

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



David Tomeček

**Interindividuální variabilita testů exokrinního  
pankreatu dechovým testem**

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

as. MUDr. Petr Kocna, CSc.

Oponent:

Prof. MUDr. Richard Průša, CSc.

Pracoviště: Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF a VFN

Praha, 2012

## Poděkování

Chci poděkovat as. MUDr. Petru Kocnovi, CSc., za veškerou pomoc a poskytnuté prostředky pro vznik této práce. Dále také personálu laboratoře ÚKBLD a v neposlední řadě děkuji RNDr. Janu Klaschkovi, Ph.D., za jeho rady při statistickém zpracování této práce.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a že veškeré citované prameny uvádím v seznamu literatury.

6. května 2012

David Tomeček

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Úvod.....	8
1. Teoretická část.....	9
1.1 Vyšetření exokrinní funkce pankreatu .....	9
1.2 Využití izotopů.....	9
1.2.1 Uhlík.....	10
1.2.2 PDB Standard.....	11
1.2.3 Bezpečnost stabilních izotopů .....	11
1.3 Dechový test s <sup>13</sup> C-MTG .....	12
1.3.1 Substrát.....	13
1.3.2 Metabolismus .....	13
1.4 Analýza stabilních izotopů .....	15
1.4.1 Metody analýzy .....	15
1.4.2 Princip metody NDIRS .....	15
1.5 Preanalytická fáze .....	17
1.5.1 Odběr vzorku vydechovaného vzorku.....	17
1.5.2 Uchování vzorku .....	18
1.5.3 Standardizace a přesnost dechových testů.....	18
1.5.4 Faktory ovlivňující výsledky dechových testů .....	20
1.5.5 Systém zajištění kvality.....	22
1.5.6 Kalibrace a standardizace analyzátoru .....	23
2. Experimentální část.....	25
2.1 Příprava pacienta.....	25
2.2 Příprava a aplikace substance <sup>13</sup> C-MTG .....	25
2.3 Vzorkování .....	25
2.4 Analýza .....	26
3. Výsledky a diskuze.....	27
3.1 Půlroční profil čtyř jedinců .....	27
3.2 Test stability CO <sub>2</sub> .....	33
3.2.1 Měření koncentrace CO <sub>2</sub> .....	33
3.2.2 Delta <sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C.....	35
3.3 Vliv rekalibrace na výsledky testů .....	37

4. Závěr .....	38
5. Literatura .....	39
6. Seznam použitých zkratek.....	40

## Abstrakt

$^{13}\text{C}$ -MTG dechové testy jsou využívány pro diagnostiku exokrinní funkce pankreatu. V případě testu s použitím substrátu značeného uhlíkem  $^{13}\text{C}$  se jedná o test poměrně drahý a jeho použití v klinické praxi nebylo nikdy zkoumáno v dlouhodobém horizontu.

Tato studie se zabývá preanalytickou fází a probíhala na souboru 4 jedinců po dobu 6 měsíců a jako taková je tedy vůbec první studií  $^{13}\text{C}$ -MTG testu provedenou v dlouhodobém horizontu. Půl roční profil čtyř jedinců ukázal, že výsledky naměřených hodnot jsou v některých případech rozptýleny až o desítky procent proti svému průměru.

Test stability oxidu uhličitého ukázal, že jeho hodnota se v závislosti na teplotě nemění. Po celou dobu 7 dnů tedy zůstala jeho koncentrace ve vácích prakticky beze změny. Z toho se dá usuzovat, že vaky jsou na přepravní a skladovací podmínky prakticky necitlivé. Otázkou ale zůstalo, proč se měnila hodnota delty  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .

Výsledky této studie tedy poukazují na fakt, že výsledné hodnoty měření kumulativního výdeje čtyř zdravých jedinců se během půl roku mění.

# Abstract

$^{13}\text{C}$ -MTG breath tests are used for exocrine pancreas diagnostics. It is a quite expansive test and its usage has never been tested in clinical practice in long time horizon.

This study is engaged in pre-analytical phase and contains a group of 4 people who were tested for 6 months and this is the first study ever that has been proceeded in a long time horizon. The half-year profile of these 4 people showed that some of those results are spread of tens percents against its average.

The test of  $\text{CO}_2$  stability showed that the value of  $\text{CO}_2$  is independent on the temperature which the breath bag is stored in. Its concentration was same for the time of 7 days. Now we can say that the breath bags are insensitive in case of transporting and storage. The question is, why the value of delta  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  changed.

The results of this study point on fact that values of cumulative dosage recovery of these 4 people did change.

# Úvod

Dechové testy jsou moderní jednoduché a neinvazivní vyšetřovací metody. Lékaři již dávno zjistili, že pach dechu jejich pacientů, může poskytovat cenné informace o tom, co se děje v jejich těle. Antoine Lavoisier byl v 18. století ve Francii zakladatelem moderních chemických analýz. Byl též prvním, kdo demonstroval, že vzduch kromě jiného obsahuje kysličník uhličitý. V 19. století byl chemiky vynalezen test na přítomnost alkoholu a též acetonu, který značí kromě jiného také diabetes melitus. Linus Pauling v roce 1971 předvedl, že lidský dech je komplexní plyn, složený z asi 200 různých organických směsí. Některé tyto směsi jsou tímto považovány za markery onemocnění. Směsi s použitím stabilního izotopu uhlíku se v laboratořích používají již přes 30 let. (1) Nepřímé dechové testy exokrinního pankreatu jsou založeny na principu perorálně podané substance, značené uhlíkem  $^{13}\text{C}$ , jakožto markerem vyšetřované funkce. Klinický význam testu s  $^{13}\text{C}$ -MTG spočívá v diferenciální diagnostice malabsorpčního syndromu, je využíván jako funkční test exokrinního pankreatu a slouží pro sledování dlouhodobě nemocných s chronickou pankreatitidou. Dechové testy s  $^{13}\text{C}$ -MTG (MTG-BT), ( $^{13}\text{C}$ -Hioleinem) patří mezi nepřímé funkční testy exokrinního pankreatu a napomáhají též sledovat úspěšnost pankreatické substituční léčby. Tato práce je zaměřená na preanalytickou část vyšetření.



# 1. Teoretická část

## 1.1 Vyšetření exokrinní funkce pankreatu

Problematika funkční diagnostiky exokrinního pankreatu zůstává stále diskutovaným tématem - jak z pohledu laboratorních metodik, tak z pohledu klinických aplikací. Klinický význam laboratorních testů pankreatické funkce zahrnuje široké spektrum od primární diagnostiky především chronické pankreatitidy a cystické fibrózy, stanovení stupně postižení pankreatu, dlouhodobého sledování nemocných s chronickou pankreatitidou, včetně monitorování suplementační terapie pankreatickými enzymy až po diferenciální diagnostiku malabsorpčního syndromu. Zlatým standardem zůstává stále klasický sekretin-pankreo-zyminový test (SCCK, PZS). Jeho provedení je velmi náročné technicky a laboratorně, pro pacienta velmi zatěžující, a pro rutinní diagnostiku se tak stává nedostupným. Frekvence použití SCCK-PZS testu klesla během uplynulých 30 let z 55 % na cca 10 %. Dalším, zcela zásadním testem posouzení pankreatické malabsorpce je kvantitativní analýza tuků v 72-hodinovém sběru. Rovněž tento test není v našich laboratořích dostupný, i když jeho frekvence ve světě zůstává během uplynulých 30 let stále cca na 20 %. Ze studie sumarizující frekvenci testů exokrinní funkce pankreatu je v roce 2000 nejčastějším přístupem vyšetření chymotrypsinu nebo elastázy ve stolici a dechový test s  $^{13}\text{C}$ -MTG, zahrnující asi 40 % testů.(2) Dechový test  $^{13}\text{C}$ -MTG je tedy v dnešní době na vzestupu, jedná se o test moderní a jeho přednostmi je neinvazivita a jednoduchost při jeho provádění.

## 1.2 Využití izotopů

Izotopy jsou prvky, se stejným protonovým číslem (tj. počet protonů v atomovém jádře) a odlišné nukleonové číslo (tj. počet protonů a neutronů v atomovém jádře), a tedy i atomovou hmotnost. Jádra atomů izotopu jednoho chemického prvku mají tedy stejný počet protonů, ale odlišný počet neutronů. Chemické vlastnosti izotopů téhož prvku jsou více méně stejné (s určitými výjimkami), fyzikální vlastnosti rovněž a nejčastější odlišností je jejich stálost. Izotopy, jejichž počet neutronů a protonů, resp. jejich poměr, je odlišný od ideálního středního poměru, jsou nestabilní a podléhají radioaktivnímu rozpadu. Poločas přeměny je doba, kdy se přemění polovina počtu atomových jader, vyjadřuje tedy

nestabilitu izotopu. Stabilní izotopy mají poločas přeměny nekonečný, jádra se tedy samovolně nepřeměňují a nejsou radioaktivní. Stabilní izotop je tedy jeden ze dvou či více forem prvku, který ve svém jádře má stejný počet protonů, ale odlišný počet neutronů a v elektronovém obalu stejný počet elektronů a nepodléhá samovolné přeměně doprovázené emisí částic. V přírodě se prvky vyskytují ve směsi, která zahrnuje procentuální zastoupení několika izotopů.

Užívanými prvky v biomedicínských aplikacích jsou především izotopy vodíku, kyslíku, uhlíku, vodíku, dusíku fosforu a síry, tedy izotopy biogenních prvků. Principem těchto studií je aplikace označeného, zkoumaného metabolického substrátu (traceru) do živého organismu. Tracer („stopař“) je substrát, který obsahuje molekuly označené způsobem, který neovlivní jejich metabolický osud a je rovnoměrně rozptýlen mezi neoznačenými molekulami (tzv. tracee) v konkrétním metabolickém poolu. Pool je zásoba sledované látky v určitém kompartmentu, který může být velký (např. celková tělesná voda) nebo naopak pouze intravaskulární (značené erytrocyty). Pro označení látek jsou využívány stabilní či radioaktivní izotopy. Označení je realizováno buď náhradou atomu v molekule jeho minoritním izotopem, nebo navázáním atomu k molekule. Tracery jsou využívány k diagnostice onemocnění i výzkumu metabolických pochodů v živých systémech. (3)

### 1.2.1 Uhlík

Uhlík (chemická značka C, latinsky Carboneum) je chemický prvek, tvořící základní stavební kámen všech organických sloučenin a tím i všech živých organismů na této planetě. Význam mají pro nás v této studii především uhlíkové izotopy  $^{12}\text{C}$  a  $^{13}\text{C}$ . Uhlík existuje ve dvou stabilních přirozeně přítomných izotopech. Izotop  $^{12}\text{C}$  tvoří 98,9% uhlíku na Zemi a izotop  $^{13}\text{C}$  tvoří zbývajících 1,1%. Základní nevýhodou použití stabilních izotopů je skutečnost, že všechny stabilní izotopy se vyskytují přirozeně a je tedy nutné počítat s přirozeným pozadím. V látkách biologického původu je izotop  $^{13}\text{C}$  zastoupen v nižším podílu proti atmosféře, a to z důvodu působení enzymu ribulóza-1,5-bifosfát-karboxylázy/oxygenázy (RuBisCO). Používají ho fotosyntetizující rostliny k fixaci oxidu uhličitého z atmosféry a tento enzym přednostně fixuje oxid uhličitý s izotopem  $^{12}\text{C}$ . To platí zvláště v případě rostlin mírného pásma, které tvoří následně potravu pro živočichy, včetně člověka. Podíl izotopu  $^{13}\text{C}$  je proto v tkáních těchto rostlin a živočichů nižší o cca

