



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Stanovení CDT metodou kapilární zónové
elektroforézy**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Burešová Kristýna

Vedoucí práce: MUDr. Franěk Tomáš, Ph.D.

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem *Stanovení CDT metodou kapilární zónové elektroforézy* ve Fakultní nemocnici Motol, jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů 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 bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5.2019

.....

podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli MUDr. Tomáši Fraňkovi, PhD. za jeho ochotu, pomoc a rady po celou dobu práce. Dále děkuji ÚLCHKB FN Motol za možnost provedení mé praktické části bakalářské práce. Velké poděkování také patří celé mé rodině, která mě během celou dobu studia podporovala.

Stanovení CDT metodou kapilární zónové elektroforézy

Abstrakt

Abusus alkoholu patří v rozvinutých zemích k velmi závažným celospolečenským problémům s mnoha sociálními a ekonomickými dopady. Diagnostikovat chronický abusus alkoholu může být v mnoha případech velmi komplikované a základem je dobrá spolupráce klinického lékaře a laboratorního pracoviště. Rutinní diagnostika chronického abusu alkoholu je v dnešní době založena na vyšetření GGT, MCV a poměru AST/ALT. Jako marker s nejvyšší diagnostickou validitou se dnes považuje karbohydrát deficientní transferin (CDT). Molekula transferinu se skládá ze dvou polysacharidových řetězců, kde na každém mohou být navázány až čtyři zbytky kyseliny sialové (tzv. sializace). Tato sializace však může být již po dvoutýdenním zvýšeném příjmu alkoholu výrazně snížena. Detekce těchto méně sializovaných molekul transferinu, označovaných jako CDT, může být využita v diagnostice chronického abusu alkoholu. Literární údaje o diagnostické validitě CDT jsou však vysoce variabilní. CDT má odlišnou validitu u žen a u mužů, nejvyšší diagnostické validity dosahujeme právě jeho stanovením v kombinaci s ostatními markery.

Experimentální část byla provedena na přístroji MINICAP, který pracuje na principu kapilární zónové elektroforézy. Měření bylo provedeno z kontrolních materiálů a ze směsného séra pacientů. Z naměřených hodnot byly poté vypočítány potřebné statistické veličiny, jako je aritmetický průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient. Na základě výpočtů byla poté provedena a zhodnocena validace metody na přístroji MINICAP pro stanovení CDT.

Klíčová slova

Alkoholová hepatopatie; karbohydrát deficientní transferin; kapilární zónová elektroforéza; elektroforetické metody; validace.

Determination of CDT by capillary zone electrophoresis

Abstract

Alcohol abuse is part of very serious social problems with many social and economic impacts in developed countries. Chronical alcohol abuse may be in many cases very complicated to diagnose and good cooperation between clinician and laboratory workspace is fundamental. Routine diagnosis of chronic alcohol abuse is nowadays based on GGT and MCV determination and AST/ALT ratio. Recently, as a marker with the highest diagnostic validity is considered Carbohydrate Deficient Transferrin (CDT). The transferrin molecule consists of two polysaccharide chains where on each chain could be attached up to four sialic acids (so-called sialization). However, sialization may be after two weeks of increased alcohol intake significantly reduced. Detection of these less sialized transferrin molecules, known as CDTs, can be used to diagnose chronic alcohol abuse. Unfortunately, informations from literature about the diagnostic validity of CDT are highly variable. CDT validation differs among women and men and the highest diagnostic validity is achieved during determination in combination with other markers.

The experimental part was done on the MINICAP instrument, which works based on the principle of capillary zone electrophoresis. Measurements of control materials and mixed serum patients were performed. From measured values, the necessary statistical values were calculated, such as arithmetic mean, standard deviation and coefficient of variation. Based on the calculations, the validation of the method on the MINICAP instrument was then performed and evaluated for CDT determination.

Key Words

Alcoholic hepatopathy; carbohydrate deficient transferin; capillary zone electrophoresis; electrophoretic methods; validation.

Obsah

Úvod.....	8
1. Teoretická část.....	9
1.1. Alkoholické poškození jater.....	9
1.1.1. Historie alkoholismu.....	9
1.1.2. Patofyziologie alkoholické hepatopatie.....	10
1.1.3. Jaterní onemocnění vyvolané alkoholem.....	13
1.1.4. Další možnosti diagnostiky alkoholické hepatopatie.....	16
1.2. Karbohydrát deficientní transferin.....	20
1.3. Možnosti stanovení CDT.....	23
1.4. Elektroforéza.....	23
1.4.1. Historie.....	23
1.4.2. Obecný princip stanovení.....	24
1.4.3. Prostředí pro elektroforézu.....	25
1.4.4. Dělení elektroforetických metod.....	26
1.4.5. Kapilární zónová elektroforéza.....	29
2. Cíle práce a hypotézy.....	31
3. Metodika.....	32
3.1. Charakteristika pacientů a vzorků použitých v práci.....	32
3.2. Princip přístroje MINICAP FLEX-PIERCING.....	32
3.3. Popis přístroje MINICAP FLEX-PIERCING.....	33
3.4. Použité reagensie.....	36
3.5. Pracovní postup.....	36
3.6. Verifikace metody.....	37
3.6.1. Postup.....	38
3.6.2. Obecné výpočty.....	39
3.7. Statistické vyhodnocení.....	40
4. Výsledky.....	41
4.1. Opakovatelnost měření.....	41
4.2. Reprodukovatelnost měření.....	45
4.3. Porovnání jednotlivých markerů u vybraných pacientů.....	47
5. Diskuze.....	51
6. Závěr.....	54

7. Seznam literatury	55
8. Seznamy obrázků, tabulek a grafů.....	59
9. Seznam příloh.....	60
10. Seznam zkratk.....	61

Úvod

V dnešní moderní době se komplikace v souvislosti s alkoholem objevují snad po celém světě. Mnoho lidí v něm hledá útěchu a pomoc při řešení svých problémů, především pak těch psychického charakteru. U těchto jedinců poté snadno přichází problém se závislostí. Klinická laboratoř ve spolupráci s psychiatrickým oborem pak napomáhá časné diagnostice. Diagnostikovat chronický abusus alkoholu může být v mnoha případech velice komplikované. Postižení často svoji alkoholovou závislost v ambulanci vyšetřujícího lékaře zatají, čímž může být ztracen čas, který mohl být využit k řešení problému. Zde se role klinické laboratoře a stanovení jednotlivých markerů využívá nejvíce. Rutinní diagnostika chronického abusu alkoholu je v současnosti založena na vzájemné kombinaci stanovení GGT, MCV, přínosným ukazatelem je i de Ritisův index AST/ALT. Jako marker s nejvyšší diagnostickou specifitou se považuje CDT, o kterém pojednávám ve své bakalářské práci. V teoretické části popisuji fyziologickou stavbu jater a dopad alkoholu na tuto „chemickou továrnu“ každého organismu. Dále jsou zde zmíněny nejčastější jaterní onemocnění vyvolaná alkoholem a popis jednotlivých použitých vyšetření. V praktické části se zaměřuji na validaci stanovení CDT na přístroji MINICAP FLEX-PIERCING. Jsou zhodnoceny statistické veličiny, zapsány do tabulek a na jejich základě vyhodnoceno, zda je validace vhodná pro zamýšlený účel.

1. Teoretická část

1.1. *Alkoholické poškození jater*

Alkohol patří mezi nejčastější příčinu poškození jater. Spotřeba alkoholu má přímý dopad na mortalitu na jaterní choroby v mnoha zemích. Obecně je množství a druh zkonsumovaného alkoholu úzce spjata s rozvojem jaterního onemocnění.

1.1.1. *Historie alkoholismu*

Svůj vztah k opilosti lidé objevili již v dávné historii, kdy přišli na to, že kvašené nápoje vykazují jisté opojné účinky. Toto zjištění je vedlo ke zkvašování snad veškerého ovoce, co existovalo. Za první surovinu, ze které bylo možné vyrobit požitelný etanol, se považuje med. Výroba medoviny byla známa především pro národy západní Evropy. Východ Evropy využíval ke kvašení spíše suroviny, jako jsou datle, obiloviny, hrozny a jiné druhy ovoce. Konzumace alkoholu je mezi lidstvem úzce spjata s různými oslavami, kdy se opilý člověk dostane do stavu duševního nadšení doprovázeného dobrou náladou. Opilost může být i způsobem, jak se člověk vypořádá se svými starostmi a pochybami, necítí se tolik osamělý, ale naopak plný sil (Sournia, 1999).

Změny, které s sebou účinek požití alkoholu přináší, jsou individuálně velmi variabilní. Obecně lze říci, že v dávkách nižších alkohol vzbuzuje pocit excitovanosti, navozuje euforii, zlepšuje náladu a působí povzbudivě. Se vzrůstajícím množstvím se však začínají projevovat jeho tlumící účinky na CNS, kdy začne docházet k poruchám vnímání, koordinace pohybů a postupnému útlumu životních funkcí, které mohou končit až zástavou dechu a smrtí (Sournia, 1999).

S pojmem „alkoholismus“ se poprvé setkáváme v polovině 19. století. Objevení tohoto termínu přispělo k vnímání člověka, který požíval nadměrné množství alkoholických látek, z lékařského hlediska. Postupem času se také začínají sestavovat statistiky o následcích způsobených alkoholem v různé populaci a určité oblasti. Od poloviny 20. století se alkoholismus začíná považovat za jednu možnou oblast toxikománie, která si dokáže jedince zotročit. Důvody, proč se člověk ocitl v roli alkoholika, jsou zkoumány hlouběji a podrobněji (Sournia, 1999).

1.1.2. Patofyziologie alkoholické hepatopatie

1.1.2.1. Játra

Játra jsou největší a zároveň nejdůležitější žlázou těla člověka. Nachází se v pravém podbráničním prostoru, mají hnědočervenou barvu a zpracovávají velké množství krve s průtokem asi 1500 ml za minutu (Trojan, 2003). Jaterní cirkulace je rozdělena na dvě základní složky. První složka nutritivního oběhu je zabezpečována jaterní tepnou, díky které je zajištěn přívod okysličené krve do jater. Druhý, funkční oběh, je zprostředkovaný vrátnicovou žílou, která přivádí živiny vstřebané v trávicím traktu (Dylevský, 2009). Hmota jater je poměrně měkká a křehká, takže jejich tkáň může být při větších nárazech snadno poraněna a spojena s krvácením. Játra jsou složena ze čtyř laloků, jejich základní funkční jednotkou je lalůček centrální žíly, tvořený trámcovitě uspořádanými hepatocyty, ve kterých jsou lokalizovány enzymy určující charakter metabolických pochodů. Oxidativní procesy se odehrávají v centrální části, procesy redukujícího charakteru probíhají spíše na periferii (Trojan, 2003).

Na povrchu jater se nachází vazivo. Místo, ve kterém do jater vstupují nervy s cévami a zároveň vystupují žlučovody, se označuje jako *porta hepatis*. V parenchymu žlázy je přítomno malé množství kolagenního vaziva, ze kterého jsou vytvořeny ostrůvky tvaru trojúhelníku. Tyto ostrůvky jsou uloženy mezi třemi jaterními lalůčky. Místo styku těchto tří lalůček centrální žíly se nazývá portobiliární prostor. Jaterní parenchym je tvořený jaterními buňkami – hepatocyty, představující základní stavební jednotku jater. Dvě k sobě přiložené řady hepatocytů vytvářejí trámce jaterních buněk. (Čihák et al., 2011).

Jako hlavní metabolické centrum mají játra spoustu fyziologických funkcí, které musí pro náš organismus vykonávat. Mezi hlavní patří zejména energetický metabolismus, játra představují jedno z hlavních míst glukoneogeneze a metabolismu glykogenu. Probíhá v nich syntéza lipidů, sacharidů a proteinů. Další důležitou funkcí je biodegradace a detoxikace, která má své uplatnění jak u látek endogenních (bilirubin, steroidní hormony, cholesterol), tak i u látek xenogenních (různé toxické látky, léky a jejich metabolity). Představují zásadní roli při udržení homeostázy, prostřednictvím detoxikace amonného iontu. Svůj úkol plní také při skladování vitamínů rozpustných v tucích. Jako orgán zodpovědný za tvorbu žlučových kyselin se účastní na procesu trávení a eliminaci spousty látek z těla. Díky přítomnosti Kupfferových buněk se podílejí na imunitních mechanismech při zachytávání cizorodých antigenů (Zima, 2002).

1.1.2.2. *Metabolismus alkoholu*

Etanol je primární alkohol a poměrně malá polární molekula, získává se kvašením cukrů účinkem kvasinek. Díky přítomnosti hydroxylové skupiny má etanol hydrofilní vlastnosti a vytváří vodíkové vazby s vodou. Nejčastěji k absorpci etanolu dochází při orálním podání, dalším způsobem může být absorpce plícemi či kolorektálně. Za standardních podmínek je etanol po perorálním podání rychle vstřebán, z části k absorpci dochází již v dutině ústní, pokračuje v žaludku a v duodenu. Po jednorázovém podání se maximální koncentrace etanolu v krvi dosahuje asi 30 – 60 min po požití (Ehrmann jr. et al., 2006). Časový úsek však může být rozdílný. Resorpce závisí na druhu požitého nápoje, ale také na složení přijaté potravy přítomné v žaludku. Díky silné interakci etanolu s vodou se velmi snadno dostává do všech tělních tekutin. Krví je pak rychle přenášen do celého organismu. Do kosterních svalů, které nevykonávají práci, proniká etanol velmi zřídka, stejně tak se v nízké koncentraci nachází i v tuku a ve tvrdých tkáních. Distribuční objem alkoholu je tedy podobný celkovému obsahu vody v těle, u žen 60% hmotnosti a u mužů 70% hmotnosti (Ehrmann jr. et al., 2006). Z těla je etanol odstraňován především oxidačními procesy a zároveň vylučován močí a dechem. Doba, za kterou se organismus zbaví alkoholu, se pohybuje přibližně okolo 100 mg etanolu/kg tělesné hmotnosti za dobu 60 minut u mužů, u žen je to asi 80 mg/kg hmotnosti za hodinu. Doba a rychlost odstranění etanolu se u chronických alkoholiků odráží od funkčnosti jater a celkového zdravotního stavu (Ehrmann jr. et al., 2006).

Existují tři základní metabolické cesty, které slouží k degradaci alkoholu; 1. alkoholdehydrogenázová cesta; 2. mikrozomální systém oxidace etanolu – MEOS (cytochrom P-450IIE1); 3. jaterní kataláza (Zakhari, 2006). Nejvýznamnější je alkoholdehydrogenázová cesta. U tohoto způsobu odbourávání mají klíčovou roli jaterní enzymy: cytozolová alkoholdehydrogenáza a mitochondriální aldehyddehydrogenáza s nikotinamidadenindinukleotidovými koenzymy. Společným úkolem enzymů je odbourat etanol vzniklý produkcí střevních bakterií, také etanol, který se do těla dostane v potravě či nápojích, a především metabolismus endogenních sterolů. Alkoholdehydrogenáza působí jako katalyzátor oxidace etanolu na acetaldehyd, ten je pak následně oxidován aldehyddehydrogenázou na acetát (Seitz a Mueller, 2014).

