



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Problematika biologických expozičních testů v klinické a toxikologické laboratoři

Vypracovala: Šárka Wolfová
Vedoucí práce: Ing. Václav Senft

České Budějovice 2017

Abstrakt

Cílem této práce je sestavit přehledné pojednání o využívání biologických expozičních testů (BET) v průběhu monitorování intoxikace různými toxickými látkami.

V teoretické části jsou vysvětleny výhody BET, je objasněna problematika volby biologického materiálu, správné doby odběru podle průběhu expozice a podle biologického poločasu dané noxy. Je vysvětlen pojem „nejvýše přípustný limit“ (NPL), s kterým se porovnávají výsledky BET. Je popsána toxicita těžkých kovů, organických rozpouštědel a pesticidů.

V praktické části je popsáno monitorování BET pomocí stanovení přímých a nepřímých ukazatelů expozice olova, při kterých je použita metodika atomové absorpční spektrofotometrie s elektrotermální atomizací, fotometrie ve viditelné i UV oblasti, tlakové mikrovlnné mineralizace a chromatografické techniky. Je zde popsáno několik případů skutečné intoxikace, ale i snaha o zkreslení výsledků s cílem dosáhnout přiznání nemoci z povolání v důsledku expozice olova. Díky monitorování celého spektra BET je tento záměr odhalen a objektivně posouzen.

Je poukázáno na relevantnost a aktuálnost BET, nejen v oblasti profesionálních, ale i neprofesionálních expozic a na vývojový trend postupného snižování NPL související s rozšiřováním znalostí o toxicitě monitorovaných nox.

Klíčová slova: biologické expoziční testy; olovo; intoxikace; biologický poločas.

Abstract

The aim of this work is to draw up a well-arranged paper on the use of biological exposure tests (BET) during the monitoring of intoxication by various toxic substances.

In the theoretical part the advantages of BET are explained, the issue of selection of biological material, the correct time of sampling according to the duration of the exposure and the biological half-life of the toxic substances are explained. The term "maximum allowable limit" (NPL) is explained to compare BET results. The toxicity of heavy metals, organic solvents and pesticides is described.

The practical part describes the BET monitoring by determining direct and indirect indicators of lead exposure using the method of atomic absorption spectrophotometry with electrothermal atomization, photometry in visible and UV area, pressure microwave mineralization and chromatographic techniques. Several cases of actual intoxication are described, as well as attempts to distort the results with the aim of achieving occupational disease due to exposure to lead. By monitoring the entire BET spectrum, this intention is revealed and objectively assessed.

The relevance and timeliness of BET is highlighted, not only in the field of professional as well as non-professional exposures, and the developmental trend of gradual reduction of NPLs related to the widening of knowledge about the toxicity of monitored toxic substances.

Key words: biological exposure tests; lead; intoxication; biological half-time.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci „Problematika biologických expozičních testů v klinické a toxikologické laboratoři“ 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 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 bakalářské 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 (datum)

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Děkuji Ing. Václavu Senftovi za odborné vedení, cenné rady a podněty při zpracování této bakalářské práce. Dále děkuji vedení Ústavu Klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice Plzeň za umožnění zpracování všech údajů potřebných pro tuto práci.

OBSAH :

1. ÚVOD.....	10
--------------	----

TEORETICKÁ ČÁST

2. BIOLOGICKÉ EXPOZIČNÍ TESTY (BET).....	11
--	----

2.1 Výhody a přínosy <i>BET</i>	11
---------------------------------------	----

2.1.1 Určení skutečného množství noxy proniklé do organismu.....	12
--	----

2.1.2 Zachycení interindividuálních rozdílů.....	13
--	----

2.1.3 Přímé ukazatele expozice.....	13
-------------------------------------	----

2.1.4 Nepřímé ukazatele expozice.....	13
---------------------------------------	----

2.2 <i>Biologické materiály používané v BET</i>	13
---	----

2.2.1 Krev, sérum, plazma.....	14
--------------------------------	----

2.2.2 Moč.....	14
----------------	----

2.2.3 Vlasy, nehty.....	14
-------------------------	----

2.3 <i>Vliv časového průběhu expozice na BET</i>	14
--	----

2.3.1 Volba doby odběru podle časového průběhu expozice.....	14
--	----

2.3.2 Biologické poločasy.....	15
--------------------------------	----

2.3.3 Doba odběru u nox s krátkým biologickým poločasem.....	16
--	----

2.3.4 Doba odběru u nox s dlouhým biologickým poločasem.....	16
--	----

2.4 <i>Postanalytické hodnocení výsledků BET</i>	17
--	----

2.4.1 Referenční hodnoty.....	18
-------------------------------	----

2.4.2 Nejvyšší přípustné limity.....	18
--------------------------------------	----

2.4.3 Trendy snižování nejvyšších přípustných limitů.....	19
---	----

2.5 <i>Nejčastěji monitorované noxy pomocí BET</i>	19
--	----

2.5.1 Těžké kovy.....	19
-----------------------	----

2.5.1.1 Olovo.....	20
--------------------	----

2.5.1.1.1 Toxicita olova.....	20
-------------------------------	----

2.5.1.1.2 Symptomy intoxikace olovem.....	23
---	----

2.5.1.1.3 Terapie při intoxikaci olovem.....	24
--	----

2.5.2 Organická rozpouštědla.....	24
2.5.2.1 Toluén.....	25
2.5.2.1.1 Toxicita toluenu.....	25
2.5.2.2 Styren.....	26
2.5.2.2.1 Toxicita styrenu.....	26
2.5.3 Pesticidy.....	27
2.5.3.1 Toxicita pesticidů.....	27
3. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	28
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	
4. STANOVENÍ EXPOZICE OLOVU.....	29
4.1. Stanovení přímých ukazatelů expozice.....	29
4.1.1 Výběr biologického materiálu.....	30
4.1.2 Metodika stanovení Pb v krvi a v moči metodou ETA AAS.....	30
4.1.2.1 Odběr a manipulace se vzorky.....	30
4.1.2.2 Princip stanovení.....	31
4.1.2.3 Přístroje a reagentie.....	32
4.1.2.4 Parametry a postup stanovení.....	33
4.1.2.5 Kalibrace a kontrola kvality.....	34
4.1.2.6 Interpretace výsledků.....	35
4.1.3 Metodika stanovení Pb ve vlasech a nehtech metodou ETA AAS.....	35
4.1.3.1 Odběr a manipulace se vzorky vlasů a nehtů.....	35
4.1.3.2 Princip úpravy pevných vzorků metodou tlakové mikrovlnné mineralizace.....	35
4.1.3.3 Čištění vlasů a nehtů před mineralizací.....	37
4.1.3.4 Přístroje a reagentie pro tlakovou mikrovlnnou mineralizaci.....	37
4.1.3.5 Postup tlakové mikrovlnné mineralizace.....	39
4.1.3.6 Vlastní stanovení ETA AAS viz bod 3.1.2.....	40
4.1.3.7 Interpretace výsledků.....	41
4.2 Stanovení nepřímých ukazatelů expozice.....	42
4.2.1 Metodika stanovení δ - aminolevulové kyseliny v moči.....	42

4.2.1.1 Odběr a manipulace se vzorky.....	42
4.2.1.2 Princip stanovení.....	43
4.2.1.3 Přístroje a reagentie.....	43
4.2.1.4 Parametry a postup stanovení.....	44
4.2.1.5 Kalibrace a kontrola kvality.....	45
4.2.1.6 Interpretace výsledků.....	46
4.2.2 Metodika stanovení koproporfyriinů III v moči.....	46
4.2.2.1 Odběr a manipulace se vzorky moče.....	46
4.2.2.2 Princip stanovení.....	46
4.2.2.3 Přístroje a reagentie.....	47
4.2.2.4 Parametry a postup stanovení.....	47
4.2.2.5 Interpretace výsledků.....	48
5. VÝSLEDKY.....	49
5.1 <i>Kazuistika rodiny exponované olovu z keramiky s olovnatou glazurou.....</i>	<i>49</i>
5.2 <i>Kazuistika restaurátora v klášteře Teplá.....</i>	<i>50</i>
5.3 <i>Otrava olovem u majitelů střelnic.....</i>	<i>51</i>
5.4 <i>Otrava olovem po požití broků.....</i>	<i>51</i>
5.5. <i>Kazuistika pacienta M.D.....</i>	<i>51</i>
6. DISKUZE.....	55
7. ZÁVĚR.....	57
8. SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ.....	58
9. PŘÍLOHY.....	61

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	atomová absorpční spektrofotometrie
ADH	alkoholdehydrogenáza
δ -ALA	δ - aminolevulová kyselina
ALDH	aldehyddehydrogenáza
BET	biologické expoziční testy
BM	biologické monitorování
CNS	centrální nervový systém
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
DMSA	dimerkaptojantarová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	etylendiaminotetraoctová kyselina
ETA AAS	atomová absorpční spektrofotometrie s elektrotermální atomizací
GIT	gastrointestinální trakt
MDR	Microwave Digestion Rotor
NMDA	N-metyl-D-aspartát
NPL	nejvýše přípustný limit
PBG	porfobilinogen
TNT	trinitrotoluen

1. ÚVOD

V průběhu života může být člověk vystaven účinku různých toxických látek. Zdrojem bývá potrava, znečištěná voda nebo ovzduší, ale také pracovní prostředí. Profesionální expozice chemickým látkám vzniká při výrobě nebo přepravě toxických látek a je nutné zabezpečit ochranu zdraví všech zúčastněných pracovníků (Becko, 1995). Velikost profesionální expozice a případná rizika se stanovují pomocí biologických expozičních testů (BET). Biologickým expozičním testem se rozumí stanovení koncentrace tox nebo expozicí ovlivněných fyziologických látek přímo ve vhodném biologickém materiálu odebraném u exponovaných osob a porovnání výsledků s nejvýše přípustnými limity (NPL).

Hladinou ukazatele škodlivosti je nejvýše přípustný limit, který odpovídá takové expozici toxické látky, při které ani opakovaně exponované osobě nezpůsobí poškození zdraví.

TEORETICKÁ ČÁST

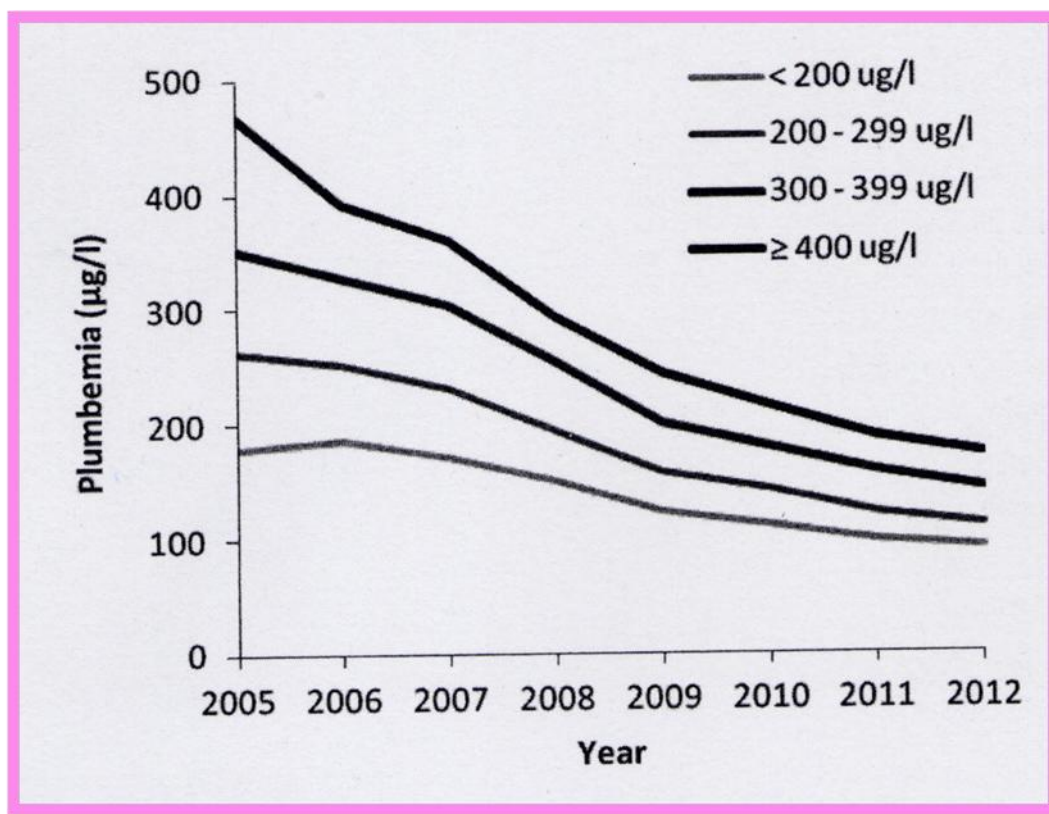
2. BIOLOGICKÉ EXPOZIČNÍ TESTY (BET)

Velikost expozice lze určit jednak analýzou prostředí, což je stanovení noxy například ve vodě, v ovzduší, v půdě nebo analýzou biologického materiálu, což je stanovení koncentrace škodlivé látky v biologickém materiálu odebraném u exponované osoby. Monitorování expozice analýzou prostředí je vhodné při sledování např. účinnosti odsávání noxy z pracovního prostoru, ale k prokázání skutečného dopadu škodlivé látky na organismus je relevantnější měření noxy přímo v biologickém materiálu, tzv. biologické monitorování (BM), respektive u látek s vyhlášeným nejvyšším přípustným limitem, tzv. biologické expoziční testy (BET), (Mráz, 2009).