0,3% proti atmosféře. Existují však rostliny s tzv. C4 metabolismem (např. kukuřice, cukrová třtina), které obsahují více izotopu  $^{13}\text{C}$  a deficit je pouze 0,1%. Výše popsáný jev je příkladem tzv. izotopového efektu, což je souhrnný název pro odlišnost ve fyzikálně-chemickém, ale i biologickém chování látek obsahujících různé izotopy daného prvku. Příčinou je pravděpodobně relativně velký rozdíl v molekulových hmotnostech  $^{12}\text{CO}_2$  a  $^{13}\text{CO}_2$ . Dalším izotopem je uhlík  $^{14}\text{C}$ , který je radioaktivní a přirozeně neustále vznikající v atmosféře kolizí rychlých neutronů kosmického záření s molekulami dusíku. V atmosféře se proto vyskytuje zhruba ve zlomku  $10^{-12}$  v poměru ke stabilním izotopům uhlíku. Je čistým beta-zářičem a jeho poločas rozpadu je 5730 let. Slouží mimo jiné k tzv. radiokarbonovému datování biologických materiálů do stáří 40000let. Tento radioizotop je široce využíván k označení molekul biologicky důležitých látek, které mohou být podány modelovým organismům. (3)

Nadechovaný vzduch se z 0,04% skládá z oxidu uhličitého, který je pod tlakem 0,3 torr. Alveolární vzduch v plicích obsahuje oxid uhličitý již z 5,2% a pod tlakem 40 torr. Vydechovaný vzduch pak obsahuje zhruba 2,5% až 3,5% oxidu uhličitého.

### 1.2.2 PDB Standard

Standardem PDB je primární referenční materiál pro měření přirozených změn obsahu izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$ , stanoveného v uhličitanu vápenatém ze schránek křídových belemnitů rodu *Belemnitella americana* z geologické formace Pee Dee v Jižní Karolině (USA). (9) Tento materiál měl výjimečně velký poměr  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$  (0,0112372) a byl prohlášen za referenční hodnotu. PDB je tedy mezinárodní standard udávající hodnotu 1,11237%, jenž představuje obsah izotopu  $^{13}\text{C}$  v těle křídového belemnita.

### 1.2.3 Bezpečnost stabilních izotopů

Vzhledem k tomu, že je u izotopů uhlíku  $^{13}\text{C}$  a  $^{12}\text{C}$  relativně malý rozdíl v atomových hmotnostech, mají tyto izotopy velmi podobné fyzikální i chemické vlastnosti. Vzhledem k relativně vysokému zastoupení izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$  (1,1%) v organismu obsahuje živočišný organismus, včetně lidského, přibližně 2g izotopu  $^{13}\text{C}$  na kilogram tělesné hmotnosti. V experimentech na zvířatech bylo dosaženo obohacení 60% uhlíku  $^{13}\text{C}$  bez jakýchkoliv toxických nebo teratogenních jevů. Jejich aplikaci pacientům lze proto považovat za zcela bezpečnou. (3)

### 1.3 Dechový test s $^{13}\text{C}$ -MTG

Tento test byl v modifikaci s  $^{14}\text{C}$  zaveden do praxe v roce 1981 jako test k posouzení intraduodenální lipázové aktivity jako exokrinní pankreatické funkce. Izotop uhlíku pocházející ze značených tuků (trávení lipázou, absorpce, beta-oxidace v játrech) je detekován ve vydechovaném vzduchu ve formě  $^{13}\text{CO}_2$ . Testovací látkou jsou smíšené triglyceroly, které obsahují v molekule dlouhé a středně dlouhé mastné kyseliny (dva řetězce kyseliny stearové a jeden  $^{13}\text{C}$ -oktanové kyseliny). MTG mají řadu výhod oproti ostatním triacylglycerolům používaným pro funkční testování (jako trioktanoát či triolein). MTG se v přirozené dietě nevyskytují, limitujícím krokem v jejich trávení je hydrolýza dvou stearylových skupin pankreatickou lipázou. V běžné dietě je jen malé množství oktanoátu, nedochází tedy k mísení s neznačeným substrátem.  $^{13}\text{CO}_2$  ve vydechovaném vzduchu dobře koreluje se sekrecí lipázy. Test je jednoduchý, reprodukovatelný, bezpečný a neinvazivní. Dobře koreluje s měřením obsahu tuku ve stolici i s duodenální koncentrací enzymů. (5) Specificita testu je závislá na struktuře substrátu, která ovlivňuje kinetiku hydrolýzy.

$^{13}\text{C}$ -MTG dechový test slouží jako nepřímý test exokrinní funkce pankreatu a pro dlouhodobé monitorování nemocných s chronickou pankreatitidou. Pro tyto účely je používán perorálně podávaný substrát smíšených triglyceridů značený stabilním izotopem uhlíku  $^{13}\text{C}$ . Princip je takový, že substrát  $^{13}\text{C}$ -MTG je štěpen pankreatickou lipázou. Uhlík  $^{13}\text{C}$  se následně kaskádou dějů váže na  $\text{CO}_2$  za vzniku  $^{13}\text{CO}_2$ . Mírou aktivity pankreatických enzymů je koncentrace  $^{13}\text{C}$  ve vydechovaném vzduchu, která se stanovuje jako poměr  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ve frakci  $\text{CO}_2$ .

Množství stabilního izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$  se vyjadřuje hodnotou delta  $^{13}\text{C}$ , která vyjadřuje vztah poměru  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  k mezinárodně uznávanému standardu PDB, který má pro  $^{13}\text{C}$  hodnotu 1,11237%. Analytickým ukazatelem  $^{13}\text{C}$ -dechových testů může být změna poměru delta  $^{13}\text{C}$  v definovaném čase, vztažená na výchozí hodnotu – DOB a vyjádřená v tisícinách jednotky – (promile; ‰). Nejčastější hodnotou  $^{13}\text{C}$ -dechových testů je hodnota kumulativního výdeje – cPDR vypočtená za definovaný čas testu a vztažená na molární množství podaného substrátu. Pro výpočet výdeje  $^{13}\text{C}$  používá většina aplikací jednoduchý vztah produkce  $\text{CO}_2$  vztažený na povrch těla a koeficient  $300 \text{ mmol CO}_2/\text{h}/\text{m}^2$  (cca 300l  $\text{CO}_2$  produkovaných dospělou osobou denně). (3)

### 1.3.1 Substrát

Substráty značené uhlíkem  $^{13}\text{C}$  mohou být vyrobeny synteticky, nebo se jedná o přirozeně se vyskytující látky izolované z rostlin nebo živočišného materiálu. Potravin y obsahující uhlík mají určité množství izotopu  $^{13}\text{C}$ . Přirozené množství uhlíku  $^{13}\text{C}$  tvoří celkem 1,08% všech atomů uhlíku. Avšak toto procento není shodné u všech rostlinných druhů, některé rostliny produkují sacharidy s vyšším obsahem  $^{13}\text{C}$ . Tyto přírodně obohacené sacharidy byly prokázány v kukuřičném škrobu, třtinovém cukru a ananasu (takzvaných C4 rostlinách, které využívají jiného způsobu karboxylace při syntéze sacharidů) a obsahují 1,09-1,10%  $^{13}\text{C}$ . Tím se liší od sacharidů většiny ostatních (takzvaných C3) rostlin, jejichž obsah uhlíku  $^{13}\text{C}$  je 1,08%. Alternativní cesta získání substrátu značeného uhlíkem  $^{13}\text{C}$  je pěstování C3 rostlin nebo chaluh v atmosférickém vzduchu uměle obohaceném uhlíkem  $^{13}\text{C}$ . Takto značené sacharidy mohou být využity k získání dalších značených substrátů – přimísením do potravy zvířat lze získat například  $^{13}\text{C}$ -laktózu z mléka krav krměných kukuřičným škrobem, nebo značené bílkoviny při podávání  $^{13}\text{C}$ -aminokyselin.

Vzhledem k tomu, že běžná západoevropská dieta obsahuje jen velmi málo kukuřičného škrobu, je přítomnost  $^{13}\text{CO}_2$  v bazálním vzorku dechu stejná, jako v běžném biologickém materiálu, a je konstantní. Ale ani u osob, které požívají potravu bohatou na kukuřičný škrob a třtinový cukr, není bazální obohacení dechu  $^{13}\text{CO}_2$  problémem, protože dieta a tím i bazální hodnota  $^{13}\text{CO}_2$  je stabilní. Pokud ale testovaná osoba požije den před provedením dechového testu s uhlíkem  $^{13}\text{C}$  větší množství obohacených sacharidů, bude bazální hodnota  $^{13}\text{CO}_2$  v den studie vyšší než obvykle a nekonstantní. Vzestup  $^{13}\text{CO}_2$  v průběhu testu pak bude nižší, než jaký očekáváme, a test může být falešně negativní. (5)

