentované názory sa snažia vychádzať len z analýzy verejne dostupných informácií a všeobecne známych faktov. Pokúsime sa upozorniť na niektoré súvislosti, ktoré nie sú jednoznačne definované v zákonnej norme a taktiež neboli prezentované v médiách. Cieľom je poukázať na problematiku dostupnosti zdravotnej starostlivosti z pohľadu laboratórnej diagnostiky.

Prečo je téma taká aktuálna?

Reforma zdravotníctva je kontinuálny proces vyvolaný tlakom zvyšujúcich sa nákladov a limitovaných zdrojov. Z veľkého počtu modelov financovania zdravotnej starostlivosti používaných vo svete, ani jeden nie je taký úspešný, aby sa stal univerzálny, alebo všeobecne odporúčany ako najvhodnejší. Preto sa v jednotlivých štátoch (aj v samotnej EÚ) uplatňujú modely, ktoré vyhovujú naturelu a typu vlády.

V súčasnosti zdravotníctvo na Slovensku vchádza do svojej ďalšej etapy, pričom so zmenou orientácie vlády naľavo od stredu by táto mala byť zameraná na zlepšenie podmienok pre širšie skupiny obyvateľstva. Aj keď prvé opatrenie, ako zrušenie poplatkov (20,- a 50,- Sk), na ktoré si už pacienti zvykli, viedlo k úspore časti osobných nákladov pacientov a k zvýšeniu nákladov z verejných zdrojov, je ťažké odhadnúť, či navrhované zmeny v sieti zdravotníckych zariadení nebudú pre niektorých pacientov znamenať podstatne hlbšie siahnutie do vrecka.

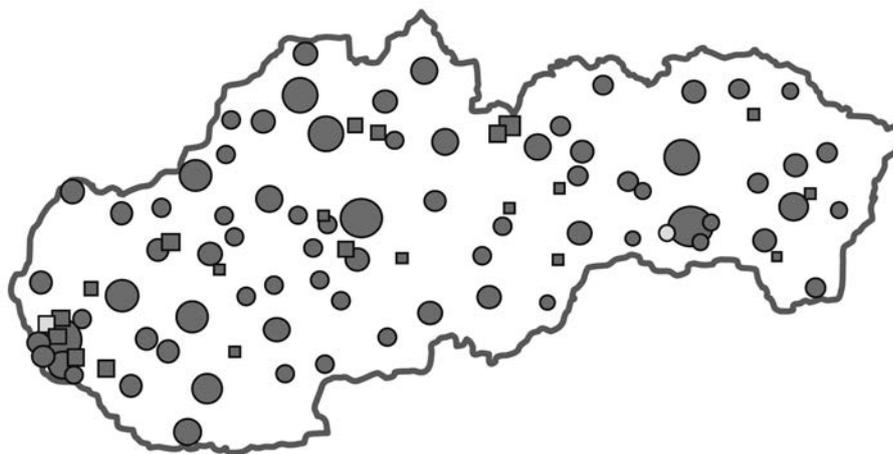
Od februára 2007 bol predložený na verejnú diskusiu nový návrh Nariadenia Vlády SR, ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 751/2004 Z. z. o verejnej minimálnej sieti poskytovateľov zdravotnej starostlivosti [1]. Účinnosť Nariadenia vlády bola plánovaná od 15.9.2007, neskôr posunutá na 15.10.2007. Konečná verzia sa dostala do parlamentu koncom októbra a po jej schválení 24.10.2007 bude platiť od 15.11.2007. Široká diskusia v masmédiách sa točila okolo dvoch základných pojmov – sieť a dostupnosť zdravotnej starostlivosti (ZS). Žiaľ, poukazovala len na úzky segment problematiky z pohľadu nemocníc a iných lôžkových zariadení a ako obvykle, upozornenia na skutočné problémy, ktoré vyplývajú z „dostupnosti či nedostupnosti“ na úrovni spoločných vyšetrovacích zložiek a hlavne laboratórnej diagnostiky, „unikli“ po-

zornosti strážcov informovanosti verejnosti a do masmédií sa nedostali.

Existuje objektívna definícia dostupnosti zdravotnej starostlivosti?

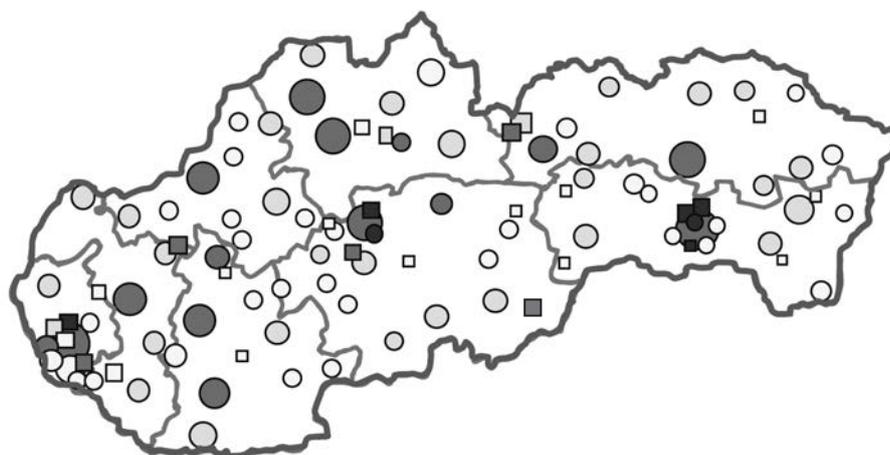
Dostupnosť ZS je len relatívny pojem, ktorého výklad podlieha módnym vplyvom politickej argumentácie. Ani pred rokom 1989 socialistický pojem všeobecnej a rovnej dostupnosti ZS sa v praxi neuplatňoval. Dostupnosť bolo možné chápať nie ako teritoriálnu (vzdialenosť do najbližšej nemocnice), ale ako rovnú príležitosť v prístupe k zdravotnej starostlivosti pre všetkých občanov. Vplyvom uplatňovania známostí a šedej ekonomiky reálne neexistovala.

Odchod od princípov rovnostárstva a reálneho socializmu po roku 1989 si vynútil aj zmenu definície. V materiáli, ktorý v roku 2000 dával do vlády bývalý minister zdravotníctva SR Kováč sa uvádza: „sieť zdravotníckych zariadení je definovaná sústavou štátnych a neštátnych zdravotníckych zariadení (ZDZ), ktoré sú usporiadané v takom počte a v takej distribúcii, ktorá vytvára podmienky pre zabezpečenie štátom garantovanej zdravotnej starostlivosti. Základnou funkciou siete ZDZ je zabezpečiť dostupnosť jednotlivých druhov zdravotnej starostlivosti“ [2]. Tvorba siete je kontinuálny proces, ktorý ovplyvňujú viaceré faktory, najmä: demografický vývoj, geografické podmienky, epidemiológia chorôb, rozvoj medicíny a finančné zdroje v systéme zdravotnej starostlivosti. V predchádzajúcej legislatívnej norme z dielne ministra zdravotníctva SR Zajaca [3] bol definovaný pojem **efektívna dostupnosť**. Tento termín znamenal, že pacient dostane služby požadovanej kvality v rozsahu a čase tak, aby nedošlo k závažnému ohrozeniu jeho života alebo zhoršeniu zdravotného stavu. Jedným z mála kritérií na posúdenie dostupnosti nemocnice (ktoré boli v minulosti diskutované) bolo maximálne 30 minútové trvanie cesty sanitkou do ZDZ z akéhokoľvek sídla v krajine. Významné zmeny vo vlastníctve zdravotníckych zariadení za ostatných 8 rokov výrazne zmenili situáciu na Slovensku. Súčasná vláda, už spomenutou legislatívnou úpravou [1] v **minimálnej sieti**, (ktorej definícia pochádza z roku 2004)[3] určuje, s ktorými zdravotníckymi zariadeniami zdravotné poisťovne **musia** uzavrieť zmluvy o poskytovaní zdravotníckej starostlivosti. Názory na ich počet sa v priebehu roku 2007 menili a po schválení parlamentom tam zostali len všetky lôžkové zariadenia a špecializované ústavy v pôsobnosti štátu (priamo riadené MZ SR alebo štátne a.s.) – pozri obr. č. 1 a-c. O razantnosti reformy zdravotníctva svedčí aj pokles počtu lôžok v nemocniciach (pozri tabuľka č. 1.) z pôvodných 50 895 na 32 334 v roku 2005. Trend v redukcii akútnych lôžok (ako relatívne drahej forme ústavnej starostlivosti) je celoeurópsky, pričom sa odporúča 5 akútnych a 2 chronické lôžka na 1 000 obyvateľov. Zdá sa, že k týmto číslam na Slovensku postupne smerujeme. Žiadna zákonná úprava nedefinuje podmienky siete laboratórií.



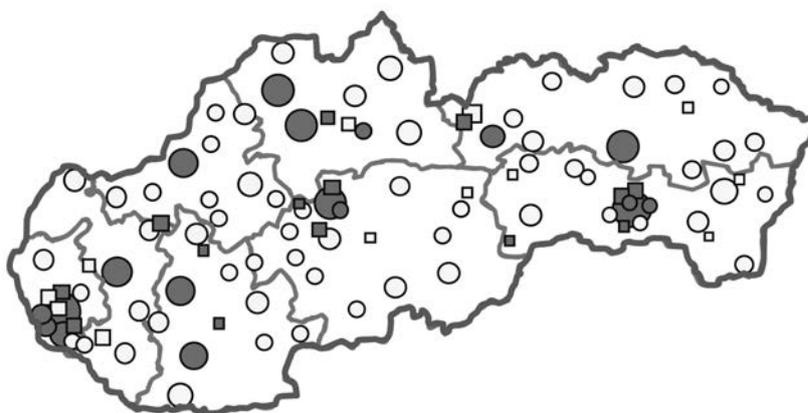
A) Stav v roku 2000.

Legenda: ○ bledomodro označené sú neštátne ZDZ (rôzne formy neštátneho vlastníctva – s.r.o./n.o. v súkromných rukách aj v majetku miest a obcí) nie sú zobrazené kúpele a hospice, červené sú štátne ZDZ.
● Krúžok označuje nemocnice a ■ štvorec špecializované ústavy.



B) Návrh minimálnej siete lôžkových ZDZ a špecializovaných ústavov – september 2007.

Legenda: Žlté ○ označené sú zariadenia mimo pôvodne na vrhovanú minimálnu sieť. Hnedo ■ označené inštitúcie, boli zriadené (najčastejšie vyčlenením z veľkých nemocníc) do roku 2007. Tieto boli spolu so svetlomodrými neštátnymi a červenými štátnymi ZDZ v pôvodne navrhovanej minimálnej sieti.



C) Definitívna verzia minimálnej siete lôžkových zariadení platná od 15.11.2007 zahŕňa „spádové“ štátne nemocnice, psychiatrické ústavy a iné špecializované ústavy v pôsobnosti štátu – červené značky. Žlté sú označené neštátne ZDZ mimo minimálnu sieť.

Obr. 1. Zmeny v počte a zaradení lôžkových zdravotníckych zariadení a ústavov v SR.

Zdroje: Atlas krajiny 2000, Návrh nariadenia vlády 2007

Tab. 1. Zmeny v počte lôžok vo vybraných rokoch. Údaj z roku 1989 platí pre všetky nemocničné lôžka, ostatné údaje len pre akútne

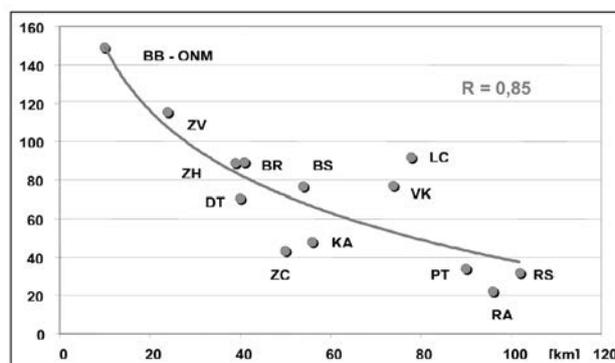
Parameter/roky	1989	1998	2005
Počet lôžok v nemocniciach	50 897	45 890	32 334
Počet akútnych lôžok/1000 obyvateľov	9,5	8,5	6,0
Trend poklesu - počet lôžok/rok		-556	-1937

Zdroje: Návrhy do zasadania Vlády SR (2000 - Kováč)

Sú existujúce štatistické ukazovatele postačujúce na hodnotenie dostupnosti?

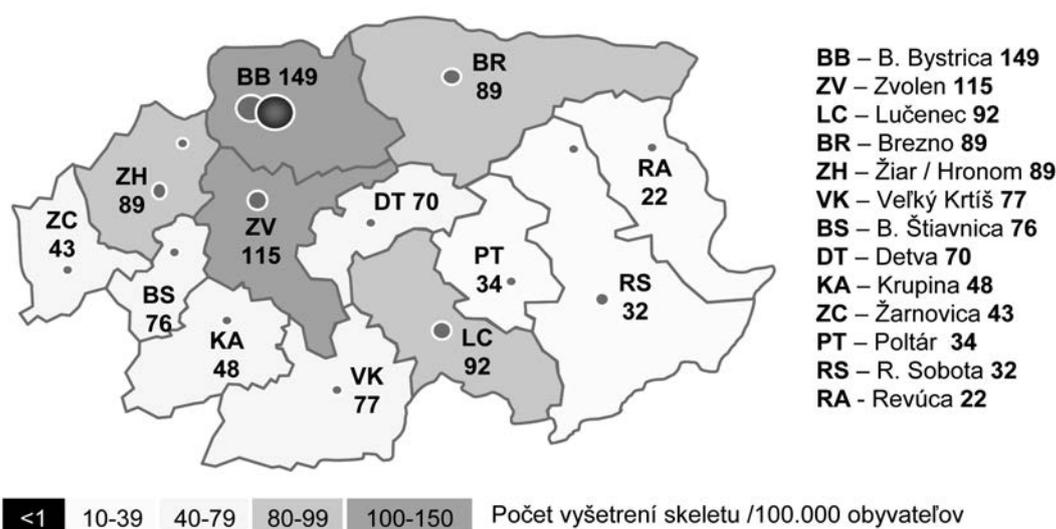
Sieť ZDZ a teda aj dostupnosť ZS vyžaduje kontinuálnu kontrolu - vyhodnocovanie a korekcie na základe stanovených indikátorov, ktoré sú špecifické pre jednotlivé druhy poskytovanej starostlivosti. Patrí sem počet vyšetrených v ambulantnej starostlivosti, počet hospitalizovaných v ústavnej starostlivosti, priemerný ošetrovací čas, počet lôžok na 1000 obyvateľov a i. Niektoré iné užitočné údaje nie sú k dispozícii, alebo sa získavajú len veľmi ťažko. Hľadanie údajov za iné krajiny, s ktorými by sme sa mohli porovnávať je veľmi zložitá. Medzi takéto indikátory, ktoré by pomohli hodnotiť dostupnosť zdravotnej starostlivosti, by mohol patriť **relatívny počet vybraných výkonov**, prepočítaný na počet obyvateľov v regióne. Pokúsili sme sa vykonať takéto hodnotenie dostupnosti scintigrafie skeletu, ktorá má byť podľa štandardných postupov vykonaná u pacientov s najčastejšími onkologickými diagnózami (C50 a C60). Na obrázku č. 2 je hodnotenie tohto parametra za rok 2001 v Banskobystrickom kraji.

Pretože výskyt uvedených nádorov (karcinóm prsníka a prostaty) v populácii nie je veľmi geograficky rozdielny, možno predpokladať približne rovnaké počty indikácií scintigrafie kostí v prepočte na počet obyvateľov. Nami zistené rozdiely medzi jednotlivými okresmi (obrázok č. 2.) sú prekvapujúco veľké. Zistili sme aj tesnú závislosť na vzdialenosti bydliska pacientov do miesta, kde sa vyšetrenie vykonáva. Predpokladáme, že brzdou vo využívaní niektorých centralizovaných služieb bola zlá finančná situácia zdravotníckych zariadení a snahy o úspory za prevozy pacientov. Vzhľadom na skutočnosť, že pacienti dochádzajú na vyšetrenie najčastejšie ambulantne, čo zvyšuje náklady na cestovné, vyšetrenia sú odmietané alebo menej indikované. V našom prípade situáciu komplikuje aj to, že okresy v dolnej časti tabuľky majú najvyššiu nezamestnanosť v štáte. Dá sa konštatovať, že kvalita (a najmä dostupnosť) zdravotnej starostlivosti v týchto okresoch je nižšia ako v centre. V okresoch, ktorých údaj je nad korelačnú krivku je situácia lepšia



Graf 1. Závislosť počtu vyšetrení na 100 000 obyvateľov v okresoch na vzdialenosti od centra - (Banská Bystrica) miesta výkonu vyšetrenia - scintigrafie skeletu - hodnotenie dostupnosti.

Zdroje: Vlastný výskum autora



Obr. 2. Relatívne počty scintigrafie skeletu na 100 000 obyvateľov u pacientov s bydliskom v jednotlivých okresoch Banskobystrického kraja nekorešponujú s výskytom diagnóz C50 a C60

ako v tých, ktoré sú pod krivkou (graf č. 1). Takáto analýza je možná, len ak vylúčime možnosť, že významná časť pacientov bola vyšetrená v iných zdravotníckych zariadeniach (mimo centrum). Tam, kde v rovnakom regióne na „trhu“ pôsobia viaceré subjekty (napríklad v okresoch s rovnakou vzdialenosťou od dvoch centier), môže takéto hodnotenie, vyjadrené pre jedno pracovisko, odrážať efekty vplyvu kvality, ale aj rôznych „marketingových stratégií“. Len centrálné posúdenie všetkých údajov môže pomôcť hodnotiť dostupnosť daného vyšetrenia pre sledovaný región.

Príklad poukazuje aj na nevyváženosť vzťahu centralizácie a decentralizácie zdravotníckej služby. Prílišná centralizácia zhoršuje dostupnosť v okrajových okresoch. Z pohľadu pravicového ekonóma v uvedených okresoch je nedostatočne „saturovaný trh“ pre danú službu a vzniká priestor pre investovanie do zriadenia nového zdravotníckeho zariadenia.

Ak by niekto tvrdil, že počty v periférii sú dostatočné a v centre príliš vysoké, stačí porovnanie so zahraničím. Počet všetkých scintigrafických vyšetrení prepočítaných na 100 000 obyvateľov bol v Českej republike 2 271 a na Slovensku 666 (čo predstavuje len 21 % dostupnosti tohto typu vyšetrení u nás!).

Úloha zdravotných poisťovní a problém dostupnosti laboratórnej diagnostiky

Ako konštatuje správa Úradu pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou (ÚDZS) z roku 2007[4]: „*Kritériá pre uzatváranie zmlúv medzi zdravotnou poisťovňou a poskytovateľmi boli rámcové a proces ich hodnotenia v súčasnej podobe neumožňoval úplne transparentnú súťaž poskytovateľov, bez vylúčenia subjektívnych faktorov*“. Aj keď základnou úlohou zdravotných poisťovní by malo byť zabezpečovanie dostupnosti zdravotnej starostlivosti, žiaľ, nemáme informácie, že by sa zaoberali podobnými analýzami, ako sme uviedli v príklade. Určite by to bolo užitočnejšie, ako bežne vykonávané extenzívne posudzovanie počtu vyšetrení na poskytovateľa – laboratórium. Získané výsledky obvykle skĺznu do konštatovania („má viac ako priemer“), čo vyvoláva **uplatňovanie limitov na výkony** zo strany ZP. Tento výslovné nespravodlivý prístup (laboratórium nemôže aktívne znižovať počet stanovení), je prejavom zlyhania regulačnej funkcie ZP. Kontrola uplatňovania princípov medicíny založenej na dôkazoch, orientácia na obmedzovanie nekvalitnej a neefektívne indikovanej diagnostiky na základne analýzy situácie by mali byť významnými metódami, ako zlepšiť efektívnosť a dostupnosť diagnostiky.

V laboratórnej praxi je nedostupnosť vyvolaná aj **nesprávnym ohodnotením výkonov**. Na tento problém sme upozornili už v minulosti a v roku 2000 [5] sme navrhli systém na ich oceňovanie. Vágne bodové hodnoty výkonov nie sú v diagnostike aktualizované priebežne. Naproti tomu v ostatných segmentoch (lieky, ambulancia a ústavná starostlivosť) je oceňovanie pravidelne upravované. Postupne došlo k situácii, že preplácaná bodová hodnota za niektoré výkony je hlboko pod cenou priamych nákladov za spotrebované reagenty a výkony sa stávajú „nelukratívne“. Pretože nemáme reálnu **cenu za výkon** (tak ako za lieky), neexistuje legislatív-

na možnosť ako pôsobiť na ZP a uplatniť zákon o cenách, ktorý podobné praktiky zakazuje [6]. Súčasný stav nesystémovo podhodnotených výkonov vyhovuje nielen ZP, ale aj niektorým pracoviskám. Niektoré laboratória preferujú vykonávanie len tých vyšetrení, ktoré sú „lepšie ocenené“. Tým, že limity naplňajú len „ziskovými výkonmi“, ponúkajú ZP dumpingové zníženie hodnoty bodu, aby sa vyhli limitom. Výhoda, ktorú získajú v konkurencii s inými laborátormi vedie k zhoršovaniu situácie pre serióznych poskytovateľov. Možnosť vytvárať zisk takýmto spôsobom (a aj na úkor iných) viedla k vzniku vyššieho počtu laboratórií, ako bola skutočná potreba, a k následnej **vojne laboratórií**. Nenásytosť v nasýtenom trhu asi 120 laboratórií zhoršuje vzťahy a spôsobuje **nedostupnosť informácií**. Obetami sú tie zdravotnícke zariadenia, ktoré musia vykonávať všetky požadované vyšetrenia a nemajú možnosť vykonávať žiadnu, viac či menej, legálnu formu obchodnej politiky. Pokles počtu vyšetrení a vykonávanie zvyšných nelukratívnych výkonov zvyšuje ich straty. Výsledkom je, že stratové výkony sa vykonávajú zriedka, aj keď sú veľmi potrebné a len v niektorých koncových nemocniciach. Stratové výkony sa stávajú nedostupnými, pretože nie sú vykonávané v regionálnych laboratóriách.

V **zozname výkonov** nie sú zaradené niektoré užitočné diagnostické parametre známe viac ako 10 rokov. Napriek tomu, že sú súčasťou medzinárodne platných diagnostických algoritmov, nemôžu byť preplácané cez ZP. Parametre ako napríklad S-100 [7], NT-proBNP a iné sa u nás vykonávajú len ako súčasť výskumných úloh – financované z iných zdrojov alebo ako iniciatíva laboratórií.

Naopak, zdravotné poisťovne vyžadujú **nepotrebnú dostupnosť** – znižujú hodnotu bodu laboratóriám, ktoré nevykonávajú ústavnú pohotovosť, aj keď sa jedná o poliklinické pracoviská, ktoré zabezpečujú regióny bez nočných pohotovostných služieb.

Na záver tejto časti konštatovanie ÚDZS [4]: V roku 2006 ZP vynaložili na svoju správu 5,3 mld. Sk, čo predstavovalo 6,2 % z celkových výdavkov (zákon stanovoval 4 % a v októbri 2007 odsúhlasil parlament zníženie na 3,5 %). ZP vykázali kladný hospodársky výsledok (zisk) 1,2 mld. Sk a ich záväzky voči poskytovateľom (dlh zdravotníckym zariadeniam) narástli o 2,3 mld. Sk, pričom ku koncu roku 2006 predstavovali celkovo 9,9 mld. Sk.

Dostupnosť a výdavky na zdravotnú starostlivosť.

Z tabuľky č. 2 – údaje zo štatistiky WHO [8] – vyplýva charakteristická črta zdravotníctva: **výdavky na jedného obyvateľa stále rastú** (prakticky vo všetkých krajinách). Pomer verejných a súkromných zdrojov, výdavky do zdravotníctva, ako % z HDP, sa medzi štátmi významne líšia a závisia od štátnej zdravotnej politiky. Odhadovaná dĺžka života je podmienená mnohými faktormi pričom vplyv finančných zdrojov na tento indikátor zdravia nie je zásadný.

Tab. 2. Vývoj výdavkov do ZS v USD na obyvateľa, % z HDP, % súkromných výdavkov v roku 2003 (PRIVAT), počet lôžok v nemocniciach na 1000 obyvateľov (2003 alebo 2004) a odhadovaná dĺžka života (LE) v roku 2004 vo vybraných štátoch.

Štát/ rok	2000	2001	2002	2003	% z HDP v 2003	PRIVAT v 2003	Lôž- ka/1000 obyv.	LE M+Ž roky
USA	4588	4934	5324	5711	15,2%	55,4%	3,3	78
Dánsko	2381	2556	2654	3762	9,0%	17,0%	4,0	78
Japonsko	1971	2092	2139	2244	7,9%	19,0%	12,9	82
Česká republika	962	1065	1186	1302	7,5%	10,0%	8,5	76
Maďarsko	857	875	1115	1269	8,4%	27,6%	7,8	73
Slovensko	597	641	716	777	5,9%	11,7%	7,0	74
Poľsko	587	646	732	745	6,5%	30,1%	5,5	75
Čína	192	212	247	278	5,6%	63,8%	2,3	72

Zdroj: štatistiky WHO

Pre horšiu dostupnosť zdravotnej starostlivosti z dôvodu reštriktívnej finančnej politiky hovorí výrazne zaostávanie SR za krajinami V4. Týka sa hlavne základného indikátora, ktorým je podiel nominálnych zdrojov financovania zdravotníctva na HDP (% z HDP). Ak porovnáme údaje Slovenska, sú výdavky na obyvateľa porovnateľné skôr s Poľskom ako s Českou republikou, aj keď % z HDP sa skôr blíži k Číne! Česká republika, ktorá má % z HDP bližšie k Japonsku, ako ku nám, má výdavky na jedného obyvateľa o 68 % vyššie ako sú na Slovensku.

Podľa údajov ÚDZS [3] v roku 2006 % z HDP do zdravotníctva bolo už 6,2 %, ale v porovnaní s rokom 2005 bol zaznamenaný dokonca pokles o 0,3 %. Je to paradox, pretože vtedy sme dosiahli najvyšší (8,3 %) medziročný nárast HDP od roku 1989. Tento fakt sa odzrkadlil aj na výsledku parlamentných volieb. Príliš razantná reforma v zdravotníctve sa prejavila odchodom slovenských zdravotníkov za prácou do ČR a iných štátoch EÚ.

U nás postupne dochádza k vzostupu podielu súkromných výdavkov do zdravotníctva. Keď v roku 2003 s 11,7 % sme boli porovnateľní s ČR, z roku 2005 na 2006 tento pomer stúpol z 16,3 % na 19,4 %, čo je viac ako bolo v roku 2003 v Japonsku. Údaje o súkromných výdavkoch nezahŕňajú vyvolané náklady na strane pacienta, spôsobené relatívnou nedostupnosťou ZDZ (napríklad: cestovné náklady). Pri ceste za špeciálnym vyšetrením, ktoré sa vykonáva len

v Bratislave, občan z Košíc zaplatí ako príplatok za indikovaný prevoz sanitkou 960,- Sk.

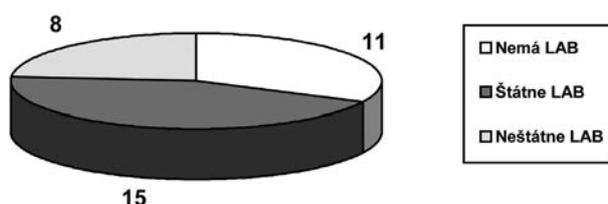
Dostupnosť a kvalita zdravotnej starostlivosti v laboratórnej diagnostike

Musíme žiaľ konštatovať, že fyzická dostupnosť zdravotníckej služby NEMUSÍ znamenať reálnu dostupnosť, pretože existujú veľké teritoriálne rozdiely v KVALITE poskytovaných služieb. Tieto sú podmienené: malým počtom výkonov na získanie požadovaných skúseností (platí len pre časť laboratórnej diagnostiky), menšou možnosťou spolupráce a horšou dostupnosťou informácií, menšom konkurenčnom tlaku na pracovníkov, horších možnostiach investícií a následne pomalšej výmene techniky a preto jej relatívnom zastarávaní. Teoreticky veľké centralizované a konsolidované laboratória majú výhodu. Avšak geografické podmienky zhoršujú transport materiálu a tak stúpajú problémy v preanalytike. Potreba vytvárania satelitných laboratórií sa ukazuje ako schodná cesta, avšak zložité vlastnícke vzťahy, ktoré vznikli za ostatných 8 rokov, tento proces neuláhčia (viď aj ďalšia kapitola).

Áké sú dôsledky neúnosných rozdielov v kvalite laboratórií? Nekvalitné (sporné) výsledky sa musia riešiť na inom mieste, čo v dôsledku spôsobuje zvýšenie nákladov a zaťažuje systém opakovaním testov. To sekundárne vedie k predĺženiu čakacej doby, rozptyľujú sa zdroje, znižuje sa efektívnosť ich využitia a zhoršuje sa stav pacienta. Mimo oblasti laboratórnej medicíny si časť pacientov volí lepšie centrá (mimo ich spádovú oblasť) a tak stúpajú vyvolané výdavky obyvateľstvo na dopravu so súkromných zdrojov.

Kam smerujeme v dostupnosti laboratórnej diagnostiky?

Situácia je taká, že v návrhu minimálnej siete je 34 štátnych zdravotníckych zariadení, ktoré zostali po viac ako 8 rokoch privatizácie.



Graf 3. Podiel štátnych a neštátnych laboratórií v schválenej minimálnej sieti 34 štátnych zdravotníckych zariadení

Z nich 11 nemá žiadne laboratórium, pretože si ho zatiaľ nevybudovali, alebo vzorky (malý počet vzoriek z psychiatrie) posielajú do iných laboratórií (prevažne súkromných). Zostávajúcimi 23 nemocnicami a ústavmi má laboratóriá. Súčasťou nemocnice (teda štátnych) je 65 % laboratórií a odštátnených – obvykle s.r.o. alebo a.s. pôsobiacich v areáli štátnych nemocníc je 35 % laboratórií. Tieto ovládajú obvykle známe finančné skupiny. Na Slovensku pôsobi

okrem laboratórií, ktoré sú súčasťou neštátnych nemocníc a aj veľký počet poliklinických laboratórií (ako a.s. alebo s.r.o.). Nemáme k dispozícii presnú štatistiku, ale z približne 120 laboratórií je len 15 štátnych. Určite cieľom jedných aj druhých je poskytovať čo najlepšie služby. Ako sa tieto vzťahy budú ďalej vyvíjať je ťažké predpovedať, pretože to závisí od viacerých premenných.

Cieľ znovunavrátania kladného hospodárskeho výsledku ZP do systému zdravotníctva je plne pochopiteľný, najmä preto, lebo majú nesplatené záväzky voči poskytovateľom vo výške 9,9 mld. SK, ktoré stále rastú. Pritom už dnes niektoré súkromné ZP, ale aj celý komplex poskytovateľov, je súčasťou niekoľkých finančných skupín. Preferovanie uzatvárania výhodnejších zmlúv a iné nepriame formy budú viesť k hromadeniu majetku v týchto spoločnostiach. Ak ponúknu vyššiu kvalitu (alebo lepší imidž) s požiadavkou pripoistenia a budú budovať nové zdravotnícke zariadenia, môžeme očakávať postupný vznik duálneho modelu zdravotníctva: súkromné s pripoistením (vysoký podiel súkromných zdrojov) a štátne odkázané prevažne na limitované verejné zdroje. Prerozdelenie sa dá obísť a so zmenou vlády aj zrušiť. Časť nemocníc, ktoré nie sú v sieti, zanikne, časť bude prežívať na rôznom stupni kvality a časť sa transformuje na zariadenia s ambíciou zisku. Ten si v budúcnosti dokážu zaistiť, len ak dobre zaplatia kvalitný personál – teoreticky na to budú mať lepšie možnosti. Odchod kvalitných pracovníkov (nielen do zahraničia a do privátnej ambulantnej starostlivosti, ale aj do súkromných nemocníc), zhoršuje situáciu a spôsobí, že štátne nemocnice (s nižšími platmi) a trvalým poklesom zdrojov (nákladovejším poistením) budú ďalej strácať na kvalite, čím výrazne klesne vplyv princípu solidarity. Hrozí vznik dvoch rozdielnych typov kvality. Vysokej - dobre zaplatenej a tej ostatnej.

Záver, alebo ako zdostupniť dostupnosť?

Predchádzajúci relatívne pesimistický pohľad sa možno nenaplní, alebo len oddialí, ak sa čo najskôr v oblasti laboratórnej diagnostiky uplatnia niektoré z nasledujúcich opatrení.

- 1) Zavedie sa systém oceňovania výkonov v reálnych cenách tak, ako to je u liekov.
- 2) Zavádzané budú nové výkony s diagnostickým a terapeutickým dopadom a vyradované tie, ktoré sú obsoletné - inštitucionálne spravovaný zoznam zdravotníckych výkonov s jeho pravidelnou, aktualizáciou minimálne raz ročne.

3) Zavedie sa povinná účasť v systémoch internej a externej kontroly kvality

4) Vyrovnajú sa príjmy zdravotníckeho personálu medzi jednotlivými typmi poskytovateľov.

Existujú iste viaceré problémy, ktoré sú dobre známe (len na niektoré sme poukázali) a ktorých riešenie by pomohlo zlepšiť dostupnosť zdravotnej starostlivosti. Zabudnite, tak skoro to nehrozí. Ak by bol záujem na strane tých, ktorí môžu zmeniť stav vecí, tak by to urobili. Dennodenná realita nás však presvedča, že takýto záujem nemajú, pretože ich ciele sú iné, než tie, ktoré deklarujú.

LITERATÚRA

1. **Návrh nariadenia vlády**, ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 751/2004 Z. z. o verejnej minimálnej sieti poskytovateľov zdravotnej starostlivosti v znení nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 422/2006 Z.z z 24. 10. 2007.
2. **Kováč:** *Informácia o stave zdravotníckych zariadení*, (Materiál na 126. schôdzku vlády SR dňa 31. 10. 2000) dostupné na: „<http://www.government.gov.sk>“ rok 2000.
3. **Zákon NR SR 578/2004 Z.z.** o poskytovateľoch zdravotnej starostlivosti,... zdravotníckych pracovníkoch, stavovských organizáciách v zdravotníctve a o zmene a doplnení niektorých zákonov. Dostupný na: „<http://www.zdravie.sk/sz/460-23135/Zakon-5782004>“ NVSR.
4. **Úrad pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou:** správa za rok 2006 na rokovanie Vlády SR, dostupné na <http://www.rokovania.gov.sk/appl/material.nsf/>
5. **Lepej, J., Balla, J., Keleová, A.:** *Nový pohľad na definovanie výkonov SVLZ - SNOLAMED, Systematická nomenklatúra v laboratórnej medicíne a ostatných odboroch spoločných vyšetrovacích a liečebných zložiek*. Medicínsky monitor, 4, 2001 s. 7-9.
6. **Zákon NR SR 18/1996 Z.z.** o cenách.
7. **Lepej, J., Podhradský, J., Lenártová, R., Kičinková, M., Lepejová, K., Beluš, P., Bernasovský, P., Kitka, M., Marín, I.:** *Proteín S-100 u pacientov po mozgovej traume*. I. časť: Oplyvňuje príčina úrazu hladiny S100? Labor Aktuell 3/2006, ČR, s. 23.
8. **Štatistiky WHO** dostupné na: <http://www.who.int/whosis/whostat2006/en>

DERZSIOVÁ KATARÍNA, MYDLÍK MIROSLAV

Nefrologická klinika Lekárskej fakulty UPJŠ
a Logman a.s., Košice

SÚHRN

Funkčné vyšetrenie obličiek je súhrn neinvazívnych vyšetrení obličiek, ktoré sú potrebné pre včasnú diagnózu, diferenciálnu diagnózu, primeranú liečbu a určenie prognózy choroby obličiek. Na zabezpečení funkčného vyšetrenia obličiek sa podieľa praktický lekár pre dospelých, klinický biochemik, internista, nefrológ a iní odborní lekári. V prípade potreby je funkčné vyšetrenie obličiek vrátane sonografického vyšetrenia doplnené niektorými invazívnymi vyšetreniami, najmä rádiagnostickými, urologickými a histologickými.

Kľúčové slová: Proteinúria, Hematúria, Glomerulová filtrácia, Tubulárne funkcie obličiek, Kvantitatívna bakteriúria

SUMMARY

Renal functional investigation is the non invasive renal investigation which is needed for the early diagnosis, differential diagnosis, adequate therapy, and for the determination of prognosis of kidney diseases. Renal functional investigation is organized by general practitioner for adults, clinical biochemist, internist, nephrologist and by other doctors of medicine. If it is necessary renal functional investigation inclusively ultrasonic investigation is supplemented by some renal invasive investigations, especially by radiodiagnostic, urological and histological methods.

Key words: Proteinuria, Haematuria, Glomerular filtration, Renal tubular functions, Quantitative bacteriuria

Funkčné vyšetrenie obličiek je neoddeliteľnou súčasťou každého nefrologického vyšetrenia, ktoré zabezpečuje nefrologické laboratórium alebo laboratórium oddelenia klinickej biochémie.

Funkčné vyšetrenie obličiek umožňuje (1,2):

- posúdiť redukciu glomerulovej filtračnej plochy
- posúdiť aktivitu choroby obličiek
- prispieť k diagnóze a prognóze choroby obličiek

Funkčné vyšetrenie obličiek tvoria nasledujúce vyšetrenia:

- 1) kvantitatívna proteinúria
- 2) kvantitatívne vyšetrenie močového sedimentu
- 3) glomerulová filtrácia
- 4) tubulárna resorpcia vody
- 5) vyšetrenie koncentračnej schopnosti obličiek

- 6) vyšetrenie zriedovacej schopnosti obličiek
- 7) iné vyšetrenie
- 8) separované funkčné vyšetrenie obličiek

1. KVANTITATÍVNA PROTEINÚRIA

Pri kvantitatívnom vyšetrení proteinúrii rozdeľujeme na tzv. fyziologickú, ktorá sa vyskytuje u zdravých jedincov a je v rozmedzí od 50–150 mg/24 h, na malú proteinúriu < 2 g/24 h, ktorá je charakteristická pre rôzne nefropatie, najmä tubulointersticiálne nefropatie, glomerulonefritídy a iné glomerulopatie a na veľkú proteinúriu > 3,5 g/h, ktorá je charakteristická pre nefrotický syndróm rôznej etiológie (1–3). Denné vylučovanie bielkovín do moču je väčšie cez deň ako v noci. Hemodynamické zmeny môžu zvýšiť exkréciu bielkovín do moču, napr. zmeny krvného tlaku, srdcová nedostatočnosť, objemové zmeny, okrem toho zvýšený príjem živočišných bielkovín v potrave, svalová námaha, chlad, zvýšenie telesnej teploty. Fyziologická proteinúria je tvorená z plazmatických bielkovín, bielkovín tvorených v obličkách (napr. Tamm-Horsfall glykoproteín) a z bielkovín extrarenálnych močových ciest (napr. IgA). Túto fyziologickú proteinúriu nie je možné dokázať bežnými rutinnými metódami: kyselinou sulfosalicylovou alebo indikátorovými papierikmi. Patologická proteinúria je > 150 mg/24 h, ktorá je prejavom obličkových a systémových chorôb (1–6).

Pre včasnú diagnostiku má veľký význam zistiť už prvé zmeny vo vylučovaní plazmatických bielkovín do moču. Prvým prejavom diabetickej nefropatie je mikroalbuminúria, ktorá je v rozmedzí od 30–300 mg/24 h (fyziologická je 10–30 mg). Na kvantitatívne stanovenie mikroalbuminúrie sa používa turbidimetrická, nefelometrická a radioimunologická metóda.

Podľa príčiny vzniku proteinúrii delíme na: a) prerenálnu; b) glomerulovú (selektívnu a neselektívnu); c) tubulárnu; d) zmiešanú; e) postrenálnu.

- a) Prerenálna proteinúria sa vyskytuje pri akútnych zápalových a nekrotizujúcich chorobách. Je charakterizovaná zvýšeným vylučovaním napr. α_2 -glykoproteínu, orosomukoidu, Bence-Jonesovej bielkoviny, hemoglobínu a myoglobínu, v dôsledku ich zvýšenej koncentrácie v plazme.
- b) Glomerulová proteinúria vzniká v dôsledku zvýšeného prieniku bielkovinových molekúl z plazmy (m.h. > 50 000) cez glomerulovú membránu do moču
 - ba) Selektívna glomerulová proteinúria je charakterizovaná vylučovaním albumínu, transferínu a v nepatrnom množstve nízkomolekulových globulínov do moču
 - bb) Neselektívna glomerulová proteinúria je charakterizovaná zvýšeným vylučovaním albumínu, transferínu a globulínov s rôznou molekulovou hmotnosťou do moču

Na posúdenie typu glomerulovej proteinúrie je potrebné vyšetriť kvantitatívne vylučovanie jednotlivých bielkovín do moču, ako aj ich koncentráciu v sére (radiálnou imunodifúziou, turbidimetrickou alebo nefelometrickou metódou),

vypočítať klírens jednotlivých bielkovín a index selektivity glomerulovej proteinúrie.

Index selektivity glomerulovej proteinúrie (IS) vyjadruje pomer klírensových hodnôt IgG a transferínu (resp. albumínu).

- a) Ak $IS < 0,1$ ide o selektívnu glomerulovú proteinúriu, ktorá sa vyskytuje napr. pri chronickej intrakapilárnej glomerulonefritíde s nefrotickým syndrómom a nálezom „malých abnormalít“, pri náhlom zlyhaní obličiek spôsobenom akútnou intrakapilárnou proliferatívnou glomerulonefritídou (3, 7).
- b) Ak $0,1 < IS < 0,3$ ide o zmiešanú glomerulovú proteinúriu napr. pri chronickej renálnej insuficiencii rôzneho pôvodu (GF v rozmedí 0,5 - 1,0 ml/s/ 1,73 m², 3. štádium), (Tab. 3).
- c) Ak $IS > 0,3$ ide o neselektívnu glomerulovú proteinúriu napr. pri chronickom zlyhaní obličiek rôzneho pôvodu (GF < 0,25 ml/s/1,73 m², 5. štádium), pri chronickej intrakapilárnej membránovej glomerulonefritíde s nefrotickým syndrómom, pri proteinúrii po náročných športových výkonoch, napr. po dlhotrvajúcich behoch (6).

Tubulárna proteinúria je podmienená zníženou resorpciou nízkomolekulových bielkovín napr. retinol-viažúcej bielkoviny, orosomukoidu, beta₂ a beta₁-mikroglobulínu. Za fyziologických podmienok sa tieto bielkoviny dostanú do glomerulového filtrátu, ale v prevažnej miere sú resorbované v tubuloch. Pri selektívnom poškodení tubulov sa tieto bielkoviny dostanú do definitívneho moču a vzniká tubulárna proteinúria, napr. pri káliopenickej nefropatii, po požití niektorých nefrotoxických liekov napr. Gentamycinu.

Zmiešaná glomerulotubulárna proteinúria sa vyskytuje v chronickej renálnej insuficiencii rôzneho pôvodu (3. a 4. štádium). V moči sú prítomné bielkoviny s rôznou molekulovou hmotnosťou.

Postrenálna proteinúria sa prejavuje zvýšeným vylučovaním IgA, IgM, alfa₂-makroglobulínu do moču pri krvácaní a zápaloch v močových cestách (1-3).

Proteinoerytrocytová disociácia sa prejavuje malou proteinúriou ($\leq 0,4$ g/24h) a mikro- až makroskopickou hematuriou. Je charakteristická pre mnohé urologické choroby (3).

O spektre všetkých vylúčených bielkovín a o ich vzájomných vzťahoch nás informuje elektrošeparčná analýza močových bielkovín - delenie bielkovín podľa ich elektrického náboja alebo podľa relatívnej molekulovej hmotnosti (2).

Na kvantitatívne vyšetrenie proteinúrie sa najčastejšie používajú: dve skupiny metód, a to turbidimetrické a fotometrické (farebná reakcia s pyrogalolovou červeňou a biuretová metóda). Pre zjednodušenie a spresnenie kvantitatívneho vyšetrenia proteinúrie sa v poslednej dobe používa pomer proteinúrie a kreatinínu v moči, najmä v rannej vzorke moču. Ak sa proteinúria vyjadruje v g/l a kreatinín v moči v mmol/l, pomer $U_{\text{prot}}/U_{\text{kr}} = 0,1$ odpovedá proteinúrii 1g/24h (8).

2. KVANTITATÍVNE VYŠETRENIE MOČOVÉHO SEDIMENTU

Ide o mikroskopické vyšetrenie formovaných elementov v močovom sedimente podľa Addisa alebo Hamburgera. Moč na Addisov sediment sa zbiera 12h a na Hamburgerov sediment 3h. Referenčné rozmedzie formovaných elementov v Addisovom sedimen je: Er: 2 mil/24h, Le: 4 mil/24h, valce: 100 000/24h a v Hamburgerovom sedimente: Er: 2000/min, Le: 4000/min, valce: 70/min. Obidve vyšetrenia môžu byť zafažené chybou, pretože pri osmolalite moču < 360 mmol/kg H₂O resp. pri mernej hmotnosti moču < 1,010, dochádza k lýze erytrocytov. Pre diferenciálnu diagnózu chorôb obličiek je dôležitá skutočnosť, ak v močovom sedimente sa zistí prevalencia erytrocytov a valcov, svedčí to pre chronickú glomerulonefritídu, ak je prevalencia leukocytov, svedčí to pre infekciu močových ciest.

Hematuriu podľa príčiny delíme na a) prerennálnu, ktorá je prítomná z extrarenálnych príčin, napr. pri hemoragických diatézach (hemofília, trombocytopenia), pri antikoagulačnej liečbe; b) renálna, ktorá vzniká pri chorobách parenchýmu obličiek; c) postrenálna vzniká pri chorobách postihujúcich extrarenálne odvodné močové cesty, napr. pri urolitiáze, po maratónskom behu (6).

Pre diferenciálnu diagnózu hematurie je dôležité morfológické vyšetrenie erytrocytov v močovom sedimente. Fairley a Birch publikovali rozlíšenie glomerulovej a neglomerulovej erytrocytúrie pomocou mikroskopu s fázovým kontrastom (9). Fázový kontrast umožňuje presné posúdenie bunečnej morfológie, pretože dochádza ku zväčšeniu fázových rozdielov a v dôsledku toho je možné posúdiť aj malé tvarové a štrukturálne odchýlky. Ak erytrocyt javí odchýlky od ideálneho tvaru, hovoríme o dysmorfných erytrocytoch (glomerulových). Erytrocyty pochádzajúce z glomerulov majú rôzne morfológické zmeny a neobsahujú Hb. Majú zmeny na membráne: nepravidelné zhrubnutia, výbežky, dvojité kontúry, pučiacie - zvané akantocyty a iné. Neglomerulové erytrocyty pochádzajúce z močových ciest a mechúra, zachovávajú si v čerstvom moči svoj pôvodný tvar s normálnym obsahom Hb, javia sa ako diskoidné telieska a majú uniformný tvar.

Existujú tri teórie na vysvetlenie zmeny tvaru erytrocytov:

- a) Mechanické poškodenie erytrocytov pri prechode cez bazálnu membránu glomerúl - erytrocyty sú prepasirované cez glomerulovú membránu. Bolo to dokázané pomocou elektronového mikroskopu.
- b) Zmeny osmotického prostredia a meniace sa pH pri prechode cez tubulárny systém nefrónov môžu viesť k rozpadu erytrocytov.
- c) Hemolýza a pôsobenie enzýmov z rozpadnutých erytrocytov môžu byť príčinou vzniku dysmorfie erytrocytov (2).

Morfológické vyšetrenie erytrocytov v močovom sedimente podľa Fasseta a spol. (1982), (10):

1. Glomerulová erytrocytúria (> 80% zmenených - dysmorfných erytrocytov), napr. chronická glomerulonefritída

2. Neglomerulová erytrocytúria (> 80 % nezmenených - izomorfných erytrocytov), napr. urologické choroby, po behoch na dlhé vzdialenosti (6)
3. Zmiešaná erytrocytúria (< 80 % zmenených a > 20 % nezmenených erytrocytov), napr. chronická glomerulonefritída so súčasne prítomnou chronickou pyelonefritídou, stav po perkutánnej biopsii obličky (11)

3. GLOMERULOVÁ FILTRÁCIA

Klírens kreatinínu sa aj v súčasnej dobe používa ako miera glomerulovej filtrácie (GF). Kreatinín je látka, ktorá sa obličkami vylučuje GF, ale čiastočne aj tubulárnou sekréciou. Tubulárna sekrécia kreatinínu sa zvyšuje v reziduálnych nefrónoch pri chronickej renálnej insuficiencii. Bezprahové látky, ktoré sa vylučujú len GF sú napr. inulín a polyfruktózan. Vyšetrenie GF pomocou klírensu inulínu a polyfruktózanu je náročné a používa sa iba z výskumných dôvodov.

$$GF = \frac{U_{kr} \cdot V}{P_{kr}} \text{ ml/s/1,73 m}^2$$

U_{kr} - kreatinín v moči

P_{kr} - kreatinín v plazme, resp. v sére

V - množstvo moču za sekundu

Referenčný rozsah GF: 1,3-1,85 ml/s/1,73 m² povrchu tela

Rýchlosť progresie chronických chorôb obličiek je možné posúdiť na základe vzťahu reciprokej hodnoty kreatinínu v plazme resp. sére, v priebehu času (mesiace resp. roky)

$$\frac{1}{P_{kr}}$$

Približné stanovenie GF pomocou kreatinínu v plazme umožňuje vzorec podľa Cockrofta a Gaulta. Tento vzorec zohľadňuje činitele, vek, telesnú hmotnosť a pohlavie, ktoré ovplyvňujú hodnotu kreatinínu v sére.

Pre mužov:

$$C_{kr}(\text{ml/s}) = \frac{(140 - \text{vek}) \times \text{telesná hmotnosť}}{49 \times P_{kr}(\mu\text{mol/l})}$$

C - klírens

Pre ženy:

$$C_{kr}(\text{ml/s}) = 0,85 \times \frac{(140 - \text{vek}) \times \text{telesná hmotnosť}}{49 \times P_{kr}(\mu\text{mol/l})}$$

Stanovenie GF na podklade koncentrácie kreatinínu v sére a veku pomocou najjednoduchšieho MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) vzorca (8,12-17):

$$GF(\text{ml/s}) = 3,1(S_{kr} \times 0,0113)^{-1,154} \times \text{vek}^{-0,203}$$

U žien: $GF \times 0,742$

V posledných rokoch vyšetrenie cystatínu C v sére bolo použité pre určenie miery GF. Cystatín C je neglykozylovaný polypeptid so 120 aminokyselinami, s molekulovou hmotnosťou 13,359 kD. Cystatín C je voľne filtrovaný cez glomerulovú membránu, kompletne je reabsorbovaný a metabolizovaný v proximálnych tubuloch. Z cirkulácie je eliminovaný takmer výlučne GF. Mierne zvýšené hodnoty cystatínu C poukázali na začínajúce zníženie GF ešte pri jeho normálnych hodnotách, vyšetrenej pomocou klírensu kreatinínu. Bol vypracovaný jednoduchý prepočet, ktorý umožňuje stanovenie GF z cystatínu C v sére (18, 19).

$$GF = 1/(\text{Cys C v sére} - 0,46)$$

Táto metóda stanovenia GF je užitočná najmä u detí a starých ľudí, u ktorých nie je možné zabezpečiť presný zber moču, alebo kde sa predpokladá chyba pri stanovení GF na základe klírensu kreatinínu (19).

Podľa „National Kidney Foundation“ na základe hodnôt GF rozdeľujeme poškodenie obličiek do 5 štádií (Tab. 1), (2,16)

Tab. 1. Poškodenie obličiek podľa glomerulovej filtrácie

1. štádium: $GF > 1,5 \text{ ml/s/1,73 m}^2$, poškodenie obličiek s GF v norme
2. štádium: $GF: 1,0-1,5 \text{ ml/s/1,73 m}^2$, poškodenie obličiek s malým znížením GF
3. štádium: $GF: 0,5-1,0 \text{ ml/s/1,73 m}^2$, poškodenie obličiek so stredne veľkým znížením GF, RI
4. štádium: $GF: 0,25-0,5 \text{ ml/s/1,73 m}^2$, poškodenie obličiek so závažným znížením GF, CHRI
5. štádium: $GF < 0,25 \text{ ml/s/1,73 m}^2$, chronické zlyhanie obličiek, CHZO

RI - renálna insuficiencia

CHRI - chronická renálna insuficiencia

CHZO - chronické zlyhanie obličiek

4. TUBULÁRNA RESORPCIA VODY (TR)

$$TR_{H_2O} = \frac{GF - V}{GF} \times 100$$

a) 1. $GF \downarrow$, 2. $TR \downarrow$
b) 1. $TR \downarrow$, 2. $GF \downarrow$

Tubulárna resorpcia vody udáva aká časť z prefiltrovaného množstva vody v glomeruloch bola resorbovaná v tu-

buloch za jednotku času. Tubulárna resorpcia v priebehu dňa má hodnotu od 98,3 do 99,5%. Variácia tubulárnej resorpcie určuje diurnálny rytmus a jeho hodnota je 1,2%. Pri chorobách postihujúcich prevažne dreň obličiek sa znižuje tubulárna resorpcia až na hodnoty okolo 75%. Pri chorobách obličiek s prevažným postihnutím glomerúl sa znižuje najprv GF a až neskôr tubulárna resorpcia (a), pri chorobách obličiek s prevažným postihnutím tubulov a interstícia sa znižuje najprv tubulárna resorpcia a až neskôr GF (b), (4).

5. VYŠETRENIE KONCENTRAČNEJ SCHOPNOSTI OBLIČIEK

A. Koncentračná schopnosť obličiek sa vyšetruje pomocou merania mernej hmotnosti alebo osmolality moču pri odňatí tekutín po dobu 24 hodín. Vyšetrenie sa začína večer a moč sa zbiera cez noc 12 h a potom v 4-hodinových intervaloch. V jednotlivých vzorkách moču sa zmeria meraná hmotnosť a osmolalita moču.

B. V súčasnej dobe sa pri vyšetrení koncentračnej schopnosti obličiek používa adiuretínový test (DDAVP test). Adiuretin-SD je syntetický analóg hormónu 1-deamino-8-D-arginín vazopresín. Adiuretin stimuluje tvorbu hypertonickeho moču. Po nočnom neprijímaní tekutín, chorý pred vyšetrením sa vymočí (kontrolná vzorka), podajú sa 2 kvapky Adiuretínu do každej nosnej dierky resp. 2 vstreky Minirinu spray (dezmopresín) a moč zbierame v štyroch jednodinových intervaloch. Vo všetkých vzorkách zmeráme osmolalitu a najvyššiu osmolalitu v moči porovnáme v závislosti od veku s referenčnými hodnotami v tabuľke 2. Koncentračnú schopnosť obličiek určíme podľa dosiahnutej maximálnej hodnoty osmolality v moči.

Referenčný rozsah osmolality v plazme je 290 ± 10 mmol/kg H_2O a v moči závislosti od príjmu tekutín 250–1200 mmol/kg H_2O .

Tab. 2. Referenčné hodnoty maximálnej mernej hmotnosti a osmolality moču pri 24 h koncentračnom teste a pri adiuretínovom teste

vek (roky)	merná hmotnosť pri 15 °C (g/cm ³)	osmolalita moču	
		24 h koncentračný test	adiuretínový test
		(mmol/kg H_2O)	
15-19	1,032	1019 ± 97	1037 ± 63
20-29	1,030	1021 ± 86	1020 ± 120
30-39	1,029	914 ± 136	1029 ± 103
40-49	1,028	977 ± 136	1026 ± 87
50-59	1,027	870 ± 150	971 ± 140
60-69	1,026	876 ± 120	857 ± 72
70-79	1,025	856 ± 102	858 ± 79

Porucha koncentračnej schopnosti obličiek je prejavom tubulointerstiálneho poškodenia. Koncentračná schopnosť obličiek je veľmi citlivá metóda, ktorá môže poukazať na patologické postihnutie obličiek v počiatočných štádiách, keď glomerulová filtrácia je ešte v medziach normy (1,4,20). Indikácia vyšetrenia koncentračnej schopnosti obličiek je posúdenie tubulárnych funkcií obličiek. Kontraindikácie vyšetrenia koncentračnej schopnosti obličiek sú akútna infekcia močových ciest, urolitiáza, dehydratácia a zlyhanie obličiek rôzneho pôvodu. Súčasne s koncentračným osmolálnym testom sa vyšetruje aj osmolálny index (U_{OSM}/P_{OSM}), ktorý sa znižuje v závislosti od stupňa poškodenia obličiek (Tab. 3), (3).

Tab. 3. Stupeň poškodenia obličiek v závislosti od maximálnej osmolality v moči a osmolálneho indexu

Stupeň poškodenia obličiek	Osmolalita v moči (mmol/kg H_2O)	Osmolálny index U_{OSM}/P_{OSM}
Zdraví	> 800	> 3
Minimálne poškodenie obličiek	600-800	> 2
Významné poškodenie obličiek	400-600	> 1,3
Zlyhanie obličiek	< 400	< 1,3

6. VYŠETRENIE ZRIEDOVACEJ SCHOPNOSTI OBLIČIEK

Pod zriedovacou schopnosťou obličiek rozumieme schopnosť obličiek vytvárať moč, ktorého osmolalita je významne nižšia ako osmolalita v sére. Tvorba hypotonického moču je umožnená tým, že distálny úsek nefrónu sa stáva takmer nepriepustný pre vodu v dôsledku inhibície výdaja antidiuretického hormónu (ADH). Vyšetrenie sa uskutočňuje za podmienok maximálnej vodnej diurézy. Chorý vypije 20–22 ml nesladeného slabého čaju za 30 min a potom zbiera moč v 30 min intervaloch po dobu 4 hodín. U zdravého jedinca klesne osmolalita moču pod 100 mmol/kg H_2O (merná hmotnosť $\leq 1,003$) a FE_{OSM} je $\leq 3,5\%$. Indikáciou vyšetrenia zriedovacej schopnosti obličiek je posúdenie tubulárnych funkcií obličiek a kontraindikáciou sú opuchové stavy a zlyhanie obličiek rôzneho pôvodu. Zriedovací test sa používa aj pri vyšetrení vylučovania rôznych látok alebo liekov do moču, či sa vylučujú za podmienok vodnej, sodíkovej diurézy alebo zmiešanej diurézy (21).

7. INÉ VYŠETRENIA

a) Frakčné exkrécie elektrolytov a iných látok vylučovaných obličkami

Intenzitu tubulárneho transportu elektrolytov alebo iných látok vylučovaných obličkami môžeme posúdiť stanovením frakčnej exkrécie (FE) danej látky. FE udáva aké % danej látky bolo vylúčené do definitívneho moču z celkového prefiltrovaného množstva (Tab. 4).

$$FE (\%) = \frac{U_x/P_x}{U_{Kr}/P_{Kr}} \times 100$$

U_x koncentrácia danej látky v moči

P_x koncentrácia danej látky v plazme

Tab. 4. Referenčné hodnoty niektorých frakčných exkrécií

FE _{H₂O}	1,0%
FE _{Na⁺}	0,4 - 1,9%
FE _{K⁺}	4,0 - 19,0%
FE _{OSM}	< 3,5%

b) Nové biomarkery pre tubulárne a glomerulové poškodenie obličiek:

ba) **Glutation S-transferázy (GSTs)** v moči sú intracelulárne biomarkery, ktoré sa nachádzajú vo vysokej koncentrácii v bunkách proximálneho a distálneho tubulu a sa uvoľňujú do moču pri renálnom tubulárnom poškodení. Izoenzýmy GSTs sú lokalizované v rôznych častiach obličiek:

- α GST – v proximálnom tubule
- π GST - v distálnom tubule

bb) **Kolagén IV** je základnou zložkou glomerulovej bazálnej membrány. Je to včasný a citlivý biomarker patologických zmien na glomerulovej membráne a je uvoľňovaný do moču pri renálnom glomerulovom poškodení napr. pri diabetickej nefropatii a pri renálnej fibróze

Glutation S-transferázy a kolagén IV v moči sa stanovujú komerčne dostupnými enzýmimunologickými metódami (22, 23).

8. SEPAROVANÉ FUNKČNÉ VYŠETRENIE OBLIČIEK

Separované funkčné vyšetrenie obličiek predpokladá vyšetrenie jednotlivých obličiek:

- Neinvazívne: rádionuklidové vyšetrenia (napr. GF s použitím ^{99m}Tc-DTPA /kyselina dietyléntriaminopentaoctová/, izotopová renografia, dynamická scintigrafia obličiek a iné) a sonografické vyšetrenie obličiek (17)
- Invazívne: získanie moču pomocou katetrizácie močového mechúra a ureterov a separované vyšetrenie napr. koncentračného indexu alebo frakčných exkrécií elektrolytov, vody a iných látok jednotlivých obličiek.

Neodeliteľnou súčasťou každého funkčného vyšetrenia obličiek je mikrobiologické kvantitatívne vyšetrenie bakteriúrie, bez ohľadu na základné ochorenie obličiek.

Kvantitatívnu bakteriúriu delíme na:

- 1) nesignifikantnú bakteriúriu < 10³ j./1 ml
- 2) signifikantnú bakteriúriu > 10⁴ j./1 ml
- 3) masívnu bakteriúriu > 10⁵ j./1 ml

Odber moču na kvantitatívnu bakteriúriu sa má uskutočniť po umytí genitálu a zacytení stredného prúdu moču do sterilnej skúmavky. Liečba nešpecifických infekcií v moči sa má uskutočňovať dlhodobe a intermitentne podľa kultivácie a citlivosti mikróbov na antibiotiká resp. chemoterapeutiká v spolupráci s urológom resp. gynekológom (1, 3, 4).

