



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Porovnání metod ECLIA a ELISA při stanovování β -CrossLaps

Vypracovala: Jana Kožantová
Vedoucí práce: MUDr. Marie Ládová

České Budějovice 2014

Abstrakt

Osteoporóza je velmi starým onemocněním postihujícím velkou část populace. Její výskyt stále narůstá. Jedná se o systémové onemocnění kostí, pro které jsou charakteristické úbytky anorganické i organické části kosti. Typickými projevy jsou osteoporotické zlomeniny. Pro včasnou diagnostiku nemoci, je třeba provést potřebná vyšetření. Jedním z nich je i laboratorní stanovení markerů kostní resorpce a novotvorby pro zjištění stavu kostního metabolismu.

Cílem mé bakalářské práce bylo stanovit hladiny markeru kostní resorpce (β -CrossLaps) pomocí metod ELISA a ECLIA na stejných sérech od pacientů s diagnostikovanou osteoporózou a výsledky statisticky zpracovat.

V teoretické části práce jsem se zaměřila na současné poznatky o osteoporóze. Popsala jsem definici osteoporózy, její historii a epidemiologii. Nastínila jsem, jaké druhy osteoporózy rozlišujeme. Dále jsem se věnovala klinickým příznakům nemoci, a koho všeho může tato choroba postihnout. Poté jsem uvedla možnosti diagnostiky a léčby osteoporózy. V další části jsem se zabývala stavbou a funkcemi kostí. Potom jsem se věnovala markerům kostní novotvorby a resorpce. Nakonec jsem se zmínila o kostním metabolismu a jeho řídicích mechanismech. Zaměřila jsem se hlavně na metabolismus vápníku, vitamín D, parathormon a kalcitonin.

Praktickou část své bakalářské práce jsem prováděla v akreditované soukromé laboratoři STAFILA, spol. s r. o. v Českých Budějovicích. Při práci jsem postupovala podle standardních operačních postupů laboratoře. Ve výzkumu jsem zanalyzovala celkem 66 sér od pacientů s osteoporózou. Nejdříve jsem stanovila koncentrace β -CrossLaps metodou založenou na principu sendvičové ELISA na přístroji NexGen Four od firmy TestLine. Poté jsem ty samé vzorky zanalyzovala na automatickém analyzátoru IDS-iSYS od společnosti IDS, tentokrát metodou ECLIA.

V metodické části práce popisují oba přístroje, na kterých jsem stanovení prováděla, dále principy obou metod, použité analytické soupravy a vlastní postupy analýzy.

V další části bakalářské práce uvádím výsledky mého měření. Nejdříve jsem zanesla do tabulky koncentrace β -CrossLaps v ng/ml změřené oběma metodami a u příslušných vzorků jsem uvedla pohlaví a roky narození jednotlivých pacientů. Dále jsem zhotovila graf, který vyjadřuje zastoupení mužů a žen různých věkových kategorií v mém výzkumu. Druhý graf poukazuje na odlišnosti hodnot koncentrací β -CrossLaps mezi oběma metodami. Výsledné koncentrace jsem poté podrobila regresní analýze. Využila jsem lineární regresi a Grubbsův test pro zjištění odlehklých hodnot, které jsem z dalšího statistického zpracování vyloučila. Ze zbylých hodnot jsem provedla Passing-Bablokovu regresi. Z výsledné regresní rovnice a 95% intervalů spolehlivosti směrnice B a úseku A se zamítla proporcionální chyba měření, ale naopak potvrdila chyba systematická. Korelační koeficient $R = 0,97$ vykazuje velmi dobrou lineární závislost mezi oběma metodami.

Praxí v laboratoři se ukázalo, že vyhodnocení koncentrací β -CrossLaps od stejných pacientů na dvou různých přístrojích může vykazovat částečně odlišné hodnoty. Pracovala jsem na dvou odlišných analyzátoch, každý byl založen na jiném principu, s odlišnou citlivostí a nakalibrováním. Vše mohlo mít vliv na výslednou koncentraci jednotlivých vzorků.

Předností automatického analyzátoru IDS-iSYS je rychlejší stanovení. Dále lze na tomto přístroji provést všechna potřebná vyšetření ohledně kostního metabolismu, od vitamínu D, parathormonu, osteokalcinu až po kostní markery. Je to výhodné pro pacienty s osteoporózou, ale i dalšími metabolickými onemocněními skeletu. Všechna potřebná vyšetření se tak provedou na jednom přístroji.

Abstract

Osteoporosis is a very old disease affecting a large majority of population. Its occurrence rate has been growing permanently. It is a systemic disease of bones for which the decrease in bone mass, i.e. of inorganic as well as organic bone part is characteristic. Typical symptoms are osteoporotic fractures. To perform an in time diagnostics of the disease, it is necessary to execute the necessary examinations. One of them is also the laboratory determination of markers of bone resorption and new creation for finding out the state of bone metabolism.

The target of my bachelor thesis was to find out the level of the bone resorption marker (β -CrossLaps) by means of ELISA and ECLIA methods on the same serum from patients with the diagnosed osteoporosis and to process statistically the results.

In my theoretical part of thesis I focused on the present knowledge of osteoporosis. The definition of osteoporosis, its history and epidemiology are described. I outlined which kinds of osteoporosis may be distinguished. Then I described the clinical symptoms of the illness and who can be affected by this illness. The possibilities of diagnostics and of the osteoporosis treatment follow. In the next part I dealt with the structure and functions of bones. Then I focused on markers of bone formation and resorption. Finally I mentioned the bone metabolism and its control mechanisms. I concentrated mainly on the metabolism of calcium, D vitamin, parathormone and calcitonin.

I carried out the practical part of my bachelor's thesis in the accredited private laboratory STAFILA, spol. s r. o. in České Budějovice. The procedure of my work followed the standard operating procedure of the laboratory. In the research, in total 66 serums of patients with osteoporosis were analysed by me. At first, I determined the concentration by β -CrossLaps method based on the principle of sandwich ELISA on the appliance NexGen Four from TestLine company. Then I analysed the same

samples on the automatic analyser IDS-iSYS from IDS company, this time by ECLIA method. Both appliances on which the determination was executed, principles of both methods, applied analytic sets and the procedures of analysis are described in the methodical part.

In the next part of my bachelor's thesis, the results of my measuring are stated. At first I entered the concentrations β -CrossLaps in ng/ml measured by both methods into the table and for the respective samples I stated the sex and years of birth of individual patients. Moreover I prepared a graph illustrating the share of men and women of various age categories in my research. The second graph shows the differences in values of β -CrossLaps concentrations between both methods. Resulting concentrations were subject to regression analysis. I applied linear regression and Grubbs test for finding out the outlying values excluded from the further statistical processing. I performed Passing-Bablok regression based on the remaining values. As a result of regression equation and 95% CI of the slope B and intercept A, the proportional error of measuring was rejected but on the contrary, the systematic error was confirmed. Correlation coefficient $R = 0,97$ shows a very good linear dependency between both methods.

It turned out by practice in the laboratory that the evaluation of concentrations β -CrossLaps from the same patients on various appliances may show partially different values. I worked at two different analysers, each of them was based on another principle, with a different sensitivity and calibration. All of this could have the influence on the resulting concentration of individual samples.

The advantage of automatic analyser IDS-iSYS is a quicker determination. Moreover it is possible to perform on this apparatus all the possible examination concerning the bone metabolism from D vitamin, parathormone, osteocalcin up to bone markers. It is advantage for the patients with osteoporosis as well as with other metabolic skeleton diseases. It follows from this that all the necessary examinations may be carried out on one apparatus.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 5. 5. 2014

.....

Jana Kožantová

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala své vedoucí práce paní MUDr. Marii Ládové za její cenné rady, připomínky a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům biochemicko-hematologické laboratoře STAFILA, spol. s r. o. v Českých Budějovicích, kde mi bylo umožněno provádět výzkum praktické části mé bakalářské práce. Poděkování patří zejména laborantkám Bc. Šárce Ochozkové a Martině Voříškové za jejich odborný dohled při mé práci.

Obsah

Úvod.....	11
1 Teoretická část.....	12
1.1 Definice osteoporózy	12
1.2 Rozdělení osteoporózy	12
1.3 Historie osteoporózy	13
1.4 Koho osteoporóza postihuje?	13
1.5 Epidemiologie osteoporózy.....	14
1.6 Klinické příznaky osteoporózy	16
1.7 Diagnostika osteoporózy	16
1.8 Léčba osteoporózy	18
1.9 Kostní markery.....	20
1.10 Stavba a funkce kostí	21
1.11 Metabolismus vápníku a řídicí mechanismy.....	22
1.11.1 Vitamín D	23
1.11.2 Parathormon.....	24
1.11.3 Kalcitonin.....	24
2 Cíle práce a hypotézy	25
2.1 Cíl práce	25
2.2 Hypotéza	25
3 Metodika.....	26
3.1 Stanovení β -Crosslaps metodou ELISA	27
3.1.1 Analyzátor NexGen Four.....	27

3.1.2	Princip metody	27
3.1.3	Souprava Serum Crosslaps [®] ELISA a její princip.....	28
3.1.4	Obsah balení	29
3.1.5	Příprava pracovních roztoků.....	30
3.1.6	Postup analýzy	30
3.2	Stanovení β -CrossLaps metodou ECLIA.....	31
3.2.1	Analyzátor IDS-iSYS	31
3.2.2	Souprava IDS-iSYS CTX-I	34
3.2.3	Obsah balení	35
3.2.4	Příprava pracovních roztoků.....	35
3.2.5	Princip metody.....	35
3.3	Průběh vlastní analýzy	36
4	Výsledky.....	41
4.1	Lineární regrese.....	49
4.2	Grubbsův test	50
4.3	Passing-Bablokova regrese:	51
5	Diskuze	53
6	Závěr.....	56
7	Seznam informačních zdrojů.....	58
8	Klíčová slova	64
9	Přílohy	65

Seznam použitých zkratk

BMD – kostní minerální denzita

BMI – body mass index

QCT – kvantitativní počítačová tomografie

CRP – C-reaktivní protein

HRT – hormonální substituční terapie

bALP – kostní alkalická fosfatáza

OC – osteokalcin

PINP – aminoterminální propeptid prokolagenu typu I

PICP – karboxyterminální propeptid prokolagenu typu I

TRACP – tartarát-rezistentní kyselá fosfatáza

INTP – aminoterminální telopeptid kolagenu typu I

ICTP – karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I

CTX - CrossLaps

PTH – parathormon

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ECLIA – Electrochemiluminescence Immunoassay

RLU – poměrná světelná jednotka

BSA – bovine serum albumin – hovězí sérový albumin

Úvod

Osteoporóza je jedním z onemocnění, které se často vyskytuje v průmyslově vyspělých zemích. Patří do skupiny tzv. civilizačních chorob. V České republice trpí tímto onemocněním přibližně tři čtvrtě miliónu obyvatel.

Vyznačuje se úbytkem kostní hmoty, změnou mikrostruktury i funkce kosti. Velmi závažným problémem je zvýšené riziko zlomenin, z nichž mezi nejčastější patří fraktura krčku stehenní kosti. Právě z tohoto důvodu se osteoporóza vyznačuje vysokou morbiditou i mortalitou. Navíc se může vyskytovat úplně u každého z nás.

Rozlišujeme osteoporózu primární a sekundární, jež vzniká jako důsledek jiného onemocnění.

Pojem osteoporóza byl definován teprve na konci 19. století, ale tato nemoc provází lidstvo už několik tisíciletí. Dokazují to například kostry Indiánů staré 4000 let či malby ze starého Řecka.

Diagnostika osteoporózy je komplexní, od denzitometrie až po různá laboratorní vyšetření. A právě laboratorní stanovení markerů kostní novotvorby a remodelace má svůj podíl na záchyt onemocnění a dále při posouzení stavu kostí a monitoringu léčby. Díky tomu můžeme zjistit, jak účinná léčba je a zda pacienti dodržují rady lékaře, aby se jejich stav nezhoršoval.

β -CrossLaps jsou markery kostní resorpce. Jsou to fragmenty kolagenu typu I, které se uvolňují z kostní hmoty do krve během jeho degradace.

Téma mé bakalářské práce je „*Porovnání metod ECLIA a ELISA při stanovování β -CrossLaps*“. Toto téma jsem si vybrala, protože si myslím, že problematika ohledně osteoporózy je velice aktuální. Osteoporóza může postihnout kohokoli z nás, zároveň její výskyt je častý a ve světě má vzestupnou tendenci. Navíc je zajímavé porovnat výsledky kostního markeru na dvou různých přístrojích pomocí dvou odlišných metod.

Cílem mé práce bylo stanovit hladiny markeru kostní resorpce (β -CrossLaps) pomocí metod ELISA a ECLIA na stejných sérech od pacientů s diagnostikovanou osteoporózou a výsledky statisticky zpracovat.

1 Teoretická část

1.1 Definice osteoporózy

Osteoporóza je systémové onemocnění kostí, které je charakterizováno úbytkem anorganické i organické části kosti, dále změnou mikrostruktury kosti a její funkce. V důsledku těchto změn ztrácí kosti svou pevnost a zvyšuje se tak riziko zlomenin. Název vznikl ze dvou řeckých slov – osteo (kost) a poros (otvor) (1, 2, 3).

Osteoporóza je vysoce frekventním onemocněním především v průmyslově vyspělých zemích, kde postihuje zhruba 7 až 8 % populace. Mezi tyto země se řadí i Česká republika, v níž touto chorobou trpí přibližně tři čtvrtě miliónu obyvatel. V důsledku častých fraktur se nemoc vyznačuje značnou morbiditou a mortalitou a představuje proto závažný zdravotní a sociální problém společnosti (1, 4, 5).

1.2 Rozdělení osteoporózy

U osteoporózy rozlišujeme formu primární a sekundární. U primární formy není známá přesná příčina úbytku kostní hmoty, zatímco u sekundární ji známe a většinou je důsledkem nějaké jiné choroby či reakcí na její léčbu (2, 5).

Primární osteoporóza se dále rozděluje na postmenopauzální a involuční, nebo také jinak stařeckou:

- postmenopauzální osteoporóza vzniká v důsledku snížené tvorby estrogenů a postihuje především kost trámčitou,
- involuční osteoporóza se objevuje u lidí starších 70 let a k osteoporotickému procesu dochází v kosti trabekulární i kompaktní.

Sekundární osteoporózu můžeme pozorovat u lidí s onemocněním trávicího ústrojí a s tím související poruchou vstřebávání vápníku a vitamínu D. Dále může provázet osoby trpící Cushingovým syndromem, hyperparathyreózou, jaterními chorobami, revmatoidní artritidou či mnohočetným myelomem a mnoha dalšími onemocněními (2, 5).

