

Seminar za inženirje in tehnike laboratorijske medicine

ZBORNIK PREDAVANJ

Izola, Ljubljana, Maribor

april, maj 2013

Založilo: Slovensko združenje za klinično kemijo, Dunajska 22, Ljubljana
Uredila: Mag. Štefka Krivec, mag.farm., spec.med.biokem.
Lektorica: Mojca Čakš, prof.
Tisk: Birografika Bori d.o.o.

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

616-074(082)

SEMINAR za inženirje in tehnike laboratorijske medicine (2013 ; Izola /
Ljubljana / Maribor)

Zbornik predavanj / Seminar za inženirje in tehnike laboratorijske
medicine, Izola, Ljubljana, Maribor, april, maj 2013 ; [uredila Štefka
Krivec]. – Ljubljana : Slovensko združenje za klinično kemijo, 2013

ISBN 978-961-6907-02-6

1. Krivec, Štefka
266076928

V S E B I N A

1. Analitske tehnike v laboratorijski medicini

Mladen Krsnik, univ.dipl.kem., spec.med.biokem.

Petra Finderle, mag.farm., spec.med.biokem.

2. Sodobni tehnološki trendi na področju laboratorijske hematologije

Petra Uljarević, univ.dipl.biokem., spec.med.biokem.

Mojca Palko, dipl.inž.lab.biomed.

Nataša Dukarić, dipl.inž.lab.biomed.

3. Osnovne biokemične in citološke analize punktatov telesnih votlin

Mag. Elizabeta Božnar Alič, univ.dipl.biol., spec.med.biokem.

Asist. mag. Alenka France-Štiglic, mag.farm., spec.med.biokem.

4. Vitamini

Klementina Berce, univ.dipl.kem., spec.med.biokem.

5. Dihalni testi, *Helicobacter pylori*

Prof. dr. Joško Osredkar, mag.farm., spec.med.biokem.



ANALITSKE TEHNIKE V LABORATORIJSKI MEDICINI

**Mladen Krsnik, univ.dipl.kem., spec.med.biokem.
Petra Finderle, mag.farm., spec.med.biokem.**



Univerzitetni klinični center Ljubljana
Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

april 2013

VSEBINA

1. UVOD

2. RAZVOJ ANALITSKIH TEHNIK V LABORATORIJSKI MEDICINI

3. ANALITSKE TEHNIKE

3.1. SPEKTROSKOPKSE TEHNIKE

- 3.1.1. Spektrofotometrija
- 3.1.2. Plamenska fotometrija
- 3.1.3. Atomska absorpcijska spektrometrija
- 3.1.4. Fluorimetrija
- 3.1.5. Kemiluminiscenca

3.2. ELEKTROKEMIJA

3.3. IMUNOKEMIJA

- 3.3.1. Turbidimetrija
- 3.3.2. Nefelometrija

3.4. KROMATOGRAFIJA

3.5. ELEKTROFOREZA

- 3.5.1. Elektroforeza na agaroznem gelu (AGE)
- 3.5.2. Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu (PAGE) in SDS-PAGE elektroforeza
- 3.5.3. Izoelektrično fokusiranje (IFE)
- 3.5.4. Imunoelektroforeza, imunofiksacija (IF)
- 3.5.5. Kapilarna elektroforeza (CE)

3.6. OSMOMETRIJA

3.7. LABORATORIJSKI TESTI OB PREISKOVANCU

3.8. MOLEKULARNA DIAGNOSTIKA

4. KONTROLA KAKOVOSTI

5. ZAKLJUČEK

6. LITERATURA

Seznam uporabljenih kratic

ang.	angleško
Ab	(ang. Antibody); protitelo
Ag	(ang. Antigen); antigen
AGE	(ang. Agarose Gel Electrophoresis); elektroforeza na agaroznem gelu
CDG	(ang. Congenital Disorder of Glycosylation); prirojena motnja glikozilacije
CE	(ang. Capillary Electrophoresis); kapilarna elektroforeza
CLIA	(ang. Chemiluminescence Enzyme Immunoassay); imunoencimski test s kemiluminiscentno detekcijo
DGGE	(ang. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis); gelska elektroforeza z gradientom denaturanta
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
EIA	(ang. Enzyme Immunoassay); imunoencimski test
ELISA	(ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay); imunoencimski test na trdnem nosilcu
FPIA	(ang. Fluorescence Polarization Immunoassay); fluorescentno polarizacijski imunski test
GC	(ang. Gas Chromatography); plinska kromatografija
HPLC	(ang. High Performance Liquid Chromatography); tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IEF	Izoelektrično fokusiranje
IF	Imunofiksacija
IR	Infrardeča svetloba
LC	(ang. Liquid Chromatography); tekočinska kromatografija
LCR	(ang. Ligase Chain Reaction); verižna reakcija z ligazo
LLC	(ang. Liquid-Liquid Chromatography); tekoče-tekoča kromatografija
LSC	(ang. Liquid-Solid Chromatography); trdno-tekoča kromatografija
MS	Masna spektrometrija
NASBA	(ang. Nucleic Acid Sequence Based Amplification); ojačanje baznega zaporedja nukleinskih kislin
PAGE	(ang. Polyacrylamide Gel Electrophoresis); poliakrilamidna gelska elektroforeza
PCR	(ang. Polymerase Chain Reaction); verižna reakcija s polimerazo
POCT	(ang. Point-of-Care Testing); laboratorijski testi ob preiskovancu
RIA	(ang. Radioimmunoassay); radioimunski test
RNK	Ribonukleinska kislina
SDS-PAGE	(ang. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis); poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom
SSCP	(ang. Single-Strand Conformation Polymorphism); konformacijski polimorfizmi enoverižne DNK
UV	Ultravijolična svetloba

1. UVOD

Laboratorijska medicina je dejavnost, ki s kemičnimi in biokemičnimi parametri preučuje etiopatogenetske vzroke nastanka bolezni in evolucijo oziroma razvoj bolezni. S kvalitativno in kvantitativno analizo biološkega vzorca (kri, serum, plazma, urin, likvor, blato, punktati telesnih votlin, znoj, plodovnica, solze, tkiva...) pridobiva diagnostične in prognostične informacije, spremlja učinke terapije, v določenih primerih pa so rezultati tudi plod raziskav in razvoja, npr. protokoli za preizkušanje novih zdravil.

Za to potrebujemo ustrezne analitske tehnike, aparature in standardne postopke. V prvi vrsti moramo vedeti, kaj v biološkem vzorcu merimo, torej, kaj je analit. Poznati moramo natančno njegov metabolizem, kemijske interakcije ter morebitne zunanje vplive, ki lahko vplivajo na rezultat. Da lahko zanesljivo oddajamo laboratorijske rezultate, moramo skrbno poznati vse korake, ki lahko kakorkoli spremenijo pravilnost rezultata:

- predanalitična faza: pravilno naročilo zdravnika, odvzem biološkega materiala, ustrezen biološki material, identifikacija pacienta in biološkega vzorca, transport;
- analitična faza: predpriprava vzorca (centrifugiranje, redčenje, zamrzovanje), izbira analitske tehnike, laboratorijski inventar (plastične epruvete, pipete, nastavki za pipete), kontrola kakovosti – ponovljivost in pravilnost, občutljivost in specifičnost;
- postanalitična faza: pravočasna dostava rezultatov do naročnika, interpretacija rezultatov, informiranje naročnika ob izjemno izstopajočih in dvomljivih vrednostih.

Analitsko tehniko laboratorij izbere na podlagi več parametrov: zvrst analita (ion, beljakovina, metabolit, zdravilo...), koncentracijsko območje – občutljivost metode, število testov, ravnanje z aparaturo, bližina sosednjih laboratorijev, ustreznost prostorov in navsezadnje velik del prispeva tudi sama cena.

Na tržišču je na razpolago ogromno raznovrstnih analitskih tehnik. Želja laboratorijskih strokovnjakov in naročnikov preiskav je, da bi bile tehnike za posamezen analit čim bolj primerljive.

Prvi korak je že v teku, saj morajo vsi medicinski laboratoriji na področju Republike Slovenije delovati v skladu s Pravilnikom o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine (Ur.l. RS, št. 64/2004).

Drugi korak pa je uporaba zdrave pameti. Potrebno je ugotoviti, katere analitske tehnike so umestne v laboratorijih na posameznih nivojih zdravstva. Uporaba ustrezne analitske tehnike je odvisna od števila naročil in izkušenj analitika, ki jih je ob manjšem naročilu bistveno manj.

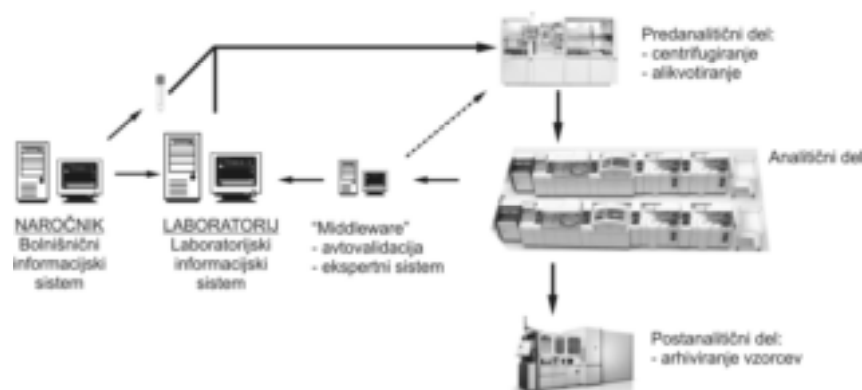
V naslednjih poglavjih so opisane le najbolj uporabljene analitske tehnike v laboratorijih klinične kemije. Na predavanju bo predstavljena uporaba analitskih tehnik s praktičnimi primeri iz vsakdanje rutine.

2. RAZVOJ ANALITSKIH TEHNIK V LABORATORIJSKI MEDICINI

Tisočletja nazaj so že t.i. zdravilci »analizirali«
urin pacientov na podlagi organoleptičnega pregleda: količina, obarvanost, vonj, struktura, okus. Skozi stoletja so se razvijala posamezna področja, nastajali so tudi manjši laboratoriji za analizo bioloških vzorcev. Takratne metode so temeljile na principu volumetrije, gravimetrije in stoletja znane organoleptične in fizikalne preiskave, npr. ekstrakcija, obarvanje, ki so se uporabljale nekako še v začetku 20. stoletja. Za analizo je bila potrebna ogromna količina biološkega materiala (2, 3).

Če samo pregledamo zadnjih 20, 25 let, vidimo, da se je krvni odvzem iz odprtega sistema preoblikoval v varnejši zaprt, vakuumski sistem. Volumen, ki je bil odvzet z odprtim sistemom, je bil v primerjavi z današnjim odvzemom ogromen. Da ne govorimo o varnosti

pred okužbo! Iz enostavnih enokanalnih spektrofometrov so se razvili moderni, tehnološko dovršeni multikanalni biokemični analizatorji. Ti analizatorji so se v zadnjih 10, 15 letih pojavili v popolnoma avtomatizirani izvedbi, kjer se lahko samodejno opravi tudi večji del predanalitike in postanalitike, t.i. avtomatizirane linije (slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz avtomatizirane linije in računalniška (informacijska) povezljivost

Začetek imunokemije sega v leto okoli 1950. Od takrat nenehoma nastajajo nove izvedbe analitskih tehnik na tem področju, kjer lahko specifično merimo izredno nizke koncentracije analitov (imunoencimski testi – EIA, ELISA, radioimunski test – RIA, fluorescentno polarizacijski imunski test – FPIA in še vrsta drugih testov).

Razvoj novih tehnik na področju molekularne diagnostike odpira posebno poglavje, čigar rezultati bodo v pomoč pri določanju osnovnih biokemičnih, hematoloških in imunokemičnih parametrov.

Področje masne spektrometrije (MS) in njene sklopitve s separacijskimi tehnikami (HPLC-MS, HPLC-MS/MS, GC-MS, CE-MS ...) odpira novo dimenzijo v laboratorijski medicini – proteomika, lipidomika, metabolomika, genomika itd. Laboratoriji čedalje bolj uporabljajo to novo pridobljeno tehniko v rutini, v analizi zdravil in drog, beljakovin in beljakovinskih frakcij, lipidov in lipidnih frakcij, organskih kislin, v dihalnih testih za ugotavljanje okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori*...

Tehnika »lab-on-chip«, je področje, ki se v zadnjem času zelo hitro razvija. Tehnike molekularne diagnostike, imunokemijske, spektroskopske, elektrokemijske tehnike se združujejo na eni sami ploščici. Analiza poteka v mikrookolju z izredno majhnimi količinami biološkega vzorca. Ponavadi ena sama ploščica predstavlja panel za posamezno obolenje ali cel sklop obolenj, kot so srčnožilna, ščitnična, respiratorna obolenja, tumorski označevalci itd. Iz ugotovljenega sledi, da gre razvoj inštrumentov v smeri avtomatizacije ob uporabi računalnikov, ki pri tem nudijo skoraj neomejene možnosti uporabe (3).

Kljub vsej avtomatizaciji in spektakularnemu razvoju na koncu odloča človek. Ekspertni sistemi, ki so skupek baze (pre)številnih rezultatov analiz na eni strani in znanja ter izkušenj znanstvenikov, strokovnjakov na drugi, bodo imeli v prihodnosti čedalje vidnejšo vlogo.

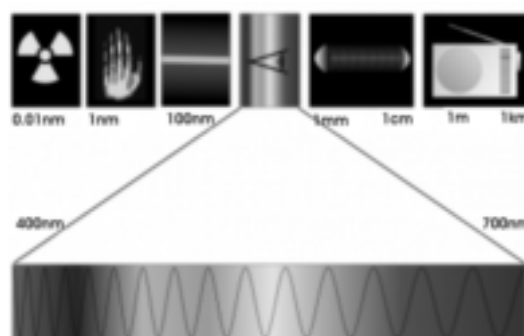
Zato ni bojazni, da področje laboratorijske medicine izgublja svoje mesto, temveč je ravno obratno. Čim več rezultatov bo na voljo, tem več dela bomo imeli z njihovo interpretacijo. Spremeniti se bo moral le naš pristop.

3. ANALITSKE TEHNIKE

3.1. SPEKTROSKOPSKE TEHNIKE

Pri fotometričnih tehnikah merimo količino svetlobe, ki pade na površino, oz. jakost svetlobnega žarka. Prvotno je veljalo, da s fotometričnim merjenjem določamo jakost svetlobe ne glede na valovno dolžino, medtem ko spektrofotometrija meri jakost svetlobe pri določeni valovni dolžini. Danes instrumente za merjenje optičnih lastnosti snovi imenujemo fotometri, če za izolacijo določenega območja optičnega spektra uporabljajo filtre, in spektrofotometri, če imajo prizmo ali uklonske mrežice za izbiro spektra. Ta tehnologija je vključena v številne avtomatske analizatorje, ki se uporabljajo v kliničnih laboratorijih in merijo oddano, prepuščeno, absorbirano, sipano in odbito svetlobo (2, 4).

Svetlobna energija se prenaša preko elektromagnetnega valovanja, opisanega s frekvenco in valovno dolžino. Svetlobo sestavljajo visokoenergetski delci (fotoni), katerih energija je obratno sorazmerna z valovno dolžino. Če se hoče žarek elektromagnetnega sevanja absorbirati, mora imeti enako frekvenco, kot je rotacijska oz. vibracijska frekvenca atoma ali molekule, ki jo zadane. Ko se energija absorbira v delec, se elektroni vzbudijo in preidejo v višje energetske stanje (orbitalo). Vzbujeni elektron ob prehodu nazaj v osnovno stanje sprosti energijo – seva svetlobo z značilno valovno dolžino (4, 5).



Slika 1: Spekter elektromagnetnih valovanj: kratki valovi (gama žarki, x-žarki, UV), vidni spekter, dolgi valovi (IR, radiofrekvence). Spekter, znan tudi kot spektralna gostota, je grafični prikaz palete barv, ko se bela svetloba razprši skozi prizmo in je opisana z jakostjo svetlobe in moči v odvisnosti od frekvence ali valovne dolžine.

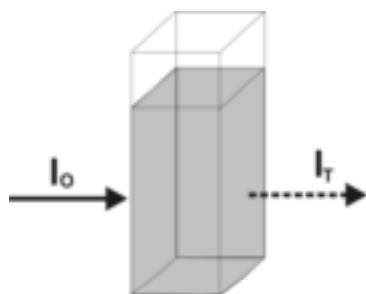
3.1.1. Spektrofotometrija

Ko raztopino presvetlimo z žarkom svetlobe, se le-ta absorbira, odbija ter prehaja skozi. Količina prepuščene svetlobe je zato manjša, kot je vpadna (začetna) svetloba. Z matematično definicijo teh količin opišemo koncentracijo snovi raztopin, ki je premo sorazmerna s količino absorbirane svetlobe z določeno valovno dolžino oz. obratno sorazmerna z logaritmom prepuščene svetlobe (Beer-Lambertov zakon) (4, 5).

Obstajata dve glavni vrsti spektrofotometrov: z enojnim in dvojnimi svetlobnim žarkom. Slednji primerja intenzivnost svetlobe med dvema potema (ena z referenčno raztopino in druga s testnim vzorcem). Enojni svetlobni spektrometri merijo relativno jakost vpadne in izstopne svetlobe. Vsem spektrofotometrom pa so enotni sestavni deli: vir svetlobe (UV-, vodikova-, devterijeva žarnica), prizma, monokromator (izolira svetlobo želene valovne dolžine), uklonska mrežica, kiveta, detektor in računalnik (4, 5).

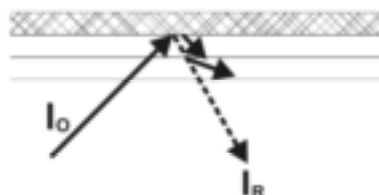
Valovno dolžino svetlobe, s katero presvetlimo vzorec, izberemo glede na absorpcijski spekter molekule, ki jo analiziramo. Običajno izberemo valovno dolžino, pri kateri ima molekula svoj absorpcijski maksimum. Ponavadi je izbrana valovna dolžina v vidnem spektru (380-750 nm, ko barvo raztopine vidimo tudi s prostim očesom). Za detekcijo organskih spojin in zdravil izberemo ultravijolično območje (200-380 nm), medtem ko za toksikološke analize in kvantitativno določanje posameznih sestavin v zmesi uporabljamo visoko selektivno infrardečo spektrometrijo (750-2000 nm) (2).

Z razvojem računalnikov in programov, ki razrešujejo zapletene formule, je bilo mogoče postaviti algoritem za izračun koncentracije snovi v raztopini iz odbite (reflektirane) svetlobe, t.i. suhe kemije. Tehniko refleksijske spektrometrije vgrajujejo v majhne ročne merilnike, kot so npr. čitalci urinskih lističev in glukometri (2).



$$T = I_T / I_0$$

Slika 3: Transmitanca (prepustnost žarka skozi tekočino): I_0 – vpadni žarek; I_T – prepušeni žarek.



$$R = I_R / I_0$$

Slika 4: Reflektanca (odbita svetloba s trdne površine): I_0 – vpadni žarek; I_R – odbiti žarek skozi plasti trdnega nosilca.

3.1.2. Plamenska fotometrija

Plamenski emisijski fotometer meri svetlobo, ki jo oddajajo vzbujeni elektroni, razpršeni v plamenu. Elementi v plamenu ustvarijo značilno obarvan plamen pri jakostni stopnji, ki je neposredno sorazmerna s koncentracijo atomov v raztopini. Ta tehnika se je nekoč uporabljala za določanje koncentracije elektrolitov (Na^+ , K^+ , Li^+) v serumu; danes se za to uporabljajo ionsko selektivne elektrode (2).

3.1.3. Atomska absorpcijska spektrometrija

Atomska absorpcijska spektrometrija je emisijska tehnika, pri kateri vzbujen element ob prehodu na nižje energetske stanje oddaja energijo. Predhodno se analizirane molekule atomizirajo v plamenu, tako da so atomi prisotni v nevzbujenem stanju. Votla katodna cev s katodnim delom, narejenim iz materiala, ki ga analiziramo, služi za tvorbo svetlobe z valovno dolžino, ki je specifična za analiziran element. Ko svetloba iz katodne cevi doseže plamen, v katerem je preiskovani element v atomskem stanju, se svetloba absorbira, kar zaznamo kot upad v signalu. Ta proces je t.i. atomska absorpcija (2, 4, 5).

Ta tehnika je 100-krat bolj občutljiva od plamenske emisijske spektrofotometrije in visoko specifična zaradi uporabe istega elementa za tvorbo svetlobe v votli katodni cevi. V kliničnih laboratorijih se uporablja pri določanju elementov v sledovih (aluminij, kalcij, baker, svinec, krom, litij, magnezij in cink) (2).

3.1.4. Fluorimetrija

Fluorimetrija je tudi emisijska spektrometrija, pri kateri molekule spodbudimo s svetlobo (običajno UV); posledično molekule fluorescirajo ali fosforescirajo. Elektroni absorbirane energije ne oddajo takoj, ampak prehajajo preko dveh ali več vzbujenih stanj v osnovno energetske stanje. Oba izraza opredeljujeta fizikalni pojav luminiscence, s tem da fluorescenca traja okoli 10 sekund, fosforescenca pa veliko dlje. Fluorescenca je direktno proporcionalna s koncentracijo. Ta povezava je linearna, dokler ni koncentracija fluorofora tako visoka, da sam vzorec absorbira vzbujajočo svetlobo. Dodatna slabost fluorimetrije predstavlja občutljivost na kontaminacijo reagentov in sprememb v okolju (pH, temperatura, sprememba topila ...). Vendar je v primerjavi s spektrometrijo fluorimetrija bolj specifična in občutljivejša; meritev oddane fluorescence se meri neposredno, medtem ko se pri

spektrometriji meri razlika svetlobnega signala v absorbirani in prepušteni svetlobi, ki je pri nizkih koncentracijah analita premajhna za natančno analizo (2, 4, 5).

Fluorescenčne spojine uporabljamo kot označevalce v kemijskih reakcijah, ki jih proučujemo. Običajno se vežejo na nosilce (molekule, protitelesa, celice ...), ki jih določamo. Za analizo vitaminov, encimov, beljakovin in nukleinskih kislin v bioloških vzorcih se uporabljajo fluorescenčni mikroskopi, laserski fluorimetri in pretočni citometri (2).

3.1.5. Kemiluminiscenca

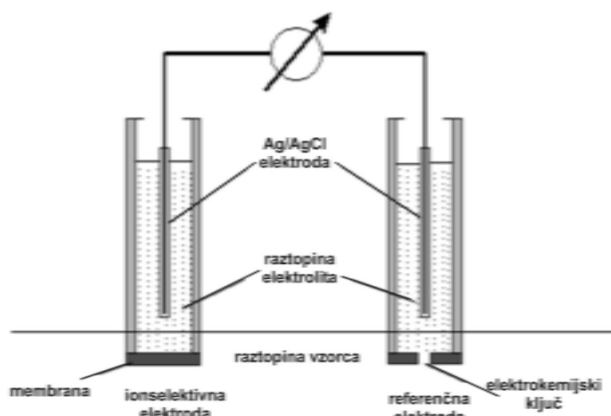
Pri kemiluminiscenci se vzbujeno stanje tvori v kemični reakciji (oksidacija luminola, akridinskih estrov ali dioksetana). Za kemiluminiscentne reakcije je značilno, da so hitre (trajajo do 30 sekund), z dodatkom pospeševalcev reakcij pa se intenziteta oddane svetlobe lahko podaljša (tudi do 30 min). Kemiluminiscenca je tehnika, s katero lahko določamo koncentracije v pikomolih, je hitra z enostavno instrumentacijo (2, 5). Kemiluminiscentna detekcija se največkrat uporablja v imunokemičnih reakcijah (CLIA – chemiluminescence enzyme immunoassay), pri spremljanju metabolnih poti in encimskih reakcij, v sistemih z biooznačevalci ter v prihodnosti za spremljanje protimikrobne aktivnosti peroksidaznega sistema v nevtrofilnih granulocitih (16).

3.2. ELEKTROKEMIJA

Elektrokemija je veja kemije, ki se ukvarja s kemijskimi reakcijami (prenosom elektronov), ki potekajo med elektrodo in elektrolitom v raztopini. Elektroda je prevodnik iz kovine ali grafita, ki omogoča stik z nekovinskim delom (polprevodnik, elektrolit ali vakuum) v električnem tokokrogu. Referenčne elektrode imajo konstanten potencial; običajno so to kalomelova (Hg, HgCl₂, KCl), srebrova (AgCl) in vodikova elektroda. Indikatorske elektrode so kovinske (Ag, Cu, Hg, Cd, Pb). Njihov potencial je odvisen od aktivnosti kovinskih ionov v raztopini; običajno se uporabljajo steklena (za določanje pH raztopin), ionska selektivna membranska (za merjenje elektrolitov) in plinska elektroda (za določanje pCO₂, pO₂...) (4, 5). Električne lastnosti, ki jih opazujemo v raztopinah, so posledica prevodnosti (konduktometrija) in sprememb dielektrične konstante. Te lastnosti povezujemo s spremembami koncentracije opazovane zvrsti v raztopini (4, 5).

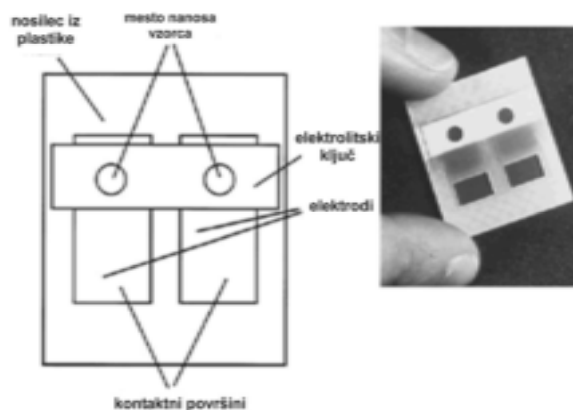
Elektrokemijska reakcija je lahko spontana (galvanski člen) ali pa je njen potek usmerjen s pomočjo zunanje električne napetosti (z elektrolitsko celico). V klinični biokemiji uporabljamo elektrokemijske metode, pri katerih med elektrodama teče tok (elektrogravimetrija, kulometrija, polarografija, amperometrija), ali pa imamo sistem, ki je v ravnotežju (potenciometrija) (2, 5).

- Potenciometrija meri razliko potenciala med dvema elektrodama (indikatorska in referenčna elektroda), ki sta potopljena v raztopini ionov. V klinični kemiji se uporabljata direktna potenciometrija (ni vpliva na koncentracijo analita zaradi visoke koncentracije beljakovin in/ali lipidov v serumu) in indirektna potenciometrija (merjenje aktivnosti analita, ki je v izredno razredčenem sistemu enaka koncentraciji).
- Voltometrija meri električni tok v celici kot funkcijo potenciala, ki se sčasoma spreminja, med delovno in referenčno elektrodo.
- Amperometrija meri tok, ki teče skozi elektrokemično celico pri konstantnem potencialu (plinska analiza krvi).
- Kulometrija je tehnika za merjenje količine električne energije (naboja), ki poteka med dvema elektrodama v elektrokemični celici.
- Konduktometrija meri prevodnost električnega toka, ki teče med dvema nepolariziranimi elektrodama (hematološki analizatorji).



Slika 5: Indirektna potenciometrija

Elektrokemična celica je sestavljena iz dveh pol-celic, ki sta povezani z elektrolitskim ključem (namočen filtrirni papir, polprepustna membrana); električni tok oz. pretok elektronov steče iz elektrode z nižjo afiniteto do elektronov (anode) proti katodi, kjer se sprostijo OH^- ioni. Namesto da sta obe elektrodi potopljene v dve raztopini, sta lahko v enotni celici z raztopino, ki deluje kot elektrolitski ključ (5).



Slika 6: Direktna potenciometrija

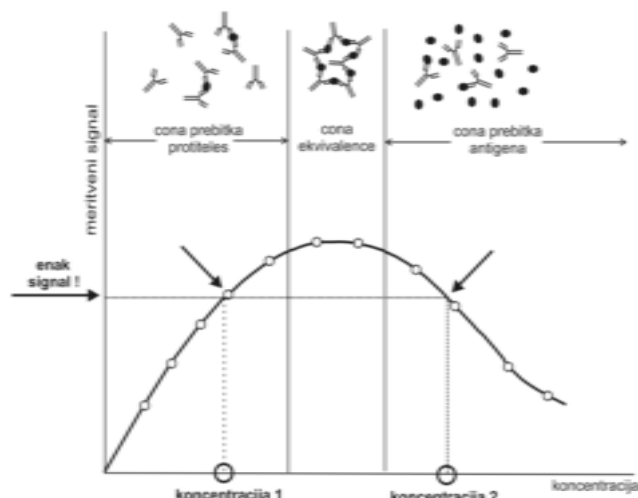
Shematski prikaz in slika reakcijske ploščice z ion-selektivno elektrodo.

Voltometrija in amperometrija sta najbolj občutljivi elektrokemijski tehniki (4). V klinično-laboratorijski praksi se uporabljajo elektrokemične reakcije za določanje elektrolitov, plinov v krvi, težkih kovin, metabolitov zdravil (2).

3.3. IMUNOKEMIJA

Temelj imunokemičnih tehnik je reakcija med protitelesom (Ab) in antigenom (Ag). Reagent je lahko bodisi Ab bodisi Ag, odvisno, kaj analiziramo. Vezava med Ab in Ag je nekovalentna, kar ne privede do kemičnih sprememb na nobeni od molekul. Sodelujejo lahko ionske, vodikove, hidrofobne in van der Waalsove vezi. Imunokemične tehnike so cenjene zaradi visoke specifičnosti reakcije in občutljivosti (2). Kljub vsemu lahko prihaja do navzkrižnih reakcij, ki jih lahko zmanjšamo z različnimi učinki (ionska jakost in pH pufra, dodatek specifičnih omakal, inhibitorji, encimi itd.). Pri imunokemiji moramo biti predvsem pozorni na razmerje med Ab in Ag v reakcijski mešanici, da pravilno interpretiramo rezultat (slika 7). Imunokemične tehnike uporabljamo na številnih področjih laboratorijske medicine za določanje beljakovin v serumu, plazmi, urinu, likvorju, beljakovin iz celičnih organel, protiteles proti virusom, zdravil, hormonov, protiteles proti DNK, za tipizacijo eritrocitov, ugotavljanje uživanja drog. Nekatere tehnike izvajamo samo kvalitativno, druge kvantitativno (2, 4).

V 60 letih razvoja imunokemičnih tehnik so bile pripravljene številne izpeljave od imunoprecipitacijskih in aglutinacijskih tehnik, radialne imunodifuzije, imunoelektroforez, do radioimunskih, encimoimunskih (EIA, ELISA), imunofluorescenčnih tehnik itd. (2, 5). V nadaljevanju bosta opisani le temeljni oz. najbolj uporabljeni tehniki v kliničnih laboratorijih – turbidimetrija in nefelometrija.



Slika 7: Precipitacijska krivulja

Za vzorec imamo lahko pri enakem meritvenem signalu dve različni koncentraciji, npr. pravilna koncentracija naše spojine je koncentracija 2, vendar analizator odda koncentracijo 1. V laboratoriju moramo zagotoviti, da vedno merimo v coni, kjer je prebitek protiteles, in ne v coni, kjer je prebitek antigena (»antigen excess«). Nekateri proizvajalci rešujejo prebitek antigena s predhodnim redčenjem (»predilution«).

3.3.1. Turbidimetrija

Turbidimetrija meri prepuščeno svetlobo določene valovne dolžine, ki prehaja skozi suspenzijo v reakcijski kiveti. Prepuščena svetloba ni odvisna le od koncentracije spojine, ki jo merimo, temveč tudi od velikosti delcev in motnosti vzorca, kar zmanjšuje občutljivost metode. Prav tako lahko kompleksi med seboj agregirajo, kar povzroči še dodatno težavo pri analizi. Analize izvajamo največkrat na spektrofotometru oz. biokemičnih analizatorjih, ki so lahko del avtomatizirane linije. S to tehniko določamo beljakovine v serumu, urinu, likvorju in drugih bioloških vzorcih.