LITERATÚRA

1. **Schüick, O.:** *Nefrologie pro praktické lékaře*. 1. vydání. Praha, Scientia Medica 1993, 171 s.
2. **Schüick, O., Tesař, V., Teplan, V. a kolektív:** *Klinická nefrologie*. 1. vydání. Praha, MEDPRIT 1995, 406 s.
3. **Mydlík, M.:** Vyšetrovacie metódy v nefrológii. In: **Takáč, M. a kol.:** *Základy diagnostiky vo vnútornom lekárstve*. 2. vydanie. Martin; Osveta 1980: 465–485.
4. **Brod, J.:** *Ledviny. Fysiologie, klinická fysiologie a klinika*. 1. vydání. Praha, Státní zdravotnické nakladatelství, 1962, 1043 s.
5. **Mydlík, M., Derzsiová, K.:** *Vitamín B₁, B₂ a B₆ pri nefrotickom syndróme*. Čas Lék Čes 1990; 129: 950–951.
6. **Mydlík, M., Derzsiová, K., Bohuš, B., Macháňová, Y.:** Renal function abnormalities after marathon run, 100-kilometre long distance run and 24-hour long-term race. In: **Consolo, F., Bellinghieri, G., Savica, V.** (Edit.): *3rd Taormina course on nephrology*. Cosenca, Editoriale Bios 1995, s.33–48.
7. **Mydlík, M., Derzsiová, K., Cesnak, D., Takáč, M.:** *Selektivita glomerulárnej proteinúrie pri renálnej insuficiencii*. Čas Lék Čes 1977; 116: 694–697.
8. **Zima, T. a kolektív:** *Laboratórná diagnostika*. 1. vydání. Praha, Galén 2002, 728 s.
9. **Fairley, K. F., Birch, D.:** *Hematuria: a simple method for identifying glomerular bleeding*. Kidney Int 1982; 21: 105–108.
10. **Fasset, R. G., Horgan, B. A., Mathew, T. H.:** *Detection of glomerular bleeding by fase-contrast microscopy*. Lancet 1982; 1: 1432–1434.
11. **Mydlík, M., Derzsiová, K., Mitrová, M.:** *Morfologické vyšetrenie erytrocytov v močovom sedimente po perkutánnej biopsii obličky*. Nepublikované údaje.
12. **Schüick, O., Teplan, V., Smrčková, I., Skibová, J., Štolllová, M.:** *Sérová koncentrace kreatinínu a funkce ledvin*. (Nový pohled do staré problematiky). Vnitř. Lék. 2005; 51: 725–727.
13. **Schüick, O., Smrčková, I., Teplan, V., Stavek, P., Skibová, J., Štolllová, M.:** *Nová metóda stanovení glomerulární filtrace na podklade sérové koncentrace kreatinínu a albuminu*. Vnitř. Lék. 2004; 50: 507–509.
14. **Lamb, E. J., Stevens, P. E.:** *Challenging times in renal medicine: and oportunity for clinical biochemistry*. Ann. Clin. Biochem. 2005; 42: 318–320.
15. **Lamb, E. J., Thomson, C. R. V., Roderick, P. J.:** *Estima-*

- ting kidney function in adults using formulae.* Ann. Clin. Biochem. 2005; 42: 321–345.
- 16. National Kidney Foundation:** *Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification.* Amer. J. Kidney Dis. 2002; 39: suppl 1, S1–S266.
- 17. Viklický, O., Dusilová Sulková, S., Rychlík, I.:** *Výšetřovací metody v nefrologii a jejich klinická aplikace.* 1. vydání. Praha, Tigris 2007, 182 s.
- 18. Schüick, O., Teplan, V., Jabor, A., Štollová, M., Skibová, J.:** *Glomerular filtration rate in patients with advanced chronic renal insufficiency based on serum cystatin C levels.* Nephron Clin. Pract. 2003; 93: 141–151.
- 19. Hertlová, M., Novotná, H., Hertl, I.:** *Využití stanovení cystatinu C v interní praxi.* Vnitř. Lék. 2005; 51: 1162–1163.
- 20. Mydlík, M., Derzsiová, K., Farkaš, M., Mizla, P., Hrabčáková, P., Haffnerová, I.:** *Renal tubulointerstitial impairment in acute intermittent porphyria and variegate porphyria.* BANTAO J. 2003; 1: 198–200.
- 21. Mydlík, M., Derzsiová, K., Žemberová, E.:** *Influence of water and sodium diuresis and furosemide on urinary excretion of vitamin B₆, oxalic acid and vitamin C in chronic renal failure.* Miner Electrolyte Metab. 1999; 25: 352–356.
- 22. Branten, A. J. W., Mulder, T. P. J., Peters, W. H. M., Assmann, K. J. M., Wetzels, J. F. M.:** *Urinary excretion of glutathione S transferases alpha and pi in patients with proteinuria: reflection of the site of tubular injury.* Nephron 2000; 85: 120–126.
- 23. Kado, S., Aoki, A., Wada, S., Katayama, Y., Kugai, N., Yoshizawa, N., Nagata, N.:** *Urinary type IV collagen as a marker for early diabetic nephropathy.* Diabetes Res. Clin. Pract. 1996; 31: 103–108.

Adresa pre korešpondenciu:

Ing. Katarína Derzsiová
Nefrologická klinika LF UPJŠ a Logman a.s.
Rastislavova 43
041 90 Košice

E-mail: katarina.derzsiova@netkosice.sk

**NIEKTORÉ ASPEKTY METABOLIZMU OXIDU
DUSNATÉHO V SÚVISLOSTI S MOŽNOSŤOU
VYUŽITIA JEHO METABOLITOV AKO MARKEROV
V KLINICKEJ PRAXI**

KALNOVIČOVÁ TERÉZIA, TURČÁNI PETER

**Prvá neurologická Klinika Lekárskej Fakulty UK
a FNsP Bratislava**

SÚHRN

Oxid dusnatý (NO) je dôležitým mediátorom fyziologických a patologických procesov. Obsahuje vo svojej molekule jeden nespárený elektrón, čo spôsobuje jeho značnú reaktivitu. Ako voľný radikál má krátku životnosť. V práci diskutujeme o niektorých metabolických premenách oxidu dusnatého v súvislosti s využitím jeho metabolitov nitritov a nitrátov v klinickej praxi.

Kľúčové slová: oxid dusnatý, nitrit, nitrát, metabolizmus

SUMMARY

Nitric oxide (NO) is an important mediator of physiological and pathological processes. It contains a single unpaired electron, which causes NO to be chemically reactive, and to function as a free radical with a short lifetime. In this article we discuss some metabolic pathways of NO in association with possible utilization of nitrite and nitrate, oxidative metabolites of nitric oxide, in clinical practice.

Key words: nitric oxide, nitrite, nitrate, and metabolism

ÚVOD

Oxid dusnatý (NO) je molekula s pleiotrofnými efektmi. Je známy svojimi vazorelaxačnými vlastnosťami, jeho implikáciou v imunitných reakciách a ako neurotransmitér. NO je termodynamicky nestabilná molekula. Reakciou s inými molekulami spôsobuje oxidáciu, nitrozyláciu, alebo nitráciu proteínov so sprievodnými účinkami na mnohé bunkové mechanizmy. Oxid dusnatý je zahrnutý v intracelulárnej signalizácii aktiváciou guanylátcyklázy, v interakciu s MAP kinázami, proteínmi apoptózy, molekulami mitochondriálneho reťazca alebo anti-proliferáčnými molekulami. Má úlohu aj v post-translačnej modifikácii proteínov. Za patologických podmienok NO má škodlivé účinky. Pri ochoreniach spojených s oxidačným stresom zvyšuje bunkové poškodenie tvorbou vysokoreaktívneho peroxynitritového aniónu (ONOO⁻) (7,19). V prezentovanej práci diskutujeme o niektorých aspektoch metabolizmu oxidu dusnatého a využití jeho oxidačných produktov v klinickej praxi.

SYNTÉZA OXIDU DUSNATÉHO

NO je plynná molekula, ktorá je syntetizovaná syntázou oxidu dusnatého (EC 1.14.13.3). Existujú 4 izoformy syntázy oxidu dusnatého (NOS): neuronálna (nNOS), endotelová (eNOS), induktabilná (iNOS) a mitochondriálna (mNOS). mNOS je izoformou neuronálnej NOS. Nachádza sa vo vnútornej mitochondriálnej membráne, kde reguluje spotrebu kyslíka inhibíciou cytochróm c oxidázy (3). eNOS a nNOS sú konštitučné, Ca²⁺-kalmodulín-dependentné enzýmy a poskytujú inkrementy NO krátkeho trvania (niekoľko minút), kým iNOS nezávisí na kalciových iónoch a exprimuje sa po imunologickej a zápalovej stimulácii v makrofágoch, astrocytoch, mikrogliaách a v iných bunkách s dlhodobou produkciou veľkého množstva NO pretrvávajúcou hodiny až dni. Pre účinnosť NOS je potrebná spolupráca niektorých ďalších faktorov a koenzýmov: reduktáz NADPH, FAD a FMN, hem-oxygenázy a tetrahydrobiopterín (7). NO sa syntetizuje pôsobením NOS z L-arginínu prenosom elektrónov z NADPH cez flavíny FAD a FMN na hem, kde sa L-arginín oxiduje cez N^G-hydroxy-L-arginín na L-citrulín a NO. Citrulín sa môže regenerovať na arginín cez arginínsukcinát. NOS môže katalyzovať aj produkciu superoxidového aniónu v závislosti od dostupnosti substrátov a kofaktorov (1).

Hoci hlavným zdrojom NO je aktivita NOS, v niektorých špeciálnych situáciách sa môže táto molekula syntetizovať aj inými mechanizmami. NO sa môže tvoriť pôsobením xantinoxidázy (XO), alebo z hydrogénperoxidu a L-arginínu neenzýmovou cestou a redukciou nitritov v kyslom a redukčnom prostredí, ktoré sa vyskytuje napr. pri ischemii (7).

CHEMICKÉ PREMENY OXIDU DUSNATÉHO

Biologický polčas oxidu dusnatého je 5 sekúnd, alebo menej. NO má v čistom vodnom roztoku (0,01–1 μmol/L) polčas života oveľa dlhší, 500 sekúnd a viac. Krátky biologický polčas NO v biologickom systéme sa pripisuje reakcii oxidu dusnatého s kyslíkom, oxyhemoproteínmi, superoxidovým radikálom a inými kyslíkovými radikálmi. NO v bunkách a v tkanivách podlieha rýchlej oxidácii na pomerne stabilné oxidačné produkty nitrit (NO₂⁻) a nitrát (NO₃⁻), ktoré sa v klinickej praxi využívajú na posúdenie produkcie NO za rôznych patologických stavoch. Významným oxidačným produktom NO z hľadiska patogenézy mnohých ochorení je peroxynitritový anión, ktorý vzniká reakciou NO so superoxidovým radikálom (8).

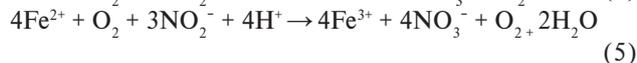
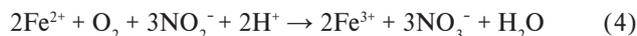
1. Oxidácia NO vo vodných roztokoch.

NO vo vodnom roztoku, ktorý obsahuje kyslík neposkytuje významné množstvo nitrátov (NO₃⁻). Oxid dusnatý sa vo vodnom roztoku oxiduje hlavne na nitrit (NO₂⁻) podľa reakcií 1–3 (8).



2. Oxidácia NO oxyhemoglobínom a oxymyoglobínom.

V krvi, alebo v tkanivách sa oxid dusnatý (NO) a nitrit (NO_2^-) pôsobením oxyhemoglobínu, resp. oxymyoglobínu oxidujú na nitrát (NO_3^-). Rýchlosť premeny NO a nitritu na nitrát je podobná. Reakciu medzi oxidom dusíka a oxyhemoglobínom, alebo oxymyoglobínom znázorňujú stochiometrické reakcie 4 a 5 (8):



3. Degradácia a transport NO hemoglobínom.

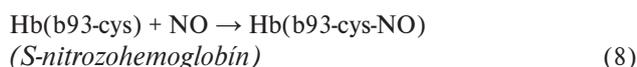
Hlavnú fyziologickú metabolickú cestu eliminácie NO predstavuje jeho vychytávanie erytrocytmi. (17). NO veľmi rýchlo preniká cez membránu ciev do lúmenu difúziou, kde reaguje s hemoglobínom (Hb-Fe(II)O_2) za tvorby nitrátov a methemoglobínu (HbFe(III)).



Ďalšou cestou odstraňovania NO z plazmy je jeho oxidácia na nitrit, ktorý sa v reakcii s hemoglobínom mení na nitrát. Oxid dusnatý sa môže tiež viazať na hemoproteíny (deoxyhemoglobín) a tvoriť so železom hémovej skupiny nitrozylové komplexy. Erytrocyty týmto spôsobom (S-nitrozáciou a trans-nitrozáciou) transportujú NO a uvoľňujú ho v iných tkanivách (12).



Iným možným mechanizmom eliminácie NO a jeho uskladňovania je tvorba S-nitrozo-hemoglobínu a S-nitrozo-L-glutathionu (GSNO) cez nitrozyláciu redukovaného glutathionu (GSH). Z GSNO sa oxid dusnatý môže uvoľňovať niekoľkými enzýmami, napr. GSH-peroxidázou, tioredoxín - reduktázou a gama-glutamyl transpeptidázou.



V situácii vysokej produkcie NO sa môže oxid dusnatý eliminovať reakciou s bikarbonátom za tvorby ONOOCO_2 (7).

4. Katabolizmus NO superoxidovým aniónom a tvorba peroxynitritového aniónu

In vivo je katabolizmus NO determinovaný hlavne jeho reakciou s oxyhemoglobínom a superoxidovým aniónom. Za fyziologických podmienok je reakcia NO so superoxidovým aniónom limitovaná rýchlosťou difúzie. Táto reakcia tvorby peroxynitritu (ONOO^-) je oveľa rýchlejšia (viac ako 3-krát) ako odstraňovanie superoxidu superoxid-dizmutázou (SOD). Za fyziologických podmienok sa NO tvorí v nízkych koncentráciách (piko - až nanomolárnych). ONOO^- sa tvorí optimálne pri ekvimolárnych koncentráciách NO a superoxidu, a preto nie je pravdepodobné, aby za fyziologických

podmienok peroxynitrit dosiahol vysokú koncentráciu. Nízke koncentrácie peroxynitritu sa správajú podobne ako oxid dusnatý. Môžu spôsobovať vazorelaxáciu, znižovať agregáciu doštičiek, redukovať adhéziu leukocytov na cievnu stenu, vyvolávať cytoprotektívne efekty a pôsobiť ako donor NO. Vyššie koncentrácie peroxynitritu sú však cytotoxické, môžu viesť k OH radikálovej toxicite a k fragmentácii proteínov nitráciou aminokyselín. K takejto situácii dochádza napr. pri ateroskleróze, kedy eNOS produkuje menej NO a viac superoxidu. Za týchto podmienok sa produkujú zvýšené množstvá superoxidového radikálu aj xantinoxidázou a NAD(P)H oxidázami. Zvýšený prísun superoxidového aniónu je aj z leukocytárných myeloperoxidáz a lipooxygenáz. Táto patologická situácia je sprevádzaná aj indukciou iNOS a sprievodným zvýšením syntézy NO a uvoľňovaním superoxidu. Za markér zvýšenej tvorby peroxynitritu a peroxynitritom sprostredkovanej modifikácie proteínov sa považuje nitrotyrozín (26).

Nitračné reakcie ovplyvňujú rôzne mechanizmy: a) alterujú fosforylácie tyrozín- dependentnej signalizácie. Nitrotyrozín sa podobá fosfotyrozínu a môže ireverzibilne blokovať fosforyláciu tyrozínu, b) modifikujú konformácie proteínov a zvýšenie proteolýzy zavedením negatívneho náboja v hydrofóbnom tyrozíne, c) iniciujú autoimunitné procesy, pretože nitrofenoly sú vysoko antigénne (20).

V CNS sa peroxynitrit môže tvoriť mikroglialnými bunkami aktivovanými proinflamačnými cytokínmi, alebo beta-amyloidom a neurónmi v troch odlišných situáciách - pri hyperaktivite glutamátovej neurotransmisie, dysfunkcii mitochondrií a deplécii tetrahydrobiopterínu a L-arginínu. Prvé dve situácie sa týkajú bunkovej odpovede na neuronálne poškodenie a vytvorený peroxynitrit len zvyšuje zápalový proces, kým v tretej situácii vytvorený peroxynitrit priamo prispieva k iniciácii neurodegeneratívnych procesov (20).

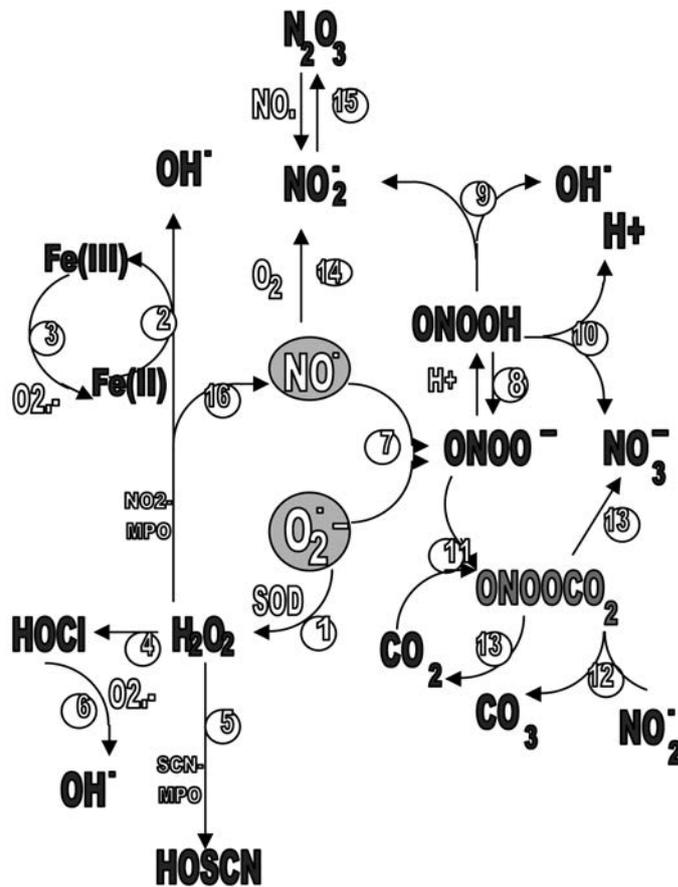
Tvorba peroxynitritu a jeho chemická reaktivita je znázornená na obr. 1. NO reaguje so superoxidovým radikálom za vzniku peroxynitritu dostatočne rýchlo, aby sa mohol vyhnúť účinku antioxidantných systémov. Afinita superoxidového radikálu je vyššia ku NO ako ku SOD a limitujúcim faktorom tejto reakcie je len množstvo NO a jej difúzny koeficient. Vznikajúci peroxynitrit má za fyziologických podmienok polčas života asi 1-2 s a jeho akčný rádius je 100 um. Degraduje sa na mnohé toxické produkty (obr.1), alebo sa vychytáva reakciou s bikarbonátom za vzniku nitrozo-peroxykarbonátu (ONOOCO_2) (26).

5. Redukcia nitritu na NO in vivo

V r. 1994 dve nezávislé pracovné skupiny podali dôkaz (10), že NO sa môže in vivo tvoriť aj z nitritu. Existuje niekoľko alternatívnych ciest pre tvorbu NO:

a) Kyslá redukcia. V kyslom prostredí tvorí nitrit kyselinu dusitú, ktorá sa spontánne rozkladá na NO a oxidy dusíka. Množstvo vytvoreného NO závisí od pH, koncentrácie nitritu a od prítomnosti redukčných látok (vitamín C, tiokyanáty), blízkosti hémovej skupiny proteínov, tiolov a od tenzie kyslíka.





Obr. 1. Tvorba voľných radikálov a reaktívnych molekúl zo superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$) a oxidu dusíka (NO).

1) Enzým superoxiddizmutáza (SOD) katalyzuje premenu superoxidového aniónu ($O_2^{\cdot-}$) na hydrogénperoxid (H_2O_2), čím znižuje jeho toxicitu, 2) Tvorba vysoko reaktívneho hydroxylového radikálu (OH^{\cdot}) z hydrogénperoxidu Fentonovou reakciou, katalyzovanou s Fe^{2+} (Cu^+), 3) Recyklizácia Fe^{3+} na Fe^{2+} superoxidovým radikálom ($O_2^{\cdot-}$) alebo askorbátom. 4) V prítomnosti chloridov alebo tiokyanátov (SCN^-) a myeloperoxidázy (MPO) hydrogénperoxid (H_2O_2) tvorí kyselinu chlórnu (HClO), 5) alebo HOSCN. 6) HClO je silné oxidačné a chloračné činidlo, ktoré v reakcii so superoxidom alebo Fe^{2+} tvorí OH radikál. V niektorých biologických tekutinách (napr. sliny) vysoké koncentrácie tiokyanátu (SCN^-) môžu súťažiť s chloridovými iónmi a pôsobením MPO tvoriť HOSCN. 7) Reakciou superoxidu ($O_2^{\cdot-}$) s NO vzniká peroxynitritový anión ($ONOO^-$). 8) $ONOO^-$ je v rovnováhe s jeho protonizovanou formou ($ONOOH$, $pK_a = 6,8$). Nedisociovaná forma $ONOOH$ tvorí asi 20% celkového peroxynitritu s polčasom života 1–3 s ($37^\circ C$, $pH = 7,4$). 9) $ONOOH$ sa rozkladá na OH radikál a nitrogéndioxid (NO_2^{\cdot}) (asi 30%). 10) Z $ONOOH$ vzniká asi 70% nitrátu (NO_3^-). Medzi $ONOOH$ a $ONOO^-$ sa veľmi rýchlo ustaluje rovnováha a celkový výsledok tvorby OH^{\cdot}/NO_2^{\cdot} závisí od ďalších metabolických ciest, hlavne od reakcie s HCO_3^-/CO_2 . 11) Reakcia $ONOO^-$ s CO_2 je rýchla a súťaží s homolytickými reakciami 9 a 10. 12) Intermediát $ONOOCO_2$, ktorý sa tvorí pri reakcii $ONOO^-$ s CO_2 sa rozkladá na nitrogéndioxid (NO_2^{\cdot}) a $CO_3^{\cdot-}$. 13) a nitrát (NO_3^-) a CO_2 s rýchlosťou < 14 v pomere 1:2 ($NO_2^{\cdot}/CO_3^{\cdot-}$; NO_3^-/CO_2). 14) Reakcia NO s kyslíkom za tvorby NO_2^{\cdot} je zložitejšia a polčas života produktu reakcie (NO_2^{\cdot}) v cytoplazme je len niekoľko mikrosekúnd. 15) Táto reakcia in vivo je len veľmi málo pravdepodobná a môže sa vyskytovať len za extrémne patologických podmienok. 16) Tvorba NO_2^{\cdot} z nitritu a hydrogénperoxidu je katalyzovaná peroxidázami, ako je napr. myeloperoxidáza (MPO), alebo laktoperoxidáza (Wardman, 2007).

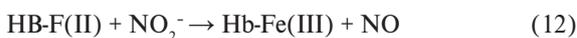
Tento typ redukcie nitritu je kvantitatívne najvýznamnejší v žalúdku, kde extrémne nízke pH v kombinácii s veľmi vysokou hladinou nitritov (0,1 až 1 mmol/l zo slín) má za následok asi o 4 poriadky vyššie hladiny NO (cca 4 $\mu mol/l$), ako sa vyžaduje pre vazodilatáciu. Tieto extrémne vysoké hladiny NO (a iných oxidov dusíka, ktoré sa tvoria z acidifikovaného nitritu) pomáhajú zabíť luminálne baktérie a difúziou cez mukóznú vrstvu zvyšovať množstvo mukózy a prietok

krvi touto časťou žalúdka. Kyslo katalyzovaná redukcia nitritov sa vyskytuje in vivo v cievach a tkanivách pri mierne kyslom pH, aj pri fyziologickej koncentrácii nitritov (10).

b) Redukcia nitritov xantinoxidázou. Xantinoxidáza (XO) je enzým, ktorý je zahrnutý v mnohých fyziologických a patofyziologických procesoch. Má kľúčovú úlohu v katabolizme purínov a pyrimidínov, ale tiež v redukcii kyslíka na superoxid a hydrogénperoxid,

čím prispieva k oxidačnému poškodeniu buniek. Expresia a aktivita XO je indukovaná hypoxiou a proinflamačnými cytokínmi. XO redukuje nitrit na NO a štruktúrne sa podobá bakteriálnej nitrát- a nitritreduktáze. Táto redukcia je významne zvýšená pri nízkej tenzii kyslíka a v kyslom prostredí, za podmienok, ktoré sa vyskytujú pri ischémii. O škodlivosti, alebo protektivitve enzýmových dráh katalyzovaných enzýmami XO a NOS do určitej miery rozhoduje stupeň zásobovania substrátmi a kyslíkom. Enzým NOS pre tvorbu NO z L-arginínu vyžaduje kyslík. V prípade dostatočného zásobovania L-arginínom a kyslíkom tvorí NOS oxid dusnatý, ale pri nedostatku substrátov (L-arginínu a kofaktorov) ten istý enzým syntetizuje značné množstvo superoxidových radikálov. Naopak superoxidové radikály tvorí xantinoxidáza počas reperfúzie a XO - katalyzovaná redukcia nitritu na NO je významne zvýšená pri hypoxii. Škodlivé účinky týchto dvoch enzýmových systémov sa prejavia vtedy, keď NO a superoxid sa tvoria súčasne a reagujú spolu za tvorby toxického peroxynitritového aniónu (10) (Obr 1.).

c) Redukcia nitritu deoxyhemoglobínom. Je známym faktom, že erytrocyty aktívne vychytávajú NO. Oxygenovaný hemoglobín (Hb) po reakcii s NO tvorí nitrát a methemoglobín (met-Hb). Touto reakciou sa eliminuje biologická aktivita NO. Nitrit a nitrát sa považovali za inertné koncové degradačné produkty NO. Nedávne výskumy (5,6) však poukázali, že nitrit sa môže späť recyklovať na bioaktívny NO v oblastiach so slabou oxygenáciou, kde prevláda deoxy-Hb (HB-F(II)). Po reakcii s deoxy-Hb sa uvoľňuje NO a z deoxy-Hb vzniká met-Hb (Hb-Fe(III)).



Ukazuje sa, že nitrit je ideálnou zásobnou rezervou NO. V krvi je prítomný v koncentráciách 0,1 až 0,5 $\mu\text{mol/l}$ a je oveľa stabilnejší ako NO. Pri dostatočnom zásobovaní kyslíkom hlavným reakčným produktom deaktivácie NO je met-Hb a nitrát (reakcia 6), kým pri poklese hladiny kyslíka sa uprednostňuje reakcia redukcie nitritu deoxyhemoglobínom, pri ktorej sa uvoľňuje NO (10), (reakcia 12).

METÓDY STANOVENIA KONCENTRÁCIE NITRITOV A NITRÁTOV

Na stanovenie oxidačných produktov oxidu dusnatého (NO), nitritov a nitrátov, sa používajú metódy kolorimetrické, kinetické so spektrofotometrickou detekciou, fluorometrické a chemiluminiscenčné metódy, kapilárna elektroforéza, plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS) a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) s konduktometrickou, elektrochemickou a UV detekciou (5).

Pri analýze hladín nitritov a nitrátov v biologických tekutinách sa najčastejšie používa Griessová reakcia, ktorá je

založená na reakcii nitritov s kyselinou sulfanilovou v kyslom prostredí. Produkt reakcie je ďalej podrobený reakcii s amino-1-naftylamínom za vzniku červeno-fialovej zlúčeniny, ktorú možno detekovať pri 540 nm. Griessová reakcia je špecifická pre stanovenie nitritov. Pri analýze nitrátov sa vyžaduje ich chemická (kovmi Cd, Cu, VO_3/VO_4), alebo enzýmová (nitrátreduktázou) redukcia na nitrity.

V súčasnosti sa už klasická Griessová reakcia (6) nepoužíva. Používajú sa jej rôzne modifikácie. Kyselinu sulfanilovú nahradil sulfanylamid a miesto druhej Griessovej reagentie amino-1-naftylamínu sa používa N-1(1-naftyl)etyléndiamín, alebo N,N-dimetyl-1-naftylamín, resp. 2,3-diaminonafalén. Na detekciu vzniknutého farbiva sa najčastejšie používa spektrofotometria a spektrofluorometria (21).

VPLYV DIÉTY NA HLADINY NITRITOV A NITRÁTOV V TELESNÝCH TEKUTINÁCH

Nitrity a nitráty (NO_x) sa pridávajú do potravinových výrobkov ako konzervačné látky a látky vylepšujúcu chuť výrobku. Sú tiež prirodzenou zložkou potravy. Na nitráty je bohatá zelenina, hlavne červená repa, zeler, hlávkový šalát a špenát. Vysoký obsah nitritov majú konzervované jedlá. Obsah nitritov v potrave zvyšuje jeho nevhodné skladovanie a bakteriálna kontaminácia. NO_x prijímané v potrave sa absorbujú v proximálnej časti tenkého čreva. Asi 25% nitrátov z potravy sa v ústach aktívne vylučuje do slín, kde sa orálnymi baktériami menia na nitrit a žalúdočnou kyselinou na NO. NO_x sa vylučujú obličkami do moču. Klírens nitrátu z krvi do moču je asi 20 ml/min (5). Variabilita NO_x v diéte významne prispieva k variabilite hladín nitrátu v plazme a k jeho vylučovaniu močom. Vysoký príjem nitrátov v potrave môže zvýšiť hladiny plazmatického nitrátu z 30 $\mu\text{mol/L}$ na 200 $\mu\text{mol/L}$ (9). Pri analýze NO_x vylučovaných močom niektorí autori odporúčajú na redukciiu týchto variabilit robiť niekoľko časovo rozdielných odberov moču, alebo obmedziť príjem NO_x v potrave 48 hodín pred odberom analyzovaného materiálu, resp. 15 hodinové hladovanie (16). Podľa Westfelta a spol. a Viinikka (24, 22) diéta s nízkym obsahom NO_x by nemala obsahovať alkoholické nápoje, kaviár, konzervované lahôdky, syry, rastliny, kyslé ryby, zeleninu, melón, čierny čaj a nápoje vyrobené zo sladú. Táto diéta by sa mala dodržiavať dva dni pred odberom biologického materiálu. Príspevok liekov, ktoré obsahujú nitráty je zanedbateľný oproti príspevku NO_x z potravy (5).

DISKUSIA A ZÁVER

Determinovať tvorbu oxidu dusnatého (NO) priamym meraním in vivo je problematické v dôsledku krátkeho biologického polčasu NO, ktorý v biologických tekutinách je limitovaný na niekoľko sekúnd. Ako index produkcie NO sa preto využíva meranie jeho oxidačných produktov nitritu a nitrátu. Z metabolismu oxidu dusnatého je zrejme, že hlavným oxidačným produktom NO v krvi je nitrát, pretože pôsobením oxyhemoglobínu nitrit podlieha rýchlej oxidač-

nej premene (reakcie 4,5). V experimente, v ktorom sa ku krvi pridal roztok nitritu sa pri laboratórnej teplote po 30 minútach z pôvodne pridaného množstva nitritu vyskytovalo v krvi len 16 %, a po 60 minútach menej ako 5 %, kým pri teplote 4 °C 69 %, resp. 55%. Hladiny nitritu a nitrátu v plazme pripravenej s absenciou hemolýzy sú stabilné pri -20 °C aspoň 1 rok (11).

Z hľadiska merania a správnej interpretácie nameraných hladín NO_x treba vždy zvažovať výskyt možných interferujúcich vplyvov, ktoré môžu viesť k falošným výsledkom. V tomto smere je veľmi dôležité vylúčiť všetky známe exogénne vplyvy už pred odberom materiálu, resp. pred analýzou skúmaného biologického materiálu. Napr. pri analýze moču je dôležitá jeho konzervácia, pretože mikrobiálna kontaminácia a kyslé pH poskytujú arteficiálne výsledky. Nitrit je v moči produkovaný hlavne bakteriálnou nitrátreduktázou. Zvýšené hladiny nitritu v moči môžu byť preto ukazovateľmi infekcií močového traktu (5).

Pri analýze hladín NO_x treba počítať s možným príspevkom zvýšenia hladín nitritov a nitrátov v krvi a v moči aj v dôsledku ich príjmu potravou a v malej miere aj z medicíny (5). Okrem liekov obsahujúcich nitrát, zdrojom NO môže byť aj napr. hydroxymočovina, z ktorej sa NO uvoľňuje po reakcii s oxyhemoglobínom. Terapeutické dávky hydroxymočoviny zvyšujú plazmatické koncentrácie NO mechanizmom, ktorý nevyžaduje aktivitu NOS erytrocytov (13).

Existujú aj metodické kontaminácie v hladinách NO_x, ako je napr. príspevok NO_x z používaného skla (napr. "viaľek" pri HPLC), z ultrafiltračných filtrov, kontaminácia nitritmi zo skúmaviek na odber krvi, obsahujúcich citrátové, alebo EDTA antikogulancie a pod. (5).

Príkladom patologickej kontaminácie biologickej tekutiny krvou a následného zvýšenia hladín NO_x je subarachnoidálne krvácanie (SAH). V prvý deň SAH sa v likvore objavujú zvýšené hladiny NO_x (22,6 ± 2,2 μmol/l vs. 6,3 ± 2,2 μmol/l) ako dôsledok príspevku inaktívnych metabolitov pochádzajúcich z vaskulárneho kompartmentu, ktoré sa počas hemoragie dostávajú do subarachnoidálneho priestoru. Neskoršie pretrvávajúce zvýšenie likvorových hladín NO_x (10,0 ± 0,9 μmol/L, 10.deň) je už dôsledkom aktívnej produkcie NO vplyvom produktov hemolýzy, ktoré sú mediátormi zápalových procesov a inductormi iNOS vo vaskulárnych bunkách hladkých svalov (15).

Pri meraní hladín NO_x treba mať na zreteli aj možnosť existencie určitej cirkadiálnej variácie. Elherik a spol. (4) merali plazmatické hladiny NO_x každé 4 hodiny počas 24 hodín a zistili výskyt vyšších hladín NO_x o 20.00 hod (15,53 ± 8,42 μmol/l) a nízkych hladín o 4.00 hod ráno (10,87 ± 4,7 μmol/L) a o 8.00 hod (9,82 ± 3,15 μmol/L). Autori predpokladajú, že cirkadiálna variácia aktivity endotelu cez vzájomnú súhru endotelínu-1, NO a vaskulárnej funkcie môže mať dôležitú úlohu v časovom výskyte kardiovaskulárnych príhod (4).

Pri patologických stavoch ako je napr. infekcia, alebo zápal je silne indukovaná aktivita iNOS, čo sa odráža vo významne zvýšených hladinách NO_x v biologických tekutinách. Enzymová aktivita iNOS plne indukovaného makrofágu je asi 1000-krát vyššia ako v bunkách endotelu (2). NO

difunduje do cieľových buniek, kde sa viaže s Fe-S centrom enzýmov potrebných na dýchanie mitochondrií a blokuje syntézu DNA v bunkovom jadre. Tým pôsobí cytostaticky a cytotoxicky. NO má v imunite zložitú úlohu. NO uvoľňujú aj lymfocyty a ich aktivácia je znižovaná mechanizmami asociovanými s NO. K negatívnym účinkom NO patria reakcie s kyslíkovými radikálmi (obr.1).

Nedávne dôkazy (14) indikujú, že väčšina cytotoxicity pripisovaná oxidu dusnatému je skôr spôsobená peroxynitritom, ktorý vzniká v reakcii NO so superoxidovým aniónom (obr. 1). Peroxynitrit reaguje s lipidmi, DNA a proteínmi priamymi oxidačnými reakciami, alebo nepriamo cez mechanizmy sprostredkované radikálmi. V závislosti od intenzity týchto reakcií sa spúšťajú jemné modulácie bunkovej signalizácie až po oxidačné poškodenie, ktoré vedie k nekróze, alebo apoptóze buniek. Tvorba peroxynitritu in vivo je kľúčovým patogénnym mechanizmom pri ochoreniach ako je napr. stroke, infarkt myokardu, chronické zlyhanie srdca, diabetes, cirkulačný šok, rakovina, chronické zápalové a neurodegeneratívne choroby. Peroxynitrit je účinným oxidantom cysteínu a glutationu, významných zložiek antioxidantného systému. Iniciuje lipoperoxidáciu, inhibuje aktivitu mitochondriálnych enzýmov respiračného reťazca, inaktivuje glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu, inhibuje aktivitu membránovej Na⁺/K⁺ ATP-ázy, inaktivuje membránové sodíkové kanály a oxidačne modifikuje mnohé dôležité proteíny. Za marker zvýšenej tvorby peroxynitritu a peroxynitritom sprostredkovanej modifikácie proteínov sa považuje nitrotyrozín (19). Najnovšie štúdie poukazujú, že nové farmakologické stratégie zamerané na odstránenie peroxynitritu môžu v budúcnosti predstavovať silný terapeutický efekt.

Oxidačné produkty oxidu dusnatého, nitrit a nitrát, spolu s markermi zvýšenej tvorby peroxynitritu majú široké uplatnenie v experimente a klinickom hodnotení mnohých infekčných, zápalových, neurodegeneratívnych a iných ochorení a v monitorovaní účinnosti terapeutických intervencií.

LITERATÚRA

1. Andrew, P. J., Mayer, B.: *Enzymatic function of nitric oxide synthases*. Cardiovasc. Res. 1999; 43(3): 521-531.
2. Anggard, E.: *Nitric oxide – mediator, murderer, and medicine*. Lancet 1994; 343:1199-1206.
3. Elfering, S. L., Sarkela, T. K., Giulivi, C.: *Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase*. J. Biol. Chem. 2002; 277: 38079-38086.
4. Elherik, K., Khan, F., McLaren, M., Kennedy, G., Belch, J. J. F.: *Circadian variation in vascular tone and endothelial cell function in normal males*. Clin. Sci. 2002; 102: 547-552.
5. Ellis, G., Adatia, I., Yazdanpanah, M., Makela, S. K.: *Nitrite and nitrate analyses: A clinical biochemistry perspective*. Clin. Biochem. 1998; 31(4): 195-220.
6. Griess, P.: *Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt: „Ueber einige Azoverbindungen“*. Ber Dtsch. Chem. Ges. 1879; 12: 426.

7. Guix, F.X., Uribesaigo, I., Coma, M., Muñoz, F.J.: *The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain*. Progress in Neurobiology 2005; 76(2): 126–152.
8. Ignarro, L.J., Fukuto, J.M., Griscavage, J.M., Rogers, N.E., Byrns, R.E.: *Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90: 8103–8107.
9. Jungersten, L., Edlund, A., Petersson, A.S., Wennmalm, A.: *Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in man: analyses of kinetics and cofounding factors*. Clin. Physiol. 1996; 16:369–379.
10. Lundberg, J.O., Weitzberg, E.: *NO generation from nitrite and its role in vascular control*. Arterioscler Thromb Vasc. Biol. 2005; 25(5): 915–22.
11. Moshage, H., Kok, B., Huitenga, J.R., Jansen, P.L.: *Nitrite and nitrate determination in plasma: a critical evaluation*. Clin. Chem. 1995; 41: 892–896.
12. Muller, B., Kleschyov, A.L., Alencar, J.L., Vanin, A., Stoclet, J.C.: *Nitric oxide transport and storage in the cardiovascular system*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002; 962:131–139.
13. Nahavandi, M., Tavakkoli, F., Millis, R.M., Wyche, M.Q., Habib, M.J., Tavakoli, N.: *Effects of hydroxyurea and L-arginine on the production of nitric oxide metabolites in cultures of normal and sickle erythrocytes*. Hematology 2006; 11(4): 291–295.
14. Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L.: *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiol. Rev. 2007; 87: 315–424.
15. Rejdak, K., Petzold, A., Sharpe, M.A., Kay, A.D., Kerr, M., Keir, G., Thompson, E.J., Giovannoni, G.: *Cerebrospinal fluid nitrite/nitrate correlated with oxyhemoglobin and outcome in patients with subarachnoid hemorrhage*. J. Neur. Sci. 2004; 219(1–2): 71–76.
16. Rhodes, P., Leone, A.M., Francis, P.L., Struthers, A.S., Moncada, S., Rhodes, P.M.: *The L-arginine: nitric oxide pathway in the major source of plasma nitrite in fasted humans*. Biochem. Biophys. Res Commun. 1995; 209: 590–95.
17. Seregelyes, C., Igamberdiev, A.U., Maassen, A., Hennig, J., Dudits, D., Hill, R.D.: *NO-degradation by alfalfa class 1 hemoglobin (Mhb1): a possible link to PR-1a gene expression in Mhb1-overproducing tobacco plants*. FEBS Lett. 2004; 571:61–66.
18. Smith, K.J., Lassmann, H.: *The role of nitric oxide in multiple sclerosis*. Lancet Neurol 2002; 1(4): 232–241.
19. Szabó, C.: *Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity*. Toxicol Lett 2003; 140–141: 105–112.
20. Torreilles, F., Salman-Tabcheh, S., Guerin, M., Torreilles, J.: *Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite*. Brain Res. Rev. 1999; 30(2): 156–163.
21. Tsikas, D.: *Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine /nitric oxide area of research*. J. Chromatogr. B 2007; 851(1–2): 51–70.
22. Viinika, L.: *Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1996; 56: 577–581.
23. Wardman, P.: *Fluorescent and luminiscent proces for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues, Progress, pitfalls, and prospects*. Free Radical Biol. Med. 2007; 43(7): 995–1022.
24. Westfelt, U.N., Benthin, G., Lundin, S., Stenqvist, O., Wennhalm, A.: *Conversion of inhaled nitric oxide to nitrate in man*. Br. J. Pharmacol. 1995; 114:1921–1624.
25. Wever, R.M.F., Luscher, T.F., Cosentino, F., Rabelink, T.J.: *Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase*. Circulation 1998; 97: 108–112.
26. Whiteman, M., Ketsawatsakul, U., Halliwell, B.: *A re-assessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002; 962: 242–259.

Adresa pre korešpodenciu:

Prof. MUDr. Peter Turčáni, PhD.
 1. neurologická klinika LF UK a FN sP
 Mickiewiczova 13
 813 64 BRATISLAVA
 e-mail: peter.turcani@faneba.sk

Spektrofotometrická analýza cerebrospinálneho likvoru po subarachnoidálnom krvácaní. Niektoré metodologické a klinické implikácie

ONDRKALOVÁ MARTA,
KALNOVIČOVÁ TERÉZIA, TURČÁNI PETER

Prvá Neurologická Klinika Lekárskej Fakulty UK a FNsP,
Bratislava

SÚHRN

V diagnostike subarachnoidálneho krvácania (SAH) sa z laboratórnych techník používa nektrastné CT vyšetrenie mozgu. V prípade negatívneho CT vyšetrenia sa pri suspektom SAH realizuje lumbálna punkcia a likvor sa vyšetruje na prítomnosť erytrocytov a xantochrómiu. Pre správnu interpretáciu tohto diagnostického testu je dôležité poznať vplyvy, ktoré môžu ovplyvniť výsledky buď falošne pozitívnym, alebo falošne negatívnym smerom. V predloženej práci upozorňuje na niektoré dôležité metodologické a klinické implikácie.

Kľúčové slová: spektrofotometria, cerebrospinálny likvor, subarachnoidálne krvácanie, SAH, xantochrómia, oxyhemoglobín, bilirubín, methemoglobín

SUMMARY

Diagnosis of subarachnoid hemorrhage (SAH) is usually established by computed tomographic (CT) scanning of the brain. However, when the CT results are negative for suspected SAH, lumbar puncture to examine the cerebrospinal fluid for erythrocytes and xanthochromia is necessary. To properly interpret the results of this diagnostic test it is important to know what test is being used and what the performance characteristic of that test are. To minimize the frequency of false positive and false negative results we inform about some important methodological and clinical aspects.

Key words: spectrophotometry, cerebrospinal fluid, subarachnoid hemorrhage, SAH, xanthochromia, oxyhemoglobin, bilirubin and methemoglobin

ÚVOD

Medzi časté indikácie pre spektrofotometrickú analýzu cerebrospinálneho likvoru (CSF) je podozrenie na krvácanie do likvorových ciest. Väčšina krvácaní je podmienená ruptúrou intrakraniálnej vakovitej aneurizmy s následným subarachnoidálnym krvácaním (SAH). Príčinou krvácania môže byť aj ruptúra dilatovanej vény, resp. venózne mal-

formácie v prepontínnej alebo interpendikulárnej cisterne. U onkologických pacientoch a interných pacientoch krvácanie do likvorových ciest sa objavuje pri zakrvácaní do vnútrolebečných nádorov alebo metastáz. Relatívne často sa spektrofotometria likvoru indikuje pri hematologických ochoreniach, u ktorých sa pozoruje intermeningeálna prímes krvných elementov ako leukemická meningeálna infiltrácia. Ďalšími indikáciami pre spektrofotometriu likvoru sú parenchýmové hematómy a mozgové kontúzie po traumách lebky. U neuroinfekcií závažným nálezom sú hemoragické zápaly a závažným diagnostickým problémom môžu byť mozgové ischémie, hlavne sekundárne krvácanie (10,12)

V diagnostike SAH sa z laboratórnych techník používa nektrastné CT vyšetrenie mozgu. Ak je CT urobené v priebehu 24 hodín od vzniku SAH, krv sa v subarachnoidálnych priestoroch zaregistruje až v 92 % (10) a môže mať zároveň topickú hodnotu, t.j. môže poukazovať na lokalizáciu zdroja krvácania. Po 24 hodinách senzitivita CT výrazne klesá a pri nie masívnom SAH môže byť už nasledujúci deň CT nález negatívny. V prípade negativity CT je potrebné realizovať vyšetrenie likvoru z lumbálnej punkcie. Vo včasnej fáze sa nachádza v závislosti od masívnosti krvácania makroskopicky hemoragický alebo erytrochrómny likvor. Po dokázaní subarachnoidálneho krvácania CT vyšetrením a lumbálnou punkciou sa zdroj krvácania ďalej zisťuje najčastejšie digitálnou subtrakčnou angiografiou (10).

V súvislosti s významným postavením spektrofotometrickej analýzy likvoru (CSF) v diagnostike subarachnoidálneho krvácania (SAH), v prezentovanej práci sa zaoberáme s niektorými implikáciami, ktoré môžu arteficiálne ovplyvniť výsledky likvorologickej diagnostiky SAH touto metódou.

Spektrofotometria likvoru

Posúdenie vzhľadom cerebrospinálneho likvoru (CSF) patrí medzi základné vyšetrenia v likvorologickej diagnostike. Za fyziologických podmienok je CSF číry a bezfarebný. Farebná zmena likvoru, najčastejšie žlté sfarbenie (xantochrómia), spravidla indikuje prítomnosť patologického stavu. Xantochrómia CSF môže vzniknúť a) pri krvácaní do likvorových ciest alebo do štruktúr, ktoré obklopujú tieto priestory, b) prienikom xantochrómnych substancií do likvoru z krvi pri poruche hematollikvorovej bariéry a c) prienikom xantochrómnych látok z krvi do likvoru pri ich vysokej koncentrácii (napr. hyperbilirubinémia) za stavu bez poruchy bariérových systémov mozgu.

CSF vzhľadom na jeho čírosť, bezfarebnosť a nízku absorbanciu vo viditeľnej oblasti za fyziologických podmienok (menej ako 0,020) je veľmi vhodný materiál pre spektrofotometrickú analýzu. Prvá správa o použití spektrofotometrie likvoru pri štúdiu jeho farebných zmien pochádza od L. Heilmeyera (r. 1933). Zásadný prínos v spektrofotometrii likvoru priniesla práca Barrowsa a spol. z r. 1955 (1). Autori na základe vyšetrenia 149 likvorov prišli k záveru, že podkladom xantochrómie likvoru sú tri farebné látky, oxyhemoglobín, methemoglobín (hemiglobín) a bilirubín. Tieto krvné farbivá sa môžu v likvore vyskytovať samostatne, ale aj v kombináciách. Kým oxyhemoglobín a methemoglobín

môžu vznikáť in vitro aj in vivo, bilirubín vzniká len in vivo. Autori sledovali aj vplyv arteficiálneho krvácania, vývoj farebných zmien a prítomnosť methemoglobín vo ventrikulárnom a lumbálnom likvore, ale výsledky pozorovaní sa vzťahovali len na malé množstvo vyšetrených CSF. Prítomnosť methemoglobín potvrdili v tekutine parenchýmového (n = 1) a subdurálneho (n = 8) hematómu. Nález absorpčného pásu methemoglobín v CSF zistili najskôr 12. deň a v subdurálnej tekutine 9. deň po hemoragii. Absorpčný pás bilirubínu (460 nm) okrem SAH zistili aj u pacientov s blokadou priechodnosti likvorových ciest v spinálnej oblasti a pri hyperbilirubínemii (460 nm a medzi 420–460 nm).

Zistenia Barrows a spol. potvrdil Kronholm (7), ktorý vyšetrenie CSF ďalej rozpracoval. Zistil, že nález methemoglobín v CSF je obvyčajne asociovaný s hemoragiami, ktoré vedú k vytvoreniu hematómu, a že vlnová dĺžka maxima absorpcie bilirubínu v CSF závisí od pôvodu bilirubínu. Navrhol štandardný postup pre vyšetrenie CSF v rutinnom laboratóriu.

Kjellin (6) dokazuje v likvore prítomnosť dvoch typov bilirubínu: tzv. SB-zložka (konjugovaný bilirubín) s absorpčným maximom pri 425–430 nm a LB-zložka (voľný, nekonjugovaný bilirubín) s absorpčným maximom pri 450–460 nm. SB zložka sa vyskytuje v CSF pri poruchách nehemoragického pôvodu (poruchy bariér), kým LB zložka pri čerstvých hemoragiách a pri novorodeneckých hyperbilirubínemiách (457 nm).

Tieto zistenia vyvolali veľký rozruch v likvorologickej diagnostike a podnietili vznik množstva prác, ktoré sa zaoberali využitím tohto diagnostického testu v klinickej praxi a niektorými metodologickými a klinickými aspektami.

Hodnotenie CSF

Dôkazom SAH je prítomnosť krvi v subarachnoidálnom priestore. Po uplynutí niekoľkých dní, alebo pri malom množstve krvi môže byť vyšetrenie CT falošne negatívne, preto pri klinickom podozrení na SAH je nevyhnutné aj vykonanie lumbálnej punkcie a vyšetrenie likvoru. Patologická prítomnosť krvi v CSF sa dokazuje vizuálne a spektrofotometricky. Mnohé pracoviská vyšetrujú xantochrómiu likvoru len vizuálne, čo nie je 100 % špecifické, pretože je subjektívne a môže byť ovplyvnené diskoloráciou oxyhemoglobínu a mnohými inými faktormi. Petzold a spol. (9) porovnávali výsledky xantochrómie likvoru získané vizuálne a spektrofotometricky. Analýza potvrdila, že kvalitnejšie hodnotenie bilirubínu v CSF poskytuje spektrofotometrická metóda. Väčšina kritických likvorov bola buď kontaminovaná oxyhemoglobínom (vizuálne hodnotenie nedetekovalo prítomnosť bilirubínu), alebo mala len nízke hodnoty bilirubínu (vizuálne nebolo registrované žlté sfarbenie likvoru).

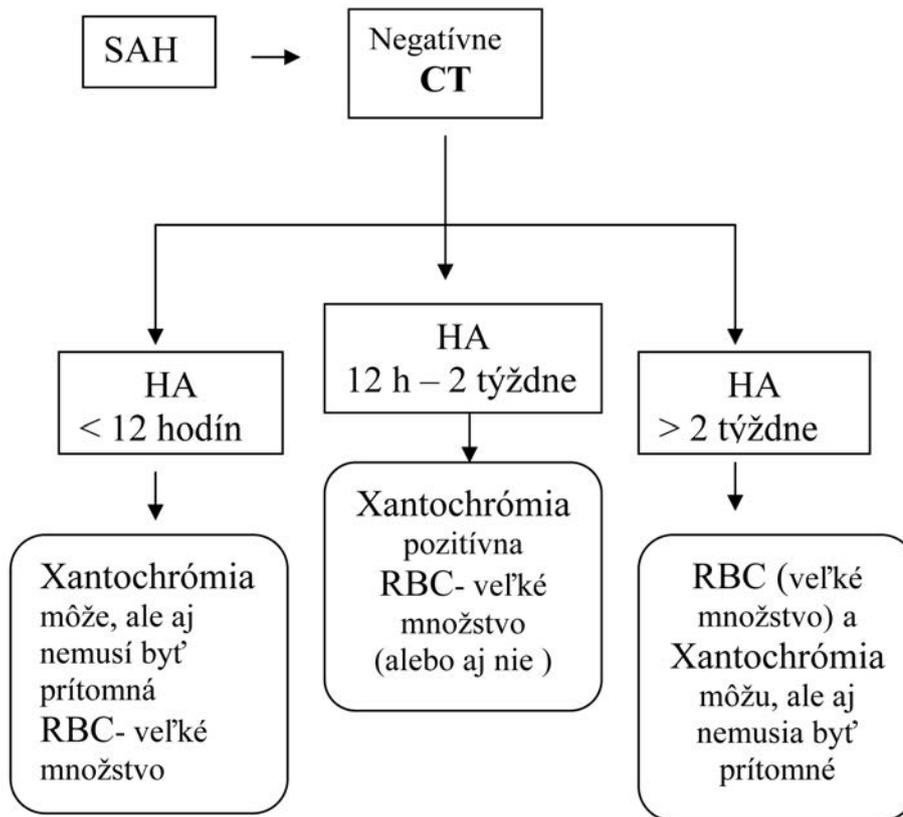
Spektrofotometrická analýza likvoru, okrem potvrdenia SAH, umožňuje určiť aj obdobie krvácania, popr. či sa ide o prvé alebo už opakované krvácanie. Spektrofotometrické hodnotenie CSF je založené hlavne na meraní absorpčných spektier oxyhemoglobínu a bilirubínu, popr. aj methemoglobínu. Po hemoragii do CSF dochádza po dvoch až štyroch hodinách k lýze erytrocytov, hoci priemerné prežívanie erytrocytov v periférnej krvi je 120 dní. Hemolýza subarach-

noidálnych erytrocytov uvoľňuje oxyhemoglobín, ktorý sa dá v likvore detekovať medzi 2 až 12 hodinami po krvácaní. Uvoľnený oxyhemoglobín sa postupne mení makrofágmi a inými bunkami leptomeningov na bilirubín. K tejto konverzii dochádza asi jeden týždeň po hemoragii. Spontánna oxidácia hemovej skupiny má za následok výskyt (asi po 10 dňoch) približne rovnakého množstva methemoglobínu a oxyhemoglobínu. Tento proces je často asociovaný s prítomnosťou intrakraniálneho hematómu (2)

Oxyhemoglobín, ktorý sa začína uvoľňovať z erytrocytov asi od dvoch hodín od začiatku krvácania dosahuje v likvore maximálnu koncentráciu v priebehu prvých 36 hodín. Po 7 a 10 dňoch z likvoru vymizne (8). Oxyhemoglobín spôsobuje ružové až červené sfarbenie likvoru s charakteristickým absorpčným maximom pri vlnovej dĺžke 415 nm a dvomi minoritnými absorpčnými vrcholmi pri 540 a 580 nm (12).

V hemoglobíne je hém s chelátovo viazaným dvojmocným železom ukrytý v „dutine“ glomerulárnych reťazcov, čo spolu s inými mechanizmami chráni dvojmocné železo pred oxidáciou na trojmocné. Oxidačné činidlá, ako napr. nitritové ióny, napriek tejto skutočnosti dokážu oxidovať ferohemoglobín na ferihemoglobín (methemoglobín), v ktorom trojmocné železo už nie je schopné transportovať molekulový kyslík. Methemoglobín má v likvore absorpčné maximum pri 408 nm. Prítomnosť tohto absorpčného maxima v CSF alebo v punktáte subdurálneho hematómu je príznakom starších zmien hemoglobínu. Absorpčný pás methemoglobínu v CSF sa zisťuje pri ohraničených krvácaniach – intraparenchymálnych a subdurálnych.

Bilirubín je žltý derivát hemu, ktorý neobsahuje železo. Kým oxyhemoglobín sa môže tvoriť buď in vitro, alebo in vivo, bilirubín je enzýmovo a časovo – dependentný proces (3). Je produkovaný makrofágmi a ďalšími bunkami v mäkkých mozgových obaloch pri enzýmovej degradácii hemoglobínu. Objavuje sa až po 10 hodinách od začiatku krvácania a maximálne koncentrácie dosahuje po 48 hodinách. V CSF sa môže nachádzať 2 až 4 týždne po krvácaní. Bilirubín vzniknutý týmto spôsobom má absorpčné maximum najprv pri 460 nm (nekonjugovaný bilirubín). Konjugáciou s vyššími karboxylovými kyselinami a s aminokyselinami, ktoré sa nachádzajú v likvore dochádza neskôr k posunu jeho absorpčného maxima na vlnovú dĺžku 430 nm (bilirubín voľný, nekonjugovaný). Pri tejto vlnovej dĺžke má svoje absorpčné maximum aj sérový bilirubín konjugovaný s kyselinou glukurónovou. (5,8,12). Mnohí autori odporúčajú odber likvoru pre potvrdenie diagnózy SAH až po 12 hodinách od nástupu symptómov, aby sa vytvoril dostatočný čas na tvorbu bilirubínu. (3) Vychádzajú z práce Vermeulen a spol. (13), ktorí pomocou spektrofotometrie zistili xantochrómiu likvoru u všetkých pacientoch (100 %, n = 111) so SAH, ktorí boli podrobení lumbálnej punkcii v období od 12 hodín až po 2 týždne po nástupe symptómov. Toto odporúčanie však nevyklučuje prítomnosť xantochrómie likvoru pri skoršom odbere. Walton (14) študoval 286 likvorov po SAH. Pri odbere likvoru v čase 0–12 hod po SAH boli všetky likvory krvavé a zreteľnú xantochrómiu mala takmer polovica pacientov (43/89), ale v čase medzi 6–12 h už dve tretiny (26/40) pacientov.



Obr. 1. Hodnotenie subarachnoidálneho krvácania (SAH) v likvore v závislosti od vzniku hemoragie (HA), RBC = erytrocyty

Interpretačnú výťažnosť zo spektrofotometrie likvoru zvyšuje aj jeho cytologický obraz. Prítomnosť voľných erytrocytov, adhézie erytrocytov na membrány aktivovaných monocytov a erytrofágov svedčí o prítomnosti čerstvého, maximálne niekoľko hodín trvajúceho krvácania, čo býva podporené spektrofotometrickou krivkou CSF s absorpčným maximom pri 415 nm (oxyhemoglobín). Popri čerstvom krvácaní môže v likvore dominovať aj staršia hemoragická zložka a v cytologickom obraze sú okrem erytrofágov a čerstvo fagocytovaných erytrocytov prítomné erytrofágy s pokročilou dekoláciou fagocytovaných erytrocytov a siderofágy, čo svedčí o krvácaní do likvorových ciest trvajúcim niekoľko dní. S výsledkom cytologického vyšetrenia CSF koreluje výsledok spektrofotometrického vyšetrenia CSF s dominantným absorpčným maximom pri 460 nm (bilirubín), čo odpovedá staršej hemoragickej zložke a s menej zreteľným maximom pri 415 nm (oxyhemoglobín), čo svedčí o aktuálne prebiehajúcom krvácaní do likvorových ciest. Prítomnosť erytrofágov a siderofágov v cytologickom obraze likvoru svedčí teda o prítomnosti minimálne niekoľko dní starého krvácania do likvorových ciest. Spektrofotometrické vyšetrenie likvoru bude mať absorpčné maxima, ktoré odpovedajú prítomnosti nekonjugovanému bilirubínu (460 nm), ale tiež konjugovanému bilirubínu (430 nm), charakteristickému pre staršiu hemoragickú zložku. (5, 12).

Interferujúce vplyvy

Xantochrómia likvoru pri SAH môže byť ovplyvnená aj inými faktormi ako je krvácanie do likvorových ciest, čo môže spôsobovať nesprávnu interpretáciu výsledkov.

1. Falošne pozitívne výsledky

Traumatická lumbálna punkcia. Oxyhemoglobín môže byť detekovaný v likvore aj pri absencii SAH v dôsledku traumatickej lumbálnej punkcie. Keď dôjde k traumatickej LP, pri troj - skúmavkovom odbere sa počet erytrocytov v CSF medzi prvým a tretím odberom výrazne zníži. Pomer červených a bielych krviniek pri traumatickej lumbálnej punkcii je porovnateľný s periférnou krvou (700:1), ale v priebehu 3-5 dní po ikte dochádza k zvýšeniu polymorfonukleárov s následným zvýšením mononukleárných buniek. Táto typická celulárna reakcia pri SAH je meningeálnou odpoveďou na produkty hemolýzy erytrocytov (11).

Pri zisťovaní, či ide o traumatickú punkciu alebo SAH sa bežne používa vizuálne hodnotenie xantochromie. Vychádza sa z patofyziológie lýzy erytrocytov, t. j. z faktu, že tvorba bilirubínu je enzýmovo dependentná, a teda prebieha in vivo. Likvor z traumatickej punkcie obsahuje oxyhemoglobín, ale nie bilirubín. (11). Na tvorbu bilirubínu sa vyžaduje určitý čas, a preto ani pri SAH sa nemusí v prvých hodinách po ruptúre aneuryzmy v likvore objaviť bilirubín. Walton (14) vizuálne hodnotil likvor od 49 pacientov so SAH v prvých

6 hodinách a len 10 pacientov malo prítomnú xantochrómiu. Po 6 až 12 hodinách po ikte mali všetci hodnotení pacienti (n=40) krvavý likvor, ale len 26 pacientov (65 %) malo xantochrómiu. Keď sa likvor hodnotil medzi 12 hod a 14 dňami, xantochrómia sa potvrdila u všetkých pacientoch. Absencia xantochrómie vizuálne hodnotená 12 hodín po ikte nie je dostačujúca na vylúčenie SAH. Na správne posúdenie xantochrómie sa vyžaduje spektrofotometrická analýza (11).