Druhý, méně zastoupený typ metabolismu etanolu, je MEOS. Nachází se v endoplazmatickém retikulu buněk jater, ledvin, plic, kůže a mozku. Za pomoci

koenzymu nikotinamidadeninindinukleotidfosfátu je produkcí oxidace acetaldehyd, stejně jako u cesty předchozí. Oxidace probíhající působením katalázy probíhá nejpomaleji. Struktura enzymu obsahuje porfyrinový skelet, jehož centrální atom je Fe^{3+} . Jeho místo je v peroxizomech, produktem této reakce je opět acetaldehyd (Ehrmann jr. et al., 2006).

1.1.2.3. *Alkoholové hepatopatie*

Při akutní intoxikaci etanolem dochází k přeměně etanolu na acetaldehyd a následně na acetát. Tento typ přeměny probíhá jak u cesty alkoholdehydrogenázové, tak i MEOS. Přítomnost acetátu v játrech způsobuje zvýšenou nabídku acetyl - CoA a dojde ke zrychlení syntézy mastných kyselin. V průběhu obou dehydrogenázových reakcí je koenzym NAD^+ redukován na $\text{NADH}+\text{H}^+$. V momentě, kdy je přítomnost redukováného $\text{NADH}+\text{H}^+$ ve zvýšené koncentraci, dojde k nadměrné tvorbě laktátu z pyruvátu a nástupu laktátové acidózy. Důsledkem laktátové acidózy je v ledvinách omezena eliminace kyseliny močové. Snížené množství pyruvátu v důsledku tvorby laktátu způsobuje sníženou glukoneogenezi a tím nástup hypoglykemie. Acetaldehyd, vzniklý po rozpadu alkoholu, je vysoce reaktivní a toxický produkt, který přispívá k poškození jaterní tkáně. Zpomaluje chod citrátového cyklu, dává vznik kyslíkovým radikálům, což vede k peroxidaci lipidů a stimulaci tvorby kolagenu. U akutní intoxikace se mohou projevat důsledky působení etanolu jako rozpouštědla. Etanol má schopnost zvyšovat fluiditu buněčných membrán. Následkem je poškození transportu látek přes membrány a funkčnosti membránových receptorů. Tyto poruchy mají především nervové a psychické projevy. V krátkém čase, po požití alkoholu, se v buňkách jater a tukové tkáně tvoří za katalýzy etylestery mastných kyselin. Etylestery vznikají reakcí etanolu s volnými mastnými kyselinami v cytosolu. Příslušná hydroláza má pak schopnost tyto estery rozkládat za uvolnění mastných kyselin, ze kterých vznikají triacylglyceroly, fosfolipidy a estery cholesterolu. Vznik a působení etylesterů mastných kyselin se považuje za příčinu neoxidativního orgánového poškození při konzumaci alkoholu (Ehrmann jr. et al., 2006).

Chronická intoxikace alkoholem způsobuje zvýšenou hladinu acetyl – CoA a $\text{NADH}+\text{H}^+$, což zvyšuje tvorbu triacylglycerolů, které se ukládají v hepatocytech, protože je blokována aktivita lipoproteinové lipázy a proces zabudování triacylglycerolů do lipoproteinů je zpomalen. (Ehrmann a Hůlek, 2014).

1.1.3. Jaterní onemocnění vyvolané alkoholem

1.1.3.1. Jaterní steatóza

Jedná se o reverzibilní postižení jaterního parenchymu s typickou akumulací triacylglyceolů v hepatocytech ve formě tukových vakuol. Příčinou hromadění lipidů je zvýšená produkce a snížená oxidace mastných kyselin v játrech (Češka et al., 2015).

Podle histologického nálezu rozlišujeme několik typů:

- Makrovezikulární steatóza

Typickým rysem je přítomnost jedné velké vakuoly v cytoplazmě hepatocytu. Přítomnost vakuoly způsobuje odtlačení jádra na okraj. Při alkoholové abstinenci tento typ steatózy vymizí v rozmezí čtyřech až osmi týdnů. Je to nejčastější forma alkoholické steatózy (Ehrmann jr. et al., 2006).

- Mikrovezikulární steatóza

U tohoto typu steatózy se v cytoplazmě nachází početné množství malých tukových vakuol. Jádro zde není podmíněně dislokaci na periferii. Příčinou vzniku zmnožených vakuol je porucha beta – oxidace mastných kyselin probíhající v mitochondriích. Vyskytuje se nejčastěji při poruchách ve spojitosti s léky (Ehrmann jr. et al., 2006).

- lipogranulom

Principem je vznik lipogranulomů způsobený rupturou hepatocytů obsahujících lipidy. Složení lipogranulomů je tvořeno lokální akumulací makrofágů, leukocytů a eozinofilů v okolí vzniklé ruptury. Jejich přítomnost způsobí fibrózu, která však nemá vliv na rozvoj chronického alkoholického postižení jater (Ehrmann jr. et al., 2006).

Dalším typem je tzv. NASH – non-alkoholická steatohepatitida. Nealkoholické tukové onemocnění je charakterizováno akumulací jaterního tuku a je převážně projevem metabolického syndromu. V současné době se používá spíše termín NAFLD- „non – alcoholic fatty liver disease“. NAFLD je považována za nejčastější příčinu vývoje chronického onemocnění jater a jaterní cirhózy. Toto onemocnění je charakterizováno infiltrací jaterního tuku spojeného se zánětem a poškozením hepatocytů. Lidé s NASH, také trpí kardiovaskulárními problémy (Daher et al., 2018).

1.1.3.2. *Jaterní cirhóza*

Podstatou vzniku cirhózy je přestavba jater, kdy se z původní lalůčkovité struktury stávají pseudolalůčky obklopené vazivem. Tento proces vede k poruše původní buněčné mikroarchitektoniky a uzlovité přestavbě jaterního parenchymu s omezenou funkčností (Schuppan a Afdhal, 2008).

Patogeneze

Chronické jaterní poškození je způsobeno důsledkem virového, autoimunitního, léky podmíněného či metabolického onemocnění. Následná fibróza a cirhóza představuje v podstatě hojivý proces a reakci na chronické postižení. Klíčovou roli při vzniku jaterní cirhózy hraje patologická fibrogeneze. Složení vaziva jaterní tkáně zaujímají dvě základní složky – buňky speciální, kde klíčové postavení představují hvězdicové (stelátové) buňky a mezibuněčná hmota, tvořená skupinami makromolekul (kolageny, nekolagenní glykoproteiny, proteoglykany, glykosaminoglykany). Tvorba a depozice pojivové jaterní tkáně – fibrogeneze a odbourávání – fibrolýza, jsou za fyziologických podmínek ve vyrovnaném stavu (Příbramská a Husová, 2007). Porucha zmíněné rovnováhy nastává při chronické stimulaci fibrogeneze s následným nárůstem vaziva. Změny zánětlivě-nekrotického charakteru aktivují Kupfferovy buňky. Aktivace Kupfferových buněk navodí vylučování velkého množství cytokinů, které způsobí stimulaci hvězdicových buněk. Takto stimulované buňky se transformují na myofibroblasty a začnou produkovat molekuly extracelulární matrix, což vede ke zvýšení množství vaziva. Další příčinou patologické fibrogeneze doprovázené mírným zánětem představuje fibróza vyvolaná alkoholem. Dochází k zániku buněk na podkladě steatózy, když praskají, dále pak na podkladě jejich přímého poškození alkoholem, kdy se pod vlivem působení acetaldehydu mění antigenní struktura hepatocytu a ten je poté napadán imunitním systémem, což vede opět k zániku buňky. Smrt buněk vyvolává tvorbu uzlů, jejichž přítomnost narušuje jaterní strukturu. Dochází k rozvoji jaterní cirhózy. K porušení jaterní funkce může dojít již během ukládání vazivové hmoty v Disseho (subendoteliálních) prostorech. Tato lokalizace vede k omezení zásobování hepatocytů výživnými látkami a kyslíkem. Proces fibrózy se jejich poruchou stává intenzivnější. Další příčinou je pokles množství a velikosti pórů, přítomných v endotelové vrstvě sinusoidů, které postupně dostávají vzhled pravých kapilár (kapilarizace sinusoidů). Dochází k omezení výměny látek mezi plazmou

a hepatocyty s nástupem portální hypertenze a dezorganizací lalůčkovité architektiky jater (Ehrmann jr. et al., 2006).

Klasifikace cirhózy

Dle velikosti uzlů má cirhóza následující rozdělení: mikronodulární (velikost uzlů do 3 mm), makronodulární (uzly větší než 3 mm) a smíšený typ. Mezi hlavní příčiny vzniku cirhózy patří chronické virové hepatitidy způsobené viry C nebo B společně s abuserem alkoholu. U většiny alkoholiků se objevuje hepatomegalie v důsledku steatózy. Vznik cirhózy jater je v korelaci s množstvím a také délkou příjmu alkoholu. V dnešní době se považuje pro vznik jaterní cirhózy dávka 60 g alkoholu denně pro muže a 30 g alkoholu pro ženy v časovém rozpětí 10-15 let (Příbramská a Husová, 2007). Mezi další příčiny patří autoimunitní hepatitida. Z metabolických chorob způsobuje cirhotickou přestavbu hemochromatóza, Wilsonova choroba, deficit α -1-antitrypsinu. Další možností jsou cholestatická onemocnění, nealkoholická steatohepatitida, léky a toxiny (Brodanová a Kordač, 1993).

Klinický obraz

Jaterní cirhóza má velmi pestrý klinický obraz, a to od stavu bezpříznakového, až k obrazu jaterního selhání. Rozlišení v klinické praxi spočívá v charakteristice cirhózy kompenzované (latentní) a dekompenzované (pokročilé) (Příbramská a Husová, 2007).

Diagnostika kompenzované jaterní cirhózy může být stanovena již při běžném klinickém vyšetření. Mezi projevy patří úbytek váhy, nechutenství, malátnost, pocit únavy a plnosti žaludku, objevují se tlaky v pravém podžebří, břišní dyskomfort. Mezi objektivní nálezy patří pavoučkové névy, nacházející se na hrudníku, krku a horních končetinách. Na dlaních může být přítomen palmární erytém či Dupuytrenova kontraktura. Mohou se objevit také otoky dolních končetin, velmi příznými příznaky jsou tuhá, zvětšená játra a zvětšení sleziny (Příbramská a Husová, 2007).

Dekompenzovaná cirhóza bývá provázena celkovou slabostí, hubnutím, ikterem a svalovou atrofií. Nastává prořidnutí ochlupení a atrofie gonád, opět se objevují pavoučkové névy, palmární erytém. Dochází k viditelnému rozšíření větších žil v oblasti břišní stěny (*Caput medusae*), které provází portální hypertenze. Vznik portální hypertenze s sebou přináší velmi závažnou komplikaci, v podobě akutního krvácení do GIT z jícnových nebo žaludečních varixů, a s tím spojený vznik ascitu. Dochází k rozvoji

hepatální encefalopatie. Zhoršená funkce jater s sebou přináší sníženou schopnost odbourávat zplodiny dusíku vznikající při metabolismu proteinů. Tyto sloučeniny se začnou hromadit v těle a mají negativní dopad na CNS. Začínají se objevovat problémy se spánkem, zapomínání a poruchy osobnosti. Mezi nápadné příznaky se řadí i *flapping tremor* – zvláštní typ třesu rukou (Gerber a Schomerus, 2000).

U klinického laboratorního vyšetření velmi napomáhá sonografie společně s jaterní biopsií. V laboratorním vyšetření často nalézáme anémii, leukopenii a trombocytopenii. Nachází se zvýšená hladina bilirubinu v séru, hladina albuminu je naopak snižena v důsledku poruchy proteosyntézy, velmi častá je vyšší hladina sérových transamináz a ALP. Cenným ukazatelem je také zvýšená hladina amoniaku v krvi způsobená blokáci přeměny amoniaku na močovinu v játrech (Ehrmann jr. et al., 2006). V moči je výrazně zvýšen urobilinogen (Ehrmann, 2011), při ikteru se objevuje přítomnost bilirubinu (Brodanová a Kordač, 1993).

1.1.4. Další možnosti diagnostiky alkoholické hepatopatie

Laboratorní diagnostika abusu alkoholu je v současnosti založena na určení hladiny alkoholu a jeho metabolitů v krvi, tělních tekutinách, ve vydechovaném vzduchu. Mezi laboratorní markery, které se používají k bližší diagnostice abusu alkoholu, se řadí aktivity sérových aminotransferáz (AST i ALT), GGT, užitečným markérem je také MCV. U pacientů s chronickým abusem alkoholu dochází také ke zvýšení imunoglobulinu A. Tento stav ve většině případů přetrvává i měsíce po abstinenci (Wohl et al., 2003).

Aminotranferázy

AST a ALT patří mezi nejčastěji používané a nejcitlivější enzymy vypovídající o funkčnosti jaterní buňky. Patří mezi testy na integritu a prostupnost membrán hepatocytu. Oba enzymy mají důležitou roli v glukoneogenezi a tvorbě glukózy ze substrátu bez přítomnosti sacharidů (Masopust, 1998).

Asparátaminotransferáza (AST)

Nachází se v buňkách srdečního a kosterního svalu, v ledvinách, pankreatu, plicích a erythrocytech. Vyskytuje se ve dvou izoformách, jedna izoforma je přítomna v cytoplazmatické části buňky, druhá je situována v mitochondriích. Cytoplazmatická frakce se do krve uvolňuje snadno i při mírném poškození hepatocytů, kdy dochází ke zvýšení permeability buněčné membrány. AST mitochondriální přechází do krve v momentě nástupu většího poškození či nekrózy jaterní buňky. Funkcí enzymu je přenos aminoskupiny z asparátu na oxoglutarát za vzniku oxalacetátu a glutamátu (Průša, 2012). Biologický poločas celkové AST je 17 hodin (Zima, 2002).

Alaninaminotransferáza (ALT)

ALT je přítomna především v játrech a ledvinách, ale může být obsažena i v jiných tkáních, podobně jako AST. Rozdíl oproti AST je v jeho lokalizaci, nachází se pouze v cytoplazmě. Úkolem ALT je transport aminoskupiny z alaninu na oxoglutarát za vzniku pyruvátu a glutamátu (Průša, 2012). Biologický poločas ALT je 47 hodin (Zima, 2002).

Jako koenzym obou transferáz působí vitamin B6 pyridoxal-5'- fosfát (PDP). V nepřítomnosti tohoto koenzymu dojde k poklesu celkové aktivity aminotransferáz. V extraktech tkání po purifikaci a sérových referenčních materiálech chybí PDP úplně, proto se během stanovení katalytické koncentrace přidává standardizované množství PDP do reakční směsi (Dastych et al., 2015). Stanovení ALT je založeno na reakci: α - alanin + 2-oxoglutarát, při které probíhá transaminace a vznikne pyruvát a α - glutamát. Vznikající pyruvát dále reaguje s $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ za katalýzy laktátdehydrogenázy. Pokles koncentrace $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ je sledována kineticky při 340/410 nm. Rychlost poklesu absorbance je úměrná katalytické koncentraci ALT ve vzorku (SOP ÚLCHKB). Při stanovení AST probíhá reakce: L – aspartát + 2- oxoglutarát, při které proběhne transaminace a vznikne oxalacetát a α - glutamát. Vznikající oxalacetát dále reaguje s $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ za katalýzy malátdehydrogenázy. Pokles koncentrace $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ při 340/410 nm je sledován kineticky a je přímo úměrný koncentraci AST ve vzorku (SOP ÚLCHKB).