3.3.2. Nefelometrija

Nefelometrija meri odklon sipane svetlobe, ki je nastala po odboju na nastalih kompleksih Ab-Ag v suspenziji reakcijske kivete. Sipanje svetlobe je odvisno od valovne dolžine vpadne svetlobe in velikosti delcev (nastalega kompleksa). Za komplekse, katerih velikost je blizu ali večja od valovne dolžine, občutljivost metode spreminjamo s prilagajanjem kota sipane svetlobe. Nekateri nefelometri merijo sipano svetlobo tudi pri kotu 90° . Nefelometrijo uporabljamo v laboratorijih klinične kemije za določanje beljakovin v serumu, urinu in likvorju.



Slika 8: Shematski prikaz principa merjenja turbidimetrije in nefelometrije

3.4. KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je skupina tehnik, ki se uporabljajo za ločevanje mešanic na osnovi različnih fizikalno-kemijskih interakcij med posameznimi spojinami in stacionarno fazo sistema. Osnovna sestavina vsake kromatografske tehnike je mobilna – gibljiva faza, ki je lahko v plinasti ali tekoči obliki in prenaša vzorec (ki je mešanica različnih spojin) skozi stacionarno – mirujočo fazo, ki je lahko v trdni ali tekoči obliki (6).

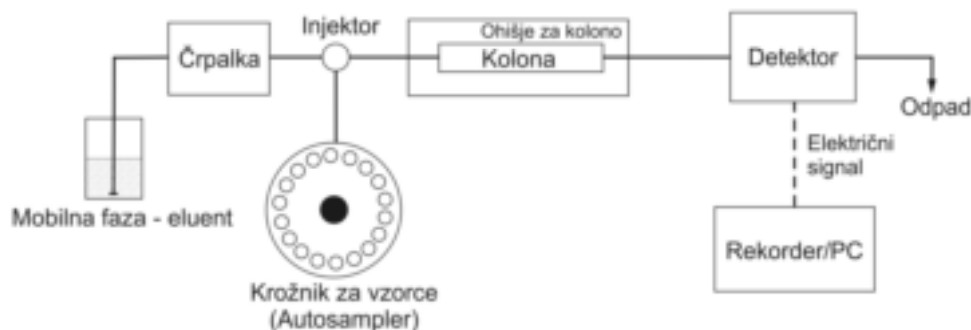
Ločitev temelji na različni porazdelitvi sestavin zmesi med dvema fazama. Pri potovanju mobilne faze (vsebuje tudi iskani/e analit/e) skozi stacionarno fazo pride do porazdelitve analita med njima. Do ločitve pride zaradi razlik med lastnostmi sestavin (topnost, ionska jakost, velikost molekul, hlapnost ...), ki se zato različno porazdelijo med stacionarno in mobilno fazo. Na primer, če ima analit večjo afiniteto do stacionarne faze ali če je manj topen v mobilni fazi, bo dalj časa potoval skozi kolono in obratno. Za detekcijo uporabljamo različne detektorje, odvisno od mobilne in stacionarne faze ter od vrste analita, ki ga ločujemo (2, 3).

Kromatografijo lahko izvajamo na:

- papirju; stacionarna faza je papir,
- ploščah (steklo, plastika ...); stacionarna faza je v tanki plasti napršena na plošči (tenkoplastna kromatografija),
- kolonah; kolone so polnjene s stacionarno fazo,
- kapilarah; stacionarna faza je nanošena na stene kapilare.

Glede na fizikalno-kemijske lastnosti analita poznamo naslednje tipe kromatografij.

- Adsorpcijska kromatografija
V to vrsto spadajo plinska (GC), tekočinska (LC), trdno-tekoča kromatografija (LSC) in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). V primeru, da uporabimo kot detektor masni spektrometer (MS), dobimo sklopitvene tehnike, ki so bolj občutljive in specifične od primarnih separacijskih tehnik. V laboratorijih klinične kemije najdemo številne uporabne aplikacije (identifikacija in/ali kvantifikacija analita), kjer se uporabljajo tovrstne tehnike. V slovenskih laboratorijih trenutno uporabljamo le GC-MS za določanje vsebnosti organskih kislin v urinu. Pri teh analizah je smiselna popolna avtomatizacija in veliko število vzorcev (2, 7).
- Porazdelitvena kromatografija
V to skupino spada tekoče-tekoča kromatografija (LLC). Kadar za detektor uporabimo masni spektrometer, je tehnika uporabna za določanje steroidnih hormonov (6).
- Ionsko-izmenjevalna kromatografija
Tovrstna tehnika je uporabna predvsem za ločevanje anorganskih ionov, aminokislin, hemoglobinskih variant, beljakovin, organskih molekul, ki lahko disociirajo na ione in za pripravo deionizirane vode v laboratorijih (2, 6).
- Gelsko-izključitvena kromatografija
Tehnika je zelo razširjena za čiščenje in analizo sintetičnih in bioloških polimerov, kot so beljakovine, polisaharidi in nukleinske kisline (2, 6).
- Afinitetna kromatografija
Predvsem se uporablja za čiščenje protiteles in krvnega seruma (2, 8).



Slika 9: HPLC – osnovne komponente (avtomatizirana oblika vsebuje krožnik za vzorce)

3.5. ELEKTROFOREZA

Elektroforeza temelji na ločevanju električno nabitih delcev v raztopini elektrolita pod vplivom električnega polja. Zaradi električnega polja potujejo nabiti delci z različno hitrostjo, odvisno od naboja, proti anodi ali katodi. Z elektroforezo ločimo delce z različnimi naboji kot tudi delce z enakimi naboji, če so različne velikosti ali oblike, ker nanje delujejo različne zaviralne sile. Na elektroforezo vplivajo tudi izbrana podlaga (zamreženost), ionska jakost, pH, temperatura, čas in elektroendoosmoza (4, 5, 6).

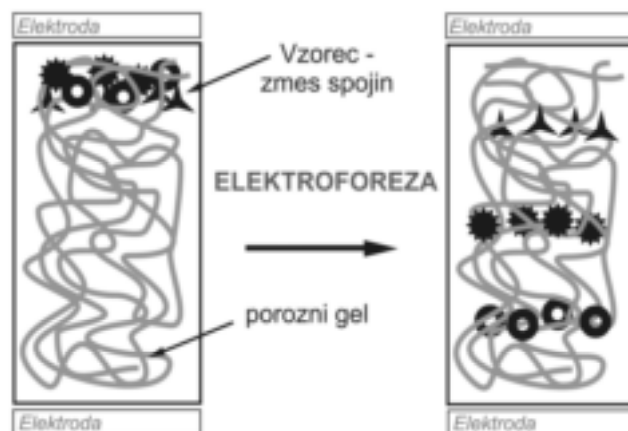
Včasih se je kot nosilec uporabljal papir, kasneje pa so začeli uporabljati druge nosilce, kot so gel (škrob, agaroz, agar, poliakrilamid) in celulozni acetat.

V praksi se v današnjem času največkrat uporablja elektroforezna tehnika na agaroznem gelu.

3.5.1. Elektroforeza na agaroznem gelu (AGE – Agarose Gel Electrophoresis)

Aparaturo, ki vsebuje katodo in anodo, priključimo na električno napetost, kar povzroči gibanje nabitih molekul vzorca in pufra po nosilcu proti nasprotno nabiti elektrodi. Proti anodi se najhitreje gibljejo molekule oz. delci z najbolj negativnim nabojem.

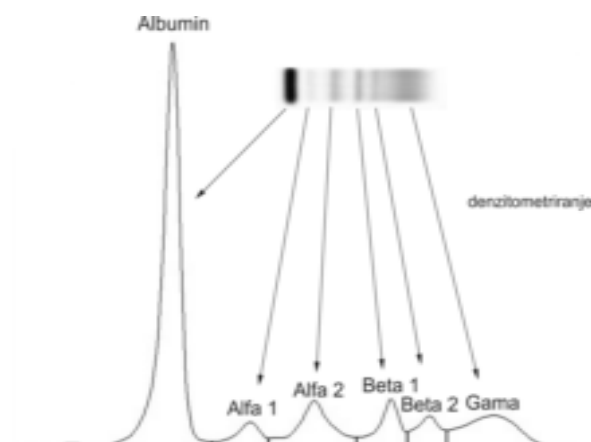
Molekule vzorca (beljakovine, lipoproteini, hemoglobini, encimi) se razdelijo na več frakcij (lis) v različni oddaljenosti od izhodišča. Frakcije postanejo vidne (obarvane) z dodatkom različnih snovi. Za maščobe se uporabljajo v maščobah topne barve, za encime se uporablja primeren substrat itd. V praksi pride lahko do mnogih prekrivanj posameznih lis. Delež posameznih sestavin (lis) dobimo tako, da izmerimo njihovo gostoto z denzitometrom.



Slika 10: Prikaz ločevanja molekul iz zmesi zaradi naboja s pomočjo elektroforezne tehnike

»Denzitometer je specialen kolorimeter za odčitavanje lis na elektroforetskih trakovih. Vsebuje izvor svetlobe, ki pošlje svetlobni žarek skozi filter na transparentni elektroforetski trak. Ko gre svetlobni žarek skozi liso, se ta na njej absorbira, prepuščena svetloba pa pade na

detektor (merimo absorbanco). Aparat zazna vse absorbance na posameznih delih lis in nariše graf. Denzitometer integrira površino pod vsakim maksimumom krivulje, tako da dobimo relativne deleže vsake frakcije. Če je znana koncentracija celokupnih beljakovin, se izračunajo še koncentracije posameznih beljakovinskih frakcij (g/L)« (3).



Slika 11: Elektroferogram serumskih beljakovin in prikaz pretvorbe lis na gelu v krivuljo z denzitometrom

Elektroforezo so sprva uporabljali le za ločevanje beljakovin. Postopek je bil zapleten in dolgotrajen. Kasneje so razvili elektroforezo za ločevanje drugih sestavin, npr. RNK in DNK, postopki pa so postajali vse bolj avtomatizirani. V laboratorijski medicini uporabljamo elektroforezo za ločevanje beljakovinskih frakcij seruma, likvorja in urina (elektroforeza beljakovin, CDT), lipoproteinov (elektroforeza lipoproteinov), encimov in izoencimov (ALKP, CK, LDH), hemoglobinov (K-Abnormalni hemoglobini, K-HbA1c).

3.5.2. Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu (PAGE) in SDS-PAGE elektroforeza

Elektroforeza PAGE je sorodna elektroforezi AGE, vendar je zamreženost gela dosežena kemično. Akrilamid v prisotnosti radikalov polimerizira v poliakrilamid.

Elektroforeza SDS-PAGE ločuje beljakovine na osnovi molske mase. SDS – natrijev dodecil sulfat nevtralizira beljakovinske naboje, zato je ločitev odvisna samo od velikosti molekule. Manjše molekule potujejo hitreje od večjih.

Tovrstna izvedba v rutinskih laboratorijih klinične kemije ni zaželena zaradi toksičnosti akrilamida in dodatkov v gelu. Prav tako podatki o sami molski masi beljakovin na določenem mestu gela nimajo prave informativne vrednosti, saj se na tem mestu lahko pojavi več beljakovin z enako molsko maso, npr. polimerizirane ali razpadle beljakovine, ki tako motijo identifikacijo našega analita (9, 10).

3.5.3. Izoelektrično fokusiranje (IEF)

»Izoelektrično fokusiranje se od klasične elektroforeze loči po tem, da se ne izvaja v okolju z enoznačno določenim pH, temveč v okolju, kjer je pH vrednost odvisna od položaja na gelu. Običajno se pH v gelu linearno spreminja od enega konca gela do drugega (linearni pH gradient), lahko pa je sprememba gradienta pH tudi drugačna. Beljakovina v električnem polju potuje toliko časa, dokler ne dospe v področje gela, kjer je pH natančno enak vrednosti njegove izoelektrične točke (pI). Takrat postane število pozitivnih nabojev, ki jih beljakovina nosi, enako številu negativnih nabojev, navzven postane beljakovina električno nevtralna. Sila električnega polja nanj ne deluje več, zato v gelu obmiruje – se fokusira. Občutljivost tehnike se poveča, če določen pH gradient pripravimo v daljšem gelu. V laboratorijih uporabljamo to

tehniko za določanje fenotipa alfa-1-antitripsina, oligoklonalnih frakcij v likvorju ali transferina (diagnostika sindroma CDG)« (9).

3.5.4. Imunoelektroforeza, imunofiksacija (IF)

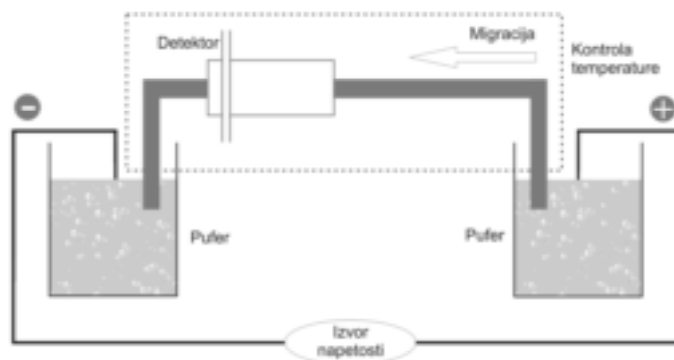
V slovenskih laboratorijih klinične kemije imunoelektroforezo ne izvajamo že najmanj 20 let. Nadomestila jo je enostavnejša tehnika imunofiksacije za kvalitativno identifikacijo monoklonskega zobca. Za določitev zvrsti monoklonskega zobca sta potrebni dve stopnji. V prvi stopnji izvedemo klasično elektroforezo na agaroznem gelu, v drugi stopnji pa nanesemo na mesta, kjer je potekla elektroforeza, specifična protitelesa. Protitelesa in antigen (v tem primeru beljakovina iz vzorca) reagirata in kompleks je fiksiran v zamreženi strukturi agaroznega gela. Obarvamo in rezultat interpretiramo. Imunofiksacije nikoli ne izvajamo brez predhodne elektroforeze beljakovin.

3.5.5. Kapilarna elektroforeza (CE)

Kapilarna elektroforeza temelji na osnovah klasične elektroforeze s to razliko, da se komponente vzorca ločijo v kapilari.

Kapilarna elektroforeza je doživela pravi razcvet in danes predstavlja orodje, ki je nepogrešljivo v vsakem sodobnem laboratoriju. Uveljavila se je kot dobra alternativa tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti in daje z njo primerljive rezultate, hkrati pa za analizo porabi manjše volumne vzorcev in topil, je enostavna za uporabo in avtomatizirana. Prvič so jo uporabili v klinične namene za analizo serumskih beljakovin. S kapilarno elektroforezo lahko analiziramo širok spekter vzorcev. Uporablja se za analize serumskih beljakovin, za ločitev različnih vrst hemoglobina, za identifikacijo monoklonskih protiteles, za analizo DNK (npr. za ugotavljanje Downovega sindroma), itd.

Glavna omejitev kapilarne elektroforeze je nizka meja detekcije, saj zaradi majhnega premera kapilare in posledično nizkega volumskega pretoka ne moremo uporabljati klasičnih detektorjev, primernih za HPLC (3, 6, 10, 11). Občutljivost in specifičnost tehnike se znatno poveča, ko se CE sklopi z masnim spektrometrom kot detektorjem.



Slika 12: Shematski prikaz aparature kapilarne elektroforeze

3.6. OSMOMETRIJA

Osmometrija je metoda, s katero merimo število raztopljenih delcev (molekul, ionov) v raztopini. Osmoza je proces, ki opisuje premik topila (vode) preko polprepustne membrane zaradi razlike v osmotskem tlaku na obeh straneh membrane (4, 5, 12).

Pri opisu meritve elektrolitsko-tekočinskega ravnotežja se uporabljata izraza osmolalnost in osmolarnost. Med sabo se tehnično razlikujeta, vendar je njuna razlika pri opisu bioloških tekočin minimalna zaradi nizke koncentracije topljencev v ekstracelularni tekočini. Osmolalnost (z "ℓ") je merilo za osmole (Osmol) topljenca na kilogram vode (Osmol/kg),

medtem ko je osmolarnost (z "r") opredeljena kot število osmolov topljenca v litru raztopine (Osmol/L) (4, 5, 12).

$$\text{Osmolarnost} = \sum \varphi \cdot n \cdot C$$

Enačba 1: Matematična definicija osmolarnosti: φ – osmotski koeficient (eksperimentalno določen faktor, ko molekule ne obstajajo v ionski obliki, kljub veliki razredčitvi); n – število raztopljenih delcev (ionov) v raztopini; C – koncentracija topila v [mol/kg] (4).

Raztopina z višjo osmolalnostjo ima večje število delcev in manj vode v volumenski enoti raztopine (enačba 1). Zaradi spremembe števila raztopljenih delcev v raztopini se spremenijo t.i. koligativne lastnosti (fizikalne lastnosti, ki so odvisne od množinskega dela topljenca v raztopini in ne od njegove kemijske narave): osmotski tlak (tlak, ki je potreben za preprečitev aktivnega pretoka vode preko polprepustne membrane; minimalni tlak, ki je potreben za odpravo osmoze), parni tlak (tlak pare snovi, ki je v ravnotežju z njeno kondenzirano fazo; je pokazatelj hitrosti izparevanja snovi in je povezan s tendenco delcev, da zapustijo tekočo ali trdno fazo), temperatura vrelišča in temperatura zmrzišča. Z osmometri določamo osmolalnost raztopine posredno z merjenjem ene od koligativnih lastnosti, običajno upada temperature zmrzišča ali parnega tlaka (2, 5).

K osmolalnosti seruma/plazme doprinesejo poleg natrijevih in kloridnih ionov (sta najbolj številna prosta delca v ekstracelularni tekočini) tudi nizkomolekularne spojine: glukoza in sečnina (2, 5). Zato osmolalnost lahko tudi matematično izračunamo (enačba 2) (4).

$$P_{osm} = 2 \times [Na^+] + [glu] + [sečnina]$$

Enačba 2: Matematičen izračun osmolalnosti plazme v [mOsm/kg]; $[Na^+]$ – koncentracija natrijevih ionov v plazmi v mmol/L; $[glu]$ – koncentracija glukoze v plazmi v mmol/L; $[sečnina]$ – koncentracija sečnine v plazmi v mmol/L (4).

Osmotska vrzel je razlika med izmerjeno in izračunano osmolalnostjo. Povečana je, ko so v plazmi prisotni drugi osmotsko aktivni delci (npr. etanol, metanol, etilenglikol, visoke koncentracije trigliceridov in beljakovin).

3.7. LABORATORIJSKI TESTI OB PREISKOVANCU

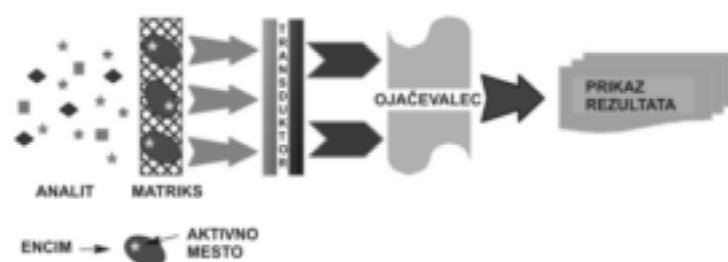
Laboratorijski testi ob preiskovancu (POCT – point-of-care testing) se nanašajo na vsako laboratorijsko analizo, ki se izvaja izven kliničnega laboratorija. POCT je v zdravstveni uporabi razširjen med zdravniškimi ambulantami, bolnišničnimi oddelki, urgenco in enotami intenzivne zdravstvene terapije. Najpogostejše se POCT uporabljajo pri samokontroli koncentracije glukoze na domu, vendar so danes na tržišču tudi aparati za merjenje hemoglobina, CRP, holesterola, nekaterih zdravil, označevalcev srčnih obolenj, koagulacijskih in mikrobioloških testov. Uporaba POCT je v zdravstvu razširjena zaradi hitre razpoložljivosti rezultata analize krvnega vzorca, manjšega števila predanalitičnih napak (npr. nižanje koncentracije glukoze zaradi nepravilnega transporta v laboratorij), potrebe po majhnem volumnu vzorca za analizo (kaplja krvi) ter zaradi razmeroma enostavnega upravljanja z merilniki (uporaba, primerna tudi za nelaboratorijsko osebo) (13).

POCT je osnovana na istih tehnikah, kot so laboratorijski instrumenti: spektrofotometrija, elektrokemija, kromatografija. Zato pri POCT veljajo ista pravila in smernice glede zagotavljanja kakovosti analiznega postopka kot v kliničnih laboratorijih (kalibracija, kontrole, izobraževanje izvajalca) (5).

Prva generacija aparatov POCT je uporabljala reagente v suhi obliki, nanešene na polimernem nosilcu. Barvni kompleks, ki nastane v reakciji med analitom v vzorcu in reagentom (npr. pri sistemu za določanje glukoze: na testnem lističu so v suhi obliki nanešena peroksidaza in glukoza-oksidadaza; nastali H_2O_2 daje v reakciji s peroksidazo barvni kompleks), spektrofotometrično detektiramo. Meritev intenzitete nastale barve, kot funkcije

koncentracije, poteka z refleksijsko spektrometrijo. Podobna tehnologija »na traku« je papirna kromatografija, kjer na traku imobilizirana specifična protitelesa služijo za ločitev analita (beljakovin ali encimov; npr. troponin) od matriksa. Druga generacija aparatov POCT uporablja biosenzorje, ki so sestavljeni iz biodektorja (npr. encima, protitelesa, nukleinskokislinske sonde), sklopljenega s pretvornikom za neposredno merjenje analita, kjer ni potrebno ločiti analita od matriksa. V zadnjih letih se je to področje tehnologije še bolj razširilo z razvojem izdelave mikrosilikonskih čipov. Tako imamo lahko na istem nosilcu vrsto različnih biosenzorjev na večtestnih ploščah (npr. elektroliti). Danes imajo aparati POCT poleg optičnega biosenzorja vgrajeno elektrokemično tehnologijo (mikro-selektivne elektrode) za meritve glukoze, elektrolitov, plinske analize. V prihodnosti bo mogoče z imobilizacijo protiteles in specifičnih DNK-sekvenc v biosenzorne sonde določati hormone, zdravila, toksikomanogena sredstva ter bakterijske in virusne okužbe (npr. klamidija, tuberkuloza, virus imunske oslabelosti) (5).

Prenos vzorca iz mesta odvzema do reakcijske celice je eden od ključnih izzivov tehnologije POCT. Z razvojem mikropretočne tehnologije je prenos vzorca prešel iz pasivnega kapilarnega toka na absorpcijskem matriksu do aktivnega tekočinskega prenosa. Slednja tehnološka rešitev je največ uporabna v sistemih, ki analizirajo več parametrov hkrati (npr. reakcijske celice za parametre plinske analize) ter doprinese k večji občutljivosti in specifičnosti in krajšemu času analize (5).



Slika 13. Shematski prikaz biosenzorja v POCT.

3.8. MOLEKULARNA DIAGNOSTIKA

Molekularna diagnostika opredeljuje področje odkrivanja bolezni zaradi patogenih mutacij DNK in/ali RNK. Dopolnjuje laboratorijske rezultate ter izsledke histopatoloških preiskav in drugih diagnostičnih podatkov v okviru diagnoze in spremljanja bolezni (odkritje vzroka, nagnjenosti ali prenašalcev); lahko daje tudi smernice za ustreznejše in učinkovitejše možnosti zdravljenja ter napovedi poteka bolezni. Najbolj se uporablja na področju družinske medicine, onkologije, ginekologije in porodništva ter v sodni medicini. Molekularna diagnostika združuje laboratorijsko medicino z znanjem in tehnologijo molekularne genetike, ki je v zadnjih desetih letih doživela velike spremembe zaradi novih odkritij pri razumevanju strukture in kemije nukleinskih kislin (2, 14).

Vsaka celica v človeškem telesu vsebuje informacijo za celo telo, zapisano v zaporedju nukleinskih kislin in organizirano v 46 kromosomih. Četrtnina celotnega genoma sestavljajo geni (predeli DNK, ki kodirajo zapis za eno polipeptidno ali RNK verigo). Človeški genom je sestavljen iz 30-35 tisoč genov, od katerih jih je do danes identificiranih le 10.000. Izmed teh je le 100 genov, ki kodirajo beljakovine, katerih fiziološka vloga je znana. Pomembno vlogo pri odkrivanju genov, odgovornih za nagnjenost k nekaterim boleznim, je imel projekt »humani genom« (15).

Spremembe v zaporedju nukleotidov (mutacije) prispevajo k nagnjenosti ali razvoju bolezni, če je ta mutacija znotraj kodirajočih sekvenc gena (eksonov) in se tako lahko izrazi kot npr. zmanjšana aktivnost ali napačno zvijanje beljakovine, ki jo mutirani gen kodira. Poleg genskih mutacij (insercije, delecije, prerazporeditve) so lahko genske spremembe t.i. polimorfizmi ter spremembe v količini in strukturi kromosomov (trisomije, translokacije,

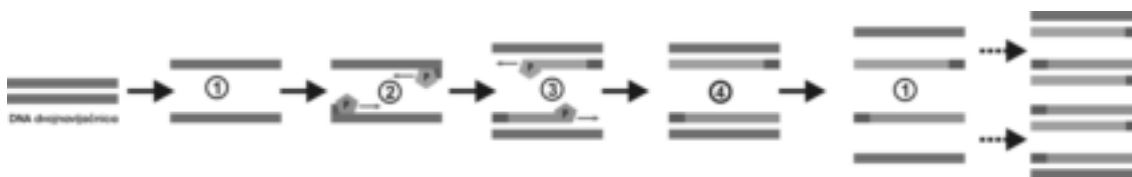
duplikacije). Pri genetskih preiskavah največkrat ugotavljamo gensko spremembo, ki jo poznamo (znana sprememba nukleotidnega zaporedja odseka gena) (14, 15).

Tehnologije, ki se na tem področju uporabljajo so (14, 15):

- amplifikacijske (ojačevalne) tehnike: PCR-verižna reakcija s polimerazo, LCR-verižna reakcija z ligazo, NASBA- ojačanje baznega zaporedja nukleinskih kislin;
- določanje zaporedja DNK;
- hibridizacije tehnike: Southern blot, Northern blot;
- elektroforezne metode: SSCP- konformacijski polimorfizmi enoverižne DNK, DGGE- gelska elektroforeza z gradientom denaturanta;
- tehnologija rekombinantne DNK;
- tehnologija biočipov: DNK-mikromreža.

Vsem naštetim metodam je skupna začetna faza izolacije DNK ali RNK iz biološkega materiala (z obarjanjem v etanolu ali izopropanolu, z ekstrakcijo s fenolom in kloroformom, z ionskoizmenjevalno kromatografijo ali kolonami s silikagelsko membrano).

- a. Reakcijo verižne polimerizacije (PCR-polimerase chain reaction) je razvil K. Mullis 1983. To je ciklični tritopenjski proces, pri katerem pomnožimo izbrani odsek DNK (slika 14). PCR v realnem času (real time PCR) je posebna izvedba PCR, pri kateri s pomočjo fluorescenčnih barvil spremljamo količino nastajajočega produkta v teku reakcije (14, 15).



Slika 14. Shematski prikaz PCR: (1) – denaturacija DNK pri 94-96° C; (2) – prileganje oligonukleotidnih začetkov pri 40-60° C; (3) – podaljševanje verige s termostabilno DNK-polimerazo (P) pri 72° C; (4) – zaključen prvi cikel, kjer novonastali dvojnivijačni DNK predstavljata šablono za naslednji cikel. V vsakem ciklu se število DNK podvoji.

- b. Določanje nukleotidnega zaporedja DNK (DNA sequencing) je edina metoda analize DNK, ki omogoča opredelitev točnega mesta in vrsto genske spremembe v DNK. Vse ostale metode temeljijo na primerjavi lastnosti pacientove DNK z referenčno (slika 15) (14, 15).



Slika 15: Shematski prikaz ene od metod DNK-sekveniranja.

Molekularna diagnostika je pomembna zato, ker ima več kot 5.000 bolezni neposredno genetski vzrok. Molekularno diagnostični testi imajo možnost avtomatizacije, zato rezultate lahko dobimo hitro, kar omogoča učinkovitejšo oskrbo pacienta. Danes je razvoj tehnik molekularne genetike usmerjen k odkrivanju infekcijskih bolezni in tumorjev (2).

4. KONTROLA KAKOVOSTI

Kontrola kakovosti je nepogrešljiva pri izvajanju analitskih tehnik. Za nemoteno izvajanje vseh postopkov je potrebno preverjanje z notranjo kontrolo, skladno z navodili proizvajalca, in zunanjo kontrolo – medlaboratorijska primerjava ne glede na to, kje in kdo laboratorijske preiskave opravlja.

5. ZAKLJUČEK

Medicina, laboratorijska medicina in različna področja tehnike in informatike se nenehoma širijo, spreminjajo in nadgrajujejo. Strokovnjaki bodo vseskozi pred novimi izzivi, kako pripraviti občutljivejše in bolj specifične analitske tehnike predvsem za zgodnje odkrivanje patofizioloških procesov, ki bi v prihodnosti človeka morebiti obvarovala pred (pre)bolečimi posledicami. Znanje, ki ga posedujemo v tem trenutku, je dobra osnova za nadaljnji korak k celovitejši preventivi in zdravlju vsakega posameznika.

6. LITERATURA

1. *Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine*, Uradni list RS, št. 64/04.
2. *Osredkar J, Marc J. Laboratorijska medicina I: Učbenik za študente medicine, farmacije in laboratorijske biomedicine*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2012.
3. *Pivk B. Instrumentalne metode v analizi kemiji*. Republika Slovenija, Ministrstvo za šolstvo in šport, Konzorcij šolskih centrov, Srednja šola za farmacijo, kozmetiko in zdravstvo, Evropski socialni skladi Evropske unije; 2011.
4. *Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Elsevier Saunders; 2006.
5. *Drees JC, Wu AHB. Analytical techniques*. In Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical chemistry: techniques, principles, correlations*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
6. *Schwedt G. Essential Guide to Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons; 1997.
7. <http://en.wikipedia.org/wiki/Chromatography>
8. http://sl.wikipedia.org/wiki/Afinitetna_kromatografija
9. *Križaj I. Metode za analizo proteoma. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost*, Ljubljana, 31. januar in 1. februar 2008; str. 3.
10. *Keren DF. Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis*. Hodder Arnold; 2003.
11. http://sl.wikipedia.org/wiki/Kapilarna_elektroforeza
12. *Anderson SC, Cockayne S. Clinical Chemistry: Concepts and Applications*. London: W.B. Saunders Company, 1993.
13. *Krivec M, Češnovar A, Miklavc D, Finderle P, Prezelj M. Zagotavljanje kakovosti POC (point-of-care) testov*. In Kobe JM, Homšak E, Krhin B, Meško-Brguljan P, Pungertnik D. 3. slovenski kongres tehnikov laboratorijske medicine [zbornik strokovnih prispevkov]. Slovensko združenje za klinično kemijo; 2008
14. *Trebušak K, Malešič I. Metode molekularne biologije v medicinski diagnostiki [seminarska naloga]*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2001.
15. *Wittwer CT, Kuskawa N. Nucleic acid techniques*. In Bruns DE, Ashwood ER, Burtis CA. *Fundamentals of Molecular Diagnostics*, Elsevier Saunders; 2007.
16. *Dodeigne C, Thunus L, Lejeune R. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review*. *Talanta* 2000; 51(3):415-39.

SODOBNI TEHNOLOŠKI TRENDI NA PODROČJU LABORATORIJSKE HEMATOLOGIJE

Petra Uljarević, univ.dipl.biokem., spec.med.biokem.

Nataša Dukarić, dipl.inž.lab.biomed.

Mojca Palko, dipl.inž.lab.biomed.

