



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie
Slovak Society of Clinical Biochemistry
Recenzovaný časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1/2024
Ročník XXIX.



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry
Recenzovaný časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1/2024

Ročník XXIX.

PRESEDA REDAKČNEJ RADY

Hedviga Pivovarníková

ODBORNÝ REDAKTOR

Oliver Rác

REDAKČNÁ RADA

Ján Balla
Pavel Blažíček
Beáta Bolerázska
Dušan Dobrota
Eva Ďurovcová
Michal Farkaš
Vladimír Heriban
Beáta Hubková
Mária Kačániová
Katarína Lepejová
Daniel Magula
Angela Molčányiová
Jana Netriová
Katarína Šebeková
Ladislav Turecký

Laboratórna Diagnostika
Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pri SLS
Cukrová 2373/3, 811 08 Bratislava
ISSN 2729-9201 (online)
Vychádza: 2-krát ročne

OBSAH

ÚVODNÍK

PRÍHOVOR PREZIDENTKY SSKB	5
---------------------------------	---

IN MEMORIAM

František Štefanec: Ing. Rastislav Valko (1939-2023)	7
--	---

JUBILANTI

Hedviga Pivovarníková: MUDr. Jozef Turay 75-ročný	9
---	---

VEDECKÉ PRÁCE

Matúš Čoma, Lukáš Urban, Eva Petrovová: Western blot analýza proteínov izolovaných z prepeličej chorioalantoickej membrány	11
Marta Habánová, Maroš Bihari, Martina Gažarová, Jana Kopčeková, Petra Lenártová, Jana Pastrnáková: Účinok pravidelnej konzumácie 100% prírodnej čučoriedkovej vlákniny na moduláciu vybraných parametrov zdravia v skupine nadhmotných/obéznych žien	16
Ivana Večurkovská, Marek Stupák, Beáta Hubková, Jana Kaľuchová, Peter Bohuš, Jana Mašlanková: Využitie stanovenia latentných a aktívnych foriem matrixových metaloproteináz v diagnostike a monitoringu gastrointestinálnych ochorení	22

PREHEADOVÉ ČLÁNKY

Ján Balla: POCT - Testovanie pri pacientovi; Časť I: Prehľad súčasného stavu a trendov implementácie, organizácie a regulácie POC testovania v zdravotníckych systémoch vyspelých krajín	30
Petra Bejdová, Katarína Dubayová, Mária Mareková: Diagnostika ochorení ústnej dutiny, perspektívne markery parodontitídy a ich využitie v rutinnej diagnostike	56
Katarína Fiedlerová: Quo vadis fluorescenčná in situ hybridizácia?	64
Simona Mattová, Terézia Kisková: P2X receptory a ich možné využitie pri liečbe rakoviny	70
Jozef Turay: Predpoveď kardiovaskulárneho rizika pomocou hmotnostnej spektrometrie	76

HISTÓRIA KLINICKEJ BIOCHÉMIE

Oliver Viktor Rácz: Čo dostala diabetológia z Iránu?	81
--	----

CONTENT

EDITORIAL

SSKB PRESIDENT MESSAGE	5
------------------------------	---

IN MEMORIAM

František Štefanec: Ing. Rastislav Valko (1939-2023)	7
---	---

JUBILANTS

Hedviga Pivovarníková: 75th Anniversary of Jozef Turay, MD.....	9
--	---

ORIGINAL RESEARCH MANUSCRIPTS

Matúš Čoma, Lukáš Urban, Eva Petrovová: Western blot analysis of proteins isolated from quail chorioallantoic membrane.....	11
--	----

Marta Habánová, Maroš Bihari, Martina Gažarová, Jana Kopčeková, Petra Lenártová, Jana Pastrnáková: The effect of regular consumption of 100% natural blueberry fiber on the modulation of selected health parameters in a group of overweight/obese women.....	16
--	----

Ivana Večurkovská, Marek Stupák, Beáta Hubková, Jana Kaňuchová, Peter Bohuš, Jana Mašlanková: Determination of latent and active forms of matrix metalloproteinases and their use in the diagnosis and monitoring of gastrointestinal diseases	22
--	----

REVIEWS

Ján Balla: Point-of-care testing; Part I: A view of the current state and trends of implementation, organization, and regulation of POC testing in high-income countries.....	30
--	----

Petra Bejdová, Katarína Dubayová, Mária Mareková: Diagnostics of oral cavity diseases, prospective markers of periodontitis and their use in routine diagnostics	56
---	----

Katarína Fiedlerová: Quo vadis fluorescent in situ hybridization?	64
--	----

Simona Mattová, Terézia Kisková: P2X receptors and their possible use in cancer treatment	70
--	----

Jozef Turay: Cardiovascular risk prediction using mass spectrometry.....	76
---	----

HISTORY OF CLINICAL BIOCHEMISTRY

Oliver Viktor Rácz: What did diabetology get from Iran?	81
--	----



Laboratórna Diagnostika, XXIX, 1, 2024: 5–8

ÚVODNÍK

*Vážené a milé kolegyně a kolegovia,
vážení členovia Slovenskej spoločnosti
klinickej biochémie!*

*Začiatok roka 2024 sa už niesol v znamení intenzívnych príprav **XV.Kongresu SSKB**, ktorý sa bude konať 6.-8. októbra 2024 v Kongres hoteli Chopok v Nízkych Tatrách. Program koncipovaný polytematicky ponúka príležitosť na výmenu nových poznatkov, rozšírenie znalostí a nadviazanie nových kontaktov aj s pozvanými zahraničnými významnými odborníkmi a partnermi. Na úvod nebude chýbať ani slávnostné oceňovanie členov SSKB pri ich životných jubileách, na ktorých nezabúdame a veríme, že sa s nimi stretne aj osobne na spomínanom kongrese. A veľmi nás teší, že pozvanie prijala aj zástupkyňa exekutívy EFLM.*

Mesiac apríl bol pre všetky laboratóriá významným ocenením v podobe prebiehajúceho Globálneho týždňa medicínskych laboratórií „**Global Medlab Week**“, ktorý sa uskutočnil 22.-28.4.2024. Je to každoročná oslava, ktorú organizuje Medzinárodná federácia klinickej chémie a laboratórnej medicíny (IFCC) na počesť medicínskych laboratórnych profesionálov, ktorí zohrávajú dôležitú úlohu vo verejnej zdravotnej starostlivosti a zdravotnej starostlivosti o pacientov. Medzinárodná federácia klinickej chémie a laboratórnej medicíny (IFCC) je popredným svetovým lídrom v oblasti klinickej chémie a laboratórnej medicíny a jej poslaním je podporovať excelentnosť v laboratórnej medicíne pre lepšiu zdravotnú starostlivosť na celom svete. Cieľom tejto oslavy je uctiť a oceniť významnú úlohu medicínskych laboratórnych profesionálov v diagnosticko-terapeutickom procese. Globálny týždeň medicínskych laboratórií tiež ponúka jedinečnú príležitosť na zvýšenie povedomia o kľúčovej úlohe medicínskeho laboratória v optimálnom poskytovaní zdravotnej starostlivosti.

Úlohou tohto podujatia je propagovanie rastúceho významu laboratórnej medicíny ako neoddeliteľnej súčasť

diagnostického procesu a zdôrazňuje jej ústrednú úlohu v zdravotnej starostlivosti. Hlavnou témou osláv **GLOBAL MEDLAB WEEK 2024** bola v tomto roku téma s názvom „**Laboratóriá zachraňujú životy**“.

Poďakovanie patrí medicínskym laboratóriám, ktoré poskytujú nepretržite neoceniteľné odborné služby, rady a konzultácie všetkým lekárom a ich pacientom.

Dôležitá je vzájomná komunikácia a neustála edukácia klinických partnerov, uplatňovanie etiky a psychológie v medicíne, aby sme my „pre odbor“ horeli, ale nevyhoreli.

V zozname súčasných laboratórií certifikovaných EFLM ako „**Zelené a udržateľné laboratórium**“ je v týchto dňoch zatiaľ 6 krajín (Belgicko, Fínsko Francúzsko, Rumunsko, Švajčiarsko a Turecko). Túto možnosť implementácie efektívnych každodenných činností s cieľom zníženia škodlivých vplyvov na životné prostredie s ambíciou stať sa zeleným a udržateľným laboratóriom a s možnosťou získania prestížneho **certifikátu** má každé verejné alebo súkromné laboratórium v odboroch: Klinická chémia, Hematológia, Mikrobiológia, Transfúzna služba, Imunológia, Patológia a Cytológia. Je to významná výzva pridať do zoznamu aj Slovensko a podieľať sa tak na udržateľnosti laboratórií.

SSKB sa v uplynulých dňoch pripojila k žiadosti ďalších odborných spoločností adresovaných MZ SR a NCZI, aby spoločne podporili realizáciu národného projektu elektronizácie laboratórnych výsledkov a ich distribúcie poskytovateľom zdravotnej starostlivosti **eLab** do praxe.

Mladí kolegovia prejavujúci záujem o medzinárodné aktivity, vzájomnú spoluprácu a zároveň aj zviditeľnenie SSKB, sa môžu zapojiť do **pracovnej skupiny mladých vedcov** (EFLM Task Group Young Scientists) pod vedením novozvoleného kolegu z Českej republiky. Predpokladom je stať sa členom SLS a SSKB a následne kolektívnym členom EFLM Akadémie.

Z významných medzinárodných odborných akcií sa pripravuje:

4. EFLM Strategická konferencia s hlavnou témou „Vizia do budúcnosti: laboratórna medicína založená na hodnotách“, ktorá sa bude konať 23. – 24.septembra 2024 v Padove, v Taliansku.

XXVI. IFCC-EFLM EUROMEDLAB 2025 sa bude konať 18. – 22. mája 2025 v Bruseli.

Všetci členovia výboru SSKB sa tešia na spoločné potrebné a milé osobné stretnutia v Demänovskej Doline na našom kongrese.

Aktuálne informácie vždy zverejňujeme na webovej stránke www.sskb.sk.

Podakovanie patrí všetkým...

Prajem zdravie, silu, trpezlivosť, nádej a dni plné radosti a šťastia...

23.5.2024

*Hedviga Pivovarníková
prezidentka SSKB*



Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 2, 2023: 7–10

IN MEMORIAM ING. RASTISLAV VALKO (1939-2023)



17. decembra minulého roka by sa dožil 84 rokov kolega Ing. Rastislav Valko.

Narodil na Gemeri, v obci Rákoš. Vyrastal v rodine spolu s piatimi súrodencami. Ako 22-ročný úspešne ukončil Chemickotechnologickú fakultu SVŠT v Bratislave. Jeho prvým pracoviskom boli Západoslovenské konzervárne a liehovary, n.p. Malacky. Po troch rokoch sa rozhodol pre svoje druhé pracovné pôsobisko - Nemocnicu s poliklinikou v Skalici. Biochemickému laboratóriu venoval takmer celý svoj produktívny vek, 39 rokov. Zastával funkciu vedúceho úseku špeciálnych metód a od decembra 1990 stál na čele oddelenia. Absolvoval množstvo školení a kurzov usporiadaných Inštitútom lekárskej fakulty v Bratislave a i v Prahe. Bol medzi prvými absolventami špecializačnej prípravy - Vyšetrovacie metódy v klinickej biochémií, pretože dovtedy atestácie pre „nelekárov“ neboli možné. Snažil sa o maximálny pokrok odboru, ktorý sa stal nielen jeho zamestnaním, ale i čímisi viac - koníčkom. Mnohokrát bolo oddelenie „skalickej biochémiie“ medzi prvými pracoviskami na Slovensku, ktoré začali vyšetrovať novými metódami. Bol autorom skoro 50 zlepšovacích návrhov. Jeho jednoduchý „močový analyzátor“ umožňoval jediným pohybom pridať tri rozličné činidlá naraz do troch skúmaviek s močom. Na oddelení sa používal takmer štyri desaťročia.

Pracoval v období rodiacej sa výpočtovej techniky a nadšenie k počítačom prepojal i s laboratóriom. Prvý po-

čítač bol v nemocnici už v roku 1989 a to práve na oddelení biochémiie. O štyri roky neskôr malo oddelenie biochémiie aj laboratórny informačný systém. Bol autorom mnohých softvérových programov, ktoré umožňovali jednoduchšie analyzovať množstvo dát. Svoje nadšenie a skúsenosti uplatňoval i v zdravotnej poisťovni ako revízny pracovník pre SValZ. Po rozdelení republiky sa snažil o neformálne stretávanie slovenských a českých biochemikov, organizoval odborné podujatia „Stretnutia biochemikov Pomoravia“, na ktoré sa tešili nielen biochemici z obidvoch brehov rieky Moravy, ale aj biochemici z Bratislavy a Prahy.

V Slovenskej spoločnosti klinickej biochémiie bol členom výboru i členom revíznej komisie počas viacerých volebných období, taktiež v Spolku lekárov Záhoria bol dlhoročným členom výboru. Aktívny bol i v spoločenskom živote v regióne, veľa rokov bol poslancom Mestského zastupiteľstva v Skalici. V roku 2011 získal Cenu primátora mesta Skalica a v 2017 Ocenenie župana Trnavského samosprávneho kraja, udeľovanú pracovníkom v zdravotníctve.

Jeho koníčkom bola turistika, veď sa narodil v lone krásnej prírody Muránskej planiny. V Skalici založil telovýchovnú jednotu TJ Zdravotník. Pre rodičov s deťmi začal organizovať v rekreačnom stredisku Zlatnícka dolina neďaleko Skalice „Rozprávkový pochod“, ktorý sa tento rok pôjde už po 30-krát. Bol „bláznom“ do elektroniky. „Tran-

zistorákov“ mal približne tridsať a vedel o nich rozprávať s takým zanietením, že každý musel vidieť, ako sa v nich dobre vyzná. Mnohí si Rasta pamätajú ako vášnivého fotografistu, zdokumentoval ne jeden biochemický kongres, či Labkvalitu.



Ing. Rastislav Valko nás navždy opustil 14. novembra 2023 v jeho dlhoročnom pôsobisku, v Skalici.

S úctou spomíname.

V mene spolupracovníkov z Oddelenia klinickej biochémie v Skalici, kolegov zo Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie a priateľov

RNDr. František Štefanec



Laboratórna Diagnostika, XXIX, 1, 2024: 9–12

MUDR. JOZEF TURAY 75-ROČNÝ 75TH ANNIVERSARY OF JOZEF TURAY, MD.



Nedávno oslávil trištvrtstoročné jubileum významný predstaviteľ slovenskej klinickej biochémie – MUDr. Jozef Turay. Toto jubileum je zároveň aj príležitosťou na krátke zhodnotenie jeho profesionálnej kariéry a prínosu pre rozvoj slovenskej medicíny.

MUDr. Jozef Turay sa narodil 27. novembra 1948 v lekárskej rodine v Trnave. Väčšinu svojho života prežil vo Zvolene. Profesionálna kariéra MUDr. Jozefa Turaya začína promóciou na LF UK v Bratislave (1973). V tom istom roku nastúpil ako sekundárny lekár na chirurgické oddelenie. Úspešne absolvoval špecializáciu I. stupňa z odboru chirurgia (1977). Profesijne sa v tom čase orientoval na problematiku vnútorného prostredia. Od roku 1978 začal pracovať na Oddelení klinickej biochémie, kde v roku 1981 získal špecializácie najprv I. stupňa (1981) a následne II. stupňa (1985) z klinickej biochémie, v roku 2008 aj špecializáciu z diabetológie a porúch látkovej premeny. Od roku 1980 do roku 2012 viedol ambulanciu pre poruchy metabolizmu lipidov. V roku 1981 úspešne riešil štátnu výskumnú úlohu „Vplyv inhalačnej expozície fenolformaldehydom a melamínovými živinicami na lipidový profil u ľudí“.

Od roku 1992 do roku 2012 pôsobil vo funkcii primára Oddelenia klinickej biochémie nemocnice vo Zvolene.

V roku 1993 založil Sekciu pre aterosklerózu pri Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie (SSKB), ktorá bola schválená výborom Slovenskej lekárskej spoločnosti

(pridelené číslo Sekcie 2586). V roku 1995 obhájil v americkom Houstone vstup tejto novovytvorenej slovenskej Sekcie do Medzinárodnej spoločnosti pre aterosklerózu - International Atherosclerosis Society (IAS). Bol dlhoročným predsedom Sekcie pre aterosklerózu pri SSKB, v súčasnosti v nej pôsobí ako vedecký sekretár. V období rokov 1993-2012 usporiadal 20 ročníkov sympózií Dyslipoproteinémia a ateroskleróza, ktoré sa pravidelne konali vo Zvolene. Podieľal sa aj na organizácii štyroch sympózií s medzinárodnou účasťou venovaných problematike porúch lipidového metabolizmu a aterosklerózy.

Od roku 2000 usporiadal so spoluorganizátorom doc. MUDr. Jozefom Kollárom, DrSc. celkom osem edukačných kurzov Slovenskej zdravotníckej univerzity (pôvodne Slovenskej postgraduálnej akadémie medicíny) v Bratislave na tému dyslipoproteinémia a ateroskleróza. Na týchto kurzoch, ktoré boli vyhľadávané najmä slovenskými klinickými biochemikmi, prednášali nielen významní slovenskí a českí odborníci, ale boli pozývaní aj najvýznamnejší predstavitelia z IAS.

Ďalšou významnou aktivitou MUDr. Jozefa Turaya bol v rokoch 1994-2004 výkon funkcie hlavného odborníka Ministerstva zdravotníctva SR pre odbor klinická biochémia. Z tejto pozície menoval krajských odborníkov pre klinickú biochémiu a zúčastňoval sa aktívne na krajských seminároch nimi organizovaných.

Bol hlavným strojcom novej koncepcie odboru klinická biochémia, ktorú v roku 1996 spoločne s vtedajším vedúcim Katedry klinickej biochémie ILF v Bratislave prof. MUDr. Ivanom Pecháňom, DrSc. obhájili vo Vedeckej rade Ministerstva zdravotníctva SR. Nová koncepcia tak nahradila pôvodnú koncepciu odboru z roku 1973.

Roku 1997 spolu s doc. MUDr. Jozefom Kollárom, DrSc. z Košíc založili časopis „Ateroskleróza - metabolizmus, klinika a liečba“ ako oficiálny časopis Sekcie pre aterosklerózu pri SSKB. Tu počas 20 rokov pôsobil v redakčnej rade na poste šéfredaktora.

V rokoch 1996 – 1997 bol koordinátorom výskumného tímu v projekte „Mapovanie Slovenska z pohľadu prevalencie lipidových rizikových faktorov aterosklerózy“ pod záštitou Sekcie pre aterosklerózu SSKB, SLS a Sekcie zdravotníckej starostlivosti MZ SR. Roku 2000 absolvoval študijný pobyt v kardiocentre Univerzity Ottawa v Kanade. V roku 2003 inicioval a v spolupráci s prof. MUDr. RNDr. Rudolfom Pullmannom, CSc. z Martina realizoval prvú slovenskú externú kontrolu kvality, ktorej sa zúčastnilo celkom 151 oddelení klinickej biochémie. Výsledky prezentoval vo Švajčiarsku na konferencii International Swiss MedLab and 8th Alps Adria Congress.

Svoje bohaté skúsenosti z oblasti lipidológie zhrnul v roku 1992 v prvej slovenskej monografii s názvom „Dyslipoproteínémia a ateroskleróza“. Úplne prepracovanú monografiu pod rovnakým názvom, s podnázvom „Základy klinickej lipidológie“ vydal nanovo v roku 2021.

Bol členom pracovnej skupiny a autorského kolektívu prvého slovenského vydania tzv. „cholesterolového konsenzu“ „Smernice pre optimálnu diagnostiku a liečbu hyperlipoproteínémií u dospelých“ (1997), ako i tzv. „lipidového konsenzu-2“ – „Odporúčania pre optimálnu diagnostiku a liečbu dyslipoproteínémií u dospelých“ (2003).

V prvých štandardných diagnostických postupoch editovaných prof. MUDr. T. Trnovcom, DrSc. a prof. MUDr. R. Dzúrikom, DrSc (vydaných MZ SR v roku 1998) zostavil spolu s MUDr. Jozefom Vozárom, CSc. kapitolu „Metabolizmus“.

Je autorom počítačového konzultačného programu „LIPID“ určeného pre vedenie metabolických ambulancií, ktorý sa využíval v Čechách i na Slovensku. Roku 2003

napísal učebnicu pre výučbu študentov SZŠ „Prevencia srdcovocievnych ochorení“. Publikácia vznikla ako súčasť projektu „Výživa pre zdravé srdce“, gestorom bolo MZ SR.

Prednášal doma i v zahraničí, publikoval viac ako 60 odborných publikácií v domácich i zahraničných časopisoch, excerpovaných v Slovenskej lekárskej knižnici, Národnej lekárskej knižnici v Prahe, ale aj v PubMed-e, prevažne v časopisoch zameraných na klinickú biochémiu a metabolizmus – Biochemia Clinica Bohemoslovaca, Ateroskleróza, Laboratórna diagnostika, CCLM – Journal of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, ale i v ďalších medicínskych časopisoch – Vnitřní lékařství, Časopis lékařů českých, a i.

V Nemocnici s poliklinikou vo Zvolene roku 1988 vybudoval a otvoril nové, moderné oddelenie klinickej biochémie. V roku 1998 mu bola pri príležitosti životného jubilea udelená bronzová, v roku 2008 strieborná medaila za zásluhy o rozvoj SLS. V roku 2019 mu Slovenská lekárska spoločnosť na návrh SSKB udelila Zlatú medailu „Propter merita“. I v súčasnosti ako dôchodca pracuje aktívne v úväzku na Oddelení klinickej biochémie a hematológie LDCH Detva.

Naďalej je publikačne aktívny, pravidelne sa zúčastňuje podujatí organizovaných SLS a SSKB ako i IAS a EAS v zahraničí, naposledy v máji 2019 v Maastrichte v Holandsku.



Pri príležitosti životného jubilea želáme MUDr. Jozefovi Turayovi do ďalších rokov veľa zdravia, spokojnosti a pohody v kruhu najbližších, ako i elánu do ďalšej tvorivej práce

V mene Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie pri SLS, jej Sekcie pre aterosklerózu, kolegov a priateľov

MUDr. Hedviga Pivovarníková, prezidentka SSKB

MUDr. Daniel Magula, CSc., vedecký sekretár SSKB

Prof. MUDr. Stanislav Oravec, CSc., predseda Sekcie pre aterosklerózu pri SSKB a hlavný odborník MZ SR pre odbor klinická biochémia

predseda Sekcie pre aterosklerózu pri SSKB



Laboratórna Diagnostika, XXIX, 1, 2024: 11–15

WESTERN BLOT ANALÝZA PROTEÍNOV IZOLOVANÝCH Z PREPELIČEJ CHORIOALANTOICKEJ MEMBRÁNY

WESTERN BLOT ANALYSIS OF PROTEINS ISOLATED FROM QUAIL CHORIOALANTOIC MEMBRANE

Matúš Čoma^{1,2}, Lukáš Urban², Eva Petrovová³

¹Ústav farmakológie UPJŠ LF, LF UPJŠ v Košiciach, Košice

²Referát biomedicínskeho výskumu, Východoslovenský ústav srdcových a cievnych chorôb, a. s., Košice

³Katedra morfológických disciplín, Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach, Košice

matus.coma@upjs.sk

SÚHRN

Angiogenéza predstavuje proces tvorby nových krvných ciev z už existujúcich ciev a je nevyhnutná pre fyziologické funkcie ako hojenie rán a regeneráciu tkanív. Avšak jej dysregulácia môže viesť k rôznym patologickým stavom. Aj keď kurací CAM model zostáva zlatým štandardom pri štúdiách angiogenézy *ex ovo*, prepeličí CAM model prináša jedinečné výhody, ako je kratší generačný interval, kratší embryonálny vývoj, vyššia kapacita experimentálnych vzoriek a možnosť použitia špecifických markerov pre prepelicu ako je monoklonálna protilátka QH1, ktorá detekuje povrch prepeličích endotelových buniek. V tejto štúdii demonštrujeme využitie *ex ovo* prepeličieho CAM modelu na hodnotenie angiogenézy, s osobitným zameraním na detekciu expresie proteínov prostredníctvom Western blot analýzy.

Kľúčové slová: chorioalantoická membrána; angiogenéza; QH1; imunoblot

ABSTRACT

Angiogenesis, the process of new blood vessel formation from pre-existing vessels, is essential for physiological functions like wound healing and tissue regeneration; yet dysregulation can lead to various pathological conditions. While the chicken CAM model remains the

gold standard in angiogenesis studies *ex ovo*, the quail CAM assay presents distinct advantages, such as a shorter generation interval, shorter embryonal development, higher experimental sample capacity, and the possibility to use quail-specific markers like the monoclonal antibody QH1, which detects quail endothelial cell surfaces. In this study, we demonstrate the utility of the *ex ovo* quail CAM model for evaluating angiogenesis, specifically focusing on protein expression via Western blot analysis

Key words: chorioallantoic membrane; angiogenesis; QH1; immunoblot

ÚVOD

Angiogenéza, ako proces tvorby nových krvných ciev z existujúcich ciev, zohráva kľúčovú úlohu v rôznych fyziologických a patologických podmienkach (Kurz, 2000). Zatiaľ čo nekontrolovaná angiogenéza je spájaná s niekoľkými chorobami vrátane rakoviny a zápalových ochorení, kontrolovaná angiogenéza je nevyhnutná pre hojenie rán a regeneráciu tkanív (Lugano et al., 2020). Správna regenerácia tkanív závisí od adekvátnej angiogenézy, ktorá poskytuje kyslík, živiny a esenciálne činitele ako sú angiogénne a osteogénne faktory, a tiež zásobu endotelových a kmeňových buniek (Ellermann et al., 2023).

V súlade s etickými a vedeckými imperatívmi znižovať používanie zvierat vo výskume rastie dôraz na vývoj alternatívnych modelov, ktoré dodržiavajú princípy 3R (z angl. Reduction, Refinement, Replacement) (Neuhaus et al., 2022). Jednou takouto alternatívou je model chorioalantoickej membrány (CAM) s použitím kuracích embryí (Schneider-Stock and Flugel, 2023). CAM, vysoko prekrvená extraembryonálna štruktúra vytvorená okolo 3. až 5. embryonálneho dňa (ED3 až ED5) slúži ako dôležitý dýchací a vylučovací orgán počas embryonálneho vývinu (Ribatti, 2017). Tento model ponúka niekoľko výhod, vrátane postupného vývoja embryonálneho imunitného systému umožňujúceho transplantáciu buniek a tkanív z rovnakých alebo rôznych druhov zvierat. Okrem toho CAM modely poskytujú vizualizáciu v reálnom čase, jednoduchú dostupnosť a rýchle výsledky za nízku cenu (Kundekova et al., 2021). V dôsledku toho sa model CAM často využíva v rôznych oblastiach výskumu, vrátane testovania biomateriálov, výskumu rakoviny, štúdií hojenia rán, transplantologickej biológie a vývoja liekov (Dunker and Jendrossek, 2019, Ribatti et al., 2020). Je dôležité poznamenať, že prepeličí CAM model ponúka určité výhody oproti častejšie používanému modelu CAM kurčiat. Prepeličie embryá majú kratšie obdobie vývinu (16 dní) v porovnaní s embryami kurčaťa (21 dní) a sú menšieho rozmeru, čo umožňuje použitie väčšieho množstva vzoriek a zvýšenú experimentálnu efektivitu (Kundekova et al., 2021, Ainsworth et al., 2010). Okrem toho použitie markerov špecifických pre prepelicu ako napríklad monoklonálna protilátka QH1 detekujúca povrch prepeličích endotelových buniek uľahčuje štúdium angiogenézy a umožňuje rozlíšenie medzi hostiteľskými a darcovskými druhmi v transplantáciách (Petrovova et al., 2019, Papoutsis et al., 2001).

V predloženej štúdií sme demonštrovali analýzu expresie QH1, E-kadherínu, N-kadherínu a vaskulárneho endotelového rastového faktora A (VEGF-A, z angl. „vascular endothelial growth factor A“) pomocou Western blot analýzy v podmienkach *ex ovo* modelu prepeličej CAM.

MATERIÁLY A METÓDY

Ex Ovo prepeličí CAM model

Oplodnené prepeličie vajcia (*Coturnix coturnix japonica*, n = 20) boli zakúpené z prepeličej farmy (Malá Ida, Košice, Slovenská republika) a prevezené do laboratória v prostredí s kontrolovanou teplotou, aby sa zabezpečila ži-

votaschopnosť vajec. Vajcia boli inkubované horizontálne v inkubátore s núteným obehom vzduchu s konštantnou vlhkosťou pri teplote $38,2 \pm 0,5$ °C a 58 % relatívnej vlhkosti (RV). Päťdesiatšesť hodín po začiatku inkubácie bola vajecná škrupina dezinfikovaná 70 % etanolom, každé vajce bolo rozbité a jeho obsah s prepeličím embryom sa opatrne preniesol do sterilnej 6-jamkovej kultivačnej platne. Embryá sa inkubovali do ED 6 v inkubátore bez prúdenia vzduchu ($38,2 \pm 0,5$ °C, 60 % RV). Na 10 embryonálnych CAM bol aplikovaný fosfátový soľný pufor (PBS) obsahujúci VEGF-A (25 ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Po 72 hodinách (ED9) boli CAM odobraté a spracované pre Western blot analýzu.

Príprava lyzátov pre analýzu Western blot

Príprava proteínových lyzátov bola uskutočnená sériou precíznych krokov, aby sa zabezpečila vysoká kvalita vzoriek. CAMy boli čo najpresnejšie vyrezané z okolitého tkaniva a zozbierané do 2 ml mikroskúmaviek. Ku každej CAM bolo napipetované malé množstvo PBS (100 µl) a CAMy boli nastrihané nožnicami na malé kúsky. Následne boli premyté 500 µl studeného PBS a scentrifugované (4 °C, 500 x g, 5 minút). Po premytí boli erytrocyty eliminované použitím 1 ml RBC lyzačného pufru (Biolegend, San Diego, CA, USA), ktorý bol pripravený zriedením 10x koncentrovaného zásobného roztoku deionizovanou vodou podľa pokynov výrobcu. Po inkubácii (10 min., izbová teplota) bola lýza zastavená použitím 500 µl PBS a vzorky boli scentrifugované (500 x g, 5 min.). V prípade prítomnosti červeného sfarbenia peletu bol pridaný ďalší lyzačný krok (5 minút, izbová teplota). Získané pelety dôkladne zbavené erytrocytovej kontaminácie boli rozpustené v Laemmli lyzačnom pufru (100 mM TRIS-HCl, 10 % glycerol, 2 % SDS, pH približne 6,8). Tento pufor bol obohatený o inhibítory fosfatáz a proteáz (obe od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Následne boli lyzáty podrobené sonikácii (QSonica, 40% amplitúda, 15 sekúnd) a udržiavané na ľade po dobu 20 minút. Po dôkladnej lýze boli vzorky scentrifugované (4 °C, 10 000 x g, 10 min.) a opatrne prenesené do nových mikroskúmaviek. Vzorky boli uskladnené pri -20 °C až do ďalšej analýzy. Pre stanovenie koncentrácie proteínov v jednotlivých pripravených vzorkách sme použili BCA (bicinchoninová metóda z angl. Bicinchoninic Acid protein assay) test s vyžitím súpravy Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

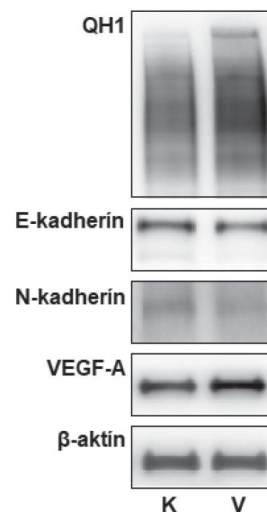
Western blot analýza

Po krátkom denaturačnom kroku (95 °C, 1 min) boli vzorky proteínových lyzátov (15 µg na jamku) nanosené do 10 % Bis-Tris gélu a separované pomocou SDS-PAGE (denaturačná elektroforéza v polyakrylamidovom gély z angl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Po separácii boli proteíny elektroblotované na PVDF („polyvinylidene difluoride“) membránu s použitím suchého blotovacieho systému iBlot2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Po elektroblote boli PVDF membrány krátko premyté v Tris-pufrovanom fyziologickom roztoku s 0,1 % Tween (TBS-T) a následne sa nešpecifické väzobné miesta blokovali počas 1 hodiny pri izbovej teplote v TBS-T pufri doplnenom o 5 % odtučnené sušené mlieko alebo hovädzí sérový albumín. Po vyblokovani boli membrány inkubované s primárnymi protilátkami cez noc pri +4 °C. Následne boli membrány trikrát premyté v TBS-T a inkubované s adekvátnymi sekundárnymi protilátkami konjugovanými s chrenovou peroxidázou (HRP, horseradish peroxidase) počas 1 hodiny pri izbovej teplote. Nakoniec sme využili chemiluminiscenčný substrát ECL (Enhanced Chemiluminescence SuperSignal West Pico PLUS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) pre získanie chemiluminiscenčného signálu, ktorý bol zachytený na iBright FL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Pre kontrolu rovnomerného nanašania proteínov sme využili β-aktín. Úplný zoznam protilátok použitých na analýzu Western blot možno nájsť v tabuľke 1.

VÝSLEDKY

Expresia QH1, E-kadherínu, N-kadherínu a VEGF-A bola hodnotená v kontrolnej CAM a CAM stimulovanej VEGF-A metódou Western blot (obrázok 1). Analýza odhalila,

že expresia proteínu QH1 a VEGF-A v CAM stimulovanej VEGF-A bola vyššia ako v kontrolnej CAM. Detekcia viacerých pásov QH1 môže naznačovať prítomnosť dimérov, multimérov, interakcií proteín-proteín, alebo modifikáciu, fragmentáciu či degradáciu cieľového proteínu. Expresia E- a N-kadherínu v oboch testovaných CAM bola rovnaká. Expresia β-aktínu slúžila ako kontrola rovnomerného nanašania vzoriek.



Obrázok 1. Western blot analýza exprese vybraných proteínov CAM. K – kontrolná CAM, V – VEGF-A stimulovaná CAM

DISKUSIA

Najvýznamnejší výsledok našej štúdie spočíva v novej aplikácii Western blotu na analýzu exprese proteínov v prepeličom CAM modeli. Prepeličí CAM model predstavuje finančne efektívny a rýchly nástroj pre *ex ovo* štúdium angiogenézy. V porovnaní s tradičným osvedčeným kuračím CAM modelom ponúka prepeličí CAM model kratší generačný interval, kratší embryonálny vývin a vyššiu kapacitu experimentálnych vzoriek (Morini et al., 2023).

Tabuľka 1. Protilátky použité pre Western blot analýzu

Primárna protilátka	Hostiteľ	Izotyp	Riedenie	Kat. č.	Klonalita	Výrobca
QH-1	Myš	IgG	1:2000	ab531829	monoklonálna	DSHB, Iowa City, IA, USA
E-kadherín	Potkan	IgG	1:1000	14-3249-82	monoklonálna	eBioscience, San Diego, CA, USA
N-kadherín	Králik	IgG	1:1000	PA5-19486	polyklonálna	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
VEGF-A	Králik	IgG	1:1000	ab214424	monoklonálna	Abcam, Cambridge, UK
β-aktín	Králik	IgG	1:1000	8457	monoklonálna	CST, Danvers, MA, USA
Sekundárna protilátka	Hostiteľ	Izotyp	Riedenie	Kat. č..		Výrobca
Anti-králik IgG, HRP-konjugovaná	Koza	IgG	1:1000	7074		CST, Danvers, MA, USA
Anti-potkan IgG, HRP-konjugovaná	Koza	IgG	1:1000	7077		CST, Danvers, MA, USA
Anti-myš IgG, HRP-konjugovaná	Kôň	IgG	1:1000	7076		CST, Danvers, MA, USA

CST- Cell Signaling Technology; HRP – Horse radish Peroxidase

Praktickosť kultivácie prepeličích embryí s dĺžkou približne 30 mm a hmotnosťou približne 10 g v 6-jamkových platinách v podmienkach *ex ovo* poskytuje výhodu využitia väčšieho počtu jedincov v experimentoch (Kundekova et al., 2021, Ainsworth et al., 2010). Prepeličí CAM model bol napríklad použitý v angiogénnom výskume, ktorý preukázal 72% stimuláciu angiogenézy pomocou zásaditého fibroblastového rastového faktora (bFGF, basic fibroblast growth factor) a 68% inhibíciu angiogenézy použitím angiostatínu (Parsons-Wingerter et al., 1998). Prepeličí CAM model bol využitý aj pri skúmaní angiogénnych modulácií ovplyvnených faktormi ako leptín, heparín sodný a nadroparín vápenatý (Macajova et al., 2020). Ďalšie štúdie na prepeličom modeli skúmali účinky nervového rastového faktora na rast krvných kapilár (Lazarovici et al., 2018), ako aj testovali angiogénne účinky kondicionovaných médií z mezenchymálnych stromálnych buniek a ich kokultiváciu s endotelovými bunkami (Ezdačková et al., 2022). Kvantifikácia angiogénnych vlastností v týchto štúdiách bola typicky založená na zmenách vo vetvení a počte krvných ciev (Cattalini et al., 2016, Vargas et al., 2013). V našej štúdii sme použili Western blot na detekciu expresie QH1, E-kadherínu, N-kadherínu a VEGF-A v prepeličom CAM modeli. Jasne sme identifikovali expresiu QH1, markera endotelových buniek zo splachnického mezodermu a zreých endotelových buniek v cievach prepelíc (Feletou, 2011). Okrem toho sme tiež identifikovali expresiu E- a N-kadherínov, endotelových markerov, ktoré sa často študujú počas normálnej a patologickej angiogenézy (Tang et al., 2018, Derycke et al., 2006). Analyzovali sme tiež expresiu VEGF-A, najviac študovaného angiogénneho faktora s kľúčovou úlohou v angiogenéze (Apte et al., 2019).

ZÁVER

Tradične sa kvantifikácia angiogénnych vlastností v modeloch CAM spoliehala na parametre, ako sú zmeny počtu a vetvenie krvných ciev (Cattalini et al., 2016, Vargas et al., 2013). Začlenenie Western blot analýzy na posúdenie expresie proteínov v modeloch CAM však značne rozširuje možnosti a potenciálne aplikácie tejto techniky a ponúka výskumníkom výkonný nástroj na skúmanie expresie proteínov a objasnenie základných mechanizmov, ktoré riadia vaskulárny vývoj a remodeláciu.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-20-0073, APVV-22-0006 a APVV-20-0017.

LITERATÚRA

1. Ainsworth, S. J., Stanley, R. L. and Evans, D. J. (2010) 'Developmental stages of the Japanese quail', *J Anat*, 216(1), pp. 3-15.
2. Apte, R. S., Chen, D. S. and Ferrara, N. (2019) 'VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development', *Cell*, 176(6), pp. 1248-1264.
3. Cattalini, J. P., Roether, J., Hoppe, A., Pishbin, F., Haro Durand, L., Gorustovich, A., Boccaccini, A. R., Lucangioli, S. and Mourino, V. (2016) 'Nanocomposite scaffolds with tunable mechanical and degradation capabilities: co-delivery of bioactive agents for bone tissue engineering', *Biomed Mater*, 11(6), pp. 065003.
4. Derycke, L., Morbidelli, L., Ziche, M., De Wever, O., Bracke, M. and Van Aken, E. (2006) 'Soluble N-cadherin fragment promotes angiogenesis', *Clin Exp Metastasis*, 23(3-4), pp. 187-201.
5. Dunker, N. and Jendrossek, V. (2019) 'Implementation of the Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Model in Radiation Biology and Experimental Radiation Oncology Research', *Cancers (Basel)*, 11(10).
6. Ellermann, E., Meyer, N., Cameron, R. E. and Best, S. M. (2023) 'In vitro angiogenesis in response to biomaterial properties for bone tissue engineering: a review of the state of the art', *Regen Biomater*, 10, pp. rbad027.
7. Ezdačková, M. I., Matveeva, D. K. and Andreeva, E. R. (2022) 'Short-Term Interaction with Endothelial Cells Enhances Angiogenic Activity of Growth-Arrested Mesenchymal Stromal Cells In Vitro and In Ovo', *Bull Exp Biol Med*, 174(1), pp. 125-130.
8. Feletou, M. (2011) *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease*. San Rafael (CA).
9. Kundekova, B., Macajova, M., Meta, M., Cavarga, I. and Bilcik, B. (2021) 'Chorioallantoic Membrane Models of Various Avian Species: Differences and Applications', *Biology (Basel)*, 10(4).
10. Kurz, H. (2000) 'Physiology of angiogenesis', *J Neurooncol*, 50(1-2), pp. 17-35.

11. Lazarovici, P., Lahiani, A., Gincberg, G., Haham, D., Marcinkiewicz, C. and Lelkes, P. I. (2018) 'Nerve Growth Factor-Induced Angiogenesis: 2. The Quail Chorioallantoic Membrane Assay', *Methods Mol Biol*, 1727, pp. 251-259.
12. Lugano, R., Ramachandran, M. and Dimberg, A. (2020) 'Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities', *Cell Mol Life Sci*, 77(9), pp. 1745-1770.
13. Macajova, M., Cavarga, I., Sykorova, M., Valachovic, M., Novotna, V. and Bilcik, B. (2020) 'Modulation of angiogenesis by topical application of leptin and high and low molecular heparin using the Japanese quail chorioallantoic membrane model', *Saudi J Biol Sci*, 27(6), pp. 1488-1493.
14. Morini, A. C., Dos Santos, G. C., de Oliveira, R. T., Farias, T. S., Batista, A. A. L. and da Silva, A. (2023) 'Embryonic development of quail eggs (*Coturnix coturnix japonica*) in a home-made incubator', *Braz J Vet Med*, 45, pp. e004322.
15. Neuhaus, W., Reininger-Gutmann, B., Rinner, B., Plasenzotti, R., Wilflingseder, D., De Kock, J., Vanhaecke, T., Rogiers, V., Jirova, D., Kejlova, K., Knudsen, L. E., Nielsen, R. N., Kleuser, B., Kral, V., Thone-Reineke, C., Hartung, T., Pallocca, G., Rovida, C., Leist, M., Hippenstiel, S., Lang, A., Retter, I., Kramer, S., Jedlicka, P., Ameli, K., Fritsche, E., Tigges, J., Kuchovska, E., Buettner, M., Bleich, A., Baumgart, N., Baumgart, J., Meinhardt, M. W., Spanagel, R., Chourbaji, S., Kranzlin, B., Seeger, B., von Kockritz-Blickwede, M., Sanchez-Morgado, J. M., Galligioni, V., Ruiz-Perez, D., Movia, D., Prina-Mello, A., Ahluwalia, A., Chiono, V., Gutleb, A. C., Schmit, M., van Golen, B., van Weereld, L., Kienhuis, A., van Oort, E., van der Valk, J., Smith, A., Roszak, J., Stepnik, M., Sobanska, Z., Reszka, E., Olsson, I. A. S., Franco, N. H., Sevastre, B., Kandarova, H., Capdevila, S., Johansson, J., Svensk, E., Cederroth, C. R., Sandstrom, J., Ragan, I., Bubalo, N., Kurreck, J. and Spielmann, H. (2022) 'The Current Status and Work of Three Rs Centres and Platforms in Europe', *Altern Lab Anim*, 50(6), pp. 381-413.
16. Papoutsi, M., Tomarev, S. I., Eichmann, A., Prols, F., Christ, B. and Wilting, J. (2001) 'Endogenous origin of the lymphatics in the avian chorioallantoic membrane', *Dev Dyn*, 222(2), pp. 238-51.
17. Parsons-Wingenter, P., Lwai, B., Yang, M. C., Elliott, K. E., Milaninia, A., Redlitz, A., Clark, J. I. and Sage, E. H. (1998) 'A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bFGF and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection', *Microvasc Res*, 55(3), pp. 201-14.
18. Petrovova, E., Giretova, M., Kvasilova, A., Benada, O., Danko, J., Medvecky, L. and Sedmera, D. (2019) 'Preclinical alternative model for analysis of porous scaffold biocompatibility in bone tissue engineering', *ALTEX*, 36(1), pp. 121-130.
19. Ribatti, D. (2017) 'The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay', *Reprod Toxicol*, 70, pp. 97-101.
20. Ribatti, D., Annese, T. and Tamma, R. (2020) 'The use of the chick embryo CAM assay in the study of angiogenic activity of biomaterials', *Microvasc Res*, 131, pp. 104026.
21. Schneider-Stock, R. and Flugel, G. (2023) 'Editorial for Special Issue: The Chorioallantoic Membrane (CAM) Model-Traditional and State-of-the Art Applications: The 1st International CAM Conference', *Cancers (Basel)*, 15(3).
22. Tang, M. K. S., Yue, P. Y. K., Ip, P. P., Huang, R. L., Lai, H. C., Cheung, A. N. Y., Tse, K. Y., Ngan, H. Y. S. and Wong, A. S. T. (2018) 'Soluble E-cadherin promotes tumor angiogenesis and localizes to exosome surface', *Nat Commun*, 9(1), pp. 2270.
23. Vargas, G. E., Haro Durand, L. A., Cadena, V., Romero, M., Mesones, R. V., Mackovic, M., Spallek, S., Spiecker, E., Boccaccini, A. R. and Gorustovich, A. A. (2013) 'Effect of nano-sized bioactive glass particles on the angiogenic properties of collagen based composites', *J Mater Sci Mater Med*, 24(5), pp. 1261-9.



Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 2, 2023: 16–21

ÚČINOK PRAVIDELNEJ KONZUMÁCIE 100% PRÍRODNEJ ČUČORIEDKOVEJ VLÁKNINY NA MODULÁCIU VYBRANÝCH PARAMETROV ZDRAVIA V SKUPINE NADHMOTNÝCH/OBÉZNYCH ŽIEN
THE EFFECT OF REGULAR CONSUMPTION OF 100% NATURAL BLUEBERRY FIBER ON THE MODULATION OF SELECTED HEALTH PARAMETERS IN A GROUP OF OVERWEIGHT/OBESE WOMEN

Marta Habánová, Maroš Bihari, Martina Gažarová, Jana Kopčeková, Petra Lenártová,
Jana Pastrnáková

Ústav výživy a genomiky, FAPZ SPU v Nitre, Nitra

marta.habanova@uniag.sk

SÚHRN

Bioaktívne látky a vláknina v drobnom ovocí zohrávajú úlohu pri znižovaní rizika obezity a s ňou súvisiacich ochorení. Cieľom práce bolo zistiť účinok pravidelnej konzumácie 100% prírodnej čučoriedkovej vlákniny na moduláciu vybraných parametrov zdravia v skupine nadhmotných/obéznych žien. Sledovaný súbor tvorilo 10 žien vo veku 50-55 rokov, ktoré konzumovali 10 g/deň 100% prírodnej čučoriedkovej vlákniny 8 týždňov. Na začiatku a konci štúdie boli zisťované antropometrické parametre, krvný tlak a vybrané biochemické parametre. Vplyv konzumácie 100% prírodnej čučoriedkovej vlákniny na antropometrické parametre a hodnoty krvného tlaku nebol štatisticky významný ($p > 0,05$). Boli však zistené štatisticky významné pozitívne zmeny v hodnotách LDL cholesterolu, HDL cholesterolu, pomeru LDL/HDL a vybraných zápalových parametrov ($p < 0,05$). Zistenia štúdie potvrdzujú vhodnosť zaradenia potravín bohatých na bioaktívne látky do bežného stravovania.