Referenční hodnoty

ALT: 0,1-0,78 μ kat/L

AST: 0,7-0,72 μ kat/L

(Průša 2012) :

Interpretace

Zvýšení sérové aktivity obou enzymů nastává u jaterních chorob. Obecně platí, že aktivita ALT je vyšší než AST s výjimkou alkoholového poškození jater a Reyova syndromu. Nejvyšší hodnoty se nacházejí při virových hepatitidách, toxickém a polékovém poškození jater, cirkulačním šoku. Naopak pokles hodnot enzymů může ukazovat na odeznění onemocnění, ale také masivní nekrózu. Pro chronické a akutní hepatitidy je typické zvýšení 20- 30x, stejně tak pro toxické poškození. Hodnoty zvýšené méně než 3x, nacházíme u jaterní steatózy, chronické hepatitidy, nealkoholové jaterní steatofibrózy. U jaterních cirhóz a neoplazií dochází k mírnému nárůstu sérových hodnot AST i ALT (Průša, 2012).

U alkoholického poškození je velmi důležitý a vypovídající de Ritisův index, tzn. poměr AST/ALT. Pro choroby jater způsobených alkoholem, je specifická hodnota poměru vyšší než 2. Poměr <1 je typický při virové hepatitidě. Při progresi do jaterní cirhózy stoupají hodnoty na >1 (Zima, 2002).

Hodnota enzymů kolísá v procentuelním rozmezí 10–30 % v závislosti na cirkadiánní variaci, ať už jde o člověka zdravého či trpícím jaterním postižením. U velmi obézních jedinců se hodnoty enzymů zvyšují až o 40% (Ehrmann jr. et al. 2006). Příčinou bývá ve většině případů NASH. Dalším faktorem, který může mít vliv na zvýšení hladiny AST je pohybová aktivita. Po velké fyzické zátěži mohou hodnoty stoupnout až na trojnásobek (Dastych et al., 2015).

Gama-glutamyltransferáza (GGT)

Gama-glutamyltransferáza se řadí k obstrukčním enzymům. Vyskytuje se v buněčných membránách, v proximálních tubulech ledvin, srdci a mozku. Jeho úkolem je přenos gama-glutamylového zbytku z gama-glutamylových peptidů na peptidy jiné, nebo na AMK. GGT se nachází také v semenných váčcích a prostatě, což způsobuje zvýšenou hladinu GGT u mužů. Stejně tak může být GGT vyšší u novorozenců, neboť je přítomna i v placentě. V případě jater se GGT objevuje ve

žlučových cestách, hepatocytech, také ve tkáních pankreatických vývodů a v epiteliálních buňkách žlučových cest. Existuje však i v mikrozomální izoformě, která má svůj klinický význam především při abusu alkoholu (Hůlek et al., 2018).

Jako metoda stanovení hladiny GGT se využívá následující reakce: glutamyltransferáza přítomná ve vzorku katalyzuje přenos glutamylové skupiny ze syntetického substrátu (L- γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid) na glycyglycin za vzniku glutamylglycyglycinu a 5-nitro-2-aminobenzoátu. Rychlost vzniku 5-nitro-2-aminobenzoátu je úměrná aktivitě enzymu GGT ve vzorku a je měřena při 410/478 nm (SOP ÚLCHKB).

Referenční hodnoty:

muži: 0,14-0,84 μ kat/L

ženy: 0,14-0,68 μ kat/L

(Průša, 2012).

Interpretace

Stoupající hodnoty GGT se mohou objevovat i u spousty mimojaterních chorob, jako je srdeční infarkt, renální insuficience, obstrukční choroby dýchacích cest, diabetu či při onemocnění pankreatu. V případě postižení jater hodnota GGT koreluje s hodnotou ALP. Hodnoty GGT při cholestáze dosahují v průměru dvanásobného zvýšení ve srovnání s vzestupem ALP o trojnásobek. Při onemocnění žlučových cest se uplatňuje přestup GGT do cirkulace žluči a hodnoty GGT dosahují až pětinasobného zvýšení. Důsledkem hromadění tuku v játrech (jaterní steatóza) se hladina GGT zvýší asi 2-3 krát (Hůlek et al., 2018).

Patologicky zvýšené hodnoty izolované formy GGT se vyskytují především u hepatobiliárních onemocnění, dále působením hepatotoxických látek např. léky, chemikálie z průmyslu a zemědělství, přírodní a syntetické jedy. Stejně tak na zvýšení GGT působí při dlouhodobějším užívání i etanol. Z tohoto důvodu se GGT používá jako spolehlivý marker pro zjištění chronického abusu alkoholu, kdy hodnoty enzymu dosahují až desetinásobného zvýšení (Hůlek et al., 2018).

Střední objem erytrocytu MCV

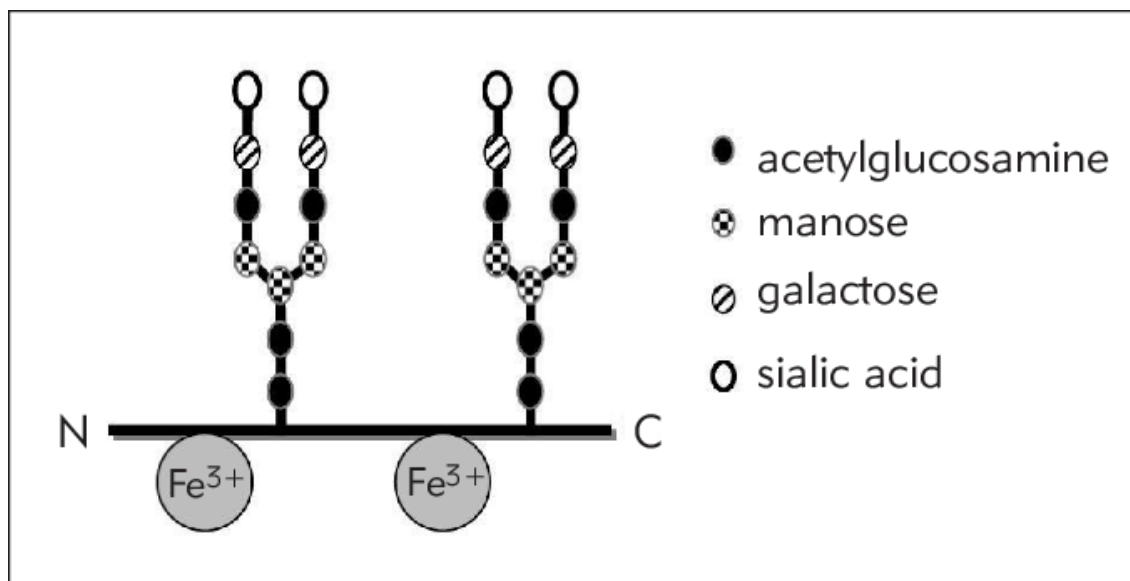
Střední objem erytrocytu vyjadřuje průměr objemů v erytrocytech, které jsou hodnoceny na příslušném typu hematologického analyzátoru. MCV je rovněž velmi spolehlivý ukazatel dlouhodobého abusu alkoholu (Krč, 2007). Ke zvýšení dochází asi po šesti týdnech abusu, v případě abstinence dochází k poklesu po dvou až třech měsících. Zvýšení MCV se odráží od množství přijatého alkoholu (10 g etanolu denně způsobí zvýšení o 1,7 fl MCV). Na zvýšeném MCV se podílí také porucha metabolismu vitamínu B 12 a kyseliny listové, užívání antiepileptik či kouření (Wohl et al., 2003).

Etylglukuronid

K dalšímu zjištění abusu je vhodné také vyšetření etylglukuronidu. Etylglukuronid stanovovaný především v moči, ve vlasech a nehtech (Paul et al., 2019), je přímým metabolitem etanolu. Je dobře rozpustný ve vodě a tvořen konjugací etanolu s aktivovanou kyselinou glukuronovou. Je považován za biomarker užitečný při stanovení nedávného příjmu alkoholu v krvi i v moči. Detekce etanolu v moči je možná několik hodin po požití, zatímco EtG zůstává v moči až 80 hodin po konzumaci alkoholu. Jeho monitorování se využívá především pro kontrolu abstinence, společně s CDT pro diagnostiku chronického abusu alkoholu (Skopp, 2000).

1.2. Karbohydrát deficiční transferin

Karbohydrát deficiční transferin je považován za vhodný marker s vysokou specifitou chronického abusu alkoholu. Transferin se řadí mezi nejvýznamnější sérové proteiny. Své uplatnění má v transportu železa v plazmě. Jeho molekulová hmotnost je asi 79,6 kDa (Cylwik et al., 2006).

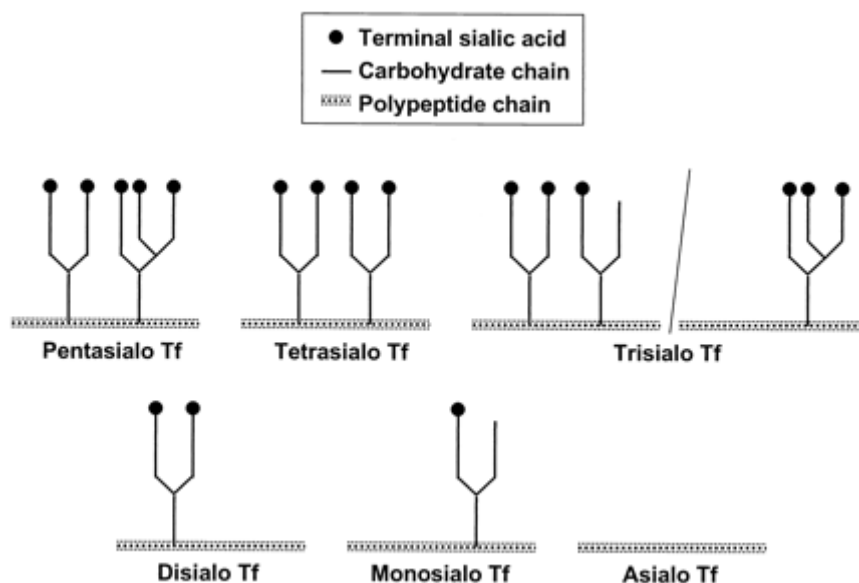


Obrázek 1: Schématická struktura transferinu

(Zdroj: Cylwik, et al., 2006)

Skládá se z jednoho polypeptidového řetězce, obsahujícího dvě vazebná místa pro železo a dva N-terminální oligosacharidové řetězce (Cylwik et al., 2006).

Každý z těchto oligosacharidových řetězců může obsahovat 0–4 terminální sialové kyseliny nesoucí negativní náboj. V séru tak mohou být přítomny asialo – až oktasialo – formy transferinu. V procentuelním zastoupení celkového transferinu převažuje izoforma tetrasialotransferinu s 64-80 %, formy asialo- a monosialo- jsou u zdravých jedinců prakticky nedetekovatelné (Arndt, 2001).



Obrázek 2: Struktura hlavních izoform sérového transferinu

Zdroj: (Helander et al., 2001).

Za CDT jsou považovány izoformy s izoelektrickým bodem vyšší hodnoty než 5,7. Na izoelektrický bod (pI) má prvořadý vliv množství sialových kyselin, které jsou na molekulu transferinu navázány. K CDT přiřazujeme formy asialo-, monosialo- a disialo-. Trisialoforma není ke stanovení CDT zahrnuta, neboť se zjistilo, že konzumace alkoholu neovlivňuje jeho hladiny. Vedle sializace je hodnota izoelektrického bodu ovlivněna také saturací železem a změnami ve struktuře proteinového řetězce, v němž hraje roli ve většině případů genetika (Arndt, 2001).

Osoby, které přijmou 50–80 g alkoholu za den po dobu nejméně dvou týdnů dochází k ovlivnění syntézy N – terminálních oligosacharidových řetězců a poklesu jejich sializace. Plazmatický poločas těchto modifikovaných molekul se tím prodlužuje až na dva týdny. Během abstinence se hladiny CDT normalizují do jednoho měsíce, je tedy možné využít CDT i jako marker pro kontrolu abstinence. Jako hlavní přínos a přednost CDT ve srovnání s ostatními metodami, které jsou používány v rutinní klinické laboratoři k určení nadměrné spotřeby alkoholu, považujeme jeho pružnost reakce na aktuální změny v příjmu etanolu. Nicméně, dochází i k situacím, kdy se hodnoty CDT vyskytují mimo referenční meze i bez předchozího excesivního pití alkoholu. Na falešně pozitivní výsledky má vliv závažné onemocnění jater (primární biliární cirhóza, chronická virová hepatitida a hepatocelulární karcinom), vrozené poruchy glykosylace, genetické D-varianty transferinu, anémie s nedostatkem železa.

Falešně negativní výsledky se nacházejí u akutních traumat spojených se ztrátou krve (Helander et al., 2001).

1.3. Možnosti stanovení CDT

Analýza CDT začíná saturací Fe^{3+} , kdy je cílem provést plnou saturaci všech molekul transferinu. Dalším krokem je separace CDT izoform, a dalších složek séra, pomocí elektroforetických a chromatografických metod. Za nejpřesnější metodu a zároveň technicky velmi náročnou se považuje izoelektrická fokusace. U chromatografických metod se používá aniontová chromatografie nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Wohl et al., 2003).

Ke konečnému kroku detekce a poté kvantifikaci CDT izoform slouží imunologické metody RIA. Vyjádření koncentrace je možné absolutně v mg/l, ale také jako procentuelní zastoupení konkrétních forem z celkového transferinu. Diagnostická validita CDT zmíněná v jednotlivých studiích zahrnuje informace o poměrně vysoké specifitě, a to okolo 80–90 %, senzitivita v rozmezí 60 až 70 %. Nejvyšší specifitu a zároveň senzitivitu vyjadřuje kombinace stanovení CDT, GGT a MCV (Wohl et al., 2003).

1.4. Elektroforéza

1.4.1. Historie

Krátce po objevu, že galvanické články slouží jako zdroj elektrického proudu, začali lidé uvažovat, co se při průchodu elektrického proudu látkami různého typu odehrává. Přišli na to, že v případě roztoků a tavenin různých látek nastává chemická reakce na rozhraní s materiálem, kterým je proud do roztoku látky přiváděn. Tento typ reakcí byl nazván jako elektrolyza, kterou se zabývá vědní část chemie – elektrochemie. Vedle reakcí probíhajících na elektrodách dochází při průchodu proudu i k migraci nabitých částic mezi elektrodami. Jedná se například o ionty a koloidní částice. Došlo k zjištění, že každý druh částice, který se pohybuje v elektrickém poli, je charakteristický svojí rychlostí. Této charakteristické vlastnosti se dá využít pro separaci a analýzu směsi. Metoda zabývající se tímto zjištěním se dostala název elektroforéza (Vesterberg, 1989). Pohyb anorganických částic v elektrickém poli koloidního roztoku byl popsán v roce 1892. Krátce poté se ukázalo, že na podobném principu putují i proteiny ve vodných roztocích. Roku 1937, švédský elektrochemik Arne Tiselius, zkonstruoval zařízení, umožňující dělení proteinů krevního séra založené na rozdílné rychlosti jejich pohybu

v elektrickém poli. Za popis metody „pohyblivého rozhraní“ (moving boundary), získal Tiselius v roce 1948 Nobelovu cenu. Tato metoda, dnes známá jako zónová elektroforéza, se při diagnostice používá na mnoha klinikách ve velmi podobném uspořádání (Gaš, 2001).