Hemolýza in vitro. In vitro štúdium CSF poskytlo dôkaz, že ak sa vzorky CSF, ktoré obsahujú menej ako 40 000/mm³ erythrocytov centrifugujú do 15 minút, nepodliehajú hemolýze a neprodukujú falošne pozitívne výsledky (2). CSF by sa preto mal do laboratória transportovať čo najrýchlejšie a rýchlo scentrifugovať (11).

Hyperbilirubinémia. Prítomnosť bilirubínu v CSF okrem hemoragie môže byť dôsledkom hyperbilirubinémie. Pri sérových hladinách vyšších ako 100 mg/L, sérový bilirubín prestupuje do CSF a spôsobuje falošne pozitívnu xantochrómiu (4).

Hyperproteïnorachia. Hladiny bilirubínu v CSF môže arteficiálne zvýšiť aj vysoká likvorová koncentrácia bielkovín (nad 1,5–2 g/l). Táto vysoká koncentrácia proteínov spôsobuje zvýšenie absorbancie likvoru pri 413 nm s absenciou absorpčného pásu pre oxyhemoglobín (2, 5, 8, 12)

Hyperkarotenémia, medikácia. Falošne pozitívnu xantochrómiu spôsobuje aj hyperkarotenémia a terapia napr. rifampínom (4,11).

2. Falošne negatívne výsledky

Falošne negatívne výsledky môžu vznikajú, ak sa odber likvoru vykoná skôr ako 12 hodín po SAH. Likvor nemusí byť xantochrómny (14).

ZÁVER

Spektrofotometria natívneho likvoru vo viditeľnej oblasti má dôležitú úlohu v diferenciálnej diagnostike náhlych cievnych mozgových príhod. Spektrofotometrické krivky umožňujú charakterizovať xantochrómiu likvoru na základe rozdielnych absorpčných maxím oxyhemoglobínu (415 nm), methemoglobínu (408 nm) a bilirubínov (420–460 nm). Patologický nález bilirubínu v likvore poukazuje na subakútne alebo staršie krvácanie, prípadne prenikanie bilirubínu hematoencefalickou bariérou.

U pacientov s podozrením na SAH, u ktorých bolo CT negatívne by sa odber likvoru nemal robiť skôr ako po 12 hodinách po krvácaní. Likvor sa musí okamžite transportovať do laboratória, kde sa vizuálne zhodnotí, časť sa odoberie na analýzu erythrocytov a zvyšok sa centrifuguje. Po vizuálnom zhodnotení sa supernatant podrobí spektrofotometrickej analýze.

Ak sa v absorpčnom spektre CSF nachádza len pík oxyhemoglobínu (415 nm), počet erythrocytov v CSF je menší ako 40 000/mm³ a centrifugácia sa uskutočnila do 15 minút po odbere, likvorový nález potvrdzuje prítomnosť SAH. Ak likvor obsahuje viac ako 40 000 /mm³ erythrocytov a čas

centrifugácie od lumbálnej punkcie (LP) bol viac ako 15 min, je tu možnosť existencie falošne pozitívnych výsledkov. Treba uvažovať o opakovaní LP. Čerstvé krvácanie, trvajúce niekoľko hodín okrem absorpčného piku oxyhemoglobínu podporuje prítomnosť erytrofágov v CSF.

Detekcia absorpčných pásov oxyhemoglobínu a bilirubínu v CSF potvrdzuje diagnózu SAH. Cytologický nález pokročilej dekolácie fagocytovaných erythrocytov a prítomnosť siderofágov svedčí o krvácaní do likvorových ciest trvajúcom niekoľko dní.

Ak sa v CSF v meranej oblasti krvných pigmentov neregistruje žiaden absorpčný pás, prítomnosť SAH sa vylučuje za podmienky, že odber likvoru bol robený až po 12 hodinách od nástupu symptómov

Pri detekcii absorpčného pásu len bilirubínu treba kvantifikovať okrem bilirubínu a celkových bielkovín v CSF aj a sérový bilirubín a celkové bielkoviny, a tým vylúčiť prienik sérového bilirubínu do CSF.

Detekcia methemoglobínu v CSF (408 nm) je indikovaná predovšetkým pri ohraničených krvácaniach – intraparenchymálnych a subdurálnych.

Tab. 1. Metódy na rozlíšenie traumatickej lumbálnej punkcie (LP) od subarachnoidálneho krvácania (SAH) (modif. Shah a Edlow, 2002)

Likvor	Traumatická LP	SAH
Likvorový tlak	normálny	zvýšený v 65 % prípadoch
3-skúmavkový test	krvavý, postupne sa vyčisťuje	trvalo krvavý
Vizuálne hodnotenie xantochrómie	číry	xantochrómia
Spektrofotometria xantochrómie	nie sú prítomné degradačné produkty hemoglobínu	sú prítomné degradačné produkty hemoglobínu
Počet erythrocytov	postupne sa znižuje	počet erythrocytov pretrváva
Počet bielych krviniek	úmerný periférnej krvi	spočiatku úmerný periférnej krvi, neskôr sa relatívne zvyšuje
Tvorba zrazeniny	zriedka	nie
D-dimér	nie	prítomný
Erytrofágy	nie	prítomné
Opakovaná LP	číry	podobný ako pri prvej LP

LITERATÚRA

1. Barrows, L. J., Hunter, F. T., Banker, B. Q.: *The nature and clinical significance of pigments in the cerebrospinal fluid.* Brain 1955; 78(1): 59–83.
2. Cruickshank, A. M.: *CSF spectrophotometry in the diagnosis of subarachnoid haemorrhage.* J. Clin. Pathol. 2001; 54: 827–830.
3. Edlow, J. A., Bruner, K. S., Horowitz, G. L.: *Xanthochromia. A survey of Laboratory methodology and its clinical implications.* Arch. Path. Lab. Med. 2002; (4): 413–415.
4. Jerrard, D. A., Hanna, J. R., Schindelheim, G. L.: *Cerebrospinal fluid.* J. Emerg. Med. 2001; 21(2): 171–178.
5. Kelbich, P., Šimečková, M., Adam, P., Váľková, R., Hanuljaková, E., Sobek, O. a spol.: *Likvorové nálezy u pacienta s bakteriálnou meningitidou - kazuistika.* Klin. Biochem. Metab. 2002; 10(31): 54–68.
6. Kjellin, K. G.: *Bilirubin compounds in the CSF.* J. Neurol. Sci. 1971; 13(2): 161–173.
7. Kronholm, V.: *A method of diagnosis by cerebrospinal fluid in haemorrhage diseases of the central nervous system.* Acta psychiat. Scand. 1961; 36(Suppl.150): 323–326.
8. Lamers, K. J. B., Wevers, R. A.: *Cerebrospinal fluid diagnostics: Biochemical and clinical aspects.* Klin. Biochem. Metab. 1995; 24(2): 63–75.
9. Petzold, A., Keir, G., Sharpe, T. L.: *Why human color vision cannot reliably detect cerebrospinal fluid xanthochromia.* Stroke 2005; 36: 1295–1299.
10. Porubec, V.: *Subarachnoidálne krvácanie.* Neurologie pro praxi 2002; 6: 299–301.
11. Shah, K. H., Edlow, J. A.: *Distinguishing traumatic lumbar puncture from true subarachnoid hemorrhage.* J. Emerg. Med. 2002; 23(1): 67–74.
12. Tyl, D., Adam, P.: *Obráz intermeningeálneho krvácania v mozkomíšnom moku.* Klin. Biochem. Metab. 1997; 1: 24–27.
13. Vermeulen, M., Hasan, D., Blijenberg, B. G., Hijdra, A., van Gijn, J.: *Xanthochromia after subarachnoid haemorrhage needs no revisitation.* J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 1989; 52: 826–828.
14. Walton, J.: In: *Subarachnoid hemorrhage.* E&S. Livingstone, Ltd, Edinburgh (1956) pp. 118–127.

Adresa pre korešpondenciu:

Prof. MUDr. Peter Turčáni, PhD.
1.neurologická klinika LF UK
Mickiewiczova 13
813 64 BRATISLAVA
e-mail: peter.turcani@faneba.sk

VYUŽITIE PRIETOKOVEJ CYTOMETRIE NA DETEKCIU DONOR-ŠPECIFICKÝCH PROTILÁTKO PRED TRANSPLANTÁCIOU OBLIČKY

CHREŇOVÁ SILVIA

Centrum orgánových transplantácií
Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

SÚHRN

Vyšetrenie donor-špecifickej humorálnej imunity pred transplantáciou solidných orgánov, tzv. „cross-match“ test, má zásadný význam pre prevenciu hyperakútnej a včasnej akútnej rejekcie štepu. Cieľom tohto testu je zistiť prítomnosť špecifických protilátok v sére potenciálneho príjemcu, namierených proti tkanivovým antigénom exprimovaným bunkami darcovského orgánu. V oblasti laboratórnych metód na ich detekciu sa v poslednom období dostala do popredia prietoková cytometria, ktorá sa popri štandardnej metóde lymfocytotoxického testu stala metódou plne akceptovanou aj v klinickej praxi. Práca sa zaoberá predovšetkým rôznymi technickými aspektami metodiky.

SUMMARY

The assesment of donor-specific humoral immunity before solid organ transplantation, known as cross-match, is of fundamental importance for prevention of hyperacute and early acute graft rejection. The aim of the test is to reveal specific antibodies in patient's serum against tissue antigens expressed on the donor organ. In addition to standard lymphocytotoxicity technique, flow cytometry has proved to be a useful laboratory method for detection of such antibodies. Cross match by flow cytometry has become fully accepted also in clinical practis in the last years. This review deals with various technical aspects of the method.

ÚVOD

Prítomnosť preformovaných donor-špecifických protilátok (DSA) v sére potenciálneho príjemcu orgánu predstavuje významný rizikový faktor z hľadiska prijatia transplantovaného orgánu a jeho funkcie najmä v skorom období po transplantácii. Tieto protilátky v závislosti od typu a koncentrácie sú príčinou hyperakútnej (HAR), akcelerovanej, alebo akútnej (AHR) humorálnej rejekcie. Preto vyšetrenie donor-špecifickej humorálnej imunity tesne pred transplantáciou obličky, známe ako „cross-match“, je rutinnou súčasťou testovania histokompatibility medzi darcom a príjemcom.

Cieľom „cross-match“ testu je zistiť prítomnosť alopertilátok v sére príjemcu, ktoré by spôsobili poškodenie tkanív transplantovaného orgánu imunitnými mechanizmami. Takéto protilátky sú v 90 % namierené proti antigénom Hlav-

ného histokompatibilného systému (HLA). HLA-antigény sú konštitutívne exprimované na povrchu všetkých jadrových buniek organizmu (I. trieda), alebo na špecializovaných imunokompetentných bunkách (II. trieda). Vyznačujú sa vysokým stupňom genetickej polymorfnosti. Prítomnosť anti-HLA protilátok je vždy dôsledkom predchádzajúcej senzibilizácie spôsobenej transfúziami, graviditami alebo transplantáciami.

Štandardnou metódou na detekciu DSA je test na komplemente závislej cytotoxicity (CDC), známy skôr ako lymfocytotoxický test (LCT). Tento test vo svojej základnej podobe bol uvedený do klinickej praxe v 60-tych rokoch minulého storočia (11). V súčasnosti je povinnou súčasťou štandardných postupov testovania histokompatibility, hoci bol medzičasom rôznym spôsobom modifikovaný.

Metóda LCT zachytáva väčšinu protilátok zodpovedných za hyperakútnu rejekciu štepu, vďaka čomu sa táto vážna komplikácia dnes vyskytuje len veľmi zriedkavo. Nie je však dosť citlivá na detekciu protilátok s veľmi nízkym titrom, a tiež neumožňuje zistiť prítomnosť protilátok slabovo viazúcich komplement, ktoré sa pravdepodobne podieľajú na patogenéze akcelerovanej a včasnej akútnej humorálnej rejekcie (9, 13, 15). Hoci niektoré modifikované postupy LCT testu čiastočne riešia tieto nedostatky (predĺženie inkubácií, použitie AHG), do popredia sa v posledných rokoch dostala prietoková cytometria, ako vysoko citlivá metóda, ktorá detekuje protilátky nezávisle od väzby komplementu. Jej veľkou výhodou je taktiež možnosť určenia izotypu detekovanej protilátky (IgG, IgM) a subpopulácie buniek, na ktoré sa viažu (T alebo B-lymfocyty). Cross-match na prietokovom cytometri (FCXM) bol prvýkrát popísaný v r.1983 (3).

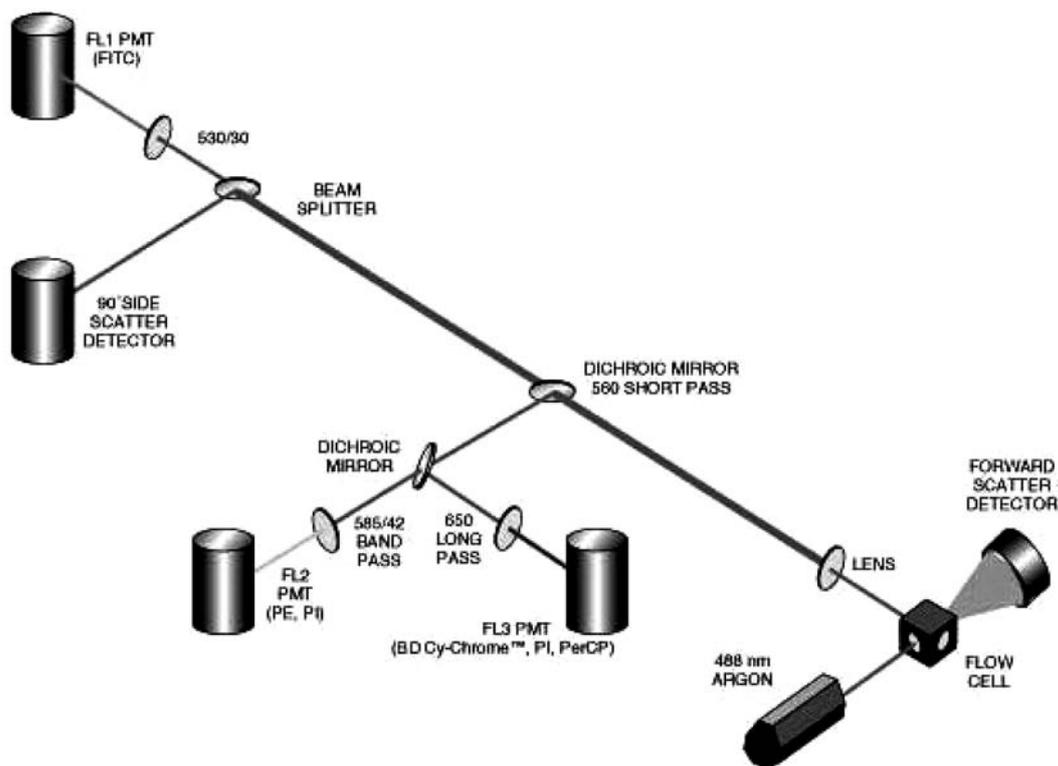
Princíp prietokovej cytometrie

Vlastnosti buniek sú v prietokovom cytometri analyzované na základe rozptylu usmerneného svetelného lúča po prechode bunkou, a intenzity a vlnového rozsahu fluorescenčného svetla emitovaného z farbiva naviazaného na jej povrchových štruktúrach.

Základnými komponentami prietokového cytometra sú:

- zdroj svetla (obyčajne argónový laser)
- optická sústava na fokusáciu a nasmerovanie svetla
- sústava zabezpečujúca reguláciu prietoku tekutiny obsahujúcej bunky cez laserový lúč (hydrodynamická fokusácia)
- elektronická sústava na meranie intenzity svetelných signálov a ich zaznamenanie
- počítačový systém na analýzu týchto svetelných signálov

Svetelný lúč z laserového zdroja je nasmerovaný na kanálik, ktorým prechádzajú bunky v prúde tekutiny tak, aby lúč pretínal tieto bunky pod pravým uhlom. Roztýlené svetlo je zachytávané niekoľkými fotodetektormi: jeden pre predný rozptyl (FSC), jeden pre bočný rozptyl (SSC), a tri detektory pre fluorescenčné svetlo – s filtermi väčšinou pre zelené (FITC), červené (PE) a tmavočervené (napr. PE-CY5) (obr. č. 1). V detektoroch sa svetelné signály menia na elektronické, ktorých intenzita je priamo úmerná intenzite



Obr. 1. Schematické znázornenie optickej sústavy prietokového cytometra.

Laserový lúč je rozptýlený bunkou a tento rozptyl je zachytený detektorom pre predný rozptyl (Forward Scatter) a bočný rozptyl (Side Scatter). Fluorescenčné svetlo emitované z povrchu buniek v troch vlnových dĺžkach (FL1, FL2, FL3) je detekované tromi fotonásobičmi (PMT-photomultiplier tubes) (prebraté z <http://www.bdbiosciences.com>)

zachyteného svetla. Napokon analógové signály sú konvertované na digitálne, vhodné na počítačové spracovanie.

Predný (FSC) a bočný (SSC) rozptyl svetla poskytujú informáciu o veľkosti, tvare a granularite buniek. Na základe týchto vlastností môžeme rozlíšiť základné typy buniek ľudskej krvi: lymfocyty, monocyty a granulocyty.

Fluorescenčné svetlo (FL1, FL2, FL3) sa využíva na identifikáciu povrchových štruktúr buniek – napr. bunkových markerov (CD znaky), alebo molekúl, naviazaných na povrch buniek (protilátky). Toto svetlo je emitované z molekúl cytochrómu, ktorým je označená špecifická protilátka proti sledovanému markeru. Po dopade laserového lúča molekuly rôznych cytochrómov emitujú svetlo s charakteristickým vlnovým rozsahom. Podľa intenzity fluorescenčného svetla pochádzajúceho z príslušného farbiva môžeme potom bunky rozdeliť na pozitívne (vysoká intenzita), či negatívne (nízka intenzita) pre daný znak. Pri použití rôznych cytochrómov môžeme sledovať súčasne viac znakov na jednej bunke.

Výsledky merania na prietokovom cytometri sú spracované vo forme dvoch typov histogramov. Dvojparametrový histogram (dot plot) znázorňuje rozdelenie buniek na základe dvoch vybraných parametrov (napr. FSC a SSC, teda veľkosti a granularity – obr. 2A).

Jednparametrový histogram vyjadruje počet meraní (buniek) s určitou hodnotou vybraného parametra (napr. fluorescence PE – obr. 2B). Hodnoty fluorescence sa jed-

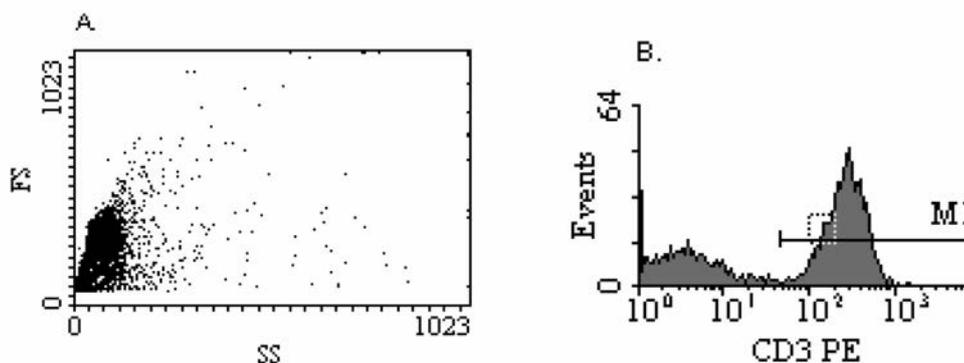
noparametrom histograme zobrazujú väčšinou v škále štyroch logaritmických dekád na osi x, rozdelených na 1024 kanálov (256 na jednu dekádu). Aby bolo možné porovnať dve rôzne vzorky (spravidla negatívnu kontrolu a vyšetrovanú vzorku, prípadne pozitívnu kontrolu), je nutné, aby všetky namerané hodnoty spadali do tejto škály. Snažíme sa spravidla umiestniť kontrolnú vzorku (negatívne sérum) do prvej ľavej dekády.

Výsledky dvojparametrového histogramu sú štatisticky vyjadrené ako počet (percento) meraných buniek nachádzajúcich sa v určitej vybratej oblasti. Táto oblasť môže slúžiť ako východisko – tzv. „gate“ pre analýzu ďalšieho parametra (FL1, FL2, FL3).

Pri jednparametrom histograme hodnotíme rozdelenie frekvencií buniek s určitou hodnotou, a to pomocou priemeru, mediánu, alebo modusu. Výber štatistického parametra závisí od charakteru farbenia danej vzorky. Napríklad keď meriame slabo žiariace farbivo, ktoré sa viaže na malú časť buniek, je lepšie porovnávať percento buniek, ktoré dosiahli stanovenú hodnotu fluorescence. V prípade, že predpokladáme veľký rozdiel v intezite fluorescence pozitívnej a negatívnej vzorky, použijeme medián, a pod.

Štandardizácia prietokovej cytometrie

Spôľahlivé a reprodukovateľné výsledky závisia vo veľkej miere od optimálnej prevádzky cytometra. Tá môže byť



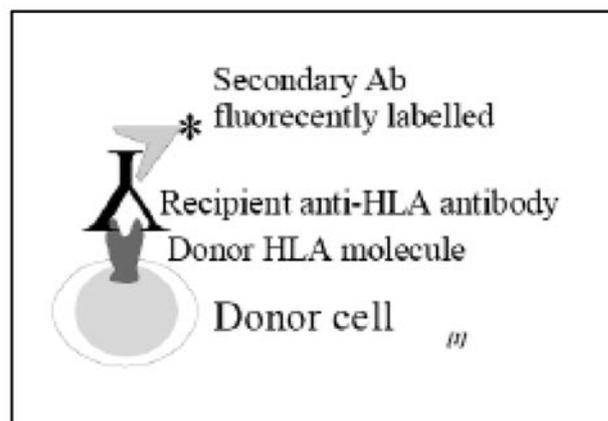
Obr. 2. Dot plot mononukleárných buniek (MNB – 5000 bb.) izolovaných gradientovou centrifugáciou z periférnej krvi (A) a histogram znázorňujúci intenzitu PE- fluorescencie týchto buniek (B). Marker M1 vyznačuje oblasť CD3 pozitívnych buniek.

ovplyvnená fluktuáciami v napájaní lasera, optickými defektami, nerovnomerným prúdením buniek a pod. Usmernenie lasera musí byť pravidelne kontrolované pomocou jednotných, priemyselne vyrobených mikročastíc. Nesprávne nasmerovaný zväzok lúčov spôsobí vysoký koeficient variácie v hodnotách predného rozptylu a neosvetlí cieľovú bunku dostatočne, aby sa dosiahla maximálna intenzita fluorescencie.

Rozptýlené svetlo prechádza filtrami, ktoré prepustia iba svetlo príslušnej vlnovej dĺžky. Toto je potom zachytené na fotonásobičoch, ktoré sa môžu líšiť svojou elektronickou odpoveďou. Linearita tejto odpovede musí byť pravidelne testovaná pomocou fluorescenčných mikročastíc s postupne sa zvyšujúcim množstvom naviazaného cytochrómu. Pomer intezity signálu medzi týmito mikročasticami by sa časom nemal meniť a mal zostať lineárny. V opačnom prípade hladina citlivosti nebude porovnateľná medzi rôznymi testami.

Ak používame v teste iba jedno fluorescenčné farbivo, môžeme predpokladať, že z neho pochádza všetko zachytené a analyzované fluorescenčné svetlo. Avšak pri použití viac ako jedného cytochrómu na jednu bunku môže byť rozlíšenie pôvodu detekovaného fluorescenčného svetla problematické, a to z dôvodu spektrálneho prekryvania („overlap“). Toto prekryvanie je potrebné eliminovať elektronickou kompenzáciou. Primeraná a správna kompenzácia je veľmi dôležitá – „podkompenzovanie“ (nedostatočná kompenzácia) vedie k falošne pozitívnym výsledkom, naopak nadmerná kompenzácia môže spôsobiť falošnú negativitu. Keďže konečná hodnota fluorescenčného signálu závisí od tzv. amplifikátora (faktor, ktorým násobíme všetky namerané hodnoty), miera potrebnej kompenzácie súvisí aj s nastavením tohto faktora. Správne nastavenie kompenzácie vyžaduje označiť paralelne jednu vzorku iba jedným fluorochrómom, a následne upraviť nastavenia s dvojfarebne označenými bunkami. Takýto postup zároveň odhalí aj prípadné interakcie medzi reagentami. Primeraná kompenzácia je dôležitým krokom pri optimalizácii testu a má významný vplyv na konečné rozlíšenie medzi pozitivitou a negativitou (4).

Zväzok laserových lúčov je v priemere väčší ako priemer bunky, preto nevie rozlíšiť medzi dvomi tmavými bunkami a jednou žiariacou bunkou. Je preto dôležité mať rovnomerne



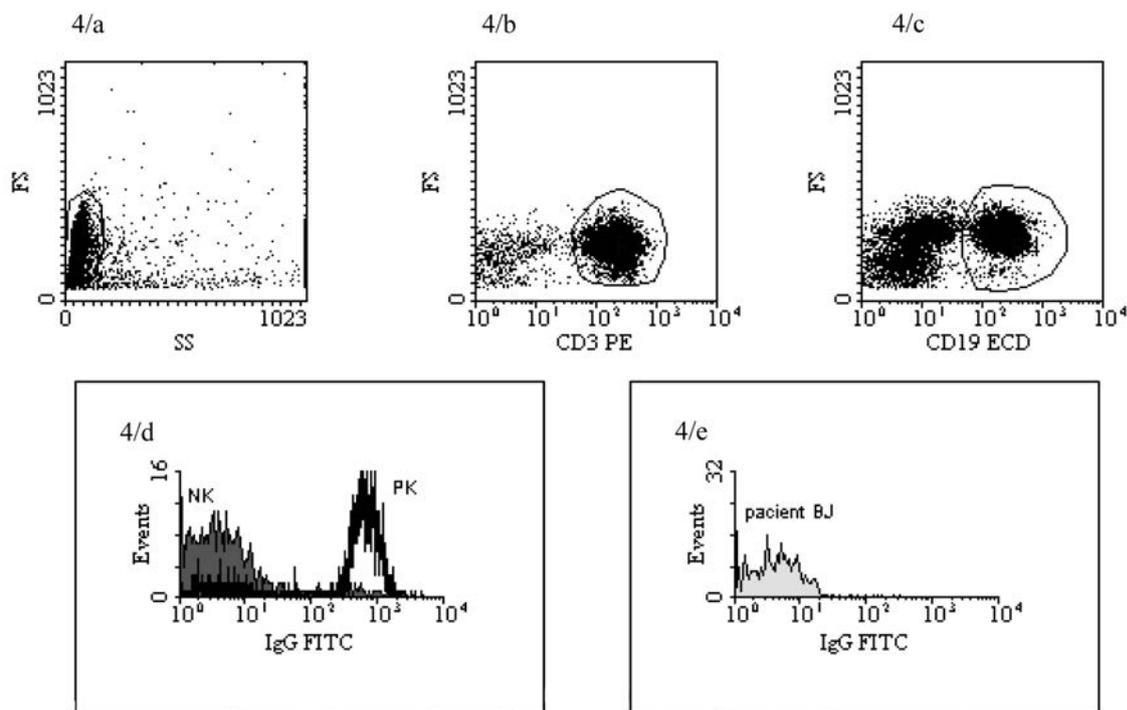
Obr. 3. Princíp FCXM: protilátky v sére príjemcu sa počas inkubácie naviažu na HLA-antigény na lymfocytoch darcu; väzbu detekujeme sekundárnou protilátkou proti ľudskému imunoglobulínu, označenou fluorochrómom.

premiešanú suspenziu buniek s vysokou životnosťou. Metódy používané v HLA-laboratóriách na izoláciu a separáciu buniek sú vhodné na prípravu práve takýchto bunkových suspenzií.

Aby nedochádzalo k prekryvaniu buniek pri prítoku laserovým lúčom, je potrebné primerané nariadenie analyzovanej suspenzie a podľa toho aj nastaviť určitú rýchlosť prúdenia bunkovej suspenzie v prietokovom kanáliku. Optimálna rýchlosť je asi 1 000 buniek za sekundu (8). Príliš nízka rýchlosť zasa predlžuje čas merania.

Cross match na prietokovom cytometri (FCXM) Princíp a porovnanie s LCT-testom

Cross-match je laboratórny test na detekciu donor-sPECIFICkých protilátok (predovšetkým anti-HLA protilátok) pred transplantáciou, príp. po transplantácii. Prítomnosť protilátok vyšetrujeme v sére príjemcu (cirkulujúce protilátky). Ako zdroj cieľových štruktúr (HLA-antigénov) používame lymfocyty, ktoré exprimujú HLA I. triedy (T-ly), alebo HLA I. aj II. triedy (B-lymfocyty). Využitie iných bunkových populácií sa uplatňuje hlavne v testoch, zameraných na detek-



Obr. 4. Príklady histogramov pri negatívnom FCXM pacienta pred príbuzenskou transplantáciou obličky:

4/a – oblasť lymfocytov; 4/b – oblasť CD3 pozitívnych buniek (T-ly); 4/c – oblasť CD19 pozitívnych buniek (B-ly);

4/d – FITC-fluorescencia CD3+ buniek – negatívna (NK) a pozitívna (PK) kontrola;

4/e – FITC-fluorescencia CD3+ buniek – sérum pacienta

ciu protilátok proti iným tkanivovým antigénnym systémom (monocyty, endotelové bunky, príp. ich prekursori).

Každá metóda „cross-match“ testu predstavuje dve základné fázy:

- inkubácia séra potenciálneho príjemcu (zdroj protilátok) s lymfocytmi darcu (nositeľ cieľových štruktúr – HLA antigénov)
- detekcia a vizualizácia naviazaných protilátok

Ak sérum príjemcu obsahuje špecifické donor-reaktívne protilátky, tieto sa počas inkubácie naviažu na povrch lymfocytov. Podmienky, za akých inkubácia prebieha (teplota, dĺžka inkubácie, objem reagencií, chem. prostredie), ovplyvňujú špecifickosť a stabilitu väzieb, príp. preferovaný typ protilátok (IgG, IgM). V tom sa odlišujú rôzne varianty ako LCT, tak ak aj FCXM.

Detekcia väzieb pri lymfocytotoxickom teste spočíva v cytolytickom účinku komplementu, ktorý sa viaže na príslušnú Fc-časť molekuly imunoglobulínu naviazaného na povrchový antigén lymfocytov, a cytolýza sa vizualizuje vitálnym farbivom. Pozitívna reakcia sa hodnotí mikroskopicky podľa podielu usmrtených (lyzovaných) buniek. V prípade prietokového cytometra detekujeme naviazaný imunoglobulín pomocou fluorochrómu (spravidla FITC), konjugovaného s protilátkou proti ľudskému imunoglobulínu (IgG, alebo IgM) – obr. č. 3. Pri hodnotení porovnáваме intenzitu fluorescenčného svetla emitovaného z povrchu buniek inkubovaných s kontrolným (negatívnym) sérom a s testovaným sérom. Na označenie buniek, ktoré chceme analyzovať (T alebo B-lymfocyty), použijeme zároveň inou farbičkou

(napr. PE) značenú monoklonovú protilátku proti príslušnému bunkovému markeru (CD3 – Tly, CD19 – Bly).

Výhody prietokovej cytometrie v porovnaní s LCT-testom sa dajú zhrnúť nasledovne:

- vyššia citlivosť (detekcia protilátok s nízkym titrom)
- detekcia protilátok nezávisle od fixácie komplementu
- určenie izotypu detekovanej protilátky (IgG, IgM)
- možnosť vyhodnotiť T a B bunky v jednom teste, bez potreby ich predchádzajúcej separácie

Nevýhodou je potreba izolácie väčšieho množstva buniek, vyššia finančná náročnosť (prístroje aj reagenty), a tiež nedostatočná štandardizácia metodiky, čo sťažuje porovnanie výsledkov medzi rôznymi laboratóriami.

1. Príprava bunkovej suspenzie a inkubačná fáza testu

Izolácia buniek určených na detekciu anti-HLA protilátok prietokovým cytometrom sa v princípe nelíši od izolácie buniek určených na HLA-typizáciu, ale má svoje špecifiká. Na nastavenie testu potrebujeme oveľa väčší celkový počet buniek, a to v tom najjednoduchšom prípade, teda keď testujeme iba jeden izotyp (napr. IgG) s jednou populáciou buniek (napr. T-lymfocytmi) je to 1,2–1,5 mil. buniek. Defibrinácia krvi pred izoláciou nie je vhodná, lebo znižuje životnosť buniek, predovšetkým B-lymfocytov. Optimálnou metódou, ktorá zabezpečí maximálny výťažok mononukleárnych buniek s dostatočnou čistotou a životnosťou je centrifugácia nariedenej krvi (príp. buffy-coatu) na hustotnom gradiente. Je možné použiť aj imunomagnetické mikročastice (beads), avšak zvyšuje sa riziko vzniku nežiadúcich

interakcii počas centrifugácie takto „obalených“ buniek. Lymfocyty môžeme rovnako izolovať z eluátu lymfatického tkaniva (slezina, uzlina) v prípade zomrelého darcu.

Pred samotnou inkubáciou so sérom sa doporučuje bunkovú suspenziu dvakrát premyť ľadovým fosfátovým pufrom s 0,01% azidom sodným. Toto opracovanie je dôležité pre stabilizáciu bunkových membrán a zabránenie straty povrchových antigénov v dôsledku javu známeho ako „capping“.

V inkubačnej fáze testu je dôležité optimalizovať podmienky tak, aby väzba protilátky bola špecifická a dostatočne stabilná. Podmienky, ktoré môžu ovplyvniť túto väzbu sú zhrnuté v tab. č.1. Inkubácia pri 4 °C je optimálna pre väzbu protilátok triedy IgM, kým pri 21 °C alebo 37 °C sa lepšie viažu IgG. Je však výhodnejšie používať teplotu 4 °C aj pre detekciu IgG protilátok, pokiaľ sa jedná o labilnejšie povrchové antigény. Takýto stabilizujúci efekt má aj prídanie azidu sodného do inkubačného roztoku.

Po inkubácii buniek so sérom a pred pridaním sekundárnej (detekčnej) protilátky je dôležité dôsledné odstránenie nenaviazaných sérových imunoglobulínov, ktoré dosiahneme opakovaným premytím suspenzie. Príliš veľké nariadenie pri premyvaní je však spojené so zmenou koncentračnej rovnováhy a môže spôsobiť odpojenie špecificky naviazanej protilátky. Strata väzby protilátky môže byť minimalizovaná pridaním proteínu (fetálne telacie sérum) do premývacieho média. Počet premyvaní a premývaci objem výrazne ovplyvňujú detekčnú citlivosť metódy (14).

2. Detekcia naviazaných protilátok

Protilátky naviazané na povrchové antigény buniek počas inkubácie detekujeme sekundárnou protilátkou, namierenou proti ľudskému imunoglobulínu, konjugovanou s vhodným fluorochrómom. Väčšinou sa používajú protilátky namierené proti konštantnej časti imunoglobulínu (Fc oblasti) príslušnej triedy - IgG, IgM, príp. IgA. Aby sa predišlo nešpecifickému naviazaniu reagencie na Fc-receptoty exprimované na povrchu niektorých buniek (B-lymfocyty, monocyty), doporučuje sa používanie protilátky

Tab. 1. Faktory ovplyvňujúce väzbu protilátok na povrchové antigény pri cross-match teste prietokovým cytometrom (Horsburgh a spol., 2000).

Parameter	Rozpätie
Inkubačná teplota	4-37 °C
Dĺžka inkubácie	15-60 min
Koncentrácia buniek	50-100 × 10 ⁴ / skúmavku
Inkubačný roztok	Fosfátni tlmenný fyziolog. roztok (PBS) s / bez albumínu (FCS) azidu sodného
Pomer objemu bb. suspenzie k objemu séra	0,1:1-1:4
Riedenie séra	Neriedené - riedené 1:5
Zdroj buniek	Slezina (40% T lymfocytov) Periférne MNB (70% T lymfocytov)

zbavenej Fc-časti molekuly (Fab-fragment). Dôležité je tiež predtitrovať reagentiu tak, aby sa dosiahol optimálny pomer signálu medzi testovanou a kontrolnou vzorkou (doporučené je riedenie 1:20 až 1:50).

Výhodou prietokovej cytometrie je, že využitím viacerých farbív môžeme analyzovať súčasne viac znakov na jednej bunke. Monoklónovou protilátkou proti špecifickému povrchovému markeru tak môžeme označiť subpopuláciu buniek, ktorá nás z hľadiska prítomných protilátok zaujíma - T-ly (CD3) na detekciu protilátok proti I. triede, alebo B-ly (CD19) pre protilátky proti II. triede HLA-antigénov. Je však dôležité zvoliť optimálnu kombináciu farbív tak, aby sa vlnové spektrá nimi emitovaného svetla prekrývali minimálne (problémy s kompenzáciou) a tiež aby navzájom neinteragovali (zháňanie, tvorba konjugátov). Najčastejšie používanou kombináciou je FITC pre sekundárnu protilátku, PE pre anti-CD3 a PE-CY5 pre anti-CD19. Cross-match s použitím trojfarebnej fluorescencie popisali Bray a spol. v r. 1989 (1).

Po inkubácii s detekčnými reagentiami nasleduje opäť odstránenie prebytočných, nenaviazaných protilátok premyvaním a nakoniec sa vzorka resuspenduje na analýzu v cytometri. Suspenzia by mala pozostávať s intaktných a jednotlivých buniek a uchovávaná v chlade a tme. Ak nie je hneď analyzovaná, fixuje sa formaldehydom.

Meranie a analýza výsledkov

Pri meraní vzoriek dbáme na dôkladné, ale jemné premiešanie suspenzie pred vložením do cytometra a nastavenie optimálnej rýchlosti prietoku buniek systémom. Minimálny počet buniek na získanie spoľahlivých štatistických údajov je 1000. Keďže pri cross-match teste spravidla pracujeme so suspenziou mononukleárných buniek, ktorá obsahuje aj iné bunky ako lymfocyty, a musíme tiež rátať aj s určitým podielom poškodených buniek („debris“), celkový počet zmeraných hodnôt musí byť teda oveľa vyšší. Ak chceme analyzovať B-lymfocyty, potrebujeme zmerať celkovo najmenej 10 000 buniek.

Pri bežne používanom protokole postupujeme tak, že najprv vyznačíme oblasť lymfocytov na dvojparametrovom histograme FSC/SSC (hist.č. 4/a). Túto oblasť zvolíme ako vstupnú oblasť pre zobrazenie fluorescencie v FL2 a FL3 a vyznačíme oblasť s vysokou intenzitou fluorescencie CD3 (4/b) a CD19 (4/c). Obidve bunkové populácie ďalej analyzujeme z hľadiska intenzity FITC-fluorescencie (FL1), ktorá pochádza zo sekundárnej protilátky a indikuje množstvo protilátok naviazaných na povrch T a B lymfocytov (4/d a 4/e).

Namerané hodnoty môžeme uložiť ako hrubé údaje, ktoré umožňujú spätnú reanalýzu aj po vyhodnení vzoriek, avšak zaberajú viac pamäte v počítači. Druhou možnosťou je zber iba požadovaného počtu meraní spadajúcich do vyznačenej oblasti.

Vyhodnotenie výsledku testu spočíva v porovnaní intenzity fluorescencie naviazanej detekčnej (sekundárnej) protilátky medzi testovanou vzorkou (sérum potenciálneho príjemcu-3/e) a negatívnou kontrolou (4/d-NK). Ako negatívna kontrola sa rutinne používa sérum od zdravého mužského darcu krvi s krvnou skupinou AB-, prípadne pool z viacerých takýchto sér. Anti-HLA protilátky sa totiž pri-

rodzene v ľudskej krvi nevyskytujú, a vznikajú iba po kontakte s cudzorodými HLA-antigénmi (gravídita, transfúzie, transplantácie). V teste nastavujeme aj pozitívnu kontrolu (4/d-PK), pozostávajúcu z poolu sér od pacientov s vysokým titrom širokospektrálnych anti-HLA protilátok (vysoko-senzibilizovaní pacienti). Toto sérum slúži na kontrolu reaktivity detekčnej protilátky ako aj správneho postupu (či nedošlo k strate povrchových HLA-antigénov).

Na porovnanie je najvhodnejší jeden zo štatistických parametrov strednej hodnoty fluorescencie, a to medián, používa sa však aj priemer. Hranica pozitivity („cut-off“) je jedným z najkritickejších bodov testu. Najčastejšie sa udáva medián vyšší ako 1,5-násobok negatívnej kontroly, alebo posun priemernej hodnoty fluorescencie o viac ako 2SD doprava oproti negatívnej kontrole. Nie sú však jednotné kritériá a jednotlivé laboratóriá postupujú na základe vlastných skúseností. Pri konečnom závere, či sérum pacienta obsahuje donor-špecifické anti-HLA protilátky alebo nie, je potrebné zohľadňovať viaceré ukazovatele celkového imunologického profilu pacienta (história senzibilizácie, detekcia anti-HLA protilátok v minulosti a ich alelová špecificita atď.).

Nešpecifická fluorescencia: vplyv Fc receptorov na T a B FCXM

Kým interpretácia T-CXM je pomerne jednoznačná a nekomplikovaná, B-CXM predstavuje problém a to hlavne z dôvodu prítomnosti Fc receptorov na povrchu B-buniek (17). Tieto receptory sa nachádzajú aj na T lymfocytoch, ale v oveľa menšej miere (18). Fc receptory môžu viazať „prirodzené“, resp. iné irelevantné (non-HLA) imunoglobulíny (7). Väzba takýchto imunoglobulínov v negatívnej kontrole zvyšuje nešpecifické pozadie fluorescencie a tým znižuje schopnosť rozlíšenia špecifického signálu od šumu (signal-to-noise), čo môže viesť k falošne negatívnym výsledkom testu. V sére pacienta naopak väzba nevýznamných protilátok môže mať za následok falošnú pozitívitu. Vzniku týchto nešpecifických väzieb je možné zabrániť opracovaním buniek pred inkubáciou proteolytickým enzýmom pronáza, ktorý odstráni Fc receptory z povrchu lymfocytov, pričom HLA molekuly, ako aj CD3, či CD19 receptory sú rezistentné k tomuto enzýmu. Túto metódu popisali Lobo a spol. (7). Neskôr aj iní autori dokázali, že použitie pronázy významne zvyšuje špecificitu, ako aj senzitivitu FCXM s B aj T lymfocytmi, a to tak pre I. ako aj II. triedu anti-HLA protilátok (16).

Iný spôsob eliminácie Fc receptorov popisali v r. 1991 Kuijpers a spol. (6). Použili myšiu monoklónnú protilátku (MoAb) proti FcRI-receptoru na monocytoch, následne pridávali koziu protilátku proti tejto MoAb, čím dosiahli premostenie molekúl primárnej protilátky a internalizáciu týchto komplexov z povrchu buniek.

Ako potenciálny zdroj nešpecifického pozadia sa v literatúre uvádzajú aj iné faktory, ako napríklad lymphokwik (mix monoklónných protilátok a komplementu používaný na izoláciu T a B lymfocytov) (2), použitie poolu viacerých sér ako zdroja negatívnej kontroly, relatívny objem séra, kontaminácia monocytmi, atď. Pri testovaní vplyvu rôznych technických aspektov metodiky na pozadie Vaidya a spol. zistili, že žiadny zo spomínaných faktorov nemal takýto

efekt, ale že nešpecifické pozadie sa menilo hlavne v závislosti od lymfocytov darcu (16). Z týchto pozorovaní autori vyvodzujú záver, že práve množstvo a charakter exprimovaných Fc receptorov je hlavným zdrojom nešpecifickej fluorescencie, ktorá skresľuje interpretáciu výsledku FCXM, a to predovšetkým s B lymfocytmi.

Zvýšená prítomnosť Fc receptorov na B bunkách darcu môže viesť k zdanlivo paradoxnej situácii, kedy CXM s T-ly je pozitívny, ale s B-ly negatívny. Ako je známe, B-ly exprimujú viac HLA molekúl I.triedy, ako T-ly, preto sú citlivejším terčom pre anti-HLA protilátky I.triedy a takýto výsledok sa zdá nelogický. Jedno z vysvetlení je, že pozitívny T-CXM je spôsobený non-HLA protilátkami, príp. autoprotilátkami, a v takomto prípade by sme aj pozitívitu T-FCXM mali považovať za irelevantnú z hľadiska uskutočnenia plánovanej transplantácie. Ak je však príčinou negatívneho výsledku s B-ly vysoké pozadie spôsobené nešpecifickou väzbou imunoglobulínov v sére na Fc receptory B buniek, môže dôjsť k nesprávnej interpretácii výsledku testu. Toto pozadie vedie k vysokej hodnote fluorescencie v negatívnej kontrole, čo posunie hranicu pozitivity smerom doprava a môže viesť k falošne negatívnemu výsledku. Vaidya a spol. potvrdili takúto situáciu retrospektívnym vyšetrením FCXM bez pronázy, a s pronázou u troch pacientov s včasnou akcelerovanou rejekciou 3.-7. deň po transplantácii.

Príčinou zníženej senzitivity testu s B-lymfocytmi môže byť aj expresia povrchových imunoglobulínových molekúl na B-bunkách. Tieto imunoglobulíny sú tiež rozpoznávané detekčnou protilátkou proti ľudskému imunoglobulínu a sú príčinou pozadia v negatívnej kontrole. Zníženie nešpecifického pozadia je možné dosiahnuť úpravou metodiky tak, že B-bunky pred pridaním testovaného séra inkubujeme s neznačenou polyvalentnou protilátkou proti ľudskému imunoglobulínu (5).

Detekcia non-HLA protilátok metódou prietokovej cytometrie

Napriek nesporne najvýznamnejšej úlohe anti-HLA imunity v rejekcii alogénneho štepu, objavujú sa humorálne rejekcie aj u časti pacientov bez detekovateľných anti-HLA protilátok. Svedčí to o existencii aj iných tkanivových antigénnych systémov, ktoré môžu aktivovať imunitnú reakciu príjemcu namierenú proti štepu (12). Jedná sa o tkanivo-špecifické antigénne determinanty, ktoré sa neexprimujú na lymfocytoch, a tak protilátky proti nim nie sú zachytené štandardným lymfocytovým cross-match testom. Doteraz bolo popísaných niekoľko takýchto systémov:

- endotelovo-monocytový systém (EM, antigény exprimované na monocytoch a endotelových bunkách)
- endotelovo-špecifický systém (antigény špecifické pre bunky cievneho endotelu)
- systém MICA a MICB antigénov (exprimované na endotelových bunkách, epitelových bunkách tráviaceho traktu, fibroblastoch kože, keratinocytoch a monocytoch)

Ojedinele boli pozorované aj akútne vaskulárne rejekcie spôsobené protilátkami proti trombocytovému antigénu HPA-1 a HPA-5 (10), prípadne špecifickým antigénom tubu-

lárnych, intersticiálnych či glomerulárnych buniek obličiek. Zatiaľ nepotvrdená je účasť anti-granulocytových protilátok v rejekcii.

Keďže hyperakútna, ale tiež akútna vaskulárna rejekcia vo väčšine prípadov vedie k strate štepu, je potrebné mať k dispozícii spoľahlivé metódy na odhalenie aj tohto typu protilátok, a to aj napriek ich nie až tak častému výskytu. Riziko vzniku týchto protilátok je vyššie u retransplantovaných pacientov, a mali by byť tiež vyšetrené pred každou transplantáciou od žijúceho darcu.

Narastajúce množstvo dôkazov o význame stanovenia non-HLA protilátok pred transplantáciou viedlo k vývoju komerčného setu, ktorý umožňuje vyšetrenie donor-špecifických protilátok proti endotelovým bunkám metódou prietokovej cytometrie. Set obsahuje suspenziu imunomagnetických mikročastíc s naviazanými monoklónovými protilátkami proti špecifickým povrchovým markerom prekurzorov endotelových buniek, ktoré sa izolujú z periférnej krvi. Samotný test je v princípe rovnaký ako pri použití lymfocytov. Výhodou testu je, že detekuje súčasne protilátky proti HLA-antigénom I. aj II. triedy, antigénom EM-systému a tiež MIC-antigénom. Nevýhodou je potreba asi 4-násobného množstva krvi ako pri lymfocytovom teste.

ZÁVER

Prietoková cytometria sa dnes stala významným a neodmysliteľným nástrojom aj v oblasti testovania histokompatibility. Spojitosť medzi protilátkami detekovanými touto metódou a humorálnou rejekciou po transplantácii solidných orgánov bola preukázaná v nespočetných klinických štúdiách. Cross-match prietokovou cytometriou sa stal súčasťou štandardných postupov EFI (European Federation for Immunogenetics) a ASHI (American Society for Histocompatibility) ako doporučovaná laboratórna metóda na detekciu protilátok pred, ako aj po transplantácii. V kombinácii s klasickým LCT-testom tak prispieva k spoľahlivejšiemu testovaniu rizika imunologickej rejekcie a ďalšej optimalizácii algoritmu výberu párov darca-prijemca pri orgánových transplantáciách.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. Bray, R.A., Lebeck, L.K., Gebel, H.M.: *The flow cytometric cross-match: dual-color analysis of T and B cell reactivities*. Transplantation 1989; 48: 834.
2. Bray, R.A., VanderMeer, J., Sinclair, D.A., Holcomb, J.B.: *False negative flow cytometric crossmatches following the use of lymphokwik*. Hum. Immunol. 1996; 49(1): 135.
3. Garovoy, M.R., Rheinschmidt, M.A., Bigos, M., Perkins, H., Comombe, B.: *Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation*. Transplant. Proc. 1983; 15: 1939-1944.
4. Horsburgh, T., Martin, S., Robson, A.J.: *The application of flow cytometry to histocompatibility testing*. Transplant. Immunology. 2000; 8: 3-15.

5. Koktathong, K., Vejbaesya, S., Bejrachandra, S., Patanapanyasat, K.: *Flow cytometric crossmatch for kidney transplantation*. J. Med. Assoc. Thai 2005; 88: 769-774.
6. Kuijpers, R.W.A.M., Dooren, M.C., Kr. von dem Borne, A.E.G., Ouwehand, W.H.: *Detection of Human Monocyte-Reactive Alloantibodies by Flow cytometry After Selective Downregulation of the Fc Receptor 1*. Blood 1991; 78(8): 2150-2156.
7. Lobo, P.I., Spencer, C.E., Stevenson, W.C. et al.: *The use of pronase-digested leucocytes to improve specificity of the flow cytometry crossmatch*. Transpl. Int. 1995; 8: 472.
8. Longobardi, Givan, A.: *Flow Cytometry*. First principles. Wiley-Liss. New York. 1994, 3. vyd.
9. Michelson, T., Schroeder, R., Fagundes, I., Canabarro, R., Sporleder, H., Rodriguez, H., Silveira, J., Montagner, J., Garcia, V., Neumann, J., Graudenz, M.: *Clinical relevance of low levels of preformed alloantibodies detected by flow cytometry in the first year post-kidney transplantation*. Transplant. Proc. 2005; 37(6): 2750-2752.
10. Ourahma, S., Barrou, B., Sylla, C. a spol.: *Kidney transplantation in highly sensitized patients*. Transplant. Proc. 1997; 29: 2398-2399.
11. Patel, R., Terasaki, P.I.: *Significance of the positive cross-match test in kidney transplantation*. N. Engl. J. Med. 1969; 280: 735-739.
12. Rodriguez, P.C., Arroyave, I.H., Mejia, G., Garcia, L.F.: *Detection of alloantibodies against non-HLA antigens in kidney transplantation by flow cytometry*. Clin. Transplantation 2000; 14: 472-478.
13. Scornik, J.C., Clapp, W., Patton, P.R., Van der Werf, W.J., Hemming, A.W., Reed, A.I., Howard, R.J.: *Outcome of kidney transplants in patients known to be flow cytometry crossmatch positive*. Transplantation 2001; 71(8): 1098-1102.
14. Shenton, B.K., Bell, A.E., Harmer, A.W. a spol.: *Importance of methodology in the flow cytometric crossmatch: a multicentre study*. Transplant. Proc. 1997; 29: 1454-1455.
15. Takeda, A., Uchida, K., Haba, T., Tominaga, Y., Katayama, A., Kobayashi, T., Oikawa, T., Morozumi, K.: *Acute humoral rejection of kidney allografts in patients with a positive flow cytometry crossmatch (FCXM)*. Clin. Transplantation 2000; 14: 15-20.
16. Vaidya, S., Cooper, T.Y., Avandsalehi, J., Barnes, T., Brooks, K., Hymel, P., Noor, M., Sellers, R., Thomas, A., Stewart, D., Daller, J., Fish, J.C., Gugliuzza, K.K., Bray, R.A.: *Improved flow cytometric detection of HLA alloantibodies using pronase*. Transplantation 2001; 71(3): 422-428.
17. Winfield, J.B., Lobo, P.I., Hamilton, M.E.: *Fc receptor heterogeneity: immunofluorescent studies of B, T and „third population“ lymphocytes in human blood with rabbit IgG_b4/anti-b₄ complexes*. J. Immunol. 1977; 119: 1778.
18. Winkel, J.G.J., Van de Andersen, C.L.: *Biology of human immunoglobulin G Fc receptors*. J. Leukoc. Biol. 1991; 49: 511.
19. <http://www.bdbiosciences.com>

APOLIPOPROTEÍN B V TERAPEUTICKÝCH
GUIDELEINÁCH ČLENSKÝCH ŠTÁTŮ EÚ
(SYSTEMATICKÝ PREHLAD) A REALITA JEHO
INDIKOVANIA V JEDNEJ FAKULTNEJ NEMOCNICI

GAŠKO, R.^{1,2}, BARLOVÁ, J.³, RAFFAC, Š.³
GELETKOVÁ, S.²

¹Biometrická jednotka
²Oddelenie klinickej biochémie,
Železničná nemocnica s poliklinikou, Košice
³Oddelenie laboratórnej medicíny
Fakultná nemocnica L. Pasteura, Trieda SNP
Košice

SÚHRN

Je podaný stručný prehľad aktuálneho stavu klinických odporúčaní pre prevenciu srdcovocievnych chorôb vo svete a u nás. Na Slovensku bolo od roku 1998 doteraz publikovaných 9 odporúčaní vo vzťahu ku dyslipidémiami a ich manažovaniu, aktuálne z nich 5 až 7 formálne platí. V 3 národných odporúčaní je vložený apolipoproteín B (apo B) ako sekundárny diagnostický alebo liečebný cieľ (I, CZ, CA). V nedávno zverejnených 4. európskych odporúčaní nie je apo B vložený iba z dôvodu jeho nedostupnosti pre všetkých lekárov. Experti očakávajú, že veľmi rýchlo bude apo B, obdobne aj apo AI a niektoré iné nové rizikové faktory pre aterosklerózu do guidelineov vložený. Apo B je vhodným a použiteľným cieľovým parametrom už teraz aj v SR. Vo Fakultnej nemocnici L. Pasteura, Košice, časť Trieda SNP, bolo v roku 2006 indikovaných a vykonaných 26 700 vyšetrení celkového cholesterolu (100%), vyšetrení apo AI bolo z tohto počtu iba 0,06% a apo B rovnako 0,06%.

Kľúčové slová: klinické guideliney, prevencia kardiovaskulárnych chorôb, 4. európske guideliney, apolipoproteín B

ABSTRACT

Apolipoprotein (apo) B is present in atherogenic lipoproteins (remnant Qm and VLDL, LDL and Lp (a)) and apo A is present in non-atherogenic lipoprotein (HDL). Measurement of the apos is automated, standardized, with a small variation of coefficient and does not require fasting blood samples.

The authors reviewed national therapeutic guidelines from the European Union member states. It was founded out, that in none of the EU member states guidelines recommends

Časť tejto práce bola v skrátenej forme prednesená ako poster na XII. Kongrese Slovenskej kardiologickej spoločnosti, 4.-6.10.2007, Bratislava.

Korešpondencia:

MUDr. Rudolf Gaško, Železničná nemocnica s poliklinikou, Masarykova 9, 040 01 Košice, e-mail: gasko@zzke.sk

the replacement of LDL cholesterol measurement by measurement of some of the apolipoproteins. Only 2 member states, plus Canada, include yet apo B in individual risk prediction and as a therapeutic target. In Slovak republic, even though practitioners indicate the measurement of apolipoproteins. If we determine the number of measured cholesterol in Teaching Hospital L. Pasteur, Košice (26 700 in year 2006) as 100%, the number of measured HDL cholesterol was 78,1%, LDL cholesterol 23% – both direct measurement and Friedewald formula, triglycerides 58,5%, apo AI 0,06%, apo B 0,06%. Experts recommended apo B/apo AI ratio as an alternative to TC/HDL-c ratio for risk estimate, and apo B as second goal in special events. Future positioning from the Guidelines is expected to include apos in individual risk prediction and as a therapeutic target. The authors suggest that, in clinical practice, measurement of apo B is necessary for coronary heart disease patients with desirable LDLc levels or when this assessment is not possible and the measurement of apo AI if HDL-c values are very low.

Key words: clinical guidelines, cardiovascular diseases prevention, fourth european guidelines, apolipoprotein B

Diagnostické a liečebné štandardy, známe pod názvom klinické odporúčania alebo guideliney – gajdlajny (clinical recommendations, guidelines) sú metódou, ktorou služby zdravotnej starostlivosti zvyšujú pravdepodobnosť dosiahnutia žiadanej úrovne zdravia jednotlivca a skupín spoločnosti za predpokladu konzistentnosti so súčasnými znalosťami z danej oblasti. Kvalitné guideliney naplňujú charakteristiky vykonateľnosť, účinnosť, výkonnosť, optimálnosť, prijateľnosť a zákonnosť. Špeciálnou charakteristikou je ich obnovovanie, aktuálnosť (up to date) vo väzbe na nové poznatky podľa princípov evidence based medicine.

Klinické odporúčania – guideliney – pre prevenciu srdcovocievnych chorôb – stručný prehľad aktuálneho stavu vo svete

V USA platia odporúčania III. z r. 2001 (18), doplnené v r. 2004 (15). Vzhľadom na kontinuitu s predošlými dvoma guidelineami, komplexnosť, precíznosť spracovania širokým autorským kolektívom a jasné použitie princípov evidence based medicine sa stali rešpektovanými a využívanými nielen v krajine vzniku, ale v podstate celosvetovo. V roku 2005 bolo publikované stanovisko ku manažovaniu krvných lipidov (11). V r. 2007 boli publikované aktualizované odporúčania so zameraním na ženy (25). Štáty Európskej únie (aktuálne 27), presnejšie väčšina štátov, ktorých národné kardiologické spoločnosti sú členmi Európskej kardiologickej spoločnosti (aktuálne 50 štátov) akceptovali 3. európske odporúčania (5). Tieto tak isto predstavujú kontinuitu s predošlými dvoma guidelineami. Veľmi čerstvo boli zverejnené 4. európske odporúčania (7,14).

Jednotlivé, predovšetkým veľké a ekonomicky vyspelé štáty vo svete si vypracovali vlastné guideliney. V nich v rôznej veľkej miere uplatňujú poznatky z epidemiológie výskytu srdcovocievnych ochorení na vlastnom území, avšak bez vý-

nimky všetky sa v základných kritériách diagnostiky a liečby odvolávajú na USA odporúčania.

Väčšina štátov Európy popri akceptácii 3. európskych odporúčaní cestou rôznych odborných spoločností zameraných na aterosklerózu, lipidológiu, verejné zdravie má vypracované vlastné, národné guideleiny. Z nich mnohé boli publikované v r. 2007 (6, 26, 27, 38). Kritériá pre diagnostiku markerov alebo rizikových faktorov aterosklerózy a racionálnu liečbu zvýšených markerov a/alebo príznakov aterosklerózy sa môžu v jednotlivých národných guideleinoch aj podstatne líšiť (1,16).

Klinické odporúčania na Slovensku

Slovenská kardiologická spoločnosť prevzala 3. európske odporúčania v r. 2004 (5). V r. 1998 boli publikované odporúčania v Štandardných diagnostických postupoch (36) aj Cholesterolový konsenzus (30). V r. 2002 bol publikovaný Lipidový konsenzus – 2, prehľadná verzia (9), v r. 2003 plná verzia (28). V r. 2004 boli publikované doporučenia pre manažment dyslipidémii u pacientov s diabetes mellitus (35). V r. 2005 bol vydaný Metodický list racionálnej farmakoterapie pre racionálnu liečbu dyslipidémii, včítane racionálnej diagnostiky (29). Tak isto v r. 2005 boli publikované odporúčania pre diagnózu a liečbu metabolického syndrómu (33). V r. 2006 boli publikované nové odporúčania pre manažment dyslipidémii u pacientov s diabetes mellitus (34). Tak isto v r. 2006 bola publikovaná aktualizácia Lipidového konsenzu – 2 (10). Ani v jednom z uvedených odporúčaní nie je apo B ako kritérium alebo cieľ liečby popísaný, aj keď v textovej časti novších je zmienka o existencii a význame apo B.

Uvedené odporúčania vypracovali, resp. prekladali zo zahraničných odporúčaní, a zaštitili svojou autoritou viaceré slovenské odborné spoločnosti alebo orgány – podrobnosti sú uvedené pri jednotlivých odporúčaníach.