Kľúčové slová: čučoriedky; vláknina; obezita; lipidový profil; zdravie

ABSTRACT

Bioactive substances and fiber in small fruit play a role in reducing the risk of obesity and related diseases. The aim of this study was to determine the effect of regular consumption of 100% natural blueberry fiber on the modulation of selected health parameters in a group of overweight/obese women. The study group consisted of 10 women aged 50-55 years who consumed 10 g/day of 100% natural blueberry fiber for 8 weeks. Anthropometric parameters, blood pressure and selected biochemical parameters were determined at the beginning and end of the study. The effect of 100% natural blueberry fiber consumption on anthropometric parameters and blood pressure values was not statistically significant ($p > 0.05$). However, statistically significant positive changes in LDL cholesterol, HDL cholesterol, LDL/HDL ratio and selected inflammatory parameters were found ($p < 0.05$). The findings of the study confirm the suitability of including foods rich in bioactive substances in the regular diet.

Key words: blueberries; fiber; obesity; lipid profile; health

ÚVOD

Svetová zdravotnícka organizácia opisuje obezitu ako závažný problém epidemického rozmeru pričom 13 % ľudí v roku 2016 bolo klasifikovaných ako obézných (WHO, 2021). Podľa správy World Obesity Atlas (2023) v súčasnosti trpí 38 % svetovej populácie nadhmotnosťou alebo obezitou ($BM \geq 25 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$). Detská obezita je rizikovým faktorom obezity v dospelom veku a v súčasnej dobe sa považuje za obézne 1 z 5 detí. Tento fakt signalizuje ešte vyššiu prevalenciu obezity v blízkej dobe (Reilly a Kelly, 2011). Obezita je komplexné, multifaktoriálne, často recidivujúce a ťažko liečiteľné chronické ochorenie, ktoré je spojené s významnou chorobnosťou a úmrtnosťou od predčasnej smrti až po chronické stavy ako sú kardiovaskulárne ochorenia, diabetes, rakovina, poruchy imunitného systému, systémové zápal, endokrinné, neurologické, psychiatrické a ortopedické ochorenia (Hruby a kol., 2016; Jin a kol., 2023). Nadmerná telesná adipozita súvisí s prítomnosťou dyslipidémie, pre ktorú sú charakteristické zvýšené koncentrácie celkového cholesterolu, triacylglycerolov a lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL cholesterol) a znížené koncentrácie lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL cholesterol) (Cunha a kol., 2018). Dôkazy zo štúdií naznačujú, že konzumácia potravín bohatých na polyfenoly môže pozitívne ovplyvňovať ukazovatele zdravia (Aloo a kol., 2023). Bobuľové ovocie obsahuje celú radu chemických zlúčenín s antioxidantnými vlastnosťami a vďaka vysokému obsahu polyfenolov má spomedzi rôznych rastlinných potravín veľký antioxidantný potenciál (Olas, 2018). Množstvo štúdií naznačilo, že polyfenoly a antokyány chránia bunky pred oxidačným poškodením a preto znižujú riziko obezity, metabolického syndrómu, diabetu 2. typu a inzulínovej rezistencie (Kouki a kol., 2011; Jennings a kol., 2014; Guo a kol., 2016; Tian a kol., 2020). Z rôznych druhov bobuľového ovocia sa čučoriedky vyznačujú vysokým obsahom antokyánov (Koponen a kol., 2007). Štúdie ukázali, že konzumácia čučoriedok môže viesť k zlepšeniu krvného tlaku, citlivosti na inzulín a pozitívne ovplyvňovať metabolizmus lipidov a tiež znižovať zápalové markery a markery oxidačného stresu (de Oliveira a kol., 2022). Cieľom práce bolo vyhodnotiť vplyv konzumácie 100 % prírodnej čučoriedkovej vlákniny ako súčasť bežného stravovania po dobu 8 týždňov na vybrané antropometrické a biochemické parametre lipidového profilu a zápalových markerov u žien s nadhmotnosťou/obezitou.

METÓDA

Výskumnú vzorku intervenčného programu tvorilo 10 nadhmotných/obézných žien vo veku 50-55 rokov (priemerný vek 53 ± 2 roky). Kritériá pre zaradenie do štúdie boli nasledovné: ženy vo veku 50-60 rokov, $BMI \geq 25 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$, približne rovnaká telesná hmotnosť za posledné 3 mesiace ($\pm 3 \text{ kg}$). Zo štúdie boli vyradené probandky, ak boli liečené statínmi, liekmi na ochorenia pečene a obličiek (za posledných 6 mesiacov), tehotné a dojčiace ženy, probandky, ktoré uvádzali užívanie antacid alebo laxatív (aspoň 1-krát týždenne), užívanie výživových doplnkov (vitamíny, antioxidanty, minerálne látky, flavonoidy) a mali nepravidelný alebo nevyvážený stravovací režim. Po splnení kritérií pre zaradenie do štúdie a dobrovoľnom podpísaní písomného informovaného súhlasu boli účastníčky zaradené do štúdie. Súčasne boli všetky probandky informované o podmienkach, priebehu, možných rizikách a benefitoch intervenčného programu. Štúdia bola vykonaná podľa smerníc Helsinskej deklarácie a schválená Etickou komisiou Špecializovanej nemocnice sv. Svorada Zborov, n. o. v Nitre pod číslom 4/071220/2020.

Intervencia

Intervencia spočívala v pravidelnej a každodennej konzumácii 10 g 100 % prírodnej čučoriedkovej vlákniny (len z čistého ovocia) vo forme prášku (výrobca Wellberry, s.r.o., Tuchyňa, Slovensko) po dobu 8 týždňov ako súčasť bežného stravovania (napríklad primiešaním do jogurtu, kaše, šalátov a podobne) bez zmien stravovacích návykov a životného štýlu.

Antropometrické merania a krvný tlak

Antropometrické merania boli vykonané vyškoleným personálom nalačno za dodržania optimálnych a rovnakých podmienok pred aj po intervencii. Telesná výška bola meraná vo vzpriamenej polohe bez topánok použitím lekárskej elektronickej váhy s výškomerom Tanita WB-3000 (Tanita Co., Tokio, Japonsko). Telesná hmotnosť a ostatné sledované parametre zloženia tela: BMI (index telesnej hmotnosti), WHR (pomer pás/boky), PBF (percento telesného tuku) a VFA (plocha viscerálneho tuku) boli diagnostikované multifrekvenčnou bioelektrickou impedančnou analýzou použitím prístroja InBody 720 (Biospace Co., Ltd., Seoul, Kórea). Referenčné hodnoty pre sledované parametre boli: BMI 18-24,99 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$, WHR $< 0,85$, VFA $< 100 \text{ cm}^2$ a PBF 18-28 %. Krvný tlak sa meral dvakrát v sede

použitím tlakomera OMRON M7 Intelli IT (OMRON Healthcare Co., Ltd., Japonsko). Priemer dvoch meraní bol použitý ako výsledná hodnota.

Odber krvi a analýza biochemických parametrov

Odber vzoriek krvi bol vykonaný na začiatku a na konci intervencie vždy ráno a nalačno (minimálne po 8 hodinovom lačnení). Pre účely štúdie bola venózna krv odoberaná lekárom štandardným spôsobom z periférnej žily lakťovej jamky. Po odbere a následnej centrifugácii vzoriek krvi sa pomocou prístroja BioMajesty JCA-BM6010/C (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Nemecko) a príslušných analytických kitov podľa pokynov výrobcu stanovili sledované biochemické parametre (celkový cholesterol, triacylglyceroly, LDL cholesterol, HDL cholesterol, glukóza, CRP, orosomukoid, IgA, IgG a IgM). Analýza krvi bola vykonaná v biochemickom laboratóriu Špecializovanej nemocnice sv. Svorada Zobor, n. o. v Nitre. Na vyhodnotenie biochemických parametrov boli použité referenčné hodnoty poskytnuté nemocnicou. Hodnoty parametrov lipidového profilu boli porovnávané s hodnotami NCEP ATP III (2001).

Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Štatistické analýzy boli vykonané v programe Microsoft Excel® 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) a údaje boli analyzované párovým t-testom, analýza rozptylu (ANOVA) Výsledky práce boli vyjadrené ako priemer \pm štandardná odchýlka a hladina štatistickej významnosti bola stanovená ako $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

Sledovalo sa 10 žien s priemerným vekom 53 ± 2 roky (max. 55, min. 50), telesnou výškou 166 ± 6 cm a telesnou hmotnosťou $81,3 \pm 10,2$ kg. Základné charakteristiky sledovaného súboru žien sú uvedené v tab. 1.

Na základe hodnôt indexu telesnej hmotnosti tvorili sledovaný súbor ženy, z ktorých bolo 6 nadhmotných ($BMI \geq 25 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$) a 4 obézne ($BMI \geq 30 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$). Priemerné hodnoty antropometrických parametrov BMI, WHR, PBF, VFA boli nad rozsah referenčných hodnôt ako aj hodnoty systolického a diastolického tlaku (systolický tlak > 120 mmHg a diastolický tlak > 80 mmHg; Muntner a kol., 2019). Zaznamenali sme zvýšené hodnoty aj ďalších rizikových faktorov kardiovaskulárnych ochorení pri posudzovaní lipidového profilu žien. Priemerná hodnota glykémie z hľadiska posúdenia biochemických parametrov bola optimálna.

Tab. 1 Základné popisné charakteristiky skupiny žien

Parametre	Ženy (n=10)	
	Priemer \pm SD	Min.-Max.
Vek (roky)	53 ± 2	50-55
Telesná výška (cm)	166 ± 6	157-174
Telesná hmotnosť (kg)	$81,3 \pm 10,2$	70,1-98,7
BMI ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$)	$29,63 \pm 3,07$	25,54-34,77
WHR	$0,97 \pm 0,05$	0,9-1,04
PBF (%)	$40 \pm 5,44$	35,67-50,46
VFA (cm^2)	$127,82 \pm 20,54$	99,64-156,87
Systolický tlak (mmHg)	$129,9 \pm 17,72$	105-158
Diastolický tlak (mmHg)	$90 \pm 7,89$	74-99
Celkový cholesterol ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$6,20 \pm 1,36$	4,09-8,58
Triacylglyceroly ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$1,45 \pm 0,47$	0,77-2,07
LDL cholesterol ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$3,65 \pm 0,75$	2,36-4,68
HDL cholesterol ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$1,61 \pm 0,41$	1,07-2,42
Glukóza ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$5,25 \pm 0,55$	4,2-6,04
CRP ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$7,17 \pm 7,73$	2,62-28,65

n – počet osôb, SD – smerodajná odchýlka, Min. – minimum, Max. – maximum, BMI – Index telesnej hmotnosti, WHR – pomer pás a boky, PBF – percentuálny podiel telesného tuku, VFA – plocha viscerálneho tuku, CRP – C-reaktívny proteín

Zmeny vybraných antropometrických parametrov a krvného tlaku po intervencii

Údaje o antropometrických parametroch a krvnom tlaku pred začiatkom a na konci konzumácie čučoriedkovej vlákniny sú uvedené v tab. 2. Tak ako sa predpokladalo konzumácia čučoriedkovej vlákniny významne neovplyvňovala telesné zloženie a zistené zmeny antropometrických parametrov neboli štatisticky významné ($p > 0,05$). Telesná hmotnosť žien sa zvýšila z $81,32 \pm 10,16$ kg na $82,15 \pm 10,16$ kg v dôsledku zvýšenia množstva tuku v tele (+0,58 kg), ale aj zvýšenia beztukovej hmoty (+0,25 kg) po intervencii. Zvýšenie telesnej hmotnosti viedlo aj k zvýšeniu priemernej hodnoty BMI z $29,63 \pm 3,07 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ na $29,92 \pm 3,18 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$. Priemerné hodnoty ukazovateľov telesného tuku boli pred aj po intervencii nadlimitné a nedošlo k ich úprave. Zmeny v hodnotách krvného tlaku neboli tiež štatisticky významné ($p > 0,05$), hoci došlo k miernemu poklesu systolického aj diastolického tlaku.

Tab. 2 Vplyv čučoriedkovej vlákniny na hodnoty vybraných antropometrických parametrov a krvného tlaku

Parametre	Ženy (n=10)		
	pred intervenciou	po intervencii	p-hodnota
Antropometrické parametre			
Telesná hmotnosť (kg)	81,32±10,16	82,15±10,16	NS
BMI (kg·m ⁻²)	29,63±3,07	29,92±3,18	NS
WHR	0,97±0,05	0,97±0,05	NS
PBF (%)	40±5,44	40,24±5,35	NS
VFA (cm ²)	127,82±20,54	130,30±22,91	NS
Krvný tlak			
Systolický tlak krvi (mmHg)	129,9±17,72	128,9±16,09	NS
Diastolický tlak krvi (mmHg)	90±7,89	86,6±7,40	NS

n – počet osôb, NS – nesignifikantné (párový t-test), BMI – Index telesnej hmotnosti, WHR – pomer pás a boky, PBF – percentuálny podiel telesného tuku, VFA – plocha viscerálneho tuku, číselné údaje sú vyjadrené ako priemer ± SD (smerodajná odchýlka)

Zmeny vybraných biochemických parametrov lipidového profilu po intervencii

Čučoriedková vláknina mala významný vplyv na vybrané biochemické parametre lipidového profilu (tab. 3). Priemerná hodnota celkového cholesterolu sa nachádzala nad referenčným rozmedzím. K zvýšeniu priemerných hodnôt po intervencii došlo v prípade celkového cholesterolu (z 6,20±1,36 mmol·L⁻¹ na 6,40±0,99 mmol·L⁻¹) a triacylglycerolov (z 1,45±0,47 mmol·L⁻¹ na 1,53±0,74 mmol·L⁻¹), avšak zmeny neboli signifikantné (p>0,05). V prípade triacylglycerolov sa jednalo o zvýšenie v rámci referenčného rozpätia. Štatisticky významné zmeny boli zistené v prípade LDL cholesterolu (p=0,002), HDL cholesterolu (p=0,004) a pomeru LDL/HDL (p<0,001). Hodnoty LDL cholesterolu sa znížili z 3,65±0,75 mmol·L⁻¹ na 3,01±0,55 mmol·L⁻¹, no jeho hodnoty boli pred aj po intervencii nad normou, HDL cholesterol sa zvýšil z 1,61±0,41 mmol·L⁻¹ na 1,94±0,58 mmol·L⁻¹ a hodnoty pomeru LDL/HDL sa znížili z 2,34±0,63 mmol·L⁻¹ na 1,64±0,48 mmol·L⁻¹. Pri týchto parametroch (LDL, HDL, LDL/HDL) bol účinok konzumácie čučoriedkovej vlákniny vysoko pozitívny a znížilo sa kardiovaskulárne riziko sledovaných probandiek.

Zmeny ďalších vybraných biochemických parametrov po intervencii

Pri posudzovaní biochemických parametrov (tab. 4) bolo zistené, že zmeny hodnoty glykémie sledovaného súboru žien neboli pred ani po intervencii signifikantné (p>0,05) a v oboch prípadoch sa nachádzali v rozmedzí referenčných hodnôt. Štatisticky významne klesla priemerná hodnota CRP (zo 7,17±7,73 mg·L⁻¹ na 5,56±7,76 mg·L⁻¹, p=0,002), ktorá po intervencii spadala do referenčného rozmedzia (0-6 mg·L⁻¹). Priemerná hodnota orosomukoidu, bola tak isto nadlimitná, no po intervencii došlo k významnej úprave na hodnotu v optimálnom rozmedzí (p< 0,001). IgA, IgM sa znížili štatisticky významne (p<0,001). Hodnota IgG sa tak isto znížila, ale táto zmena nebola signifikantná (p=0,142). Vo všetkých prípadoch išlo o zníženie v rámci referenčných hodnôt, keďže pred a po intervencii boli priemerné hodnoty týchto parametrov sledovaného súboru žien v norme.

Tab. 3 Vplyv čučoriedkovej vlákniny na hodnoty vybraných parametrov lipidového profilu

Parametre	Ženy (n=10)		
	pred intervenciou	po intervencii	p-hodnota
Celkový cholesterol (mmol·L ⁻¹)	6,20±1,36	6,40±0,99	NS
Triacylglyceroly (mmol·L ⁻¹)	1,45±0,47	1,53±0,74	NS
LDL cholesterol (mmol·L ⁻¹)	3,65±0,75	3,01±0,55	0,002
HDL cholesterol (mmol·L ⁻¹)	1,61±0,41	1,94±0,58	0,004
LDL/HDL (mmol·L ⁻¹)	2,34±0,63	1,64±0,48	<0,001

n – počet osôb, NS – nesignifikantné (párový t-test), číselné údaje sú vyjadrené ako priemer ± SD (smerodajná odchýlka)

Tab. 4 Vplyv čučoriedkovej vlákniny na hodnoty vybraných biochemických parametrov

Parametre	Ženy (n=10)		
	pred intervenciou	po intervencii	p-hodnota
Glukóza (mmol·L ⁻¹)	5,25±0,55	5,28±0,73	NS
CRP (mg·L ⁻¹)	7,17±7,73	5,56±7,76	0,002
Orosomukoid (g·L ⁻¹)	1,41±0,18	0,68±0,14	<0,001
IgA (g·L ⁻¹)	2,10±0,58	1,74±0,48	<0,001
IgG (g·L ⁻¹)	10,11±1,40	9,65±1,32	NS
IgM (g·L ⁻¹)	1,34±0,64	1,01±0,65	<0,001

n – počet osôb, NS – nesignifikantné (párový t-test), CRP – C-reaktívny proteín, IgA – imunoglobulín A, IgG – imunoglobulín G, IgM – imunoglobulín M, číselné údaje sú vyjadrené ako priemer ± SD (smerodajná odchýlka)

DISKUSIA

V tejto štúdií sme posudzovali v sledovanom súbore žien vplyv konzumácie 10 g 100 % prírodnej čučoriedkovej vlákniny ako súčasť bežného stravovania po dobu 8 týždňov na vybrané antropometrické a biochemické parametre. V rámci posudzovania zmien vybraných antropometrických parametrov po 8 týždňovej konzumácii čučoriedkovej vlákniny sa zistil nárast priemerných hodnôt všetkých sledovaných parametrov telesného zloženia. Tieto zmeny neboli signifikantné ($p > 0,05$). V štúdiách Higuera-Hernández a kol. (2019) (konzumácia 50 g čučoriedok 30 dní), Habanova a kol. (2022) (každodenné pitie 300 ml šťavy z bobuľového ovocia a jablka 6 týždňov) zistili, že zmeny pozorované v hodnotách antropometrických parametrov nadhmotných a obéznych žien neboli štatisticky významné ($p > 0,05$). Konzumácia čučoriedkovej vlákniny nemala významný vplyv na hodnoty systolického a diastolického tlaku aj keď ich priemerné hodnoty mierne klesli. Metaanalýza Delpino a kol. (2023) potvrdila neutrálne účinky konzumácie čučoriedok na hodnoty krvného tlaku. Signifikantné zníženie krvného tlaku vplyvom konzumácie čučoriedok zaznamenali Johnson a kol. (2015). Vitamíny, minerálne látky, polyfenoly a flavonoidy preukázali priaznivé účinky na zlepšenie funkcie endotelu, krvného tlaku, lipidového profilu a zápalových markerov (Hügel a kol., 2016; Bondonno a kol., 2017). Tmavo sfarbené bobuľové ovocie ako sú čučoriedky bohaté na vitamíny, polyfenoly, flavonoidy a iné bioaktívne látky, môže prispieť k pozitívnej úprave rizikových faktorov kardiovaskulárnych ochorení (Wu a kol., 2018). V súlade s týmito tvrdeniami sme zistili pozitívne zmeny lipidového profilu (zníženie priemernej hodnoty LDL cholesterolu, zvýšenie priemernej hodnoty HDL cholesterolu a zníženie pomeru LDL/HDL) a tiež aj zápalových markerov, ktorých priemerné hodnoty klesali.

ZÁVER

V sledovanej skupine žien s nadhmotnosťou/obezitou s rizikom kardiovaskulárnych ochorení viedla konzumácia 100 % prírodnej čučoriedkovej vlákniny obsahujúcej množstvo bioaktívnych látok v rámci bežného stravovania k pozitívnej úprave LDL a HDL cholesterolu, pomeru LDL/HDL. Zistenia tiež naznačujú, že bioaktívne látky obsiahnuté v čučoriedkovej vláknine môžu mať pozitívny vplyv na zápalové markery. Aj napriek našim zisteniam je potrebné sa danej problematike ďalej venovať.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dlhodobý strategický výskum prevencie, intervencie a mechanizmov obezity a jej komorbidít, kód ITMS: 313011V344, spolufinancovaného zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja (50%) a vďaka podpore projektu KEGA 003SPU-4/2022 Prepojenie vysokoškolského vzdelávania s praxou prostredníctvom implementácie praktickej výučby v rámci nového predmetu Nutričné poradenstvo (50%).

LITERATÚRA

1. Aloo, S. O. et al. (2023). "Insights on Dietary Polyphenols as Agents against Metabolic Disorders: Obesity as a Target Disease", *Antioxidants (Basel)*, 12(2), pp. 416. doi:10.3390/antiox12020416
2. Bondonno, N. P. et al. (2018). "Flavonoid-Rich Apple Improves Endothelial Function in Individuals at Risk for Cardiovascular Disease: A Randomized Controlled Clinical Trial.", *Mol Nutr Food Res*, 62(3), 1700674. doi:10.1002/mnfr.201700674
3. Cunha, E. B. B. et al. (2018). "Evaluation of Lipid Profile in Adolescents", *Int. J. Cardiovasc. Sci.*, 31(4), pp. 367-73.
4. de Oliveira, M. S. et al. (2022). "Blueberry Consumption and Changes in Obesity and Diabetes Mellitus Outcomes: A Sys-

- tematic Review”, *Metabolites.*, 13(1), pp. 19. doi:10.3390/metabo13010019
5. **Delpino, F. M. et al. (2023).** “The effects of blueberry and cranberry supplementation on blood pressure in patients with cardiovascular diseases: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials”, *Phytother Res.*, 2023. doi:10.1002/ptr.8069
 6. **Guo, X. et al. (2016).** “Associations of dietary intakes of anthocyanins and berry fruits with risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies”, *Eur J Clin Nutr.*, 70(12), pp. 1360-1367. doi:10.1038/ejcn.2016.142.
 7. **Habanova, M. et al. (2022).** “Modulation of Lipid Profile and Lipoprotein Subfractions in Overweight/Obese Women at Risk of Cardiovascular Diseases through the Consumption of Apple/Berry Juice”, *Antioxidants (Basel).*, 11(11), pp. 2239. doi:10.3390/antiox11112239
 8. **Higuera-Hernández, M. F. et al. (2019).** “Blueberry intake included in hypocaloric diet decreases weight, glucose, cholesterol, triglycerides and adenosine levels in obese subjects”, *J Funct Foods.*, 60, 103409. doi: doi.org/10.1016/j.jff.2019.06.011
 9. **Hruby, A. et al. (2016).** “Determinants and Consequences of Obesity”, *Am J Public Health*, 106(9), pp. 1656-1662. doi:10.2105/AJPH.2016.303326
 10. **Hügel, H. M. et al. (2016).** “Polyphenol protection and treatment of hypertension”, *Phytomedicine*, 23(2), pp. 220-231. doi:10.1016/j.phymed.2015.12.012
 11. **Jennings, A. et al. (2014).** “Intakes of anthocyanins and flavones are associated with biomarkers of insulin resistance and inflammation in women”, *J Nutr.*, 144(2), pp. 202-208. doi:10.3945/jn.113.184358
 12. **Jin, X. et al. (2023).** “Pathophysiology of obesity and its associated diseases”, *Acta Pharm Sin B.*, 13(6), pp. 2403-2424. doi:10.1016/j.apsb.2023.01.012
 13. **Johnson, S. A. et al. (2015).** “Daily blueberry consumption improves blood pressure and arterial stiffness in postmenopausal women with pre- and stage 1-hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial”, *J Acad Nutr Diet.*, 115(3), pp. 369-377. doi:10.1016/j.jand.2014.11.001
 14. **Koponen, J. M. et al. (2007).** “Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland”, *J Agric Food Chem.*, 55(4), pp. 1612-1619. doi:10.1021/jf062897a
 15. **Kouki, R. et al. (2011).** “Food consumption, nutrient intake and the risk of having metabolic syndrome: the DR’s EXTRA Study”, *Eur J Clin Nutr.*, 65(3), pp. 368-377. doi:10.1038/ejcn.2010.262
 16. **Muntner, P. et al. (2019).** “Measurement of Blood Pressure in Humans: A Scientific Statement From the American Heart Association” *Hypertension.*, 73(5), pp. e35-e66. doi:10.1161/HYP.0000000000000087
 17. **NCEP ATP III (2001).** “Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)”, *JAMA.*, 285(19), pp. 2486-2497. doi:10.1001/jama.285.19.2486
 18. **Olas, B. (2018).** “Berry Phenolic Antioxidants - Implications for Human Health?”, *Front Pharmacol.*, 9, pp. 78. doi:10.3389/fphar.2018.00078
 19. **Reilly, J. J., Kelly J. (2011).** “Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review”, *Int J Obes (Lond)*, 35(7), pp. 891-898. doi:10.1038/ijo.2010.222
 20. **Tian, C. et al. (2020).** “Polyphenols, Oxidative Stress, and Metabolic Syndrome”, *Oxid Med Cell Longev.*, 2020, 7398453. doi:10.1155/2020/7398453
 21. **WHO. (2021).** Dostupné na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (cit. 26.01.2024)
 22. **World Obesity Atlas. (2023).** Dostupné na: <https://data.worldobesity.org/publications/?cat=19> (cit. 26.01.2024)
 23. **Wu, X. et al. (2018).** “Prevention of Atherosclerosis by Berries: The Case of Blueberries”, *J Agric Food Chem*, 66(35), pp. 9172-9188. doi:10.1021/acs.jafc.8b03201



Laboratórna Diagnostika, XXIX, 1, 2024: 22–29

VYUŽITIE STANOVENIA LATENTNÝCH A AKTÍVNYCH FORIEM MATRIXOVÝCH METALOPROTEINÁZ V DIAGNOSTIKE A MONITORINGU GASTROINTESTINÁLNYCH OCHORENÍ

DETERMINATION OF LATENT AND ACTIVE FORMS OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR USE IN THE DIAGNOSIS AND MONITORING OF GASTROINTESTINAL DISEASES

Ivana Večurkovská¹, Marek Stupák¹, Beáta Hubková¹, Jana Kačuchová², Peter Bohuš³,
Jana Mašlanková¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF, LF UPJŠ v Košiciach, Košice

²I. chirurgická klinika UPJŠ LF a UNLP, LF UPJŠ v Košiciach, Košice

³Ústav patológie UPJŠ LF a UNLP, LF UPJŠ v Košiciach, Košice

jana.maslankova@upjs.sk

SÚHRN

Skupina Zn^{2+} -dependentných enzýmov, *matrixových metaloproteináz*, je zapojená do vzniku a progresie mnohých závažných ochorení. Aktuálne publikácie potvrdzujú zvýšený výskyt najmä MMP-2, -7 a -9 u pacientov s ochoreniami hrubého čreva a konečníka. Cieľom predkladanej práce bolo zistiť výskyt latentných a aktívnych foriem vybraných MMP u týchto pacientov pomocou metódy zymografie. Zistili sme, že u pacientov so zápalovými ochoreniami čreva, konečníka a u pacientov s kolorektálnym karcinómom je významný rozdiel medzi týmito formami vybraných MMP a že tieto odlišnosti súvisia s pohlavnou diferenciáciou a lokalizáciou nálezu. Výsledky tejto pilotnej štúdie by mohli podporiť budúci klinický výskum, ktorý by v klinickej praxi mohol pomôcť pri plánovaní stratégie liečby viacerých ochorení.

Kľúčové slová: matrixové metaloproteinázy; zymografia

ABSTRACT

A group of Zn^{2+} -dependent enzymes, the matrix metalloproteinases, is involved in the development and progression of many serious diseases. Recent publications confirm an increased prevalence of MMP-2, -7 and -9 in particular in patients with colorectal diseases. The aim of the present study was to determine the occurrence of latent and active forms of selected MMPs in these patients using the zymography method. We found that there is a significant difference between these forms of selected MMPs in patients with inflammatory bowel diseases, rectal diseases and colorectal carcinoma patients and that these differences are related to sexual differentiation and localization of the findings. The results of this pilot study could support future clinical research, which in clinical practice could help in planning treatment strategies for multiple diseases.

Key words: matrix metalloproteinases; zymography

ÚVOD

Zápalové ochorenia gastrointestinálneho traktu (GIT; GastroIntestinal Tract) sú závažným medicínskym a sociálno-zdravotníckym problémom. V posledných rokoch sa monitoruje nárast incidencie a prevalencie týchto ochorení najmä vo vyspelých krajinách. Ochorenia GIT sú spojené s výrazným znížením kvality života, ako a s jeho skrátením. Benígne nálezy môžu metamorfovať do malígnych, často bez výrazných príznakov (Zhang a kol., 2023). Vznik malígnych novotvarov, napríklad počas kolorektálneho karcinómu (CRC; ColoRectal Carcinoma), je v prípade ich resekovateľnosti liečený chirurgicky. Komplikácie nastávajú, ak je nádor neresekovateľný a/alebo ak sú prítomné vzdialené metastázy. U takýchto pacientov volia onkológovia (neo)adjuvantnú terapiu, ktorá je často nešpecifická, cytotoxická a vedie k závažným sekundárnym komplikáciám (Kumar a kol., 2023). Je preto nesmierne dôležité nájsť pre ochorenia GIT spoľahlivé diagnostické a prognostické markery, ktoré by lekárom pomohli rozhodnúť o najvhodnejšej stratégii liečby.

V posledných rokoch sa do popredia záujmu vedecích výskumných tímov v oblasti diagnostiky markerov kolorektálneho karcinómu dostáva úloha *matrixových metaloproteináz* (Zhong a Khalil, 2019). *Matrixové metaloproteinázy* (MMP, matrixíny, kolagenázy stavovcov) sú vysoko homológne enzýmy, ktoré obsahujú ión zinku (Zn^{2+}) v katalytickej oblasti a sú schopné degradovať rôzne zložky extracelulárneho matrixu (ECM; ExtraCellular Matrix): kolagén, elastín, laminín a ďalšie (Almutairi a kol., 2023). V súčasnosti je známych 28 typov MMP, ktoré sú kategorizované do 7 podtried podľa preferovaného substrátu alebo proteolytických funkcií (Napoli a kol. 2020). MMP sú syntetizované a vylučované vo svojej neaktívnej pro-forme. V latentnom zymogéne sulfhydrylová skupina voľného cysteínového zvyšku katalytickej domény interaguje so zinkovým iónom, čím udržuje MMP v neaktívnej forme. Pre aktiváciu MMP je nevyhnutné z ich štruktúry odstrániť pro-doménu, najčastejšie účinkom iných proteáz (katepsín K, plazmín, MMP-2) (Loffek a kol., 2011).

Matrixová metaloproteináza 9 (EC 3.4.24.35.; želatináza B, 92 kDa typ IV kolagenáza) patrí spolu s MMP-2 do 2. skupiny MMP- želatináz, vďaka svojej vysoko účinnej proteolytickej aktivite štiepiť želatínu, tepelne denaturovanú formu kolagénu (Laronha a Caldeira, 2020). MMP-9 je syntetizovaný najmä monocytmi, zápalovými makrofágmi, ale aj neutrofilnými granulocytmi

a rakovinovými bunkami. Syntéza MMP-9 v iných typoch buniek prebieha ako odpoveď na stimuláciu indukovanú cytokínmi, napr. IF- α , PDGF, GM-CSF, či TGF- β . Štiepením koordinačnej väzby medzi cysteínom v amino-terminálnom propeptide a iónom zinku v aktívnom centre vzniká z latentnej pro-formy (92 kDa) aktívna forma MMP-9 u ktorej často dochádza aj k autoprotolyze propeptidovej cysteín-obsahujúcej domény, v dôsledku čoho má aktívna forma nižšiu molekulovú hmotnosť (82 kDa) (Aughoff a kol., 2022).

Proteolyticky aktívna MMP-9 ovplyvňuje proteínové zloženie ECM, nakoľko degraduje jeho hlavné proteínové zložky. Zmeny v ECM sú prísne kontrolované a prispievajú k normálnemu vývoju tkaniva, zápalu a hojeniu rán. Na druhej strane však môžu podporovať fibrózu, vznik a progresiu nádorových procesov. Zvýšené koncentrácie MMP-9 korelujú so zlou prognózou nádorových ochorení a v mnohých štúdiách sa považujú za tumor podporujúce (Barabás a kol., 2021; Li a kol., 2022; Zeng a kol., 2022).

Matrixová metaloproteináza 2 (EC 3.4.24.24.; želatináza A, 72 kDa typ IV kolagenáza) zdieľa mnohé spoločné charakteristiky s MMP-9, akými sú štruktúrne znaky, syntéza, spôsob aktivácie a hlavné funkcie (Jabłońska-Trypuć a kol., 2016). Aktívna forma MMP-2 má 66 kDa (Nishida a kol., 2008). Ide o najrozšírenejšiu metaloproteinázu v tejto enzýmovej rodine, nakoľko je zapojená do najširšieho spektra biologických procesov akými sú degradácia ECM, proliferácia, migrácia a apoptóza buniek, angiogenéza, zápal, epiteliálno mezenchymálny transport (EMT; Epithelial-Mesenchymal Transition) a iných, čím sa podieľa na vzniku a progresii mnohých ochorení (Buttacavoli a kol., 2021).

Najmenší enzým MMP, MMP-7 (matrilýzín-1), je exprimovaný endotelovými bunkami žliaz a slizníc, keratinocytmi, fibroblastami a makrofágmi (Burke, 2004), ale aj mnohými typmi nádorových buniek (najmä v nádoroch tráviaceho, močového a reprodukčného systému), pričom inhibuje apoptózu nádorových buniek, znižuje ich adhéziu a indukuje angiogenézu (Liao a kol., 2021). Neaktívny pro-MMP-7 (28 kDa) sa štiepi na aktívnu formu (19 kDa) najmä pôsobením oxidačného stresu (Bassiouni a kol., 2021). Hlavnými substrátmi pre aktívnu MMP-7 sú nehelikálne segmenty natívných kolagénov (typy IV, V, IX, X a XI), želatína, elastín a fibronektín (Mustafa a kol., 2022).

V databáze ClinicalTrials.gov je zverejnených niekoľko klinických štúdií, ktoré sú založené na stanovení expresie

MMP v diagnostike, či predikcii CRC. Štúdia „Matrixové metaloproteinázy po operácii a/alebo rádiografreknčnej ablácii u pacientov s metastázami kolorektálneho karcinómu v pečeni“ (NCT00899210) analyzovala kinetiku postoperatívnych zmien sérových hladín MMP (MMP-1, -2, -7, a -9) a ich inhibítorov (TIMP-1, -2) v závislosti od použitej operačnej techniky/ rádiografreknčnej ablácii. Štúdia mala pomôcť lekárom predpovedať pooperačné riziko recidívy, reakciu pacientov na liečbu, či zistiť koreláciu rizika recidívy s operačnou technikou. Štúdia však neprinesla signifikantné výsledky.

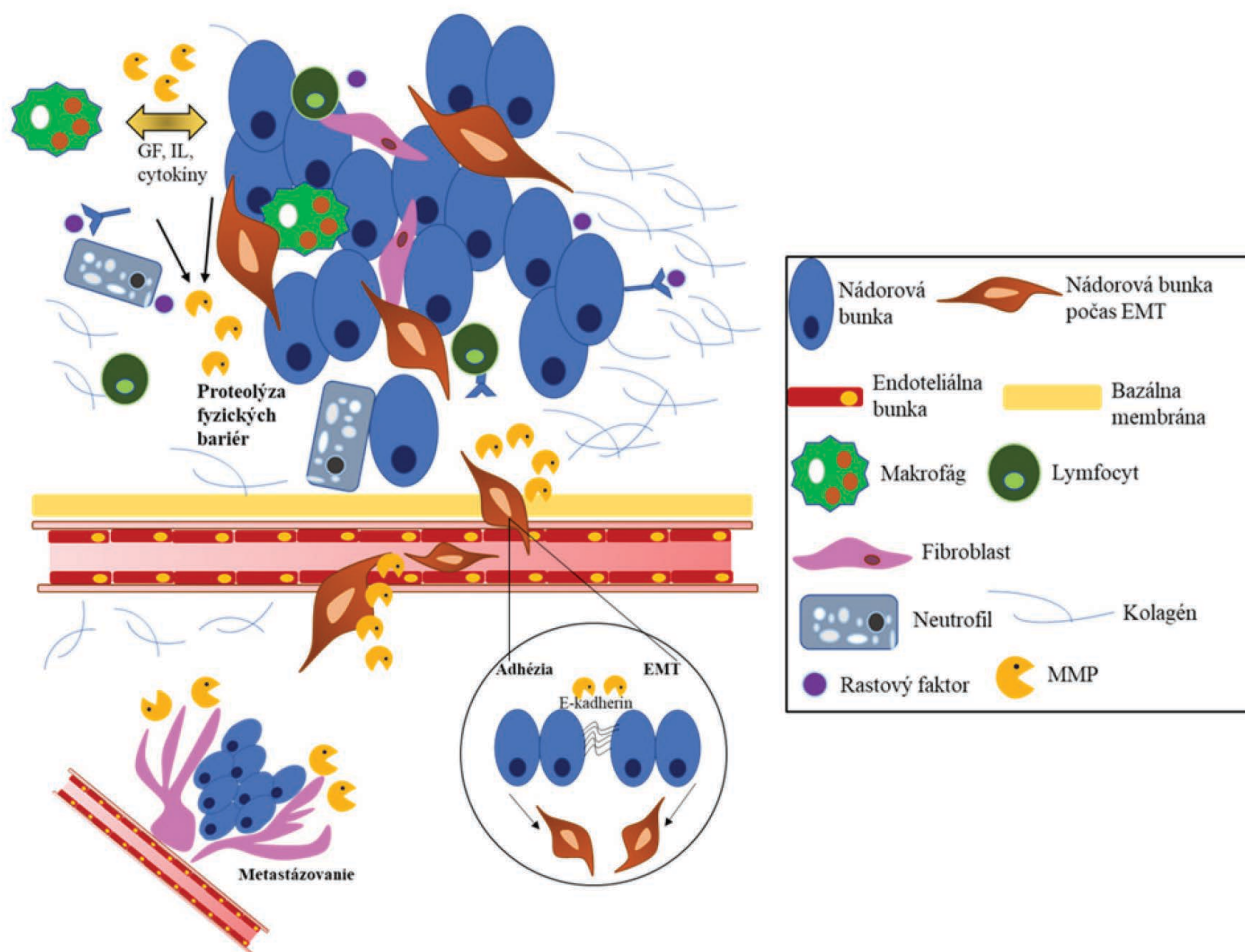
Cieľom ďalšej klinickej štúdie „Expresia matrilýzínu v rôznych štádiách kolorektálnych nádorov“ (NCT01570452) bolo analyzovať MMP-7 v čreve a lymfatických uzlinách rôznych štádií nádorov pomocou imunoanalytických metód ELISA, Western Blott a imunohistochemickej analýzy a vyhodnotiť jeho expresiu ako potenciálny biomarker CRC u chirurgicky liečených pacientov. Štúdia potvrdila zvýšenie MMP-7 so zvyšujúcou sa dyspláziou a štádiom

CRC v nádorovom tkanive. Expresia MMP-7 by teda mohla pomôcť pri diagnostike lokálneho pokročilého nádoru, avšak štúdia sa nedostala do ďalšej klinickej fázy. Úlohy MMP počas tumorigenézy sú znázornené na obrázku (Obr.1).

Nakoľko existuje mnoho štúdií, ktoré potvrdzujú zvýšené expresie MMP-2, -7 a -9 počas zápalových a nádorových ochorení tráviaceho traktu, cieľom predkladanej práce bolo zistiť expresie jednotlivých foriem MMP vzhľadom na pohlavie, vek a lokalizáciu nálezu.

MATERIÁL A METÓDA

Analyzovanú vzorku tvorilo 32 pacientov, ktorí boli prijatí na 1. chirurgickú kliniku UPJŠ LF a UNLP v Košiciach kvôli operačnému zákroku hrubého čreva a/alebo konečníka. 8 pacientom (25%) bol diagnostikovaný benígny nález (divertikulitída, hemoroidy, adenóm) a 24 pacientom (75%) adenokarcinóm. Na základe TNM klasifikácie bolo do 1. klinického štádia CRC zaradených 8 pacientov (33,33%), 8



Obrázok 1 Úlohy matrixových metaloproteináz počas tumorigenézy

(33,33%) do 2. štádia CRC a 8 (33,33%) do 3. štádia CRC. Analyzovanú vzorku tvorilo 14 žien (43,75%) a 18 mužov (56,25%) s priemerným vekom 66 rokov (+/-9). Počas operačného zákroku bola pacientom odobraná vzorka tkaniva, ktorá bola následne homogenizovaná v extrakčnom pufrí (Invitrogen), centrifugovaná 18 000g/20min/4oC a supernatant bol uchovávaný pri teplote -80oC do doby analýzy. Všetci pacienti boli o štúdiu poučení a podpísali informovaný súhlas. Protokol štúdie bol schválený Etickou komisiou 2020/EK/06042.

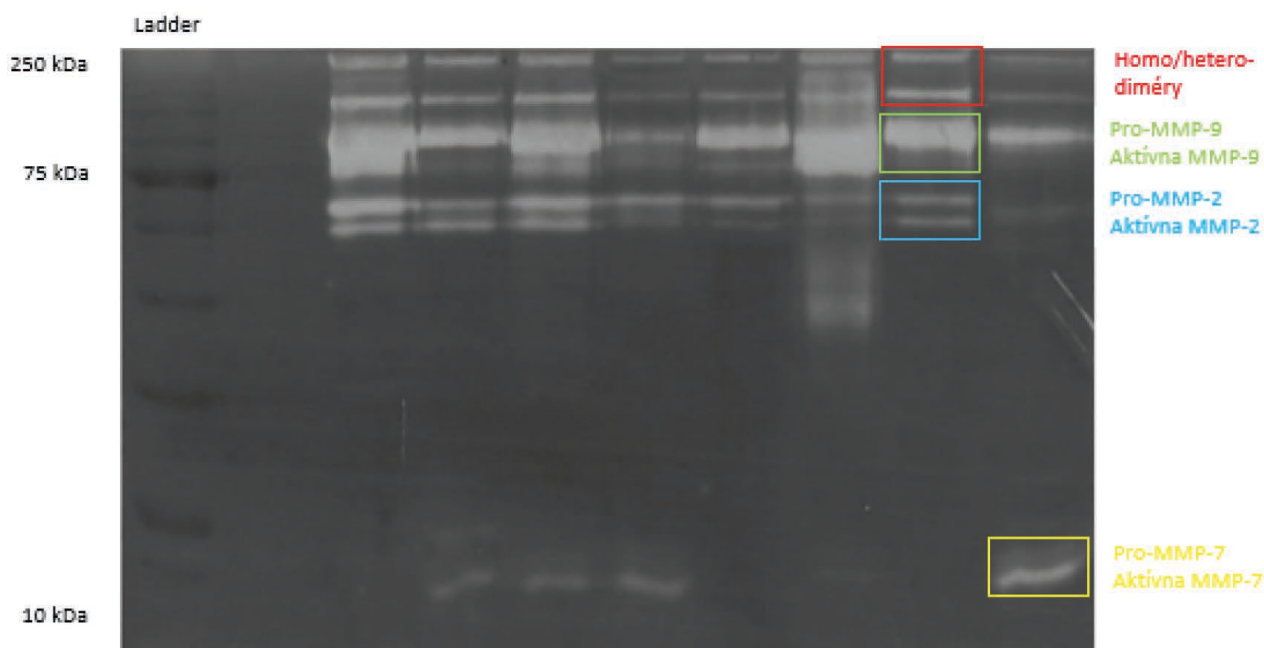
Na detekciu aktívnych/neaktívnych foriem vybraných MMP bola použitá želatínová zymografia, ktorá prebiehala v 10% polyakrylamidovom géli kopolymerizovanom so želatínou (1mg/ml) pri 150V. Po elektroforéze bol gél trikrát premytý v 2,5%-nom povrchovo aktívnom roztoku Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a inkubovaný v renaturačnom roztoku obsahujúcom ióny Zn^{2+} a Ca^{2+} cez noc pri 37°C. Po inkubácii bol gél farbený s 0,5%-ným roztokom Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad) a následne odfarbený v roztoku metanolu a kyseliny octovej. Enzymová aktivita jednotlivých typov MMP bola pozorovaná v podobe bielych pásov na modrom podklade gélu (Obr.2). Výsledky boli vyhodnotené v programe ImageJ ako plochy píkov jednotlivých foriem MMP podľa denzity prúžkov. Tie boli následne prepočítané na koncentráciu proteínu a pre efektívnejšie zobrazenie v spoločných grafoch boli použité logaritmy hodnôt. Na štatistické vyhodnotenia bol použitý

neparametrický Kruskal-Wallisov test a Mann-Whitneyho test. Výsledky s $p < 0,05$ boli posúdené ako štatisticky signifikantné.

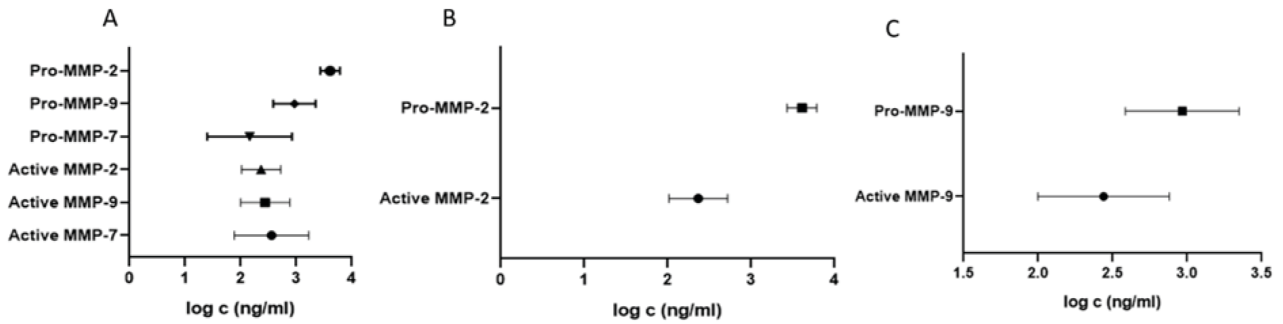
VÝSLEDKY

Rozdiely v expresii jednotlivých foriem MMP boli najskôr analyzované v závislosti od pohlavia pacientov. Najviac sa u pacientov so zápalom/nádorom čreva vyskytovala pro-MMP-2, tak u žien (medián 3,621; Obr.3A), ako aj u mužov (medián 3,604; Obr.4A) a naopak, najmenej sa vyskytovala pro-MMP-7 (medián 1,763 u žien; Obr.3A a 1,933 u mužov; Obr.4A). Rozdiely medzi aktívnymi MMP-2 a pro-MMP-2 boli štatisticky signifikantné u žien (Obr.3B) aj u mužov (Obr.4B), rovnako ako rozdiely medzi aktívnymi MMP-9 a pro-MMP-9 (Obr.3C, Obr.4C). Rozdiely medzi aktívnymi MMP-7 a pro-MMP-7 boli štatisticky nesignifikantné u oboch pohlaví.