1.3 Historie osteoporózy

Osteoporóza je velmi starým onemocněním. Důkazem toho je několik dochovaných starých čínských a řeckých maleb, na nichž jsou znázorněny ženy s typickou osteoporotickou hrudní hyperkyfózou. V roce 1989 Smrčka a spol. objevili předčasnou osteoporózu na kostrách mladých egyptských žen pocházejících z 3. – 5. st. n. l. Možnou příčinou bylo požívání chleba s vyšším obsahem fytátu, který na sebe ve střevě váže vápník. Dále byla tato choroba nalezena i na kostrách severoamerických Indiánů starých přibližně 4000 let (2).

Samotný pojem osteoporóza byl definován až v roce 1885, kdy Pommer odlišil tuto nemoc od osteomalacie. Začátkem 20. století již byla známa i senilní osteoporóza (2).

Významný rozvoj v této oblasti nastal po druhé světové válce vydáním knihy *The Parathyroid Gland and Metabolic Bone Disease* autorů Albrighta a Reifensteina (2).

1.4 Koho osteoporóza postihuje?

Osteoporóza může postihnout každého z nás, ale existují skupiny lidí, jež mohou být touto nemocí více ohroženy. Nejčastěji se vyskytuje u žen několik let po klimakteriu. Ovlivňuje to tvorba ženských pohlavních hormonů, především estrogenů, která je po přechodu snižena. Estrogeny působí celkově na skelet i metabolismus kostí ochranným účinkem (5).

Nemoc není výjimkou ani u mužů či dětí. Osteoporóza u mužů souvisí rovněž s úbytkem pohlavních hormonů. Ty jsou však jiné než u žen. Produkce testosteronu začíná u mužů klesat pozvolněji a v pozdějším věku než u žen produkce estrogenů, jež je relativně náhlá. U mužů se tedy vyskytuje osteoporóza až v pozdějším věku. U dětí není příliš častá a jedná se především o sekundární formu nemoci (5).

Osteoporóza může dále postihnout lidi trpící chronickým onemocněním trávicího traktu, jater či ledvin. Sklon k této nemoci mají také pacienti s chronickými zánětlivými chorobami, malabsorpčním syndromem, lidé, kteří se nemohou delší dobu pohybovat nebo diabetici I. typu. Při snížené kostní minerální hustotě hraje svou roli i dědičnost. Pokud měla matka zlomeninu krčku stehenní kosti, je u její dcery až dvakrát vyšší riziko této zlomeniny. Vyšší riziko mají rovněž ženy dlouhodobě léčené benzodiazepiny, vyšší než 168 cm, kuřačky a ty, které už dříve měly nějakou zlomeninu. Naopak nižší nebezpečí fraktury je u žen, jež po pětadvacátém věku přibraly na váze (1, 2, 6).

V České republice trpí osteoporózou 33 % žen a 15 % mužů ve věku nad 50 let. S přibývajícím věkem se zvyšuje i výskyt nemoci. Ve věku nad 70 let postihuje pak až 47 % žen a 39 % mužů (1).

1.5 Epidemiologie osteoporózy

Incidence osteoporózy má ve světě vzestupný trend. Je velmi obtížné hodnotit výskyt choroby, jelikož nemoc může probíhat i zcela asymptomaticky. Ani z osteoporotických zlomenin, mezi které řadíme typické zlomeniny obratlů, Collesovu frakturu dolního předloktí či zlomeniny krčku stehenní kosti, se nedá udělat přesný obrázek o výskytu této nemoci. Některé z nich mohou být léčené pouze ambulantně a nemusí být centrálně zaregistrované (2).

Za směrodatný ukazatel výskytu osteoporózy se považuje fraktura krčku stehenní kosti, která je zároveň i nejzávažnější zlomeninou. Také u této fraktury se sleduje vzestupný trend (2).

Výskyt zlomenin krčku femuru je závislý na řadě faktorů, jimiž je věk, pohlaví, rasa, zeměpisné vlivy, nutriční zvyklosti a životní styl (2).

Muži i ženy se shodnou kostní densitou mají také přibližně stejně vysoké riziko zlomenin. Přesto ženy celkově utrpí více fraktur než muži, protože mají průměrně nižší hustotu kostí (7).

Dalším z rizikových faktorů je etnický původ. Nejčastěji se vyskytují zlomeniny krčku femuru u bělochů. Lidé afrického původu mají lepší kostní densitu než ostatní rasy, proto je u nich také o 30 % menší výskyt zlomenin. Také u Asiatů je vyzorována menší incidence fraktur, přestože mají nižší hustotu kostí než běloši. Zajímavostí také je častější výskyt v oblastech mírného pásma, kde na to má částečný vliv i změna ročních období a s ní zvýšená kluzkost povrchů (2, 7, 8).

Vliv na BMD mají i nutriční zvyklosti, a to především příjem vápníku, což také prokázali Reid a spol. ve své studii u postmenopauzálních žen. Zatímco jedna skupina přijímala ve zvýšené míře kalcium, druhé skupině bylo podáváno pouze placebo. U žen s vyšším příjmem kalcia došlo ke snížení ztráty kostní minerální denzity v celém těle průměrně až o 43 % ve srovnání s těmi, jež přijímaly jen placebo (9).

V další studii bylo zjištěno, že příjem vápníku pozitivně koreluje s některými biochemickými markery kostní remodelace, které zase souvisejí s BMD a sníženým rizikem fraktur. Velký podíl na to má uhličitan vápenatý, ale předpokládá se, že podobné účinky mají i další vápenaté soli (10).

Dalším velmi výrazným faktorem je BMI. Nízké hodnoty body mass indexu jsou významným rizikovým faktorem zlomeniny krčku stehenní kosti, ale i dalších osteoporotických zlomenin. Riziko zlomeniny je u jedince s BMI 20 až dvakrát vyšší než u jedince s BMI 25. Během jedné prováděné studie, byly sledovány dvě skupiny lidí. V první skupině byli lidé, kteří změnili svůj životní styl a zhubli průměrně o 3,2 kg, naopak se jim ale dvakrát tak rychle snížila BMD v oblasti kyčlí a bederní páteře oproti těm, kteří byli po celou dobu váhově stabilní (11, 12).

1.6 Klinické příznaky osteoporózy

Osteoporóza probíhá ve většině případů zcela bez příznaků. Velmi často se ani nepozná, kdy přesně se choroba začne rozvíjet. Mnohdy je prvním projevem právě některá osteoporotická zlomenina. Lidé začínají obvykle vyhledávat lékaře, až když trpí některým z charakteristických symptomů, kterými jsou nespecifické bolesti v zádech či dlouhých kostech končetin (2, 5).

Změny se projeví i na postavě lidského těla. Velmi nápadným projevem je hrudní kyfóza neboli tzv. „stařecký hrb“. Nacházíme ho v pozdějším stadiu nemoci téměř u každého pacienta. Vlivem snižování obratlů se zmenšuje i tělesná výška osob o více než 3 centimetry. Aby se tělo vyrovnalo se zakulacováním zad, dochází také k vyklenování břicha. S hrudní kyfózou souvisí i snížená kapacita plic, která v těžkých případech vede až k dušnosti a projevům restriktivního onemocnění plic. Kvůli změnám v břišním prostoru se může rozvinout i refluxní esofagitida (2, 5, 13, 14).

Uvažovat o osteoporóze by se mělo, i pokud pacient nemá žádné symptomy, ale jsou u něj dle jeho anamnézy zjištěny některé rizikové faktory. Mezi ně řadíme léčbu kortikoidy či tyreoidálními hormony, nemoci ovlivňující metabolismus vápníku, předčasnou menopauzu, nedostatečnou tvorbu pohlavních hormonů, nízkou tělesnou hmotnost, sedavé zaměstnání, nedostatek pohybu nebo silné kuřáctví a alkoholismus (2, 5, 13, 14).

1.7 Diagnostika osteoporózy

Diagnostika osteoporózy je komplexní. Zahrnuje rodinnou anamnézu, klinické symptomy, vyšetření pomocí zobrazovacích metod a nakonec biochemické laboratorní testy (2, 5).

Stanovení kostní denzity je jedním z nejvýznamnějších markerů pro diagnostiku osteoporózy pomocí zobrazovací metody zvané *denzitometrie*. Touto metodou lze

přibližně určit riziko hrozících osteoporotických zlomenin a také, zda je nutné brát léky, jež by zabraňovaly dalším ztrátám kostní hmoty.

Dříve se osteoporóza stanovovala prakticky jen pomocí rentgenových snímků skeletu, především u hrudní a bederní části páteře. Dnes se použitím této metody přijde na osteoporózu většinou u pacientů, kteří utrpěli nějakou frakturu. Prokáže-li se onemocnění na rentgenovém snímku, většinou se jedná už o velké ztráty kostní denzity ve výši minimálně 30 % (2, 5).

V dnešní době se používají metody, které jsou pro zachycení osteoporózy přesnější. Patří mezi ně absorpciometrie a kvantitativní počítačová tomografie.

Absorpciometrie je založená na absorpci fotonů, které jsou uvolňovány z rentgenového či radionuklidového zdroje. Rozlišujeme absorpciometrii o jedné a dvojí energetické hladině. Jednoenergetické metody nerozlišují mezi měkkými tkáněmi a kostí. Z tohoto důvodu se využívají především na periferní části kostry, hlavně na předloktí. Naopak dvouenergetická absorpciometrie už dokáže odlišit měkké tkáně od kostí, a proto je vhodná k měření kostní denzity v axiální oblasti skeletu, jako je páteř a kyčle (2, 5, 15).

Kvantitativní počítačová tomografie (QCT) umožňuje zhodnotit množství absorpce ionizujícího záření, které projde kalcifikovanými tkáněmi. Tato metoda dokáže odlišit trámčitou a kortikální kost (2, 5).

Další možností stanovení kostní hmoty je ultrazvukové vyšetření, při němž ale nejsou od sebe odlišeny jednotlivé složky kosti. Většinou se využívá na patní kosti. Výhodou je nulová radiační zátěž na organismus (2, 5).

Ke stanovení aktivity procesu je proto nezbytné i *biochemické vyšetření*. Zjistíme tak celkový metabolický stav nemocného, ale také zhodnotíme metabolismus vápníku a kostí. S tím souvisí laboratorní vyšetření některých minerálů a hormonů, dále ukazatelů resorpce a novotvorby kostí. K biochemické diagnostice se využívají nejen vzorky krve, ale i moči, kde se nachází odpadní produkty těchto látek (2, 5, 15)

Ke zjištění celkového metabolického stavu pacienta se využívá rutinních biochemických vyšetření – krevní obraz s diferenciativním rozpočtem, sedimentace erytrocytů, CRP, moč a sediment, jaterní testy, ionty, kreatinin, kyselina močová,

močovina, glykémie, elektroforéza sérových bílkovin, případně další. Tím se vyloučí běžné příčiny sekundární osteoporózy (2, 5, 15).

Při vyšetřování kalciofosfátového a kostního metabolismu zjišťujeme hladinu vápníku v krvi. Z hormonů se nejčastěji stanovuje hormon příštítných tělísek, parathormon, a hormony štítné žlázy. U starších lidí se v důsledku poklesu produkce pohlavních hormonů zvyšuje odbourávání kostí, zároveň u nich může být snižená i jejich novotvorba. Z toho vyplývá, že dle hodnot markerů kostní novotvorby a odbourávání lze zjistit, zda není narušena rovnováha mezi nimi, a to ve prospěch odbourávání kosti. Pomocí těchto kostních ukazatelů lze určit prognóza onemocnění i monitorovat účinnost léčby (2, 5, 15).

1.8 Léčba osteoporózy

Hlavním účelem léčby je zamezit dalšímu úbytku BMD, následnému zhoršení kostní tkáně, frakturám a dalším komplikacím (16).

Aby byla terapie pro pacienta úspěšná, musí dodržovat nejen všeobecné zásady léčby, ale i specifickou léčbu různými léky. Léčebných metod existuje hodně, proto je podstatné vybrat tu správnou pro daného jedince. Závisí na stáří pacienta, zda jde o muže či ženu a jaké se u něj vyskytují rizikové faktory (2, 5, 16).

Mezi všeobecné zásady se řadí obecné terapeutické postupy a z části i prevence. Patří sem různá dietní opatření a s tím související správná výživa s dostatečným příjmem vápníku. Důležitý je rovněž vitamín D, a to především jeho aktivní formy. Značnou roli hrají též sportovní aktivity, které jsou přizpůsobené věku a stavu pacienta. Vhodné je např. plavání a chůze. Nepříznivý účinek na léčbu má kouření a nadměrné pití alkoholu, kterým by se měli nemocní vyvarovat. U sekundární formy je důležitá účinná léčba nemocí, v důsledku nichž osteoporóza vzniká a může progradovat. Pokud je nutná imobilizace nemocného, např. po zlomenině obratlů, měla by být co nejkratší. Dále se k obecným zásadám řadí rehabilitace, analgetika na bolest, lokální teplo a další podpůrné prostředky (2, 5).

U specifické léčby rozlišujeme léky, které potlačují odbourávání kostní tkáně a ty, jež naopak podporují její novotvorbu. Do skupiny léčebných látek tlumících odbourávání kostí patří kalcium, vitamín D, HRT a bisfosfonáty. Parathormon a anabolika se řadí k látkám stimulujícím kostní novotvorbu. (2, 5)

Dostatečný příjem *vápníku* je základem prevence vzniku onemocnění, ale je významný i při rozvinutí nemoci. Doporučená denní dávka je u dospělých do 50 let alespoň 1 g, u lidí starších 50 let by měl být vyšší, a to 1,2 – 1,5 g. Vyšší příjem by měly mít rovněž těhotné a kojící ženy, pacienti s osteoporózou a dospívající děti. Jestliže není dostatečný příjem kalcia v potravě, mělo by být doplňováno formou tablet. Vápník přijímáme v potravě hlavně v mléce a mléčných výrobcích. Vyskytuje se také v celozrnném pečivu, sardinkách, máku, oříškách, sušených švestkách, meruňkách, pažitce, petrželi, minerálkách, a pokud pijeme tvrdou vodu (2, 5, 17).

Dostatek *vitamínu D* je nutný pro tvorbu kalcitriolu, který následně stimuluje sliznici tenkého střeva k tvorbě specifického proteinu nezbytného pro navázání a vstřebávání vápníku (17, 18).

