

1. Úvod	1
2. Teoretická část	2
2.1. Pankreatická elastáza, vlastnosti, význam a stanovení	2
2.1.1. Fyziologie pankreatu	2
2.1.2. Vlastnosti a význam stanovení pankreatické elastázy	3
2.1.3. Imunochemické metody se značenými protilátkami	4
2.1.3.1. RIA	5
2.1.3.2. EIA	5
2.1.3.3. ELISA	6
2.1.4. Metody stanovení pankreatické elastázy	8
2.1.4.1. Stanovení elastázy I v séru	8
2.1.4.2. Stanovení elastázy I ve stolici	8
2.2. Preanalytika	9
2.2.1. Neovlivnitelné podmínky	10
2.2.2. Ovlivnitelné podmínky	11
2.2.3. Odběr a skladování vzorku	14
3. Praktická část	15
3.1. Materiál a přístrojové vybavení	15
3.1.1. Přístroje	15
3.1.2. Materiál	18
3.2. ELISA souprava a způsob provedení testu	19
3.3. Vlastní měření a statistika	22
3.4. Vyhodnocení půlročního měření	24
3.5. Vyhodnocení týdenního měření	29
4. Diskuze	37
5. Závěr	39

6. Literatura	40
7. Zkratky	42
8. Přílohy	43

# 1. Úvod

Pro diagnostiku celého zažívacího ústrojí je určena celá řada specializovaných metod a to jak fyzikálních, tak chemických. Morfologický obraz orgánů gastrointestinálního traktu umožňují moderní zobrazovací metody jako je endoskopie, sonografie, rentgenové vyšetření, počítačová tomografie nebo magnetická rezonance. Nutným doplněním jsou metody biochemické. Jejich přínos pro diagnostiku je především v oblasti funkčních testů, screeningových programů a sledování dynamiky procesů v průběhu léčby resp. dlouhodobého sledování nemocného (follow-up).[18]

Zjištění hodnot pankreatické elastázy 1 ve stolici se využívá k určení funkce exokrinního pankreatu. Stanovení pankreatické elastázy 1 má vysokou specifitu i senzitivitu a je využíváno na dlouhodobé sledování pacientů s chronickou insuficiencí pankreatu, dále jako screeningový test onemocnění pankreatu a u diferenciální diagnostiky malabsorbčního syndromu.

Pankreatickou elastázu 1 lze stanovit ve stolici i v krvi pomocí metody ELISA. V této práci byla k určení hodnot ve stolici využita metoda ELISA setem od firmy ScheBo® v laboratoři Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Princip této metody je založen na reakci sandwichového typu se dvěma monoklonálními protilátkami vysoce specifickými proti lidské pankreatické elastáze 1.

Cílem této práce je zjistit míru variability u sledovaného testu u čtyř zdravých jedinců. Jejich vzorky budou odebírány v měsíčních intervalech po dobu půl roku a změřeny pomocí metody ELISA.

Práce je doplněna o týdenní test změn v hodnotách pankreatické elastázy 1 u dvou zdravých jedinců při různých teplotách uchování vzorků. Cílem této části je zjistit, nakolik různé teploty mění hodnoty pankreatické elastázy 1 v měřených vzorcích.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Pankreatická elastáza, vlastnosti, význam a stanovení

#### 2.1.1. Fyziologie pankreatu

Pankreas(slinivka břišní) je anatomicky rozdělen na hlavu, tělo a ohon. Napohled vypadá jako šedě růžová slinná žláza, s patrnou kresbou lalůčků. Je dlouhý 12 až 16 cm a jeho hmotnost je mezi 60 až 90 gramy. Je umístěn za žaludkem napříč po zadní stěně břišní, od duodena(dvanáctník) až ke slezině. [1]

Pankreas má dvě funkce: exokrinní a endokrinní. Endokrinní část pankreatu tvoří asi 1 milion drobných, až do 0,5 milimetrů velkých, buněčných okrsků, což jsou difusně rozesté Langerhansovy ostrůvky. Ty tvoří asi 1,5 % celkového objemu pankreatu. V Langerhansových ostrůvcích jsou umístěny A, B a D buňky, produkující glukagon(A), insulin a somatostatin. Tyto hormony, mimo účinky celotělové, ovlivňují navzájem svoji sekreci a působí i na činnost GIT. [1] [2]

Z hlediska této práce je důležitý exokrinní oddíl slinivky, který je funkční složkou gastrointestinálního traktu. Je to tuboalveolární žláza, do které vstupují jemná septa a dělí ji na lalůčky. Lalůčky jsou složeny ze žlázových acinů tvořených serosními buňkami. Tato žláza uvolňuje alkalickou pankreatickou šťávu do dvanáctníku na Vaterově papile buď samostatně, nebo společným kanálem se žlučí. [1] [2]