Oddelek za laboratorijsko diagnostiko
UKC Maribor

april 2013

VSEBINA

1. UVOD

2. AVTOMATIZIRANI SISTEM ZA TRANSPORT IN ANALIZO HEMATOLOŠKIH VZORCEV

2.1. Elementi avtomatiziranega sistema

3. MERITVENE METODE IN PARAMETRI

3.1. Možni načini za analizo vzorcev periferne krvi, kapilarne krvi in telesnih tekočin

3.2. Načini analize vzorcev telesnih tekočin

4. POTRJEVANJE (VALIDACIJA) REZULTATOV

5. AVTOMATIZIRANI NAČIN PRIPRAVE IN BARVANJA KRVNIH RAZMAZOV

6. SODOBNE TEHNIKE DIFERENCIRANJA KRVNIH RAZMAZOV Z UPORABO AVTOMATIZIRANEGA SISTEMA

6.1. Splošen opis sistema za avtomatizirano diferenciranje krvnih razmazov

6.2. Aplikacija za periferno kri

6.3. Aplikacija za telesne tekočine

6.4. Notranja kontrola kvalitete

6.5. Vzdrževanje

7. ZAKLJUČEK

8. LITERATURA

1. UVOD

V hematološkem laboratoriju Oddelka za laboratorijsko diagnostiko UKC Maribor dnevno analiziramo do 720 vzorcev periferne krvi na osnovne hematološke parametre (kompletna krvna slika). Ena tretjina (približno 250 vzorcev) izmed teh ima naročeno še diferencialno krvno sliko. Od tega pregledamo mikroskopsko do 50 razmazov periferne krvi. V hematološkem laboratoriju analiziramo tudi vzorce drugih telesnih tekočin (punktati, likvor). Povprečno šest vzorcev telesnih tekočin na dan pregledamo organoleptično, preštejemo celice in pregledamo sedimente teh vzorcev.

Zaradi pomanjkanja laboratorijskega kadra, velikega števila vzorcev, ki jih analiziramo, in potrebe po krajšem času analitičnega procesa, smo se v našem laboratoriju odločili za avtomatizacijo procesa. Avtomatizacija postaja vedno bolj pomembna, saj povečuje produktivnost in zmanjšuje možnost pojavljanja napak.

Naš cilj je bil zagotoviti visoko pretočnost dela z minimalnim številom laboratorijskih delavcev in pri tem obdržati ali celo nadgraditi kakovost opravljenega dela.

Kljub tem izpopolnjenim sistemom pa ostaja mikroskopski pregled krvnega razmaza še vedno pomembna preiskava v hematoloških laboratorijih.

2. AVTOMATIZIRANI SISTEM ZA TRANSPORT IN ANALIZO HEMATOLOŠKIH VZORCEV

Avtomatizirani način transporta in analize vzorcev predstavlja samostojni pretok vzorcev med aparati, ki jih analizirajo (kompletna krvna slika, diferencialna krvna slika, analiza vzorcev telesnih tekočin), pripravljajo, barvajo in diferencirajo razmaze periferne krvi v skladu z našimi nastavitvami. Zaključni korak avtomatizacije je razvrščanje vzorcev na logičen in enostaven način ter izločanje vzorcev krvi, ki so namenjeni drugim laboratorijem za druge naročene preiskave.

Delovanje celotnega sistema nadzoruje računalniški program, ki sprejme naročilo iz laboratorijskega informacijskega sistema in ga usmerja na analizatorje. Po opravljeni preiskavi rezultate usmeri v program za potrjevanje (validacijo) le teh. S procesom (avto)validacije se pospeši pretok rezultatov do naročnika (oddelki, ambulate). Opisani način dela olajša analiziranje velikega števila vzorcev in skrajša čas analitičnega procesa.

2.1. Elementi avtomatiziranega sistema

Elementi avtomatiziranega sistema so:

- Vstopni modul
- Hematološki analizator
- Aparat za pripravljanje in barvanje razmazov periferne krvi
- Aparat za razvrščanje vzorcev
- Aparat za avtomatizirano diferenciranje in razvrščanje digitalnega prikaza celic

3. MERITVENE METODE IN PARAMETRI

Hematološki analizatorji s fluorescentno pretočno citometrijo zagotavljajo podrobno analizo rdeče in bele populacije krvnih celic.

Uporabljamo 4 specifične meritvene metode.

- Pretočna citometrija s semikonduktivnim laserjem pridobi informacije o velikosti celic (forward scattered light), celični vsebini (side scattered light) in vsebini nukleinskih kislin v celici (side fluorescence). Kombinacija teh informacij omogoča štetje in diferenciranje levkocitov, normoblastov in retikulocitov. Ločimo 4 kanale s pretočno citometrijo (DIFF, WBC/BASO, NRBC in RET/PLT-O).
 - Detekcijska metoda RF/DC (IMI kanal) omogoča hkratno določanje velikosti celic (direct current) in vsebine celice (radiofrequent current). Celice enake velikosti ločimo glede na velikost jedra in stopnjo granuliranosti celic.
 - HF/DC (RBC/PLT) metoda hidrodinamičnega fokusiranja omogoča štetje eritrocitov in trombocitov, ki v nosilni tekočini prehajajo skozi odprtino meritvene komore. V njej se posamezne celice opredelijo po velikosti glede na interakcijo s svetlobo (DC).
 - SLS Hemoglobinska metoda uporablja natrijev lauril sulfat (SLS) za določanje koncentracije hemoglobina v vzorcu. SLS lizira eritrocite ter z vezavo na hemoglobin povzroči konformacijske spremembe hemoglobina in oksidacijo hema v skupino hemin. Kompleks SLS-hemoglobin omogoča spektrofotometrično določanje koncentracije hemoglobina (535 in 560nm).
1. Levkociti, normoblasti in retikulociti se določajo s pomočjo pretočne citometrije in semikonduktivnega laserja.
 2. Eritrociti in trombociti se določajo s pomočjo tehnologije pretočne citometrije in hidrodinamičnega fokusiranja.
 3. Hemoglobin določamo s hemoglobinsko SLS metodo.
 4. Nezrele celice (vključno s hematopoetsko celico) detektiramo in določamo v kanalu IMI (temelji na detekcijski metodi RF/DC in kanalu DIFF, kjer se izvaja pretočna citometrija).

3.1. Možni načini za analizo vzorcev periferne, kapilarne krvi in telesnih tekočin

Analiza se lahko izvede na šest možnih načinov :

- manualni (ročni),
- “manual closed mode”, ki je enak splošnemu manualnemu načinu, vendar ni potrebno odstranjevati pokrova epruvete,
- “sampler closed mode” z avtomatskim mešanjem vzorca ter aspiriranjem vzorca brez odstranjevanja pokrova epruvete,
- kapilarni način aspirira in redči vzorec v razmerju 1:5 s pomočjo reagenta za redčenje; uporabljamo ga za analizo pediatričnih vzorcev, odvzetih iz prsta ali ušesa,
- HPC (periferna kri z antikoagulantom EDTA in popkovnica),

- način za analizo telesnih tekočin - “body fluid mode”- način za analizo materiala, kadar je potrebno ročno odstraniti pokrov epruvete ter izvesti aspiriranje materiala preko aspiracijske igle za polno kri.

Minimalna količina vzorca za posamezne načine analize materiala je 200 µL.

3.2. Načini analize vzorcev telesnih tekočin

Za analizo telesnih tekočin uporabljamo “Body Fluid Mode” (BF) oziroma tehnologijo pretočne citometrije ter metodo hidrodinamičnega fokusiranja.

Določanje številčne koncentracije levkocitov in dvodelne DKS (loči mononuklearne celice od polimorfonuklearnih) temelji na tehnologiji pretočne citometrije s semikonduktivnim laserjem oziroma na uporabi fluorescentnega barvila za nukleinske kisline celic in monoklonskih protiteles s fluorescentnimi barvili za površinske označevalce celic (najpogosteje CD5).

Štetje eritrocitov temelji na detekcijski metodi DC – hidrodinamičnega fokusiranja. Številčna koncentracija eritrocitov je zelo pomembna za pravilno klinično interpretacijo rezultatov.

Ugotovili smo, da daje analizator zelo natančne rezultate pri analizi vzorcev telesnih tekočin z visokim številom celic. Za vzorce z nizkim številom celic je še vedno metoda zlatega standarda štetje v Fuchs-Rosenthalovi komori. “Body fluid mode” detektira in šteje specifične vrste celic (makrofage oz. monohistiocite, endotelne celice – epitelij subarahnoidnega kanala, tumorske celice, siderofagocite) ter njihovo prisotnost označi kot pojav “High Fluorescence Body Fluid”.

4. POTRJEVANJE (VALIDACIJA) REZULTATOV

Validacijo rezultatov izvajamo v posebnem programu “Extended IPU”.

V programu so definirana dovoljena odstopanja za vrednosti posameznih parametrov krvne slike in sicer za:

- številčno koncentracijo levkocitov,
- koncentracijo hemoglobina,
- povprečno prostornino eritrocitov – MCV,
- številčno koncentracijo trombocitov,
- morfološke spremembe v rdeči krvni sliki,
- pojav normoblastov ,
- diferencialno krvno sliko (absolutne, relativne vrednosti levkocitnih podvrst).

Analizator nas opozori, če zazna nedovoljena odstopanja in če zazna posebnosti v diferencialni krvni sliki (alarmi): pomik v levo, patološki pomik v levo, prisotnost atipičnih limfocitov, abnormalnih limfocitov/blastov, ipd.

V kolikor ni zgoraj naštetih odstopanj ali posebnih opozoril, se parametri v programu avtovalidirajo. Avtovalidacija je samodejno pošiljanje rezultatov v laboratorijskem informacijskem sistemu na višji nivo potrjevanja in zato v tem primeru ukrep analitika ni potreben.

V primeru enega ali več naštetih odstopanj oziroma posebnega opozorila mora rezultate pregledati in validirati analitik. Ta pregled lahko pomeni zavrnitev vzorca zaradi

predanalitične napake, ponovitev meritve, zahtevo za kontroliranje diferencialne krvne slike, klic naročniku preiskave in podobno. Najpogostejši ukrepi se nanašajo na pojav trombocitnih skupkov, trombocitopenijo, morfologijo levkocitov (pomik v levo, patološki pomik v levo, prisotnost atipičnih limfocitov, abnormalnih limfocitov/blastov), oceno morfologije celic (rdeča, bela krvna slika) in pregled značilnosti v diferencialni krvni sliki (odstopanje deleža posameznih vrst levkocitov).

Zaradi velikega deleža patoloških in strokovno zahtevnih vzorcev so priprava, barvanje in mikroskopski pregled razmaza periferne krvi še vedno velik del naše vsakdanje prakse.

5. AVTOMATIZIRANI NAČIN PRIPRAVE IN BARVANJA KRVNIH RAZMAZOV

Del avtomatiziranega sistema za transport in analizo hematoloških vzorcev v našem laboratoriju vključuje tudi aparat, ki avtomatsko pripravi krvni razmaz iz kapilarne in venozne krvi, odvzete z antikoagulantom K₃EDTA.

Aparat aspirira 200 µl venskega vzorca in 60 µl kapilarnega vzorca krvi. Aparat pripravi razmaz iz venske krvi samodejno, glede na izdelana in določena pravila kontrolnega programa. Na aparatu lahko uporabimo tudi „manual mode“. Le ta omogoča aspiracijo krvi, pripravo, sušenje, označevanje in barvanje razmaza z barvili po May-Grunwald Giemsi. Uporabljamo izključno kapilarne vzorce krvi, odvzete v mikrokolektorje Becton Dickinson.

Vsak laboratorij ima izdelane kriterije oziroma pravila, kdaj je potreben mikroskopski pregled diferencialne krvne slike. V našem laboratoriju ga izvedemo na osnovi odstopanja številčnih vrednosti za posamezne celice, opozoril hematološkega analizatorja in zahtev s strani naročnika. Slovensko združenje za klinično kemijo je novembra leta 2011 izdalo knjižico Priporočeni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza, ki vsebuje jasno predpisana merila, kdaj bi naj razmaze pregledali mikroskopsko.

Z upoštevanjem vseh kriterijev, tako priporočil za mikroskopski pregled razmaza periferne krvi kot internih laboratorijskih pravil, aparat pripravi in barva krvni razmaz kadar je:

1. številčna koncentracija levkocitov pod $2 \times 10^9/L$ ali nad $25 \times 10^9/L$,
2. številčna koncentracija nevtrofilcev pod $1 \times 10^9/L$ ali nad $20 \times 10^9/L$,
3. številčna koncentracija limfocitov nad $5 \times 10^9/L$,
4. številčna koncentracija monocitov nad $1,5 \times 10^9/L$,
5. številčna koncentracija eozinofilcev nad $2 \times 10^9/L$,
6. številčna koncentracija bazofilcev nad $0,5 \times 10^9/L$,
7. številčna koncentracija trombocitov pod $100 \times 10^9/L$ ali nad $1000 \times 10^9/L$,
8. v izpisu iz analizatorja opozorilo za spremenjene morfološke lastnosti eritrocitov,
9. v izpisu analizatorja opozorilo za agregate ali velike trombocite,
10. v izpisu analizatorja opozorilo za neznačilne in nezrele levkocite.

Postopek avtomatizirane priprave in barvanja razmaza periferne krvi:

- Čitalec črtne kode na liniji (HST) odčita stojalo, v katerem so nameščene epruvete z vzorci krvi.
- Čitalec črtne kode ob aparatu odčita kodo na posamezni epruveti krvi.
- Aparat epruveto premeša in aspirira vzorec krvi.

- Kapljico krvi prenese na objektno steklo in napravi razmaz krvi.
- Razmaz krvi po sušenju označi in barva z raztopinama May-Grunwald in Giemsa.
- Barvanje razmaza kot del avtomatiziranega sistema traja 23 minut.

Barvilo May-Grunwald ima v metanolu raztopljen eozin in metilensko modrilo. Barva predvsem citoplazmo in njene sestavine, medtem ko obarva jedro nežno modro. Giemsa vsebuje barvili eozin in azur. Jedra celic obarva vijolično rdeče, citoplazmo pa modro ali rdeče (odvisno od vrste celic).

Danes le redko ročno barvamo razmaze periferne krvi, saj z avtomatsko pripravo razmazov dobimo konstantno kakovost izvedbe in barvanja razmaza.

Za avtomatizirano diferenciranje potrebujemo razmaze periferne krvi enakomerne debeline, brez črt, brazd, lukenj ali mehurčkov. Poleg tega mora biti razmaz dolg vsaj 30 mm, ustrezno označen in kvaliteto barvan. Aparat Sysmex SP 1000i izpolnjuje vse te zahteve.

6. SODOBNE TEHNIKE DIFERENCIRANJA KRVNIH RAZMAZOV Z UPORABO AVTOMATIZIRANEGA SISTEMA

Težava ročnega diferenciranja je v subjektivni oceni morfoloških značilnosti krvnih celic, kar privede do različnih rezultatov, zahteva pa tudi strokovno usposobljeno osebje. Sama priprava, barvanje in diferenciranje krvnega razmaza zahtevajo veliko časa. Da bi skrajšali čas, ki je potreben za diferenciranje krvnega razmaza periferne krvi, smo v našem laboratoriju dosegli veliko pridobitev z avtomatskim digitalnim morfološkim analizatorjem (CellaVision DM96).

6.1. Splošen opis sistema za avtomatizirano diferenciranje krvnih razmazov

6.1.1. Splošne funkcije sistema

- Sprejme informacije o naročilu iz laboratorijskega informacijskega sistema (LIS).
- Poišče in prikaže slike vsake posamezne celice ali elementa, ki jih najde v razmazu.
- Shrani slike in rezultate v bazo podatkov.

6.1.2. Glavni deli sistema:

- računalniški sistem - računalnik z operacijskim sistemom Microsoft Windows XP in programsko opremo CellaVision DM96;
- enota za fotografiranje preparatov, ki vsebuje:
 1. motoriziran mikroskop,
 2. barvno digitalno kamero,
 3. enoto z imerzijskim oljem,
 4. enoto za podajanje preparatov z bralnikom črtnih kod,
 5. enoto za podajanje kaset,
 6. krmilna enota,
 7. ohišje.

6.1.3. Namembnost

Analizator samodejno naredi diferencialno krvno sliko periferne krvi (PB) in telesnih tekočin (BF), klasificira levkocite, opiše eritrocitno morfologijo in trombocite. Analizator se dobro vključi v vsak hematološki delovni proces. Z zmogljivostjo med 35 in 40 razmazov na uro omogoča visoko stopnjo avtomatizacije.

6.2. Aplikacija za periferno kri

Aplikacija za periferno kri (PB) je namenjena diferencialni sliki levkocitov, karakterizaciji morfologije eritrocitov in oceni števila trombocitov.

Sistem samodejno poišče in prikaže slike krvnih celic v razmazih periferne krvi.

Laboratorijsko osebje identificira in preveri predlagano klasifikacijo vsake celice glede na vrsto.

6.2.1. Klasifikacija levkocitov

Sistem klasificira levkocite v naslednje razrede:

- Segmentirani in paličasti nevtrofilci, eozinofilci, bazofilci, limfociti, monociti, blastne celice, promielociti, mielociti, metamielociti, atipični limfociti, plazma celice in neprepoznavne celice.
- Obstaja možnost klasifikacije celic v razrede: nedozoreli eozinofilci, nedozoreli bazofilci, promonociti, prolimfociti, veliki granulirani limfociti, dlakaste celice, Sezaryjeve celice, megakariociti, brez razreda in drugo.
- Klasifikacija celic, ki ne sodijo v levkocitno populacijo: eritroblasti (NRBC), veliki trombociti, skupki trombocitov, zabrisane celice in artefakti.

6.2.2. Opis morfologije eritrocitov

Avtomatizirana karakterizacija morfologije eritrocitov zajema: anizocitozo, mikrocitozo, makrocitozo, polikromazijo, hipokromazijo in poikilocitozo. Na voljo so tudi naslednje karakteristike: tarčaste celice, srpaste celice, shistiociti, sferociti, eliptociti, ovalociti, dakriociti, stomatociti, akantociti, ehinociti, Howell-Jollyjeva telesca, Pappenheimerjeva telesca, bazofilno punktirani eritrociti, paraziti in drugo.

6.2.3. Ocena števila trombocitov

Analitik lahko v pregledni sliki prešteje ali oceni trombocite.

6.2.4. Opombe

K rezultatom levkocitov, eritrocitov, trombocitov ali k posamezni celici lahko dodamo opombe.

6.3. Aplikacija za telesne tekočine

Aplikacija za telesne tekočine (BF) je namenjena diferencialni sliki levkocitov v različnih telesnih tekočinah. Sistem samodejno poišče in prikaže slike celic v citocentrifugiranih pripravkih vzorcev telesnih tekočin.

Laboratorijsko osebje preveri predlagano diferenciranje celic.

6.3.1. Klasifikacija za telesne tekočine (BF)

Sistem klasificira levkocite v naslednje razrede: nevtrofilci, eozinofilci, limfociti, makrofagi in drugo (other). Celice, ki so klasificirane kot bazofilci, limfomske celice, atipični limfociti, blasti ali tumorske celice, so samodejno uvrščeni v razred celic "other" (drugo).

Celice, ki ne sodijo v levkocitno populacijo, analizator poda kot število celic ali elementov na 100 levkocitov.

6.3.2. Priprava vzorcev

Vzorci telesnih tekočin se pripravijo s citocentrifugo ter pobarvajo po enakem postopku kot razmazi periferne krvi.

6.4. Notranja kontrola kvalitete

Za notranjo kontrolo kvalitete uporabljamo naključno izbran razmaz periferne krvi, s katerim preverjamo pravilno delovanje mikroskopa. Priporočen interval za izvajanje kontrol v laboratoriju je enkrat tedensko.

6.5. Vzdrževanje

Vzdrževanje izvajamo po navodilih proizvajalca:

- dnevno vzdrževanje
- tedensko vzdrževanje

7. ZAKLJUČEK

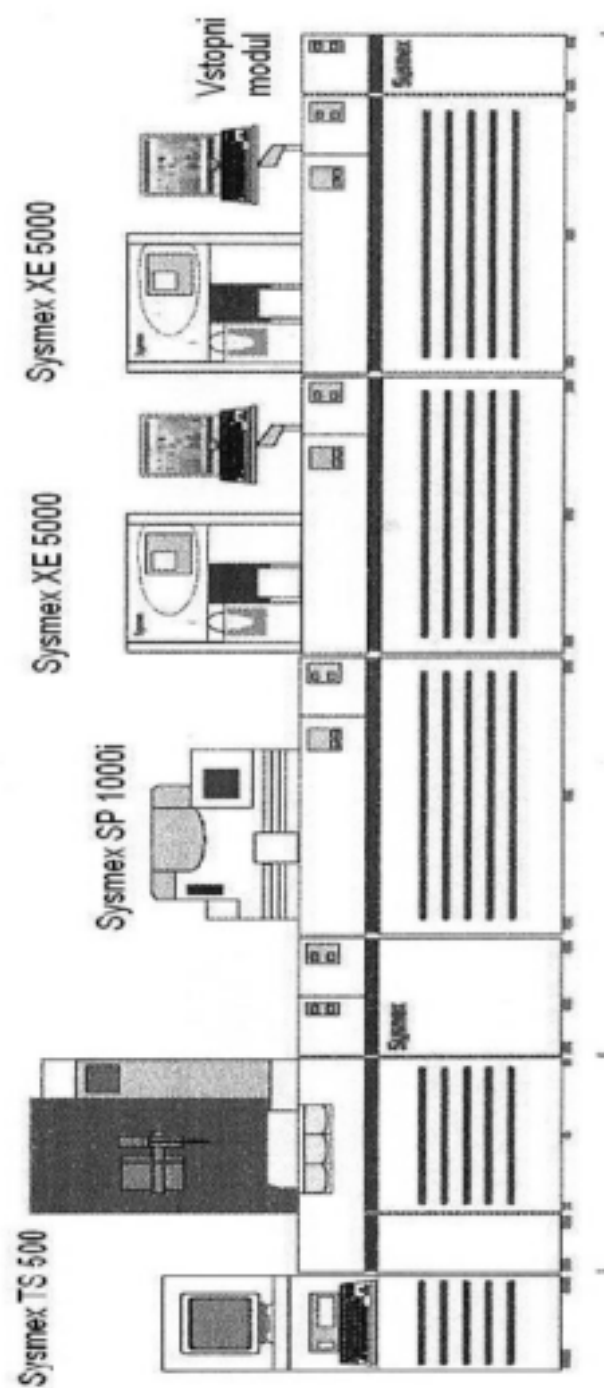
Nova tehnologija, ki jo uporabljamo v našem laboratoriju zagotavlja visoko kakovost opravljenih preiskav in olajša delo laboratorijskemu osebju. Omogoča racionalno organizacijo dela zaposlenih, izboljšuje produktivnost in zmanjšuje možnost pojava analitičnih napak.

Kljub vsemu ostaja mikroskopiranje pomemben del hematološkega delovnega procesa, saj tudi najsodobnejša tehnologija ne more vedno pravilno opredeliti celic in oceniti njihovih posebnosti.

8. LITERATURA:

1. *Sysmex LASC-HST Operator's Manual*
2. *Sysmex HST - N Operator's Manual*
3. *Sysmex XE - 5000 Operator's Manual*
4. *Berce, Božnar-Alič, Podgornik, Trampuš-Bakija, Žontar: Priporočeni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza – SZKK, november 2012.*
5. <http://www.cellavision.com>
6. <https://www.sysmex.com/us/en/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-5000-Hematology>

Dodatek: Grafični prikaz avtomatiziranega hematološkega sistema na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko UKC MB



OSNOVNE BIOKEMIČNE IN CITOLOŠKE PREISKVE PUNKTATOV TELESNIH VOTLIN

**Mag. Elizabeta Božnar Alič, univ.dipl.biol., spec.med.biokem.
Asist. mag. Alenka France-Štiglic, mag.farm., spec.med.biokem.**

Univerzitetni klinični center Ljubljana
Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

maj 2013

V S E B I N A

1. UVOD

2. ODVZEM, TRANSPORT IN SHRANJEVANJE

3. ORGANOLEPTIČNI PREGLED

4. pH

5. BIOKEMIČNE PREISKAVE

5.1. Kreatinin

5.2. Alfa-amilaza in lipaza

5.3. Laktat dehidrogenaza

5.4. Bilirubin

5.5. Celokupni proteini in albumin

5.6. Trigliceridi

5.7. Holesterol

5.8. Elektroliti

5.9. Glukoza

5.10. Opredelitev izlivov v transudat in eksudat

5.11. Učinek matriksa

6. CITOLOŠKE PREISKAVE

6.1. Določanje koncentracije celic z jedrom

6.2. Diferenciacija celic

6.3. Identifikacija posameznih vrst celic

7. BAKTERIOLOŠKI SEDIMENT

8. LITERATURA

1. UVOD

V klinično biokemičnih laboratorijih vzorci punktatov različnih telesnih votlin niso tako pogosti kot vzorci krvi. Vzorci punktatov so običajno enkratni nenadomestljivi vzorci, ki se pridobijo s punkcijo. Ker je punkcija težko ponovljiv invaziven poseg, moramo dobro poznati vse postopke, ki so ključni za pridobitev zanesljivega rezultata analize (odvzem, transport, shranjevanje, predanalitični vplivi, postopki analize, vpliv biološke in analitične variabilnosti na interpretacijo rezultatov).

Glavni namen analitike punktatov telesnih votlin (PTV) je opredelitev v transudat ali eksudat. Le na osnovi kliničnih znakov je ta opredelitev nezanesljiva, zato so pri opredelitvi v pomoč laboratorijske analize, ki daje informacije o **organoleptičnih lastnostih, biokemični in celični sestavi** izliva. Opredelitev izliva v transudat ali eksudat ima ključen pomen za opredelitev vzroka bolezni ter vpliva na izbiro nadaljnjih preiskav in diagnostičnih postopkov.

Podrobneje bomo obravnavali tri telesne tekočine: **plevralno, perikardialno in peritonealno**. Vse tri tekočine se nahajajo znotraj zaprtih telesnih votlin, ki jih imenujemo **plevralna, perikardialna in peritonealna votlina**. V plevralni votlini se nahajajo pljuča, v perikardialni srce in v peritonealni trebušni organi. Votline so prekrite z dvema seroznima membranama, ki sta obdani z enim slojem mezotelijskih celic. Membrana, ki prekriva steno telesne votline, se imenuje **parietalna membrana**, druga, ki prekriva organe znotraj te votline, se imenuje **visceralna membrana**. Med obema membranama se nahaja zelo majhna količina serozne tekočine (15 do 50 mL), ki deluje kot lubrikacijsko sredstvo in preprečuje nastanek trenja med njima, do katerega pride med premikanjem organov znotraj votline. Prostor med membranama je zelo ozek in ni prava votlina; ta nastane, ko pride do bolezenskega kopičenja tekočine, to je do **nastanka izliva**.

Serozna tekočina med membranama je ultrafiltrat plazme, tvori jo parietalna membrana, reabsorbira jo visceralna membrana. Proces tvorbe in reabsorpcije potekata kontinuirano in sta v ravnotežju, zato se v normalnem stanju količina tekočine bistveno ne spreminja. Tekočina nastaja s filtracijo plazme preko endotelija kapilar, količina nastale tekočine pa je odvisna od hidrostatskega tlaka v kapilarah, koloidnega (onkotskega) tlaka, prepustnosti kapilar in reabsorpcije preko limfe. Porušenje ravnotežja med mehanizmi, ki sodelujejo pri nastanku in reabsorpciji tekočine, je vzrok za povečano količino tekočine med membranama, kar imenujemo izliv. Do izliva pride, kadar je količina tekočine, ki vstopa v telesno votlino, večja od količine, ki se odstranjuje preko limfe, lahko gre za večje nastajanje, zmanjšano reabsorpcijo ali za kombinacijo obeh procesov.

Primarni vzroki za nastanek izliva:

- povečan kapilarni hidrostatski tlak:
 - srčno popuščanje
 - zadrževanje soli in vode v telesu
- znižan onkotski tlak:
 - nefrotski sindrom
 - jetrna ciroza
 - nezadostna prehrana
 - enteropatija z izgubo proteinov
- povečana prepustnost kapilar:
 - bakterijska okužba
 - vnetje membran
 - maligna obolenja
- zapora limfnih žil:

- maligni tumorji, limfomi
- vnetje in okužbe
- poškodba limfnih vodov

Izliv lahko opredelimo kot transudat ali eksudat. **Transudat** je izliv, ki nastane zaradi neke sistemske motnje oz. bolezni, ki poruši ravnotežje v regulaciji filtracije in reabsorpcije. Vzroki za nastanek so spremembe v hidrostatskem tlaku, ki nastanejo zaradi srčnega popuščanja ali sprememb v onkotskem tlaku (hipoproteinemija) zaradi jetrne ciroze ali nefrotskega sindroma. Pri nastanku **eksudata** pa so neposredno vključene membrane, ki obdajajo votline, vzrok je lahko povečana prepustnost kapilar pri okužbi ali ovirana reabsorpcija zaradi maligne bolezni.

2. ODVZEM, TRANSPORT IN SHRANJEVANJE

Odvzem plevralne tekočine s toracentezo, perikardialne tekočine s perikardiocentezo in peritonealne tekočine ali ascitesa s paracentezo opravi zdravnik pod sterilnimi pogoji in s sterilnimi pripomočki. Pomembno je, da so vzorci za preiskave odvzeti v ustrezne epruvete:

- prve mililitre za mikrobiološke preiskave v **sterilno epruveto brez dodatkov** ali v transportno gojišče,
- vzorec za citološki pregled v **epruveto z vijoličnim zamaškom** z EDTA,
- vzorec za biokemične analize v **epruveto brez dodatkov oziroma z rdečim zamaškom**,
- vzorec za določitev pH v **brizgo za plinsko analizo s heparinom** ali **epruveto s heparinom**,
- vzorec za bakteriološki sediment v epruveto z EDTA ali z rdečim zamaškom.

Transport do laboratorija mora biti hiter. Punktat mora biti analiziran ali pravilno pripravljen za analizo najkasneje v dveh urah po punkciji. Podaljšan čas vpliva na kakovost analize in posledično na interpretacijo rezultatov.

Vzorci PTV za biokemične preiskave po centrifugiranju in ločitvi od celičnega dela shranjujemo v hladilniku. Tako shranjeni vzorci so stabilni do 48 ur oziroma odvisno od posamezne preiskave in priporočil proizvajalca reagentov.

Meritve pH moramo opraviti v 30 minutah, v primeru, ko je vzorec hranjen v ledeni kopeli v 60 minutah.

Vzorci za citološki pregled PTV so stabilni do dve uri, saj celice v punktatu razpadajo in jih zato po daljšem hranjenju ni mogoče diferencirati. Pomembno je, da citološki sediment naredimo v najkrajšem možnem času in ga tudi obarvamo. Do analize punktata v laboratoriju (do štetja levkocitov in priprave citološkega sedimenta) hranimo punktata na sobni temperaturi. Za mikrobiološko osamitev bakterij iz kužnine hranimo vzorce na sobni temperaturi (25 °C) ali v termostatu (35–37 °C).

3. ORGANOLEPTIČNI PREGLED

Izgled vzorca izliva vedno zabeležimo. Opisujemo **motnost** in **obarvanost**. Barva PTV je odvisna od vzroka nastanka. Transudati so bistri in svetlo rumene (slamnate) barve. Pri različnih patoloških procesih so punktati lahko obarvani: rdeče, rjavo, zeleno, belo in črno.

Pri krvavih vzorcih je priporočljiva določitev hematokrita. Kadar vrednost hematokrita presega 50 % vrednost hematokrita v krvi, obstaja sum na **hemotoraks** (prisotnost krvi v plevralni votlini, običajno zaradi neke poškodbe). Kadar je vrednost hematokrita nižja kot 1 % vrednosti v krvi, je ta lahko prisotna zaradi malignega obolenja, pljučne embolije ali poškodbe.

Moten in gnojen izgled imajo vzorci, zaradi povečane koncentracije levkocitov in proteinov (okužba, empiem-gnojno vnetje).

Kadar **vzorci motnost** in **mlečni** izgled ohranijo tudi po centrifugiranju, je to običajno zaradi povečane koncentracije lipidov, ki je značilna za **hilotoraks** ali **pseudohilotoraks**. Stanji lahko med sabo ločimo z določitvijo trigliceridov in holesterola. Do hilotoraksa pride zaradi prisotne limfne tekočine v plevralni votlini ali poškodbe limfnih vodov. V vzorcu je povečana koncentracija trigliceridov. Do nastanka pseudohilotoraksa pride pri kroničnih izlivih, povečana je koncentracijo holesterola, ki izhaja iz membrane razpadlih vnetnih celic. Motnost povzročajo visoke koncentracije holesterola in/ali prisotni lecitinsko-globulinski kompleksi. Lahko pride tudi do nastanka kristalov holesterola.