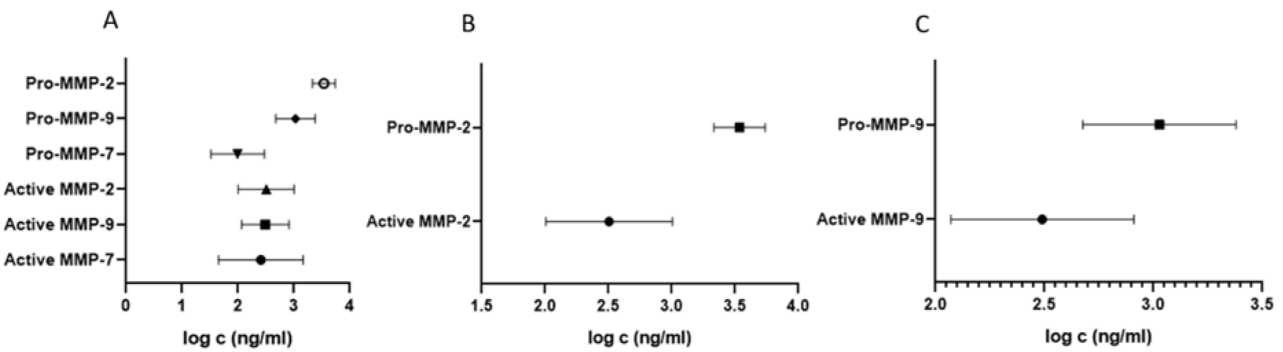
U žien sa zápal/nádor potvrdil najčastejšie v oblasti konečníka. V týchto prípadoch bola zvýšená expresia najmä pro-MMP-2 (medián 3,489) a naopak, najmenšia expresia bola zaznamenaná v prípade aktívnej formy MMP-9 (medián 1,893; Obr.5A). Rozdiely medzi aktívnymi MMP-2 a pro-MMP-2 (Obr.5B), aj aktívnymi MMP-9 a pro-MMP-9 (Obr.5C) boli štatisticky signifikantné. Rozdiely medzi aktívnymi MMP-7 a pro-MMP-7 boli štatisticky nesignifikantné.



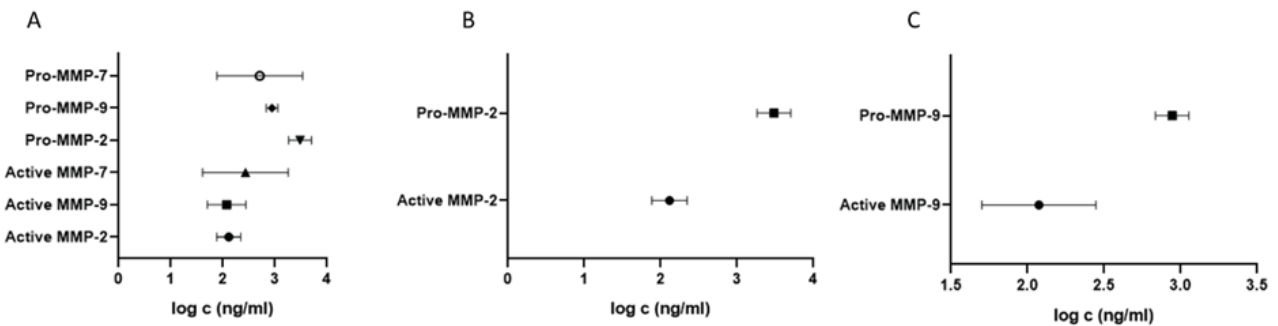
Obrázok 2 Ukážka zymogramu tkanivových homogenátov pacientov s nálezmi v čreve a/alebo konečníku



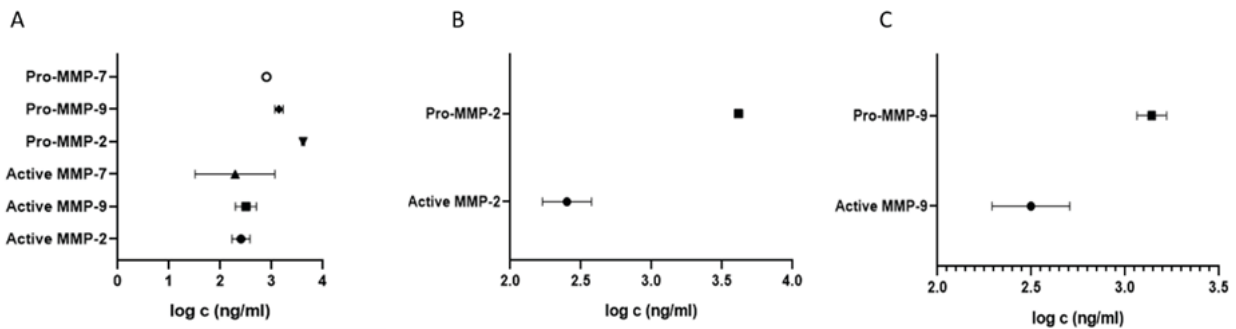
Obr.3 A) Vybrané formy MMP u žien (Kruskal-Wallis $p < 0,0001$ ****); B) MMP-2 u žien (Mann-Whitney $p < 0,0001$ ****); C) MMP-9 u žien (Mann-Whitney $p = 0,0014$ **)



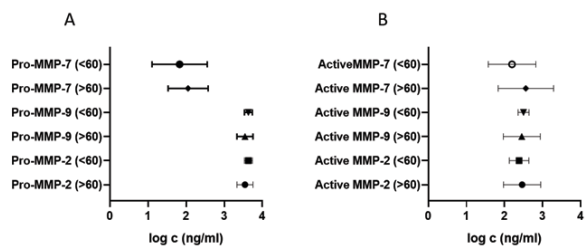
Obr.4 A) Vybrané formy MMP u mužov (Kruskal-Wallis $p < 0,0001$ ****); B) MMP-2 u mužov (Mann-Whitney $p < 0,0001$ ****); C) MMP-9 u mužov (Mann-Whitney $p = 0,0004$ **)



Obr.5 A) Vybrané formy MMP u žien s rektálnym nádorom (Kruskal-Wallis $p = 0,0076$ **), B) MMP-2 u žien s rektálnym nádorom (Mann-Whitney $p = 0,0076$ **), C) MMP-9 u žien s rektálnym nádorom (Mann-Whitney $p = 0,0079$ **)



Obr.6 A) Vybrané formy MMP u mužov s nádorom v colon transversum (Kruskal-Wallis $p = 0,0321$ *), B) MMP-2 u mužov s nádorom v colon transversum (Mann-Whitney $p > 0,05$), C) MMP-9 u mužov s nádorom v colon transversum (Mann-Whitney $p > 0,05$)



Obr. 7 A) Pro-formy vybraných MMP podľa veku pacientov (Kruskal-Wallis $p < 0,0001$ *) B) Aktívne formy MMP podľa veku pacientov (Kruskal-Wallis $p > 0,05$)**

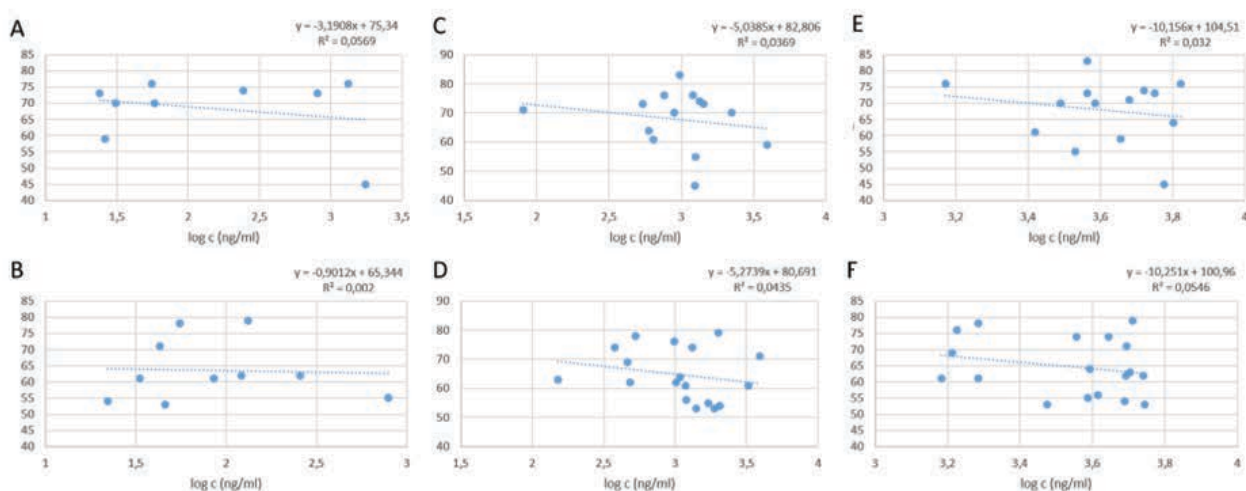
U mužov sa zápal/nádor potvrdil najčastejšie v oblasti colon transversum. U týchto pacientov, podobne ako u žien so zápalom/nádorom v oblasti konečníka, bola zvýšená expresia najmä v prípade pro-MMP-2 (medián 3,615). Najmenšia koncentrácia bola zaznamenaná v prípade aktívnej formy MMP-2 (medián 2,485; Obr.6A). Rozdiely medzi neaktívnymi a aktívnymi formami MMP-2 (Obr.6B), MMP-9 (Obr.6C) a MMP-7 boli štatisticky nesignifikantné.

Po zadelení pacientov na základe veku do skupín nad, resp. pod 60 rokov sa nepotvrdil štatisticky signifikantný rozdiel medzi jednotlivými formami MMP (Obr.7A).

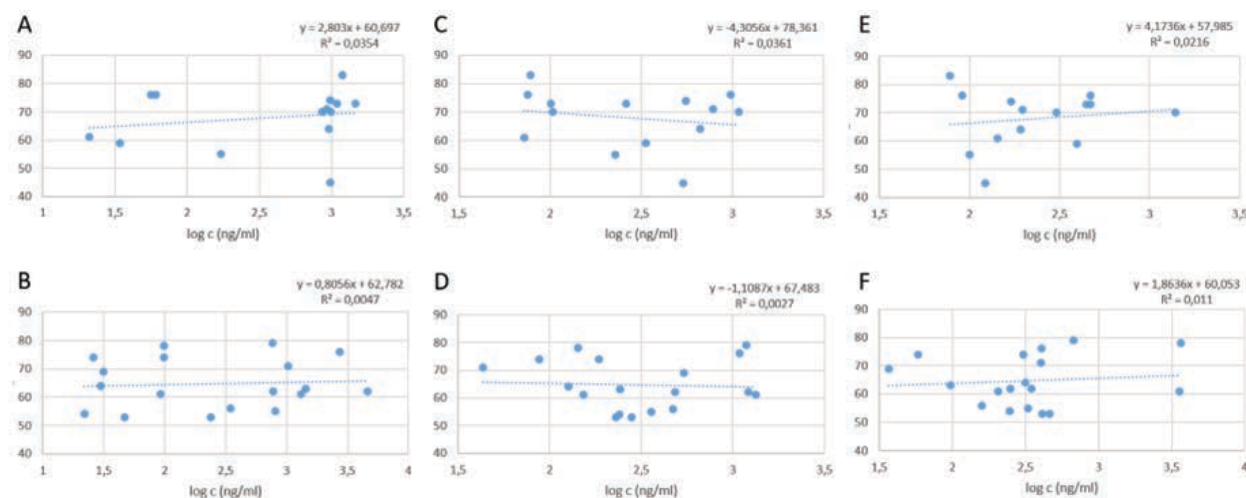
U žien je možné pozorovať o niečo výraznejšie sklony trendových spojnic v grafoch porovnávajúcich súvislosť medzi vekom a pro-MMP (Obr.8), ako aj v grafoch porovnávajúcich súvislosť medzi vekom a aktívnymi MMP (Obr.9), rovnica dôveryhodnosti (R^2) je však vo všetkých prípadoch veľmi nízka.

DISKUSIA

Spočiatku sa predpokladalo, že MMP plnia funkcie len počas fyziologických procesov (rast a vývin, hojenie rán a ďalšie), no neskôr sa ukázalo, že sú kľúčovými regulátormi mnohých zápalových procesov. Mohutnou degradáciou ECM a modifikáciou významných biologických dráh sa zapájajú do progresie viacerých typov nádorov



Obr. 8 Pro-MMP-7 u žien (A) a u mužov (B); Pro-MMP-9 u žien (C) a u mužov (D), Pro-MMP-2 u žien (E) a u mužov (F) podľa veku



Obr. 9 Aktívna MMP-7 u žien (A) a u mužov (B); Aktívna MMP-9 u žien (C) a u mužov (D), Aktívna MMP-2 u žien (E) a u mužov (F) podľa veku

(Pezeskhian a kol., 2021). V našej štúdií sme Kruskal-Wallisovým testom potvrdili ($p < 0,0001$), že u pacientov so zápalovým ochorením hrubého čreva a konečníka a u CRC pacientov je štatisticky signifikantný rozdiel medzi jednotlivými formami MMP-2, -9 a -7. Tieto ochorenia sú sprevádzané najmä vysokými hladinami pro-MMP-2. Nakoľko podľa WHO sú na ochorenia gastrointestinálneho traktu náchylnejší viac muži ako ženy, rozhodli sme sa vybrané MMP analyzovať najmä vzhľadom na pohlavie a určiť ich odlišnosti. Pri porovnaní pro-MMP-2 a aktívnej MMP-2 bol potvrdený štatisticky signifikantný rozdiel ($p < 0,0001$) v oboch skupinách pacientov. To platilo aj pri porovnávaní pro-MMP-9 a aktívnej MMP-9. U žien bol potvrdený štatisticky signifikantný rozdiel na úrovni $p = 0,0014^{**}$ a u mužov $p = 0,0004^*$. Tieto výsledky naznačujú, že stanovenie jednotlivých foriem MMP by mohlo slúžiť ako doplnková metóda, ktorá by sa využívala pri monitorovaní úspešnosti liečby zápalových ochorení, či kolorektálneho karcinómu.

Aby sa bližšie špecifikovala skupina pacientov, pre ktorých by bola táto liečba účinná, pokračovali sme v hodnotení hladín jednotlivých MMP u pacientov s rôznou lokalizáciou nálezu. Podľa literatúry sa u pacientov vyskytuje o niečo častejšie ľavostranný primárny nález, kam sa radí aj oblasť konečníka a distálna tretina priečného tračníka hrubého čreva (Cai a kol., 2018). Zistili sme, že ženy v našej skupine pacientov mali najčastejšie nádor v oblasti konečníka. V týchto prípadoch bol opäť vysoko štatisticky signifikantný rozdiel medzi pro-MMP-2 a aktívnou MMP-2 ($p = 0,0076$), ako aj pro-MMP-9 a aktívnou MMP-9. U mužov, ktorí mali najčastejšie diagnostikovaný nádor v priečnom tračníku, sa tieto rozdiely nepotvrdili. Zdá sa teda, že u žien s ľavostranným primárnym nádorom (LCC; Left-sided Colorectal Cancer) by bolo vhodné aplikovať postupy na znižovanie hladín pro-MMP-2 a pro-MMP-9.

Podľa Šafčáka a kol. (2020) sú starší pacienti, pre ktorých sú typické komorbidity, postihnutia a orgánovo-špecifické fyziologické zmeny, špecifickou populáciou pacientov. Rutinne používaný liečebný postup u nich musí byť vzhľadom na mnohé faktory modifikovaný. V práci sme preto pristúpili aj k zadeleniu pacientov na skupinu starších a skupinu mladších ako 60 rokov. V tomto prípade sa potvrdil štatisticky signifikantný rozdiel v hladinách pro-foriem jednotlivých MMP. Pacienti nad 60 rokov majú vyššie hladiny pro-MMP-7 a nižšie hladiny pro-MMP-2 a pro-MMP-9 v porovnaní s pacientami pod 60 rokov. Následne u skupín

pacientov zadelených podľa veku a pohlavia síce možno pozorovať o niečo výraznejšie sklony trendových spojnic v grafoch porovnávajúcich súvislosť medzi vekom a jednotlivými formami vybraných MMP u žien, rovnica dôveryhodnosti je však vo všetkých prípadoch veľmi nízka. Vek sa teda pri ženských ani mužských pacientoch nedá brať ako faktor, ktorý by pomáhal pri špecifikácii skupiny pacientov, u ktorej by bolo vhodné stanovenie foriem MMP z dôvodu zefektívnenia liečebného postupu.

Práca navyše preukázala, že metóda želatínovej zymografie je veľmi vhodnou možnosťou odlišenia jednotlivých foriem MMP. Jej výhodou je, že v porovnaní s inými bežne používanými metodikami, je omnoho lacnejšia. Vďaka týmto charakteristikám má želatínová zymografia vysoký potenciál využitia v klinickej praxi.

ZÁVER

Proteíny MMP sa prostredníctvom zložitých mechanizmov zapájajú do vzniku ochorení čreva a konečníka a prechodu z pred-rakovinových lézií a polypov do pokročilého CRC. Stanovenie jednotlivých foriem MMP-2, -9 a -7 by mohlo byť doplňujúcou metódou pri plánovaní postupu liečby z pohľadu využitia cieľených inhibítorov týchto MMP. Naša práca predstavuje prvý krok pre budúce klinické výskumy v tejto oblasti na Slovensku. V spolupráci s chirurgami a onkológmi plánujeme rozšíriť analyzovanú vzorku pacientov a začleniť formy MMP do panelu markerov, ktoré je potrebné sledovať pri zápalových ochoreniach hrubého čreva, konečníka a CRC.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla v rámci riešenia projektu VEGA 1/0435/23: Štúdium úlohy nekódujúcich RNA a zloženie metabolómu pri endometrióze a karcinóme endometria.

LITERATÚRA

1. Augoff, K. et al. (2022) "MMP9: A Tough Target for Targeted Therapy for Cancer", *Cancers (Basel)*, 14(7), p. 1847. doi: 10.3390/cancers14071847.
2. Barabás, L. et al. (2021) "The Behavior of MMP-2, MMP-7, MMP-9, and Their Inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in Adeno-ma-Colorectal Cancer Sequence", *Digestive Diseases*, 39(3), p. 217-224. doi: 10.1159/000511765.
3. Bassiouni, W. et al. (2021) "Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease", *The FEBS Journal*, 288(24), p. 7162-7182. doi: 10.1111/febs.15701.

4. **Bufu, T. et al. (2018)** "Celastrol inhibits colorectal cancer cell proliferation and migration through suppression of MMP3 and MMP7 by the PI3K/AKT signaling pathway", *Anticancer Drugs*, 29(6), p. 530-538. doi: 10.1097/CAD.0000000000000621.
5. **Burke, B. (2004)** "The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity", *Immunobiology*, 209(1-2), p. 51-6. doi: 10.1016/j.imbio.2004.04.005.
6. **Buttacavoli, M. et al. (2021)** "Integrated Multi-Omics Investigations of Metalloproteinases in Colon Cancer: Focus on MMP2 and MMP9", *International Journal of Molecular Science*, 22(22), p. 12389. doi: 10.3390/ijms222212389.
7. **Cai, X. et al. (2018)** "The effect of the primary tumor location on the survival of colorectal cancer patients after radical surgery", *International Journal of Medical Science*, 15(14), p. 1640-1647. doi: 10.7150/ijms.27834.
8. **Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M. and Rosochacki, S. (2016)** "Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(sup1), p. 177-183. doi: 10.3109/14756366.2016.1161620.
9. **Laronha, H. and Caldeira, J. (2020)** "Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases", *Cells*, 9(5), p. 1076. doi: 10.3390/cells9051076.
10. **Li, X. et al. (2022)** "Clinical significance of MMP-9 over-expression in endometrial cancer: A PRISMA-compliant meta-analysis", *Frontiers in Oncology*, 12, p. 925424. doi: 10.3389/fonc.2022.925424.
11. **Liao, H.Y. et al. (2021)** "Roles of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) in cancer", *Clinical Biochemistry*, 92, p. 9-18. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2021.03.003.
12. **Klupp, F. et al. (2016)** "Serum MMP7, MMP10 and MMP12 level as negative prognostic markers in colon cancer patients", *BMC Cancer*, 16, p. 494. doi: 10.1186/s12885-016-2515-7.
13. **Mustafa, S., Koran, S. and AlOmar, L. (2022)** "Insights Into the Role of Matrix Metalloproteinases in Cancer and its Various Therapeutic Aspects: A Review", *Frontiers in Molecular Bioscience*, 9, p. 896099. doi: 10.3389/fmolb.2022.896099.
14. **Nishida, Y. et al. (2008)** "Activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by membrane type 1 matrix metalloproteinase through an artificial receptor for proMMP-2 generates active MMP-2", *Cancer Research*, 68(21), p. 9096-104. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2522.
15. **Pezeshkian, Z. et al. (2021)** "Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Precancerous Conditions and in Colorectal Cancer", *Cancers (Basel)*, 13(24), p. 6226. doi: 10.3390/cancers13246226.
16. **Sanyal, S. et al. (2022)** "A review of MMP-2 structures and binding mode analysis of its inhibitors to strategize structure-based drug design", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 74, p. 117044. doi: 10.1016/j.bmc.2022.117044.
17. **Šařčák, D. et al. (2020)** "Liečba kolorektálneho karcinómu u geriatrických pacientov", *Onkológia (Bratislava)*, 15(6), p. 410-415. ISSN 1336-8176.
18. **Zeng, Y. et al. (2022)** "Prognostic and Immunological Roles of MMP-9 in Pan-Cancer", *Biomed Research International*, 2022, p. 2592962. doi: 10.1155/2022/2592962.
19. **Zucker, S. and Vacirca, J. (2004)** "Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer", *Cancer Metastasis Review*, 23(1-2), p. 101-17. doi: 10.1023/a:1025867130437.



Laboratórna Diagnostika, XXIX, 1, 2024: 30–55

POCT - TESTOVANIE PRI PACIENTOVI

Časť I: Prehľad súčasného stavu a trendov implementácie, organizácie a regulácie POC testovania v zdravotníckych systémoch vyspelých krajín

POINT-OF-CARE TESTING

Part I: An overview of the current state and trends of implementation, organization, and regulation of POC testing in high-income countries

Ján Balla

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie

jan.balla.sr@gmail.com

SÚHRN

V súčasnosti je vo svete badať výrazný nárast POCT, poháňaný zameraním na decentralizáciu zdravotnej starostlivosti a rastúcim záujmom o telemedicínu, domáce testovanie a monitorovanie. Testovanie pri pacientovi (*Point of care testing, POCT*) je rýchlo sa rozvíjajúca oblasť decentralizovanej diagnostiky, ktorá ponúka potenciál na zlepšenie starostlivosti o pacienta v podmienkach primárnej aj sekundárnej starostlivosti. Je užitočné najmä v prostredí, kde nie sú dostupné diagnostické laboratória. POC prístroje dodávajú výsledky v reálnom čase, čím sa urýchľuje rozhodovací proces s klinickým rozhodnutím. Zariadenia POC používa vo všeobecnosti ošetrojúci personál, ktorý nemá laboratórne znalosti, vzdelanie, školenia a zručnosť ako laboratórni profesionáli. POCT dobre funguje v sieťach pracujúcich v synergii s centrálnymi laboratóriami. V tomto kontexte POCT zariadenia ponúkajú množstvo výhod, ale predstavujú aj klinické riziko. Pri každom diagnostickom teste je dôležité, aby správny test na správnom pacientovi vykonala vhodne vyškolená osoba pomocou presne kalibrovaného zariadenia. Klinická prax a medzinárodné normy vyžadujú, aby laboratórne výsledky boli spoľahlivé (presné a správne) bez ohľadu na to, či sú analyzované pri lôžku pomocou POCT alebo v laboratóriu. Hlavným cieľom prvej časti tohto článku je podať stručný prehľad súčasného stavu

testovania v blízkosti pacienta (POCT) v Európe a vo svete, pričom osobitná pozornosť je venovaná špecifickým podmienkam v jednotlivých krajinách.

Kľúčové slová: zdravotný systém; zdravotné poistenie; laboratórna medicína; POCT; implementácia; kvalita

ABSTRACT

There is currently a significant increase in POCT, driven by the focus on decentralization of healthcare and the growing interest in telemedicine and home testing and monitoring. Point of care testing (POCT) is a rapidly developing field of decentralized diagnostics that can potentially improve patient care in primary and secondary care settings. They are especially useful in environments where diagnostic laboratories are not available. POC devices deliver real-time results, speeding up the clinical decision-making process. POC devices are generally used by nursing staff who do not have the laboratory knowledge, education, training, and skills of laboratory professionals. However, they work well in networks operating in synergy with central laboratories. In this context, POCT devices offer several advantages and pose a clinical risk. With any diagnostic test, the right test must be performed on the right patient by a properly

trained person using precisely calibrated equipment. Clinical practice and international standards require laboratory results to be reliable (accurate and correct), regardless of whether they are analyzed at the bedside using POCT or in the laboratory. The main objective of this article is to provide a brief overview of the current state of near-patient testing (POCT) in Europe and the world with particular attention paid to country-specific details.

Key words: health system; insurance system; laboratory medicine; POCT; implementation; quality

TERMINOLÓGIA A SKRATKY

Point of Care Testing (POCT) je testovanie vykonávané kvalifikovaným zdravotníckym pracovníkom na mieste poskytovania zdravotnej starostlivosti mimo priestorov klinického laboratória. Poznámka. Existuje mnoho rôznych definícií POCT, čo vedie k mylným predstavám a zmätkom nielen laikmi, ale i odbornými pracovníkmi. Termín POCT sa v niektorých situáciách používa nesprávne a preto je na tomto mieste použitá definícia podľa Delphi.

POCT operátor je osoba, ktorá prešla školením a hodnotením uznanou školiacou inštitúciou, organizáciou, kurzom alebo programom a je spôsobilá na obsluhu prístrojov POCT.

Near-patient testing (NPT) je testovanie vykonávané zdravotníckym pracovníkom v tesnej blízkosti pacienta.

Bedside testing (BST, BT) je testovanie vykonávané zdravotníckym pracovníkom pri lôžku pacienta.

Direct to Consumer Testing (DTCT, DTC) je priame testovanie spotrebiteľom (pacientom).

Direct access testing (DAT) je testovanie s priamym prístupom spotrebiteľa (výberom testu pacienta), t. j. testovanie požadované priamo spotrebiteľom (nie lekárom). Test sa vykonáva v klinickom laboratóriu, ale žiada ho (autorizuje) sám pacient, ktorý ho uhrádza ako samoplatca. DAT nie je financované zo zdravotného poistenia (alebo iba čiastočne podľa regulačných opatrení danej krajiny) stavia laboratórneho profesionála vo vzťahu k pacientovi (spotrebiteľovi) do priameho servisného vzťahu.

Patient self testing (PST) znamená samotestovanie pacientom (spotrebiteľom).

Over-the-counter (OTC) tests sú voľnopredajné testy, ktoré bez lekárskeho predpisu predáva lekárnik v lekárni alebo online.

Delphi je metóda na zhromažďovanie údajov od respondentov v rámci ich odbornosti. Táto technika je sku-

pinový komunikačný proces, ktorého cieľom je dosiahnuť konvergenciu názorov na konkrétny problém v reálnom svete (HSU, 2007).

ÚVOD

Testovanie v blízkosti pacienta zohráva dôležitú úlohu pri poskytovaní efektívnej zdravotnej starostlivosti. Testovanie na mieste starostlivosti znamená vykonanie testu pomocou zariadenia alebo testovacej súpravy v prítomnosti pacienta bez potreby poslať vzorku do laboratória. V publikáciách sa používajú rôzne prívlastky - testovanie v blízkosti pacienta (Near patient testing), pomocné testovanie (Ancillary testing), satelitné testovanie (Satellite testing), testovanie pri lôžku (Bedside testing), testovanie na diaľku (Remote testing), lekárske laboratórium (Physician's office laboratory). V tejto súvislosti sa často spomína aj domáce testovanie (Home testing) alebo samotestovanie (Self-testing), tie však nepatria do POC testovania.

Aj keď sú POC prístroje veľkosťou malé zariadenia, sú vybavené pokročilými technológiami, ktoré vyžadujú presné dodržiavanie predpísaných postupov. Nelaboratórnym profesionálom sa môže zdať, že obsluha POC prístrojov je veľmi jednoduchá, ale takéto vnímanie testovania býva zradné. Jednoduchosť neznamená laxnosť. Navyše, rozmanitosť POC prístrojov a ich umiestnenie, edukácia, školiace aktivity a analytické zručnosti operátorov sťažujú kontrolu, správu a integráciu POC testovania.

V porovnaní s centrálnym laboratóriom ponúka POC testovanie niekoľko **výhod**:

- laboratórny test (analýza) sa vykonáva na počkanie pri pacientovi,
- skrátenie doby vyšetrenia urýchľuje diagnostický a liečebný proces,
- rýchlejšie rozhodovanie a zlepšený klinický manažment vďaka bezprostrednej dostupnosti výsledkov,
- nie sú potrebné opakované návštevy pacientov na prediskutovanie výsledkov a ďalších krokov,
- zlepšuje klinické výsledky a rýchlosť v akútnych situáciách,
- skracaje dobu a náklady na nevyhnutnú hospitalizáciu,
- umožňuje väčšie zapojenie každého pacienta do vlastnej starostlivosti (triage) podľa naliehavosti potreby,

- je významným pomocníkom pri epidémii, pandémii a v katastrofických situáciách,
- poskytuje komfort lekárom, vyššiu bezpečnosť a spokojnosť pacientov,
- skvalitňuje zdravotnú starostlivosť na vidieku,
- minimalizuje inváziu - vyžaduje nenáročný odber biologického materiálu,
- malý objem vzorky (ale príliš malý objem nie je vždy výhodou, môže spôsobiť problém s presnosťou pipetovania),
- nepotrebuje transport vzoriek do centrálného laboratória,
- aplikácia natívnej vzorky nevyžaduje úpravu,
- POC prístroje majú malé nároky na priestory,
- väčšie pohodlie, bezpečnosť a spokojnosť pacientov – vzhľadom na rýchlosť diagnostiky a rozhodnutia o liečbe,
- viac príležitostí na zapojenie pacientov do tímu (všeobecného) lekára.

Napredovanie v technológiách ukazuje, že prístroje POCT sú čoraz presnejšie a spoľahlivejšie. Tento pokrok je prísľubom nových aplikácií, ktoré ponúknu ešte väčšie výhody ako predtým. Tak ako čokoľvek v laboratórnej medicíne, aj POC testovanie má nielen výhody ale aj nevýhody.

Nevýhody POC testovania determinujú v praxi hlavne:

Rozdiely v metodológiách a technológiách

- POCT využíva rôzne metódy a technológie, ktoré majú rôzne obmedzenia a interferencie a môžu sa líšiť od testovacích metód používaných v centrálnom laboratóriu.
- Kontaminácia a nesprávny odber vzoriek sú špecifické pre metódu a prístroj.
- Správne použitie testovacích metód. Testovacia súprava alebo zariadenie sa nemá používať mimo určeného použitia. Niektoré testovacie metódy POCT sa môžu použiť len na skrining a nemožno ich použiť na diagnostiku.

Spôsobilosť personálu

- Nevyhnutné je kvalitné vzdelanie, laboratórna zručnosť a prax (tréning) v laboratórnych technikách.
- Preťaženosť operátorov (sestier) ostatnými činnosťami a úlohami.

Skladovanie činidiel

- Skladovacie priestory činidiel musia byť vhodné (chladné a suché).
- Reagencie sa nemajú používať po uplynutí doby trvanlivosti (exspirácie) spotrebného materiálu.

Kvalita a spoľahlivosť výsledkov

- Rýchlosť je kráľom, ale spoľahlivosť je viac ako kráľ. POC testu môžete dôverovať iba vtedy, ak poskytuje rovnaké výsledky ako laboratórny test. Laboratórne testovanie podlieha niekoľkostupňovej kontrole kvality (interná kontrola, externé hodnotenie, Delta-Check, AON-priemer normálov, atď.), zatiaľ čo POC testovanie je menej regulovaná oblasť, v ktorej tieto nástroje chýbajú.
- Rozdiely v testovacích podmienkach a metódach a personálom vnímaná zdanlivá jednoduchosť testovacích metód je zavádzajúca a potenciálne prispieva k nedostatku pozornosti pri testovaní.
- Rozdiely v úrovni vzdelania, školenia a skúseností zamestnancov vykonávajúcich testy, ako aj potenciálna fluktuácia zamestnancov, ovplyvňujú kvalitu a spoľahlivosť výsledkov.
- Testy vykonáva nelaboratórny personál, chyba mu laboratórna kvalifikácia, vzdelanie a prax. Sestry sú pri testovaní „rozptyľované“ mnohými ďalšími povinnosťami okolo pacientov a vedie to k podceneniu alebo prehliadaniu dôležitých aspektov laboratórnej práce.
- Výsledky testov nemusia byť porovnateľné s výsledkami centrálného laboratória. Metódy používané v POCT sa líšia od metód používaných v centrálnom laboratóriu. V porovnaní s centrálnym laboratóriom môže POCT znamenať väčšiu variabilitu výsledkov. Táto variabilita môže ovplyvniť starostlivosť o pacienta.
- Testovanie si vyžaduje dennú, resp. týždennú kontrolu kvality, alebo vždy vtedy, ak sa začne používať nová šarža reagencií, prúžkov alebo kaziet.

Riadenie dokumentácie

- Laboratórne výsledky sa do zdravotnej dokumentácie prenášajú automaticky elektronickou cestou, zatiaľ čo zápis POCT výsledkov do zdravotnej dokumentácie je často manuálny a spôsobuje transkripčné chyby.
- Na automatický prenos POCT údajov do zdravotnej dokumentácie absentuje konektivita zariadení.

Compliance

Testovanie na mieste starostlivosti si vyžaduje pravidelný dohľad a presadzovanie najlepších laboratórnych postupov. Aby bolo možné primárne zabezpečiť kvalitné výsledky a procesy testovania je potrebné zaviesť už pri výbere POCT prístrojov a testov kvalifikované posudzovanie.

ČINITELE OVPLYŇUJÚCE LABORATÓRNE VYŠETRENIE A IMPLEMENTÁCIU TESTOVANIA NA MIESTE STAROSTLIVOSTI

Organizácia a prax klinickej chémie a laboratórnej medicíny v krajinách, ktoré tvoria EÚ, je rozmanitá z niekoľkých hľadísk, napr. názov a definícia odboru, systém vzdelávania a kvalifikačné požiadavky na pracovníkov, medziodborové hranice, zodpovednosť lekárov a laboratórnych diagnostikov, školenia (Oosterhuis, 2015). Ústredným problémom laboratórnych profesií je vývoj systému kvality založený na ISO/EN 15189, ktorý v mnohých laboratóriách v EÚ prebiehal rôznym tempom. V tejto oblasti sú medzi krajinami veľké rozdiely. Niektoré krajiny, napr. Švédsko, Fínsko, Holandsko a Francúzsko, dosiahli takmer úplné zavedenie auditov a akreditácia je u nich pre každé laboratórium povinná zo zákona. V iných krajinách, napr. Rakúsko a Taliansko, sa viac používa systém kvality podľa ISO 9000, ktorý je povinný zo zdravotného poistenia (Taliansko). Hoci norma ISO 15189 nie je v Nemecku zo zákona povinná, smernica Nemeckej lekárskej komory na zabezpečenie kvality medicínskych laboratórnych vyšetrení (právny predpis RiliBÄK), ktorá prijala základný obsah ISO 15189, najmä aspekty riadenia kvality a riadenie dokumentov za základ, je v Nemecku povinná.

Testovanie na mieste starostlivosti je vo svete najrýchlejšie rastúci trh v segmente IVD. Podľa prieskumu *Future Market Insights* (2023), prieskumníka globálnych trhových trendov, sa očakáva, že globálny trh s diagnostikou v mieste starostlivosti porastie v rokoch 2023-2032 kumulovanou ročnou mierou rastu (CAGR) o 6,8 %. Odhaduje sa, že trhová hodnota vzrastie z 38,7 miliárd USD v roku 2023 na 74,8 miliárd USD do roku 2033. Podľa *Precedence Research* (2023), popredného poskytovateľa strategických informácií o trhu, sa globálna veľkosť trhu testovania v mieste starostlivosti (POCT) v dôsledku narastajúceho počtu ochorení medzi obyvateľstvom odhadovala v roku 2023 na 35,33 miliárd USD a očakáva sa, že do roku 2032 dosiahne približne 99,33 miliárd USD s rastúcou

kumulovanou ročnou mierou rastu (CAGR) o 12,2 % (*Future Market Insights*, 2023; *Precedence Research*, 2023). Najväčším trhom POCT vo svete je severná Amerika, ktorá v roku 2021 predstavovala 46 % podiel. Najväčší segment predstavovali produkty na monitorovanie glukózy (27 %) a podľa technologickej platformy získal segment laterálnych prietokových testov až 36 % podiel na trhu. Významne rastie segment OTC (voľnopredajné testy), ktoré predstavovali až 59 % podiel na trhu. Vysoký regionálny trhový podiel má Latinská Amerika a Európa, ktoré je po Spojených štátoch druhým najväčším svetovým trhom. Hnacím motorom rastu európskeho trhu s testovaním na mieste starostlivosti (POCT) je narastajúca prevalencia infekčných a chronických chorôb. Spojené kráľovstvo, Francúzsko a Nemecko sú tri najdominantnejšie krajiny na európskom trhu POC diagnostiky. Kľúčoví producenti POC diagnostík a prístrojov sú Abbott, ACON, Becton Dickinson, Bio Rad, bioMerieux, Danaher, Diasorin, DiaSys, EKF, Fluxergy, Hologic, Chembio, InBios, Jiangsu Mole Bioscience, Johnson and Johnson, LifeScan, Menarini, Nova Biomedical, OraSure, PHC, Qiagen, Quidel, Radiometer, Roche, SD Biosensor, SEKISUI, Siemens, Sinocare, Sysmex, Thermo Fisher, Trinity, UNIMA, Visby. Mnohé spoločnosti sa pokúšajú uviesť svoje POCT produkty na trh v Európskej únii a preto implementujú Nariadenie o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro (EU IVDR) 2017/746 (Regulation (EU) 2017/746; Regulation (EU) 2022/112; Balla, 2022). Rozvíjajúci trend POCT v Európe a implementácia IVDR kladie na výrobcov zvýšené nároky. Článok 2 EU IVDR definuje POCT ako pomôcku určenú na vykonávanie testov mimo laboratórneho prostredia, ktoré vo všeobecnosti vykonáva zdravotnícky pracovník v blízkosti pacienta alebo vedľa neho. Rovnako ako akékoľvek iné IVD, aj POCT produkty musia požiadať o posúdenie zhody a získať označenie CE. Pre POCT sú však v IVDR ďalšie požiadavky, najmä preukázanie podstatných dôkazov o bezpečnosti konštrukcie a výkonu, ale najmä zabezpečenie kvality produktov a splnenie akreditačných požiadaviek. POC testy sú určené obvykle užívateľom mimo laboratórneho prostredia, ktorí nemajú potrebné laboratórne zručnosti, môžu robiť chyby, ktoré zhoršujú kvalitu produktu. Preto IVDR jasne stanovuje povinnosť výrobcov produkt navrhovať a vyrábať so zreteľom na zručnosti používateľov. Informácie a pokyny dodávané s POCT pomôckou musia byť pre používateľa ľahko zrozumiteľné, aby mohol správne vykonať analýzu a správne interpretovať výsledok poskytovaný zariadením.

Výrobcovia a dodávatelia POCT zariadení musia zabezpečiť potrebné školenia, vzdelávanie a poskytnutie znalostí a zručností určeným užívateľom. Výrobca/dodávateľ musí v čase použitia zariadenia zabezpečiť overovanie funkcionality zariadenia a čo najviac znížiť riziko chyby pri manipulácii so zariadením a vzorkami. Ak sú testy určené na použitie v širokom rozsahu prostredí, výrobcovia musia preukázať, že test možno spoľahlivo použiť v príslušných zariadeniach (napríklad v ambulanciách, v domovoch seniorov, pohotovosti, ap.). POCT produkty musia byť vybavené príbalovým papierovým návodom, elektronický formát (tzv. eIFU) nestačí. Z hľadiska posudzovania zhody je celý proces pre POCT produkty rovnaký ako pre ostatné laboratórne zariadenia. V technickej dokumentácii sa však vyžaduje, aby POCT obsahovali konštrukčné detaily odôvodňujúce rozsah ich zariadenia. Pri podávaní žiadosti o posúdenie zhody notifikovaným orgánom musia POCT obsahovať správy o skúškach, výsledky štúdií vykonaných s určenými používateľmi a údaje preukazujúce vhodnosť manipulácie s pomôckou na jej zamýšľané použitie. Po uvedení na trh musí byť zavedený pravidelne aktualizovaný systém dohľadu (*post-market surveillance*).

Rastúci počet dostupných testov na mieste starostlivosti (POC) je výzvou pre lekárov pri rozhodovaní aké testy použiť, ako ich efektívne využívať a ako interpretovať výsledky. Hoci testy POC môžu ponúknuť výhody v podobe krátkeho času obrátky, zlepšenej spokojnosti pacientov a zdravotných výsledkov, len málo z nich sa skutočne využíva v klinickej praxi. Výsledky nedávnej holandskej štúdie o užívaní a osvojení testov na mieste starostlivosti pomocou multikriteriálnej rozhodovacej analýzy považujú za najdôležitejšie klinickú užitočnosť testu a jeho technickú výkonnosť a riziká (Kip, 2019). Napríklad odborníci uprednostnili test POC CRP pred jeho laboratórnym ekvivalentom, zatiaľ čo test POC HbA1c neuprednostnili. Štúdia identifikovala kritériá a poznatky o ich relatívnom vplyve na úspešnú implementáciu a využitie POC testov v klinickej praxi. Zoznam kritérií identifikovaných v spomínanej štúdii môže uľahčiť správny výber POCT zariadenia, jeho efektívnu implementáciu a používanie v praxi.

Spokojnosť pacienta: *Do akej miery sa očakáva, že použitie testu POC zlepší služby v prospech pacienta.*

Zrozumiteľnosť pracovných pokynov: *Rozsah, v akom sú postup testu POC jasne a zrozumiteľne napísaný v protokoloch a/alebo príručkách.*

Užívateľská prívetivosť: *Do akej miery je POC test ľahko vykonateľný.*

Interpretácia testu: *Do akej miery je výsledok POC testu ľahko čitateľný a rôzne výsledky testov ľahko interpretovateľné.*

Čas obratu (TAT): *Do akej miery sú výsledky POC testu okamžite dostupné.*

Frekvencia používania: *Do akej miery sa test dostatočne využíva vzhľadom na indikáciu a veľkosť ambulancie.*

Priestor pre inovácie: *Miera, do akej tlak každodennej praxe necháva priestor pre inovácie a možnosti na zmenu.*

Pracovná záťaž: *Do akej miery je možné implementovať POC test bez dramatických zmien v doterajšom spôsobe práce a užívateľskej záťaži.*

Podpora, školenia a kontrola kvality: *Do akej miery je zavedenie, údržba a kontrola kvality POC testu, ako aj zaškolenie personálu dostatočné a podporované výrobcom/dodávateľom a koordinátorom z laboratória a ordinácie.*

Konektivita: *Rozsah, v akom sú výsledky a chyby POC testu evidované v informačnom systéme.*

Klinická užitočnosť: *Do akej miery má správne (liečebné) rozhodnutie založené na výsledku POC testu pridanú hodnotu v klinických výsledkoch.*

Technický výkon: *Do akej miery je POC test presný, správny, spoľahlivý a robustný v rukách používateľa.*

Negatívna prediktívna hodnota: *Podiel negatívnych výsledkov, ktoré sú skutočne negatívne, čo zvyšuje schopnosť používateľa spoľahlivo vylúčiť stav.*

Pozitívna prediktívna hodnota: *Podiel pozitívnych výsledkov, ktoré sú skutočne pozitívne, čo zvyšuje schopnosť používateľa spoľahlivo diagnostikovať stav.*

Riziká: *Vplyv (nesprávnej) liečby/ rozhodnutia na základe (nesprávneho) výsledku testu.*

Klinické usmernenia: *Rozsah, v akom je POC test implementovaný v národných usmerneniach.*

Vedecký dôkaz: *Do akej miery je pridaná hodnota POC testu preukázaná vo vedeckej literatúre.*

Úhrada: *Prepláca sa vyšetrenie POC u všeobecného lekára?*

Celkové náklady: *Očakáva sa, že test POC zníži náklady na systém zdravotnej starostlivosti.*

Legislatíva: *Do akej miery inovácia zapadá do existujúcich právnych predpisov.*

VÝVOJ ZDRAVOTNÍCKYCH SYSTÉMOV, LABORATORNEHO PROSTREDIA A TESTOVANIA NA MIESTE STAROSTLIVOSTI VO VYSPELÝCH KRAJINÁCH

Veľká Británia

V Anglicku, Škótsku, Severnom Írsku a Walese sa uplatňujú rôzne zásady zdravotnej starostlivosti. Zastrešujúci názov, ktorý sa bežne používa na označenie štyroch systémov zdravotnej starostlivosti financovaných z verejných zdrojov v Spojenom kráľovstve (súhrnne alebo jednotlivo) sa nazýva Národná zdravotná služba (*National Health Service, NHS*). Podľa zákona je v Anglicku len jedna poisťovňa a tou je štátna NHS a poistení v nej musia byť všetci obyvatelia. Ministerstvo zdravotníctva a sociálnych vecí spolu s NHS prezentovali v r. 2019 spoločnú dohodu o tom, ako komunitná lekáreň podporí poskytovanie dlhodobého plánu NHS. Základom dlhodobého plánu je posunúť tradičný model nemocničných služieb k prispôbivejšiemu prístupu v komunitných lekárňach tak, aby pacienti dostávali zdravotnú starostlivosť bližšie k bydlisku. V r. 2024 by mali komunitné lekáreň získať prístup k zdravotnej dokumentácii pacientov od všeobecných lekárov. Systém im má umožniť tieto záznamy aktualizovať. Služba *GP Connect* umožní lekárnikom nahliadnuť priamo do záznamu všeobecného lekára tak, aby videli výsledky testov a vyšetrení pacientov. Lekárnici by v budúcnosti mali získať prístup aj k informáciám o alergiách pacientov, konzultáciám všeobecných lekárov a vakcinácii. Podľa zmluvného rámca medzi vládou, NHS a *Výborom pre dohodovanie farmaceutických služieb* (PSNC) táto dohoda garantuje komunitným lekárňam v nasledujúcich piatich rokoch finančnú stabilitu takmer 13 miliárd libier. Táto významná investícia v porovnaní s pôvodnými vládnyimi plánmi oceňuje prínos, ku ktorému sa komunitná lekáreň zaviazala prispieť k splneniu dlhodobého plánu NHS. Zavádza sa systém platieb za kvalitu s cieľom posunúť lekáreň smerom k oveľa viac klinicky zameraným službám a zavádza relevantnú legislatívu a zdroje na podporu poskytovania služieb POCT, ktorý zaisťuje správny výber POCT prístrojov, ich kompetentné používanie vyškolenými operátormi a efektívnu údržbu. Dohoda má tri podmienky kvality: 1. POCT vybavenie musí byť vhodné na zamýšľaný účel; 2. používatelia musia rozumieť funkcii a obsluhu POCT zariadení; 3. musia ich udržiavať v bezpečnom, bezchybnom a spoľahlivom stave a zaistiť primeranú bezpečnosť a kvalitu služieb s cieľom optimalizovať náklady a minimalizovať

riziko. Tento dokument by sa mal používať ako referencia a usmernenie pri plánovaní, navrhovaní, implementácii a poskytovaní služieb POCT v komunitných lekárňach.