2.1 Výhody a přínosy BET

BET stanovují koncentraci noxy přímo v biologických materiálech exponovaných osob. Poskytnou nám tímto skutečný obraz o tom, kolik toxické látky proniklo do organismu nebo jaké jsou následky expozice. Podchytí také rozdíly v množství vstřebané škodliviny v závislosti na různých parametrech jako je pracovní námaha, používání ochranných pracovních pomůcek, dodržování pracovních návyků.

BET jsou velmi důležitým pomocníkem v prevenci zdravotního rizika exponovaných pracovníků v nebezpečných provozech (Los, 2013), (viz. graf č. 1).



Graf č. 1: Vliv preventivních opatření na pokles profesionální expozice olovu (Los, 2013).

U monitorování BET je velmi důležitá preanalytika. Je nutné vhodně zvolit správnou dobu odběru a správný typ materiálu, s tím souvisí dobrá znalost metabolismu dané noxy a jejího biologického poločasu – např. Pb má biologický poločas 10 let, zatímco rozpouštědlo toluen jen několik hodin.

2.1.1 Určení skutečného množství noxy proniklé do organismu

Výsledek BET podchycuje skutečné množství škodlivé látky, které pronikne do organismu bez ohledu na cestu vstupu. Některé látky se vstřebávají pokožkou, některé mohou být vdechovány s prachem nebo požitý při nedodržování hygienických pravidel. BET dokáže odhalit expozice z nečekaných zdrojů nebo i záměrně skrývané.

2.1.2 Zachycení interindividuálních rozdílů

Výsledek BET nám umožňuje zachytit rozdíly v množství vstřebané noxy v závislosti na fyziologických parametrech každého jedince. Množství vstřebané noxy ovlivňuje fyziologie dýchání, pracovní námaha, používání ochranných pomůcek a dodržování hygienických návyků.

2.1.3 Přímé ukazatele expozice

Monitorování přímo škodlivé látky nebo jejího metabolitu v biologickém materiálu se označuje jako přímý ukazatel (biomarker) expozice, např. stanovení Pb v krvi, moči a ve vlasech nebo při expozici styrénu se stanovuje jeho hlavní metabolit kyselina mandlová, dále např. při expozici toluenu se stanovuje jeho hlavní metabolit kyselina hippurová.

2.1.4 Nepřímé ukazatele expozice

Monitorování fyziologicky se vyskytující látky, která byla v důsledku účinku noxy ovlivněná, označujeme jako nepřímý ukazatel (biomarker) expozice. Příkladem je zvýšená koncentrace δ -aminolevulové kyseliny v moči nebo koproporfyrinů III v moči v důsledku poškození syntézy hemoglobinu olovem. Dalším příkladem je pokles hladiny cholinesterázy po expozici organofosfátovým insekticidům.

2.2 Biologické materiály používané v BET

Rozhodující preanalytický faktor u BET je volba biologického materiálu. Typ odebraného biologického materiálu se volí podle časového průběhu expozice, podle biologického poločasu noxy, podle doby odběru vzorku a podle druhu stanovované noxy.

2.2.1 Krev, sérum, plazma

Krev, sérum, plazmu je nejvhodnější použít k odběru do několika hodin od expozice, protože v té době je noxa ještě v krevním řečišti a není dosud zmetabolizovaná.

2.2.2 Moč

Odběr moče se volí v době, kdy se noxa nebo většinou již její metabolity dostanou do moče. Bývá to několik hodin až dní od expozice, podle druhu noxy.

2.2.3 Vlasy, nehty

Odběr vlasů a nehtů je vhodný při monitorování expozice těžkým kovům, které mají dlouhý biologický poločas a kumulují se v těle, hlavně v kostech, vlasech a nehtech. Tyto biologické materiály je možno použít při realizaci BET např. po expozici olovu, rtuti nebo kadmiu.

Vlasy se mohou použít nejdříve po měsíci od expozice, kdy část „exponovaných vlasů“ dorostla do odstříhnutelné délky. Výhodou je možnost stanovení expozice i s několikaměsíčním až několikaletým odstupem, pokud se bere v úvahu, že 1 cm vlasů odpovídá 1 měsíci.

Nehty lze použít až po 4 měsících od expozice, kdy dorostou do odstříhnutelné délky.

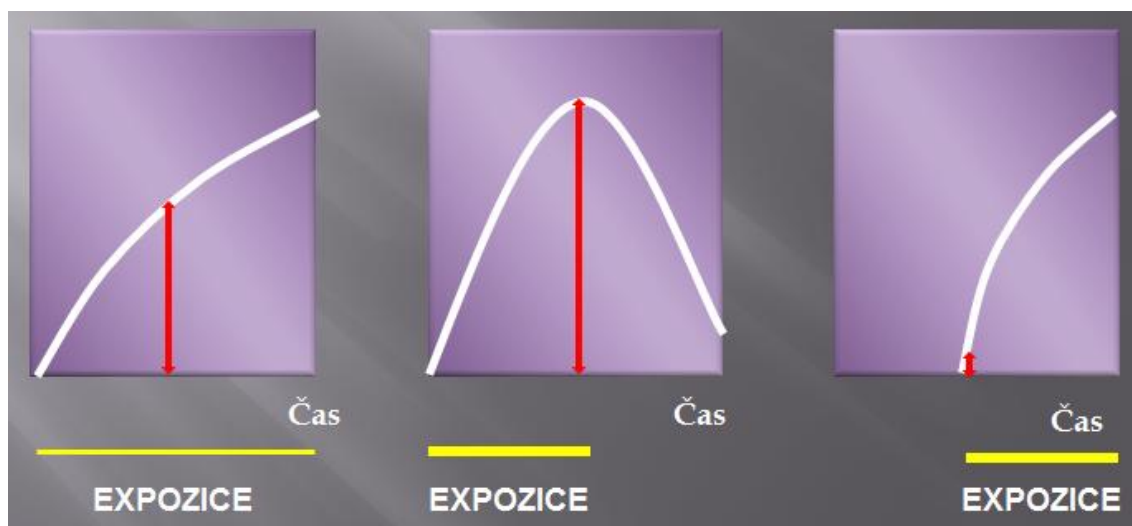
2.3 Vliv časového průběhu expozice na BET

Velmi důležitým faktorem preanalytické fáze je doba odběru. Rozhodující je přitom časový průběh expozice a biologický poločas stanovované noxy.

2.3.1 Volba doby odběru podle časového průběhu expozice

Naprosto zásadní podmínkou pro relevantní výsledek je dodržení správné doby odběru vzorku v závislosti na průběhu expozice, zejména u nox s krátkým biologickým

poločasem. Obrázek č. 1 znázorňuje rozdílné výsledky noxy s krátkým biologickým poločasem (např. toluen – 6 hod), získané při odběru vzorku ve stejnou dobu, ale s různým průběhem expozice.



Obr.č.1: Schematické znázornění závislosti koncentrace noxy s krátkým biologickým poločasem na době expozice a průběhu expozice (Senft, 2014)
žlutá úsečka – doba expozice
bílá úsečka – průběh expozice
červená úsečka – naměřená koncentrace noxy

2.3.2 Biologické poločasy

Biologický poločas látky se obecně označuje jako doba, za kterou se množství určité látky v organismu sníží na polovinu, a to jak vyloučením z organismu ledvinami, stolicí, plícemi a kůží, tak i přeměnou dané látky metabolismem. Spektrum biologických poločasů toxických látek je rozmanité, od několika hodin v případě rozpouštědel až po řadu let např. u kadmia (viz. tab. č. 1).

Tab. č. 1: Biologický poločas u různých nox

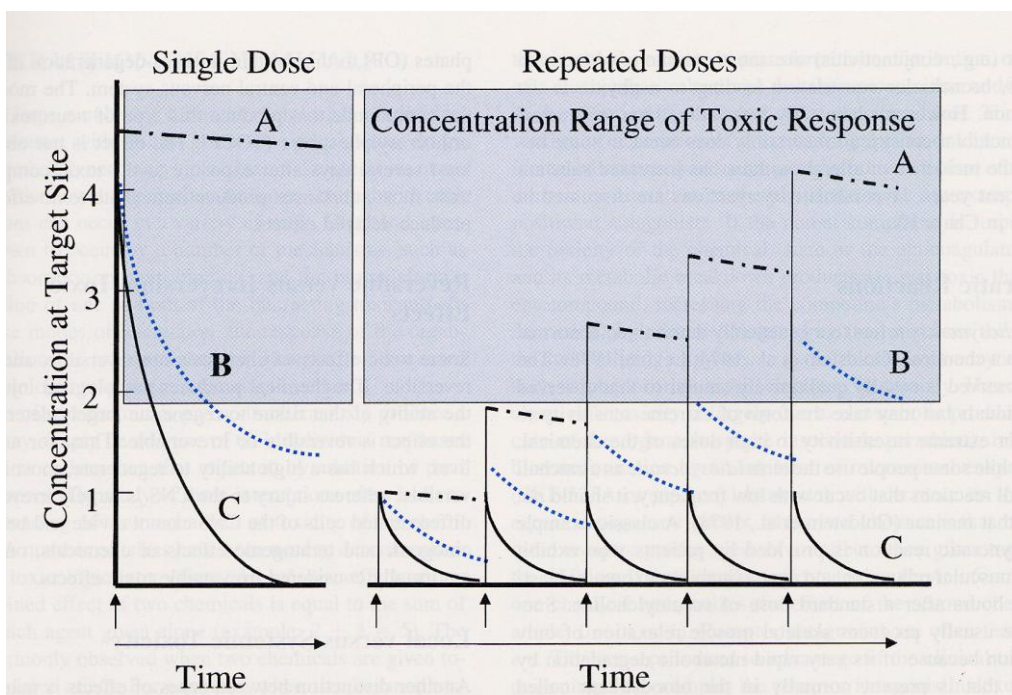
	<i>Noxa</i>	<i>Biologický poločas</i>
<i>Noxy s krátkým biologickým poločasem</i>	Toluen	6 hod
	Styren	8 hod
<i>Noxy se středním biologickým poločasem</i>	Trichloretylen	2 dny
	perchlorethylen	3 dny
<i>Noxy s dlouhým biologickým poločasem</i>	Hg	5 týdnů
	Pb	10 let
	Cd	20 let

2.3.3 Doba odběru u nox s krátkým biologickým poločasem

Doba odběru biologického materiálu u osob exponovaných noxou s krátkým biologickým poločasem se obvykle volí na konec pracovní směny, většinou ve čtvrtek při týdenním pracovním procesu, zásadní chybou by bylo odebrat vzorek v půlce pracovní směny nebo dokonce před začátkem pracovní směny (viz. obr. č. 1).

2.3.4 Doba odběru u nox s dlouhým biologickým poločasem

Toxické látky s dlouhým biologickým poločasem zůstávají v těle exponovaných jedinců dlouho a kumulují se. Při každé následující expozici ještě přetrvává noxa z expozice minulé a toxická látka se v organismu hromadí. Odběr lze provést kdykoliv (viz. obr. č. 2).



Obr. č. 2: Vývoj koncentrace nox s různě dlouhým biologickým poločasem při jednorázové dávce a při opakované expozici (Klaasen, 2010)

A (— · — · — ·) noxa s dlouhým biologickým poločasem.

B (··········) noxa se středně dlouhým biologickým poločasem.

C (————) noxa s krátkým biologickým poločasem.

V případě nox s dlouhým biologickým poločasem lze využít odběru vlasů a možnosti nahlédnutí do minulosti i několik měsíců až let zpátky, pokud jsou k dispozici dostatečně dlouhé vlasy.

2.4 Postanalytické hodnocení výsledků BET

Správné vyhodnocení výsledků BET závisí na porovnání výsledků stanovené noxy s nejvýše přípustným limitem, což není totožné s „referenčními hodnotami“ používanými v klinické biochemii.

2.4.1 Referenční hodnoty

Referenční interval zahrnuje hodnoty v hranicích průměr ± 2 směrodatné odchylky, což je 95% rozsahu v referenční zdravé populaci. Lze je určit buď neparametricky, pouhým seřazením výsledků získaných vyšetřením souboru zdravých jedinců podle velikosti naměřené hodnoty a odtržením 2,5% nejvyšších a nejnižších extrémů, nebo častěji parametricky, tj. spočítá se průměr ± 2 směrodatné odchylky. Hodnoty mírně mimo toto referenční rozmezí není vhodné označovat za patologické, ale za velmi vysoké nebo velmi nízké, protože tyto hodnoty se vyskytují ve zdravé výběrové referenční populaci s určitou předem definovanou pravděpodobností. Znamená to tedy, že u 5% zdravých jedinců najdeme výsledek, který je mimo referenční mez, což je známkou individuality jedinců vzatých do tohoto použitého souboru (Racek, 2006).