Izliv je lahko **zeleno** obarvan zaradi prisotnosti žolča ob perforaciji žolčnika ali črevesja in ob akutnem pankreatitisu.

4. pH

pH v izlivih je načeloma nižji v eksudatih kot v transudatih. Na osnovi vrednosti pH je težko ločevati med njima, saj se vrednosti prekrivajo, čeprav nekateri avtorji navajajo vrednosti za eksudate **pod 7,2**. Test je nespecifičen in neobčutljiv, zato meritve večinoma niso klinično uporabne. pH se v izlivih znižuje v odvisnosti od števila celic.

V plevralni tekočini je pH nizek tudi pri poškodbi požiralnika ter prisotnosti krvi ali urina v izlivu.

Meritve pH v perikardialni tekočini z izjemo ločevanja med krvavo perikardialno tekočino in krvjo, ki je v tekočino prišla med odvzemom, niso klinično uporabne.

5. BIOKEMIČNE PREISKAVE

V PTV merimo različne biološke označevalce. Z njimi lahko opredelimo vzrok nastanka patološke tekočine. Izbor označevalcev je odvisen od izvora PTV. Za zanesljivejšo interpretacijo rezultatov je potrebno, da sočasno določimo iste biološke označevalce tudi v serumu ali plazmi. Priporočljivo je, da kri odvezamemo sočasno s PTV in v enako epruveto, saj se nekatere molekule lahko nespecifično adsorbirajo na stene epruvet in jih tako izgubimo iz vzorca.

5.1. Kreatinin

Kreatinin je občutljiv in specifičen test za prisotnost urina v peritonealnem izlivu.

Na uhajanje urina v peritonealni prostor posumimo, če je koncentracija kreatinina v ascitesu relativno višja kot v serumu pacienta, zato je priporočljivo, da sočasno določamo kreatinin tudi v serumu.

5.2. Alfa-amilaza in lipaza

Alfa-amilaza in lipaza sta encima, ki izhajata iz eksokrinih celic pankreasa. Zelo visoke aktivnosti teh dveh encimov v peritonealni ali plevralni tekočini kažejo na prisotnost

pankreatičnega soka zaradi pankreatitisa. Vrednosti v PTV so tudi pri akutnem pankreatitisu nekajkrat višje kot v sočasno odvzetem serumu.

Pri poškodbi požiralnika lahko v plevralni tekočini določimo visoke aktivnosti alfa-amilaze zaradi kontaminacije s slino, ki uhaja preko poškodovanega mesta v plevralni prostor. Visoka aktivnost alfa-amilaze je v plevralni tekočini tudi v primeru prisotnosti tumorskih celic, ki sproščajo amilazo. V obeh primerih je aktivnost lipaze zelo nizka.

5.3. Laktat dehidrogenaza

Aktivnost encima laktat dehidrogenaze (LDH) je visoka v eksudatnem PTV in izvira večinoma iz prisotnih levkocitov, zato ob visoki številčni koncentraciji levkocitov v PTV določimo tudi visoko katalitično aktivnost LDH. Katalitično aktivnost LDH in njeno razmerje glede na aktivnost LDH v serumu uporabljamo za opredelitev izliva v transudat ali eksudat.

5.4. Bilirubin

Visoke koncentracije bilirubina v peritonealni tekočini so posledica uhajanja žolča. Žolč vsebuje velike količine konjugiranega bilirubina, zato je smiselno določati koncentracijo konjugiranega ali celokupnega bilirubina v PTV in jo primerjati s koncentracijo v sočasno odvzetem serumskem vzorcu bolnika. Koncentracije bilirubina v PTV bodo v primeru prisotnosti žolča kar nekajkrat višje kot v serumu.

5.5. Celokupni proteini in albumin

Celokupne proteine in albumin določamo v punktatih telesnih votlin za opredelitev punktata v skupino transudatov ali eksudatov. Koncentracijo celokupnih proteinov primerjamo z njihovo koncentracijo v sočasno odvzetem serumu in glede na razmerje opredelimo punktata kot transudat ali eksudat.

5.6. Trigliceridi

Limfa prehaja v serozno tekočino zaradi poškodbe ali obstrukcije torakalnega limfnega voda ali jetrne ciroze. Vsebuje hilomikrone, ki so bogati s trigliceridi, zato za ugotavljanje prisotnosti limfe v izlivu določamo trigliceride. Koncentracija trigliceridov v izlivu, ki ne vsebuje limfe, je okrog 0,38 mmol/L, ob prisotnosti limfe koncentracija trigliceridov v izlivu naraste na povprečju 2,85 mmol/L. Za razmejitveno vrednost uporabljamo koncentracijo **1,25 mmol/L**.

5.7. Holesterol

Holesterol v izlivu določamo, ko so rezultati opredelitve izliva po Lightovih kriterijih dvoumni. Transudati imajo vrednosti za holesterol nižje kot eksudati. Razmejitvena vrednost holesterola v izlivu za eksudate je **1,35 mmol/L**. Pri eksudatih je razmerje med holesterolom v serozni tekočini in v serumu večje od **0,3**.

5.8. Elektroliti

Elektroliti v telesnih tekočinah so običajno v ravnovesju z njihovo ionsko aktivnostjo v plazmi, zato njihovo določanje v punktatih načeloma ni smiselno.

5.9. Glukoza

Glukoza v izlivih je običajno v ravnovesju z glukozo v serumu. Izjema so izlivi z veliko celicami, ki glukozo porabljajo. V takšnih izlivih je glukoza nižja kot v serumu, zato je za vrednotenje koncentracije glukoze v izlivih nujno sočasno določanje glukoze v serumu.

5.10. Opredelitev izlivov v transudat in eksudat

Najpogostejše uporabljani kriteriji za ločevanje med eksudati in transudati so **kriteriji po Lightu**. Light za ločevanje uporablja koncentracijo celokupnih proteinov v punktatu (za eksudat > 30 g/L), razmerje koncentracije proteinov v punktatu in serumu (za eksudat $> 0,50$), razmerje LDH v punktatu in serumu (za eksudat $> 0,60$) ali aktivnost LDH v punktatu ($> 2/3$ zgornje referenčne meje v serumu).

Lightovi kriteriji za opredelitev v transudate in eksudate so uporabni za opredelitev patoloških procesov v plevralni in perikardialni tekočini. Za peritonealno tekočino Lightovi kriteriji niso zadostni, zato za opredelitev, ali gre za transudat ali eksudat, uporabljamo tudi razliko med serumskim albuminom in albuminom v ascitesu. Po **Rothovem kriteriju** je razlika 12 g/L ali manj značilna za eksudatne izlive in je še posebej uporabna pri srčnem popuščanju. Pri uporabi kriterijev moramo biti pozorni na možnost, da je za nastanek izliva prisotnih več vzrokov sočasno.

5.11. Učinek matriksa

Pri punktatih telesnih votlin so v večini primerov koncentracije proteinov nižje kot v serumu, hkrati pa so lahko vsebnosti drugih snovi zaradi lokalnih procesov vnetja in izločanja mnogo višje. Prav te razlike v sestavi lahko privedejo do učinkov matriksa, ki vplivajo na rezultate. Razlike v kemični sestavi vzorcev lahko vplivajo tako na fizikalne kot tudi kemične lastnosti vzorca.

Glavni vpliv imajo lipidi in proteini oziroma albumin, ki vplivajo na koncentracijo snovi, ki so topne v lipidih, oziroma snovi, ki so vodotopne.

Poleg tega vsebnost proteinov vpliva na fizikalne lastnosti vzorca, kot sta **viskoznost** in **površinska napetost**. Zaradi spremenjene viskoznosti se lahko pojavijo težave kot pipetiranje nepravilnega volumna vzorca v reakcijsko zmes, nezadostno mešanje reakcijske zmesi in nepopolno spiranje vzorčne igle in/ali reakcijskih kivet analizatorja.

Analite v punktatih telesnih votlin merimo z metodami, ki so postavljene za serum ali plazmo, zato se moramo zavedati, da na rezultate v večji ali manjši meri vpliva tudi matriks. S primerjavo vrednosti analitov v punktatih z vrednostmi v serumu, kliniki vseeno lahko ocenijo, kakšna je koncentracija analita v punktatu glede na serum. Visoke koncentracije v izlivu kažejo na domnevno vpletenost organa, koncentracije, podobne serumskim, pa kažejo, da organ v nastanek izliva ni vpleten.

6. CITOLOŠKE PREISKAVE

6.1. Določanje koncentracije celic z jedrom

V punktatih telesnih votlin določamo koncentracijo celic z jedri, da bi ugotovili, ali gre za vnetni ali nevnetni proces. Citološki kriterij za razlikovanje med transudatom in eksudatom je koncentracija celic z jedrom. Razmejitvena vrednost je $1,0 \times 10^9/L$. Koncentracijo celic z jedrom določamo **mikroskopsko v Neubauerjevi komori** za štetje krvnih celic. V tem primeru punktate razredčimo v razmerju 1:20 z raztopino po Türku. Raztopina po Türku je hipotonična, zato hemolizira eritrocite, obenem pa modro-vijolično obarva jedra levkocitov, da celice lažje štejemo. Preštajemo vse levkocite na površini 4 mm^2 . Kadar so vzorci zelo motni ali krvavi, jih predhodno redčimo z izotoničnimi raztopinami (npr. fiziološka raztopina) v razmerjih 1:10, 1:100 ali 1:200, lahko tudi več, odvisno od motnosti vzorca. Če je v celotni komori prisotnih manj kot 200 celic, preštajemo površino celotne komore, v nasprotnem primeru zmanjšamo površino štetja in to upoštevamo pri izračunu. Celice v komori najprej pregledamo pod 100-kratno povečavo, da preverimo, če so enakomerno razporejene oz. se ne

prekrivajo. Celice nato štejemo pod 400-kratno povečavo. V števni komori je celice težko ločiti med sabo, to velja predvsem za mezotelijske celice in monohistiocite, zato preštajemo vse celice z jedri in rezultat podamo v SI enotah (št. $\times 10^9/L$).

Nekateri **sodobnejši hematološki analizatorji omogočajo določanje koncentracije celic tudi v telesnih tekočinah**. Metodo odlikuje večja točnost rezultatov. Lahko določajo samo celokupno število celic, nekateri pa izvedejo tudi diferenciacijo na polimorfonuklearne in mononuklearne celice. Vsak laboratorij, ki določa koncentracijo celic na avtomatiziran način, mora sam določiti analitično merilno območje, spodnjo mejo detekcije in v primeru opozoril uporabiti druge metode (števna komora, citološki sediment).

Opozorila

- Če je v vzorcu prisoten **strdek**, določitev koncentracije celic kljub temu izvedemo, vendar zapišemo v komentar, da je netočno tako celokupno število kot tudi diferenciacija celic.
- V primeru, da so v komorici prisotni **skupki celic**, jih ne vključimo v celokupno število celic in v komentar navedemo, da je rezultat koncentracije celic netočen zaradi prisotnosti skupkov.

6.2. Diferenciacija celic

Citološki pregled je namenjen diferenciaciji celic z jedri in ugotavljanju prisotnosti malignih celic. Za diferenciacijo celic se priporoča priprava preparatov **citoloških sedimentov** s pomočjo **citocentrifuge**. Pri tej tehniki celice primerno skoncentriramo, celični nanos je v enem sloju, možnosti, da se celice pri tem poškodujejo, pa so minimalne. S pomočjo citocentrifuge se celice skoncentrirajo približno 20-krat, tako tudi pri vzorcih, ki imajo izredno nizko koncentracijo celic ali v komori za štetje celic ne najdemo ($0 \times 10^9/L$ celic), lahko v citološkem sedimentu najdemo do 35 celic.

V primeru, da nimamo citocentrifuge, lahko pripravimo **klasične razmaze iz sedimenta vzorca**, ki smo ga centrifugirali 10 minut pri 2500 vrtljajev/min. Vsekakor pa je diferenciacija celic v citoloških sedimentih bolj zanesljiva, ker lahko pri pripravi razmazov pride do poškodb in neenakomerne razporeditve celic. Z uporabo metode barvanja preparatov po Pappenheimu so celice zelo podobne tistim v krvi in kostnem mozgu. Diferenciramo vse celice z jedri in rezultat izrazimo v odstotkih ali pa diferenciramo le levkocite in ostale celice opišemo s semikvantitativnimi izrazi (npr.: posamezni, maloštevilni, številni). Pomembno je, da rezultate vedno izražamo ne enak način. Zaradi možne prisotnosti malignih celic je prav tako pomembno, da pregledamo cel preparat, saj so lahko prisotne le posamezne maligne celice.

Opozorila

- Na izkoristek in morfologijo celic, ki jih pridobimo s pripravo citološkega sedimenta, vplivajo hitrost in čas centrifugiranja, količina vzorca v kiveti ter absorpcijska sposobnost filtra.
- Za pripravo vedno uporabimo svež, necentrifugiran vzorec (do razpadanja celic pride že po nekaj urah). Če je citološki preparat narejen več kot 8 ur po punkciji in so v preparatu prisotne **razpadle oz. delno razpadle celice**, moramo v komentar izvida navesti, da rezultat diferenciacije ni povsem točen zaradi prisotnosti razpadlih celic.
- Izlivi lahko vsebujejo fibrin ali druge proteine, ki lahko zamašijo filter, zato je lahko količina celic v preparatu zmanjšana, obenem pa lahko vpliva tudi na njihovo razporeditev.
- Če je prisoten strdek ali opazimo skupke celic v števni komori, je lahko rezultat diferenciacije netočen, kar zapišemo v komentar.

- Vzorce z **visokim številom levkocitov** ali **zelo krvave vzorce** moramo pred pripravo citoloških sedimentov **razredčiti** s fiziološko raztopino. V primeru, da so celice preveč nagnetene ali se celo prekrivajo, nam to otežuje diferenciacijo in interpretacijo, saj pride do popačenja izgleda celic oz. njihovih morfoloških lastnosti. Priporočljivo je, da se držimo standardne sheme redčenja vzorcev, ki naj temelji na številčni koncentraciji levkocitov. Tako bomo vedno pripravili ustrezne preparate, kjer bodo celice enakomerno razporejene v enem sloju.

6.3. Identifikacija posameznih vrst celic

Diferenciramo naslednje skupine celic z jedri:

- hematopoetične celice: nevtrofilci (segmentirani, paličasti), nezreli granulociti (metamielociti, mielociti, promielociti), limfociti, monociti/makrofagi, eozinofilci, bazofilci, mastociti, plazma celice, eritroblasti;
- mezotelijske celice;
- blasti, limfomske celice, nehematopoetske tumorske celice;
- atipične celice (opis zapišemo v komentar).

Nevtrofilni granulociti

Število nevtrofilcev v različnih izlivih se lahko zelo razlikuje, vendar v primeru prevladovanja lahko sumimo na bakterijsko pljučnico, pljučni infarkt ali pankreatitis. V izlivih lahko vidimo vse razvojne stopnje nevtrofilcev in so enake kot v krvi. Za segmentirane nevtrofilne granulocite je značilno, da so segmenti med sabo bolj jasno ločeni in pogosto so jedrni segmenti nameščeni bolj na zunanji strani celice, blizu membrane. Če so toksične granulacije in vakuolizacija citoplazme prisotne pri nevtrofilcih v krvi, jih lahko vidimo tudi v izlivu. Nevtrofilci so v izlivih, kjer so prevladujoča celična vrsta, pogosto degenerirani. Jedro lahko postane piknotično in je vidno kot majhna, gosta in okrogla masa. Če so prisotne toksične granulacije, se lahko združujejo v azurofilne skupke. Te celice spominjajo na eritroblaste, vendar jih zaradi tipičnih ostankov azurofilnih granulacij običajno brez težav prepoznamo kot nevtrofilce. Pri okužbah pa se degeneracija lahko kaže z zabrisano strukturo jedra, izrazito vakuolizacijo in izgubo granulacij. V nevtrofilcih lahko opazimo tudi fagocitirane bakterije.

Eozinofilni granulociti

Morfološko se ne razlikujejo od eozinofilcev v krvnem razmazu. V večjem številu (več kot 10 %) pa so prisotni pri pnevmotoraksu, hemotoraksu, alergijskih reakcijah in parazitskih okužbah. Pri pnevmotoraksu eozinofilijo izzovejo prašni delci različnega izvora, ki z zrakom vstopijo v plevralni prostor.

Bazofilni granulociti, mastociti

Bazofilci so po morfologiji enaki tistim v krvi. Pogosto so prisotni takrat kot eozinofilci.

Limfociti

Prisotni so tako v transudatih kot eksudatih, po velikosti so različni: mali, veliki, lahko so tudi reaktivni. Tipični majhni zreli limfociti so nekoliko večji kot v krvi, običajno imajo obilnejšo citoplazmo, jedro je lahko zažeto, lahko je vidno manjše jedrce. Včasih je prisotno manjše število azurofilnih granulacij.

Reaktivni limfociti so v izlivih pogosto prisotni in se po morfologiji zelo razlikujejo. Običajno imajo okroglo ali rahlo zažeto jedro, obilno citoplazmo, ki se razlikuje v barvi, od svetle do izrazito bazofilne. Reaktivni limfociti lahko izhajajo iz naravnih celic ubijalk ali limfocitov T. Ti običajno vsebujejo manjše število azurofilnih granulacij. Limfociti B občasno vsebujejo

manjše citoplazmatske vakuole. Imunoblasti imajo rahlejšo strukturo kromatina, več manjših jedrc in manjšo količino izrazito bazofilne citoplazme z redkimi azurofilnimi granulacijami. Plazmacitoidne oblike imajo značilno strukturo kromatina, več manjših jedrc in izrazito bazofilno citoplazmo. Pogosto imajo ob jedru svetlino. V nasprotju s celicami malignih limfomov imajo reaktivni limfociti izrazito in gladko jedrno membrano in pravičen oris jedra. Večje število limfocitov zasledimo v izlivih pri tuberkulozi, virusnih okužbah ter avtoimunskih boleznih, kot sta revmatoidni artritis in sistemski lupus eritematosus.

Plazmatke

So podobne kot v krvi in se običajno pojavljajo skupaj z reaktivnimi limfociti. V izlivih lahko pogosto zasledimo tudi dvojedrne oblike in večje nezrele plazmatke z obilnejšo izrazito bazofilno citoplazmo ter rahlejšo strukturo kromatina.

Mononuklearni fagocitni sistem

- **Monociti/monohistiociti**

Nahajajo se posamično ali v skupinah, veliki so od 20 do 40 μm in so nekoliko večji od normalne mezotelijske celice. Morfološko so zelo različni, od tipičnih oblik, podobnih monocitom v krvi, do reaktivnih monocitov. Celica je svetlo obarvana, jedro je okroglo ali ledvičasto in leži ekscentrično ali periferno. Kromatinska struktura je drobno zrnata, jedra niso prisotna. Citoplazma je obilna, jasno ali neizrazito omejena in vakuolizirana. Take oblike monocitov imenujemo tudi monohistiociti. Občasno se vakuole v citoplazmi združijo in tvorijo t.i. pečatnico - celico v obliki pečatnega prstana.

- **Makrofagi**

Kadar imajo monociti/monohistiociti jasne znake fagocitoze (fagocitoza različnih materialov, veliki ostanki prebavnih vakuol), jih imenujemo makrofagi. Aktivnost makrofagov je lahko zelo velika. Lahko vsebujejo fagocitirane eritrocite (**eritrofagi**), nevtrofilce (**nevtrofagi**), lipide (**lipidofagi**), mikroorganizme, kristale in modročrne hemosiderinske granule (**siderofagi**), ki nastanejo iz železa fagocitiranih eritrocitov. Lahko vidimo tudi **kristale hematina** (rumenorjavi, romboidne oblike), ki so v makrofagih redko prisotni in so ostanki razgrajenega hemoglobina iz fagocitiranih eritrocitov. Kristali hematina ne vsebujejo železa.

Mezotelijske celice

Prekrivajo notranji del plevralne, perikardialne in peritonealne votline in so po morfologiji zelo različne. Razmnožujejo se z delitvijo. Ob bolezenskem procesu se lahko odluščijo in sprostijo v izliv. Normalne mezotelijske celice so velike 15 do 30 μm in so po izgledu enotne. Imajo centralno ali ekscentrično nameščeno okroglo, včasih ovalno jedro, ki v premeru zavzema 1/3 do 1/2 velikosti celice. Kromatin je gost, enakomeren, vidno je lahko manjše neizrazito jedrce. Celice imajo zmerno količino svetlo do zmerno bazofilne citoplazme, ki ne vsebuje granulacij in je jasno omejena. Običajno se nahajajo posamezno. V kroničnih izlivih so prisotne **reaktivne mezotelijske celice**, ki so po morfologiji izredno raznolike (različna velikost in oblika). Lahko se nahajajo posamično, v nizih, v ploščatem sloju ali tridimenzionalnih skupkih. Celice so lahko dvojedrne, posamične tudi več jedrne (tudi 20 ali več jeder), so povečane, imajo rahlejšo strukturo kromatina in vidna majhna jedrca. Jedrca so lahko številna vendar so, v nasprotju z malignimi celicami, enake velikosti. Količina citoplazme je različna, intenzivno bazofilna in drobno vakuolizirana. Vakuolizacija je lahko prisotna po celotni citoplazmi ali pa le ob jedru (perinuklearni halo). Zaradi teh sprememb lahko spominjajo na maligne celice.

Degenerativne spremembe mezotelijskih celic se kažejo z vakuolami v citoplazmi, predvsem na periferiji celic. Celice so večje in blede obarvane, jedro je lahko piknotično ali pa je napihnjeno in ima zabrisano strukturo kromatina.

Mezotelijske celice prav tako lahko opravljajo fagocitozo in se pretvorijo v makrofage. Možne so tudi vmesne oblike, takrat pa je razlikovanje med mezotelijskimi celicami in makrofagi zelo težavno.

Maligne celice

Med maligne celice uvrščamo hematopoetične (blasti, limfomske celice) in nehematopoetične maligne celice, ki so lahko različnega izvora.

- **Blasti**

Po obliki so podobni blastom v krvi ali kostnem mozgu. Kadar jih najdemo v izlivu, je pomembno, da hkrati pregledamo tudi krvni razmaz in ugotovimo, ali blasti v izlivu res predstavljajo zaplet pri levkemiji ali pa so posledica kontaminacije izliva s krvjo.

- **Limfomske celice**

Velike limfomske celice so podobne imunoblastnim reaktivnim limfocitom. Imajo nezrel jedrni kromatin, številna jedrca in zmerno količino bazofilne citoplazme. Zanje značilne morfološke lastnosti so: nepravilna oblika jedra, jedrna membrana ni izrazita, velika jedrca, majhne vakuole, ki prekrivajo tudi jedro, brez jasne Golgijeve regije in homogen izgled celic v izlivu. Pri limfomih z majhnimi celicami jih težko ločimo od normalnih limfocitov. V tem primeru so potrebne še druge preiskave, kot so pretočna citometrija in imunohistološke preiskave.

- **Nehematopoetične maligne celice**

Številne maligne neoplazme lahko vdrejo v telesne tekočine. Maligne celice lahko izvirajo iz primarnih tumorjev ali metastaz (adenokarcinom, sarkom in primarni možganski tumorji).

Morfološke značilnosti malignih celic:

- celice so velike in več jedrne;
- visoko razmerje med jedrom in citoplazmo, večje kot je razmerje, slabše so celice diferencirane;
- neenakomerno razporejen jedrni kromatin;
- različna velikost in oblika jeder;
- hiperkromatična jedrca;
- povečano število in velikost jedrc;
- vakuolizirana citoplazma;
- tvorba tesnih skupkov, celice med sabo niso jasno ločene (celice se prekrivajo);
- fagocitoza.

Pri pregledu citoloških sedimentov je pomembno, da prepoznamo maligne celice, če so prisotne. Zavedati pa se moramo omejitev morfološkega pregleda pod mikroskopom, saj je razlikovanje med reaktivnimi in atipičnimi mezotelijskimi celicami ter malignimi celicami pogosto zelo težko.

Opozorila

- Pri pripravi preparatov s pomočjo citocentrifuge je nanos celic v enem sloju. Celice so zato lahko nekoliko večje kot v krvnih razmazih, prav tako se lahko bolj intenzivno obarvajo azurofilne citoplazmatske granulacije, citoplazma je lahko bolj bazofilna.
- V primerih, ko je koncentracija celic majhna, lahko podajamo rezultate opisno (semikvantitativno), še posebno, če so celice v citološkem sedimentu redke.
- Število diferenciranih celic moramo zapisati v komentar, kadar je to nižje od 100.
- Kadar diferenciacije ne izvedemo, je potrebno navesti, katere celice so prisotne (npr. limfociti; monociti/makrofagi; prevladovanje nevtrofilcev; prisotne mešane vnetne celice ...)

- Posamezne skupine celic se lahko združijo ali ločijo. Pogosto težko ločimo med reaktivnimi mezotelijskimi celicami in monociti/makrofagi. Te celice lahko med seboj združimo, ne da bi ogrozili klinično interpretacijo rezultatov.
- Intra- ali ekstracelularno prisotnost mikroorganizmov ter prisotnost eritrofagov, siderofagov, lipofagov in kristalov zapišemo v komentar.
- Celic, ki so prisotne zaradi kontaminacije, ne smemo vključiti v diferenciacijo; če jih opazimo že v komorici; jih ne vključimo v celokupno število celic (ploščate epitelne celice, endotelne celice, ...)
- Iz diferenciacije izključimo tudi degenerirane celice, razen če je njihova identiteta jasna.
- Skupke mezotelijskih celic in maligne celice raje opišemo v komentarju, kot da jih vključujemo v rezultat diferenciacije.
- Če celic ne moremo jasno opredeliti oz. identificirati, jih opredelimo kot atipične in to zapišemo v komentar.

7. BAKTERIOLOŠKI SEDIMENT

Ob sumu na bakterijsko okužbo v telesnih votlinah je nujna čim hitrejša prepoznavna bakterijskega povzročitelja bolezni in nato hitra uvedba ustrezne antibiotične terapije. Za natančno identifikacijo bakterije pošljemo punktat v mikrobiološki laboratorij na izolacijo bakterije iz kulture, kar pa lahko traja nekaj dni. Da bi čim prej ugotovili verjetnega bakterijskega povzročitelja, si pomagamo s presejalnim mikroskopskim pregledom bakteriološkega sedimenta, obarvanega po Gramu.

8. LITERATURA

1. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Analysis of Body Fluids in Clinical Chemistry; Approved Guideline. CLSI document C49-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.*
2. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Body Fluid analysis for Cellular Composition; Approved Guideline. CLSI document H6-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.*
3. *King Strasinger S, Schaub DI Lorenzop M. Urinalysis and Body Fluids. Fifth edition. F. A. Davis Company, Philadelphia, 2008.*
4. *Citopatologija plevralnega izliva. Zbornik predavanj tečaja citopatologije plevralnega izliva v okviru 4. Golniškega simpozija, ur. Izidor Kern, Golnik, 2005.*
5. *Kjeldsberg K, Knight J. Body Fluids. Third edition, American Society of Clinical pathologists, 1993.*
6. *Light RW. Diagnostic principles in pleural disease. Eur Respir J 1997; 10: 219-225.*
7. *Light RW. Diagnostic approach in a patient with pleural effusion. Eur Respir Mon 2002; 22: 131-145.*
8. *Leers MPG, Kleinveld HA, Schernhorst V. Differentiating transudative from eksudative pleural effusion: should we measure effusion cholesterol dehydrogenase? Clin Chem Lab Med 2007; 45: 1332-1338.*
9. *Roth BJ, O'Meara TF, Craugun WH. The Serum_Effusion Albumin Gradient in the Evaluation of Pleural Effusions. Chest 1990; 98: 546-409.*
10. *Porcel JM, Light RW. Diagnostic Approach to Pleural Effusion in Adults. American Family Physician 2006; 73: 1211-1220.*

VITAMINI

Klementina Berce, univ.dipl.kem., spec.med.biokem.

Splošna bolnišnica Izola
Laboratorij za klinično kemijo in hematologijo

maj 2013

VSEBINA

1. UVOD

2. DELITEV VITAMINOV

3. VLOGA VITAMINOV V TELESU

4. HIPOVITAMINOZA, HIPERVITAMINOZA

5. ESENCIALNI VITAMINI ZA ČLOVEKOVO TELO

5.1. Vitamin A	RETINOL
5.2. Vitamin B ₁	TIAMIN
5.3. Vitamin B ₂	RIBOFLAVIN
5.4. Vitamin B ₃	NIACIN
5.5. Vitamin B ₅	PANTOTENSKA KISLINA
5.6. Vitamin B ₆	PIRIDOKSIN
5.7. Vitamin B ₇	vitamin H = BIOTIN
5.8. Vitamin B ₉	FOLNA KISLINA – PTEROILGLUTAMINSKA KISLINA
5.9. Vitamin B ₁₂	KOBALAMIN
5.10. Vitamin C	ASKORBINSKA KISLINA
5.11. Vitamin D	KALCIFEROL
5.12. Vitamin E	TOKOFEROL
5.13. Vitamin K	FILOKINON – antihemoragični vitamin

6. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA VITAMINOZ

7. ZAKLJUČEK

8. LITERATURA

1. UVOD

Beseda vitamin je sestavljena iz dveh pojmov: »vita« pomeni »življenje«, »amin« pa »vsebuje dušik«.

Vitamini so poleg mineralov esencialni za vzdrževanje humanih biokemičnih procesov. Tako vitamine kot minerale moramo v telo vnesti iz okolja. Med minerale prištevamo kemijske elemente kalcij, fosfor, kalij, natrij, klor, magnezij, železo, kobalt, baker, cink, molibden, jod in selen. Za razliko od mineralov so vitamini organske snovi, večina jih vsebuje dušik.

Beseda vitamini označuje skupino biološko aktivnih snovi, ki so v zelo majhnih količinah nujno potrebni za vzdrževanje normalnega delovanja človeškega telesa, za njegove presnovne procese, rast in razvoj. Njihovo pomanjkanje povzroča različna bolezenska stanja.

V majhnih količinah so vitamini prisotni v različnih živilih, od koder jih večino v telo tudi dobimo. Človeško telo jih namreč iz osnovnih hranilnih snovi, kot so proteini, ogljikovi hidrati ali maščobe, ne more sintetizirati. Proizvaja lahko samo vitamin D, vse ostale vitamine ali njihove prekursorje (provitamine) pa prejme telo večinoma s hrano. Nekatere vitamine tvorijo tudi bakterije v črevesju.

2. DELITEV VITAMINOV

Trenutno je poznanih 13 za človekovo telo esencialnih vitaminov. Ločimo v maščobah topne (lipidotopni) in v vodi topne (vodotopne) vitamine. **Vitamini A, D, E in K** spadajo med topne v maščobah, topni v vodi pa so vitamini iz skupine B (**B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉ in B₁₂**) ter **vitamin C**.

Vitamini, topni v maščobah, se absorbirajo v črevesju s pomočjo maščob (lipidov). Shranjujejo se tako v maščobnem tkivu kot tudi v jetrih. Za razliko od vodotopnih se lažje skladiščijo in lahko ostanejo v telesu kot rezerva nekaj dni, nekateri med njimi pa celo mesece.

V vodi topni vitamini se v telesu ne hranijo dolgo. Zelo kmalu se iz telesa izločijo skozi ledvice z urinom. Zato skorajda ni nevarnosti, da bi se zastrupili s preveliko količino zaužitih v vodi topnih vitaminov. Zaužitje nenormalno velikih količin vitaminov B posledično ne povzroča toksičnih, ampak prehodne neželene učinke.

V vodi topne vitamine je potrebno veliko pogosteje nadomeščati kot pa vitamine, topne v maščobah.

3. VLOGA VITAMINOV V TELESU

Glavna naloga vitaminov je sodelovanje v presnovnih procesih organizma. Mnogi so koencimi ali prostetične skupine encimov. Tako so nujno potrebni za vzdrževanje aktivnosti številnih encimov.