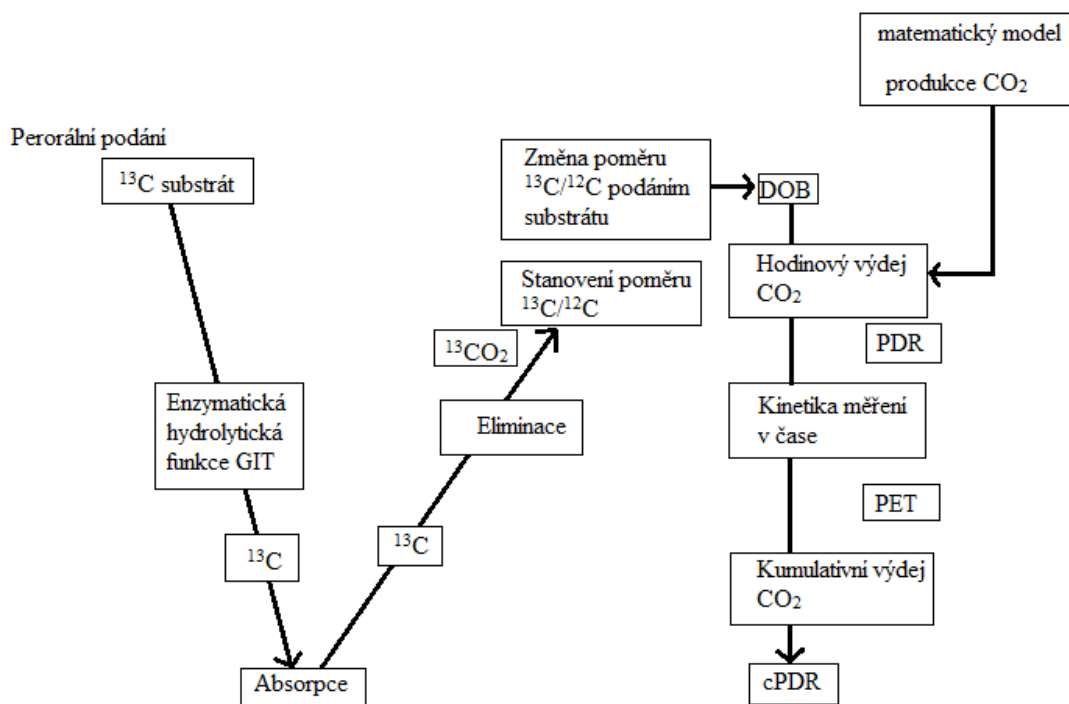
### 1.3.2 Metabolismus

Triglyceridy, též triacylglyceroly, jsou tvořeny jednou molekulou glycerolu v kombinaci s molekulami mastných kyselin na všech třech OH skupinách. Tvoří většinu tuků v potravě člověka. Esterové vazby se tvoří mezi každou z mastných kyselin a glycerolem. Na nich působí enzym pankreatická lipáza, hydrolyzuje tyto vazby a "uvolňuje" mastné kyseliny. Ve formě triacylglycerolů nemohou být lipidy vstřebávány z dvanáctníku. Mastné kyseliny, monoglyceridy (jedna molekula glycerolu, jedna molekula

masné kyseliny) a některé diglyceridy (vznikající štěpením triacylglycerolů) jsou vstřebatelné. (7)

Triacylglyceroly, jakožto hlavní složky lipoproteinů s velmi nízkou hustotou (VLDL) a chylomikronů, hrají důležitou roli v metabolismu jako zdroje energie a přenašeče výživového tuku. Obsahují více než dvojnásobek energie (cca 40 kJ/g) oproti sacharidům a bílkovinám. Chylomikrony mohou zachycovat různé tkáně a uvolňovat z nich triacylglyceroly k použití jako zdroj energie.

Pankreatická šťáva - produkt exokrinní funkce pankreatu obsahuje mimo jiné enzymy zejména lipázu, která hydrolyzuje triacylglyceroly přednostně v polohách 1 a 3 glycerolu na diacyl- a monoacylglyceroly, méně často i v poloze 2 na volný glycerol a příslušné masné kyseliny.(6)



**Obrázek č. 1** – Metabolismus  $^{13}\text{C}$  a princip vyšetření

$^{13}\text{C}$ -MTG substrát je triglycerid s  $^{13}\text{C}$ -označeným oktanoátem v poloze 2, a stearátem v poloze 1 a 3. Pankreatickou lipázou je triglycerid rozštěpen a vzniká meziprodukt  $^{13}\text{C}$ -oktanoát. Oktanová kyselina má středně dlouhý řetězec, je snadno a zcela absorbována, cestou venae portae transportována do jater, kde je rychle oxidována játry na  $^{13}\text{CO}_2$  a vodu. Vzniklý oxid uhličitý je rychle absorbován, následně se dostává do krve a

dále do plic. Izotop uhlíku  $^{13}\text{C}$  je markerem testované funkce a podaný substrát je obohacen o definované množství  $^{13}\text{C}$  a tato veličina je v molárním vyjádření porovnávána s množstvím izotopu  $^{13}\text{C}$  ve vydechovaném vzduchu. (12)

## 1.4 Analýza stabilních izotopů

### 1.4.1 Metody analýzy

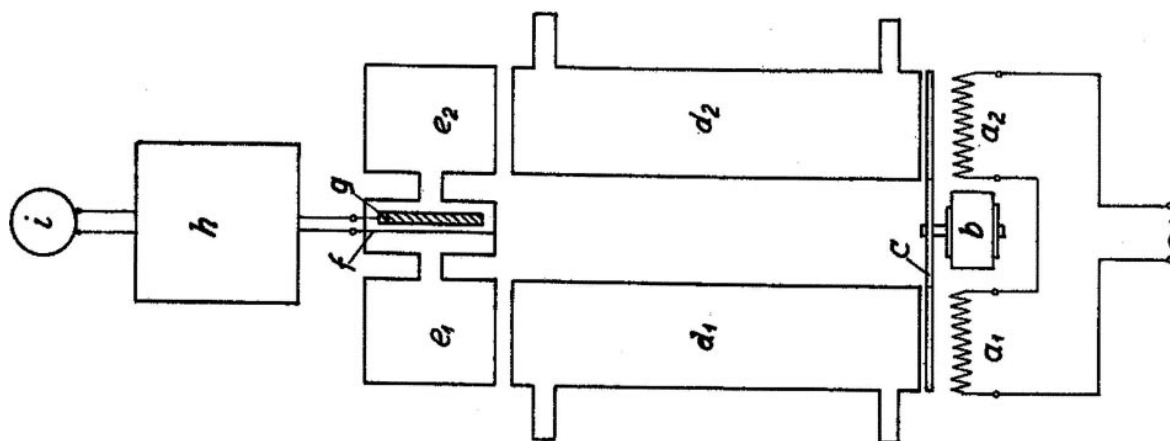
Detekce sloučenin obsahujících stabilní izotopy může být provedena řadou analytických technik, z nejdůležitějších považujeme hmotnostní spektrometrii, infračervenou spektrometrii a nukleární magnetickou rezonanci. Zde budu uvádět pouze první dvě metody. První metodou je IRMS, což je poměrová hmotnostní spektrometrie, která využívá trojici detektorů pro zachycení a počítání izotopů oxidu uhličitého. Tato metoda dokáže analyzovat, rozlišit a změřit přesné množství uhlíku  $^{13}\text{C}$ . Toto měření probíhá proti standardnímu (referenčnímu) plynu a díky tomu je metoda IRMS považována celkově za přesnější. Metoda NDIRS je druhým analytickým postupem a principem detekce je rozdílné absorpční maximum obou izotopů uhlíku v oblasti infračerveného spektra (4350nm). Technika infračervené spektrometrie je v oblasti analytiky stabilních izotopů využívána spíše ke stanovení poměru  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  ve vydechovaném vzduchu. Nelze tedy říci, že naměřené hodnoty jsou absolutní hodnoty odrážející jejich přesný stav v těle pacienta. Jsou to hodnoty, které se vztahují příslušnému nastavení a kalibraci přístroje. Analyzátoři pracující na principu NDIRS vyžadují větší objemu vzorku, než je to v případě metody IRMS, kde se používají vzorky do 5-10ml zkumavek. Relativně nízká senzitivita této metody se projevuje potřebou velkého množství vzorku, což je v biomedicínském výzkumu možné pouze v případě vydechovaného vzduchu.. Přístroje využívající princip NDIRS vyžadují až stovky mililitrů vzorku vydechovaného vzduchu. Analyzátoři tohoto typu jsou však jednodušší, menší, levnější, nevyžadují speciální obsluhy a jsou řazeny mezi POCT typ přístrojů mající své místo u lůžka pacienta nebo v ordinaci lékaře. (3)

### 1.4.2 Princip metody NDIRS

Principem metody NDIRS je detekce izotopů uhlíku v absorpčním maximu 4350nm infračerveného světla. Molekula  $\text{CO}_2$  díky svému složení a tvaru silně absorbuje

světlo z infračervené části spektra. Schéma jednotky analyzátoru typu NDIRS je znázorněné na obrázku. Jednou z hlavních částí tohoto analyzátoru je tedy zdroj infračerveného záření s vlnovou délkou pohybující se zhruba od 2-8 $\mu$ m. Takto pracuje v té určité části spektra, která odpovídá absorpčnímu maximu analyzovaného plynu. Dále analyzátor obsahuje komoru, do které je vstříknut analyzovaný plyn, ta je prosvěcována paprskem infračerveného záření, které dále prochází přes interferenční filtr, jenž propouští pouze část požadovaného spektra. Záření prošlé vzorkem dopadá na detektor, jenž je tepelného nebo fotonového typu a převádí záření na elektrický signál.

Analyzátor NDIRS obsahuje optoakustický detektor typu Leher & Luft, jehož schéma je znázorněno na obrázku č. 2. Karl Friedrich Luft (1909-1999) vynalezl infračervenou technologii, která využívala kondenzátorový mikrofon jako detektor, skládající se z oddělených komor obsahujících čistý CO<sub>2</sub>, oddělený membránou. Luft stanovil, že plyn jako takový by mohl být přijímačem záření, jenž má jistou selektivitu potřebnou k rozlišení plynů ve směsi. Luft spolupracoval s Lehrerem, který úspěšně vynalezl nahrávací infračervený spektrofotometr, jenž vedl k vývoji zařízení, které využívalo plynem plněné detektory.



**Obrázek č. 2** – Optoakustický detektor podle Lufta a Lehrera (8)

Optoakustický detektor (obr. č. 1) - Záření přicházející ze zdroje  $a_1$  a  $a_2$  je pravidelně přerušované kolem s clonou  $c$ , které je poháněno motorem  $b$ . Kolo s clonou  $c$  obsahuje štěrbinu, které jsou umístěny tak, aby záření procházející z obou zdrojů mohlo projít ve stejnou dobu (nebo bylo přerušeno ve stejnou dobu). Za kolem s clonou  $c$  záření prochází přes trubici  $d_1$  a  $d_2$ , kde  $d_1$  obsahuje plyn, který je předmětem zkoumání a



trubice  $d_2$  je naplněna referenčním plynem (0.5 ATM). Záření pak přichází do komor  $e_1$  a  $e_2$ , které obsahují absorpční vrstvu, která se skládá z plynu, který je předmětem analýzy. Obě komory jsou oddělené (téměř nepropustné) tenkou kovovou membránou  $f$ ; tato membrána je spojena s počítadlem  $g$  - kondenzátor. Jestliže směs plynu obsahuje daný plyn, který má být určen, komora  $e_1$  získá menší záření než  $e_2$ ; jako důsledek, odpovídající přerušením kola s clonou  $c$ , vzniká tlakový rozdíl mezi komorou  $e_1$  a  $e_2$ , což se projeví na membráně  $f$  a je transformováno jako změna kapacity na kondenzátoru  $g$ . Na kondenzátor navazuje zesilovač  $h$ , který získáme výsledky z měřícího zařízení  $i$  a tím  $i$  rozdíly kapacitance, tzn. koncentrace plynu, který má být stanoven. (8)

## 1.5 Preanalytická fáze

### 1.5.1 Odběr vzorku vydechovaného vzorku

Vzorkování je pro dechové testy klíčovým bodem v analytickém postupu stanovení. Při odběru se musí použít metoda co nejjednodušší, reprodukovatelná a s minimem chyb. Mezi tři nejdůležitější zdroje chyb během vzorkování patří vnější kontaminace z odběrového zařízení, použití nevhodné odběrové techniky a ztráty sloučenin v důsledku difúze stěnou a adsorpce na povrch odběrové nádoby.