Pankreatická šťáva obsahuje trávicí enzymy, které tvoří 90% bílkoviny pankreatické šťávy. Tyto enzymy jsou trypsinogen a chymotrypsin, dále amyláza, lipáza, elastáza. Trypsinogen a chymotrypsin štěpí bílkoviny, amyláza štěpí škroby a cukry, lipáza štěpí tuky a elastáza štěpí elastin. Pankreatická šťáva také obsahuje anorganické látky. Vzhledem k její funkci jsou důležité hydrogenkarbonátové ionty( $\text{HCO}_3^-$ ). Pankreas produkuje na jednotku své hmotnosti nejvíce bílkovin ze všech tkání v lidském těle. Je-li slinivka břišní stimulována k sekreci, je šťáva čirá, bezbarvá, alkalická a isotonická s krevní plasmou. V klidu se vytvoří 0,2 – 0,3 ml/min a toto množství může stoupnout až na 3 ml/min. Za den se tak uvolní přibližně 1 až 2 litry pankreatické šťávy. [2] [9]

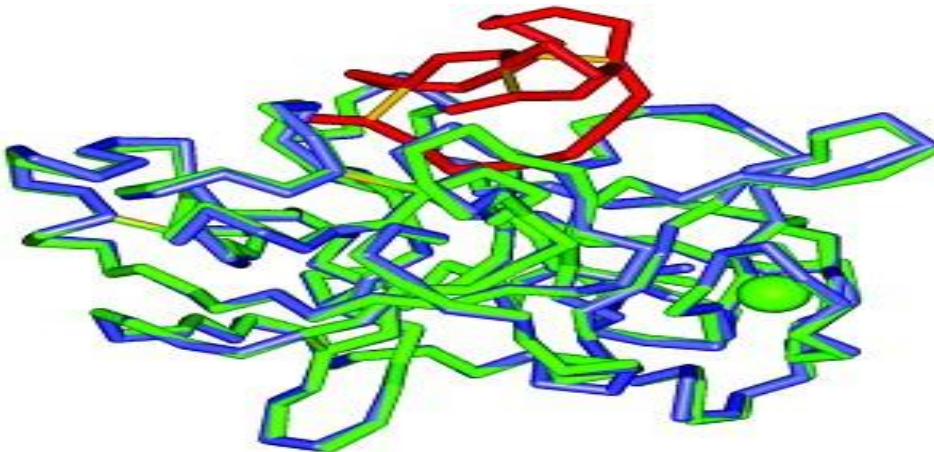
## 2.1.2. Vlastnosti a význam stanovení pankreatické elastázy

Elastáza je specifický pankreatický enzym endopeptidázy, který hydrolyzuje proteiny. Působí v gastrointestinálním traktu při štěpení elastinu, kolagenu a dalších látek. Pankreatická elastáza (elastáza 1, ELA1) je stále v některých publikacích označována jako EC (Enzyme Commission number) 3.4.21.11. Toto označení zaniklo devět let po svém vzniku v roce 1981. Dnes je elastáza 1 (CELA 1) označována jako EC 3.4.21.36 a elastáza 2 (ELANE, neutrofilní elastáza) jako EC 3.4.21.37. [12] [19]

Skupinu pankreatické elastázy 1 tvoří 5 izoenzymů. Klinicky jsou významné dva izoenzymy: elastáza 1 (CELA1, Mr (molekulová hmotnost) Mr 30000 Da, anodická frakce, obr. 2.1) a elastáza 2 (CELA2A, Mr 25000 Da, katodická frakce). Ty jsou secernovány jako proelastáza a ta je aktivována trypsinem. Jsou syntetizovány v acinárních buňkách pankreatu a následně jsou pankreatickou šťávou uvolňovány do dvanáctníku. [3] [13] [19]

Pankreatická elastáza 1 je většinou vázána na soli žlučových kyselin. Je resistantní vůči prostředí v celé střešní pasáži a během jejího průchodu není degradována proteinová sekvence zvolená pro imunochemickou detekci. Obsah elastázy 1 ve stolici je 5 až 6 vyšší než v pankreatické šťávě. V malém množství se též u zdravých jedinců dostává do krevní cirkulace, kde existuje jednak volná, jednak vázaná v komplexu s  $\alpha$ 1-proteinasovým inhibítorem (dříve označovaným jako  $\alpha$ 1-antitrypsin). Ten je zejména nutný k regulaci aktivní elastázy 2 (ELANE), kdy při jeho nedostatku by došlo k proteolýze plicní tkáně. [4] [7] [13]

Indikace k vyšetření pankreatické elastázy je při potřebě potvrdit nebo vyvrátit podezření na závažnou insuficienci exokrinní funkce pankreatu, tedy u chronické či akutní pankreatitidy a nádoru pankreatu. Také u zjišťování míry participace pankreatu při mukoviscidóze a ke kontrole exokrinní funkce pankreatu u pacientů s diabetem mellitus. Bylo však zjištěno, že nízké hodnoty pankreatické elastázy nejsou hodnověrné pro diagnostiku insuficience pankreatu u pacientů s diabetem mellitus. Neměly by tedy sloužit pro indikaci k drahé léčbě substitučními preparáty pankreatických enzymů. [4][23]



Obr. 2.1 Pankreatická elastáza 1 [[http://www1.lfl.cuni.cz/~kocna/glab\\_01.htm](http://www1.lfl.cuni.cz/~kocna/glab_01.htm)]