Dříve se k léčbě osteoporózy využíval také *kalcitonin*. Zpomaloval odbourávání kostí tím, že tlumil činnost osteoklastů. Působil také jako analgetikum. Nejvíce efektivním typem byl lososí kalcitonin, který je 30 až 50 krát účinnější než ten lidský. Podával se ve formě injekce nebo nosního spreje. V roce 2013 byla léčba kalcitoninem ukončena z důvodu mírného zvýšení rizika nádorových onemocnění (5, 17).

Bisfosfonáty jsou sloučeniny podobné pyrofosfátům, ale jsou synteticky vyrobené. Tlumí odbourávání kostní tkáně a zároveň pomáhají tvořit tkáň novou. Existuje několik druhů těchto léků. Mezi nejúčinnější patří alendronát a risendronát. (5)

Hormonální substituční léčba, která je také označována jako estrogenní terapie, je efektivní u žen po menopauze. Nejen, že zbavuje ženy obtíží způsobených klimakteriem, ale navíc má pozitivní vliv právě na prevenci osteoporózy i u žen se zvýšeným rizikem fraktur, protože zabraňuje dalšímu úbytku kostní hmoty. Léčba trvá alespoň 5 let, ale už od počátku jsou znát výsledky. Její účinky snižují riziko zlomenin krčku femuru až o 50 %. Na druhou stranu je považována za velmi kontroverzní. Mnoho organizací radí, aby se podávala v co nejmenší dávce a po co nejkratší dobu, jak

jen to je možné. Tato doporučení jsou založena na výsledcích Women's Health Initiative, které objevily u žen léčených pomocí kombinované substituční terapie škodlivé vedlejší účinky na srdce a zároveň častější výskyt rakoviny prsu. Právě kvůli nepříznivým vedlejším účinkům není tato léčba ještě moc používána. Nejvíce ji využívají ženy v USA, a to cca 40 %, zatímco u nás je to jen okolo 12 % žen. Z další studie naopak vyplývá, že léčba využívající pouze podávání estrogenů je příznivá a udržuje kosti silné. Jiná klinická studie provedená v Dánsku ukázala, že většina nežádoucích účinků je způsobena progestiny, ale ne estrogeny. Zároveň bylo u žen, které začaly užívat estrogen brzy po menopauze, sníženo riziko kardiovaskulárních chorob a rakoviny (5, 19, 20, 21, 22).

1.9 Kostní markery

Rozlišují se dvě základní skupiny kostních ukazatelů. Ty, které poukazují na resorpci kostí, a ty, jež přibližují kostní novotvorbu. Jejich biochemické stanovení poskytuje informace ke zhodnocení aktivity těchto procesů. Celkově ve stáří a u žen po menopauze je většinou snižena novotvorba, ale zvýšené odbourávání kosti. Kostní markery slouží k monitorování léčby osteoporózy, ale ne k její diagnostice. Pomáhají pochopit fyziologii kostních onemocnění (5, 23).

Do skupiny ukazatelů kostní novotvorby patří kostní alkalická fosfatáza (bALP), osteokalcin (OC) a amino- a karboxyterminální propeptid prokolagenu typu I (PINP, PICP). Kostní alkalická fosfatáza je enzym obsažený v membráně osteoblastů, jejichž aktivací se uvolňuje do krve, a lze tak stanovit v séru. Osteokalcin je důležitým proteinem kostní tkáně. Pro jeho tvorbu je třeba vitamín K a aktivní forma vitamínu D. Vzniká také v osteoblastech, odkud se asi 70 % uvolňuje do krve, zbylých 30 % se zabudovává do kostní matrix. Díky jeho velmi malé molekule snadno proniká glomerulem. Z tohoto důvodu jsou jeho hodnoty zvýšené u pacientů s nedostatečností ledvin. Váže na sebe hydroxyapatit. Dalším markerem kostní novotvorby jsou amino- a karboxyterminální propeptidy, které vznikají štěpením od prokolagenu I. Ten je

prekurzorem kolagenu typu I, který představuje nejdůležitější bílkovinu organické kostní matrix (2, 18).

Mezi markery kostní resorpce se řadí hydroxyprolin, pyridinolin a deoxypyridinolin, tartarát-rezistentní kyselá fosfatáza (TRACP), amino- a karboxyterminální telopeptid kolagenu I (INTP, ICTP). Hydroxyprolin je aminokyselina a zároveň degradační produkt metabolismu kolagenu. Dostává se do moči, ze které se také stanovuje. Není ale specifickým ukazatelem kostní resorpce, protože se vyskytuje ve všech typech kolagenu. Pyridinolin a deoxypyridinolin tvoří příčné vazby (tzv. cross-links), které vzájemně spojují molekuly kolagenu. Degradaci kolagenu se uvolňují do krve a lze je stanovit z moči. Specifičtějším ukazatelem je deoxypyridinolin vznikající pouze z kostního kolagenu typu I (2, 18).

Karboxyterminální telopeptid kolagenu I (CrossLaps, CTX) se uvolňuje do krve při štěpení kolagenu typu I. Je to marker kostní resorpce. Laboratorně se stanovuje imunochemickými metodami. Velikost tohoto peptidu je velmi malá, a tak snadno prochází glomeruly. Z toho vyplývá, že jeho koncentrace v séru závisí na funkci ledvin. Po spontánní izomeraci a racemizaci zbytků kyseliny asparagové s C-terminálním telopeptidem vznikají 2 izomery CTX – α (nově vzniklý kolagen) a β (zralý izomerizovaný kolagen). Vysoké hodnoty nalézáme u dětí, u nichž je kostní resorpce spojená s růstem a modelováním konců dlouhých kostí, ale také u postmenopauzálních žen. Dle cirkadiálních rytmů dosahuje nejvyšší hodnoty okolo páté hodiny ráno, naopak nejnižší kolem druhé hodiny odpolední (18, 24, 25, 26).

1.10 Stavba a funkce kostí

Kosti těla tvoří přibližně 15 – 20 % celkové hmotnosti člověka. Mají mnoho různých funkcí. Jsou pevnou oporou těla a spolu se svalovou soustavou tvoří pohybový aparát. Některé kosti zastupují ochrannou funkci pro jiné orgány. Podílí se na homeostáze, jelikož zde dochází k metabolismu minerálů, zejména vápníku, a slouží i jako jeho

zásobárna. Díky kostní dřeni, jež je v kostech uložená, je také místem vzniku erytrocytů, trombocytů a většiny leukocytů (2, 27).

Kostní tkáň má původ v mezodermu. Vzniká dvěma způsoby, a to primární osifikací, kdy dochází přímo k přeměně na kost, anebo sekundární osifikací, tzn. transformací z chrupavky (2).

Všechny kosti jsou tvořeny vazivovou okosticí (periostem), vlastní kostní tkání a kostní dření. Okostice je hojně prostoupena cévami a nervy a tudíž je metabolicky aktivní. Mezibuněčná hmota kosti se skládá ze dvou hlavních složek – organické a anorganické. Organická část je tvořena vláknitým kolagenem a nevláknitými proteoglykany. Tvoří asi 35 % kostní hmoty. Zatímco anorganická část se skládá převážně z krystalů hydroxyapatitu, představujících největší zásobárnu vápníku v lidském těle. Při tvorbě a růstu kosti se uplatňují osteoblasty, které obsahují alkalickou fosfatázu. Naopak na odbourávání kosti se podílí osteoklasty s kyselou fosfatázou. Osteocyty se nacházejí v definitivně vytvořené kosti a jejich funkcí je regulace kostní resorpce. Oba tyto procesy, jak tvorba kosti i její odbourávání, jsou navzájem propojené a probíhají po celý život. Jedná se o tzv. remodelaci kostní tkáně (2, 18, 27).

Rozlišuje se kostní tkáň kompaktní (hutná, kortikální) a trámčitá (spongiózní, houbovitá). Většina skeletu, přibližně 70 %, je tvořena kompaktní složkou. Spongiózní část má zase díky své trámčité struktuře větší povrch. Dle převahy jednotlivé tkáně se rozlišuje kost hutná a houbovitá. Typickou trabekulární kostí je lopatka či mandibula. Diafýzy dlouhých kostí a povrchové vrstvy krátkých a plochých kostí jsou příkladem kompaktní kosti. Houbovitá tkáň se nachází ve vnitřku plochých a krátkých kostí a v epifýzách dlouhých kostí (2, 27).

1.11 Metabolismus vápníku a řídicí mechanismy

Vápník je biogenním prvkem, který se vyskytuje převážně v kostech ve formě hydroxyapatitu. Odtud se dle potřeb uvolňuje do krve. Hladina vápníku v séru vypovídá o vzájemné zpětnovazebné interakci mezi koncentrací kalcia v extracelulární tekutině a

regulačními hormonálními mechanismy. Metabolismus kalcia řídí na jedné straně parathormon (PTH) a aktivní forma vitamínu D a na straně druhé kalcitonin. Hladiny kalcia v krvi se ovlivňují prostřednictvím orgánů, na které tyto hormony působí. PTH způsobuje resorpci kosti, proti tomu účinkuje kalcitonin. Ve sliznici střeva je vlivem vitamínu D navozena absorpce vápníku. Také ledviny reagují na pokles hladiny vápníku v krvi zvýšenou zpětnou absorpcí iontů v proximálním a distálním tubulu. V menší míře působí na metabolismus kalcia i některé další hormony – kortizol, T₃ a T₄ a aldosteron (2, 4, 18).

Okolo 46 % vápníku v plazmě je vázáno na bílkovinu, zejména na albumin. Této formě kalcia se také říká nedifuzibilní, protože nedokáže projít skrz semipermeabilní membrány. Další část se váže na citrát, sulfát či laktát do komplexních sloučenin, které jsou rozpustné ve vodě. Tuto skupinu tvoří přibližně pouze 6 % vápníku. Zbytek, necelá polovina, je tzv. ionizované kalcium (Ca²⁺). Vápník v komplexech a ionizovaný může procházet semipermeabilními membránami, je difuzibilní. Hladina celkové kalcemie souvisí tedy s hladinou krevních bílkovin. Z tohoto důvodu se v laboratořích většinou přímo měří ionizovaný vápník, který je jako jediný fyziologicky aktivní (4, 18).

1.11.1 Vitamín D

Člověk získává vitamín D dvěma způsoby. Jedním jeho zdrojem je potrava živočišného (cholecalciferol, D₃) i rostlinného původu (ergocalciferol, D₂). Přijatý vitamín D se vstřebává v tenkém střevě. Důležitější je však jeho endogenní tvorba, kdy vzniká ze 7-dehydrocholesterolu působením UV paprsků na kůži. Všechny tyto formy vitamínu D nejsou účinné, dokud nedojde k jejich aktivaci. Musí být dvakrát hydroxylovány – nejdříve v poloze 25 v játrech a poté v poloze 1 v ledvinách. Vzniká 1,25-dihydroxycholecalciferol neboli kalcitriol, který je účinnou formou vitamínu D. Je schopný podněcovat tvorbu specifického proteinu ve sliznici tenkého střeva, jenž je nezbytný pro navázání a vstřebávání vápníku (18).

1.11.2 Parathormon

PTH je peptidický hormon složený z 84 aminokyselin. Je produkován buňkami příštítných tělísek. Při snížené koncentraci vápníku v plazmě dochází k jeho uvolňování do krve, kde je štěpen. Jeho degradační produkty nevykazují takovou hormonální aktivitu jako intaktní parathormon. Ten má ale velmi krátký poločas rozpadu. PTH působí přímo na kosti a tubuly ledvin a nepřímo na tenké střevo. V kostech ovlivňuje jak novotvorbu, tak i odbourávání, které převažuje. Při hypokalcémii uvolňuje vápník z kostí. V ledvinách brání zpětné resorpci fosfátů a naopak zvyšuje zpětné vstřebávání vápenatých iontů a vylučování HCO_3^- . Dále stimuluje vznik kalcitriolu v ledvinách, což má za následek zvýšenou absorpci vápníku ve střevě (18).

1.11.3 Kalcitonin

Kalcitonin je hormon produkováný ve štítné žláze. Působí antagonisticky vůči parathormonu. Je secernován do krve při hyperkalcémii. Pomáhá ukládat kalcium zpět do kostí. V metabolismu vápníku má nejmenší význam (18).

2 Cíle práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem mé práce bylo stanovit hladiny markeru kostní resorpce (β -CrossLaps) pomocí metod ELISA a ECLIA na stejných sérech od pacientů s diagnostikovanou osteoporózou a výsledky statisticky zpracovat.

2.2 Hypotéza

Naměřené hodnoty se budou od sebe minimálně lišit.

3 Metodika

Praktickou část své bakalářské práce jsem prováděla v soukromé laboratoři STAFILA, spol. s r. o. v Českých Budějovicích. Vedoucí laboratoře je MUDr. Marie Ládová, která je také mojí vedoucí práce. Laboratoř se zabývá biochemickými, hematologickými, mikrobiologickými, sérologickými a některými imunologickými vyšetřeními. Velká část vyšetření je prováděna pro praktické i specializované ambulantní lékaře. Ale vyšetřují se zde i vzorky od veterinářů. Součástí laboratoře je i několik odběrových míst v Českých Budějovicích, Strakonících a Vodňanech. Laboratoř i ostatní detašovaná pracoviště jsou akreditována dle normy ČSN EN ISO 15189:2007. Veškerou přepravu biologických materiálů do laboratoře zajišťuje vlastní svozová služba.

Mým úkolem bylo stanovit hladiny markeru kostní resorpce (β -CrossLaps) pomocí dvou metod – ELISA a ECLIA na dvou různých přístrojích. Během roku 2013 jsem postupně zanalyzovala 66 sér nejdříve metodou ELISA. Tuto metodu jsem prováděla na mikrobiologickém úseku laboratoře na přístroji NexGen Four od firmy TestLine pod kontrolou laborantky Bc. Šárky Ochozkové. Poté jsem ty samé vzorky zanalyzovala na automatickém analyzátoru IDS-iSYS metodou ECLIA, a to v biochemické části laboratoře. Při práci na mě dohlížela laborantka Martina Voříšková.

Vzorky sér jsem získala od MUDr. Ládové, která vede v Českých Budějovicích osteologickou ambulanci a už několik let se zabývá diagnostikou a léčbou osteoporózy. Všechny vzorky byly od pacientů s diagnostikovanou osteoporózou.

3.1 Stanovení β -Crosslaps metodou ELISA

3.1.1 Analyzátor NexGen Four

NexGen Four je plně automatizovaný otevřený čtyřdestičkový analyzátor (příloha 1). Umožňuje provádět souběžně až 16 testů v 96 jamkovém formátu. Analyzátor tvoří 1 centrálně uložená stanice pro vzorky, 2 nezávislá pipetovací robotická ramena, 4 nezávislé inkubátory, 2 fotometry a 2 promývací stanice. Přístroj je řízen 2 počítači – interním a externím. V externím PC je nainstalovaný software OpenLab, který je vyvinutý pod systémem Windows XP.