Vývoj elektroforézy začíná v padesátých letech. Objevuje se popis separace i aminokyselin a anorganických iontů. Přichází objev dalších elektroforetických technik, jako jsou izoelektrická fokusace a izotachoforéza (Vesterberg, 1989). Zmíněné metody mají svůj základ na odlišných principech a praktické využití spočívá v jejich kombinaci. Rozdílnost těchto metod je patrná i z prostřední, která v nich historicky byla použita: polymerní gel, papír a kapilára (Gaš, 2001).

Začátky elektroforézy jsou spojeny s používáním papíru, pro jeho finanční nenáročnost a zároveň lehkou použitelnost bez zvláštní přípravy. Škrobový gel jako médium pro elektroforézu byl použit Oliverem Smithiesem v roce 1955. Kohn o dva roky déle použil jako nosič acetát celulózy. Polyakrylamidový gel byl použit v roce 1959 Omsteinem, Davisem, Raymondem a Weintraubem (Pazourek, 2003). Počátkem devadesátých let dvacátého století se J.W.Jorgenson a K.D. Luckasové podařilo popsat separaci některých iontů (aminokyselin, dipeptidů, aminů) pomocí zónové elektroforézy v tenké skleněné kapiláře o vnitřním průměru 75 μm . Bylo velmi překvapující, jak účinná byla tato separace v porovnání s rozšířenou kapalinovou chromatografií (Pazourek, 2003).

Svůj vývoj v průběhu let zaznamenaly také detekční techniky. Většina složek, které procházejí separací, je prostému oku neviditelná. Z tohoto důvodu byly vyvíjeny vizualizační a kvantifikační techniky. Patří mezi ně například vybarvování gelů, imunoelektroforetické metody, také dvourozměrná elektroforéza a další různé blotting- techniky (Gaš, 2001).

1.4.2. *Obecný princip stanovení*

Princip elektroforézy je založen na rozdílném pohybu analytů v médiu za působení elektrického pole. Jako médium bývá nejčastěji použit vodný tlumivý roztok – elektrolyt. K vytvoření elektrického pole slouží vkládání konstantního stejnosměrného napětí mezi dvě elektrody, kde dochází k výměně elektricky nabitých částic. Typ elektrody lze určit podle elektrochemického děje, který na ní probíhá. V případě, že na elektrodě probíhá redukce, mluvíme o katodě. Pokud na elektrodě probíhá oxidační děj, jedná se o anodu.

V průběhu dělení částic putují kladně nabitě kationty směrem ke katodě a záporně nabitě anionty k anodě. Pohyb jednotlivých částic je podmíněn vlastnostmi pufru, intenzitou elektrického proudu, tvarem a velikostí částic, velikostí náboje a také stupněm disociace. Elektroforetické metody lze využít na dělení nízkomolekulárních látek, ale i na dělení látek vysokomolekulárních (Pavlíková et al., 2007).

Elektroforetická pohyblivost vyjadřuje pohyb iontů v elektrickém poli, který je ovlivněn elektrostatickým přitahováním elektrického náboje k elektrodě, s opačným nábojem. Jaká bude pohyblivost iontu, závisí především na jeho velikosti, náboji a také na viskozitě prostředí. Ionty o různé velikosti poloměrů s různým nábojem se v elektrickém poli pohybují za konstantní rychlosti přímo úměrné intenzitě elektrického pole a velikosti náboje iontu (Kašička, 1997).

Vztah pro vyjádření rychlosti pohybu iontů: (http://fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/inan/)

$$v = \mu E = \mu \frac{U}{l}$$

V uvedeném vztahu v vyjadřuje rychlost pohybu iontů, μ je elektroforetická pohyblivost, E vyjadřuje intenzitu elektrického pole, U je napětí a l je vzdálenost mezi elektrodami.

1.4.3. *Prostředí pro elektroforézu*

- Elektroforéza na papíře

Pro první elektroforetické separaci byl používán papír napuštěný elektrolytem, neboť byl levný. Výhodou využití tohoto typu separace bylo, že papír obvykle nenesl žádný náboj, v tom případě nemůže interagovat s analytem. Vzorek bývá nanášen přímo na plochu papíru. Papír položený na chladicí desce má konce ponořeny do elektrolytů, ve kterých jsou přítomny konce elektrod. Pro sledování migrace vzorku se zároveň používají ionizovaná barviva a standardy. Protože papír vykazuje větší elektrický odpor než gely, musí být aplikováno vyšší napětí. Omezení papírové elektroforézy je dáno póry papíru (velikost a kvalita), neboť nedochází k přímé kontrole uživatelem a technika tak ztrácí na citlivosti a reprodukovatelnosti (Pazourek, 2003).

- Elektroforéza v gelu

Důvodem, proč byl zaveden gel jako separační prostředí, byla možnost narušení separace či rozmytí zóny analytu, zapříčiněné pohybem kapaliny v důsledku tepla uvolňovaného průchodem elektrického proudu. Mezi používané gely patří agaróza nebo polyakrylamid (Klouda, 2003).

Gely z agarózy jsou používány u analýz, kdy je zapotřebí gel s většími póry. Uplatňují se především při separaci velkých makromolekul. Agar se získá izolací z červené mořské řasy, je složen z agarózy a agaropektinu. Z důvodu absence elektrického nabití agarózy, je vhodné její využití jako elektroforetické matrice. Agarózové roztoky bývají zředěné, její struktura jí umožňuje přijetí velkého množství vody (Westermeier, 2016).

Elektroforéza v polyakrylamidu se využívá pro separaci převážné většiny proteinů a menších oligonukleotidů. Struktura polyakrylamidových gelů je tvořena z monomerů akrylamidu, které jsou zesíťovány do dlouhých řetězců pomocí kovaletní vazby, které se účastní tzv. crosslinker N,N' - methylenbisakrylamid. Tímto způsobem vzniká čirý gel s nízkou elektroosmózou (Klouda, 2003).

- Elektroforéza v kapiláře

Nosičem tohoto typu elektroforézy je kapilára naplněná základním elektrolytem nebo gelem vedoucím elektrický proud. Konce kapiláry jsou ponořeny do nádob, ve kterých je přítomen elektrolyt (Klouda, 2003). Vnitřní průměr křemenné kapiláry obvykle nebývá větší než 100 μm a délka se pohybuje v rozsahu 30–80 cm (Kašička, 1997).

1.4.4. Dělení elektroforetických metod

S úspěšností při separaci látek lze počítat v případě dostatečné odlišnosti separovaných látek v elektroforetické pohyblivosti. Snaha v úspěšnost efektivní separace vedla k vytvoření technik a jejich různých modifikací. V obecném principu lze elektroforetické metody rozdělit do základních třech skupin. Do první skupiny patří volná elektroforéza (elektroforéza s pohyblivým rozhraním). Metody v této skupině při dělení nevyužívají žádné nosiče, řadíme sem volnou gelovou elektroforézu (fGE) společně s volnou kapilární elektroforézou (fCE). Skupinu druhou tvoří zónová elektroforéza (elektroforéza na nosičích). Tyto metody při svém dělení využívají elektroforetické nosiče, např.

agarový, agarózový či polyakrylamidový gel. Ve třetí skupině se vyskytují metody rovnovážné elektroforézy, tedy metody: izoelektrická fokusace a izotachoforéza (Káš et al., 2005).

1.4.4.1. Volná elektroforéza

Ve „volné“ technice je elektroforéza prováděna ve vodných roztocích elektrolytu, ve kterém částice putují k elektrodě s opačnou polaritou. Rychlost pohybu částic je přímo úměrná velikosti jejich náboje. Vzájemné oddělování a rychlost migrace závisí také na použitém gradientu napětí. I přes jednoduchost metody je velmi nevýhodné její použití, neboť dojde ke snadnému porušení konvenčních proudů v kapalině způsobených vlivem tepla, které vzniká průchodem elektrického proudu (Pazourek, 2003).

1.4.4.2. Zónová elektroforéza

Zónová elektroforéza je nejjednodušší elektromigrační technikou, která je v klinických laboratořích využívána k analýze sérových proteinů. Jako nosič u tohoto typu elektroforézy bývá používán agarózový gel. Délka separace se pohybuje v poměrně krátkém časovém rozpětí, okolo 30 minut. Průběh separace se odvíjí od aplikace vzorku do startovní zóny (Westermeier, 2016).

- SDS elektroforéza

SDS elektroforéza probíhá v polyakrylovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS). Průběh separace je charakteristický výhradně dělením na základě molekulární hmotnosti separovaných látek. SDS představuje záporně nabitý detergent a po vazbě s bílkovinou dochází ke vzniku komplexů SDS-bílkovina nesoucí konstantní náboj na jednotku hmoty. Poměr látek pro vznik komplexu 1,4 g SDS na 1 g proteinu. Z důvodu negativního náboje SDS, kterým přispívá k překrytí náboje proteinu, je možná separace pouze podle molekulové velikosti, ne podle náboje. Konečný náboj je vždy negativní a přímo úměrný velikosti proteinu (Pazourek, 2003).

- Kapilární zónová elektroforéza

U této metody dochází k dělení složek v závislosti na pH elektrolytu. Práce probíhá s volnými roztoky a analýza trvá poměrně krátkou dobu.

- Afinitní elektroforéza

V tomto případě se jedná o typ elektroforézy na nosičích. Separované látky se pohybují v gelu, ve kterém je přítomný imobilizovaný ligand. Tento ligand je specifický alespoň pro jednu složku analyzované směsi – dochází ke tvorbě specifického komplexu. Ta složka s afinitou k ligandu se při průchodu gelem zpomaluje. Neaktivní látky prochází gelem za normální rychlosti (Pazourek, 2003).

1.4.4.3. Dvourozměrná elektroforéza

Tento typ elektroforetické techniky je založen na kombinaci dvou metod. První použitá metoda je izoelektrická fokusace (IEF), kdy se rozdělí proteiny dle svého náboje. Druhou použitou metodu je polyakrylamidová elektroforéza za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Zde probíhá další dělení již rozdělených proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Takto separované bílkoviny jsou fixovány v gelu a následně podrobeny vizualizaci a analýze. K vizualizaci vzorku se používá stříbrné nebo modré barvy Coomassie. Po barvení se gely skenují a vystavují analýze hmotnostní spektrofotometrií (Rees-Unwin et al., 2004).

1.4.4.4. Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace umožňuje dělení látek amfoterního charakteru na základě jejich izoelektrických bodů (pI), tzn. dle rozložení kladných a záporných nábojů jejich molekul. Separace částic probíhá v gradientu pH. Nejnižší pH je u anody a postupně roste směrem ke katodě. Gradient je vytvořen působením elektrického pole v elektrolytu (amfolytu). Vlivem napětí pak dělené látky migrují v tomto prostředí až do místa separace, jehož hodnota pH je rovna izoelektrickému bodu. Tím dojde k rozdělení vzorku na zóny vykazující stejnou hodnotu pH. Aby mohla být provedena detekce UV detektorem po dosažení ustáleného stavu, musí být provedena mobilizace hydrodynamického toku, který je vyvolán přetlakem anebo podtlakem u konců kapilár (Kašička, 1997).

1.4.4.5. Izotachoforéza

Princip spočívá v aplikaci vzorku mezi vedoucí a koncový elektrolyt. Vedoucí elektrolyt obsahuje vedoucí aniont. Pohyblivost tohoto aniontu je vyšší než pohyblivost jakékoli složky vzorku. V koncovém elektrolytu je obsažen koncový aniont s pohyblivostí pomalejší, než je pohyblivost kterékoli složky vzorku. Při průchodu elektrického proudu

migruje vzorek různou rychlostí. Následně dojde k uspořádání složek analyzovaného vzorku na základě jejich mobilit. V době ustanovení rovnováhy se jednotlivé složky vzorku postupně seřadí do oddělených zón podle klesající pohyblivosti, od nejrychlejší po nejpomalejší složku (Everaerts et al., 1976).

1.4.5. Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) patří mezi nejpoužívanější typ kapilární elektroforézy (CE). Separační mechanismus je založen na rozdílné pohyblivosti iontů v elektrickém poli. Využívá se především pro separaci těch iontů, které se liší nábojem, tvarem a molekulovou hmotností. Tento typ elektroforézy umožňuje separaci pouze nabitých částic. Molekuly s menší velikostí, ale větším nábojem, se pohybují rychleji než molekuly větší s nábojem menším. Molekuly neutrální jsou uvedeny do pohybu v důsledku působení elektroosmotického toku. Elektrolyt vedoucí elektrický proud tvoří výplň kapiláry (Klouda, 2003).

Průběh CZE se řadí mezi volný typ elektroforézy bez nosiče v tenké kapiláře, která je naplněna základním elektrolytem. Tento elektrolyt představuje vhodně zvolený pufr, složený z roztoků kyselin nebo zásad a jejich solí. Hlavní úlohou těchto pufrů je udržet příznivé pH pro probíhající separaci a zároveň dát možnost průchodu elektrického proudu. Ochranný obal křemenných kapilár vytváří polyimidový povlak z důvodu křehkosti kapiláry. Na místě, kde dochází k detekci, malý kousek povlaku chybí. Délka kapiláry se pohybuje v rozmezí mezi 25-100 cm s průměrem 50–75 μ m. Aplikace vzorku probíhá do konce kapiláry vzdálenějšího od detektoru. Nejběžnější je vysokotlaké dávkování, kdy je konec kapiláry ponořen do nádoby obsahující roztok vzorku. Princip nejvíce používaných detektorů je založen na sledování absorpce UV záření za využití diodového pole, možné je i využití fluorescenčních detektorů. Z důvodu poměrně malého průměru kapiláry, je kladen velký důraz na vysokou citlivost detektorů. V momentě, kdy kapilára projde detektorem, přichází na řadu počítačové vyhodnocení píků v podobě elektroforeogramu – výsledného záznamu (Klouda, 2003).

Elektroosmotický tok

Kapiláry z křemenného materiálu na svém povrchu obsahují skupiny: $-\text{SiOH}$ (silanolové), u kterých je v roztoku možná disociace na $-\text{SiO}^-$. Tato disociace je závislá na prostředí pH. Na rozhraní stěny kapiláry a roztoku dojde ke vzniku elektrické dvojvrstvy tzv. Sternova vrsta (Dutta a Beskok, 2001). Dojde ke kompenzaci nepohyblivého povrchu kapiláry nesoucí negativní náboj s kationty, které se volně pohybují v roztoku. Roztok je tedy převážně tvořen kladně nabitými ionty a jako celek je tedy v přítomnosti elektrického pole unášen směrem ke katodě. Jakou rychlost bude mít elektroosmotický tok je určeno pomocí pH a iontové síly roztoku. Čím vyšší pH a nižší iontová síla, tím je rychlost elektroosmotického toku vyšší (Kašička, 1997).