### 2.1.3. Imunochemické metody se značenými protilátkami

Ke stanovení hormonů, nádorových i kardiálních markerů a látek s podobným složením a koncentrací se pro stanovení v biologickém materiálu používají v posledních letech převážně imunochemické metody. Jsou to metody založené na specifické reakci antigen-protilátka, které ke konečné detekci používají rozdílné technologie. Metodiky můžeme dělit podle systému uspořádání reakce nebo podle používaného značení a způsobu měření odpovídajícího signálu. [3]

Podle stanovení

- a) Kompetitivní stanovení, při kterém antigen ze vzorku soutěží se stejným, ale značeným antigenem ze soupravy o omezené množství protilátky. Původní koncentrace stanovovaného analytu je nepřímo závislá na výšce signálu, pro tyto metody je typická kalibrační křivka podobná hyperbole. [3]
- b) Nekompetitivní stanovení (nejčastěji sendvičové(sandwich)), při kterém je antigen ze vzorku obvykle vychytáván mezi dvě protilátky, které se vyskytují v reakční směsi v přebytku. Původní koncentrace stanovovaného antigenu je přímo úměrná velikosti měřeného signálu. Kalibrační křivka má pak typický průběh, který se podobá parabole. [3]

Podle značky a signálu

Další dělení se obvykle provádí hlavně podle používané značky a měřeného signálu. Nejběžnější jsou radioimunoanalýza(RIA a IRMA), enzymoimunoanalýza(EIA, MEIA, EMIT a ELISA), fluoroimunoanalýza(DELFIA, FPIA a TRACE) a luminiscenční imunoanalýza(LIA). Dále existuje řada dalších metodik, které jsou vázány většinou na výrobce a celý systém analyzátorů i reagensů a jež se stále vyvíjí. [3]

Specifita a senzitivita imunochemických vyšetření záleží hlavně na používané protilátce, jejím typu a čistotě. Protilátky mohou být monoklonální nebo polyklonální. [3]

- a) Monoklonální protilátka je produkována hybridomy, které se připravují fúzí imunizovaných slezinných buněk s nádorovými. Ty po čištění a selekci produkují jen jediný typ protilátky. Jejich příprava je drahá, ale s monoklonální protilátkou se dosahuje vyšší specifity a lze ji produkovat kontinuálně. [3]
- b) Polyklonální protilátky se připravují imunizací zvířete, jsou vždy směsí protilátek, jsou schopné rozeznat i isoformy antigenu a mají proto vyšší citlivost. Nevýhodou je závislost na imunizovaném zvířeti, někdy je získání protilátky neopakovatelné. [3]

Podle místa stanovení a detekce

- a) Homogenní metody – u nich lze provádět stanovení přímo v reakční směsi a nevyžadují separaci volné a vázané frakce analytu. Homogenní imunoanalýzu lze použít u metod, kdy navázání protilátky ovlivní značku, např. u fluoroimunoanalýzy. [3] [6]
- b) Heterogenní metody, které potřebují separaci volné a vázané frakce analytu. Tyto metody se dále dělí na kompetitivní, která mají značenou protilátku či antigen anebo nekompetitivní, které mají značenou protilátku. [3] [6]

### 2.1.3.1 RIA(radio immunoassay)

Historicky nejstarší(1959) imunochemickou metodou se značenými protilátkami jsou radioizotopové metody. Radioaktivním prvkem je označena protilátka a její pomocí je stanoven antigen. Poté, co vzniknou precipiáty, se vyšetřovaný vzorek promyje a tím se odstraní nadbytečné volné protilátky. Po promytí zůstane sediment a v něm navázaný izotop(značka) na antigen-protilátku. Jako značka je používán téměř výhradně  $^{125}\text{I}$ . Je to  $\gamma$ -zářič, poločas rozpadu je 60 dní. Vzácně se používá  $^3\text{H}$  -  $\beta$ -zářič (jeho detekce je obtížnější), který má poločas rozpadu přes 12 let. Antigen-protilátku-izotop je pak možné detekovat měřiči dle typu záření izotopu, tedy gama nebo beta. [3] [6]

Radioizotopové metody jsou dostupné jak v kompetitivním uspořádání RIA, tak v sendvičovém IRMA. I dnes jsou považovány za standart v imunochemii, pro jejich velkou citlivost a reprodukovatelnost. Metoda je využívána při stanovování hormonů, proteinů výjimečně dnes i protilátek. Jejich nevýhodou je, že vyžadují protilátku značenou radioizotopem. K provedení testu je tak zapotřebí izotopového pracoviště a s ním i speciální měřicí techniku. Na tomto pracovišti může pracovat pouze proškolený personál. Toto pracoviště kromě zvýšených bezpečnostních opatření, produkuje také izotopový odpad. Proto jsou tyto metody postupně nahrazovány moderními metodami, které nevyužívají ke značení radioaktivního materiálu a dosahují srovnatelné citlivosti. [6]