Z uvedených odporúčaní boli niektoré zrušené vydaním novších odporúčaní (30, 35, čiastočne 9, 28).

Ostatné, podľa našich vedomostí, neboli relevantným spôsobom zrušené a formálne preto stále platia (29,36), aj keď obsahovo diagnostickými kritériami a cieľovými hodnotami boli už prekonané.

Apolipoproteín B – vzťah ku riziku a prevencii

Apolipoproteín B-100, skrátene apolipoproteín B (apo B) patrí medzi objavujúce sa nové rizikové faktory pre aterosklerózu (20). Vo viacerých dobre dokumentovaných retrospektívnych, prospektívnych aj intervenčných štúdiách (21,39) s veľmi kvalitným metodickým spracovaním, a zároveň v neprebernom množstve publikácií lokálnejšieho pôvodu alebo významu je dobre dokumentovaný prínos stanovenia apo B oproti stanoveniu zavedených lipidových parametrov – LDL-cholesterol a non-HDL cholesterol – pri určovaní rizika vzniku aterosklerózy, alebo niektorých závažných komplikácií aterosklerózy (2, 12, 17, 18, 23). Kvôli objektívite treba poukázať aj na menší počet rovnako kvalitných štúdií, ktoré výhodu apo B voci lipidom nepotvrdzujú (19,32) alebo popisujú „nerozhodný“ výsledok (37).

Obdobne, ako viaceré iné nové rizikové faktory, apo B zatiaľ nebol implementovaný do nadnárodných guideleinov.

Bol však už pridaný do nových algoritmov, ktoré vypočítávajú predikciu globálneho srdcovocievneho rizika (31). Na rozdiel od iných nových rizikových faktorov už bol pridaný do niektorých národných štandardov.

Apolipoproteín B a aktuálne platné guideleiny.

V tabuľke 1 je prehľad členských štátov EÚ a guideleinov pre prevenciu srdcovocievnych chorôb, ktoré v nich platia. Veľká časť štátov, ale nie všetky, prevzala 3. odporúčania Európskej kardiologickej spoločnosti (5). Podľa našich zistení 17 štátov má vypracované vlastné, národné guideleiny, niektoré z týchto štátov majú aj viaceré guideleiny.

Tab. 1.

Kardiologická spoločnosť	ESC (2003)	Národné guideleiny
Austrian SC	X	X
Belgian SC	X	X ⁰⁷
British CS		X
Bulgarian SC		
Czech SC	X	A ⁰⁷
Cyprus SC	X	
Danish SC	X	
Estonian SC	X	X
Finish CS	X	
French SC	X	X
German CS	X	X
Hellenic CS	X	X
Hungarian SC	X	X
Irish CS		
Italian FC		A
Latvian SC	X	
Lithuanian SC	X	
Luxembourg SC		
Malta		
Netherlands SC	X	X
Polish CS	X	X ⁰⁷
Portuguese SC	X	
Romanian SC	X	
Slovak SC	X	X
Slovenian SC		X
Spanish SC	X	X ⁰⁷
Swedish SC		X
(Scotland)		X ⁰⁷
(Canadian SC)		A

ESC (2003) – krížikom je označené schválenie guideleinu ESC národnou spoločnosťou, s prípadným prekladom do národného jazyka.

Zdroj: www.escardio.com

Národné guideleiny – vydané národnými kardiologickými, aterosklerotickými alebo lipidovými spoločnosťami od roku 2001 doteraz. A = apolipoproteín B je uvedený ako cieľový parameter. 07 = guidelein bol publikovaný v r. 2007

Dva štáty (I, CZ) majú v národných guideleinoch uvedené ako jeden zo sekundárnych diagnostických a liečebných cieľov stanovenie Apo B (38). V poradí prvým štátom, ktorý mal do národných guideleinov zakomponované stanovenie

apo B, je Kanada. Prvýkrát publikovala takéto guideleiny v r. 2003 (3, 13), v roku 2006 boli so zachovaním apo B inovované (4,24).

V ČR bolo už pred prijatím guideleinov informovanými lekármi v praxi stanovenie apo B indikované v podstatne vyššej miere než na Slovensku.

Tab. 2. **Dynamika počtov vykonaných laboratórnych vyšetrení v rokoch 2004 až 2006**

Zdroj: Zdravotné poisťovne, Česká spoločnosť klinické biochemie

	2004	2005	2006
SR			
Celkový cholesterol	100,0%	100,9%	100,3%
HDL-cholesterol	53,1%	54,9%	54,9%
Apolipoproteín B	0,5%	0,5%	0,5%
ČR			
Celkový cholesterol	100,0%	100,6%	101,0%
HDL-cholesterol	53,9%	60,5%	63,8%
Apolipoproteín B	2,2%	2,3%	2,4%

České odporúčania uvádzajú: Apolipoproteín B je vhodným sekundárnym cieľom všade tam, kde možno predpokladať prítomnosť zvýšenej koncentrácie malých denzných LDL alebo prítomnosť väčšieho množstva ďalších aterogénnych lipoproteínov bohatých na triacylglyceroly, predovšetkým u pacientov s hypertriglyceridémiou, diabetes mellitus a metabolickým syndrómom. Časť týchto pacientov zostáva vo zvýšenom riziku aj pri dosiahnutí cieľovej hodnoty LDL-cholesterolu, pokiaľ nedosahujú aj cieľové hodnoty apo B.

Cieľové hodnoty Apolipoproteínu B:

Všeobecná populácia	menej než 1,0 g/l
Bez KVO, riziko DM2, DM1 s MAU	menej než 0,9 g/l
Prítomnosť KVO	menej než 0,8 g/l

V 4. európskych odporúčaníach je v krátkej stati venovanej apo B uvedené: „Meranie apo B je užitočným indikátorom rizika aterosklerózy, predovšetkým u pacientov s hypertriacylglycerolémiou a u ľudí s normálnou koncentráciou LDL-cholesterolu. Hodnoty vyššie než 150 mg/dl sú jasne združené so zvýšeným rizikom. Napriek tomu, pretože meranie apo B nie je všeobecne dostupné všetkým lekárom v Európe, nie je vložené do týchto odporúčaní pre hodnotenie kardiovaskulárneho rizika.“ (14, s. S57). (Hodnota 150 mg/dl = 1,5 g/l) Zvýrazňujeme, že jediným deklarovateľným dôvodom nezariadenia apo B do 4. európskych odporúčaní je nedostupnosť jeho merania pre všetkých lekárov.

Indikovanie apolipoproteínov v jednej fakultnej nemocnici

Fakultná nemocnica L. Pasteura, časť Trieda SNP, Košice, je plnoorganizovaná samostatná nemocnica s poliklinikou. Klinickobiochemické vyšetrenia pre ňu zabezpečuje

predovšetkým Oddelenie laboratórnej medicíny (OLM). Vyšetrenia cholesterolu, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu (výpočtom podľa Friedewalda aj priamym meraním) apo B a apolipoproteínu AI z rutínnej indikácie, teda nie z dôvodu akejkoľvek výskumnej úlohy, pre túto nemocnicu v r. 2006 vykonávalo iba OLM, ostatné laboratória fakultnej nemocnice nie. Počet vykonaných vyšetrení lipidov a lipoproteínov za rok 2006 je uvedený v tabuľke 3.

Tab. 3. **Počet vyšetrení laboratórnych parametrov vo fakultnej nemocnici za rok 2006**

Parameter	Kód	Počet výkonov	Z toho % patologických
Apolipoproteín A	4550	17	11,70%
Apolipoproteín B	4551	17	5,88%
Celkový cholesterol	3674a	26 686	25%
HDL-cholesterol	3675a	15 550 1	5%
LDL-cholesterol priamy	3676a	385	12%
Triacylglyceroly	3677a	21 167	20%
LDL-cholesterol Fried.		13 587	20%

Vyšetrení apo B aj apo AI je mizivo málo, dôvody nám nie sú známe. Akýkoľvek ďalší rozbor by bol málo relevantný.

ZÁVER

V štátoch EÚ začína proces postupnej akceptácie 4. európskych odporúčaní, s očakávanými národnými modifikáciami. 4. európske odporúčania medicínsky neodmietli stanovovanie apo B ako sekundárneho kritéria.

S cieľom lepšej primárnej prevencie zdravých aj lepšieho manažovania určitých skupín pacientov je vhodné aj v našej republike využívať stanovovanie apolipoproteínu B podľa Českých guideleínov.

LITERATÚRA

1. Ballantyne, Ch., Arroll, B., Shepherd, J.: *Lipids and CVD management: towards a global consensus*. Eur. Heart J. 2005; 26(21): 2224–2231.
2. Barter, P. J., Ballantyne, C. M., Carmena, R. et al: *Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guiding therapy: Report of the thirty-person/ten-country panel*. J. Intern. Med. 2006; 259(3): 247–258.
3. Canadian Diabetes Association. *2003 clinical practice guidelines for the prevention and management of diabetes in Canada*. Can. J. Diabetes. 2003; 27 (Suppl 2).
4. Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert Committee. *Dyslipidemia in adults with diabetes*. Can. J. Diabetes. 2006; 30: 230–40.

5. **De Backer, G., Ambrosioni, E., Borch-Johnsen, K. et al.:** *European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice.* Eur Heart J. 2003; 24(17): 1601–1610. Idem. Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehab. 2003; 10(Suppl. 1): S1–S78. Slovenský preklad: Súhrn európskych odporúčaní pre prevenciu srdcovocievnych chorôb v klinickej praxi. Cardiol. 2004; 13(3): 167–178.
6. **De Laet, Ch., Neyt, M., van Brabant, H., Ramaekers, D.:** *En collaboration avec Domus Medica, Departement de recherche: Rapid Assessment: Prévention cardiovasculaire primaire dans la pratique du médecin généraliste en Belgique.* KCE reports vol. 52B, April 2007, 96 pages.
7. **European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary.** Fourth 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 experts). Eur. J. Cardiovasc. Prev. 2007; 14(Suppl. 2): E1–E40.
8. **Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III).** Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection. JAMA. 2001; 285(19): 2486–2497.
9. **Filipová, S., Bada, V., Rašlová, K.:** *Odporúčania pre diagnostiku a liečbu dyslipoproteinémií dospelých.* Lipidový konsenzus – 2. Prehľadná verzia. Cardiol. 2002; 11(1): 47–55.
10. **Filipová, S., Fábryová, L., Mikeš, Z., Tkáč, I.:** Aktualizácia Lipidového konsenzu – 2. Cardiol. 2006;15(6):252–255.
11. **Fletcher, B., Berra, K., Ades, P. et al.:** *Managing abnormal blood lipids.* A collaborative approach. AHA scientific statement. Circulation 2005; 112: 3184–3209.
12. **Forti, N., Diament, J.:** *Apolipoproteínas B e A-I: Fatores de risco cardiovascular?* Rev. Assoc. Med. Bras. 2007; 53(3): 276–82.
13. **Genest, J. et al.:** Recommendations for the management of dyslipidemia and the prevention of cardiovascular disease: summary of the 2003 update. CMAJ. 2003; 169: 921–4.
14. **Graham, I., Atar, D., Borch-Johnsen, K. et al.:** *European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: full text.* Fourth 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 experts). Eur. J. Cardiovasc. Prev. 2007; 14(Suppl. 2): S1–S113.
15. **Grundy S.M., Cleeman J.I., Merz C.N., et al.:** *Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines.* Circulation. 2004; 110(2): 227–239
16. **Hockley, T.:** *European Cholesterol Guidelines Report.* A Policy Analysis Centre Study on Cholesterol Guidelines. June 2007.
17. **Hsia, S. H.:** *Alternate approaches to managing lipid-associated cardiovascular risk.* Future Lipidology. 2007; 2(2): 157–163.
18. **Hsia, S. H., Pan, D., Berookim, P., Lee M. L.:** *A Population-Based, Cross-Sectional Comparison of lipid-Related Indexes for Symptoms of Atherosclerotic Disease.* Am. J. Cardiol. 2006; 98(8): 1047–1052.
19. **Ingelsson, E., Schaefer, E. J., Contois, J. H. et al.:** *Clinical Utility of Different Lipid Measures for Prediction of Coronary Heart Disease in Men and Women.* JAMA. 2007; 298(7): 776–785
20. **John, J. M., Bhatt, D. L.:** *Emerging risk factors for atherosclerosis.* State-of-the-art paper. Indian Heart J. 2007; 59: 28–37.
21. **Jungner, I., Sniderman, A. D., Furberg, C. et al.:** *Does Low-Density Lipoprotein Size Add to Atherogenic Particle Number in Predicting the Risk of Fatal Myocardial Infarction?* Am. J. Cardiol. 2006; 97: 943–946.
22. **Lima, L. M., Carvalho, M., Sousa, M. O, Moreira, L.:** *Apo B/Apo A-I Ratio and Cardiovascular Risk Prediction.* Arq. Bras. Cardiol. 2007; 88(6): e140–e143.
23. **Lind, L., Vessby, B., Sundström, J.:** *The Apolipoprotein B/AI Ratio and the Metabolic Syndrome Independently Predict Risk for Myocardial Infarction in Middle-Aged Men Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26; 406–410.
24. **McPherson, R. et al.:** *Canadian Cardiovascular Society position statement – recommendations for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease.* Can. J. Cardiol. 2006; 22: 913–927.
25. **Mosca, L., Banka, C. L., Benjamin, E. J. et al.:** *Evidence-Based Guidelines for Cardiovascular Disease Prevention in Women: 2007 Update.* Circulation. 2007;115:1481–1501.
26. **National Institute for Health and Clinical Excellence:** *Cardiovascular risk assessment: the modification of blood lipids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease.* In progress. Expected date of issue: January 2008. www.nice.org.uk
27. **Podolec, P., Kopec, G., Pajak, A. et al.:** *Wytyczne Polskiego Forum Profilaktyki Chorób Układu Krążenia dotyczące oceny ryzyka sercowo-naczyniowego. Polish Forum for Prevention Guidelines on Cardiovascular Risk Assessment.* Kardiol. Pol. 2007; 65: 100–104.
28. **Rašlová, K., Filipová, S., Mikeš, Z., Tkáč, I., Turay, J.:** *„Lipidový konsenzus – 2“ Odporúčania pre optimálnu diagnostiku a liečbu dyslipoproteinémií u dospelých.* Interná medicína. 2003; 3(1): 10–18.
29. **Rašlová, K., Tkáč, I., Fábryová, L.:** *Racionálna liečba dyslipidémií.* Metodický list racionálnej farmakoterapie 36, 2005; 9(1): 1–8.
30. **Rašlová, K., Turay, J., Mikeš, Z.:** *Smernice pre optimálnu diagnostiku a liečbu hyperlipoproteinémií u dospelých „Cholesterolový konsenzus“.* Cardiol. 1998; 7: K/C1–7.
31. **Ridker, P. M., Buring, J. E., Rifai, N., Cook, N. R.:** *Development and Validation of Improved Algorithms for the Assessment of Global Cardiovascular Risk in Women. The Reynolds Risk Score.* JAMA. 2007; 297: 611–619.
32. **Ridker, P. M., Rifai, N., Cook, N. R. et al.:** *Non-HDL Cholesterol, Apolipoproteins A-I and B100, Standard Lipid Measures, Lipid Ratios, and CRP as Risk Factors for*

- Cardiovascular Disease in Women*. JAMA. 2005; 294: 326–333.
33. **Tkáč, I.:** *Nové odporúčania panelu expertov Diagnóza a možnosti liečebného ovplyvnenia metabolického syndrómu*. Interná medicína. 2005; 5(4): 12–15.
34. **Tkáč, I., Fábryová, L., Rašlová, K.:** *Manažment dyslipidemií u pacientov s diabetes mellitus*. Vyjadrenie stanoviska Slovenskej diabetologickej spoločnosti a Slovenskej asociácie aterosklerózy. Interná medicína. 2006; 6(1): 45–50.
35. **Tkáč, I., Fábryová, L., Klimeš, I., Mokán, M., Némethyová, Z., Rašlová, K., Šeböková, E.:** *Manažment dyslipidemií u pacientov s diabetes mellitus*. Vyjadrenie stanoviska Slovenskej diabetologickej spoločnosti. Diabetes Obez. 2004, 4(7): 92–99.
36. **Turay, J., Vozár, J.:** *Dyslipoproteínémie*, s. 218–223. In: **Trnovec, T., Dzúrik, R.** (eds.): *Štandardné diagnostické postupy*. Martin, Osveta, 1998, 832 s.
37. **Van der Steeg, W.A., Boekholdt, S.M., Stein, E.A. et al.:** *Role of the Apolipoprotein B-Apolipoprotein A-I Ratio in Cardiovascular Risk Assessment: A Case-Control Analysis in EPIC-Norfolk*. Ann. Intern. Med. 2007; 146: 640–648.
38. **Vaverková, H., Soška, V., Rosolová, H., et al.:** *Doporučení pro diagnostiku a léčbu dyslipidemií v dospělosti, vypracované výborem České společnosti pro aterosklerózu*. Čas. Lék. čes. 2007; 146(6): I–XV. Idem. Vnitřní Lek. 2007; 53(2): 181–197. Idem. Cor et Vasa, 2007; 49(3): K73–K86.
39. **Walldius, G., Jungner, I.:** *The ApoB/Apo A-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy - a review of the evidence*. J. Int. Med. 2006; 259(5): 493–519.

KRÁTKE ORIGINALNE ZDELENIA

**EPIDEMIOLOGIA DIABETES MELLITUS 2. TYPU
A JEHO KOMPLIKÁCIÍ U HOSPITALIZOVANÝCH
PACIENTOV NA INTERNEJ KLINIKE V OBDOBÍ
JANUÁR - AUGUST 2006**

**BABČÁK, M.¹, MERČIAKOVÁ, N.¹, RÁCZ, O.²
SLIVKA, M.¹, NÉMETH, F.³**

¹Prvá interná klinika I, FN J. A. Reimana v Prešove

²Ústav patologickej fyziológie LF UPJŠ, Košice,

³Geriatrická klinika, FN J. A. Reimana v Prešove

Artérová hypertenzia a diabetes mellitus sú chronické ochorenia, ktoré sa vo výraznej miere podieľajú na vzniku závažných makrovaskulárnych a mikrovaskulárnych komplikácií. V dospeljej populácii sa odhaduje prevalencia artériovej hypertenzie v hodnote od 15–20 % na základe mnohých epidemiologických štúdií

Skupina diabetikov predisponuje k artériovej hypertenzii 2× viac ako nediabetikov. Postihuje zhruba 40 % mužov a 53 % žien. Diabetes mellitus je sprevádzaný 2–3 násobným výskytom artériovej hypertenzie, ako u nediabetickej populácie. Dôležitou črtou je prítomnosť obezity, inzulínovej rezistencie a hyperinzulinizmu. V našom súbore bola artérová hypertenzia prítomná u 81,22 % diabetických pacientov. Z tohto počtu tvorili muži 37,71 % a ženy 62,19 %. Tieto výsledky možno interpretovať v súvislosti s vyšším počtom sledovaných diabetičiek v súbore v porovnaní so sledovanými diabetikmi. V sledovanom súbore diabetikov 2. typu v Prahe malo hypertenziu 44 % mužov a 56 % žien.

Obezita je dôležitou črtou a súčasťou diabetes mellitus. Dôležitý je nielen stupeň obezity, ale aj distribúcia viscerálneho tuku a doba trvania obezity. V pražskom registri diabetikov malo BMI vyšší ako 30–26,6 % všetkých diabetikov 2. typu. BMI vyšší ako 35 malo 8,9 % všetkých diabetikov 2. typu. Nadváhou trpelo 38,3 % diabetikov druhého typu. Normálnu telesnú hmotnosť malo len 16,2 % analyzovaných diabetikov druhého typu. V našom súbore sme namerali priemerný BMI 30,04. Z nášho analyzovaného súboru malo normálnu telesnú hmotnosť 21,94 % pacientov, nadváhu malo 38,84 % pacientov a obezitu 39,2 % pacientov.

V Európe je obéznych 10–25 % populácie a 50 %–70 % má nadváhu. BMI väčší ako 31 kg/m² u žien predstavuje 40 násobné riziko vzniku cukrovky oproti chudým ženám.

Koronárna ateroskleróza a jej dôsledky v podobe manifestnej ischemickej choroby srdca narastá významným spôsobom u diabetikov. V nami sledovanom súbore pacientov sme mali prevalenciu ischemickej choroby srdca u 82,93 % pacientov s diabetes mellitus 2. typu. Tento údaj je vysoko štatisticky významný. Častým prejavom u diabetikov je asymptomatická (tichá) ischemia myokardu, mestnavé zlyhanie srdca, dysrhythmie a náhla srdcová smrť

Diabetici majú horšiu prognózu po prekonanom IM, nielen krátkodobo ale aj dlhodobo. V našom súbore sme diagnostikovali nový infarkt myokardu u 10,58 % pacientov diabetikov druhého typu. Zistené údaje boli na hranici štatistickej významnosti.

Cerebrovaskulárne príhody sú u diabetikov spájané so súčasným výskytom artériovej hypertenzie. Ich výskyt stúpa s vekom, stupňom artériovej hypertenzie a kardiomegálie. Mortalita na cievne ochorenia mozgu je 2–3× vyššia u diabetikov ako u nediabetikov. V nami sledovanom súbore prevalencia CMP bola prítomná u 19,79 % nami analyzovaných diabetikov 2. typu. Tento údaj je vysoko štatisticky významný a porovnateľný s odbornou domácou i zahraničnou literatúrou. Vo svetovej literatúre sa udáva, že prevalencia CMP je na úrovni 5–13 % diabetikov 2. typu. Novú cievnu mozgovú príhodu v hodnotenom časovom období malo 4,09 % diabetikov 2. typu. Tento údaj je na hranici štatistickej významnosti.

Diabetická retinopatia je závažnou súčasťou DM 2. typ. Riziko oslepnutia u diabetika je 10–20× vyššie ako u nediabetika. Diabetická retinopatia bola prítomná u 36,5 % pacientov v nami sledovanom súbore. Získané hodnoty sú na hranici štatistickej významnosti. V roku 1959 bola prevalencia DR vo svete 8 %, v roku 1980 už 26 %. Vo veku 45–74 rokov sa podieľala cukrovka až 20 % ako príčina oslepnutia.

Klinickým prejavom diabetických mikroangiopatických zmien je aj diabetická nefropatia. Celková prevalencia u DM 2. typu je 10–20 %. Riziko renálnej insuficiencie u tohto typu ochorenia je 7× vyššie ako u nediabetikov. V nami sledovanom súbore bola diabetická nefropatia prítomná u 36,5 % diabetikov 2. typu. Získané údaje boli na hranici štatistickej významnosti. Nefropatia bola stanovená na základe prítomnosti bielkoviny v moči, stanovenej metódou kvantitatívnej proteinúrie. S ohľadom na morbiditu a mortalitu je najzávažnejšou mikroangiopatickou komplikáciou diabetická nefropatia. Diabetická neuropatia sa podľa písomníctva uvádza od 10–90 % v závislosti od klinických prejavov až po neurofyziologické abnormality. Možno predpokladať prevalenciu u 7 % novoobjavených diabetikov a približne u 32 % u 1. a 2. typu diabetes mellitus. Diabetici s autonómnou neuropatiou majú v priebehu 2,5 roka viac ako 50 % úmrtnosť. V našom súbore diabetickú polyneuropatiu malo 30,48 % pacientov z celkového počtu diabetikov 2. typu. Získané údaje boli na hranici štatistickej významnosti. Závažnou komplikáciou DM 2. typu je diabetická noha. Prevalencia je podľa literatúry od 2–7 %. Cieľom Saint-Vincentskej deklarácie je znížiť amputácie u diabetikov o 50 %. V našom súbore bola diabetická noha prítomná u 9,2 % pacientov z celkového počtu hospitalizovaných diabetikov 2. typu. Tieto údaje sú na hranici štatistickej významnosti.

DIAGNOSTIKA DIABETES MELLITUS U DOSPELÝCH A DIAGNOSTIKA GESTAČNÉHO DIABETES MELLITUS.

FRANEKOVÁ, J.

Institut klinické a experimentální medicíny
Pracoviště laboratorních metod, Praha
Ústav klinické biochemie, Fakultní nemocnice Ostrava

V roku 1997 International Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus upravila diagnostické kritéria pre diabetes mellitus (DM).

1. Doporučuje používať na diagnostiku diabetu koncentráciu glukózy v plazme žilnej krvi nalačno (FPG).
2. Cut-off hodnota pre diskrimináciu diabetikov od „nediabetikov“ sa posúva zo 7,8 mmol/l na 7,0 mmol/l. Dôvod: Zvýšená prevalencia a incidencia diabetickej retinopatie od koncentrácie glukózy nad 7,0 mmol/l, redukcia diskrepancie medzi výsledkom FPG a koncentrácie glukózy v plazme žilnej krvi po dvoch hodinách od záťaže behom orálneho glukózového tolerančného testu (oGTT)
3. Za normálnu FPG sa považuje koncentrácia nižšia ako 6,1 mmol/l. Limit pre normálnu FPG je stanovený ako 95. percentil „zdravej“ populácie.
4. Definovaná je porušená glukóza nalačno (IFG) – stav medzi „normál“ a „diabetes“ (kategória nalačno kompatibilná s IGT po záťaži). Identifikuje jedincov s vyšším rizikom.
5. OGTT je považovaný za validný postup pre diagnózu DM ale s horšou reprodukovateľnosťou a vyššou cenou v porovnaní s FPG.
6. Porušená glukózová tolerancia (IGT) – koncentrácia glukózy v plazme žilnej krvi nalačno pod 7,0 mmol/l, dve hodiny po záťaži počas oGTT 7,8–11,0 mmol/l.
7. HbA_{1c} zatiaľ nie je doporučený k diagnostike DM.

Bod č. 3 je predmetom diskusie (viz ďalší text), ostatné body zostali v platnosti

FOLLOW-UP REPORT ON THE DIAGNOSIS OF DIABETES MELLITUS – 2003

V Diabetes Care v roku 2003 je publikovaný skupinou expertov Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes mellitus. **Je doporučené cut-off hodnotu pre IFG posunúť z 6,1 na 5,6 mmol/l.** Dôvod: Posunutie dolnej hranice IFG smerom dolu zvýši senzitivitu a zlepši koreláciu medzi IFG a IGT. Patofyziologická väzba medzi IFG a IGT nie je jasná, ale je známe, že oba stavy predikujú riziko budúceho diabetu a sú rizikovým faktorom kardiovaskulárnych ochorení. Nová cut-off hodnota bola stanovená tak, aby dávala najvhodnejšiu kombináciu senzitivity a špecificity.

Studie DECODE (Diabetes Epidemiology: Collaborative

analysis of Diagnostic criteria in Europe, Diabetes Metabol., 2000) potvrdila, že posunutie cut-off hodnoty pro diagnózu diabetu zo 7,8 mmol/l na 7,0 mmol/l v plazme žilnej krvi je odôvodnené. Počet predčasných úmrtí na kardiovaskulárne ochorenia v skupine diabetikov s FPG 7,0–7,7 mmol/l. bol obdobný ako v skupine diabetikov diagnostikovaných podľa predchádzajúcich kritérií (cut-off 7,8 mmol/l). Obdobný dôkaz však zatiaľ neexistuje pre posunutie cut off hodnoty pre IFG na 5,6 mmol/l. Posunutie cut off hodnoty na 5,6 mmol/l zostáva predmetom diskusie.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA) – 2007

V januári roku 2007 ADA publikuje v Diabetes Care Standards of Medical care in Diabetes – 2007, kde je kapitola I a II venovaná diagnostike a screeningu diabetu. Váha jednotlivých odporúčaní je hodnotená kritériami evidence based medicine pre praktické odporúčania. Aj naďalej je doporučené používať pre diagnostiku DM u dospelých populácie a u detí stanovenie koncentrácie glukózy v plazme žilnej krvi nalačno. OGTT nie je doporučený pre rutinnú klinickú prax ako diagnostický test, je ho ale možné použiť na diagnostiku diabetu ak je u pacienta podozrenie na DM aj napriek normálnej FPG, alebo ak sa u pacienta zistí IFG. Stanovenie HbA_{1c} zatiaľ nie je odporúčané k diagnostike DM. Podľa „Evidence grading“ ADA sú všetky tieto kritéria klasifikované do kategórie E (konsensus expertov a klinická skúsenosť).

Pre IFG a IGT je zavedený pojem „pre-diabetes“. Oba stavy predstavujú rizikový faktor pre rozvoj diabetu a tiež rizikový faktor pre kardiovaskulárne ochorenia.

Pre diagnostiku **gestačného diabetu** je odporúčaný jednodušový screening – 100g oGTT, alebo dvojstupňový postup: screening – 50g oGTT, pre potvrdenie diagnózy 100g oGTT (pripúšťa sa aj oGTT so záťažou 75g glukózy). Skrining gestačného diabetu sa robí po analýze rizikových faktorov a na diagnostiku je doporučený výhradne oGTT. Toto odporúčanie patrí do kategórie C podľa ADA „Evidence grading“ (nie je podložené veľkými kontrolovanými štúdiami)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) – 2005

World Health Organization (WHO) v spolupráci s International Diabetes Federation (IDF) revidovala v novembri 2005 odporúčania vydané WHO v roku 1998. Diagnostickým kritériom pre DM je vyšetrenie koncentrácie glukózy v plazme žilnej krvi – cut off hodnota $\geq 7,0$ mmol/l, a/alebo koncentrácia glukózy v plazme žilnej krvi 2 hodiny po jedle $\geq 11,1$ mmol/l (bez zmeny oproti odporúčaniam z roku 1998). Nezmenili sa ani pravidlá pre klasifikáciu IGT a sú totožné ako u ADA. Na rozdiel od ADA a v súlade s predchádzajúcim doporučením WHO je **IFG definovaná ako koncentrácia glukózy v plazme žilnej krvi 6,1–6,9 mmol/l** (ADA 5,6–6,9 mmol/l). V súlade s predchádzajúcim doporučením WHO je ako diagnostický test pre DM a pre klasifikáciu

glukózo tolerančného statusu doporučený oGTT (2 hodínová koncentrácia glukózy v plazme žilnej krvi, záťaž 75g glukózy). Diagnostika **gestačného diabetu** nie je revidovaná. WHO doporučuje používanie štandardného oGTT (záťaž 75 g glukózy).

WHO a ADA sa zásadne rozchádzajú v cut-off hodnote pre FPG, v preferencii používania oGTT a v postupe pri diagnostike gestačného diabetu.

STANOVISKO ODBORNÝCH SPOLOČNOSTÍ V ČESKEJ REPUBLIKE

V Českej republike bol prijatý konsenzus odborných spoločností - ČDS ČLS JEP a ČSKB ČLS JEP v roku 2003, ktorý bol aktualizovaný v roku 2005. Odborné spoločnosti

zaujali stanovisko k problematike diagnostiky DM a GDM vychádzajúc z odporúčaní ADA aj WHO. Obe odborné spoločnosti toto odporúčanie v aktualizovanej podobe zverejnili na svojich internetových stránkach www.cskb.cz/Doporu-ceni/DM.htm a publikovali v odborných časopisoch.

Zavedenie odporúčaní do klinickej praxe so sebou prináša nemalo problémov, zvlášť v situácii, kedy odporúčania medzinárodných spoločností nie sú jednotné (ADA, WHO, národné spoločnosti). Dokumentujú to aj výsledky Postanalytickej fázy v rámci kontrolných cyklov SEKK. Prieskumu sa zúčastnilo 97 pracovísk (5 pracovísk zo SR). Výsledky ukázali dobrú teoretickú informovanosť pracovníkov klinických laboratórií o danej problematike, ale mierne zaostávajúcu realizáciu odporúčaní v klinickej praxi.

VÝSLEDKY ŠTÚDIE DE-PAC - SÚČASNÝ STAV
SLOVENSKEJ DIABETOLÓGIE

MICHÁLEK, J.

Národný endokrinologický a diabetologický ústav
Lubochňa

V priebehu roku 2004 vzniklo v Bruseli združenie DE-PAC (Diabetes Experts Panel of Accesing Countries) zložené zo zástupcov novoprijatých krajín EÚ (Česko, Poľsko, Slovensko, Maďarsko, Slovinsko, Litva, Estónsko, Lotyšsko, Cyprus a Malta) s cieľom koordinovať spoločné postupy v starostlivosti o diabetes. Jedným z prvých výsledkov bolo uskutočnenie prierezovej štúdie, mapujúcej momentálny stav diabetológie v jednotlivých krajinách (okrem Cypru a Malty). Štúdia bola uskutočnená v prvých 6 týždňoch roku 2005.

Na Slovensku prebehla v 11 centrách a zahrňovala celkovo 1100 pacientov s DM.

Výsledky: z počtu 1 100 pacientov bolo 55 % žien a 45 % mužov v priemernom veku 58,7r. Trvanie DM priemerne 11,1r., priem. hmotnosť: 82,7kg, priem. výška: 167,5cm.

Diagnostikovaný DM1 u 12%, DM2 u 85%. Priemerná hodnota HbA1C v súbore bola 7,6%, hodnoty pod 6,1% dosiahlo 15% pacientov, do 7% dosiahlo 36% pacientov. Vynikajúco kompenzovaných bolo 22%, vyhovujúco 28%, nevyhovujúco 12,7% a zle kompenzovaných 35% pacientov. Z hľadiska liečby PAD bolo: 45% liečených metformínom, 38% derivátmi sulfonylurey, glinidmi 3%, tiazolidindionmi 1,6% a akarbózou 3,8%. Kombinovanú liečbu PAD+inzulín dostávalo 3,8%. Inzulínovými pumpami bolo liečených 0,36% pacientov. Selfmonitoring glykémii vykonávalo 49% a nevykonávalo 46% pacientov. Priemerná denná dávka inzulínu bola 47,6j.

Z hľadiska chronických komplikácií IM prekonal 9% pacientov a rôznymi formami ICHS trpelo 21%. Nefropatia s pozitívnou mikroalbuminúriou bola zistená u 20%, s proteínúriou u 14,1%, v štádiu chronickej renálnej insuficiencie bolo 3,3% pacientov. Retinopatia bola zistená: neproliferatívna u 29%, proliferatívna u 5,1%, makulopatia u 1,3% a faktická slepota u 0,1% pacientov. Diabetická noha s ulkusom u 3,9%, s amputáciou pod Chopartom u 1,5%, nad Chopartom u 0,8%. Z hľadiska akútnych komplikácií výskyt závažnej hypoglykémie bol v súbore 1,9%, hypertonické kóma v 0,09% a ketoacidóza u 0,2% pacientov.

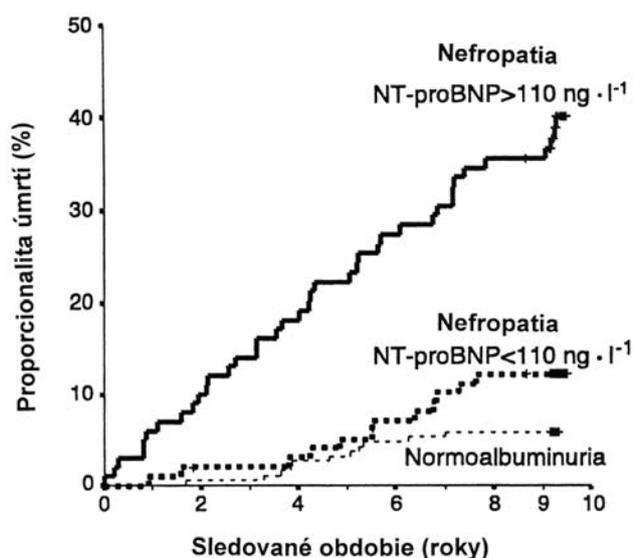
Aj keď je možné, že výsledky sú zafažené istou štatistickou chybou, predsa len poskytujú cenné údaje pre prijatie strategických opatrení v odbore.

PECHÁŇ I, DAŇOVÁ K

Oddelenie laboratórnej medicíny
Národný ústav srdcových a cievnych chorôb, a.s.
Bratislava

Diabetes mellitus patrí medzi najčastejšie civilizačné choroby a všeobecne sa usudzuje, že začína pomaly nadobúdať rozmery celosvetovej epidémie. Svedčia o tom rozsiahle multicentrické štúdie opierajúce sa o údaje renomovaných pracovísk. Udáva sa, že koncom minulého storočia bolo sledovaných okolo 110 miliónov diabetikov, pričom sa usudzuje, že ďalšia tretina obyvateľstva sa klinicky nediagnostikovala a teda ani adekvátne neliečila (cit. podľa 1). Tento počet diabetikov ďalej narastá s perspektívou jeho zdvojnásobenia do roku 2015 (2).

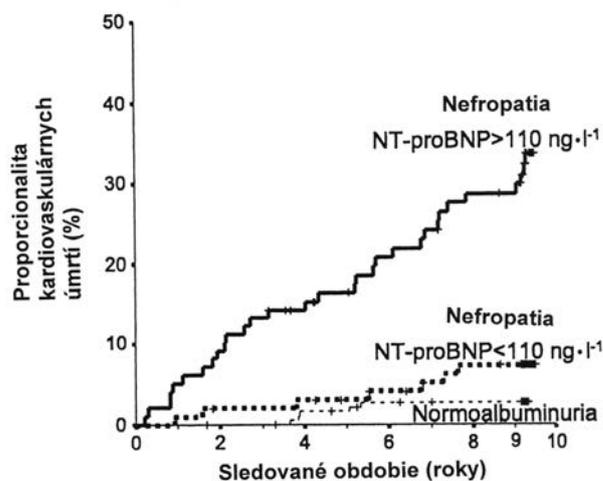
Už dávnejšie publikované práce upozorňujú, že diabetes mellitus sprevádzajú rôzne formy *kardiovaskulárnych chorôb*, pričom práve diabetes sa stal ich dominantným rizikovým faktorom. Podrobné štúdium veľkého súboru diabetikov dovolilo Juutilainenovi a spolupracovníkom (3) priamo označiť diabetes typu 2 za „ekvivalent choroby koronárnych artérií“. Ukázalo sa, že práve choroba koronárnych artérií a rezultujúci akútny infarkt myokardu sú najčastejšími príčinami vysokej mortality pacientov s diabetom, o čom svedčí dlhodobé sledovanie týchto pacientov. K tejto alarmujúcej situácii výrazne prispieva fakt, že progredujúci vývoj komplikácií diabetu, ktorý je v iničiálnych štádiách ľahko klinicky



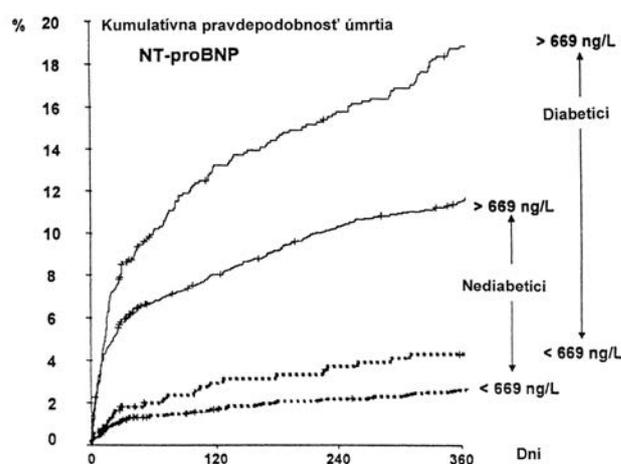
Obr. 1. Kaplanove-Meierove krivky celkovej mortality u pacientov s diabetickou nefropatiou a hladinami NT-proBNP nad a pod hodnotou mediánu (110 ng/l) podľa Tarnowa et al. (10)

diagnostikovateľný, vyvolal snahu nájsť vhodný, finančne menej náročný marker, využiteľný pre rozsiahly skríning u diabetikov už pri ich kontrolách v špecializovaných ambulanciách, ktoré nie sú prístrojovo a často ani odborné vybavené pre komplexnejšie kardiovaskulárne vyšetrenie pacientov.

Pred niekoľkými rokmi sa uviedol do klinickej praxe perspektívny biochemický marker – *natriuretický peptid typu B (BNP)*, ktorý zvýšením hladiny v krvnej plazme reaguje už na mierne zmeny funkcie srdcových komôr, najmä pri ich preťažení, ale aj na zníženú dodávku kyslíka, pri hypertrofii srdcových komôr a už pri skorých formách zlyhávania srdcovej funkcie. Popri kardiológoch a po ich dobrých skúsenostiach pri odhaľovaní skorých zmien srdcovej funkcie týmto markerom siahli po tomto citlivom teste i diabetológovia.



Obr. 2. Kaplanove-Meierove krivky kardiovaskulárnej mortality pacientov s diabetickou nefropatiou a hladinami NT-proBNP nad a pod hodnotou mediánu (110 ng/l) podľa Tarnow et al (10)



Obr. 3. Kumulatívna pravdepodobnosť jednoročnej mortality diabetikov a probandov bez diabetu s vysokými a nízkymi hladinami NT-proBNP podľa James et al. (7)

Prvé skúsenosti publikovali už koncom minulého storočia japonskí autori Yano a spolupracovníci (4), ktorí zistili vyššie hladiny BNP u normotenzných diabetikov s mikroalbuminúriou. Zvýšené hladiny tohto markera u diabetikov so suspektnou kardiálnou dysfunkciou demonštrovali neskôr i ďalší autori (5), ktorí súčasne poukázali i na jeho prediktívnu hodnotu pre vyššiu mortalitu diabetikov v porovnaní s inými skupinami osôb.

K intenzívnejšiemu využívaniu stanovenia hladín tohto natriuretického peptidu v diabetológii došlo po zavedení diagnostických testov, ktorých základom bolo stanovenie jednej z jeho stabilnejších foriem – jeho prekursora *NT-proBNP*. U súboru 300 pacientov s asymptomatickou dysfunkciou ľavej komory srdca sa zistili významne vyššie hladiny tohto markera v porovnaní so súborom nediabetikov (6). Presvedčivé výsledky priniesla i štúdia GUSTO IV (7) analyzujúca celkovo 7 800 pacientov, z ktorých 1677 bolo diabetikov. Ukázalo sa, že medián hladín *NT-proBNP* bol po prijatí pacientov so stenokardiami na intenzívnu jednotku dvakrát vyšší u diabetikov, hoci hladiny TnT boli u oboch skupín pacientov prakticky rovnaké. Hladiny *NT-proBNP* mali výraznú prediktívnu hodnotu: jednoročná mortalita u diabetikov narastala so zvyšujúcimi sa jeho hladinami – v dolnom kvartile hodnôt bola mortalita 3,9%-ná, v hornom už 29%.

Výrazne vyššie hladiny *NT-proBNP* na zistili i u diabetikov typu 2 s klinicky overenými mikro- a makrovaskulárnymi komplikáciami (8). Hladiny tohto markera boli u pacientov s uvedenými komplikáciami v priemer viac ako ako trojnásobne vyššie v porovnaní s diabetikmi bez klinicky detegovateľných cievnych zmien. Išlo o cievne komplikácie pri nefropatiách, chorobe koronárnych artérií, pri periférnych artériopatiách, pričom samotná artériová hypertenzia hladiny tohto peptidu neovplyvnila.

Viacero štúdií sa venovalo stanoveniu hladín *NT-proBNP* u diabetikov s prejavmi mikro- a makroalbuminúrie. Siebenhofer so spolupracovníkmi (9) sledovala skupiny diabetikov a zistila významne vyššie hladiny *NT-proBNP* u pacientov s rôznym stupňom mikroalbuminúrie a vysvetľuje to možnou zníženou reguláciou receptorov pre natriuretické peptidy. Presvedčivé výsledky o možnostiach využitia tohto laboratórneho parametra u pacientov oboch typov diabetu prezentuje tím pracovníkov z renomovaného dánskeho Steno Diabetes Centre (10, 11), ktorí takmer 10 rokov sledovali celkovú a kardiovaskulárnu mortalitu niekoľkých stoviek dlhodobo liečených diabetikov (obr. 1 a 2) a zistili, že diabetická nefropatia a zvýšená incidencia kardiovaskulárnych chorôb predstavuje serióznym rizikovým faktorom skorej úmrtnosti diabetikov. Pozoruhodným zistením bol fakt, že zvýšené riziko zvýšenej mortality týchto pacientov bolo u tej skupiny chorých, u ktorých sa zistili vysoké hladiny *NT-proBNP*. Tieto poznatky sa v plnej miere potvrdili i v rozsiahlej multicentrickej štúdií amerických, švédskych a holandských autorov (7), ktorí zhrnuli výsledky dosiahnuté v rokoch 1999 a 2000 na 458 centrách v 24 krajinách (obr. 3).

Záverom možno jednoznačne konštatovať, že natriuretické peptidy typu B (BNP a najmä *NT-proBNP*) predstavujú nový nezávislý rizikový faktor, ktorým možno získať

objektívnu a užitočnú informáciu najmä o zvýšenom kardiovaskulárnom riziku pacientov s diabetom a umožniť správne určiť stratégiu pre ich cieleňú, efektívnu a skorú liečbu.

LITERATÚRA

1. **Epshteyn, V., Morrison, K., Krishnaswamy, P. et al.:** *Utility of B-type natriuretic peptide (BNP) as a screen for left ventricular dysfunction in patients with diabetes.* Diabetes Care 2003, 26: 2081–2087.
2. **King, H., Aubert, R. E., Herman, W. H.:** *Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numeric estimates, and projections.* Diabetes Care 1998, 21: 1414–1431.
3. **Juutilainen, A., Lehto, S., Rönnemaa, T. et al.:** *Type 2 diabetes as a „coronary heart disease equivalent“: an 18-year prospective population-based study in Finnish subjects.* Diabetes Care 2005, 28: 2901–2907.
4. **Yano, Y., Katsuki, A., Gabazza, E. C. et al.:** *Plasma brain natriuretic peptide levels in normotensive noninsulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria.* J. Clin. Endocrinol. Metab 1999, 84: 2353–2356.
5. **Bhalla, M. A., Chiang, A., Epshteyn, V. A. et al.:** *Prognostic role of B-type natriuretic peptide levels in patients with type 2 diabetes mellitus.* J. Am. Coll. Cardiol. 2004, 44: 1047–1052.
6. **Magnusson, M., Melander, O., Israelsson, B. et al.:** *Elevated plasma levels of Nt-proBNP in patients with type 2 diabetes without overt cardiovascular disease.* Diabetes Care 2004, 27: 1929–1935.
7. **James, S. K., Lindahl, B., Timmer, J. R. et al.:** *Usefulness of biomarkers for predicting long-term mortality in patients with diabetes mellitus and non-ST-elevation acute coronary syndromes (a GUSTO IV substudy).* Am. J. Cardiol. 2006, 97: 167–172.
8. **Beer, S., Golay, S., Bardy, D. et al.:** *Increased plasma levels of N-terminal brain natriuretic peptide (NT-proBNP) in type 2 diabetic patients with vascular complications.* Diabetes Metab. 2005, 31: 567–573.
9. **Siebenhofer, A., Ng, L. L., Plank, J. et al.:** *Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide in type 1 diabetic patients with and without diabetic nephropathy.* Diabet. Med. 2003, 20: 535–539.
10. **Tarnow, L., Hildebrandt, P., Hansen, B. V. et al.:** *Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide as an independent predictor of mortality in diabetic nephropathy.* Diabetologia 2005, 48: 149–155.
11. **Tarnow, L., Gall, M. A., Hansen, B. V. et al.:** *Plasma N-terminal proB-type natriuretic peptide and mortality in type 2 diabetes.* Diabetologia 2006, 49: 2256–2262.

**SÚHRN VIII. ZJAZDU SLOVENSKEJ
SPOLOČNOSTI KLINICKEJ BIOCHÉMIE
1.–3 JÚNA 2008, BRATISLAVA**

A

**VI. SLOVENSKO-RAKÚSKO-ČESKÉHO SYMPÓZIA
NA TÉMU URGENTNÁ MEDICÍNA
A INTENZÍVNA STAROSTLIVOSŤ
2. JÚNA 2008, BRATISLAVA**

BALLA, J.

Analyticko-diagnostické laboratórium, s.r.o.
Prešov

Tradičný spôsob vyšetrenia telových tekutín sa vykonáva v klinickom laboratóriu za dobre definovaných a kontrolovateľných podmienok. Zavádzanie systémov kvality, manažérstva kvality a akreditácia medicínskych laboratórií v EÚ nadobúda čoraz väčší význam. Pokroky v nových technológiách vyúsťujú do vzniku nových, kompaktných a ľahko ovládateľných prístrojov, ktoré umožňujú vykonať laboratórne vyšetrenie blízko pacienta. Point-of-Care Testing (POCT) predstavuje diagnostický proces, ktorý sa realizuje v blízkosti pacienta alebo priamo na mieste poskytovania zdravotnej starostlivosti pacientovi s výsledkom, ktorý vedie k zmene jeho liečby. K prínosom „**point-of-care /near-patient testing**“ (**diagnostiky v blízkosti pacienta**) patria komfort a rýchlosť v akútnych situáciách, zlepšenie zdravotnej starostlivosti o pacienta a niekedy aj úspora nákladov zo skracovania doby ošetrovania. Najväčšie uplatnenie majú POCT na pohotovosti, operačných sálach, ambulanciách a jednotkách intenzívnej starostlivosti. Nevýhody POCT predstavuje obmedzená ponuka vyšetrení a realizácia systému manažérstva kvality, ktoré zahŕňa posudzovanie nových alebo alternatívnych POCT, schvaľovanie a certifikáciu protokolov pre koncových užívateľov, nákup a inštaláciu prístrojov, materiálne zabezpečenie (reagencie), školenie, certifikáciu a re-certifikáciu obsluhujúceho personálu, kontrolu kvality a zabezpečenie kvality. Na akreditáciu POCT prístrojov slúži normatívny medzinárodný dokument ISO/CD 22870, ale každá krajina môže uplatňovať aj svoje vlastné špecifické predpisy (nariadenia, smernice, pokyny). POCT sa považujú za doplnok centrálnej laboratórnej diagnostiky a z uvedených dôvodov ju nikdy nenahradia. Aj keď v praxi POCT neobsluhujú laboratórni pracovníci, v absolútnej väčšine sveta sú za spoľahlivosť POCT výsledkov zodpovedné príslušné klinické laboratóriá. Medicínske laboratóriá tak majú nielen povinnosť sledovať výkon, školenie a zcvik obsluhujúceho personálu, ale sú aj kompetentné posudzovať spoľahlivosť, správnosť, presnosť, kalibráciu, kontrolu kvality a údržbu POCT. Aby vyšetrenie POCT mohlo priniesť potrebné informácie pri riešení zdravotného stavu pacienta je nevyhnutné zabezpečiť jeho kvalitu. Odborný dohľad nad POCT by mala mať Komisia pre POCT, ktorá by pozostávala z medicínskych zástupcov, laboratórnych profesionálov a odborníkov na analytickú kvalitu. Komisia by mala kontrolovať, či

je zavedený systém internej kontroly kvality funkčný a dostatočne citlivý, či sa užívateľ POCT pravidelne zúčastňuje EHK a vyhodnocuje dosiahnuté výsledky. Na slovenskom trhu je dostupná široká paleta kontrolných cyklov EHK pre POCT (Tab. 1). K veľmi dôležitým otázkam patrí aj monitorovanie akceptovateľnej porovnateľnosti medzi výsledkami meraní pomocou POCT a prístrojovej techniky v medicínskom laboratóriu. Ak sa párové výsledky rozchádzajú, potom také merania nemajú praktický význam, pretože sú zdrojom neistoty, chaosu a pacienti nepomáhajú, ale škodia a už nehovoriac o plytvaní finančnými zdrojmi. Aktívna spolupráca medzi užívateľmi POCT a medicínskymi laboratóriami poskytuje medicínskym laboratóriám aj novú reálnu príležitosť aktívne sa podieľať a pozitívne vplyvať na pred analytickú fázu laboratórnej diagnostiky, na ktorú napr. v podmienkach slovenskej laboratórnej medicíny má iba obmedzené možnosti.

Tab. 1. Niektoré možnosti EHK pre POCT na slovenskom trhu

POCT	Labquality	SEKK
POCT Hemoglobín	√	
POCT Glukóza	√	√
POCT HbA1c	√	
POCT Troponíny	√	
POCT Moč	√	√
POCT Hemoglobín	√	
POCT CRP	√	√
POCT Krvné plyny	√	√
POCT Ťarchavosť*	√	√
POCT INR**		√
POCT Sedimentácia Ery		√
POCT DAT	√	
POCT Okultné krvácanie	√	
POCT Mononukleóza	√	
POCT Chrípka	√	
POCT Nefropatia	√	

* - SEKK ponúka kontrolu HCG pri POCT Moč

** - SEKK v spolupráci s UK NEQAS

BÁTOROVÁ, E., DOBÁKOVÁ, E.

Laboratórna diagnostika MEDIREX a.s
Bratislava

Vitamín D patrí do skupiny v tukoch rozpustných prohormónov. Je biologicky neaktívny a aby sa stal aktívnym 1,25 hydroxyvitamínom D, musí sa dvakrát hydroxylovať v pečeni a v obličkách. Dve najvýznamnejšie formy vitamínu D sú vitamín D3 (cholecalciferol) a vitamín D2 (ergocalciferol). Vitamín D3 vzniká z 7-dehydrocholesterolu nachádzajúceho sa v koži po expozícii ultrafialovým žiarením. Viac ako 95 % z 25(OH) vitamínu D merateľného v sére je 25(OH) vitamín D3, zatiaľ čo vitamín 25(OH)D2 dosahuje merateľné hodnoty iba u pacientov, ktorým je podávaný medikamentózne.

Cieľ práce: Porovnať analytické možnosti, výhody, nevýhody a validačné charakteristiky dvoch metód, ktoré boli uvedené v minulom roku do klinickej laboratórnej praxe. Sú to metódy založené na rôznych princípoch merania.

Metódy: 25(OH) D3 sme stanovili HPLC systémom (LC-20 AD, SHIMADZU- Japonsko) s UV detekciou reagenčným kitom firmy Chromsystems.

Princípom HPLC metódy je izolácia 25(OH)D3, D2 metabolitov zo séra deproteináciou, následnou selektívnou extrakciou pomocou SPE kolóniek. Po premytí a elúcii SPE kolóniek sa získaný eluát separuje na analytickej kolóne izokratickým systémom, pričom sa obidva metabolity 25(OH) D3, D2 detegujú na UV-VIS detektore pri 264 nm. Druhou porovnávanou metódou bola metóda diagnostickou súpravou firmy Roche na imunochemickom analyzátore Modular E170 (Roche - Bazilej), založenou na princípe kompetície s elektrochemiluminiscenčnou detekciou.

Výsledky: Vitamín 25(OH)D3 sme vyšetrili v súbore 77 premenopauzálnych žien (20-40 r.) Ako biologický materiál sme použili sérum získané odberovou súpravou so separačným gélom. Získané výsledky sa pohybovali v koncentračnom rozsahu od 12,3 µg/l do 64,9 µg/l. Porovnaním metód sme získali koreláciu ($y = 1,1043x + 0,708$) $R = 0,852$. Výsledky získané metódou založenou na princípe ECL ukazujú v priemere 13 % negatívnu odchýlku od výsledkov získaných metódou HPLC-UV. Nespornou výhodou HPLC metódy fy Chromsystems je simultánne stanovenie aj metabolitu 25(OH) D2, čo však má význam iba u suplementovaných pacientov vitamínom D2.

Záver: Porovnaním výsledkov metód sa zistila dobrá korelácia. Napriek tomu, že HPLC metóda patrí medzi doporučované metódy, automatizované stanovenie 25(OH) D3 princípom ECL prináša nesporné množstvo výhod pred dennú laboratórnu prax.

BEHÚLOVÁ, D.¹, HOLEŠOVÁ, D.¹, VASILENKOVÁ, A.¹
LALUHOVÁ-STRIEŽENCOVÁ, Z.¹, PEVALOVÁ, E.²
TUHARSKÝ, J.², PONEC, J.¹

¹Oddelenie laboratórnej medicíny

²Detská klinika anesteziológie a intenzívnej medicíny
Detská fakultná nemocnica s poliklinikou, Bratislava

Úvod: Wilsonova choroba je autozómovo recesívne dedičná porucha metabolizmu medi, ktorá je spôsobená mutáciami v ATP7B géne. Pre ochorenie je charakteristický defekt vylučovania medi z pečene do žlče a narušená inkorporácia medi do apoceruloplazmínu. Dôsledkom je akumulácia medi v pečeni s jej progredujúcim poškodením a následne akumulácia medi aj v extrahepatálnych tkanivách najmä v mozgu, obličkách, očiach, krvi a iných orgánoch. Do cirkulácie sa môže z pečene uvoľniť obrovské množstvo medi, ktoré vedie k intravaskulárnej hemolýze a k prechodnému zvýšeniu koncentrácie voľnej medi v sére a k extrémnemu vylučovaniu medi v moči. Prezentujeme 12-ročnú pacientku, ktorá exitovala napriek intenzívnej liečbe v priebehu niekoľkých týždňov po prvej manifestácii Wilsonovej choroby.

Kazuistika: Dievčatko sa narodilo zdravým rodičom bez príbuzenského vzťahu. Bola liečená pre polinózu, nezaznamenali sa žiadne známky ochorenia pečene. Jej 18-ročný brat je sledovaný pre hyperbilirubinémiu, 16-ročná sestra je mentálne retardovaná. Vo veku 12 rokov v priebehu januára a februára dostala pacientka prvé dve dávky vakcíny proti hepatitíde B. Ťažké sa objavili v marci - intermitentné bolesti brucha, nauzea, vracanie, nechutenstvo, slabosť, apatia, výstup teploty, ikterus. Počas prvého aprílového týždňa bolo dievča hospitalizované v rajónnej nemocnici a po 7 dňoch preložené do fakultnej nemocnice s diagnózou: ťažká neimunologická hemolytická anémia s reaktívnou hepatitídou nejasného pôvodu. Po jednodňovej hospitalizácii nasledoval urgentný transport do detskej fakultnej nemocnice so závermi: fulminantné zlyhanie pečene, ťažká anémia, podozrenie na autoimúne ochorenie. Pacientka bola pri prijatí somnolentná, výrazne ikterická, hypohydratovaná, s miernou hepatomegaliou. Vstupné laboratórne vyšetrenia odhalili ťažký hypokoagulačný stav, závažnú neimunologickú anémiu s retikulocytózou, extrémnu kombinovanú hyperbilirubinémiu, mierne zvýšené aktivity aminotransferáz a zníženú aktivitu alkalickéj fosfatázy v sére a ďalšie nálezy potvrdzujúce akútnu hemolýzu a akútne zlyhanie pečene. Početnými sérologickými, imunologickými a toxikologickými analýzami sa opakovane vylúčili najčastejšie príčiny ťažkej akútnej lézie pečene. Podrobné metabolické vyšetrenie nakoniec odhalilo nálezy typické pre Wilsonovu chorobu, ktorá sa manifestovala ako akútna hemolytická kríza s následným zlyhaním pečene. V sére sa zaznamenala mierne

znižená koncentrácia ceruloplazmínu 0,102...0,155...0,147 g.L⁻¹ (RH 0,15–0,60), koncentrácia celkovej medi bola v norme 17,6...16,6...17,9 μmol.L⁻¹, (RH 11–24), zachytila sa excesívne zvýšená exkrécia medi v moči pripomínajúca akútnu otravu meďou 376...385 μmol/24 h (RH < 0,6), a tak tiež známky závažného renálneho tubulárneho poškodenia. V géne ATP7B sa dokázala prevalentná mutácia H1065Q, druhú mutáciu sa zatiaľ nepodarilo identifikovať. Napriek agresívnej symptomatickej i špecifickej liečbe (penicilamín, zinok), pacientka exitovala na 13. deň hospitalizácie pred plánovanou transplantáciou pečene.

Diskusia a záver: Očkovanie proti hepatitíde B bolo neďávno zaradené do povinného očkovacieho systému u detí v našej krajine. Prezentovaný prípad by si podľa nášho názoru vyžadoval overenie bezpečnosti tejto vakcinácie u pacientov s Wilsonovou chorobou, osobitne s rozvinutým ťažkým poškodením pečene.

BELICOVÁ, Z., BURAN, J.
DOBÁKOVÁ, E., STECOVÁ, A.

Laboratórna diagnostika, Medirex a.s., Bratislava

Medicínske laboratórium je povinné zaviesť a udržiavať komplexný dokumentovaný systém zabezpečenia kvality svojich vyšetrení. Jednou zo zložiek tohoto systému je sledovanie, hodnotenie a riadenie kvality analytickej činnosti – IQC. Vnútorne riadenie analytickej kvality je potrebné vykonávať takým spôsobom, aby boli splnené odporúčania odborných spoločností, regulačných orgánov, ktoré v mnohých aspektoch korelujú s požiadavkami noriem pre posudzovanie kvality a kompetentnosti laboratórií. „Výsledné údaje IQC sa musia zaznamenávať takým spôsobom, aby boli viditeľné trendy a na preverenie výsledkov sa musia aplikovať štatistické metódy“ (STN EN ISO/IEC 17025). „Je dôležité, aby kontrolný systém poskytoval pracovníkom jasné a ľahko pochopiteľné informácie, na základe ktorých môžu robiť odborné a medicínske rozhodnutia“ (STN EN ISO 15189).

Väčšie analytické systémy spravidla majú zabudovanú viac alebo menej vyhovujúcu možnosť sledovania kvality. Výhodou je, ak je spôsob monitorovania jednotný pre všetky metódy a všetky analytické systémy daného pracoviska napr. ako zložka LIS. Ideálne riešenie pre medicínske laboratórium predstavuje IQC, ktoré sa prispôsobuje aktuálnym podmienkam pracoviska a vyhovuje predstavám a požiadavkám užívateľa. Z týchto dôvodov Medirex laboratórna diagnostika riešila vlastný systém vnútorného riadenia kvality ConSys, vytvorený v spolupráci s firmou Biosoft, ktorá je dodávateľom LIS. Pre jednotlivé laboratórne prevádzky Medirex a.s., ktoré sú prepojené centrálnym informačným systémom a pre všetky analytické prístroje biochémie, hematológie a imunológie sa snímajú kontrolné merania v reálnom čase a spracúvajú sa v denných alebo kumulatívnych prehľadoch. Vstupné údaje je možné sledovať pomocou Westgardových pravidiel, na vyhodnotenie výsledkov sa využívajú štatistické nástroje, k vizuálnej orientácii slúžia Levey-Jenningsove diagramy. ConSys umožňuje automatické vyhodnotenie dosahovaných analytických kritérií kvality pre testy, ktoré majú k dispozícii kritické limitné hodnoty. Všetky výsledky kontrolných analýz sa spolu so štatistickými a grafickými prehľadmi uchovávajú po dobu určenú platnou legislatívou.