Analyzátor má kapacitu 240 vzorků. Centrální stanice je složena z 8 držáků na zkumavky. V každém držáku je místo pro 15 primárních a 15 předředovacích zkumavek. Obě pipetovací ramena obsahují zároveň standardní vyměnitelnou špičku a kovovou jehlu. Přístroj je založen na technice dvojího pipetování. Kapacita zpracování jsou 2 destičky na 1 rameno. Dokáže napipetovat objemy od 10 do 1000 μ l. Přesnost pipetování je pod 2,5 %.

K promývání jsou určeny 2 stanice, 6 promývacích roztoků s možností protřepání a šestilitrový integrovaný kontejner na odpad.

Měření výsledných hodnot probíhá pomocí fotometrů v rozmezí od 400 do 700 nm. Je zde i několik interferenčních filtrů – standardně 405, 450, 492, 550, 692 nm.

Dodávaný software pomáhá archivovat výsledky pacientů a provádí kontrolu kvality Levey-Jennings.

Přístroj má několik bezpečnostních funkcí. Snímá hladiny roztoků, dokáže detekovat bubliny a sraženiny v roztoku a nahlas hlásí jakékoli chyby (28).

3.1.2 Princip metody

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je imunochemická metoda, u které se ke značení komplexu antigen-protilátka využívá enzym. Existuje několik typů této metody. Hlavní rozdělení je na kompetitivní a nekompetitivní. Já jsem se zaměřila

na nekompetitivní formu, neboli sendvičovou, na jejímž principu jsem stanovení β -CrossLaps prováděla.

Sendvičová ELISA je nejpoužívanější technikou svého druhu. Využívá se dvou vysoce specifických protilátek, většinou monoklonálních. Stanovované antigeny v neznámých vzorcích se navážou mezi dvě specifické protilátky a vzniká tak komplex protilátka – antigen – protilátka značená enzymem. Následuje inkubace a promytí, při němž se odstraní přebytečný nenavázaný materiál a stanoví se aktivita enzymu navázaného na sendviči. Přidá se chromogenní substrát a barevná reakce se ukončí zastavovacím roztokem. Nakonec se změří absorbance pomocí fotometru. Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství antigenu v neznámém vzorku, v tomto případě séru pacienta (29).

3.1.3 Souprava Serum Crosslaps[®] ELISA a její princip

Při tomto stanovení jsem využila enzymatický imunologický test Serum CrossLaps[®] ELISA od firmy IDS, který kvantifikuje C-terminální telopeptidy kolagenu typu I v séru i plazmě člověka. Sada je určena pro indikaci kostní resorpce. Umožňuje monitorovat změny resorpce kostí a předpovědět změny BMD u žen po menopauze, které podstupují anti-resorpční léčbu. Nelze ale pomocí něj předvídat osteoporózu či rizika fraktur (30).

Principem testu je použití dvou vysoce specifických monoklonálních protilátek proti sekvenci aminokyselin EKAHD- β -GGR. Aby byl získaný signál specifický, musí být tyto dvě sekvence navzájem překřížené. Do mikrojamek mikrotitrační destičky, které jsou potaženy streptavidinem, jsou napipetovány standardní, kontrolní i neznámé vzorky sér pacientů. Poté se aplikuje směs biotinylovaných protilátek a protilátek značených peroxidázou. Následně vznikají komplexy mezi CrossLaps antigeny a oběma druhy protilátek. Tyto komplexy se naváží na streptavidin pomocí biotinylované protilátky. Potom se nechá vše inkubovat při pokojové teplotě. Následuje vyprázdnění a vymytí jamek. Nakonec se přidá chromogenní substrát, který celou reakci barevně

zviditelní. Pro ukončení reakce je přidána kyselina sírová. Na závěr se změří absorbance pomocí fotometru. (30)

3.1.4 *Obsah balení*

Celá souprava obsahuje reagentie, které postačí na provedení 96 testů. Součástí balení je:

- mikrotitrační destička s 12 stripy po 8 jamkách, které jsou potaženy streptavidinem,
- CrossLaps Standard (Cal 0) - jde o PBS-pufrovaný roztok s proteinovým stabilizátorem a konzervačním činidlem (min. 5 ml),
- CrossLaps Standard (Cal 1-5) – obsahují CrossLaps Standard v roztoku pufrovaném PBS s preteinovým stabilizátorem a konzervačním činidlem (5 x 0,4 ml),
- kontrola 1-2 (CTRL 1-2) – jedná se o odsolené antigeny z lidské moči v PBS-pufrovaném roztoku s proteinovým stabilizátorem a konzervačním činidlem (0,4 ml),
- biotinylovaná protilátka (Ab BIOTIN) – což je koncentrovaný roztok biotinylované myší monoklonální protilátky, která je specifická k degradačním produktům kolagenu typu I – C-terminálním telopeptidům (0,25 ml),
- protilátka značená peroxidázou (ENZYMCONJ) – jedná se o koncentrovaný roztok myších monoklonálních protilátek značených peroxidázou, jež jsou specifické k produktům degradace kolagenu typu I (0,25 ml),
- inkubační pufr (BUF) – pufrovaný roztok s proteinovým stabilizátorem a konzervačním činidlem (19 ml),
- substrátový roztok (SUBS TMB) – tetramethylbenzidin v kyselém pufru; jedná se o chromogen, který může být lehce namodralý (12 ml),
- zastavovací roztok – v tomto případě 0,18 mol/l kyselina sírová (12 ml),

- promývací pufr (WASHBUF) – 50 x koncentrovaný promývací pufr obsahující detergent a konzervační činidlo, před použitím se ředí destilovanou vodou v poměru 1:50,
- krycí fólie – potřebná na překrytí jamek během inkubování (30).

Souprava Serum CrossLaps[®] ELISA je stabilní do data uvedeného na obalu, pokud se dodržují podmínky skladování při 2 až 8 °C (30).

3.1.5 Příprava pracovních roztoků

- všechna činidla a vzorky se nechávají před použitím vytemperovat na pokojovou teplotu (18 až 22 °C) a je potřeba, aby byly pečlivě promíchány,
- roztok protilátek se připravuje vždy čerstvý, maximálně 30 minut před začátkem analýzy. Do prázdné nádoby se přidá biotinylovaná protilátka (Ab BIOTIN), protilátka značená peroxidázou (ENZYMCNJ) a inkubační pufr (BUF) v poměru 1:1:100. Vše se opatrně promíchá, aby se zabránilo tvorbě pěny,
- promývací roztok (WASHBUF) se ředí před použitím destilovanou vodou v poměru 1:50,
- všechny kalibrátory, kontroly, substrátový i zastavovací roztok jsou určeny k okamžitému použití a dále se neředí (příloha 2) (30).

3.1.6 Postup analýzy

Všechny níže popsané kroky a časy inkubací jsou naprogramovány v automatickém analyzátoru NexGen Four, na kterém jsem stanovení prováděla.

1. Nejdříve se postupně napipetuje do jamek mikrotitrační destičky po 50 µl CrossLaps Standardu (Cal 0 až 5), dále stejné množství obou kontrol a neznámých vzorků.

2. Poté se přidá po 150 μ l roztoku protilátek.
3. Destička se přikryje fólií a nechá se vše inkubovat 120 \pm 5 minut při pokojové teplotě a za stálého míchání (300 otáček za minutu).
4. Po inkubaci se jednotlivé stripy propláchnou promývacím pufrem (300 μ l). Většinou stačí 5 cyklů. Po každém promytí by měly zůstat jamky úplně prázdné.
5. Do každé jamky se přidá 100 μ l chromogenního roztoku substrátu a nechá se vše opět inkubovat 15 \pm 2 minuty při pokojové teplotě v temnu a za stálého míchání.
6. Nakonec se do každé jamky přidá po 100 μ l kyseliny sírové, která ukončí probíhající reakce.
7. Hodnota absorbance se změří do dvou hodin po ukončení barevné reakce pomocí fotometru při 450 nm. Referenční vlnová délka je 650 nm (30).

3.2 Stanovení β -CrossLaps metodou ECLIA

3.2.1 Analyzátor IDS-iSYS

IDS-iSYS je přístroj určený pro in vitro diagnostiku (příloha 3). Umožňuje provádět biochemické a imunochemické analýzy na jedné platformě. Analyzátor využívá k detekci luminiscenční a spektrofotometrické metody, dále podporuje chemiluminiscenční imunoanalýzy a rozbory založené na enzymatické detekci. Přístroj umožňuje všechny analýzy plně zautomatizovat (31, 32).

Analyzátor se skládá z následujících součástí:

- chlazeného zásobníku na reagentie s patnácti pozicemi, ve kterých jsou reagenční soupravy pro imunoanalýzu, biochemické rozbory a speciální stojánek na chronometrické reagentie,
- zásobníku na vzorky, kalibrátory a kontroly. Je zde místo pro šest vyjímatelných stojáneků s dvaceti pozicemi (příloha 4),

- pipetovacího ramena,
- karuselu, který obsahuje devadesát pozic pro jednorázové kyvety. Teplota je regulována na $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. V karuselu je zabudovaný spektrofotometr určený k měření absorbance vzorků při imunochemických, biochemických a turbidimetrických reakcích,
- automatického podavače kyvet, který může obsahovat až 960 kyvet, jež jsou předem seřazené v krychlovém zásobníku,
- dvou modulů pro chronometrická měření (koagulační varianta)
- luminometru, který měří luminiscenci při imunoanalýze (imunoanalytická varianta),
- čtyř promývacích stanic určených k promývání magnetických částic (imunoanalytická varianta),
- dvou čteček čárových kódů. Jedna je umístěná v zásobníku na reagentie a je určena k identifikaci reagenčních souprav dodávaných společností IDS. Druhá čtečka je na přední straně přístroje a slouží k identifikaci pomocných reagentií. Kalibrátory, kontroly a samotné vzorky jsou identifikovány rovněž čtečkou vestavěnou v zásobníku na reagentie (31, 32).

Reagentie jsou v chlazeném zásobníku udržovány při teplotě 12 až 15 °C, pokud je analyzátor v provozu, popřípadě při teplotě 8 až 10 °C za pohotovostního režimu. V přístroji lze naprogramovat až 15 imunoanalytických parametrů nebo až 36 biochemických parametrů nebo jejich kombinací. Pro imunoanalytická stanovení je nutné používat pouze reagenční soustavy od společnosti IDS. Pro biochemické rozborly lze použít reagentie od jiných dodavatelů, ale je nutné zapsat všechny potřebné údaje ručně, protože tyto reagentie nebudou načteny pomocí čárových kódů.

Pipetovací jehla je vybavena kapacitní detekcí hladiny kapaliny. Vzorky a reagentie se pipetují v souladu s ověřenými parametry pro jednotlivé analýzy. Přenášejí se do kyvety, ve které probíhá reakce. Pipetovací jehla se vždy mezi jednotlivými vzorky propláchne zvenku i zevnitř. Tím se zabrání riziku kontaminace (31, 32).

V případě imunoanalýzy se kyvety přenášejí do promývací stanice. Zde jsou pevné látky (magnetické částice) vychytány magnety. Následně je kyveta přenesena do luminometru, pokud se jedná o chemiluminiscentní stanovení, nebo zůstane v karuselu na enzymatickou analýzu. Při chemiluminiscentním stanovení se do kyvety přidávají spouštěcí reagenty, které vyvolávají luminiscenci. U enzymatických analýz je dodáván substrát a spektrofotometr měří neustále fotometrické změny. Po ukončení všech měření se kyvety automaticky vyhodí do zásobníku na pevný odpad. U biochemických rozborů jsou měřeny neustálé fotometrické změny pomocí spektrofotometru (31, 32).

Přístroj je připojen k PC pomocí rozhraní Ethernet. Software je naprogramován k provádění následujících funkcí:

- spravuje šarže všech reagentů, kontrol i kalibračních vzorků,
- provádí kontrolu kvality (Levey-Jenningsova a Westgardova),
- spravuje pomocné reagenty,
- dokáže dohledat obsluhu,
- přenáší výsledky do centralizovaného počítačového systému,
- tiskne, ukládá a dohledává výsledky.

Analyzátor umožňuje provádět až 120 testů za hodinu při imunoanalytickém stanovení a až 200 testů za hodinu u biochemických rozborů. V přístroji je možné provádět až 15 různých imunoanalytických a až 50 odlišných biochemických testů.

Jako vzorky lze použít sérum, plazmu a moč. Pipetovat lze objemy od 4 do 300 μl při imunoanalýze a od 4 do 50 μl u biochemických rozborů. Reagenty se pipetují od objemu 10 až 400 μl u obou stanovení.

U spektrofotometru s interferenčními filtry lze nastavit 6 vlnových délek: 340, 405, 500, 540, 580 a 620 nm. Obsahuje halogenovou lampu, která přenáší světlo optickým vláknem. Luminometr měří při vlnových délkách od 300 do 500 nm (31, 32).

3.2.2 *Souprava IDS-iSYS CTX-I*

Tuto soupravu jsem využila při stanovování β -CrossLaps ze séra pacientů pomocí metody ECLIA. Analýzu jsem prováděla na přístroji IDS-iSYS od firmy IDS. Metoda je určena ke kvantitativnímu stanovení produktů degradace kolagenu typu I – C-terminálním telopeptidům (CTX-I). CrossLaps jsou používány jako indikátory stavu kostní resorpce nebo pomáhají monitorovat průběh substituční léčby a bisfosfátové terapie.

Kolagen typu I je syntetizován především v kostech a tvoří zde více než 90 % organické hmoty. Kolagen I je degradován během obnovy skeletu. Uvolněné peptidické fragmenty jsou následně vylučovány do krevního řečiště a mohou být detekovány pomocí soupravy IDS-iSYS CTX-I.

Souprava CTX-I je založená na chemiluminiscentní metodě. Využívají se dvě vysoce specifické monoklonální protilátky proti sekvenci aminokyselin EKAHD- β -GGR, kde zbytek kyseliny asparagové (D) je přítomný jako β -izomer. Aby byl výsledný signál, který je získán tímto testem, specifický, musí být tyto dva řetězce aminokyselin překříženy.

Vzorky jsou inkubovány po určitou dobu spolu s oběma značenými protilátkami. Poté se k nim přidají streptavidinem potažené magnetické částice a následuje další inkubace. Částice jsou zachyceny pomocí magnetu. Po promytí a přidání spouštěcích roztoků dochází k emisi světla estery akridinu, která je přímo úměrná koncentraci CTX-I v původním vzorku.