2. Cíle práce a hypotézy

C1: Zavedení metody stanovení CDT na přístroji MiniCap

H1: Předpokládáme, zavedení přesné, rychlé a spolehlivé analytické metody na vyšetření CDT v séru pacientů k diagnostice chronického abusu alkoholu

C2: Ověření validačních parametrů

H2: Na základě vypočítaných validačních parametrů metody, můžeme posoudit analytické vlastnosti metody a rozhodnout, zdali je vhodná k rutinnímu použití v klinické laboratoři

C3: Diagnostika chronického abusu alkoholu v souboru 30 pacientů obou pohlaví a vyhodnocení naměřených výsledků

H3: Předpokládáme, že stanovené hodnoty CDT v souboru pacientů mohou zvýšit diagnostickou výtěžnost ostatních markerů a spolehlivěji verifikovat jedince s chronickým abusem alkoholu

3. Metodika

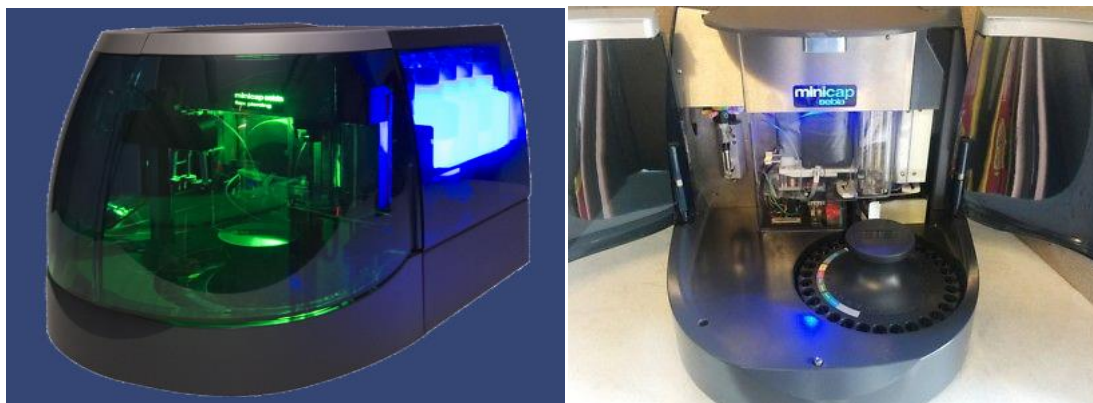
3.1. *Charakteristika pacientů a vzorků použitých v práci*

K analýze CDT na systému MINICAP FLEX-PIERCING bylo použito 60 patientských vzorků (průměrný věk 57,5 let, věkové rozmezí od 25 do 74 let), z toho 40 mužů (průměrný věk 59 let, věkové rozmezí 31 až 77 let) a 20 žen (průměrný věk 54,5 let, věkové rozmezí od 24 až 76 let). Ověření opakovatelnosti bylo provedeno ze dvou směsných sér. První směsné sérum bylo připraveno z pěti patientských vzorků, stejně tak i druhé směsné sérum. Potřebný minimální objem k analýze jednoho vzorku byl 200 μ l séra. Každý vyšetřovaný pacient podstoupil informovaný souhlas směrnice GDPR ve FN Motol.

3.2. *Princip přístroje MINICAP FLEX-PIERCING*

MINICAP CDT je určen k dělení isoform transferinu lidského séra v přítomnosti alkalického pufru s $\text{pH} = 8,8$. Isoformy transferinu normálního séra se na tomto přístroji rozdělují na základních 5 frakcí. Tyto frakce jsou rozděleny podle míry jejich sializace: asialotransferin (nesializovaný), disialotransferin, trisialotranferin, tetrasialotransferin a pentasialotransferin. Ty formy, které jsou málo sializované (tedy asialo-, mono-, disialo-), vytváří CDT. Systém MINICAP je založen na principu kapilární elektroforézy ve volném roztoku. Molekuly s elektrickým nábojem jsou děleny podle elektroforetické pohyblivosti v alkalickém tlumivém roztoku.

MINICAP má dvě kapiláry, které jsou v paralelním zapojení. Toto zapojení umožňuje 2 paralelní analýzy pro kvantifikaci CDT. Vzorek je ředěn specifický ředícím roztokem, který je nastříknut aspirací na anodovém konci kapiláry. Dalším krokem je dělení bílkovin pod vysokým napětím 200nm a jejich detekce na katodovém konci kapiláry. Ihned po dokončení jsou kapiláry promývány promývacím roztokem a připraveny k další analýze.



Obrázek 3: Přístroj MINICAP FLEX-PIERCING

Zdroj: (<https://www.sebia.com/en-EN/produits/minicap-flex-piercing>)

3.3. Popis přístroje MINICAP-FLEX-PIERCING

MINICAP FLEX-PIERCING je automatizovaný, počítačem řízený přístroj. Skládá se z následujících částí:

- otočný autosampler
- analyzační jednotka
- zásobník reagentů
- řídicí jednotka
- softwar na zpracování dat „PHORESIS“

a) otočný autosampler: Jeho dostupnost je možná ihned po otevření dvířek na přední straně analyzátoru. Obsahuje 28 možných pozic k analýze. Vkládání do autosampleru musí vždy začínat od pozice č. 1. Na pozici č. 27 musí být přítomen ředící roztok vzorku. Po uzavření dvířek jsou vzorky načteny pomocí čárového kódu.



Obrázek 4: Otočný autosampler

Zdroj: vlastní zpracování

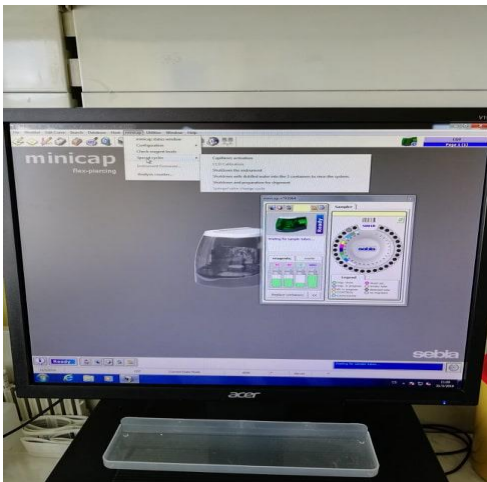
- b) analyzační jednotka: skládá se ze 2 samostatně tepelně vodivých kazet. Každá z nich obsahuje trubičku z křemičitého skla. Teplota kazet pro udržení kapilár ve stabilní teplotě je regulována jednotkou řízení teploty na základě Peltierova jevu – ventilátor odvádí teplo pryč. Sensorový systém obsahuje deuteriovou lampu a LED, motorizované filtry, sadu vstupních a výstupních 2 optických vláken přítomných na detekčním okénku každé kazety a zachycovač. Detekce proteinů probíhá přímo a současně na každé kapiláře pomocí absorpční fotometrie. Pro zajištění cirkulace reagentů je uvnitř kapilár hydraulický systém, tvořený dvěma nádržkami (anodická a katodická). Anodická je v reagenční nádobce – 1 čerpadlo, 1 vícecestný ventil a 1 elektromagnetický ventil sloužící k promývání kapilár a ke vstřikování vzorků.
- c) Zásobník pro reagentie: V tomto zásobníku jsou obsaženy 2 lahvičky tlumivého roztoku, 1 zásobník na promývací roztok, 1 zásobník na destilovanou vodu, 1 odpadní kontejner na shromažďování použitých reagentů, 1 kontejner na použité nádoby. Přenos a sběr reagentů je umožněn pomocí čerpadla a stříkačky.



Obrázek 5: Přítomné reagentie v soupravě MINICAP

Zdroj: vlastní zpracování

- d) Řídící jednotka: Automatizovaný přístroj MINICAP FLEX-PIERCING je ovládán pomocí softwaru „PHORESIS“. Každá analýza má již předprogramované nastavení. Průběh analýzy se zobrazuje na obrazovce. Zde uživatel může spustit jednotlivé automatizované cykly, jako je například vypnutí systému, aktivace kapilár aj.



Obrázek 6: Zobrazení průběhu analýzy

Zdroj: vlastní zpracování

3.4. Použité reagensie

Reagensie dodávané v diagnostické soupravě MINICAP CDT, REF 2208, firma Sebia:

- Tlumivý roztok o pH8,8 – pufr k analýze isoform transferinu v systému MINICAP
- Ředící roztok vzorku – automatické ředění vzorků séra
- Promývací roztok – k promývání kapilár po elektroforetické separaci
- Promývací roztok MINICAP CDT – každodenní čištění vzorkovací sondy po ukončení analýzy
- Destilovaná voda – vyplachování kapilár

Kontrolní materiál byl použit ve dvou hladinách:

- 1) Normal CDT control
- 2) High CDT control

Spotřební materiál

- Reagenční nádobky
- Kontejnery na použité nádobky
- Filtry
- Špičky k automatickým pipetám
- Zkumavky Eppendorf

3.5. Pracovní postup

Pro analýzu byly použity vzorky se sérem pacientů. Odběr vzorku probíhal v souladu s požadavky pro testování klinických laboratoří. Odebraný vzorek byl po přijetí stočen v centrifuze po dobu 10 minut (3000 ot./ min). Poté bylo převedeno 200 μ m séra do mikrozkušavky a připraveno k analýze. Před zapnutím přístroje MINICAP CDT byla doplněna destilovaná voda a promývací roztok. Promývací roztok byl připraven ze zásobní lahvičky dodávané v sadě MINICAP a zředěn destilovanou vodou v poměru 1:10. Dále byly vloženy 2 lahvičky tlumivého roztoku do zásobníku reagentů již dodané v sadě MINICAP. Po zapnutí přístroje byl na počítači spuštěn program Phoresis a provedena kontrola hladin reagensií. Poté bylo spuštěno promytí přístroje. Po dokončení promytí byl spuštěn cyklus aktivace kapilár. Po dokončení cyklu je přístroj ve stavu ready. Na pozici 27 v otočném autosampleru byla vložena zkumavka opatřená čárovým

barkodem SAMPLE DILUENT s obsahem dilučního činidla. Počátek analýzy probíhal v kontrolním materiálu, a to ve dvou hladinách: normal a high. Kontroly jsou dodávány v lyofilizovaném stavu, proto je potřebná jejich příprava. Ke kontrolám bylo přidáno 1 ml dilučního roztoku, který je dodáván společně s kontrolami. Kontroly byly ponechány po dobu 30 min, aby se rozpustily. Takto připravené kontroly byly dobře promíchány a množství 200 µm bylo převedeno do zkumavek typu eppendorf. Tyto eppendorfy byly vloženy do zkumavek a poté vloženy do otočného autosampleru. Po změření kontrol bylo provedeno měření patientských směsných vzorků. Po skončení práce byl spuštěn cyklus na promývání.

3.6. Verifikace metody

Verifikace (ověření) poskytuje objektivní důkaz, že data o analytických znacích, která jsou poskytnutá výrobcem, jinou laboratoří nebo referenční institucí jsou v dané laboratoři při použití konkrétního měřicího systému dosažena (Friedecký et al., 2011).

Důvodem provedení verifikace zaváděné metody v klinické laboratoři, je mimořádně silný dopad výsledků analytických měření v praxi. Tyto výsledky vydané laboratoří mohou mnohdy fatálním způsobem ovlivnit zdraví, kvalitu a někdy i samotný život pacienta. Provádění měření, které je podloženo dostatečnou kvalitou, patří mezi povinnost každého analytika. Verifikací si laboratoř zajišťuje kvalitu dat, které při rutinním provozu vydává. Poskytuje data potřebná pro odhad nejistot měření, tedy interval spolehlivosti měřených výsledků (Friedecký et al., 2011).

Kdy se provádí verifikace:

- Před zavedením nové metody
- Před aplikací nového analytického měřicího systému do laboratoře
- Před zavedením jiného diagnostického kitu
- Pokud rozšíříme použití současné metody o další účel
- Ukazuje-li kontrola kvality přetrvávající problém
- Při převzetí metody z jiné laboratoře nebo z publikace

Hloubka a rozsah verifikace musí být vždy odpovídající potřebě získání dostatku údajů, aby mohlo být rozhodnuto, zda je metoda opravdu vhodně zvolená pro zamýšlený účel. Metody, které jsou vylisované výrobcem – výrobky IVD MD jsou označeny jako CE (Evropské unie). Postupy, které jsou prověřené mezilaboratorní validační studií, vyžadují nižší rozsah validace než metody, které si laboratoř vyvine sama (tzv. typ in house) (Friedecký et al., 2011).

3.6.1. Postup

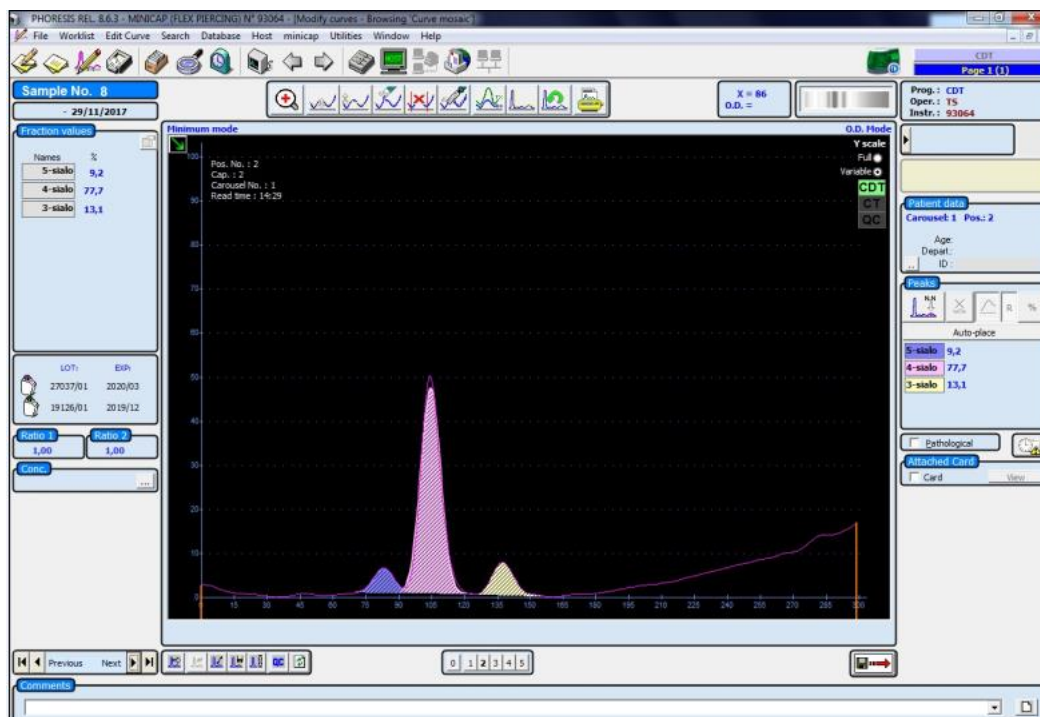
Kalibrační roztoky CDT MINICAP se používají ve 2 hladinách. Tyto roztoky 1 a 2 jsou získávány ze zásobních roztoků lidského séra, jsou ve stabilizované lyofilizované formě. Kalibrační materiály se v rámci uzavřeného systému Sebia do laboratoře nedodávají.

Interference

Vizuální inspekce záznamu je nutná pro vyloučení interferencí, které mohou rušit a bránit kvantifikaci CDT. Faktory, které mohou analýzu narušit, jsou následující:

- CDG syndrom – dědičná porucha glykosylace
- genetické varianty transferinu
- některé monoklonální složky nebo vysoké polyklonální pozadí
- fibrinogen a hemolyzované vzorky
- antikoagulanty – citrát a EDTA
- poškození jater – konečné stadium nemoci

Přítomnost variantní frakce CDT při hodnocení analýzy zabrání kvantifikaci disialo – formy. Na záznamu se objevuje zvýšená koncentrace trisialotransferinu, který může dosáhnout optické hustoty podobné tetrasialotransferinové frakci. K degradaci dochází např. skladováním vzorku séra při pokojové teplotě. U vybraných jaterních chorob se koncentrace transferinu nachází v nízké koncentraci. Pík tetrasialotranferinu je tedy významně snížen.