Z hlediska výměny plynů a exkrece látek vydechováním je důležitý fakt, že dýchací cesty jsou slepé. Proto je kompletní výměna vzduchu během ventilace nemožná. Prostor pro výměnu plynů mezi vzduchem a krví je dosažen pouze difúzí plynů. Na základě tohoto procesu má alveolární vzduch konstantní složení, ale odebrání vzorku tohoto plynu je *in vivo* nemožné. Složení vydechovaného vzduchu se plynule mění v průběhu výdechu s maximální koncentrací látek vylučovaných dechem na konci každého výdechu.

Celkový povrch plochy alveol (tedy i plochy k výměně plynů a těkavých látek) u dospělého člověka při výdechu dosahuje asi  $35\text{m}^2$  a při maximálním nádechu  $100\text{m}^2$ . To je důvodem významného vlivu hloubky dýchání na koncentraci vydechovaných plynů. V klidu je fyziologická ventilace u člověka kolem  $7,5\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ . Tohoto objemu je dosaženo při přibližně 15 vdechnutích po 0,5l. Tzv. alveolární ventilace je 5,25l, mrtvý objem dýchacích cest je 1,25 l.

Důležitými faktory ovlivňujícími stanovení látek ve vydechovaných plynech jsou vlhkost a teplota vzduchu v dýchacích cestách. Vlhkost vdechovaného vzduchu se dosahuje velmi rychle během průchodu plynu nosní dutinou. Teplota inhalovaného vzduchu nedosahuje teploty těla dříve než hluboko v plicích. Protože je vzduch promícháván, ani teplota vydechovaného vzduchu nedosahuje tělesné teploty. (3)

V podmínkách ÚKBLD se vzorek vzduchu odebírá do hliníkových vaků o objemu 1,5l. Z vaků je vyvedena pryžová hadička bez náustku, opatřena plastovou krytkou a škrtidlem, aby se zabránilo vypuštění vzorku. Odběr vzorku se provádí tak, že se pacient zcela nadechne pouze nosem a na 10 sekund zadrží dech. Po uplynutí 10 sekund pacient bez přídechu ústy vydechne co největší objem vzduchu do odběrového vaku. Ten okamžitě zaškrtí přiloženým škrtidlem a ucpe plastovou zátkou. Tyto vaky běžně dodává firma distribuující analyzátory.

### 1.5.2 Uchování vzorku

Výběr materiálu odběrového zařízení pro dechové testy má prvořadý význam. Vyskytují se zde tři hlavní problémy. Koncentrace analytu se může snižovat permeabilitou materiálu. Materiál použitý na vzorkovací zařízení může interferovat s analyty v dechu – např. jako důsledek adsorpce a znovuvolňování látek do vzorku. Dále vzorky mohou být kontaminovány vzduchem odběrové místnosti. Také těsnění a spojovací části musí být vždy zcela vzduchotěsné.

Nejllepšími materiály pro odběr a uchování vydechovaného vzduchu se osvědčily nerezová ocel, sklo a voda. Hadičky a vaky vyrobené ze silikonové gumy a latexu jsou pro řadu analytů propustné, ale Tygon a Teflon jsou vhodnější materiály s delšími poločasmi propustnosti. Z praktických důvodů jsou jako odběrová zařízení často využívány odběrové vaky, u nichž je volba materiálu klíčová. Vaky jsou vyráběny z různých materiálů – Rilsan, Mylar, Teflon nebo obsahují aluminiovou folii na vnitřním povrchu. (3)

### 1.5.3 Standardizace a přesnost dechových testů

Vyšetřování trávicích a metabolických funkcí organismu pomocí dechových testů s uhlíkem  $^{13}\text{C}$  vyžaduje orální nebo intravenózní podání značeného substrátu. Vylučování  $^{13}\text{CO}_2$  (tedy konečného produktu absorpce, trávení, metabolismu a oxidace) vydechovaným vzduchem měříme v určitém časovém intervalu. Konečný výsledek

dechového testu ovlivňuje velký počet proměnných faktorů. Testy jsou prováděny v řadě center, metodika není vždy standardizována. Aby bylo možno porovnávat výsledky dechových testů z různých center, je nezbytná standardnost substrátu a jeho dávky, uspořádání testu a analýzy. Za optimálních podmínek by jedinou proměnnou zůstala měřená funkce subjektu. (7)

Rozhodující faktory při měření funkčních dechových testů:

- substrát (dávka, množství  $^{13}\text{C}$ )
- testovací pokrm (množství, složení)
- subjekt (metabolismus, proband, oxidační pochody, trávení, pasáž trávicím traktem)
- časový faktor
- stupeň poruchy sledované funkce
- variační rozpětí poměru  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

#### 1.5.4 Faktory ovlivňující výsledky dechových testů

Faktory, které mohou ovlivnit výsledky testů jsou: základní stav  $^{13}\text{CO}_2$ , rychlost vyprázdnění žaludku, produkce oxidu uhličitého a energetický výdej pacienta. (10)

##### **Substrát:**

Značený substrát je podáván jednorázově buď jako čistý, nebo ve směsi značeného a neznačeného substrátu. Určitý podíl fyziologické potravy ve směsi se substrátem je při studiích gastrointestinálního traktu výhodný, pokud chceme optimálně modelovat fyziologický děj. Je pochopitelné, že poměr množství substrátu a příslušného enzymu ovlivňuje výsledek testu. Dávka podaného značeného substrátu musí být standardizována. Při vyšetřování dospělých osob může být použito stejného množství substrátu pro všechny osoby (nebyl prokázán vztah mezi tělesnou hmotností a funkcí trávicího traktu). V dětské populaci je zvykem přizpůsobovat dávku tělesné hmotnosti. V případě podávání značeného substrátu při vyšetření dechových testů však nebyla nutnost redukce dávky u dětí potvrzena, větší roli má zralost jednotlivých enzymatických systémů u dětí různého věku. Vyšetření dechovým testem se u dětí a dospělých metodicky neliší, pokud je dítě schopné provést výdech do zkumavky. U novorozenců a kojenců se dechový test provádí s pomocí nosní masky, vzduch se odsává pomalu a plynule z nosní masky do injekční stříkačky a z ní pak naplníme vakuované zkumavky přes zátku injekční jehlou (bez otevření zkumavky). (5)

##### **Testační pokrm:**

Značený substrát může být podáván jako vodný roztok (sacharidy), nebo v kombinaci s testačním pokrmem, který často obsahuje tuk. Obsah kalorií a zastoupení

živin ovlivňuje rychlost evakuace žaludku a intestinální transit substrátu, stejně tak jako fyziologické odpovědi na testační pokrm – evakuaci žlučníku, uvolnění pankreatických enzymů a sekreci regulačních hormonů. Z toho jasně vyplývá nutnost standardizace testačních pokrmů pro jednotlivé testy. (5)

#### **Testovaný subjekt:**

Trávicí a metabolické pochody testovaných osob vykazují inter-individuální, ale i intra-individuální variabilitu – týká se nejen funkce testovaného enzymu, ale i všech procesů vedoucích k produkci  $^{13}\text{CO}_2$ , předcházejících sledovanému enzymatickému procesu či jej následujících. Je nutné odstranit co nejvíce rušivých faktorů: standardizovat energetický výdej tím, že vyšetřovaná osoba je v klidu, doba lačnění před začátkem testu je přesně stanovena.

Výsledek testu může rovněž ovlivnit rychlost evakuace žaludku (například u nemocných po resekcii žaludku dochází k rychlé evakuaci pahýlu žaludku a čas na hydrolýzu urey je velmi krátký). U nemocných po resekcii může však test být i falešně pozitivní z důvodu bakteriálního přerůstání a štěpení urey jinými bakteriemi. (5)

#### **Časový interval:**

Výsledek testu je vyjádřen jako množství vyloučeného  $^{13}\text{CO}_2$  v určitém časovém intervalu. Zvolený časový interval může významně ovlivnit výsledky testů. Při vyšetřování trávicích funkcí jsou data získaná z časné fáze vyšetření méně ovlivněna metabolickými faktory, než data z pozdních časových intervalů. Optimální časový interval je závislý na typu a množství použitého substrátu a testačního pokrmu. Pro jednotlivé testy je nezbytná standardizace časového intervalu (i jednotlivých časů měření) pro možnost porovnávání výsledků. (5)

#### **Stupeň poruchy sledované funkce:**

Výsledek ideálního testu by měl odrážet stupeň poruchy sledovaného enzymatického pochodu. Ve většině případů je však enzym fyziologicky přítomen ve velkém nadbytku. Určitá porucha funkce takového enzymu proto může zůstat nerozpoznána. (5)

#### **Variační rozpětí:**

Přestože je provedení testu jednoduché a výdech vzorku vzduchu do zkumavky snadný, měřený poměr izotopů  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  se mění vzorek od vzorku. Rozlišujeme dva typy odchylkek. První je analytické variační rozpětí, které činí 0,1-0,2 % při použití hmotnostní

izotopové spektrometrie (při opakovaném měření stejného vzorku dechu). Druhá je časová variace, kterou pozorujeme při měření velkého počtu vzorků opakovaně v čase. Standardní odchylka v závislosti na čase je kolem 5 %. Tyto odchylky jsou při běžném vyšetření zanedbatelné. Význam by mohli mít pouze při nízkém obsahu  $^{13}\text{C}$  ve vydechovaném vzduchu po podání příliš malého množství substrátu (a například po požití přirozeně obohacených potravin před zahájením testu). Z tohoto důvodu je standardizováno měření bazálních vzorků dechu (před požitím substrátu), jsou standardizovány intervaly mezi jednotlivými měřeními a vzorky jsou odebírány duplicitně. (5)

#### **Metodické chyby v provedení testu:**

Nejčastějšími chybami, které ovlivňují výsledek testu, jsou chyby jeho provedení. Vysvětlení testu pacientovi je nutno věnovat dostatek času. Pokud není jistota, že pacient bude schopen v domácích podmínkách test spolehlivě provést, raději volíme jeho provedení v ordinaci se zkušenou zaškolenou sestrou.

Mezi nejčastější chyby patří: testovaná osoba nelační před zahájením testu (omezení kontaktu substrátu s žaludeční sliznicí), nepožije substrát, neodebere vzorky dechu ve stanovenou dobu. Brčko, kterým testovaná osoba provádí výdech do zkumavky, se nesmí použít k míchání roztoku urey. Roztok urey musí proband spolknout co možná nejrychleji – v ústech a orofaryngu mohou být přítomny další bakterie s ureázovou aktivitou, jejichž působení by mohlo ovlivnit výsledek testu. Pokud se zapomene odebrat bazální vzorek dechu, je hrubou chybou odebrat ho po spolknutí urey, protože k její hydrolyze může dojít velmi rychle. Alternativou v takovém případě je použít průměrný bazální  $\delta^{13}\text{C}_2$  výdej při dostatečném počtu předchozích vyšetření v dané laboratoři, případně odebrat bazální vzorek dechu s časovým odstupem několika dní.