Systém bol vytvorený tak, aby bol jednoduchý a praktický, prehľadný, účinný a aby poskytoval údaje potrebné k verifikácii metód a k odhadu neistoty meraní.

BIRKOVÁ A, KUŠNÍR J, DUBAYOVÁ K.

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie
a LABMED a.s. Lekárskej fakulty Univerzity Pavla Jozefa
Šafárika, Košice.

Súčasnými metódami využívanými v klinickej biochémii, ktoré sú selektívne, nie je možné obsiahnuť veľké množstvo informácií, ktoré biologický materiál poskytuje. Na analýzu je efektívnejšie použiť biologický materiál bez predchádzajúcej úpravy alebo s minimálnymi úpravami, a preto je strategicky výhodnejšie použiť takzvané profilové analýzy, ktoré dovoľujú komplexnejšie monitorovať celý súbor analytov na základe určitých spoločných kritérií. Profilové analýzy bez individuálneho určovania identity jednotlivých metabolitov obsiahnutých v biologickom materiáli sa nazývajú metabolický fingerprinting. Svojim komplexnejším prístupom umožňuje takýto typ analýzy odhaliť aj nepredvídané zložky. Porovnávanie časovej závislosti profilov biologických materiálov za rôznych fyziologických alebo patologických stavov je veľmi prínosné. Hodnotenie biologického materiálu na základe vytypovaných znakov v profiloch je výhodné najmä ako prvotný náhľad na biologický materiál a jeho rýchlu klasifikáciu. Príkladom je fluorescenčný fingerprint študovaný na našom pracovisku, ktorý umožňuje na základe prítomnosti a koncentrácie fluorofórov prirodzene vyskytujúcich sa v biologickom materiáli jeho rýchle definovanie a typizáciu s možnosťou diagnostickej aplikácie.

BOOR, P.^{1,2}, EITNE, R F.¹, GIOT, L.³
COHEN, C. D.⁴, LINDENMEYER, M.⁴

FOR THE ERCB-CONSORTIUM
MERTENS, P. R.¹, OSTENDORF, T.¹, FLOEGE, J.¹

¹Division of Nephrology and Immunology
RWTH University of Aachen
Germany

²Department of Clinical and Experimental Pharmacotherapy
Research Base of Slovak Medical University, Bratislava
Slovakia

³CuraGen Corporation, Branford, CT
USA

⁴Institute of Physiology and Nephrology Clinic
University of Zürich, Zürich
Switzerland

Background and objectives. The B- and D-isoforms of platelet-derived growth factor (PDGF) are centrally involved in the pathogenesis of mesangioproliferative glomerulonephritis. In experimental mesangioproliferative nephritis, PDGF-DD serum levels, unlike PDGF-BB, increased up to 1000-fold.

Design, setting, participants & measurements. The present study investigated serum PDGF-DD levels by an ELISA and renal PDGF-D mRNA expression by real-time PCR in healthy subjects and patients with various glomerular diseases.

Results. The mean serum PDGF-DD concentration in healthy subjects (n = 42) was 1.17 ± 0.46 ng/ml (range 0.25–2.09 ng/ml). Similar means were observed in patients with focal segmental glomerulosclerosis (FSGS; n = 10), membranous nephropathy (MN; n = 12), and ANCA-positive vasculitis (VAS; n = 8). Patients with IgA-nephropathy (IgAN; n = 33) exhibited significantly higher levels (1.67 ± 0.45 ng/ml), whereas they were significantly lower in patients with lupus nephritis (LN; n = 18; 0.66 ± 0.86 ng/ml). In the whole cohort and the IgAN subgroup, serum PDGF-DD concentrations correlated positively with creatinine clearance and leukocyte counts. Proteinuria exhibited a borderline ($p = 0.056$) negative correlation with serum PDGF-DD levels. Clinical features of IgAN patients observed at the times of elevated PDGF-DD levels (27% of all samples) did not differ from those observed at times of normal PDGF-DD levels. In IgAN patients, where 4 or more samples were available, most patients exhibited minor fluctuations of PDGF-DD serum levels over time. We found no difference in intrarenal PDGF-D mRNA expression in glomeruli or tubulointerstitium of healthy subjects and patients with glomerulonephritides.

Conclusions. Our study demonstrates upregulated serum PDGF-DD levels in patients with IgAN.

BUCOVÁ, M.

Imunologický ústav, Lekárska fakulta UK
Bratislava

Sepsis is characterised by generalized activation of monocyte-macrophage system, vascular endothelial cell wall activation (panendothelitis) with the disturbance of microcirculation and activation of gut epithelium. From ethiopathogenesis of sepsis we can assume some implications for praxis. 1. Very important is the early differential diagnosis between SIRS (systemic inflammatory response syndrome) and sepsis. There are two parameters for this: procalcitonin (PCT) and molecule TREM-1. While PCT rises both in the cases of infectious and noninfectious systemic inflammation, the molecule TREM-1 is specific for sepsis. 2. The main problem of sepsis is the state of immune system activation and hyperinflammation. Systemic inflammation in sepsis is dynamic. The very early phase of sepsis is mostly associated with overactivation of Th1 immune mechanisms that turns early into opposite state – immunosuppression even immunoparalysis. Some patients (small children, old people, polymorbid people, people with craniotrauma) can start sepsis with immunosuppression. The knowledge of sepsis etiopathogenesis, activity of cytokines and other parameters of immunity in different stages of sepsis are very important for accurate sepsis therapy. 3. The cause of inflammation in sepsis is mostly infectious. However, non-infectious factors (hypoxia, hyperglykemia, hypokalemia...) and also endogenous mediators arising during tissue damage (elastase, soluble heparan-sulfat, fibrinogen, extra domene of fibronectine, hyaluronic acid and heat shock proteins...) also potentiate the inflammatory state. 4. We can implicate that for septic patients are necessary both good Th1 immunity and the restraint of hyperactivation. For that reason it might be useful to prepare patients (by immunostimulation) even 3-5 days before large surgical interventions. This way, we could restrain the development of immunoparalysis – the main cause of polymicrobial sepsis. The next therapeutical intervention could be the early antiinflammatory therapy. 5. For the prognosis of sepsis it would be useful to determine the Th1/Th2 state of immunity and the state of inflammation. The easiest is the determination of expression of both HLA-DR and IL-10 on monocytes and the determination of the IL-10/IFN- γ ratio. The ratio between IL-10 and TNF- α tell us something about inflammatory state.

BUCOVÁ, M.

Imunologický ústav, Lekárska fakulta UK
Bratislava**ÚVOD**

Sepsa predstavuje vysokoaktuálny medicínsky a ekonomický problém aj vo vyspelých krajinách. Výskyt ťažkej sepsy každoročne stúpa o 1,5%. Medzi najčastejšie príčiny sepsy patria infekcie gastrointestinálneho traktu, pľúc, genitourinárneho systému a primárne infekcie krvi. V patogeneze sepsy sa uplatňuje celá paleta mikroorganizmov, zložky ich bunkových stien ale aj toxíny a exotoxíny (Alberti a spol., 2002; Annane a spol., 2003).

Hlavnou črtou sepsy je generalizovaná aktivácia monocyto-makrofágového systému, aktivácia cievneho endotelu s poruchou mikrocirkulácie a aktivácia črevného epitelu (Bucová, 2006).

Čo nám dáva poznanie etiopatogenézy sepsy do praxe?

1. Obrovský význam má rozlíšenie SIRS od sepsy. Existujú dva parametre: procalcitonín (PCT) a TREM-1 (Bucová, 2005; Bucová, 2006; Bucová a spol., 2006; Pincíková a spol., 2005). Kým PCT stúpa aj pri neinfekčnom SIRS (syndróm systémovej zápalovej reakcie), stanovenie hladiny sTREM-1 sa zdá byť špecifickejšie pre infekčný SIRS (sepsu).
2. Hlavným problémom sepsy z imunologického hľadiska je stav imunitného systému a hyperinflamácia. Systémový zápal u sepsy nie je vždy v hyperaktivácii, ale je dynamický. Počiatočný hyperinflamačný stav s nadmernou aktiváciou Th1 imunity môže byť rýchle vystriedaný opačným stavom, ktorý sprevádza imunodepresia až imunoparalýza. U niektorých pacientov (oslabených) môže imunodepresia sprevádzať sepsu hneď od začiatku. Nastolenie rovnovážneho stavu je pre pacienta prognosticky najvýhodnejšie. Poznanie etiopatogenézy sepsy, aktivity cytokínov ako aj iných imunitných mechanizmov pacienta v tom-ktorom období sepsy je mimoriadne dôležité z hľadiska jej správnej imunoterapie.
3. Zápal, ktorý sa u pacientov so sepsou rozvíja, má príčinu v prvom rade infekčnú. Neinfekčné príčiny však tiež prispievajú k jeho potenciácii (hyperglykémia, hypokaliémia...). Potenciálnymi faktormi môžu byť aj endogénne mediátory, ktoré sprevádzajú poškodenie tkaniva ako je elastáza, solubilný heparan-sulfát, fibrinogén, extra doména A fibronektínu, kyselina hyalurónová a proteíny teplotného šoku (Johnson a spol., 2004).
4. Z poznatkov vyplýva potreba udržania dobrej Th1 imunity a súčasne zábrana prestrelenej zápalovej aktivity. Predpokladom pre to je, aby pacienti išli na operačný výkon čo najviac kompenzovaní (tým by sa do určitej miery znížilo riziko hyperinflamácie z neinfekčných príčin). Imunologickou predprípravou aspoň časti pacien-

DITTE M.

GPN s.r.o. Ružinovská 10, 821 01 Bratislava

- to - malých detí, starších oslabených pacientov s veľkým operačným výkonom (podpora imunity 3-5 dní pred operačným výkonom) by sa zas zabezpečila dobrá Th1 imunita, čím by sa znížilo riziko rozvoja imunoparalýzy a tým aj polymikróbnej sepsy. Ďalšou možnou prevenciou komplikácií je včasná antiinflatória terapia.
5. Pre prognózovanie stavu pacienta by bolo dobré vyšetriť stav Th1/Th2 imunity a zápalu, a to najlepšie stanovením počtu HLA-DR, poprípade stanovením expresie IL-10 na monocytoch (pokles hodnôt HLA-DR a zvýšená expresia IL-10 na monocytoch svedčí pre poruchu Th1 imunity a rozvoj imunosupresie) a tiež vyšetrovaním pomeru IL-10/IFN- γ . Pomer hladiny cytokínov IL-10/TNF- α nám odhalí reguláciu zápalu.
 6. Poznanie aktivity cytokínov ako aj iných imunitných mechanizmov pacienta v tom-ktorom období sepsy je mimoriadne dôležité z hľadiska jej správnej imunoterapie. Ešte stále sa nájdu vedci, ktorí sa snažia držať koncepcie centrálného mediátora sepsy, t.j. hľadať vinníka (jediného), ktorý by bol za to všetko zodpovedný, a to v nádeji, že keď sa proti tomuto faktoru podá nejaká protilátka, celý problém so sepsou by mohol byť vyriešený (najprv to bolo TNF, neskôr IL-6 a potom ďalšie). A keď terapia monoklonovými protilátkami nebola presvedčivá, z pôvodného imunoterapeutického nadšenia sa vyvinula imunoterapeutická skepsa. Príčina? Všetci pacienti so sepsou sa liečili rovnako, bez ohľadu na ich imunitu, na štádium choroby.
 7. Keďže stav systémovej imunity sa nám odvíja od stavu lokálnej imunity v mieste infekčného ložiska, bolo by dobré poznať stav oboch a prípadnú imunoterapiu zamerať nielen systémovo ale aj lokálne.

LITERATÚRA:

Alberti, C., Brun-Buisson, C., Burchardi, H. et al.: *Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study*. Int. Care Med. 2002; 28: 108-21.

Annane, D., Aegerter, P., Jars-guinestre, M. C., Guidet, B.: *Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003; 1687: 165-172.

Bucová, M.: *Prokalcitonín - prohormón, hormokín, mediátor zápalu, diagnostický a prognostický marker systémového zápalu*. Československá fyziologie 2005; 54(3): 97-108.

Bucová, M.: *Sepsa - etiopatogenéza*. Interná med 2006; 6(4): 204-211.

Bucová, M., Záhorec, R., Buc, M.: *Immunosuppressive effect of recombinant human procalcitonin on mitogenic activity of lymphocytes*. Centr. Eur. J. Immunol. 2006; 31(3-4): 87-93.

Pinčíková, T., Bucová, M., Slobodníková, L.: *Vplyv rekombinantného ľudského prokalcitonínu na fagocytovú a kandidacidnú schopnosť polymorfonukleárných leukocytov a na cídne mechanizmy séra a krvi voči baktériám Staphylococcus aureus a Escherichia coli*. Vnitr. Lek. 2005; 51(12): 1365-1370.

Johnson, G. B., Brunn, G. J., Platt, J. L.: *Cutting edge: An endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4*. J Immunol. 2004; 172: 20-24.

Úvod. Látky prítomné v sére matky v tehotnosti, ktoré sú produktami placentárneho a fetálneho tkaniva sa v sére mimo tehotnosti nevyskytujú. Ich hladiny v sére matky nás informujú o metabolizme plodu, a pomáhajú odhaliť odlišný vývoj dieťaťa. Významnými detektormi odlišného vývoja dieťaťa sú: tehotenský plazmatický proteín A (PAPP-A) a voľný Beta-hCG. Hladiny týchto dvoch látok v sére matky v 11. až 14. týždni gravidity nám slúžia na odhalenie genetických porúch plodu, hlavne triploidii chromozómov 21,18,13, a rôznych numerických porúch sexchromozómov. Bez stanovenia presnej dĺžky gravidity a ďalších parametrov ako je šírka prejasnenia šije plodu, prítomnosť nosovej kostičky a niektorých parametrov cirkulácie u plodu zisťovaných ultrazvukom, nie je možné stanoviť riziko poruchy pre plod. Bez sérových hladín PAPP-A a voľného Beta-hCG je určenie rizika genetickej poruchy u plodu zafažené veľkou chybou. Hladiny PAPP-A dané do súvislosti s dĺžkou gravidity nám pomáhajú pri prognóze porúch rastu plodu a odhaliť tehotnosti ktoré sú zafažené vyššou intrauterinnou mortalitou. Pri stanovovaní rizika výskytu plodu s chromozómovou poruchou je dôležitá spolupráca medzi biochemikom a gynekológom, takáto spolupráca a vzájomné pochopenie problematiky a jej úskalí pomôžu zvýšiť predikčnú hodnotu a znížiť falošnú pozitivitu týchto skríningových vyšetrení.

Interpretácia výsledkov. Hladina voľnej podjednotky Beta-hCG v krvi matky sa za normálnych okolností znižuje s dĺžkou tehotnosti. Hladina PAPP-A sa v krvi matky za normálnych okolností zvyšuje. Pre každú sledovanú tehotnosť predstavujú hladiny PAPP-A a voľného Beta-hCG koeficienty pravdepodobnosti, ktoré po vynásobení s rizikom vyplývajúcim z veku matky nám dávajú nový údaj. Čím je hladina Beta-HCG vyššia a hladina PAPP-A nižšia, tým je riziko výskytu trizómie 21 chromozómu vyššie. Z veku matky a hladín spomenutých látok sa dá odhaliť asi 60% postihnutých plodov pri falošnej pozitivite 5%. Základným predpokladom biochemického skríningu chromozómových chýb je presné ultrazvukové stanovenie dĺžky tehotnosti. V opačnom prípade sa miera detekcie znižuje len na 10%.

U trizómie 21 je v 12. týždni tehotnosti koncentrácia voľnej Beta-hCG v materskom sére vyššia (cca 2 MoM) než u chromozómovo normálnych plodov. Koncentrácia PAPP-A je nižšia (cca 0,5 MoM). Rozdiel v koncentracii voľnej Beta-hCG v materskom sére medzi normálnou graviditou a tehotenstvom s plodom s trizómiou 21 sa s dĺžkou tehotnosti zvyšuje a rozdiel koncentracii PAPP-A sa naopak znižuje.

U trizómii 18 a 13 sú hodnoty voľného Beta-hCG a PAP-

P-A v materskom sére znížené. V prípade aberácií pohlavných chromozómov je hodnota voľnej Beta-hCG v materskom sére normálna a PAPP-A je nízka. Pri zmnožení Y chromozómu sú hodnoty voľnej Beta-hCG v materskom sére výrazne zvýšené, PAPP-A je mierne znížené. Triploidia X je spájaná s výrazne zníženými hodnotami Beta-hCG aj PAPP-A v materskom sére.

Pri kombinovanom vyšetrení prejasnenia šije plodu (nuchálnej translucencie) a biochemických parametrov je možné odhaliť cca 90 % všetkých chromozómových chýb pri falošnej pozitívite 1 %, k tomu treba pripočítať 5 %-nú falošnú pozitívitu skríningu trizómie 21. Podobné výsledky sa dosahujú aj pri skríningu v II. trimestri tehotnosti vyšetrením hladiny AFP, Beta-hCG, voľného Estriolu a inhibínu A, spolu s prvotrimestrovým vyšetrením prejasnenia šije. Pri falošnej pozitívite záchytu trizómie 21,5 % je miera detekcie 85–90 %. Pri vyšetrení len AFP a Beta hCG je záchytnosť 80 % pri relatívne vysokej falošnej pozitívite 15 %. Dvojfázové vyšetrenie v prvom a druhom trimestri tehotnosti pri stanovení všetkých spomenutých parametrov zvyšuje mieru detekcie trizómie 21 na na 94 % pri falošnej pozitívite 5 %.

Interpretácia výsledkov meraných v našich biochemických laboratóriách je obtiažna pre nedostupnosť normálnych hodnôt PAPP-A a Beta hCG v sére. Nepodarilo sa mi dopátrať sa normálnych hladín pre jednotlivé týždne tehotnosti. Dostupným programom je len program FMF „OSCAR“, ktorý na základe v programe zadaných nomogramov stanovuje hodnoty v násobkoch mediánov (MoM) a z nich priamo vypočítava kalkulované riziko. Získať tento program nie je finančne náročné, jeho zakúpenie stojí len 50 Euro, ale je viazané na získanie certifikátu na ultrazvukové stanovovanie prejasnenia šije plodu a opakovanej recertifikácii v polročných intervaloch.

Záverom mojej prezentácie chcem požiadať auditórium na stanovenie normálnych hodnôt pre jednotlivé týždne tehotnosti a dať ich k dispozícii gynekologickej verejnosti. Bez tohoto kroku povinný skrínung PAPP-A a voľného Beta-hCG nebude mať žiaden praktický význam.

WILSONOVA CHOROBA – DIAGNOSTICKÉ MOŽNOSTI V DETSTKOM VEKU

ĐUROVCOVÁ, E.¹, ŠALIGOVÁ, J.²
POTOČŇÁKOVÁ, L.², MAJOROVÁ, E.²
MAJLINGOVÁ, S.², BAJUZOVÁ, M.³
BEHÚLOVÁ, D.⁴

¹Laboratórna diagnostika LABMED, a.s., Košice

²Špecializované poradne DFN, Košice

³Klinika pracovného lekárstva a klinickej toxikológie,
FN L. Pasteura, Košice

⁴Odd. laboratórnej medicíny, DFNSP, Bratislava

Wilsonova choroba je dedičná porucha metabolizmu medi z deficitu lyzozómovej ATP-ázy (ATP7B). Dôsledkom je hromadenie medi v orgánoch. Klinický obraz ochorenia je variabilný, ale vo všeobecnosti platí, že v detskom veku sa Wilsonova choroba zvyčajne manifestuje postihnutím pečene, v neskoršom veku – po druhom decéniu dominuje postihnutie nervového systému.

Neoddeliteľnou súčasťou diagnostiky ochorenia sú laboratórne vyšetrenia. Základný skrínungový diagnostický algoritmus zahŕňa stanovenie ceruloplazmínu v sére, stanovenie Cu v sére a v moči (za bazálnych podmienok a po podaní penicillamínu). Tieto neinvazívne, časovo a finančne nenáročné vyšetrenia sú dostupné vo väčšine zdravotníckych zariadení. Zlatým štandardom v diagnostike je stanovenie medi v sušine bioptickej vzorky pečene. Definitívnym potvrdením diagnózy je DNA analýza v súčasnosti dostupná už aj na Slovensku.

Autori analyzujú prínos jednotlivých laboratórnych parametrov v diagnostike a monitorovaní pacientov, poukazujú na niektoré interpretačné problémy a problematiku dokumentujú kazuistikami vybraných pacientov.

ACUTE KIDNEY INJURY - NAC AS A POSSIBLE RENOPROTECTIVE AGENT?

FRANEKOVÁ, J.¹, JABOR, A.¹
KOMÍNKOVÁ, M.¹, ŠOCHMAN, J.²

¹Pracoviště laboratorních metod
Institut klinické a experimentální medicíny, Praha
²Oddělení kardiologických ambulancí
Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Introduction. Ischemic and reperfusion injury is one of the main causes of acute kidney injury. This risk is common both in native and transplanted kidneys. One of the possible causative factors could be reactive oxygen species (ROS). Therefore, toxic effects of ROS could be counterbalanced by compounds with antioxidant effects - glutathion transferase, superoxide dismutase or catalase. N-acetyl-cysteine (NAC) has been recognized as a renoprotective agent in several experimental studies. The principle of the action involves positive influence on glutathion production and cytokine network function. NAC has been used as a renoprotective agent in patients with the risk of radiocontrast nephropathy. In clinical studies, a decrease of creatinine concentration and thus GFR improvement has been described in patients treated with NAC as a part of preventive regimen before radiocontrast procedures. However, there were some reports describing interference of NAC with Jaffé method of creatinine measurement. The main goal of this study is to evaluate possible interference of NAC with creatinine measurement.

Material and methods. Common dose of NAC in clinical practice is 600 mg two times daily. Recommended plasma concentration for NAC experiments (protocol EP7-A2: Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline – Second Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, Vol. 25, No. 27, 2005) is 10,2 mmol/l, target therapeutic concentration is 3,4 mmol/l. NAC (commercial ampoules for intravenous application, 3 ml, 300 mg per ampoule) was added to three patient plasma pools, final concentrations of creatinine were A = 103,9 µmol/l, B = 204,5 µmol/l and C = 291,5 µmol/l. We tested the interference of NAC with calculated final concentrations of 0–3,07–6,13–9,20–12,26–15,33 mmol/l, the dilution effect was corrected by addition of saline (0,9 g/l). Creatinine was measured by Abbott original procedure (Architect Ci8200, Jaffé principle).

Results. The effect of NAC on creatinine concentration is given in Table 1, the only significant correlation $r = -0,919$ ($N = 6$, $p = 0,0095$) was for the highest creatinine concentration and NAC.

Table 1. The effect of different concentrations of NAC on plasma creatinine (three pools of patient plasma, for initial creatinine concentration – see text)

NAC (mmol/l)	Creatinine A (µmol/l)	Creatinine B (µmol/l)	Creatinine C (µmol/l)
0	102,2	202,4	290,5
3,07	102,8	202,2	290,3
6,13	102,7	200,7	288,6
9,2	102,0	199,3	287,7
12,26	101,4	199,1	288,0
15,33	102,4	200,6	284,3

Discussion. In vivo experiments with NAC as renoprotective agent are inconsistent. For example, Tepel described in clinical study significant decrease in plasma creatinine concentration in NAC treated patients from 220 (± 118) µmol/l to 186 (± 112) µmol/l (Tepel, 2000). On the other hand, Huber did not find any significant changes in creatinine concentration after NAC administration (Huber et al., 2006). The effect of NAC in our in vitro experiment was negligible. The only negative correlation between creatinine and NAC concentration was found in pool C, but difference in creatinine concentration was -2,1 % (-6,2 µmol/l in comparison to initial concentration of 291 µmol/l). However, such decrease is apparently without any practical significance. We did not observe any significant difference for pool A (102,2 µmol/l) or B (202,4 µmol/l). In conclusion, in vitro analytical effect of NAC on plasma creatinine measurement (Jaffé) is negligible. Therefore, it seems to be valuable to evaluate the effect of NAC administration in vivo by creatinine evaluation.

DIAGNOSTIKA PORÚCH METABOLIZMU GLUKÓZY (DM, IFG, IGT, GDM) - SÚČASNÝ STAV

FRANEKOVÁ, J.^{1,2}, JABOR, A.¹, UNGEROVÁ, J.²

¹Inštitút klinickej a experimentálnej medicíny, Praha
²Fakultná nemocnica, Ostrava

Diagnostika DM je založená výlučne na stanovení koncentrácie glukózy v plazme žilnej krvi nalačno, postprandiálne, alebo v rámci glukózového tolerančného testu (oGTT). Ide o identifikáciu zvýšených koncentrácií glukózy. Kritéria sú deklarované na základe epidemiologických štúdií medzinárodnými odbornými spoločnosťami - WHO (Svetová zdravotnícka organizácia) a ADA (Americká diabetologická asociácia). Stanoviská jednotlivých spoločností sa v identifikácii jednotlivých porúch metabolizmu glukózy v niektorých bodoch odlišujú (tbl.1).

Tab.1 Kritéria pre diagnostiku DM, IFG, IGT, GDM

Typ	WHO	ADA
Diabetes mellitus (DM)	7,0 mmol/l (FPG)* 11,1 mmol/l (PP**, oGTT)	7,0 mmol/l (FPG) 11,1 mmol/l (PP**, oGTT)
Porušená glukózová tolerancia (IGT)	<7,0 mmol/l (FPG) a súčasne 7,8-11,0 mmol/l (oGTT)	<7,0 mmol/l (FPG) a súčasne 7,8-11,1 mmol/l (oGTT)
Hraničná glukóza nalačno (IFG)	6,1-6,9 mmol/l (FPG) a súčasne <7,8 mmol/l (oGTT)	5,6 - 6,9 mmol/l (FPG) a súčasne <7,8 mmol/l (oGTT)
Gestačný diabetes mellitus (GDM)	oGTT, 75 g 120': 7,8 mmol/l	oGTT, 100 g (75 g) min 2 patologie 0': 5,3 mmol/l 60': 10,0 mmol/l 120': 8,6 mmol/l 180': 7,8 mmol/l

* - FPG - Koncentrácia glukózy v plazme žilnej krvi nalačno

** - PP - postprandiálne

Diagnostika porúch metabolizmu glukózy musí rešpektovať možnosti laboratórneho vyšetrenia koncentrácie glukózy - biologickú variabilitu, analytickú variabilitu a súčasný stav kalibrácie metódy na stanovenie glukózy. Intra-individuálna variabilita 5,7%, interindividuálna variabilita 6,9%, index individuality 0,8, požadovaná presnosť merania 2,9%, kritická diferencia 17,7%. Koncentrácia glukózy v plazme žilnej krvi, ktorá klasifikuje pacienta do niektorej z uvedených porúch metabolizmu glukózy, musí byť potvrdená opakovaným vyšetrením (najmä v prípade absencie klinických príznakov ochorenia).

Diagnostika DM na základe stanovenia glykovaného hemoglobínu nemá doposiaľ relevantnú oporu.

Patofyziológia vzniku zvýšenej koncentrácie glukózy je pri rôznych poruchách metabolizmu glukózy odlišná a preto výpovedná hodnota merania nalačno a postprandiálne (po záťaži) je rôzna. V skupine netehotných dospelých osôb indikovaných k oGTT predikuje koncentrácia glukózy nalačno poruchu glukózovej homeostázy na koncentrácii 5,6 mmol/l so senzitivitou 69,1% a špecificitou 62,7% (AUC 0,735, analýza 806 oGTT dospelých netehotných mužov a žien). U tehotných žien je prediktívna účinnosť FPG slabšia, na koncentrácii 5,6 mmol/l je senzitivita 18,2% a špecificita 98,9 (AUC 0,641, 2043 oGTT u tehotných žien). Pre dosiahnutie senzitivity 70% by cut off hodnota nalačno musela u tehotných byť 4,5 mmol/l. U tehotných žien je 63% pozitívnych výsledkov identifikovaných len vyšetrením koncentrácie glukózy dve hodiny po záťaži. Glukóza nalačno je pozitívna u 82% dospelých netehotných jedincov a len u 37% u tehotných.

Predovšetkým v diagnostike gestačného diabetu vládne jednotnosť a vytvorenie národných doporučení je užitočné.

DIAGNOSIS OF SEPSIS

GRIESMACHER, A.
SOTTARA, E. ANLIKER, M.

Central Institute of. Medical and Chemical Laboratory
Diagnostics, University Hospital of Innsbruck
Austria

Despite great advancement in the understanding of the pathophysiology and in the development of novel therapeutic approaches, mortality of sepsis still remains unacceptably high. Every year in Germany 60.000 people die of sepsis, which is the 4th frequent cause of death. Adequate laboratory diagnostics represents a major requirement for the improvement of this situation. The term sepsis was defined 1992 by a consensus conference of the American College of Chest Physicians (ACCP) and the Society of Critical Care Medicine (SCCM). The concept of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) was also introduced. Within these new definitions of SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock diagnosis uses mostly clinical symptoms, thus differing from the previously existing microbiological oriented definitions.

Laboratory investigations are important tools in the management and diagnosis of sepsis and can be helpful for the differential diagnosis of sepsis and non-infectious SIRS (IL-6, CRP, procalcitonin, neopterin). In addition procalcitonin and neopterin are useful to say whether the origin of the infection is bacterial or viral. Moreover, these markers shorten the time span of sepsis diagnosis.

Interesting new approaches for a rapid diagnosis of sepsis are new parameters derived from the white blood cell count as high fluorescent lymphocytes or immature granulocytes.

KORELÁCIA MEDZI HLADINOU EXPRESIE WT1 GÉNU MERANOU METÓDOU REAL-TIME PCR A KLINICKÝM OBRAZOM PACIENTA PRI AKÚTNYCH LEUKÉMIÁCH

HANUŠOVSKÁ, E., MARKOVÁ, K., LUKÁČKOVÁ, R.
HOJSÍKOVÁ, I., TOMÁŠOVÁ, R., KRÍŽAN, P.

Oddelenie klinickej genetiky, Medirex a.s.
Bratislava

Hlbšou znalosťou biochemických procesov na molekulárnej úrovni sa v klinickej praxi objavujú stále nové biomarkery. Pri akútnych leukémiách tvorí celkový obraz pacienta viacero faktorov. Ku klasickým biochemickým, hematologicko-morfologickým parametrom a cytogenetiky prichádza na pomoc aj molekulová biológia, ktorá s vysokou citlivosťou zachytáva patologické procesy na úrovni DNA. Asi 40 % akútnych myeoloických leukémií (AML) je charakterizovaných špecifickými chromozomálnymi aberáciami detekovateľnými kvalitatívne metódami cytogenetiky a FISH a kvantitatívne metódou RQ PCR. Keďže približne u 60 % pacientov sa tieto špecifické markery nenašli, hľadali sa nové možnosti monitorovania AML. Na základe celosvetových štúdií sa medzi nové biomarkere dostal aj WT1 gén. Jeho názov pochádza z Wilmsovho tumoru obličiek, avšak neskôr sa zistila aj jeho fyziologická funkcia v iných tkanivách. Je lokalizovaný na 11. chromozóme a kóduje jadrový DNA viažuci proteín. Exóny 7–10 kódujú štyri zinkové prsty, a tým hrá úlohu génového aktivátora aj represora. Je schopný regulovať transkripciu viacerých génov a postranskripčný procesing RNA, čím priamo ovplyvňuje proliferáciu, diferenciáciu a apoptózu. Expresia WT1 génu prebieha hlavne počas embryogenézy a reguluje vývoj močopohlavného ústrojenstva. V dospelosti sa obmedzuje na gonády, slezinu a normálne CD 34+ hemopoetické progenitorové bunky. Hladina expresie WT1 génu v leukocytoch kostnej dreňi zdravých jedincov sa pohybuje rádovo okolo 10^{-2} NCN (Normalizovaný počet kópii) a v periférnej krvi sú o rád nižšie, čiže 10^{-3} NCN, alebo nedetekovateľné. Meraním hladiny expresie v leukemických blastoch boli zistené o 1 až 5 rádov vyššie hodnoty (medián sú 3 rády) oproti fyziologickým hodnotám a naznačujú patológiu. Vyšetrenia nadexpresie WT1 génu sa preferujú z PK kvôli väčšiemu dynamickému rozsahu merania a menšiemu pozadiu fyziologickej expresie. Nadexpresia WT1 génu bola pozorovaná asi u 90% pacientov s AML bez ohľadu na subtyp leukémie. Takisto sa nadexpresia pozorovala u ALL a u MDS s prechodom do AML a pri CML v blastovej kríze.

V našom laboratóriu kvantifikujeme expresiu WT1 génu v leukocytoch metódou Real-time PCR. Podľa amplifikačných kriviek štandardov sa z kalibračnej krivky získava hodnota expresie neznámej vzorky. Kvôli presnejšiemu meraniu expresie WT1 génu v biologických materiáloch, sa súčasne meria aj expresia kontrolného ABL génu a z nameraných hodnôt získame pomerné číslo NCN pre WT1/

ABL. Hodnoty NCN porovnáваме s mediánom fyziologickej hladiny exprese získaným z literatúry. Za rok sme urobili 200 analýz vzoriek, čo bolo 106 pacientov. Našou cieľovou skupinou boli takí pacienti, u ktorých neboli zachytené iné štandardné markery na monitoring ochorenia (t. j. boli negatívne panely pri AML: t(15;17)_PML-RARA, t(8;21)_AML1/ETO, inv(16)_CBFB-MYH11, del(11q23)_MLL, del(12p)_etv6, resp. 5/5q-, 7/7q-. Pokiaľ bola v čase diagnózy vo vzorke nameraná nadexpresia WT1 génu (cca 90%), s postupom úspešnej liečby buď chemoterapiou, alebo transplantáciou krvotvorných buniek, jeho hladina rádo-vo klesala až do negativity a korelovala s klinickým obrazom pacienta. Opätovný nárast exprese WT1 génu bol signálom relapsu. Podobný priebeh mala aj druhá skupina pacientov so špecifickými markermi, kde sme sledovali kopírovanie hladiny exprese WT1 génu s kvantitou iných markerov. Sústredili sme sa prevažne na koreláciu s markerom t(15;17)_PML-RARA. Zaujímavý prípad je jednej pacientky, kde po 7 ročnej remisii ochorenia AML a po autológnej TKB, sa ukázala pozitivita trizómie 8, avšak po pol roku sa zatiaľ neprejavili žiadne známky zvýšenej hladiny exprese WT1 génu a pacientka je po klinickej stránke stále v remisii. Ukázala sa byť užitočná aj detekcia exprese WT1 génu pri myelodisplastickom syndróme (MDS) pri podozrení na prechod do AML s následným monitoringom ochorenia. Pri pacientoch, ktorí neodpovedali na liečbu, ostávala hladina exprese WT1 génu rádovo nad fyziologickými hodnotami. Niekoľko meraní sme robili aj pri ALL. V období blastovej progresie CML (chronickej myeloidickej leukémie) sa hladina exprese WT1 rádovo zvyšuje.

Záverom, by sa dalo zhrnúť, že vo väčšine nami sledovaných prípadov akútnej leukémie bola zistená korelácia medzi nadexpresiou WT1 génu a celkovým klinickým obrazom pacienta. Meranie exprese WT1 génu metódou RQ-PCR môže pomôcť klinikovi pri monitoringu a predikcii ochorenia a vhodnej liečebnej stratégii.

FREKVENCIA VÝSKYTU OLIGOKLONÁLNYCH PÁSOV V CEREBROSPINÁLNO M LIKVORE U PACIENTOV SO SKLERÓZOU MULTIPLEX V ZÁVISLOSTI OD GEOGRAFICKÝCH A ETNICKÝCH FAKTOROV

HENKRICHOVÁ, P., KALNOVIČOVÁ, T., TURČÁNI, P.

Prvá neurologická klinika Lekárskej fakulty UK
Bratislava

Sclerosis multiplex (SM) je chronické autoimunitné demyelinizačné ochorenie centrálneho nervového systému s patologickými znakmi zápalu, demyelinizácie, gliózy a straty axónov. SM je v našej zemepisnej šírke najčastejšou neurologickou príčinou invalidity pacientov mladších vekových skupín. Dobre známym rysom tohto ochorenia je prevalencia SM podľa geografickej lokalizácie a modifikácia klinického obrazu etnickými faktormi. Najznámejší geografický faktor je tzv. severo-južný gradient. Minimálny výskyt SM okolo rovníka a jeho nárast so zemepisnou šírkou sa dáva do súvisu so slnečným svitom a vplyvom vitamínu D na imunitný systém. Geograficky viazané riziko vzniku SM sa viaže na prvých 15. rokov života jedinca. Najnáhyľnejšia na vznik ochorenia je indoeurópska rasa. U Afričanov v rovníkovej Afrike sa ochorenie prakticky nevyskytuje.

Detekcia oligoklonálnych IgG pásov (OP) v cerebrospinálnom likvore (CSF) je dôležitým laboratórnym nálezom podporujúcim diagnózu SM. Frekvencia výskytu OP v CSF u SM pacientov v našich geografických podmienkach je okolo 90%. V krajinách Ázie a v Japonsku je frekvencia výskytu OP v CSF u SM pacientov oveľa nižšia, čo spôsobuje určité diagnostické problémy. Príčinu tohto javu je možno hľadať v senzitivite použitých detekčných metód a v genetických faktoroch.

Na analýzu OP sa používa celá rada metodík, elektroforéza na celulóze, agare, polyakrylamide, izoelektrická fokusácia (IEF) na polyakrylamidovom alebo agarovom géle a pod. Na detekciu OP sa používajú aj rôzne druhy farbenia, napr. s Coomassie blue, Ponceau S alebo Amido black. Všetky tieto metódy a ich modifikácie poskytujú rozdielne výsledky. Za metódu, ktorá pri detekcii OP poskytuje najvyššiu senzitivitu a rozlíšenie sa považuje metóda izoelektrickej fokusácie (Tab. 1).

Ázijský typ SM sa prejavuje ako odlišnú entitu SM charakterizovanú vyšším výskytom viacerých neurologických symptómov pri nástupe ochorenia, prevalenciou rekurentnej akútnej transverznej myelitídy a vysokým výskytom opticko - spinálneho typu SM (neuromyelitis optica - Devicova choroba), pri ktorom je významne nižšia frekvencia výskytu OP ako pri klasickom type SM (Tab. 1, Nakashima et al. 2005). Možným faktorom, ktorý ovplyvňuje pozitivitu alebo negativitu OP je aj lokalizácia mozgových lézií. Zistilo sa, že pozitívny výskyt OP u Japoncov je prevažne asociovaný s léziami periventrikulárnymi a v corpus callosum.

Významnú úlohu vo frekvencii výskytu OP u SM zohráva aj odlišnosť v genetickom základe. Príkladom je napr.

zistenie, že HLA-DR15 je asociovaná s pozitívnym výskytom OP v CSF, kým HLA-DR4 s negatívnou OP u SM pacientov.

Záver: Detekcia OP v CSF podporuje diagnózu sklerózy multiplex. Pozitívnosť OP v CSF je však podmienená etnickými, genetickými a enviromentálnymi faktormi, ako aj lokalizáciou lézií a použitou detekčnou metódou.

Tab. 1. Frekvencia výskytu IgG oligoklonálnych pásov (OP) v cerebrospinálnom likvore (CSF) u pacientov so sklerózou multiplex (SM) a nezápalovými neurologickými chorobami (OND) v niektorých krajinách Európy, Ázie a Ameriky.

Krajina	Metóda	SM (n)	OND (n)	OP SM	OP OND	Cit.
Švédsko	AIEF	58	1014	86%	4%	Kostulas et al., 1987
	AIEF + IB	58	1014	100%	9%	
Nórsko	AIEF+IB	20	127	100%	9%	Lundig et al. 2000
Dánsko	IEF+IB	80	30	96%	7%	Sellebjerg et al. 2000
Nemecko	PIEF+SS	70		94%		Petereit a Reske, 2005
Česko	AIEF+IB	42	15	81%	7%	Bednárová et al., 2005
Francúzsko	IEF	407	463	85%	5%	Bourahoui et al. 2004
Portugalsko	AIEF+IB	92	173	83%	18%	Sa et al., 2005
Holandsko	IEF	143		77%		Koch et al., 2007
Kanada	AE	267	45	93%	8%	Ebers a Paty, 1980
USA	A(P)IEF	72(P) 65(A)		86% 97%		Rudick et al. 1999
USA	AE AIEF+IB	20 20	35	60% 90%	3%	Fortini et al. 1999
Brazília	AIEF+IB	23		91%		Brandao et al. 2005
Čína	PIEF+SS	30	22	63%	1%	Li et al., 2007
India		46		35%		Syal et al., 1999
Thajsko		53		21%		Siritho et al. 2006
Japonsko	PIEF+IB	39		77%		Nakashima et al. 2005
	AE	39		23%		
	PIEF+IB	20 OS		10%		
	AE	20 OS		5%		

IEF (izoelektrická fokusácia), AIEF (IEF na agaróze),

IB (imunobloting), SS (farbenie striebrom),

PIEF (IEF na polyakrylamidovom géle), AE (elektroforéza na agaróze)

CYTOGENETICKÉ VYŠETROVACIE METÓDY V ONKOGENETIKE HEMOBLASTÓZ

HOJSÍKOVÁ, I., TOMÁŠOVÁ, R., LUKAČKOVÁ, R.
BUJALKOVÁ, M., KRÍŽAN, P.

Oddelenie klinickej genetiky, Medirex a.s.
Antolská, Bratislava

Metódy genetickej analýzy sú v súčasnosti neoddeliteľnou súčasťou vyšetrovacích metód rôznych onkologických ochorení. Oddelenie genetiky v rámci Medirex, a.s. sa zaoberá geneticou analýzou pri nádorových ochoreniach krvi (PK) a kostnej drene (KD), ako napr. akútne a chronické leukémie, myeloproliferatívne a lymfoproliferatívne ochorenia, myelodisplastické syndrómy... Základom každého genetického vyšetrenia je cytogenetická analýza a FISH analýza periférnej krvi a kostnej drene. Materiál určený na oba typy analýz sa odoberá a spracúva rovnakým spôsobom, rozdiel je v spôsobe vyhodnocovania získaných preparátov. Bezprostredne po odobratí materiálu do striekačky prepláchnutej heparínom sú vzorky dopravené na pracovisko genetiky. Po 24-hodinovej (resp. 72-hod.) kultivácii a príslušnom spracovaní sú zhotovené preparáty a farbené troma typmi farbenia. Preparáty určené na klasickú cytogenetickú analýzu musia obsahovať dostatok kvalitných metafázových figúr (MF), ktoré vyhodnocujeme pomocou klasického svetelného mikroskopu pri cca 1000-násobnom zväčšení. Takýchto metafázových figúr sme v štandardných podmienkach schopní vyhodnotiť 15–30. Cytogenetika tvorí tzv. „zlatý štandard“ genetickej analýzy hemoblastóz. Dokážeme pomocou nej získať celkový karyotypový obraz pacienta s najrôznejšími typmi štruktúrových a numerických aberácií v čase diagnózy a sledovať jeho zmeny počas liečby. Vzhľadom na zmenenú mitotickú aktivitu v PK a KD je niekedy pomerne ťažké získať dostatok kvalitných MF. Tento problém sme schopní eliminovať pomocou FISH analýzy, pri ktorej pomocou špeciálneho fluorescenčného mikroskopu vyhodnocujeme okrem MF najmä interfázové jadrá, a to v počte cca 200 až 400. Princíp metódy spočíva v hybridizácii fluorescenčne značenej DNA-sondy na určitý úsek DNA vopred zvoleného génu, a to priamo na preparáte. Rádovo vyššia citlivosť metódy nie je jej jedinou výhodou. Takisto môžeme detegovať numerické zmeny chromozómov, ale aj veľmi drobné štruktúrové aberácie neviditeľné pri klasickej cytogenetike a vzhľadom na vysokú citlivosť metódy môžeme zmenu zaznamenať podstatne skôr.

Kombináciou týchto dvoch metód spolu s mimoriadne citlivou molekulovou analýzou ponúkame hematológom pomocnú ruku pri vyšetrovaní pacientov s onkologickým ochorením krvi jednak v čase diagnózy, ale aj pri monitorovaní minimálnej reziduálnej choroby

JABOR A, FRANEKOVÁ J.

**Pracoviště laboratorních metod
Institut klinické a experimentální medicíny, Praha**

Rifle classification

Rifle classification is based on measurable quantities: plasma (serum) creatinine concentration, glomerular filtration rate (GFR) and timed urine volume. There are five stages: Risk, Injury, Failure, Loss and End stage, first three are solely based on measurable quantities, last two on clinical evaluation. The RIFLE system has increased sensitivity for initial stages (increased false positivity, more patients diagnosed) and maximalized specificity for end stage (increased true negativity, less patients treated specifically). In the intensive care settings, R stage was found in about 16 % of patients with mortality about 18 %. Stage I was present in 14 % with mortality rate of 28 %, stage F was found in about 6 % with mortality of 33 %. Rifle classification increased standardization of the evaluation of kidney injury and seems to be a valuable tool for evaluation of at-risk patients. Rifle is used as primary tool for the assessment of prognosis by means of SHARF scoring system.

SHARF scoring system

This scoring system was developed for the intensive care patients and the aim is to predict prognosis of the patient at the time of R stage and 48 hours later. SHARF score is based on laboratory and clinical data: age, serum albumin, prothrombin time, artificial ventilation, heart failure, serum bilirubin, sepsis and hypotension (data are quantitative or categorical). Probability of survival is calculated and expressed in percent.

Role of common markers (expert panel, 2004)

Markers of GFR: serum (plasma) creatinine, creatinine clearance in two-hour urine collection, serum (plasma) urea, clearance of iohexol, iopromide, iothalamate; acceptable, but not suitable for routine use: creatinine clearance in 24-hour urine collection, inulin clearance; unsuitable: PAH clearance.

Markers of kidney perfusion: ultrasound methods; acceptable but not suitable for routine use: angiography, thermolilution, PAH dilution.

Markers of tubular function: timed diuresis, water balance, urinalysis, fractional excretion of sodium, urine osmolality, urine to serum ratio of creatinine; unacceptable and not suitable for routine use: tubular proteins.

Role of specific and new markers

Cystatin C seems to be valuable marker due to practicability (urine evaluation not needed), lack of interferences and high diagnostic effectivity in comparison to creatinine. On the other hand, creatinine is less expensive and guidelines are based on creatinine and creatinine-derived eGFR (estimated GFR). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) is detected in urine as potential marker of tubular injury. KIM-1 is detected very early and seems to be very promising marker. KIM-1 was found in ischemic kidney injury, acute tubular necrosis, toxic damage, proteinuria nephropathy and graft dysfunction. Interleukin 18 is a potential marker of acute kidney injury, especially among patients in intensive care. However, experiences are limited. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is probably one of the early markers of toxic and ischemic injury and other renal pathology.

JABOR, A., ŠTERN, P.

**Katedra klinické biochemie
Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví
Praha**

Současná legislativní úprava umožňuje v České republice specializační vzdělávání v jednotlivých laboratorních oborech a neexistuje výchova univerzálních odborníků pro více laboratorních oborů. Pojem laboratorní medicína nebyl dosud všeobecně akceptován. Postgraduální (specializační) vzdělávání v oboru klinické biochemie je strukturou obdobné pro lékaře a analytiky (dle zákona: klinický bioanalytik pro klinickou biochemii). Pro lékaře je vzdělávání upraveno zákonem 95/2004 Sb. a specializační vzdělávání je ukončeno atestační zkouškou z klinické biochemie, pro analytiky platí zákon 96/2004 Sb. a na konci specializačního vzdělávání skládají atestační zkoušku z vyšetřovacích metod v klinické biochemii. Specializační vzdělávání probíhá formou celodenní průpravy při výkonu povolání na akreditovaném pracovišti (lékaři) nebo na pracovišti s akreditací pro vzdělávací program (analytici). Požadavek, aby celá průprava probíhala na akreditovaném pracovišti, není dosud možné beze zbytku splnit zejména z finančních důvodů.

Celková délka přípravy je 66 měsíců a je stejná pro lékaře i analytiky. Rovnocenná je i povinnost absolvovat 8 týdnů specializačních kurzů (s rozdílným zaměřením pro lékaře a analytiky), 2 týdny výběrových kurzů (doporučených), dále kurz Neodkladná první pomoc a seminář Veřejné zdravotnictví a zdravotnické právo. Během 8 povinných týdnů se testují znalosti standardizovaným testem, dvakrát u každého uchazeče (při vstupu do cyklu a ukončení specializačních kurzů). Vlastní obsah specializačního vzdělávání je předepsán vzdělávacími programy dostupnými na www.ipvz.cz. Zaměření obou vzdělávacích programů je převzato z evropského sylabu (European syllabus for post-graduate training in clinical chemistry, EC4 Document, Version 2, 1999). Z tohoto sylabu dále vycházejí předměty vyučované v povinných specializačních kurzech i okruhy otázek k atestačním zkouškám.

Vzdělávací program pro lékaře má tři části – úvodní praxi (6 měsíců), společný interní základ (24 měsíců) ukončený povinným týdenním kurzem a testem a vlastní specializovaný výcvik (36 měsíců). Z ostatních laboratorních oborů se vyžaduje praxe v oboru hematologie a transfúzní lékařství (v rámci společného interního základu), dále praxe v hematologické, imunologické a mikrobiologické laboratoři. Rozsah praktických dovedností je předepsán v logbooku, který má část pro společný interní základ a pro vlastní specializovaný výcvik.

Vzdělávací program pro analytiky má připraven společný kmen, k němuž se po diskusích přihlásily obory imunologie a alergologie, nukleární medicína (in vitro část) a toxikologie. S hematologií dosud probíhá diskuse o využití principů společného laboratorního kmene. Podobně jako u lékařů je i povinná praxe pro analytiky v laboratoři hematologické, imunologické a mikrobiologické. V logbooku pro analytiky jsou předepsány povinné úkony, které musí uchazeč splnit v předepsaném počtu. Délka vzdělávacího programu pro analytiky je 60 měsíců, ale předchází mu povinná praxe v laboratořích klinické biochemie v délce 6 měsíců.

Celková délka specializačního vzdělávání je shodná pro lékaře i analytiky. Příprava je ukončena u obou větví atestační zkouškou, jejíž struktura je podobná. V praktické části se zjišťují znalosti a dovednosti v analytických metodách a managementu s rozбором metod používaných na pracovišti uchazeče, u lékařů je doplněn rozbor kazuistik, u analytiků se vyžaduje podrobnější znalost pracovních postupů. Teoretická část má 3 otázky (zveřejněné na www.cskb.cz) orientované na kliniku, klinickou biochemii a analytickou chemii (lékaři), resp. na klinickou biochemii, management a analytickou chemii (analytici). Jedna teoretická otázka může být nahrazena obhajobou nepovinné písemné práce.

Specializační vzdělávání a atestační zkoušky organizačně zajišťuje IPVZ, takže jsou požadavky na úroveň požadovaných znalostí a dovedností dlouhodobě vyrovnané. Uvedená struktura vzdělávání v oboru klinické biochemie se používá řadu let, v srpnu 2006 byla zveřejněna poslední aktualizace atestačních otázek. Koncepce vzdělávacích programů umožňuje získání jak hlubokých znalostí ve vlastním oboru klinické biochemie, tak i dostatečnou orientaci v příbuzných laboratorních oborech. Přes řadu změn, které ve vzdělávání v poslední době proběhly, je struktura specializačního vzdělávání v oboru klinické biochemie v ČR určitou zárukou stability v kvalitě našich absolventů.

PROTILÁTKY PROTI CYKlickÝM CITRULÍNOVÝM PEPTIDOM – VČASNÝ A ŠPECIFICKÝ PARAMETER PRE REUMATOIDNÚ ARTRITÍDU

JANOKOVÁ, E., KOLLÁROVÁ, E.

Oddelenie klinickej biochémie, Nemocnica Košice-Šaca a.s.
Košice

ÚVOD: Reumatoidná artritída (RA) je najčastejším reumatickým ochorením, ktoré postihuje 1–2% obyvateľstva, ženy častejšie než mužov. Je charakterizované symetrickým zápalovým postihnutím kĺbov, postupným rozvojom kĺbových deformácií, typickým RTG nálezom a pozitívnymi testami na reumatoidné faktory. Okrem kĺbových prejavov môže byť prítomné postihnutie srdca, pľúc, obličiek, ciev, CNS a iných orgánov. Ochorenie má multifaktoriálny pôvod s genetickou predispozíciou a je sprevádzané autoimunitne podmieneným chronickým zápalovým procesom.

Pre stanovenie diagnózy RA sa využívajú diagnostické kritériá Americkej reumatologickej asociácie z r. 1987 (musia byť splnené aspoň 4 z nich): ranná stuhnutosť kĺbov (min. 1 hod.) > 6 týždňov, artritída aspoň 3 kĺbových skupín > 6 týždňov, artritída kĺbov ruky > 6 týždňov, symetrická artritída > 6 týždňov, reumatoidné uzly, pozitívita RF v krvi, typické RTG zmeny na rukách a zápästiach.

Progresia ochorenia je však často významná oveľa skôr, ako sú splnené tieto kritériá. Bolo dokázané, že najviac deštruktívnych zmien vzniká v prvých 2 rokoch ochorenia a najvyšší terapeutický potenciál má včasná terapia.

Krv pacientov s RA obsahuje mnoho protilátok proti vlastným antigénom. Najznámejšie sú reumatoidné faktory (RF). Test má dobrú senzitivitu pre RA, ale je málo špecifický.

Slubným markerom pre včasnú diagnostiku RA sa ukazuje stanovenie protilátok proti cyklickým citrulínovým peptidom (anti-CCP).

Parameter je vysoko špecifický pre RA (špecificita 94.5%). Protilátky sa vyskytujú už vo včasnom štádiu ochorenia, keď jednoznačné klinické príznaky ešte nie sú prítomné, preto ich prítomnosť umožňuje včasné stanovenie diagnózy a následnú adekvátnu terapiu. Test má aj prognostický význam, jeho pozitívita vysoko zvyšuje pravdepodobnosť, že dôjde k rozvoju agresívneho priebehu ochorenia s ťažkým RTG dokázateľným poškodením kĺbov.

CIEĽ: Cieľom našej práce bolo zistiť prínos stanovenia protilátok proti cyklickým citrulínovým peptidom u pacientov Osteologickej a reumatologickej ambulancie v Nemocnici Košice-Šaca s diagnózou RA alebo inými ochoreniami.

MATERIÁL A METÓDY: Sledovaný súbor tvorilo 195 pacientov, z toho 91 s diagnózou RA a 104 pacientov s inými diagnózami (osteoporóza, bolesť kĺbu, iné artropatie, psoriáza, spondylitída, SLE, Reiterova choroba, Sjogrenov syndróm, lámka, systémová skleróza). Všetci pacienti mali

vyšetrené v sére RF a anti-CCP. Reumatoidný faktor bol stanovený na analyzátore ADVIA 1200 diagnostickou súpravou Rheumatoid factor FS od firmy DiaSys. Stanovenie protilátok proti cyklickým citrulínovým peptidom bolo robené na imunochemickom analyzátore AxSYM setom AxSYM Anti-CCP firmy ABBOTT.

VÝSLEDKY: Priemerná hodnota protilátok proti cyklickým citrulínovým peptidom u pacientov s RA bola 60.43 U/ml a pri iných diagnózach 1.76 U/ml. Priemerná hodnota RF u pacientov s RA bola 131.75 U/ml, u pacientov s inými diagnózami 24.79 U/ml.

V skupine s RA stanovenie protilátok proti cyklickým citrulínovým peptidom bolo pozitívne (nad 2.9 U/ml) u 60 pacientov (65.93%), v skupine s inými diagnózami u 11 pacientov (10.58%). Parameter RF bol pozitívny (nad 25 U/ml) v skupine s RA u 61 pacientov (67.03%), v skupine s inými diagnózami u 27 pacientov (25.96%).

U pacientov s RA boli obidva parametre pozitívne v 52 prípadoch (57.14%), aspoň jeden zo sledovaných parametrov bol pozitívny v 69 prípadoch (75.82%). U pacientov s inými diagnózami jeden pozitívny parameter bol zistený u 38 pacientov (36.54%) a obidva parametre súčasne pozitívne neboli zistené ani u jedného pacienta.

Tab. 1. Percento pozitívnosti sledovaných parametrov u pacientov s reumatoidnou artritídou a inými diagnózami

pozitívita (%)	anti-CCP	RF	aspoň 1 parameter	obidva parametre
iné diagnózy	10.58	25.96	36.54	0
RA	65.93	67.03	75.82	57.14

ZÁVER: Stanovenie protilátok proti cyklickým citrulínovým peptidom má pri diagnostike reumatoidnej artritídy významné miesto. Tieto protilátky sú prítomné už vo veľmi skorých štádiách ochorenia a môžu byť detekovateľné už niekoľko rokov pred výskytom prvých klinických symptómov. Vyšetrenie je vysoko špecifické pre reumatoidnú artritídu. Výsledky vyšetrenia sú okamžite dostupné. V kombinácii s vyšetrením reumatoidného faktora urýchľuje a spresňuje diagnostiku tohto ochorenia a prispieva k zlepšeniu manažmentu liečby, čím dáva pacientom s týmto ochorením nádej na plnohodnotnejší život.

VÝZNAM PRODUKTOV MAILLARDOVEJ REAKCIE V STRAVE DOJČIAT

KLENOVICSOVÁ, K.^{1,2}, SAAVEDRA, G.³,
ZUMPE, C.³, SOMOZA, V.⁴,
BIRLOUEZ-ARAGON, I.³, ŠEBEKOVÁ, K.¹

¹ Oddelenie klinickej a experimentálnej farmakoterapie,
Vedecko-výskumná základňa

Slovenskej zdravotnickej univerzity, Bratislava

² II. Detská klinika Detskej fakultnej nemocnice s poliklini-
kou a Lekárskej fakulty Univerzity Komenského, Bratislava,

³ Polytechnický inštitút LaSalle Beauvais, Francúzsko,

⁴ Nemecký inštitút potravinovej chémie, Garching, Nemecko

Úvod: Tepelnou úpravou potravy (najmä nad 100 °C) vznikajú neenzýmovou reakciou sacharidov s bielkovinami alebo peptidmi tzv. produkty Maillardovej reakcie (MRP). U dospelých je nadmerná konzumácia MRP spojená so zvýšením koncentrácií MRP v plazme a ich zvýšeným vylučovaním do moču, vyvoláva priberanie na hmotnosti, zvýšenie ukazovateľov zápalu a oxidačného stresu, a má nefrotoxické a diabetogénne účinky. Pri priemyselnej výrobe dojčenských formúl (DF) sa vysoké požiadavky na mikrobiologickú nezávadnosť a dlhú skladovateľnosť zabezpečujú ich tepelným spracovaním. Sterilizácia spôsobuje, že obsah MRP v dojčenských formulách je rádovo vyšší ako v materskom mlieku. Doposiaľ nie je jasné, či sa MRP z DF resorbujú do obehu dojčiat, a ak áno, či sú biologicky aktívne.

Cieľom našej práce bolo porovnať koncentrácie MRP (furozín, karboxymetylyzín - CML) v strave dojčiat (formulách na slovenskom trhu a v materskom mlieku), stanoviť koncentrácie MRP v plazme dojčiat a ich renálnu exkréciu, a v prípade zistenia rozdielov sledovať biologické ukazovatele, ktoré by mohli byť nadmernou konzumáciou MRP ovplyvnené.

Metódy: V spolupráci s ambulantnými pediatriami, detskými klinikami a detskými domovmi v Bratislave a Trnave sme zaradili do štúdie zdravé 5-7 mesačné deti, od narodenia exkluzívne dojčené (n = 43; vek: 5,9 ± 1,0 mes.) alebo kŕmené výhradne DF (n = 33; vek: 5,9 ± 1,0 mes.). Deťom sme odoberali krv a jednorazovú vzorku moču. Koncentráciu CML a furozínu sme analyzovali vo vzorkách 16 komerčne dostupných práškových DF vybraných na základe stravovacích dotazníkov detí, vyplnených pediatriami alebo matkami detí (10 počiatočných, 6 pokračujúcich respektíve 7 hydrolyzovaných a 9 nehydrolyzovaných DF). Z každej DF sme odobrali dve vzorky: prvú hneď po otvorení balenia a druhú s odstupom 2-4 týždňov, podľa maximálnej doby spotreby uvedenej na obale. Koncentráciu MRP v materskom mlieku sme stanovili v 56 vzorkách čerstvého materského mlieka, dobrovoľne poskytnutých zdravými matkami zaradených detí (vek matiek: 20-43 rokov).

Výsledky: DF obsahovali priemerne 320-krát vyššie koncentrácie furozínu (p < 0,001) a 70-násobne vyššie koncentrácie CML (p < 0,001) v porovnaní s materským mliekom. Pri porovnaní DF rozdelených na hydrolyzované a nehydrolyzované sme zistili asi 3-násobne vyššie koncentrácie CML (p = 0,007) a furozínu (p = 0,000007) v hydrolyzovaných DF. Počiatočné a pokračujúce DF obsahovali rovnaké koncentrácie MRP.