Souprava CTX-I je stabilní do data uvedeného na obalu, pokud je skladována ve tmě při 2 až 8 °C. Před vlastní analýzou by měly mít všechny vzorky, kontroly a kalibrátory pokojovou teplotu (20 až 25 °C) (33).

3.2.3 *Obsah balení*

Celá souprava CTX-I obsahuje:

- magnetické částice potažené streptavidinem (MPS3) ve fosfátovém pufru, který obsahuje azid sodný jako konzervační činidlo (2,6 ml),
- monoklonální protilátku značenou derivátů esteru akridinu (CONJ) v pufru z hovězích a myších proteinů a azidem sodným (5 ml),
- biotinylovanou protilátku (Ab-BIOT) v pufru obsahujícím hovězí a myší proteiny a azid sodný (5 ml),
- fosfátový BSA pufr (Assay Bu) zahrnující hovězí a myší proteiny, koňské sérum a azid sodný (8,4 ml),
- ředící pufr (Diluent Bu) – fosfátový BSA pufr z hovězích a myších protilátek, koňského séra a azidu sodného (8,4 ml),
- kalibrátory (CAL A, CAL B) – fosfátová BSA matrix obsahující CTX-I a azid sodný (2,5 ml) (33).

3.2.4 *Příprava pracovních roztoků*

Všechny reagenční soupravy jsou připraveny k použití. Analyzátor automaticky provádí míchání magnetických částic pro udržení homogenity. Kalibrační roztoky jsou určeny k okamžitému použití (33).

3.2.5 *Princip metody*

Metoda je založena na měření luminiscence. Jedná se o fyzikální jev, kdy látky (luminofory) emitují světelné záření. Produkce světla je obvykle způsobena změnou některých vnějších podmínek, mezi které patří například teplota, pH či elektrický potenciál, jež ovlivní změnu fyzikálně-chemických vlastností molekul látky. Luminofor

se tak dostane do excitovaného stavu. Návratem do stabilního stavu se zbavuje přebytečné energie formou elektromagnetického záření, které se měří pomocí luminometru a vyjadřuje se v poměrných světelných jednotkách (RLU). U metody ECLIA se využívá k vybuzení chemiluminiscence elektrický impuls (31, 34).

U analyzátoru IDS-iSYS se používají jako detekční indikátory deriváty luminiscentních esterů akridinu (DMAE – dimethylethanolamin). Estery akridinu vyzařují světlo po reakci s peroxidem vodíku a zásaditým roztokem. Spouštěcí roztok A obsahuje peroxid vodíku ve zředěném kyselém médiu. Spouštěcí roztok B obsahuje roztok zředěného hydroxidu sodného. Tyto spouštěcí roztoky jsou automaticky vstříkované do reakční kyvety, kde následně dochází k oxidaci esteru, který se dostává do excitovaného stavu. Návrat do stabilního stavu doprovází emise světla, jež je měřena luminometrem (31).

3.3 Průběh vlastní analýzy

Celou laboratorní část své bakalářské práce jsem prováděla v akreditované laboratoři STAFILA, spol. s r. o., kde jsem postupovala podle standardních operačních postupů pracoviště.

V preanalytické fázi musí být proveden správný odběr vzorku od pacienta, aby byla zajištěna spolehlivost a správnost výsledku vyšetření. Krev by měla být odebrána ze žíly, nejlépe ráno nalačno, a mělo by být zamezeno její hemolýze (30). Další důležitou částí preanalytické fáze je transport biologického materiálu do laboratoře. STAFILA má svou vlastní svozovou službu, jejíž pracovníci dodržují všechny potřebné podmínky a zajišťují tak spolehlivý transport.

Dopravené vzorky se dostávají na příjem laboratoře, kde se třídí. Zde jsem také zahájila svou práci. Přidělovala jsem k žadance odebraný materiál podle jména, příjmení a rodného čísla pacienta. Informace na žadance musí souhlasit s těmi na odebraném materiálu. Roztříděný materiál jsem předala pracovníkům příjmu, kteří jsou proškoleni k zadávání potřebných dat do počítače. Ke každé zadané žadance

i jejímu materiálu je přiřazen totožný kód. Vytisknuté čárové kódy jsem nalepila na příslušnou žádanku a k ní patřící vzorky. Laboratoř využívá systém Infolab, do kterého jsou zadávány veškeré informace a předávány dále na jednotlivé úseky.

Vzorky s přiřazenými čárovými kódy jsem odnesla zcentrifugovat, aby se oddělilo sérum od krevních buněk. Mělo by se to provést nejdéle tři hodiny po odběru krve. Séra se centrifugovaly při 3500 otáčkách za minutu po dobu deseti minut. Poté jsem si oddělila séra od krevních buněk do předem připravených zkumavek se stejnými čárovými kódy. Takto připravený stojánek se séry jsem odnesla do mikrobiologické části laboratoře, kde jsem zahájila své měření.

V laboratoři se provádí vyšetření β -CrossLaps pouze jedenkrát týdně, a tak bylo nutné séra skladovat v lednici při teplotě 2 až 8 °C. To je však možné maximálně 4 dny, jinak je nutné séra zmrazit alespoň na -18 °C.

Na mikrobiologickém úseku jsem provedla stanovení β -CrossLaps v séru metodou ELISA-sendvič na přístroji NexGen Four od společnosti TestLine. Výsledky byly vyhodnoceny kvantitativně v ng/ml.

Před začátkem samotné analýzy jsem si musela zapnout automatický analyzátor NexGen Four, jehož software je propojen se samostatným počítačem v laboratoři. Každé ráno se nejdříve zahájí údržba přístroje, která vše zkontroluje a propláchne pipetovací jehly destilovanou vodou, a připraví ho na vlastní analýzu. Dále jsem si připravila vzorky sér a soupravu Serum CrossLaps[®] ELISA od společnosti IDS a nechala vše vytemperovat na pokojovou teplotu.

Díky propojení počítače s přístrojem jsem si přetáhla z Infolabu vyšetřovaný soubor pacientů dle přidělených čárových kódů do programu analyzátoru, v němž pracuje. Zvolila jsem příslušnou metodu a na určená místa v přístroji vložila reagenty. Umístění reagentních roztoků je určeno programem pro každou metodu.

Dále jsem si připravila roztok protilátek, který by měl být připraven maximálně 30 minut před začátkem analýzy. Smíchala jsem do prázdné kádinky roztok biotinylované protilátky, protilátky značené peroxidázou a inkubační pufr v poměru 1:1:100. Opatrně jsem vše promíchala a snažila jsem se zabránit tvorbě pěny.

Poté jsem ještě naředila roztok promývacího pufru destilovanou vodou v poměru 1:50.

Připravila jsem si také mikrotitrační destičky, které byly součástí setu, a potřebný počet stripů dle počtu vzorků. Musí se počítat ale také s místem pro 6 kalibračních roztoků a dvě kontroly. Takto nachystanou destičku jsem vložila do přístroje na místo tomu určené.

Nakonec jsem rozmístila otevřené zkumavky se séry pacientů do centrálně uložené stanice na vzorky podle schématu v počítači. Poté jsem zkontrolovala, zda má přístroj nachystané vše, co potřebuje, a stiskla jsem tlačítko „RUN“.

Automatický analyzátor má všechny kroky postupu naprogramované a je schopný pracovat sám. Nejdříve si do příslušných jamek mikrotitrační destičky napipetoval 50 μ l CrossLaps Standardu (CAL 0 – 5), obě kontroly a nakonec vzorky sér od pacientů a přidal k nim 150 μ l roztoku protilátek. Následovala první inkubace, která trvala cca 120 minut a byla prováděna při pokojové teplotě a za stálého míchání – 300 otáček za minutu. Poté analyzátor všechny stripy propláchnul promývacím pufrům. Dále napipetoval do každé jamky 100 μ l chromogenního roztoku substrátu a nechal vše inkubovat 15 minut při pokojové teplotě a za stálého míchání. Celou reakci ukončil přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku, v tomto případě kyseliny sírové, do každé jamky. Intenzita zabarvení každého vzorku se měří fotometricky při vlnové délce 450 nm proti Standardu 0 (tzv. blank), referenční vlnová délka byla 650 nm. Pokud se mu některý krok nepodaří provést, začne hlasitě signalizovat. Nejčastěji se stává, že nedokáže napipetovat potřebný objem, a tak je nutné dokončit tento krok ručně. Naprogramovány má i veškeré inkubační časy, promývání i promíchávání.

Analyzátor začal po změření všech vzorků nahlas signalizovat, že ukončil celý postup a vyhodnotil výsledky, které jsem si mohla otevřít v programu v počítači. Zobrazily se i hodnoty kalibračních roztoků a kontrol a kalibrační křivka, kde na ose x byly zaneseny hodnoty koncentrací kalibrátorů v ng/ml a na ose y jejich optická denzita (absorbance). Spojením těchto bodů vznikla kalibrační křivka. Spektrofotometr dále změřil absorbance u ostatních vzorků a sám přepočtl hodnoty na koncentrace β -CrossLaps v séru u jednotlivých pacientů. Hodnoty koncentrací byly uváděny

v ng/ml. Pokud byla absorbance vzorku vyšší než absorbance Standardu 5, vzorek musel být rozředěn Standardem 0 (blankem) a opět zanalyzován (30).

Detekčním limitem stanovení β -CrossLaps v séru je koncentrace 0,020 ng/ml, která odpovídá 3 standardním odchylkám od průměru vypočteného z 21 stanovení Standardu 0. Serum CrossLaps[®] ELISA je lineární v koncentracích CrossLaps mezi 0,020 – 3,380 ng/ml (30).

Získané výsledky byly přeneseny z programu do systému Infolab a zařazeny k jednotlivým pacientům. Vše ještě zkontroloval a odsouhlasil lékař a výsledky mohly být zaslány jednotlivým lékařům, kteří o dané vyšetření žádali.

Po ukončení práce jsem si nechala vzorky sér zmrazit pro další analýzu metodou ECLIA prováděnou na přístroji IDS-iSYS. Toto stanovení probíhalo obdobně. Nejdříve jsem si vyndala z lednice všechna reagenční činidla a vzorky z mrazáku a nechala je vytemperovat na pokojovou teplotu (18 až 22 °C). IDS-iSYS je také automatický analyzátor a všechny kroky analýzy má v sobě naprogramovány. Zvolila jsem si příslušnou metodu. Do chlazeného zásobníku na reagenty jsem vložila všechna potřebná reagenční činidla, která jsou udržována za provozu při teplotě 12 až 15 °C. Vzorky pacientů jsem umístila do stojánek označených svými čárovými kódy. Poté jsem je pomalu vkládala do zásobníku na vzorky, aby si analyzátor stihl načíst číslo stojánek a identifikoval dle kódů jednotlivé vzorky. Přístroj si poté sám vzorky a reagenty pipetoval do kyvet, ve kterých probíhaly reakce. Mezi jednotlivými vzorky si propláchnul pipetovací jehly. Dále přenesl kyvety do promývacího modulu, kde byly zachyceny magnetické částice pomocí magnetů. Po ukončení reakcí přenesl kyvety do luminometru na chemiluminiscenční analýzu. Přístroj automaticky vstříkoval do reakční kyvety dva spouštěcí roztoky, peroxid vodíku a hydroxid sodný, které vyvolaly luminiscenci. Po ukončení měření se kyvety automaticky vyhodily do zásobníku na pevný odpad. Emise světla je vyjadřována v poměrných světelných jednotkách (RLU). Analyzátor sám vyjádřil hodnoty koncentrace CrossLaps jednotlivých vzorků, jež jsou uváděny v ng/ml. Po ukončení měření jsem si mohla najít v programu tabulku s výsledky.

Rozsah měření soupravy IDS-iSYS CTX-I je v koncentraci od 0,033 – 6,000 ng/ml. Hodnoty koncentrace pod 0,033 ng/ml jsou označeny jako OMR⁻, tzn., že vypočítaný výsledek je nižší než dolní mez měření (31, 33).

4 Výsledky

Praktická část mé bakalářské práce byla založena na stanovení koncentrace karboxyterminálních telopeptidů kolagenu typu 1 (β -CrossLaps) v 66 sérech pacientů s diagnostikovanou osteoporózou. Analýzu jsem prováděla na dvou různých přístrojích pomocí dvou metod – sendvičová ELISA a ECLIA. Měření založené na principu ELISA testů jsem prováděla na automatickém analyzátoru NexGen Four od společnosti TestLine. Dále jsem ty samé vzorky zanalyzovala na přístroji IDS-iSYS od firmy IDS metodou ECLIA.

Výsledky jsou vyjádřeny kvantitativně v ng/ml. Rozsah měření u IDS-iSYS CTX-I je v koncentracích od 0,033 do 6000 ng/ml. Hodnoty koncentrace menší než 0,033 ng/ml jsou hlášeny jako OMR⁻, tzn., že vypočítaný výsledek je nižší než dolní mez oblasti měření.

Naměřené hodnoty z obou přístrojů jsem statisticky zpracovala pomocí programů Microsoft Office Excel a MedCalc.

V tabulce 1 uvádím naměřené výsledky koncentrací β -CrossLaps, dále pohlaví a roky narození pacientů. Séra jsem očíslovala od 1 do 66.