### 2.1.3.2. EIA(enzyme immunoassay)

Jsou to analytické metody, které využívají imunochemické reakce s enzymatickou detekcí. Díky tomu je možné stanovit koncentraci antigenu či protilátky v měřeném vzorku. Jejím indikátorem je enzymový konjugát podle druhu substrátu. Reakci je možné detekovat spektrofotometricky, nefelometricky, fluoremetricky a luminometricky. [6]

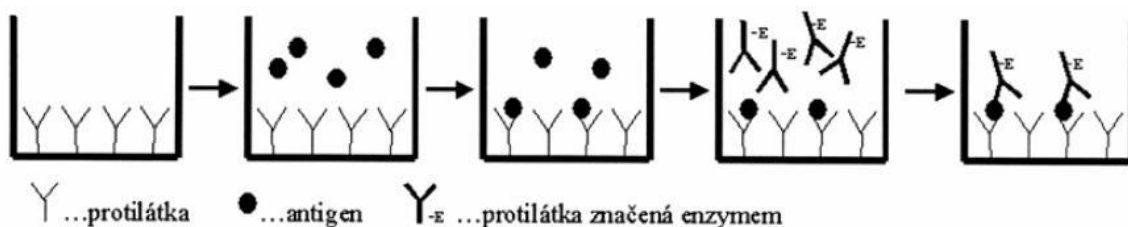
S příchodem tzv. EIA testů nastalo období velkého rozvoje imunochemických metod. Protilátka a antigeny byly navazovány na různé nosiče, řada metod probíhala i v tekutém prostředí. Byly použity různé systémy enzymů a substrátů(křenová peroxidáza, ortofenyldiamin), TMB(tetrametylbenzidín) či systém biotin-avidin apod. [6]

V roce 1971 byla objevena možnost navázat k molekule protilátky specifický enzym. Experimentovalo se s křenovou peroxidázou a následně s alkalickou fosfatázou. Enzym křenové peroxidázy byl velmi snadno dostupný enzym, ale měl velkou molekulu ve srovnání s protilátkou IgG. Právě velikost molekuly a možnosti vytvořit pevnou vazbu se specifickým místem na protilátce je důležitým faktorem. Proto se začala používat menší molekula alkalické fosfatázy. V dnešní době je však křenová peroxidáza téměř ve všech běžných soupravách, protože se podařilo technologickými postupy vytvořit dostatečně pevné vazby mezi specifickou protilátkou a enzymem. [6]

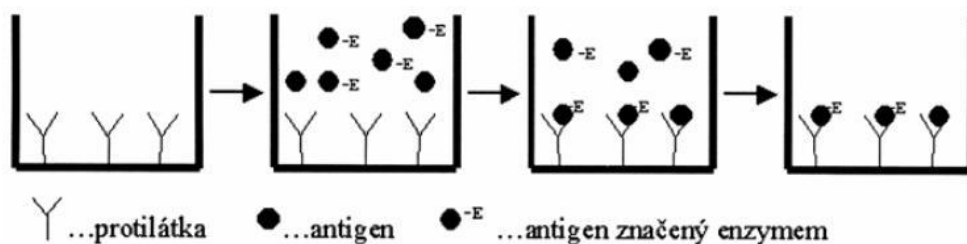
### 2.1.3.3 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)

Metoda ELISA se využívá v celé řadě odvětví. Vedle medicíny také v biologických odvětvích, ve veterinární léčbě atd. Metoda je buď heterogenní nekompetitivní EIA(tzv. sandwich), nebo kompetitivní heterogenní EIA(obr. 2.2). Používá se při ní protilátka, která se naváže na pevnou fázi. Po kompetitivní reakci s antigenem se ve vyšetřovaném vzorku ustanoví rovnováha. Promytím se odstraní nenavázaný konjugát z reakční směsi. Konjugát vázaný na pevné fázi je inkubován s enzymovým substrátem a následně změřen. [6]

#### Nekompetitivní (sendvičová) enzymová imunoanalýza



#### Kompetitivní enzymová imunoanalýza



Obr. 2.2 (3tern P., Obecná a klinická biochemie, Karolinu 2007)



## Princip metody

Využívají se buď jednotlivé polystyrenové stripy o 8 jamkách, jež jsou umístěny na destičku, která jich pojme dvanáct nebo celá polystyrenová destička o 96 jamkách. Na polystyrenovou stěnu jamky je navázána protilátka proti vyšetřovanému antigenu. Protilátky mohou být navázány pouhou absorpcí, ale většina je navázána chemicky využitím různých vazeb (například kovalentní). Neobsazená místa na polystyrenu jsou blokována inertní bílkovinou (třeba albuminem). [6]

Do jamky se přidá naředěný vzorek obsahující antigen a inkubuje se určitou dobu. Následně se nenavázané složky odmyjí a přidá se druhá protilátka s navázaným enzymem (konjugát). Vzorek se znovu inkubuje a po dalším promytí se výsledná reakce vizualizuje přidáním substrátu. Ten je štěpen enzymem navázaným na druhou protilátku. Vzniklá barevná reakce se měří fotometricky. [6]