Koncentrácie MRP boli vo väčšine DF významne vyššie vo vzorkách odobratých 2-4 týždne po otvorení ako hneď po otvorení. Počas skladovania sa zvyšovala koncentrácia furozínu o 26-60 % a koncentrácia CML o 20-55 %.

U polročných dojčených detí bola vypočítaná priemerná denná záťaž CML 0,005-0,031 mg/deň a furozínom 0-0,78 mg/deň. U umelo živých detí bola teoretická denná expozícia CML 25-2800 násobne (0,76-14,14 mg/deň, p < 0,001) a záťaž furozínom 19-3100 násobne (14,74-312,8 mg/deň, p < 0,001) vyššia oproti dojčeným deťom.

Umelo živé deti mali o 37 % vyššie koncentrácie CML v plazme (p < 0,05) a 40-násobne vyššiu renálnu exkréciu CML (p < 0,00001) v porovnaní s dojčenými deťmi. Deti kŕmené hydrolyzovanými DF vylúčili močom o 49 % viac CML ako dojčatá kŕmené nehydrolyzovanými prípravkami, tento rozdiel však nebol štatisticky významný.

Predbežné výsledky naznačujú, že renálna exkrécia bielkovín a 8-OHdG je významne vyššia (p = 0,027; p = 0,001) u detí kŕmených DF v porovnaní s dojčenými deťmi.

Záver: Naše výsledky dokazujú, že DF obsahujú niekoľkonásobne viac MRP ako materské mlieko a tieto koncentrácie sa ďalej zvyšujú skladovaním formúl. Vysoký príjem MRP v umelej strave dojčiat je spojený s vyššou záťažou detského organizmu týmito potenciálne škodlivými látkami. Predpokladáme, že u detí je CML (a pravdepodobne aj iné MRP) z dojčenských formúl absorbované do cirkulácie a následne rýchlo vylučované obličkou. Výsledky klinických štúdií naznačujú, že nadmerná konzumácia MRP má zdraviu škodlivé účinky, u zdravých dospelých jedincov ako i u pacientov s diabetes mellitus alebo ochoreniami obličiek. Preto bude predmetom ďalšieho sledovania práve zistenie týchto účinkov MRP z DF v skupine polročných detí ako i u tých istých detí po ich prechode na pestrú stravu dospelých. Výsledky tejto štúdie môžu viesť k identifikácii nového mechanizmu vysvetľujúceho všeobecne známu a jednoznačnú fyziologickú nadradenosť materského mlieka nad umelou výživou dojčiat.

Výsledky boli získané v rámci udeleného grantu 6RP EU: Projekt ICARE, COLL-CT-2005-516415.

KOLLÁROVÁ, E., JANOKOVÁ, E.

Oddelenie klinickej biochémie, Nemocnica Košice-Šaca a.s.,
Košice

ÚVOD: Vitamín D je jedným z troch hormónov, ktoré sú zodpovedné za homeostázu kalcia v ľudskom organizme (parathormón, kalcitonín, vitamín D). Má esenciálny význam pre správny vývoj skeletu. Jeho nedostatok v detstve má za následok nedostatočný rast a vznik rachitídy. Táto choroba v priemyselných centrách USA a Európy v 19. storočí dosiahla rozmery epidémie. V 20-tych rokoch minulého storočia sa v týchto štátoch zaviedla úspešná terapia tohto ochorenia vitamínom D. V dospelom veku nedostatok vitamínu D vedie k vzniku sekundárnej hyperparatyreózy s následnou mobilizáciou kalcia z kostí. Dôsledkom býva vznik osteoporózy alebo osteomalácie, resp. ich kombinácie.

Viacere štúdie potvrdili vysokú prevalenciu hypovitaminózy D v európskej populácii, je to dokonca najčastejšia hypovitaminóza. Kritické sú najmä zimné mesiace. Zvýšená potreba vitamínu D je v gravidite a u novorodencov. Na zabezpečenie dostatočného príjmu stačí 15 minút denne od jari do jesene byť vonku s odhalenou tvárou a rukami.

Vitamín D sa vyskytuje v dvoch prirodzených formách - D₂ ergokalciferol a D₃ cholekalciferol. Syntézu vitamínu D₃ ovplyvňuje UV - žiarenie, vek, resorpcia v čreve a pigmentácia pokožky. Významný podiel na nedostatku kalcitriolu (biologicky účinného hormónu) majú aj chronické hepatálne a renálne ochorenia.

CIEĽ: Cieľom našej práce bolo zistiť výskyt znížených hodnôt vitamínu D u pacientov Osteologickej a reumatologickej ambulancie našej nemocnice a zhodnotiť vplyv hypovitaminózy D na ďalšie biochemické parametre kostného metabolizmu (Ca, P, ALP, CrossLaps, osteokalcín, PTH).

Ďalej sme chceli preveriť sezónnu závislosť hladín vitamínu D v sledovanej populácii. Naším zámerom bolo upozorniť na aktuálnu zmenu pohľadu odborníkov na celkový biologický význam vitamínu D pre človeka a na jeho široké terapeutické uplatnenie v blízkej budúcnosti.

MATERIÁL A METÓDY: Vyšetrovaný súbor tvorilo 155 pacientov Osteologickej a reumatologickej ambulancie Nemocnice Košice - Šaca a.s. prevažne s diagnózou osteoporózy. U viacerých pacientov boli súčasne prítomné aj iné ochorenia - najčastejšie endokrinné poruchy, gastrointestinálne a chronické zápalové reumatické ochorenia, ktoré sa podieľali na rozvoji osteoporózy u nich. Išlo o 136 žien a 19 mužov, ktorí boli vyšetrení v období od októbra 2007 do apríla 2008. U všetkých bol stanovený vitamín D súpravou Vitamin D3 (25-OH) firmy ROCHE na imunochemickom analyzátore ELECSYS 2010, vápnik a fosfor v sére setmi firmy BAYER na biochemickom analyzátore ADVIA 1200. Časť pacientov mala vyšetrenú ALP (set DiaSys, ADVIA

1200), CrossLaps, osteokalcín a intaktný PTH (sety ROCHE, ELECSYS 2010).

VÝSLEDKY: Naše merania potvrdili skutočnosť, že hypovitaminóza D je v súčasnej populácii veľmi častá hlavne u starších ľudí. V nami sledovanom súbore až 46.5% (72) pacientov trpelo nedostatkom vitamínu D, z toho 22.6% (32) pacientov malo hodnoty vitamínu D pod 10 nmol/l. Len u 4.5% (7) pacientov bola hladina vitamínu D nad 75 nmol/l, čo je na základe nedávnych odporúčaní potrebná hladina na udržanie všeobecného zdravia. Ani u jedného pacienta sa nevyskytla hypervitaminóza D.

Nedostatok vitamínu D ovplyvňuje kostný metabolizmus, čo sa prejavilo aj na sledovaných biochemických parametroch u vyšetrovaných pacientov. Výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke.

Tab. 1. Pozitívita vybraných parametrov kostného metabolizmu u pacientov so zníženými a normálnymi hladinami vitamínu D

patolog. hodnoty	Ca n=155	P n=155	PTH n=27	ALP n=141	Cross Laps n=84	Osteokalcín n=84
vit. D - normálny	14	11	1	7	3	9
vit. D - znížený	9	13	6	13	5	13

Hladiny vitamínu D súvisia s expozíciou slnečnému žiareniu a majú sezónny charakter, najnižšie sú v zimných mesiacoch. Túto skutočnosť potvrdili aj naše výsledky. Priemerná hodnota vitamínu D nameraná v jesenných mesiacoch október a november bola 50.27 nmol/l. V zimných mesiacoch (december-február) bola priemerná hodnota vitamínu D 23.34 nmol/l a v jarných mesiacoch marec a apríl bola 44.31 nmol/l.

DISKUSIA: Kým v minulosti bol vitamín D najsilnejšou zbraňou v boji s rachitídou, v súčasnosti sa jeho pôsobenie namierilo na prevenciu a liečbu osteoporózy. Osteoporóza je ochorenie známe už z minulosti, ale predlžovanie ľudského veku, zlá životospráva a ďalšie civilizačné faktory vedú k prudkému vzostupu jej výskytu. A práve vitamín D je neoddeliteľnou súčasťou nielen prevencie, ale aj diagnostiky a terapie tohto ochorenia.

Za posledných 10 rokov sa urobilo veľa prekvapujúcich objavov týkajúcich sa vitamínu D. Vitamín D je antioxidant účinnejší ako vitamín E. Má imunomodulačný efekt. Ako ukazujú posledné výskumy, hrá dôležitú úlohu pri ďalších ochoreniach, ktoré nesúvisia s homeostázou kalcia (17 druhov rakoviny, srdcové príhody, hypertenzia, diabetes, autoimunitné choroby, depresia, autizmus.) Dokáže regulovať bunky, systémy a orgány, preto vie ovplyvniť takú paletu chorôb. A práve tu je pole jeho pôsobnosti v budúcnosti.

Podľa najnovších odhadov sa dostatočným príjmom vitamínu D dá predísť až 600 000 prípadom rakoviny prsníka a kolorektálneho karcinómu ročne vo svete. Odporúčaná denná dávka vitamínu D je 800 IU, ale niektorí autori odporúčajú aj vyššie dávky. Na dosiahnutie signifikantného poklesu výskytu rakoviny je potrebná denná dávka 2000 IU vitamínu D. Vitamín D môže zlepšiť výsledok liečby u pacientov, ktorí už majú diagnostikovaný nádor. Tým, že vitamín D podporuje diferenciaciu a inhibuje proliferáciu, stáva sa dôležitým faktorom v prevencii a terapii nádorov.

ZÁVER: Možnosť stanoviť hladinu vitamínu D v sére testom na imunochemickom analyzátore ELECSYS 2010 je veľkým prínosom pri diagnostike porúch kostného metabolizmu. Pomáha odhaľovať najčastejšie sa vyskytujúcu hypovitaminózu, ktorá môže byť príčinou rozvoja mnohých vážnych ochorení. Súčasný intenzívne prebiehajúci výskum ukáže určite ešte ďalšie možnosti využitia stanovenia „slnečného vitamínu“.

VITAMÍN D STATUS A INZULÍNOVÁ REZISTENCIA U PACIENTOV S DOWNOVÝM SYNDRÓMOM.

KRIVOŠÍKOVÁ, Z.¹, ŠUSTROVÁ, M.²
SPUSTOVÁ, V.¹, ŠTEFÍKOVÁ, K.¹

¹Oddelenie klinickej a experimentálnej farmakoterapie

Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

²Oddelenie imunológie a imunotoxikológie

Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

Úvod: Inzulínová rezistencia je významný rizikový faktor pre diabetes mellitus 2. typu a kardiovaskulárne ochorenia. Hlavná funkcia vitamínu D je udržiavať kalcium-fosfátovú homeostázu a zabezpečovať mineralizáciu kosti. Je známe, že poškodená funkcia pankreatických β -buniek je spojená s deficitom vitamínu D, pričom suplementácia vitamínu D sekréciu inzulínu obnovuje. Presný mechanizmus účinku vitamínu D na inzulínovú rezistenciu v súčasnosti nie je dostatočne objasnený. Prevalencia diabetu a inzulínovej rezistencie u ľudí s Downovým syndrómom je vyššia než v bežnej populácii. Cieľom našej práce bolo zistiť vzťah medzi statusom vitamínu D a metabolizmom glukózy u nediabetikov s Downovým syndrómom.

Pacienti a metódy: Do súboru sme zaradili 102 ľudí s Downovým syndrómom, 50 žien a 52 mužov. U všetkých sme vyšetřili sérové koncentrácie 25(OH) D, glukózy a inzulínu na lačno a vypočítali sme hodnoty BMI a Quicki. Deficit 25(OH) D sme hodnotili nasledovne: normálne hodnoty (≥ 30 ng/ml), ľahký deficit (20–30 ng/ml), stredný deficit (10–20 ng/ml) a ťažký deficit (< 10 ng/ml). Inzulínovú senzitivitu/rezistenciu (IS/IR) sme hodnotili na základe indexu Quicki (IS: Quicki $\geq 0,354$, IR: Quicki $< 0,354$).

Výsledky: Pacientov sme rozdelili na dve podskupiny podľa pohlavia (Ž - ženy, M - muži). Skupiny sa významne nelíšili vo veku (Ž: $25,7 \pm 10,3$; M: $27,8 \pm 10,1$) ani v BMI (Ž: $26,2 \pm 5,9$; M: $25,6 \pm 4,4$). Významný rozdiel sme našli v koncentráciách 25(OH) D (Ž: $15,9 \pm 6,4$; M: $20,1 \pm 8,8$; $p < 0,01$). Počty pacientov v jednotlivých skupinách podľa deficitu vitamínu D sú uvedené v tabuľke č. 1.

Tab. 1.

	25(OH) D (ng/ml)			
	≥ 30	20-30	10-20	< 10
n (%) Ženy	2 (4,1)	8 (16,3)	32 (65,3)	7 (14,3)
Muži	7 (14,3)	16 (32,7)	21 (42,9)	5 (10,2)
Spolu	9 (9,2)	24 (24,5)	53 (54,1)	12 (12,2)

Inzulín senzitivných bolo v súbore 32 ľudí (15 žien, 17 mužov), inzulín rezistentných bolo 70 ľudí (35 žien, 35 mu-

žov). Priemerné hodnoty BMI, glukózy, inzulínu a Quicki a 25(OH) vitamínu D sú udané v tabuľke č. 2.

Tab. 2.

	Ženy		Muži		p
	IS	IR	IS	IR	
BMI (kg/m ²)	22,6±4,2	27,7±5,9	24,4±3,9	26,2±4,5	°
Glu (mmol/l)	4,9±0,4	5,2±0,4	5,0±0,5	5,4±0,5	#
Inzulín (uIU/ml)	5,3±0,1	14,6±9,5	5,2±1,7	16,2±10,2	°#
Quicki	0,375±0,02	0,326±0,02	0,380±0,04	0,320±0,02	°#
25(OH) D (ng/ml)	16,5±5,9	15,7±6,7	17,7±8,9	21,3±8,7	*

° - IS(Ž) vs. IR(Ž); # - IS(M) vs. IR (M); * - IR(M) vs. IR(Ž)

Regresnou analýzou sme zistili významnú závislosť sérovej glukózy od 25(OH) D ($r = -0,2949$, $p < 0,04$) od 25(OH) D u žien, ale nie u mužov.

Záver: Zistili sme vysokú prevalenciu deficitu vitamínu D (90,8%), pričom ženy mali významne nižšie priemerné koncentrácie vitamínu D ako muži. Zistili sme tiež vysokú prevalenciu inzulínovej rezistencie, ktorá bola v oboch sledovaných podskupinách rovnaká. Pri sledovaní vzťahu medzi inzulínovou rezistenciou a deficitom vitamínu D sme našli inverznú závislosť sérovej koncentrácie glukózy od koncentrácie 25(OH) D. Hoci sme nepotvrdili významný vzťah medzi inzulínovou rezistenciou a koncentráciou vitamínu D, je potrebné deficit vitamínu D u pacientov s Downovým syndrómom korigovať.

Táto práca bola podporená projektom Ministerstva zdravotníctva SR (č.2005/39-SZU-17).

PRODUKTY OXIDAČNÉHO POŠKODENIA U ZDRAVÝCH SUBJEKTOV VO VZŤAHU KU VÝŽIVE A VEKU

KUDLÁČKOVÁ, M., VALACHOVIČOVÁ, M.
PAUKOVÁ, V., DUŠINSKÁ, M.

Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

Poškodenie molekúl v dôsledku oxidačného stresu zohráva úlohu v patogenéze chronických ochorení spojených s vekom. Výživa je kľúčovým environmentálnym faktorom ovplyvňujúcim výskyt mnohých chronických ochorení. Antioxidanty potravy zabezpečujú ochranu DNA, lipidov a proteínov pred poškodením voľnými radikálmi.

Produkty oxidačného poškodenia DNA (DNA zlomy s oxidovanými purínmi, DNA zlomy s oxidovanými pyrimidínmi), lipidov (konjugované diény mastných kyselín) a proteínov (karbonyly) vo vzťahu ku výžive (vegetariánske stravovanie verus nevegetariánske, tradičné zmiešané stravovanie) boli merané u náhodne vybraných 161 dospelých žien, nefajčiarok z regiónu Bratislava a okolie: mladé subjekty veku 20–30 rokov (46 vegetariánok, 48 nevegetariánok), staršie subjekty veku 60–70 rokov (33 vegetariánok, 34 nevegetariánok). Plazmatické koncentrácie vitamínov (C, E, A, β -karotén) boli merané HPLC metódami. Alkalickej comet assay modifikovaná zaradením špecifických enzýmov bola použitá na detekciu DNA zlomov, oxidovaných purínov a oxidovaných pyrimidínov v izolovaných lymfocytoch. Plazmatické koncentrácie konjugovaných diénov a proteín karbonylov boli merané spektrofotometrickými metódami. Príjem vitamínov, minerálnych a stopových prvkov bol len v naturálnej forme (žiadna suplementácia).

U mladých subjektov neboli zistené žiadne rozdiely v hodnotách oxidačného poškodenia ako aj v plazmatických koncentráciách antioxidantných vitamínov (C, β -karotén) medzi vegetariánskou a nevegetariánskou skupinou. Vo vegetariánskej skupine starších subjektov verus nevegetariánska skupina boli zistené signifikantne redukované hodnoty DNA zlomov s oxidovanými purínmi, DNA zlomov s oxidovanými pyrimidínmi a hodnota lipidovej peroxidácie a na druhej strane signifikantne zvýšené plazmatické koncentrácie vitamínu C a β -karoténu.

Významné vekové závislosti (zvýšenie všetkých produktov oxidačného poškodenia a pokles plazmatických koncentrácií vitamínu C a β -karoténu) boli zaznamenané len u nevegetariánov. Vegetariánske hodnoty starších žien verus mladé ženy boli rovnaké alebo nevýznamne zmenené. Vekovo-nutričné zmeny v prípade vitamínu A neboli pozorované. Významné zvýšenie plazmatických koncentrácií vitamínu E u starších subjektov oboch nutričných skupín verus mladé subjekty je dôsledkom jeho akumulácie pri vyššej hodnote telesného tuku. Tento predpoklad podporujú signifikantne zvýšené hodnoty body mass index.

Výsledky naznačujú, že zvýšeniu oxidačného poškodenia s narastajúcim vekom možno predísť vegetariánskou výživou.

LANDLOVÁ, D., SUCHÁŇOVÁ, Z.

Oddelenie klinickej genetiky, Medirex a.s.
Malacky

Vyšetrenie chromozómov je súčasťou celej rady rutinných diagnostických postupov. K indikáciám na toto vyšetrenie patria: problémy včasného rastu a vývoja, poruchy sexuálnej diferenciacie, poruchy reprodukcie, narodenie mŕtveho plodu a úmrtie novorodenca, problémy s fertilitou, nádorové ochorenia a rodinná anamnéza. Ide teda o diagnostiku chorôb podmienených zmenou počtu alebo štruktúrou chromozómov. Tieto chyby nazývame chromozómové aberácie a sú to väčšinou veľmi závažné zmeny, ktoré priamo alebo nepriamo ovplyvňujú väčší počet génov. Gény sa môžu vyskytnúť vo viacerých kópiách alebo môžu byť deletované, prerušené, popr. fúzované s inými génmi. Preto sa u pacienta cytogenetického laboratória väčšinou vyskytujú mnohopočetné postihnutia rôznych orgánových sústav a ochorenia majú charakter syndrómu.

Chromozómy možno vyšetrovať v bunkách rôznych tkanív. Najpoužívanejšou je kultivácia stimulovaných lymfocytov periférnej krvi. Táto metóda patrí k metódam klasickej cytogenetiky a pre jej jednoduchosť sa používa v každom cytogenetickom laboratóriu. Lymfocyty majú dobrú mitotickú aktivitu a poskytujú veľmi dobre hodnotiteľné chromozómy. Pri tejto metóde z 1–2 ml periférnej krvi možno po 72 hodinovej kultivácii získať dostatočný počet kvalitných mitóz potrebných k hodnoteniu. V ďalšom spracovaní prebieha vizualizácia chromozómov farbením, a to konvenčne roztokom Giemsa-Romanowski a G-prúžkovaním, pri ktorom sú na každom chromozóme tmavé a svetlé prúžky rôzneho rozsahu typické pre daný chromozóm. Pri C-prúžkovaní je vizualizovaná oblasť konštitučného heterochromatínu.

Výsledky získané klasickou cytogenetikou sa v prípade potreby dopĺňajú molekulárno-cytogenetickými vyšetreniami. Sú to mikrolečné syndrómy, mozaiky chromozómov alebo nejasné štruktúrne aberácie. V našom laboratóriu je to metóda fluorescenčnej in situ hybridizácie (FISH).

LENÁRTOVÁ, R.¹, KOVÁČOVÁ, A.¹
LEPEJ, J.², WAGNEROVÁ, M.³

¹Laboratórna diagnostika, LABMED, a.s., Košice
²Inštitút nukleárnej a molekulárnej medicíny, a.s., Košice
³Východoslovenský onkologický ústav, a.s., Košice

P1NP: N-terminálny peptid prokolagénu typu I. Je špecifickým pri monitorovaní procesu osteoformácie. Počas tvorby kolagénu je P1NP uvoľňovaný do intracelulárneho priestoru a následne do krvi. Pri kostných metastázach nastáva porucha regulácie remodelingu kostí, t.j. rovnováhy aktivity osteoblastov a osteoklastov.

Cieľ práce: Porovnať kostné zmeny u vyšetrovanej skupiny pacientiek pomocou stanovenia P1NP a následným scintigrafickým vyšetrením skeletu.

Metodika: P1NP sme stanovili elektrochemiluminiscenčnou metódou na analyzátore ELECSYS 2010 diagnostickou súpravou ROCHE.

Výsledky: V čase od januára do apríla 2008, sme vyšetřili P1NP 111 pacientkám vo veku od 38 do 79 rokov. Z celkového počtu bolo 35 pozitívnych stanovení, priemerná hodnota 60,99 ug/l, pri referenčnom rozpätí: 15–59 ug/l u premenopauzálnych žien a 20,3–76,3 ug/l u postmenopauzálnych žien.

45 pacientiek bolo vyšetřených scintigraficky, u 29 bol pozitívny nález, štádium 3–5.

Záver: Z recentných štúdií je známe, že u 85 % pacientiek s karcinómom prsníka sa v priebehu ochorenia vyvinú kostné metastázy. Karcinóm prsníka tvorí prevážne osteolytické menej často osteoblastické, eventuálne zmiešané metastázy. P1NP nevykazuje cirkadiánu, má nízku intra-individuálnu variáciu, v dôsledku čoho sa javí ako vhodný marker novotvorby kostí. Zvýšené koncentrácie P1NP v sére po operácii a následnej systémovej liečbe sú nepriaznivým prognostickým ukazovateľom. V súčasnosti u nás prebiehajú porovnávacie merania koncentrácií P1NP a scintigrafického nálezu v definovanej skupine.

LUKAČKOVÁ, R., HOJSÍKOVÁ, I.
TOMÁŠOVÁ, R., KRIŽAN, P.

Oddelenie klinickej genetiky, Medirex, a.s.
Bratislava

Mnohopočetný myelóm (MM) je lymfoproliferatívne ochorenie, ktoré postihuje terminálne vývojové štádiá B-lymfocytov. Spôsobuje klonálnu proliferáciu B-lymfocytov a akumuláciu myelómových buniek. MM tvorí 10% všetkých hematologických malignít. Klasické cytogenetické vyšetrenie je vo väčšine prípadov neinformatívne, pretože plazmocytov majú nízku mitotickú aktivitu. Citlivejšie sú molekulové cytogenetické metódy, najmä I-FISH (interfázová fluorescenčná in situ hybridizácia) na zachytenie submikroskopických chromozómových aberácií. Pri použití metódy I-FISH v jej základnom variante nemožno spresniť podiel patologických plazmocytov a pri fyziologickom náleze nie je možné potvrdiť, že vo vzorke nejaké plazmocytov boli (v tomto prípade mohlo ísť o B-lymfocyty). Stanovenie presného podielu klonálnych plazmatických buniek umožňuje ich imunofluorescenčné podfarbenie pomocou špecifických protilátok a následnú analýzu metódou I-FISH. Imunologické značenie plazmocytov je metóda, ktorá umožňuje zachytiť plazmocytov s chromozómovými aberáciami aj pri nízkej infiltračii kostnej drene. Cieľom našej práce je stanoviť početnosť chromozómových zmien metódou I-FISH na podfarbených bunkách. Všetci pacienti s diagnózou MM sú vyšetrení I-FISH pomocou sond LSI 13q14/Rb1, LSI 14q32, ON 1q21 / SRD 1p36 a ON MM 19q13/ 17p13. Pri pozitívnom náleze prestavby IgH génu nasleduje hľadanie translokačného partnera LSI sondami IgH/CCND1 a IgH/FGFR3. V niektorých prípadoch nachádzame len numerické aberácie, trizómie a monozómie (len chromozómu 13). Deléciou 13q14 dochádza k inaktivácii supresorového génu Rb1, regulujúceho bunkový cyklus. Delécia 17p13 vedie k inaktivácii supresorového génu TP53 a zhoršuje prognózu. Imunofluorescenčné podfarbenie zvyšuje špecificitu tejto diagnostickej metódy a má veľký význam pre stanovenie presnejšieho výsledku. Môže prispieť k efektívnej liečbe a tým predĺžiť dobu prežitia. Cytogenetické vyšetrenie prispieva k rozdeleniu pacientov s MM do prognostických skupín a pomáha pri výbere vhodnej liečby.

LUKNÁR, M., LESNÝ, P., GONCALVESOVÁ, E.

Heart Failure and Transplant Department
National Institute of Cardiovascular Diseases, Bratislava

Introduction: Erroneous diagnosis and management of acute heart failure (HF) can have a devastating effect on the patient. Constant effort is being performed to develop a simple non-invasive correlate of HF. Plasma BNP and NT-proBNP are released from ventricular tissue in response to volume overload and/or increased wall tension. In acute HF, ventricular wall tension rises as a consequence of increased filling pressures that can be invasively measured as pulmonary capillary wedge pressure (PCWP) and right atrial pressure (RAP). The aim of the study was to evaluate BNP changes in the acute hemodynamic test in patients with acute decompensated HF.

Patients and methods: 17 patients (15 males), candidates of heart transplant (HTx), in whom severe pulmonary hypertension (PH) was diagnosed by central hemodynamic examination (pulmonary vascular resistance ≥ 4 Wood units and/or transpulmonary gradient ≥ 15 mmHg), were examined. Mean age was 50 ± 6 yrs., mean ejection fraction $21 \pm 5\%$, left ventricle end-diastolic diameter (LVEDD) 72 ± 9 mm. The primary diagnosis was dilated cardiomyopathy (CMP) in 10 pts., coronary heart disease in 6 pts., and hypertrophic CMP in 1 pt. In all of them, PH reversibility test was performed using infusion of vasodilating prostaglandine E1 (PGE1). BNP level was measured at the baseline, at maximum hemodynamic effect of PGE1, and after resolution of hemodynamic parameters to the basal values (after discontinuation of PGE1). Patients who reached 20% and greater decrease in BNP levels in comparison with baseline values were considered responders.

Results: A significant drop in ventricular filling pressures and BNP levels was registered during PGE1 infusion (RAP = 10.6 ± 4.1 mmHg vs. 7.3 ± 2.9 , $p < 0.01$; PCWP = 24.5 ± 2.9 mmHg vs. 18.4 ± 4.3 , $p < 0.01$; BNP = 739 ± 328 pg/ml vs. 588 ± 281 pg/ml, $p < 0.01$). The recovery of the filling pressures to basic levels was accompanied by BNP level increase to 742 ± 352 pg/ml. Responders (13 pts.) and non-responders (4 pts.) showed no difference in the level of the ventricular filling pressure decrease. LVEDD was greater than 65 mm in 12 responders and in only one non-responder.

Conclusion: In patients with acute decompensated HF, BNP level immediately reflects changes in ventricular filling pressures and thus severity of HF. Predictive reliability of hemodynamic changes appears to be higher in a more pronounced left ventricular dilation. These results seem to further support the concept of treatment adjustment and management of acute HF based on BNP levels. Serial BNP measurement might improve the titration of treatment in patients with acute heart failure in the intensive care setting.

SCREENING VROZENÝCH
VÝVOJOVÝCH VAD V ČR: SOUČASNÝ STAV
A PERSPEKTIVY DALŠÍHO VÝVOJE

MALBOHAN, I.¹, BUDINA, M.²
KRATOCHVÍLA, J.², SPRINGER, D.¹, ZIMA, T.¹

¹UKBLD VFN a 1. LF UK Praha
²SEKK Pardubice

Screeningem vrozených vývojových vad prochází v České republice prakticky všechny těhotné ženy. Biochemický screening v mateřském séru (MS) ve 2. trimestru (stanovení MS AFP, MS HCG, případně doplněné o MS uE3) který zůstává zlatým standartem pro terénní pracoviště, umožňuje při správném použití zachyt více než 60 % těhotenství postižených Downovým (DS) a Edwardsovým (ES) syndromem a také defekty neurální trubice. Na některých, zejména fakultních, pracovištích je v současné době často nahrazován kombinovaným screeningem v 1. trimestru (stanovení MS free-beta HCG a MS PAPP-A doplněné o ultrasonografické změření nuchální translucence – NT) který vyžaduje zkušeného a kvalifikovaného sonografistu disponujícího velmi kvalitním ultrazvukovým přístrojem, jenž umí přesně provést měření nuchální translucence a odhalí také defekty neurální trubice, které biochemie v prvním trimestru nemůže zjistit. Kombinovaný screening dokáže zachytit přes 80% těhotenství postižených DS a ES. Nejlepší výsledky dává integrovaný screening, při kterém se v prvním trimestru provádí stanovení MS PAPP-A, případně i měření NT, a ve druhém trimestru stanovení MS AFP a MS HCG, event. i. MS uE3. Záchyt DS a ES při integrovaném screeningu dosahuje až 90%; pokud se provádí bez měření NT mluvíme o integrovaném sérovém screeningu, u kterého se záchyt výše uvedených vad blíží 85 %.

Všechny formy prenatalního screeningu vyžadují spolehlivou práci biochemické laboratoře, která je podmíněna pravidelnou úspěšnou účastí v externím hodnocení kvality. V ČR tuto kontrolu pro druhý trimestr zajišťuje SEKK ve spolupráci s UK NEQAS, pracoviště provádějící screening v 1. trimestru se zpravidla zúčastňují externího hodnocení kvality přímo v UK NEQAS.

MOLEKULOVÁ DIAGNOSTIKA
V ONKOHEMATOLOGII

MARKOVÁ, K.
HANUŠOVSKÁ, E., KRIŽAN, P.

Oddelenie klinickej genetiky, Medirex a.s.
Bratislava

Normálny a patologický vývoj lymfoidných alebo myeloidných buniek priamo súvisí s integritou a funkčnosťou DNA. Mutácie a chromozomálne aberácie so vznikom fúzných génov narušujú pôvodné naprogramovanie bunky. Poznanie zmien na úrovni DNA umožňuje nielen diagnostikovať a monitorovať ochorenia ale najmä cielenejšie liečiť onkologických pacientov.

Jednokroková a nested PCR sú kvalitatívne PCR metódy, ktoré nám slúžia na detekciu väčšieho spektra zlomov v postihnutých oblastiach fúzných génov. Pozitívny resp. negatívny výsledok týchto metód je rozhodujúci v stanovení diagnózy pacienta ale je nedostačujúci pre ďalšie sledovanie vývinu ochorenia. Túto hodnotu nám prináša kvantitatívna metóda real-time PCR.

V našom laboratóriu pracujeme s „Real-time PCR Systémom“ modelom 7300 od firmy Applied Biosystems v troch základných oblastiach.

Prvou je kvantifikácia expresie fúzných génov (BCR-ABL, AML1-ETO, PML-RARA, CBFβ-MYH11) a kvantifikácia nadexpresie génov (WT1) pri akútnych a chronických leukémiách. Podstatou je presné určenie počtu kópií transkriptov v analyzovanej vzorke.

Druhou oblasťou je kvalitatívna analýza. Tá môže byť zameraná buď na skríning fúzných génov, alebo na skríning a monitoring DNA markerov (polymorfizmov nukleotidov) sledovaných u transplantovaných pacientov.

Tretie široké využitie prístroja umožňuje funkcia rozlišovania alel („allelic discrimination“). Môžeme detekovať bodovú mutáciu V617F JAK2 génu pri BCR-ABL negatívnych myeloproliferatívnych ochoreniach, ktorými sú najčastejšie PV (Polycytémia vera), ET (Esenciálna trombocytémia) a OMF (Osteomyelofibróza).

Výhodou „Real-time PCR Systému“ je jeho široké využitie v diagnostike a najmä v sledovaní minimálnej reziduálnej choroby hemoblastóz. Metóda je rýchla, presná a spoľahlivá.

METABOLISM OF VITAMIN B₆ AND ITS REQUIREMENT IN KIDNEY DISEASES

MYDLÍK, M.¹, DERZSIOVÁ, K.¹, ŽEMBEROVÁ, E.²

¹Nephrological Clinic
Medical School of P. J. Šafárik University
and Logman a.s

²RIA Laboratory Ltd., Košice
Slovak Republic

Vitamin B₆ is a water soluble vitamin, which is important for the normal function of multiple organ systems. It is metabolised to the active molecule pyridoxal-5-phosphate (PLP), which serves as coenzyme for more than 60 enzymes. PLP influences protein and lipid metabolism, metabolism of several aminoacids and formation of antibodies.

Aim of the study was to investigate the metabolic disorders of vitamin B₆ in patients with various kidney diseases.

Material and Methods: Erythrocyte vitamin B₆ was investigated in 15 patients suffering from chronic glomerulonephritis and nephrotic syndrome with normal glomerular filtration rate; in 10 CAPD patients during 12-month long-term study and in 27 CAPD patients using peritoneal dialysis solution with 1.5 or 2.5 % glucose. Erythrocyte vitamin B₆ was investigated in 30 haemodialysis patients with impairment of cellular immunity and 16 haemodialysis patients during the erythropoietin treatment. In addition urinary excretion of vitamin B₆ was investigated in 15 healthy subjects during maximal water diuresis, in 12 patients with chronic renal insufficiency without dialysis treatment (CHRI) during a diet with restriction (2 g/day) or high intake (15 g/day) of sodium chloride and in other group of 15 CHRI patients after the i.v. administration of 20 mg furosemide.

Vitamin B₆ in plasma, urine and peritoneal dialysate was determined by radioenzymatic assay using Bühlmann Laboratories AG kit "Vitamin B₆ REA".

Reference range: a) plasma vitamin B₆: 20–160 nmol/L, b) urinary vitamin B₆: 1.2 ± 0.6 nmol/L. Erythrocyte vitamin B₆ was determined by means of an indirect method, i. e. by assessing the activity of erythrocyte aspartate aminotransferase with and without addition of the coenzyme PLP in vitro. The effect of PLP on the activity of erythrocyte enzyme displayed an indirect relationship with the concentration of vitamin B₆ and it was expressed in per cents. Reference range: the effect of PLP: 0–20 %.

Results and Conclusions:

1a. In patients with chronic glomerulonephritis and nephrotic syndrome with normal glomerular filtration rate plasma (15.5 ± 3.8 nmol/L) and erythrocyte vitamin B₆ (effect of PLP = 42.1 ± 7.5 %) were significantly decreased, p < 0.01. Plasma oxalic acid in that patients was significantly elevated (9.8 ± 2.3 μmol/L); (normal range:

2–5.5 μmol/L). One of the causes of that finding was probably the deficiency of vitamin B₆.

- 1b.** Six months supplementation by pyridoxine 50 mg/day led to the effect of PLP in the normal range (16.3 ± 1.4 %) in patients suffering from chronic glomerulonephritis and nephrotic syndrome.
- 2.** In CAPD patients plasma and erythrocyte vitamin B₆ were in reference ranges and mean value of peritoneal clearance of vitamin B₆ was very low, 8.8 % of urea clearance.
- 3.** Three-month use of daily 50 mg pyridoxine led to a significant improvement in electrophoretic mobility of peripheral blood lymphocytes and of some other parameters of cellular immunity (absolute number of T lymphocyte E rosette-forming cells increased from 421 ± 81 to 1.288 ± 22 and absolute number of T lymphocyte active E rosette-forming cells from 197 ± 28 to 508 ± 105, p < 0.01) in haemodialysis patients.
- 4.** In haemodialysis patients treated by EPO and supplemented by 5 mg pyridoxine/day erythrocyte vitamin B₆ significantly decreased i.e. the effect of PLP significantly increased from 19.0 ± 1.8 % to 30.4 ± 2.4 %, (p < 0.01). After three months supplementation of pyridoxine 20 mg/day the effect of PLP significantly decreased to the normal range (16.4 ± 1.9 %, p < 0.01). It was indirect evidence that erythrocyte vitamin B₆ is consumed by the haemoglobin synthesis much more during EPO treatment in haemodialysis patients.
- 5.** Maximal water diuresis led to the significant increase of urinary excretion of vitamin B₆ (from 1.2 ± 0.3 to 3.7 ± 0.5 nmol/4hr, p < 0.01) in healthy subjects. No changes of urinary excretion of vitamin B₆ (from 4.4 ± 0.8 to 4.6 ± 0.7 nmol/day, p > 0.05) during the diet with high intake of sodium chloride in CHRI patients was found. Urinary excretion of vitamin B₆ depends on water diuresis.
- 6.** Intravenous administration of 20 mg furosemide led to the increase of urinary excretion (from 0.7 ± 0.2 nmol/3hr to 1.1 ± 0.2 nmol/3hr, p < 0.01) of vitamin B₆ in patients with CHRI. This is a side effect of furosemide.
- 7.** We recommend for prevention of vitamin B₆ deficiency in patients with chronic glomerulonephritis and nephrotic syndrome with normal glomerular filtration rate: 50 mg pyridoxine/day, in haemodialysis patients for the treatment of impaired cellular immunity: 50–70 mg pyridoxine/day and in CAPD and haemodialysis patients following doses of pyridoxine: without EPO treatment: 5 mg pyridoxine/day; with EPO treatment: 20 mg pyridoxine/day.

**PREVALENCIA DEFICITU VITAMÍNU D
V POPULÁCIÍ SLOVENSKÝCH ŽIEN A JEHO VZŤAH
K HUSTOTE KOSTÍ**

**NĚMCOVÁ T¹, KRIVOŠÍKOVÁ Z², KRAJČOVIČOVÁ-
KUDLÁČKOVÁ M³, SPUSTOVÁ V², ŠTEFÍKOVÁ K²,
VALACHOVIČOVÁ M³, DZÚRIK R²**

¹Trnavská univerzita, Trnava,

²Oddelenie klinickej a experimentálnej farmakoterapie,
Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava,

³Oddelenie bioaktívnych látok a nutričného skríningu, Slo-
venská zdravotnícka univerzita, Bratislava

Úvod: Vitamín D je steroidný hormón s rôznymi špecifickými regulačnými a funkčnými účinkami. Syntetizuje sa ako prekursor v koži pod vplyvom UVB žiarenia. Malá časť vitamínu D sa získava z potravy (mlieko, ryby, olej, výživové doplnky). V pečeni sa hydroxyluje na 25(OH) vitamín D, ktorý sa ďalej hydroxyluje v obličkách na 1,25(OH)₂ vitamín D. Hydroxyláciu v obličkách kontroluje parathormón (PTH), hypofosfatémia a 1,25(OH)₂ vitamín D. 25(OH) vitamín D je hlavný metabolit vitamínu D v cirkulácii a je považovaný za hlavný indikátor statusu vitamínu D v sére. 1,25(OH)₂ vitamín D je hlavný aktívny metabolit vitamínu D. Reguluje génovú transkripciu prostredníctvom jadrových receptorov. Tieto receptory sa nachádzajú v mnohých orgánoch a tkanivách (mozog, srdce, črevo, pankreas, imunitné bunky). Reguluje rast a dozrievanie buniek, inhibuje produkciu renínu, stimuluje sekréciu inzulínu a moduluje funkciu aktivovaných T a B lymfocytov a makrofágov. Hypovitaminóza vitamínu D sa môže odraziť na vzniku a rozvoji osteoporózy, zvýšenom riziku pádov a vzniku fraktúr, zvýšenom riziku vzniku nádorových ochorení a zmene glukózového a lipidového metabolizmu. Cieľom našej práce bolo zistiť prevalenciu deficitu vitamínu D a jeho vzťah k hustote kostí a kostnému metabolizmu.

Metódy: Vyšetřili sme 141 zdravých dobrovoľníčok, z toho 82 vo veku 20–30 rokov (A) a 59 vo veku 60–70 rokov (B). U všetkých žien sme stanovili sérové koncentrácie iPTH a 25(OH)vitamín D. Vyšetřili sme tiež hustotu kostí v oblasti krčku femuru (FBMD), trochanteru (TrBMD) a lumbálnej chrbtice (L₁₋₄BMD). Všetkým ženám sme tiež stanovili BMI.

Výsledky: Zistili sme významné rozdiely vo výške (p < 0,0001), hmotnosti (p < 0,0001), BMI (p < 0,0001), PTH (p < 0,0001), FBMD (p < 0,0001) a L₁₋₄BMD (p < 0,001) v závislosti od veku. Počty žien v jednotlivých podskupinách podľa dosiahnutej koncentrácie sérového vitamínu D sú v tabuľke č. 1.

Tab. 1.

Veková skupina (roky)	25(OH) vitamín D (ng/ml)			
	≥ 30	20–29,9	10–19,9	< 10
A (20–30)	17 %	29 %	49 %	5 %
B (60–70)	18 %	30 %	48 %	4 %

Každú vekovú skupinu sme ďalej rozdelili na dve podskupiny podľa sérovej koncentrácie vitamínu D (A1/B1 ≥ 20 ng/ml, A2/B2 < 20 ng/ml). Podiel žien s deficitom vitamínu D je v skupine A2 aj B2 rovnaký (p < 0,896, OR = 0,956). Pri delení podľa deficitu vitamínu D sme našli významne nižšie hodnoty L₁₋₄BMD v skupine A2 (p < 0,05) a významne vyššie hodnoty PTH v skupine B2 (p < 0,02). Lineárnou regresnou analýzou sme nepotvrdili závislosť BMD ani v jednej z meraných oblastí od koncentrácie vitamínu D ani v celom súbore, ani v jednotlivých vekových podskupinách. V celom súbore a v podskupine A sme zistili významnú koreláciu medzi PTH a vitamínom D (p < 0,005). Pozitívnu koreláciu medzi BMD vo všetkých troch meraných miestach a BMI sme potvrdili v oboch vekových podskupinách. Korelačné koeficienty a hodnoty p sú uvedené v tabuľke č. 2.

Tab. 2.

BMI (závislá premenná)	A (20–30)		B (60–70)	
	r	p	r	p
Premenné				
FBMD	+ 0,4052	0,0001	+ 0,4196	0,002
TrBMD	+ 0,4412	0,0001	+ 0,5788	0,0001
L ₁₋₄ BMD	+ 0,3830	0,001	+ 0,5018	0,0001

Súhrn: V sledovanej skupine žien sme zistili vysokú prevalenciu deficitu vitamínu D, pričom odporúčenú koncentráciu (≥ 30 ng/ml) dosiahlo menej ako 20 % žien. Nenašli sme závislosť sérovej koncentrácie vitamínu D na veku a nezistili sme ani priamy vzťah medzi sérovou koncentraciou vitamínu D a hustotou BMD v oblasti krčku femuru, trochanteru a lumbálnej chrbtice. Potvrdili sme významnú závislosť BMD vo všetkých sledovaných miestach na BMI.

Záver: O vysokej prevalencii deficitu vitamínu D svedčí mnoho epidemiologických štúdií. Nízke sérové koncentrácie vitamínu D boli zistené vo všetkých vekových skupinách nezávisle od zemepisnej šírky. Chronický deficit vitamínu D zapríčiňuje u detí rachitídu a u dospelých ľudí sekundárnu hyperparatyreózu, osteomaláciu, bolesti kostí a svalovú slabosť spojenú so zvýšeným rizikom pádov a fraktúr. Najúčinnjšou prevenciou hypovitaminózy D je primeraný pobyt na slnku a suplementácia nutričných dávok vitamínu D.

Táto práca bola podporená grantom Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVT-21-010104 a APVT-21-017704.

**ASOCIÁCIA MEDZI MNOŽSTVOM
OLIGOKLONÁLNYCH PÁSOV A INTRATEKÁLNOU
TVORBOU IgG U PACIENTOV SO SKLERÓZOU
MULTIPLEX**

**ONDRKALOVÁ, M.
KALNOVIČOVÁ, T., TURČÁNI, P.**

**I. neurologická klinika Lekárskej fakulty UK a FN
Bratislava**

Včasná a správna diagnóza sklerózy multiplex (SM) je kľúčovým faktorom, ktorý môže významne ovplyvniť ďalší osud pacienta. Okrem klinického vyšetrenia a vyšetrenia MRI a evokovaných potenciálov sa na potvrdenie diagnózy vyžaduje aj analýza cerebrospinálneho likvoru (CSF). Vyšetrenie CSF nadobúda dôležitý diagnostický význam hlavne pri objavení sa prvých neurologických príznakov s negatívnym nálezom na MRI. Charakteristickým likvorovým nálezom u SM pacientov je prítomnosť intratekálnej syntézy imunoglobulínov triedy G (IgG), ktorá sa môže vyjadriť kvantitatívne pomocou IgG indexu (alebo iných navrhnutých vzťahov, napr. podľa Reibera) a kvalitatívne pomocou dôkazu prítomnosti oligoklonálnych IgG pásov (OP). Detekcia dvoch a viac OP v likvore bez ich nálezu v krvnom sére poukazuje na chronický imunopatologický proces prebiehajúci v nervovom tkanive. Absencia, alebo prítomnosť malého počtu OP v CSF v čase stanovenia diagnózy môže predikovať lepšiu prognózu ochorenia. Existujú dôkazy, že u pacientov s benigným priebehom SM sa v CSF vyskytuje nižší počet OP ako v skupine pacientov so závažnejším priebehom tohoto ochorenia. V tejto súvislosti sme sa v prezentovanej práci zaoberali hodnotením stupňa asociácie medzi intenzitou intratekálnej produkcie IgG a množstvom oligoklonálnych IgG pásov v CSF vo včasnom štádiu SM a porovnávali sme senzitivitu dvoch použitých metód na dôkaz prítomnosti intratekálnej syntézy IgG - kvantitatívnej (nefelometria) a kvalitatívnej elektromigračnej (izoelektrická fokusácia - IEF) metódy.

Pacienti a metódy. Skupinu pacientov so sklerózou multiplex (SM) tvorilo 127 subjektov (priemerný vek $33,0 \pm 9,8$ rokov) s pozitívnym nálezom prítomnosti likvorových oligoklonálnych IgG pásov (OP). Cerebrospinálny likvor (CSF) bol odobratý lumbálnou punkciou vo včasnom štádiu ochorenia. Koncentráciu albumínu a IgG v CSF sme stanovili nefelometricky, prítomnosť OP sme dokazovali metódou izoelektrickej fokusácie na polyakrylamidovom géle. Intratekálnu produkciu IgG sme vypočítali podľa Reiberovho vzorca (Reiber and Felgenhauer, 1987).

Výsledky. V tabuľke 1 sa nachádzajú niektoré biochemické a cytologické parametre od SM pacientov rozdelených na dve skupiny podľa hodnoty intratekálnej tvorby imunoglobulínov vyjadrenej podľa Reibera ($RIG=0$; $RIG>0$). V súlade s patogenézou ochorenia, skupina SM pacientov

s $RIG>0$ má v porovnaní so skupinou $RIG=0$ signifikantne vyššie likvorové hladiny IgG a zvýšenú pleocytózu. Výsledky naznačujú, že množstvo OP v CSF závisí na intenzite intratekálnej syntézy IgG (pozitívna signifikantná korelácia medzi RIG a počtom OP). Pozitívny dôkaz prítomnosti OP aj v skupine SM pacientov s $RIG=0$ indikuje, že kvalitatívna metóda IEF je senzitívnejšia ako kvantitatívne vyjadrenie intratekálnej syntézy IgG podľa Reibera.

Záver: V dôsledku nižšej diagnostickej senzitivity, intratekálna syntéza IgG vyjadrená pomocou RIG nemôže nahradiť dominantné postavenie OP v diagnostike SM, hlavne pri nízkej hladine intratekálnej produkcie IgG v CSF. V rámci Reiberovho diagramu sa kvantitatívne stanovenie IgG však významne uplatňuje v poskytovaní informácií o produkcii IgG v súvislosti so stavom funkcie hematoklikvornej bariéry a je dôležitým doplnkovým markerom v diagnóze SM.

Tab.1. Hodnoty niektorých biochemických a cytologických parametrov u pacientov so sklerózou multiplex (SM) s pozitívnym dôkazom prítomnosti oligoklonálnych IgG pásov (OP) v cerebrospinálnom likvore (CSF). ($RIG>0$; $30,6 \pm 34,1$ mg/L), z - počet hodnôt, ktoré sa nachádzajú mimo referenčný rozsah

Parameter	RIG = 0	RIG>0
Počet pacientov (n)	33/127 (26%)	94/127 (74%)
Vek pacientov (roky)	$32,2 \pm 9,8$	$34,5 \pm 10,0$
Počet OP (n)	$6,48 \pm 2,4$	$12,1 \pm 5,71^{****}$
RIG (mg/L)	0	$30,6 \pm 34,1$
Korelačný koeficient (RIG/nOP)		$r=0,6384$ $p=0,0270(*)$
CSF - IgG (mg/L)	$37,72 \pm 15,0$ $z = 13/33 (39,4\%)$	$68,07 \pm 39,7^{****}$ $z = 80/94 (85,1\%)$
CSF - albumín (mg/L)	$279,4 \pm 99,2$ $z = 5/33 (15,2\%)$	$235,6 \pm 91^*$ $z = 11/94 (11,7\%)$
CSF - CB (mg/L)	$470,2 \pm 136,8$ $z = 16/33 (48,5\%)$	$468,9 \pm 166,7$ $z = 54/94 (57,4\%)$
QA	$6,16 \pm 3,8$ $z = 6/33 (18,2\%)$	$5,2 \pm 2,1^*$ $z = 13/94 (13,8\%)$
Mononukleáry (n/3)	$10,2 \pm 5,96$	$32,3 \pm 32,2^{**}$
Polynukleáry (n/3)	$1,75 \pm 1,01$	$2,42 \pm 2,05$

PASTOREK, J.

Virologický ústav Slovenskej akadémie vied
Bratislava

V modernej medicíne majú súčasné trendy ako genómika, proteomika, bioinformatika a metabolomika nezastupiteľné miesto. Za zakladateľa genomiky sa dnes považuje dvojnásobný nositeľ Nobelovej ceny Fred Sanger, ktorý bol priekopník sekvenovania DNA – určovania primárnej štruktúry génov. Sekvenovanie génov je aj v súčasnosti prioritou genomiky. Ďalšie smery rozvoja genomiky ako funkčná genomika, zaoberajúca sa určením hladiny kvantitatívnej a kvalitatívnej expzie génov, určením polymorfizmov nakoniec vyústili do určovania expresných profilov tisícky génov pomocou metódy microarray. Všetky možné využitia techník genomiky v súčasnej medicíne, hlavne so zameraním pri diagnostike infekčných ochorení, určení predispozície kardiovaskulárnych, onkologických ochorení, porúch metabolizmu, ich význam pri cielej terapii budú diskutované. Dôležitou časťou genomiky je aj jej metodická náročnosť, kde budú prezentované najnovšie techniky a ich meria využitia v našich podmienkach.

Proteomika je vedná oblasť zaoberajúca sa v čo najširšej miere proteínmi z hľadiska ich štruktúry a funkcie. Jej využitie je hlavne tam, kde nestačí prítomnosť expzie génu detekovanej ako mRNA, ale skôr jej translačný produkt a rôzne funkčné formy proteínu. Z metodického hľadiska je potrebné zvládnuť izoláciu proteínov z klinických vzoriek, ich separáciu pomocou účinných chromatografických metód až po separáciu pomocou 2D elektroforézy a izoláciu intaktných proteínov určených na ďalšiu analýzu. Na presné určenie molekulovej hmotnosti proteínov, ich posttranslačných modifikácií a nakoniec aj určenie primárnej štruktúry proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie je posledným a najdôležitejším krokom pri štúdiu proteómu, ako kompletného spektra proteínov organizmu alebo systému. Úspešné využitie genomiky a proteomiky si vyžaduje spracovávanie množstva informácií a práve tento fakt podnietil potrebný rozvoj bioinformatiky. Táto je nielen závislá na rozvoji rôznych softvérov, ale aj prístupnosti databáz, ktoré sú dnes väčšinou voľne dostupné.

Metabolomika je systematické štúdium unikátnych chemických odtlačkov – metabolitov, produktov špecifických bunkových procesov. Metabolom predstavuje zbierku metabolitov biologického organizmu, ktoré sú konenčnými produktami génovej expzie v bunke. Štúdium metabolomu, ako celého komplexu navzájom kooperujúcich a interagujúcich bunkových proteínov zohráva dôležitú úlohu pri pochopení fyziologických a patologických procesov organizmu.

PECHÁŇ, I.¹, KOUTUN, J.²

¹Oddelenie laboratórnej medicíny
Národný ústav srdcových a cievnych chorôb, a.s., Bratislava
²Klinika anesteziológie a intenzívnej medicíny
Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

Dynamické sledovanie hladiny laktátu u kriticky chorých pacientov je jedným zo základných parametrov, ktorý pomáha lekárovi stanoviť diagnózu, určiť prognózu pacienta i efektívne monitorovať jeho liečbu. Problémom býva zväčša určenie príčiny hyperlaktatémie, ale najmä spôsob metabolizovania laktátu pri celkovom porušení metabolizmu u pacientov na intenzívnych jednotkách. Svedčí o tom i dilema francúzskeho intenzivistu Leverva (2005), ktorý uvažuje o tom, či laktát u týchto pacientov je „pyromanom, distribútorom alebo hasičom“. Hladina laktátu v krvnej plazme sa začala rutinne využívať na oddeleniach intenzívnej medicíny už pred polstoročím a považovala sa jednoznačne za markera hypoxie tkanív, ktorú vvoláva ich inadekvátna perfúzia, prejavujúca sa kyslíkovým deficitom.

Ostatné roky prinášajú iný pohľad na hromadenie laktátu v organizme pacientov so sepsou. Tieto predstavy sponchybujú úlohu hypoperfúzie tkanív a tým i ich hypoxiu u pacientov so septickým stavom. Potvrďuje to i fakt, že zlepšenie transportu kyslíka tkanivám neprináša znižovanie hyperlaktatémie, ako i skutočnosť, že pO_2 vo svaloch septických pacientov je skôr zvýšené. Poznatky biochemikov hovoria skôr o tom, že zvýšená produkcia laktátu akcelerovanou glykolýzou ho stavia vlastne do úlohy poskytovateľa energie. Nedostatočná schopnosť využitia kyslíka mitochondriami buniek preferuje totiž procesy oxidácie glukózy glykolytickou cestou, v ktorej získavanie limitovaného množstva ATP zabezpečuje funkciu membránových transportných systémov, najmä Na^+, K^+ -ATPázy. Akceleráciu glykolytickej cesty zabezpečuje endogénna tvorba adrenalínu, ktorý je silný stimulátor β_2 -receptorov bunkovej membrány. Jeho pôsobením sa aktivuje adenylcykláza a vytvorený cAMP vyvoláva štiepenie glykogénu, čím dochádza akcelerovanou glykolýzou k zvýšenej tvorbe laktátu. Prostredníctvom špecifických transportných systémov (MCT-1) sa zabezpečuje prenos laktátu nielen do ďalších bunkových kompartmentov (najmä do mitochondrií), ale aj do iných buniek organizmu. K výraznej syntéze laktátu dochádza najmä v kostrovom svale, z ktorého vytvorený laktát je transportovaný do ďalších funkčne dôležitých tkanív a orgánov. U septického pacienta sa takto stáva laktát najvýznamnejším energetickým zdrojom napr. pre myokard, kde pomáha vytvárať ATP pre udržanie jeho minimálnej funkčnosti (Matějovič a spol., 2007).

Napriek dostatočnej dodávke kyslíka a potrebných substrátov do tkanív ostáva limitujúcim faktorom pre získavanie energie pri septických stavoch dysfunkcia a poškodenie štruktúr mitochondrií. Dôsledkom tohto stavu je znefunkč-

nenie niektorých častí terminálneho dýchacieho reťazca, najmä komplexu I a cytochrómoxidázy. Riešenie je logické – bunka musí dramaticky znížiť spotrebu energie a minimalizovať svoje funkcie alebo zahynie. Tento stav sa označil ako **hibernácia**, stav, ktorý je obvyklý u zvierat – zimných spáčov a známy i u kardiakov po prolongovanej ischémii myokardu. Pre úspešný „výstup“ septických pacientov z tohto stavu je dôležité postupné, relatívne pomalé obnovenie funkcie mitochondrií buniek ich tkanív a orgánov. Ukázalo sa, že tento proces návratu k pôvodnej funkčnej aktivite je možný po zmiernení až potlačení akútneho zápalu postupnou obnovou mitochondriovej hotovosti (mitochondriová biogenéza) expresiou jednotlivých článkov dýchacieho reťazca a ich aktiváciou. Tento proces možno urýchliť malými dávkami oxidu dusnatého, pričom väčšie dávky majú skôr negatívny vplyv.

Záverom možno povedať, že hyperlaktatémii pri septických stavoch nemožno paušálne posudzovať ako stav hromadenia odpadového metabolického produktu, ktorý je dôsledkom vyvíjajúcej sa hypoxie tkanív a pôvodcom metabolickej acidózy, ktorú možno ovplyvniť zvýšenou dodávkou kyslíka („zlý laktát“). Naopak jeho zvýšenú tvorbu možno považovať za adaptívnu odpoveď na agresívny stav spôsobený nekorigovanou systémovou zápalovou odpoveďou. Vytváraný laktát takto predstavuje významný energetický zdroj pre funkciu bunky („dobrý laktát“) a jeho tvorbu sa netreba snažiť znižovať zvýšenou dodávkou kyslíka.

PROTEÍNY AKÚTNEJ FÁZY PRI SEPTICKÝCH STAVOCH

PIVOVARNÍKOVÁ, H.¹, ROMANOVÁ, L.²

¹Klinické laboratórium Aliatros s.r.o., Prešov

²Klinika anestéziológie a resuscitácie

Fakultná nemocnica J.A.Reimana, Prešov

Sepsa zostáva hlavnou príčinou morbiditu a mortality na jednotkách intenzívnej starostlivosti (ICU) a jej včasná diagnóza nie je priamočiara. Problematika sepsy je pravidelnou témou na stránkach lekárskej odbornej literatúry, na sympóziách a zjazdoch. Dôvodom je neustále stúpajúci počet poznatkov, ako aj vysoká úmrtnosť, ktorá sa pohybuje okolo 40-50% u chorých postihnutých septickým šokom. Aj v nedávnej štúdií SOAP (Sepsis Occurrence in Acutely ill Patients 2006), ktorá zahŕňala údaje od 3147 pacientov zo 198 jednotiek intenzívnej starostlivosti v 24 európskych krajinách, bolo zaznamenané, že až 37% pacientov malo sepsu a mortalita pacientov so sepsou bola 27% v porovnaní so 14% pacientov bez sepsy. Sepsa sa definuje ako systémová odpoveď na infekciu a jej priebeh sa delí na tri štádiá – sepsa, ťažká sepsa a septický šok. Významnou úlohou klinickej biochémie je monitorovanie hrozby infekčných komplikácií a orgánového zlyhania, ich nástupu, dynamiky a liečby. Včasná diagnóza sepsy a následne jej správna liečba sú základom na dosiahnutie pozitívnych výsledkov pre pacientov. Mnoho štúdií sa neustále zaoberá vyhodnocovaním užitočnosti rozličných markerov infekcie za rôznych septických podmienok – najčastejšie C-reaktívny proteín (CRP), prokalcitonín (PCT), TNF, IL-6, IL-8, IL-10 a ďalšie. Aj keď pre mnohé chorobné procesy sú dostupné špecifické markery, pre sepsu takýto marker neexistuje a diagnóza spočíva v kombinácii rozličných parametrov majúcich diagnostickú hodnotu vrátane klinického vyšetrenia, tradičných príznakov sepsy akými sú počet leukocytov, horúčka, tachypnoe a tachykardia a v súčasnosti dostupné markery sepsy ako CRP, PCT, sérový amyloid A (SAA), ceruloplazmín (Cpl), fibrinogén (Fbg), neopterin, elastáza. Marker sepsy bol definovaný ako „miera identifikujúca normálny biologický stav alebo predikujúca výskyt závažnosti patologického procesu alebo choroby“. Rokmi boli navrhnuté mnohé markery sepsy, avšak všetky nie je možné pokryť v tomto súhrne, preto bude poukázané iba na najfrekvencovanejšie používané markery.