4. HIPOVITAMINOZA, HIPERVITAMINOZA

Telo ima minimalno zalogo vitamina C glede na potrebe in zelo veliko zalogo vitamina B₁₂. Šele v približno sedmih letih telo porabi 2-3 miligramsko zalogo vitamina B₁₂.

Bolezensko stanje pomanjkanja vitaminov imenujemo hipovitaminoza. Pomanjkanje vitaminov je lahko primarno (neustrezna, nezadostna prehrana) ali sekundarno (bolezensko stanje: malabsorpcija, hiposekrecija želodca, ...). Ne kaže se kot splošno obolenje, ampak kot

specifična bolezen. Posebno občutljivi za pomanjkanje različnih vitaminov so koža in sluznice.

Hipervitaminoza je stanje, ko človekovo telo vsebuje preveliko količino vitaminov. Če dnevno zaužita količina vitamina A in D več kot desetkrat presega priporočeno dnevno količino, sta vitamin A in D toksična. Zelo visoke količine vnesenih vitaminov E in K ne povzročajo toksičnosti. Vitamin B₃, vitamin B₆ in vitamin C so v velikih odmerkih škodljivi, ostali vitamini B pa ne. Kopičenje v telesu zasledimo pri vseh v maščobah topnih vitaminih, le da se vitamina A in E nakopičita v velikih količinah, vitamina D in K pa v manjših.

Do toksičnih učinkov vodotopnih vitaminov naj ne bi prišlo, ker se njihov presežek izloča iz telesa z urinom. Literatura navaja, da so bili pri nekaterih vodotopnih vitaminih opaženi neželeni učinki, ki pa niso tako nevarni kot pri lipidotopnih vitaminih.

Poznane so zastrupitve z večjimi odmerki vitaminov, predvsem z vitamini A, D, K in B₃. Običajno so posledica predoziranja pri vitaminskem zdravljenju in profilaksi. Neobičajne so hipervitaminoze ali zastrupitve pri nepravilnem prehranjevanju.

5. ESENCIALNI VITAMINI ZA ČLOVEKOVO TELO

5.1. Vitamin A – RETINOL

Znani sta dve obliki, vitamin A₁ ali retinol in vitamin A₂ ali 3-dehidro-retinol. Vitamin A₁ je biološko aktivnejši od vitamina A₂.

Nastaja iz karotena (provitamin), ki ga sintetizirajo rastline in nekatere vrste živali. Človek karotena ne more proizvajati, lahko pa iz njega tvori vitamin A (v črevesni sluznici in jetrih). Zatorej ga moramo v telo vnašati kot sam vitamin (živalskega izvora) ali pa njegove provitamine karotene (rastlinskega izvora).

Vitamin C pospeši absorpcijo vitamina A, vitamin E pa prehod karotena v retinol.

S hrano se vitamin A v telo vnaša v obliki estra, ki se v tankem črevesu hidrolizira s pomočjo pankreatične lipaze. Sproščeni retinol se absorbira v celice črevesne sluznice, kjer se ponovno esterificira z maščobnimi kislinami, predvsem palmitinsko kislino. Veže se na hilomikrone in preko limfe dospe v jetra, od koder, vezan na β-lipoproteine, preide v krvni obtok. V krvi se nahaja pretežno kot prosti retinol, vendar obstaja tudi protein RBP (retinol binding protein), na katerega se lahko veže in tako vezan kroži po telesu.

Vitamin A je potreben za rast in razvoj, za sintezo mukopolisaharidov ter za normalen vid. Slednja vloga je najpomembnejša, saj sodeluje pri pretvarjanju svetlobnih učinkov v živčne impulze.

Hipovitaminoza A je pomanjkanje vitamina A. Povzroča nočno slepoto, nesposobnost adaptacije vida v temi (kseroftalmija); dolgo trajajoča hipovitaminoza povzroča keratomalacijo (poroženitev epitela). Pri otrocih povzroča motnje v rasti; pri otrocih s hipotirozo je koncentracija karotina zvišana, ker jetra ne zmorejo pretvarjati karotene v vitamin A.

Toksični učinki prevelike količine vitamina A so lahko kronični ali akutni, odvisni od časovnega intervala uživanja ter višine odmerka (toksična doza za odrasle je 0,6-1,5 g, za otroke pa 22,5-90 mg). Znaki akutne zastrupitve se pojavijo že v nekaj urah in po nekaj dneh izginejo: slabost, vrtoglavica, močan glavobol, spremembe vida, nekoordinirani gibi, rdečica kože; pri zelo visokih dozah pa nespečnost, srbečica, luščenje kože, poškodbe oči in ponavljajoče se bruhanje. Kronična zastrupitev se pojavi po uživanju 6-12 mg v obdobju nekaj let ali 60 mg v dveh mesecih. Tipični znaki so izguba las (alopecija), izguba apetita, anemija, bolečine v kosteh, nekateri nevrološki simptomi, lomljivi nohti, diareja, edemi, dermatitis. Po prenehanju jemanja ali zmanjšanju doze večina teh simptomov izgine.

Visoke količine vitamina A zmanjšajo absorpcijo vitamina E, tako da lahko pri hipovitaminozi

E sumimo na hipervitaminozo A. Vitamin A preprečuje tudi absorpcijo vitamina K iz črevesja, pri čemer se posledično podaljša protrombinski čas in poveča nagnjenost h krvavitvam.

Vitamin A se skladišči v jetrih. Ko je pri velikih dozah presežena skladiščna kapaciteta, prehaja v kri. Zaradi povečanega sproščanja v kri se v plazmi zveča koncentracija vitamina A, ki ni vezan na RBP. Tak, v prosti obliki, kroži po telesu in vstopa v organe, kjer deluje toksično. Kot površinsko aktivna snov destabilizira oz. poškoduje biološke membrane. Med drugim lahko poškoduje tudi membrano eritrocitov in povzroča hemolizo.

Vitamin A vsebujejo jetra, ribje olje, korenje, brokoli, sladki krompir, maslo, ohrovt, špinača, buča, nekateri siri, rumenjaki, marelica, melona, mleko. Dnevna potreba telesa po vitaminu A je 1,5 do 2 mg.

5.2. Vitamin B₁ – TIAMIN

Je najdlje poznani vitamin, ki pride v telo pretežno z rastlinsko prehrano. Iz telesa se izloča delno spremenjen z urinom, delno pa v obliki približno 20 različnih presnovkov.

V plazmi se nahaja kot prosti tiamin, v eritrocitih pa je fosforiliran kot koencim.

Njegova biološko aktivna oblika je koencim tiamin-pirofosfat, ki pretvarja piruvat v acetilkoencim A. Sodeluje v reakcijah dekarboksilacije kot koencim dekarboksilaze α -ketokislilin koencim aldehyd-transferaze, v presnovi ogljikovih hidratov ter pri nastajanju klorovodikove kisline, ki je nujno potrebna za pravilno prebavo. Udeležen je v številnih funkcijah delovanja živčnega sistema ter mišic, pri pretoku elektrolitov v in iz živčnih in mišičnih celic (skozi ionske kanale).

V telesu je vitamina B₁ uskladiščenega zelo malo, zato se lahko pomanjkanje pokaže zelo kmalu, v 14. dneh. Odraža se v različnih organih s težkimi oslabitvami živčno-mišičnega sistema. Hudo kronično pomanjkanje tiamina povzroča beri-beri, bolezen, ki se pojavlja v vzhodni Aziji zaradi prehranjevanja z rižem, pri katerem je bil zaradi obdelave odstranjen vitamin B₁. Posledica te bolezni so resni zapleti v živčnem sistemu, možganih, mišicah, srcu in gastrointestinalnem traktu. V industrijskih deželah je hrana, izdelana iz belega riža in bele moke, obogatena s tiaminom, saj se večina naravnega tiamina med prečiščevalnim procesom riža ali pšenice uniči. Zapleti se pojavljajo tudi pri alkoholikih kot alkoholni polinevritis.

Pri zaužitju velikih doz tiamina se toksični učinki ne pojavijo, saj je maksimalna količina, ki se absorbira, 5 mg. Toksični učinki, kot so glavobol, krči, šibkost, mišična relaksacija, srčna aritmija, anafilaktični šok in alergijske reakcije, so znani samo pri parenteralni, subkutani in intramuskularni aplikaciji in pri koncentracijah, ki so stokrat presežene ali pri večkratnih višjih odmerkih.

Vitamin B₁ se nahaja v pšeničnih kalčkih, ovsenih kosmičih, kvasu, riževih otrobih, sončničnih semenih, rjavem rižu, beluših, ohrovту, cvetači, krompirju, pomarančah, jajcu, mesu, stročnicah (fižol, leča), mleku, oreščkih. Dnevna potreba telesa po vitaminu B₁ je 0,5 do 1 mg.

Tiamin se uporablja pri zdravljenju presnovnih motenj (subakutna nekrozirajoča encefalopatija, pomanjkanje piruvat karboksilaze, hiperalaninemija) in znakov pomanjkanja tiamina (beriberi, Wernickova encefalopatija, Korsakoffova psihoza, Wernicke-Korsakoffov sindrom).

5.3. Vitamin B₂ – RIBOFLAVIN

V večini živil se nahaja v vezani obliki (kot flavinomononukleotid - FMN ali flavin-adenin-dinukleotid - FAD), le v mleku ter mlečnih izdelkih pa se nahaja kot prosti riboflavin.

V krvi je nekaj prostega riboflavina, nekaj pa vezanega v FMN in FAD. Iz telesa se izloča skupaj z uroflavinom v urinu.

FMN in FAD sodelujeta kot koencima oksido-reduktaz. Riboflavin je potreben za aktivnost NADH dehidrogenaze v dihalni verigi, piruvat dehidrogenaze, α -ketoglutarat dehidrogenaze,

dehidrogenaze D-aminokislin in ksantin dehidrogenaze. Sodeluje pri nastanku energije za transportno verigo elektronov v ciklu citronske kisline (Krebsov cikel) in pri katabolizmu maščobnih kislin (beta oksidacija).

Pomanjkanje vitamina B₂ povzroča razpoke v ustnih koticah, spremembe vida s pekočim občutkom v očeh in občutljivostjo na svetlobo, dermatitis, navadno v predelu nosu, obraza, vulve, prihaja pa tudi do zaostalosti v rasti. Pomanjkanje vitamina B₂ je običajno združeno s pomanjkanjem vitamina B₁ in B₃. Vitamin B₂ ni toksičen, četudi so koncentracije tridesetkrat presežene. Vsebujejo ga beluši, banana, kaki, bamija, blitva, skuta, mleko, jogurt, meso, jajce, ribe, stročji fižol, jetra, polnovredna žita, kvas. Dnevna potreba telesa po vitaminu B₂ je 1 mg.

5.4. Vitamin B₃ – NIACIN

V naravi se nahaja kot nikotinska kislina ali amid, v katerega nikotinska kislina lahko prehaja. Je derivat piridina. Lahko nastane iz triptofana, ki ga v telo vnesemo s hrano.

V plazmi se nahaja nikotinska kislina in njeni presnovki. Z urinom se dnevno izloči 0,3 – 1,5 mg niacina.

Obstajata dve koencimski obliki niacina: NAD (nikotinamid-adenin-dinukleotid) in NADP (nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat), ki sta pomembni pri presnovi glukoze, maščob in alkohola. NAD prenaša vodik in elektrone med presnovnimi procesi. NADP je koencim pri sintezi lipidov in nukleinskih kislin.

Pomanjkanje nikotinamida povzroča pelagro s pojavom dermatitisa in rjavo obarvane kože, driske in delirija. To pomanjkanje je zelo redko. Včasih, ko so se ljudje prehranjevali v glavnem s koruzo, je bilo pomanjkanje vitamina B₃ pogostejše, saj je koruza revna s triptofanom.

Glavni vir vitamina B₃ je piščančje meso, goveje meso, tuna, losos, mleko, jajce, avokado, paradižnik, listnata zelenjava, brokoli, korenje, sladki krompir, beluši, oreški, polnozrnat žitarice, stročnice, gobe, pivski kvas.

5.5. Vitamin B₅ – PANTOTENSKA KISLINA

S cisteaminom tvori pantotein, ki je sestavni del koencima A in multiencimskega kompleksa pri sintezi maščobnih kislin. Aktivna skupina koencima je SH – skupina, ki sodeluje pri aktivaciji očetne kisline in višjih maščobnih kislin. Koencim A sodeluje pri sintezi aminokislin, maščobnih kislin, ketonov, holesterola, fosfolipidov, steroidnih hormonov, nevrottransmitterjev in protiteles.

Pantotenska kislina je udeležena v oksidaciji maščobnih kislin in ogljikovih hidratov.

Pomanjkanje vitamina B₅ se pojavlja zelo redko, saj je pantotenska kislina zelo razširjena in jo v telo dovolj vnesemo s hrano. Znaki pomanjkanja se kažejo v spremembah živčnega sistema. Pomanjkanje pantotenske kisline pa se kaže tudi na stanju kože, las, nadledvične žleze, povzroča pa tudi zmanjšanje acetilacijskih procesov v telesu.

Vitamin B₅ vsebujejo kvas, drobovina, jajčni rumenjaki, matični mleček, riževa in pšenična ovojnica, artičoke, zelje, cvetača, grah, paradižnik, arašidi, meso, brokoli, avokado. Dnevna potreba telesa po vitaminu B₅ je 3 do 5 mg.

5.6. Vitamin B₆ – PIRIDOKSIN

Je derivat piridina, ki se v telo vnaša v obliki aldehida, kot piridoksal, ali v obliki amina, kot piridoksamin.

V tkivih in krvnih celicah piridoksin zelo hitro preide v fosforiliran derivat piridoksala, piridoksal-5-fosfat (koencimska oblika B₆). Slednji je koencim aminotransferaz in dekarboksilaz aminokislin. Piridoksin sodeluje v presnovi aminokislin, lipidov in v glukogenezi. Potreben je za sintezo nevrottransmitterjev (serotonina in norepinefrina), hemoglobina, za nastajanje mielina ter tvorbo nikotinske kisline (vitamin B₃).

Pomanjkanje vitamina B₆ pri odraslih prizadene periferno živčevje, kožo, sluznične membrane, krvni obtok (krvne celice – anemija), upočasni rast in povzroči periferno nevropatijo. Pri otrocih je prizadet tudi centralni živčni sistem. Pomanjkanje vitamina B₆ je lahko posledica pomanjkanja folne kisline in vitaminov C, A, E in B₁₂.

Piridoksin vsebujejo meso, banana, polnozrnat žitarice, zelenjava (korenje, špinača, grah, krompir), oreški, mleko, sir, pesa, perutnina, stročnice, rumenjak, listnata zelenjava, ribe, pšenični kalčki, kvas. Pri sušenju mleka se izgubi približno polovica B₆. Zamrzovanje in predelava prav tako znižata njegovo vsebnost. Dnevna potreba telesa po vitaminu B₆ je 2 mg za ženske in 2,2 mg za moške.

5.7. Vitamin B₇ – vitamin H – BIOTIN

Manjši del vitamina B₇ se nahaja v prosti obliki, večji del pa je vezan na proteine (v jetrih je 92 % biotina vezanega na proteine).

Njegova biološka funkcija je sodelovanje pri karboksilaciji. Biotin je prostetična skupina encimov, ki katalizirajo karboksilacijo. V encimu je peptidno vezan na lizin, kjer lahko sprejme karboksilno skupino. To skupino nato karboksiliran biotin preda akceptorju. Nam poznana reakcija, pri kateri sodeluje biotin, je nastanek malonil-CoA iz acetil-CoA.

Glavno vlogo igra tudi pri presnovi lipidov (holesterola), proteinov in ogljikovih hidratov.

Pomanjkanje biotina zelo redko srečamo, kajti sorazmerno veliko ga je v hrani, sintetizirajo pa ga tudi črevesne bakterije. Pomanjkanje je možno pri ljudeh, ki pojedjo veliko jajc. Jajca namreč vsebujejo protein avidin, s katerim se biotin veže in inaktivira. Znaka pomanjkanja sta dermatitis in izpadanje las.

Biotin se nahaja v kvasu, pšenični in riževi moki, čokoladi, jajčnem rumenjaku, gobah, zelju, cvetači. Dnevna potreba telesa po vitaminu B₇ je 0,25 mg.

5.8. Vitamin B₉ – FOLNA KISLINA – PTEROILGLUTAMINSKA KISLINA

Folati so naravna oblika vitamina (v hrani), folna kislina pa sintetična oblika (vitaminski dodatki, obogatena živila). Absorpcija poteka v tankem črevesju. V eritrocitih se nahaja 95 % folatov. V serumu je 40 % folatov vezanih na protein v obliki N-metiltetrahidrofolata, na slednjega pa zaščitno deluje askorbinska kislina. Iz telesa se izloča z urinom, pretežno kot folinska kislina.

V živalskih in rastlinskih tkivih najdemo poleg folne kisline tudi njene derivate. V jetrih in drugih organih se reducira v dihidrofolno kislino in nato v koencim tetrahidrofolno kislino.

Folna kislina deluje v obliki tetrahidrofolata. Je koencim encimom v presnovi metionina in histidina ter biosintezi purinov in pirimidinov.

Folna kislina je v obliki koencima potrebna za sintezo timina, le-ta pa je nujno potreben v sintezi DNK. Njegovo pomanjkanje ovira sintezo hemoglobina in dozorevanje eritrocitov. Tako folna kislina sodeluje v eritropoezi.

Dnevno potrebujemo približno 50 µg folatov. Zaloge se kopičijo v jetrih in znašajo 5-20 mg ter zadoščajo za 4-5 mesecev po prenehanju absorpcije iz prebavil.

Pomanjkanje folne kisline se pojavi v odsotnosti črevesnih mikroorganizmov (peroralno zdravljenje z antibiotiki), pri slabi absorpciji v črevesju (močne driske, resekcija črevesja), pri nezadostnem vnosu s hrano, pri večji uporabi folne kisline (nosečnost, dojenje), pri boleznih jeter ali malignih boleznih ter pri zdravljenju z antibiotiki, ki se uporabljajo pri zdravljenju levkemij.

Pri pomanjkanju se pojavlja makrocitna, megaloblastna anemija (motnja v dozorevanju jedra), ker je za dozorevanje eritrocitov poleg vitamina B₁₂ potrebna tudi folna kislina.

V pomanjkanje vodi tudi nezmožnost absorpcije folatov ali folne kisline v tankem črevesju (Chronova bolezen, celiakija, kirurška odstranitev velikega dela črevesja ali bypass). Tudi alkohol zmanjša absorpcijo folatov v črevesju. Nosečnice in doječe ženske imajo povečano

zahtevo po folatih (800 µg/dan), prav tako dializni bolniki. Uživanje velikih doz folne kisline lahko prekrije pomanjkanje vitamina B₁₂, kar pa lahko vodi v nepopravljivo nevrolško poškodbo.

Folate vsebujejo zeleno listnata zelenjava, stročnice, jetra, pivski kvas, nekateri obogateni žitni izdelki, sončnična semena. Večina sadja ga vsebuje zmerne količine, prav tako pivo. S kuhanjem se večji del folatov uniči. Dnevna potreba telesa po vitaminu B₉ je 1 do 2 mg.

5.9. Vitamin B₁₂ – KOBALAMIN

Že samo ime pove, da ima kelatno vezan atom kobalta (Co). Imenujemo ga tudi cianokobalamin, ker pri izolaciji nastaja stabilen CN-derivat. V metilkobalaminu je CN-skupina zamenjana z metilno. Namesto CN-skupine je lahko na Co-atom vezana OH-skupina (hidroksikobalamin) ali molekula vode (aquokobalamin).

Absorbcija vitamina B₁₂ se odvija v ileumu s pomočjo predhodne vezave na glikoprotein intrinzični faktor (IF), ki ga izločajo sluznične žleze v želodcu in spremlja vitamin B₁₂ do tankega črevesja. Brez IF se vitamin B₁₂ ne more absorbirati in zapusti telo kot odvečna snov. Kompleks B₁₂-IF (nastane v želodcu) se spoji s kalcijevimi ioni in se kot tak veže na receptorje mukoznih epiteljskih celic ileuma, od koder se preko celičnih membran prenaša v same mukozne celice ter se v njih večinoma pretvori v dezoksiadenozil-kobalamain. Vitamin B₁₂ se izloča v žolč in se z enterohepatično cirkulacijo vrača nazaj v jetra.

V plazmi se nahaja večinoma v obliki metilkobalamina in v nekoliko višji koncentraciji kot v eritrocitih. Pri prenosu se vitamin B₁₂ lahko veže na tri glikoproteine, transkobalamin tipa I, II ali III. V retikulocite in kostni mozeg prispe kobalamin iz plazme na proteinu tipa II. Transkobalamin I in III vežeta kobalamin v želodčnem soku, slini, solzah, mleku, levkocitih, eritrocitih in drugih tekočinah.

Skupaj s folno kislino je vitamin B₁₂ nujno potreben za nastanek eritrocitov v kostnem mozgu. Oba vitamina delujeta sinergistično. Poleg tega je esencialen tudi pri pravilnem razvoju živčevja, tako pri nastanku živčnih celic kot pri njihovem pravilnem delovanju (pri vzdrževanju posebne zaščite na živčnih končičih).

Kobalamin služi kot koencim nekaterim encimom. V telesu preide v koencima 5-dezoksiadenozil-kobalamin ter metil-kobalamin. Oba sodelujeta pri pretvorbi metilmalonil-koencima A v sukcinil-koencim A, pri pretvorbi ribonukleotida v dezoksiribonukleotid ter, najpomembnejše, pri sintezi metionina iz homocisteina in metiltetrahidrofolata. Ta sinteza povezuje presnovo kobalamina in folne kisline.

Pomanjkanje vitamin B₁₂ izzove megaloblastno anemijo zaradi motnje v dozorevanju eritrocitov. Najpogostejši vzrok pomanjkanja vitamina B₁₂ je motnja v izločanju IF in pomanjkanje le tega. Lahko gre za avtoimunsko bolezen, saj se pri teh bolnikih običajno najdejo protitelesa proti IF. To pomanjkanje izzove perniciozno anemijo (anemija pomanjkanja vitamina B₁₂, ki jo povzroči pomanjkanje IF), zaradi česar imenujemo kobalamin tudi antiperniciozni faktor. Posledica perniciozne anemije so spremembe pri dozorevanju eritrocitov, ko je zmanjšana aktivnost ribonukleotid-reduktaze (manjka ji koencim), pri tem pa se ne tvori dovolj DNK. Če pride do pomanjkanja vitamina B₁₂ pri sintezi metionina iz homocisteina in metiltetrahidrofolata, se zmanjša transmetiliranje iz metilfolata. Le ta se kopiči in njegova koncentracija v serumu raste. Takšno stanje lahko začasno izboljšamo s terapijo s folati, vendar se mora dodajati tudi vitamin B₁₂, ker se brez njegove prisotnosti folat hitro pretvarja nazaj v metiltetrahidrofolat. Pomanjkanje vitamina B₁₂ lahko izzove tudi subakutno kombinirano degeneracijo kostnega mozga, na kar pa folna kislina nima vpliva. Nevrolške simptome verjetno izzove kopičenje abnormalnih lipidov v živčnem sistemu. Vzrok za to je pomanjkanje koncemina, pri čemer je zmanjšana pretvorba metilmalonil CoA v sukcinil CoA. Ta reakcija je namreč pomembna pri presnovi maščobnih kislin in alifatskih aminokislin. V tem primeru se v urin izloča več metilmalonske kisline. Do

pomanjkanja lahko pride pri vegetarijancih, saj je glavni vir vitamina B₁₂ prav meso. Anemija zaradi pomanjkanja vitamina B₁₂ je posledica pomanjkanja vitamina B₁₂ v hrani ali zaradi nezmožnosti absorpcije le tega v tankem črevesju (kirurški gastrični bypass, abnormalna rast bakterij v tankem črevesju, črevesne bolezni).

Vitamin B₁₂ se nahaja v mesu, predvsem drobovini (goveja in svinjska jetra, ledvice, srce), ribah, slanikih, skušah, školjkah, jajcu, mleku, mlečnih izdelkih, nekaterih obogatenih žitnih in sojinih izdelkih, jedilnem kvasu. Kot ekstrinzični faktor se nahaja samo v živilih živalskega izvora. Dnevna potreba telesa po vitaminu B₁₂ je 0,001 mg.

5.10. Vitamin C – ASKORBINSKA KISLINA

Je močen reducent, saj se lahko reverzibilno oksidira v dehidroaskorbinsko kislino.

Živali in rastline lahko vitamin C sintetizirajo iz D-glukoze (preko vmesne D-glukuronske kisline in L-glukonolaktona), človek ga ne more. Zato ga v telo vnašamo s hrano, saj L-glukonolakton ne moremo pretvoriti v askorbinsko kislino.

Dehidroaskorbinska kislina je biološko aktivna, saj se v telesu lahko reducira v askorbinsko kislino. V telesu se nahaja pretežno kot askorbinska kislina, le manjši del je dehidroaskorbinske kisline. Iz telesa se izloča kot askorbinska kislina, dehidroaskorbinska kislina in oksalat.

Vitamin C je v telesu potreben za tvorbo kolagena v kosteh, hrustancu, mišicah in krvnih žilah. V veliko pomoč je tudi pri absorpciji železa v prebavilih.

V presnovi deluje askorbinska kislina kot donator vodika pri nekaterih encimskih reakcijah. Potrebna je za hidroksilacijo prolina, tirozina, DOPA ter nekaterih vmesnih produktov adrenokortikoidov. Pri presnovi tirozina služi kot kofaktor encima p-hidroksifenilpiruvat-hidroksilaze pri oksidativnem odpiranju obroča homogentizinske kisline v maleil-acetoacetno kislino. Zato je urin pri avitaminozi temne barve, v njem se kopiči homogentizinska kislina.

Dnevna potreba po vitaminu C pri človeku je okrog 70 mg, to je dvakrat več kot vseh ostalih vitaminov, nekateri pa priporočajo celo 100 do 200 mg dnevno. Vitamin C ima visok sprejemljiv dnevni vnos (ADI-acceptable daily intake) brez kakršnihkoli posledic. Za zaščito pred prehladom se priporoča 1 do 3 g dnevno, pri malignih boleznih pa od 20 do 30 g dnevno. Tveganje nastanka oksalatnih kamnov ob jemanju visokih odmerkov vitamina C je izredno majhno. 100-miligramski odmerki zvišajo raven železa za 3 do 5 enot. Kajenje oslabi telesno sposobnost absorpcije vitamin C.

Posledica pomanjkanja vitamina C je skorbut. Klinični znaki pomanjkanja so poškodbe kapilar, krvavitve dlesni, majavost in izpadanje zob ter slabo celjenje ran. Da se pokažejo ti znaki, mora pomanjkanje trajati 3-4 mesece oz. ko dnevna količina zaužitega vitamina C pade pod 7,5 mg. Pomanjkanje vitamina C je povezano tudi z nekaterimi sideropeničnimi anemijami ter s pomanjkanjem folatov.

Vitamin C ni toksičen, ima pa nekaj škodljivih učinkov pri zaužitih zelo visokih koncentracijah; povzroča zgago, prebavne motnje in diarejo.

Vsebujejo ga sveža zelena zelenjava, sadje, limona; pozimi je njegov glavni vir zelje in krompir. Največje količine ga vsebujejo kakadu slive ter sadje camu camu. Tudi jetrca vsebujejo vitamin C. Pri pripravi hrane se zelo hitro uniči, ker je topen v vodi in je občutljiv na toploto, v prisotnosti kovin pa tudi hitro oksidira.

5.11. Vitamin D – KALCIFEROL

Ločimo dva tipa vitamina D:

- vitamin D₃ – živalski kalciferol/kalcitriol ali holekalciferol (nastaja v živalih iz provitamina 7-dehidroholesterola),
- vitamin D₂ – rastlinski ergokalciferol (nastaja v rastlinah iz ergosterola).

Človek lahko vitamin D sam izdelava iz prekursorja: 7-dehidroksiholesterol v koži (povrhnciji -

epidermi) se pod vplivom UV žarkov pretvori v kalciferol/kalcitriol, ki ni biološko aktiven. S presnovo preide v aktiven hidroksi-derivat.

V črevesju se vitamin D₃ resorbira preko limfnega sistema. Vezan na albumine, α -globuline in β -lipoproteine se po krvi transportira v jetra. V jetrih deluje nanj encim 25-hidroksilaza, pri čemer nastane 25-hidroksi-vitamin D₃ (odvija se v mikrosomih, potreben je NADPH in molekularni kisik). Tako hidroksiliran vitamin preide v ledvice, kjer z delovanjem 1-hidroksilaze v mitohondrijih preide v zelo aktiven 1,25-dihidroksi-vitamin D₃.

Tvorbo 25-hidroksi-vitamina D₃ regulira sama količina tega vitamina v jetrih, medtem ko je nastanek 1,25-dihidroksi-vitamina D₃ reguliran s potrebo po kalciju in fosforju. Ledvice vsebujejo tudi 24-hidroksilazo in poleg 1,25-dihidroksi- D₃ lahko tvorijo tudi 24,25-dihidroksi- D₃ in 1,24,25-trihidroksi- D₃ (spojine s 24-hidroksilno skupino niso aktivne). Pri hipokalcemiji se tvori več 1,25-dihidroksi- D₃, pri hiperkalcemiji pa več 24,25-dihidroksi- D₃ (se ne presnavlja naprej, ampak se izloča). Potreba po kalciju aktivira izločanje parathormona, kateri deluje na nastanek aktivnega vitamina v ledvicah. Nekateri menijo, da je 1,25-dihidroksi- D₃ hormon, ker deluje ciljano na črevo, kosti in verjetno tudi ledvice.

Glavna funkcija vitamina D je pospeševanje mineralizacije kosti. Vzdrževanje koncentracije kalcija in fosforja v krvi se lahko doseže s stimulacijo njune absorpcije v črevesju ali s povečanjem njune reabsorpcije v ledvicah. Vitamin D skupaj s parathormonom stimulira mobilizacijo kalcija in fosforja iz kosti. Zaradi tega pomanjkanje vitamina D₃ povzroča spremembe v mineralizaciji kosti, kar ima za posledico osteomalacijo pri odraslih in rahitis pri otrocih. Do pomanjkanja vitamina D lahko pride zaradi premajhne vsebnosti v hrani, premalo izpostavljenosti soncu in zaradi motenj v absorpciji vitamina, pri boleznih jeter ali ledvic.

Sončna svetloba tvori dovolj vitamina D za potrebe organizma, vitaminska dopolnila pa se morajo jemati samo v primeru, če ljudje niso dovolj izpostavljeni soncu (ljudje s temno poltjo, starostniki, ki večino časa preživijo v hiši, prebivalci severnih držav). Do toksičnih pojavov vitamina D, ki nastaja v telesu, ne more priti, lahko pa se pojavijo pri prekomernem uživanju vitamina D. Znaki zastrupitve so slabost, izguba apetita, glavobol, tinitus, somnolenca, abdominalne bolečine, krči, bruhanje, diareja, poliurija, suha usta in okus po kovini. Glavna toksična posledica je kalcifikacija mehkih tkiv, kar pomeni, da se kalcij lahko nalaga v ledvicah, srcu, pljučih in arterijah.

Človek dnevno potrebuje okrog 0,025 mg vitamina D₃. Nahaja se v olju iz jeter tun in drugih rib, tunini, mesu, maslu in nekaj malega tudi v mleku. Nastaja v koži ob izpostavljenosti sončnim UV žarkom, zato so tudi referenčne vrednosti odvisne od letnega časa. Poleti je vitamina D veliko več v telesu kot pozimi.

5.12. Vitamin E – TOKOFEROL

Sestavlja ga 8 kemijsko podobnih spojin, tokoferolov, vsi pa imajo antioksidativno delovanje. Razlikujejo se po številu metilnih skupin.

Pri človeku prevladujejo α , β in γ -tokoferol. α -tokoferol je najaktivnejša oblika. V serumu je 80 % tokoferola prostega, 20 % pa v obliki acetata. V serumu se nahaja predvsem v lipoproteinih nizke gostote (LDL).

Biološko delovanje vitamina E ni natančno poznano. Ker deluje kot antioksidant, predpostavljajo, da je to njegova bistvena biokemična vloga.