Tabulka 1: Vyjádření koncentrace β -CrossLaps [ng/ml] v sérech pacientů
s diagnostikovanou osteoporózou

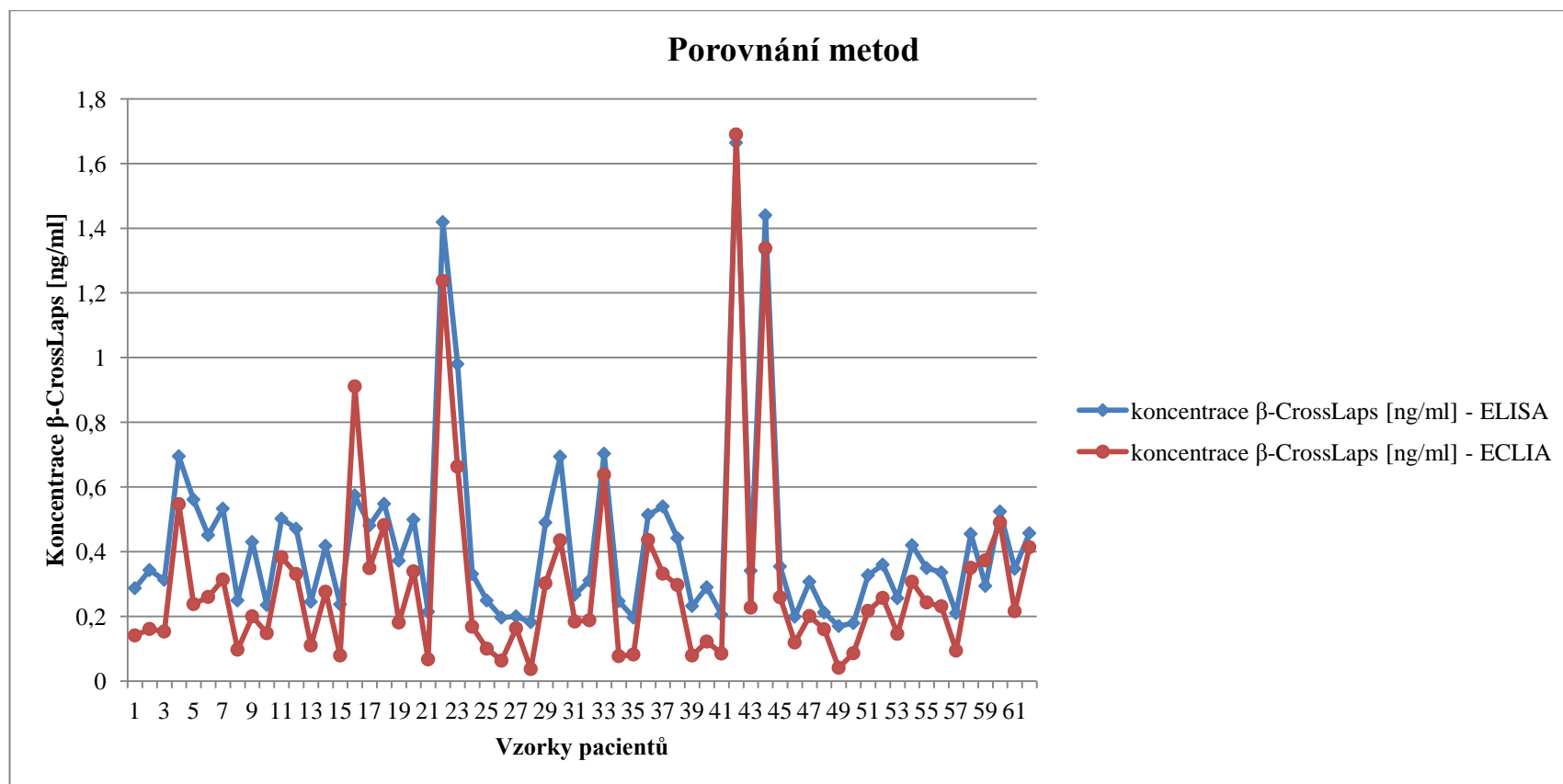
Číslo vzorku	Pohlaví	Rok narození	Koncentrace β -CrossLaps [ng/ml] - ELISA	Koncentrace β -CrossLaps [ng/ml] - ECLIA
1	žena	1938	0,287	0,141
2	žena	1964	0,343	0,161
3	žena	1941	0,313	0,153
4	žena	1943	0,695	0,547
5	žena	1951	0,561	0,238
6	žena	1934	0,451	0,260
7	žena	1945	0,533	0,314
8	žena	1944	0,249	0,097
9	žena	1946	0,430	0,200
10	žena	1944	0,235	0,148
11	žena	1943	0,502	0,383
12	žena	1955	0,471	0,331
13	žena	1941	0,245	0,110
14	muž	1980	0,418	0,276
15	žena	1940	0,237	0,079
16	žena	1946	0,574	0,911
17	žena	1930	0,131	OMR
18	žena	1936	0,481	0,349
19	žena	1950	0,548	0,482
20	muž	1955	0,372	0,181
21	muž	1932	0,499	0,339
22	žena	1953	0,214	0,067
23	žena	1935	1,419	1,237
24	žena	1942	0,980	0,663
25	žena	1938	0,331	0,168
26	žena	1954	0,249	0,100
27	žena	1949	0,196	0,063
28	žena	1937	0,200	0,163
29	žena	1938	0,182	0,037
30	žena	1938	0,490	0,302
31	žena	1929	0,694	0,435
32	žena	1945	0,267	0,184
33	žena	1951	0,311	0,188
34	žena	1955	0,703	0,638
35	žena	1941	0,247	0,077

Číslo vzorku	Pohlaví	Rok narození	Koncentrace β -CrossLaps [ng/ml] - ELISA	Koncentrace β -CrossLaps [ng/ml] - ECLIA
36	žena	1935	0,196	0,082
37	žena	1954	0,514	0,436
38	žena	1984	0,540	0,332
39	žena	1941	0,442	0,297
40	muž	1943	0,232	0,079
41	žena	1929	0,290	0,122
42	žena	1956	0,205	0,085
43	žena	1933	1,664	1,690
44	žena	1934	0,341	0,227
45	žena	1931	1,440	1,338
46	žena	1944	0,354	0,259
47	žena	1938	0,199	0,119
48	žena	1951	0,307	0,201
49	žena	1962	0,212	0,160
50	žena	1946	0,170	0,041
51	žena	1959	0,179	0,086
52	žena	1935	0,327	0,217
53	žena	1961	0,360	0,257
54	žena	1970	0,256	0,146
55	žena	1935	0,420	0,307
56	žena	1959	0,349	0,243
57	žena	1927	0,336	0,231
58	žena	1944	0,210	0,094
59	žena	1955	0,455	0,350
60	žena	1939	0,294	0,373
61	žena	1951	0,524	0,490
62	žena	1941	0,026	OMR ⁻
63	žena	1928	0,347	0,216
64	žena	1932	0,457	0,414
65	žena	1935	0,079	OMR ⁻
66	žena	1952	0,161	OMR ⁻



Graf 1: Zastoupení věkových kategorií dle pohlaví v mém výzkumu

Do mého výzkumu bylo náhodně vybráno 66 sér. Graf 1 ukazuje počty vzorků od jednotlivých věkových skupin.



Graf 2: Znáznornění koncentrací β -CrossLaps v ng/ml vyhodnocených oběma metodami u jednotlivých sér pacientů

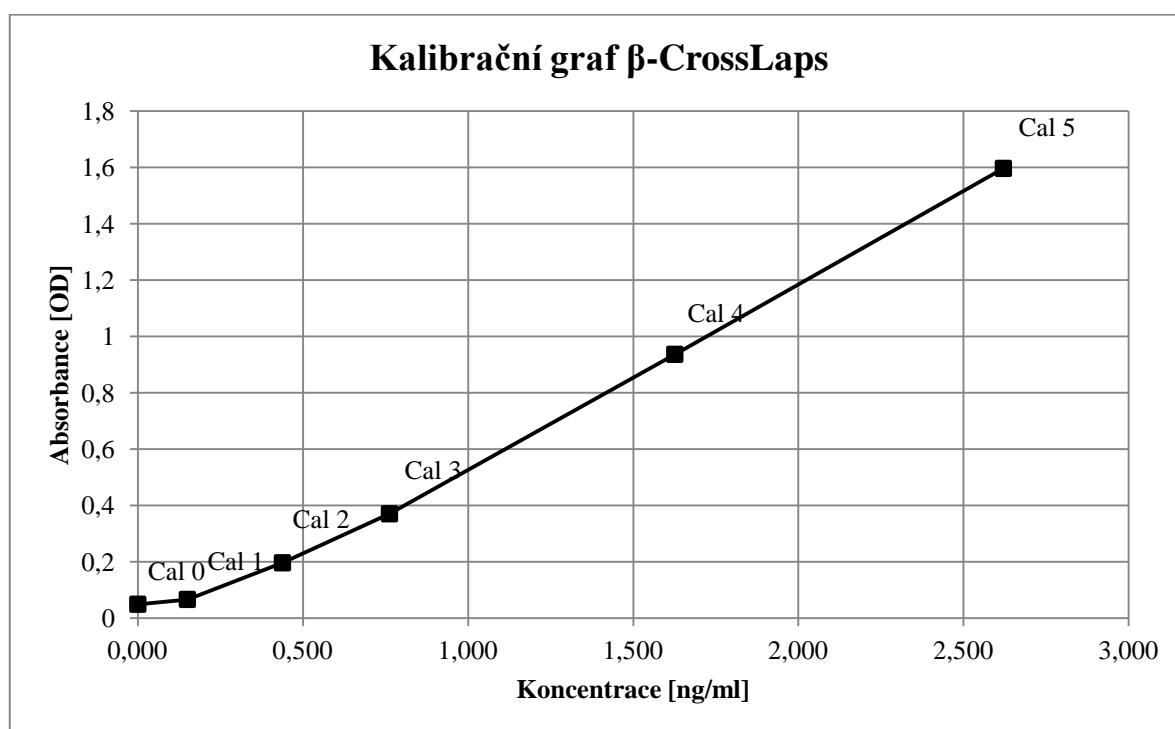
Před samotnou analýzou vzorků sér od pacientů jsem musela vždy provést kontrolu přístroje. Využila jsem k tomu kalibrační roztoky a kontroly, které byly součástí testovací soupravy Serum CrossLaps® ELISA. Naměřené hodnoty kontrolních roztoků musí odpovídat požadovaným hodnotám uvedených v Certifikátu kontroly kvality. Pokud by tomu tak nebylo, následné měření by nemohlo být validní a ani objektivní. Správnost mého měření dokládám kalibračními křivkami a tabulkami s naměřenými hodnotami absorbancí a koncentrací.

V tabulkách 2 a 3 představuji postupně hodnoty Standardu 0 (tzv. BLANK), jehož koncentrace musí být 0,000 ng/ml, dále ostatní Standardy (Cal 1 – 5) s přesně definovanými koncentracemi. U všech Standardů byla naměřena i jejich absorbance. V tabulkách dále uvádím naměřené hodnoty dvou kontrol.

Kalibrační grafy ukazují vztah mezi koncentracemi jednotlivých kalibračních roztoků v ng/ml a jejich absorbancemi.

Tabulka 2: Naměřené hodnoty kalibrátorů a kontrol na přístroji NexGen Four metodou ELISA při 1. analýze vzorků

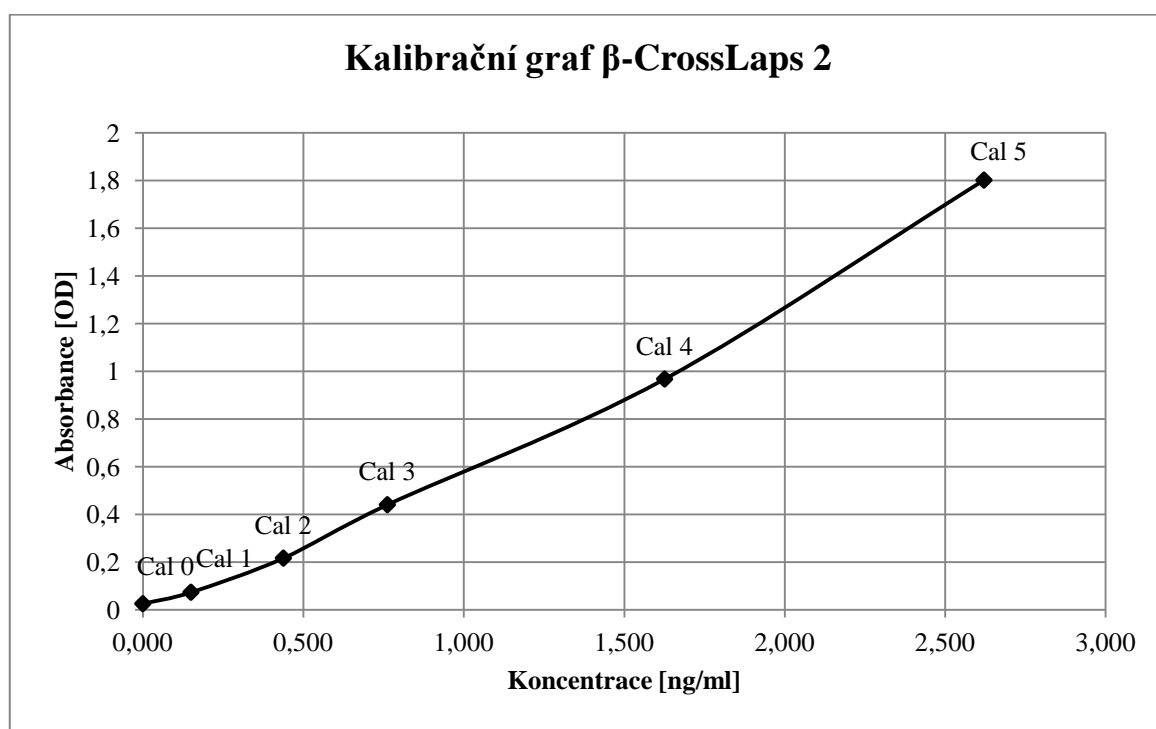
Kontrola	Typ kontroly	Absorbance [OD]	Koncentrace CrossLaps [ng/ml]
Cal 0	STANDARD - BLANK	0,049	0,000
Cal 1	STANDARD	0,066	0,150
Cal 2	STANDARD	0,196	0,438
Cal 3	STANDARD	0,370	0,762
Cal 4	STANDARD	0,936	1,626
Cal 5	STANDARD	1,596	2,621
CTRL 1	CONTROL	0,124	0,278
CTRL 2	CONTROL	0,524	0,997



Graf 3: Kalibrační graf znázorňující vztah koncentrace β -CrossLaps [ng/ml] na absorbanci kalibračních roztoků

Tabulka 3: Naměřené hodnoty kalibrátorů a kontrol na přístroji NexGen Four metodou ELISA při 2. analýze vzorků