Za reguláciu trhu so zdravotníckymi pomôckami v Spojenom kráľovstve je zodpovedný Úrad pre reguláciu liekov a zdravotníckych pomôcok (*Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, MHRA*), ktorý v r. 2021 aktualizoval smernicu Manažment a používanie testu IVD zariadení na mieste starostlivosti (*Management and use of IVD point of care test devices*). Toto usmernenie poskytuje informácie Úradu pre reguláciu liekov a zdravotníckych pomôcok o certifikácii, registrácii a označení zhody POCT zariadení v dobe po vystúpení Veľkej Británie z EÚ. Usmernenie obsahuje rôzne pravidlá, ktoré platia vo Veľkej Británii (Anglicko, Wales, Škótsko) a Severnom Írsku. V Severnom Írsku platia iné pravidlá ako vo Veľkej Británii. V tomto usmernení pojem „zdravotnícka pomôcka“ zahŕňa diagnostické zdravotnícke pomôcky in vitro a aktívne implantovateľné zdravotnícke pomôcky a nevzťahuje sa na iné produkty označené CE alebo UKCA, ktoré podliehajú samostatnému usmerneniu. 1. januára 2021 došlo k niekoľkým legislatívnym zmenám v spôsobe uvádzania zdravotníckych pomôcok na trh vo Veľkej Británii (Anglicko, Wales a Škótsko). Pred uvedením POCT produktu na trh Veľkej Británie musí byť výrobca zaregistrovaný v MHRA, ktorý niektoré POCT prístroje hodnotí spolu s úradom obstarávania NHS. Ak má výrobca zdravotníckych pomôcok sídlo mimo Spojeného kráľovstva a chce umiestniť pomôcku na trh Veľkej Británie, musí menovať na všetky svoje zariadenia zodpovednú osobu pre Spojené kráľovstvo, ktorá bude konať v jeho mene pri vykonávaní špecifických úloh, ako je napríklad registrácia. Vláda vo Veľkej Británii zaviedla legislatívu na predĺženie akceptácie pomôcok s označením CE po 30. júni 2023. Značka CE je označenie, ktoré umožňuje uvedenie zdravotníckej pomôcky na trh EÚ. Vláda zaviedla opatrenia, ktoré zabezpečujú, že zdravotnícke pomôcky s označením CE môžu byť uvádzané na trh Veľkej Británie v nasledujúcich časových harmonogramoch: a) všeobecné zdravotnícke pomôcky v súlade so smernicou EÚ o zdravotníckych pomôckach (EU MDD) alebo smernicou EÚ o aktívnych implantovateľných zdravotníckych pomôckach (AIMDD) s platnou deklaráciou a označením CE je možné uvádzať na trh Veľkej Británie až do uplynutia platnosti certifikátu alebo do 30. júna 2028; b) diagnostické zdravotnícke pomôcky in vitro (IVD), ktoré sú v súlade so smernicou EÚ o diagnostických

zdravotníckych pomôckach in vitro (IVDD), je možné uvádzať na trh Veľkej Británie až do uplynutia platnosti certifikátu alebo do 30. júna 2030; c) všeobecné zdravotníckych pomôckach (EU MDR) a IVD v súlade s nariadením EÚ o in vitro diagnostických zdravotníckych pomôckach (EU IVDR) môžu byť uvedené na trh Veľkej Británie do 30. júna 2030. Keďže EÚ už nezahŕňa Spojené kráľovstvo, notifikované orgány Spojeného kráľovstva nie sú schopné vydávať certifikáty CE a stali sa certifikovanými orgánmi Spojeného kráľovstva (označenie UKCA). Britská legislatíva okrem iného definuje jasnú cestu pre reorganizáciu laboratórných služieb. Postupy riadenia kvality a vylepšený akreditačný systém by mali byť povinné pre všetkých poskytovateľov laboratórných služieb, vrátane poskytovateľov POCT. Všetci poskytovatelia laboratórných služieb by mali podliehať povinnej akreditácii organizáciou nezávislou od poskytovateľov a profesií. Povinná akreditácia (vrátane testovania na mieste starostlivosti) má poskytnúť verejnosti istotu, že kvalita laboratórných služieb bola nezávisle overená ako splnila štandardy. Okrem toho odporúčanie uvádza „... že od všetkých poskytovateľov laboratórných služieb (vrátane poskytovateľov testovania na mieste starostlivosti) by sa mala vyžadovať účasť na klinickom audite a iných činnostiach klinického riadenia ako ďalšieho prostriedku na podporu kvality; a aby sa všetci zamestnanci podieľajúci sa na poskytovaní laboratórných služieb, vrátane technického a podporného personálu, podieľali na príslušnom nepretržitom odbornom rozvoji v rámci zachovania svojej spôsobilosti a kompetencií.

Proces integrácie POCT v Anglicku možno považovať za zložitý vzhľadom na veľký počet rôznych zainteresovaných strán zapojených do POCT v porovnaní s inými systémami zdravotnej starostlivosti. Táto zložitosť môže prispieť k tomu, že zainteresované strany nepochopia, kto je zodpovedný za integráciu inovácií, a tým vysvetľuje obmedzenú integráciu POCT.

Nemecko

Nemecko je federatívnou demokratickou parlamentnou republikou tvorenou šestnástimi, čiastočne suverénnymi spolkovými krajinami (Bundesländer). Každý nemecký spolkový štát (Bundesland) má svoju vlastnú spolkovú vládu a príslušný orgán pre oblasť zdravotníctva. Rovnako ako všetky krajiny Európskej únie, aj Nemecko prijalo nové Nariadenie (EÚ) 2017/745 o zdravotníckych pomôckach.

Všetky zdravotníckych pomôcky, ktoré sú uvádzané v Nemecku na trh, musia mať označenie CE a od výrobcov sa vyžaduje, aby mali vydané vyhlásenie o zhode. Výrobca zdravotníckych pomôcky je zodpovedný za vykonanie postupu posudzovania zhody. Článok 9 smernice EÚ 98/79/ES stanovuje, že IVD sa klasifikujú ako vysoko rizikové a rizikové produkty (príloha II, zoznam A a B), pomôcky na samotestovanie a všetky ostatné IVD.

Výrobcovia mimo EÚ musia vymenovať svojho autorizovaného európskeho zástupcu. Osoba zodpovedná za prvé uvedenie zdravotníckych pomôcky na trh so sídlom v Nemecku to musí oznámiť miestnemu úradu zodpovednému za príslušnú spolkovú krajinu. Okrem toho pri prvom uvedení na trh musí zodpovedná osoba identifikovať osobu zodpovednú za bezpečnosť a informovať o nej príslušný orgán. Oznámenia musia byť uskutočnené online prostredníctvom webovej stránky Federálneho ústavu pre lieky a zdravotníckych pomôcky (*Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM*), ktorá je neustále aktualizovaná v nemčine a angličtine. Implementácia európskych požiadaviek sa v Nemecku riadi Vyhláškou o zdravotníckych pomôckach (*Verordnung über Medizinprodukte, MPV*), Vyhláškou o bezpečnosti zdravotníckych pomôck (Medizinprodukte-Sicherheitsplanverordnung, MPSV) a Vyhláškou o databanke, ktorou sa riadi informačný systém Nemeckého ústavu pre zdravotnícku dokumentáciu a informácie (*Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information, DIMDI*). Vyhláška o prevádzkovateľovi zdravotníckych pomôck (*Medizinprodukte-Betreiberverordnung, MPBetreibV*) je národný nemecký predpis, ktorý stanovuje požiadavky na tvorbu, prevádzku a používanie zdravotníckych pomôck. V niektorých prípadoch sa výrobcovia stávajú aj prevádzkovateľmi, a preto podliehajú MPBetreibV. Okrem európskych požiadaviek Nariadenia (EÚ) 2017/745 sa v Nemecku uplatňujú aj ďalšie pravidlá, ktoré spadajú do sféry národnej regulačnej kompetencie a ktoré nemajú oporu v európskom práve. Sú to napr. ustanovenia na obsluhu, používanie a údržbu zdravotníckych pomôck, o lekárskom predpise pre zdravotníckych pomôcky pre lekárne, o domácej (in-house) výrobe zdravotníckych pomôck, postupoch narábania so zdravotníckymi pomôckami a predaji zdravotníckych pomôck. Vo vnútroštátnych právnych predpisoch o zdravotníckych pomôckach platia v Nemecku aj ustanovenia o vykonávaní klinických skúšok a dohľadu zo strany príslušných orgánov, ktoré definujú požiadavky v konkrétnej podobe. Vyhláška o prevádzkovateľovi zdravotníckych

pomôcok (MPBetreibV) a vyhláška o bezpečnosti zdravotníckych pomôcok (MPSV) sú pre užívateľov zdravotníckych pomôcok mimoriadne dôležité. Bezrizikové užívanie zdravotníckych pomôcok si vyžaduje dodržanie minimálnych požiadaviek uvedených v týchto vyhláškach.

Okrem uvedeného sa užívateľov POCT v Nemecku týka aj Smernica Nemeckej lekárskej komory na zabezpečenie kvality medicínskych laboratórnych vyšetrení, časť B (*Die Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen Teil B, RiliBÄK B*), ktorá obsahuje usmernenia Nemeckej lekárskej komory pre zabezpečenie kvality laboratórnych vyšetrení a okrem iného vyžaduje implementáciu celkového systému riadenia kvality (QMS) pre všetky medicínske laboratórne testy a teda aj pre všetky POC testy. Smernica pre laboratórne testy v lekárskej praxi (RiliBÄK) (vydaná v r. 2007, revidovaná v r. 2014, posledná verzia aktualizovaná 14.4.2023) platí pre všetky zariadenia, ktoré vykonávajú laboratórne testy a musí ju rešpektovať každá lekárska ordinácia, ktorá vykonáva laboratórne vyšetrenia. Podľa § 4a vyhlášky o prevádzkovateľovi zdravotníckych pomôcok (MPBetreibV) existuje zákonná povinnosť zabezpečiť kvalitu v každom zdravotníckom laboratóriu a POCT. Každé lekárske laboratórium musí zaviesť a neustále udržiavať systém zabezpečenia kvality (systém QM). Každá osoba zapojená do akýchkoľvek činností súvisiacich s touto laboratórnou prevádzkou musí byť vyškolená a konať v súlade s týmto systémom. Systém zabezpečenia kvality musí zodpovedať uznávanému všeobecnému stavu lekárskej vedy a techniky. Jednotná štruktúra smerníc Nemeckej lekárskej komory na zabezpečenie kvality laboratórnych vyšetrení má zaistiť bezpečnosť, kvalitu a výkon in vitro diagnostiky a dlhodobo zabezpečiť spoľahlivé výsledky. Základná štruktúra RiliBÄK sa skladá zo 7 kapitol:

Časť A: Základné smernice na zabezpečenie kvality pri vyšetreniach v zdravotníckych laboratóriách

Časť B: Špecifické pokyny pre skúšky

B 1 popisuje kvantitatívne požiadavky na vyšetrenia v zdravotníckych laboratóriách

B 2 popisuje kvalitatívne požiadavky na vyšetrenia v zdravotníckych laboratóriách

B 3 obsahuje pokyny na charakterizáciu a priamu detekciu pôvodcov infekcie

B 4 upravuje vyšetrenia ejakulátu

B 5 objasňuje požiadavky na cytologické a molekulárne genetické vyšetrenia

Časť C upravuje zloženie poradného zboru RiliBÄK

Časť D popisuje zloženie odborných skupín

Časť E objasňuje usmernenia pre referenčné inštitúcie

Časť F obsahuje prechodné ustanovenia RiliBÄK

Časť G upravuje nadobudnutie účinnosti

Požiadavky RiliBÄK na kvalitu sú synchronizované so známymi princípmi a normami ISO 15189. Nad rámec všeobecných noriem ISO stanovil RiliBÄK špecifické požiadavky na kvalitu (prípustné chyby/neistoty). Ustanovenia RiliBÄK obsahujú v časti B špecifikácie pre prijateľnú percentuálnu strednú štandardnú odchýlku (RMSD) a prijateľnú relatívnu odchýlku pre medzilaboratórne testy. RMSD znamená prijateľné % priemernej štandardnej odchýlky, ktorej výpočet je jedinečný pre Nemcov a žiadna iná krajina ho nepoužíva. Ďalej obsahuje prijateľnú odchýlku (chybu) pre medzilaboratórne porovnanie. Táto je analogická k cieľovým celkovým prípustným chybám TEA v CLIA. Pre špecifikáciu medzilaboratórnych porovnávacích skúšok sú uvedené dva typy cieľových hodnôt. RMW znamená, že na stanovenie usmernenia bola použitá hodnota referenčnej metódy. SW znamená, že na stanovenie usmernenia bola použitá cieľová hodnota špecifická pre testovaciu metódu (medián skupiny). Posledná verzia (2023) RiliBÄK obsahuje zoznam 95 analytov v plazme, sére a plnej krvi, ktorý sa pravidelne aktualizuje, zatiaľ čo špecifikácie CLIA neboli aktualizované od r. 1992.

RiliBÄK sa týka aj pravidelných kontrolných meraní POCT prístrojov. Ak sa na prístroji používa každý deň elektronický alebo fyzikálny štandard alebo iný integrovaný test, stačí jedno individuálne meranie kontrolnej vzorky za týždeň. Na zariadeniach bez integrovaného testu a bez denného používania elektronických/fyzikálnych štandardov sa musia vykonať aspoň 2 individuálne merania kontrolných vzoriek v dňoch, kedy sa analyzujú vzorky pacientov. Dodatočné merania kontrolných vzoriek sú potrebné pri reštartovaní zariadenia, po užívateľských kalibráciách, po opravách a údržbe a pri každej novej dávke činidla.

Regionálny prieskum o využívaní POCT v Nemecku (Matthes, 2023) potvrdil, že praktickí lekári v Nemecku využívajú len relatívne malý počet POCT v bežnej zdravotnej starostlivosti. Tieto testy zahŕňajú vyšetrenie moču, glukózy, troponínu, mikroalbumínu a D-diméru. Obmedzené používanie POCT v nemeckej primárnej starostlivosti možno vysvetliť niekoľkými faktormi, ako sú úhrada, realizovateľnosť a znalosti. Okrem lekárskej starostlivosti v ambulanciách všeobecných lekárov, nemeckí všeobecní lekári

často poskytujú lekársku starostlivosť aj pri návštevách doma, obyvateľom domovov dôchodcov a mimo pracovného času pohotovostné služby. Perspektívy nemeckých všeobecných lekárov na použitie POCT v týchto zariadeniach ambulantnej starostlivosti ešte neboli študované. Nemeckí praktickí lekári považujú za najdôležitejšie charakteristiky POCT vysokú diagnostickú presnosť, vysokú používateľskú prívetivosť (vrátane možnosti integrácie do praxe) a rýchle výsledky testov. Kvantitatívny výsledok testu a primeraná skladovateľnosť boli hodnotené ako najmenej dôležité vlastnosti POCT. Medzi najdôležitejšie faktory POCT považujú praktickí lekári okamžité rozhodnutia o manažmente pacienta a zvýšenie diagnostickej istoty, zatiaľ čo spokojnosť pacientov považujú za najmenej dôležitý dôvod na vykonávanie POCT. Okrem týchto faktorov ovplyvňujú používanie POCT v ambulanciách všeobecných lekárov faktory súvisiace s nemeckým systémom zdravotnej starostlivosti a predpisy o úhradách. Nedostatočná primeraná úhrada a vysoké náklady na POCT sú v skutočnosti najčastejšie uvádzanými prekážkami používania POCT. V Nemecku úhrada za laboratórne testy in vitro v ambulanciách všeobecných lekárov u pacientov so zákonným zdravotným poistením (približne 88 % nemeckej populácie) často nepresahuje 1,50 Eur. Výsledkom je, že vykonávanie POCT nie je často pre praktického lekára ekonomicky efektívne. Okrem toho má Nemecko dostatočnú infraštruktúru centrálnych laboratórií, ktoré často poskytujú výsledky v ten istý deň alebo skoro nasledujúci deň po odbere vzoriek, čo môže znížiť skutočnú potrebu vykonávania POCT v ambulanciách všeobecných lekárov. V spomínanom prieskume 75 % praktických lekárov uviedlo, že výsledky laboratórných analýz externých laboratórií sú zvyčajne dostupné po menej ako 18 hodinách od jej odoslania do laboratória predpoludním. Okrem toho pri rozhodovaní nemeckých praktických lekárov o implementácii POCT v praxi zohráva veľký význam vysoká užívateľská prívetivosť a integrovateľnosť do praktických postupov.

Francúzsko

V roku 1945, kedy sa vo Francúzsku uskutočnila reforma zdravotníctva, dosiahlo všeobecné zdravotné pokrytie prostredníctvom rôznych reforiem a zlepšení zdravotného systému 99% obyvateľov. Postupne pokrývalo rôzne skupiny a rozširovalo sa, až kým nedosiahlo univerzálne pokrytie. Uzákonal sa Systém povinného zdravotného poistenia (*l'Assurance Maladie, SHI*), ktorý existuje dodnes a ktorý svojim

obyvateľom poskytuje univerzálne krytie. Spočiatku sa pokrytie týkalo len pracujúcich, ale potom sa rozšírilo na viac skupín populácie: zamestnancov (v roku 1945), dôchodcov (v roku 1945), samostatne zárobkovo činných osôb (v roku 1966) a v roku 2000 sa všeobecné zdravotné poistenie (*Couverture Maladie Universelle, CMU*) rozšírilo aj na nezamestnaných (ochranu osôb, na ktoré sa nevzťahuje SHI). Systém pokrýva väčšinu nákladov na nemocničnú, lekársku a dlhodobú starostlivosť, ako aj na lieky na predpis; pacienti sú zodpovední za spolupoistenie, spoluúčasť a účty za poplatky lekárov, ktoré presahujú kryté výkony. Systém zdravotného poistenia je financovaný z príspevkov zamestnancov a zamestnávateľov a v čoraz väčšej miere z vyčlenených daní zo širokého spektra príjmov. Finančné prostriedky sa združujú na národnej úrovni s možnosťou dotácií medzi schémami. V roku 2016 sa podľa zákona o univerzálnej ochrane zdravia (*La Protection Universelle Maladie, PUMa*) spôsobilosť SHI stala univerzálnou. Tento prístup k zdravotnej starostlivosti majú všetci obyvatelia Francúzska, ako aj cudzinci. Zlúčilo sa krytie pre osoby, na ktoré sa predtým vzťahovalo všeobecné zdravotné krytie, a pre prisťahovalcov, na ktorých sa vzťahuje štátom podporované zdravotné poistenie. SHI čelil za posledných 20 rokov veľkým deficitom, ktoré však klesli z 10 – 12 miliárd EUR (12,6 – 15,2 miliardy USD) v roku 2003 na 4,1 miliárd EUR (5,2 miliárd USD) v roku 2016. Medzi opatreniami, ktorými sa to dosiahlo, patrila okrem zníženia počtu nemocničných lôžok a zmien v liekovej politike (vyňatie 600 liekov z verejného poistenia, zníženie cien generík a rozšírenie sortimentu voľnopredajných liekov) aj redukcia platieb pre samostatne zárobkovo činných rádiológov a biologických laboratórií a obmedzenie duplicitného laboratórneho testovania. Pri vyplnení medzier v SHI zohráva významnú úlohu aj dobrovoľné doplnkové súkromné zdravotné poistenie (*l'assurance volontaire Maladie, VHI*), ktoré má asi 90 % obyvateľov. Väčšina dobrovoľného zdravotného poistenia (VHI) je doplnková, pokrýva najmä spoluúčasť pri oftalmologickom, audiometrickom a stomatologickom vyšetrení, ktoré sú zo zdravotného poistenia hradené minimálne. VHI je nastavená tak, aby pokrývala spoluúčasť za výhody, na ktoré sa nevzťahuje SHI. Jednotlivci s nízkymi príjmami majú nárok na bezplatné alebo štátom sponzorované VHI. Doplnkové poistenie poskytujú najmä neziskové, zamestnanecké združenia.

Poskytovanie zdravotnej starostlivosti vo Francúzsku je národnou zodpovednosťou. V roku 2024 sa Francúzsko stalo prvou krajinou na svete s ústavným právom, ktoré

ženám poskytne explicitnú ochranu v súvislosti s umelým ukončením tehotenstva. Za definovanie národnej zdravotnej stratégie je zodpovedné ministerstvo sociálnych vecí, zdravotníctva a práv žien. Stanovuje a realizuje vládnu politiku v oblasti verejného zdravia, ako aj organizáciu a financovanie systému zdravotnej starostlivosti. Na základe celkového rámca ustanoveného parlamentom reguluje zhruba 75 percent výdavkov na zdravotníctvo. Ústredná vláda rozdeľuje rozpočtové výdavky medzi rôzne sektory (nemocnice, ambulatná starostlivosť, duševné zdravie a služby pre zdravotne postihnutých obyvateľov) a regióny. Ministerstvo sociálnych vecí, zdravotníctva a práv žien zastupujú v regiónoch regionálne zdravotnícke úrady, ktoré zodpovedajú za koordináciu zdravia obyvateľstva a zdravotnej starostlivosti vrátane prevencie, verejného zdravotníctva a sociálnej starostlivosti. V r. 2008 predložila Roselyne Bachelotová, ministerka zdravotníctva, mládeže, športu a žien, návrh nového zákona pod oficiálnym názvom „Nemocnica, pacienti, zdravie, územia“, ktorý je vo Francúzku bežne známy ako HPST zákon (skratka francúzskeho výrazu *Hôpital, Patients, Santé, Territoires*) alebo lepšie známy ako Bachelotovej zákon (Ordonnance no 2010-49, 2010). Cieľom zákona bolo zaručiť lepší a rovnaký prístup k zdravotnej starostlivosti pre všetkých Francúzov bez ohľadu na ich geografickú polohu. Táto reforma si vyžiadala úplné prepracovanie organizácie nemocníc, čo vyvolalo silné protesty medzi zamestnancami, ale tieto nepodkopali jeho prežitie. Doplnený niekoľkými úpravami získal meno a nikto teraz nespochybňuje Regionálne zdravotnícke agentúry ako nové riadiace orgány. Stal sa dokonca jedným z posledných veľkých nemocničných zákonov. V nadväznosti na Bachelotovej zákon vládni experti pod vedením M. Ballereaua a A.M. Gallota, presadili v r. 2010 v oficiálnom vestníku Francúzskej republiky novú vyhlášku reformujúcu lekársku biológiu (Ordonnance n° 2010-49, 2010). Ústredným bodom, na ktorom stojí reforma francúzskej lekárskej biológie, je téza, že medicínske biologické testy sú medicínske postupy samy osebe. Reforma tak stavia lekársku biológiu do centra nemocničných profesií a manažmentu pacientov a stáva sa rozhodujúcim krokom v poskytovaní zdravotnej starostlivosti pre diagnostiku väčšiny patológií a následnú liečbu. Táto legislatíva modernizovala právny rámec pre medicínske laboratória (*Laboratoires de Biologie Medicale, LBM*) ustanovený v roku 1975 a zohľadnila medicínske a vedecké inovácie, ktoré sa odvtedy v odbore udiali. Poskytla jednotný rámec pre

výkon povolania a mala za cieľ zlepšiť kvalitu služieb prostredníctvom povinnej akreditácie ISO 15189 pre všetky laboratória najneskôr do konca roka 2016. Reforma opätovne potvrdzuje profesionálnu transformáciu disciplíny. Lekársky biológ už nie je technikom, ale má plnú medicínsku úlohu a je súčasťou manažmentu pacienta (Gouget, 2010).

Reforma vytvára systémy, ktoré zaručujú pluralitu ponuky lekárskeho služieb v rámci územia verejného zdravotníctva, a to stanovením takzvaných preventívnych pravidiel. Právnickým a fyzickým osobám je zakázané nadobúdať podiely v spoločnostiach prevádzkujúcich lekárske laboratórium, ak by výsledkom tohto nadobudnutia bolo umožniť takejto osobe priamo alebo nepriamo kontrolovať podiel, ktorý je vyšší ako 33 % z celkového množstva vykonaných lekárskeho laboratórnych vyšetrení na tom istom regionálnom území verejného zdravotníctva. Zákon zakazuje, aby na základnom imaní laboratórií mali podiel právnické alebo fyzické osoby, ktoré vykonávajú zdravotnícke povolanie, ktoré ich oprávňuje predpisovať laboratórne vyšetrenia alebo vykonávať činnosť dodávateľa, distribútora alebo výrobcu prístrojov lekárskej diagnostiky in vitro, alebo byť zamestnaný v zdravotnej poisťovni alebo v orgánoch sociálneho zabezpečenia, dôchodkového zabezpečenia alebo sociálnej starostlivosti. Nariadenie obsahuje 11 článkov. Obsahuje definíciu medicínskeho biologického testovania, podmienky, za ktorých sa má vykonávať, povinnosti medicínskych laboratórií a úlohu lekárskeho biológa. Ide o zdravotnícky výkon, ktorý prispieva k prevencii chorôb, skríningu, diagnostike a zhodnoteniu rizík vzniku patologických stavov, ktorý je súčasťou rozhodovania, terapeutického manažmentu a určovania alebo sledovania fyziologických alebo fyziopatologických stavov. Nariadenie špecifikuje najmä podmienky pre vykonávanie medicínsko-biologických testov mimo laboratória a stanovuje limity pre rozsah tejto disciplíny (POCT, rýchle skrínigové testy pre lekárov a domáce testy pre pacientov). Stanovuje sa zapojenie lekárskeho biológa do terapeutického vzdelávania pacientov, najmä pre novú kontrolu samomonitorovacích meracích zariadení. Spolu s klinickým lekárom je teraz lekársky biológ zodpovedný za celý lekársky postup, ktorý sa odteraz nazýva lekárske biologické vyšetrenie. Posilňuje sa komunikácia medzi lekárskeho biológom a klinickým lekárom, získavanie relevantných klinických informácií, právo na „náhradné“ vyšetrenia s ohľadom na pravidlá správnej

praxe pre správne predpisovanie. Zodpovednosť lekárskeho biológa v preanalytickej fáze je špecifikovaná v oblasti postupov pri odbere vzoriek vo verejnom a súkromnom sektore a v rôznych situáciách (laboratórium, domov, ústav starostlivosti). Špecifikujú sa body prelínania s patologickou anatómiou a cytológiou.

V r. 2017 malo Francúzsko 953 klinických laboratórií, 10 442 lekárskeho biológov, z toho 2 975 lekárov a 7 467 farmaceutov. Vo Francúzsku (ale aj v iných krajinách ako Portugalsko, Španielsko, Belgicko alebo Švajčiarsko) je biologický farmaceut (vo Francúzsku nazývaný *Pharmacien biologiste*) farmaceut špecializovaný na klinickú biológiu (laboratórnu medicínu). Majú takmer rovnaké práva ako lekári špecializovaní na túto disciplínu. Obaja sa nazývajú „klinický biológ“. Lekársky biológ je lekár alebo farmaceut s diplomom o špecializácii v odbore lekárska biológia. Nariadenie popisuje podmienky, za ktorých môžu laboratórni biológovia vykonávať svoje povolanie, t. j. lekársku biológiu alebo cytopatologickú anatómiu. Tento konkrétny článok umožňuje laboratórnym pracovníkom zaradiť sa do kategórie zdravotníckych pracovníkov. Stanovené sú aj pravidlá, ktoré oprávňujú vykonávať túto disciplínu inými odborníkmi, najmä odborníkmi vyškolenými v iných krajinách. Ak by odborná kvalifikácia potvrdená osvedčeniami o odbornej príprave vydanými tretími štátmi a príslušná odborná prax naznačovala podstatné rozdiely v porovnaní s požadovanými kvalifikáciami vo Francúzsku, musia sa uplatniť kompenzačné opatrenia vo forme skúšok spôsobilosti alebo adaptačných kurzov (Gouget, 2009; Oosterhuis, 2015). Lekárski biológovia predstavujú 2,5 % odborných zdravotníckych pracovníkov. Lekárska biológia pokrýva všetky subdisciplíny v laboratórnej medicíne. Financovanie je založené na type poskytovateľa a je kombináciou verejného a súkromného zdravotníctva s regionálnymi rozdielmi. Celkové výdavky na lekársku biológiu vo Francúzsku, podporované národným systémom zdravotnej starostlivosti, boli 4,3 miliardy eur v súkromnom sektore a 2,4 miliardy eur vo verejnom sektore. Reforma francúzskej biológie poskytla ústredné miesto pre biologickú diagnostiku, ktorá zlepšuje diagnostické cesty a klinické výsledky lepšími službami bližšie ku klinickým lekárom a pomocou nových nástrojov, technológií a laboratórnej medicíny založenej na dôkazoch. Reforma si tiež kladie za cieľ dosiahnuť zoskupenie laboratórií a zachovať územné limity pre činnosť klinických laboratórií. Zdravotnícke laboratóriá môžu byť v nemocnici alebo nemocničnom obvode v rámci

územia, ale tieto pracoviská nesmú byť zriadené na viac ako troch susediacich miestach verejného zdravotníctva, pokiaľ regionálny úrad na to neudelí povolenie (Nicholls, 2017). Nariadenie podporuje profesionalizovanú inšpekciu, t. j. určené poradie a štruktúru vyšetrení na základe referenčných systémov, zverejnených najmä národným orgánom pre zdravie (*Haute Autorité de Santé, HAS*) a zavádza finančnú pokutu pre všetky zdravotnícke laboratóriá za vykonávanie takých vyšetrení, ktoré nie sú uvedené v nomenklatúre postupov lekárskej biológie alebo platných odporúčaní správnej laboratórnej praxe.

Francúzsko je v Európe na čele v zavádzaní povinnej akreditácie. Ak lekárske laboratórium nie je akreditované nemôže mať účasť na klinickom výskumnom skúšaní. Nariadenie stanovuje povinnú akreditačnú schému pre zdravotnícke laboratóriá. Táto akreditácia sa týka všetkých laboratórií, súkromných aj verejných, univerzitných aj neuniverzitných, s cieľom posilniť kvalitu a bezpečnosť testovania. Francúzsky akreditačný výbor (*Comité français d'accréditation, COFRAC*) je jediným orgánom, ktorý je oprávnený udeľovať akreditáciu na základe noriem NF EN ISO 15189 a pred rokom 2023 aj EN ISO 22870. Vyšetrenie akreditované COFRAC zahŕňa niekoľko medicínskych odborov: mikrobiológiu, biochémiu, hemostázu a hematocytológiu. Rozhodnutia vydané COFRAC sa zasielajú národnému úradu pre zdravie (HAS), francúzskej agentúre pre bezpečnosť zdravotných výrobkov (*Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, AFSSAPS*), Agentúre pre biomedicínu (ABM) a Regionálnej zdravotníckej agentúre (ARS). Nariadenie taktiež špecifikuje podmienky inšpekcií, ktoré majú vykonávať inšpekční pracovníci a ich vzťahy s COFRAC. Stanovujú sa správne, disciplinárne a trestné sankcie. Nariadenie tiež nanovo definuje národnú kontrolu kvality výsledkov lekárskeho biologického testovania a navyše sa zavádza povinnosť externého hodnotenia kvality pre všetky lekárske biologické testy.

Štandardným postupom pre pacienta vyžadujúceho laboratórne vyšetrenie vo Francúzsku je ísť do laboratória lekárskej biológie so žiadosťou svojho lekára na laboratórne testy a nechať si vyšetriť biologický materiál. Pandémia COVID-19 ako aj naliehavá potreba riešiť preplnenosť zdravotníckych zariadení však akcelerovala vzostup POCT. Vo Francúzsku je POCT definované ako lekárske biologické vyšetrenie, ktorého analytická fáza sa vykonáva mimo laboratórií lekárskej biológie. Tento typ vyšetrenia, vykonávaný čo najbližšie k pacientovi, je čoraz rozšírenejší, jeho nasadenie urýchlilo zdravotnú krízu spôsobenú koronavi-

rusom. Testovanie v mieste starostlivosti spĺňa široké spektrum výziev v oblasti verejného zdravia: zlepšuje územné pokrytie lekárskej biológie a umožňuje rýchlejšie osloviť viac pacientov, čím bojuje proti prenosným chorobám a antimikrobiálnej rezistencii a zlepšuje prevenciu chorôb a skrining, najmä chronických ochorení. Testovanie na mieste starostlivosti tiež pomáha zmierniť preťaženie na pohotovostných oddeleniach nemocníc, najmä skrátením času potrebného na získanie výsledkov a skrátením počtu hospitalizácií. POCT sú čoraz rozšírenejšie najmä v ambulanciách všeobecných lekárov a na pohotovostných oddeleniach nemocníc, ale aj v lekárňach a menej tradičných lokalitách, ako sú domovy dôchodcov, ambulancie, školy, väznice, atď. Vo Francúzsku existuje množstvo prekážok rozvoja POCT: regulačné nariadenia, normy na implementáciu „offshoringu“ lekárskej biológie, finančné ťažkosti a nedostatočná podpora na nákup prístrojov, preplácanie POC vyšetrení, ale aj otázky týkajúce sa kvality vykonania testov a nedostatku školení potenciálnych používateľov. Existujú rôzne spôsoby riešenia týchto problémov, pričom sa Francúzi inšpirujú krajinami, ktoré už vo veľkej miere zaviedli mobilné biologické systémy a diagnostické testovanie na mieste starostlivosti. Nasadenie POCT vo Francúzsku sa javí o to dôležitejšie vzhľadom na početné výhody offshoringu, ako to jasne ukázala kríza COVID. Zapojenie lekárskeho biológov je nevyhnutné, najmä pri zaškoľovaní personálu užívateľov a zabezpečovaní správneho vykonávania POC testovania (Gouget, 2009).

Holandsko

V holandskom zdravotnom systéme dominujú neziskové nemocenské fondy a nezávislí poskytovatelia. Úloha vlády je malá a zapadá do Bismarckovskej tradície. Zvláštnosťou holandského systému sú praktickí lekári v pozícii ochrancu a nezávislé pôrodné asistentky, ktoré sú zodpovedné za nekomplikované pôrody. Sociálne zdravotné poistenie od svojho vzniku v roku 1941 pokrývalo len dve tretiny obyvateľstva s nižšími príjmami. Na ďalšiu tretinu sa vzťahovalo súkromné zdravotné poistenie. Koncom 60. rokov 20. storočia bol zavedený aj systém sociálneho poistenia pre dlhodobú starostlivosť a neskôr rozšírený na starostlivosť o starších ľudí a služby duševného zdravia. Veľká reforma zdravotníctva v roku 2006 nahradila rozdelenie medzi verejným a súkromným poistením univerzálnym sociálnym zdravotným poistením a zaviedla riadenú súťaž ako hnací mechanizmus v systéme zdravotnej starostlivosti.

Priniesla nielen dlho želaný jednotný systém povinného poistenia, ale zásadne zmenila aj úlohy aktérov v zdravotníctve. Mnohé súkromné zdravotné poisťovne začali v regulovanom prostredí súťažiť o poistencov. Namiesto vlády sa tak relatívne nezávislé orgány stali zodpovednými za riadenie systému. Sociálna podpora bola delegovaná na obce (Kroneman, 2016). V roku 2014 sa služby v oblasti duševného zdravia rozdelili na všeobecné a špecializované, pričom ústrednú úlohu zohráva všeobecný lekár ako poskytovateľ starostlivosti. Hlavnou hnacou silou reformy v r. 2015 sa stala udržateľnosť dlhodobej starostlivosti. Nový zákon sa týkal len najzávažnejších prípadov, zatiaľ čo podpora domácej starostlivosti o starších pacientov prešla do zodpovednosti samospráv. Domáca ošetrovateľská starostlivosť a časť starostlivosti o duševné zdravie boli zahrnuté do základného balíka zdravotného poistenia.

Holandania pozitívne hodnotia kvalitu svojho zdravotného systému. Medzinárodné porovnania ukazujú, že Holandsko má nízke užívanie antibiotík, nízky počet odvrátiteľných hospitalizácií a relatívne nízku odvrátiteľnú úmrtnosť. Vnútroštátne štúdie ukazujú, že zdravotná starostlivosť významne prispela k zdraviu holandskej populácie, čo sa odráža v predlžujúcej sa dĺžke života (Kuipers et al., 2022). Povinné zdravotné poistenie (*basisverzekering*) pokrýva primárnu starostlivosť (napr. starostlivosť o duševné zdravie a pohotovostné služby). Voliteľné doplnkové zdravotné poistenie (*aanvullende verzekering*) pokrýva sekundárnu starostlivosť (napr. stomatólogov a oftalmológov). Dlhodobá starostlivosť, chronické ochorenia a sociálna starostlivosť je financovaná z daní. Za verejnú zdravotnú starostlivosť je v Holandsku zodpovedné Ministerstvo zdravotníctva, sociálnych vecí a športu, ktoré ponúka poradenstvo prostredníctvom Národného ústavu pre verejné zdravie a životné prostredie (*Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, RIVM*). Vláda každý rok prehodnocuje potreby primárnej starostlivosti holandského obyvateľstva a určuje čo bude systém pokrývať a čo nie. Podľa neziskového think-tanku *Foundation for Research on Equal Opportunity* je holandský zdravotnícky systém na treťom mieste na svete (2020). Vysoká kvalita a účinnosť systému je možno dôvodom, prečo bolo Holandsko vyhlásené za ôsmu najzdravšiu krajinu na svete (2021). Celková priemerná dĺžka života je 81,5 roka, čo je takmer o rok viac ako priemer EÚ 80,6 roka (FREOPP.org).

Kým v medicínskych laboratóriách klinickej chémie a laboratórnej medicíny v Nemecku pracuje vyše 2 tisíc

laboratórných profesionálov, z ktorých 2/3 tvoria lekári a 1/3 laboratórni diagnostici (*scientists*), tak v Holandsku pracuje v medicínskych laboratóriách 10x menej pracovníkov ako v Nemecku, z ktorých vyše 90% tvoria laboratórni diagnostici (*scientists*), 2% farmaceuti a len 8% lekári. Pred 8 rokmi bolo Holandsko jedinou krajinou v EÚ bez odbornej prípravy lekárov na špecialistu v laboratórnej medicíne, kde vzdelávanie lekárov bolo v roku 2001 pozastavené. Významnú úlohu v holandských medicínskych laboratóriách zohráva Holandská spoločnosť pre klinickú chémiu a laboratórnu medicínu (*Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde, NVKC*). NVKC je pravdepodobne najstaršou vedeckou profesionálnou asociáciou na svete v oblasti klinickej chémie, ktorú v r. 1947 založila malá skupina veľmi motivovaných a nadšených chemikov pod názvom Spoločnosť pre klinických chemikov a chemických lekárov (*Vereniging voor klinische chemici en chemische artsen*). Holandská spoločnosť pre klinickú chémiu je aj v súčasnosti zaradená medzi lídrami rozvoja klinickej chémie vo svete a významne prispieva k národnému a medzinárodnému pokroku v zdravotnej starostlivosti. NVKC má viacero komisií a pracovných skupín, napr. pre automatizáciu, nádorové markery, molekularno-biologickú diagnostiku, kvalitu, akreditáciu, zahraničné veci a iné. Okrem toho sa členovia NVKC zúčastňujú výskumu a vývoja v mnohých medzinárodných komisiách EFLM a IFCC (Heeren, J. J., 2007).

Ústrednú rolu v klinických laboratóriách Holandska predstavuje kvalita. Od dvadsiatich rokov otázky kvality čoraz viac získavajú ústredné miesto v holandskom systéme zdravotnej starostlivosti. Koncom osemdesiatych a začiatkom deväťdesiatych rokov niekoľko spoločností pre lekárov špecialistov vytvorilo prostredníctvom vzájomných návštevnych komisií štruktúrne hodnotiace postupy. Holandská vláda podnietila tento vývoj a v roku 1989 zorganizovala konferenciu, na ktorej sa zúčastnili všetky relevantné zainteresované strany v holandskom systéme zdravotnej starostlivosti: lekári, pacienti, zdravotné poisťovne (HOPKINS, M. M. et al., 2006). Konferencia viedla k niekoľkým odporúčaniam, ktoré boli prediskutované a preformulované počas nasledujúcich piatich rokov a nakoniec boli stanovené v holandskom zákone. Od roku 1995 holandské laboratóriá v nemocniciach a iných miestach klinickej praxe – alebo s nimi súvisiace – aktívne vytvárajú akreditačný systém na garanciu a zviditeľnenie kvality svojich procesov a tým aj výsledkov najmä pros-

treďníctvom Nadácie pre podporu kvality laboratórneho výskumu a pre akreditáciu zdravotníckych laboratórií (*Stichting voor de bevordering van de kwaliteit van het laboratoriumonderzoek en voor de accreditatie van laboratoria in de gezondheidszorg, CCKL*). Túto nadáciu založili profesijné organizácie klinických chemikov, farmaceutov, mikrobiológov, patológov a imunológov. Pre medicínske laboratóriá vyvinula CCKL všeobecný rámec systému kontroly kvality. Celý proces od požiadavky na laboratórne vyšetrenie až po nahlásenie výsledku lekárovi musí spĺňať prísne požiadavky kvality. Ako prvé ich zaviedli klinické laboratóriá, väčšina laboratórií patológie ich nasledovala v polovici deväťdesiatych rokov. Ďalším krokom bolo, že odborné spoločnosti v oblasti laboratórnej medicíny zriadili organizáciu na vzájomné porovnávacie skúšky testovania - externé hodnotenie kvality. Systematický prístup vyvinutý CCKL je zavedený systém kvality, ktorý je stanovený v príručke. Príručka poskytuje popis všetkých relevantných činností v laboratóriu, organizáciu, vzdelávanie a školenie personálu, údržbu a kalibráciu technických zariadení, hlásenie výsledkov, atď. Príručka obsahuje všetky štandardné pracovné postupy (SOP), ktoré popisujú hlavné činnosti laboratória a ktoré musia byť v súlade medzinárodnou normou pre laboratóriá ISO 15189. CCKL zahrnuje túto normu pre holandské laboratóriá do svojej Praktickej smernice (*Praktijkrichtlijn*).

Národným akreditačným orgánom v Holandsku je Rada pre akreditáciu (*Raad voor Accreditatie, RvA*). Základným prvkom systémov kvality sú každoročné audity každého laboratória osobami, ktoré sú na to vyškolené. Na základe systému interných a externých auditov laboratória vypracovávajú plán kontinuálneho zlepšovania a vykonávajú pravidelné kontroly tak, aby sa plánované zlepšenia realizovali. Keď laboratórium úspešne prejde auditom, získa akreditáciu na štyri roky; po týchto štyroch rokoch musí opäť prejsť auditom. Podľa ISO 15189 vyžaduje RvA akreditácia organizovanie a účasť na programoch externého hodnotenia kvality, na programoch kontinuálneho vzdelávania a školenia a pravidelnú registráciu. Všetci špecialisti v Holandsku sa musia každých päť rokov opätovne zaregistrovať, aby si udržali svoje miesto v lekárskej registrácii. Do roku 2005 získanie akreditácie CCKL nebolo zo zákona povinné. Laboratóriá to robili na dobrovoľnom základe, pretože chceli dodržiavať medzinárodné normy. Akreditácia nemá pre laboratórium žiadne finančné výhody. Z iniciatívy NKVC bola v Holandsku v r.

2015 vydaná Smernica pre laboratórne výsledky (*Richtlijn vrijgave van laboratoriumuitslagen*). NVKC rozvíja nielen svoje vlastné smernice, ale podieľa sa aj na tvorbe smerníc iných špecializácií, ktoré vypracúvajú indikátory kvality v oblasti analytických, kvalitatívnych alebo medicínskych činností klinickej chémie (NVKC Reglement, 2015). Richtlijn vrijgave van laboratoriumuitslagen obsahujú minimálne terénne a cieľové štandardy. Minimálne štandardy predstavujú neprekročiteľné minimum. Jednotlivé kapitoly smernice obsahujú predpisy pre transfúziu krvi (2020), predanalytickú fázu (2020), pokyny pre uvoľňovanie laboratórných výsledkov (2016), usmernenie pre profesionálnu štandardnú klinickú chémiu a laboratórnu medicínu (2013), pokyny na odber vzoriek žilovej krvi (2013), odporúčanú metódu a terminológiu na mikroskopické hodnotenie krvného obrazu (“brožúra Dif”), usmernenie pre konzultácie so špecialistami v laboratórnej medicíne/klinickej chémii (2013) a pokyny pre reflexnú diagnostiku pri anémii (2012).