Obrázek 7: Zobrazení variantního transferinu při zvýšené frakce trisialotransferinu

Zdroj: vlastní zpracování

3.6.2. Obecné výpočty

Ke zpracování dat, které byly naměřeny na systému MINICAP byly použity následující statistické charakteristiky:

- Aritmetický průměr

Definice aritmetického průměru je dána jako součet všech hodnot x_i , který je vydělený jejich počtem n .

$$AM \equiv \frac{\sum x_i}{n}$$

- Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka je veličina, která vyjadřuje míru přesnosti a rozptýlenost dat kolem aritmetického průměru. Označuje se jako SD. Čím je výběrová směrodatná odchylka menší, tím je přesnost větší. Vzorec pro výpočet SD je následující:

$$SD \equiv \sqrt{\frac{\sum (x_i - AM)^2}{n - 1}}$$

- Variační koeficient

Variační koeficient se používá k posouzení relativní velikosti rozptýlenosti dat vztahených k průměru. Vyjadřuje tedy podíl směrodatné odchylky a aritmetického průměru, je značen jako CV a vyjádřen v procentech. Vzorec pro výpočet CV:

$$CV \equiv 100 * \frac{SD}{AM}$$

3.7. *Statistické vyhodnocení*

Statistická analýza dat byla provedena pomocí programu Excel. Při posouzení verifikace byl použit F test pro hladinu významnosti $p=0,05$ (Giorgia et al., 2017).

4. Výsledky

4.1. Opakovatelnost měření

Ke stanovení opakovatelnosti byly použity 4 vzorky, vzorek A byl rozpipetován z nízké kontroly, vzorek B z vysoké kontroly. Vzorky C a D byly připraveny jako dvě směsná séra. Každý vzorek byl měřen v 10 replikacích v rámci jedné série, v jeden den a jedním operátorem. Průměrná hodnota CDT u vzorku A byla 0,8 %, tedy pod dolní hodnotou referenčního intervalu. U vzorku B a D byla zvolena hodnota CDT 4,7 % a 2,0 %, tedy nad horní hodnotou referenčního intervalu. U vzorku C byla naměřena průměrná hodnota CDT 1,3 %, tzv. šedá zóna. Všechny výsledky byly zaznamenány do tabulky a následně porovnány s hodnotami dodávanými výrobcem.

Tabulka 1: Stanovení opakovatelnosti vzorek A

měření č.	CDT %
1	0,7
2	0,8
3	0,7
4	0,8
5	0,8
6	0,8
7	0,8
8	0,8
9	0,7
10	0,7
průměr	0,8
SD	0,05
CV %	6,45

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 2: Stanovení opakovatelnosti vzorek B

měření č.	0-sialo	2-sialo	CDT %
1	0,5	4,2	4,7
2	0,4	4,1	4,5
3	0,5	4,2	4,7
4	0,4	4,1	4,5
5	0,4	4,3	4,7
6	0,5	4	4,5
7	0,5	4,2	4,7
8	0,5	4,1	4,6
9	0,5	4,2	4,7
10	0,5	4,1	4,6
průměr	0,47	4,15	4,7
SD			0,09
CV %			1,99

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 3: Stanovení opakovatelnosti vzorek D

měření č.	CDT %
1	1,2
2	1,3
3	1,3
4	1,3
5	1,3
6	1,2
7	1,2
8	1,3
9	1,3
10	1,4
průměr	1,3
SD	0,06
CV %	4,9

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 4: Stanovení opakovatelnosti vzorek C

měření č.	CDT %
1	2
2	1,9
3	1,9
4	2,1
5	2,1
6	1,9
7	1,9
8	1,8
9	1,9
10	2
průměr	2,0
SD	0,10
CV%	4,98

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 5: Porovnání hodnot opakovatelnosti laboratoře s výrobcem

	% CDT	
	výrobce	laboratoř
Vzorek A		
Průměr (%)	0,7	0,8
SD	0,03	0,05
CV %	4,3	6,45
Vzorek B		
Průměr (%)	5,2	4,6
SD	0,09	0,09
CV %	1,8	1,99
Vzorek C		
Průměr (%)	1,7	1,3
SD	0,05	0,06
CV %	3,1	4,9
Vzorek D		
Průměr (%)	1,9	2
SD	0,05	0,10
CV %	2,8	4,98

Zdroj: vlastní zpracování

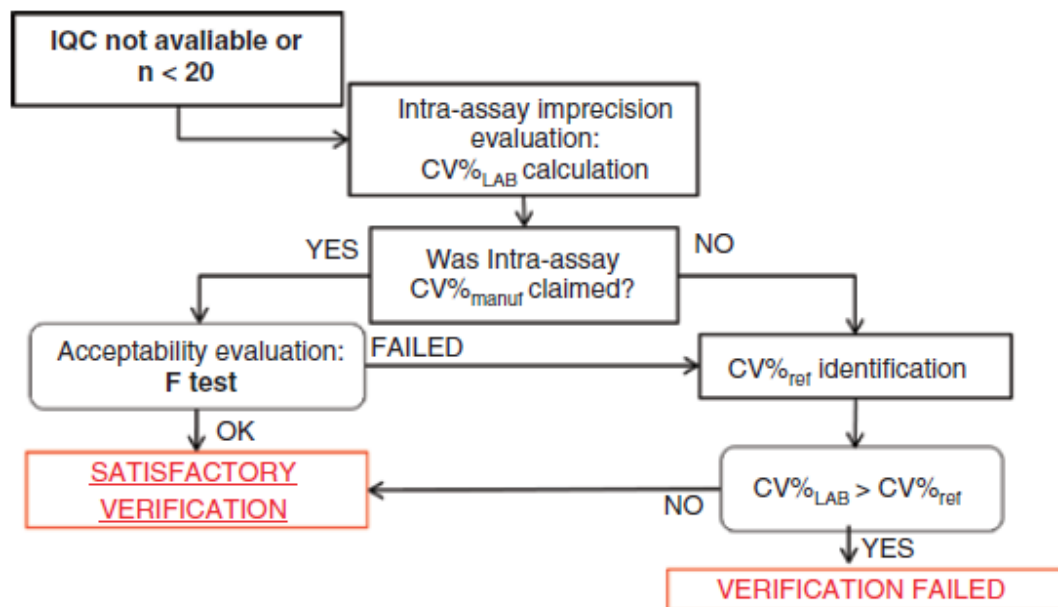
Z tabulky vyplývá, že průměrné hodnoty CDT% u vzorků naměřených laboratoří, se mírně liší od průměrných hodnot CDT% výrobce. Při výběru hladin CDT pro vyhodnocení a porovnání CV%, byly zvoleny ty hodnoty výrobce, které se svým průměrem nejvíce blížily získaným hodnotám laboratoře. Celková povolená chyba při

stanovení CDT je 15,7 % (J. W. Founder, 2014). Můžeme tedy říct, že variační koeficient získaný z naměřených hodnot je vyhovující pro všechny analyzované vzorky. Nicméně je zřejmé, že $CV\%_{lab} > CV\%_{ref}$. K testování významnosti rozdílu mezi $CV\%_{lab} > CV\%_{ref}$, byl zvolen postup dle publikace viz statistická analýza. Zvolili jsme testovací kritérium R:

$$R = \frac{CV\%_{lab}^2}{CV\%_{ref}^2}$$

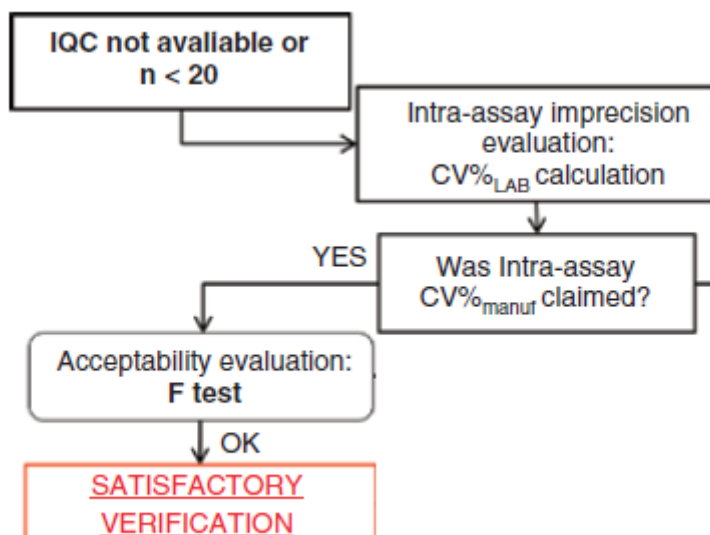
Hodnota R byla poté porovnána s hodnotou získanou z distribuce F, pro hladinu významnosti $p=0,05$ a odpovídajícím stupňům volnosti.

Vyhodnocení probíhalo dle následujícího algoritmu:



Obrázek 8: Operativní schéma pro znázornění přesnější verifikace

Zdroj: (Giorgia et al., 2017)



Obrázek 9: Znárodnění výpočtu, který byl v tomto případě využit.

Zdroj: (Giorgia et al., 2017).

Tabulka 6: Tabulka vypočtených testovacích hodnot pro R a F

	Výrobce	Laboratoř			
Průměr CV %	4,3	6,45	R	F	
CV% ²	18,49	41,6	2,25	3,18	R<F

	Výrobce	Laboratoř			
Průměr CV %	1,8	1,99	R	F	
CV% ²	3,24	4,0	1,22	3,18	R<F

	Výrobce	Laboratoř			
Průměr CV %	3,1	4,9	R	F	
CV% ²	9,61	24,0	2,50	3,18	R<F

	Výrobce	Laboratoř			
Průměr CV %	2,8	4,98	R	F	
CV% ²	7,84	24,8	3,16	3,18	R<F

Zdroj: vlastní zpracování

Po výpočtu testovacího kritéria R a jeho porovnání s F testem lze potvrdit splnění verifikace.

4.2. Reprodukovatelnost měření

Reprodukovatelnost byla provedena v kontrolních materiálech v obou hladinách, tedy ve vysoké a nízké. Hodnoty byly získány z 10 vzorků obou hladin, které byly měřeny

v deseti po sobě jdoucích dnech. Jednotlivé výsledky byly zaznamenány do tabulek a porovnány s hodnotami, které jsou poskytnuté výrobcem. Průměrná hodnota CDT nízké kontroly byla 0,8 % a u vysoké byl vypočítán průměr 4,9 %. Rozmezí kontrol udávaný výrobcem se pohybuje v rozsahu $0,9 \pm 0,3$ u nízké kontroly a $5,2 \pm 0,7$ u kontroly vysoké. Tyto hodnoty byly poté porovnány s rozsahy hodnot výrobce.

Tabulka 7: Stanovení reprodukovatelnosti nízká kontrola

č. měření	Hladina L CDT%
1	0,8
2	0,7
3	0,7
4	0,7
5	0,8
6	0,8
7	0,8
8	0,8
9	0,8
10	0,7
Průměr	0,8
SD	0,05
CV %	6,79

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 8: Stanovení reprodukovatelnosti vysoká kontrola

č. měření	Hladina H CDT %
1	4,9
2	4,7
3	4,9
4	5,1
5	5,1
6	5,1
7	4,8
8	4,6
9	4,5
10	4,9
Průměr	4,9
SD	0,21
CV	4,36

Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 9: Porovnání průměrných hodnot uváděných výrobcem (n=15) a laboratoří (n=20)

Laboratoř				
	Průměr (%)	SD	CV (%)	Průměr CV (%)
CDT	0,8 - 4,9	0,05 - 0,21	4,36 - 6,79	5,6
Výrobce				
	Průměr (%)	SD	CV (%)	Průměr CV (%)
CDT	0,5 - 7,7	0,00 - 0,28	0,0 - 10,1	4

Zdroj: vlastní zpracování

Porovnání hodnot výrobce a laboratoře bylo provedeno stejným způsobem jako v případě opakovatelnosti.

Tabulka 10: Vypočtené testovací hodnoty pro R a F

	Výrobce	Laboratoř			
Průměr CV %	4	5,6	R	F	
CV% ²	16	31,4	1,96	2,4	R<F

Zdroj: vlastní zpracování

Po vypočítání testovacího kritéria R a jeho porovnání s F testem lze verifikaci opět považovat za úspěšnou.

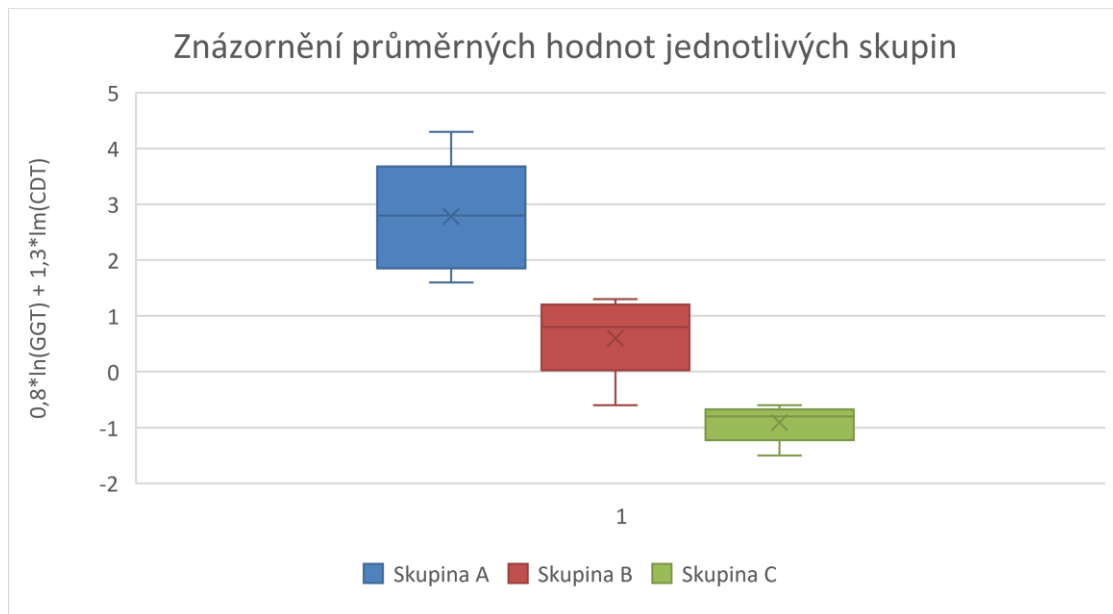
4.3. Porovnání jednotlivých markerů u vybraných pacientů

Další krok představoval měření CDT% u 60 patientských vzorků. U alkoholiků platí, že hodnota CDT není v korelaci s aktivitou GGT vzhledem k odlišným mechanismům jejich indukce při příjmu alkoholu. Proto se v diagnostice využívá následujícího jevu: CDT vypovídá o frekvenci a kvantitě požívaného alkoholu a GGT vypovídá o jaterní indukci vyvolané intenzivním požíváním alkoholu. Tato vzájemná kombinace je vyjádřena vztahem $\gamma\text{-\%CDT} = 0,8 \cdot \ln(\text{GGT}) + 1,3 \cdot \ln(\text{CDT})$ (Anttila et al., 2003). Ze souboru naměřených dat byly vytvořeny tři skupiny pacientů, které byly rozděleny na základě hodnot CDT a GGT. Ke zjištění hodnot GGT bylo využito systému LIS v ÚLCHKB FN Motol a následně dosazeno do uvedeného vztahu poskytující lepší diagnostickou přesnost pro detekci nadměrného požívání alkoholu. Hodnoty byly zaznamenány do tabulky a do grafu vyneseny průměry jednotlivých skupin. Z vypočtených hodnot lze usoudit, že se zvyšujícím se množstvím požitého alkoholu také roste riziko poškození jater a hodnota vypočtených přirozených logaritmu má vzrůstající tendenci. U pacientů s normálními hodnotami CDT a GGT se průměrná hodnota vypočteného přirozeného logaritmu pohybuje v záporných hodnotách (graf č. 1).