2.4.2 Nejvyšší přípustné limity

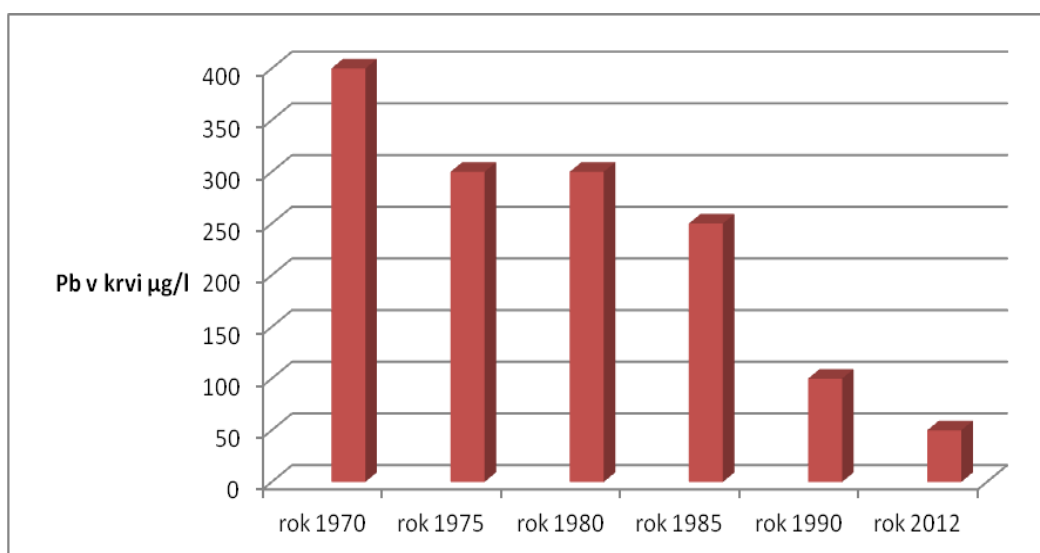
Zatímco referenční hodnoty zahrnují zdravou populaci, která nepříjde do styku s toxickými látkami, při vytváření nejvýše přípustného limitu jsou ve středu zájmu osoby exponované nebezpečnými chemickými látkami. Nejvýše přípustný limit odpovídá takové úrovni expozice, o níž se předpokládá, že ani při dlouhodobé opakované expozici nepoškodí zdraví exponovaných osob (Bardoděj, 1980).

Do určení nejvýše přípustného limitu se může promítnout celá řada faktorů, např. otázky ekonomické – pokud se stanoví příliš nízký přípustný limit – zvýší se náklady na provoz nutností zdokonalit technologii, zatímco při příliš vysokém přípustném limitu dojde k poškození zdraví zaměstnanců a zaměstnavatel jim bude nucen vyplácet odškodnění. Mohou se promítnout i otázky politické – jak která firma dbá na zdraví svých pracovníků.

Zásadně důležitá při určování nejvýše přípustných limitů je znalost toxicity monitorované noxy.

2.4.3 Trendy snižování nejvyšších přípustných limitů

Rozšiřováním znalostí o toxických vlastnostech nox dochází k postupnému snižování nejvyšše přípustných limitů. Např. koncentrace Pb v krvi u dětí se z původních 400 $\mu\text{g/l}$ snížila na současných 50 $\mu\text{g/l}$ (viz. graf. č. 2).



Graf. č. 2: Postupné snižování nejvyšše přípustných limitů pro Pb v krvi u dětí (Roper et al., 1991).

2.5 Nejčastěji monitorované noxy pomocí BET

Biologicky monitorovat lze velké množství nox v biologickém materiálu exponovaných osob, ale BET představují biologické monitorování spolu se srovnáním s nejvyšše přípustnými limity, které však nejsou stanoveny pro všechny noxy. Podle typu noxy lze rozdělit nejčastěji monitorované toxické látky zhruba do tří skupin – těžké kovy, organická rozpouštědla a „icidy“.

2.5.1 Těžké kovy

Jde o skupinu prvků správně definovanou jako *stopové chemické prvky určitých vlastností*. Mohou mezi nimi být zastoupeny jak kovy podle specifické hmotnosti opravdu "těžké" (rtuť, měď, olovo, kadmium), tak i kovy, které tak nazvat nelze

(beryllium, hliník, baryum), dále polokovy (arzen, selen, telur, thalium), nebo nekovy (bór, chlór, síra).

Obvykle těžkými kovy rozumíme kovy o hustotě vyšší než 5g/cm^3 , patří mezi ně např. železo, měď, zinek, chrom, nikl, kadmium, olovo a rtuť. Některé z nich jsou pro živé organismy nezbytné (železo, měď, zinek), ovšem při vyšších koncentracích jsou toxické, jiné jsou jedovaté při všech koncentracích (olovo, rtuť, kadmium), (Kadeřábková, 2011).

Za jeden z nejnebezpečnějších těžkých kovů je považováno olovo.

2.5.1.1 Olovo

Olovo lidstvo využívá již od starověku, protože jeho rudy jsou poměrně snadno dostupné. Nejběžnější olověnou rudou je galenit (sulfid olovnatý PbS).

Olovo se dnes používá nejvíce v průmyslu, k výrobě elektrických akumulátorů, při výrobě střeliva, v hutích, při pájení, slouží jako ochrana před radiací na rentgenologických pracovištích, využívalo se při výrobě vodovodních rozvodů.

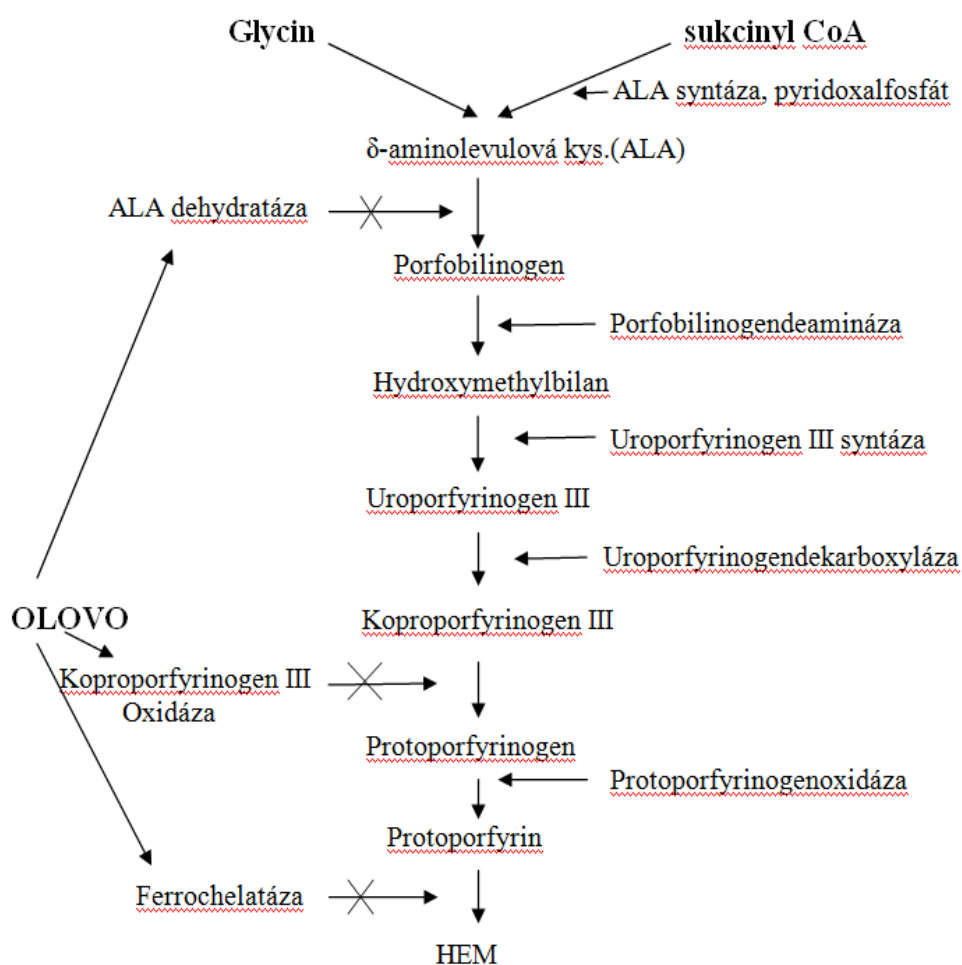
Z nejvýznamnějších sloučenin olova se uvádí oxid olovnatý PbO , který se využívá při výrobě broušeného skla, oxid olovnato - olovičitý (suřík) Pb_3O_4 se využívá jako účinná složka antikoročních nátěrů, oxid olovičitý PbO_2 se využívá při výrobě zápalek pro jeho oxidační vlastnosti, uhličitán olovnatý PbCO_3 se používá k výrobě malířské běloby, přidáním tetraetylolova $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ do benzínu se zvyšovalo oktanové číslo.

V současné době již je zakázáno používat olovo v rozvodech pitné vody, při výrobě barev a při výrobě benzínu.

2.5.1.1.1 Toxicita olova

Olovo má schopnost nahradit jiné biogenní prvky (Ca, Fe, Zn) ve vazbě na funkční skupiny (-SH, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$), čímž snižuje, až úplně zamezuje funkci aktivních látek, zejména enzymů.

Nejvýznamnější je inhibice enzymů zapojených do syntézy hemu (ALA-dehydratáza, koproporfyriinogen III oxidáza a ferrochelatóza), což způsobuje hromadění meziproductů (kyseliny δ -aminolevulové v moči a koproporfyriinů III v moči), (viz. obr. č. 3), (Štrosová, 2012). Stanovení koncentrace těchto meziproductů v moči se využívá společně s koncentrací olova v moči a krvi k diagnostice otravy Pb.



Obr. č. 3: Syntéza hemu ovlivněná olovem – inhibice ALA dehydratázy, koproporfyriinogenu III oxidázy ferrochalatózy

Významné je také poškození dlouhodobé paměti způsobené inhibicí NMDA (N – metyl - D - aspartát) receptorů v mozku.

Vstřebávání olova do organismu závisí na celé řadě faktorů (fyzikálně chemické vlastnosti kovu a jeho sloučenin, fyziologický stav organismu, věk - u dětí je zvýšená absorpce, pohlaví, aj.). Absorpci také zvyšuje tuk v potravě, nedostatek vápníku, deficit železa nebo vitamínu D.

Olovo je kumulativní jed, což je toxická látka s dlouhým biologickým poločasem, která se z organismu vylučuje pomalu a při další expozici v organismu ještě přetrvává noxa z předešlé expozice a postupně tak dochází k hromadění – kumulaci jedu v organismu. Biologický poločas olova v krvi bývá okolo 20 až 40 dnů, ale ukládá se do kostí, odkud se uvolňuje velmi pomalu s biologickým poločasem 5 až 10 let (Bencko, 1995).

V určitých situacích (těhotenství, zlomeniny kostí, stres) může dojít k mobilizaci olova z kostí a recidivě otravy třeba dlouhou dobu po expozici.

Olovo se dostává do organismu nejčastěji cestou inhalační ve formě páry nebo prachu, kdy se vstřebává 40% z celkové dávky, ale také zažívacím traktem, kdy se vstřebává 8% požití dávky. U dětí se vstřebává plicemi až 7% z celkové dávky a zažívacím traktem 40% požití dávky. Olovo také prochází placentou a do mateřského mléka. V krvi je olovo vázáno na erytrocyty a vylučování probíhá hlavně močí (Holečková, 2015).

Distribuce *anorganického olova* probíhá nejdříve do měkkých tkání, jako jsou ledviny a játra, poté se ukládá do kostí.

Organické sloučeniny olova, jako je tetraetylolovo a tetrametylolovo, se distribuují do tukových tkání a poškozují CNS, snadno se také vstřebávají kůží, na rozdíl od anorganických sloučenin olova.

U dospělých je okolo 95% zátěže organismu olovem deponováno v kostech, zatímco u dětí je deponováno jen okolo 70% zátěže (Kenšová, 2014).

Toxicita olova je zvláště významná u dětí. Dlouhodobé vystavení dětského organismu i nízkým dávkám olova je příčinou zpomalení duševního vývoje a změn v chování (viz. obr. č. 4).

Děti		Dospělí
	1500	
Smrt		
	1000	Encefalopatie
Encefalopatie Nefropatie Kolika		
	500	Syntéza hemoglobinu ↓
Syntéza hemoglobinu ↓	400	Nefropatie
Metabolismus vitamínu D ↓	300	Systolický krevní tlak u mužů ↑
		Protoporfyrin v ery u mužů ↑
Nervová vodivost ↓	200	
Protoporfyrin v ery ↑		Protoporfyrin v ery u žen ↑
IQ ↓ Vývoj ↓ Růst ↓	100	

Obr. č. 4: Negativní efekty u dětí a dospělých v závislosti na koncentraci Pb v krvi ($\mu\text{g/l}$), (Senft, 2014)

2.5.1.1.2 *Symptomy intoxikace olovem*

Mezi symptomy akutní intoxikace olovem patří GIT efekty, akutní encefalopatie, akutní nefropatie, retardace růstu a behaviorální změny u dětí.

Chronická intoxikace olovem se projevuje neuropatií, reprodukčními poruchami, hypertenzí, anemií a Saturninskou dnou (zvýšení hladiny kyseliny močové v ledvinách).

Objevování spojitosti mezi výše uvedenými příznaky a toxicitou olova trvalo dlouho. Např. mezi léty 1890 až 1940 byly rozpoznány první akutní otravy u dětí, které natíraly most v Sydney v Austrálii olovnatými barvami, což vyvolalo u dětí akutní poruchy tvorby hemoglobinu. V letech 1940 až 1950 byly zaznamenány dlouhodobé poruchy paměti způsobené inhibicí NMDA a až po roce 1960 byly objeveny negativní dopady chronické expozice na IQ dětí.

Prohlubování znalosti toxicity olova vedlo k postupnému snižování doporučených nejvýše přípustných limitů ((Roper et al., 1991), což se týká i ostatních toxických látek.

2.5.1.1.3 Terapie při intoxikaci olovem

Základem terapie jsou chelátové injekce (infuze) EDTA (ethylendiaminotetraoctová kyselina) nebo DMSA (dimerkaptojantarová kyselina), které uvolní olovo z kostí vazbou na chelát, s následným vyloučením močí. Po této terapii se odebírá moč na stanovení olova pro kontrolu účinnosti léčby po každé aplikované dávce chelátu (Holečková, 2015).