Mešana prehrana vsebuje dovolj vitamina E, zato je primarno pomanjkanje redko. Sekundarno pomanjkanje lahko nastane pri malabsorpciji, ki je pridružena manjši absorpciji maščob (statoreja). Pri človeku lahko pomanjkanje vitamina E povzroči mišično oslabeledost in kreatinurijo. Pri podganah je potrjeno antisterilno delovanje tega vitamina.

Visoke doze vitamina E povzročajo neželene, ne pa toksične učinke: glavobol, oslabeledost, slabost, utrujenost, dvojni vid, težave prebavnega trakta, zvišan krvni tlak in palpitacije.

Literatura navaja o mogočem nastopu alergij in dermatitisu po zaužitju vitamina E.

Vitamin E vsebujejo olje pšeničnih in koruznih kalčkov, oljčno olje, kivi, mandeljni, avokado, jajce, mleko, oreški, zelena listnata zelenjava (špinača), nesegevano rastlinsko olje, polnozrnat žitarice. Dnevna potreba telesa po vitaminu E je 5 mg.

5.13. Vitamin K – FILOKINON – antihemoragični vitamin

V naravi najdemo dva vitamina K. Vitamin K₁ je filokinon in je rastlinskega izvora (zelenjava), vitamin K₂ ali menokinon pa živalskega izvora (bakterije v črevesju). Poznan pa je tudi sintetični produkt K₃ (menadion), ki pa se v telesu pretvori v K₂.

Vitamin K₂ sintetizirajo črevesne bakterije, kar zadostuje kot vir tega vitamina. Ker antibiotiki in sulfonamidi uničujejo črevesno floro, se pri dolgi peroralni uporabi omenjenih zdravil lahko pojavijo znaki pomanjkanja vitamina K.

Strukturno podobne spojine naftokinonskega tipa, brez metilne skupine, so dikumarol in njegovi derivati. To so antagonisti (zaviralci) vitamina K, ki se uporabljajo v antikoagulacijskem zdravljenju (pri zdravljenju tromboz).

Vitamin K je potreben za sintezo koagulacijskih faktorjev II (protrombina), VII, IX in X v jetrih.

Pomanjkanje vitamina K lahko nastane tudi zaradi zapore žolčnih izvodil, pri malabsorpciji in pri dolgotrajnem zdravljenju z antibiotiki. Povzroča nagnjenost h krvavitvam in motnje v koagulaciji krvi, saj se ne tvori dovolj protrombina.

Toksični učinki so izključno posledica predoziranja ali preobčutljivosti na K₃. So zelo redki.

Filokinon je netoksičen, čeprav je znanih nekaj stranskih učinkov po intravenski aplikaciji: reakcija na koži na mestu vboda, alergijske reakcije, hipertenzija, bolečine v srcu.

Naraven vir vitamina K so zelenolistnata zelenjava, zelje, paradižnik, soja, avokado, kivi, peteršilj. Dnevna potreba telesa po vitaminu K je 0,001 mg.

6. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA VITAMINOZ

Raznovrstna prehrana vsebuje zadostne količine vitaminov, medtem ko neustrezna prehrana lahko privede do pomanjkanja nekega vitamina. Značilne klinične spremembe imajo vzrok v hipovitaminozi ali avitaminozi. Številne avitaminoze povzročijo spremembe v razvoju in rasti, pogoste so tudi spremembe na koži. Hipervitaminoze so izjemno redke. Ne povzročajo jih prehrana, ampak več kot desetkratno predoziranje z vitaminskimi pripravki v terapiji, pri samozdravljenju in kot rezultat ekstremno enolične prehrane.

Za zdravljenje avitaminoz se uporabljajo vitamini, ki jih pridobivajo z izolacijo iz naravnih virov, s kemično sintezo ali s pomočjo mikroorganizmov. Količina vitaminov v posameznih farmacevtskih pripravkih se izraža v mednarodnih enotah (IU).

6.1. Določevanje koncentracije posameznih vitaminov

V serumu ali plazmi se lahko določa koncentracije vitaminov A, D, E, B₁₂ ali določenih presnovkov (folna kislina), v urinu pa predvsem koncentracije vitaminov skupine B. Pri določenih obolenjih se priporoča določanje znotrajcelične vsebnosti vitaminov (folati, vitamin C). Kadar ima vitamin pomembno koencimsko funkcijo, se določa aktivnost nekaterih encimov (npr. transketolaza (B₁), glutation reduktaza (B₂), transaminaze (B₆), ...). Za ugotavljanje pomanjkanja vitaminov je najprimerneje meriti aktivnosti omenjenih encimov in določati znotrajcelične koncentracije vitaminov.

Trenutno je v slovenskih bolnišničnih laboratorijih najpogostejše določevanje vitamina B₁₂, folne kisline in vitamina D. Terciarni nivo ponuja tudi določitev vitaminov A in E.

Vzorec izbora je običajno serum, lahko pa se preiskave izvedejo tudi v plazmi (antikoagulant

Li-heparinat ali K₃-EDTA). Za določevanje folatov v eritrocitih je potreben odvzem krvi v epruveto s K₃-EDTA.

Vitamina A in E se določata v enem samem slovenskem laboratoriju in to s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Ostali vitamini se pa večinoma merijo s kemiluminiscentnimi imunokemijskimi tehnikami.

Pomanjkanje vitamina K se kaže v koagulacijskih motnjah, kar se izraža v podaljšanem protrombinskem času (INR - International Normalized Ratio) ter parcialnem tromboplastinskem času. S tem so izvedene posredne meritve aktivnosti vitamina K.

Priporočljivo je, da vsak laboratorij sam izdela ustrezne referenčne orientacijske vrednosti za posamezne koncentracije vitaminov, ki jih določuje. Referenčne vrednosti so namreč odvisne tudi od metode, s katero se posamezen vitamin določa.

Določevanje ostalih vitaminov verjetno ni potrebno, saj se večina vitaminov skupine B v presežkih izloča iz telesa. Dejstvo, da toksičnih učinkov vodotopni vitamini ne povzročajo, je dodaten razlog, da se le-ti ne določajo. Vemo, da je askorbinska kislina v krvi stabilna 3 ure pri 4°C, kar je verjetno tudi eden izmed razlogov, da se vitamina C v krvi ne določa.

7. ZAKLJUČEK

Vitamini niso strukturne komponente našega telesa kot so aminokisline ali maščobne kisline, zato so potrebe telesa po vitaminih minimalne. Koncentracija vitamina v različnih bioloških tekočinah predstavlja prehodno stanje glede na vnos s hrano ali prehod iz organa v organ. Merjenje presnovne aktivnosti, pri kateri je vitamin prisoten, predstavlja funkcionalni test za določanje pomanjkanja ali zadostnosti določenega vitamina.

8. LITERATURA

1. Thomas L. *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results.* 1st ed. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998.
2. Kocjančič A., Mrevlje F., Štajer D. *Interna medicina. Littera picta*, Ljubljana, 2005, st. 652 – 656.
3. Talwar D.K, Azharuddin M.K., Williamson C., Teoh Y.P. McMillan D.C., O'Reilly D.J. *Biological Variation of Vitamins in Blood of Healthy Individuals. Clinical Chemistry.* 2005, 2145-2015.
4. http://www.uptodate.com/contents/overview-of-water-soluble-vitamins?source=search_result&search=VITAMIN&selectedTitle=4%7E150
5. http://www.uptodate.com/contents/vitamin-supplementation-in-disease-prevention?source=search_result&search=VITAMIN&selectedTitle=1%7E150
6. http://www.uptodate.com/contents/overview-of-vitamin-a?source=search_result&search=VITAMIN&selectedTitle=7%7E150
7. Štraus B. *Medicinska biokemija. Jugoslovenska medicinska naklada*, 1988. st.653 – 690

DIHALNI TESTI

HELICOBACTER PYLORI

Prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem.



Univerzitetni klinični center Ljubljana
Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

maj 2013

VSEBINA

SPLOŠNO O DIHALNEM TESTU

OBOLENJA, KJER LAHKO V DIAGNOSTIKI UPORABLJAMO DIHALNI TEST

HELICOBACTER PYLORI

Splošno o obolenju

Diagnostika okužbe

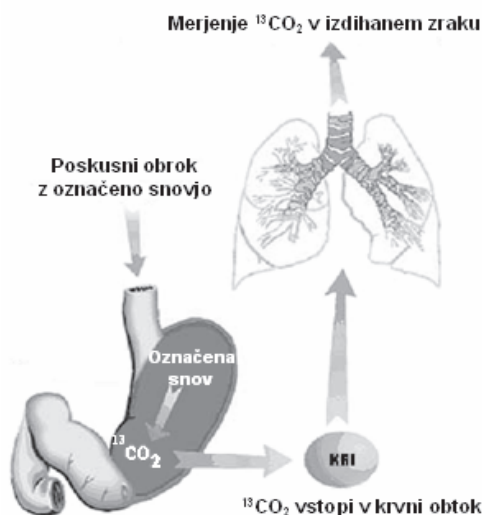
Zdravljenje okužbe

SPLOŠNO O DIHALNEM TESTU

Uvod

Dihalni test z uporabo stabilnega ogljikovega izotopa ^{13}C je neinvazivno diagnostično orodje v znanstvenih in kliničnih preiskavah številnih fizioloških in patofizioloških procesov. Temelji na merjenju obogatitve ogljika v izdihanem zraku po zaužitju testnega obroka, ki vsebuje označen ^{13}C v specifični funkcionalni skupini molekule. ^{13}C se v izdihanem zraku lahko meri z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov in z nedisperzivno infrardečo spektrometrijo.

Princip dihalnega testa: Preiskovancu v tekoči ali trdni testni obrok vmešamo snov, ki je označena z ogljikovim izotopom ^{13}C . Sestavine testnega obroka upočasnijo praznjenje želodca in podaljšajo kontaktni čas označene snovi z encimom. Ko se v želodcu snov, označena s ^{13}C , razgradi v odvisnosti od količine prisotnega aktivnega encima, se ^{13}C izloči iz organizma z izdihanim zrakom in ga je možno detektirati (slika 1). Pojav presežka $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanem CO_2 nam pove tri različne tipe informacij: (1) prikazuje prisotnost encimske aktivnosti, (2) hitrost in količino označene snovi v izdihanem zraku v določenem časovnem obdobju, kar lahko pogosto povežemo s količino prisotnega aktivnega encima v telesu, in (3) lahko odraža stopnjo fiziološkega procesa ali pa kaže na prisotnost tujka (npr. bakterije, encima ...). Večina ogljikovega dioksida, kar 60 % do 70 % se po krvi do pljučnega tkiva prenaša v obliki bikarbonatnega iona. Med 10 % in 20 % se ga veže na beljakovinski del hemoglobina in na beljakovine v plazmi, manjši delež, sicer med 7 % in 10 % pa se prenaša raztopljen v plazmi in v eritrocitih.



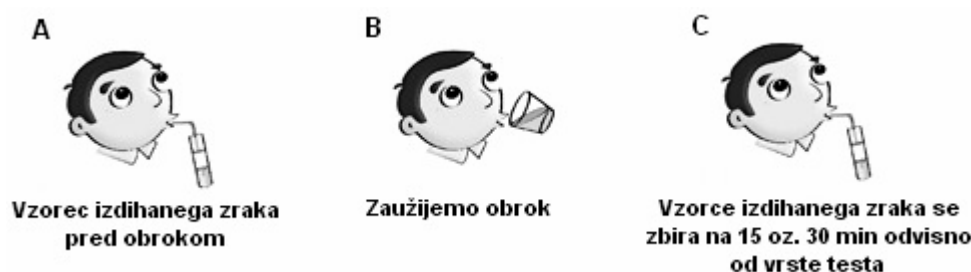
Slika 1: Princip dihalnega testa

Postopek izvedbe dihalnih testov

Pred izvedbo dihalnega testa mora biti preiskovanec tešč 12 ur, najbolje preko noči. Med samim testom mora mirovati in ne sme kaditi, saj bi lahko prišlo do hiperventilacije in s tem do napačne interpretacije rezultatov testa. Prav tako ne sme jesti. Pije lahko le negazirano vodo. Najmanj teden dni pred testom mora preiskovanec prenehati z jemanjem zdravil, ki bi lahko imela vpliv na rezultate dihalnih testov. Vsa zgoraj naštetá navodila je potrebno striktno upoštevati, da ne pride do lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov. Če je potrebno test ponoviti, ga lahko ponovimo šele naslednji dan.

Prvi vzorec se odvzame pred zaužitjem testnim obrokom ob času nič minut. Preiskovanec pihne skozi slamico v epruveto toliko zraka, da se orosi. Nato se jo takoj zamaši (slika 2A).

Preiskovanec potem zaužije tekoči ali trdni obrok, odvisno od preiskave (slika 2B). Sledijo nadaljnji odvzemi vzorcev po enakem postopku, največkrat v časovnem razmaku 15 oz. 30 min (slika 2C). Število zbranih vzorcev je odvisno od posamezne preiskave.



Slika 2: Postopek izvedbe dihalnih testov ^{13}C

Izračun parametrov dihalnih testov

Rezultati dihalnih testov ^{13}C so ponavadi podani kot odstotek izločenega ^{13}C v izdihanem zraku glede na čas ($\% ^{13}\text{C}/\text{h}$) in kot odstotek kumulativne količine izločenega ^{13}C v merjenem času ($\% \text{ izdihanega } ^{13}\text{C}$).

Izotopsko sestavo elementov v izdihanem zraku se lahko meri z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov (IRMS - Isotope Ratio Mass Spectrometry) in z nedisperzivno infrardečo spektrometrijo (NDIR – Non-dispersive Infrared Spectrometry). Slednja ima manjšo analitično natančnost kot masni spektrometer, vendar je cenejša in enostavnejša za uporabo. Izmerjena izotopska sestava se izraža z vrednostjo delta (δ), ki predstavlja relativno razliko (presežek) izotopske sestave raziskovanega vzorca (vz) glede na izbrani standard (st) in je izražena v promilih ‰ (enačba 1):

$$\delta = \frac{R_{vz} - R_{st}}{R_{st}} \cdot 1000 \quad (1)$$

V enačbi 1 vrednost R pomeni razmerje med izotopi ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in je vedno podana kot razmerje redkejšega, težjega izotopa proti bolj pogostemu, lažjemu izotopu, simboli R_{vz} in R_{st} pa predstavljajo razmerja v vzorcu (vz) in standardu (st).

Aplikacije dihalnih testov

Dihalni testi se med seboj razlikujejo glede na vrsto bolezni, ki se jo lahko detektira (infekcija s *Helicobacter pylori*, laktozna intoleranca, insuficienca pankreasa, jetrna disfunkcija), glede na občutljivost in specifičnost, čas trajanja, število odvzetih vzorcev izdihanega zraka, čas, ki poteče med vzetimi zaporednimi vzorci, vrsto testnega substrata (tabela 1) in metodo merjenja izotopske sestave. Trajanje dihalnih testov ^{13}C je zelo različno, od najkrajšega, ki traja 30 min za detekcijo okužbe s *Helicobacter pylori*, do 300 min, s katerim preverimo aktivnost pankreatične lipaze. Tekoči substrati imajo pri dihalnih testih ^{13}C prednost pred trdnimi substrati, predvsem zaradi krajšega časa odvzemanja vzorcev.

Tabela 1: Aplikacije dihalnih testov ^{13}C v raziskavah in diagnostiki (8)

^{13}C označeni substrati	Aplikacije v kliničnih raziskavah in diagnostiki
OGLJIKOVI HIDRATI	
Monosaharidi	
Glukoza	Absorpcija heksoze in diagnoza sladkorne bolezni (diabetes mellitus); vpliv telesne aktivnosti na

	metabolizem ogljikovih hidratov
Fruktoza	Absorpcija heksoze in diagnoza sladkorne bolezni (diabetes mellitus)
Galaktoza	Bolezni jeter; jetrna mikrosomalna biotransformacija; delovanje galaktoze-1-fosfat uridiltransferaze
Ksiloza	Bakterijska okužba črevesja
Oligosaharidi	
Saharoza	Pomanjkanje encima saharaze pri otrocih z gastrointestinalnimi simptomi
Laktoza	Pomanjkanje encima laktaze pri otrocih z gastrointestinalnimi simptomi
Maltoza	Metabolizem ogljikovih hidratov in maščob
Polisaharidi	
Škrob	Razgradnja in resorpcija; funkcija pankreasa; cistična fibroza
Polimeri iz glukoze	Metabolizem glikogena v jetrih; razgradnja in produkcija energije
PROTEINI IN AMINO KISLINE	
Proteini	Metabolizem proteinov
Kazein	Steatoreja; razgradnja in resorpcija proteinov
Jajčni beljak	Metabolizem proteinov
Označeni proteini v jajcu	Ocena razgradnje jajčnih proteinov v ileumu
Alge	Metabolizem
Leucin	Oksidacija aminokislin; raziskovanje vpliva diete pri fenilketonuriji
Glicin	Oksidacija aminokislin; ocena hitrosti praznjenja želodca
DL-Fenilalanin	Oksidacija aminokislin
L fenilalanin	Oksidacija aminokislin; ocena jetrne funkcije
Tirozin	Ocena katabolizma tirozina
MLEČNI PRODUKTI	Metabolizem
LIPIDI	
Lipidi	Metabolizem maščob; malabsorpcija maščob
Koruzno olje	Malabsorpcija maščob
Sojino olje	Malabsorpcija maščob
Trigliceridi	Metabolizem maščob
3-oktanoil glicerol	Malabsorpcija maščob
1,3-distiril-2-oktanoil glicerol	Malabsorpcija maščob
Triolein	Malabsorpcija maščob
Tripalmitin	Malabsorpcija maščob
Trioktanoil	Malabsorpcija maščob
KARBOKSILNE KISLINE	
Maščobne kisline	Študije metabolizma miokarda
Acetat	Ocena hitrosti praznjenja želodca; pomanjkanje encima dehidrogenaze
Oktanoična kislina	Ocena hitrosti praznjenja želodca
Ketoizokaproična kislina	Alkoholna jetrna steatoza
Glikolična kislina	Malabsorpcija žolčnih kislin; bakterijska okužba črevesja; enterohepatična cirkulacija žolčnih kislin
Valproična kislina	Epilepsija
KARBONILNE KISLINE IN	

DERIVATI	
Natrijev hidrogen karbonat	Gastrointestinalni tranzitni čas; ocena hitrosti praznjenja želodca
Urea	Okužba s <i>Helicobacter pylori</i>
Glikolna kislina	Gastrointestinalni tranzitni čas
Laktozna kislina	Fermentacija v kolonu, oročkalni tranzitni čas, cekalni retencijski čas
Propionat	Pomanjkanje vitamina B12
ALKOHOL	
Etanol	Pomanjkanje aldehyd dehidrogenaze
RAZNO	
[methyl- ¹³ C]methacetin	Jetna obolenja; hepatična mikrosomalna biotransformacija
1,3,7-metilkofein	Jetna obolenja; hepatična mikrosomalna biotransformacija
Aminopirin	Jetna obolenja; hepatična mikrosomalna biotransformacija
Eritromicin	Jetna obolenja

Zaključek

Problem dihalnih testov je, da različni laboratoriji uporabljajo različne količine in vrste hrane kot tudi različne izotope. Zato so izvidi preiskav različni in je njihovo tolmačenje odvisno od ustanove, ki preiskavo izvaja. Potrebno bi bilo standardizirati postopke glede količine zaužitega označenega ¹³C substrata, časa testiranja, metode zbiranja vzorcev in metode merjenja razmerja ¹³CO₂/¹²CO₂ (laser, infrardeča in masna spektroskopija). Standardni protokoli bodo omogočali primerjavo rezultatov dihalnih testov ¹³C med različnimi raziskovalnimi laboratoriji in omogočili lažjo interpretacijo za klinično diagnozo ali za spremljanje zdravljenja.

Pri prirojenih napakah metabolizma, verjetno pri katerikoli bolezni, je potrebno predvidevati da so rezervoarji in tokovi ¹³CO₂ bistveno spremenjeni. Zato so v takih primerih izračuni šibki in konec koncev se je potrebno vrniti k invazivnim metodam za ustrezno interpretacijo dihalnih testov, kot je odvzem krvi. Poleg tega bodo imele spremembe v izhodiščni koncentraciji izdihanega ¹³CO₂ med samim testom vpliv na izračun dihalnega testa. Drug problem je tudi, da je za natančen izračun potreben BMR (Basal Metabolic Rate = izračun bazalnega metabolizma) in dejanski endogeno proizveden CO₂ v preiskovancu, kar v večini primerov ni znano. Ni lahko vzdrževati stabilno endogeno produkcijo CO₂, še posebno pri mlajših otrocih, ki so težko na miru, ali pri novorojenčkih in majhnih otrocih, ki bodo nasprotovali odvzemu vzorcev izdihanega zraka. Te omejitve so vzrok, zakaj dihalni testi še niso dosegli rutinske klinične uporabe, še posebno pri diagnostiki motenj delovanja jeter ali prirojenih napakah metabolizma.

Glede na njihovo preprosto izvedbo in neinvazivnost bodo dihalni testi ¹³C v prihodnosti postali nepogrešljivo orodje v kliničnih raziskavah in diagnostiki, predvsem pri prehranskih preiskavah, diagnostiki gastrointestinalnih bolezni in motnjah v metabolizmu. Število substratov in s tem različnih testov iz leta v leto narašča.

Literatura:

1. Klein, PD. *¹³C breath tests: visions and realities. Journal of Nutrition* 2001; 131: 1637S-1642S.
2. Paschke KM, Mashir A, Dweik RA. *Clinical applications of breath testing. F1000 Med Rep.* 2010 Jul 22;2:56.

OBOLENJA, KJER LAHKO V DIAGNOSTIKI UPORABLJAMO DIHALNI TEST

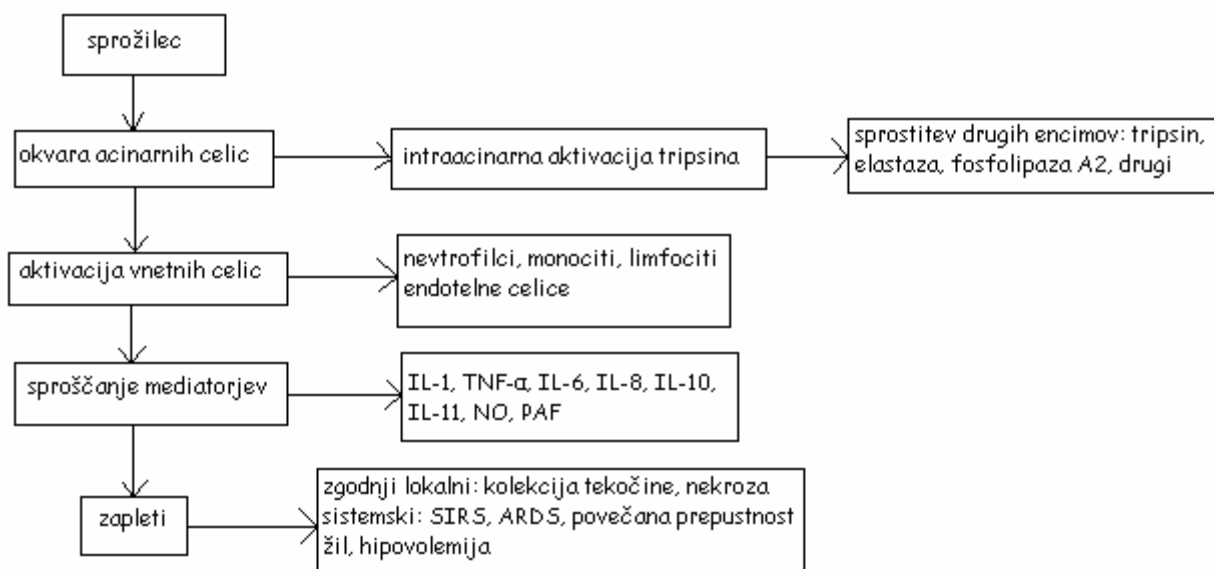
Pankreatitis je vnetje trebušne slinavke. Navadno se pojavi zaradi aktivacije encimov znotraj organa, namesto šele kasneje v prebavni cevi. Ti encimi med drugim razkrajajo beljakovine in maščobe, zato poškodujejo tudi trebušno slinavko. Posledica je vnetna reakcija. V hujših primerih pride do krvavitev, nekroze tkiva, okužb in nastanka cist. Encimi lahko zaradi vnetja prehajajo v krvni obtok in poškodujejo pljuča, srce in ledvice.

Akutni pankreatitis (AP) je akutno vnetje pankreasa z različno prizadetostjo peripankreatičnega tkiva in oddaljenih organov. Razvije se kot kompleks kaskadnih imunoloških dogodkov.

Akutni pankreatitis lahko povzročijo številni dejavniki. Najpogostejši so žolčni kamni in alkohol, drugi vzroki so redki.

Mehanizem nastanka še vedno ni povsem jasen.

Obstajata dve teoriji; mehanistična in biokemična. Slednjo potrjujejo številni poskusi na živalih. Po tej teoriji se AP razvije zaradi poškodbe ali motnje pankreatičnih acinusov, ki sproščajo encime (tripsin, himotripsin in elastaza) v pankreatično tkivo. Sproščeni encimi se aktivirajo že v tkivu in povzročijo avtodigestijo žleze. Aktivirane proteaze (tripsin in elastaza) in lipaza poškodujejo tkivo in celične membrane, povzročijo lokalno vnetje, edem, žilne poškodbe in nastanek intravaskularnih trombov, čemur sledi hemoragija in nekroza, po vstopu v sistemski obtok pa sistemski vnetni odgovor in poškodbe oddaljenih organov.



Slika 3: Patofiziologija akutnega pankreatitisa

Klinična slika je v začetku bolezni pri vseh bolnikih podobna. Vodilni simptom je bolečina v trebuhu; močna, lokalizirana v žlički ali ob popku, se stopnjuje in širi zadaj v hrbet in/ali navzgor v prsni koš. Nastopi ponavadi po mastnem obroku ali po obdobju intenzivnega pitja alkohola. Po 15 minutah doseže maksimalno jakost in takšna tudi ostane. Bolnika sili na bruhanje ali pa res bruha, to je lahko hudo in neustavljivo. Hudo vnetje povzroči pomembno sekvestracijo tekočine v retroperitonej in peritonealno votlino; lahko se izgubi do 6 L tekočine. Bolnik je zato dehidriran, hipovolemičen, hipotenziven in tahikarden, pride lahko tudi do hipovolemičnega šoka.

Kadar so vzrok pankreatitisa žolčni kamni, lahko bolečino spremlja zaporna zlatenica ali znaki akutnega holangitisa z vročino (do 39°C) in mrzlico. Če vročina nastane v prvih nekaj dneh, je posledica vnetnih citokinov pri sterilnem AP, ki pojenja takoj, ko se vnetje umiri. Če pa se pojavi kasneje, v drugem ali tretjem tednu, pa je znak okužbe nekroze. Koncentracija citokinov in drugih posrednikov vnetja v krvi je premo sorazmerna jakosti bolezni.

Podobne mikrovaskularne spremembe, kot se dogajajo v pankreasu, se pričnejo dogajati tudi v oddaljenih organih in povzročijo njihovo disfunkcijo in odpoved. Najpogosteje prizadeti organi so pljuča in ledvice (vzdrževanje GFR).

Klinične simptome spremljajo hude metabolne motnje, spremembe v elektrolitskem in acidobazičnem ravnotežju, hipokalcemija, vročina, levkocitoza, porast CRP in padec hematokrita.

Diagnoza akutnega pankreatitisa obsega začetne laboratorijske teste in slikovne preiskave.

Slikovne preiskave:

- nativni RTG abdomna
- ultrazvok trebuha
- CT ali MR trebuha

Laboratorijski testi:

- hemogram in diferencialna bela krvna slika
- amilaza
- lipaza
- CRP
- jetrni testi: AST, ALT, bilirubin (celoten in direktni), AF, γ GT
- elektroliti
- sečnina, kreatinin
- kalcij
- lipidogram
- urinski testi: amilaza, lipaza, TAP (tripsin aktivirajoči protein)
- glukoza
- protrombinski čas in INR pri sumu na akutni biliarni pankreatitis

Amilaza in lipaza sta v prvih dneh bolezni zvišani pri 90 % bolnikov. Ob značilni klinični sliki zadošča za diagnozo 3-5-kratno zvišanje aktivnosti encimov, vendar višina koncentracije ni sorazmerna s klinično sliko in o jakosti pankreatitisa ne pove nič.

Lipaza ostaja zvišana dlje, tudi en teden. Ponavadi, če se bolnik zateče k zdravniku kasneje, je zvišana le še ta.

Amilaza je v urinu povečana še kak dan dlje kot v serumu, zvišana več kot teden dni po začetku bolezni pa napoveduje zaplete. Zvišana serumska amilaza pa ni specifična za akutni pankreatitis, lahko je zvišana še pri drugih boleznih s podobno klinično sliko (akutni hepatitis, holecistitis, holangitis, izvenmaternična nosečnost, peritonitis, perforiran želodčni ali duodenalni ulkus, zdravila, diabetična ketoacidoza, bronhialni karcinom idr.).

Okoli 80 % bolnikov z akutnim pankreatitisom ima blažjo obliko bolezni, ki se v nekaj dneh umiri. Pri približno 20 % pa poteka v hudi obliki. Pojavijo se zapleti, ki brez ustrezne nege in terapije lahko povzročijo smrt bolnika. Zato so uvedli klinične in biokemične napovedne kazalce, ki opozorijo klinika, da bolniku grozi razvoj nekrozantnega pankreatitisa.

Za oceno jakosti uporabljamo Ransonove kriterije in kriterije APACHE II. Prednost kriterijev APACHE II je, da jih lahko uporabljamo za oceno stanja ves čas bolezni, medtem ko Ransonove samo v prvih 48 urah.

Bolniku opravimo preiskave in meritve, ki so potrebne za ocenitev kriterijev.

Ransonovi kazalci

Pri sprejemu v bolnišnico

- starost > 55 let
- levkociti > $16 \times 10^9/l$
- glukoza v krvi > 10 mmol/l
- AST > 2,0 $\mu\text{kat/l}$
- LDH > 5,83 $\mu\text{kat/l}$

V 48 urah pa

- padec HT > 10 %
- serumski Ca < 2 mmol/l
- pO_2 < 8 kPa
- presežek baz > 4 mmol/l
- volumski deficit > 6 l tekočine

Tabela 2: Kazalci APACHE II

Physiologic Variable	High Abnormal Range					Low Abnormal Range					Points
	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4		
Temperature - rectal (°C)	≥41°	39 to 40.9°		38.5 to 38.9°	36 to 38.4°	34 to 35.9°	32 to 33.9°	30 to 31.9°	≤29.9°		
Mean Arterial Pressure - mm Hg	≥160	130 to 159	110 to 129		70 to 109		50 to 69		≤49		
Heart Rate (ventricular response)	≥180	140 to 179	110 to 139		70 to 109		55 to 69	40 to 54	≤39		
Respiratory Rate (non-ventilated or ventilated)	≥50	35 to 49		25 to 34	12 to 24	10 to 11	6 to 9		≤5		
Oxygenation: A-aDO ₂ or PaO ₂ (mm Hg) a. FIO ₂ ≥0.5 record A-aDO ₂ b. FIO ₂ <0.5 record PaO ₂	≥500	350 to 499	200 to 349		<200 PO ₂ >70	 PO ₂ 61 to 70		PO ₂ 55 to 60	PO ₂ <55		
Arterial pH (preferred)	≥7.7	7.6 to 7.69		7.5 to 7.59	7.33 to 7.49		7.25 to 7.32	7.15 to 7.24	<7.15		
Serum HCO ₃ (venous mEq/l) (not preferred, but may use if no ABGs)	≥52	41 to 51.9		32 to 40.9	22 to 31.9		18 to 21.9	15 to 17.9	<15		
Serum Sodium (mEq/l)	≥180	160 to 179	155 to 159	150 to 154	130 to 149		120 to 129	111 to 119	≤110		
Serum Potassium (mEq/l)	≥7	6 to 6.9		5.5 to 5.9	3.5 to 5.4	3 to 3.4	2.5 to 2.9		<2.5		
Serum Creatinine (mg/dl) Double point score for acute renal failure	≥3.5	2 to 3.4	1.5 to 1.9		0.6 to 1.4		<0.6				
Hematocrit (%)	≥60		50 to 59.9	46 to 49.9	30 to 45.9		20 to 29.9		<20		
White Blood Count (total/mm ³) (in 1000s)	≥40		20 to 39.9	15 to 19.9	3 to 14.9		1 to 2.9		<1		
Glasgow Coma Score (GCS) Score = 15 minus actual GCS											
A. Total Acute Physiology Score (sum of 12 above points)											
B. Age points (years) <44=0; 45 to 54=2; 55 to 64=3; 65 to 74=5; ≥75=6											
C. Chronic Health Points (see below)											
Total APACHE II Score (add together the points from A+B+C)											

Ransonovi kazalci temeljijo na 10 kliničnih znakih, 5 jih merimo ob sprejemu, saj napovedujejo jakost vnetja, 5 pa 48 ur po prihodu v bolnišnico. Ti označujejo sistemske učinke vnetnih mediatorjev in prizadetost organov. Več kot trije Ransonovi kazalci v prvih 48 urah ali kazalci APACHE II nad 8 točk kažejo na razvoj hudega pankreatitisa.