Výhodou metod ELISA je dostatečná citlivost, specifičnost a reprodukovatelnost. Současné systémy umožňují automatizaci celého procesu. Příznivá je i dlouhá expirační doba souprav a také cena. Protože nevyužívá látky značené radioizotopem, není nutné mít izotopové pracoviště a náročnou techniku. [6]

## Uplatnění metod ELISA

V imunologické laboratoři se tyto metody využívají hlavně ke stanovování proteinů protilátek (imunoglobulinů). Zejména u těch imunoglobulinů, které se v séru vyskytují v nízkých koncentracích. Nefelometrické metody je tedy nemohou zachytit ve svých detekčních mezích. ELISA metodami lze stanovovat i autoprotilátky, které mají známou specifitu, cytokiny, specifické protilátky proti očkovacím antigenům a proti infekčním činitelům mikrobiálním, parazitárním i virovým a řadě dalších látek. [6]

## Přístroje pro metodu ELISA

Základním přístrojem pro vyhodnocení ELISA metody je ELISA – reader. Jde o upravený spektrofotometr, který umožňuje měření barevné reakce při různých vlnových délkách a dokáže odečítat z mikrotitračních destiček. Laboratoře v dnešní době pracují také s ELISA procesory. Ty obsahují pipetovací blok na ředění vzorků a jejich aplikaci do mikrotitračních destiček spolu s přidáváním vlastních reagensů. Pak mají blok pro promývání vzorků, inkubaci a odečítání včetně vyhodnocení. [6]

Tyto systémy jsou buď:

- a) reagenčně otevřené a je možné v nich zpracovávat soupravy od různých výrobců
- b) reagenčně uzavřené a ty umožňují zpracovávání souprav pouze od jednoho výrobce.

Uzavřené systémy nejsou příliš časté, protože se používají zvláště u speciálních reagensů. Příkladem takového systému je Uni-CAP, který se používá pro stanovení specifického IgE a IgG4 proti různým alergenům. Dále také imunochemické analyzátoři používané většinou biochemických laboratoří. [6]

Reagenčně otevřené systémy jsou častější právě pro jejich schopnost zpracovávat sety od různých výrobců. Dovolují tak imunochemické laboratoři zvolit si například ekonomicky výhodnější set. Mezi výrobce souprav pro metodu ELISA patří například firmy ScheBo<sup>®</sup> a mnoho dalších. [6]

## 2.1.4. Metody stanovení pankreatické elastázy

### 2.1.4.1 Stanovení elastázy 1 v séru

Při zánětlivých procesech v pankreatu, tedy při akutní a chronické pankreatitidě nebo při karcinomu pankreatu dochází k retrográdnímu uvolnění pankreatické elastázy do krevního oběhu. Hladina pankreatické elastázy 1 v séru je vhodným markerem těchto procesů. Při akutní i chronické pankreatitidě je její hladina zvýšená a je pro stanovení vhodnější než stanovení  $\alpha$ -amylázy (lépe koreluje s klinickým stavem pacienta). U karcinomu pankreatu má, při stanovení ELISA technikou, nejvyšší specifitu i senzitivitu ze všech pankreatických enzymů. [4] [10]

K určení pankreatické elastázy 1 v séru se může využít metody RIA se <sup>125</sup>I-značenou elastázou. Druhou metodou je využití novějších metod ELISA s monoklonální protilátkou k elastáze 1. Referenční rozmezí pro analýzu metodou RIA je 1.3-4.3  $\mu\text{g/l}$ . Nejnovější studie stanovení sérové elastázy 1 je založena na latexové immunoassay. [10]

### 2.1.4.2. Stanovení pankreatické elastázy 1 ve stolici

Stanovení látek ve stolici je běžnou praxí. Mezi nejběžnější metody vyšetření stolice je Haemocult, který je screeningovým testem na přítomnost okultního krvácení. Stanovení pankreatických enzymů ve stolici je nejjednodušší testem jak pro nemocného, tak pro laboratorní stanovení. Tyto testy patří proto k nejlevnějším, základním screeningovým testům. Nejedná se o funkční diagnostiku, test nezahrnuje žádnou stimulaci pankreatu, není porovnávána bazální hodnota na lačno, testy nelze použít pro monitorování substituční léčby. [5]

Stanovení pankreatické elastázy 1 ve stolici využívá faktu, že během průchodu střevní pasáží není degradována proteinová sekvence zvolená pro immunochemickou detekci. Hodnoty pankreatické elastázy 1 ukazují míru funkce exokrinního pankreatu. Stanovení pankreatické elastázy 1 má vysokou specifitu i senzitivitu a je využíváno na dlouhodobé sledování pacientů s chronickou insuficiencí pankreatu, dále jako screeningový test onemocnění pankreatu a u diferenciální diagnostiky malabsorbčního syndromu. [10]

Metody zjištění pankreatické elastázy 1 ve stolici mohou využívat polyklonální i monoklonální protilátky. Bylo zjištěno, že metody polyklonální vykazují stejnou míru detekce hodnot jako metody monoklonální. [22]