Test může být rovněž ovlivněn podávanou medikací (sole bismutu, antibiotika,  $\text{H}_2$  blokátory, inhibitory protonové pumpy, sucralfat). Léky před provedením testu vysazujeme, případně test odložíme. Gastroskopické vyšetření ovlivňuje přirozené prostředí žaludku (oplach sliznice, drobné krvácení po biopsii, insuflace vzduchu). Test proto provádíme nejdříve za 4 hodiny po gastroskopii. (5)

#### **1.5.5 Systém zajištění kvality**

Zabezpečování kvality je část managementu jakosti zaměřená na poskytování důvěry, že požadavky na jakost budou splněny. Jsou to všechny plánované a systematické

činnosti, zavedené jako součást systému kvality a potřebné k prokazování přiměřené důvěry, že výrobek nebo služba splňují požadavky na kvalitu. Zabezpečení kvality popisují obecná opatření zavedená v laboratoři, která laboratoř používá k zajištění kvality svých činností. Zavedení systému zajištění kvality do systému činnosti laboratoře má řadu příznivých důsledků: např. celá činnost laboratoře se stane transparentní, čímž se chyby nejen lépe napravují, ale lze jim i předcházet. Systém zajištění kvality v laboratoři zvyšuje důvěryhodnost laboratoře v očích zákazníků. (7)

Důležité prvky zabezpečení kvality jsou:

- vyhovující laboratorní prostředí,
- udržované a kalibrované zařízení,
- programy řízení jakosti (interní a externí)
- vzdělaný, školený a zkušený personál,
- vypracované a dokumentované metody,
- postupy kontroly a vydávání zpráv
- návaznost výsledků
- interní audity a přezkoumávání systému,
- požadavky na činidla, kalibrační a kontrolní standardy, referenční materiály,
- plány vzdělávání a záznamy o něm.

#### 1.5.6 Kalibrace a standardizace analyzátoru

Kalibrace analyzátoru HeliFan je prováděna zhruba každých 14 dní a přístroj pomocí ovládacího softwaru automaticky vyzve obsluhu, aby tuto kalibraci provedla. Děje se tak pomocí tzv. blanku, což je vzorek vzduchu (bez aplikace substance  $^{13}\text{C}$ -MTG), který přístroj považuje za určitý standard a vytvoří si podle něj kalibrační křivku.

V kapitole „Výsledky“ je možné porovnat výsledky měření čtyř vzorků před kalibrací a po kalibraci.

Byla též provedena studie, jež porovnává metodu IRMS a nejnovější provedení metody NDIRS. Individuální testy, kde výsledky jsou vyjádřeny jako DOB, byly provedeny jak metodou IRMS tak metodou NDIRS. Důležitým faktem tohoto testu bylo, že obě metody přesně rozlišily mezi pozitivním a negativním nálezem *Helicobacter pylori*. Žádná z metod nepodala falešně negativní ani falešně pozitivní výsledky. Výsledek DOB

jednoho téhož subjektu byl 5,1‰ u metody IRMS a 6,7‰ u metody NDIRS. (11) To jen zvyšuje důvěryhodnost a správnost výsledků podávaných metodou NDIRS, která je často srovnávána s přesnější metodou IRMS.



## 2. Experimentální část

### 2.1 Příprava pacienta

Vyšetření všech osob začínalo vždy v 8 hodin ráno. Podle instrukcí laboratoře jsem dodržoval noční lačnění, poslední jídlo jsem měl vždy zhruba v 8 hodin večer před vyšetřením. Jelikož netrpím žádnou pankreatickou chorobou, nebylo nutné vysazovat žádnou substituční léčbu. Před a během vyšetřením jsem nekouřil, nejedl a pil jen nesyčenou vodu.

### 2.2 Příprava a aplikace substance $^{13}\text{C}$ -MTG

Substance je podána ve formě snídaně, která se skládá z 250mg substance  $^{13}\text{C}$ -MTG, čtyř křehkých kukuřičných chlebů (bez cholesterolu a glutenu) a 2x10g margarínu Rama (rostlinný tuk bez mléčných proteinů). Nejprve jsem před aplikací látky, nadýchal první dechový vzorek, což je bazální nulová hodnota. Namazal jsem posléze čtyři kukuřičné chleby margarínem a následně, dle instrukcí laboratoře, vetřel rovnoměrně na všechny kukuřičné chleby poměrnou dávkou substance. Je velmi důležité rozetřít na chleby veškeré množství substance, protože nedodržení tohoto by mělo za následek zkreslení výsledků vyšetření. Je třeba dbát opatrnosti, protože podávaná látka ve zkumavkách tvoří hrudky a vzhledem k tukové povaze této látky jsem zkumavku ještě dvakrát důkladně vypláchl nesyčenou vlažnou vodou. Takto připravené chleby se substancí jsem snědl a nakonec vypil obsah zkumavky se zbylou substancí.

### 2.3 Vzorkování

Hliníkové vaky jsem připravil v počtu 9 kusů. Dva první vaky, označené A0 a B0, jsem nadýchal ještě před aplikací substance a slouží jako tzv. blanky. Poté, co jsem snědl všechny kukuřičné chleby a vypil zbytek substance ze zkumavky, jsem za jednu hodinu nadýchal první vzorek vzduchu.

Vzorek vzduchu jsem odebíral tak, že jsem si připravil hliníkový vak s pryžovou hadičkou, plastovým škrtidlem a zátkou. Uvolnil jsem škrtidlo a sejmul zátku. Před vydechnutím do vaku jsem se zcela nadechl nosem a zadržel dech na 10 sekund. Tím

dojde ke zvýšení koncentrace oxidu uhličitého ve vydechovaném vzduchu, jenž tímto odpovídá koncentraci oxidu uhličitého v alveolárním vzduchu. Po 10 sekundách jsem vydechl do vaku. Během zadržetí dechu a před výdechem do testovacího vaku se nesmí přidechovat pusou ani nosem. Neprodleně po vydechnutí vzduchu do testovacího vaku jsem zaškrtil pryžovou hadičku plastovým škrtidlem a ucpal zátkou.

## 2.4 Analýza

V laboratoři ÚKBLD byl pro naši studii použit přístroj FANci3 HeliFANplus (Fischer Analysen Instrumente GmbH). Tento přístroj využívá pro měření plynů metodu NDIRS. Tato metoda se nehodí na přesné měření koncentrace  $^{13}\text{CO}_2$ , resp.  $^{12}\text{CO}_2$ , ani pro to není určena. Tato metoda pouze porovnává změřené hodnoty těchto plynů, vše je ale vztaženo k faktu, že analyzátor nemá vlastní referenční plyn a řády, ve kterých se výsledky pohybují jsou vždy v závislosti na předchozí kalibraci.

Celý analyzátor je obsluhován pomocí PC a dodávaného softwaru. Vaky se vzorky vzduchu jsem připojil k ventilům na přístroji a uvolnil škrtidlo. Na obrazovce software indikuje všechny připojené vaky. V ovládacím softwaru jsem nastavil, aby byl každý vzorek měřen čtyřikrát, takže výsledná hodnota kumulativního výdeje  $^{13}\text{C}$  a delta  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  je aritmetickým průměrem těchto naměřených hodnot. Měření čtyř vzorků trvá cca 40 min. Po doměření jsem zaškrtil pryžové hadičky a sejmul vaky z ventilů. Pro opakované měření vzorku (takto to bylo provedeno v testu stability  $\text{CO}_2$ ) jsem ucpal hadičku ještě plastovou zátkou.

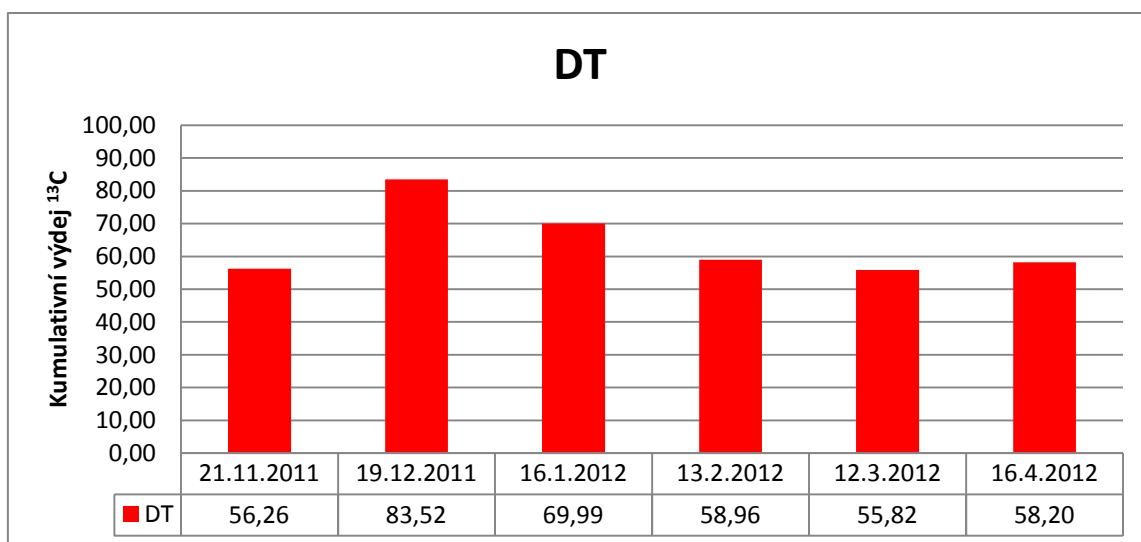
Vzorek pro týdenní test stability jsem řádně uložil do předem stanovených podmínek a další manipulace se vzorky byla stejná, jako jsem uvedl v předchozím textu.

## 3. Výsledky a diskuze

### 3.1 Půlroční profil čtyř jedinců

Tato studie se zaměřuje na interindividuální variabilitu testů  $^{13}\text{C}$ -MTG a účastnili se jí čtyři jedinci. Výsledky zobrazují půlroční profily a test byl prováděn každý jeden den v měsíci. Po aplikaci substance  $^{13}\text{C}$ -MTG byly odebrány každému jedinci vzorky dechu po dobu šesti hodin, v hodinových intervalech. Výsledné hodnoty jsou procentuálním vyjádřením kumulativního výdeje (zpětné výtěžnosti) uhlíku  $^{13}\text{C}$ .