2.5.2 Organická rozpouštědla

Organická rozpouštědla jsou vesměs těkavé lipofilní kapaliny různého chemického složení, se strukturami aromatickými, alicyklickými i alifatickými a s různými funkčními skupinami. Exponováno bývá velké množství lidí nejen profesionálně, ale i v domácnosti, vyskytuje se i zneužívání. Organická rozpouštědla rozpouštějí tuky, pryskyřice a vosky, používají se k ředění lepidel a barev, v chemických čistírnách a v tiskařství. S expozicí organickým rozpouštědlům se lidé setkávají ve výrobnách nábytku, v lakovnách, při nátěru kovů proti korozi, při výrobě lodí aj. K intoxikaci může dojít inhalační cestou, perorální cestou nebo kůží.

Většinu organických rozpouštědel dokáže lidské tělo metabolizovat, především oxidací.

Důležitou metabolickou drahou jsou enzymy alkoholdehydrogenáza (ADH) a aldehyddehydrogenáza (ALDH) – organismus jimi metabolizuje např. trichloretylen, toluen, etylenglykol a metylalkohol.

U intoxikace etylenglykolem není toxický samotný alkohol, ale jeho metabolický produkt kys. šťavelová, která poškozuje ledviny. Stejně tak u intoxikace metylalkoholem je toxický až jeho metabolit kys. mravenčí, která poškozuje zrakový nerv. Proto principem léčby obou naposledy zmíněných toxických alkoholů je inhibice ADH buď podáním *etanolu* nebo inhibitoru *fomepizol*, aby nevznikaly tyto toxické metabolity.

Mezi nejvíce toxická organická rozpouštědla patří např. benzen, chloroform, sirouhlík a tetrachlormetan, kdy smrtelná dávka představuje jen několik ml.

V rámci realizace BET se monitoruje expozice toluenu stanovením jeho metabolitu kys. hippurové v moči (Tomokuni, 1972), při expozici styrenu se stanovuje jeho metabolit kys. mandlová v moči, při expozici benzenu se stanovuje fenol v moči nebo při expozici trichloretylenu se stanovuje kys. trichloroctová spolu s trichloretanolem v moči.

Jednou z nejčastěji monitorovaných nox je toluen a styren.

2.5.2.1 Toluén

Toluén – chemicky methylbenzen je čirá, ve vodě nerozpustná kapalina. Používá se k ředění barev, laků, nitrocelulózných a silikonových nátěrových hmot, při výrobě trhaviny *trinitrotoluén* TNT.

2.5.2.1.1 Toxicita toluenu

Toluén dráždí oči a dýchací cesty, tlumí CNS a kardiovaskulární činnost, má narkotické účinky. Při působení menších koncentrací se projeví bolestmi hlavy, žaludeční nevolností a poruchou rovnováhy. Dlouhodobé užívání toluenu se projeví toxickou encefalopatií. Čichání toluenu patří mezi časté a závažné drogové závislosti.

V organismu se metabolizuje na kys. hippurovou, která se stanovuje v moči při monitorování BET. Biologický poločas toluenu je 6 hodin.

Toluén se vstřebává především plícemi. Vstřebávání par kůží je nepodstatné, značné je však vstřebávání kapalného toluenu. Z inhalovaného množství toluenu se

vstřebává průměrně 53 %. Z vstřebaného toluenu (plícemi i kůží) se na kyselinu hippurovou přemění asi 75 %.

Normální úroveň vylučování kyseliny hippurové v moči je do 5 mmol/l.

Nejvyšší přípustný limit při profesionální expozici je 14 mmol/l.

2.5.2.2 Styren

Styren – chemicky vinylbenzen je bezbarvá, těkavá kapalina se sladkým zápachem. (Jágr, 2009). Využívá se jako rozpouštědlo a jako výchozí surovina pro výrobu polystyrenu. Můžeme se s ním setkat při výrobě izolace, potrubí, sklolaminátu, pryže, automobilových součástí, koberců, při výrobě laminovaných a polystyrenových pryskyřic (Miller, 1994).

2.5.2.2.1 Toxicita styrenu

V ovzduší styren není stálý, v atmosféře je odbouráván fotochemickými reakcemi. Lidé jsou vystaveni působení styrenu zejména ve vnitřním prostředí, nejvyšším koncentracím jsou vystaveni zaměstnanci chemických provozů, při výrobě plastů polystyrenů. Do organismu se dostává zejména inhalací (Manini, 2004).

Styren má vliv na nervový systém, vyvolává bolesti hlavy, deprese, poruchy vidění až křeče. Nejzávažnějším biologickým efektem je genotoxicita, zvýšený počet chromozomových aberací, DNA zlomů a mutací na některých genech (Vodička, 2006).

Po vstupu do organismu se styren metabolizuje v játrech pomocí cytochromu 450 na styren-7,8 oxid, který podléhá dalším detoxikačním procesům. Hlavním metabolitem je kys. mandlová a kys. fenylglyoxylová, které jsou vylučované močí (Summer, 1994). V rámci monitorování expozice styrenu principem BET se stanovuje kys. mandlová v moči (Engstrom, 1976). Styren má ale krátký biologický poločas – 8 hod, proto se musí volit doba odběru moče bezprostředně v návaznosti na průběh expozice. V průběhu pracovního týdne se většinou odebírá vzorek moče na konci směny čtvrtek.

Kyselina mandlová se v moči neexponovaných osob nevyskytuje.

Nejvyšší přípustný limit kyseliny mandlové v moči u exponovaných osob je 2 mmol/l.

2.5.3 Pesticidy

Pesticidy se používají k hubení rostlinných a živočišných škůdců, k ochraně zvířat a člověka. Až 85% spotřebuje ročně zemědělství (Marková, 2016). Mezi nejznámější patří organofosfáty, organochlorované pesticidy, karbamáty nebo neonikotikoidy.

2.5.3.1 Toxicita pesticidů

Organofosfátové pesticidy jsou neurotoxické látky, vysoce toxické pro savce, inhibují enzym acetylcholinesterázu, který je nezbytný pro uvolnění acetylcholinu na zakončení motorických svalů a k dokončení svalové kontrakce. Zablokování acetylcholinesterázy vede ke svalovým křečím dechového svalstva a dochází ke smrti. Patří mezi ně tabun, sarin, soman – dnes již jsou zakázané.

Organochlorované pesticidy jsou lipofilní povahy, způsobují pokles reprodukční schopnosti vodních ptáků a šelem. V půdě jsou perzistentní, např. DDT se rozloží za 2 až 15 let. Dnes jsou už také celosvětově zakázané.

Karbamáty jsou neurotoxické estery kys. karbamové, které také inhibují acetylcholinesterázu.

Neonikotikoidy působí podobně jako nikotin, který ničí hmyz, jsou však toxické i pro včelu medonosnou.

Pro BET je nejvýznamnější stanovení aktivity acetylcholinesterázy v krvi.

3. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem této práce je sestavit přehledné pojednání o problematice a využívání biologických expozičních testů (BET) a na základě příkladů z vlastní praxe odpovědět na otázku aktuálnosti, relevantnosti a vývojových trendů tohoto principu. Při monitorování toxických látek (Pb, toluen, styren) principem BET je použita řada analytických principů – atomová absorpční spektrofotometrie, fotometrie ve viditelné i ultrafialové oblasti, tlaková mikrovlnná mineralizace a chromatografická technika.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Rozsáhlá problematika BET zahrnující celou řadu nox přesahuje možný rozsah, proto jsem pro účely této bakalářské práce vybrala a detailněji popsala BET týkající se expozice olova.

4. STANOVENÍ EXPOZICE OLOVU

Přestože toxicita olova a jeho sloučenin je známa již od starověku, zájem o monitorování nepoklesl, spíše naopak. Došlo totiž k plošnému rozšíření olova do životního prostředí (benzin s aditivem tetraethylolova, barvy s obsahem olova) a nově se objevily i negativní faktory, zvláště u dětí, které dříve unikaly pozornosti.

Negativní působení olova na vyšetřovaný organismus lze sledovat a hodnotit podle výsledků celé řady testů.

První skupinou jsou tzv. *přímé ukazatele expozice*, tj. přímé stanovení koncentrace olova ve vhodných biologických materiálech (krev, moč, vlasy, nehty) odebraných u exponované osoby.

Druhou skupinu tvoří tzv. *nepřímé ukazatele expozice*, které jsou již zaměřené na zjištění stupně poškození zdraví (syntézy hemoglobinu) následkem intoxikace či vysoké expozice olova, např. stanovení kyseliny *δ -aminolevulové* v moči a *koproporfyrinů III* v moči.

4.1 Stanovení přímých ukazatelů expozice

Stanovení koncentrace olova v krvi, v moči a ve vlasech, popř. v nehtech je indikováno jednak při akutních otravách olovem, jednak jako biologický expoziční test umožňující monitorovat velikost expozice olova z profesionálního i životního prostředí.

4.1.1 Výběr biologického materiálu

Olovo je převážně intracelulární prvek – je navázáno v erythrocytech, pro stanovení proto není možné využít sérum či plazmu, ale pouze *nesrážlivou krev*, lze použít například zkumavku s protisrážlivým činidlem K₃EDTA. Vzhledem k dlouhému biologickému poločasu olova není volba doby odběru vzorků krve kritická.

U moči se dává přednost průměrnému vzorku z 24 hodinové sbírané moče (do laboratoře stačí dodat cca 3-5 ml moče).

Odebírat vzorek vlasů pro monitorování aktuální expozice má význam až po 1 měsíci od expozice.

4.1.2 Metodika stanovení Pb v krvi a v moči metodou ETA AAS

4.1.2.1 Odběr a manipulace se vzorky

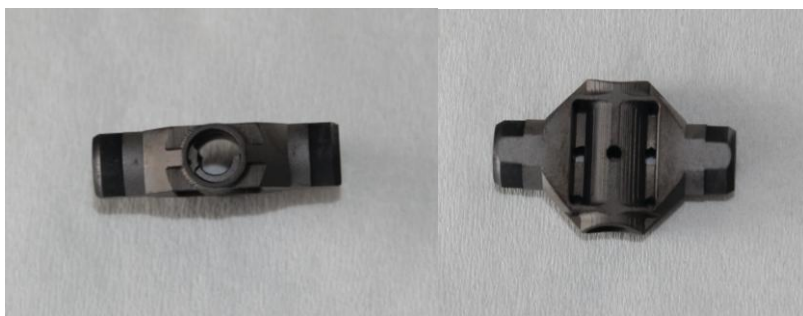
Vzorky nesrážlivých krví a moči se odebírají běžným způsobem. Nevyžaduje se žádná speciální příprava pacienta před odběrem vzorku, pouze je nutné zabránit eventuální kontaminaci vzorků olovem, například ze zaprášeného pracovního oděvu.

Vzorky krví a moči se před stanovením uchovávají dobře uzavřené v lednici při 2-8 °C, kde jsou stabilní po dobu dvou týdnů. V mrazáku při – 20 °C vydrží beze změny až půl roku.

Nezbytným předpokladem provádění analýz principem ETA AAS je i dokonale zabezpečená preanalytická oblast. Vzhledem k nízkým koncentracím, které jsou stanovované principem ETA AAS, mohou mít nezanedbatelný vliv například nečistoty v používaných odběrových nádobkách. Čistota nádobek vkládaných do autosampleru se zabezpečuje speciálním mytím v kyselině dusičné, zředěné 1:10 destilovanou vodou a následným opláchnutím v redestilované vodě a vysušením. Stejným způsobem se připravují i jednorázové nástavce k automatickým pipetám.

4.1.2.2 Princip stanovení

Atomová absorpční spektrofotometrie s elektrotermální atomizací (ETA AAS) je založená na měření absorpce monochromatického záření volnými atomy stanovovaného prvku. Při absorpci energie se elektrony prvku excitují ze základního do excitovaného stavu. Každý prvek má specifické uspořádání a počet elektronů a proto je pro excitování každého prvku potřebná specifická energie představovaná zářením určité vlnové délky. Aby prvek absorboval energii záření, musí být atomy v atomizovaném stavu. Atomizace, tj. disociace chemických sloučenin na volné atomy se u přístroje ETA AAS realizuje při vysoké teplotě 1500 až 3000 °C zahříváním vzorku v grafitové kyvetě (viz. obr. č. 5), (viz. obr. č. 7).



Obr. č. 5: Grafitová příčně vyhřívána kyveta pro realizaci atomizace chemických sloučenin na volné atomy.

Zdrojem záření jsou nejčastěji výbojky s dutou katodou zhotovenou ze stanovovaného prvku. Paprsek lampy prochází obláčkem volných atomů vytvořených vypařením vzorku na platformě grafitové kyvety a volné atomy stanovovaného prvku absorbují záření lampy. Registruje se úbytek záření, úměrný koncentraci stanovovaného prvku ve vzorku (Welz, 1999).

Pro odstranění negativního vlivu možných nespecifických absorpcí se používá korekce pozadí využívající Zeemanův jev, tj. štěpení energetických hladin v silném magnetickém poli.

4.1.2.3 Přístroje e reagentie

Přístroje:

Atomový absorpční spektrofotometr vybavený elektrotermální atomizací a korekcí pozadí využívající Zeemanův jev, typ PinAAcle 900 Z firmy Perkin Elmer (viz. obr. č. 6).



Obr. č. 6: Atomový absorpční spektrofotometr PinAAcle 900 Z firmy Perkin Elmer.



Obr. č. 7: Prostor pro dávkování vzorku do grafitové kyvety.