Referenční interval(95 % výsledků – Stein, 1996) ELISA testu pankreatické elastázy 1 je 175 - 2500  $\mu\text{g}$  na gram stolice(průměr 1083) a u dětí 963 +/- 143  $\mu\text{g}/\text{g}$ . Klinicky je významné pásmo 100 - 200  $\mu\text{g}/\text{g}$ , což značí sníženou funkci exokrinního pankreatu. Velmi závažné jsou hodnoty pod 100  $\mu\text{g}/\text{g}$  stolice, které jasně indikují těžkou insuficienci pankreatu. U mukoviscidózy jsou hodnoty pod 15  $\mu\text{g}/\text{g}$ . Podle stupně závažnosti se liší senzitivita stanovení. Specifická se pohybuje mezi 93% až 99%. [4] [10]

Při mírně snížené funkci pankreatu, kdy jsou hydrogenuhličitan a enzymy v pankreatické šťávě abnormální, ale fekální tuk normální je senzitivita 87 - 88%. Při středně snížené funkci pankreatu, kdy je hydrogenuhličitan, enzymy v pankreatické šťávě i fekální tuk abnormální činí senzitivita 96%. U těžké insuficience je senzitivita 100%. U mukoviscidózy je specifická i senzitivita téměř 100%. [4] [5] [10]

Před využíváním testu pankreatické elastázy 1 byl využíván test stanovení chymotrypsinu ve stolici, který má specifickou 85%. Ten ovšem mohl být falešně pozitivní vlivem mikrobiální flóry tlustého střeva. Falešná negativita může být způsobena intraluminární degradací molekuly chymotrypsinu. Proto má stanovení pankreatické elastázy větší diagnostický význam. Nejnovější aplikace doporučují stanovení pankreatické elastázy-1 v duodenální šťávě při stimulovaném funkčním testu. [5] [10]

## 2.2. Preanalytika

Cílem každého laboratorní vyšetření je získání spolehlivého výsledku. Aby vyšel takový výsledek, je nutno dodržet všechny podmínky před stanovením výsledku, což je fáze preanalytická, v průběhu stanovení(analytická fáze) a také po stanovení. [20]

Řada faktorů preanalytické fáze se může významně podílet na ovlivnění výsledku vyšetření a zahrnuje všechny procesy, které předcházejí stanovení. Tyto faktory jsou zdrojem preanalytické variability a snažíme se je eliminovat, pokud je to možné. [5] [20]

Preanalytická fáze zahrnuje biologické vlivy, které jsou děleny na ovlivnitelné a neovlivnitelné, odběr materiálu, transport materiálu a skladování materiálu. [5]

## 2.2.1. Neovlivnitelné podmínky

### Cyklické variace(biologické rytmy)

Jsou to periodické jevy, kterým podléhají analyty v lidském organismu. Tyto chronobiologické jevy lze s určitou nejistotou předpovědět. Mezi nejvíce prostudované a mající značný dopad na laboratorní vyšetření, jsou rytmy cirkadiánní(denní) a biologické. Denní změny ovlivňují celou řadu analytů, například koncentrace kalia, železa nebo ALT je vyšší ráno než odpoledne. Mezi biologické jevy lze zařadit například menstruační cyklus, který výrazně ovlivňuje hladinu hormonů, ale také železa a cholesterolu. [5] [20]

Sezónní jevy jsou v současné době málo prozkoumané, ale některé údaje o změnách jsou známy. Například u trijodthyroninu je jeho hladina v létě nižší než v zimě, zatímco koncentrace 25-OH-cholecalciferolu se v létě zvyšuje. [5] [20]

### Interindividuální variabilita

Patří mezi nepredikovatelné variace, ale lze minimalizovat jejich dopad na vyšetření pomocí opakovaných odběrů. [20]

### Pohlaví

Před dosažením puberty jsou rozdíly mezi chlapci a dívkami minimální. Poté však rozdíly nejsou jen v aktivitě pohlavních hormonů, ale liší se i jejich koncentrace(aktivita) ALT, AST, ALP, hemoglobinu, ferritinu, CK, kyseliny močové. Všeobecně mají mnohé analyty o něco vyšší normální hodnoty u mužů. Pohlaví i věk jsou zohledněny v referenčních mezích a jsou důležitou součástí správné interpretace nálezu. [5] [20]

### Věk

Hraje významnou roli ve správné interpretaci nálezu. Řada biochemických dějů i systému je spojena s lidským vývojem a jeho konkrétními fázemi. Například aktivita ALP je vysoká v dětském věku, kdy dosahuje maxima v desátém až šestnáctém roce. To je dáno vývojem skeletu a hodnoty naměřené v tomto věku by byly u ženy v kolem 40 až 50 let patologické. [5]

Věk má vliv na funkci pankreatu. Ve skupině 159 vyšetřovaných ve věku od 60 do 92 let, kteří neměli onemocnění pankreatu, hodnota pankreatické elastázy 1 ve stolici korelovala negativně s věkem a její hodnota byla zřetelně nižší u osob, kterým bylo přes 70 let. [16]