Osoba:	DT
Pohlaví:	M
Věk:	24 let
Hmotnost:	91 kg
Výška:	185 cm
BMR:	8,5983

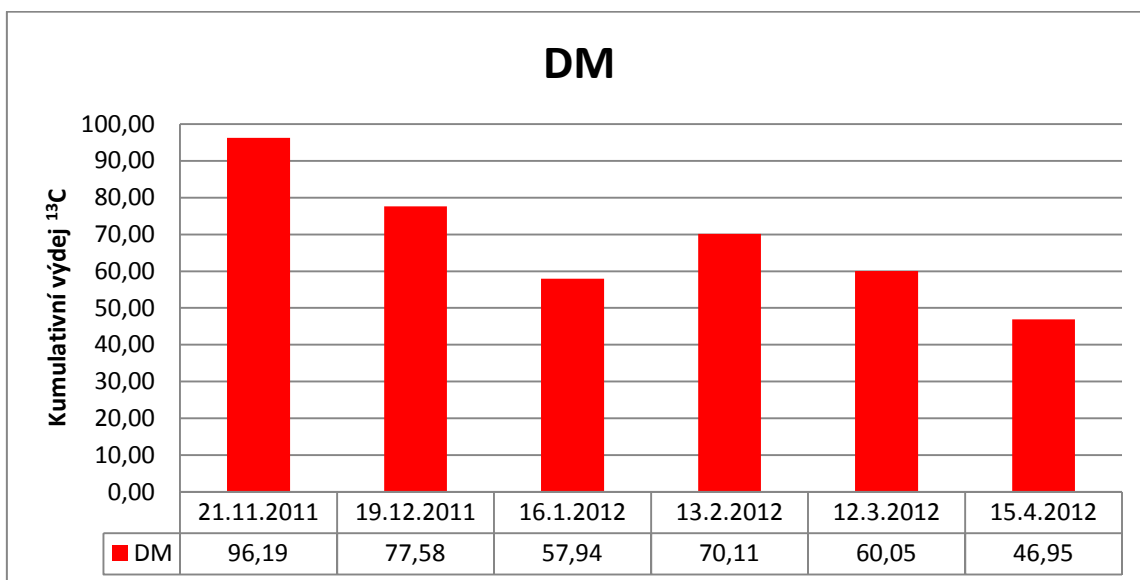


**Graf č. 1** – DT – Kumulativní výdej  $^{13}\text{C}$  v půlročním profilu (uváděno v procentech)

<i>Statistické výsledky - DT</i>		Procentuální odchylka od průměru	
Střední hodnota	63,79	21.11.2011	-11,81%
Směrodatná odchylka	10,98	19.12.2011	30,92%
Minimum	55,82	16.1.2012	9,72%
Maximum	83,52	13.2.2012	-7,57%
Rozpětí	27,7	12.3.2012	-12,50%
Variační koeficient	17,21	16.4.2012	-8,77%

**Tabulka č. 1** – Statistické výsledky osoby DT

Osoba:	DM
Pohlaví:	M
Věk:	23 let
Hmotnost:	75 kg
Výška:	185 cm
BMR:	7,5903

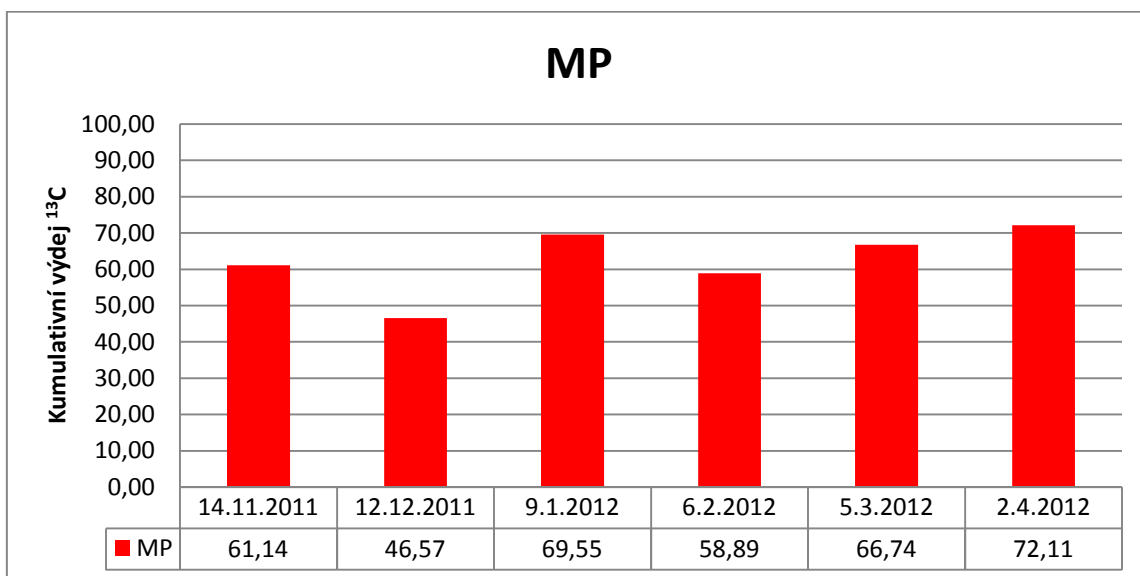


**Graf č. 2** – DM – Kumulativní výdej <sup>13</sup>C v půlročním profilu (uváděno v procentech)

<i>Statistické výsledky - DM</i>		Procentuální odchylka od průměru	
Střední hodnota	68,14	21.11.2011	41,18%
Směrodatná odchylka	17,31	19.12.2011	13,86%
Minimum	46,95	16.1.2012	-14,97%
Maximum	96,19	13.2.2012	2,90%
Rozpětí	49,24	12.3.2012	-11,87%
Variační koeficient	25,41	15.4.2012	-31,09%

**Tabulka č. 2** – Statistické výsledky osoby DM

Osoba:	MP
Pohlaví:	M
Věk:	23 let
Hmotnost:	74 kg
Výška:	183 cm
BMR:	7,5281

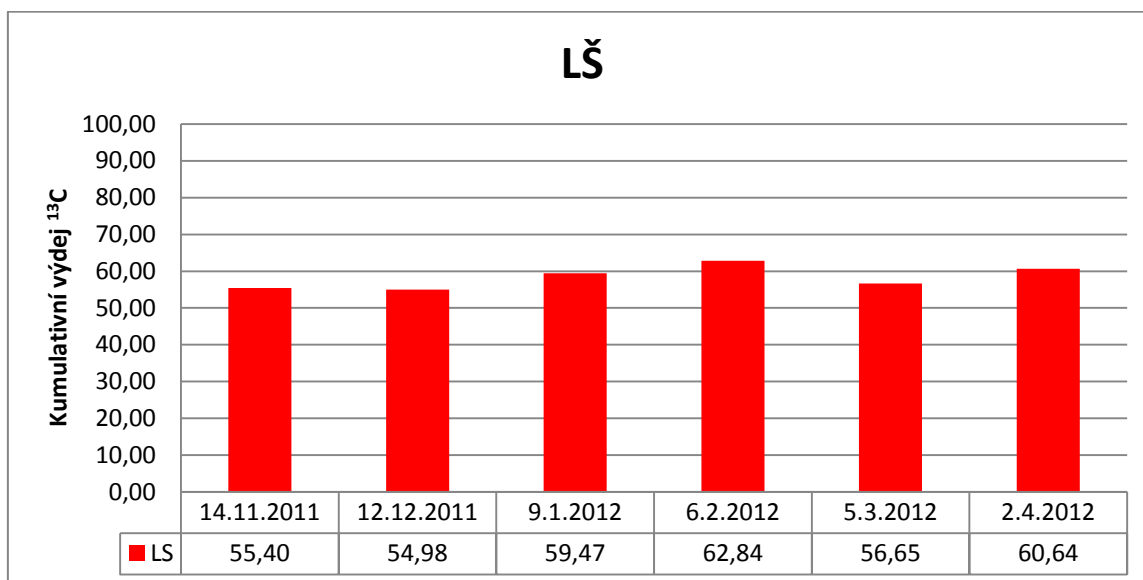


**Graf č. 3** – MP – Kumulativní výdej <sup>13</sup>C v půlročním profilu (uváděno v procentech)

<i>Statistické výsledky - MP</i>		Procentuální odchylka od průměru	
Střední hodnota	62,50	14.11.2011	-2,18%
Směrodatná odchylka	9,26	12.12.2011	-25,49%
Minimum	46,57	9.1.2012	11,28%
Maximum	72,11	6.2.2012	-5,77%
Rozpětí	25,54	5.3.2012	6,79%
Variační koeficient	14,82	2.4.2012	15,38%

**Tabulka č. 3** – Statistické výsledky osoby MP

Osoba:	LŠ
Pohlaví:	Ž
Věk:	22 let
Hmotnost:	49 kg
Výška:	158 cm
BMR:	5,0747



**Graf č. 4** – LŠ – Kumulativní výdej <sup>13</sup>C v půlročním profilu (uváděno v procentech)

<i>Statistické výsledky - LŠ</i>		Procentuální odchylka od průměru	
Střední hodnota	58,33	14.11.2011	-5,03%
Směrodatná odchylka	3,15	12.12.2011	-5,74%
Minimum	54,98	9.1.2012	1,95%
Maximum	62,84	6.2.2012	7,73%
Rozpětí	7,86	5.3.2012	-2,88%
Variační koeficient	5,4	2.4.2012	3,96%

**Tabulka č. 4** – Statistické výsledky osoby LŠ

Zajímavou charakteristikou je v mém případě variační koeficient, který představuje relativní velikost rozptýlenosti dat vzhledem k průměru, vyjádřený v procentech. Nejnižší hodnota variačního koeficientu se nachází u osoby LŠ a to je 5,4%. Na jejím grafu vidíme, že její procentuální odchylka od průměru nabývá relativně nízkých hodnot. Výsledky těchto měření můžeme považovat tedy za velmi podobné. Naopak nejvyšší hodnotu variačního koeficientu jsem našel u osoby DM. Variační koeficient této osoby je 25,41% a na grafu tedy vidíme hodnoty více rozptýlené okolo průměru.

Všechny čtyři osoby se pohybovaly v hodnotách, které značí normální funkci pankreatu. Předmětem diskuze tedy mohou být faktory, které ovlivňovaly preanalytickou fázi vyšetření a tudíž zapříčinily takové rozpětí hodnot měření. Jeden z možných faktorů je podle mého názoru lačnění před vyšetřením. Doba lačnění před začátkem této studie nebyla dodržena. Lze tedy říci, že jednak u každé osoby a jednak před každým měřením byla doba lačnění jiná. Obsah potravy v žaludku tím pádem zapříčiní omezení kontaktu substrátu s žaludeční sliznicí. Je též možné, že nebyla dodržena podmínka fyzického klidu, což by mělo za následek zvýšení metabolického obrátu u testovaných jedinců. Dalším faktorem, který ale není možné ovlivnit, je fyziologická odpověď gastrointestinálního traktu na podaný substrát. Testační pokrm byl u všech čtyř jedinců i u všech měření použit stejný, tento faktor je tedy možné zanedbat.