Významný podiel na klinicko-biochemickej diagnostike má vyšetrenie reaktantov akútnej fázy. V reakcii akútnej fázy dochádza k výraznému vzostupu cytokínov, mediátorov medzibunkovej komunikácie, ktoré koordinujú obranu proti mikróbom i alterovaným bunkám. Z prozápalových cytokínov sa najväčšia pozornosť venuje faktoru nekrotizujúceho tumory (TNF) a interleukínom (IL-1 a IL-6). Prozápalové cytokíny dávajú pečenej bunke signál, ktorý v nej indukuje syntézu rôznych proteínov akútnej fázy. Tie pôsobia ako regulátory zápalového procesu, mediátory

biologických reakcií, inhibitory proteolytických enzýmov uvoľnených z fagocytov, zametajú nežiaduce katabolity, pôsobia imunomodulačne a kontrolujú bielkoviny novotvoreného spojiva. V priebehu zápalového procesu obvykle prevažuje vylučovanie bielkovín z pečene nad ich katabolizmom, čo vedie k vzostupu bielkovín akútnej fázy, netýka sa to všetkých druhov bielkovín (prealbumín, transferín sú označované ako negatívne reaktanty akútnej fázy a sú to bielkoviny s krátkym polčasom). Reaktanty akútnej fázy sú citlivé, ale nešpecifické z hľadiska diagnostiky bakteriálnej infekcie. Z hľadiska časovej závislosti patria medzi reaktanty zvyšujúce sa už po 6 hodinách od poškodenia tkaniva a dosahujúce maximum do 48 hodín CRP a SAA. PCT sa zvyšuje po 3–6 hodinách a maximum dosahuje medzi 12–48 hodinami. α_1 -antitrypsín, haptoglobín a fibrinogén sa zvyšujú po 12–24 hodinách a maximum dosahujú za 72–96 hodín. Bielkoviny s ešte pomalšou reakciou tvoria Cpl a C-3 zložka komplementu. Snáď najviac používanými markermi súčasnosti sú CRP a PCT. CRP je citlivý, ale nešpecifický. K stimulácii sekrécie stačí pomerne malá zápalová reakcia. Je indukovaný infekciou, zvlášť bakteriálnou. Dynamika jeho zmien je rýchla, biologický polčas je 19 hodín. Dôležitý je priebeh hladín. Pokles hladín CRP u pacientov, ktorí neprogredovali do septického šoku bol rýchlejší v porovnaní s pacientami v septickom šoku, u ktorých bol pokles hladín CRP pomalší, čím CRP môže zlepšiť svoju diagnostickú a prognostickú hodnotu. PCT umožňuje rozoznať infekcie lokalizované od systémových, jeho polčas je 24 hodín a najvyššie hodnoty sú zisťované u ťažkej sepsy a septického šoku. PCT v sére sa nezvyšuje u vírusových infekcií a u zápalových reakcií neinfekčného pôvodu. U novorodencov je PCT dobrým indikátorom včasnej (0–48 hodín) a pozdnej sepsy (3–15 dní). PCT nie je markerom lokalizovanej infekcie a nízke hladiny PCT nevyklúčujú infekciu. SAA je nešpecifickým reaktantom akútnej fázy a včasným a senzitívnym markerom detekcie pozdnej sepsy u predčasne narodených novorodencov. V sepe sa plazmatické hladiny Cpl zvyšujú ako odpoveď akútnej fázy. Avšak tieto znalosti miery zvýšenia a korelácie súvisia s ostatnými biochemickými zmenami. Signifikantné priame korelácie medzi Cpl a CRP, α_1 -antitrypsinom a α_2 -makroglobulínom boli simultánne ovplyvnené hladinou alkalickej fosfatázy (ALP), ktorá bola nezávislým determinantom zvýšenia Cpl. Okrem toho sa Cpl zvyšuje s poklesom pH a vzostupom triacylglycerolov (TAG) a hladiny taurínu. Maximum zvýšenia Cpl je asoci-

ované s cholestázou, zvýšenými hladinami TAG a metabolickou acidózou. Cpl súvisí lepšie so závažnosťou metabolických a biochemických abnormalít indukovaných sepsou než skórovací systém SOFA (Systemic Organ Failure Assessment), ktorý vyjadruje mieru funkčného poškodenia pri syndróme multiorgánovej dysfunkcie (MODS). Zvýšené hladiny Cpl môžu odrážať stupeň protizápalovej odpovede, pretože Cpl pôsobí ako antioxidant a protizápalová obrana. Sú potrebné ďalšie výskumy na potvrdenie dvoch odlišností: jedna s cholestázou, charakterizovaná zvýšenou ALP a Cpl a druhá s normálnou ALP a zvýšeným bilirubínom, úzko korelujúcim so zvýšenými hladinami cystationínu a cysteínu. Tieto nálezy podporené starostlivou analýzou tesných korelácií by mohli poskytnúť nový pohľad do patofyziológie hepatocelulárnej dysfunkcie v sepe. Fbg patrí medzi koagulačné faktory. Je reaktantom akútnej fázy syntetizovaný v pečeni, s polčasom katabolizmu 2–4 dni. Jeho význam je znížený tým, že pri hemokoagulačných poruchách, ktoré akútne stavy často sprevádzajú, naopak klesá. Indikáciou na vyšetrenie Fbg u pacientov s MODS je kontrola stupňa jeho konzumpcie a degradácie a tiež spolu s ďalšími analytmi odhad prebiehajúceho zápalu. Celková bielkovina a albumín v katabolických stavoch klesajú. Bol zistený vzťah medzi hypoalbuminemiou a prognózou. Pokles albumínu o každých 10 g/l signifikantne zvyšuje riziko mortality (o 137 %), morbiditu (o 89 %), predlžuje pobyt na ICU a v nemocnici (o 28 resp. 71 %), zvyšuje náklady na liečbu (o 66 %). V ťažkej sepe je pozorovaný trend k väčšiemu benefitu pri podávaní albumínu.

ZÁVER

Pre starostlivosť o pacienta v kritickom stave je vedľa vhodného výberu proteínov akútnej fázy, cytokínov a iných markerov limitujúca dostupnosť v reálnom čase. Ani cytokíny, ani proteíny akútnej fázy nespĺňajú úplne všeobecné požiadavky kladené na ukazovateľ zápalu s optimálnymi vlastnosťami a vo všetkých klinických situáciách. S vývojom proteomiky, genomiky a mikroanalýzy budeme schopní získať infekčný alebo septický profil každého pacienta zvlášť veľmi rýchlo z malej vzorky krvi. Bioinformatika pomôže interpretovať tento profil do klinicky relevantného indexu, ktorý môže určiť a prispôbiť liečbu a charakterizovať pacienta so sepsou.

SCHMIDTOVÁ, K.

Klinika laboratórnej medicíny, Synlab.SK, s.r.o., Bratislava

Špecifikom v diagnostike intoxikácií je, že analýza je vo väčšine prípadov zameraná na zistenie neznámej exogénnej látky. Napriek tomu, že sú niekedy uvedené látky, ktoré pravdepodobne spôsobili zmenu zdravotného stavu pacienta, laboratórium väčšinou vykonáva skriningové vyšetrenie spektra látok, ktoré by mohli byť pravdepodobne požitie. Podmienkou toxikologickej analýzy je, že pri akútnom stave pacienta musí byť rýchla. Výsledok musí byť spoľahlivý a rýchlo dostupný.

Najčastejšou príčinou akútnych otráv sú otravy liekmi, drogami, alkoholom, pesticídmi a/alebo ich kombináciou.

Najväčšie možnosti v oblasti analýzy týchto látok poskytujú separačné a imunochemické metódy. Rozvoj práve týchto metód v posledných rokoch výrazne zvýšil možnosti dôkazu cudzorodých látok v organizme.

Chromatografické metódy postupne prešli od tenkovrstvovej chromatografie ku kolónovým technikám kvapalinovej a plynovej chromatografie. Obe tieto metódy zaznamenali v ostatných rokoch výrazný posun vo zvýšení separačnej účinnosti a možnosti detekcie. Automatizovaná on-line SPE extrakcia spolu so separáciou na viacerých ko-

lónach súčasne zrýchlila čas analýzy. Porovnaním UV spektier rozdelených látok v elektronickej knižnici spektier sa zvýšila objektivita identifikácie.

Hmotnostná spektrometria v spojení s kvapalinovou a plynovou chromatografiou sa dnes stala v toxikologickej praxi rutinnou metódou. Elektronickej databáza hmotnostných spektier, ktoré sú softvérovým priamo spojené s chromatografickou analýzou, umožňuje rýchlu a spoľahlivú identifikáciu veľkého spektra toxických látok v biologickom materiáli. Rozvoj uvedených metód, ich vysoká citlivosť, umožňuje znížiť množstvo biologického materiálu až 10-násobne. Okrem identifikácie toxických látok umožňuje aj ich kvantifikáciu v biologickom materiáli (moč, krv).

Rovnako významný pokrok nastal aj vo vývoji imunochemických metód. Ich výhodou je vysoký stupeň automatizácie, minimalizácia objemu vzorky, možnosť využitia automatickej predanalytickej fázy- načítanie a rozdávkovanie vzorky do jednotlivých automatov. Všetky tieto kroky vedú k zníženiu času od prijmu vzorky po výdaj výsledkov.

Imunochemické metódy s spojení s chromatografickými sú dnes široko používanými technikami najmä ako jednokrokové testy na dôkaz drog a niektorých skupín liekov. Slúžia na rýchlu orientáciu požitia druhu drog pri podozrení z drogovej závislosti, prípadne oddiferencovanie od požitia alkoholu, čo môže byť v niektorých prípadoch klinickým vyšetrením problematické. Tu však by sa nemalo zabúdať na konfirmáciu pozitívnych výsledkov inou, najlepšie GC/MS metódou.

V prednáške je rozobrané praktické využitie týchto metód v toxikologickej analýze intoxikácií.

**STAVNÝ, J., JURÁŠKOVÁ, E.
KAČÁNIOVÁ, M., VARMUSOVÁ, E.**

**Oddelenie klinickej biochémie, s.r.o. Žilina
pracovisko Poprad**

Diabetes mellitus (DM) je najčastejším metabolickým ochorením. Incidencia diabetu neustále vzrastá. Najvyšší výskyt DM 1A bol zaznamenaný v severnej časti Európy.

DM 1A sa najčastejšie spája s molekulami HLA DQ2 a HLA DQ8. Genetickú predispozíciu prenášajú na svoje deti viac muži ako ženy. Vzhľadom na skutočnosť, že až 80% prípadov DM 1A vzniká mimo rodín poukazuje na spúšťači resp. modulujúci efekt faktorov vonkajšieho prostredia na vývoj diabetu. Obviňuje sa najmä predčasné ukončenie dojčenia a následné kŕmenie kravským mliekom.

Ďalším významným faktorom sú najmä vírusové infekcie ako sú Coxackie B, vírus rubeoly, parotitídy a cytomegalovírusu (CMV). Časť peptidového reťazca Coxackie B4 vírusu má rovnaké zloženie ako peptid pochádzajúci z GAD 65 (vírusové mimikry). Predpokladá sa, že pri imunitnej odpovedi na CB4 vírus dôjde k aktivácii a následnej proliferácii klonov T-lymfocytov. Mechanizmus deštrukcie beta-buniek Langerhansových ostrovčekov spočíva v aktivite TH1 lymfocytov, aktivovaných makrofágov a cytotoxických T-lymfocytov. TH1 lymfocyty sa interakciou s bunkami prezentujúcimi antigén (beta-bunky) aktivujú, začnú produkovať cytokíny, najmä INF-gama, ktorý následne stimuluje makrofágy. Aktivované makrofágy poškodzujú beta-bunky ako svojim cytotoxickým pôsobením (produkcia VKR), tak produkciou cytokínov a interferónu, ktoré indukujú apoptózu.

K dôkazu autoimunitnej inzulinídy sa požívajú stanovenia týchto autoprotilátok:

anti-GAD (glutamát dekarboxyláza), anti-IA-2A (tyrozin fosfatázy), autoprotilátky proti inzulinu (IAA) a ICA (Islet Cells Antibodies).

V roku 1974 Botazzo a spol. začali prvýkrát stanovovať ICA na kryostatických rezoch pankreasu v sérach pacientov s DM 1A s využitím nepriamej imunofluorescencie (NIF).

V posledných rokoch je čoraz výraznejšia snaha nahradit ICA inými sérologickými markermi. Autoprotilátky proti GAD, IA-2A a inzulinu môžeme detekovať jednoduchými metódami ELISA alebo RIA. V podmienkach nášho laboratória je to ELISA.

Baekesskov a spol. v roku 1990 zaviedol stanovenie autoprotilátok proti dekarboxyláze kyseliny glutámovej (GADA). GAD je enzým, ktorý katalyzuje dekarboxyláciu kyseliny glutámovej za tvorby inhibičného neurotransmitera kyseliny gama-aminomaslovej (GABA). GAD sa nachádza hlavne v GABA-ergných neurónoch mozgu a v beta-bunkách Langerhansových ostrovčekov. V menšom množstve sa nachádza aj v ováriach, testes, obličkách a štítnej žla-

ze. Existujú dve izoformy: GAD 65 a GAD 67. V beta-bunkách je GAD 65. Výhodou GADA je, že ich prítomnosť aj koncentrácia pretrvávajú dlhšie a sú najčastejšie zisťovanou autoprotilátkou u DM 1A s klinickou manifestáciou v dospelom veku. Výskyt GADA u príbuzných pacientov s DM 1A dosahuje 5-9%. Nie menej dôležitý je pomerne častý (3-16%) výskyt týchto protilátok aj u pacientov klasifikovaných ako DM 2. Pozitivita tohto markera upozorňuje na prítomnosť autoimunitnej inzulinídy a teda latentného autoimunitného diabetu dospelých (LADA), čo predikuje potrebu inzulinovej liečby.

Protilátky proti tyrozinovým fosfatázam (IA-2A).

IA-2A je transmembránový proteín patriaci do rodiny intracelulárnych transmembránových proteínov s tyrozin fosfatázovou aktivitou. Autoprotilátky IA-2A sa zistili u 60-80% novozistených DM 1A. Sú o niečo menej časté ako ICA a GADA, ale častejšie ako IAA (50-60%). IA-2A sa najlepšie hodia na predikciu diabetu u príbuzných pacientov s DM 1A.

Protilátky proti inzulinu (IAA).

Inzulin bol prvým chemicky definovaným autoantigénom beta-buniek Langerhansových ostrovčekov. IAA sa v sérach pacientov objavujú už v predklinickej fáze u najmenších detí a objavujú sa ako prvé (Ziegler a spol.,1999). IAA je možné zistiť asi u 50-60% pacientov s novozisteným DM 1A, ale tiež u menej ako 1% zdravých jedincov. U dospelých pacientov je pozitivita IAA významne nižšia. IAA ako sérologický marker sa využíva hlavne v detskom veku.

Je dôležité stanoviť aj hladinu C-peptidu, aby sa zistilo, do akej miery sú zničené beta-bunky prebehnutou inzulinídou. Klinicky sa DM 1A prejaví, ak sa počet beta-buniek zníži asi o 80%.

Prítomnosť IA-2A sa združuje s agresívnejšou formou ochorenia a má spomedzi protilátok najvyššiu prediktívnu hodnotu u prvostupňových príbuzných pacientov s DM 1A. Zo stúpajúcim vekom začiatku DM 1A narastá hodnota GADA.

Hoci DM 1A dosahuje najvyššiu prevalenciu v detskom veku, toto ochorenie sa môže vyvíjať v ktoromkoľvek veku vrátane ôsmej dekády života. Začiatok DM 1A v dospelom veku je v skutočnosti omnoho častejší ako sa pôvodne predpokladalo. Ukazuje sa, že v dospelom veku sa rozvíja 20 až 27% z celkového počtu DM 1.

Podľa jednotlivých štúdií sa výskyt GADA medzi pacientami s DM 2 dosahuje u 3-16% v závislosti od etnika, geografickej oblasti, prítomnosti alebo neprítomnosti obezity.

Medzi pacientami s DM 2 mladšími ako 35 rokov sa GADA vyskytovala až v 34% prípadov, u pacientov 34-44-ročných v 14% prípadov a u starších ako 45 rokov bola GADA pozitívna v 7-9% prípadov

Prítomnosť obezity je ďalším faktorom, ktorý ovplyvňuje pozitivitu GADA. GADA je častejšia u štíhlych ako u obéznych s DM-2. Prítomnosť GADA predpovedá neskoršiu potrebu inzulinovej liečby vo viac ako 70-90% prípadov DM 2 a senzitivitou cca 50%.

STECOVÁ, A.¹, BÁTOROVÁ, E.¹, DOBÁKOVÁ, E.¹
KILIÁN, E.¹, PAYER, J.², KILLINGER, Z.²

¹Laboratórna diagnostika Medirex, a.s., Bratislava,
²V. interná klinika Lekárskej fakulty
Univerzity Komenského a Fakultnej nemocnice Bratislava

Zo skupiny vitamínov D sú najdôležitejšie vitamín D3 (cholecalciferol) a vitamín D2 (ergocalciferol). Väčšinu potrebného vitamínu D3 si organizmus tvorí v koži účinkom ultrafialového žiarenia na 7-dehydrocholesterol. Iba malú časť prijíma potravou živočíšneho pôvodu, ako sú vaječný žltok alebo olej z rybovej pečene. Vitamín D2 vzniká účinkom slnečného žiarenia na ergosterol, ktorý vytvárajú predovšetkým kvasnice. Je biologicky menej aktívny, ako vitamín D3. Obidva vitamíny D sú prenášané z kože do krvi. V organizme sa nachádzajú v niekoľkých formách: 25-OH-vitamín D3 a 25-OH-vitamín D2 sú najdôležitejšími metabolitmi vitamínov D nachádzajúcich sa v krvi a sú odrazom ich zásob v organizme. Vznikajú hydroxyláciou 25. uhlíka v pečeni. Hormonálne aktívne sú však až 1,25-(OH)₂-vitamín D3 a 1,25-(OH)₂-vitamín D2, ktoré sa tvoria enzýmovou 1-hydroxyláciou v obličkách. Aktivovaná forma vitamínu D pôsobí po jej naviazaní sa na receptory pre 1,25-(OH)₂-vitamín D3 v rôznych orgánoch ľudského tela.

Úlohy vitamínu D:

- absorpcia vápnika z čreva
- mineralizácia kostnej matrix
- diferenciacia osteoblastov
- inhibícia sekrécie PTH
- udržiavanie svalového tonusu
- imunomodulačné účinky dané aktiváciou monocytov, potlačením proliferácie lymfocytov, tvorby imunoglobulínov a cytokínov
- ovplyvnenie vzniku a rastu niektorých nádorov (karcinóm prsníka, pankreasu)
- ovplyvnenie stavu niektorých infekčných a zápalových ochorení (tuberkulóza, reumatoidná artritída, ap.)
- pôsobenie na syntézu a vylučovanie inzulínu v Langerhansových ostrovcích - deficit D vitamínu sa vo viacerých štúdiách ukázal byť spojený so sníženou sekréciou a syntézou inzulínu

Referenčné hodnoty 25-OH vitamínu D3: vzhľadom k závislosti na slnečnom žiarení, ozónovej vrstve, veku a pigmentácii uvádzame iba orientačné koncentrácie v sére:

Optimálne:	30-80 ug/l
Insuficiencia:	15-30 ug/l
Ťažká insuficiencia:	< 15 ug/l

25-OH vitamín D2 tvorí menej, ako 10% koncentrácie 25-OH vitamínu D3.

Znížené koncentrácie vitamínu D sú najčastejšie pri:

- nutričnom deficite
- senilnej/postmenopauzálny osteoporóze
- celiakii a iných malnutričných ochoreniach GIT
- insuficiencii exogénnej funkcie pankreasu
- biliárnej cirhóze a iných hepatopatiách
- renálnej osteodystrofii a nefrotickom syndróme
- hypokalcémii
- liečbe antikoagulanciami

Zvýšené koncentrácie pri:

- hyperkalcémii
- intoxikácii vitamínom D

Vzhľadom k významu vitamínu D sme v spolupráci s osteocentrami v Košiciach, Lubochni, Banskej Bystrici, Piešťanoch a Bratislave urobili epidemiologickú štúdiu, ktorej cieľom bolo zistiť koncentrácie 25-OH-vitamínu D3 v populácii slovenských premenopauzálnych žien.

Materiál a metódy: štúdie sa zúčastnilo 162 zdravých žien vo veku 23-41 rokov. Odber materiálu sa robil v jesenných mesiacoch roku 2007, sérum bolo až do vyšetrenia zmrazené pri -20 °C. Analýzy sa robili vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (LC-20 AD, Shimadzu- Japonsko) s UV detekciou, reagenčným kitom firmy Chromsystems.

Výsledky: Hodnoty sa pohybovali v rozmedzí 32,58 ± 12,25 ug/l (tabuľka č. 1.). Rozdelenie nebolo gausovské, krivka bola posunutá nižším hodnotám. Približne polovica žien mala hodnoty nižšie ako 30 ug/l, najnižšie koncentrácie boli u žien vo veku 38-41 rokov, najvyššie u 22-25-ročných.

Tab. 1. Koncentrácie 25-OH-vitamínu D3 u zdravých premenopauzálnych slovenských žien

	medián	priemer	SD	n	5 percentil	95 percentil
S-25OH-D3	30,21	32,58	12,25	162	16,20	57,47

Záver: Deficit 25-OH-vitamínu D3 sme našli až u 50% sledovaných zdravých slovenských premenopauzálnych žien.

STECOVÁ, A., SCHENKOVÁ, K.
DOBÁKOVÁ, E., WEIGLOVÁ, K.

Laboratórna diagnostika Medirex, a.s.
Bratislava

V rámci prenatálnej starostlivosti o tehotnú ženu boli v mnohých krajinách zavedené celoplošné skriningové programy na detekciu vrodených vývojových chýb plodu. Medzi najčastejšie a najzávažnejšie vrodené vývojové chyby (VVCH) v našej populácii patria rúžštepové chyby nervovej trubice (neural tube defects, NTD) a chromozómové aberácie (CHA).

Na Slovensku je organizácia skriningu ošetrovaná Odborným usmernením MZ SR číslo 14631-3/2006-OZS, ktorého cieľom je štandardizácia a skvalitnenie prenatálneho skriningu vývojových chýb v segmente vyšetrovania biochemických markerov gravidity a ich celoplošného využitia v prenatálnej diagnostike s možnosťou zvýšenia zachytnosti VVCH.

I. trimester: vyšetrenie by sa malo robiť v 10+1 až 13+6 týždni gravidity, optimálne v 10+0 až 11+3. Základnými biochemickými parametrami sú: s graviditou asociovaný proteín A (prednancy associated protein A, PAPP-A) a humánný choriogonadotropný hormón (HCG).

II. trimester: v 14+0 až 18. týždni gravidity (maximálne v 20. týždni) stanoví alfa-fetoproteín (AFP) a HCG. Stanovované parametre musia spĺňať kritériá kvality. Vyšetrenia majú byť hodnotené certifikovaným softvérom.

V súčasnosti sa za najpreukázateľnejší považuje tzv. integrovaný test.

PAPP-A je bielkovina vznikajúca v rozvíjajúcej sa placentе, predpokladá sa, že zvyšuje dostupnosť IGF. V materskej krvi sa zvyšuje od 7. týždňa gravidity. Znížené hodnoty sú spôsobené posttranslačnými zmenami, poruchou prechodu placentou alebo modifikovanou stabilitou v sére. Predikujú Downov syndróm a iné aneuploidie. PAPP-A sa nesmie hodnotiť samostatne, ale vždy s inými parametrami (nuchálna translucencia, free-beta-HCG, ap.) Základnou podmienkou interpretácie je presne určený gestačný vek, vzhľadom k tomu, že koncentrácia PAPP-A sa so stúpajúcim vekom plodu zvyšuje exponenciálne.

HCG je produkovaný v placentе, jeho úlohou je udržiavanie corpus luteum, ovplyvňuje tiež syntézu steroidných hormónov. Biologicky aktívny HCG je tvorený podjednotkami alfa a beta, ale v placentе a v krvi sa nachádza vo viacerých formách (viazané i voľné podjednotky, ap.). Voľné beta-HCG tvorí asi 1-4% celkového HCG a toto percento sa zvyšuje u plodov postihnutých chromozómovými aberáciami. Pre skrining aneuploidii v I. trimestri sa preto doporučuje stanovenie voľného beta-HCG. Pre II. trimester sa používa stanovenie celkového HCG.

AFP je produkovaný pečeňou plodu a obličkami vylučovaný do amniovej tekutiny, odkiaľ sa dostáva do materskej krvi. Jeho zvýšené hodnoty sú prítomné u plodov s defektami neurálnej trubice a prednej brušnej steny. Môžu indikovať tiež predčasný pôrod a retardáciu intrauterínneho rastu. Nachádzajú sa fyziologicky pri viacplodovej gravidite. Znížené hodnoty predikujú chromozómové aberácie.

Pre správny skrining je dôležitá úzka spolupráca s gynekológmi a genetikmi, ako aj premyslená kombinácia rôznych parametrov tak, aby sa zachytilo čo najvyššie percento VVCH pri nízkej falošnej pozitivite.

NÁVRH REFERENČNÝCH HODNÔT UKAZOVATEĽOV KOSTNÉHO METABOLIZMU PRE POPULÁCIU SLOVENSKÝCH PREMENOPAUZÁLNYCH ŽIEN

STECOVÁ, A.¹, DOBÁKOVÁ, E.¹
KILIÁN, P.¹, PAYER, J.², KILLINGER, Z.²

¹Laboratórna diagnostika Medirex, a.s., Bratislava,
²V. interná klinika Lekárskej fakulty
Univerzity Komenského a Fakultnej nemocnice, Bratislava

Úvod. Ukazovatele kostného metabolizmu sa používajú predovšetkým pri zisťovaní veľkosti kostného obratu a monitorovaní antiresorpčnej aj anabolickej liečby.

Na hodnotenie resorpcie kostnej hmoty sa najčastejšie používajú:

- Hydroxyprolín – dnes sa od neho ustupuje vzhľadom k predanalytickým problémom a s tým súvisiacimi ťažkosťami pri interpretácii
- Voľné alebo na bielkoviny viazané cross-links:
 - Deoxypyridinolín
 - Karboxyterminálny telopeptid kolagénu typu 1 (ICTP, β -CTX)
 - Aminoterminálny telopeptid kolagénu typu 1 (NTx)

Pri zmenách kostnej novotvorby sú to:

- Kostný izoenzým alkalickéj fosfatázy
- Karboxyterminálny propeptid prokolagénu typu I (PICP)
- Aminoterminálny propeptid prokolagénu typu I (PINP)

Obrazom celkového kostného obratu je osteokalcín.

Dôležitým bodom sú referenčné hodnoty, keďže od týchto sa odvíjajú hranice, ktoré by sa mali dosiahnuť pri

terapii. Pri anabolickej terapii je ukazovateľom úspešnosti liečby PINP, ktorého koncentrácie by sa mali zvýšiť najmenej o 40%. Úspešnosť antiresorpčnej terapie sa monitoruje pomocou CTx (zníženie koncentrácie o 35–55%), osteokalcínu (zníženie o 20–40%) a PINP (zníženie o 40%).

Materiál a metódy: Vzhľadom k tomu, že viaceré pracovišká na Slovensku používajú ako ukazovatele kostného metabolizmu osteokalcín, PINP a CTx, stanovili sme referenčné hodnoty pre tieto parametre na analytickom systéme Modular E 170 (Roche, Bazilej, Švajčiarsko). Metódy sú založené na imunochemickom stanovení pomocou dvoch monoklonových protilátok, s elektrochemiluminiscenčnou detekciou. Výber vhodných probandiek sa robil v spolupráci s osteocentrami v Košiciach, Lubochni, Banskej Bystrici, Piešťanoch a 2 centrami v Bratislave. Do súboru bolo vybraných 162 zdravých žien vo veku 23–41 rokov s normálnou kostnou denzitou. Materiál sa predanalyticky spracoval v laboratóriách klinickej biochémie a zmrazil až do termínu stanovenia na -20°C . Analýzy sa robili v jednej sérii pre každý parameter.

Výsledky: sú uvedené v tabuľke č. 1:

Tab. 1. Hodnoty kostných ukazovateľov v populácii premenopauzálnych slovenských žien

	medián	priemer	SD	5 percentil	95 percentil
CTx	258,95	261,05	109,76	86,90	439,31
OSTEO	19,45	19,95	6,55	9,91	32,02
PINP	34,16	36,29	13,94	17,71	62,18

Záver: Stanovili sme referenčné hodnoty ukazovateľov kostného metabolizmu v populácii slovenských premenopauzálnych žien, a to PINP, osteokalcín a CTx.

PRÍNOS SKRÍNINGOVÉHO VYŠETRENIA
GUANIDÍNOACETÁTU K DIAGNOSTIKE PACIENTOV
S PORUCHOU BIOSYNTÉZY KREATÍNU

ŠALINGOVÁ, A.¹, BEHÚLOVÁ, D.¹, KOLNÍKOVÁ, M.²
BÁRTL, J.³, BODAMER, O.⁴, BELAN, S.⁵, PONEC, J.¹

¹Oddelenie laboratórnej medicíny

²Klinika detskej neurológie a Detská fakultná nemocnica
s poliklinikou, Bratislava, Slovenská republika

³Ústav dedičných metabolických poruch, 1. LF UK, Praha
Česká republika

⁴Department of Pediatrics and National Newborn
Screening Laboratory, University Hospital and General
Hospital of Vienna, Austria

⁵Klinika rádiodiagnostiky, Fakultná nemocnica
akad. L. Déreza, Bratislava, Slovenská republika

Úvod: Deficit guanidínoacetát metyltransferázy (GAMT, EC 2.1.1.2; Mc Kusick 601240) je autozómovo recesívne dedičné ochorenie biosyntézy kreatínu. Klinický fenotyp je variabilný, zahŕňa široké spektrum neurologických príznakov od progresívneho extrapyramidového postihnutia, svalovej hypotonie po epilepsiu a mentálnu retardáciu. Charakteristickým biochemickým nálezom je vysoké vylučovanie guanidínoacetátu (GAA), nízka koncentrácia kreatinínu a deplécia kreatínu v mozgu a vo svaloch. Deficit GAMT je dobre liečiteľný orálnou suplementáciou kreatínmonohydrátom a ďalšou podpornou terapiou.

Kazuistika: V práci prezentujeme dve sestry, 6- a 16-ročné, s psychomotorickou retardáciou, poruchami reči, autistickým správaním a epilepsiou. Rutinné biochemické nálezy poukázali na výrazne znížené koncentrácie kreatinínu v sére (17 a 21 $\mu\text{mol/l}$) a extrémne zníženú exkréciu kreatinínu v zbieranom moči 0,02 mmol/kg/24 h (referenčný rozsah 0,06–0,19) a 0,08 mmol/kg/24 h (referenčný rozsah 0,16–0,24). Skrínigová HPTLC metóda s využitím Sakaguchiho činidla na dôkaz guanidíno zlúčenín v rannom a zbieranom moči dokázala extrémne zvýšené vylučovanie GAA. Metóda kvantitatívneho stanovenia GAA pomocou tandem MS potvrdila jeho zvýšenú exkréciu. Hoci nález na NMR bol u obidvoch sestier v norme, výsledky in vivo protónovej magnetickej rezonančnej spektroskopie (¹H-MRS) potvrdili výraznú depléciu kreatínu v mozgu. Definitívna konfirmácia diagnózy deficitu GAMT u prezentovaných pacientiek mutačnou analýzou je v súčasnosti realizovaná v spolupráci s genetickým laboratóriom v zahraničí.

Záver: Vyšetrenie GAA by malo byť dostupné v rámci skrínigového metabolického vyšetrenia v príslušných špecializovaných diagnostických centrách. Obzvlášť dôležitá je indikácia tohto parametra u pacientov s neurologickou symptomatológiou, epilepsiou, mentálnou retardáciou, extrapyramidovými príznakmi, poruchami reči, autizmom, svalovou hypotoniou a slabosťou. Pri včasnom stanovení diagnózy a nasadení liečby dochádza k výraznému zlepšeniu klinického stavu pacientov s deficitom GAMT.

LATE BLOCKADE OF THE RENIN-ANGIOTENSIN
SYSTEM IN THE OBESE ZUCKER RAT -
FUNCTIONAL AND PARTIAL MORPHOLOGICAL
REGRESSION OF RENAL INJURY

ŠEBEKOVÁ, K.¹, LILL, M.²
BOOR, P.¹, HEIDLAND, A.³, AMANN, K.²

¹Department of clinical and experimental Pharmacotherapy
Slovak Medical University, Bratislava, Slovakia

²University Erlangen-Nürnberg, Department of Pathology
Erlangen, Germany

³Department of Internal Medicine, University of Würzburg,
Würzburg, Germany

Background and objectives. In various experimental nephropathies, inhibitors of the renin-angiotensin-system (RAS) halted the progression, and in a few studies even induced a regression of renal injury. However, whether in the established diabetic nephropathy (DN) of type 2 diabetes mellitus RAS inhibitors are able to reverse renal damage remains unclear. We studied the effects of a late blockade of RAS with perindopril or candesartan on renal injury in the obese Zucker rat (OZR).

Design, animals, materials and methods. Forty 4-week-old OZR were uninephrectomized and fed a high protein diet to accelerate DN. After 16 weeks, they were randomized into 4 groups (n = 10 each) with comparable proteinuria: 1) control group sacrificed immediately for baseline data, and groups daily gavaged for 8 weeks with 2) placebo, 3) perindopril (1 mg/kg/d), or 4) candesartan (10 mg/kg/d).

Results. Compared to placebo, both drugs reduced blood pressure (perindopril by 15.6%, candesartan by 9.5%), and renal hypertrophy. Glomerulosclerosis was halted and the numbers of glomerular endothelial and podocyte cells were restored. Mesangiolysis was reversed by perindopril, length density of glomerular capillaries by candesartan, and proteinuria by both treatments (perindopril to 32% and candesartan to 37% of pre-treatment values). Metabolic and oxidative parameters were either stabilized (perindopril), or improved (candesartan) in comparison to pre-treatment values.

Conclusions. Our data show that in the OZR late inhibition of RAS halts the progression of glomerulosclerosis, induces a partial regression of mesangiolysis and of capillary length density, and prevents the decline in glomerular endothelial and podocyte cell numbers. Tubulointerstitial fibrosis and vascular injury remains unchanged. Proteinuria shows a marked regression.

ŠEBOVÁ, C.¹, OSTROŽLÍKOVÁ, M.¹
BEHÚLOVÁ, D.¹, ŠALINGOVÁ, A.¹, HOLEŠOVÁ, D.¹,
HLAVATÁ, A.³, BZDÚCH, V.², HÁLOVÁ, K.⁴
ŠALIGOVÁ, J.⁵, POTOČŇÁKOVÁ, E.⁵, PONEC, J.¹

¹Oddelenie laboratórnej medicíny,

²Prvá detská klinika a

³Druhá detská klinika, Detská fakultná nemocnica
s poliklinikou, Bratislava

⁴Detská fakultná nemocnica, Banská Bystrica

⁵Detská fakultná nemocnica, Košice

Úvod: Glykogenózy (GSD) sú dedičné metabolické poruchy metabolizmu glykogénu. Známých je viac než 12 typov (každý podmienený iným genetickým defektom). Ich klasifikácia je založená na deficite príslušného enzýmu a postihnutých tkanivách. Poruchy metabolizmu glykogénu poškodzujú primárne pečeň, svaly, ale aj iné orgány.

Cieľ práce: Odhadnúť prevalenciu glykogenóz na Slovensku a poukázať na ich problematickú diagnostiku.

Metódy: Z troch centier pre dedičné metabolické poruchy na Slovensku sme získali údaje o diagnostikovaných a liečených pacientoch s glykogenózou (GSD). Podklady sme analyzovali a následne sme hľadali efektívne riešenia v tejto oblasti.

Výsledky a závery: V súčasnosti je na Slovensku v detskej populácii evidovaných iba 13 pacientov s potvrdenou diagnózou glykogenózy (GSD). Na základe výsledkov ich molekulovo-genetických a/alebo enzýmových vyšetrení boli detegované tieto typy glykogenóz: 5 pacientov s GSD typ Ia, 3 pacienti s GSD typ Ib, 3 pacienti s GSD typ III, 1 pacient s GSD typ IV, 1 pacient s GSD typ IX a 1 pacient s GSD typ 0. Nenašli sme pacientov so svalovými formami glykogenóz (V,VII).

Výskyt glykogenóz v Európe je podľa súčasných štúdií priemerne 1 prípad na 20 000–25 000 živonarodených detí. Nízky počet potvrdených glykogenóz je pravdepodobne dôsledkom nedostatočnej detekcie týchto ochorení na Slovensku:

1. V pediatrickej praxi je potrebné v diferenciálnej diagnostike častejšie uvažovať o možných glykogenózach, obzvlášť pri miernejších formách ochorenia.
2. Diagnostika glykogenóz v populácii dospelých nie je doriešená. Nepredpokladáme, že mierne formy glykogenóz sú správne odhalené u pacientov s pečeno- a svalovou symptomatológiou.
3. Ku zmene situácie je nutná dostupnosť lepšej edukácie v danej problematike pre klinikov.

ŠKODOVÁ, J., PEREČKOVÁ, J.
PONEC, J., BEHÚLOVÁ, D.

Centrum dedičných metabolických porúch
Oddelenie laboratórnej medicíny
Detská fakultná nemocnica s poliklinikou, Bratislava

Úvod: Stanovovanie organických kyselín (OK) metódou GC-MS je potrebné na diagnostikovanie mnohých dedičných metabolických porúch (DMP), najmä organických acidúrií. Pre tieto poruchy je charakteristické vylučovanie veľkého množstva normálneho metabolitu, ktorý nie je obvykle detegovaný, alebo vylučovanie malého množstva špecifických metabolitov. Organické acidúrie sú genetické poruchy, ktoré vznikajú v dôsledku zníženej aktivity niektorého enzýmu. Nastáva narušenie intermediárneho metabolizmu a akumulácia toxických látok v organizme.

Metóda a pacienti: Organické kyseliny sa vyšetřovali u pacientov so suspektnou DMP z ranného moču po úprave. Klasická príprava vzorky na stanovenie OK pozostáva z úpravy pH, oximácie, extrakcie do etylacetátu a derivatizácie. Analýza bola robená na prístroji TRACE GC 2000/Polaris Q (Thermo Finnigan, USA), na kolóne DB - 5 MS (30 m x 0,25 mm i. d., 0,25 µm film). Bol použitý nosný plyn hélium, ionizácia EI - 70 eV a kvantifikácia v SCAN móde.

Výsledky: Počas 5 rokov (2004-2008) sme vyšetřili 3250 vzoriek od pacientov s podozrením na DMP a zachytili sme a/alebo monitorovali 48 pacientov s nasledovnými ochoreniami:

DMP	Počet pacientov
Organické acidúrie	15
Metylmalónová acidúria	5
Propiónová acidúria	2
2-oxoadipová acidúria	1
3-metylglutakonová acidúria	1
Glutarová acidúria I	2
Canavanova choroba	3
Mevalónová acidúria	1
Aminoacidopatie	9
Leucinóza	1
Tyrozínémia I	1
Alkaptonúria	5
Fenylketonúria	2
Poruchy oxidácie mastných kyselín	14
Deficit MCAD	8
Deficit MAD	4
Deficit LCHAD	1
Deficit VLCAD	1
Mitochondriové poruchy	9
Peroxizómové poruchy	1
Zellwegerova choroba	1
Spolu	48

Sme zaradení do mezinárodního systému kontroly kvality ERNDIM.

Záver: Organické acidúrie, poruchy oxidácie mastných kyselín a iné DMP sú život ohrozujúce stavy. Je veľmi dôležité tieto ochorenia včas diagnostikovať a pacientov liečiť, čím sa ich život nielen zachráni ale i skvalitní. Centrum dedičných metabolických porúch v DFNSP v Bratislave je súčasťou Oddelenia laboratórnej medicíny. Poskytuje rutinné i vitálne indikované vyšetrenia v nepretržitej prevádzke pre celé Slovensko.

VÝUKA BIOCHEMIE A KLINICKÉ BIOCHEMIE V EVROPSKÉ UNII

ŠTERN, P., TRNKOVÁ, B.
ŠEBESTA, I., ZIMA, T.

Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN Praha

Přednáška shrnuje výsledky získané při návštěvách 53 lékařských fakult ve 13 původních zemích EU v letech 2004 až 2006. Pro srovnání jsou uvedeny také údaje z České republiky.

Začíná se dávat přednost modulově orientované výuce lékařství před zaměřením dle jednotlivých oborů. Zatímco v některých zemích je tento postup již zaveden (např. Rakousko, Nizozemí), v jiných je zaveden částečně (např. Česko, Irsko, SRN) nebo se o této změně uvažuje (např. Portugalsko, Španělsko). Nová orientace klade daleko vyšší nároky na samostatné studium studentů. Velkým problémem je nedostatek studijní literatury zaměřené na modulově orientovanou výuku. Zavádí se e-learning, ale to je jen doplněk a nástavba výuky. Zásadní změna z předmětově na modulově orientovanou výuku vede k tomu, že účast studentů na přednáškách je enormně vysoká. Je diskutabilní, zda při přednáškách přenášených televizi z centrální posluchárny pro 500 studentů do několika poslucháren pro 300 studentů, se neztrácí lidský rozměr výuky.

Základ výuky tvoří semináře, na které musí chodit studenti předem připraveni. Intenzita výuky v seminářích je do značné míry dána počtem studentů. Na některých fakultách jsou diskuse o kazuistikách pro malý počet, např. 6 studentů. Jinde jsou semináře chápány jako doplněk přednášek s poměrně velkým počtem, např. 30 studentů. Praktická výuka chemie, biochemie a klinické biochemie se značně omezuje. Není tomu tak ale všude, např. německé fakulty věnují praktickým cvičením značnou pozornost a řada praktik je průběžně vybavována novou technikou. Na některých fakultách jsou tyto místnosti obrovské (až pro 90 studentů) a vypadají spíše jako výrobní haly, než jako výuková zařízení.

Zkoušky jsou realizovány převážně formou písemných testů s volbou z více odpovědí, případně doplněny rozбором kazuistik. Na některých fakultách studenti odpovídají na otázky několika větami nebo píšou obsáhlejší pojednání na vybrané biochemické téma. Studenti mohou mít při zkoušce svobodu výběru, kdy si k odpovědi vyberou jen dvě třetiny otázek a k eseji jedno téma ze tří. Ústní zkoušky jsou využívány zpravidla jen při opravných termínech a ani v tomto případě to není pravidlem. V České republice se většinou uplatňují ústní zkoušky.

K harmonizaci výuky mezi lékařskými fakultami EU převládá obecně skepse. Fakulty jsou samostatné celky, velmi hrdé na svou minulost a tradice, takže kooperace při inovacích studijních programů mezi jednotlivými ústavami různých fakult není příliš rozvinutá. Pokud by se podařilo odstranit administrativní a technické překážky, pak by celému procesu harmonizace napomohla intenzivnější výměna hostujících profesorů a několika-semesterová výměna studentů.

ŠTERN, P., TRNKOVÁ, B., ŠEBESTA, I., ZIMA, T.

**Institute of Clinical Biochemistry and
Laboratory Diagnostics, the 1st Faculty of Medicine
Charles University and General University Hospital
Prague**

The lecture summarizes the results obtained during visits to 53 medical schools in the 13 original EU countries during 2004–2006. Data from the Czech Republic are shown for comparison.

Medical education based on modules is becoming more popular than individual subjects of study. While some countries have already introduced this procedure (e.g. Austria and the Netherlands), other countries have introduced it only partially (e.g. the Czech Republic, Ireland, Germany) or they are considering it (e.g. Portugal or Spain). This new development places much higher requirements on students' self-guided studies. One of the problems rests in a lack of study literature focused on module-based education. E-learning is being introduced, but it is only a supplement and extension of education. The key shift from subject-based to module-based education significantly increases the number of students participating in lectures. The question is whether lectures broadcast via TV from a central lecture room for 500 people to a few lecture rooms for 300 people are still effective and student-friendly.

The basis of education rests in seminars, for which students must be prepared. Work intensity during these seminars depends on the number of students. Students of some schools discuss casuistics in small groups – for example, 6 students. Other schools see seminars as lecture supplements, in which large numbers of students participate – for example, 30 students. The practical education of chemistry, biochemistry, and clinical biochemistry becomes severely limited. However, this does not apply to all schools. For example, German schools pay great attention to practical exercises and many of them are continuously equipped with new technology. Some schools have very big rooms for practical exercises (for up to 90 students) and they look rather like production halls and not like educational facilities.

Students usually take written examinations and they may select from a few answers. Sometimes, they analyze casuistics. Students of some schools answer their questions in a few sentences or they write more comprehensive essays on selected biochemical topics. During examinations, students may select only two-thirds of the questions and one of three essay topics. Oral examinations are usually used after failed written examinations and even that does not happen regularly.

Education provided by individual EU medical schools is not believed to be properly harmonized. Schools are independent institutions that are extremely proud of their past and traditions; therefore, cooperation in the innovation of study programs of the individual schools is not very good. If it became possible to eliminate administrative and technical obstacles, the whole harmonization process could be accelerated through more intensive exchanges of hosting professors and students lasting a few semesters.

VPLYV ZVÝŠENEJ EXPRESIE GÉNOV
21. CHROMOZÓMU U LUDÍ S DOWNOVÝM
SYNDRÓMOM NA KOSTNÝ METABOLIZMUS

ŠUSTROVÁ, M.¹, KRIVOŠÍKOVÁ, Z.²
SPUSTOVÁ, V.², ŠTEFÍKOVÁ, K.²

¹Oddelenie imunológie a imunotoxikológie
Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

²Oddelenie klinickej a experimentálnej farmakoterapie
Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

Úvod: Zvýšená expresia génov 21. chromozómu u ľudí s Downovým syndrómom (DS), je spojená s viacerými patologickými stavmi, medzi ktoré patria aj zmeny v kostnom, oxidačnom a lipidovom metabolizme. Predčasný výskyt osteoporózy je v literatúre opísaný, nie je však etiologicky potvrdený. Na vývoji osteoporózy sa môžu podieľať rôzne faktory a zdravotné problémy, z nich pravdepodobne častejšie sú abnormality v pohlavnom vývine, nedostatočné stravovanie, gastrointestinálne problémy – Celiakálna choroba, intolerancia laktózy, potravinové alergie, autoimunitné choroby a nedostatočná pohybová aktivita. Cieľom našej práce bolo zistiť stav kostného metabolizmu u dospelých ľudí s Downovým syndrómom

Pacienti a metódy: Do súboru sme zaradili 90 ľudí s Downovým syndrómom, 45 žien a 45 mužov vo veku od 18 do 45 rokov, s priemerným vekom u žien $25,71 \pm 10,3$; a u mužov $27,8 \pm 10,1$. Z ukazovateľov kostného metabolizmu sme vyšetrili 25(OH)vitamín D, osteokalcín, osteoprotegerín, RANKL, katepsín K, TNF-alfa, minerálne látky (vápnik, horčík, fosfor) v sére a v moči. Densitometrické vyšetrenie absolvovali všetci probandi s DS. Deficit 25(OH) D sme hodnotili podľa všeobecných kritérií: normálne hod-

noty (≥ 30 ng/ml), ľahký deficit (20–30 ng/ml), stredný deficit (10–20 ng/ml) a ťažký deficit (< 10 ng/ml). Densitometrické vyšetrenie sa robilo dvojfotónovou absorpciometriou lumbálnej chrbtice a krčku femuru.

Výsledky: V oboch skupinách bola znížená koncentrácia 25-(OH) vitamínu D (pod 20 ng/ml). Signifikantné rozdiely sme zaznamenali medzi oboma skupinami (muži a ženy) v nasledujúcich výsledkoch – znížená koncentrácia 25-(OH) vitamínu D u žien ($p < 0.005$), znížená koncentrácia hladín osteokalcínu u žien ($p < 0.05$). Kostná denzita bola signifikantne znížená u mužov oproti ženám: NF hlavice femuru ($p < 0.05$), NF Z-score ($p < 0.0001$), lumbálna BMD, Z-score ($p < 0.003$). Zníženú kostnú hustotu malo 66 % mužov a 33 % žien s DS. Nezaznamenali sme rozdiely v koncentráciách vápnika, horčíka, fosforu v sére, či v moči.

Záver: V našom súbore sme zistili u ľudí s DS vysokú prevalenciu deficitu vitamínu D, u žien signifikantne nižšie koncentrácie ako u mužov. Paradoxne však muži mali významne zníženú kostnú hustotu ako ženy, ktorá však nebola závislá ani od koncentrácie vitamínu D, ani od gastrointestinálnych problémov (celiakia) a výživy. Našli sme však závislosť medzi pohlavným vyzrievaním (anamnestické údaje o ejakulácii) a kostnou denzitou u mužov s DS. Na predčasnom vývoji osteoporózy u ľudí s DS sa podieľa viac faktorov, etiologicky čiastočne odlišných u mužov, a u žien. Z výsledkov vyplýva nasledovné: 1. densitometrické vyšetrenie musí byť súčasťou preventívnej starostlivosti o dospelých ľudí s DS, 2. deficitu vitamínu D je potrebné predchádzať vhodnou suplementáciou a 3. u mužov s DS s nedostatočným pohlavným vyzrievaním je potrebné doplniť hormonálny status o vyšetrenie mužských pohlavných hormónov a FSH.

Táto práca bola podporená projektom Ministerstva zdravotníctva SR (č.2005/39-SZU-17).

TIBENSKÁ, E.

Laboratórna diagnostika Medirex a.s.
Bratislava

Celiakálna choroba je autoimunitné ochorenie, pri ktorom prevažuje humorálna imunitná odpoveď. V organizme sa vytvárajú protilátky proti viacerým antigénom – či už exogénnym (protilátky proti gliadínu) alebo endogénnym (protilátky proti endomýziu, retikulínu, tkanivovej transglutamináze). V posledných rokoch je v diferenciálnej diagnostike celiakálnej choroby zaznamenaný pokles využitia detekcie protilátok proti gliadínu (AGA), retikulínu (ARA) a endomýziu (EMA) v prospech stanovenia protilátok proti tkanivovej transglutamináze (anti-tTG). Na našom oddelení vyšetrujeme podľa požiadaviek lekára protilátky proti všetkým trom antigénom – AGA, anti-tTG v triedach IgG a IgA a EMA v triede IgA.

Vzhľadom k pomerne vysokej indikácii anti-tTG v triede IgG sme si položili otázku výpovednej hodnoty tohto vyšetrenia, pretože podľa svetovej a domácej literatúry má stanovenie anti-tTG v triede IgG význam len pri selektívnej deficiencii celkového IgA.

Cieľ práce: vyhodnotiť význam stanovenia protilátok proti tkanivovej transglutamináze IgG a zistiť koreláciu medzi testami EMA anti-tTG používanými v diferenciálnej diagnostike celiakálnej choroby.

Pacienti: Od januára 2007 do konca marca 2008 sme vyšetřili spolu 3065 pacientov na anti-tTG IgA, u 1438 pacientov boli súčasne stanovené aj protilátky anti-tTG v triede IgG a 1552 u pacientov boli stanovené EMA protilátky.

Metódy: Protilátky proti tkanivovej transglutamináze sme stanovovali ELISA metódou (EUROIMMUN AG, následne HYCOR Biomedical Ltd), protilátky proti endomýziu metódou nepriamej munofluorescencie (EUROIMMUN AG)

Výsledky: Pozitívny výsledok anti-tTG IgA (> 20 IU/ml) sme zaznamenali u 223 z 3065 vyšetřených pacientov (7,3%), z toho u 92 bolo robené aj vyšetřenie anti-tTG IgG. V 79 prípadoch bol výsledok anti-tTG negatívny pri pozitívnom výsledku anti-tTG a len v 13 prípadoch sme pri pozitívite anti-tTG IgA zaznamenali súčasný pozitívny výsledok anti-tTG IgG. Ani v jednom prípade sme nezistili pri negatívnom výsledku anti-tTG IgA pozitívny výsledok anti-tTG IgG. Zvyšných 1346 stanovení anti-tTG IgG bolo negatívnych pri súčasnej negatívite anti-tTG.

Záver: Z našich výsledkov, v súlade s literatúrou vyplýva, že v diferenciálnej diagnostike celiakálnej choroby má význam stanovenie protilátok proti transglutamináze v triede IgA, v triede IgG len pri selektívnej deficiencii celkového IgA, nakoľko sme ani v jednom prípade nezaznamenali pozitívne protilátky anti-tTG IgG pri negatívite IgA.

TICHÁ, E., BZDÚCH, V.
HORNOVÁ, J., BIRČÁK, J.

I. detská klinika DFNSP a LF UK
Bratislava

Úvod

Starostlivosť o pacientov s mentálnou anorexiou má na I. detskej klinike LF UK takmer 40-ročnú tradíciu. Liečili sme viac ako 300 pacientov vo veku $15 \pm 0,2$ roka (9–18 rokov).

Pokles telesnej hmotnosti pri mentálnej anorexii ovplyvňujú metabolické pochody organizmu, ktoré sú prísne regulované endokrinnými mechanizmami. Vzhľadom na ich centrálnu úlohu v metabolizme sme v danej práci sledovali hormonálnu odpoveď pri hladovaní a poststimulačnú inzulínovú odpoveď.

Pacienti a metódy

Vyšetřili sme 32 pacientov s AN vo veku 9–18 rokov, s deficitom hmotnosti –9 až –45% oproti norme pre daný vek a výšku. U každého pacienta sme uskutočnili štandardný perorálny glukózový tolerančný test. Vzorky krvi na stanovenie plazmatickej hladiny glykémie, imunoreaktívneho inzulínu (IRI) sme odobrali tesne pred podaním glukózy spolu so vzorkami krvi na vyšetřenie hormonálnych parametrov a potom opakovane o 30, 60, 120 a 180 minút po podaní glukózy. Výsledky vyšetření boli spracované štatisticky.

Výsledky

Minimálne, maximálne a priemerné hodnoty sledovaných parametrov sú uvedené v tabuľke 1, 2 a 3. Nízke hodnoty T_3 , významná korelácia T_3 s deficitom hmotnosti a normálne hladiny TSH poukazujú na prítomnosť syndrómu nízkeho T_3 . Nízku hladinu gonadotropínov na začiatku ochorenia a ich vzostup po úprave klinického stavu, ako aj koreláciu s % hmotnosti ($r=0,6$) považujeme za fyziologickú odpoveď organizmu na hladovanie. Glykemická krivka a inzulínová odpoveď počas testu boli u všetkých pacientov v medziach referenčných hodnôt. Avšak podanie glukózy viedlo u pacientok s AN k významne menšiemu vzostupu glykémie a IRI v porovnaní s referenčnými hodnotami pre zdravé deti, ako aj s obeznými pacientami, kým hodnoty glykémie a IRI boli v skupine detí s obezitou identické s referenčnými hodnotami pre zdravé deti.

Diskusia

V danej práci sme sledovali reakciu organizmu na hladovanie u pacientok s AN. Poznanie endokrinných zmien pri hladovaní a ich správna interpretácia zabráni k predčasnému odosielaniu detí s AN na rôzne odborné vyšetřenia, najmä gynekologické, kde sa predčasne indikuje i tak neefektívna hormonálna liečba, ktorá môže zabrániť reštaurácii endokrinných parametrov pri adekvátnej terapii.

Tab. 1. Hodnoty endokrinných parametrov u pacientok s mentálnou anorexiou (n = 32) a u dievčat v kontrolnej skupine (n = 14). Pacientky s mentálnou anorexiou boli vyšetrené opakovane (pred liečbou a po čiastočnom terapeutickom zlepšení). Štatisticky významné zmeny * - p < 0,05, ** - p < 0,005, *** - p < 0,001

PARAMETER	Mentálna anorexia pred liečbou Priemer ± SE	Mentálna anorexia po zlepšení stavu Priemer ± SE	Kontrolná skupina Priemer ± SE
T ₃ (nmol/l)	1,36 ± 0,09	1,55 ± 0,05*	1,84 ± 0,12*
T ₄ (nmol/l)	88,98 ± 4,86	88,09 ± 3,12	87,44 ± 4,14
TSH (mIU/l)	2,02 ± 0,22	2,05 ± 0,20	1,94 ± 0,21
LH (IU/l)	0,55 ± 0,12	4,50 ± 1,11**	3,65 ± 0,64
FSH (IU/l)	2,43 ± 0,45	4,87 ± 0,61***	4,68 ± 0,41
Testosterón (nmol/l)	1,33 ± 0,14	1,08 ± 0,10	1,37 ± 0,16
Estradiol (nmol/l)	0,14 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,30 ± 0,05*
Progesterón (nmol/l)	4,84 ± 0,75	3,36 ± 0,85*	3,36 ± 0,321,59

Tab. 2. Priemerné hodnoty (±SEM) glykémie počas orálneho glukózového tolerančného testu u pacientok s mentálnou anorexiou a obezitou. Vzorky krvi boli odobraté pred začatím testu a nasledovne o 30, 60, 120, 180 minút po podaní glukózy

Pacienti	Vzorka	Glykémia počas oGTT (mmol/l)				
		0 min.	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.
Anorexia nervosa	Priemer ± SEM	3,69 ± 0,50	5,25 ± 1,52	5,51 ± 1,47	4,72 ± 1,56	4,34 ± 1,35
Obezita	Priemer ± SEM	4,04 ± 0,48	6,87 ± 1,69	6,75 ± 1,99	5,91 ± 0,96	5,03 ± 0,98

Tab. 3. Priemerné hodnoty (±SEM) IRI počas orálneho glukózového tolerančného testu u pacientok s mentálnou anorexiou a obezitou. Vzorky krvi boli odobraté pred začatím testu a nasledovne o 30, 60, 120, 180 minút po podaní glukózy

Pacienti	Vzorka	IRI počas o GTT (nmol/l)				
		0 min.	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.
Anorexia nervosa	Priemer ± SEM	0,05 ± 0,02	0,26 ± 0,16	0,26 ± 0,13	0,18 ± 0,11	0,12 ± 0,08
Obezita	Priemer ± SEM	0,09 ± 0,05	0,70 ± 0,66	0,63 ± 0,50	0,49 ± 0,43	0,29 ± 0,19

LITERATÚRA

Fairburn, C.G., Harrison, P.J.: *Eating disorders*. Lancet, 361, 2003, 407–416.

Fisher, M.M., Rome, E.S., Kaplan, D.W.: *Identifying and treating eating disorders*. Pediatrics, 111, 2003, 204–211.

Fennig, S., Roe, D.: *Physical recovery in anorexia nervosa: is this the sole purpose of a child and adolescent medical-psychiatric unit?* Gen. Hosp. Psychiatry, 24, 2002, 87–92.

Tichá, E., Birčák, J.: *Anorexia nervosa*. In Šašinka, M., Šagát, T., Kovács, L.: *Pediatrica I*, Bratislava, Herba, 2007, 333–337.

TICHÁ, L., BZDÚCH, V.
HORNOVÁ, J., BIRČÁK, J.

I. Department of Paediatrics of Children's Hospital Comenius
University Medical School

Background: The care about patients with anorexia nervosa (AN) has 40-years tradition in the Department of Paediatrics of Children's Hospital Comenius University. We have been treating patients with anorexia nervosa for 40 years. We treated more than 300 patients, in age $15 \pm 0,2$ years (9–18 years). The lost of body weight in patients with anorexia has influence to metabolic reaction in organism witch are strictly regulated endocrine mechanism. In this work we investigated endocrine parameters and answer of insulin after charge of glucosae under standard conditions.

Patients and methods: We investigated 32 patients with AN in age 9–18 years, with % deficit of weight -9 – -45 %. We took samples of blood to determine hormonal parameters. Plasma levels of glycemia, imunoreactive insulin (IRI) and C-peptide were determined before and during standard glucose tolerance test in 30, 60, 120 180 min.

Results: Values (means \pm SD) of indexes of body weight and hormonal parameters are in table. We found increased frequency of low T3 syndrome. Low LH, FSH levels and their significant increased after refeeding can be a physiological answer of organism to increments of body weight.

Conclusion: Our results demonstrated several endocrine changes in fasting patients with AN. Additional studies are needed to evaluate the mutual interaction of these hormonal changes with other endocrine parameters.

TURAY, J. VÁEKA, J., GRNIAKOVÁ, V.

Metabolická ambulancia – Metabolic Centrum, Zvolen
Ústav Ekológie SAV – pracovisko biomatematiky, Zvolen

Lp:PIA2 (s lipoproteínmi združená fosfolipáza A2) je dnes považovaná za jeden z hlavných markerov vulnerability ateromatózných plakov a ich stupňa inflamácie. V našej práci sme vyšetrili u 90 pacientov Lp:PIA2 a ďalších 16 metabolických parametrov, ktoré sa účastnia na rozvoji aterosklerózy a jej komplikácii. Pacienti boli rozdelení do troch skupín. Zdraví $n=26$, s metabolickým syndrómom $n=20$ a čistou hypercholesterolémiou $n=44$. Voči zdravým bola Lp:PIA2 zvýšená u pacientov s hypercholesterolémiou o 28% a u pacientov s metabolickým syndrómom o 56%. Na základe vytvorenia matematického modelu (program Statistika) sme zistili že u pacientov s metabolickým syndrómom je Lp:PIA2 najmä funkciou ApoAI, ApoB/apoA1 a apoCIII v čom sa pacienti odlišujú od druhých dvoch sledovaných skupín. Tieto parametre sa priradujú v modernej diagnostike nie len k markerom rozvoja plakov, ale aj k aktívnym účastníkom zmien vo vulnerabilite plakov.

**ALFA-2-MAKROGLOBULÍN V SÉRE PACIENTOV
S CHRONICKÝMI HEPATOPATIAMI A EFEKT
TRANSPLANTÁCIE PEČENE NA HLADINU
TOHOTO PROTEÍNU**

**TURECKÝ, L.¹, KUPČOVÁ, V.²
SZÁNTOVÁ, M.², UHLÍKOVÁ, E.¹**

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie
LFUK

²III. interná klinika LFUK Bratislava

Fibrogenéza predstavuje dôležitý prvok v patogenéze chronických ochorení pečene. V súčasnosti je biopsia pečene s následným histologickým vyšetrením tkaniva „zlatým štandardom“ pre zhodnotenie stupňa fibrogenézy. Avšak biopsia pečene predstavuje invazívny zákrok, ktorý je stále spojený s možnosťou závažnejšej komplikácie. Preto je stála snaha nájsť vhodnejšiu, menej invazívnu metódu sledovania procesu fibrogenézy. Takouto metódou sa javí vyšetrenie biochemických markerov fibrogenézy v sére pacientov s chronickými hepatopatiami. V súčasnosti sa v praxi využíva viacero rôznych fibromarkerov ako napr. N-koncový peptid prokolagénu III, kyselina hyaluronová a ďalšie. Napriek relatívne širokej škále vyšetovaných markerov, ani jeden nespĺňa požiadavky, ktoré by sme očakávali od ideálneho fibromarkeru. Preto sa stále hľadajú nové parametre pre zhodnotenie tohto procesu. Jedným z potenciálnych fibromarkerov je aj alfa-2-makroglobulín (AMG).