## Rasa

Někdy je obtížné odlišit vliv rasy, socioekonomických a geografických odlišností na změny hladin analytů. Různé rasy mají odlišné některé enzymatické aktivity a množství svalové hmoty. Například běloši mají vyšší množství granulocytů než černoši. Ti mají až dvojnásobnou aktivitu kreatinkinázy a Asiaté vyšší aktivitu slinné amylázy. [5] [20]

## Gravidita

Těhotenství vede k výrazným změnám v koncentracích analytů, v enzymatické aktivitě nebo počtu komponent. Tyto změny mohou být na podkladě mnoha mechanismů. Například zvýšení proteinů akutní fáze nebo zvýšení plazmatických transportních proteinů vede ke změnám v koncentraci thyroxinu, mědi a ceruloplazminu. [5] [20]

## 2.2.2. Ovlivnitelné podmínky

### Stravovací návyky

Hormony a enzymy se vyplavují a přesouvají před příjmem potravy i během její konzumace. Většina vyšetření tedy vyžaduje odběr krve nalačno a je nutné informovat pacienta o správné dietě před odběrem. Většinou se jedná o 10-12ti hodinové hladovění. Pro některé analýzy je vyžadovaná speciální dieta před odběrem vzorku. Pokud pacient požil nějakou stravu bezprostředně před odběrem a přesto lékař na odběru trvá, musí to být vyznačeno na žádance. Laboratoř tuto informaci sděluje na výsledkovém listu textem – „po jídle“, časem odběru a označuje stav séra. Čas odběru na některé analýzy je rovněž důležitý. Obvyklá doba odběru je mezi 7. a 10. hodinou ranní. [5] [20]

Vliv stravovací návyků na analyty:

- a) Požití potravy bohaté na cukry má vliv zejména na hladinu glukózy. Sekundárními důsledky vyplavení inzulínu způsobují pokles koncentrace draselného kationu a fosfátů. [5] [20]
- b) Při konzumaci stravy vysoce bohaté na proteiny dochází k tomu, že při analýze koncentrace urey čtvrtý den od přechodu na vysoceproteinovou stravu jsou její hodnoty až dvojnásobné. Zvyšuje se i cholesterol a fosfáty. Nízkoproteinové diety vedou k poklesu hladiny prealbuminu, transferinu, ceruloplazminu albuminu, prolaktinu, proteinu vázajícímu retinol, vedou také k odbourávání tuků a metabolické ketoacidóze. [5] [20]
- c) Strava bohatá na tuky způsobí snížení dusíkatých látek (například kyseliny močové), ale zvýší se obsah triacylglycerolů. To vede ke vzniku lipemického séra. To může mít

za následek interference u spektrofotometrických měření a sníží se koncentrace analytu redukcí objemu vody. [5] [20]

- d) Prodloužené lačnění až hladovění zvyšuje koncentraci nebo aktivitu beta-hydroxybutyrátu, volných mastných kyselin, kyseliny močové, alkalické fosfatázy, snižuje koncentraci nebo aktivitu inzulinu, a apolipoproteinů, triacylglycerolů, cholesterolu, GGT, koagulačních faktorů atd. [20]
- e) Dehydratace ovlivňuje výsledky stanovení analytů a ztěžuje odběr krve. [20]
- f) Příjem kofeinu vyvolává zvýšení hladin glukózy a katecholaminů. Dva šálky kávy zvyšují volné(neesterifikované) mastné kyseliny. [5]

## Kouření

Následkem kouření je celá řada okamžitých i trvalých změn. Zvyšuje hladinu sérové mastné kyseliny, glukózy, cholesterolu, olova, kadmia, aldosteronu a kortizolu. Také některé hormony a tumorové markery, mezi nimiž je CEA(kracinoembryonální antigen) a fibrinogen. Kouření naopak snižuje koncentraci imunoglobulinů a vitamínu B12 a C. [5] [20]

## Vliv alkoholu a návykových látek

Konzumace alkoholu mění biochemické analyty podle toho, zda se jedná o akutní nebo chronický abúzus. Změny obsahu analytů tedy závisí na intenzitě a délce konzumace alkoholu. Jednorázové požití alkoholu v mírné a střední dávce ovlivňuje měření jen minimálně. [5] [20]

Akutní abúzus alkoholu vyvolává zvýšení aldosteronu, triglycerolů a snižuje se glukóza, kortizol a další látky. Vede také ke změnám acidobazické rovnováhy, kdy se zvyšuje laktát a nastává metabolická acidóza. [5] [20]

Chronická konzumace alkoholu vede ke zvýšení hormonů adrenalinu, kortizolu, AST, ALT, triacylglycerolů, cholesterolu a některých hormonů. Stejně jako akutní abúzus vede i chronický abúzus ke zvyšování laktátu a kyseliny močové a ke ketoacidóze. [5] [20]

## Vliv léků a drog

Nelze zobecnit vliv léků na laboratorní testy. Podávané léky mohou mít vliv na procesy in vivo, kde mohou způsobovat indukci nebo inhibici enzymů, zvýšení transportních proteinů či mohou být cytotoxické. Léky mohou vyvolávat také fyzikálně chemické interference, což může být například zkřížená reaktivita při imunochemických reakcích. Interference mohou vyvolávat i biologickou cestou, kdy například působení morfinu se vyvolá spasmus Oddiho svěrače a to vede k nárůstu amylázy a lipázy. [5]

Pokud pacient musí užívat léky, je třeba upozornit laboratoř jejich uvedením na žádanku. Vliv léků na konkrétní stanovení je uveden v databázi biochemických a hematologických

vyšetření. [5] [20] Není však známa žádná substituční léčba, která by interferovala s vyšetřením pankreatické elastázy 1 ve stolici.