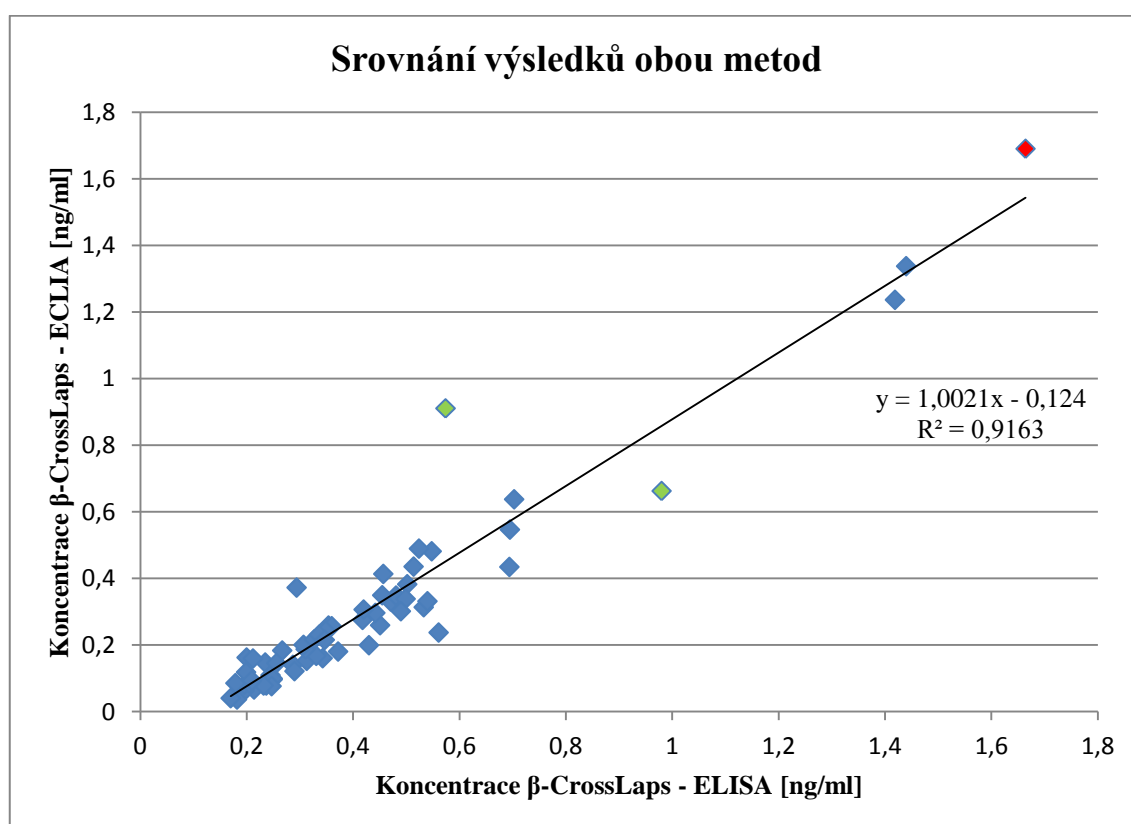
Kontrola	Typ kontroly	Absorbance [OD]	Koncentrace CrossLaps [ng/ml]
Cal 0	STANDARD - BLANK	0,025	0,000
Cal 1	STANDARD	0,073	0,150
Cal 2	STANDARD	0,216	0,438
Cal 3	STANDARD	0,440	0,762
Cal 4	STANDARD	0,967	1,626
Cal 5	STANDARD	1,801	2,621
CTRL 1	CONTROL	0,143	0,291
CTRL 2	CONTROL	0,575	0,983



Graf 4: Kalibrační graf znázorňující vztah koncentrace β -CrossLaps [ng/ml] na absorbanci kalibračních roztoků

4.1 Lineární regrese

Naměřené hodnoty jsem podrobila regresní analýze. Nejdříve jsem zvolila lineární regresi, která je zobrazená v grafu 4. Tímto způsobem jsem porovnála výsledky obou metod. Na ose x jsou naneseny koncentrace β -CrossLaps získané metodou ELISA a na ose y koncentrace vyhodnocené metodou ECLIA.



Graf 5: Srovnání výsledných koncentrací β -CrossLaps dosažených oběma metodami pomocí lineární regrese

4.2 Grubbsův test

Naměřené koncentrace β -CrossLaps v sérech pacientů jsem dále vyhodnocovala pomocí Grubbsova testu. Díky němu jsem zjistila odlehlé hodnoty, které se nehodily mezi ostatní a byly z vyšetřovaného souboru vyloučeny.

Nejdříve jsem si vypočítala aritmetický průměr a směrodatnou odchylku z výsledků koncentrací každé metody. Poté jsem si získané hodnoty dosadila do vzorce:

$$T_n = \frac{x_n - \bar{x}}{s}$$

Vypočítané hodnoty T jsem porovnávala s kritickými hodnotami pro Grubbsův test. Pokud byla výsledná hodnota T vyšší než ta kritická, byla označena jako odlehlá. Grubbsovým testem jsem vyloučila stejné hodnoty jako lineární regresí.

Tabulka 4: Výsledky Grubbsova testu

	ELISA	ECLIA
Počet vzorků	66	66
Nejmenší koncentrace CrossLaps [ng/ml]	0,026	< 0,033 (OMR)
Největší koncentrace CrossLaps [ng/ml]	1,664	1,690
Průměr všech koncentrací [ng/ml]	0,408	0,305
Medián [ng/ml]	0,339	0,222
Směrodatná odchylka	0,292	0,304

4.3 Passing-Bablokova regrese:

Ze statistické analýzy jsem celkově vyloučila 7 vzorků (označených červeně v tabulce 1): 4 vzorky, u nichž nebyla naměřena přesná hodnota a byly označeny jako OMR⁻ (tzn. s hodnotou nižší než dolní mez měření, pod 0,033 ng/ml), další vzorky byly vyloučeny lineární regresí a Grubbsovým testem kvůli svým odlehlým hodnotám.

Ze zbylých hodnot 59 vzorků jsem provedla Passing-Bablokovu regresi, která je označována jako neparametrická a její výsledky jsou odolné vůči odlehlým hodnotám (35).

Tabulka 5: Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese

	ELISA	ECLIA
Počet vzorků	59	59
Nejnižší koncentrace [ng/ml]	0,170	0,037
Nejvyšší koncentrace [ng/ml]	1,440	1,338
Aritmetický průměr	0,395	0,265
Median	0,341	0,216
Standardní odchylka	0,239	0,236
Standardní chyba průměru	0,031	0,031

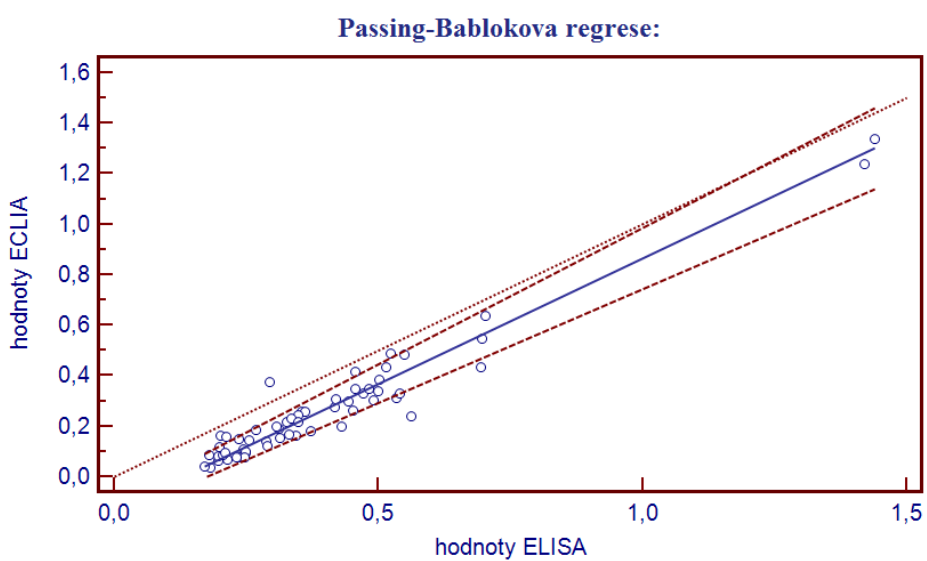
Tabulka 6: Výsledky Passing-Bablokovy regrese

Rovnice Passing-Bablokovy regrese	$y = - 0,1288 + 0,9936 x$
Úsek A	- 0,1288
95% interval spolehlivosti (CI)	(- 0,1582 až - 0,0944)
Směrnice B	0,9936
95% interval spolehlivosti (CI)	(0,9000 až 1,0784)
Korelační koeficient	0,97

Byly dány hypotézy:

- $a = 0$,
- $b = 1$,

Z toho vyplývá, že úsek A musí obsahovat 0 a směrnice B zase 1. V případě směrnice na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ se vyloučila proporciální chyba měření. Naopak 95% interval spolehlivosti u úseku A nezahrnuje 0, což poukazuje na konstantní chybu měření.



Graf 6: Passing-Bablokova regrese

5 Diskuze

V mé bakalářské práci jsem se zabývala stanovením markeru kostní resorpce, β -CrossLaps, který souvisí s onemocněním nazývaným osteoporóza. Dle Společnosti pro metabolická onemocnění skeletu je osteoporóza generalizovaným systémovým onemocněním kostí s velmi vysokým výskytem v populaci (1).

Osteoporóza představuje problém hlavně v průmyslově vyspělých zemích, kde podle Žofkové postihuje cca 7 až 8 % populace. (4) K tomuto názoru se přiklání i Palička, který uvádí, že v České republice trpí osteoporózou přibližně tři čtvrtě miliónu obyvatel (5). Podle SMOS postihuje cca 15 % mužů a 33 % žen nad 50 let a dokonce 39 % mužů a 47 % žen ve věku na 70 let (1).

Do mého výzkumu bylo náhodně vybráno 66 sér od pacientů s osteoporózou. Největší zastoupení měly vzorky od žen – celkem 62. Pouze 4 vzorky byly odebrány od mužů. V grafu 1 uvádím celkové počty vzorků rozdělených dle věkových kategorií pacientů. Vytvořila jsem 6 skupin – ženy pod 50 let, ženy nad 50 let, ženy nad 70 let, dále muže pod 50 let, muže nad 50 let a muže nad 70 let. Z grafu je také vidět, že 59 sér pocházelo od žen po menopauze. Přestože můj analyzovaný soubor pacientů představuje jen malý zlomek lidí, kteří mají osteoporózu diagnostikovanou, můžu souhlasit s Paličkou, který uvádí, že touto nemocí jsou nejvíce ohroženy ženy po klimakteriu, ale nevyhýbá se ani mužům nebo dětem. I v mém vyšetřovaném souboru byly mladší ročníky – muž narozený v roce 1980 a žena v roce 1984.

Osteoporózu lze diagnostikovat několika způsoby. Podle Paličky je důležité znát pacientovu rodinnou anamnézu, jaké má klinické příznaky a dále ho vyšetřit pomocí nějaké zobrazovací metody a udělat mu potřebná biochemická vyšetření (5). Právě na biochemické laboratorní testy jsem zaměřila svůj výzkum.

Zjišťovala jsem koncentrace β -CrossLaps v sérech pacientů dvěma metodami – ELISA a ECLIA. Jsou to imunoanalytické metody, každá je ale založená na jiném principu. ELISA využívá k detekci analytu enzym, ECLIA naopak chemiluminiscenci. Detekční limit soupravy Serum CrossLaps[®] ELISA je 0,020 ng/ml CrossLaps. Souprava je lineární v rozsahu koncentrací 0,020 až 3,380 ng/ml CrossLaps. Limit detekce

u IDS-iSYS CTX-I je 0,023 ng/ml CrossLaps a limit kvantifikace je 0,033 ng/ml. Souprava je lineární od 0,033 do 6,000 ng/ml.

Metody jsem prováděla na dvou různých automatických analyzátořech – NexGen Four od společnosti TestLine a IDS-iSYS od firmy IDS. K analýze byla náhodně vybrána séra pacientů, kteří se léčí s osteoporózou. Celkově jsem zanalyzovala 66 sér.

Horák upozorňuje, že stanovením koncentrace kostních markerů můžeme předurčit vývoj onemocnění a jeho prognózu a dále pomocí něho můžeme monitorovat účinnost léčby. Samotným laboratorním vyšetřením ale nelze osteoporózu diagnostikovat (15).

Před začátkem jakékoli práce na analyzátoru se musí každé ráno provést kontrola a kalibrace přístroje. K tomu jsem využila kalibrační standardy a kontroly obsažené v soupravě pro následnou analýzu CrossLaps. To, že výsledky mého měření byly validní, dokazují kalibračními grafy (graf 3 a 4) společně s tabulkami (tabulka 2 a 3) s výsledky analyzovaných kalibračních roztoků.

Z výsledných koncentrací jsem dále sestrojila spojnicový graf (graf 2), kde na ose x jsou znázorněny jednotlivé vzorky pacientů a na ose y jejich koncentrace naměřené oběma metodami. Z grafu lze vyčíst, že koncentrace získané metodou ECLIA byly až na 3 výjimky o něco nižší než metodou ELISA. U 2 hodnot nebyl výrazný rozdíl, ale 1 koncentrace se výrazně lišila a zřejmě byla způsobená nějakou chybou v měření (např. bublina ve zkumavce).

Potom jsem získané výsledky podrobila regresní analýze. Nejdříve jsem je porovnávala lineární regresí (graf 5). Na ose x jsou naneseny hodnoty koncentrací dosažené metodou ELISA a na ose y metodou ECLIA. Touto analýzou jsem vyloučila hodnoty, které nezapadaly mezi ostatní.

Následoval Grubbsův test. Pomocí něj jsem identifikovala odlehlé hodnoty, které byly ze sledovaného souboru vyloučeny. Dále jsem vyčlenila hodnoty, u kterých nebyly naměřeny přesné koncentrace. Tyto hodnoty byly označeny v programu jako OMR, tzn., že jejich koncentrace byly nižší než 0,033 ng/ml.

Vhodným způsobem, jak porovnat 2 metody, bylo použití Passing-Bablokovy regrese. Do ní jsem zahrnula zbylých 59 vzorků, které zůstaly po vyřazení všech nevhodných hodnot.

Výsledkem byla rovnice Passing-Bablokovy regrese: $y = -0,1288 + 0,9936 x$. 95% interval spolehlivosti (CI) pro směrnici B vyšel 0,9000 až 1,0784 a pro úsek A -0,1582 až -0,944. Korelační koeficient byl roven 0,97. Těmito výsledky jsem potvrdila hypotézu, že 95% CI směrnice B zahrnuje 1. Ale naopak jsem zavrhl hypotézu u 95% CI úseku A, který nezahrnoval 0. Vyloučila jsem tak proporcionální chybu měření, ale potvrdila chybu konstantní (systematickou).

Své výsledky jsem konfrontovala s výzkumem společnosti IDS, která porovnála tyto dva testy (IDS-iSYS CTX-I a Serum CrossLaps[®] ELISA). Využila k tomu 322 vzorků, které zanalyzovala každou metodou. Výsledná Passing-Bablokova regrese měla tvar: $y = -0,019 + 0,987 x$. 95% CI směrnice B bylo od 0,954 do 1,025 a pro úsek A od -0,031 do -0,004. Korelační koeficient byl roven 0,96 (32). Výsledky této studie jsou podobné s těmi mými. Také se vyloučila proporcionální chyba měření a potvrdila chyba konstantní.