Holandskí všeobecní lekári v úzkej spolupráci s odborníkmi z diagnostických centier a laboratórií vo veľkej miere prijali testovanie na mieste starostlivosti. Za najväčšie benefity POCT pre pacienta považujú viac bezpečnosti, lepšie služby a lepšiu starostlivosť. Smernicu pre testovanie na mieste starostlivosti (POCT) pre praktického lekára (*Richtlijn Point of care testing (POCT) in de huisartsenzorg*) vypracovala spoločná pracovná skupina Holandskej spoločnosti všeobecných lekárov (NHG), Holandskej asociácie pre klinickú chémiu a laboratórnu medicínu (NVKC), Holandskej asociácie pre lekársku mikrobiológiu (NVMM) a Asociácia lekárske laboratórií Holandska (SAN) (Hopstaken, 2015). Toto usmernenie poskytuje odporúčania na bezpečné používanie POCT v praxi praktických lekárov. Okrem toho sú v nej špecifikované samostatné zodpovednosti a úlohy POCT pre poskytovateľov zdravotnej starostlivosti v zariadeniach všeobecných lekárov a pre spolupracujúce laboratóriá a diagnostické centrá. Richtlijn Point of care testing (POCT) in de huisartsenzorg sa obmedzuje na testy vykonávané v zariadeniach praktického lekára a neposkytuje odporúčania týkajúce sa testovania samotným pacientom na samotestovanie a domáce testy. Zariadenia všeobecných lekárov môžu byť akreditované/certifikované prostredníctvom *NHG Practice Accreditation*. Hodnotiaci rámec vytvorila rada odborníkov, ktorá pozostáva zo zástupcov všeobecných lekárov (NHG a LHV), pacientov (NPCF) a zdravotných poisťovní

(ZN), pričom pozorovateľom je Inšpektorát zdravotnej starostlivosti (IGZ). Cieľom systému akreditácie je, aby všeobecní lekári udržiavali systematickú politiku kvality, založenú okrem iného na zákonných požiadavkách a špecifických profesijných a národne stanovených indikátoroch kvality. Ak celkový proces POCT v zariadení všeobecného lekára podporuje akreditované laboratórium, zabezpečenie kvality POC testovania na ambulancii všeobecného lekára spadá do akreditácie príslušného laboratória. Ambulancia všeobecného lekára, ktorá nakupuje a používa POCT vo vlastnej réžii, musí spĺňať požiadavky zákona o kvalite zdravotníckych zariadení. Pokiaľ ide o výkonnostné charakteristiky, za dobré meranie sa všeobecne považuje vysoká medziľahlá presnosť (opakovateľnosť a reprodukovateľnosť) spolu s dobrou nadväznosťou na referenčné materiály. Referenčné intervaly a rozhodovacie limity umožňujú užívateľovi porovnať výsledky s normálnou populáciou a robiť lekárske rozhodnutia. Tieto tri prvky presnosť, správnosť a referenčný interval, resp. rozhodovací limit, ktoré sa nachádzajú medzinárodných usmerneniach (smernice CLIA a IVDR), tvoria základ výkonnostných charakteristík na overenie vyšetrovacieho postupu. Okrem toho sa niekedy uvádzajú laboratórne technické požiadavky, ako napríklad rozsah linearity testu (CLIA). Na základe vyššie uvedeného boli v smernici NVKC z roku 2016 zvolené nasledujúce výkonnostné charakteristiky na validáciu: presnosť (opakovateľnosť a reprodukovateľnosť), neistota merania, analytická špecifickosť vrátane rušivých látok, analytická citlivosť, limit detekcie a limit stanovenia, rozsah merania, diagnostická špecifickosť a diagnostická citlivosť merania. Stanovisko z EFLM Working Group Accreditation a normy ISO/CEN pridáva ešte „porovnanie s predchádzajúcou metódou“, pretože je dôležité, aby laboratórium aj žiadateľ porovnali výsledky novozavedenej metódy s výsledkami predchádzajúcej metódy. V roku 2022 nadobudla účinnosť nová príloha II odsek 6 o overovaní a validácii, ktorá nevyžaduje vyhodnocovanie uvedených charakteristík, ale povinnosť poskytovať údaje o spomínaných výkonnostných charakteristikách. Mimoriadna pozornosť sa venuje stabilite vzorky a činidla, nadväznosti kalibrátorov, klinickému výkonu a vhodnosti na zamýšľaný účel. Počas validácie sa musia zdokumentovať všetky uvedené výkonnostné charakteristiky a akceptačné kritériá, počas overovania to platí pre obmedzený výber.

Nórsko

Nórsko a ostatné škandinávske krajiny sú považované za príklad úspešných národných systémov. Nórska zdravotná starostlivosť nie je bezplatná, ale je silne dotovaná. Nórsky systém zdravotnej starostlivosti je založený na princípoch univerzálneho prístupu, decentralizácie a slobodného výberu poskytovateľa. V prepočte na osobu sú nórske výdavky na zdravotnú starostlivosť najvyššie na svete. Každý člen nórskeho systému národného poistenia má právo na prístup k službám zdravotnej starostlivosti. Vo všeobecnosti je to každý daňový poplatník s trvalým pobytom v Nórsku. Liečba však nie je bezplatná. Nórski obyvatelia platia za zdravotnícke služby na mieste poskytovania služieb. Poplatky sú však dotované a existuje ročný limit, koľko musí jednotlivec zaplatiť za zdravotnú starostlivosť. Zatiaľ čo politika zdravotnej starostlivosti je riadená centrálnou, zodpovednosť za poskytovanie zdravotnej starostlivosti je decentralizovaná. Miestne orgány na komunálnej úrovni organizujú a financujú služby primárnej zdravotnej starostlivosti podľa miestneho dopytu. Ústredná vláda má celkovú riadiacu a finančnú zodpovednosť za nemocničný sektor. Všetky verejné nemocnice v Nórsku prevádzkujú štyri regionálne zdravotnícke úrady (RHA), na ktoré dohliada ministerstvo zdravotníctva a opatrovateľských služieb.

Obyvatelia Nórska, žiadatelia o azyl alebo členovia NATO majú nárok na všeobecného lekára (*fastlege*). Jedná sa o nórsky ekvivalent všeobecného lekára (GP), u ktorého je zaregistrovaných 99% Nórov. V mestách majú skupiny všeobecných lekárov tendenciu pracovať z jedného zdravotníckeho zariadenia, aby využili širšie možnosti. Každý si môže slobodne vybrať svojho praktického lekára a bezplatne sa zaregistrovať. Svoju registráciu môže zmeniť maximálne dvakrát do roka. Akákoľvek zmena je účinná od prvého dňa nasledujúceho mesiaca. Keď však človek dosiahne ročný limit výdavkov (v súčasnosti niečo cez 2 000 NOK), dostane kartu výnimky, ktorá ho oprávňuje na bezplatné ošetrovanie po zvyšok roka. Tento systém zabezpečuje, že každý trochu zaplatí, no chorí nie sú zaťaženi stresom z obrovských zdravotných účtov. Výnimky z tohto systému zahŕňajú deti do šestnásť rokov a tehotné ženy, ktoré dostávajú bezplatnú zdravotnú starostlivosť.

Väčšina všeobecných lekárov sú samostatne zárobkovo činní a sú súčasťou praxe s dvoma až šiestimi lekármi. Praktickí lekári sa sami rozhodujú, ktorý POCT ponúknu svojim pacientom. Prax je súčasťou verejného systému

prostredníctvom zmlúv s obcami. Praktickí lekári dostávajú platby od samospráv, poplatok za službu od externej agentúry Nórskej správy pre zdravotníctvo a sociálne veci (*Helseøkonomiforvaltningen, HELFO*) a hotovostné platby od pacientov až do výšky približne 250 eur ročne, po ktorých sa už neplatí žiadna spoluúčasť. O presnom platobnom systéme rozhoduje na národnej úrovni Ministerstvo zdravotníctva po rokovaní s Nórskou lekárskou asociáciou (*Den norske legeförening*). Približne 95 % nórskeho lekárov je registrovanými členmi *Den norske legeförening*, profesijného združenia a odborového zväzu lekárov, ktoré zohráva aktívnu úlohu v rozvoji systému zdravotnej starostlivosti. Praktickí lekári sú v celej krajine pomerne rozšírení, ale špecializovaná starostlivosť sa zvyčajne obmedzuje na mestské oblasti. Väčšina všeobecných lekárov v mestských aj vidieckych prostrediach využíva POCT.

Testovanie na mieste starostlivosti (POCT) zahŕňa odber vzoriek a vykonávanie biomedicínskych laboratórnych analýz v blízkosti pacienta a mimo klinických laboratórií. POCT sa vykonáva v rámci nemocníc na úrazových a urgentných oddeleniach, na akútnych oddeleniach (ARO, JIS, ambulancie). Mimo nemocníc záchranármi, v ústavoch ošetrovateľskej starostlivosti, opatrovateľských domoch, na klinikách v primárnej zdravotnej starostlivosti a v domovoch seniorov. Za decentralizovanú analytickú činnosť a jej kvalitu zodpovedajú laboratórni diagnostici z biomedicínskeho laboratória spolu so špecialistami v laboratórnej medicíne. Laboratórni diagnostici z biomedicínskych laboratórií sú zodpovední za výber metód a zariadení, ktoré sa majú použiť pri testovaní v mieste starostlivosti, zabezpečenie a zlepšenie kvality všetkých analytických prác vykonaných v oblastiach blízko pacientom a na vyhodnotenie prínosu a alokácie zdrojov v rámci analýzy blízko pacienta. Vypracovávajú užívateľské pokyny, podieľajú sa na praktických tréningových postupoch pre užívateľov. Zabezpečujú poradenstvo s cieľom zabezpečiť, aby sa metódy a vybavenie používali v súlade so schválenými protokolmi. Dbajú a kontrolujú dodržiavanie interných a externých protokolov kontroly kvality. Nórsky inštitút biomedicínskych vied pre testovanie POC v nemocniciach deklaruje tieto základné princípy (NITO, 2008):

1. Celkovú zodpovednosť za POC testovanie v nemocniciach majú biomedicínske laboratóriá.
2. Všetky nemocnice musia mať v biomedicínskom laboratóriu laboratórnych diagnostikov, ktorí sú zodpo-

vední za POC testovanie a plnia funkciu koordinátorov POCT. To zahŕňa zodpovednosť aj za výber štandardizovaných metód a zariadení, multidisciplinárnu spoluprácu, poradenstvo a zabezpečenie kvality.

3. Potreba a náklady súvisiace s testovaním v mieste starostlivosti sa musia vyhodnotiť z hľadiska optimálnej liečby pacienta a celkového využitia zdrojov v zdravotníckych službách.
4. Kvalita testovania v mieste starostlivosti musí byť zabezpečená prostredníctvom systematického monitorovania a overovania používaných metód a zariadení, aby sa zabezpečilo, že spĺňajú rovnaké normy kvality ako ostatné analytické postupy v biomedicínskych laboratóriách.
5. Výsledky získané z testovania v mieste starostlivosti musia byť hlásené rutinnými postupmi pre oznamovanie výsledkov a musia byť vystopovateľné.

Odborné premisy POC testovania **mimo nemocníc** zahŕňajú:

1. Ktokoľvek vykonáva analýzu, musí zabezpečiť, aby výsledky poskytovali reprezentatívny parameter pre stav ochorenia alebo liečby. Každá analytická práca musí byť zabezpečená kvalitou.
2. Tí, ktorí vykonávajú analytickú prácu mimo nemocnice, sa zúčastňujú programu NOKLUS (podrobnosti v ďalšom texte) alebo podobného systému zabezpečenia kvality.
3. Metódy a analytické vybavenie používané mimo nemocnice by mali byť, pokiaľ je to možné, štandardizované a prispôsobené metódam, ktoré používa spolupracujúce biomedicínske laboratórium.
4. Tí, ktorí ponúkajú vybavenie (prístroje) na POC testovanie, musia zverejniť poznatky o analytických variáciách a mať postup potrebný zabezpečenie kvality metód a zariadení.
5. Pacienti, ktorí si testujú a vyhodnocujú výsledky sami na svoj vlastný konkrétny stav, musia absolvovať aspoň raz ročne primerané školenie a nadväzne aj prístup ku kontrole kvality metód a vybavenia.
6. Za zabezpečenie kvality analytickej práce vykonávanej mimo nemocnice prostredníctvom POCT sú zodpovední pracovníci biomedicínskych laboratórií, ktorí fungujú v pozícii nórske laboratórnych konzultantov. Pracovníci biomedicínskych laboratórií v špecializovanej zdravotnej službe sú navyše zodpovední za všeobecné

rady a usmernenia vo vzťahu k primárnym zdravotníckym službám.

Každý konzultant má prehľad o všetkých užívateľoch POCT vo svojom regióne a celkový register vedie centrála. Odborné vedenie laboratórnych konzultantov zabezpečuje centrála spoločnosti NOKLUS, ktorá zároveň prevádzkuje systém externého zabezpečenia kvality (EHK) pre všetkých užívateľov POCT v primárnej zdravotnej starostlivosti. NOKLUS neustále monitoruje a hodnotí užívateľov z hľadiska zabezpečenia kvality, používania testov a akýchkoľvek problémov, ktoré môžu nastať. NOKLUS tiež radí vláde a Nórskeho lekárskeho združenia, ktoré testy by mali byť preplácané. Väčšinu odporúčaných testov pre všeobecných lekárov vláda prepláca. Približne 3500 užívateľom POC testovania poskytuje svoje služby aj národná Nórska nezisková organizácia pre zlepšovanie kvality laboratórnych vyšetrení (NOKLUS). Všetkým nórske ambulanciám všeobecných lekárov, nemocničným a súkromným lekárske laboratóriám, opatrovateľským domom a iným zdravotníckym inštitúciám ponúka programy externého hodnotenia kvality (EHK). NOKLUS ponúka svoje služby ambulanciám nórske lekárov, opatrovateľským domom a zdravotným inštitúciám, vojenským zariadeniam a pacientom, ktorí si sami robia testovanie doma. NOKLUS organizuje vzdelávacie kurzy (asi 700 ročne s približne 7000 účastníkmi) a poskytuje poradenstvo poskytovateľom zdravotnej starostlivosti v primárnej zdravotnej starostlivosti. Okrem toho každoročne organizuje v oblasti klinickej chémie míting pre biomedicínskych laboratórnych diagnostikov a špecialistov v laboratórnej medicíne v sekundárnej zdravotnej starostlivosti. NOKLUS je decentralizovaná organizácia s približne 120 zamestnancami, prevažne laboratórnymi diagnostikmi a špecialistami v laboratórnej medicíne. Približne 40 zamestnancov má sídlo v centrále v Bergene a zvyšní pracujú v 22 rôznych miestnych pobočkách v rámci nemocníc po celej krajine. To umožňuje tesný kontakt so všetkými účastníkmi. NOKLUS má dohodu o partnerstve so všetkými štyrmi nórske regionálnymi zdravotníckymi úradmi a *Fürst Medical Laboratory*. V deväťdesiatych rokoch sa v Nórsku objavili obavy, že laboratórne testy na mieste starostlivosti (POCT) sú vykonávané s nízkou analytickou kvalitou. Preto v roku 1992 Nórska lekárska asociácia, Nórske združenie miestnych a regionálnych orgánov a Ministerstvo zdravotníctva a opatrovateľských služieb založili NOKLUS s cieľom zlepšiť

všetky prvky celkového testovacieho procesu v primárnej zdravotnej starostlivosti. V roku 2017 sa NOKLUS zlúčil s organizáciou Nórskeho programu externého hodnotenia kvality v klinickej chémii, ktorá bola zodpovedná za poskytovanie schém externého hodnotenia kvality (EHK) nemocničným laboratóriám. Odvtedy sa NOKLUS zameriava na primárnu aj sekundárnu zdravotnú starostlivosť. Služby, ktoré ponúka ambulanciám všeobecných lekárov, financuje Nórska lekárska asociácia prostredníctvom fondu na zlepšenie kvality. Ostatní účastníci ako domovy dôchodcov, domáca starostlivosť a nemocničné laboratória platia účastnícky poplatok.

Hlavnou úlohou NOKLUS je ponuka programov externého hodnotenia kvality (EHK) pre všetky POC testy, ktoré sa vykonávajú na mieste starostlivosti. Účast' v NOKLUS nie je povinná, no približne 99 % všetkých praktických lekárov sa ho zúčastňuje dobrovoľne. Spoločnosť aktívne spolupracuje s inými organizátormi EHK a koordinuje prihlasovanie nemocničných a súkromných lekárske laboratórií do schém externého hodnotenia kvality od iných organizácií EHK. Poskytuje tiež poradenstvo, aké analytické metódy použiť. NOKLUS pomáha nemocniciam a súkromným lekárske laboratóriám v odborných a praktických otázkach a zapája sa do rôznych projektov rozvoja kvality v úzkej spolupráci s národnými a medzinárodnými akademickými komunitami. Ročne organizuje 1000 kurzov po celej krajine, ktorých sa zúčastňuje takmer 10 000 ľudí, čo z NOKLUS robí významného organizátora kurzov pre poskytovateľov zdravotnej starostlivosti. Každoročné stretnutie pracovníkov v oblasti klinickej chémie je populárnym vzdelávacím stretnutím pre laboratórnych pracovníkov a špecialistov biomedicínskych laboratórií. NOKLUS ponúka desať webových kurzov (e-learning) v oblasti laboratórnej práce, ktoré pokrývajú témy ako odber vzoriek krvi a moču, testovanie v mieste starostlivosti, predanalytické chyby a práca na zabezpečenie kvality. NOKLUS je zodpovedný aj za rozvoj a každodennú prevádzku Nórskeho národného registra diabetu pre dospelých, ktorého hlavným cieľom je zlepšiť kvalitu liečby ľudí s cukrovkou. Register tiež poskytuje údaje pre výskum diabetu a s ním súvisiacich stavov. Nórske pacientom liečeným warfarínom ponúka vzdelávacie kurzy o samodávkovaní a samokontrole INR. Štúdie ukázali, že samotestovanie a sebakontrola robí pacientov viac informovanými a že majú väčší pocit slobody a dôvery vo vzťahu k vlastnej situácii a že ich kvalita života je lepšia. Spoločnosť NOKLUS

si vybudovala dobrú medzinárodnú povest' pre svoj výskum v oblasti testovania na mieste starostlivosti a laboratórneho testovania v primárnej zdravotnej starostlivosti a vedie aj doktorandské štúdium (Lingervelder, 2022).

SKUP

Škandinávské hodnotenie laboratórneho vybavenia pre testovanie na mieste starostlivosti (*Skandinavisk utprøving av laboratorieutstyr for pasientnær analyse-ring, SKUP*), je spoločnou organizáciou medzi Dánskym inštitútom pre externé zabezpečenie kvality v zdravotníckych laboratóriách (*Dansk Institut for Ekstern Kvalitetssikring for Laboratorier i Sundhedssektoren, DEKS*), Švédskym organizátorom externého zabezpečenia kvality (*Akrediterad arrangør av extern kvalitetssikring, Equalis*) a Nórskou organizáciou pre zlepšovanie kvality laboratórnych vyšetrení (*Norsk kvalitetsforbedring av laboratorieundersøkelser, NOKLUS*). SKUP bol založený v roku 1997 z iniciatívy odborníkov v oblasti laboratórnej medicíny v troch krajinách Nórsku, Dánsku a Švédsku, pretože neexistoval žiaden systém hodnotenia POCT prístrojov. SKUP vedie škandinávsky riadiaci výbor a sekretariát sa nachádza v Nórskom Bergene v sídle NOKLUS. NOKLUS je národná nezisková organizácia, ktorú spravuje komisia zložená zo zástupcov nórskej vlády, Nórskej lekárskej asociácie a Nórskej spoločnosti lekárskej biochémie. Nórska asociácia miestnych a krajských úradov ma v komisii štatút pozorovateľa. Účelom SKUP je zlepšiť v Škandinávii kvalitu testovania poskytovaním objektívnych a dodávateľsky nezávislých informácií o analytickej kvalite a užívateľskej prívetivosti meracích systémov na mieste starostlivosti. Protokoly SKUP hodnotení sú prístupné na web stránke <https://www.skup.org/evaluation-results/evaluations/>. K dátumu predloženia tohto rukopisu ich bolo 136, z toho 41 na glukózu, 15 na PT(INR), 12 na StrepTest A, 8 na HbA1c, 7 na CRP, 5 na SARS-CoV-2, 3 na u-hCG, a po jednom na NT-proBNP, močové prúžky, leukocyty, MAU, lipidový profil a iné.

Hodnotenie SKUP je skúškou analytickeho výkonu a užívateľskej prívetivosti meracieho systému. Hodnotenia SKUP sa riadia vopred stanovenými a všeobecnými pokynmi opísanými v protokole a vykonávajú ich zamýšľaní používatelia meracieho systému s čerstvo odobratými vzorkami. Analytický výkon sa hodnotí podľa vopred stanovených pravidiel a používatelia, ktorí sa zúčastňujú hodnotenia SKUP, vyjadria svoj názor na používateľskú

prívetivosť v štruktúrovanom a podrobnom dotazníku zostavenom SKUP. Špecifikácie analytického výkonu (Analytical Performance Specifications, APS) a klinicky relevantné limity určuje v hodnoteniach SKUP podľa toho, čo považuje za najmodernejšie v oblasti laboratórneho testovania. APS (predtým analytické ciele kvality) sú založené prevažne na medzinárodných a/alebo národných usmerneniach, ako aj na vedeckých publikáciách. APS v hodnoteniach SKUP sú uvedené v protokole a správe testovaného zariadenia. SKUP kontroluje APS pred každým hodnotením a v prípade potreby ich upravuje na základe vyššie uvedených zdrojov. Užívateľská prívetivosť sa hodnotí štruktúrovaným dotazníkom týkajúcim sa všetkých aspektov meracieho systému. Dotazník zahŕňa hodnotenie jednoduchosti obsluhy, informácií v používateľskej príručke, a internú analytickú kontrolu kvality a stabilitu testu. Pre každú otázku môže hodnotiteľ vybrať odpoveď uspokojivú, strednú alebo neuspokojivú. Na dosiahnutie celkového hodnotenia „uspokojivý“ musí merací systém dosiahnuť celkové hodnotenie „uspokojivý“ vo všetkých podoblastiach. SKUP ponúka hodnotenie meracích systémov pre použitie v mieste starostlivosti aj výrobcom a dodávateľom POCT prístrojov. Spoločnosť žiadajúca o hodnotenie zaplatí náklady na hodnotenie a na oplátku dostane nestranné hodnotenie svojho systému. Správy SKUP sú publikované a dostupné na webovej stránke <https://www.skup.org/about-skup/the-aim-and-organisation-of-skup/>. SKUP nestanovuje lehotu platnosti výsledkov hodnotenia a ani nešpecifikuje, ktoré zmeny produktu je možné vykonať bez straty platnosti úvodnej hodnotiacej správy. Čas, kedy SKUP hodnotil produkt, je uvedený v správe. Hodnotené prístroje by mali byť v štandardnej verzii a reprezentatívne pre prístroje na trhu. Ak je to možné, do hodnotenia sú zahrnuté tri šarže činidiel/testovacích prúžkov/kaziet. Hodnotenie SKUP sa vzťahuje výlučne na prístroje a šarže činidiel/testovacích prúžkov/kaziet použitých pri hodnotení a nemôže zaručiť, že iné prístroje alebo čísla šarží činidiel/testovacích prúžkov/kaziet poskytnú rovnaké výsledky. Je to výhradne výrobca prístroja a činidiel/testovacích prúžkov/kaziet, ktorý môže zabezpečiť, že výkon a ostatné charakteristiky meracieho systému na predaj sú ekvivalentné tým, ktoré hodnotí SKUP.

Spojené štáty americké (USA)

USA sú jedinou rozvinutou krajinou bez systému univerzálnej zdravotnej starostlivosti a značná časť ich oby-

vateľstva nemá zdravotné poistenie. Systém zdravotnej starostlivosti v USA neposkytuje univerzálne pokrytie a možno ho definovať ako zmiešaný systém, v ktorom verejne financované štátne zdravotné poistenie *Medicare* a *Medicaid* koexistuje so súkromne financovaným trhovým pokrytím (US Healthcare System Overview). Zdravotná starostlivosť v Spojených štátoch je z veľkej časti poskytovaná súkromnými zdravotníckymi zariadeniami a je hradená kombináciou verejných programov, súkromného poistenia a platieb z vlastného vrecka. Spojené štáty americké vynakladajú na zdravotnú starostlivosť viac ako ktorákoľvek iná krajina, a to v absolútnom vyjadrení aj v percentách HDP (https://en.wikipedia.org/wiki/Healthcare_in_the_United_States). Pokrytie zdravotnej starostlivosti sa v rámci populácie značne líši, pričom určité skupiny, ako napr. starí ľudia a jednotlivci s nízkymi príjmami, dostávajú komplexnejšiu starostlivosť prostredníctvom vládnych programov Medicaid a Medicare.

V 80. rokoch 20. storočia vzniklo v USA niekoľko pojmov týkajúcich sa laboratórneho testovania: testovanie v blízkosti pacienta (*near patient testing*), testovanie pri lôžku (*bedside testing*), testovanie v mieste starostlivosti (*point of care testing*), decentralizované testovanie (*decentralized testing*), doplnkové testovanie (*ancillary testing*), náročné testovanie (*complexity testing*). Na laboratórne testovanie dohliada regulačný program *Clinical Laboratory Improvement Amendments, CLIA*, ktorý bol v r. 1988 schválený Kongresom Spojených štátov amerických ako federálny zákon s cieľom regulovať laboratórne testovanie a zabezpečiť presnosť, spoľahlivosť a včasnosť laboratórnych výsledkov. Systém CLIA 88 je súbor postupov a opatrení na kontrolu kvality laboratórneho testovania (Regulatory and Quality Assurance Frameworks for PGX, 2006). Všetky laboratóriá a POCT miesta, ktoré vykonávajú diagnostické alebo terapeutické testovanie u ľudí, musia mať certifikáciu CLIA. Platia pre nich rovnaké predpisy bez ohľadu na to, kde sa test vykonáva. Všetky programy POCT musia požiadať o certifikát CLIA a vybrať si vhodnú akreditačnú agentúru pre svoje potreby. Všetky akreditačné agentúry musia dodržiavať požiadavky uvedené vo federálnom registri, niektoré agentúry sú prísnejšie ako iné. Proces certifikácie CLIA zahŕňa absolvovanie série inšpekcií, ktoré majú zabezpečiť, aby laboratórium bolo riadne personálne a technicky vybavené a malo zavedený systém kontroly a zabezpečenia kvality. Všetok laboratórny personál musí byť riadne vyškolený a kvalifikovaný na vyko-

návanie svojich úloh. O laboratóriách, ktoré spĺňajú tieto normy, sa hovorí, že sú „v súlade so zákonom o zlepšovaní systému klinických laboratórií“. CLIA od klinických laboratórií vyžaduje, aby mali príslušný certifikát pred prijatím ľudských vzoriek na testovanie. Existujú rôzne typy certifikátov CLIA, ako aj rôzne regulačné požiadavky na základe typov a zložitosti klinických laboratórnych testov, ktoré laboratórium vykonáva. CLIA realizuje viacero federálnych agentúr, z ktorých každá má špecifické funkcie:

- **Ministerstvo zdravotníctva a sociálnych služieb** (*The U.S. Department of Health and Human Services, HHS*) certifikuje laboratóriá.
- **Centrá pre Medicare & Medicaid Services (CMS)** spravujú certifikačný program CLIA pre Ministerstvo zdravotníctva, ktorý pozostáva z nasledujúcich funkcií:
 - Slúžia ako kontrolné agentúry pre dodržiavanie CLIA.
 - Zverejňujú pravidlá a predpisy CLIA.
 - Kontrolujú dodržiavania predpisov.
 - Vydávajú laboratórne certifikáty.
 - Monitorujú výkon laboratórií testovaním spôsobilosti.
 - Schvaľujú programy testovania spôsobilosti.
- **Úrad pre potraviny a liečivá** (*Food and Drug Administration, FDA*). Je zodpovedný za ochranu verejného zdravia. Zaisťuje bezpečnosť, účinnosť a ochranu humánnych a veterinárnych liekov, biologických produktov, zdravotníckych pomôcok, potravín, kozmetiky a rádioaktívnych produktov.
 - Kategorizuje laboratórne testy na základe zložitosti.
 - Vytvára pravidlá a usmernenia pre kategorizáciu zložitosti testov podľa CLIA.
 - Posudzuje žiadosti o výnimku testov.
- **Centrum pre kontrolu a prevenciu chorôb** (*The Centers for Disease Control and Prevention, CDC*)
 - Vytvára a distribuuje odborné informačné a vzdelávacie materiály.
 - Vytvára technické normy a usmernenia (*guidelines*) pre laboratórnu prax.
 - Vykonáva laboratórne štúdie na zlepšenie kvality.
 - Riadi poradný výbor CLIA.
 - Monitoruje postupy testovania odbornej spôsobilosti.
 - Poskytuje technickú pomoc, analýzu a výskum.

CLIA klasifikuje laboratórne testy na základe zložitosti výkonu a špecifických požiadaviek do troch hlavných kategórií:

- **waived tests** - voľné, jednoduché testovanie, ktoré nepodliehajú regulácii CLIA. Patria sem jednoduché testy, ktoré majú nízke riziko chybných výsledkov. Existuje približne 120 *waiver* testov, medzi ktorými sa nachádzajú aj také, ktoré môžu mať negatívny vplyv na zdravie, ak sa vykonajú nepresne.
- **non-waived tests of moderate complexity** - testovanie strednej zložitosti, napr. testovanie na ľudský papilomavírus (HPV), testovanie na chrípku a testovanie na streptokoky.
- **non-waived tests of high complexity** - náročné testovanie, napr. z histopatológie, mikrobiológie a molekulárne testovanie. Laboratóriá, ktoré vykonávajú testovanie strednej zložitosti, podliehajú prísnejším predpisom ako laboratóriá, ktoré vykonávajú jednoduché testy. Laboratóriá alebo pracoviská, ktoré vykonávajú komplexné testy, musia mať CLIA certifikát, musia spĺňať normy kvality (CLIA) (interná kontrola kvality a skúšky spôsobilosti (*Proficiency testing, PT*)).

Na niektorých miestach sa spomína aj štvrtá kategória testov a to mikroskopia vykonávaná poskytovateľom. Podľa CLIA klinické laboratórne testy vrátane testovania v mieste starostlivosti (POCT) skúmajú „materiály pochádzajúce z ľudského tela za účelom poskytovania informácií na diagnostiku, prevenciu alebo liečbu akejkoľvek choroby...“.

Regulačný dohľad nad POCT sa v USA líši od klinických laboratórnych služieb v niekoľkých ohľadoch. Federálna regulácia POCT je minimálna a pre väčšinu testov v tejto kategórii je jedinou požiadavkou, aby sa test vykonal podľa pokynov výrobcu (Ehrmeyer, 2011). Z 234 584 laboratórií, ktoré registruje CLIA (2022), má 80 % certifikát na voľné testovanie (*Waiver*), 9 % na vlastnú mikroskopiu (*Provider Performed Microscopy*), 6 % Osvedčenie o zhode, 5 % Osvedčenie o akreditácii. Podľa týchto údajov len 11 % všetkých testovacích miest absolvuje dvojročnú kontrolu zo strany regulačných orgánov. Na zvyšných 89 % testovacích miestach nie je kontrola garantovaná. Na ambulantné testovanie (*Physician Operated Labs, POL*), je vydaných 131 238 licencií CLIA, z nich 70 % licencií má licenciu na voľné testovanie (*Waiver*), 18 % na mikroskopiu vykonávanú poskytovateľom, 8 % osvedčenie o zhode a 4 % osvedčenie o akreditácii (*Point of Care Testing (2022)*, <https://ascls.org/point-of-care/>). *Point-of-Care* testy, na ktoré sa nevzťahuje CLIA, môžu vykonávať aj lekáreň, ak disponujú *Waiver* certifikátom (COW). COW sa zvyčajne

získava od Štátnej rady zdravia. POC testy, ktoré sú oslobodené od podmienok komplexnosti, sa sústreďujú na 3 fázy testovania: preanalytické, analytické a postanalytické. Štáty a akreditačné agentúry často kladú na POCT dodatočné požiadavky, s ktorými sa zdravotnícke zariadenia musia vysporiadať. Tieto požiadavky sa zameriavajú predovšetkým na kompetentnosť operátora (školenie a spôsobilosť personálu vykonávajúceho testovanie) a overenie, či postupy špecifikované výrobcom POCT zariadenia pre daný test sa prísne dodržiavajú. To je obzvlášť dôležité, pretože voľné alebo stredne zložité laboratórne metódy, môžu za určitých okolností vykonávať aj nelaboratórni pracovníci a vtedy sa stávajú veľmi zložitými, ak sa používajú spôsobom, ktorý sa odchyľuje od protokolu (pokynov) výrobcu schváleného FDA. Vysoko komplexné laboratórne testy môžu podľa federálneho zákona vykonávať iba pracovníci, ktorí spĺňajú kvalifikáciu špecifikovanú v CLIA.

Kanada

Kanada má decentralizovaný, univerzálny, verejne financovaný zdravotný systém s názvom *Canadian Medicare*. Zdravotná starostlivosť je financovaná a spravovaná predovšetkým 13 provinciami a územiami krajiny. Každý z nich má svoj vlastný poisťný plán a každý dostáva finančnú pomoc od federálnej vlády na základe počtu obyvateľov. Canadian Medicare bol zriadený na základe federálnej legislatívy pôvodne schválenej v roku 1957 a v roku 1966. Kanadský zákon o zdraví z roku 1984 nahrádza a konsoliduje dva predchádzajúce zákony a stanovuje národné štandardy pre medicínsky nevyhnutné nemocničné, diagnostické a lekárske služby (Martin, 2018).

Za správu a poskytovanie zdravotnej starostlivosti v Kanade zodpovedá každá provincia (štát). Všetci občania a osoby s trvalým pobytom majú bezplatne nemocničné a lekárske služby. Na úhradu vylúčených služieb vrátane ambulantných liekov na predpis a zubnej starostlivosti poskytujú provincie určité pokrytie pre cieľové skupiny. Okrem toho asi dve tretiny Kanadčanov majú súkromné poistenie. Primárnu zodpovednosť za financovanie, organizáciu a poskytovanie zdravotníckych služieb a dohľad nad poskytovateľmi majú provincionálne a územné vlády. Federálna vláda spolufinancuje programy univerzálneho zdravotného poistenia a spravuje celý rad služieb pre určité skupiny obyvateľstva vrátane oprávnených pôvodných obyvateľov a Inuitov (Eskimákov arktického územia Kanady), členov kanadských ozbrojených síl, veteránov, utečencov a niektorých ďalších špecifických

skupín obyvateľstva. Vláda reguluje bezpečnosť a účinnosť zdravotníckych pomôcok, liečiv a prírodných zdravotných produktov, financuje zdravotnícky výskum a niektoré systémy informačných technológií a spravuje niekoľko funkcií verejného zdravotníctva na celoštátnej úrovni. Federálne ministerstvom zdravotníctva (*Health Canada*) zohráva kľúčovú regulačnú úlohu v oblasti bezpečnosti potravín a liekov, preskúmania zdravotníckych pomôcok a technológií a dodržiavania národných noriem. Kanadská agentúra verejného zdravia (*The Public Health Agency of Canada*) je zodpovedná za verejné zdravie, mimoriadne situácie, kontrolu a prevenciu infekčných a chronických chorôb a podporu zdravia. Nové ministerstvo federálnej vlády Služby domorodých obyvateľov Kanady (*Indigenous Services Canada*) financuje určité zdravotnícke služby pre domorodcov a Inuitov.

Národná vedecká a profesionálna organizácia zastupujúca klinických biochemikov v celej Kanade sa nazýva Kanadská spoločnosť klinických chemikov (*Canadian Society of Clinical Chemists, CSCC*). CSCC predstavuje vedúce postavenie v praxi klinickej biochémie a klinickej laboratórnej medicíny prostredníctvom služieb, vzdelávania a výskumu. CSCC dbá na bezpečnosť pacientov vývojom a podporou vysokých štandardov kvality v rámci diagnostických služieb. CSCC slúži ako zdroj a partner pre vládu, priemysel a zdravotníctvo. Podporuje profesiu klinickej biochémie a zasadzuje sa za odborné uznanie klinických biochemikov (<https://cscsccc.ca/>). Klinickí biochemici sú laboratórni diagnostici na úrovni PhD so špecializovaným postdoktorandským vzdelaním v laboratórnej medicíne. Všetci majú certifikáciu od Kanadskej akadémie klinickej biochémie alebo jeho ekvivalent. Priebežná odborná spôsobilosť je zabezpečená účasťou v programe Udržiavanie kompetencií, ktorý ponúka Akadémia. Klinickí biochemici zabezpečujú poskytovanie konzistentne vysokej kvality, presných a presných výsledkov biochemických testov, aby sa pacientovi mohla poskytnúť vysokokvalitná starostlivosť. Klinickí biochemici vedú vývoj a implementáciu laboratórnych systémov manažérstva kvality, ktoré zahŕňajú všetky aspekty testovacieho procesu: preanalytickú, analytickú a postanalytickú fázu.

Akreditáciu klinických laboratórií v Kanade regulujú provinčné zdravotnícke orgány. Z desiatich provincií Kanady má päť akreditačné orgány, zatiaľ čo v ostatných piatich provinciách sú medicínske laboratóriá akreditované Kanadskou radou pre akreditáciu zdravotníckych služieb (*Canadian Counsel on Health Service Accreditation, CCHSA*).

Každý z týchto akreditačných orgánov má svoje vlastné normy, ktoré v rôznom rozsahu implementujú dokumenty Medzinárodnej organizácie pre normalizáciu ISO. Národný program a harmonizáciu riadenia kvality v klinických laboratóriách zabezpečuje Kanadská koalícia pre kvalitu v laboratórnej medicíne (*Canadian Coalition for Quality in Laboratory Medicine, CCQLM*) (Li, 2009).

POC testovanie sa používa v rôznych prostrediach, ale najčastejšie na pohotovosti a v urgentnej medicíne, v nemocničnej ústavnej starostlivosti, primárnej starostlivosti a pri samotestovaní pacientov. POC testovanie zvyčajne vykonávajú nelaboratórne vyškolení jednotlivci, predovšetkým sestry, lekári, perfúziológovia, respirační fyzioterapeuti, pôrodné asistentky a záchranári, ako aj pacienti. POC testovanie iniciovali kanadskí poskytovatelia zdravotnej starostlivosti kvôli problémom s nedostupnosťou laboratórnych testov vo vidieckych zariadeniach v málo osídlených oblastiach. Testovanie na mieste pacienta nemusí byť akreditované a nevzťahujú sa naň rovnaké normy kvality a regulačné požiadavky ako na centrálné laboratória. To následne vedie k zvýšenému záujmu regulačných orgánov o monitorovanie kvality POCT a jeho implementácie. Naopak, ak sa POCT vykonáva v prostredí, ktoré patrí do zodpovednosti centrálného laboratória, štandardy kvality a regulačné požiadavky musia byť splnené. Príkladom toho je centrálny laboratórny dohľad nad programami POCT v rámci skupiny nemocníc združenia *Eastern Ontario Regional Laboratory Association (EORLA)* v Ontáriu.

Koncept POCT sa v Kanade riadi právnou definíciou „POCT je testovanie vykonávané kvalifikovanými zdravotníckymi odborníkmi mimo uznávaných a akreditovaných verejných alebo súkromných laboratórií a mimo inštitúcií poskytujúcich zdravotné a sociálne služby“. Politika definuje riadiace a technické požiadavky pre POCT v rámci nasledujúcich kategórií (28):

- dohľad nad riadením postupov POC testovania
- kritériá výberu, nákupu a inštalácie prístrojov
- protokoly hodnotenia a schvaľovania POCT prístrojov
- požiadavky na správnosť a presnosť POCT prístrojov
- údržba POCT prístrojov
- manipulácia so spotrebným materiálom a činidlami
- školenie, certifikácia a re-certifikácia operátorov POCT
- kontrola a zabezpečenie kvality
- správa zdravotnej dokumentácie

Centrálné laboratória v každej lokalite EORLA dohliadajú na programy POCT v rámci svojich nemocníc, poskytujú poradenstvo v oblasti zabezpečenia a kontroly kvality a dokumentácie výsledkov.

Austrália

Austrálsky systém zdravotnej starostlivosti je jedným z najkomplexnejších a patrí medzi najlepšie na svete. Ponúka celý rad služieb od všeobecného a preventívneho zdravia až po liečbu zložitejších stavov, ktoré si vyžadujú špecialistov alebo nemocničnú starostlivosť. Systém má dve hlavné časti: systém verejného zdravotníctva a súkromný systém zdravotníctva. Austrália má regionálne spravovaný program univerzálneho verejného zdravotného poistenia (*Medicare*), ktorý je financovaný prostredníctvom všeobecných daňových príjmov a vládneho odvodu. Registrácia je automatická pre občanov, ktorí majú bezplatnú verejnú nemocničnú starostlivosť a značné pokrytie lekárskeho služieb, liekov a niektorých ďalších služieb. Do *Medicare* sa môžu zapísať aj občania Nového Zélandu, osoby s trvalým pobytom a ľudia z krajín s recipročnými výhodami. Približne polovica Austráľčanov si kupuje aj súkromné doplnkové poistenie na zaplatenie súkromnej nemocničnej starostlivosti, služieb stomatólogov a iných služieb. Federálna vláda poskytuje finančné prostriedky a nepriamu podporu pre ústavnú a ambulantnú starostlivosť prostredníctvom programu Výhodný Medicare (*Medicare Benefits Scheme, MBS*) a pre ambulantné lieky na predpis prostredníctvom programu Farma výhody (*Pharmaceutical Benefits Scheme, PBS*). Federálna vláda je tiež zodpovedná za reguláciu súkromného zdravotného poistenia a vypláca buď zľavu zo súkromného poistného alebo účtuje daňovú pokutu domácnostiam s vyššími príjmami, ktoré si nekúpia súkromné poistenie (The Australian health system, 2019).

Austrália má 31 primárnych zdravotníckych sietí, ktoré spolupracujú priamo s praktickými lekármi a inými poskytovateľmi primárnej starostlivosti s cieľom zlepšiť koordináciu starostlivosti o pacientov. V Austrálii sú praktickí lekári zvyčajne považovaní za samostatne zárobkovo činné osoby a sú súčasťou praxe s priemerne štyrmi praktickými lekármi na ordináciu. V prípade špecializovaných služieb môže pacient poberať dávku programu Výhodný Medicare (*Medicare Benefits Scheme, MBS*) len vtedy, ak ho odporučí praktický lekár. Poprednou profesiou organizáciou všeobecných lekárov v Austrálii je Kráľovská austrálska akadémia všeobecných lekárov (*Royal Australian College*

of *General Practitioners, RACGP*), ktorá poskytuje podporu praktickým lekárom prostredníctvom vzdelávania, školenia, zdrojov, smerníc a štandardov, ktoré môžu praktickí lekári použiť pri poskytovaní vysokokvalitnej zdravotnej starostlivosti. RACGP razí presvedčenie, že POCT by malo byť prístupné praktickým lekárom a malo by byť kryté zdrojmi MBS. Austrálska akadémia vidieckej a vzdialenej medicíny (*Australian College of Rural and Remote Medicine*) je profesiou organizáciou mnohých praktických lekárov na vidieku (Dixit, 2018).

Neexistujú žiadne povinné štandardy alebo usmernenia, ktoré by praktickí lekári mali dodržiavať pri používaní POCT. Za kvalitu sú zodpovední sami a za týchto podmienok nemajú POCT zahrnuté v platbách MBS. Aby mal všeobecný lekár nárok na platby MBS, musí mať prax akreditovanú podľa noriem pre POCT. Normy implementované vo všeobecnej praxi pre POCT spadajú pod Národnú poradnú komisiu pre akreditáciu patológie (*National Pathology Accreditation Advisory Council, NPAAC*), ktorá od praktických lekárov vyžaduje, aby dodržiavali rovnaké štandardy ako klinické laboratória. To znamená, že praktickí lekári musia dodržiavať akreditačné opatrenia, ktoré boli vyvinuté pre medicínske laboratória, čo vyžaduje, aby si praktickí lekári zaregistrovali svoju prax ako akreditované klinické laboratória podľa noriem Austrálskej národnej asociácie pre skúšobné laboratória (*National Association of Testing Authorities, NATA*), čo je nielen časovo náročné, ale aj nákladné, pretože zahŕňa rozsiahlu administratívnu prácu a návštevy na mieste. Väčšina implementovaných POCT u praktických lekárov sa v súčasnosti vykonáva bez akreditácie prostredníctvom certifikovaného systému Austrálskej národnej asociácie pre skúšobné laboratória. To znamená, že neexistuje kontrola kvality POC testovania ani ich nemožno účtovať MBS.

Od roku 2019 bolo v Austrálii akreditovaných cca 20 praktických lekárov, ktorí vo svojej praxi používajú testy POC. V súčasnosti existujú dva súbory noriem a usmernení na implementáciu POCT a zabezpečenie vhodného použitia vo všeobecnej praxi; jeden je navrhnutý NPAAC a druhý RACGP. V rámci požiadaviek na implementáciu POCT u praktického lekára obidva dokumenty stanovujú rámce kvality, klinické riadenie, školenia, bezpečnosť a likvidáciu odpadu. Austrálska asociácia klinických biochemikov (*Australasian Association for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine, AACB*) odporúča, aby každé zdravotnícke centrum, ktoré chce implementovať POCT,

zriadilo plánovacia skupina pozostávajúca zo všetkých zamestnancov, ktorí sa budú podieľať na testovaní POC, aby sa pred implementáciou podelili o zodpovednosť za plánovanie vyžadované normami a smernicami. Táto plánovacia skupina v ideálnom prípade rozhodne aj o tom, ktoré POC testy kúpi, a bude zodpovedná za obstarávanie zariadení od výrobcu. Smernice a štandardy vyžadujú, aby každá ordinácia mala supervízora POCT (napríklad určitého a vyškoleného praktického lekára, zdravotnú sestru alebo praktického asistenta), ktorý dohliada na používanie a riadenie POCT v praxi a aby táto osoba dostatočne rozumela aj POCT. Supervízor musí absolvovať príslušné školenie a môže delegovať niektoré zodpovednosti na iného člena praxe, pokiaľ tento člen tiež absolvoval školenie POCT. Supervízor alebo ním menovaný pracovník je tiež zodpovedný za zabezpečenie kvality POCT v rámci ordinácie a musí pravidelne vykonávať a overovať kontrolu kvality, skúmať výsledky a výkon a kontrolovať trendy vo výsledkoch kontroly kvality. Hoci ordinácia by mala byť akreditovaná ako klinické laboratórium, lekári v ordinácii, sestry alebo asistenti sa považujú za nelaboratórne vyškolený personál (Lingervelder, 2022).