Reagentie:

- Kyselina dusičná, koncentrovaná, kvalita Suprapur firmy Merck.
- TRITON X- 100 p.a.
- Dihydrogenfosforečnan amonný p.a. ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)

- **Ředící roztok:** 2,0 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 2 ml koncentrované HNO_3 + 5 ml TRITON X100. Slouží pro ředění vzorků krve, moči, kontrolních materiálů a přípravu kalibračního roztoku.
- **Základní roztok:** 1,000 ±0,002 g// Pb při 20 °C: Certifikovaný referenční materiál - „vodný kalibrační roztok“ CZ 9041 (1N) Olovo, dodávaný pod obchodním názvem ASTASOL[®] – Pb firmou ANALYTIKA. Praha. Roztok je stabilní do doby expirace vyznačené na 100 ml láhvi z tmavého plastu při uchovávání v lednici.
- **Pracovní roztok:** 10 mg/l : 1 ml základního roztoku se přidá do odměrky na 100 ml s cca 50 ml redestilované vody a doplní se po rysku redestilovanou vodou. Stabilní cca rok.
- **Kalibrační roztok:** 20 µg/l : 0,2 ml pracovního roztoku se přidá do odměrky na 100 ml s cca 25 ml ředícího roztoku a doplní se ředícím roztokem po rysku. Stabilní cca půl roku.

4.1.2.4 Parametry a postup stanovení

A) Příprava (ředění) vzorků krve a moči:

Krve i moče se ručně ředí ředícím roztokem 1:9.

Přímo do nádoby autosampleru se napipetuje 100 µl krve (moče) + 900 µl ředícího roztoku. Důkladně se promíchá převrácením přes parafilm.

B) Stručný postup na ETA AAS

- otevření ventilu na tlakové lahvi s argonem
- zapnutí PinAAcle 900Z a PC, spuštění ovládacího programu Winlab 32 on line, otevření Workspace, nastavení ukládání výsledků, nastavení sample Info
- zapnutí lampy
- seřízení a nastavení raménka autosampleru
- vložení nádobek s naředěnými vzorky a kontrolami do kruhu autosampleru
- provedení analýzy, vtištění výsledků (User manual Pin AAcle 900Z, 2014).

4.1.2.5 Kalibrace a kontrola kvality

Kalibrační křivku proměří analyzátor vždy na začátku měření série vzorků metodou standardních přídavek, obvykle se volí přídávky do referenčního materiálu s velmi nízkou hladinou Pb, tj. Seronorm Trace Elements Whole Blood, Level 1.

Kalibrace je navázána na certifikovaný kalibrační roztok ASTASOL[®] firmy Analytika a. s. Praha, opatřený certifikátem vydaným Českým metrologickým institutem s hodnotami koncentrací, nejistot a expirační doby, uvedenými v Identifikačním listu.

Tab. č. 2: Dávkování kalibračního roztoku při stanovení Pb v krvi a moči autosamplermem ETA AAS

	Koncentrace	Pozice autosampleru	μl kalibračního roztoku 20 μg/l	μl ředícího roztoku
Kalib. blank	Calib Blank	1	10	10
Reag. blank				
Standard 1	40 μg/l (0,2 μmol/l)	2	2	8
Standard 2	80 μg/l (0,4 μmol/l)	2	4	6
Standard 3	120 μg/l (0,6 μmol/l)	2	6	4
Standard 4	160 μg/l (0,8 μmol/l)	2	8	2

Linearita: je potvrzena minimálně v celém rozsahu kalibrační křivky, tj. do cca 0,8 μmol/l (160 μg/l).

Mez detekce: (3x směrodatná odchylka slepého vzorku): 0,02 μmol/l

Mez stanovitelnosti: (10x směrodatná odchylka slepého vzorku): 0,06 μmol/l

Interference: Vzhledem k aplikovanému principu ETA AAS nemají běžně uvažované interference (hemolýza, iktericita, chylozita) významný vliv.

Jako kontrolu kvality pro stanovení Pb v krvi lze použít Seronorm Trace Elements Whole Blood, Level 1 až 3. Jako kontrolu kvality pro stanovení Pb v moči lze použít Seronorm Trace Elements Urine. Kontroly jsou dodávány v lyofilizovaném stavu.

4.1.2.6 Interpretace výsledků

Tab. č. 3 : Referenční hodnoty a NPL pro stanovení Pb v krvi a v moči.

<i>Test</i>	<i>Referenční hodnota</i>	<i>Nejvýše přípustný limit</i>
<i>Pb v krvi</i>	0.06 ± 0.02 mg/l	< 0.4 mg/l
<i>Pb v moči</i>	< 1.0 μmol/l	< 1.5 μmol/l
<i>Pb v moči po chelátové terapii</i>		< 2.7 μmol/l

4.1.3 Metodika stanovení Pb ve vlasech a nehtech metodou ETA AAS

4.1.3.1 Odběr a manipulace se vzorky vlasů a nehtů

Odebírá se několik praménků vlasů v celé délce z různých míst hlavy, v množství cca 200 mg (někdy se pro názornou představu uvádí: odebírá se tolik vlasů, aby se jimi po nastříhání na malé kousky naplnila polévková lžice). Odebrané vlasy se uloží do označeného polyetylenového sáčku. Důležité je, aby byly vlasy jednotně srovnané a zafixované (např. převázáním pramenu vlasů nití) tak, aby bylo možné určit konec vlasů od hlavy (nutné k určení historie organismu).

Vlasy srovnané a zafixované v polyetylenovém označeném sáčku jsou stabilní. Podle typu zadání se analyzují vlasy v celé délce, nebo jen určité zájmové úseky. Např. 6 cm vlasů od hlavy zahrne historii organismu za půl roku (6 měsíců) před odběrem.

4.1.3.2 Princip úpravy pevných vzorků metodou tlakové mikrovlnné mineralizace

Rozklad (mineralizace) vzorků biologického materiálu probíhá kombinovaným působením koncentrovaných kyselin a peroxidu vodíku, tlaku a mikrovlnné energie produkované zabudovaným magnetronem (Senft, 1998). Mineralizace probíhá podle předem naeditovaných programů, pro každý druh rozkládaného materiálu je jiný (viz. tab. č. 4), (viz. obr. č. 8).

Tab. č. 4: Parametry pro mineralizaci vlasů a nehtů na mineralizátoru ETHOS 900

WORK-PROGRAM (1-20)	*4 ENT= OK				
STEP	TIME	POWER	PRESS	TEMP1	TEMP2
1	00:02:00	250 W	0 B	0 °C	0 °C
2	00:02:00	0 W	0 B	0 °C	0 °C
3	00:07:00	300 W	0 B	0 °C	0 °C
4	00:05:00	400 W	0 B	0 °C	0 °C
RCTL=OFF	VENT=00:05:00	TWIST=OFF	TAT=OFF		



Obr. č. 8: Ovládací panel mineralizátoru ETHOS 900

V programu jsou přesně definované jednotlivé kroky, jako je rychlost náběhu kroku, doba trvání kroku, velikost vkládané mikrovlnné energie. Mikrovlnná energie je v režimu 250 W do vzorku vkládána kontinuálně (nepulzně), což umožňuje optimalizovat počáteční kroky mineralizace, při nichž dochází k největšímu a nejrychlejšímu uvolňování tepla, zvláště u rychle se oxidujících organických látek. Vyšší hodnoty mikrovlnné energie se do mineralizovaného vzorku dodávají pulzně,

tj. kombinuje se peak 1000 W s pauzou, kdy je mikrovlnná energie nulová (User manual Milestone, 0/98).

4.1.3.3 Čištění vlasů a nehtů před mineralizací

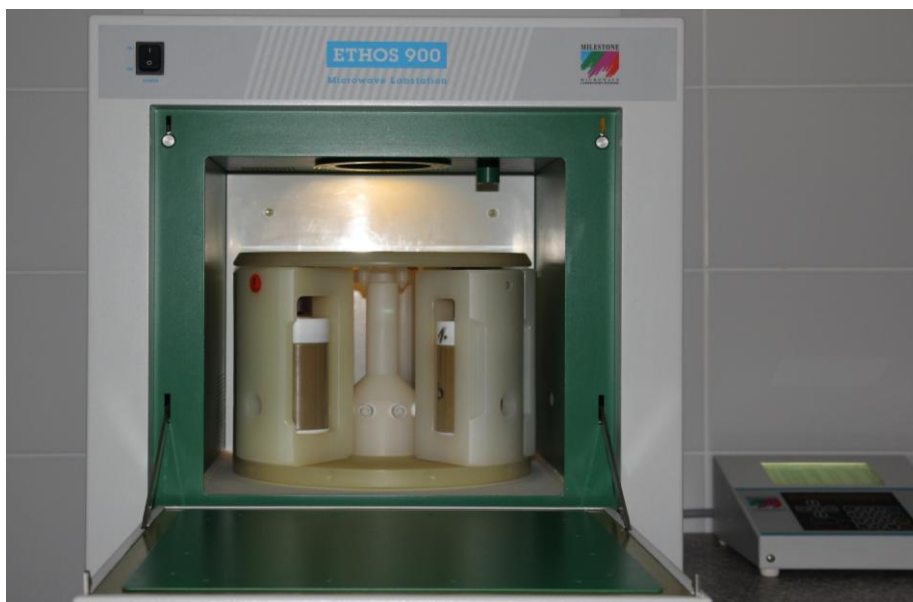
Úvodním krokem analýzy je mytí vzorků vlasů/nehtů střídavě vodnou a organickou fází s cílem pokud možno omezit vliv potenciální vnější kontaminace vlasů/nehtů z vnějšího prostředí. Vlasy/nehty (cca 100 mg) se nastříhají na cca 1 cm části a sesypou se do 100 ml baňky. Přidá se 10 ml acetonu, protřepe se, nechá 10 min stát a opět se protřepe. Aceton se opatrně slije a vlasy/nehty se 3x promyjí 10 ml vody.

Nakonec se opakuje promytí s 10 ml acetonu. Aceton se slije a vlasy/nehty se vysuší 1 hod v termostatu při cca 70 °C. Vlasy/nehty se nechají vychladnout a na analytických vahách se naváží cca 100 mg. Navážka se zaznamená a vlasy/nehty se kvantitativně sesypou do označené rozkladné nádoby (Rjabuchin, 1978).

4.1.3.4 Přístroje a reagentie pro tlakovou mikrovlnnou mineralizaci

Přístroje:

Mikrovlnný laboratorní mineralizační systém ETHOS 900 Milestone s technologií MDR (Microwave Digestion Rotor), (viz. obr. č. 9)



Obr. č. 9: Mineralizátor ETHOS 900 s vloženými teflonovými rozkladnými nádobkami

Spotřební materiál:

- teflonová rozkladná nádobka (HPR-1000/6/100/110 High Pressure Vessel)
(viz. obr. č. 10)
- teflonové víčko k rozkladným teflonovým nádobkám (SD-05/S TFM Covers)
- bezpečnostní disková pružina (HTC-1000 Special Spring)
- indikátorový kroužek (IR 63/25 Indicator Ring)
- ochranný kryt rozkladných nádobek (HS-08 HTC Protection Shield)
- podložka pružiny (AP-45/S Adapter Plate)



Obr. č. 10: Segment a jednotlivé části teflonové rozkladné nádobky

Reagencie:

- *Kyselina dusičná*, koncentrovaná, HNO_3 , kvalita Suprapur firmy Merck
- *Peroxid vodíku*, koncentrovaný, p. a. H_2O_2
- *Dihydrogenfosforečnan amonný* p. a. ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)
- *Aceton* p. a.

Ředící roztok: 2,0 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 2 ml koncentrované HNO_3 : Do odměrky na 1000 ml s cca 500 ml redestilované vody se přidají 2 ml koncentrované kyseliny dusičné Suprapur a 2,0 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Promíchá se a doplní do 1000 ml redestilovanou vodou.

Základní roztok: 1,000 ±0,002 g// Pb při 20 °C: Certifikovaný referenční materiál - „vodný kalibrační roztok“ CZ 9041 (1N) Olovo, dodávaný pod obchodním názvem

ASTASOL[®] – Pb firmou ANALYTIKA. Praha. Roztok je stabilní do doby expirace vyznačené na 100 ml láhvi z tmavého plastu při uchovávání v lednici.

Pracovní roztok: 10 mg/l : 1 ml základního roztoku se přidá do odměrky na 100 ml s cca 50 ml redestilované vody a doplní se po rysku redestilovanou vodou. Důkladně se promíchá. Stabilní cca rok.

Kalibrační roztok: 20 µg/l : 0,2 ml pracovního roztoku se přidá do odměrky na 100 ml s cca 25 ml ředícího roztoku a doplní se ředícím roztokem po rysku. Důkladně se promíchá. Stabilní cca půl roku.

4.1.3.5 Postup tlakové mikrovlnné mineralizace

Ke každé sérii měřených vzorků se připravuje:

1. *slepý vzorek* – do rozkladné nádoby se napipetuje 6 ml kys. dusičné a 1 ml H₂O₂
2. *neexponovaný vzorek* vlasů s prověřeným nízkým obsahem Pb
3. *stejný neexponovaný vzorek* vlasů s prověřeným nízkým obsahem Pb, do kterého se přidá *standardní přídavek* 1 µg Pb, tj do rozkladné nádoby se připipetuje 100 µl pracovního roztoku

Postup:

Do rozkladných nádobek se kvantitativně přenesou cca 100 mg umytých a suchých vlasů/nehtů. Přidá se 6 ml HNO₃ a nakláněním se dosáhne toho, aby veškeré vlasy/nehty byly smočeny. Ponechá se chvíli reagovat. Poté se přidá 1 ml H₂O₂ a nechá se chvíli reagovat. Složí se jednotlivé díly rozkladné nádoby. Sestavy nádobek se umístí do segmentů pomocí momentového klíče a umístí se do rotoru mikrovlnného tlakového mineralizátoru ETHOS 900. Mineralizace se musí provádět minimálně se čtyřmi nádobkami.

Nastaví se parametry mineralizace, respektive vybere se jeden z předvolených programů s již nastavenými parametry a spustí se vlastní mineralizace.