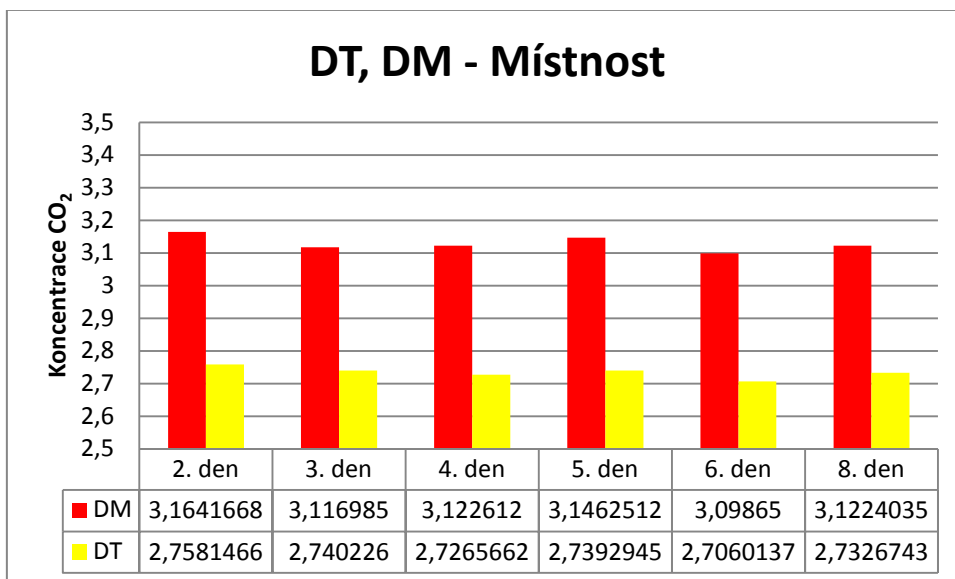
Vzhledem k použité metodě analýzy, se podle mého názoru, veškeré tyto výsledky nehodí k porovnávání s ostatními laboratořemi, či referenčními hodnotami. Je třeba si uvědomit, že výsledky všech měření jsou v určité závislosti na nastavení přístrojů, kalibraci a typu použitého spotřebního materiálu.



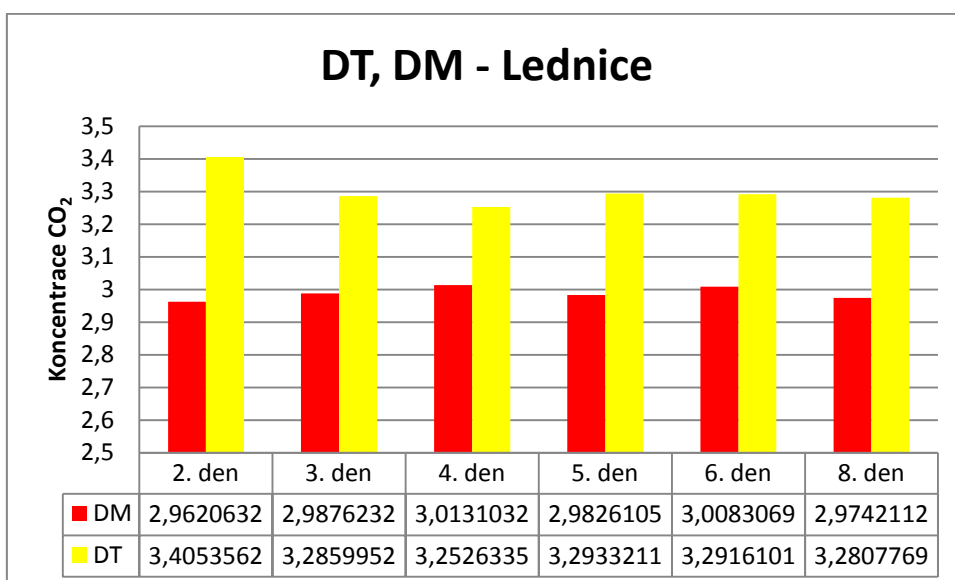
## 3.2 Test stability CO<sub>2</sub>

### 3.2.1 Měření koncentrace CO<sub>2</sub>

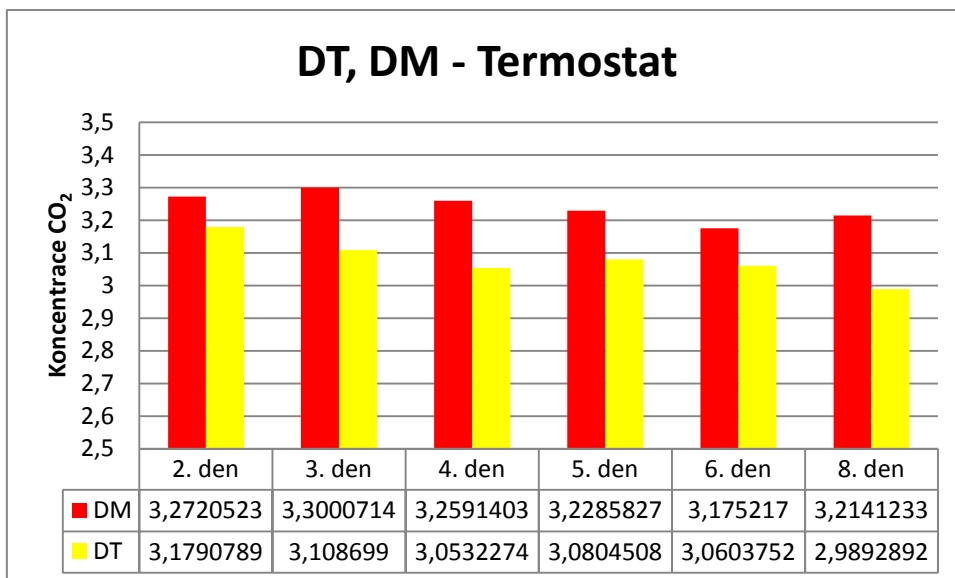
Předmětem tohoto testu je zjišťování stability oxidu uhličitého během sedmi dnů. Následující grafy zobrazují koncentraci oxidu uhličitého v nadýchaných vzorcích. Podle toho tedy můžeme uvažovat, jaká je závislost těchto hodnot na podmínkách, ve kterých jsou vzorky uchovávány.



**Graf č. 5** – Hodnoty CO<sub>2</sub> během 7 dnů. Naměřeno z vaku uchovávaného v místnosti (25°C)



**Graf č. 6** - Hodnoty CO<sub>2</sub> během 7 dnů. Naměřeno z vaku uchovávaného v lednici (10°C)

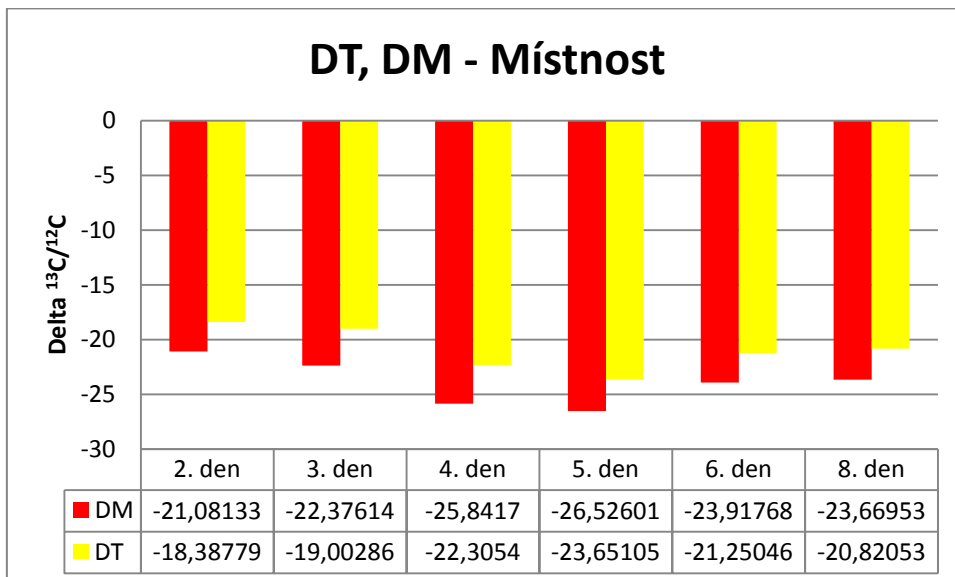


**Graf č. 7** - Hodnoty CO<sub>2</sub> během 7 dnů. Naměřeno z vaku uchovávaného v termostatu (37°C)

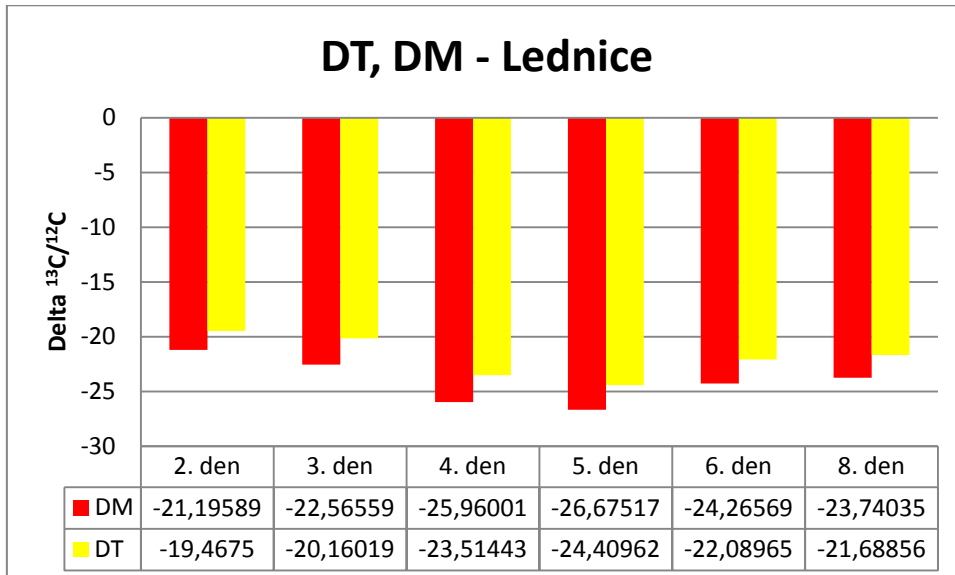
Z těchto grafů a hodnot je zřejmé, že koncentrace oxidu uhličitého se za dobu 7 dnů prakticky nezměnila. Z toho lze vyvodit, že vliv teploty na koncentraci oxidu uhličitého není nutný uvažovat.