Austrália v uvádzaní POCT technológií za ostatným vyspelým svetom nezaostáva, práve naopak. Rozsiahla geografická rozloha ju k tomuto systému zdravotníckej starostlivosti priam predurčuje. Odhaduje sa, že v celej Austrálii sa každý rok vykoná približne 8 až 10 miliónov POC testov. To je v porovnaní s počtom testov vykonaných centrálnymi laborátormi málo, ale očakáva sa, že objem POCT porastie. Platba za väčšinu typov POCT je dostupná prostredníctvom Medicare za predpokladu, že takéto testovanie vykonáva akreditované laboratórium. Aby bolo laboratórium akreditované, musí spĺňať normu AS 4633 / ISO 15189. Austrália zaviedla nariadenie, ktoré od výrobcov POCT vyžaduje, aby používateľom dodávali ľahko zrozumiteľné pokyny a špecifikácie, ktoré zabezpečia správne používanie zariadení. Glukometre a koagulometre sú rozšírené už mnoho rokov. Nemocnice a akreditované klinické laboratória používajú širokú škálu POCT zariadení. S výnimkou glukózy sa nemocničné POC testovanie zvyčajne týka pohotovosti alebo kritickej starostlivosti a často sa vykonáva v nadväznosti na akreditované laboratórne služby (Tirimacco, R., 2010). Zdravotné sestry a iní zdravotníckí pracovníci, ktorí pracujú vo veľmi vzdialených lokalitách alebo v malých vidieckych nemocniciach, ktoré nemajú laboratórium, často potrebujú mať možnosť testovať na

mieste. POC testovanie je väčšinou združené do sietí ako QAAMS, iCCnet a POCT Pathology Queensland. Tieto siete využívajú zdokumentované postupy kontroly kvality a zúčastňujú sa externého hodnotenia kvality alebo skúšok spôsobilosti. POCT využíva špeciálne navrhnutý program EHK a indikátorov kvality. Často prehliadané, ale tiež veľmi bežné v Austrálii, je použitie POCT v športovej medicíne a skríningu na pracovisku na zneužívanie drog. Z právneho hľadiska sa POC testovanie drog (a etanolu) zvyčajne považuje len za predbežný alebo skríningový postup. Pozitívne skríningové testy na zneužívanie drog zvyčajne vyžadujú potvrdenie akreditovaným laboratóriom na základe austrálskeho štandardu AS 4308.

Normy pre POCT vo všeobecnej praxi spadajú v súčasnosti pod Národnú poradnú radu pre akreditáciu laboratórií (NPAAC), čo znamená, že všeobecná prax sa riadi rovnakými normami ako klinické laboratóriá. Rámec riadenia POCT stanovujú Požiadavky na testovanie v mieste starostlivosti (*Requirements for Point of Care Testing, 2021*), ktoré poskytujú usmernenia pre každé zdravotnícke zariadenie alebo zariadenie spojené s laboratóriom, ktoré vykonáva POCT. Dodržanie týchto požiadaviek zaisťuje, že bezpečnosť pacienta nie je ohrozená. Požiadavky na testovanie v mieste starostlivosti, ktoré boli aktualizované v r. 2021, majú prístup založený na riziku, ktorý odzrkadľuje aktuálne najlepšiu prax pri vykonávaní POCT. V tomto štandarde je zahrnutý aj súbor požiadaviek vytvorených RACGP, ktorý sa používa pri akreditácii POCT vykonávanej v prostredí všeobecnej praxe. Tieto štandardy obsahujú rovnaké kľúčové princípy pre POCT ako zastrešujúce štandardy. Do úvahy sa berú všetky príslušné austrálske predpisy a normy. V Austrálii podliehajú všetky diagnostické zdravotnícke pomôcky in vitro (IVD) regulácii podľa zákona Austrálskeho registra zdravotníckych prípravkov (*Australian Register of Therapeutic Goods, ARTG*). IVD určené na použitie v mieste starostlivosti musia byť uvedené v austrálskom registri ARTG predtým, ako môžu byť dodané a distribuované v Austrálii. ARTG je verejne dostupná databáza zdravotníckych pomôcok, ktoré možno legálne predávať a dodávať v Austrálii. Informácie obsiahnuté v ARTG zahŕňajú názov produktu a podrobnosti o jeho zložení, použití a výrobcovi /predajcovi.

ZÁVER

V 20. storočí sa pozornosť zo všeobecnej patológie presunula na špecifické choroby. Toto obdobie je známe aj ako

terapeutická revolúcia chápaná ako moment, kedy začala fungovať medicína. „Zdravie pre všetkých“ bol cieľ stanovený v roku 1978 vo vyhlásení medzinárodnej konferencie o primárnej zdravotnej starostlivosti (*Alma Ata*). Jeho hlavnou agendou bolo vyjadrenie potreby naliehavých krokov všetkých vlád, všetkých zdravotníckych pracovníkov a svetového spoločenstva na ochranu a podporu zdravia všetkých ľudí. Postupy a rozvoj zdravotnej starostlivosti v jednotlivých krajinách sa líšia, pretože zdravotná starostlivosť bola vždy tradične považovaná za miestne odvetvie špecifické pre regióny a krajiny. Niektorým krajinám sa podarilo vybudovať silný systém zdravotnej starostlivosti, iné krajiny stále zaostávajú v mnohých faktoroch. V súčasnosti sa však zdravotná starostlivosť mení na globálne odvetvie, ktoré vyžaduje harmonizáciu vo všetkých oblastiach, laboratórnu medicínu a POCT nevyvíjajú. Meniaci sa moderný životný štýl, spôsob stravovania, obezita a nedostatok pohybu vedie k zvýšenej prevalencii chronických ochorení v populácii. Tieto faktory sa stávajú motorom využívaniu diagnostických prípravkov aj mimo laboratórií. Prísne regulačné opatrenia a konkurenčné prostredie vedie výrobcov k produkcii diagnostických súprav s vyššou účinnosťou. Rozvoj infraštruktúry a zdravotníckych zariadení a obrovský počet ľudí s chronickými poruchami stupňuje zvýšený dopyt po diagnostických metódach s modernými technológiami a technikami potrebnými na vykonávanie diagnostických postupov. Nedostatok zručností nelaboratórnych pracovníkov a laikov vedie k vývoju čoraz k sofistikovanejších medicínskych diagnostických technológií nielen s vylepšenými technikami, ale aj softvérovým systémom zabudovaným do zariadení. Rýchle akceptovanie novo vyvinutých technológií a zlepšenie kvality testovania pomocou vylepšených technológií vedie k rozvoju zdravotnej starostlivosti v zaostalých regiónoch. Regulačný dohľad nad POCT sa v niekoľkých ohľadoch líši od iných klinických laboratórnych služieb a udržiavanie súladu s úradmi zapojenými do dohľadu nad POCT je náročná úloha. Aby sa test vykonal podľa pokynov výrobcu často nestačí. Štáty a akreditačné agentúry často kladú na POCT dodatočné požiadavky, s ktorými sa zdravotnícke zariadenia musia vysporiadať. Elektronické lekárske záznamy umožnia okamžité zdieľanie výsledkov testovania s poskytovateľmi zdravotnej starostlivosti. Očakáva sa, že v budúcnosti sa POCT rozšíri ešte na viac oblastí diagnostiky a liečby infekčných chorôb, v onkologických ochorení a demencie. Na zaručenie bezpečnosti pacienta je nevyhnutné, aby nasadenie, implementácia a hodno-

tenie POCT bolo vykonané na základe jasného postupu a zabezpečenia kvality. V dôsledku nedostatku predpisov nie je kvalita POCT vždy dostatočne známa. POCT sa musí použiť na správnu indikáciu, na správne príznaky ochorenia, v správnom čase a pre správneho pacienta. To si vyžaduje dostupnosť a prenos vedecky podložených medicínskych poznatkov a optimalizáciu všetkých technických a prevádzkových aspektov. Vo všeobecnosti platí, že kvalita POCT je taká dobrá, aký dobrý je najslabší článok reťaze. Indikácia a interpretácia laboratórnej diagnostiky a POCT je odlišná v primárnej starostlivosti (extramurálna, najmä ambulancia všeobecného lekára) a v sekundárnej starostlivosti (intra-murálna, hlavne nemocničná). Pacienti v primárnej starostlivosti majú často v ranom štádiu málo výrazných ťažkostí alebo príznakov. Riziko ochorenia vopred je často malé. Oba tieto faktory ovplyvňujú charakteristiky diagnostického testu, ako je citlivosť, špecifickosť, pozitívna a negatívna prediktívna hodnota zamýšľaného POC testu, ktorý sa má použiť. Napríklad diagnostická pridaná hodnota s nízkou pravdepodobnosťou ochorenia môže byť stále značná, dokonca aj pri teste so stredne pozitívnou prediktívnou hodnotou. Na druhej strane sa môže stať, že POC test s vysokou negatívnu prediktívnou hodnotou sotva prispieva k manažmentu pacienta, pretože riziko ochorenia bolo už vopred extrémne nízke. Okrem toho závažnosť stavu tiež zohráva dôležitú úlohu pri zvažovaní testovacích charakteristík. POC testovanie u praktického lekára môže vykonávať iba oprávnený a kvalifikovaný personál, ktorý musí mať potrebný praktický výcvik v laboratórnej práci. Odporúča sa, aby pracovisko praktického lekára okrem kontroly kvality s kontrolnými vzorkami systematicky porovnávalo výsledky POC testov aj s laboratóriom. Ďalej musí pracovisko POCT venovať dostatočnú pozornosť údržbe POCT zariadenia, kontrole a skladovaniu materiálov v ambulancii a tiež evidencii chybových hlásení. Monitorovanie (resp. kontrola) kvality testovania v zariadeniach všeobecných lekárov má byť trvalou súčasťou POCT. Vzhľadom na zložitosť procesu validácie a overovania POCT prístrojov ponúkaných na trhu je žiaduce, aby pracovisko praktického lekára posúdilo spolu s laboratóriom, či konkrétny POCT prístroj vyhovuje na účely zamýšľaného použitia. Podľa praktických lekárov je poradie najvýznamnejších POCT charakteristík nasledovné (1) vysoká diagnostická správnosť (citlivosť a špecifickosť), (2) užívateľská prívetivosť (*user-friendliness*), (3) rýchly výsledok testu (krátky TAT), (4) ekonomicky efektívny, (5) kvantitatívny výsledok testu, (6) primeraná doba použiteľnosti. Poradie

dôležitosti (naliehavosti) pre použitie POC testov je podľa praktických lekárov nasledovné: (1) okamžité rozhodovanie o manažmente pacienta, (2) istota diagnostického a liečebného rozhodnutia, (3) lepšia komunikácia s pacientom, (4) efektívnejšia ambulantná prax, (5) spokojnosť a komfort pacienta (Matthes, 2023).

Technológie nikdy neprestanú napredovať, najmä čo sa týka presnosti, špecifickosti, citlivosti a rýchlejšej doby obrátky. Vďaka tomu diagnostické testy umožnia rýchlejšie rozhodovanie a jednoduchšiu interpretáciu. Okrem toho, užitočnosť zariadení POCT bude umocňovať umelá inteligencia, ktorá sa stane kľúčovým prostriedkom na podporu lekárov pri analýze údajov o pacientovi a pri diagnostickom rozhodovaní. Významným spôsobom môže posilniť úlohu domácich testov a ich prepojenie prostredníctvom aplikácií a telemedicíny.

LITERATÚRA

1. **Australian Register of Therapeutic Goods (ARTG).** <https://www.tga.gov.au/products/australian-register-therapeutic-goods-artg>
2. **Balla, J. (2022).** Implementačné úskalia nového nariadenia EU/2017/746 In vitro diagnostické zdravotnícke pomôcky / Implementation challenges of the new EU/2017/746 In vitro diagnostic medical devices regulation. *Laboratórna diagnostika, XXVII(1/2022)*, 96–106. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6457967>
3. **Dixit, S. K., Sambasivan, M. (2018)** „A review of the Australian healthcare system: A policy perspective “. *SAGE Open Medicine Volume 6: 1–14*, 2018. <https://doi.org/10.1177/2050312118769211>
4. **Ehrmeyer, S. (2011)** The US Regulatory Requirements for Point-of-Care Testing”. *Point of Care: The Journal of Near-Patient Testing & Technology* 10(2): p 59-62. DOI:10.1097/POC.0b013e31821bd6af
5. **Future Market Insights (2023)** „Global Point-of-Care Diagnostics Market Snapshot (2023 to 2033)“ May 2023, REP-GB-17291. <https://www.futuremarketinsights.com/reports/point-of-care-diagnostics-market>
6. **Gouget, B. (2009)** „Organization and evolution of the regulation and standards in France for the clinical laboratories” *Clinical Biochemistry* 42 (2009) 314.
7. **Gouget, B. (2010)** „SFBC and the Transformation of Medical Biology in France: Benchmark for the EU? “ *EFCC Newsletter* August 2010. <http://www.efccim.eu>
8. **Healthcare in the Netherlands. (2016)** Ministry of Public Health, Welfare and Sport. The Netherlands, January 2016.

9. Heeren, J. J. (2007) „Highlights of history: foundation of the Netherlands Society for Clinical Chemistry. “Breda. IFCC conference EuroMedLab Amsterdam 2007.
10. HOPKINS, M. M. et al. (2006). “Regulatory and Quality Assurance Frameworks for PGX: A Comparative Study of the US, EU and Four EU Member States. Part 3 An esto study on pharmacogenetics and pharmacogenomics: state of the art and social and economic impacts.” Technical Report EUR 22214 EN. European Commission Directorate-General Joint Research Centre (<http://www.jrc.ec.eu.int>). Institute for Prospective Technological Studies (<http://www.jrc.es>).
11. Hopstaken, R.M. (2015). „Richtlijn Point of care testing (POCT) in de huisartsenzorg“. Nederlands Huisartsen Genootschap (NHG), de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde (NVKC), de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM) en de Samenwerkende Artsenlaboratoria Nederland (SAN).
12. HOWICK J et al. (2014). Current and future use of point-of-care tests in primary care: an international survey in Australia, Belgium, The Netherlands, the UK and the USA”. *BMJ Open* 2014; 4:e005611. <https://doi:10.1136/bmjopen-2014-005611>
13. HSU CC. The Delphi Technique: Making Sense of Consensus. Practical Assessment, Research & Evaluation. Volume 12, Number 10, August 2007 ISSN 1531-7714.
14. Kip, M. A, et al (2019) „Understanding the adoption and use of point-of-care tests in Dutch general practices using multi-criteria decision analysis “. *BMC Family Practice* (2019) 20:8. <https://doi.org/10.1186/s12875-018-0893-4>
15. Kroneman, M., Boerma, W., van den Berg, M. et al. (2016). „The Netherlands: health system review. “*Health Systems in Transition*, 2016; 18(2):1–239. <https://eurohealthobservatory.who.int/publications/i/netherlands-health-system-review-2016>
16. Kuipers et al. (2022) „Is the healthcare provision in the Netherlands compliant with universal health coverage based on the right to health? A narrative literature review. “ *Globalization and Health* (2022) 18:38. <https://doi.org/10.1186/s12992-022-00831-7>
17. Li, H., Adeli, K. (2009) Laboratory quality regulations and accreditation standards in Canada. *Clinical Biochemistry*, Volume 42, Issues 4–5, March 2009, Pages 249–255.
18. Lingervelder, D. et al. (2022) „How to Realize the Benefits of Point-of-Care Testing at the General Practice: A Comparison of Four High-Income Countries“. *Int J Health Policy Manag* 2022, 11(10), 2248–2260. <https://doi.org/10.34172/ijhpm.2021.143>
19. LINGERVELDER D, KOFFIJBERG H, EMERY JD et al. How to Realize the Benefits of Point-of-Care Testing at the General Practice: A Comparison of Four High-Income Countries. *International Journal of Health Policy and Management*, 2022, 11(10), 2248–2260. DOI: 10.34172/ijhpm.2021.143
20. Martin, D. et al. (2018). “Canada’s universal health-care system: achieving its potential”. *Lancet* 2018; 391: 1718–35.
21. MATTHES A, WOLF F, SCHMIEMANN G, et al. Point-of-care laboratory testing in primary care: utilization, limitations and perspectives of general practitioners in Germany. *BMC Primary Care* (2023) 24:96. <https://doi.org/10.1186/s12875-023-02054-0>
22. Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency. **Revision January 2021**. Management and use of IVD point of care test devices .
23. Nicholls, M. (2017) „Lab medicine in Norway, Serbia and France“ <https://healthcare-in-europe.com/en/news/lab-medicine-in-norway-serbia-france.html>
24. NITO - Norges ingeniør- og teknologorganisasjon: Point of Care Testing. 2. edition, revised 2008. www.nito.no/bfi
25. NVKC Reglement: ontwikkeling, herziening en autorisatie van richtlijnen commissie richtlijnen VERSIE 2, Maart 2015. <https://www.nvkc.nl/ons-vak/kwaliteit-richtlijnen>
26. Oosterhuis, W. P., Zerah, S. (2015) „Laboratory medicine in the European Union“ *Clin Chem Lab Med* 2015; 53(1): 5–14.
27. Or, Z. et al. (2023) **France: health system review 2023**. Country report. *Health Systems in Transition*, Vol. 25 No. 3. <https://eurohealthobservatory.who.int/publications/i/france-health-system-review-2023>
28. Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. *Journal officiel «Lois et Décrets» JORF n° 0012 du 15 janvier 2010*.
29. Ordonnance no 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. *JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE*. 15 janvier 2010. Texte 43 sur 195.
30. **Point of Care Testing (2022)**. Position paper. The American Society for Clinical Laboratory Science (ASCLS). Approved Revision June 30, 2022 <https://ascls.org/point-of-care/>
31. **Precedence Research (2023)** „Point-of-Care Testing (POCT) Market Size, 2023 - 2032“, June 2023, Report Code:2270. <https://www.precedenceresearch.com/point-of-care-testing-market>
32. **Regulation (EU) 2017/746** of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission

- Decision 2010/227/EU. Official Journal of the European Union L 117/176 (2017).
- 33. Regulation (EU) 2022/112** of the European Parliament and of the Council of 25 January 2022 amending Regulation (EU) 2017/746 as regards transitional provisions for certain in vitro diagnostic medical devices and the deferred application of conditions for in-house devices. Official Journal of the European Union L 19/3 (2022).
- 34. Requirements for Point of care testing (Second Edition 2021).** Australian Government Department of Health. NPAAC Tier 4 Document. https://www.safetyandquality.gov.au/sites/default/files/2022-08/tier_4_requirements_for_point_of_care_testing_second_edition_2021.pdf
- 35. The Australian health system (2019).** Australian Government, The Department of Health and Aged Care. <https://www.health.gov.au/about-us/the-australian-health-system>
- 36. The Community Pharmacy Contractual Framework for 2019/20 to 2023/24: supporting delivery for the NHS Long Term Plan. (2019).** Medicines and Pharmacy Directorate / DHSC/London. www.gov.uk/dhsc
- 37. Tirimacco R, St John A, Astill K, et al. (2019)** „Point of Care Testing Implementation Guide.“ Australasian Association of Clinical Biochemists (AACB); 2019.
- 38. Tirimacco, R. Evolution of Point-of-Care Testing in Australia.”** Clin Biochem Rev. 2010 Aug; 31(3): 75–80. PMID: 24150508; PMCID: PMC2924125.
- 39. US Healthcare System Overview. Basic information.** <https://www.ispor.org/heor-resources/more-heor-resources/us-healthcare-system-overview/us-healthcare-system-overview-background-page-1>



DIAGNOSTIKA OCHORENÍ ÚSTNEJ DUTINY, PERSPEKTÍVNE MARKERY PARODONTITÍDY A ICH VYUŽITIE V RUTINNEJ DIAGNOSTIKE DIAGNOSTICS OF ORAL CAVITY DISEASES, PROSPECTIVE MARKERS OF PERIODONTITIS AND THEIR USE IN ROUTINE DIAGNOSTICS

Petra Bejdová^{1,2}, Katarína Dubayová¹, Mária Mareková¹

¹ Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF, LF UPJŠ v Košiciach, Košice

² Pearl Dental Bratislava

katarina.dubayova@upjs.sk

SÚHRN

Diagnostika ochorení ústnej dutiny je neoddeliteľnou súčasťou poskytovania kvalitnej zdravotnej starostlivosti. Parodontitída je považovaná za jedno z najrozšírenejších imunitne-zápalových ochorení ústnej dutiny, kedy v dôsledku pôsobenia patogénnych baktérií dochádza k deštrukcii periodontálneho tkaniva. Veľký dôraz sa kladie na prevenciu a včasnú diagnostiku, aby nedošlo k nedoškľu k nezvratnému poškodeniu tkaniva. Konvenčné klinické parametre na diagnostiku parodontitídy často nie sú postačujúce. Preto sa výskum sústreďuje na hľadanie markerov ochorení ústnej dutiny najmä analýzou slín. Prehľadová práca prináša najnovšie poznatky o molekulových markeroch parodontitídy, ktoré sú prítomné v slinách a majú potenciál na včasnú neinvazívnu diagnostiku ako aj monitoring úspešnosti liečby tohto ochorenia.

Kľúčové slová: parodontitída; slina; diagnostika; molekulové markery

ABSTRACT

Diagnosis of oral diseases is an integral part of providing quality healthcare. Periodontitis is considered one of the most prevalent immune-inflammatory diseases of the oral cavity, where the destruction of periodontal tissue occurs as a result of the action of pathogenic bacteria. Great

emphasis is placed on prevention and early diagnosis to prevent irreversible tissue damage. Conventional clinical parameters for the diagnosis of periodontitis are often not sufficient. Therefore, research is focused on the search for markers of oral disease, mainly by saliva analysis. This review paper presents the latest findings on molecular markers of periodontitis that are present in saliva and have the potential for early non-invasive diagnosis as well as monitoring the success of treatment of this disease.

Key words: periodontitis; saliva; diagnostics; molecular markers

ÚVOD

Ochorenia ústnej dutiny patria k najrozšírenejším chorobám na celom svete a majú vážne zdravotné následky a zásadný vplyv na kvalitu života. Široká škála chorôb a porúch postihuje mäkké a tvrdé tkanivá ústnej dutiny, vrátane radu kraniofaciálnych porúch, vrodených anomálií, poranení a rôznych infekcií. K najbežnejším ochoreniam patrí zubný kaz, parodontálne ochorenie a s nimi spojená strata zubov. Zriedkavé nie sú ani nádory v orofaciálnej oblasti. Orálne ochorenia majú spoločné rizikové faktory, medzi ktoré patrí najčastejšie konzumácia jednoduchých cukrov, užívanie tabaku, konzumácia alkoholu a nesprávna životospráva (Peres a kol., 2019).

Diagnostika ochorení ústnej dutiny je neoddeliteľnou súčasťou poskytovania kvalitnej zdravotnej starostlivosti. Včasná detekcia ochorení, či už orálnych alebo systémových zohráva rozhodujúcu úlohu v rámci prognózy a stanovení liečby. Systematický prístup k vyšetreniu pacienta je kľúčový pre efektívnu diagnostiku a diferenciálnu diagnostiku. To zahŕňa dôkladné klinické intraorálne vyšetrenie ústnej dutiny a extraorálne vyšetrenie, pri ktorom sa lekár zameriava na identifikáciu možných príznakov, symptómov ochorení a prípadnej bolesti u pacienta (Robinson a kol., 2018)

Okrem diagnostiky zubných kazov sa v praxi zubný lekár stretáva takmer denne s ochoreniami parodontu. Parodontitída je považovaná za jedno z najrozšírejších imunitne-zápalových ochorení ústnej dutiny. Pochádza zo špecifickej patogénnej interakcie baktérie – hostiteľ a vedie k deštrukcii periodontálneho tkaniva (Ramenzoni a kol., 2021).

PARODONTÁLNE OCHORENIA

Parodontitída je chronická bakteriálna infekcia parodontu, ktorá vedie k deštrukcii kostí a spojivového tkaniva (Peres a kol., 2019). Hlavnými cieľmi parodontálnej liečby by mala byť včasná diagnostika a manažment, pretože je ťažké obnoviť parodont po úbytku alveolárnej kosti. Parodontitída však často postupuje bez prejavov akýchkoľvek symptómov a mnohí pacienti nevyhľadajú odbornú zubnú starostlivosť, kým poškodenie parodontu nedosiahne nezvratné štádium (Isola, 2022).

Parodontálne ochorenia vznikajú zväčša na podklade zápalového procesu, ktorý postihuje závesný aparát zuba (tkanivo, ktoré obklopuje a fixuje zub). Hlavnou príčinou ochorenia parodontu je nesprávna ústna hygiena, ktorá vedie k hromadeniu patogénneho mikrobiálneho biofilmu (plaku) na okraji ďasien a pod ním. Najčastejšou etiológiou býva zápal spôsobený bakteriálnymi kmeňmi v zubnom plaku. Hlavnými bakteriálnymi kmeňmi, ktoré zapríčiňujú progresívne ochorenia parodontu sú *Actinobacillus*, ktorý uvoľňuje leukotoxín ničiaci granulocyty, monocyty a endotoxíny a spôsobuje resorpciu kostí. *Porphyromonas* je schopný štiepiť kolagén typu I, II a III a spirochéty spôsobujúce nekrotizujúcu ulceróznú gingivitídu a parodontitídu.

Chronická parodontitída predstavuje najčastejšie ochorenie parodontu a po zubnom kaze je druhým najčastejším ochorením ústnej dutiny. Vzniká na podklade

neliečenej gingivitídy, ktorá sa prejavuje najmä krvácaním a opuchom ďasien. Zápal postupne deštruuje parodontálne tkanivo vrátane alveolárnej kosti obklopujúcej zuby. Chronická parodontitída je charakterizovaná stratou podpory parodontálneho tkaniva, prítomnosťou parodontálneho vaku, krvácania z ďasien a rádiograficky úbytkom alveolárnej kosti. Najčastejšou etiológiou býva zápal spôsobený bakteriálnymi kmeňmi v zubnom plaku (Peres a kol., 2019).

Agresívna parodontitída sa od chronickej parodontitídy odlišuje tým, že postihuje najmä systémovo zdravých jednotlivcov mladších ako 30 rokov. Spôsobuje rýchlu deštrukciu tkanív parodontu a líši sa aj zložením subgingiválnej mikroflóry. Predstavuje 5% zo všetkých parodontopatií a podľa nových štúdií môžu byť okrem mikrobiálnej flóry príčinou aj oslabenie organizmu, stres, poprípade systémové ochorenia ako diabetes, hypertenzia, aj užívanie liekov, napr. beta-blokátorov alebo fajčenie (Joshipura a kol., 2015).

Pri vzniku agresívnej parodontitídy hrajú rozhodujúcu úlohu aj genetické a environmentálne faktory. Bolo zistených niekoľko polymorfizmov génov a silná asociácia napr. medzi interleukínom (IL) -1a a polymorfizmom IL-1a alely3954 2 polymorfizmy a agresívnu parodontitídu.

KONVENČNÉ VYŠETRENIA PARODONTU

Základné vyšetrenie parodontu predstavuje klinické vyšetrenie a meranie hĺbky parodontálneho vaku pomocou parodontálnej sondy, krvácanie pri sondovaní (BOP) a rádiologické hodnotenie výšky alveolárnej kosti (Tonetti a Sanz, 2019).

Röntgenová diagnostika je neodmysliteľnou súčasťou pri diagnostike ochorení ústnej dutiny. Röntgenové snímky poskytujú detailné informácie o zuboch a okolitých kostných štruktúrach a umožňujú detekciu zubných kazov, posúdenie stavu alveolárnej kosti, polohu neprerezaných zubov a zubov múdrosti, cysty a iných kostných abnormalít (Obr. 1). Najčastejšími RTG snímkami v zubnom lekárstve sú panoramatické snímky (OPG), intraorálne a bitewingové snímky.



Obr. 1 Fotografia klinického obrazu a RTG snímka agresívnej parodontitídy. Prevzaté z DentoSurf, n.d.

Fotodokumentácia v zubnom lekárstve je dôležitým nástrojom pre diagnostiku, plánovanie liečby a sledovanie pokroku pacienta (Casaglia a kol., 2016). Fotografie pomáhajú identifikovať existujúce problémy a poskytujú jasný obraz pre budúce porovnávanie. Detailné fotografie môžu pomôcť pri diagnostike rôznych stavov, ako sú kazy, parodontálne ochorenia (obr. 2), ortodontické a iné problémy. Pravidelná fotodokumentácia počas liečby umožňuje sledovať pokrok ako aj pomôcť pacientom lepšie pochopiť svoje zdravie a motivovať ich k správnej starostlivosti o zub. Fotografie poskytujú jasný záznam o stave pacienta pred, počas a po ukončení liečby. Dodržiavanie etických noriem a súhlasu pacienta s ich použitím je samozrejmosťou.

Konvenčné klinické parametre na diagnostiku parodontitídy často nie sú postačujúce. Tieto diagnostické techniky môžu vyhodnotiť iba stratu tkaniva, ktorá už

nastala; nevedia povedať, ako choroba postupuje alebo ako to bude v budúcnosti (Isola, 2022). Preto sa výskum sústreďuje na hľadanie markerov ochorení ústnej dutiny najmä analýzou slín.

PERSPEKTÍVNE BIOMARKERY PARODONTITÍDY V SLINÁCH

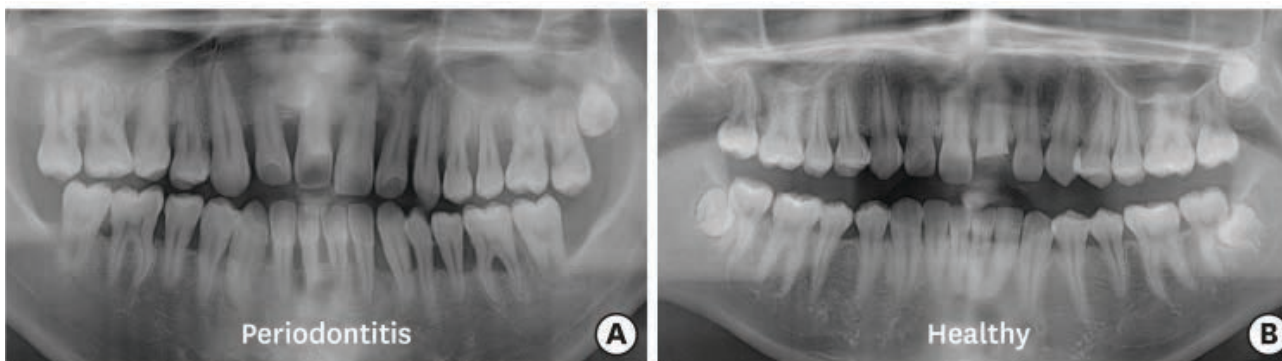
Detekcia slinných biomarkerov je perspektívna ako neinvazívne laboratórne vyšetrenie na včasnú diagnostiku parodontitídy. Sliny, napriek neinvazívnemu odberu, sú vo všeobecnosti ako diagnostický materiál podcenené. Ich diagnostický potenciál je nielen pri ochoreniach ústnej dutiny, ale aj pri systémových chorobách, kde sa zistila vysoká korelácia zloženia slín s plazmou alebo sérom, čo umožňuje ich použitie na neinvazívnu detekciu zdravotného stavu.

Pri ochoreniach ústnej dutiny sú sliny využívané na diagnostiku nádorov ústnej dutiny, zubného kazu, ochorení parodontu a xerostomie (Ngamchuea a kol., 2018)

Príčinou parodontitídy je interakcia baktérií zubného plaku s tkanivom ďasna. Výsledkom je zápalový proces, ktorý spôsobuje deštrukciu tkaniva. Z tohto dôvodu sa výskum biomarkerov sústreďuje na metabolický proces súvisiaci so zápalom (Bolerázka a kol., 2016). Skúmaniu tohto procesu sa v súčasnosti výskumníci venujú na rôznych „omických úrovniach“: od genomiky (DNA, RNA), cez proteomiku (enzýmy, cytokíny, rastové faktory, protilátky...) až k metabolomike. Ako vhodné biomarkery sa skúmajú aj anorganické zložky, antioxidanty, hormóny či antigény (Koirala a Pradhan, (2021).

Enzýmy ako diagnostické markery

Medzi obranné reakcie na ochorenie parodontu patrí produkcia rôznych enzýmov, ktoré môžu byť produkované alebo uvoľňované prostredníctvom stromálnych, epiteli-



Obr. 2 Porovnanie RTG snímku pacienta s parodontitídou (A) a zdravého jedinca (B). Prevzaté od Jeon a kol., 2020.

álnych a zápalových buniek. Po poškodení buniek a smrti buniek sa uvoľňujú rôzne dôležité enzýmy. Sú to enzýmy, ktoré sa normálne nachádzajú vo vnútri buniek, napr. *peroxidáza*, *laktátdehydrogenáza*, *kreatínkinázy*, *aspartát- a alanínaminotransferáza*. Akékoľvek zmeny v aktivite týchto enzýmov by preto mohli naznačovať metabolické zmeny v ďasnách a znamenie zápalu parodontu.

Antioxidačný enzým *peroxidáza* sa nachádza v dvoch formách – *slinná peroxidáza (SPO)* a *myeloperoxidáza (MPO)* – a obe tvoria súčasť obranného systému hostiteľa v ústnej dutine (34). Kluknavská a kol., sledovali v súvislosti s parodontitídou antioxidačné enzýmy ako *superoxid-dismutáza (SOD)*, *glutatiónpoxidáza (GPx)*, *glutatiónreduktáza (GR)* ale aj *matrixové metaloproteinázy (MMP)*. *MMP* sú hlavnou skupinou enzýmov zodpovedných za degradáciu extracelulárneho matrixu. Izofорма enzýmu *MMP-9* mala zvýšenú aktivitu v slinách u pacientov s parodontitídou. (Kluknavská a kol., 2021). Aj zvýšená aktivita izoformy *MMP-8* v slinách a *MMP – 7* v gingiválnej tekutine poukazuje na zvýšené riziko ochorenia parodontu (Emingil a kol., 2006). Koreláciu medzi zvýšenou aktivitou *MMP-7* a parodontitídou potvrdili aj Jeon a kol., 2020 na základe analýzy RNA profilu. Zvýšenú expresiu génu však potvrdili v gingiválnom tkanive, ale nie v slinách (Jeon a kol., 2020).

V súvislosti s deštrukciou a remodeláciou kostného tkaniva bola sledovaná aj aktivita *alkalickej fosfatázy (ALP)* v slinách a gingiválnej tekutine. Nízka aktivita *ALP* korelovala s nedeštruktívnou alebo mierne deštruktívnou parodontitídou, zatiaľ čo signifikantne vysoká aktivita bola preukázaná v miestach s deštrukciou a závažnou deštrukciou parodontu (Isola, 2022).

Aj ďalšie slinné enzýmy boli študované za účelom ich využitia ako markerov na detekciu priebehu parodontálnych problémov a iných možných ochorení v ústnej dutine (Ghannam a Singh, 2023)

Glykozyltransferázy sú skupinou transferáz, ktoré sa podieľajú na tvorbe zubného povlaku. Zmenená aktivita *glykozyltransferázy* produkovanej *Streptococcus gordonii* by sa mohla použiť ako slinný marker na tvorbu plaku pri periodontitíde. *GLT6D1* (Glycosyltransferase 6 Domain Containing 1) je gén lokalizovaný na chromozóme 9q34.3, ktorý kóduje daný proteín/enzým. Detekcia jednonukleotidového polymorfizmu (SNP, single nucleotide polymorphism) SNP rs1537415 je spojená s predikciou genetického rizika akútnej parodontitídy (Schaefer a kol., 2010). Detek-

cia tohto polymorfizmu je aj súčasťou diagnostického panelu „Dental GEN“ na zisťovanie rizika parodontitídy (tab. 1, Dental GEN, n.d.).

Oxidoreduktázy predstavujú široké spektrum enzýmov, z ktorých väčšina sa nachádza v intracelulárnom prostredí, a preto sa môžu uvoľňovať v dôsledku poranenia a poškodenia bunkovej membrány. Dehydrogenázy sú najrozšírenejšou skupinou oxidoreduktáz, ale zriedkavo sa uvádza ich prítomnosť v slinách. *Laktátdehydrogenáza (LDH)*, je enzým prítomný v slinnej tekutine a zistilo sa, že aktivita LDH v slinách je u pacientov trpiacich parodontitídou zvýšená a je priamo úmerná závažnosti parodontitídy (Paknjad a Rezaei, 2013).

Glykozaminoglykány

V súvislosti s deštrukciou tkaniva bola skúmaná aj hladina glykozaminoglykánov (GAG) v gingiválnej tekutine u pacientov s parodontitídou. Prítomnosť GAG v gingiválnej tekutine je výsledkom degradácie extracelulárneho matrixu periodontálnych tkanív počas progresie periodontálneho ochorenia. Hlavné GAG prítomné v periodontálnych tkanivách sú dermatansulfát, kyselina hyalurónová, chondroitínsulfát a keratánsulfát. Z nich najmä chondroitínsulfát vykazoval silnú koreláciu so závažnosťou parodontitídy (Khongkhunthian a kol. 2014).

Cytokíny

Mnohé štúdie sa zameriavajú na cytokíny v slinách, ktoré by mohli mať potenciál ako biomarkery pri systémových a orálnych ochoreniach. Cytokíny ako biologicky aktívne molekuly pôsobia ako tkanivové hormóny a imunomodulačné činidlá. Prozápalový účinok majú napr. IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 a TNF- α (Tawfig, 2016).

IL1 ako prozápalový cytokín reguluje imunitnú odpoveď na bakteriálnu infekciu a je modulátorom pri úbytku kostného tkaniva. V génoch interleukínu 1 α (IL1A) a interleukínu 1 β (IL1B) boli nájdené DNA polymorfizmy, ktoré majú asociáciu s agresívnymi typmi zápalu. IL1B je jednoznačne jedným z najviac skúmaných cytokínov v súvislosti s ochoreniami parodontu a patrí medzi najčastejšie sledované slinné biomarkery. Ich prítomnosť znamená vyššie riziko parodontálnych ochorení alebo vzniku periimplantitídy.

IL1RN je členom rodiny cytokínov interleukínu 1. Tento proteín inhibuje aktivity interleukínu 1, alfa (IL1A) a interleukínu 1, beta (IL1B) a moduluje rôzne imunitné a zápa-

lové reakcie súvisiace s interleukínom 1, najmä v akútnej fáze infekcie a zápalu.

Iným sledovaným biomarkerom je tumor nekrotizujúci alfa faktor (tumor necrosis factor alfa, TNF- α) ako kľúčový prozápalový cytokín produkovaný makrofágmi a aktivovanými T bunkami. Zvýšená aktivita tohto cytokínu sa nachádza pri zápalovej odpovedi a úbytku kostného tkaniva.

Ako prozápalový cytokín pôsobí interleukín 6 (IL-6). Stanovenie jeho hladiny v gingiválnej tekutine môže byť dôležitým diagnostickým a prognostickým faktorom v ochorení perodontu (Mazurek-Mochol a kol., 2024).

Rastové faktory zohrávajú úlohu v niekoľkých fyziologických procesoch ako je vývoj, regenerácia a hojenie rán. Tieto molekuly majú špecifické úlohy aj v imunitných reakciách a zápalových ochoreniach. Rastový faktor hepatocytov (Hepatocyte Growth Factor, HGF) sa javí ako potenciálny biomarker pri ochoreniach parodontu (Frodge a kol., 2008). Zaujímavé výsledky priniesol výskum Zhao a kol. (2024) na experimentálnej parodontitíde u transgénnych myší. Bolo zistené, že v počiatočných štádiách parodontitídy má HGF ochrannú funkciu, ale v neskorých štádiách pôsobí deštruktívne na kostné tkanivo.

Z doteraz skúmaných molekúl s cytokínovou aktivitou sú IL1B a HGF najvýraznejšími slinnými biomarkermi pri parodontálnych ochoreniach.

Prítomnosť alely HLA-DRB1*4 bola identifikovaná v súvislosti s agresívnou parodontitídou, reumatoidnou artritídou, ale aj sklerodermiou. Zvyšuje riziko úbytku kosti a osteoklastogenézy (Frodge a kol., 2008).

Detekcia DNA polymorfizmov v génoch vybraných cytokínov sa v súčasnosti realizuje už aj v ambulantnej praxi zubných lekárov.

DIAGNOSTIKA MARKEROV PARODONTITÍDY V AMBULANTNEJ PRAXI

Laboratórna diagnostika poskytuje asi 70% informácií o zdravotnom stave pacienta. V súčasnej dobe už nie je zriedkavosťou, že poskytuje vyšetrenia, a tým aj cenné informácie taktiež zubným lekárom.

Prienik molekulovej genetiky do laboratórnej diagnostiky priniesol pokrok aj v diagnostike parodontitídy. Štandardizované a certifikované testy kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie (q PCR) v súčasnosti majú dôležitú úlohu v periodontálnej diagnostike. Aj v našej ambulantnej praxi (Pearl Dental, pracovisko autor-ky) využívame na posúdenie rizika parodontitídy výsled-

ky genetických testov na detekciu DNA polymorfizmov v génoch vybraných markerov, najmä cytokínov (Tab. 1) ako aj na detekciu DNA patogénnych baktérií (Tab. 2).

Analyzuje sa DNA pacienta, ktorá je izolovaná zo vzorky gingiválneho steru, ktorý odborne odoberá lekár. Správny odber z hlbokých vačkov minimálne na 5. rôznych miestach je mimoriadne dôležitý pre úspešnú analýzu. Cieľové oblasti DNA sú amplifikované metódou real time PCR s fluorescenčne značenými sondami špecifickými pre sledované DNA varianty.

Detekcia DNA polymorfizmov vybraných markerov parodontitídy

Diagnostický test Dental GEN je určený na detekciu DNA polymorfizmov génov vybraných markerov. Z gingiválneho steru pacienta je vyzolovaná DNA a následne je realizovaná séria qPCR reakcií. Na základe výsledku qPCR je pre každý marker detegovaný genotyp, genotypový stav a bodmi ohodnotené riziko parodontitídy. Súčet bodov určuje celkové genetické riziko parodontitídy, ktoré je hodnotené na základe škály bodov takto: bežné riziko = menej ako 3 body; zvýšené riziko = 4 – 6 bodov; vysoké riziko = 7-12 bodov. Ukážka výsledku pacienta „A“ (Tab. 1) potvrdzuje nízke genetické riziko parodontitídy.

Detekcia DNA patogénnych baktérií

Parodontitída je multifaktoriálne chronické ochorenie, na ktorom sa významne podieľajú parapatogénne baktérie. Bakteriálna kultúra je zlatým štandardom v parodontálnej mikrobiológii, keďže žiadna iná metóda nedokáže analyzovať citlivosť patogénov na antibiotiká (Koirala a Pradhan, (2021).

Identifikácia prítomnosti jednotlivých baktérií je v súčasnosti relatívne jednoduchá a rýchla aplikáciou metódy qPCR. V našej ambulancii na určenie rizika parodontitídy, na základe prítomnosti patogénnych baktérií, využívame DNA diagnostický test Dental BAC.

Vo výsledkovom sumári sú baktérie zoradené do komplexov podľa stupňa patogenity a tak sú aj farebne vyznačené.

Baktérie červeného komplexu sú vysoko patogénne baktérie (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* a *Treponema denticola*), ktoré sú schopné degradovať napadnuté tkanivo a migrovať v epitelových bunkách.

Baktérie oranžového komplexu (*Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra* a *Fusobacterium nucleatum*) sú stredne

Tab. 1 Odpis výsledku testu Dental GEN vyšetrenia DNA polymorfizmu anonymného pacienta „A“

Gén	Normálna funkcia proteínu	Efekt	Detegovaný genotyp	Genotypový stav	Parciálne riziko	
					P/R	Body
IL1A	Zvýšený zápal	Štandardná aktivita	CC	HOM WT	-	0
IL1B	Zvýšený zápal	Zvýšená aktivita	CT	HET MUT	R	2
IL1RN	Inhibícia zápalu	Zvýšená aktivita	TC	HET MUT	P	-1
TNF	Odbúravanie kostí	Štandardná aktivita	GG	HOM WT	-	0
NIN	Správna štruktúra a funkcia T-lymfocytov	Štandardná aktivita	AA	HOM WT	-	0
IL19	Inhibícia zápalu	Štandardná aktivita	GG	HOM WT	R	1
GLT6D1	Zvýšenie aktivity inhibičného faktora	Štandardná aktivita	CC	HOM WT	-	0
IL6	Zvýšený zápal	Znížená aktivita	CG	HET MUT	-	0
HLA-DRB1	Odbúravanie kostí	Funkčný receptor	neprítomný	-	-	0
Celková hodnota rizika: NÍZKE RIZIKO (2 z 12 b)					Súčet	2

HOM – homozygot, HET – heterozygot, WT – wild type = referenčný „normálny“ genotyp, MUT – mutovaný typ; R = riziko; P = protektívny účinok

Tab. 2 Odpis výsledku testu Dental BAC vyšetrenia prítomnosti DNA parapatogénnych baktérií u anonymného pacienta „A“

Bakteriálny genotyp	Skratka	Komplex	Patogenita	Prítomnosť	Hodnota Ct
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Aa	samostatný	3+	++	18,80
<i>Filifactor alocis</i>	Fa	samostatný	3	++	15,08
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Pg	červený	3	+++	11,33
<i>Tannerella Forsythia</i>	Td		3	+++	13,28
<i>Treponema denticola</i>	Tf		3	+++	13,71
<i>Prevotella intermedia</i>	Pi	oranžový	2/3	+++	11,95
<i>Parvimonas micra</i>	Pm		2/3	+++	12,92
<i>Fusobacterium sp.</i>	Fsp		2/3	+++	11,46
<i>Campylobacter rectus</i>	Cr	združený	2	+	20,60
<i>Eubacterium nodatum</i>	En		2	+	24,81
<i>Eikenella corrodens</i>	Ec	zelený	1	++	15,06
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	Cg		1	++	15,93

+/- prítomnosť/neprítomnosť DNA patogénu; 3+, 3 = vysoká patogenita; 2 = stredná patogenita; 1 = mierna patogenita

až vysoko patogénne a vytvárajú spojenie medzi skorými kolonizátormi a baktériami červeného komplexu. V rámci rodu *Fusobacterium* je detegovaná, ale nešpecifikovaná (*Fusobacterium sp.*) prítomnosť viacerých druhov: *F. nucleatum*, *F. nodatum*, *F. naviforme*.

Fialový a oranžový združený komplex združuje baktérie, tzv. skorých kolonizátorov. Majú stredný patogénny potenciál a sú súčasťou biofilmu. Týmto vytvárajú podklad pre pôsobenie ďalších baktérií. Medzi zástupcov tohto komplexu patria napr. *Campylobacter rectus* alebo *Eubacterium nodatum*.

Do zeleného komplexu sú zaradené nízko patogénne typy, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis* (Dental BAC, n.d.).

Hlavnou baktériou s vysoko patogénnym potenciálom je *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, ktorý dokáže odolávať imunitnej odpovedi hostiteľa a enzymaticky ničiť napadnuté tkanivo. Táto baktéria nie je zaradená do žiadneho komplexu.

Ďalšou baktériou, ktorá nie je zaradená do žiadneho komplexu, je *Filifactor alocis* (*Fa*). Táto gram-pozitívna obligátne anaeróbná baktéria je ďalším diagnostickým indikátorom periodontálneho ochorenia. Jej patogénne vlastnosti sú zvýraznené schopnosťou prežiť v prostredí parodontálneho vaku, ktoré je bohaté na oxidačný stres a významne meniť dynamiku mikrobiálnej komunity vytváraním biofilmov a interakciou s niekoľkými orálnymi baktériami. *Fa* je asociovaný s neúspešnou endodontic-

kou liečbou. U pacientov s agresívnou parodontitídou je prítomnosť *Fa* a *Aa* v subgingiválnom tkanive asociovaná s úbytkom kostnej hmoty (Aja a kol., 2021).