Systematická chyba měření může být důsledkem práce na dvou odlišných přístrojích, kdy každý pracuje na jiném principu nebo je odlišně nakalibrován. Každá metoda je také jinak citlivá a je lineární v odlišném rozmezí koncentrací.

Výhodou měření metodou ECLIA na automatickém analyzátoru IDS-iSYS byla doba analýzy. Měření všech vzorků trvalo zhruba okolo 1 hodiny. Oproti tomu měření metodou ECLIA trvalo nejméně 2,5 hodiny. Dále je přístroj IDS-iSYS specialistou na laboratorní vyšetření metabolismu vápníku a kostního metabolismu od stanovení vitamínu D, parathormonu až po CrossLaps, osteokalcin či bALP. Myslím si, že je výhodnější stanovit všechny potřebné hodnoty ohledně kostního metabolismu na jednom přístroji než analyzovat každý marker na jiném analyzátoru.

6 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo stanovit koncentrace markeru kostní resorpce, β -CrossLaps, pomocí dvou metod ELISA a ECLIA ve stejných sérech od pacientů s diagnostikovanou osteoporózou a výsledky statisticky zpracovat. Takto jsem zanalyzovala 66 sér.

Spolu s naměřenými koncentracemi jsem si zjistila i pohlaví a roky narození vyšetřovaných pacientů. Složení lidí v mém analyzovaném souboru odpovídá statistickým údajům o výskytu osteoporózy. Tato nemoc se častěji objevuje u žen, ale není výjimkou ani u mužů. Nejvíce jsou ale ohroženy ženy po menopauze, které mají sníženou produkci estrogenů, jež působí na kosti ochranným účinkem.

Výsledné koncentrace β -CrossLaps v sérech pacientů zjištěné metodami ELISA a ECLIA na dvou různých přístrojích – NexGen Four a IDS-iSYS jsem následně statisticky zpracovala. Nejdříve jsem použila lineární regresi a Grubbsův test pro určení odlehklých hodnot a následně Passing-Bablokovu regresi pro porovnání metod. Výsledky u metody ECLIA byly až na 3 výjimky o něco nižší než u metody ELISA. Korelační koeficient $R = 0,97$ vykazuje velmi dobrou lineární závislost mezi oběma metodami. Díky Passing-Bablokově regresi se potvrdila systematická chyba měření, ale zavrhla se chyba proporcionální.

Rozdíl ve výsledných koncentracích mohl být způsoben analýzou na různých přístrojích založených na rozdílných principech, dále jejich citlivostí či odlišným nakalibrováním.

Praxí v laboratoři se ukázalo, že vyhodnocení koncentrací β -CrossLaps od stejných pacientů na dvou různých přístrojích může vykazovat částečně odlišné hodnoty. Nelze však přesně určit, která hodnota odpovídá skutečné koncentraci v séru. A tak je nutné výsledky sdělovat s určitou nejistotou.

Myslím si, že pro pacienty s osteoporózou a dalšími kostními onemocněními by bylo lepší provádět potřebná vyšetření na přístroji IDS-iSYS využívající k detekci analytu chemiluminiscenci. Tento analyzátor dokáže provádět všechna nezbytná vyšetření ohledně kostního metabolismu, od stanovení hladin vitamínu D,

parathormonu, osteokalcinu, kostní alkalické fosfatázy až po CrossLaps. Pokud by všechna tato vyšetření byla provedena na jednom přístroji, tyto výsledky by byly objektivnější. Navíc doba stanovení β -CrossLaps u automatického analyzátoru IDS-iSYS je výrazně kratší než u přístroje Nexgen Four. Souprava IDS-iSYS CTX-I je lineární ve větším rozmezí koncentrací – od 0,033 ng/ml do 6000 ng/ml.

V laboratoři STAFILA, spol. s r. o., kde jsem realizovala svůj výzkum, se dříve prováděla vyšetření β -CrossLaps na přístroji Nexgen Four, ale v současné době se přešlo na nově zakoupený přístroj IDS-iSYS od společnosti IDS. STAFILA vlastní tento analyzátor jako jediná laboratoř v České republice. Myslím si, že výsledky mé práce by mohly být zajímavé nejen pro laboratoř STAFILA, ale i pro další laboratoře a lékaře specializující se na kostní onemocnění, kteří by uvažovali o zakoupení tohoto přístroje.

7 Seznam informačních zdrojů

- (1) ROSA, J., M. BAYER, J. JENÍČEK, I. KUČEROVÁ, V. PALIČKA a Š. KUTÍLEK. Minimum o osteoporóze. In: SMOS [online]. 2007 [cit. 2014-01-04]. Dostupné z: <http://smos.cz/osteoporozaz.asp>
- (2) BLAHOŠ, Jaroslav. *Osteoporóza. Diagnostika a terapie v praxi*. Praha: Galén, 1995. ISBN 80-85824-26-4
- (3) MeDitorial. Co je osteoporóza. In: Osteoporóza [online]. ©2013 [cit. 2014-03-18]. Dostupné z: <http://www.osteoporozaz.cz/osteoporozaz>
- (4) ŽOFKOVÁ, Ivana. *Osteologie a kalcium-fosfátový metabolismus*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3919-9
- (5) PALIČKA, V. et al. *Osteoporóza. Choroba, která se může týkat nás všech*. Praha: Liga proti osteoporóze, 2003. ISBN 80-239-0844-8
- (6) CUMMINGS, S. R., M. C. NEVITT, W. S. BROWNER, K. STONE, K. M. FOX, K. E. ENSRUD, J. CAULEY, D. BLACK and T. M. VOGT. Risk Factors for Hip Fracture in White Women. *N Engl J Med* [online]. 1995, 332: 767-774 [cit. 2014-02-22]. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199503233321202>
- (7) OTT, S. Epidemiological risk factors. In: Osteoporosis and Bone Physiology [online]. ©1998-2014, updated 1. 6. 2011 [cit. 2014-02-09]. Dostupné z: <http://courses.washington.edu/bonephys/oprisk.html#epifactors>

- (8) CAULEY, J. A., L. Y. LUI, K. E. ENSRUD, J.M. ZMUDA, K. L. STONE, M. C. HOCHBERG, S. R. CUMMINGS. Bone Mineral Density and the Risk of Incident Nonspinal Fractures in Black and White Women. *JAMA* [online]. 2005, 293(17): 2102-2108 [cit. 2014-02-09]. Dostupné z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=200820>
- (9) REID, I. R., R.W. AMES, M. C. EVANS, G. D. GAMBLE and S. J. SHARPE. Effect of Calcium Supplementation on Bone Loss in Postmenopausal Women. *N Engl J Med* [online]. 1993, 328: 460-464 [cit. 2014-02-11]. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199302183280702>
- (10) WEISMAN, S. M. and V. MATKOVIC. Potential use of biochemical markers of bone turnover for assessing the effect of calcium supplementation and predicting fracture risk. *Clinical Therapeutics* [online]. 2005, 27(3): 299-308 [cit. 2014-02-11]. Dostupné z: [http://www.clinicaltherapeutics.com/article/S0149-2918\(05\)00046-9/abstract](http://www.clinicaltherapeutics.com/article/S0149-2918(05)00046-9/abstract)
- (11) SALAMONE, L. M., J. A. CAULEY, D. M. BLACK, L. SIMKIN-SILVERMAN, W. LANG, E. GREGG, L. PALERMO, R. S. EPSTEIN, L. H. KULLER and R. WING. Effect of a lifestyle intervention on bone mineral density in premenopausal women: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* [online]. 1999, 70(1): 97-103 [cit. 2014-02-11]. Dostupné z: <http://ajcn.nutrition.org/content/70/1/97.long>

- (12) De LAET, C., J. A. KANIS, A. ODÉN, H. JOHANSON, O. JOHNNELL, P. DELMAS, J. A. EISMAN, H. KROGER, S. FUJIWARA, P. GARNERO, E. V. McCLOSKEY, D. MELLSTRON, L. J. MELTON, P. J. MEUNIER, H. A. POLS, J. REEVE, A. SILMAN and A. TENENHOUSE. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporosis Int* [online]. 2005, 16(11): 1130-1138 [cit. 2014-02-11]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15928804?dopt=abstract>
- (13) OTT, S. Clinical features of osteoporosis. In: *Osteoporosis and Bone Physiology* [online]. ©1998-2014, updated 1. 6. 2011 [cit. 2014-02-23]. Dostupné z: <http://courses.washington.edu/bonephys/opclin.html>
- (14) MeDitorial. Příznaky osteoporózy. In: *Osteoporóza* [online]. ©2013 [cit. 2014-02-23]. Dostupné z: <http://www.osteoporozaz.cz/priznaky-osteoporozy>
- (15) HORÁK, P. a T. PÍKA. Současné možnosti diagnostiky a léčby osteoporózy. *Vnitř lék* [online]. 2006, 52(7&8):749-755 [cit. 2014-03-04]. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=v1_06_07_14.pdf
- (16) MeDitorial. Léčba osteoporózy. In: *Osteoporóza* [online]. ©2013 [cit. 2014-03-07]. Dostupné z: <http://www.osteoporozaz.cz/lecba>
- (17) ROSA, J., M. BAYER, J. JENÍČEK, I. KUČEROVÁ, V. PALIČKA a Š. KUTÍLEK. Doporučené postupy pro diagnostiku a terapii postmenopauzální osteoporózy II. Část první. *Osteologický bulletin, SMOS ČSL JEP* [online]. Březen 2007, 12(1): 24-33 [cit. 2014-03-07]. Dostupné z: http://smos.cz/docs/dp_smos1.pdf

- (18) RACEK, J. et al. *Klinická biochemie*. 2. přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9
- (19) ROSA, J., M. BAYER, J. JENÍČEK, I. KUČEROVÁ, V. PALIČKA a Š. KUTÍLEK. Doporučené postupy pro diagnostiku a terapii postmenopauzální osteoporózy II. Část druhá. *Osteologický bulletin, SMOS ČSL JEP* [online]. Březen 2007, 12(2): 74-81 [cit. 2014-03-07]. Dostupné z: http://smos.cz/docs/dp_smos2.pdf
- (20) OTT, S. Estrogen. In: *Osteoporosis and Bone Physiology*. [online]. ©1998-2014, updated 23. 11. 2012 [cit. 2014-03-07]. Dostupné z: <http://courses.washington.edu/bonephys/opestrogen.html>
- (21) WELLS, G., P. TUQWELL, B. SHEA, G. GUYATT, J. PETERSON, N. ZYTURUK, V. ROBINSON, D. HENRY, D. O'CONNELL, A. CRANNEY. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. V. Meta-analysis of the efficacy of hormone replacement therapy in treating and preventing osteoporosis in postmenopausal women. *Endocr Rev* [online]. 2002, 23(4): 529-539 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202468?dopt=abstract>
- (22) SHIERBECK, L. L., L. REJNMARK, CH. L. TOFTENG, L. STILGREN, P. EIKEN, L. MOSEKILDE, L. KØBER and J.-E. BECK JENSEN. Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular events in recently postmenopausal women: randomised trial. *BMJ* [online]. 2012, 345:e6409 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: <http://www.bmj.com/content/345/bmj.e6409>
- (23) OTT, S. Biochemical markers of bone cell activity. In: *Osteoporosis and Bone Physiology* [online]. ©1998-2014, updated 22. 3. 2012 [cit. 2014-03-08]. Dostupné z: <http://courses.washington.edu/bonephys/opmark.html>

- (24) GARNERO, P. The contribution of collagen crosslinks to bone strength. *Bonekey Rep* [online]. 2012, 1:182 [cit. 2014-03-08]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3868729/>
- (25) MORA, S., P. PITUKCHEEWANONT, F. R. KAUFMAN, J.C. NELSON and V. GILSANZ. Biochemical Markers of Bone Turnover and the Volume and the Density of Bone in Children at Different Stages of Sexual Development. *JBMR* [online]. 1999, 14(10): 1664-1671 [cit. 2014-03-08]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1359/jbmr.1999.14.10.1664/full>
- (26) QVIST, P., S. CHRISTQAU, B. J. PEDERSEN, A. SCHLEMMER, C. CHRISTIANSEN. Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTX): effects of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol and fasting. *BONE* [online]. 2002, 31(1): 57-61 [cit. 2014-03-08]. Dostupné z: [http://www.thebonejournal.com/article/S8756-3282\(02\)00791-3/abstract](http://www.thebonejournal.com/article/S8756-3282(02)00791-3/abstract)
- (27) NOVOTNÝ, I. a M. HRUŠKA. *Biologie člověka*. 3. rozšíř. a uprav. vyd. Praha: Fortuna, 2005. ISBN 80-7168-819-3
- (28) TestLine. NexGen Four: Plně automatizovaný ELISA analyzátor. In: TestLinecd [online]. ©2009-2014 [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: http://www.testlinecd.cz/file/1702/Letak_NexGen%20Four.pdf
- (29) Univerzita Palackého v Olomouci. Imunochemické metody [online]. 2009 [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/kbc/Imunochemicke_metody.pdf
- (30) IDS. *Serum CrossLaps[®] ELISA*. Návod na provedení testu. 2010

- (31) IDS. Uživatelská příručka k IDS-iSYS – Revize I. Francie, 2011
- (32) IDS. Fully automated CTX-I (CrossLaps[®]). Boldon (England), 2011
- (33) IDS. IDS-iSYS CTX-I (CrossLaps[®]): Instructions for use. Boldon (England), 2011
- (34) BARTOŠ, V., M. KARLÍKOVÁ, M. LUDVÍKOVÁ, M. PEŠTA, K. ŠAFARČÍK a J. VRZALOVÁ. *Imunoanalytické metody a jejich využití v biomedicínském výzkumu a klinické praxi* [online]. Listopad 2012. [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: <http://www.imunokurzy.cz/studijni-materialy-kategorie/monografie.html>
- (35) DOHNAL, L. Passing-Bablok a ti druzí. *Klinická biochemie – elektronický časopis* [online]. 2001, č. 1 [cit. 2014-04-06]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/casopis/cis1-01/passing.htm>
- (36) IDS. IDS-iSYS Specialty Immunoassay Menu. Boldon (England), ©2012

8 Klíčová slova

Osteoporóza

β -CrossLaps

ELISA

ECLIA

9 Přílohy

Příloha 1: Automatický analyzátor NexGen Four od firmy TestLine



Zdroj: vlastní foto

Příloha 2: Připravené reagenty ze soupravy Serum CrossLaps® ELISA



Zdroj: vlastní foto

Příloha 3: Automatický analyzátor IDS-iSYS od společnosti IDS



Zdroj: vlastní foto

Příloha 4: Vydímatelný stojánek se vzorky, součást přístroje IDS-iSYS



Zdroj: vlastní foto