Ne eni, ne drugi pa ne morejo napovedati poteka akutnega pankreatitisa v prvem dnevu, zato se išče nove, zanesljivejše kazalce. Do sedaj je bil najuspešnejši TAP, ki se zviša že zelo

zgodaj in tak tudi ostane. Določamo ga v urinu. Napovedovalec hudega pankreatitisa je tudi visok dvig koncentracije CRP (> 150 mg/l) ali padec hematokrita, ki se ne popravlja.

Kronični pankreatitis (KP) je kronično vnetje trebušne slinavke, ki ga označuje napredujoči propad žleznega parenhima in fibroza z izgubo ekso- in endokrine funkcije žleze ter spremembe pankreatičnih izvodil z dilatacijami in pankreatoliti. Značilna je kronična bolečina, ki prehaja v nevropatsko.

Večina raziskav KP je bila narejenih zaradi alkohola. Značilnosti bolezni so vnetje, atrofija žleze, spremembe v vodih in fibroza. Nastanek je verjetno povezan s podaljšano izpostavljenostjo toksinom in oksidativnim stresom. Pri tem zgodnje in pozno vnetje povzroči nastanek profibrotičnih celic, vključno s stelatnimi celicami, ki tvorijo kolagen in matriksne metaloproteaze. Sledi periacinarna fibroza in kronični pankreatitis.

Etanol povzroči proliferacijo pankreatičnih stelatnih celic preko PDGF in NADPH. Vpleteni pa so tudi prosti radikali, ki nastajajo pri pretvorbi ksantinske dehidrogenaze v oksidazo.

Avtoimuni pankreatitis je redka bolezen, za katero so značilni avtoimunske vnetje, limfocitna infiltracija, fibroza in pankreatična disfunkcija.

Kronični pankreatitis lahko poteka v obliki ponavljajočih se akutnih zagonov ali pa s stalno bolečino in malabsorpcijo zaradi insuficience eksokrine žleze. Zaradi insuficience endokrine žleze pa nastane sladkorna bolezen. Pojavijo se tudi simptomi obstrukcije žolčevoda, dvanajstnika ali velikih žil.

Prisotni so steatoreja, hujšanje, pomanjkanje vitaminov in slabost.

Diagnoza sloni na klinični sliki, laboratorijskih izvidih, morfološki diagnostiki in funkcionalnih testih. Za KP je značilen trias bolečine, steatoreje (izločanje v blatu več kot 7 g maščobe/dan) in sladkorne bolezni.

Laboratorijske preiskave so navadno normalne, vključno s serumsko amilazo in lipazo. Število levkocitov in elektrolitov v serumu je običajno normalno. Do elektrolitskih motenj pride le, kadar bolnik močno bruha. Koncentracija encimov je lahko normalna, čeprav je steatoreja že razvita. Pojavi se pri napredovalem KP, ni pa zanj specifična; prisotna je tudi pri malabsorpciji zaradi bolezni ozkega črevesa.

Izbor preiskav, njihovo zaporedje in kombinacija so odvisni od individualne klinične slike, bolnikovih težav in tehničnih in ekonomskih možnosti okolja, v katerem se izvajajo.

Tabela 3: Laboratorijski testi, ki se uporabljajo za ocenitev stanja bolnika pri sumu na kronični pankreatitis

TESTI

Kompletna krvna slika
Serumska amilaza in lipaza
Celotni bilirubin, AF, in jetrne transaminaze
Glukoza v serumu na tešče
Pankreatični funkcionalni testi

ZAZNAMKI

Povišani pri infekciji, absces
Nespecifična za kronični pankreatitis
Povišani pri biliarnem pankreatitisu in duktalni obstrukciji
Zvišana napoveduje pankreatični diabetes
Včasih uporabni pri zgodnjem KP z normalnim CT-jem ali MRI

Ocena maščob v blatu
 > 7 g maščob/dan je abnormalno; kvantitativno; potrebno 72 ur; mora biti na dieti z 100 g maščobe na dan

Elastaza v blatu
 < 200 mcg per g (0.20 g per kg) blata je abnormalno; neinvazivno; eksogeni pankreatični nadomestek ne bo spremenil rezultatov, potrebno le 20 g blata.

Sekretinska stimulacija	Maksimalna bikarbonatna koncentracija < 80 mEq/L (80 mmol/L) pri duodenalni sekreciji; najboljši test za diagnozo pankreatične eksokrine insuficience.
Serumski tripsinogen	< 20 ng /mL (0.83 nmol / L) je abnormalno
Lipidi	Signifikantno povišani trigliceridi so redek vzrok KP
Kalcij	Hiperparatiroidizem je redek vzrok KP
Antiimunoglobulin G4 v serumu, antinuklearno protitelo , revmatoidni faktor, hitrost sedimentacije eritrocitov	Nenormalnosti lahko kažejo na avtoimuni pankreatitis.

Testi so naštetí glede na pogostost izvajanja: od najpogostejše do najredkeje

Slikovne preiskave – morfološka diagnostika:

- RTG trebuha
- UZ
- CT
- MR s kombinacijo MRCP¹
- ERCP²
- EUZ³
- PEPS⁴

Funkcionalni testi

Teste delimo na direktne in indirektne.

DIREKTNI

Merimo izločanje bikarbonata, pankreatičnih encimov in ugotavljamo sestavo pankreatičnega soka:

- sekretin in sekretin-holecistokininski test
- sekretin cerulein test
- Lundhov test

Direktni test temelji na spodbujanju žleze k močnem izločanju soka - s hrano (Lundhov test) ali z i.v. injekcijo sekretagoga (sekretina ali sekretina in holecistokinina). Sledi črpanje pankreatičnega soka iz dvanajstnika - duodenalna intubacija - ali celo iz pankreatičnega voda. Po intubaciji analiziramo vsebino.

Direktni testi za merjenje eksokrine funkcije pankreasa so zlati standard, ker imajo visoko občutljivost in specifičnost, vendar so invazivni, dolgotrajni in dragi. So neprimerni za večkratno testiranje. Za izvedbo morajo uvesti sondo v dvanajstnik, lego sonde pa preveriti z rentgenskim slikanjem. Osnovna pogoja testa sta pravilna lega sonde in volja bolnika, da se med izvedbo ne premakne – test traja 1 uro. Večina bolnikov test odkloni, saj je neprijeten. Izvaja ga le nekaj gastroenteroloških enot v Evropi in ZDA. V Sloveniji se ne izvaja.

INDIREKTNI

Indirektni testi potekajo brez sonde, so neagresivni in jih pogosteje uporabljamo v klinični praksi.

¹ MRCP - magnetic resonance cholangiopancreatography- magnetnoresonančna holangio-pankreatografija

² ERCP - endoskopska retrogradna holangio-pankreatografija

³ EUZ - endoskopski ultrazvok

⁴ PEPS - optična in elektronska pankreatoskopija

Temeljijo na pretvorbi z izotopom ali barvilom označene kemične spojine, ki v dvanajstniku zapade encimski digestiji z enim od pankreatičnih encimov. Kadar je delovanje encimov normalno, lahko odcepljeni del molekule, označen z izotopom, izmerimo v seču, blatu ali izdihanem zraku. Kadar je delovanje encimov zmanjšano, je izmerjena koncentracija nižja, lahko celo odsotna.

- NBT-PABA
- Pankreolavrilni test-fluorescein dilavrat test
- Analiza blata: - maščobe – IR refleksijska tehnika
 - himotripsin (kolorimetrična tehnika)
 - pankreatična elastaza - 1(ELISA)
- Serumski tripsin
- Dihalni testi

N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid test (NBT-PABA)

Bolnik zaužije substrat (NBT-PABA), ki ga hidrolizira pankreatični encim himotripsin v NBT in PABA. Metabolit PABA, ki v reakciji nastane, se absorbira, konjugira in izloči z urinom, kjer ga lahko izmerimo.

Urin se zbira 6, 8 ali 9 ur. Ponavadi je 6 ur dovolj. Celotno koncentracijo aromatskega amina v urinu detektiramo spektrofotometrično.

Analiza blata

Ocenjevanje eksokrine funkcije pankreasa ponavadi zahteva zbiranje blata, v katerem se določa količina maščob ali encimov (himotripsin in elastazo). Metoda ni dovolj občutljiva in ni primerna za ponavljanje.

Pankreatična elastaza-1 v blatu

To je specifična človeška proteaza, ki jo sintetizirajo pankreatične acinarne celice. Proteaza je izjemno stabilna, zato jo lahko kvantitativno merimo v blatu. Koncentracijo merimo z imunoencimsko metodo, detektiramo pa fotometrično. Za blažje pankreatitise je občutljivost testa 63 %, za srednje in hude pa 100 %. Specifičnost je 93 %.

Dihalni testi

Dihalni test ^{13}C temelji na merjenju razmerja med ^{13}C in ^{12}C v izdihanem CO_2 , po zaužitju določenega hranila, obroka ali drugega substrata, ki vsebuje ^{13}C .

^{13}C je neradioaktivni stabilni izotop ogljika; njegova naravna prisotnost je 1,11 % vsega ogljika.

Preiskovanec zaužije substrat, ki je relativno bogat s ^{13}C . Po absorpciji substrat vstopi v oksidativni metabolizem, se vključi v različne organske metabolite vključno z bikarbonatom, proteini, maščobami in ogljikovimi hidrati. Končni produkt oksidativnega metabolizma je CO_2 in voda, ki ju izločimo z izdihom. Vzorec, ki ga analiziramo, je izdihan zrak, iz katerega ločimo CO_2 od drugih sestavin zraka. Preiskovanci izdihavajo v posebno izdelano vrečo.

Na podlagi razlike v enem nevtronu med ^{13}C in ^{12}C lahko z masnim spektrometrom ali masnim spektrometrom razmerja izotopov (IRMS) določimo relativno vsebnost ^{13}C v izdihanem CO_2 .

Če je funkcija trebušne slinavke normalna, bomo izdihali približno 300 mmol CO_2/m^2 telesne površine na uro. Ko pa je njena funkcija zmanjšana, se zmanjša koncentracija encimov za prebavo hranil in temu primerno tudi absorpcija, oksidacija in koncentracija izdihanega CO_2 iz pljuč.

Vzorci se vzamejo pred zaužitjem – za bazno linijo – in med določenimi časovnimi intervali po zaužitju določenega substrata.

Izmerjeno razmerje izotopov v vzorcih se izrazi kot relativna razlika (δ na ml v %) med vzorcem in mednarodnim standardom.

Od ^{13}C v izdihanem zraku pa moramo vedno odšteti bazno linijo, ker se, kot že omenjeno, naravno pojavlja v naši prehrani, zato se vsebnost spreminja glede na dieto.

Na izbiro je več tipov substratov, izbor pa je odvisen od encima trebušne slinavke, ki mu merimo aktivnost.

Različni lipidni substrati se uporabljajo za merjenje aktivnosti lipaze, ^{13}C obogateni škrob za amilazo, ^{13}C -dipeptidi za proteaze ali peptidaze.

Zaenkrat je občutljivost metode najboljša pri lipidnih substratih, saj se intraduodenalna lipazna aktivnost zniža v zgodnejših fazah bolezni pankreasa v primerjavi z drugimi pankreatičnimi encimi.

Lipidni substrati

Absorpcijo maščob lahko razdelimo v 3 faze: - lipoliza (lipazna odvisnost), solubilizacija (odvisnost od žolčnih soli), mukozni privzem (funkcionalna integriteta epitelija). Lipoliza je prva faza, zato je zelo primerna za diagnostiko eksokrine funkcije pankreasa.

Do sedaj uporabljeni so: trioktanoin, triolein, tripalmitin, holesteril-oktanoat, mešani trigliceridi (1,3-distearil 2-oktanil glicerol, hiolein).

Test temelji na hidrolizi do npr. PMK in monoacilglicerola z lipazami, vgraditve metabolitov v micela, njihove absorpcije, resinteze in transporta v jetra. Lipolitični hepatični encimi sprostijo ^{13}C označene MK, ki so potem podvržene β -oksidaciji, pri kateri nastajata CO_2 in voda. CO_2 se transportira po krvi do pljuč, kjer ga izločimo z izdihanjem.

Uporabnost substratov

- **Trioktanoin**

Njegova absorpcija je regulirana z lipolizo, zato lahko z njim ločimo med pankreatično insuficienco in pomanjkanjem žolčnih soli.

- **Triolein**

Absorpcija je odvisna od vseh faz, zato je primeren za ločitev med osebki s steatorejo (katerega koli razloga) in tiste brez okvare v metabolizmu ali absorpciji.

- **holesteril -[1- ^{13}C]oktanoat**

Hidrolizirajo ga le pankreatične lipaze, na pa tiste v želodcu in slini. Za absorpcijo ne potrebuje solubilizacije in tvorbe micelov. Oktanojska kislina se zato hitro privzame in zapade metabolni oksidaciji. Encim hidrolizira vez med ^{13}C oktanoatom in holesterolom, zato je primeren za merjenje aktivnosti izključno pankreatičnih encimov, vendar se do sedaj uporablja le za eksperimentalne namene. Rezultati kažejo na dobro specifičnost, a omejeno občutljivost pri steatoreji nepankreatičnega izvora. Diagnostični pristop bi se lahko izboljšal z uporabo dodatnega substrata – npr. Na-[1- ^{13}C]oktanoata, ki bi izključil možno motnjo absorpcije.

- **Mešani trigliceridi**

1,3-distearil 2-oktanil glicerol

Primeren je za merjenje pankreatične lipazne aktivnosti. Hidroliza 1. in 3. stearilne skupine je omejujoč dejavnik metabolizma, kar pa je ključno za boljšo specifičnost metode.

Hiolein

je derivat iz alg, triglicerid večinoma dolgih maščobnih kislin. S tem substratom lahko ločimo bolnike s steatorejo, zato je primerna alternativa testu analize fecesa. Test hitro pokaže postprandialno asimilacijo - (pretvorbo maščob v CO_2), medtem ko pri analizi maščob v fecesu dobimo rezultat, ki je povprečna vrednost standardnih maščob zaužitih v treh dneh.

Analize kažejo, da so testi z mešanimi trigliceridi zelo občutljivi pri napredovali stopnji insuficiencie eksokrinega izločanja trebušne slinavke, vendar pa je občutljivost omejena pri detekciji začetne stopnje.

Testi z lipidnimi substrati bi lahko bili moderna alternativa za trenutno dostopne pankreatične funkcionalne teste, vendar pa specifičnost včasih ni dovolj visoka zaradi vpliva želodčne lipaze, biliarne sekrecije, gastrointestinalnega prehoda in absorpcije. Vsi ti dejavniki vplivajo na vsebnost izdihanega $^{13}\text{CO}_2$, kar lahko daje lažno pozitivne rezultate. Tudi občutljivost ni velika.

Testi, pri katerih uporabljamo substrate z daljšimi maščobnimi kislinami, zahtevajo daljši čas analize (6-8 h) v primerjavi z mešanimi trigliceridi.

Škrobni substrati

Prebava škroba ni specifična za pankreatično funkcijo, saj se prebava škroba začne že v ustih z amilazo, ki jo izločajo žleze slinavke, tudi ne dovolj občutljiva za začetne stopnje insuficience, saj se izločanje encima zmanjša šele pri napredovalih stopnjah insuficience. Ne absorbiran škrob pa zapade tudi fermentaciji do $^{13}\text{CO}_2$ v kolonu s pomočjo bakterij. Čeprav je substrat široko dostopen in poceni, ima test slabo občutljivost pri detekciji insuficience trebušne slinavke.

Peptidni substrati

Podobno kot pri škrobu proteolize ne vršijo le pankreatične proteaze. Želodčna kislina in peptidaze v ščetkasti membrani prav tako prispevajo k proteolizi. Vendar novejša raziskava z novimi substrati kažejo na boljše rezultate.

V raziskavah je Bz-Tyr-Ala dipeptid (benzoil-L-tirozil[1- ^{13}C]alanin), ki je odporen na aminopeptidaze in esteraze, cepi ga le karboksipeptidaza. Poleg tega substrata pa preiskovanci zaužijejo samo L-[1- ^{13}C]alanin za izključitev možne slabe absorpcije in metabolizma.

PREDNOSTI IN SLABOSTI

Večina dihalnih testov dobro zazna napredovalo stopnjo odpovedi, ne pa mile, začetne stopnje. Še najbolj občutljivi so testi za funkcijo lipaze, vendar pa je tudi pri tem testu vsebnost $^{13}\text{CO}_2$ odvisna še od želodčne lipaze, žolčnih soli; pri jetrnih boleznih, sindromu iritabilnega kolona bo test pozitiven kljub normalni aktivnosti pankreasa. Te lažne rezultate lahko izključimo s sočasnimi kontrolnimi testi za delovanje teh organov.

Pri testih za merjenje maščobe v blatu se te pojavijo, šele ko so vsi adaptivni mehanizmi izčrpani – pri 90 % zmanjšanju izdihanega CO_2 oziroma 90 % znižanju izločanja pankreatične lipaze. Velika rezervna kapaciteta pankreasa je razlog, da se steatoreja pojavi šele v pozni fazi kroničnega pankreatitisa, zato so s tega vidika dihalni testi ključnega pomena. Ker so varni, so primerni tudi za dojenčke, otroke in doječe matere.

HELICOBACTER PYLORI

SPLOŠNO O BOLENJU

Okužba s *H. pylori* je najpogostejša okužba pri ljudeh, saj je z njo okužena več kot polovica človeštva. Bakterija *H. pylori* je vpletena v nastanek aktivnih kroničnih obolenj želodčne sluznice. Ima različne patogene dejavnike in se lahko izredno gensko spreminja ter se tako prilagaja posebnim življenjskim razmeram na želodčni sluznici. Spada v skupino karcinogenih mikrobov prvega reda.

Odkritje *H. pylori* in njenega pomena pri gastroduodenalnih boleznih je eno najpomembnejših spoznanj v gastroenterologiji v zadnjih 30 letih. Po začetnem dvomu glede pomena te bakterije velja danes *H. pylori* za glavnega povzročitelja sprememb v želodčni sluznici, kar je bilo tudi formalno potrjeno leta 1994 na konferenci v ZDA in objavljeno v reviji ameriškega združenja (JAMA).

Zdravnika Barry J. Marshall in J. Robin Warren sta leta 1982 z odkritjem bakterije *Helicobacter (H.) pylori*, najprej poznane kot *Campylobacter (C.) pylori* ali *pyloridis*, v bioptičnih vzorcih želodčne sluznice pri človeku in potrditvijo njene ključne etiološke vloge pri nastanku gastritisa in ulkusne bolezni želodca in dvanajstnika bistveno spremenila dotedanje pojmovanje o patogenezi in načinu zdravljenja teh bolezni. Za to odkritje sta prejela leta 2005 tudi Nobelovo nagrado. Z odkritjem bakterijskega povzročitelja se je pokazala možnost vzročnega zdravljenja. Te bolezni so pričeli zdraviti tudi z antimikrobnimi zdravili. Nesporno ima *H. pylori* najpomembnejšo vlogo pri patogenezi ulkusne bolezni želodca in dvanajstnika ter pri kroničnem gastritisu, pomembno vlogo pri nizkomalignem limfomu B tipa MALT in nastanku raka želodca, s čimer je povezan tudi pomen odstranitve te bakterije. Z odstranitvijo te bakterije se odstotek ozdravitve zviša prek 90 %, tveganje za ponovni pojav bolezni pa se zniža tudi pod 10 %.

Zelo verjetno okužba ni etiološko povezana s simptomi funkcijske dispepsije. Večina bolnikov s kronično razjedo na želodcu in dvanajstniku ter nekatere bolnike z limfomom MALT lahko pozdravimo samo z ustreznim antimikrobnim zdravljenjem. Tako privarčujemo znatna sredstva v zdravstveni blagajni in pred to boleznijo rešimo številne bolnike. Po drugi strani pomeni nepravilno zdravljenje veliko potratu denarja ter razvoj odpornosti proti antibiotikom pri bakteriji *H. pylori* in pri drugih bakterijah.

Okužba z bakterijo *H. pylori* je ena najpogostejših okužb pri ljudeh, ki spremlja človeštvo že iz pradavnine, saj so že pri več tisoč let starih mumijah odkrili okužbo z njo in z dokazovanjem genetskih značilnosti te bakterije so lahko tudi zasledovali, od kod in kam so se ljudje preseljevali.

Okužba s *H. pylori* se pojavlja pri 40-50 % populacije v razvitih državah in pri 80-90 % populacije v državah v razvoju. Pojavnost okužbe je za razviti svet ocenjena na 0,5 % letno, za države v razvoju pa 3-10 % letno.

V nerazvitem svetu se večina prebivalstva okuži že v otroštvu. Na stopnjo okuženosti vplivajo ob socialno-ekonomskem statusu še z njim povezana razlika v bivalnem standardu in osebni higieni, oskrba s kakovostno pitno vodo in možnostjo mešanja fekalij z viri pitne vode ter uporaba fekalij pri pridelavi hrane.

Tudi v razvitih državah je okuženost večja med revnejšimi sloji. Odrasli se v razvitih državah redko okužijo s *H. pylori*. Višja stopnja okuženosti z bakterijo v razvitem svetu pri starejši populaciji je po vsej verjetnosti bolj posledica slabih higiensko-epidemioloških in ekonomskih razmer tega prebivalstva v mladosti kot pa velikega letnega tveganja okužbe v odrasli dobi.

Pri večini je okužba dosmrtna, redke izjeme spontano ozdravijo.

Podatki iz leta 1991 kažejo, da je bilo v Sloveniji v starostni skupini do 20 let pozitivnih 38 % preiskovanih serumov. Vrh prekuženosti je bil v starostni skupini med 30. in 39. letom, saj je bilo pozitivnih kar 73,5 % preiskovanih serumov. Med vsemi serumi (242 zdravih preiskovancev) je imelo 51,6 % testiranih protitelesa proti *H. Pylori*. Čeprav je okuženih veliko ljudi, pa le nekateri razvijejo klinično sliko.

Epidemiološki dejavniki, kot so starost bolnikov, socialno-ekonomski status in bivalne razmere so dejavniki tveganja za okužbo s *H. pylori*. Bakterija je 'in vitro' občutljiva za številna protimikrobna zdravila: amoksicilin, makrolide, nitrofurane, tetracikline, aminoglikozide, imidazole (metronidazol, tinidazol), kinolone, rifampicin in tudi bizmutove soli. Vendar občutljivost 'in vitro' ni vedno porok za klinično uspešnost in izkoreninjenje.

Bakterija *Helicobacter pylori* je mikroaerofilna, po Gramu negativna, 0,5 x 3 do 5 µm velika spiralna bakterija, ki se lahko svedrasto giblje s pomočjo štirih do šestih bičkov. Z njo je okužena več kot polovica človeštva, najdemo jo pa tudi pri primatih, prašičih in mačkah. Najdemo jo lahko le na želodčni sluznici, saj je specializirana za življenje na njej. Ima močan tkivni tropizem (potuje glede na smer, iz katere prihajajo določeni kemični ali fizikalni dražljaji) in se naseli samo na celice z gastričnim fenotipom: želodčni epitelij, gastrična metaplazija v dvanajstniku. Kolonizira želodec in povzroča kronično vnetje. *H. pylori* lahko okvari želodčno sluznico neposredno ali posredno prek vpliva na homeostazo izločanja kisline. Nahaja se predvsem v globljih plasteh sluzi, tik ob površini epiteljskih celic. Ni invazivna, v celice ne prodira, ampak se nanje prilepi.

Čeprav je izločanje HCl v želodcu močna obramba proti bakterijski okužbi, se je *H. pylori* prilagodila življenju v tem okolju. To ji omogočajo vdor v mukusni sloj, gibanje v mukusu, bivanje in razmnoževanje v kislem okolju, pripetje na epitelne celice in izogibanje imunskemu odgovoru.

Za kolonizacijo je pomembna gibljivost, ki jo omogočajo bički. Umesti se v sloj med sluzjo in epitelijem in v tem, manj kislem okolju, tvori velike količine encima ureaze.

Ureaza hidrolizira ureo v amoniak in ogljikov dioksid. Deluje v okolici in v notranjosti bakterije. V reakciji vode in amoniaka nastaja amonijev hidroksid, kar vodi do hitrega porasta pH vrednosti. Tako v svoji neposredni okolici ustvari okolje za preživetje (pH med 4 in 7). Amoniak pa tudi okvarja sluznico. Ureaza igra tudi poglavitno vlogo v vzdrževanju intracelularnega pH. V citoplazmi bakterijske celice je prisotna tudi zato, da oskrbuje celice z amonijakom in dušikom, ki sta nujna gradnika aminokislin. Tako skrbi za celično homeostazo bakterije. Njeno aktivnost pa uravnava koncentracija uree.

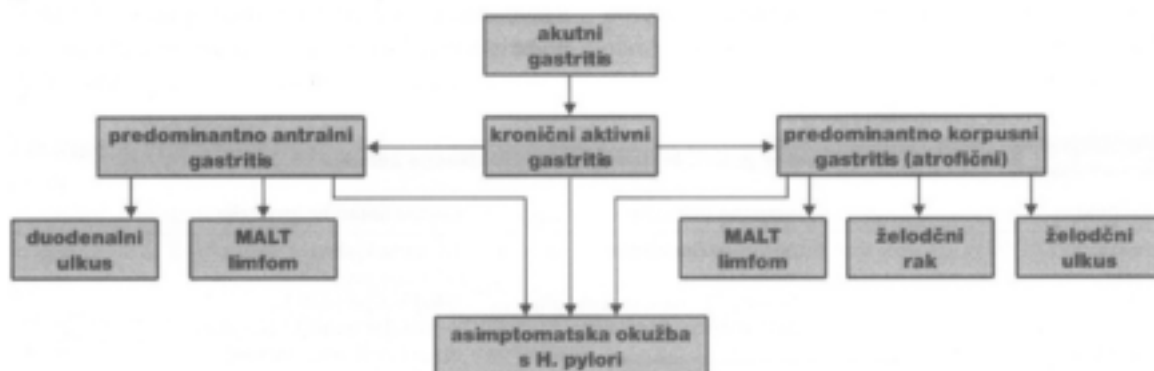
Akutna okužba je lahko popolnoma asimptomatska, pri večini okuženih pa se pokaže s simptomi dispepsije. Pri teh bolnikih se dispepsija razvije nekaj dni po okužbi s *H. pylori*, pojavijo se bolečine v epigastriju, slabost, bruhanje in zadah. Simptomi v nekaj dneh minejo. Akutna okužba navadno preide v kronično. Kronična okužba lahko poteka asimptomatsko in pri nekaterih ljudeh povzroči simptome šele takrat, ko se razvije razjeda želodca ali dvanajstnika. Pri 50 % bolnikov pa ostaja asimptomatska okužba prisotna celo življenje.

H. pylori povzroča gastritis pri okuženih ljudeh. Začetni vnetni odgovor sestoji iz nevtrofilnih levkocitov, ki mu sledijo limfociti T in B in makrofagi. Zato je ob akutni okužbi prisoten nevtrofilni gastritis. Vnetno dogajanje spremlja okvara epiteljskih celic.

Okužba s *H. pylori* spodbudi močan sistemski in mukozni humoralni odgovor; povzroči nastanek specifičnih protiteles tipa IgA in IgG, ki jih lahko dokazujemo v serumu. Nastanek protiteles pa ne omogoči eradikacije okužbe. Dogajanja na molekularni ravni spremljajo histološke in funkcionalne spremembe želodčne sluznice. Nekaj dni po okužbi se razvije nevtrofilni pangastritis (po celem želodcu) in prehodna aklorhidrija, ki lahko traja od 50 do 250 dni.

Akutna faza okužbe je enaka pri vseh okuženih ljudeh. Nadaljnji razvoj okužbe pa lahko poteka po treh različnih poteh:

- 1) razporeditev bakterije po celem želodcu (pangastritis) → kronični aktivni gastritis → lahko vodi v MALT;
- 2) razporeditev bakterije pretežno po antrumu (antralni gastritis) → lahko vodi v duodenalno razjedo, MALT;
- 3) razporeditev bakterije pretežno po korpusu (korpusni gastritis) → lahko vodi v želodčno razjedo, želodčnega raka, MALT;
- 4) asimptomatsko



Slika 4: Možni izidi okužbe z bakterijo *H. pylori*

DIAGNOSTIKA OKUŽBE

INVAZIVNE METODE (vezane na endoskopijo)

1. Hitri bioptični ureazni test (HUT)

Temelji na sposobnosti razgradnje sečnine (uree) s pomočjo bakterijskega encima ureaze v amonijev ion in bikarbonat. Zaradi te reakcije se poveča pH, kar bakteriji omogoča preživetje v kislem želodčnem okolju. Pri diagnostičnem testu pa povečan pH spremeni barvo indikatorja iz slamnato rumene v rdečo. Zdravnik test opravi takoj ob gastroskopiji na odvzetem koščku želodčne sluznice (biopt). Pozitiven rezultat je potrditel okužbe. Hitrost reakcije je premosorazmerna koncentraciji *H. pylori* v vzorcu in je lahko v nekaterih primerih zaradi majhnega števila bakterij tudi lažno negativen. Lažno pozitivne rezultate dobimo zelo redko, ker je *H. pylori* edina bakterija, ki v tako veliki koncentraciji tvori ureazo. Segrevanje medija z vzorcem lahko pospeši reakcijo, ne vpliva pa na občutljivost in specifičnost. Prednosti omenjenega diagnostičnega testa sta nizka cena, preprosta izvedba in hiter rezultat, zato je to osnovni diagnostični test za dokazovanje okužbe s *H. pylori* pri endoskopiji. Test je pri 75 % okuženih bolnikov pozitiven v 20 minutah, pri 90 % pa v 3 urah. Občutljivost testa je 75-98 %, specifičnost pa 95-100 %. Občutljivost metode je odvisna od števila bioptičnih vzorcev, mesta odvzema biopta, bakterijske gostote in predhodne uporabe antibiotikov in zaviralcev protonske črpalke (ZPČ). Nekoliko manjša občutljivost testa je lahko posledica možne neenakomerne krpaste razporeditve bakterij in posledične napake pri vzorčenju. Zato za izboljšanje občutljivosti testa priporočajo odvzem dveh vzorcev iz antruma pred zdravljenjem oz. vzorec iz antruma in korpusa želodca po končanem protimikrobnem zdravljenju.

2. Faznokontrastni mikroskopski pregled svežega biopta

Takoj po odvzemu tkivnega vzorca lahko v faznokontrastnem mikroskopu pregledamo bioptični vzorec brez posebnega barvanja. Ta metoda se v praksi redko uporablja, čeprav naj bi bila zelo občutljiva in specifična.

3. Histološka preiskava biopta (barvanja: s hematoksilin-eozinom, po Giemsi, po Warthin-Starryju, imunohistokemična barvanja)

Najmanj en mesec po zdravljenju okužbe je treba odvzeti vsaj dva tkivna vzorca iz antruma ali angularne gube in korpusa želodca. Poleg ocene prisotnosti *H. pylori* nam histološka preiskava da še pomembne podatke o stopnji aktivnosti vnetja želodčne sluznice in sluznice dvanajstnika, razširjenost tega vnetja, morebitni prisotnosti atrofičnega gastritisa, intestinalni metaplaziji, displastičnih spremembah ali celo o malignih spremembah. Za rutinsko histološko preiskavo uporabljamo barvanje s hematoksilin-eozinom, za določitev bakterije *H. pylori* pa je najenostavnejše in najcenejše barvanje po Giemsi. V raziskovalne namene uporabljamo različne tehnike srebrenja (po Warthin-Starryju, Genta) ali imunohistološke metode. V rokah izkušenega patologa je to zelo občutljiva in specifična metoda (prek 95 %). Na občutljivost vpliva tudi število vzorcev želodčne sluznice.