Positivita, resp. negativita výsledku qPCR sa posudzuje podľa hodnoty Ct, amplifikačnej krivky. Táto hodnota je určená softverovo a znamená cyklus, v ktorom amplifikačná krivka danej PCR reakcia dosiahla stanovenú hodnotu, tzv. threshold. Podľa celkového počtu cyklov PCR reakcie sa stanoví významnosť hodnoty Ct v súvislosti s pozitivitou/negativitou prítomnosti detegovanej DNA. V teste Dental BAC bol celkový počet cyklov 30, horný limit detekcie Ct = 25. cyklus. Hodnotenie prítomnosti bakteriálneho druhu podľa hodnoty Ct bolo nasledovné: Ct > 25 = negat (-); Ct = 20-25, pozit (+); Ct = 15-20, pozit (++); Ct < 15, pozit (+++).

Ukážka výsledku pacienta „A“ (Tab. 2) potvrdzuje **vyso-ko rizikový bakteriálny nález** pre parodontitídu.

ZÁVER

Správna diagnostika ochorení ústnej dutiny je nevyhnutná pre úspešnú liečbu a udržanie celkového zdravia. Kompletný diagnostický proces pri ochoreniach ústnej dutiny si vyžaduje kombináciu všetkých kľúčových faktorov, od dôkladného vyšetrenia a diferenciálnej diagnostiky až po využitie moderných diagnostických techník, ako aj spoluprácu so špecialistami, aby sa dosiahla najlepšia možná diagnostika a liečba. Moderné diagnostické metódy umožňujú v zubnom lekárstve spresniť diagnózu a tým ponúknuť pacientovi najvhodnejšie liečebné možnosti, čím sa minimalizuje riziko komplikácií a zlepšuje kvalita života pacientov.

POĎAKOVANIE

Práca bola realizovaná v rámci projektu VEGA 1/0559/18: Štúdium vzniku a progresie parodontitíd využitím najnovších molekulárno-biochemických metód.

LITERATÚRA

1. Aja, E. et al. (2021) "Filifactor alocis: Recent Insights and Advances". *Journal of Dental Research* 2021, Vol. 100(8) 790–797. doi: 10.1177/00220345211000656
2. Bolerázka, B., Mareková, M., Markovská, N. (2016) „Trends in laboratory diagnostic methods in periodontology“, *Acta Medica*, 59(1), p. 3–9. doi: 10.14712/18059694.2016.47
3. Casaglia, A et al. (2016) "Dental photography today. Part 1: basic concepts". *Oral Implantol (Rome)*, 8(4), p.122-129. doi: 10.11138/orl/2015-8.4.122.
4. Dental BAC (n.d.) Dostupné na <https://ghcgenetics.sk/testy/dentalbac-2/>.
5. Dental GEN (n.d.) Dostupné na <https://ghcgenetics.sk/testy/dentalgen/>
6. DentoSurf.(n.d.) Dostupné na <https://elearning.medizin.unibe.ch/dentosurf/zahnmedizin/paradontologie/verschiedene-parodontitiden/aggressive-parodontitis-6>
7. Emingil, G. et al. (2006) "Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase (MMP)-7, extracellular MMP inducer, and tissue inhibitor of MMP-1 levels in periodontal disease". *J. Periodontol.*, 77 (12), p.2040–2050. doi: 10.1902/jop.2006.060144.
8. Frodge, B.D. et al. (2008) "Bone remodeling biomarkers of periodontal disease in saliva." *J Periodontol*, 79(10), p. 1913-9. doi: 10.1902/jop.2008.080070
9. Ghannam, M.G. and Singh P. (2023) "Anatomy, Head and Neck, Salivary Glands." in *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
10. Isola, G. (2022) "Salivary Tests: A New Personalized Approach for the Early Diagnosis of Oral and Periodontal Diseases". *J. Pers. Med.* 2022, 12, 1636, p. 1-3. doi: 10.3390/jpm12101636
11. Jeon, Y-S. et al. (2020) "Transcriptomic profiles and their correlations in saliva and gingival tissue biopsy samples from periodontitis and healthy patients." *J. Periodontal Implant Sci.*, 50(5), p. 313-326, doi: 10.5051/jpis.1905460273
12. Joshipura, V., Yadalam U. and Brahmavar B, (2015) „Aggressive periodontitis: A review“. *Journal of International Clinical Dental Research Organization*, 7(1), p. 11-17. doi: 10.4103/2231-0754.153489
13. Khongkhunthian, S. et al. (2014) „Comparisons between two biochemical markers in evaluating periodontal disease severity: a cross-sectional study“ *BMC Oral Health*, 14(107) p. 1-8. doi: 10.1186/1472-6831-14-107.
14. Koirala, P.K. and Pradhan, S. (2021) „Gold Standards in Periodontics: A Review“. *J. Nepal Soc. Perio Oral Implantol.* 5(9), p. 49-53. doi: 10.3126/jnspoi.v5i1.38194
15. Mazurek-Mochol, M. et al. (2024) "The Role of Interleukin 6 in Periodontitis and Its Complications". *Int. J. Mol. Sci.* 25(4), 2146, p. 1-13. doi: 10.3390/ijms25042146
16. Ngamchuea, K., et al. (2018) „Correction: Chemical analysis in saliva and the search for salivary biomarkers - a tutorial review.“ *Analyst*, 143(3) p. 777-783. doi: 10.1039/c7an90101a
17. Paknjad, M. and Rezaei, A. (2013) "Salivary biochemical markers of periodontitis". *Rom. J. Biochem.*, 50 (2) p. 129–146

- 18. Peres, M.A., et al. (2019)** „Oral diseases: a global public health challenge“. *Lancet*, 394(10194): p. 249-260. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31146-8
- 19. Ramenzoni L.L, et al. (2021)** “Oral Diagnostic Methods for the Detection of Periodontal Disease”. *Diagnostics (Basel)* 11(3), 571, p. 1-13. doi: 10.3390/diagnostics11030571
- 20. Robinson M. et al. (2018)** “Diagnosis of oral disease”, in *Soames’ & Southam’s Oral Pathology*, Fifth edition, Oxford, Oxford University Press, p. 1-10. doi: 10.1093/oso/9780199697786.002.0001
- 21. Schaefer et al. (2010)** “A genome-wide association study identifies GLT6D1 as a susceptibility locus for periodontitis”. *Human Molecular Genetics*, 19(3), p. 553-562. doi:10.1093/hmg/ddp508
- 22. Tawfig N (2016)** “Proinflammatory Cytokines and Periodontal Disease.” *J. Dent. Probl. Solut.* 3(1) p. 012-017. doi: 10.17352/2394-8418.000026
- 23. Tonetti M.S. and Sanz M. 2019.** “Implementation of the new classification of periodontal diseases: Decision-making algorithms for clinical practice and education.” *J. Clin. Periodontol.*, 46(4), p. 398-405. doi: 10.1111/jcpe.13104.
- 24. Zhao, X. et al. (2024)** “Hepatocyte growth factor is protective in early stage but bone-destructive in late stage of experimental periodontitis”. *Journal of Periodontal Research.* (Early view 19.01.2024) doi: 10.1111/jre.13237



Laboratórna Diagnostika, XXIX, 1, 2024: 64–69

QUO VADIS FLUORESCENČNÁ *IN SITU* HYBRIDIZÁCIA? QUO VADIS FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION?

Katarína Fiedlerová

Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF, LF UPJŠ v Košiciach, Košice

katarina.fiedlerova@upjs.sk

SÚHRN

Súčasná genetická laboratórna diagnostika disponuje bohatou škálou vyšetrovacích postupov od tzv. „klasických“ cytogenetických metód vrátane FISH až po sekvenovania najnovších generácií. Atraktivita nových moderných metód a predpoklad ich diagnostickej a ekonomickej efektivity spôsobujú, že sú staršie diagnostické metódy odsúvané do úzadia a niekedy je dokonca spochybňovaná a podceňovaná ich opodstatnenosť v diagnostickom a vyšetrovacom procese. Dlhoročné praktické skúsenosti z rutínnej laboratórnej diagnostiky však potvrdzujú, že žiadna z metód nie je ideálna ani univerzálna a nedokáže v plnej miere nahradiť všetky ostatné. Kľúčová je presnosť, rýchlosť a efektivita v kvalitnej odpovedi na otázky diagnostické, prognostické a spojené s výberom cielej terapie. Prehľadový článok je pohľadom dlhoročnej laboratórnej diagnostičky na opodstatnenosť a najväčšie devízy FISH metódy v súčasnej rutínnej genetickej diagnostike.

Kľúčové slová: fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH); diagnostika; onkohematológia; solídne tumory

ABSTRACT

Current genetic laboratory diagnostics possesses a wide variety of examination methods ranging from “classical” methods to sequencing of the new generation. Attractiveness of new modern methods and assumption of their diagnostic as well as economic effectiveness cause that previously applied diagnostics methods are getting neglected and sometimes their eligibility in diagnostics process is doubted. The practical experiences indicate that no single method is universal, therefore, it may not fully substitute all the other. Accuracy, speed and efficiency are absolutely crucial in providing a high-quality answer to any diagnostics question eventually questions concerning disease prognosis or selection of target therapy. This review article is a view of a laboratory diagnostician on the benefits of FISH method in current genetic diagnostics.

Key words: fluorescent *in situ* hybridization (FISH); diagnostics; oncohematology; solid tumors

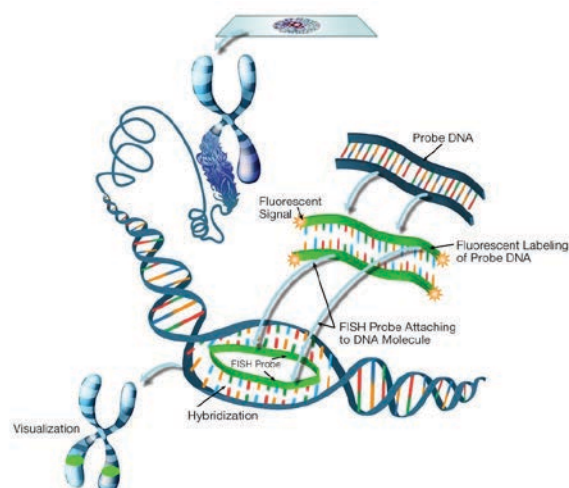
ÚVOD

Súčasná genetická laboratórna diagnostika disponuje bohatou škálou metód zahŕňajúcou tzv. „klasické“ metódy – cytogenetiku a fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu (FISH), metódy molekulovo genetické postavené na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR) a jej rôznych variáciách – nested PCR, real time PCR, multiplex PCR, RT PCR a pod., metódy „hybridné“ - spájajúce prvky *in situ* hybridizácie a PCR - ako sú MLPA či CGH a metódy sekvenačné I., II. a III. generácie (molekulové metódy). Sekvenačné techniky novej generácie v genetickej diagnostической praxi už nie sú zriedkavé, ale ich aplikácia do bežnej rutínnej diagnostiky je v našich podmienkach v súčasnosti nereálna z dôvodu vysokej ekonomickej, časovej, analytickej a interpretačnej náročnosti. V rutínnej diagnostической praxi aktuálne dominujú analýzy založené na metóde PCR, ale svoje opodstatnenie ešte stále nestratila klasická cytogenetika, či vyšetrenia založené na metóde FISH.

PRINCÍP FISH METÓDY

FISH, ako molekulovo – cytogenetická metóda, umožňuje analyzovať numerické a štruktúrne aberácie chromozómov na báze *in situ* hybridizácie sondy s komplementárnym úsekom v cieľovej DNA. Takýmto spôsobom vieme identifikovať a následne vizualizovať konkrétne sekvencie nukleotidov v DNA: špecifické gény prípadne ich úseky, skupiny génov, celé chromozómy alebo ich časti (centroméry, teloméry) a to ako v mitózach tak aj v interfázových jadrách (obr.1). Princíp metódy spoločne s FISH sondami

sú dôležitými faktormi, ktoré zásadne **determinujú** možnosti jej praktického využitia.

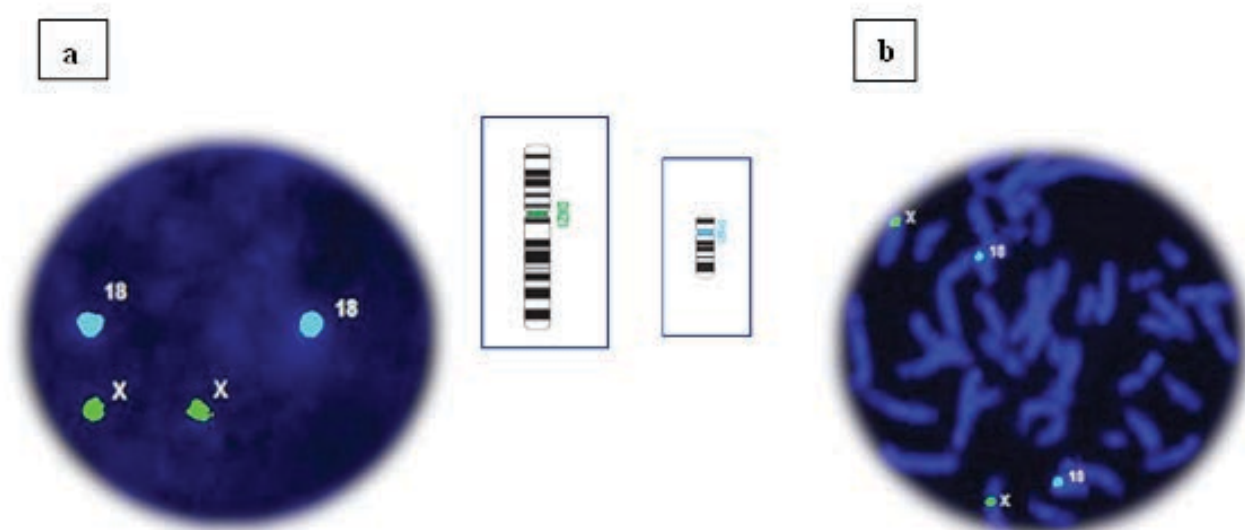


Obr.1 Princíp metódy FISH – fluorescenčne značená DNA sonda po denaturácii hybridizuje s komplementárnym úsekom vo vyšetrovanej DNA. (Prevzaté od Kumar, A., 2020)

FISH SONDY

FISH sondy sú synteticky pripravené, fluorescenčne značené oligonukleotidové DNA reťazce. Môže ísť o úseky DNA klonované pomocou vektorov alebo amplifikované pomocou PCR. V diagnostike sú využívané prevažne sondy s dĺžkou niekoľkých 100 kb.

Podľa oblasti na chromozóme, v rámci ktorej dochádza k hybridizácii sondy, rozlišujeme 4 základné typy DNA sond: centromérové, lokusovo špecifické, celochromozómové a subtelomérové (tzv. β – satelitové, ktoré sú v rutínnej diagnostike používané len výnimočne).



Obr. 2 Detekcia chromozómov X a 18 – použitím centromérových sond Vysis CEPX (SG) a CEP18 (SA) (Abbott). Centroméry v jadre (a), na metafázických chromozómoch (b)

Zdroj: Z archívu autorky (Gendiagnostica Košice, s.r.o.)

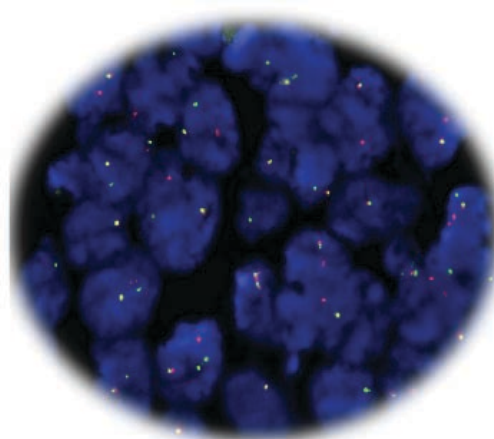
Centromérové (α – satelitové) sondy sa viažu k centromére a sú vhodné najmä k diagnostike numerických zmien a k detekcii marker chromozómov. Použitím centromérových sond je možné vizualizovať oblasť centroméry konkrétnych chromozómov v jadre ako aj na metafázických chromozómoch (obr. 2).

Lokusovo špecifické - viažu sa ku konkrétnemu génu (lokusu). Umožňujú vyšetrenie mikrodencií napr. pri mikrodelečných syndrómoch, amplifikácií onkogénov, prestavieb génov, špecifických translokácií, inverzií, duplikácií a pod. Na obr. 3 je ilustrovaná detekcia prestavby MLL génu FISH metódou s použitím lokusovo špecifickej sondy. Prítomnosť prestavby MLL génu indikujú dva oddelené signály – oranžový a zelený. Intaktný MLL gén má podobu fúzneho signálu.

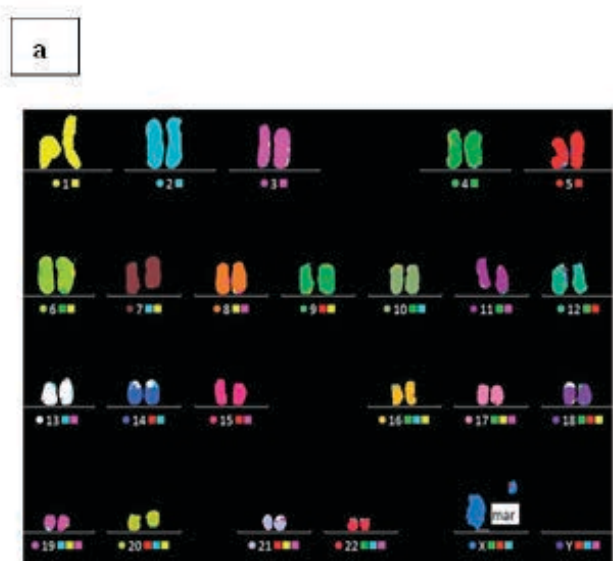
Celochromozómové FISH sondy hybridizujú s mnohočetnými sekvenciami pozdĺž celého chromozómu (obr. 4). Umožňujú doriešenie komplexných chromozómových prestavieb, detekciu translokácií a marker chromozómov (mFISH, SKY, mBAND). Nie sú vhodné pre interfázovú FISH.

V rámci rutínnej laboratórnej diagnostiky sú preferované komerčne dostupné fluorescenčné sondy. Ich výber v diagnostickom procese sa odvíja od typu aberácií, ktoré majú byť detegované.

Komerčné FISH sondy sú priamo značené rôznymi fluorochrómami (TexasRed, FITC, Rhodamine, DEAC a pod.) a vďaka tomu je možné výsledok hybridizácie vizualizovať fluorescenčným mikroskopom vybaveným vhodnými fluorescenčnými filtrami. V tabuľke 1 je prehľad fluorochrómov, ktorými sú značené komerčne dostupné sondy od firmy Zytolight.



Obr. 3 Prestavba MLL génu - interfázová FISH s použitím lokusovo špecifickej sondy Vysis LSI MLL dual color, break apart rearrangement probe (Prevzaté od Abbott, 2024)



Obr.4 Príklad multicolor FISH (mFISH) pri detekcii pôvodu marker chromozómu (a). Vpravo karyotyp so zachyteným marker chromozómom (b). (Prevzaté od Kalkan, R. et al, 2016)

Dostupné farebné spektrum komerčne vyrábaných FISH sond a fluorescenčných filtrov však limituje počet aberácií hodnotiteľných v rámci jedného FISH vyšetrenia (pod jedným krycím sklom). Fluorescenčné mikroskopy používané v rutinej laboratórnej diagnostike sú zvyčajne vybavené štyrmi až piatimi fluorescenčnými filtrami – pre DAPI (counterstain), spectrum orange (SO), spectrum green (SG), spectrum aqua (SA) a tzv. trojkockou (DAPI + SO + SG).

To znamená, že FISH metóda umožňuje detegovať naraz v rámci jedného vyšetrenia maximálne tri rôzne aberácie (SO + SG + SA), väčšinou len jednu prípadne dve. Počet súčasne analyzovateľných genetických zmien závisí aj od ich typu.

V prípade numerických aberácií – aneuploidií – je reálne vyšetrenie maximálne troch rôznych chromozómov použitím troch rôzne značených sond (napr. chromozómu č.1 v SO, chromozómu č.2 v SG, chromozómu č.3 v SA). Kombináciou numerickej a štruktúrnej aberácie sa počet detegovateľných genetických zmien redukuje na dve (napr. prestavba génu (SO+SG) + aneuploidia (SA) a pod.).

Tab.1 Prehľad fluorochrómov používaných na značenie komerčných sond
(Prevzaté a upravené podľa Zytovision, (2024))

Fluorochrom	Excitácia	Emisia	Označenie
ZyBlue™	418 nm	467 nm	DEAC
ZyGreen™	503 nm	528 nm	FITC
ZyGold™	532 nm	553 nm	Rhodamine 6G
ZyOrange™	547 nm	572 nm	Rhodamine
ZyRed™	580 nm	599 nm	TexasRed®

APLIKAČNÝ POTENCIÁL FISH

FISH metóda nie je vhodná na primárne „preskríňovanie“ genómu príp. exómu na prítomnosť rôznych aberácií. Detegujú sa ňou už známe aberácie odhalené inou vhodnejšou metódou (karyotyp, MLPA, CGH, sekvenovanie) a aberácie o ktorých je známe, že môžu byť v kauzálnej súvislosti so supponovaným ochorením. Veľkou výhodou FISH v porovnaní s inými diagnostickými metódami je skutočnosť, že akonáhle je zachytená nejaká aberácia / aberácie - patologický klon / klony - je možné ich opakovane sledovať v čase a monitorovať ich dynamiku. Táto obrovská devíza FISH metódy je využívaná najmä v onkohematológii (Vašková et al., 2015).

FISH je možné aplikovať na širokej škále biologického materiálu - na kultivovaných vzorkách periférnej krvi, kostnej drene, plodovej vody, na náteroch, otlačkoch,

choriových klkoch, rôznych druhoch fixovaných a do parafrínu zaliatych tkanív, dokonca na 1 bunke (predimplantačná genetická diagnostika, PGD).

Na rozdiel od klasického cytogenetického vyšetrenia, ktoré spočíva v zostavení karyotypu a vyžaduje prítomnosť metafáz (deliacich sa buniek), FISH je možné realizovať ako na metafázach tak aj na interfázových (nedeliacich sa) jadrách. Možnosť detegovať vybrané genetické aberácie v interfázových jadrách priniesla metóde FISH výsadné postavenie hlavne v onkohematológii a patológii.

Aplikácia metódy FISH v onkohematológii

Východiskovými materiálmi pre genetické vyšetrenia v onkohematológii sú periférna krv a kostná dreň t. j. biologické materiály, ktoré sú pacientom odoberané v čase stanovovania diagnózy a následne, opakovane, aj v priebehu liečby.

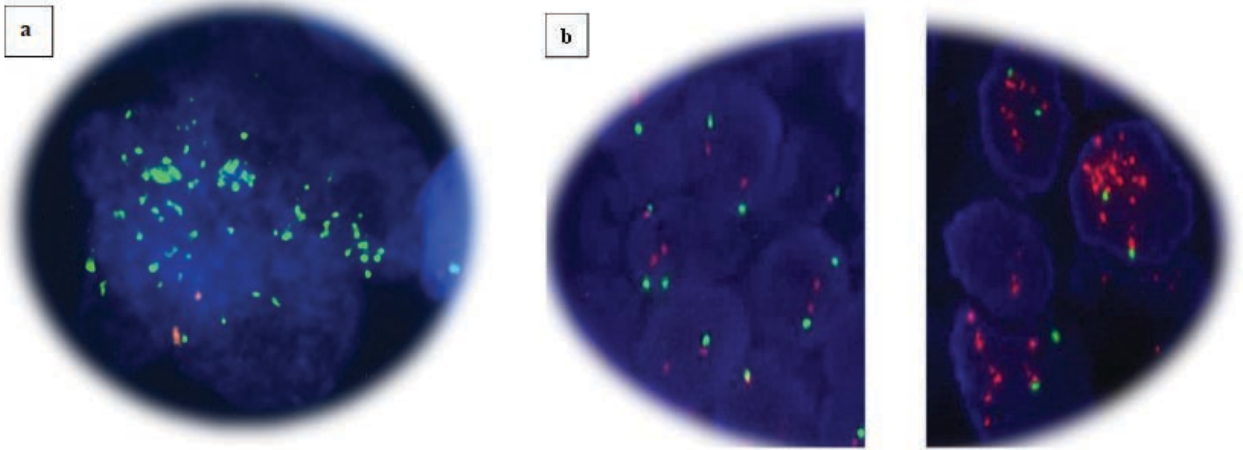
V čase stanovovania diagnózy je primárnou snahou kombináciou rôznych genetických metód detegovať u pacienta aberácie, ktoré sú v kauzálnej súvislosti so supponovanou diagnózou. Následne – po vyšpecifikovaní vstupnej diagnózy - je pacient liečený a účinnosť liečby sa okrem iného posudzuje aj na základe pretrvávania, poklesu alebo vzostupu sledovaných aberácií práve metódou FISH. Vďaka možnosti hodnotiť konkrétne genetické zmeny v interfázových jadrách je možné pri opakovaných odberoch sledovať dynamiku jednotlivých patologických klonov bez odkázanosti na prítomnosť metafáz (u väčšiny liečených onkologických pacientov sú metafázy zriedkavé).

Takýto „genetický monitoring“ poskytuje lekárovi konkrétnejšiu predstavu o účinnosti nasadenej terapie (či pacient smeruje k remisii) eventuálne pri dlhodobejšom sledovaní je možné zachytiť relaps ochorenia oveľa skôr ako sa premietne do iných klinických parametrov.

Aplikácia metódy FISH v patológii

Spojenie metódy FISH a patológie je unikátne z viacerých dôvodov. Východiskovým materiálom pre FISH diagnostiku v patológii sú FFPE - t. j. vo formalíne fixované a do parafrínu zaliaté - tkanivové vzorky z rôznych typov nádorov napr. karcinómu prsníka, karcinómu žalúdka, nemalobunkového karcinómu pľúc, sarkómov, mozgových tumorov a pod. (obr.5).

Už samotná príprava FISH preparátov je v prípade niektorých vzoriek náročnou záležitosťou kvôli veľmi malému množstvu odobratého tkaniva (malé broncho- a gas-



Obr. 5 Amplifikácia génov MDM2 a HER2. (a) amplifikácia MDM2 génu (zelené signály) pri dediferencovanom liposarkóme detegovaná použitím sondy ZytoLight® SPEC MDM2/CEN 12 Dual Color Probe; (Prevzaté od Zytovision-ZytoLight-z2013) (b) amplifikácia HER2 (ERBB2) génu (červené signály) pri karcinóme žalúdka v porovnaní s negatívnym statusom detegovaná použitím sondy ZytoLight® CEN 17/SPEC ERBB2 Dual Color Probe (b) (Zytovision) (Prevzaté od Zytovision-ZytoLight-z2077)

tro - skopie, „core – cut“ biopsie). Vlastná FISH analýza si okrem štandardných znalostí súvisiacich s hodnotením genetických aberácií vyžaduje aj vedomosti z histológie a imunohistochemie t. j. multidisciplinárny prístup.

Detekcia jednotlivých genetických aberácií priamo na fixovanom tkanive umožňuje vizualizovať napr. ich rôznu distribúciu v rámci nádoru pri nádorovej heterogenite, rôzne zastúpenie in situ a invazívnej komponente a pod. Poskytuje tak oveľa komplexnejší a presnejší obraz o genetickom profile daného nádoru v porovnaní s molekulovo genetickými metódami. V tomto ohľade je metóda FISH jedinečná a nenahraditeľná.

Genetické markery u solídnych tumorov sú vyšetrované veľmi cielene a majú predovšetkým diagnostický, prognostický a prediktívny význam.

Špecifikom FISH metódy, využívaným ako v onkohematológii tak aj v patológii, je taktiež možnosť identifikovať prestavby tzv. „promiskuitných génov“ t. j. génov, ktoré majú veľa potenciálnych translokačných partnerov a to

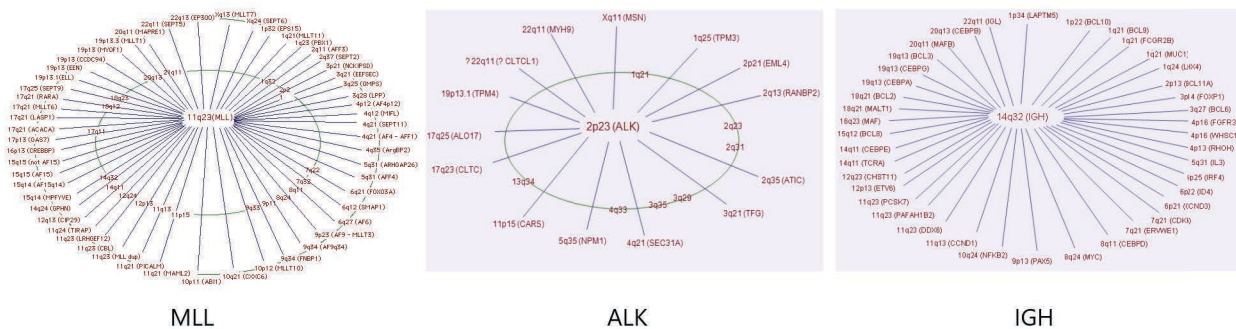
bez nutnosti presnej identifikácie konkrétnej translokácie napr. u génov MLL, ALK, IgH a mnohých ďalších. MLL má napr. 54 možných partnerov, ALK 21 a IGH 40 (obr.6).

ZÁVER

Metóda FISH má stále svoje miesto v rutínnej diagnostike, ale je potrebné rozumne a citlivo zvažovať kedy ju použiť a kedy naopak je efektívnejšie a výhodnejšie siahnuť po inej metóde. Každá metóda má svoje výhody aj nevýhody, pozitíva rovnako ako negatíva a v praxi je dôležité vedieť sa vysporiadať s otázkou voľby, avšak na úvodnú otázku „ Quo vadis fluorescenčná *in situ* hybridizácia ? “ je možné s pokojným svedomím odpovedať – ešte stále vpred!

Podakovanie

Práca vznikla v rámci riešenia projektu VEGA 1/0435/23: Štúdium úlohy nekódujúcich RNA a zloženie metabolómu pri endometrióze a karcinóme endometria.



Obr. 6 Príklady promiskuitných génov MLL (Prevzaté od Huret, JL, 2003); ALK (Prevzaté od Allouche, M., 2010); IGH (Prevzaté od Lefranc, MP., 2010)

LITERATÚRA

1. **Abbott, (2024)**. Dostupné na <https://www.molecularcatalog.abbott/int/en/Vysis-LSI-MLL-Dual-Color-Break-Apart-Rearrangement-Probe>.
2. **Allouche, M. (2010)**. *Atlas of Genetics and cytogenetics in Oncology and Haematology*. Dostupné na [https://atlasgeneticsoncology.org/gene/16/alk-\(anaplastic-lymphoma-receptor-tyrosine-kinase\)/](https://atlasgeneticsoncology.org/gene/16/alk-(anaplastic-lymphoma-receptor-tyrosine-kinase)/).
3. **Huret, JL., (2003)**. *Atlas of Genetics and cytogenetics in Oncology and Haematology*. Dostupné na <https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1030/11q23-rearrangements-%28kmt2a%29-in-leukaemia>
4. **Kalkan, R. et al, (2016)** A unique mosaic Turner syndrome patient with androgen receptor gene derived marker chromosome. *Syst Biol Reprod Med*, Early Online: 1–7, doi: 10.3109/19396368.2015.1109007
5. **Kumar, A., (2020)** FISH: Fluorescence In Situ Hybridization. Dostupné na <https://www.clinicallab.com/fish-fluorescence-in-situ-hybridization-22054>
6. **Lefranc, MP., (2000)**. *Atlas of Genetics and cytogenetics in Oncology and Haematology*. Dostupné na IGH (Immunoglobulin Heavy) (atlasgeneticsoncology.org)
7. **Vašková, J. et al., (2015)** Incidence and prognostic value of known genetic aberrations in patients with acute myeloid leukemia - a two year study. *Klin Onkol*, 28(4): 278-283. doi: 10.14735/amko2015278
8. **Zytovision, (2024)**. Dostupné na <https://www.zytovision.com/products/zytolight>.
9. **Zytovision-ZytoLight-z2013 (2024)**. Dostupné na <https://www.zytovision.com/products/zytolight/z-2013>
10. **Zytovision-ZytoLight-z2077 (2024)**. Dostupné na <https://www.zytovision.com/products/zytolight/z-2077>



Laboratórna Diagnostika, XXIX, 1, 2024: 70–75

P2X RECEPTORY A ICH MOŽNÉ VYUŽITIE PRI LIEČBE RAKOVINY P2X RECEPTORS AND THEIR POSSIBLE USE IN CANCER TREATMENT

Simona Mattová, Terézia Kisková

Ústav biologických a ekologických vied, PF UPJŠ v Košiciach, Košice

terezia.kiskova@upjs.sk

SÚHRN

Rakovina patrí medzi závažné a rozmanité ochorenie, ktoré je jednou z hlavných príčin úmrtnosti na celom svete. V súčasnosti sa v boji proti rakovine využívajú liečebné postupy, medzi ktoré patrí chemoterapia, ožarovanie, cielená liečba a imunoterapia. Tieto liečebné postupy však nie sú vždy dostačujúce, pričom najväčší problém predstavuje rezistencia na liečbu. Je preto potrebné hľadať nové terapeutické ciele. P2X receptory predstavujú sľubnú cestu. Sú to iónové kanály riadené ATP, ktoré sú exprimované v rôznych bunkách a tkanivách. Bolo identifikovaných 7 podtypov receptora P2X (P2X1-7). Tieto receptory sa podieľajú na mnohých fyziologických a patofyziologických procesoch. *In vitro* a *in vivo* dôkazy naznačujú, že receptory P2X môžu byť ideálnym terapeutickým cieľom pri rakovine, ako aj pri niektorých ďalších ochoreniach.

Kľúčové slová: P2X receptory; ATP; rakovina; glioblastóm

ABSTRACT

Cancer is a serious and diverse disease that is one of the leading causes of mortality worldwide. Currently, treatments used in the fight against cancer include chemotherapy, radiation, targeted therapies, and immunotherapy. However, these treatments are not always sufficient, with treatment resistance being a major problem. It is therefore necessary to look for new therapeutic targets. P2X receptors provide a promising pathway. They are ATP-gated ion channels that are expressed in

a variety of cells and tissues. Seven P2X receptor subunits (P2X1-7) have been identified. These receptors are involved in many physiological and pathophysiological processes. *In vitro* and *in vivo* evidence suggests that P2X receptors may be an ideal therapeutic target in cancer as well as in some other diseases.

Key words: P2X receptors; ATP; cancer; glioblastoma

Rakovina sa prejavuje ako rozmanité ochorenie charakterizované odlišnými genotypovými a fenotypovými znakmi, ktoré sa líšia nielen medzi jednotlivými pacientmi, ale aj medzi rôznymi oblasťami nádorov (Zhang a kol., 2018). Je jednou z hlavných príčin úmrtnosti na celom svete. Prognózy naznačujú rýchle zvyšovanie výskytu rakoviny a úmrtnosti, čo koreluje s expanziou populácie, demografickým starnutím a osvojením si životného štýlu, ktorý zvyšuje riziko rakoviny (Torre a kol., 2016).

Napriek pokrokom v navrhovaní a implementácii účinných protinádorových terapií predstavuje rezistencia na liečbu zásadnú prekážku na zlepšenie prežívania pacientov (Sung a kol., 2021). Existujúce liečebné postupy, ako je chemoterapia, ožarovanie, cielená liečba a imunoterapia, zvyšujú metabolický a oxidačný stres, čím vyvíjajú významný selektívny tlak na nádorové bunky. K tomuto tlaku dochádza predovšetkým prostredníctvom stimulácie imunitného systému a aktivácie mechanizmov bunkovej smrti. Aby sa nádorové, imunitné a stromálne bunky prispôbili týmto stresorom a prežili, využívajú rôzne zmierňujúce cesty spojené so zmeneným metabolizmom, opravou DNA, zápalom a odolnosťou voči apo-

ptóze (Zanoni a kol., 2022). Odolnosť voči chemoterapii zostáva významným problémom, ktorý možno pripísať rôznym mechanizmom, ako je oprava poškodenia DNA, znížený influx liečiv, zmeny metabolizmu liečiv a potlačenie apoptózy (Mansoori a kol., 2017). Rádioterapia je popri chirurgickej liečbe a chemoterapii základom liečby mnohých solídnych nádorov (Larionova a kol., 2022). Napriek tomu problém vývoja mechanizmov rádiorezistencie pretrváva, čo vedie k horším výsledkom u pacientov, zvýšenému riziku recidívy a metastatickej progresii (Zanoni a kol., 2022). Imunoterapia, ktorá reaktivuje protinádorové imunitné reakcie, spôsobila revolúciu v liečbe rakoviny. Ponúka účinnú terapiu mnohých predtým neliečiteľných druhov rakoviny. Nástup inhibítorov kontrolných bodov, ako napr. inhibítorov cytotoxických T lymfocytov 4 (CTLA-4) alebo ligand programovanej smrti 1 (PDL1) významne predĺžil očakávanú dĺžku života pacientov (Smyth a kol., 2016). Nežiaduce účinky vyplývajúce z nadmerných imunitných odpovedí a taktiež aj značné náklady na liečbu si však často vyžadujú prerušenie imunoterapeutických liečebných postupov. Navyše nereagovanie na liečbu u niektorých pacientov zdôrazňuje potrebu alternatívnych kombináčnych terapií na dosiahnutie lepších výsledkov (Zanoni a kol., 2022).

ATP v nádorovom mikroprostredí

V súčasnosti rastúce povedomie o komplexnej sieti výmeny informácií, ktorá sa vyskytuje v nádorovom mikroprostredí, predstavuje jedinečnú príležitosť v boji proti nádorom (Vultaggio-Poma a kol., 2020). V procese tumorigenézy sa veľké množstvo intracelulárneho adenosíntrifosfátu (ATP) uvoľňuje do extracelulárneho matrixu, čo vedie k výraznému zvýšeniu koncentrácie ATP v nádorovom mikroprostredí (Zhang, 2021). ATP vyniká ako kľúčová zložka nádorového mikroprostredia, ktorá má vplyv na proliferáciu nádorových buniek, mobilitu, šírenie a následnú imunitnú odpoveď (Vultaggio-Poma a kol., 2020). Extracelulárny ATP uplatňuje svoj vplyv na nádory prostredníctvom špecifických plazmatických membránových receptorov. Prakticky všetky nádorové a imunitné bunky exprimujú P2 receptory, ktoré sú citlivé na extracelulárny ATP (Burnstock, 2007). Tieto P2 receptory sú rozdelené do dvoch podrodín: P2Y (P2YR) a P2X (P2XR) receptory. Receptory P2X sú iónové kanály riadené ATP, ktoré sa nachádzajú na plazmatickej membráne excitabilných aj neexcitabilných buniek. Sú priepustné pre ióny Ca^{2+} , Na^{+}

a K^{+} . Z cicavčích buniek bolo doteraz klonovaných sedem podtypov, P2X1-7R, z ktorých každý vykazuje rôzne afinity k ATP, profily desenzibilizácie a kinetiku aktivácie/inaktivácie. Zaujímavosťou je, že podtypy P2XR, a to P2X4R a P2X7R, môžu byť modulované aj nenukleotidovými zlúčeninami, ktoré pôsobia ako pozitívne alosterické modulátory (Di Virgilio a kol., 2021). Za normálnych fyziologických podmienok zostávajú purinergné receptory P2X takmer neaktívne a ich biologické funkcie sú obmedzené. V patologických stavoch sa však uvoľňovanie ATP zvyšuje, čím sa purinergné receptory P2X aktivujú a tak sa podieľajú na procese reakcie mnohých ochorení (Zhang, 2021).

V nádorovom mikroprostredí podlieha extracelulárny ATP hydrolýze na adenosínmonofosfát (AMP) prostredníctvom ektonukleotidázy CD39, po ktorej nasleduje ďalšia hydrolýza na adenosín prostredníctvom ektonukleotidázy CD73 (Allard a kol., 2017). Adenosín, kľúčová zložka v nádorovom mikroprostredí, má schopnosť navodiť imunitnú toleranciu v nádoroch prostredníctvom imunosupresie, čím znižuje účinnosť terapeutických liekov (Boison a Yegutkin, 2019). V nádorovom mikroprostredí môže ATP regulovať progresiu nádoru interakciou s purinergnými receptormi P2X na membránach nádorových buniek a iných buniek. Takto aktivované purinergné receptory P2X môžu iniciovať otvorenie iónových kanálov na bunkovej membráne, čo vedie k prítoku vápnikových a sodíkových iónov a odtoku draslíkových iónov. Táto aktivácia následne spúšťa rôzne signálne dráhy v bunkách, čím sa mení osud nádorových buniek. Okrem toho sú purinergné receptory P2X zamerané aj na imunitné a zápalové bunky v rámci nádorového mikroprostredia, pričom tieto receptory zohrávajú kľúčovú úlohu pri progresii a liečbe nádorov tým, že modulujú tieto bunky (Zhang, 2021). Aktivácia alebo zvýšené hladiny expresie P2X purinergných receptorov môžu účinne regulovať proliferáciu, apoptózu, migráciu a inváziu nádorových buniek (Roger a kol., 2015).

Je všeobecne známe, že liečba ATP či analógmi ATP má silný cytotoxický účinok na rôzne nádory. Naopak, je zrejme, že nízke dávky ATP, napríklad tie, ktoré sa spontánne uvoľňujú takmer z každého typu buniek, môžu podporovať rast. Odpoveď nádorových buniek na ATP sa líši v závislosti od purinergných P2 receptorov, ktoré exprimujú. Niektoré nádorové bunky môžu byť citlivejšie na účinky ATP vyvolávajúce bunkovú smrť, zatiaľ čo iné môžu viac reagovať na jeho účinky podporujúce rast. Táto variabilita zdôrazňuje komplexnú interakciu medzi signalizá-

ciou ATP a správaním nádorov a poukazuje na dôležitosť pochopenia špecifických podtypov receptorov (Burnstock a Di Virgilio, 2013).

P2X receptory a ich úloha v rakovine

V rámci rodiny P2X vyniká receptor P2X7 ako kľúčová molekula vo vývoji nádoru, a preto sa objavuje ako nový cieľ pre skúmanie liečby nádorov. V zdravých tkanivách je receptor P2X7 prevažne exprimovaný v centrálnom nervovom systéme (CNS), periférnom nervovom systéme (PNS) a imunitných bunkách, čím sa stáva cieľom pre chronickú bolesť a chronické zápalové ochorenia. Pri mnohých typoch rakoviny je však P2X7R nadmerne exprimovaný, čo potenciálne usmerňuje vývoj nádoru a pomáha pri prežívaní nádoru (Lara a kol., 2020). Viaceré štúdie v priebehu rokov odhalili jeho aktivitu podporujúcu rast a podporu progresie nádorov a to napriek dobre známej cytotoxickej aktivite spojenej s P2X7R. To predstavuje zaujímavý paradox vzhľadom na vysokú extracelulárnu koncentráciu ATP v TME, ktorá by teoreticky mala spustiť cytotoxicitu sprostredkovanú P2X7R. Zdá sa však, že nádorové bunky sú voči tomuto účinku pozoruhodne odolné (Vultaggio-Poma a kol., 2020). Presná príčina tejto rezistencie zostáva neznáma, ale predpokladá sa, že ju možno čiastočne pripísať odpojeniu aktivácie P2X7R od vnútrobunkového mechanizmu smrti (Raffaghello a kol., 2006). P2X7R je exprimovaný v rôznych typoch rakoviny, okrem iného v rakovine prsníka, žalúdka, pľúc, obličiek, prostaty, hrubého čreva, konečníka, melanómu, kožných skvamocelulárnych a bazocelulárnych karcinómov, papilárnej štítnej žľazy, pankreasu, leukémie, gliómu, neuroblastómu, vaječníkov, krčka maternice, močového mechúra a kostí (Lara a kol., 2020). Okrem P2X7R sa na proliferácii a prežití nádorových buniek taktiež podieľa aj nadmerná expresia P2X3R a P2X5R (Maynard a kol., 2015; Greig a kol., 2003). ATP tiež vykonáva kontrolu nad imunitnými bunkami a jeho akumulácia spúšťa protinádorovú imunitnú odpoveď, čím inhibuje tumorigenézu. Na potlačaní nádorového rastu sa podieľajú napr. receptory P2X5 a P2X7. Zistilo sa, že P2X5R zohráva úlohu pri cytotoxických účinkoch T-buniek a prispieva k potlačeniu chronickej myeloidnej leukémie. Vyradenie P2X7R vedie k zníženiu populácie CD8+ cytotoxických T buniek. Zdá sa preto, že obohatenie ATP v nádorovom mikroprostredí teda predstavuje vnútorný protinádorový mechanizmus vyvolaný imunitným systémom (Huang a kol., 2021).

Vysoká expresia P2X1R bola spojená s nádorovou progresiou pri svalovo-invazívnom karcinóme močového mechúra (Ledderose a kol., 2023). Zvýšená expresia P2X6R bola indukovaná žiarením v bunkovej línii T24, čo môže slúžiť ako priaznivý prognostický faktor (Dietrich a kol., 2022).

Ďalším zaujímavým purinergným receptorom je P2X4. Výskum naznačuje, že P2X4R zvyšuje inváziu in vitro, ako aj podporuje rast a metastázovanie nádorov prsníka in vivo (Chadet a kol., 2022). Okrem toho sa zistilo, že P2X4R je nadmerne exprimovaný v hepatokarcinóme závislom od vírusu hepatitídy C (Khalid a kol., 2018) a zohráva kľúčovú úlohu pri iniciácii a progresii podkožných alograftov rakoviny prostaty u myši (Maynard a kol., 2022). Dôležitú úlohu má aj pri raste a apoptóze buniek glioblastómu (Huo a Chen, 2019).

P2X receptory v glioblastómoch

Glioblastóm je najrozšírenejším a zároveň najagresívnejším primárnym nádorom mozgu u dospelých. Medzi charakteristické histopatologické znaky patrí nekroza a endotelová proliferácia. Glioblastóm je preto zaradený do IV. stupňa, teda najvyššieho stupňa v klasifikácii nádorov mozgu Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO). Okrem veku sú rizikové faktory vzniku glioblastómu nedostatočne vymedzené (Wirsching a kol., 2016). Štúdie naznačujú možnú koreláciu medzi P2X receptormi, konkrétne P2X4 a P2X7, a glioblastómom. V CNS zohrávajú tieto receptory významnú úlohu pri modulácii komunikácie medzi neurónmi a gliou, zápale a apoptóze (Territo a Zarrinmayeh, 2021). P2X4R je exprimovaný v nízkych hladinách v bunkách CNS, vrátane neurónov a gliových buniek. Za normálnych podmienok prispieva aktivácia P2X4R k synaptickému prenosu a synaptickej plasticite (Montilla a kol., 2020). Štúdia poskytla prvé dôkazy o zapojení P2X4R do rastu a apoptózy gliómových buniek a zdôraznila zapojenie signálnej dráhy BDNF/TrkB/ATF4 do sprostredkovania účinku P2X4R. Ich zistenia ukázali, že znížená expresia P2X4R významne inhibuje prežívanie a proliferáciu gliómových buniek a zároveň podporuje ich apoptózu (Huo a Chen, 2019).