Zpracování zmineralizovaných vzorků:

Po ukončení programu se mineralizátor automaticky vypne. Z rotoru se vyjmou segmenty s nádobkami a nechají se vychladnout cca 45 min. V digestoři se pak uvolní

nádobky ze segmentů pomocí momentového klíče. Sejme se víčko a spláchnou se případné kapky 0.5 ml redestilované vody do připravené skleněné mineralizační zkumavky. Nádobka se ještě 2x vypláchne 0.5 ml redestilované vody a vše se přenese do skleněné mineralizační zkumavky. Tyto zkumavky se umístí do aluminiového bloku na topné desce, nastavené na 145°C a odpaří se téměř do sucha, konečné odpaření do sucha se provádí ve vodní lázni. Po vychladnutí se k odparkům přidá 10 ml redestilované vody a nechá se 30 min stát.

Takto připravený zmineralizovaný roztok se použije pro stanovení Pb principem ETA AAS. Naměřená koncentrace se přepočítá na množství Pb v gramu analyzovaných vlasů a výsledek se porovná s nejvyšší přípustným limitem.

4.1.3.6 Vlastní stanovení ETA AAS

Do nádobek autosampleru ETA AAS se pipetuje:

100 µl zmineralizovaného roztoku + 600 µl ředícího roztoku

- Dále viz bod 4.1.2

Kalibrace:

Kalibrační křivku proměří analyzátor vždy na začátku měření série vzorků přidavky kalibračního roztoku do vzorku umístěného na pozici č. 3 autosampleru, což je zmineralizovaný vzorek neexponovaných vlasů s nízkým obsahem olova (viz. tab. č. 5). Na tuto kalibraci se potom proměří celá série měřených vzorků. V uvedeném rozsahu koncentrací je kalibrace lineární.

Kalibrace je navázána na certifikovaný kalibrační roztok ASTASOL[®] firmy Analytika a. s. Praha, opatřený certifikátem vydaným Českým metrologickým institutem s hodnotami koncentrací, nejistot a expirační doby, uvedenými v Identifikačním listu.

Tab. č. 5: Dávkování kalibračních roztoků pro stanovení Pb ve vlasech a nehtech autosamplermem ETA AAS

	Koncentrace	Pozice autosampleru	μl kalibračního roztoku 20 μg/l	μl ředícího roztoku
Kalib. blank		1	10	10
Reag. blank				
Standard 1	28 μg/l (0, 14 μmol/l)	2	2	8
Standard 2	56 μg/l (0,28 μmol/l)	2	4	6
Standard 3	84 μg/l (0,42 μmol/l)	2	6	4
Standard 4	112 μg/l(0,56 μmol/l)	2	8	2
Standard 5	140 μg/l (0,70 μmol/l)	2	10	0

Linearita kalibrace: minimálně do 150 μg/l v roztoku vzniklém po mineralizaci cca 10 mg navážky vlasů.

Pravdivost metody se prověřuje tím, že se při měření každé série vzorků provede i měřením odezvy standardního přídatku 1 μg olova ke vzorku neexponovaných vlasů.

Naměřená koncentrace se přepočítá na množství Pb v gramu analyzovaných vlasů a výsledek se porovná s nejvýše přípustným limitem (viz. tab. č. 6).

4.1.3.7 Interpretace výsledků

Zajímavou možností nahlédnutí do historie organismu představuje stanovení olova v segmentech vlasů nebo nehtů. Každý centimetrový úsek vlasů odpovídá zhruba jednomu měsíci.

Tab. č. 6: Referenční hodnoty a NPL pro stanovení Pb ve vlasech

Test	Referenční hodnota	Nejvýše přípustný limit
Pb ve vlasech	2 ±1.9 μg/g	< 10 μg/g

4.2 Stanovení nepřímých ukazatelů expozice

Mezi nepřímé ukazatele expozice olovu v rámci monitorování BET patří *kyselina δ -aminolevulová* v moči a *koproporfyirin III* v moči. Opět se rozlišuje referenční hodnota u běžné neexponované populace a nejvýše přípustný limit.

Kyselina δ -aminolevulová vzniká v organismu kondenzací sukcinyl-CoA s glycinem za současné dekarboxylace, jako první stupeň tvorby porfyrinů, respektive hemoglobinu. Reakci katalyzuje syntáza kyseliny δ -aminolevulové, která je klíčovým enzymem syntézy porfyrinů (viz. obr. č. 3).

Nejčastější indikací pro stanovení koncentrace kyseliny δ -aminolevulové v moči je monitorování potenciální otravy organismu olovem, ať již profesionální nebo náhodné. Olovo blokuje mimo jiné právě přeměnu kyseliny delta-aminolevulové na porfobilinogen a tím způsobuje zvýšení koncentrace kyseliny δ -aminolevulové v moči. Stanovení kyseliny δ -aminolevulové umožňuje odlišit různé formy porfyrií od negativního působení olova.

4.2.1 Metodika stanovení δ -aminolevulové kyseliny v moči

4.2.1.1 Odběr a manipulace se vzorky

Stanovení lze sice realizovat i z jednorázově odebraného vzorku moče, ale optimální je zajistit standardní sběr 24 hodinového vzorku moče. Vzorek moče je zapotřebí chránit před světlem, například odběrem do lahvičky z tmavého skla, nebo zabalením zkumavky do alobalu apod.

Vedle ochrany vzorku před světlem, je třeba vzorek bezprostředně po odběru, nebo bezprostředně po transportu do laboratoře, nakonzervovat upravením pH na hodnotu 6,0 pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Vzorek moče je potom při uchovávání v lednici při teplotě 2-8 °C stabilní po dobu 1 měsíce.

4.2.1.2 Princip stanovení

Vzorek moče postupně prochází dvěma chromatografickými kolonkami s ionexy. První kolonka obsahující pufovaný anex zachytí porfobilinogen, zatímco na druhé kolonce s pufovaným katexem se zachytí kyselina δ -aminolevulová. Po promytí a odstranění potenciálně interferujících látek, jsou oba analyty separátně eluovány a kvantitativně stanoveny spektrofotometricky s využitím Ehrlichovy reakce: Kyselina δ -aminolevulová reaguje za tepla s acetylacetonem Knorrovou reakcí za vzniku substituovaného pyrrolu, který obdobně jako porfobilinogen poskytuje s Ehrlichovým činidlem (4-dimethylaminobenzaldehyd) červenofialové zbarvení s absorpčním maximem při 555 nm. Vyhodnocuje se jednobodovou kalibrací, pomocí současně se vzorky změřeného standardu kyseliny δ -aminolevulové.

4.2.1.3 Přístroje a reagentie

Přístroje:

- spektrofotometr Varian Cary 100 umožňující měřit při 555 nm (eventuelně v rozsahu 520 – 570 nm).
- vroucí vodní lázeň
- automatické pipety
- vhodný stojan pro ionexové separační kolonky umožňující jednak promývání a odstraňování interferujících látek a balastu do odpadu, jednak eluci a jímání stanovovaných substancí, tj. kyseliny δ -aminolevulové.

Reagentie:

Set obsahuje reagentie a chromatografické mikrokolonky, které postačují pro analýzu 40 vzorků moči.

Před použitím lze skladovat při běžné teplotě laboratoře (15-30 °C) a reagentie jsou stabilní do doby expirace vyznačené na obalu.

Set obsahuje:

Činidlo 1: 2 x 350 ml octanu sodného o koncentraci 1 mol/l.

Činidlo 2: 1 x 175 ml kyseliny octové o koncentraci 1 mol/l.

Mikrokolonky pro stanovení porfobilinogenu: 2 x 20 ks obsahujících zvážené množství pufovaného anexu.

Mikrokolonky pro stanovení kyseliny δ -aminolevulové: 2 x 20 ks obsahujících zvážené množství pufovaného katexu.

Činidlo A: 1 x 17 ml acetylacetonu.

Činidlo B1: 2 x pro 50 ml, lahvičky obsahují 4-dimethylaminobenzaldehyd v takovém množství, aby po rekonstituci pomocí 50 ml činidla B2 vznikl roztok o koncentraci 6 mmol/l.

Činidlo B2: 2 x 50 ml kyseliny octové o koncentraci 18 mol/l.

Standard kyseliny δ -aminolevulové: 2 x pro 5 ml. Koncentrace je vždy vyznačená na štítku lahvičky

Kyselina chloristá 65% p. a. HClO_4

Před vlastní analýzou je zapotřebí připravit:

Činidlo B: Obsah lahvičky s činidlem B2 se přelije do lahvičky s činidlem B1 a protřepává se do úplného rozpuštění. Stabilita je potom 6 měsíců při uchovávání v lednici (2-8 °C).

Standard δ -ALA: Obsah lahvičky se rozpustí v 5 ml destilované vody. Připravený standard je stabilní 12 měsíců při uchovávání v lednici (2-8 °C).

Ehrlichovo činidlo: K 10 ml činidla B se přidá 1,9 ml 70% kyseliny chloristé a třepe se, dokud se nezíská homogenní směs. Činidlo je stabilní po dobu 7 hodin při teplotě laboratoře (15-30 °C).

4.2.1.4 Parametry a postup měření

Chromatografická separace:

Filtr se lehce zatlačí k ionexu.

1. Pufr z mikrokolonek se nechá vytéci do odpadu, PBG mikrokolonka se umístí nad δ -ALA mikrokolonku, sestava se promyje 10 ml vody, potom se do horní mikrokolonky nanese 1 ml vzorku čirého podílu zcentrifugované moče a opět se promyje 20 ml vody. Vše se nechá odtéci do odpadu.

2. Mikrokolonky se použijí pro stanovení kyseliny delta-aminolevulové

Stanovení kyseliny δ -aminolevulové:

1. Na ALA mikrokolonku se napipetuje 10 ml činidla 1 a eluát se jímá do zkumavky označené VZOREK.

2. Označí se další dvě zkumavky jako BLANK a STANDARD a pipetuje se:

	BLANK	STANDARD	VZOREK
	/	/	Eluát
Standard	/	0,1 ml	/
Činidlo 1	10 ml	9,9 ml	/
Činidlo A	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

3. Vše se promíchá a na 10 minut se vloží do vroucí vodní lázně.

4. Zkumavky se co nejrychleji ochladí pod tekoucí vodou a do dalších tří zkumavek označených a *BLANK*, *STANDARD* *VZOREK* se napipetuje vždy 1 ml inkubované směsi a 1 ml Ehrlichova činidla.

5. Promíchá se a po 15 minutách se proměří absorbance standardu a vzorku při 555 nm proti blanku.

6. Vypočítá se koncentrace kyseliny δ -aminolevulové podle vzorce:

$$CALA = \frac{A_{vzALA}}{A_{stALA}} \times 188 \quad \mu\text{mol/l} \quad (\text{platí pro verzi 10/2009, kde je konc. std.}$$

1526 $\mu\text{mol/l}$)

4.2.1.5 Kalibrace a kontrola kvality

Kalibrace:

Jednobodová kalibrace pro kvantitativní stanovení kyseliny δ -aminolevulové se průběžně zajišťuje tím, že se s každou sérií vzorků současně analyzuje v setu dodávaný standard kyseliny δ -aminolevulové a výsledné koncentrace kyseliny δ -aminolevulové ve vzorcích moče se získávají výpočtem zahrnujícím absorbanci měřeného kalibračního bodu.

Kontrola kvality:

Ke kontrole kvality se použijí referenční kontrolní materiály na bázi moče, například: Lyphochek BIO RAD Quantitative Urine Control, level 1 a 2.

4.2.1.6 Interpretace výsledků

Nejčastější indikací pro stanovení koncentrace kyseliny delta-aminolevulové v moči je monitorování potenciální otravy organismu olovem, ať již profesionální nebo náhodné. Olovo blokuje mimo jiné právě přeměnu kyseliny delta-aminolevulové na porfobilinogen a tím způsobuje zvýšení koncentrace kyseliny delta-aminolevulové v moči. Stanovení kyseliny delta-aminolevulové umožňuje odlišit různé formy porfyrií od negativního působení olova.

Tab. č. 7: Referenční hodnoty a NPL pro stanovení kyseliny δ -aminolevulové v moči

Test	Referenční hodnota	Nejvýše přípustný limit
Kys.δ-aminolevulová v moči	< 35 $\mu\text{mol/l}$	< 75 $\mu\text{mol/l}$

4.2.2 Metodika stanovení koproporfyriinů III v moči

4.2.2.1 Odběr a manipulace se vzorky

Moč se musí chránit před světlem, odebírá se do tmavé lahvičky nebo se obalí alobalem. Pokud se nezpracuje v den odběru, konzervuje se přidavkem 15% Na_2CO_3 (uhlíčitan sodný) a 5% chelatonem III.

Standardně se odebírá 24 hodinový vzorek moče, ale je možné provést stanovení i z jednorázového vzorku moče.

4.2.2.2 Princip stanovení

Porfyryny jsou cyklické tetrapyroly, které jsou prekursory hemu. Vznikají řadou na sebe navazujících reakcí. Podle toho, v které fázi syntézy hemu existuje anomálie,

objevují se různé formy porfyrií.

Moč se okyselí kys.octovou na pH 3. Moč se potom extrahuje do diethyletheru, nechá se na světle, aby proběhla oxidace prekurzorů na koproporfyryn. Etherová vrstva se promyje octanem sodným a koproporfyryn se vyextrahuje do zředěné HCl.

4.2.2.3 Přístroje a reagentie

Přístroje a pomůcky:

- spektrofotometr Varian Cary 100
- dělicí baňky na 50-100 ml
- odměrné baňky na 25 ml
- automatické pipety

Reagentie:

diethylether p.a. stabilizovaný, (C₂H₅)₂O

kys. octová, CH₃COOH

1% roztok octanu sodného: 1g CH₃COONa . 3 H₂O se rozpustí ve 100 ml dest. vody

5% roztok HCl: 114 ml konc. HCl se doplní do 1000 ml dest.vodou

4.2.2.4 Parametry a postup stanovení

Do odměrné baňky na 25 ml se napipetuje 5 ml moče, přidá se 5 ml diethyletheru a 0.5 ml kys.octové.