Cieľ práce: Zistiť koreláciu hladiny alfa-2-makroglobulínu so stupňom fibrogenézy a sledovať vplyv transplantácie pečene na sérové hladiny alfa-2-makroglobulínu u pacientov s chronickými hepatopatiami.

Pacienti a metódy: Hladinu AMG sme vyšetrili u 52 pacientov so steatózou pečene, 28 pacientov s chronickou hepatitídou C a 64 pacientov s cirhózou pečene. U 7 pacientov sme sledovali vplyv transplantácie na AMG – vyšetrili sme koncentráciu AMG pred transplantáciou a 3, 6 a 9 mesiacov po zákroku. Hladinu AMG sme vyšetrovali elektroimunodifúziou podľa Laurella s použitím monošpecifických antisér. Stupeň fibrogenézy sme hodnotili na základe histologického vyšetrenia biopsických vzoriek pečene na škále od 0-4: Fibrosis in liver biopsy specimens were staged on scale of 0-4: 0- žiadna fibróza, 1- portálna fibróza bez sept, 2- ojedinelé septá, 3- početné septá bez cirhózy, 4- cirhóza pečene.

Výsledky a diskusia: Hladiny AMG boli mierne zvýšené u pacientov so steatózou pečene a chronickou hepatitídou. Najvyššie hodnoty boli u pacientov s cirhózou pečene. Pri rozdelení pacientov podľa stupňa fibrózy boli u pacientov s ťažkou fibrózou signifikantne vyššie hladiny AMG ako u pacientov s miernym stupňom fibrózy. Sledovanie hladín AMG u pacientov po transplantácii pečene ukázalo signifikantný pokles hladiny AMG.

Získané výsledky nasvedčujú tomu, že zvýšená hladina AMG u pacientov pred transplantáciou pečene súvisí s ich chronickou hepatopatiou a s najväčšou pravdepodobnosťou so zvýšenou fibrogenézou v postihnutej pečeni, lebo po transplantácii sa hladiny tohto proteínu normalizovali. Aj toto zistenie podporuje hypotézu o možnosti využitia vyšetrenia hladiny AMG ako biochemického markera fibrogenézy.

Práca vznikla v rámci riešenia grantového projektu VEGA 1/4268/07

VYŠETRENIE IZOENZÝMOV ALKALICKEJ FOSFATÁZY V DIAGNOSTIKE INTRAHEPATÁLNEJ CHOLESTÁZY GRAVIDNÝCH

TURECKÝ, L.^{1,2}, KUPČOVÁ, V.³, DIVÉKY, L.⁴
UHLÍKOVÁ, E.¹, GURÁŇOVÁ, O.², BAŠOVÁ, L.²

¹Ústav lek.biochémie a klinickej biochémie
LFUK Bratislava

²Alpha-Medical, a.s., Martin

³Tretia interná klinika LFUK Bratislava

⁴Druhá Gynekologicko-pôrodná klinika LFUK Bratislava

Aj fyziologická gravidita predstavuje zvýšenú záťaž pre organizmus matky. Jej priebeh môže byť u časti žien komplikovaný poruchou funkcie rôznych orgánov. Intrahepatálna cholestáza gravidných (ICP) je reverzibilná forma cholestázy objavujúca sa v druhej polovine gravidity a pretrvávajúca až do pôrodu. Predpokladá sa, že ide o geneticky podmienenú poruchu biliárnej exkrécie zhoršovanú estrogénmi.

Ako najcitlivejšie vyšetrenie pri diagnostike ICP sa ukázalo vyšetrenie plazmatickej hladiny žlčových kyselín. Bežné rutínne hepatálne testy ako sú vyšetrenia aktivít aminotransferáz (ALT a AST), alkalické fosfatázy (ALP) a gamaglutamyltransferázy (GGT) majú signifikantne nižšiu senzitivitu. Vyšetrovanie plazmatickej hladiny žlčových kyselín v našich podmienkach zatiaľ nepatrí do štandardnej ponuky vyšetrení klinicko-biochemických laboratórií. Aktivita alkalické fosfatázy, ktorá patrí medzi štandardné markery cholestázy, je fyziologicky zvýšená počas gravidity v dôsledku produkcie placentového izoenzýmu, čo sťažuje jej použitie na diagnostiku prítomnosti cholestatickej poruchy.

V našej práci sme chceli zistiť, či vyšetrenie izoenzýmov ALP nezvýši senzitivitu stanovenia ALP pri rutínnom biochemickom vyšetrení u žien s podozrením na ICP.

Pacienti a metódy

Vyšetrovaný súbor tvorilo 39 gravidných žien vo veku 22–37 rokov (priemerný vek $27,9 \pm 1,8$), u ktorých bola na základe klinickej symptomatológie a vyšetrenia hladiny celkových žlčových kyselín v sére stanovená diagnóza intrahepatálnej cholestatickej hepatopatie (ICP). Kontrolný súbor tvorilo 30 gravidných žien bez známkov tehotenských komplikácií, a u ktorých sa v anamnéze nevyskytovalo ochorenie pečene. Druhý kontrolný súbor tvorilo 25 negravidných žien bez anamnestických údajov o ochorení pečene. Hladinu celkových žlčových kyselín v sére sme stanovovali enzymaticky s použitím diagnostickej súpravy BILE ACIDS kit 450-A. Štandardne vyšetrované hepatálne vyšetrenia (GGT a celková alkalická fosfatáza) boli vyšetované komerčnými diagnostickými súpravami podľa návodu výrobcov. Izoenzýmy alkalické fosfatázy sme stanovovali na základe rozdielnej tepelnej stability. Inkubáciou 10 minút pri 65°C sme inhibovali tkanivovo-nešpecifický izoenzým (hepatálny a kostný). Výsledky boli spracované štatistickým programom Statgraphics.

Výsledky

Plazmatická koncentrácia celkových žlčových kyselín v súbore našich pacientiek s ICP bola $25,53 \pm 5,32 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Vzhľadom na skutočnosť, že ani u jednej z pacientiek neprekročila hladina žlčových kyselín hodnotu $40 \mu\text{mol.l}^{-1}$, jednalo sa u všetkých pacientiek o miernu formu ICP.

V oboch kontrolných súboroch – zdravých gravidných a zdravých negravidných žien boli hladiny žlčových kyselín v rámci referenčných hodnôt, tj. do $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ($5,38 \pm 0,98 \mu\text{mol.l}^{-1}$, resp. $4,81 \pm 1,02 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

Priemerná aktivita gamma-glutamyltransferázy sa v súbore pacientiek s ICP štatisticky významne nelíšila od aktivity v oboch kontrolných súboroch.

Aktivita celkovej alkalické fosfatázy bola v súbore pacientiek s ICP štatisticky významne vyššia ako u zdravých gravidných žien, pričom hodnoty zvýšené nad hornú hranicu referenčného rozsahu sme zaznamenali u 46 % pacientiek.

Vyšetrovanie tkanivovo-nešpecifického izoenzýmu ALP ukázalo signifikantne vyššie aktivity u žien s ICP v porovnaní so zdravými gravidnými ženami ($4,64 \pm 2,65 \mu\text{kat.l}^{-1}$ vs. $1,38 \pm 0,29 \mu\text{kat.l}^{-1}$), pričom aj podiel patologických hodnôt (hodnôt prekračujúcich hornú hranicu referenčného rozmedzia) bol v súbore žien s ICP vyšší ako v prípade celkovej aktivity ALP (69 % vs. 46 %).

Pri hodnotení vzťahu medzi hladinou žlčových kyselín a celkovou aktivitou ALP ako aj aktivitou tkanivovo-nešpecifického izoenzýmu ALP v sére zdravých gravidných žien nebola zistená signifikantná korelácia.

V súbore žien s ICP sa však ukázala medzi týmito dvoma parametrami štatisticky signifikantná pozitívna korelácia. Táto bola vyššia v prípade izoenzýmu ALP ($P < 0,01$, korelačný koef. 0,835 pre tkanivovo-nešpecifický izoenzým ALP vs. $P < 0,05$, korelačný koef. 0,532 pre celkovú aktivitu ALP).

Tab. 1. Biochemické parametre v sére kontrol a pacientiek s ICP

Skupina	celková aktivita ALP $\mu\text{kat.l}^{-1}$	tepelne inhibovaná aktivita ALP $\mu\text{kat.l}^{-1}$	GGT $\mu\text{kat.l}^{-1}$	Žlčové kyseliny $\mu\text{mol.l}^{-1}$
zdravé negravidné ženy	$1,54 \pm 0,04$	$1,43 \pm 0,08$	$0,31 \pm 0,11$	$4,81 \pm 1,02$
zdravé gravidné ženy	$3,04 \pm 0,90$	$1,38 \pm 0,29$	$0,25 \pm 0,15$	$5,38 \pm 0,96$
gravidné ženy s ICP	$5,76 \pm 3,67^{**}$	$4,64 \pm 2,65^{**}$	$0,61 \pm 0,42$	$25,53 \pm 5,32^{**}$

* - $P < 0,05$ gravidné ženy s ICP vs. zdravé gravidné ženy

** - $P < 0,01$ gravidné ženy s ICP vs. zdravé gravidné ženy

Tab.2. Podiel pozitívnych výsledkov enzýmových vyšetrení v sére pacientiek s ICP

skupina	celková aktivita ALP	tepelne inhibovaná aktivita ALP	GMT
gravidné ženy s ICP	18/39 46,15 %	27/39 69,23 %	7/39 17,95 %

Závery

Vyšetrenie izoenzýmov ALP zvyšuje senzitivitu vyšetrenia aktivity celkovej alkalické fosfatázy

Vyšetrenie hladiny žlčových kyselín stále zostáva najcitlivejším parametrom v diagnostike intrahepatálnej cholestázy gravidných.

Práca vznikla v rámci riešenia grantového projektu VEGA 1/4268/07.

PREGRADUÁLNA VÝUČBA KLINICKEJ BIOCHÉMIE NA LEKÁRSKYCH A NELEKÁRSKYCH ODBOROCH NA LEKÁRSKEJ FAKULTE UK V BRATISLAVE

TURECKÝ, L.

**Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie
Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave
a Alpha-Medical, a.s., pracovisko Bratislava-Rača**

Klinická biochémia je aplikovanou formou biochémie, ktorá sa zaoberá využitím biochemických vyšetrení na diagnostiku ochorení. Jej úlohou je poskytovať objektívne kvantifikovateľné údaje o chemickom zložení telových tekutín, sekrétov a exkrétov a jeho zmenách tak, aby sa dali posúdiť funkcie jednotlivých orgánov a teda i zdravotný stav jednotlivca. Osobitnou úlohou klinickej biochémie je podieľať sa na diagnostickom procese, t.j. na rozlíšení medzi zdravým a chorým jedincom, resp. zdravou a chorou populáciou, ako aj na rozhodovaní o tom, či nastala významná zmena zdravotného stavu. Svojím charakterom činnosti sa klinická biochémia takto prelína prakticky so všetkými lekáorskými odbormi. Rastúce požiadavky na úroveň a rozsah modernej liečebno-preventívnej starostlivosti vyžadujú od klinickej biochémie zavádzať stále novšie, zložitejšie a kvalitou náročnejšie biochemické vyšetrenia ako i racionalizáciu laboratórnych postupov modernizáciou prístrojovej laboratórnej techniky, s možnosťou elektronicky spracovávať laboratórne údaje a používať výpočtovú techniku.

Klinická biochémia je typický interdisciplinárny medicínsky odbor. To sa nutne musí prejavovať aj v rámci výuky klinickej biochémie. Z didaktického hľadiska je obsah výuky odlišný pre študentov lekáorských a nelekáorských odborov. Z poslucháčov všeobecného lekárstva len mizivé percento končí na pracoviskách klinickej biochémie. Drvivá väčšina poslucháčov medicíny zakotví v rôznych klinických disciplínach a sú teda konzumentami laboratórnych výsledkov. To predpokladá, že ťažisko výuky klinickej biochémie sa zameriava hlavne na problematiku indikácie a interpretácie laboratórnych výsledkov a na problematiku predanalytickej fázy laboratórneho vyšetrenia.

Na našej fakulte zabezpečujeme aj výuku klinickej biochémie pre poslucháčov Prírodovedeckej fakulty UK. Absolventi odboru biochémie, resp. analytickej chémie prírodovedeckej fakulty sú v celkom inom postavení ako pracovníci medicínskych odborov. Ich úlohou je hlavne zabezpečovať analytickú fázu laboratórnych vyšetrení a sú teda producentami laboratórnych výsledkov. Ťažisko výuky je teda zamerané na analytickú fázu laboratórneho vyšetrenia, hodnotenie kvality analytického procesu, poznanie možných interferencií rôznych exogénnych faktorov so samotným laboratórnym vyšetrením ako aj s možnými zmenami hladiny vyšetovaných analytov. Avšak je potrebné, aby aj títo poslucháči mali základnú predstavu o patobiochémii chorobných procesov v ľudskom organizme ako aj o zmenách laboratórnych parametrov, ktoré nastávajú pri poškodení funkcie

jednotlivých orgánových systémov. V poslednej dobe sa ďalšou cieľovou skupinou výuky klinickej biochémie stávajú aj poslucháči nelekárskych odborov lekárskej fakulty – poslucháči odboru ošetrovateľstva a poslucháči odboru pôrodnej asistencie. Absolventi vysokoškolského štúdia týchto smerov by mali byť pomocníkom lekára na kvalitatívne vyššej úrovni ako dnešný stredný zdravotnícky personál a mali by mať aj určité väčšie právomoci pri starostlivosti o pacienta. Z tohoto hľadiska je potrebné aby mali poznatky hlavne z problematiky predanalytickej fázy vyšetrenia – príprava pacienta pred vyšetrením, odber biologického materiálu a možné chyby spojené s touto fázou diagnostického procesu. Tak isto by mali mať základné vedomosti o zmenách jednotlivých laboratórnych vyšetrení vo vzťahu ku patologickým procesom, aby vedeli adekvátne reagovať.

Čo sa týka zakotvenia výuky klinickej biochémie v rámci výukového programu je to tak isto rozdielne. Výuka klinickej biochémie poslucháčov všeobecného lekárstva prebieha momentálne formou povinne voliteľného predmetu. Výuka prírodovedcov začala ako povinný predmet pre poslucháčov odboru biochémie, neskôr sa tiež transformovala na povinne voliteľný predmet. Výuka klinickej biochémie pre nelekárske odbory LFUK je formou povinného predmetu. Čo sa týka časového zaradenia výuky klinickej biochémie medikov, je určená pre poslucháčov 4. a 5.ročníka, keď už majú absolvovanú patológiu a patologickú fyziológiu, internú propedeutiku a základy interného lekárstva. Bez týchto predpokladov nemá výuka klinickej biochémie praktický význam. Vzhľadom na nárast významu laboratórnych vyšetrení v diagnostickom procese ako aj vzhľadom na rozširovanie spektra vyšetrení bolo by žiadúce, aby sa forma výuky zmenila na povinný predmet.

VÝZNAM CHOLESTEROLU U KRITICKY CHORÝCH ONKOCHIRURGICKÝCH PACIENTOV

UHLIARIKOVÁ, H.¹, SVOBODOVÁ, A.²

¹Oddelenie anesteziológie a intenzívnej medicíny
Národný onkologický ústav, Bratislava

²Oddelenie klinickej biochémie, Národný onkologický ústav
Bratislava

Udržanie správnych hodnôt lipidového spektra je dôležité u pacientov v rámci prevencie vzniku kardiovaskulárnych chorôb (ICHS, AIM), ako aj súčasťou liečby pre zastavenie progresie ich komplikácií. Aktuálne je popri diéte používaná široká plejáda antihyperlipidémik.

Iný pohľad je však na význam cholesterolu u kriticky chorých pacientov v sepe, polytraume, rozsiahlych popáleninách, nekrotizujúcej pankreatitíde alebo malignít – navyiac spojených s náročnou chemoterapiou, rádioterapiou alebo chirurgickou intervenciou. V týchto situáciách dochádza k hypocholesterolémii v dôsledku zvýšenej spotreby, zníženej syntézy a prísunu cholesterolu, ktorý je zdrojom dôležitých hormónov – predovšetkým kortizolu a aldosterónu.

Sledovali sme hladiny cholesterolu v skupine 41 najnáročnejších onkochirurgických výkonov (subtotálne a totálne gastrektómie, resekcie pažeráka thorakofrenolaparotomickej, kolektómie, duodenopankreatektómie) predoperačne a v dynamike do 7. pooperačného dňa, ako aj komplikácie pri závažnej hypocholesterolémii, ktorú sme podľa potreby korigovali podávaním zmrazenej plazmy. Podľa našich záverov doporučujeme predoperačne týždeň vysadiť farmakoterapiu statínmi pred najzávažnejšími onkochirurgickými výkonmi.

MEĎ A CERULOPLAZMÍN V SÉRE PACIENTOV S ALKOHOLOVOU STEATÓZOU PEČENE

UHLÍKOVÁ, E.¹, KUPČOVÁ, V.², SZÁNTOVÁ, M.²
VOZÁR, M.¹, PETRAKOVIČOVÁ, M.², TURECKÝ, L.¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie
LFUK a ²III.interná klinika LFUK, Bratislava

Úvod

Meď je esenciálny stopový prvok uplatňujúci sa pri rôznych metabolických procesoch. Dominantnou formou medi v krvnej plazme je metaloproteín ceruloplazmín. Ceruloplazmín sa syntetizuje v hepatocytoch ako jednoduchý polypeptidový reťazec. Aj keď jeho presná fyziologická funkcia nie je celkom jasná, je známe, že vykazuje oxidázovú aktivitu voči železu, LDL a homocysteínu a zohráva úlohu aj pri antioxidačných procesoch, transporte medi a taktiež pri angiogenéze (Daimon a spol., 2000). Pečeň zohráva dôležitú úlohu v metabolizme viacerých stopových prvkov, vrátane medi. Je preto pochopiteľné, že u pacientov s hepatopatiami dochádza aj ku zmenám v sérových hladinách medi a ceruloplazmínu.

Cieľom našej štúdie bolo sledovať zmeny v metabolizme medi a jej ukazovateľov u pacientov s alkoholovou steatózou pečene.

Pacienti a metódy

Vyšetrovaný súbor tvorila skupina pacientov s alkoholovou steatózou pečene (17 mužov a 12 žien), priemerný vek v súbore bol 48,9 rokov. Diagnóza hepatopatie bola verifikovaná histologicky. Kontrolnú skupinu tvorilo 42 zdravých jedincov. Hepatálne laboratórne parametre boli v kontrolnej skupine v rámci referenčných hodnôt. Enzymatickú aktivitu ceruloplazmínu sme stanovovali s použitím p-fenyléndiamín hydrochloridu ako substrátu (Příbyl, 1978). Apoceruloplazmín sme vyšetrovali metódou elektroimunodifúzie s použitím monošpecifických protilátok proti ceruloplazmínu. Hladina medi v sére sa vyšetrovala atómovou absorpčnou spektrometriou. Štandardné hepatologické vyšetrenia (AST, ALT, GMT, CHE, bilirubín, albumín) sme realizovali pomocou komerčných diagnostických súprav. Štatistické vyhodnotenie sme robili pomocou neparametrických metód (Wilcoxonov test, Spearmanov korelačný koeficient).

Výsledky

Zhodnotenie metabolizmu medi u pacientov s alkoholovou steatózou pečene sme robili na základe nasledovných parametrov: hladina medi v sére, koncentrácia imunoreaktívneho apoceruloplazmínu v sére, koncentrácia ceruloplazmínu v sére stanovená na základe jeho oxidázovej aktivity. Z hodnoty ceruloplazmínu zistenej na základe jeho enzymovej aktivity a hodnoty ceruloplazmínu vyšetreného ako apoceruloplazmín sme vypočítavali špecifickú aktivitu ceruloplazmínu (Cpl-enzýmová aktivita/Cpl-apoprotein).

Tabuľka 1 ukazuje štandardné hepatálne parametre zistené v súbore pacientov s alkoholovou steatózou pečene a v kontrolnom súbore. Parametre charakterizujúce metabolizmus medi u pacientov so steatózou pečene a v kontrolnom súbore sú zhrnuté v tabuľke 2. Hladiny medi boli u pacientov so steatózou pečene signifikantne nižšie v porovnaní s kontrolným súborom (14,96 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ vs. 17,58 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, $P < 0,001$). Koncentrácia imunoreaktívneho ceruloplazmínu sa v súbore pacientov so steatózou pečene signifikantne neodlišovala od kontrolného súboru (359,5 mg.l^{-1} vs. 341,4 g.l^{-1}). Na druhej strane, oxidázová aktivita ceruloplazmínu u pacientov so steatózou pečene bola signifikantne nižšia ako u zdravých kontrol. Špecifická aktivita ceruloplazmínu (ceruloplazmín ako enzým/apoceruloplazmín) bola tiež signifikantne nižšia u pacientov so steatózou pečene. U pacientov s alkoholovou steatózou pečene bol taktiež štatisticky významne znížený pomer medi ku apoceruloplazmínu (Cu/Cpl). Vyšetrenie vzťahu medzi hladinou medi a hladinou ceruloplazmínu vyšetreného na základe jeho enzymovej aktivity a množstvom apoceruloplazmínu vyšetreného imunochemicky ukázalo lepšiu koreláciu plazmatickej hladiny medi s ceruloplazmínom vyšetreným na základe oxidázovej aktivity ($r=0,95$, $P < 0,001$) ako medzi hladinou medi a množstvom apoceruloplazmínu ($r=0,63$, $P < 0,001$).

Diskusia

Steatóza pečene patrí medzi bežné patologické zmeny u pacientov s abúзом alkoholu. Steatóza pečene nepredstavuje len morfológickú odchýlku, ale v takto zmenenej pečeni dochádza aj k určitým metabolickým odlišnostiam, ako tomu nasvedčujú aj zmeny niektorých biochemických parametrov. Alkoholová steatóza pečene je sprevádzaná aj zmenami v metabolizme medi. Svedčia o tom signifikantne znížená hladina medi v sére pacientov ako aj pokles enzymovej aktivity ceruloplazmínu. Pokles oxidázovej aktivity ceruloplazmínu pri súčasne nezmenenej koncentrácii apoceruloplazmínu poukazuje na poruchu v syntéze tejto bielkoviny a naznačujú možnosť syntézy funkčne defektnej molekuly ceruloplazmínu. Oxidázová aktivita ceruloplazmínu je závislá na obsahu medi v molekule. Je možné, že znížený obsah medi v molekule ceruloplazmínu, o čom svedčí pokles pomeru Cu/Cpl u pacientov s alkoholovou steatózou pečene, je zodpovedný za pokles enzymovej aktivity ceruloplazmínu v tejto skupine pacientov. Zmena enzymovej aktivity ceruloplazmínu zrejme lepšie odráža diskrétné zmeny v metabolizme medi u pacientov so steatózou pečene ako hladina apoceruloplazmínu. Pokles oxidázovej aktivity ceruloplazmínu môže byť pre organizmus škodlivý, lebo ceruloplazmín sa svojou enzymovou aktivitou podieľa na antioxidačnej kapacite krvnej plazmy. Pokles antioxidačnej funkcie ceruloplazmínu v tejto skupine pacientov je o to závažnejší, že pri metabolizme etanolu vzniká celý rad reaktívnych radikálov (superoxidový radikál, peroxid vodíka, hydroxyetylový radikál), ktoré sa môžu uplatňovať pri zvyšovaní oxidačného stresu a pri poškodení pečeneového parenchýmu.

Práca vznikla v rámci riešenia výskumného projektu VEGA 1/4268/07.

Použitá literatúra

Daimon, M., Susa, S., Hasegawa, K., Yamaguchi, H., Kimura, M., Ohnuma, H., Eguchi, H., Igarashi, M., Manaka, H., Kato, T.: Increase in serum ceruloplasmin with aging is not observed in type 2 diabetes. *Endocrine J.* 2000, 47: 215–219.

Příbyl, T.: Serum polyphenol oxidase activity (ceruloplasmin) in conventional laboratory animals and man. *Folia Biol. (Praha)* 1978, 24: 136–141.

Wessling-Resnick, M.: Understanding copper uptake at the molecular level. *Nutrition Rev.* 2002, 60: 177–186.

Tab. 1. Štandardné hepatálne parametre v sére pacientov so steatózou a v kontrolnom súbore

parameter	ALT μkat.l ⁻¹	AST μkat.l ⁻¹	GMT μkat.l ⁻¹	CHE μkat.l ⁻¹	bilirubín μmol.l ⁻¹	albumín g.l ⁻¹
kontroly	0,43 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,76 ± 0,12	85 ± 7,3	13,3 ± 1,2	41,5 ± 2,5
steatóza	0,81 ± 0,06	0,68 ± 0,07	2,05 ± 0,38	124 ± 23	17,4 ± 1,3	40,2 ± 3,8

Tab. 2. Parametre metabolizmu medi v sére pacientov so steatózou a v kontrolnom súbore

parameter	Med ³ μmol.l ⁻¹	Cpl-enzymaticky g.l ⁻¹	Cpl-apoprotein g.l ⁻¹	Cu/Cpl	Cpl-špeci- fická aktivita
kontroly	17,58 ± 0,31	281,3 ± 10,8	341,6 ± 6,7	0,054 ± 0,002	0,82 ± 0,024
steatóza	14,96 ± 1,09	239,7 ± 22,6	362,1 ± 16,6	0,040 ± 0,003	0,64 ± 0,048

ÚČINOK PRÍRODNÝCH ANTIOXIDANTOV Z ASPALATHUS LINEARIS PRI EXPERIMENTÁLNO DIABETE

ULIČNÁ, O.¹, VANČOVÁ, O.¹
BOŽEK, P.², ČARSKÝ, J.³, ŠEBEKOVÁ, K.⁴
BOOR, P.⁴, GREKSÁK, M.⁵

¹Farmakobiochemické laboratórium
III. int. kliniky LF UK, Bratislava

²Oddelenie klinickej biochémie a hematológie
NsP MV SR, Bratislava

³Ústav lekárskej chémie, biochémie
a klinickej biochémie LF UK, Bratislava

⁴Oddelenie klinickej a experimentálnej farmakológie SZÚ
Bratislava

⁵Ústav biochémie a genetiky hospodárskych živočíchov SAV
Ivanka pri Dunaji.

Úvod: Pri diabete je hyperglykémia príčinou zvýšenej tvorby voľných radikálov. Potreba tlmenia oxidačného stresu podnietila štúdium látok s antioxidantnými vlastnosťami. V tejto súvislosti vzrástol záujem o výskum čajov. Rooibos čaj (*Aspalathus linearis*) obsahuje spektrum antioxidantných látok, hydroxylovaných a polyhydroxylovaných zlúčenín, ako sú organické kyseliny, flavóny, flavonoly a dihydrochalkóny.

Cieľ práce: Cieľom bolo študovať ako vodný alebo alkalický extrakt rooibos čaju a pre porovnanie antioxidant N-acetyl-L-cysteín (NAC) znižuje oxidačný stres a glykáciu pri experimentálnom diabete.

Materiál a metódy: Použili sme potkany kmeňa Wistar s hmotnosťou 250–320 g. Diabetes mellitus (DM) sme vyvolali jednorazovým podaním streptozotocínu (45 mg.kg⁻¹) do chvostovej veny. Zvieratá sme rozdelili do piatich skupín: 1. Kontrolná skupina (5 ml.kg⁻¹ sondou per os pitná voda); 2. Pokusná skupina s vyvolaným DM; 3. Pokusná skupina s DM + rooibos čaj (5 ml.kg⁻¹ sondou per os); 4. Pokusná skupina s DM + alkalický extrakt rooibos čaju (300 mg.kg⁻¹ sondou per os); 5. Pokusná skupina s DM + N-acetyl-L-cysteín (150 mg.kg⁻¹ sondou per os). Zvieratá tretej skupiny pili rooibos čaj namiesto vody. Po 8 týždňoch trvania diabetu sme odobrali krv z brušnej aorty, tkanivá pečene, obličiek a šošovky. Stanovili sme koncentráciu glukózy, triacylglycerolov a cholesterolu v plazme štandardnými metódami na automatickom analyzátoze Hitachi 911. Glykovaný hemoglobín a fruktózamín sme stanovili fotometricky, koncentráciu malondialdehydu (MDA) HPLC metódou, koncové produkty pokročilej glykácie (AGEs) spektrofotometricky a koncové produkty pokročilej oxidácie bielkovín (AOPP) spektrofotometricky.

Výsledky: Pri DM sa významne zvýšila koncentrácia glukózy v plazme, množstvo glykovaného hemoglobínu a fruktózamínu, AGEs a AOPP. Zvýšila sa koncentrácia

malondialdehydu v plazme, šošovkách, pečeni a obličke. Podávanie vodného alebo alkalického roztoku rooibos čaju ani NAC neovplyvnilo koncentrácie glukózy, glykovaného Hb a fruktóзамину. Po podávaní antioxidantov sa významne znížila tvorba AGEs a mierne AOPP. Koncentrácia MDA sa významne znížila po podaní obidvoch extraktov rooibos čaju a NAC v plazme a šošovke. Pokles MDA v pečeni sme zistili len po podávaní vodného extraktu čaju a v obličke po podávaní NAC.

Záver: Zníženie koncentrácie MDA po podávaní antioxidantov, ktoré obsahuje rooibos čaj alebo antioxidantu NAC poukazuje na ich ochranný vplyv na peroxidáciu lipidov pri oxidačnom strese navodenom diabetom. Zníženie produkcie toxického MDA môže prispieť k oddialeniu poškodenia bielkovín a membrán, ku ktorým dochádza v diabetickom prostredí. Zníženie tvorby AGEs prispieva k oddialeniu/zníženiu mikrovaskulárnych a/alebo makrovaskulárnych komplikácií. Široká škála zlúčením s antioxidantnými vlastnosťami, ktoré obsahuje rooibos čaj, znižuje oxidačný stres v podmienkach hyperglykémie v hydrofilných aj hydrofóbných biologických systémoch. Rooibos čaj možno doporučiť ako doplnok pri prevencii a liečení diabetických komplikácií vyvolaných oxidačným stresom.

TECHNOLOGIE PROTEINOVÝCH BIOČIPŮ - MOŽNOSTI LABORATORNÍ ANALÝZY A KLINICKÉHO VYUŽITÍ

ULRYCHOVÁ, M.¹, VÁVROVÁ, J.¹
HORÁČEK, J. M.^{2,3}, PUDIL, R.⁴, TICHÝ, M.^{1,2}

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta
Karlovy univerzity a Fakultní nemocnice, Hradec Králové
Česká Republika

²Katedra válečného vnitřního lékařství
Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany
Hradec Králové, Česká Republika,

³Oddělení klinické hematologie, II. Interní klinika
Lékařská fakulta Karlovy univerzity a Fakultní nemocnice
Hradec Králové, Česká Republika,

⁴I. Interní klinika, Lékařská fakulta Karlovy univerzity
a Fakultní nemocnice, Hradec Králové, Česká Republika

V posledních letech se použití biočipové technologie rozšířilo z oblastí výzkumu genomiky a proteomiky i do klinických laboratoří. Proteinové biočipy mohou být využity pro kvalitativní i kvantitativní analýzu a studium interakcí proteinů (antigen-protilátka, enzym-substrát, receptor-ligand). Z pohledu klinické biochemie jsou čipy používány pro analýzy diagnostických a prognostických markerů.

Jako proteinový biočip se označuje destička, na které jsou v miniaturních, přesně definovaných pozicích (spotech) imobilizované proteiny sloužící k vyvážení analytu ze vzorku. Proteiny jsou k čipu upevněny kovalentní vazbou pomocí spojovacích molekul (linkerů), čímž se zajistí dostatečná koncentrace a správná orientace vázaného proteinu na spotu.

Podstatnou výhodou analýzy proteinů na biočipech je simultánní stanovení několika analytů z minimálního množství vzorku. Metody jsou založené na imunochemických principech. Používají se jak kompetitivní tak sendvičové techniky. Protilátky nebo antigeny bývají značeny enzymaticky nebo fluoroforem. Pro detekci signálu se nejčastěji používá chemiluminiscenční reakce nebo laserem indukovaná fluorescence. Záření z jednotlivých spotů snímají tzv. CCD-kamery (charge-coupled device).

S biočipovým analyzátozem Evidence Investigator (Randox) pracujeme již dva roky. Jedná se o poloautomatický přístroj pracující na principu enzymoimunoanalýzy s chemiluminiscenční detekcí. Měli jsme možnost vyzkoušet několik panelů metod. Pracovali jsme se soupravami pro stanovení kardiálních markerů, tyroidních hormonů, cytokinů a adhezních molekul. V rámci výzkumných projektů se zabýváme hlavně měřením kardiálních markerů. Stanovujeme soubor šesti analytů: CK-MB izoenzym kreatinkinázy (CKMB mass), myoglobin (MYO), kardiální troponin I (cTnI), BB izoenzym glykogen-fosforylázy (GPBB), srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny (H-FABP) a karboanhydrázu III (CA III). Ověřili jsme analytické parametry soupravy a referenční meze uváděné výrobcem.

ÜRGE, O.^{1,2}, STRNOVÁ, J.²

¹Klinika laboratórnej medicíny, Synlab.SK s.r.o., Bratislava

²Klinika pre deti a dorast A. Getlíka SZU, FNsP Bratislava,
Nemocnica sv. Cyrila a Metoda

Cílem jedné z našich studií je hledání nových markerů pro hodnocení kardiotoxicity cytostatik používaných k léčbě pacientů s akutní leukémií. Léčba antracykliny a myeloablativní předtransplantační režim s následnou transplantací krvetvorných buněk reprezentuje vysoké riziko vývoje kardiotoxicity. Výsledky klinických výzkumů zabývajících se touto problematikou nejsou jednotné a nezmiňují případnou roli nových perspektivních biomarkerů ischemie a nekrózy myokardu, jako jsou GPBB a H-FABP.

Sledováno bylo 21 pacientů (průměrný věk 43,6 ± 10,2 let, 14 mužů) s akutní leukémií po předchozí léčbě antracykliny v celkové kumulativní dávce 448,7 ± 91,3 mg/m². Předtransplantační režim zahrnoval léčbu pacientů vysokými dávkami cyklofosfamidu (60 mg/kg/den v tříhodinových intravenózních infuzích po 2 dny) v kombinaci s perorálním podáním busulfanu nebo celotělovým ozařováním. Kardiomarkery byly měřeny na přístroji Evidence Investigator (Randox) před a 6 resp. 24 hodin po podání předtransplantačního režimu a dále 24 hodin a 14 dní po transplantaci krvetvorných buněk. U všech pacientů byly před léčbou koncentrace kardiomarkerů v normě. Šest hodin po podání předtransplantačního režimu se u 5 (23,8%) pacientů zvýšila hladina GPBB nad cut-off hodnotu a přetrvávala zvýšená. U dvou pacientů byla hladina GPBB vyšší ještě 14 dní po transplantaci. Ostatní markery kardiálního poškození po přípravném režimu a transplantaci krvetvorných buněk zůstaly v referenčních mezích. Naše výsledky ukazují, že myeloablativní předtransplantační režim zahrnující podání cyklofosfamidu s následnou transplantací krvetvorných buněk může být spojen s poškozením myokardu se zvýšeným uvolněním GPBB. Pozitivní hladiny GPBB u pacientů s negativním cTnI ukazují, že GPBB by mohl být citlivějším markerem pro detekci akutní kardiotoxicity předtransplantačního režimu u pacientů s akutní leukémií.

Autizmus je v súčasnosti chápaný ako neuropsychické ochorenie s nedostatočnými sociálnymi interakciami, nedostatočnou verbálnou a neverbálnou komunikáciou, abnormálnym až bizarným návykovým správaním, ktoré je stereotypné a rituálne. Incidencia ochorenia je asi 5 : 100 000.

Po stránke etiologickej posledné informácie nasvedčujú, že môže ísť aj o metabolické ochorenie podobné celiakii alebo fenylketonúrii spojené s nekompletným trávením a poruchou metabolizmu proteínov. Mnohí odborníci, či psychiatri, psychológovia, genetici, anatómovia, elektrofyziológovia, pediatri alebo biochemici sa snažia vysvetliť autizmus na základe vlastných pozorovaní a skúseností. Autizmus zostal naďalej „syndrómom“, ktorý je definovaný iba pozorovanými príznakmi. Ak tento syndróm existuje, musí existovať tiež racionálne vysvetlenie abnormálneho správania sa týchto pacientov. V súčasnosti sa objavili určité fakty, ktoré by mohli autizmus chápať aj ako následok metabolickej poruchy. Boli analyzované vzorky moču od viac ako 1 000 pacientov s autizmom so zaujímavým zistením. Fragmenty nekompletného trávenia – špecifické peptidy – prenikajú črevnou stenou do krvného obehu, poškodzujú centrálny nervový systém. Nadbytok nekompletné natrávených proteínov sa dostáva do moču. Zistilo sa, že vzniknuté peptidy sú chemicky podobné morfinu. Ide o tzv. endogénne opioidy (beta-endorfiny). Nekompletným trávením lepku vzniká tzv. **gluteomorfín**, nekompletným trávením mlieka vzniká tzv. **caseomorfín**. Práve tieto peptidy sú pravdepodobne zodpovedné za poškodenie centrálného nervového systému u autistických pacientov. Klinický stav detí s autizmom sa dramaticky zlepšil po vylúčení gluténu a kazeínu z potravy tzv. GFCF (gluten free and casein free diet) diéta. Morfín účinkuje v centrálnom nervovom systéme tak, že sa viaže na tzv. **opioidný receptor** (má receptor) s následným opioidným účinkom na CNS. Zo zjednodušeného prehľadu látok, ktoré majú opioidnú aktivitu v CNS vyplýva, že ide predovšetkým o

- prírodné alkaloidy z ópia (morfín, kodeín)
- polosyntetické deriváty morfinu a kodeínu
- syntetické analógy morfinu
- analgetické peptidy – endogénne morfíny (endorfiny)
- enkefalíny-pentapeptidy – met-enkefalín, leu-enkefalín
- **endorfiny** – reťazec aminokyselín – AK (16–30) – tzv. alfa, beta, gama, delta endorfíny

V práci prinášame nové poznatky a skúsenosti s diagnostikou a liečbou autizmu v detskom veku. V spolupráci s Fyziologickým ústavom LF Univerzity Komenského v Bratislave sme sa v roku 2007 zúčastnili celoslovenského

projektu zameraného na zlepšenie starostlivosti o deti s autizmom. Bolo vyšetrených viac ako 50 pacientov z celého Slovenska. Projekt bol zameraný na psychometrické, endokrinologické, genetické, metabolické, toxikologické a alergologické aspekty ochorenia. Projekt ešte nie je definitívne ukončený. Čiastočné poznatky hlavne v diagnostike peptidov a diétnej liečbe uvádzame v našej práci.

SÚČASNÝ STAV PRENATÁLNEJ GENETICKEJ DIAGNOSTIKY V SR

VALACHOVÁ A¹, CISARIK F².

¹Oddelenie lekárskej genetiky, Fakultná nemocnica
Trenčín

²Oddelenie lekárskej genetiky, Nemocnica s poliklinikou
Žilina

Autori analyzujú súčasný stav výkonu prenatálnej genetickej diagnostiky v SR.

Na Slovensku podstupuje prenatálne invazívne vyšetrenie 6,5–7% tehotných žien.

Najčastejšími indikáciami na prenatálne vyšetrenie chromozómov plodu (PGD) sú vek matky nad 35 rokov a vypočítané riziko Downovho syndrómu pomocou prenatálneho multimarkerového biochemického skriningu. V súčasnosti už prevládajú indikácie odvodené z biochemického skriningu. Ročne sa v SR vykoná viac ako 3400 invazívnych prenatálnych vyšetrení (amniocentéz) a cca u 3% sa zistí chromozómová chyba plodu. Diagnóza Downovho syndrómu pritom tvorí menej ako 50% všetkých zistených chromozómových anomálií plodu. Prenatálna genetická diagnostika má preto nielen priamy diagnostický význam, ale zachytáva aj niektoré rodiny s významným genetickým rizikom chromozómovej chyby. Priemerná záchytnosť chromozómovej chyby je síce 3%, najvýznamnejšia záchytnosť sa však dosahuje u indikácií genetických (6–7%) a najmä ultrazvukových (11–12%). Ultrazvukový nález vývojovej chyby plodu alebo prítomnosť ultrazvukových minimarkerov znamená viac ako 10%-nú možnosť zistenia chromozómovej chyby plodu.

Autori sa venujú prenatálnym skriningovým stratégiám z pohľadu bezpečnosti pre plod a dosiahnutia požadovanej úrovne záchytnosti chromozómových chýb. V súčasnosti sa už na Slovensku vykonáva plošne minimálna verzia skriningu v podobe doubletestu (AFP a thCG). Táto stratégia neuspokojuje ani záchytnosťou Downovho syndrómu (pod 60%) ani bezpečnosťou (47 strát nepostihnutých plodov na 100 000 skrínovaných tehotných pri 75% DR). Evidujeme veľký záujem o bezpečnejšie a efektívnejšie stratégie. Z praktického pohľadu nie je možné zabezpečiť plošné vykonávanie niektorej bezpečnejšej a efektívnejšej stratégie, napríklad kompletný Integrovaný test. Je však možné dobre definovať a kvalitatívne kontrolovať regionálnu stratégiu a jej organizáciu.

Najlepšie výsledky sa dosahujú integrovanými stratégiami, teda využitím markerov I. a II. trimestra.

Výsledky zásadne závisia nielen od kvality biochémie, ale aj od presného určenia veku plodu, od skúsenosti so skriningovými stratégiami a hodnotením rizika a v rozhodujúcej miere aj od UZV špecialistov na I. a II. trimester. Indikácia na PGD znamená genetické testovanie plodu a pre takého testovanie treba prísne dodržiavať medzinárodné postupy, ktoré vyžadujú predtestovú a potestovú konzultáciu erudovaným klinickým genetikom.

VALACHOVIČOVÁ, M.¹, KUDLÁČKOVÁ, M.¹
SPUSTOVÁ, V.¹, BLAŽÍČEK, P.², VOLKOVÁ, K.¹

¹Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

²Nemocnica ministerstva obrany SR, Bratislava

Úvod. Konzumácia ovocia, zeleniny, celozrnných produktov, strukovín, rastlinných olejov je ochrana voči degeneratívnym ochoreniam. Uvedené potravinové komodity sú kľúčové komponenty vegetariánskej stravy. U dlhodobých vegetariánov boli v porovnaní s nevegetariánmi a vzhľadom na vek vyhodnotené vybrané ukazovatele kardiovaskulárneho rizika.

Metodiky. Súbor tvorilo náhodne vybraných 400 subjektívne zdravých vo veku 21–76 rokov, rozdelených do dvoch skupín podľa stravovania. Lakto-ovo-vegetariánov bolo 193 a nevegetariánsku skupinu (kontrolná skupina) tvorilo 203 probandov. Lipidové rizikové parametre – celkový cholesterol, triacylglyceroly, HDL-cholesterol sa stanovili štandardnými laboratórnymi metódami. Z nelipidových kardiovaskulárnych parametrov hs-CRP bolo stanovené imunoturbidimetrickou metódou a inzulín bol meraný elektrochemiluminiscenčnou imuno metódou. Inzulínová rezistencia (IR HOMA) bola počítaná z koncentrácie glukózy a inzulínu (glukóza x inzulín/22,5).

Výsledky. V každej vekovej dekáde (okrem tretej vekovej dekády) rizikové kardiovaskulárne parametre boli signifikantne redukované u vegetariánov. U kontrolnej skupiny rizikové parametre stúpali po šiestu dekádu. Veková závislosť cholesterolu a triacylglycerolov u vegetariánov bola signifikantne menej zreteľná ako u nevegetariánov (1,04–1,32 mmol/l vs 1,21–2,02 mmol/l pre triacelyglyceroly a 3,95–4,77 mmol/l vs 4,28–5,88 mmol/l pre celkový cholesterol). Nelipidové ukazovatele boli vo vegetariánskej skupine od veku nezávislé (0,66–0,81 mg/l vs 0,88–2,10 mg/l pre hsCRP; 0,87–1,23 vs 1,43–2,77 pre IR/HOMA/).

Záver. Výsledky nízkych a na veku nezávislých hodnôt markerov kardiovaskulárneho rizika u vegetariánov poukazujú na priaznivý vplyv vegetariánskej výživy v prevencii kardiovaskulárnych ochorení.

Táto práca bola podporená agentúrou na podporu výskumu a vývoja APVT-21-017704 a Ministerstvom zdravotníctva SR 2006/07-SZU-02.

VALOVIČOVÁ, E., SVOBODOVÁ, A.

Oddelenie klinickej biochémie, Národný onkologický ústav,
Bratislava

Onkologické ochorenie možno definovať ako systémové ochorenie s poruchami imunitného systému s rozsiahlymi metabolickými dôsledkami. Zmeny energetického metabolizmu sú spôsobené zmeneným metabolizmom cukrov, tukov a bielkovín, ako odpoveď hostiteľa na neoplastický proces produkujúci cytokíny, rastové faktory a iné mediátory zabezpečujúce preferenčne substráty pre rast nádorového tkaniva. V čase diagnostiky ochorenia má značná časť pacientov malnutríciu a podľa viacerých odborných prác až 20% pitvaných nemá po liečbe zistenú nádorovú masu, ale zomreli na ťažkú malnutríciu – kachexiu. Patogenéza syndrómu anorexie-kachexie (SAK) je multifaktoriálna, poznatky o etiológii a patogenéze SAK pribúdajú – zostáva však veľa neobjasneného. Ide o proteínovo-energetickú malnutríciu s klinickými prejavmi, stratu svalovej hmoty, životne dôležitých bielkovín, celkovú fyzickú a psychickú slabosť, zvýšenú náchylnosť na infekcie, preležaniny, trombózy, zníženú odpoveď na liečbu a zvyšujúce sa nežiadúce účinky. Znižuje sa kvalita života a zvyšuje sa úmrtnosť. Z hľadiska príčin a zaistenia vhodného liečebného postupu sa rozlišuje primárny SAK (vyvolaný prítomnosťou neoplázie) a sekundárny SAK (spôsobujú ho príčiny zhoršujúce príjem stravy – nádory hlavy, krku, GIT-u, liečebné metódy, zlý psychický stav pacienta). Primárny SAK je ťažko liečiteľný, sekundárny je lepšie ovplyvniteľný, ak sa včas zistí. Častá je kombinácia oboch typov malnutrie. Nutričná starostlivosť o onkologických pacientov nepredstavuje homogénny systém, avšak patrí dnes jednoznačne do komplexnej onkologickej starostlivosti. Riadi sa definovanými zásadami: 1) zhodnotenie nutričného stavu každého pacienta už v čase zdiagnostikovania choroby; 2) zhodnotenie typu a štádia malnutrie pred začatím liečby a uvedomenie si jej možných rizík (vzniku alebo zhoršenia malnutrie liečbou) a zahájenie prevencie nutričného a funkčného poškodenia orgánov; 3) plánovanie nutričnej podpory, správna voľba jej metód a kvalifikované vedenie nutričnej podpory, podľa konkrétneho štádia choroby.

Základom diagnostiky nutričného stavu sú:

- 1) nutričná anamnéza (vývoj telesnej hmotnosti v poslednom období – 1,3,6 mesiacov, zmeny chuti do jedla, ťažkosti obmedzujúce príjem a využiteľnosť stravy, odhad celodenného príjmu, neznášanlivosť niektorých zložiek stravy, chronické ochorenia vedúce k zmenenému metabolizmu, fyzická aktivita, únavnosť, lieky);
- 1) celkové vyšetrenie, včítane antropometrických parametrov (BMI, kožná riasa nad tricepsom, stav svalovej hmoty, objem drieku);

- 3) laboratórne vyšetrenia (sérové koncentrácie celkových bielkovín, albumínu, prealbumínu, transférínu, kreatinínu, cholesterolu, absolútny počet lymfocytov).

V prednáške prezentujeme problémy s interpretáciou laboratórných výsledkov u onkologických pacientov (dehydratácia, interferencie liekov, potreba poznania klinických parametrov).

NATRIURETIC PEPTIDES IN INTENSIVE CARE

WOLOSZCZUK, W., POTOCNIK, N.
HAWA, G.

R & D Group, Biomedica, Vienna, Austria

The quest is ongoing to identify biomarkers that can help to differentiate diseases in which clinical symptoms are ambiguous or polyvalent. Such as in patients in intensive care. Atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP) are members of a family of hormones which can serve as such markers. Increased plasma levels of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) have been identified as predictors of cardiac dysfunction, prognosis in congestive heart failure and ischemic heart disease and can be used as non-invasive markers for critically ill patients. NT-proBNP pre-operative levels and outcome are correlated in patients undergoing emergency surgery. Septic patients present with high levels of NT-proBNP which remains elevated in cases with cardiac disease.

Our own data showed distinct NT-proCNP profiles in patients with or without TBI (traumatic brain injury). Three patient groups were defined: isolated TBI (n = 20), MT (multiply trauma) with TBI (n = 26) and MT w/o TBI (n = 26). During 14 days following the MT, 37 (51 %) patients developed sepsis and 14 (17 %) died. Only in the MT patients w/o TBI (n = 19) who developed sepsis the NT-proCNP level between days 2 and 6 (post-MT) was significantly ($p < 0.05$) higher compared to non-septic ones. In MT w/o TBI who died (n = 2) there was a dramatic pre-lethal spike of NT-proCNP. Conversely, in septic patients either with TBI alone or MT-TBI, the NT-proCNP level tended to be lower than in non-septic ones. Prediction of sepsis (ROC) from day 1 to 8 after MT by NT-proCNP in patients w/o TBI was significant with an area under the curve of 0.78 ± 0.03 . At a cut-off value of 2.3 pmol/L sensitivity was 84 % and specificity 76 %. Our data showed that levels of systemic NT-proCNP between MT patients w/o TBI who do and do not develop septic complications are distinctly different. Blood NT-proCNP concentration can serve as a predictor of sepsis in the MT patients without TBI.

The combination of NT-proCNP with NT-proBNP could serve as differential diagnostic marker for sepsis. NT-proCNP levels are increased in septic patients and decreased in patients with cardiac shock whereas NT-pro BNP levels are elevated in those patients.

	Cardiac (n=51)	Cardio Surgery (n=26)	Cardiac Shock (n=5)	Sepsis (n=8)	Respi-ratory (n=13)	Others
NT-proCNP (pmol/l)						
Mean	14.6	8.1	11.7	27.2	7.5	15
SD	21	5.9	10	34.3	4.9	24.3
NT-pro BNP (nmol/l)						
Mean	7.8	3.0	18.6	11.9	6.2	6.0
SD	10.1	3.5	15.2	15.9	6.9	9.4

RECENZIE KNÍH

Phonec Agency s.r.o., Bratislava 2007
ISBN 80-8073-252-3

V súčasnosti stále aktuálnou ostáva otázka včasnej diagnostiky myokardiálneho poškodenia. Čím špecifickejšie markery máme k dispozícii, tým rýchlejšie určíme diagnózu, následnú terapiu i stratifikáciu pacienta.

Práca MUDr. Špirkovej a kolektívu¹ zahŕňa 172 strán rukopisu, vrátane obsahu, tabuliek a obrázkov, ktoré sú súčasťou textu. Je rozdelená do 15 kapitol, pričom každá z nich je zakončená literárnym prehľadom.

Po krátkom úvode nasleduje kapitola, zaoberajúca sa základnými zmenami metabolizmu kardiomyocytov v normoxii, ischemii a počas oxygenačnej reperfúzie.

Najrozsiahlejšia časť tejto publikácie je venovaná významu stanovenia jednotlivých kardiomarkerov. Detailne spracované kapitoly sa začínajú popismi aspartátaminotransferázy (AST) a laktátdehydrogenázy (LD). Boli to historicky prvé enzýmy, ktoré sa používali na stanovenie diagnózy poškodenia kardiomyocytu.

Ďalšie časti sú venované novším, špecifickejším markerom, akými sú kreatínkináza (CK) a jej izoenzýmy. Podrobnejšie sa autori zaoberajú problematikou využitia stanovenia niektorých štrukturálnych a regulačných proteínov kardiomyocytov, ktoré sa vyznačujú vysokou senzitivnosťou, špecifickosťou a relatívnou stabilitou. K nim patria hlavne kardiálne troponíny (cTnT, cTnI), myoglobín a CKMB mass. Ich význam je popisovaný hlavne v súvislosti s rýchlosťou diagnostikou akútnych koronárnych syndrómov, ale tiež pri iných poškodeniach myokardu.

Samostatná kapitola je venovaná novším, zatiaľ rutinne nepoužívaným markerom kardiálnej ischemie ako sú väzobná kapacita albumínu pre kobalt (ACB), voľné mastné kyseliny (FFA), cholin a glykogénfosforyláza BB. Ich širšie využitie je v súčasnosti predmetom mnohých klinických štúdií a vývoja komerčných setov.

Ďalšie kapitoly sa zaoberajú otázkami významu používania jednotlivých kardiomarkerov v klinických štúdiách

s akútnym koronárnym syndrómom i pri lôžku pacienta.

Rozsiahla kapitola je venovaná C-reaktívnemu proteínu (CRP) ako markeru úzkeho prepojenia zápalu a vulnerability aterosklerotického plátu. CRP sa takto vníma ako silný nezávislý predikčný marker kardiovaskulárneho rizika v primárnej prevencii i na identifikáciu jednotlivcov s vysokým rizikom ruptúry aterosklerotického plátu.

Nasledujúca kapitola sa detailne venuje natriuretickým peptidom, ich štruktúre, biosyntéze, receptorom a biologickej aktivite. Nezabúda sa ani na ich funkciu v regulácii vodno-soľnej rovnováhy. Stanovenie týchto natriuretických peptidov využívame hlavne v oblasti diagnostiky srdcovej dysfunkcie a zlyhania srdca, v stratifikácii zlyhania srdca a v stanovení prognózy srdcovej dysfunkcie a zlyhania srdca. V neposlednom rade i v stanovení prognózy akútneho koronárneho syndrómu.

Záverčné kapitoly sú venované molekulárnej biológii kardiálnych markerov. Aplikácia poznatkov z molekulárnej genetiky v kardiovaskulárnej biológii i v klinike je jednou z najintenzívnejšie sa rozvíjajúcich oblastí medicíny. V súčasnosti klinická kardiológia využíva molekulárnu diagnostiku z oblastí diagnostiky kandidátnych génov predčasnej aterosklerózy, infarktu myokardu, hypertenzie, kardiomyopatií a ďalších ochorení. V jednotlivých kapitolách sa potom autori podrobnejšie venujú popisu kandidátnych génov v procese aterosklerózy, ich asociácii so zvýšeným rizikom pre ischemickú chorobu srdca a infarkt myokardu, identifikácii génov v súvislosti s esenciálnou hypertenziou. Samostatná časť je venovaná i problematike molekulárnej genetiky restenóz a trombofilných stavov.

Záverom možno skonštatovať, že publikácia predstavuje ucelený pohľad na danú problematiku. Zaoberá sa možnosťami využitia stanovenia kardiálnych markerov v klinickej praxi, či už akútneho koronárneho syndrómu, ale i iných stavov, súvisiacich s poškodením myokardu. Je napísaná veľmi zrozumiteľnou, ale vysoko odbornou terminológiou a pre tieto vlastnosti sa určite stane veľmi prínosnou pre kardiológov, lekárov z klinickej praxe i pre klinických biochemikov.

MUDr. Eva Sedláková
Ústav patologickej fyziológie, LF UPJŠ v Košiciach

¹Kolektív: Špirková, Z., Daňová, K., Pecháň, I., Pivovarníková, H., Pullman, R.

JÁN JESSENIUS
O KRVI

Univerzita P. J. Šafárika, 2007
Preklad: F. Šimon, J. Balegová, M. Výrostová

V záplave moderných informačných tokov sú skromnejšie zastúpené originálne práce k dejinám medicíny a jej vývoja z historického pohľadu. O to cennejšie je, že v roku 2007 vyšiel preklad pomerne krátkeho, ale významného Jessenioveho spisu: O KRVI.

Preklad z latinčiny a zároveň i komentár bol predmetom diplomovej práce Mileny Výrostovej, ktorej konzultantom bol František Šimon, oponentom Jana Balegová. Všetci menovaní pôsobili v čase prekladu na Filozofickej fakulte Prešovskej univerzity. Dielo poteší čitateľov, ktorí privítajú vtedajšie názory na vlastnosti krvi.

Ján Jessenius [1566–1621] bol lekár, filozof a politik. Narodil sa v Turčianskom kraji, vtedajšom Uhorsku. Širokej verejnosti je známy svojou prvou verejnou pitvou v strednej Európe. Štúdiá absolvoval na najlepších univerzitách, pôsobil v Prahe, kde sa stal osobným lekárom uhorského kráľa Mateja. Ako 55-ročný umiera násilnou smrťou. Spolu s ostatnými odbojnými českými pánmi (účastníkmi protihabsburského povstania) bol popravený na Staromestskom námestí.

Jessenius bol ovplyvnený starovekými lekármi – Hippokratom, Celsom, Galenom a svoj obdiv prenášal i do svojich diel, čo mu jeho súčasníci občas vytýkali, ba až obviňovali z kompilácie. Na druhej strane ho nazývali „ozdobou lekárstva“ pre jeho elegantnú latinčinu.

Hodnotenie Jessenioveho spisu je priaznivé u dnešných slovenských, českých a maďarských historikov, ktorí konštatujú, že na základe vlastných pozorovaní dospel k pozoruhodným záverom. Jessenius stál na konci tradičnej stredovekej hematoskopie, ktorá po objavení krvného obehu upadla do zabudnutia.

Ján Jessenius ako stredoveký učenec a lekár sa zhodne so svojimi súputníkmi zaoberal venesekciou a hematoskopiou po praktickej a teoretickej stránke. Svoje skúsenosti zhrnul v spise *De sanquine vena secta dimisso indicum* (Posúdenie krvi vypustenej po seknutí žilou), ktorý vyšiel v Prahe v roku 1608. Je to veľmi zaujímavé čítanie a porovnávanie, keď si uvedomíme, že lekári v tej dobe nemali k dispozícii žiadne prístroje, laboratórne vyšetrovacie metódy a spoliehali sa na skúmanie výlučkov tela svojimi zmyslami.

Už od čias Hippokrata bolo odporúčané púšťanie žilou ako rýchly, bezpečný a pre pacienta pomerne dobre znášaný výkon. Venesekcia bola ponímaná ako liečebná metóda pri rôznych ochoreniach (svrab, zápal, stukovatenie orgánov, choroby srdca a ciev), ba dokonca aj ako prevencia rôznych ochorení.

Jessenius tvrdil, že venesekciou a následným rozborom krvi (hematoskopiou) možno navrhnúť liečebné prostriedky, určiť životosprávu, ba dokonca vydedukovať povahu a zvyky človeka. Jessenius vo svojom traktáte definuje krv

a jej skladbu, pričom vychádza z humorálnej teórie. Pokúša sa o definíciu zdravia v súvislosti s krvou, hovorí o porušenej rovnováhe organizmu, keď vzniká „*kakochýmia*“ (str. 19). Naznačil vzťah medzi vznikom chorôb a vplyvom prostredia (chybná životospráva, podnebie a vzduch). Je to revolučné, keď vieme, že tieto myšlienky boli postulované v stredoveku a že im prikladáme dôležitosť i dnes, najmä pri vzniku chorôb z nadbytku (nie vždy správne sa zaraďujú medzi tzv. civilizačné ochorenia).

Autor diela o krvi popisuje vlastnosti krvi dobrej a zlej a o tom, na čo treba upriamiť pozornosť, keď vyteká po seknutí žilou. Popisuje tiež jej fyzikálno-chemické vlastnosti, reológiu, a to všetko bez použitia mikroskopu a prístrojov. Používa pri tom len svoje zmysly a vychádza z empirických znalostí.

Dáva radu, ako posudzovať krvné sérum, krvný koláč, ako chrániť krv po vypustení pred znehodnotením, ba dokonca nabáda k metodickým postupom, ktoré sú v modernej forme praktizované v laboratóriách aj dnes (zachytávanie krvi do vhodných materiálov, nádob, sledovanie priebehu zrážania..., str. 19–25).

Jessenius ide dokonca ďalej a rozvíja teóriu, že okrem stavby tela krv môže prezradiť i povahu mysle. V tom je zajedno s Hippokratom, Galenom, Aristotelom, ktorí zdôrazňovali, že duša sa mení v závislosti od tela, rovnako ako telo od duše. Známy je Avicenov výrok: Ako telo nasleduje vo svojej činnosti dušu, tak aj duša sa zjednocuje s telom v jeho chorobách. (s. 37). Tu je základ neskorších konštitučných typov a nazeraní na psychosomatické ochorenia, ktoré boli zdôrazňované najmä v 19., 20. storočí.

Jessenius dokončil svoje dielo ako 42-ročný muž, v plnom rozkvetе svojich odborných schopností a ako sám píše, v období „psích dní“, keď býva najväčšia horúčava – „*canicula*“ (medzi 22. júlom a 23. augustom). I dnes, 400 rokov od vydania Jessenioveho traktátu o krvi, počas celého roka – v dňoch chladných i sparných, je hodno siahnuť po jeho práci s vedomím, že ani storočia neubrali na jeho originalnosti. O to viac, keď držíme v rukách útlu brožúru (42 stranovú), s latinským textom a následným prekladom a keď vnímame cez riadky celkovú úpravu, snahu autorov – prekladateľov o priblíženie sa k jednému z veľkánov stredovekej medicíny.

MVDr. Magdaléna Riemerová
Ústav patologickej fyziológie
LF UPJŠ v Košiciach