P2X7R sa považuje za hlavný imunomodulátor, ktorý reaguje na ATP v miestach zápalu a poškodenia tkaniva (Burnstock a Kennedy, 2011). P2X7R nájdeme lokalizované v CNS prednostne na mikroglíách, ale aj pri nižšej hustote na neuroglíách (astrocyty, oligodendrocyty), pre-

to stimulácia tohto receptora vedie k uvoľňovaniu bioaktívnych molekúl indukujúcich neurodegeneráciu, ako sú napríklad prozápalové chemokíny, cytokíny, proteázy, reaktívne molekuly kyslíka a dusíka (Illes, 2020). Tieto zložky zápalovej reakcie zohrávajú kľúčovú úlohu pri rôznych neurologických patológiách a neurodegeneratívnych poruchách. V CNS sa expresia P2X7R na mikrogliách, astrocytoch a oligodendrocytoch zvyšuje počas neurozápalového stavu (Territo a Zarrinmayeh, 2021). P2X7R je zodpovedný za proliferáciu, migráciu a invazivitu mnohých nádorových buniek. Tento receptor je exprimovaný v ľudských mozgových nádoroch vrátane malígnych gliómov. Údaje o úlohe P2X7R v tomto type nádorov však zostávajú kontroverzné (Matyšíniak a kol., 2022). Na jednej strane štúdie preukázali na P2X7R závislé zvýšenie intracelulárneho vápnika a ATP cytotoxicitu v gliómovej bunke GL261 odvodennej od myších astrocytov (Strong a kol., 2018). Ďalší výskumníci preukázali, že P2X7R zohráva kľúčovú úlohu pri inhibícii rastu gliómových kmeňových buniek (D'Alimonte a kol., 2015). Bol skúmaný antagonizmus P2X7R s brilantnou modrou G (BBG), pričom došlo k zníženiu počtu nádorových buniek. To naznačuje antagonizmus P2X7R ako potenciálny terapeutický postup na liečbu ľudských gliómov (Monif a kol., 2014). V bunkovej línii glioblastómu U251 viedla inhibícia P2X7R pomocou AZ10606120 k zníženiu expresie mRNA a proteínu GM-CSF. Antagonizmus P2X7R pomocou AZ10606120 významne znížil počet buniek glioblastómu U251 (Drill a kol., 2020). Inhibícia P2X7R *in vitro* aj *in vivo* viedla k zníženiu expresie niektorých negatívnych prognostických markerov rakoviny, ako napr. proteínov súvisiacich s nádorovým mikroprostredím a taktiež bola preukázaná aj znížená hladina ATP či produkcia ROS v gliómových bunkách C6 (Matyšíniak a kol., 2022).

Niekoľko predklinických štúdií poskytuje presvedčivé dôkazy, že kombinácia tradičných protinádorových intervencií s terapiami zameranými na purinergickú signalizáciu by mohla ponúknuť sľubnú stratégiu na vyliečenie rakoviny a prevenciu jej relapsu. Zacielením na purinergné signálne dráhy, ktoré hrajú rozhodujúcu úlohu v rôznych aspektoch vývoja a progresie nádoru, ako je bunková proliferácia, apoptóza a imunitná modulácia, môžu kombinované terapie zvýšiť účinnosť existujúcich protinádorových terapií. Zacielenie na purinergickú signalizáciu by navyše mohlo potenciálne prekonať mechanizmy rezistencie voči konvenčným terapiám a zlepšiť celkové výsledky liečby. Preto integrácia terapií zameraných na purinergnú signalizáciu so zavedenými protinádorovými intervenciami má v budúcnosti významný potenciál pre pokrok v stratégiách liečby rakoviny.

LITERATÚRA

1. Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C., & Stagg, J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological Reviews*, 276(1), 121-144. doi:https://doi.org/10.1111/imr.12528
2. Boison, D., & Yegutkin, G. G. (2019). Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy. *Cancer Cell*, 36(6), 582-596. doi:10.1016/j.ccell.2019.10.007
3. Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, 64(12), 1471-1483. doi:10.1007/s00018-007-6497-0
4. Burnstock, G., & Di Virgilio, F. (2013). Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal*, 9(4), 491-540. doi:10.1007/s11302-013-9372-5
5. Burnstock, G., & Kennedy, C. (2011). P2X receptors in health and disease. *Adv Pharmacol*, 61, 333-372. doi:10.1016/b978-0-12-385526-8.00011-4



Obrázok 1 Porovnanie receptorov P2X4 a P2X7 vo funkcií CNS a GBM; CNS, centrálna nervová sústava; GBM, glioblastóm

6. D'Alimonte, I., Nargi, E., Zuccarini, M., Lanuti, P., Di Iorio, P., Giuliani, P., . . . Ciccarelli, R. (2015). Potentiation of temozolomide antitumor effect by purine receptor ligands able to restrain the in vitro growth of human glioblastoma stem cells. *Purinergic Signal*, 11(3), 331-346. doi:10.1007/s11302-015-9454-7
7. Di Virgilio, F., Vultaggio-Poma, V., & Sarti, A. C. (2021). P2X receptors in cancer growth and progression. *Biochem Pharmacol*, 187, 114350. doi:10.1016/j.bcp.2020.114350
8. Dietrich, F., Cappellari, A. R., Filippi-Chiela, E. C., de Paula, P. B., de Souza, J. B., Agatti, S. W., . . . Battastini, A. M. O. (2022). High P2X6 receptor expression in human bladder cancer predicts good survival prognosis. *Mol Cell Biochem*, 477(8), 2047-2057. doi:10.1007/s11010-022-04425-0
9. Drill, M., Powell, K. L., Kan, L. K., Jones, N. C., O'Brien, T. J., Hamilton, J. A., & Monif, M. (2020). Inhibition of purinergic P2X receptor 7 (P2X7R) decreases granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) expression in U251 glioblastoma cells. *Scientific Reports*, 10(1), 14844. doi:10.1038/s41598-020-71887-x
10. Greig, A. V., Linge, C., Healy, V., Lim, P., Clayton, E., Rustin, M. H., . . . Burnstock, G. (2003). Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells. *J Invest Dermatol*, 121(2), 315-327. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12379.x
11. Huang, Z., Xie, N., Illes, P., Di Virgilio, F., Ulrich, H., Semyanov, A., . . . Tang, Y. (2021). From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduct Target Ther*, 6(1), 162. doi:10.1038/s41392-021-00553-z
12. Huo, J. F., & Chen, X. B. (2019). P2X4R silencing suppresses glioma cell growth through BDNF/TrkB/ATF4 signaling pathway. *J Cell Biochem*, 120(4), 6322-6329. doi:10.1002/jcb.27919
13. Chadet, S., Allard, J., Brisson, L., Lopez-Charcas, O., Lemoine, R., Heraud, A., . . . Roger, S. (2022). P2x4 receptor promotes mammary cancer progression by sustaining autophagy and associated mesenchymal transition. *Oncogene*, 41(21), 2920-2931. doi:10.1038/s41388-022-02297-8
14. Illes, P. (2020). P2X7 Receptors Amplify CNS Damage in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, 21(17). doi:10.3390/ijms21175996
15. Khalid, M., Manzoor, S., Ahmad, H., Asif, A., Bangash, T. A., Latif, A., & Jaleel, S. (2018). Purinoceptor expression in hepatocellular virus (HCV)-induced and non-HCV hepatocellular carcinoma: an insight into the proviral role of the P2X4 receptor. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2625-2630. doi:10.1007/s11033-018-4432-0
16. Lara, R., Adinolfi, E., Harwood, C. A., Philpott, M., Barden, J. A., Di Virgilio, F., & McNulty, S. (2020). P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Frontiers in Pharmacology*, 11. doi:10.3389/fphar.2020.00793
17. Larionova, I., Rakina, M., Ivanyuk, E., Trushchuk, Y., Chernyshova, A., & Denisov, E. (2022). Radiotherapy resistance: identifying universal biomarkers for various human cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*, 148(5), 1015-1031. doi:10.1007/s00432-022-03923-4
18. Ledderose, S., Rodler, S., Eismann, L., Ledderose, G., Rudehus, M., Junger, W. G., & Ledderose, C. (2023). P2X1 and P2X7 Receptor Overexpression Is a Negative Predictor of Survival in Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*, 15(8). doi:10.3390/cancers15082321
19. Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., & Baradaran, B. (2017). The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull*, 7(3), 339-348. doi:10.15171/apb.2017.041
20. Matyśniak, D., Chumak, V., Nowak, N., Kukla, A., Lehka, L., Oslislok, M., & Pomorski, P. (2022). P2X7 receptor: the regulator of glioma tumor development and survival. *Purinergic Signal*, 18(1), 135-154. doi:10.1007/s11302-021-09834-2
21. Maynard, J. P., Lee, J. S., Sohn, B. H., Yu, X., Lopez-Terrada, D., Finegold, M. J., . . . Thevananther, S. (2015). P2X3 purinergic receptor overexpression is associated with poor recurrence-free survival in hepatocellular carcinoma patients. *Oncotarget*, 6(38), 41162-41179. doi:10.18632/oncotarget.6240
22. Maynard, J. P., Lu, J., Vidal, I., Hicks, J., Mummert, L., Ali, T., . . . Sfanos, K. S. (2022). P2X4 purinergic receptors offer a therapeutic target for aggressive prostate cancer. *J Pathol*, 256(2), 149-163. doi:10.1002/path.5815
23. Monif, M., O'Brien, T. J., Drummond, K. J., Reid, C. A., Liubinas, S. V., & Williams, D. A. (2014). P2X7 receptors are a potential novel target for anti-glioma therapies. *Journal of Inflammation*, 11(1), 25. doi:10.1186/s12950-014-0025-4
24. Montilla, A., Mata, G. P., Matute, C., & Domercq, M. (2020). Contribution of P2X4 Receptors to CNS Function and Pathophysiology. *Int J Mol Sci*, 21(15). doi:10.3390/ijms21155562
25. Raffaghello, L., Chiozzi, P., Falzoni, S., Di Virgilio, F., & Pistoia, V. (2006). The P2X7 Receptor Sustains the Growth of Human Neuroblastoma Cells through a Substance P-Dependent Mechanism. *Cancer Research*, 66(2), 907-914. doi:10.1158/0008-5472.can-05-3185
26. Roger, S., Jelassi, B., Couillin, I., Pelegrin, P., Besson, P., & Jiang, L. H. (2015). Understanding the roles of the P2X7

- receptor in solid tumour progression and therapeutic perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1848(10 Pt B), 2584-2602. doi:10.1016/j.bbame.2014.10.029
- 27. Smyth, M. J., Ngiow, S. F., Ribas, A., & Teng, M. W. (2016).** Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat Rev Clin Oncol*, 13(3), 143-158. doi:10.1038/nrclinonc.2015.209
- 28. Strong, A. D., Indart, M. C., Hill, N. R., & Daniels, R. L. (2018).** GL261 glioma tumor cells respond to ATP with an intracellular calcium rise and glutamate release. *Mol Cell Biochem*, 446(1-2), 53-62. doi:10.1007/s11010-018-3272-5
- 29. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021).** Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. doi:10.3322/caac.21660
- 30. Territo, P. R., & Zarrinmayeh, H. (2021).** P2X7 Receptors in Neurodegeneration: Potential Therapeutic Applications From Basic to Clinical Approaches. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15. doi:10.3389/fncel.2021.617036
- 31. Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016).** Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends-- An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 25(1), 16-27. doi:10.1158/1055-9965.epi-15-0578
- 32. Vultaggio-Poma, V., Sarti, A. C., & Di Virgilio, F. (2020).** Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy. *Cells*, 9(11), 2496.
- 33. Wirsching, H. G., Galanis, E., & Weller, M. (2016).** Glioblastoma. *Handb Clin Neurol*, 134, 381-397. doi:10.1016/b978-0-12-802997-8.00023-2
- 34. Zaroni, M., Pegoraro, A., Adinolfi, E., & De Marchi, E. (2022).** Emerging roles of purinergic signaling in anti-cancer therapy resistance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. doi:10.3389/fcell.2022.1006384
- 35. Zhang, J., Späth, S. S., Marjani, S. L., Zhang, W., & Pan, X. (2018).** Characterization of cancer genomic heterogeneity by next-generation sequencing advances precision medicine in cancer treatment. *Precision Clinical Medicine*, 1(1), 29-48. doi:10.1093/pcmedi/pby007
- 36. Zhang, W. J. (2021).** Effect of P2X purinergic receptors in tumor progression and as a potential target for anti-tumor therapy. *Purinergic Signal*, 17(1), 151-162. doi:10.1007/s11302-020-09761-8



Laboratórna Diagnostika, XXIX, 1, 2024: 76–80

PREDPOVEĎ KARDIOVASKULÁRNEHO RIZIKA POMOCOU HMOTNOSTNEJ SPEKTROMETRIE CARDIOVASCULAR RISK PREDICTION USING MASS SPECTROMETRY

Jozef Turay

Oddelenie klinickej biochémie a hematológie, Poliklinika- LDCH, s.r.o. ,Detva

jturay@upcmail.sk

SÚHRN

Lipidomika je vedný obor, ktorý sa zaoberá štúdiom biochemických dráh lipidov v biologických systémoch. Ide o novú subšpecializáciu klinickej biochémie, ktorá je podložená výsledkami najmä hmotnostnej spektrometrie. V poslednom desaťročí sa nahromadili dôkazy o úlohe ceramidov a fosfolipidov ako možných mediátorov aterosklerózy podmienených kardiovaskulárnymi ochoreniami (ASKVO) alebo prognostických biomarkerov. Kombinácia plazmatickej hladiny ceramidov a fosfolipidov zlepšuje predpoveď ASKVO. CERT1 a CERT2 sú nové skórovacie systémy v predpovedi koronárneho rizika na základe stanovenia špecifických ceramidov a fosfolipidov hmotnostnou spektrometriou.

Kľúčové slová: ceramidy; fosfolipidy; hmotnostná spektrometria; skórovací systém; ateroskleróza; kardiovaskulárne ochorenie

ABSTRACT

Lipidomics is the branch of science that deals with the study of the biochemical pathways of lipids in biological systems. Lipidomics is a new sub-specialty of clinical biochemistry using mainly mass spectrometry. In the last decade, evidence has accumulated for the role of ceramides and phospholipids as possible mediators of

atherosclerosis-related cardiovascular disease (ARVD) or prognostic biomarkers. The combination of plasma ceramide and phospholipid levels improves the prediction of ASKVO events. CERT1 and CERT 2 are novel scoring systems in the prediction of coronary risk based on the determination of specific ceramides and phospholipids by mass spectrometry.

Key words: ceramides; phospholipids; mass spectrometry; scoring system; atherosclerosis; cardiovascular disease

ÚVOD

Kardiovaskulárne riziko v súčasnej dobe vypočítavame z bežne stanovovaných parametrov, ktoré sú implementované v medzinárodných odporúčaníach, akým je SCORE (z anglického *Systematic Coronary Risk Evaluation*, Mach a kol., 2020). Základným parametrom, ktorým sme sa doteraz prevažne zaoberali pri ateroskleróze podmienených kardiovaskulárnymi ochoreniami (ASKVO) bol cholesterol a LDL-cholesterol (LDL-Ch). LDL-Ch bol zároveň vybraný ako ukazovateľ miery liečby a prevencie aterosklerózy. Menej pozornosti sme venovali nesterolovým zložkám lipoproteínov a lipidom všeobecne. V poslednej dekáde sa do medicínskej praxe začali razantne presadzovať poznatky o jednotlivých zložkách lipoproteínov a lipi-

dov získaných na základe nových separačných postupov s následným stanovením pomocou hmotnostnej spektrometrie (MS). Na základe hmotnostnej spektrometrie vieme stanovovať hladiny ceramidov a fosfolipidov v plazme, ktoré zohrávajú významnú úlohu v rozvoji aterosklerózou podmienených kardiovaskulárnych ochorení a zároveň sú markermi v systémoch predpovede ASKVO.

Lipidomika je dnes považovaná za biochemický odbor, ktorý sa rýchle rozvíja najmä zlepšovaním technológií hmotnostnej spektrometrie spolu s bioinformatikou. Lipidomická analýza je viacstupňový proces. Lipidy sa extrahujú v organických rozpúšťadlách z rôznych vzoriek. Extrahované lipidy sa buď ďalej separujú pomocou chromatografie, alebo sa priamo infundujú do hmotnostnej spektrometrie. Analýza píkov identifikuje druhy lipidov (Obr.1).

V roku 2005 LIPID MAPS konzorcium (n.d.) určilo medzinárodnú klasifikáciu lipidov na osem kategórií založených na chemickej a biochemickej charakteristike lipidov: masné kyseliny, glycerolipidy, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, sterolové lipidy, prenolové lipidy, sacharolipidy a polyketidy. Každá kategória sa delí na podtriedy podľa chemickej štruktúry. Doteraz bolo identifikovaných viac ako 40 000 lipidových jednotiek, ktoré sú zahrnuté v databáze LIPID MAPS (n.d.; Lydic a Goo, 2018). V lipidomike sú používané viaceré moderné metodiky: nukleárna magnetická rezonančná spektrometria, fluorescenčná spektroskopia, chromatografia, hmotnostná spektrometria. Práve elektrosprejová ionizácia (ESI) je ionizačná technika v hmotnostnej spektrometrii a je najpopulárnejšia a najviac využívaná metóda v stanovovaní malých polárnych lipidov.

Hmotnostná spektrometria prešla svojím vývojom za posledných 20 rokov. Prelomový bol objav, za ktorý bola udelená Nobelova cena v roku 2002, ktorú získal John Bennett Fenn za rozvoj využitia elektrosprejovej ionizácie (ESI) v analýze biologických molekúl (Markides a Gräslund,

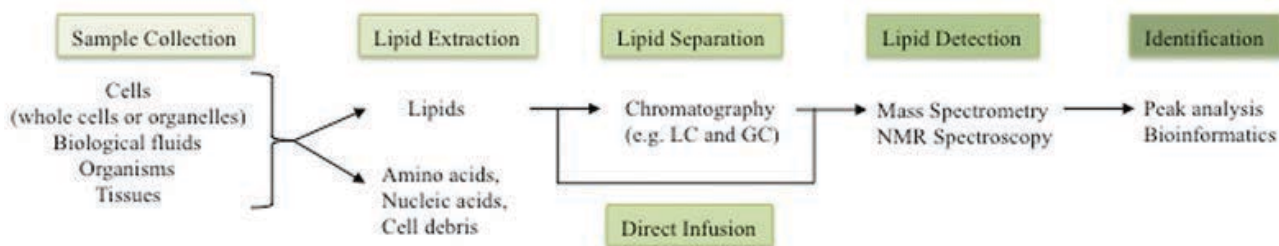
2002). V roku 2002 dostal Nobelovu cenu aj Koichi Tanaka za využitie ionizačnej techniky MALDI – matricou asistovaná laserová desorpčná ionizácia. Neexistuje univerzálna ionizačná technika. Hmotnostná spektrometria využívajúca ESI sa nazýva hmotnostná spektrometria s elektrosprejovou ionizáciou (ESI-MS). Spojenie kvapalinovej chromatografie s elektrosprejovou ionizáciou a hmotnostnou spektrometriou (LC-ESI-MS) významne prispelo k stanovovaniu jednotlivých zložiek lipidómu (Yang a Han, 2011). Hydrofilná interakčná kvapalinová chromatografia (HILIC) ako separačná technika je alternatívny prístup k separácii malých polárnych látok (Buszewski a Noga, 2012). Pre stanovovanie ceramidov boli pokusy o vypracovanie validácie metodiky pre ich rutinné používanie (Kauhanen a kol., 2016).

Využitie hmotnostnej spektrometrie

Veľké štúdie zamerané na ASKVO používali rôzne lipidomické postupy, ale najmä LC-ESI-MS. Počiatkové práce, najmä štúdia LURIC, skúmajúca ceramidy a fosfolipidy, ich rozdelila na pozitívne alebo negatívne korelujúce s kardiovaskulárnou mortalitou (Sigruener a kol., 2014). Na základe spomenutej štúdie sú príkladom šiestich lipidových ukazovateľov pozitívne korelujúcich s mortalitou na ASKVO nasledujúce sfingomyelíny (SM), ceramidy (Cer) a fosfolipidy (PC): SM 16:0, SM 24:1, Cer 16:0, Cer 24:1, PC 32:0 a PC 0-32:0; kým 6 negatívne korelujúcich – „protektívnych“ druhov je: SM 23:0, SM 24:0, PC 38:5, PC 38:6, PC 36:5 a PC 40:6.

Ceramidy a fosfolipidy sú syntetizované v bunkových membránach a v endoplazmatickom retikule a len tie, ktoré sú syntetizované v pečeni a v čreve sú prenášané lipoproteínmi do periférie.

Najmä oxidované fosfolipidy menia aktivitu endotelových buniek, trombocytov, hladkých svalov a HDL, tým podporujú vznik aterosklerózy. Oxidované fosfolipidy majú odlišnú signálnu sústavu a metabolické cesty cez rôzne re-



Obr.1 Pracovné postupy lipidomiky, zdroj: Lydic a Goo, 2018.

Tab.1 Relatívne zastúpenie fosfolipidov detegované metódou vysokoúčinnnej chromatografie na tenkej vrstve, zdroj: Dashti a kol., 2011

PLF	Fosfolipidy							
	PE	PG	PS	PI	PC	SM	Lp-C	CL
VLDL	+++++	nd	nd	++++	++++	+++	+	nd
IDL	+	nd	nd	++	+++	++	+++++	nd
LDL	+	nd	nd	+++	++++	+++++	++	nd
HDL2	+	nd	nd	+++	++++	++	+	nd
HDL3	++	nd	nd	+++++	+++++	+++	++	nd
VHDL	+	nd	nd	++++	+++	++	+++	nd
PLFF	nd	nd	nd	nd	+	+	++++	nd

PLF – lipoproteínová frakcia plazmy; PE – fosfatyditetanolamín; PG – fosfatydiglycerol; PS – fosfatydilserín; PI – fosfatydilinositol; PC – fosfatidylcholín; SM – sfingomyelín; Lp-C – lyzofosfatidilcholín; CL- kardiolipín; VLDL – lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou; IDL – lipoproteíny so strednou hustotou; LDL – lipoproteíny s nízkou hustotou; HDL – lipoproteíny s vysokou hustotou; VHDL – lipoproteíny s veľmi vysokou hustotou; PLFF – frakcia plazmy bez lipoproteínov; + – ukazovateľ zastúpenia, nd (not detected) – nedetegovateľné

ceptory pre individuálne druhy oxidovaných fosfolipidov (Lee a kol., 2012). Detailnejšie skúmanie metabolizmu ceramidov a fosfolipidov poukázalo na procesy, v ktorých uvedené zložky zasahujú do procesu aterogenézy.

Zvýšené hladiny ceramidov sú spojené so zvýšeným rizikom KVO. Ceramidy modulujú lokálne zápalové reakcie a indukujú apoptózu endotelu (Obr. 3). Zvýšená je inflamácia, apoptóza, agregácia LDL častíc, znížená je produkcia oxidu dusnatého.

Ďalšie štúdie, SPUM-ACS a BECAC štúdia (Laaksonen a kol., 2016), skúmali rôzne kombinácie ceramidov a ich využitie pri diagnostike ASKVO príhod. Popri štandardných rizikových faktoroch, ceramidy zlepšujú odhad rizika vzniku ASKVO (Meeusen a kol., 2020). Na základe hore

uvedených poznatkov bolo zostavené skóre CERT1 (z anglického *Cardiovascular Event Risk Test 1*), na vývoji ktorého sa podieľali Zora Biosciences, Fínsko a Mayo Clinic, USA (Laaksonen a kol., 2016; 5.Hlivo, M, Vasile,V.C, Meeusen a kol., 2020).

Ceramidové skóre CERT1 sa vypočítava na základe rozdelenia zistených hodnôt ceramidov do kvartilov, ku ktorým sú priradené hodnoty vyjadrujúce závažnosť zmien parametrov. Vzhľadom na to, že jeden parameter nedostatočne vyjadruje mieru rizika pri ceramidoch, bolo použitých 6 komponentov pre stanovenie rizikového skóre. Tri samostatné ceramidy a tri pomery ceramidov navzájom sú komponentmi skóre. CERT1 má šesť zložiek a body udeľujú iba kvartily 3 a 4. Súčet bodov pri skóre CERT1

SCORE CALCULATION					
Score component		Q1	Q2	Q3	Q4
CERT1	Cer(d18:1/16:0)	0	0	+1	+2
	Cer(d18:1/18:0)	0	0	+1	+2
	Cer(d18:1/24:1)	0	0	+1	+2
	Cer(d18:1/16:0) / Cer(d18:1/24:0)	0	0	+1	+2
	Cer(d18:1/18:0) / Cer(d18:1/24:0)	0	0	+1	+2
	Cer(d18:1/24:1) / Cer(d18:1/24:0)	0	0	+1	+2
CERT2	Cer(d18:1/24:1) / Cer(d18:1/24:0)	0	+1	+2	+3
	Cer(d18:1/16:0) / PC 16:0/22:5	0	+1	+2	+3
	Cer(d18:1/18:0) / PC 14:0/22:6	0	+1	+2	+3
	PC 16:0/16:0	0	+1	+2	+3

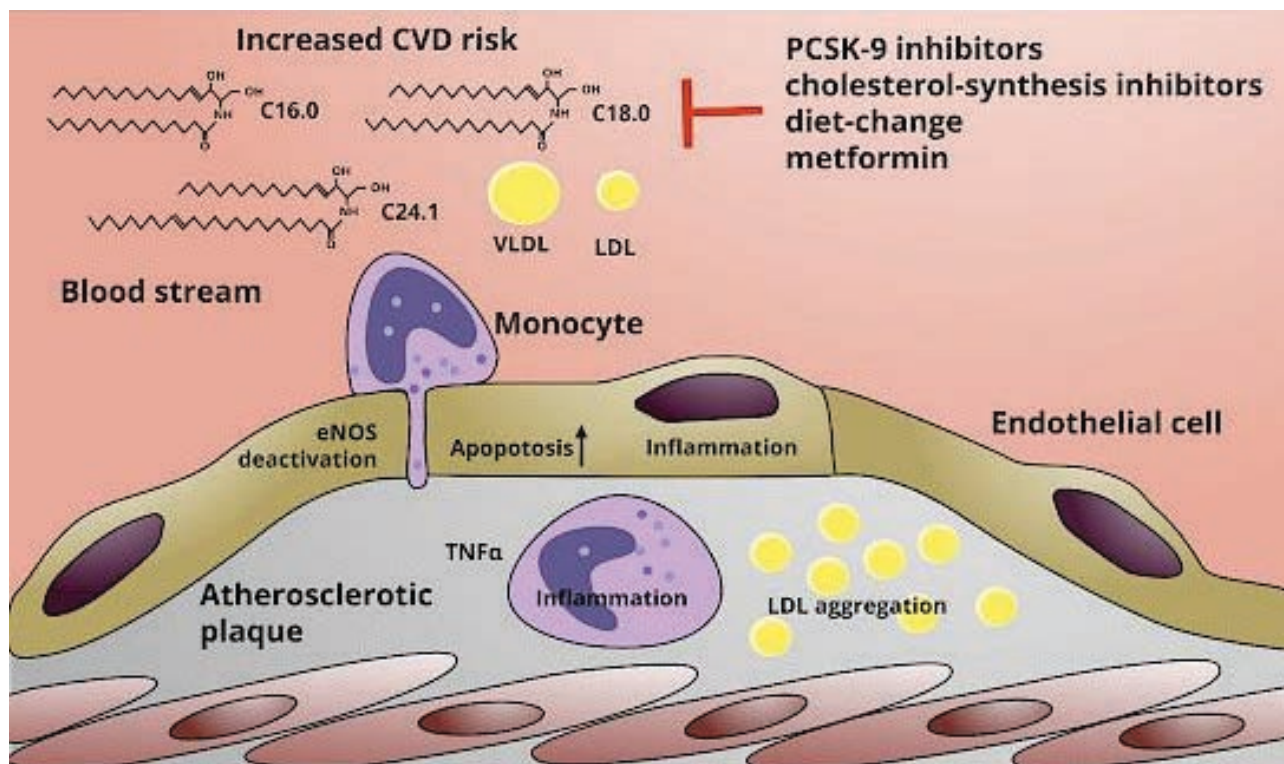
➔ CERT1 / CERT2 SCORE:
0-12 points

↓

RISK GROUP DETERMINATION

Risk group	CERT1	CERT2
Low risk	0-2	0-3
Moderate risk	3-6	4-6
Increased risk	7-9	7-8
High risk	10-12	9-12

Tab.2 Výpočet skóre rizika CERT a určenie rizikových skupín, zdroj: Hilvo a kol., 2020b



Obr. 3 Zhrnutie bunkového metabolizmu ceramidov vrátane ich potenciálnej účasti na kardiovaskulárnych ochoreniach, zdroj: Zietzer a kol., 2022

komponentoch v jednotlivých kvartiloch vyjadruje rizikóvú skupinu. Rizikové skupiny sú nasledujúce: 0-2 nízke riziko, 3-6 stredné riziko, 7-9 zvýšené riziko, 10-12 vysoké riziko (Tab. 2).

Z počiatočných štúdií, akou je LURIC, bolo evidentné, že aj fosfolipidy môžu byť rizikovým faktorom ASKVO. Kombinácia ceramidov a fosfolipidov efektívnejšie vyjadruje riziko ASKVO. Na základe poznatkov z veľkých štúdií WE-CAC (*The Western Norway Coronary Angiography Cohort*), LIPID (*Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease*) a KAROLA (*Langzeiterfolge der Kardiologischen Anschlussheilbehandlung*) bolo zostavené skóre CERT2. (Hlivo a kol., 2020a) CERT2 bolo vytvorené tou istou skupinou ako CERT1, ale vychádza z hodnôt 4 ceramidov a troch fosfolipidov. Postup výpočtu a určenie rizikovej skupiny je analogický ako pri výpočte z ceramidov pri CERT1 (tab. 2). CERT2 rizikové skóre je významným faktorom pre predpoveď rizika ASKVO aj v sekundárnej prevencii - MACE (z anglického *Major Adverse Cardiovascular Events*), čo je definované ako infarkt myokardu, cievná mozgová príhoda a úmrtie na ASKVO (Papazoglou a kol., 2022). Oproti CERT1 má CERT2 len 4 zložky, ale už druhý kvartil poskytuje rizikový bod. Stupnica pre skóre

CERT1 aj CERT2 je rovnaká, s maximom 12 bodov a na základe nich je subjekt zaradený do jednej z rizikových kategórií KVO (Tab. 2).

DISKUSIA

V tomto článku sú uvedené novšie poznatky o sfingolipidoch a fosfolipidoch a ich možné využitie v klinickej praxi. Nové poznatky sú založené na zdokonalení techniky hmotnostnej spektrometrie resp. kombinácie kvapalínovej chromatografie, ionizácie a hmotnostnej spektrometrie (Avela a Sirén, 2020). Ide o nový prístup v prevencii a diagnostike ASKVO. Tieto nové poznatky budú pomáhať rozpoznávať biochemické pochody na molekulárnej úrovni v aterogenéze a neskoršie aj v oblasti pre skúmanie nových účinných liekov pri liečbe dyslipoproteinémií a ASKVO. Nové poznatky a nové systémy skóre je nutné preveriť v praxi. Existujú aj určité neobjasnené body ako je napríklad úloha nenasýtených mastných kyselín s dlhým reťazcom v skórovacích systémoch. Začlenenie skórovacích systémov CERT1 a CERT2 do rutínnej biochemickej práce bude vyžadovať dlhšie sledovanie a skúmanie, ako aj zváženie ekonomickej efektivity.

LITERATÚRA

1. **Avela, H.F. and Sirén, H. (2020)** 'Advances in lipidomics', *Clinica Chimica Acta* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.049>.
2. **Buszewski, B. and Noga, S. (2012)** 'Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique', *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>.
3. **Dashti, M. et al. (2011)** 'A phospholipidomic analysis of all defined human plasma lipoproteins', *Scientific Reports* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep00139>.
4. **Hilvo, M. et al. (2020a)** 'Development and validation of a ceramide- And phospholipid-based cardiovascular risk estimation score for coronary artery disease patients', *European Heart Journal* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz387>.
5. **Hilvo, M. et al. (2020b)** 'Ceramides and Ceramide Scores: Clinical Applications for Cardiometabolic Risk Stratification', *Frontiers in Endocrinology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.570628>.
6. **Kauhanen, D. et al. (2016)** 'Development and validation of a high-throughput LC-MS/MS assay for routine measurement of molecular ceramides', *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9425-z>.
7. **Laaksonen, R. et al. (2016)** 'Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol', *European Heart Journal* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw148>.
8. **Lee, S. et al. (2012)** 'Role of phospholipid oxidation products in atherosclerosis', *Circulation Research* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.256859>.
9. **LIPID MAPS** (no date). Available at: <https://www.lipidmaps.org/> (Accessed: 3 June 2024).
10. **Lydic, T.A. and Goo, Y. (2018)** 'Lipidomics unveils the complexity of the lipidome in metabolic diseases', *Clinical and Translational Medicine* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0182-9>.
11. **Mach, F. et al. (2020)** '2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk', *European Heart Journal* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz455>.
12. **Markides, K. and Gräslund, A. (2002)** *Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002, The Royal Swedish Academy of Sciences*. Available at: www.kva.se (Accessed: 3 June 2024).
13. **Meeusen, J.W. et al. (2020)** 'Ceramide improve atherosclerotic cardiovascular disease risk assessment beyond standard risk factors', *Clinica Chimica Acta* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.10.005>.
14. **Papazoglou, A.S. et al. (2022)** 'CERT2 ceramide- and phospholipid-based risk score and major adverse cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis', *Journal of Clinical Lipidology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2022.02.001>.
15. **Sigruener, A. et al. (2014)** 'Glycerophospholipid and sphingolipid species and mortality: The Ludwigshafen risk and cardiovascular health (LURIC) study', *PLoS ONE* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085724>.
16. **Yang, K. and Han, X. (2011)** 'Accurate quantification of lipid species by electrospray ionization mass spectrometry - Meets a key challenge in lipidomics', *Metabolites* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.3390/metabo1010021>.
17. **Zietzer, A. et al. (2022)** 'Ceramide Metabolism in Cardiovascular Disease: A Network With High Therapeutic Potential', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318048>.



Laboratórna Diagnostika, XXIX, 1, 2024: 81–83

ČO DOSTALA DIABETOLOGIA Z IRÁNU? WHAT DID DIABETOLOGY GET FROM IRAN?

Oliver Viktor Rác

Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice

oliver.racz@upjs.sk

SÚHRN

Opis objavu zvláštnej formy hemoglobínu u diabetikov iránskym genetikom Samuelom Rahbarom a cesta k objasneniu biosyntézy jednej malej frakcie ľudského hemoglobínu (HbA1c) a k jej využitiu ako zlatého štandardu posúdenia glykemickej kompenzácie chorých s diabetes mellitus

Kľúčové slová: Samuel Rahbar; diabetes; glykovaný hemoglobín

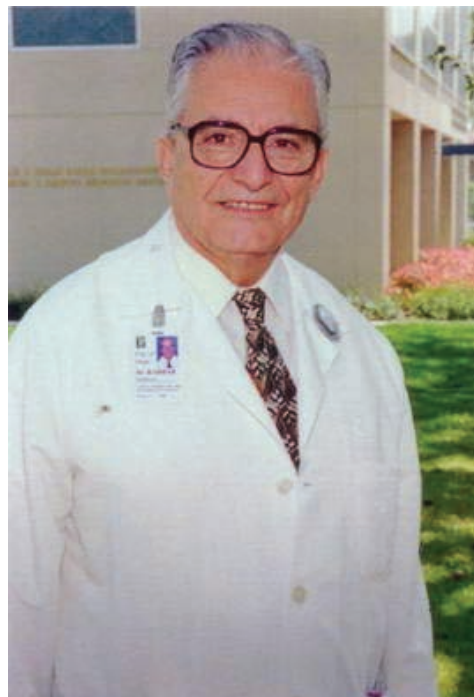
ABSTRACT

A description of the discovery of a peculiar form of hemoglobin in diabetics by the Iranian geneticist Samuel Rahbar, and the journey to elucidate the biosynthesis of one of the small fractions of human hemoglobin (Hb A1c) and to its use as the gold standard for assessing glycaemic compensation in patients with diabetes mellitus.

Key words: Samuel Rahbar; diabetes; glycated hemoglobin

V posledných rokoch sa o Iráne hovorí skôr negatívne a často zabúdame na to, že ide o bývalú mocnú a bohatú Perziu. Málo sa už dnes hovorí aj o tom, že posledný panovník krajiny, Mohammad Reza Pahlavi navštívil v roku

1979 - krátko pred prevzatím moci ajatolláhom Chomejním - Prahu a na Karlovej univerzite dostal čestný doktorát. Tieto údaje však ešte nemajú žiadnu súvislosť s diabetológiou, ale ak spomenieme meno Samuela Rahbara (Obr. 1), niektorí starší kolegovia si možno spomenú na niečo okolo glykovaného hemoglobínu.



Obrázok 1. Samuel Rahbar

Profesor Samuel Rahbar. M.D., PhD. sa narodil v roku 1929 v židovskej rodine a komunitě v Hamedane, ako jeden zo siedmich súrodencov. Po skončení gymnázia študoval medicínu v Teheráne a po promócií, v roku 1963 získal doktorát z imunológie. Po študijnej ceste v Izraeli (kde jeho brata liečili na leukémiu) a vplyvom prednášky profesora Hermana Lehmana zmenil svoje pôvodné rozhodnutie stať sa imunológom a začal sa venovať hľadaniu variantných foriem hemoglobínu v iránskej populácii. Vďaka vylepšenej elektroforetickej metóde delenia rôznych frakcií hemoglobínu bol schopný analyzovať veľký počet vzoriek denne. Počas niekoľkých rokov výskumu objavil vo vzorkách iránskej populácie až 11 hemoglobínopatií. V súbore veľkého počtu analyzovaných vzoriek zbadal niečo nezvyčajné na elektroforetogramě u dvoch vyšetrených s diabetes mellitus (Rahbar, 1968). Neskôr ten istý čudný nález potvrdil na väčšom počte diabetikov, ale nemal na to vysvetlenie. V tomto bode sa spája jeho výskum diabetickeho hemoglobínu s panovníkom, ktorý mal dobré vzťahy s USA a vyslal ho na študijnú cestu na pracoviská, kde o štruktúre hemoglobínu a jeho malých frakciách už vedeli a výsledky profesora Samuela Rahbara boli v odborných kruhoch známe (Rahbar a kol., 1969). Netrvalo dlho a Rahbarov „nezvyčajný (unusual)“ hemoglobín bol identifikovaný ako jedna z malých frakcií hemoglobínu, ako aj to, že táto frakcia, známa ako HbA1c, vzniká neenzýmovou adíciou glukózy na ľudský hemoglobín A. Od tohto momentu bola cesta glykovaného hemoglobínu priamočiara

k dnešnej sláve zlatého štandardu hodnotenia glykemickej kompenzácie (Tabuľka 1).

Na tejto dlhej ceste sme sa zúčastnili aj my (Tabuľka 2).

Po ukončení študijného pobytu v USA sa Samuel Rahbar vrátil do Teheránu, stal sa dekanom lekárskej fakulty a naďalej sa venoval výskumu. Žiaľ, toto obdobie bolo ukončené Islamskou revolúciou v roku 1979, keď ho vyhodili z univerzity, údajne pre jeho úzke kontakty s rodinou panovníka. Spolu so svojou rodinou emigroval do USA, kde sa v City of Hope National Medical Centre (Duarte, California) ďalej venoval výskumu, až do svojej smrti v roku 2012. Samuel Rahbar bol tesne pred smrťou ocenený *Outstanding Discovery Award* Americkej diabetologickej spoločnosti (Gebel, 2012). Jeho tri dcéry nepadli ďaleko od stromu: najstaršia Roya sa zaoberá výskumom v oblasti molekulovej biológie, Geeta je všeobecnou lekárkou a najmladšia Firoozeh zubnou lekárkou.

Málo sa však vie o tom, že Rahbar mal aj „predskokanov“, konkrétne veľmi známych hematológov Huismana a Dozyho, ktorí už v roku 1962 videli niečo podobné pri analýze hemoglobínu diabetikov (Huisman a Dozy, 1962). Títo pacienti boli liečení tolbutamidom (sulfanylurea, prvý orálny prípravok na liečbu diabetikov 2. typu) a ich logická hypotéza bola, že zmenený hemoglobín je aduktom tejto látky na hemoglobín. Experimentálne pridali tolbutamid ku krvinkám, ale keďže nenastala očakávaná reakcia, ich výskum pokračoval iným smerom. V tom istom roku videl abnormálny hemoglobín u chorých s diabetes mellitus aj

Tabuľka 1. Dôležité momenty objavu HbA1c a jeho významu v diabetológii

1958-1962	Vyriešenie priestorovej konfigurácie 4 podjednotiek koňského hemoglobínu a následne získanie Nobelovej ceny v roku 1962: Kendrew a Perutz (zdroj: Rácz a kol., 1989).
1961	Určenie primárnej štruktúry alfa a beta reťazcov ľudského hemoglobínu Braunitzerom a spol. a Hillom a spol. (zdroj: Rácz a kol., 1989).
1966	Identifikácia malých frakcií ľudského hemoglobínu vrátane HbA1c Holmquistom a Schroederom (zdroj: Rácz a kol., 1989).
1968-1969	Nález nezvyčajného hemoglobínu u diabetikov a potvrdenie nálezu v USA (Rahbar, 1968; Rahbar, Blumenfeld a Ranney*, 1969).
1969-1977	Objasnenie biosyntézy HbA1c a jeho významu ako možného ukazovateľa glykemickej kompenzácie u chorých s diabetes mellitus na základe výskumu Bunna a spol. v roku 1975 a Koeniga a spol. v roku 1977 (zdroj: Rácz a kol., 1989).
Po roku 1977	Upresnenie kinetiky glykácie hemoglobínu. Meranie glykovaného hemoglobínu u väčšieho počtu chorých s diabetes mellitus kolorimetrickou metódou a stĺpcovou chromatografiou.
1993-1998	Výskumná skupina kontroly chorých s diabetes mellitus a jeho komplikácií (Diabetes Control and Complications Trial Research Group, DCCT) určuje HbA1c ako dôležitého ukazovateľa u chorých s diabetes prvého typu. Britská prospektívna štúdia diabetes (UK Prospective Diabetes Study, UKPDS) stanovuje to isté u chorých s druhým typom (Shamoon a kol., 1993; Turner, 1998).
2008	Vývoj primárneho analytu a jednotná štandardizácia metód na meranie HbA1c pracovnou skupinou International Federation of Clinical Chemistry, IFCC (Weykamp a kol., 2008).
2018, 2019	Veľké medzinárodné kontrolné štúdie „EurA1c“ zamerané na kontrolu kvality, správnosť a presnosť metód na meranie HbA1c.

*Helen Ranney bola okrem iného aj významnou odborníčkou výskumu kosáčikovej anémie

Tabuľka 2. Naša účasť na dlhej ceste HbA1c

1979	Prvé pokusy merania glykovaného hemoglobínu dnes obsolentnou kolorimetrickou metódou
1982	Prvá publikácia o glykovanom hemoglobíne, do roku 1989 17 ďalších (Vícha a kol., 1982)
1989	Monografia o glykovanom hemoglobíne (Rác a kol., 1989) ocenená cenou Slovenského literárneho fondu v roku 1990.
21. storočie	Návrat k problematike pomocou modernej metodiky. Riešenia otázok kinetiky HbA1c a správnej interpretácie hodnôt. Spolu viac ako 40 publikácií a prezentácií na domácich a zahraničných podujatiach.
2024	Prednáška na 3. kongrese emeritných profesorov v Londýne (Rác., 2024)

japonský výskumník Shibata, ale jeho článok bol publikovaný v japonskom jazyku a preto ostal bez medzinárodnej odozvy (Shibata a kol., 1962). Reakcia aminoskupín s karbonylmi však bola opísaná už dávno pred nimi francúzskym farmaceutom a chemikom Maillardom (Maillard, 1912). Najjednoduchší príklad tejto reakcie je zožltnutie sladkého kondenzovaného mlieka po určitej dobe. Z Maillardových originálnych pozorovaní spred vyše sto rokmi vznikla celá vedecká disciplína okolo pokročilých produktov glykácie a podobných reakcií (Jakuš a kol., 2014).

LITERATÚRA

- Gebel, E. (2012)** 'The start of something good: The discovery of HbA1c and the American Diabetes Association Samuel Rahbar outstanding discovery award', *Diabetes Care*. doi: 10.2337/dc12-1763.
- Huisman, T.H.J. and Dozy, A.M. (1962)** 'Studies on the heterogeneity of hemoglobin. V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione', *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*.
- Jakuš, V. et al. (2014)** 'Monitoring of glycation, oxidative stress and inflammation in relation to the occurrence of vascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus', *Physiological Research*. doi: 10.33549/physiolres.932672.
- Maillard, L.C. (1912)** 'Reaction generale des acides amines sur le sucres: ses consequences biologiques'. *Compt Rend Acad Sci* 1912; 154: 66-68
- Rác O. (2024)** Progress in markers of glycaemic compensation of diabetes mellitus from Joslin, through DCCT study and to continuous glucose measurement. 3rd EAPE Congress, 'The Capital of Knowledge', University of East London, 3-5 April 2024, Book of abstracts
- Rác, O., Vícha, T., Pačin, J. (1989)** Glykohemoglobín, glykácia bielkovín a diabetes mellitus. Osveta Martin, 245 s, ISBN 80 – 217 – 0072 - 6
- Rahbar, S. (1968)** 'An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics', *Clinica Chimica Acta*. doi: 10.1016/0009-8981(68)90372-0.
- Rahbar, S., Blumenfeld, O. and Ranney, H.M. (1969)** 'Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/0006-291X(69)90685-8.
- Shamoon, H., and others (1993)** 'The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group.', *N Engl J Med*.
- Shibata, S. et al. (1962)** 'Hemoglobin M-Kurume: its identity with hemoglobin M-Saskatoon.', *Nippon Ketsueki Gakkai zasshi : journal of Japan Haematological Society*
- Turner, R. (1998)** 'Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)', *Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(98)07019-6.
- Vícha, T., Rác, O., Stanická, S. (1982)** The practical value of measuring glycosylated haemoglobin in diabetic outpatient practice. 18th Annual Meeting, European Association for the Study of Diabetes, Budapest, Hungary, 1st – 4th Sept. 1982.
- Weykamp, C. et al. (2008)** 'The IFCC reference measurement system for HbA1c: A 6-year progress report', *Clinical Chemistry*. doi: 10.1373/clinchem.2007.097402.