20 sekund se protřepává a volně uzavřené se nechá stát na světle cca 2 hod. Proběhne oxidace prekursorů na koproporfyryn.

Poté se obsah odměrné baňky přelije do dělicí baňky a odměrná baňka se ještě vypláchne 5 ml diethyletheru a oplach se také přelije do dělicí baňky. Vše se 5 až 10 sekund protřepává, vrstvy se nechají oddělit a spodní podíl moče se odpustí do odpadu.

Etherová vrstva se promyje 2 x 2.5 ml 1% roztoku octanu sodného. Poté se koproporfyryn z diethyletheru vyextrahuje vytřepáním 2 x 2 ml 5% HCl. Spojené extrakty se ve zkumavce doplní 5% HCl na objem 5ml.

Promíchá se a změří na spektrofotometru Varian Cary 100.

4.2.2.5 Interpretace výsledků

Tab. č. 8: Referenční hodnoty a NPL pro koproporfyryin III

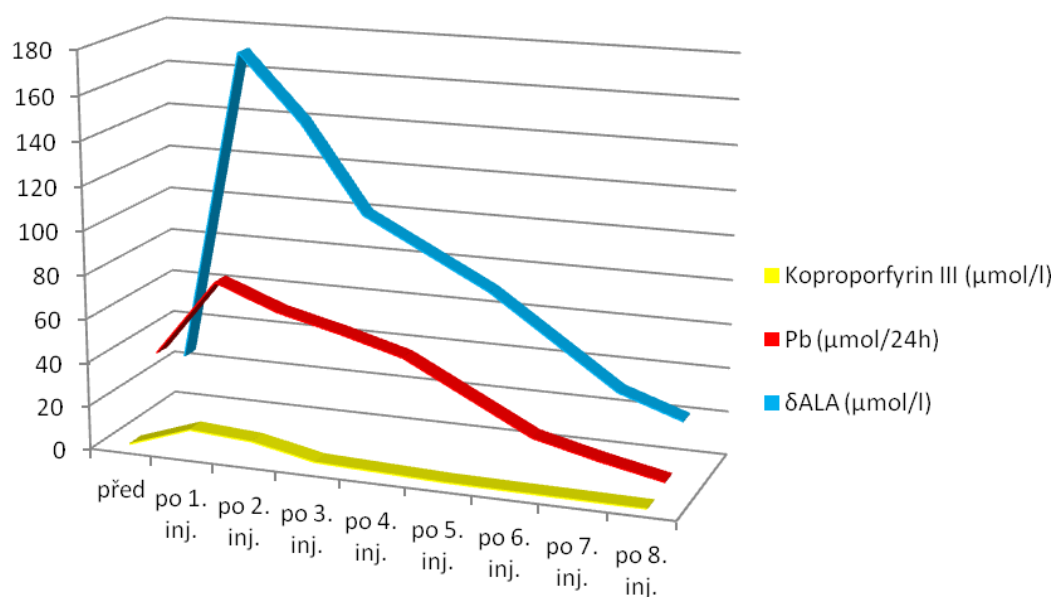
<i>Test</i>	<i>Referenční hodnota</i>	<i>Nejvýše přípustný limit</i>
<i>Koproporfyryin III</i>	< 225 nmol/l (< 150 µg/l)	< 450 nmol/l (< 300 µg/l)

5. VÝSLEDKY

Podílela jsem se na měření řady BET souvisejících s expozicí olovu při monitorování celé řadě kazuistik s prokázanou vysokou expozicí, která zahrnovala stanovení Pb v krvi, v moči, ve vlasech a v nehtech, dále pak stanovení kyseliny δ -aminolevulové v moči a koproporfyriu III v moči.

5.1 Kazuistika rodiny exponované olovu z keramiky s olovnatou glazurou

Celá rodina (otec, matka, děti 4 a 7 let) se intoxikovala olovem při pití čaje s citronem z keramické konvice. Glazura obsahovala olovo, které se v kyselém prostředí citronu rozpouštělo do čaje (viz. graf. č. 3), (Senft, 1991).

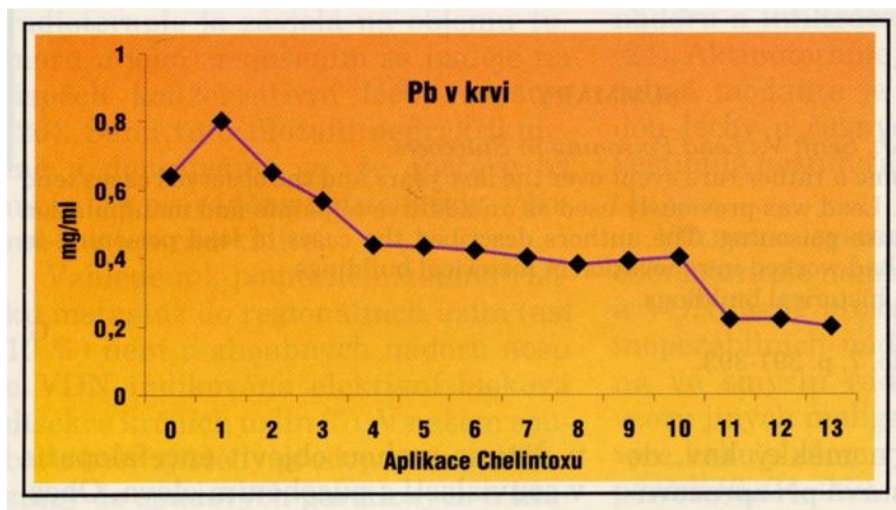


Graf č. 3: Typický průběh mobilizace Pb aplikací EDTA po závažné intoxikaci z keramické konvice s olovnatou glazurou

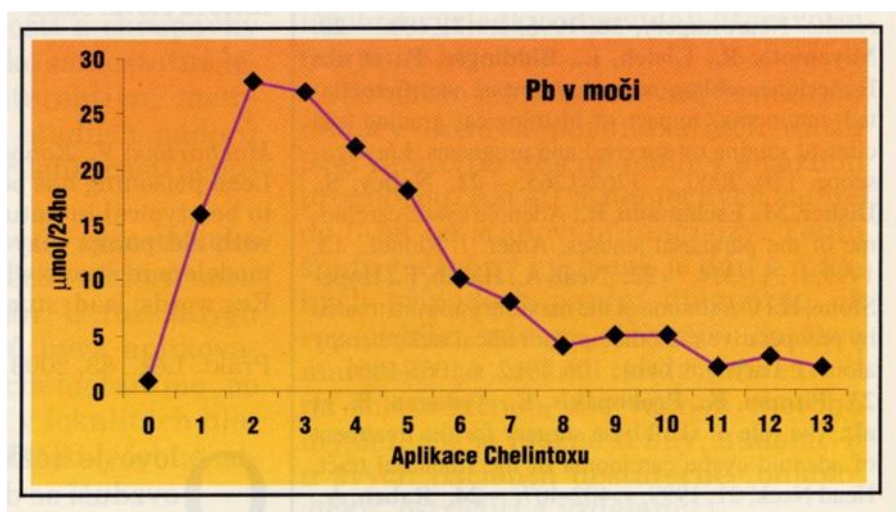
Podobná intoxikace olovem ze spotřební keramiky bohužel není ojedinělá (Tothová, 2003), (Hoffmanová, 2016).

5.2 Kazuistika restaurátora v klášteře Teplá

Restaurátor se exponoval olovem při opravách starých omítek a maleb v klášteře Teplá u Mariánských lázní. Intoxikace byla tak vysoká, že musel být hospitalizován na Klinice pracovního lékařství FN v Plzni, kde byla realizována mobilizace olova injekcemi EDTA (viz. graf. č. 4,5), (Machartová, 2004).



Graf č. 4: Intoxikace Pb při restaurování historických nástěnných maleb, Pb v krvi po mobilizaci injekcemi Chelintoxu (Machartová, 2004)



Graf č. 5: Intoxikace Pb při restaurování historických nástěnných maleb, Pb v moči po mobilizaci injekcemi Chelintoxu (Machartová, 2004)

5.3 otrava olovem u majitelů střelnic

Dva majitelé střelnice se intoxikovali olovem při domácí neodborné výrobě střeliva ze starých použitých nábojů. Zpočátku bylo problematické zjištění zdroje intoxikace, neboť střelnice nepatřila mezi provozovny s vyhlášeným rizikem olova, ani Městská hygienická stanice v Plzni nezjistila zdroj olova na této střelnici. Jako příčina otravy bylo tavení olova v kotlíku nad otevřeným ohněm ve stodole (Machartová, 1998).

5.4 Otrava olovem po požití broků

Pacient požil nešťastnou náhodou 20 diablek. Měl totiž zvyk schovávat si zásobu diablek v ústech pro rychlejší nabíjení, ale po upadnutí a následném spolknutí diablek se těžce intoxikoval olovem. Naměřená hladina Pb v krvi překročila 2.4 násobně NPL, hladina koproporfyrinů III překročila až 30 násobek NPL a hladina kyseliny δ -aminolevulové 2.7 násobek NPL (Vlček, 2005).

V této bakalářské práci se detailně soustředím na zajímavou, dosud nepublikovanou kazuistiku pacienta M.D. upozorňující na některé souvislosti mající vliv na výsledky BET.

5.5. Kazuistika pacienta M.D.

Pacient M.D. nar. 1955 se vyučil na SOŠ polygrafické v Děčíně, obor sazeč-typograf. Po vyučení dva roky pracoval jako typograf v tiskárně, takže byl exponován výparům olova při odlévání olovených tyčí a při práci na sázecím stroji. Následující zaměstnání měl různá, ale již bez expozice olovu (dřevorubec, strojník, bagrista). Pro různé polymorfní zdravotní potíže mu byl přiznán částečný invalidní důchod a praktickým lékařem dohodnuta hospitalizace na Klinice pracovního lékařství

FN Plzeň s cílem prověření možnosti přiznání nemoci z povolání z důvodu dřívější expozice olova. Při hospitalizaci bylo provedeno kompletní biochemicko-hematologické vyšetření, EKG, RTG plic, sonografii břicha, CT páteře, aj. Bylo stanoveno několik lehkých až středně závažných diagnóz. Klinika pracovního lékařství se zaměřila na potvrzení či vyvrácení diagnóz Z575 a T560 (profesionální expozice olova v minulosti dle anamnézy). Bylo realizováno celé spektrum BET. Veškeré výsledky byly v normálu, kromě stanovení olova ve vlasech a nehtech, kde byly naměřeny extrémně vysoké výsledky. (Pb ve vlasech 106 $\mu\text{g/g}$ a v nehtech 517 $\mu\text{g/g}$). Kvůli těmto vysokým koncentracím v kožních adnexech bylo rozhodnuto o provedení mobilizace olova z organismu aplikací infuzí Chelintoxu. Výsledky mobilizace olova z organismu byly ale negativní, dokonce ani po opakované aplikaci infuze Chelintoxu nedošlo ke zvýšení hladiny olova v moči, které bývá při této terapii naprosto specifické (graf č. 3, 5).

Vzhledem k rozporu vysokých koncentrací olova ve vlasech a nehtech oproti negativním nálezům ostatních BET i negativního výsledku mobilizace, byly BET realizovány opakovaně při dalších ambulantních kontrolách (tab. č. 9,10). Vysoké hodnoty ve vlasech a v nehtech přetrvávaly a ostatní výsledky BET byly stále v normálu. Nakonec byla zamítnuta nemoc z povolání a při následné kontrole byly hodnoty Pb ve vlasech a v nehtech v normálu.

Tab. č. 9: Naměřené výsledky **přímých BET** realizovaných v průběhu prověřování možnosti přiznání nemoci z povolání pacienta M.D.

Zvýrazněn je negativní výsledek mobilizace Pb a výrazný pokles Pb ve vlasech a v nehtech po zamítnutí nemoci z povolání.

Pb v krvi (mg/l)	Pb v moči (μmol/24 h)	Pb ve vlasech (μg/g)	Pb v nehtech (μg/g)	Poznámka
				Přiznán část. inv. důch.
0,16	<0,1	106	517	
0,09	<0,1 chel.			Po 1. inf. EDTA
	<0,1 chel.			Po 2. inf. EDTA
0,09	<0,1 chel.	195	240	Po 1. inf. EDTA
	<0,1 chel.			Po 2. inf. EDTA
0,14	<0,1	157	245	
		53	69	
0,03	<0,1	77	138	
		102	385	
		116	497	
0,04	<0,1	130		
0,09		63	42	Zamítnuta nemoc z pov.
0,04		5,2	8,7	

Tab. č. 10: Naměřené výsledky **nepřímých BET** realizovaných v průběhu prověřování možnosti přiznání nemoci z povolání pacienta M.D.

Zvýrazněn je negativní výsledek mobilizace Pb a žádná změna po zamítnutí nemoci z povolání.

Kopro III v moči ($\mu\text{mol/l}$)	Kopro III/kr. ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatininu)	dALA v moči ($\mu\text{mol/l}$)	dALA/kr. ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatininu)	Poznámka
0,137	0,017			
0,108	0,008	23,4	1,7	Přiznán část. inv. důch.
0,043				
0,077	0,008	31,6	3,2	
0,089	0,023	13,1	3,4	
0,075	0,008	8,1	1,9	Po 1. inf. EDTA
0,055	0,022	6,5	2,6	Po 2. inf. EDTA
0,105	0,013	22,5	2,8	Po 1. inf. EDTA
0,100	0,023	14,9	3,4	Po 2. inf. EDTA
0,067	0,014	16,2	3,3	
0,094	0,020	15,8	3,4	
0,202	0,015	22,5	1,7	
0,108	0,014	14,0	1,3	
0,141	0,018	49,9	2,1	
0,156	0,012	32,7	2,4	Zamítnuta nemoc z pov.
0,158	0,013	28,3	2,3	

6. DISKUZE

Výsledky zmíněných kazuistik s prokázanými expozicemi olova (Senft, 1991), (Tothová, 2003), (Machartová, 2004), (Vlček, 2005) jednoznačně dokumentují relevantnost, užitečnost a aktuálnost BET. Stále se objevují nečekané případy intoxikací a expozic.