### 3.2.2 Delta $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

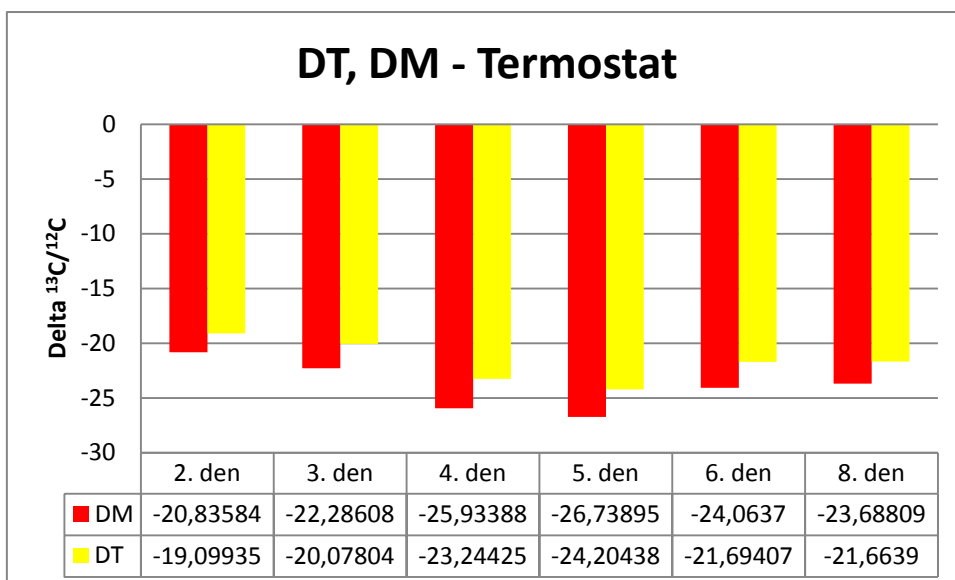
Poslední porovnanou hodnotou je delta  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . Rovněž jsou to sedmidenní výsledky měření vaků z místnosti, lednice a termostatu.



**Graf č. 8** – Hodnoty delta  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  během 7 dnů. Naměřeno z vaku uchovávaného v místnosti (25°C)



**Graf č. 9** – Hodnoty delta  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  během 7 dnů. Naměřeno z vaku uchovávaného v lednici (10°C)



**Graf č. 10** – Hodnoty delta  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  během 7 dnů. Naměřeno z vaku uchovávaného v termostatu (10°C)

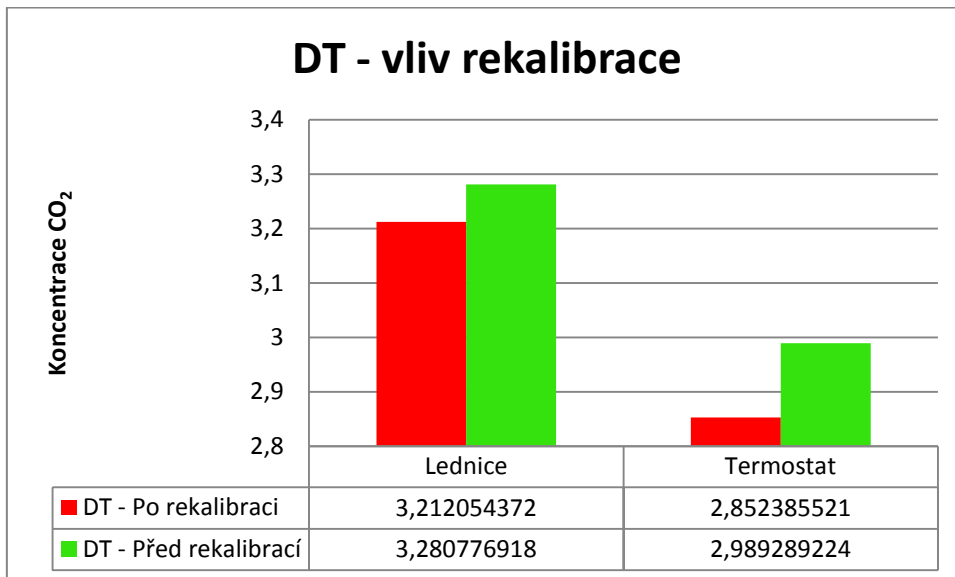
Na předchozích třech grafech můžeme pozorovat hodnoty delta  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . Výsledky se však u obou osob v průběhu 7 dnů změnilo téměř o 6 ‰, což by mohlo též ukazovat na pozitivní nález *Helicobacter pylori*. Jelikož ale dochází ke změně této hodnoty o cca 6 ‰ pouze v jednom měření ze šesti a tato změna není skoková, osobně bych infekci *Helicobacter pylori* vyloučil. Standardní odchylka v závislosti na čase doby skladování vzorku je kolem

5 ‰. Tyto odchylky jsou při běžném vyšetření zanedbatelné. (3)

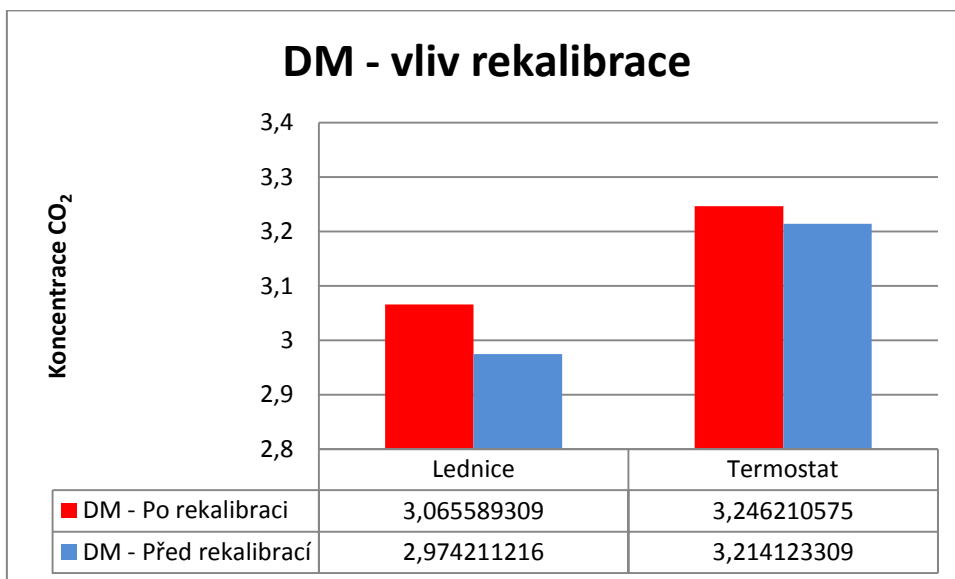
Jak vidíme na grafech koncentrace  $\text{CO}_2$ , tyto hodnoty se příliš nezměnily. Otázkou tedy zůstává jen, proč se měnila hodnota delty  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .

### 3.3 Vliv recalibrace na výsledky testů

Na následujících grafem můžeme vidět, jak se změnilo hodnoty měření koncentrace CO<sub>2</sub> stejných vaků před a po recalibraci analyzátoru.



**Graf č. 11** – Naměřené hodnoty u osoby DT před recalibrací analyzátoru a po ní



**Graf č. 12** – Naměřené hodnoty u osoby DM před recalibrací analyzátoru a po ní

## 4. Závěr

Z výsledků čtyř jedinců během půl roku je vidět, že hodnoty se často odkláněly od průměru až v desítkách procent, ačkoliv se pohybovaly stále ve fyziologickém rozmezí. Vede mě to tedy k otázkám, jaké faktory ovlivňovaly preanalytickou fázi vyšetření. Podle mého názoru, stále jiné výsledky testů zapříčinily jiné stravovací návyky všech čtyř osob a také nejednotná doba lačnění před každým vyšetřením.

Z tohoto testu tedy vyplývá, že pro dechové testy by bylo dobré zavést jednotný řád, který bude pacient dodržovat před vyšetřením a standardizovat testy natolik, abychom zabránili co nejvíce faktorům, které ovlivňují výsledky vyšetření.

Výsledky testů stability oxidu uhličitého prokázaly, že vaky si i po sedmi dnech stále drží stejnou koncentraci oxidu uhličitého. Co však stále zůstává otázkou, proč se měnila hodnota delty  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . Rozdíl mezi těmito izotopy představuje de facto jen rozdílný počet neutronů. Poukazuje to spíše na chybu měření analyzátoru. Výsledky toho testu tudíž nebyly natolik uspokojivé, jak jsem očekával.

Poslední výsledky porovnávají, zdali nastalo k nějaké změně naměřených hodnot před kalibrací analyzátoru a po ní. Z grafů a tabulky je vidět, že hodnoty zůstaly ve stejných řádech a jsou si velmi podobné. Lze tedy soudit, že analyzátor měří správně.

## 5. Literatura

1. **Modak, Anil S.** *Stable isotope breath tests in clinical medicine: a review.* Andover, Massachusetts, USA, 11. July 2007.
2. **Kocna, Vaníčková Z., Krechler T., Lukáš M., Doseděl J., Kohout P.** Česká společnost hepato-pankreato-biliární chirurgie. [Online] [Citace: 10. Duben 2012.] <http://www.hpb.cz/index.php?pld=06-3-10>.
3. **Zadák, Zdeněk a Květina, Jaroslav.** *Metodologie předklinického a klinického výzkumu v metabolismu, výživě, imunologii a farmakologii.* Praha : Galén, 2011.
4. Dechové testy s uhlíkem-13. *Wikiskripta.* [Online] [Citace: 10. Duben 2012.] [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Dechové\\_testy\\_s\\_uhlíkem-13](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Dechové_testy_s_uhlíkem-13).
5. **Kopáčová, Marcela.** *Využití funkčních dechových testů v gastroenterologii.* Praha : RNDr. František Skopec, CSc. - Nucleus HK, 2006.
6. Triacylglycerol. *Wikipedie.* [Online] Creative Commons, 5. Květen 2012. [Citace: 10. Duben 2012.] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Triacylglycerol>.
7. **Štern, Petr.** *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia.* Praha : Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, 2005.
8. **Jaffe, Michael B.** *Infrared Measurement of Carbon Dioxide in the Human Breath: "Breathe-Through" Devices from Tyndall to the Present Day.* Wallingford, Connecticut, USA, 17. April 2008.
9. **Kocna, Petr.** *Seminář PGS 1.LF UK - DECHOVÉ TESTY PRINCIPY, TECHNOLOGIE A APLIKACE.* Praha, Česká republika , Březen 2012.
10. **Weaver, L, Amarri, S a Swart, G.** *13C mixed triglyceride breath test.* Glasgow, 1998.
11. **Hildebrand, P a Beglinger, C.** *Nondispersive Infrared Spectrometry: A New Method for the Detection of Helicobacter pylori Infection with the 13C-Urea Breath Test.* Basel, Switzerland, 1996.
12. **Kocna, Petr.** *Dechové testy - moderní, neinvazivní diagnostika.* Praha, 2006. Interní medicína.

## 6. Seznam použitých zkratk

**ÚKBLD** – Ústav klinické biochemie a lékařské diagnostiky

**PDB** – Pee Dee Belemnite

**MTG-BT** – Mixed triglyceride breath test

**SCCK/PZS** - pankreatusekretin-pankreozymínový test

**DOB** – Delta Over Baseline

**cPDR** - cumulative Percentage Doses of Recovery

**VLDL** – Very Low Density Lipoproteins

**IRMS** – Infra Red Mass Spectroscopy

**NDIRS** – Non-Dispersive Infra Red Spectroscopy

**POCT** – Point Of Care Testing

**ATM** - Atmosféra

**BMR** – Bazální metabolická rychlost