4. Bakteriološka kultura (iz biopsijskega vzorca)

H. pylori prepoznamo z mikroskopsko sliko, dokazom gibljivosti ter biokemični zaznavi različnih bakterijskih encimov (ureaza, oksidaza, katalaza...). Občutljivost je 83-98,4 %, specifičnost pa več kot 95 %. Slabša občutljivost je lahko posledica neustreznega transporta vzorca ali pa neizkušenosti laboratorijskega osebja. Vzorce je treba transportirati v prenosnih medijih, v katerih bakterije pri 4° C preživijo do 48 ur. Na rezultate kulture je treba čakati 3–14 dni. Omogoča nam določitev rezistence bakterij na antibiotike pred ali po zdravljenju, kar postaja vse bolj pomembno. Mikrobiološka kultura je izjemno pomembna prav zaradi ugotavljanja občutljivosti bakterij za antibiotike pri bolnikih, pri katerih protimikrobno zdravljenje prve izbire ni bilo uspešno.

5. Reakcija verižne polimeraze (PCR) in reakcija verižne polimeraze s primerjavo restrikcijskih odsekov

To je zelo občutljiva genetska metoda, ki jo uporabljamo tako za določitev bakterijske DNK kot tudi za ugotavljanje rezistence na antibiotike. Dokazujemo jo v bioptičnem vzorcu želodčne sluznice, želodčnem soku, žolču, slini in blatu. Transportni pogoji tu niso pomembni, natančnost pa je vsaj takšna kot pri kulturi. Zaradi visoke občutljivosti je primerna prav za ugotavljanje majhnega števila bakterij po protimikrobnem zdravljenju. Ugotavljamo lahko tudi prisotnost genetskih značilnosti posameznih sevov, ki so pomembne za nastanek ulkusne bolezni. Primerjava dolžine restrikcijskih odsekov nam omogoča razlikovati med ponovnim razrastom istega osnovnega seva (relaps) in novo okužbo (reinfekcijo). S to metodo ugotavljamo tudi možnost prenosa istega seva bakterij med družinskimi člani in možnost iatrogene okužbe. Uporabljamo jo redko zaradi visokih stroškov.

NEINVAZIVNE METODE (niso povezane z endoskopijo)

1. Serološke priskave (dolčanje specifičnih protitelov IgG in IgA)

To je najpomembnejša preiskovalna metoda pri epidemioloških raziskavah. Okužba z bakterijo *H. pylori* povzroči lokalno tvorbo cirkulirajočih protiteles IgM, IgA in IgG. Humoralni imunski odziv pa žal ne more odstraniti bakterije. Občutljivost in specifičnost metode ELISA sta večji kot 90 %. Ta preiskovalna metoda je bistveno natančnejša od drugih seroloških testov. Ob okužbi s *H.pylori* se pri dveh tretjinah bolnikov poveča količina protiteles IgA, ki so diagnostično pomembna pri tistih bolnikih (okrog 2 %), pri katerih se ne poveča koncentracija protiteles IgG. Če hočemo zmanjšanje koncentracije protiteles uporabiti kot diagnostično metodo za ugotavljanje uspešnosti zdravljenja, moramo z metodo ELISA določiti koncentracijo protiteles v serumu pred zdravljenjem ter 6 in 12 mesecev po njem. Če se je koncentracija protiteles zmanjšala vsaj za 30 % glede na izhodiščno vrednost, je občutljivost te metode 75 % po 6 mesecih in 95 % po 12 mesecih. Hitrost seroreverzije (negativizacija protiteles) je odvisna od začetne koncentracije protiteles. Določitev teh protiteles ni uporabna pri ugotavljanju uspešnosti terapije z antibiotiki. Današnji serološki testi ne ločijo trenutne infekcije od prebolele.

2. Dihalni test s sečnino ^{13}C ali ^{14}C

Tako kot hitri ureazni test, ki ga zdravnik naredi ob gastroskopiji, tudi dihalni test temelji na isti reakciji. Uporabo principa dihalnega testa sta sočasno predlagala dva avtorja, Graham in Marshall. Zelo hitro po prvih objavah je test zaradi enostavnosti, visoke občutljivosti in specifičnosti ter zanesljivosti v diagnostiki primarne okužbe prešel v široko uporabo. Princip testa temelji na že predstavljeni reakciji sečnine in ureaze. S testom določamo celokupno encimsko aktivnost. Pri testu damo preiskovancu določeno količino sečnine, ki ima namesto ^{12}C v molekuli ^{13}C . Tik pred tem preiskovanec popije tudi testni obrok, ki vsebuje citronsko kislino ali pomarančni sok, ki upočasni praznjenje želodca in podaljša kontaktni čas označene sečnine s *H. pylori*. Tako se izognemo lažno negativnim rezultatom. Ko v želodcu ureaza, ki jo bakterija izloča, razgradi sečnino, sproščen ogljikov dioksid difundira v krvne žile in se prenese kot bikarbonat v pljuča, kjer se sprosti kot ^{13}C v izdihanem zraku. Če izmerimo razmerje izotopov $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ v izdihanem zraku pred tem, ko preiskovancu damo označeno sečnino in po tem, ko je preiskovanec popil označeno sečnino (običajno po 30 minutah), bo to razmerje ob prisotnosti bakterije spremenjeno. Če je povečanje razmerja za več kot 4 ‰, je rezultat pozitiven. V zadnjem času se pojavljajo objave, kjer mejno vrednost postavljajo celo na 3 ‰ oz. 2,5 ‰.

Izotop ^{13}C je povsem neškodljiv in je primeren tudi za uporabo pri otrocih, nosečnicah in doječih materah. Delež $^{13}\text{CO}_2$ v vzorcih izdihanega zraka se lahko določa s pomočjo masne spektrometrije za določanje razmerja izotopov (IRMS) ali z drugo ustrezno veljavno metodo, ki jo mora opraviti usposobljen laboratorij.

Izotop ^{14}C je radioaktiven, zato je v uporabi mikrokapsulirani dihalni test urea ^{14}C , pri katerem radioaktivnost ne preseže prejetega dnevnega odmerka sevanja iz naravnega okolja.

Občutljivost in specifičnost, ki sta običajno nad 90 %, se lahko zmanjšata, če test uporabimo prej kot 1 mesec po končanem protimikrobnem zdravljenju. Če bolniki po protimikrobnem zdravljenju nadaljujejo zdravljenje še z zaviralci receptorjev H_2 ali ZPČ, je lahko dihalni test za kontrolo učinkovitosti zdravljenja lažno negativen. Vsaj 2

tedna pred dihalnim testom z ureo naj bolniki ne jemljejo teh zdravil. Uporabljamo ga za začetno odkrivanje okužbe in za ocenjevanje uspešnosti eradikacijskega zdravljenja.

3. Dokazovanje *H. pylori* v blatu (PCR, ELISA)

To je imunokromatografsko določanje antigena *H. pylori* z uporabo monoklonskih ali poliklonskih protiteles. Princip določanja je dokazovanje specifičnega antigena, ki se pojavi v blatu po okužbi organizma s *H. pylori*. Monoklonalna ali poliklonalna protitelesa anti-*H. pylori* protitelesa so nanešena na mikrotitersko ploščo in reagirajo z antigenom *H. pylori* v razredčenem vzorcu blata. Dodamo tudi s peroksidazo konjugirana poliklonalna protitelesa anti-*H. pylori* in inkubiramo 1 uro. Dodamo substrat in razvije se barva. Pozitiven rezultat je definiran kot tisti, kjer je absorbanca večja ali enaka 0,160. Specifičnost je do 100 %, občutljivost pa okoli 80 %, odvisni pa sta tudi od izbire proizvajalca testa. Uporabljamo ga za začetno odkrivanje okužbe in za ocenjevanje uspešnosti eradikacijskega zdravljenja.

ZPČ, H2 antagonisti, bizmutove soli in protimikrobna zdravila (antibiotiki) se ne smejo jemati 4 tedne pred testom, ker uničijo antigene bakterije *H. pylori* in zato vplivajo na rezultat. Prednost teh testov pa je enostavna izvedba, hiter rezultat ter cena.

Postopek pričnemo z zbiranjem vzorcev za določitev začetne vrednosti (0-minutne vrednosti):

1. Izpolnimo formular z bolnikovimi podatki.

2. Iz kompleta vzamemo slamico in dve epruveti z napisom: "Čas vzorčenja: 00-minutna vrednost". Z epruvete odstranimo zamašek, odvijemo slamico in jo vstavimo v epruveto. Bolnik naj počasi izdihuje skozi slamico, dokler se notranja površina epruvete ne zarosi. Medtem ko bolnik neprekinjeno izdihuje, izvlečemo slamico in takoj zapremo epruveto s priloženim zamaškom. (Če ostane odprta več kot 30 sekund, bo izid testa morda napačen.) Epruveto držimo pokonci in nanjo prilepimo črtno kodo z napisom "00-minutna vrednost" tako, da so črte v vodoravnem položaju.

3. Po enakem postopku napolnimo z izdihanim zrakom še drugo epruveto (Oznaka: "Čas vzorčenja: 0-minutna vrednost").

4. Takoj po tem mora bolnik popiti 200 ml 100-odstotnega pomarančnega soka ali 200 ml vode z 1 g citronske kisline.

5. Sledi priprava raztopine.

Iz kompleta vzamemo platenko z napisom "¹³C-sečnina prašek", jo odpremo in do 3/4 napolnimo z navadno vodo. Platenko zapremo in jo previdno stresamo, dokler se prašek ne raztopi. Prelijemo vsebino v kozarec. Platenko do roba napolnimo z vodo še drugič in tretjič in dodamo to vsebino v kozarec (celotna količina vode mora biti približno 30 ml).

6. Raztopino mora bolnik popiti takoj. Zapišemo si točen čas zaužitja.

7. Trideset minut po zaužitju testne raztopine zberemo vzorca 30-minutnih vrednosti v preostala vsebnika (Oznaka: "Čas vzorčenja: 30-minutna vrednost"), kot je opisano v korakih 2. in 3. Za ta vzorca uporabimo nalepki z napisom »30-minutna vrednost«.

8. Ustrezno nalepko s črtno kodo nalepimo tudi na bolnikov podatkovni list. Na koncu zapečatimo paket z nalepko.

9. Epruvete pripravimo za merjenje na aparatu. Sledi analiza vzorcev.

PODROBNOSTI TESTIRANJA IN ANALIZE VZORCEV IZDIHANEGA ZRAKA

Vzorci izdihanega zraka, zbrane v 10 ml steklenih ali plastičnih epruvetah, analiziramo s spektrometrično metodo določanja razmerja mase izotopov (IRMS). Analiza razmerja med ¹³C in ¹²C v izdihanem ogljikovem dioksidu je sestavni del diagnostičnega postopka testa

Helicobacter INFAI. Natančnost testa je močno odvisna od kakovosti analize izdihanega zraka. Podroben opis parametrov analize zraka – linearnost, stabilnost (natančnost referenčnega plina) ter natančnost meritev sta bistvena pogoja za točnost testnih rezultatov.

Specifikacije za določitev razmerja med ^{13}C in ^{12}C

Koncept testa izdihanega zraka je zasnovan na uporabi s ^{13}C specifično označene sečnine, katere porabo v presnovi nadzorujemo z merjenjem $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanem zraku.

Masni spektrometer mora imeti naslednje funkcije:

večkratna ponovitev analize: vsaj tri zaporedne analize istega vzorca;

zavarovan dostop: shranjevanje delovnih parametrov in rezultatov z varovanim dostopom, da se prepreči poznejše spreminjanje podatkov;

nastavitev: razmerje med ^{13}C in ^{12}C glede na standard PDB (Pee Dee Belemnite);

zanka za vzorec: < 200 μl .

Glavni testi, s katerimi preverimo specifikacije, so linearnost, stabilnost (natančnost referenčnega plina) in natančnost meritev.

Vsi masni spektrometri za analizo izdihanega zraka morajo ustrezati naslednjim specifikacijam:

linearnost: $\leq 0,5 \text{ ‰}$ za vzorce izdihanega zraka v različnih koncentracijah med 1 % in 7 % CO_2 ;

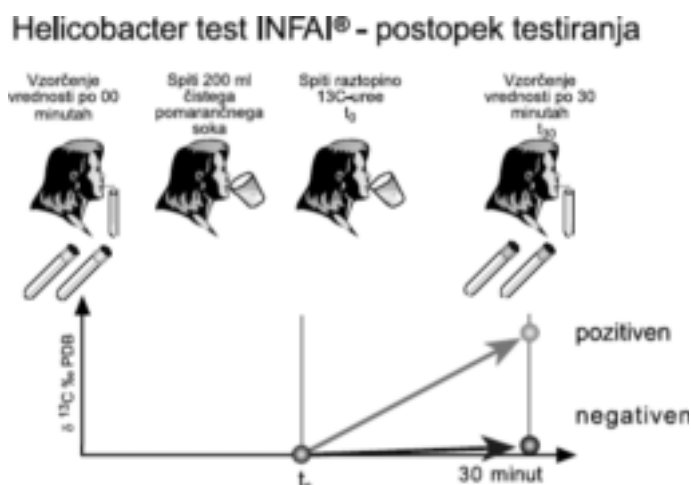
stabilnost: $\leq 0,2 \text{ ‰}$ pri 10 zaporednih pulzih;

natančnost meritev: $\leq 0,3 \text{ ‰}$ pri običajni naravni prisotnosti ^{13}C , z uporabo 10 ml epruvete s 3 % CO_2 v izdihanem zraku.

Okužba s *Helicobacter pylori* je prisotna, če razlika $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ med osnovno vrednostjo in 30-minutno vrednostjo presega 4,0 ‰.

Uporabimo lahko tudi kakšno drugo primerno, validirano metodo, ki jo izvede usposobljen laboratorij.

Pri otrocih je postopek enak, le da dobijo 45 mg sečnine in popijejo 100 ml pomarančnega soka.



ZDRAVLJENJE OKUŽBE

Raziskovalne skupine po svetu so priporočale različne sheme za zdravljenje okužbe s *H. pylori* in tako povzročile pravi kaos. Poznanih je bilo več sto načinov zdravljenja okužbe, ki so se razlikovali glede na vrsto, odmerke, kombinacije antibiotikov in vrsto inhibitorja protonske črpalke. S ciljem da se poenoti obravnava bolnikov z gastroduodenalnimi boleznimi, ki so okuženi s *H. pylori*, je bila ustanovljena Evropska skupina za raziskovanje bakterije *H. pylori* (European Helicobacter Study Group). Prvi sestanek so imeli leta 1996 v Maastrichtu in izoblikovali so pomembna priporočila, ki so do današnjih dni doživela le majhne popravke.

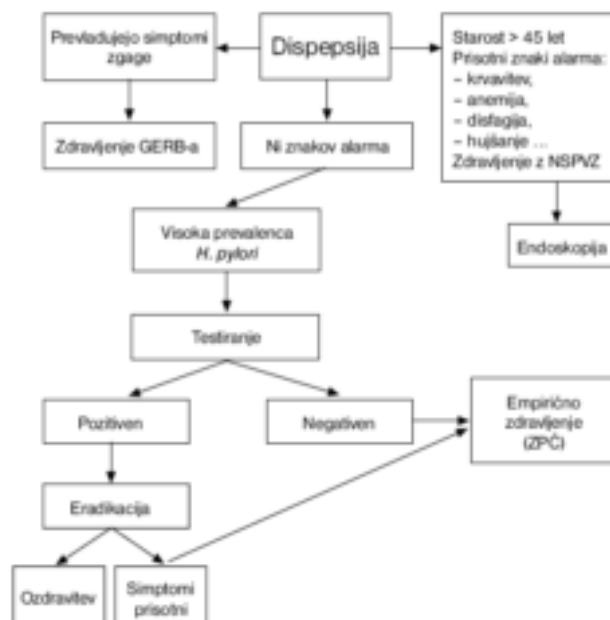
Indikacije za zdravljenje in načini zdravljenja okužbe z bakterijo *H. pylori* so določeni v mednarodnih in domačih smernicah. V Sloveniji zdravimo okužbe z bakterijo *H. pylori* pri vseh okuženih bolnikih, pri bolnikih z razjedo želodca in dvanajstnika, pri bolnikih s kroničnim gastritisom z intestinalno metaplazijo in/ali atrofijo, pri bolnikih z gastroezofagealno refluksno boleznijo pred začetkom kroničnega zdravljenja z zaviralci protonske črpalke in dolgotrajnega zdravljenja z nesteroidnimi protivnetnimi zdravili ali salicilati. Poleg tega zdravimo bolnike z limfomom MALT po operaciji raka želodca ter sorodnike v prvem kolenu bolnika z rakom želodca.

Za vse ostale indikacije obstaja relativna upravičenost zdravljenja, nenazadnje tudi na željo bolnika v primeru ugotovljene pozitivnosti. Bolnikov strah za posledicami, ki bi jih bakterija lahko povzročila je tako velik, da je bolj smiselno predpisati enotedensko antibiotično terapijo, kot pa jo odkloniti. Nikakor pa ni smiselno ob ponovnih težavah brez testiranj, kar avtomatično predpisati eradikacijsko antibiotično terapijo enkrat, dvakrat ali celo trikrat v tekočem letu, kar se žal še večkrat izvaja. V Sloveniji smo v zadnjih petnajstih letih opazili prepolovitev prevalece okužbe, ki po nekaterih podatkih v povprečju znaša dobrih 25 %, v populaciji starejših od 60 let pa dobrih 50 %, kar je tudi posledica dosedanjega pristopa do zdravljenja in preventivnih ukrepov.

Izbor diagnostičnih postopkov za odkrivanje okužbe s *H. pylori* je odvisen od intenzitete simptomov in starosti bolnika. Evropska skupina predlaga različen protokol pri bolnikih starejših od 45 let, kot tudi pri tistih, ki imajo dominantno prisotne simptome gastroezofagealnega refluksa.

V skupini bolnikov mlajših od 45 let, brez alarmantnih simptomov, ob prvem pojavu bolezni ali ponovitvi, lahko diagnostični postopek začne zdravnik na primarni ravni z enim od neinvazivnih diagnostičnih postopkov (v prvi vrsti je to dihalni test s sečnino ali pa dokazovanje protiteles v blatu). V primeru pozitivnega testa se priporoča eradikacijska terapija. To je t.i. pristop "test and treat". Uspeh terapije prav tako kontroliramo z neinvazivnim testom. Slabost te strategije je v tem, da zdravimo številne bolnike z dispepsijo, pri večini katerih eradikacijsko zdravljenje večinoma ne odstrani težav. Obenem zaradi masovne uporabe antibiotikov ustvarjamo sekundarno (pridobljeno) rezistenco bakterije. Dobra stran tega zdravljenja je predvsem ekonomska.

V primeru bolnikov starejših od 45 let oz. ob prisotnosti alarmantnih simptomov, se pacienta napoti h gastroenterologu. To je t.i. pristop "search/scope and treat", ki omogoča ugotavljanje bolezni, povzročene z okužbo, in ciljno zdravljenje te bolezni. Diagnostika se izvede z endoskopijo (HUT, histologija), kontrola uspešnosti zdravljenja pa z dihalnim testom, dokazovanjem protiteles v blatu ali endoskopijo.



Slika 6: Priporočila za obravnavo bolnikov z dispepsijo

Ta priporočila v Evropi danes sicer še veljajo, vendar smo v Sloveniji pred kratkim zaradi vse večje rezistence proti antibiotikom sprejeli drugačne ukrepe. Po slovenskih smernicah lahko eradikacijo izvaja samo gastroenterolog, ne pa splošni zdravnik, razen če ima sorodnik v prvem kolenu rak želodca, če je razjeda na dvanajstniku kronična ali pa če je bil gastroskopsko ugotovljen ulkus.

Evropsko združenje za raziskave *H. pylori* je leta 2000 na 2. Konsenzus konferenci v Maastrichtu predlagalo kot zdravljenje izbire sedemdnevno shemo.

Shema 1. izbora (tritirno zdravljenje)

ZDRAVILO	DNEVNI ODMEREK
zaviralec protonske črpalke ali ranitidin bizmutov citrat	2 x standardni odmerek 2 x 400 mg
klaritromicin	2 x 500 mg
amoksisilin ali metronidazol	2 x 1000 mg 2 x 400 / 500 mg

Priporočena shema izbire je klaritromicin in amoksisilin zaradi potencialno boljših rezultatov zdravljenja v primerjavi z drugo shemo, v kateri je metronidazol, če slednji ni bil uporabljen že v prvi shemi zdravljenja. Če smo neuspešni s prvo shemo zdravljenja, priporočila iz Maastrichta svetujejo drugo najmanj sedemdnevno shemo.

Shema 2. izbora (štiritirno zdravljenje)

ZDRAVILO	DNEVNI ODMEREK
zaviralec protonske črpalke ranitidin bizmutov citrat	2 x standardni odmerek 2 x 400 mg
metronidazol	2 x 400 / 500 mg
oksitetraciklin	4 x 500 mg

V državah, kjer bizmuta ni na voljo (Slovenija), se kot druga terapevtska shema predpiše tritirno, antimikrobno zdravljenje z ZPČ, amoksicilinom in metronidazolom.

PRIPOROČILA V SLOVENIJI

Glede na to, da v Sloveniji nimamo na voljo pripravkov bizmut subcitrata/subsalicilata, smo glede na možnosti zdravljenja zelo omejeni.

Priporočena sedemdnevna shema izbire (št. 1) je:

ZDRAVILO	DNEVNI ODMEREK
zaviralec protonske črpalke	2 x standardni odmerek
klaritromicin	2 x 500 mg
amoksicilin	2 x 1000 mg

V primeru neuspeha priporočamo sedemdnevno shemo (št. 2):

ZDRAVILO	DNEVNI ODMEREK
zaviralec protonske črpalke	2 x standardni odmerek
klaritromicin	2 x 500 mg
metronidazol	2 x 500 mg

Uspeh zdravljenja je glede na slabše rezultate potrebno preveriti predvsem zaradi pomena neuspešnega izkoreninjenja *H. pylori* za možnost kasnejše ponovitve bolezni. Kontrolo uspešnosti zdravljenja izvedemo mesec dni po zdravljenju, najbolje z dihalnim testom¹³C-urea, ki je metoda izbire. Lahko pa uporabimo tudi določanje antigena v blatu. Izjema od tega pravila je, če obstaja medicinska indikacija za ponovno endoskopijo zgornjih prebavil (razjeda želodca, peptična razjeda z zapleti, limfom MALT).

Testiranje na *H. pylori* iz krvi je nesmiselno, ker ne pokaže realnega rezultata, njena povišana vrednost je lahko odraz že prebolele okužbe in gre le za prisotnost protiteles.

Bolniki mesec dni pred kontrolo uspeha zdravljenja ne smejo jemati antibiotikov, vsaj 2 tedna pred kontrolo pa tudi ne ZPČ ali blokatorjev H₂. Nadaljevalno zdravljenje z ZPČ po enotedenskem antimikrobnem zdravljenju je potrebno le pri bolnikih z razjedo želodca ali z razjedo z zapleti. V primeru aktivne razjede dvanajstnika in v primeru ostalih indikacij za zdravljenje pa nadaljevalno zdravljenje ZPČ ni potrebno.

V primeru neuspešnega zdravljenja s shemama 1 in 2 sodi tak bolnik k specialistu gastroenterologu. Glede na nedosegljivost preparatov bizmuta v Sloveniji so nadaljnje možnosti zdravljenja sorazmerno omejene. Najbolj pomembno vprašanje pred izbiro naslednje možnosti zdravljenja je vsekakor, ali je bakterija občutljiva za makrolidne antibiotike. Odgovor nam lahko da le kultura in antibiogram. Če odpornost na makrolide ni prisotna, lahko uporabimo shemo ZPČ, klaritromicin in ciprofloksacin. Če pa obstaja rezistenca na makrolide, je možno bolnike zdraviti z visokimi odmerki ZPČ in amoksicilina (ZPČ 3 × 40 mg, amoksicilin 3 × 1000 mg). Učinek amoksicilina je zelo odvisen od pH želodčnega soka, zato se predpišejo višji odmerki ZPČ.

Izračuni kažejo, da je eradikacijsko zdravljenje kljub visoki začetni ceni upravičeno, ker z njim preprečimo ponovitve bolezni in tako bolnikom in družbi prihranimo veliko denarja. Bolnik po uspešni eradikaciji praviloma ne potrebuje vzdrževalnega zdravljenja, zmanjšana je tudi potreba po bolniškem staležu. Zapleti (zlasti pogoste so krvavitve) so po eradikaciji bakterije mnogo redkejši.

Razlogi za neuspeh zdravljenja

Uspešna odstranitev *H. pylori* je možna le, če antibiotiki na mestu okužbe dosežejo koncentracijo, ki presega minimalno baktericidno koncentracijo in se takšno stanje zadržuje zadosti dolgo.

Glavni razlogi za neuspešno zdravljenje so:

- slabo sodelovanje bolnika;
- odpornost bakterije na predpisane antibiotike;
- učinkovitost antibiotika je zmanjšana zaradi nizkega pH želodčnega soka;
- koncentracija antibiotikov ni zadostna zaradi velikih količin bakterije.

Drugi redkejši vzroki za neuspeh zdravljenja so:

- bakterija se zadržuje intracelularno;
- bakterija preživi kot kokoidna oblika;
- motnja imunskega odgovora gostitelja;
- zgodnja ponovna okužba.

Možnost ponovne okužbe s *H. pylori* v štirih tednih po končanem zdravljenju so zgolj teoretične. V primeru pozitivne kontrole 1 mesec po antimikrobnem zdravljenju gre v glavnem za razrast osnovnega seva in ne za ponovno okužbo. V Sloveniji je možnosti za ponovno okužbo po uspešnem zdravljenju *H. pylori* le 0,5 % letno.

Z odstranitvijo *H. pylori*, če za to obstaja indikacija, dosežemo umiritev kliničnih težav, padec koncentracije IgG in zmanjšanje nevtrofilne infiltracije želodčne sluznice, zaradi česar se kronično ulcerativno vnetje povsem pozdravi. Po uspešnem zdravljenju se vnetne spremembe v sluznici normalizirajo šele v roku treh do štirih let. Sedanja kombinacija eradikacijskega zdravljenja je relativno uspešna, pojavljajo pa se posamezni sevi, ki so odporni proti več antibiotikom hkrati.

Med letoma 2007 in 2009 so v Sloveniji ugotovili popolno občutljivost bakterije *H. pylori* za amoksisilin in tetraciklin. V testiranem obdobju niso osamili niti enega izolata, ki bi bil na katerega od njiju odporen. Odpornost na klaritromicin in metronidazol je znašala 18,6 % in 17,5 %. Kombinirana odpornost proti metronidazolu in klaritromicinu je bila prisotna pri 4,1 % primarnih izolatov. To po drugi strani pomeni, da je bil delež izolatov, ki so bili odporni proti najmanj enemu izmed ključnih antibiotikov, 32 %. Sevi po enkratnem ali večkratnem zdravljenju so bili tudi popolno občutljivi za amoksisilin in tetraciklin, odpornost na metronidazol, klaritromicin in ciprofloksacin pa je bila bistveno višja od tiste pri primarnih izolatih in je znašala 86,5 %, 90,8 % in 13,7 %. To z drugimi besedami pomeni, da je po enkratnem ali večkratnem neuspelem eradikacijskem zdravljenju večina izolatov odpornih na oba ključna antibiotika in da je sekundarna odpornost bakterije *H. pylori* proti fluorokinolonom občutna.

Spojine, ki vsebujejo bizmut, učinkujejo baktericidno na *H. pylori* ter tudi povečajo baktericiden učinek antibiotikov (npr. klaritromicina). Ranitidin-bizmutov citrat in klaritromicin delujeta sinergistično. Bizmut in mukus 'in vitro' tvorita kompleks glikoprotein-bizmut. To tvori oblogo na ulkusu in tako predstavlja bariero za kislino, kar pospeši celjenje ulkusa. Bizmut tudi stimulira proizvodnjo prostaglandinov (ki stimulirajo sekrecijo HCO_3^- v mukus).

Več študij je dokazalo inhibitoren vpliv probiotikov na rast *H. pylori*. Probiotiki zmanjšajo gastrično vnetje, kolonizacijo ter gostoto bakterije. Pri uživanju probiotikov ob standardni terapiji se poveča možnost uspešne eradikacije. Nobena študija pa še ni dokazala, da bi lahko probiotiki sami odstranili okužbo. Uživanje probiotikov med terapijo pa tudi pripomore h komplianci, saj se zmanjšajo neželeni učinki (diareja).

Verjetni mehanizmi pozitivnega vpliva probiotikov na okužbo s *H. pylori* so naslednji: kompeticija za adhezinske receptorje (pritrditev bakterije), proizvodnja antimikrobnih snovi

(mlečna kislina, bakteriocini, avtolizini), stimulacija proizvodnje mucina, stabilizacija črevesne mukozne bariere; gastrično vnetje pa zmanjšajo, ker modificirajo imunski odgovor na *H. pylori*.

Cepivo je ena od možnih oblik preprečitve okužbe in hkrati način zdravljenja že okuženih bolnikov. Bolniki naj bi ga jemali peroralno, vzpodbudilo pa naj bi razvoj sekrecijskih protiteles razreda IgA in predvsem imunski odgovor Th2. Pri poskusih na živalih so že dokazali, da cepljenje z rekombinantnim antigenom ureaza B bakterije *H. pylori* ob dodatku toksina vibria kolere kot adjuvansa lahko bistveno zmanjša možnost nastanka okužbe in povzroči celo ozdravitev večine okuženih živali. Raziskovalci s pomočjo znanega bakterijskega genoma iščejo primerne kombinacije antigenov bakterije *H. pylori* in najprimernejši adjuvans. Pričakujemo, da bodo različna cepiva kmalu prešla v II. in III. fazo kliničnih študij.

Literatura:

1. Kocijančič A., Mrevlje F., Štajer F.: *Interna medicina*; 3.izdaja; Littera picta, Ljubljana, 2005; 461-492;
2. Tepeš B.: *Helicobacter pylori*; Krka v medicini in farmaciji 1999, 20 Suppl 1, 1-49;
3. M. Gubina, B. Tepeš, G. Vidmar, A. Ihan, J. Logar, B. Wraber, J. Poljanec in sod.: *Prevalenca protiteles proti bakteriji Helicobacter pylori v Sloveniji v letu 2005*; Zdrav vestn 2006; 75: 169-73;
4. Kocijančič B., Orel R., Osredkar J.: *Dispepsija*; Pliva Ljubljana, 2006; 4-5, 8-13;
5. Mičetić – Turk D., Urlep D., Krajnc M., Knehtl M.: *Diagnostična vrednost neinvazivnih testov pri okužbi s Helicobacter pylori v otroški dobi*; Med razgl 2006; 45: 79-89;
6. Jeverica S., Tepeš B., Ihan A., Skvarč M.: *Primarna odpornost bakterije Helicobacter pylori*; Zdrav vestn 2010; 79: 25-30;
7. Tepeš B. *Helicobacter pylori v novem milenijumu*. Gastroenterolog 2004; 8: Supl. 2: 54-9;
8. Tepeš B., Gubina M.: *Razlogi za neuspeh antimikrobnega zdravljenja okužbe z bakterijo Helicobacter pylori in naše terapevtske možnosti*; Zdravn vestn 2004; 73: 503-6;
9. Tepeš B., Ojsteršek Z.: *Uspešnost zdravljenja okužbe z bakterijo Helicobacter pylori v Sloveniji v letu 2008*; Zdrav Vestn 2010; 79: 19-24;
10. Osredkar J.: *Dihalni test s sečnino – njegovo mesto v diagnostiki*; Zdrav vestn 2004; 73: 13-7.