Výsledky BET realizovaných v případě kazuistiky pacienta M.D. ukazují na to, jak je vhodné použít pokud možno co nejširší spektrum BET. Pokud by se přihlíželo jen k vysokým koncentracím olova ve vlasech a nehtech, dospělo by se k přiznání nemoci z povolání a následnému odškodnění. Naopak, pokud by se přihlíželo jen k normálním hodnotám koproporfyrinu III a kyseliny δ - aminolevulové v moči, bylo by veškeré další prověřování ukončeno jednoznačným zamítnutím.

Při interpretaci výsledků je nutné uvažovat i o různých souvislostech a motivacích. Zatímco sportovci nebo uživatelé drog se snaží o normální nezvýšené hodnoty, při prověřování nemoci z povolání je situace složitější. Na jedné straně může být zájem o přiznání nemoci z povolání a získání finančního odškodnění, na druhé straně nelze vyloučit snahu zatajit poškození zdraví z obavy o ztrátu zaměstnání.

V kazuistice M.D. se nakonec rozpor vysokých koncentrací Pb ve vlasech a nehtech uzavřel tak, že se pravděpodobně jednalo o vědomou snahu ovlivnit výsledek pomocí kontaminace vlasů a nehtů např. koncentrovanými mastnými roztoky olova.

Nedílnou součástí stanovení olova ve vlasech a nehtech je sice umytí biologického materiálu vodnou a organickou fází (Rjabuchin, 1978), ale tento standardizovaný postup vyzkoušený na běžně se vyskytující zprášení z normálního nebo pracovního prostředí nemusí stačit na záměrnou vysokou kontaminaci např. ponořením vlasů do koncentrovaného roztoku olova. Takto lze ovlivnit koncentraci ve vlasech a nehtech, ale nelze nasimulovat vysokou hladinu koproporfyrinů III a kyseliny δ - aminolevulové v moči, ani mobilizaci olova po infuzi EDTA.

Pro ilustraci, jak vypadá mobilizace olova u skutečné intoxikace Pb, uvádím graf č. 3, na kterém je po infuzi EDTA jasně patrný vysoký pík olova v moči a δ - aminolevulové kyseliny, jakožto i koproporfyrinu III v moči.

Oprávněnost těchto úvah potvrzuje i to, že po zamítnutí nemoci z povolání byla při další kontrole koncentrace olova ve vlasech a nehtech zcela normální (viz poslední řádka tab. č. 9).

7. ZÁVĚR

BET původně vznikly a byly používány v oblasti průmyslové toxikologie, ale nyní se využívají i v běžné klinické praxi, v životním i domácím prostředí.

Problematika BET je stále aktuální, objevují se nové originální případy využití při monitorování intoxikace nejen v pracovním, ale i v domácím prostředí.

Při monitorování BET v kazuistice pacienta M.D. jsem celkem změřila 67 výsledků, které vyústily ve stanovení závěru, že se pacient M.D. pravděpodobně záměrně snažil zvýšit hodnoty Pb ve vlasech a nehtech a tím chtěl docílit přiznání nemoci z povolání. Díky monitorování celého spektra BET týkajících se intoxikace olovem byla kazuistika pacienta M.D. správně vyhodnocena a nemoc z povolání byla zamítnuta.

8. SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

1. BARDODĚJ, Z., et al. *Expoziční testy v průmyslové toxikologii*. AVICENUM Praha, 1980, 367 s.
2. BENCKO, V., CIKRT, M., LENER, J.: *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*. Grada: Praha 1995. ISBN 80–7169–150-X.
3. ENGSTROM, K., HARKONEN, H., KALLIOKOSKI, P. and RANTANEN, J.: *Urinary mandelic acid concentration after occupational exposure to styrene and its use as a biological exposure test*. Scand. J. Work. Env. Health 2: 21, 1976.
4. HOFFMANOVÁ, I., KAČÍRKOVÁ, P., KUČEROVÁ, I., ŠEVČÍK, R., SÁNCHEZ, D., *Otrava olovem – překvapivá příčina bolestí břicha, obstrukce a anémie*. *Vnitř. Lék.* 2016; 62(2): 157–163
5. HOLEČKOVÁ, M., MICHAJLÍKOVÁ, M., DUBNOVÁ, H., PAVLÍKOVÁ, L.: *sledování olova v krvi u exponovaných osob*. *Fons* 1/2015 , s. 6-8.
6. JÁGR, M., PACÁKOVÁ, V., PETŘÍČEK, M. *Styren a styren - 7, 8 - oxid: Metabolismus a analytické metody stanovení aduktů s proteiny*. *Chemické Listy* 103, 902-910 (2009).
7. KADERÁBKOVÁ, O., MACHARTOVÁ, V., BAJEROVÁ, S., ČECHOVÁ, H., CHUDÁČEK, Z., SENFT, V.: *Neobvyklý rentgenový plicní nálezh u svářeče – kazuistika*. *Pracov. Lék.*, 63, 2011, č. 3-4, s. 147-151.
8. KENŠOVÁ, R. HYNEK, D., ADAM, V., KIZEK, R.: *Působení olova na živé organizmy*. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 2014, 3, 35-37.
9. KLAASSEN, CD., WATKINS, JB., eds.: *Casarett and Doull's essentials of toxicology*, 2nd ed. , New York, The McGraw-Hill Comp., 2010, 435 p., ISBN 978-0-07-162240-0, Figure 2-1 at p. 10.
10. LOS, F., KOTAČKOVÁ, L., ZIMA, T.: *Significant decrease of blood lead levels in lead-exposed workers due to effective preventive measures*. *Klin. Biochem. Metab.*, 21 (42), 2013, No. 2, p. 103-105.

11. MACHARTOVÁ, V., KOHOUT, J., SENFT, V., DVOŘÁK, J., BALIHAR, K., HEJDA, V.: Atypická profesionální otrava olovem v západočeském regionu. *Pracovní lékařství*, 3 (56), 2004, s. 153-155.
12. MACHARTOVÁ, V., SOUKUPOVÁ, K., KOHOUT, J., SENFT, V., TVRZKÝ, J.: Otrava olovem u majitelů střelnice. *Prakt. Lék.* 78, 1998, č. 1, s. 25-26.
13. MANINI, P., DE PALMA, G., ANDREOLI, R., GOLDONI, M., MUTTI, A.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 77, 433 (2004).
14. MARKOVÁ, D., 2016, *Webchemie : Pesticidy aneb globální chemická hrozba*, dostupné z: <http://www.webchemie.cz/pesticidy.html>
15. MRÁZ, J., STRÁNSKÝ, V., *Biologické monitorování a biologické expoziční testy*, SZU, 2009, dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/pracovni-prostredi/biologicke-monitorovani-a-biologicke-expozicni-testy>
16. NOVELA č. 107/2013 Sb. Vyhlášky č. 432/2003 Sb., kterou se stanoví limitní hodnoty ukazatelů BET, dostupné z: http://khsstc.cz/dokumenty/vyhlaska-c--107-2013-sb---kterou-se-meni-vyhlaska-c--432-2003-sb---2701_2701_161_1.html
17. PELCLOVÁ, D. et al.: *Nemoci z povolání a intoxikace*. 3. vyd. Karolinum: Praha 2014. ISBN 978-80-246-2597-3.
18. RACEK, J. et al: *Klinická biochemie*. 2. Vydání, Galén, Praha, 2006, 329 stran, ISBN 80-7262-324-9.
19. RJABUCHIN, J. S.: *Activation analysis of hair as an indicator of contamination of man by environmental trace element pollutants*. Report IAEA/RL/50, IAEA, Vienna, 1978.
20. ROPER, W. L.: *Preventing Lead Poisoning in young children*. US dept. of health and human services, Atlanta, 1991, 107 p., p. 8.
21. SENFT, V.: Biologické expoziční testy (BET). CEVA [online] 5. August 2014, [cit.]. Dostupné z: [www:http://www.ceva-edu.cz/mod/data/view.php?d=13&rid=327](http://www.ceva-edu.cz/mod/data/view.php?d=13&rid=327). ISSN 1803-8999.
22. SENFT, V., BOUCHNER, L., KOHOUT, J., BEJČKOVÁ, H., BARTÁKOVÁ, E., SUCHANOVÁ, L., FIKAR, M.: Další případ neprofesionální otravy olovem. *Prakt. Lék.*, 71, 1991, č. 9, s. 333-334.

23. SENFT, V., RACEK, J., KOHOUT, J.: Stopové prvky v biologických materiálech. Preanalytické zabezpečení. *Čas. Lék. čes.*, 137, 1998, No. 8, s. 240-243.
24. ŠTROSOVÁ, L., *Hematotoxické chemické látky*. CZ.01.07/3.2.02/01.0026, dostupné z:
<http://www.pracovnilekarstvi.eu/doc/ppt/2012-12-5/06.hematotoxlatky.pdf>
25. TOMOKUNI, K., OGATA, M.: *Direct Colorimetric Determination of Hippuric Acid in Urine*. *Clin. Chem.*, 18, 1972, p. 349.
26. TÓTHOVÁ, M.: Spotřební keramika jako neobvyklá příčina otravy olovem, *Postgraduální medicína*, 2003, č. 3: 285-286.
27. USER MANUAL: Milestone ETHOS900 – Rev. 0/98.
28. USER MANUAL: PinAccle 900Z Perkin Elmer, 2014.
29. VLČEK, K. a kol.: Těžká otrava olovem po požití broků, *Časopis lékařů českých*, 2005, č. 4: 282- 284.
30. VODIČKA, P., KOSKINEN, M., NACCARATI, A., OESCHBARTLOMOWICZ, B., VODIČKOVÁ, L., HEMMINKI, K., OESCH, F.: Styrene metabolism, genotoxicity, and potential carcinogenicity. *Drug Metab. Rev.* 38, 805 (2006).
31. WELZ, B., SPERLING, M.: *Atomic Absorption Spectrometry*. Wiley-vch Verlag Weinheim, 3 th ed. 1999, 941 s.

9. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Limitní hodnoty ukazatelů BET v moči (př. č. 2 k vyhl. č. 432/2003 Sb.)

Látka	Ukazatel	Limitní hodnoty	
Anilin	p-Aminofenol	50 mg/g kreatininu	52 µmol/mmol kreatininu
Arsen a arsenovodík	Arsen	0,05 mg/g kreatininu	0,075 µmol/mmol kreatininu
Benzen	S-Fenylmerkapturová kyselina, t-Mukonová kyselina	0,05 mg/g kreatininu 1,5 mg/g kreatininu	0,024 µmol/mmol kreatininu 1,2 µmol/mmol kreatininu
Cyklohexanon	1,2-Cyklohexandiol (po hydrolyze)	50 mg/g kreatininu	0,049 mmol/mmol kreatininu
Dimethylformamid	N-Methylformamid	15 mg/g kreatininu	0,029 mmol/mmol kreatininu
Ethylbenzen	Mandlová kyselina	1500 mg/g kreatininu	1100 µmol/mmol kreatininu
Ethylglykolmono-butylether	Butoxyoctová kyselina (po hydrolyze)	200 mg/g kreatininu	0,17 mmol/mmol kreatininu
Ethylglykolmono-ethylether	Ethoxyoctová kyselina	50 mg/g kreatininu	0,048 mmol/mmol kreatininu
Fenol	Fenol	300 mg/g kreatininu	360 µmol/mmol kreatininu
Fluoridy	Fluorid	10 mg/g kreatininu	60 µmol/mmol kreatininu
Chrom (VI) sloučeniny	Celkový chrom	0,030 mg/g kreatininu	0,065 µmol/mmol kreatininu
Kadmium	Kadmium	0,005 mg/g kreatininu	0,005 µmol/mmol kreatininu
Methanol	Methanol	15 mg/l	0,47 mmol/l
Nikl	Nikl	0,04 mg/g kreatininu	0,077 µmol/mmol kreatininu
Nitrobenzen	p-Nitrofenol	5 mg/g kreatininu	4 µmol/mmol kreatininu
Olovo*	5-Aminolevulová kyselina Koproporfyryl	15 mg/g kreatininu 0,2 mg/g kreatininu	13 µmol/mmol kreatininu 0,035 µmol/mmol kreatininu
Rtuť a její sloučeniny anorganické a fenylrtuťnaté	Rtuť	0,1 mg/g kreatininu	0,056 µmol/mmol kreatininu
Sírouhlik	2-Thiothiazolidin-4-karboxylová kyselina	1,5 mg/g kreatininu	1,04 µmol/mmol kreatininu
Styren	Mandlová kyselina	400 mg/g kreatininu	300 µmol/mmol kreatininu
	Mandlová + fenylglyoxylová kyselina	600 mg/g kreatininu	
Toluen	o-Kresol (po hydrolyze) Hippurová kyselina**	1,5 mg/g kreatininu 1600 mg/g	1,6 µmol/mmol kreatininu 1000 mikromol/mmol kreatininu
Trichlorethylen	Trichloroctová kyselina	100 mg/g kreatininu	70 µmol/mmol kreatininu
	Trichlorethanol	200 mg/g kreatininu	150 µmol/mmol kreatininu
Xyleny	Methylhippurová kyselina	1400 mg/g kreatininu	820 µmol/mmol kreatininu