Tabulka 11: Rozdělení vybraných pacientů dle hodnot GGT a CDT

Zdroj: Vlastní zpracování

skupina A			
↑CDT a ↑GGT			
pacient č.	CDT	GGT	ln GGT + CDT
1	7,6	8,07	4,3
2	3,3	8,63	3,3
3	2,9	15,78	3,6
4	13,8	1,82	3,9
5	2,5	2,34	1,9
6	2,3	2,14	1,7
7	2	2,39	1,6
8	5,8	1,28	2,5
9	2,4	12,34	3,1
10	2,9	1,95	1,9
		průměr	2,8
		median	2,8
Skupina B			
↑CDT a ↓GGT			
pacient č.	CDT	GGT	ln GGT + CDT
11	3,7	0,58	1,3
12	2,4	0,38	0,4
13	2,5	0,63	0,8
14	3,1	0,67	1,2
15	1,7	0,19	-0,6
16	2,8	0,83	1,2
17	3,2	0,19	0,2
18	2,9	0,84	1,2
19	2,3	0,67	0,8
20	1,7	0,23	-0,5
		průměr	0,6
		median	0,8
Skupina C			
↓ CDT a ↓GGT			
pacient č.	CDT	GGT	ln GGT + CDT
21	1	0,22	-1,2
22	0,6	0,45	-1,3
23	0,5	0,48	-1,5
24	0,8	0,46	-0,9
25	0,7	0,77	-0,7
26	0,9	0,57	-0,6
27	0,9	0,47	-0,7
28	0,8	0,71	-0,6
29	0,9	0,39	-0,9
30	0,7	0,77	-0,7
		průměr	-0,9
		median	-0,8



Graf 1: Průměrné hodnoty přirozených logaritmů

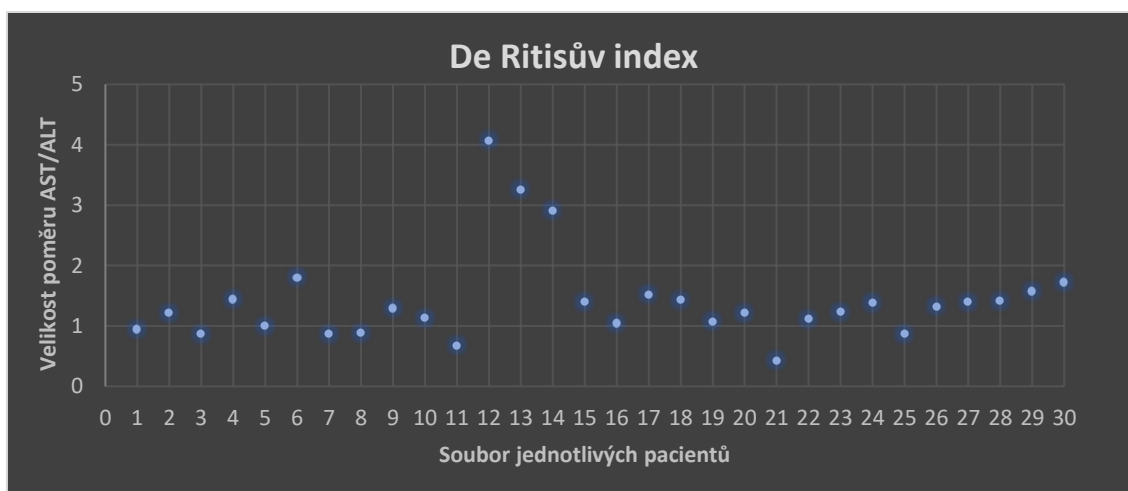
Zdroj: vlastní zpracování

U skupiny pacientů, kde byl potvrzen abusus alkoholu pomocí CDT a GGT byly v LISu laboratoře dohledány ještě další markery, a to AST a ALT. Z hodnot transferáz byl vypočten de Ritisův index, který je velmi dobrým ukazatelem při posouzení alkoholové hepatopatie. Z grafu vyplývá, že nejvíce pacientů se pohybuje v intervalu 1-2. Tři z pacientů mají hodnotu de Ritisova indexu vyšší než 2. Obecně lze říci, že čím vyšší hodnota indexu, tím vyšší pravděpodobnost alkoholového poškození jater.

Tabulka 12: Hodnoty jednotlivých parametrů u pacientů s abusem alkoholu

Pacient č.	CDT %	GGT ukat/l	AST ukat/l	ALT ukat/l	AST/ALT
1	7,6	8,07	0,73	0,78	0,94
2	3,3	8,63	1,16	0,96	1,21
3	3,7	0,58	0,36	0,42	0,86
4	2,9	15,78	4,11	2,86	1,44
5	1,7	3,22	0,25	0,25	1,00
6	13,8	1,82	1,89	1,05	1,80
7	1,8	3,93	0,7	0,81	0,86
8	2,5	2,34	0,45	0,51	0,88
9	2,8	48,85	4,85	3,75	1,29
10	2,3	2,14	0,88	0,78	1,13
11	1,6	1,61	0,65	0,97	0,67
12	1,6	27,91	1,79	0,44	4,07
13	2	2,39	1,73	0,53	3,26
14	2,9	0,94	2,97	1,02	2,91
15	5,8	1,28	1,15	0,82	1,40
16	3,2	0,19	0,27	0,26	1,04
17	2,4	12,34	1,2	0,79	1,52
18	2,8	0,83	0,93	0,65	1,43
19	3,1	1,56	0,31	0,29	1,07
20	1,7	0,19	0,29	0,24	1,21
21	1,6	3,43	0,64	1,49	0,43
22	1,6	1,07	0,39	0,35	1,11
23	3,1	0,67	0,38	0,31	1,23
24	2,5	0,63	0,62	0,45	1,38
25	3	13,05	0,95	1,09	0,87
26	2,9	1,95	1,15	0,87	1,32
27	2,4	0,38	0,39	0,28	1,39
28	1,8	1,92	2,2	1,56	1,41
29	1,8	4,03	1,48	0,94	1,57
30	2,6	0,55	0,43	0,25	1,72

Zdroj: vlastní zpracování



Graf 2: Poměr hodnot AST/ALT u pacientů s abusem alkoholu

Zdroj: vlastní zpracování

5. Diskuze

Karbohydrát deficientní transferin je v dnešní době považován za významný biochemický marker při identifikaci pacientů, kteří dlouhodobě v nadměrném množství užívají alkohol. Stanovení CDT se široce využívají pro identifikaci osob s vyšším příjmem alkoholu a diferenciální diagnostiku alkoholem navozených zdravotních problémů. Zároveň může být využito i pro monitorování abstinence v ambulantních léčebných programech. Při přerušení pití se koncentrace CDT normalizuje asi do jednoho měsíce. Hlavní výhodou CDT oproti ostatním běžně používaným markerům je dobrá specifická pro alkoholem navozené poruchy. Na stanovení CDT se používá několik metod, u kterých mohou být problémem jistá omezení. Hojně využívanou metodou je například HPLC, v jejímž případě může být problematickým zvýšený podíl trisialotransferinu. U těchto vzorků může být také přítomný monosialotransferin, který způsobí interferenci v podobně neodlišitelné separaci od disialotransferinu (Helander, 2004). Při použití metody HPLC i CZE může interpretaci výsledků komplikovat také přítomnost genetické D nebo B varianty transferinu. Omezení je zapříčiněno možným přesmykem B a D forem, čímž dojde ke zkresleně sníženým nebo zvýšeným hodnotám CDT. I přes možnost tohoto omezení, tak díky vizuálnímu vzhledu a tvaru příslušného chromatogramu či elektroferogramu, je o tom příslušný operátor informován (Carchon, 2004). Mezi faktory, které narušují analýzu v podobě falešně vysokých výsledků patří, také tzv. CDG syndrom – poruchy glykosylace a vážná jaterní onemocnění, jako je chronická virová hepatitida nebo hepatocelulární karcinom. Falešně negativní výsledky se mohou vyskytovat u lidí trpících anémií nebo nemocemi jater doprovázených nedostatkem celkového transferinu (Helander et al., 2001).

CZE představuje účinnou metodu pro identifikaci karbohydrát deficientních izoform transferinu CDT, součet asialo -, mono - a disialo - transferinu ve vztahu k celkovému Trf v lidském séru. Vnitřní kapilára s vnitřním průměrem 50 μm a celkové délce 60 cm za optimalizovaných podmínek poskytuje vysokou přesnost stanovení CDT. Byly zavedeny komerční soustavy, které zjednodušují a standardizují tento typ analýzy CDT. Jako spolehlivá mezní hodnota při stanovení CDT pomocí CZE je 1,6 %, hodnoty CDT v rozmezí 1,3 % až 1,6 % jsou neprůkazné hodnoty tzv. šedé zóny, tyto hodnoty by měly být ještě přeměřeny, případně je vhodné vyšetření opakovat s několika týdenním odstupem. Vzorky, které jsou používané u analýzy metodou CZE, nepotřebují žádnou

předběžnou úpravu a probíhají v poměrně krátkém časovém rozmezí, což může být výhodou například oproti stanovení pomocí HPLC metody (Helander a Bergström, 2006).

Cílem mé bakalářské práce bylo zavedení metody CDT na přístroji MINICAP a na základě vypočítaných validačních parametrů rozhodnout, zdali je vhodná k rutinnímu použití v klinické biochemické laboratoři.

Postup, který byl využit k verifikaci nové metody, vycházel z doporučení ČSKB k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. V prvním kroku validace byla změřena opakovatelnost ze vzorku kontrol (nízké i vysoké) a ze dvou připravených směsných sér o různé koncentraci. Byly dopočítány statistické veličiny, tedy aritmetický průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient. Tyto hodnoty byly porovnány s hodnotami dodavatele soupravy. Na základě statistických porovnání bylo ověřeno pro opakovatelnost i reprodukovatelnost splnění podmínek validace metody.

Důvodem rozdílů mezi variačními koeficienty mohl být způsobem například nestabilitou používaného pufru $\text{pH} = 8,8$, který je nutný skladovat v chladu. Po opakovaném použití může dojít k ovlivnění jeho stability a tím k výskytu chyby při analýze. Další z možností mohlo být uchování vzorku, protože analýza směsných sér probíhala až po shromáždění dostatečného množství materiálu. Během této doby byl biologický materiál zmrazen.

Protože byla verifikace prováděná na přístroji MINICAP v klinické biochemické laboratoři, bylo využito přístupu do systému LIS a dohledání dalších markerů, které napomáhají k diagnostice chronického abusu alkoholu. Dohledaná data umožnila další statistická vyhodnocení. Vysoké hodnoty GGT poukazují na fakt, že při zvýšeném příjmu etanolu dochází k vyšší indukci enzymu a díky porušení permeability buněčných membrán či nekróze vyvolané detergentními účinky alkoholu se může více uvolňovat do krve. Průměrné hodnoty součtu logaritmu GGT a logaritmu CDT, jsou významně vyšší u skupiny pacientů se zvýšenými CDT i GGT hodnotami než u pacientů, se zvýšenými hodnotami pouze u CDT. Lze u nich tedy předpokládat větší jaterní poškození. U pacientů s normálními hodnotami CDT i GGT se průměr logaritmů vyskytuje v záporných hodnotách. Při výpočtu de Ritisova indexu se většina pacientů nachází v rozmezí poměru 1-2, tedy s vyšší hodnotou enzymu AST. Uvolňování ALT a AST z jaterních buněk do krevního oběhu je známkou poškození hepatocelulárního systému. Tři z prezentovaných pacientů (graf č. 2) se objevují nad hodnotou poměru vyšší než 2. Jejich AST, je více než

dvakrát zvýšené oproti hodnotě ALT. Můžeme tedy říct, že de Ritisův index je dobrým ukazatelem pro určení rozsahu poškození při alkoholickém onemocnění jater.

Studie zahraničních autorů považují stanovení CDT pomocí systému MINICAP založenou na principu CZE za přijatelnou s možným využitím v rutinní diagnostice. Jsou uváděny silné korelace mezi dalšími používanými metodami ke stanovení tohoto bezsacharidového transferinu, především pak u metody HPLC. Ze studie Schellenberga a kolektivu, kdy byla porovnána zjištěná data s údaji z literatury, jejich údaje naznačovaly, že při zvýšení mezní hodnoty z 1,3 % na 1,4 %, by došlo ke snížení počtu falešně pozitivních hodnot (Schellenberg et al., 2007).

6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zavedení kvalitní, rychlé a analyticky spolehlivé metody na stanovení CDT pomocí přístroje MINICAP-FLEX-PIERCING. Všechna výše uvedená kritéria byla ověřena následnou kalkulací validačních parametrů, která vykazovala požadovanou spolehlivost. Vzhledem k tomu, že metoda je z velké části automatizována, byla zkrácena i celková doba od přijetí vzorku laboratoří až do vydání výsledku.

Dále byly v laboratoři verifikovány údaje, díky kterým jsme mohly provést srovnání s validačními parametry od výrobce. Na základě tohoto porovnání jsme získali potřebné informace k ověření správnosti. Je tedy možné konstatovat, že metoda je vhodná pro zavedení rutinního použití v klinické laboratoři k přesnější diagnostice chronického abusu alkoholu.

Chronický abusus alkoholu jsme prokázali u 30 pacientů obou pohlaví. Diagnostika probíhala v kombinaci několika markerů. Díky stanovení CDT jsme spolehlivěji identifikovali jedince se suspektně vyšším příjmem alkoholu. Uvedené hodnoty ostatních markerů nám byly nápomocné při určení rozsahu jaterního poškození způsobené alkoholem. Tím byla potvrzena hypotéza, že stanovené hodnoty CDT mohou zvýšit diagnostickou výtěžnost ostatních markerů.

7. Seznam literatury

1. ANON., nedatováno. *Kapilární zónová elektroforéza* [online]. Dostupné z: <https://www.natur.cuni.cz/chemie/fyzchem/zuskova/soubory/praktikum/cze>
2. ARNDT, T., 2001. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clinical Chemistry*. **47**(1), 13–27. ISSN 0009-9147.
3. BRODANOVÁ, Marie a Václav KORDAČ, 1993. *Klinická hepatologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-7169-069-6.
4. CARCHON, H. A., 2004. Diagnosis of Congenital Disorders of Glycosylation by Capillary Zone Electrophoresis of Serum Transferrin. *Clinical Chemistry* [online]. **50**(1), 101–111. ISSN 0009-9147, 1530-8561. Dostupné z: [doi:10.1373/clinchem.2003.021568](https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.021568)
5. CYLWIK, Bohdan, Lech CHROSTEK a Maciej SZMITKOWSKI, 2006. [New methods for the determination of transferrin isoforms in the diagnostics of alcohol abuse]. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)*. **60**, 101–112. ISSN 1732-2693.
6. ČEŠKA, Richard, Tomáš ŠTULC, Vladimír TESAŘ a Milan LUKÁŠ, 2015. *Interna*. ISBN 978-80-7387-885-6.
7. ČIHÁK, Radomír, Miloš GRIM, Oldřich FEJFAR, UNIVERZITA KARLOVA, 1 LÉKAŘSKÁ FAKULTA a ANATOMICKÝ ÚSTAV, 2011. *Anatomie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3817-8.
8. DAHER, Saleh, Namma LEV COHEN, Muhammad MASSARWA, Mahmud MAHAMID, Mira NASSER, Wadi HAZOU, Rani OREN, Rifaat SAFADI a Tawfik KHOURY, 2018. Portal lymphadenopathy predicts non-alcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *PLOS ONE* [online]. **13**(11), e0207479. ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0207479](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207479)
9. DASTYCH, Milan, Petr BREINEK, MASARYKOVA UNIVERZITA a LÉKAŘSKÁ FAKULTA, 2015. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. ISBN 978-80-210-7788-1.
10. DUTTA, Prashanta a Ali BESKOK, 2001. Analytical Solution of Time Periodic Electroosmotic Flows: Analogies to Stokes' Second Problem. *Analytical Chemistry* [online]. **73**(21), 5097–5102. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: [doi:10.1021/ac015546y](https://doi.org/10.1021/ac015546y)
11. DYLEVSKÝ, Ivan, 2009. *Funkční anatomie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3240-4.
12. EHRMANN, Jiří, 2011. Jaterní fibróza - diagnostické možnosti a její monitorování. *FONS Informační Bulletin* [online]. **21**(1). Dostupné z: <http://www.bulletinfons.cz/12011/klin4.pdf>
13. EHRMANN, Jiří a Petr HŮLEK, 2014. *Hepatologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-5510-6.
14. EHRMANN JR., Jiří, Petr SCHNEIDERKA a Jiří EHRMANN, 2006. *Alkohol a játra*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-1048-8.

15. EVERAERTS, Frans M., Jo L. BECKERS a Theo P. E. M. VERHEGGEN, 1976. *Isotachopheresis: theory, instrumentation and applications*. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company. Journal of chromatography library, 6. ISBN 978-0-444-41430-4.
16. FRIEDECKÝ, Bedřich, Luděk ŠPRONGL, Josef KRATOCHVÍLA a Zbyněk PLZÁK, 2011. Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. (1), 36–44.
17. GAŠ, Bohuslav, 2001. Kapilární elektroforéza. *Vesmír*. **80**(7), 370–373. ISSN 1214-4029.
18. GERBER, Tilman a Haus SCHOMERUS, 2000. Hepatic Encephalopathy in Liver Cirrhosis: Pathogenesis, Diagnosis and Management. *Drugs* [online]. **60**(6), 1353–1370. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-200060060-00008
19. GIORGIA, Antonelli, Andrea PADOAN, Ada AITA, Laura SCIACOVELLI a Mario PLEBANI, 2017. Verification of examination procedures in clinical laboratory for imprecision, trueness and diagnostic accuracy according to ISO 15189:2012: a pragmatic approach [online]. **10**(55), 1501–1508. Dostupné z: doi:doi: 10.1515/cclm-2016-0894.
20. HELANDER, A., 2004. Testing for Congenital Disorders of Glycosylation by HPLC Measurement of Serum Transferrin Glycoforms. *Clinical Chemistry* [online]. **50**(5), 954–958. ISSN 0009-9147, 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2003.029629
21. HELANDER, Anders a Jonas P. BERGSTRÖM, 2006. Determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum using the Bio-Rad %CDT by HPLC test. *Clinica Chimica Acta* [online]. **371**(1–2), 187–190. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2006.03.010
22. HELANDER, Anders, Gunne ERIKSSON, Helena STIBLER a Jan-Olof JEPPSSON, 2001. Interference of Transferrin Isoform Types with Carbohydrate-deficient Transferrin Quantification in the Identification of Alcohol Abuse. *Clinical Chemistry*. (7), 9.
23. HŮLEK, Petr, Petr URBÁNEK, ČESKÁ HEPATOLOGICKÁ SPOLEČNOST a NADAČNÍ FOND, 2018. *Hepatology*. ISBN 978-80-271-0394-2.
24. KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ, 2005. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 978-80-7080-586-2.
25. KAŠIČKA, Václav, 1997. TEORETICKÉ ZÁKLADY A SEPARAČNÍ PRINCIPY KAPILÁRNÍCH ELEKTROMIGRAČNÍCH METOD. *Chemické listy*. (91), 320–329.
26. KLOUDA, Pavel, 2003. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 978-80-86369-07-5.
27. KRČ, Ivo, 2007. HEMATOLOGIE- HODNOCENÍ KREVNÍHO OBRAZU. **11**(9), 529–530.
28. MASOPUST, Jaroslav, 1998. *Klinická biochemie: požadování a hodnocení biochemických vyšetření. Část 1 Část 1*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-7184-648-2.

29. PAUL, R, L TSANACLIS, C MURRAY, R BOROJERDI, L FACER a A CORBIN, 2019. Ethyl Glucuronide as a Long-term Alcohol Biomarker in Fingernail and Hair. Matrix Comparison and Evaluation of Gender Bias. *Alcohol and Alcoholism* [online]. [vid. 2019-03-25]. ISSN 0735-0414, 1464-3502. Dostupné z: doi:10.1093/alcalc/agz015
30. PAVLÍKOVÁ, Lucie, Hana BROZMANOVÁ a František KVASNIČKA, 2007. Terapeutické monitorování léků pomocí elektromigračních metod. *Klinická farmakologie a farmacie*. **21**(2), 79–83.
31. PAZOUREK, Jiří, 2003. *Skripta : Elektroforetické analytické metody* [online]. 2003. Dostupné z: <https://docplayer.cz/1428450-Jiri-pazourek-moderni-elektroforeticke-analyticke-metody-prednasky-pro-magisterske-studium-skripta-elektroforeticke-analyticke-metody-2-6.html>
32. PRŮŠA, Richard, 2012. *Průvodce laboratorními nálezy*. Praha: Raabe. ISBN 978-80-87553-68-8.
33. PŘÍBRAMSKÁ, V. a L. HUSOVÁ, 2007. Jaterní cirhóza. **9**(11), 486–489.
34. REES-UNWIN, K. S., G. J. MORGAN a F. E. DAVIES, 2004. Proteomics and the haematologist. *Clinical and Laboratory Haematology* [online]. **26**(2), 77–86. ISSN 0141-9854, 1365-2257. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2257.2004.00598.x
35. SEITZ, H.K. a S. MUELLER, 2014. Alcohol. In: *Reference Module in Biomedical Sciences* [online]. B.m.: Elsevier [vid. 2019-03-23]. ISBN 978-0-12-801238-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.00229-4
36. SCHELLENBERG, François, Catherine GIRRE, Bertrand NALPAS, Arnaud PLAT, Antonio TOME a Jean Christophe PAGÈS, 2007. Analytical evaluation of a new capillary electrophoresis method for carbohydrate-deficient transferrin measurement. *Clinica Chimica Acta* [online]. **382**(1–2), 48–53. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2007.03.020
37. SCHUPPAN, Detlef a Nezam H AFDHAL, 2008. Liver cirrhosis. *The Lancet* [online]. **371**(9615), 838–851. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(08)60383-9
38. SKOPP, G., 2000. ETHYL GLUCURONIDE IN HUMAN HAIR. *Alcohol and Alcoholism* [online]. **35**(3), 283–285. ISSN 14643502. Dostupné z: doi:10.1093/alcalc/35.3.283
39. SOURNIA, Jean-Charles, 1999. *Dějiny pijáctví*. Praha: Garamond. ISBN 978-80-86379-01-2.
40. TROJAN, Stanislav, 2003. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-0512-5.
41. VESTERBERG, Olof, 1989. History of electrophoretic methods. *Journal of Chromatography A* [online]. **480**, 3–19. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)84276-X
42. WESTERMEIER, Reiner, 2016. *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. 5th edition. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN 978-3-527-69519-5.

43. WOHL, Pavel, Petr WOHL, P. TRUNEČKA a J. ŠPIČÁK, 2003. Diagnostika abúzu alkoholu u nemocných s podezřením na alkoholovou závislost [online]. **11**(3). Dostupné z: <http://www.hpb.cz/cz/cas/03-3/klin/main03.html>
44. ZAKHARI, Samir, 2006. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. **29**(4), 245–254. ISSN 1535-7414.
45. ZIMA, Tomáš, 2002. *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galen. ISBN 978-80-7262-201-6.
46. <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>
47. http://fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/inan/
48. SEBIA. Návod k použití: MINICAP CDT. Ref. 2208. [online]. cit. 2017-06-20]. Dostupný na WWW: http://extranet.sebia.com/sites/site/files/pdfs/12208_cz.pdf

8. Seznamy obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1: Schématická struktura transferinu	21
Obrázek 2: Struktura hlavních izoform sérového transferinu	22
Obrázek 3: Přístroj MINICAP FLEX-PIERCING	33
Obrázek 4: Otočný autosampler	34
Obrázek 5: Přítomné reagenty v soupravě MINICAP	35
Obrázek 6: Zobrazení průběhu analýzy	35
Obrázek 7: Zobrazení variantního transferinu při zvýšené frakce trisialotransferinu	39
Obrázek 8: Operativní schéma pro znázornění přesnější verifikace	44
Obrázek 9: Znázornění výpočtu, který byl v tomto případě využit	45
Tabulka 1: Stanovení opakovatelnosti vzorek A	41
Tabulka 2: Stanovení opakovatelnosti vzorek B	42
Tabulka 3: Stanovení opakovatelnosti vzorek D	42
Tabulka 4: Stanovení opakovatelnosti vzorek C	43
Tabulka 5: Porovnání hodnot opakovatelnosti laboratoře s výrobcem	43
Tabulka 6: Tabulka vypočtených testovacích hodnot pro R a F	45
Tabulka 7: Stanovení reprodukovatelnosti nízká kontrola	46
Tabulka 8: Stanovení reprodukovatelnosti vysoká kontrola	46
Tabulka 9: Porovnání průměrných hodnot uváděných výrobcem (n=15) a laboratoří (n=20) ...	47
Tabulka 10: Vypočtené testovací hodnoty pro R a F	47
Tabulka 11: Rozdělení vybraných pacientů dle hodnot GGT a CDT Zdroj: Vlastní zpracování	48
Tabulka 12: Hodnoty jednotlivých parametrů u pacientů s abusem alkoholu,	50
Graf 1: Průměrné hodnoty přirozených logaritmů\	49
Graf 2: Poměr hodnot AST/ALT u pacientů s abusem alkoholu	50

9. Seznam příloh

Příloha č. 1 Ukázka záznamu jednotlivých frakcí u vysoké kontroly

Příloha č. 2 Ukázka záznamu jednotlivých frakcí u nízké kontroly

10. Seznam zkratek

ALP – alkalická fosfatáza

ALT – alaninaminotransferáza

AMK – aminokyseliny

AST – aspartátaminotransferáza

CDT – karbohydrát deficientní transferin

CE – kapilární elektroforéza

CNS – centrální nervová soustava

CV – variační koeficient

CZE – kapilární zónová elektroforéza

ČSKB – Česká společnost klinické biochemie

EtG – etylglukuronid

fCE – volná kapilární elektroforéza

fGE – volná gelová elektroforéza

GDPR – obecné nařízení o ochraně osobních údajů (

GGT – gama-glutamyltransferáza

GIT – gastrointestinální trakt

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IEF – izoelektrická fokusace

IVD MD – In vitro diagnostic medical devices

kDa – kilodalton

LIS – laboratorní informační systém

MCV – střední objem erytrocytu

MEOS – mikrozomální systém oxidace etanolu

NAD⁺ – nikotinamidadeninukleotid

NAFLD – nealkoholická steatohepatitida (non alcoholic fatty liver diseases)

NASH – nealkoholická steatohepatitida

PDP – pyridoxal-5'-fosfát

pI – izoelektrický bod

RIA – radioimunoanalýza

SD – směrodatná odchylka

SDS – dodecylsulfát sodný

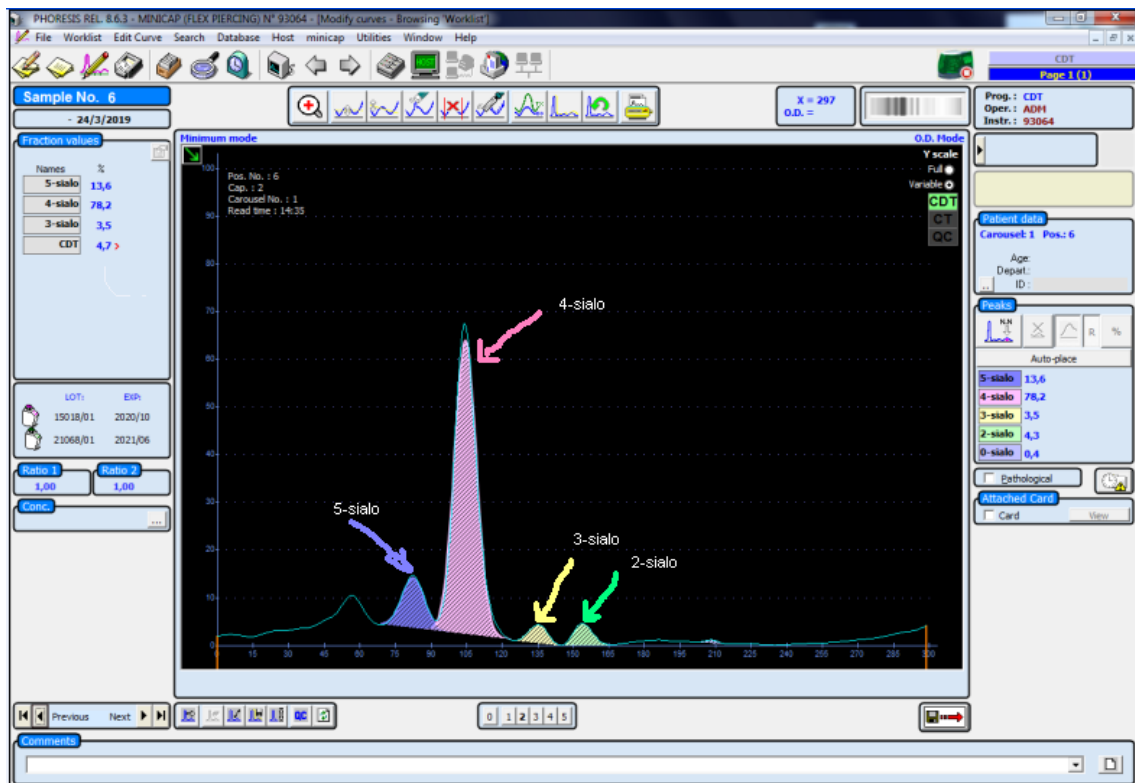
SDS-PAGE – polyakrylamidová elektroforéza za přítomnosti dodecylsulfátu sodného

Trf – transferin

ÚLCHKB – Ústav lékařské chemie a klinické biochemie

UV záření – ultrafialové záření

Příloha č. 1 Ukázka záznamu jednotlivých frakcí u vysoké kontroly



Příloha č. 2 Ukázka záznamu jednotlivých frakcí u nízké kontroly