Konzumace návykových látek může vést ke zvýšení hladin určitých enzymů, jako je například amyláza, lipáza, AST, ALT, ALP, hladiny některých hormonů (TSH, prolaktin). Klesají hladiny inzulínu, norepinefrinu, kreatininu, glukózy a kyseliny močové. [20]

#### Mechanické vlivy(vliv diagnostických a terapeutických zásahů)

Takřka každý diagnostický nebo terapeutický zásah má vliv na výsledné hodnoty měření. Proto se u pacientů provádí odběr obvykle před procedurou. Mezi tyto zásahy patří například: operace(mechanické trauma), infuze, transfuze, punkce, injekce, biopsie, endoskopie, dialýza, ergometrie, funkční testy, podání kontrastní látky, ozařování, trombolýza. [20]

Svalové trauma nebo intramuskulární injekce mohou zvýšit hladiny ALT, AST, CK a koncentraci myoglobinu. Falešně negativní hodnoty u pankreatické elastázy 1 vycházejí u pacientů, kterým byla provedena operace Billroth 2. Při ní je velké zakřivení(curvatura major) žaludku propojeno přímo k lačnicku a obvykle následuje resekce dolní části žaludku. Pankreatické šťávy tak nemohou být uvolněny do dvanáctníku. [4] [5] [21]

#### Mentální stres

Může se projevit před invazivním výkonem a má značný význam na výsledky laboratorních vyšetření. Mohou jej vyvolat nejen velké invazivní výkony jako je operační zásah, ale i prostý odběr krve. Zvyšuje sekreci hormonů aldosteronu, angiotenzinu, katecholaminů, kortizolu, prolaktinu, reninu a dalších a také se zvyšuje hladina albuminu, fibrinogenu, glukózy, inzulínu, laktátu a cholesterolu, erytrocytů. [20]

#### Zevní prostředí

Laboratorní výsledky měření vyšetřovaného může do značné míry ovlivňovat, v jakém prostředí žije. Tedy nadmořská výška, teplota prostředí a také geografická lokace. Některé analyty jsou významně měněny u osob, které žijí ve vysoké nadmořské výšce. Vlivem adaptace lidského organismu na vysokou nadmořskou výšku se zvyšuje počet erytrocytů, koncentrace hemoglobinu a CRP. Naopak se snižuje koncentrace močového kreatininu, estriolu, sérové osmolality a dalších analytů. [20]

#### Fyzická zátěž a tělesná aktivita

Složení tělních tekutin je závislé na délce a intenzitě fyzické zátěže. [5]

Fyzickou zátěž rozlišujeme[5] [20]:

- a) Akutní silová a vyčerpávající zátěž. Při ní je vysoký podíl anaerobního metabolismu a v těle nastává stresová poplachová reakce.
- b) Střední zátěž. Zvyšuje stresovou reakci a následně se zvyšuje koncentrace glukózy a je stimulována sekrece inzulínu.
- c) Vytrvalá zátěž. Při ní je vysoký podíl převážně aerobního metabolismu.

Zvýšená tělesná námaha způsobuje změny hladin některých analytů. Např. při krátkodobém a intenzivním cvičení se snižuje hladina inzulínu, zvyšuje se hladina glukózy a laktátu. Po dlouhodobé námaze, srovnatelné s maratónským během, se zvyšují koncentrace nebo aktivity některých analytů např. sodíku, draslíku, vápníku, ALP, AST, albuminu, anorganických fosfátů, močoviny a kreatin kinázy. [20]

### 2.2.3. Odběr a skladování materiálu

Nejčastější chybou v preanalytice při odběru vzorků je, při jeho odebrání od vyšetřovaného a jeho následné označení. Vzorek je nutné ihned po odběru označit, nejlépe identifikačním štítkem či čárovým kódem. Během transportu k vyšetření tak nemůže dojít záměně za jiný. [5]

Hnědé zbarvení stolice je dáno produkty odbourávání bilirubinu. Zápach pochází z organických sírných sloučenin, které vytvářejí anaerobní bakterie. Stolice se v současné době nejčastěji vyšetřuje na okultní krvácení a odběr je prováděn do předem připravených detekčních políček. Velmi zřídka se kvůli zjištění odpadu dusíku nebo obsahu lipidů vyšetřuje sběr stolice za 24 hodin. [3] [5]

Pro vyhodnocení pankreatické elastázy 1 ve stolici metodou ELISA jsou připravené neprodyšné odběrové nádoby(Příloha 1). Vzorky v nich uložené jsou následně uchovávány při teplotě -25 °C v mrazáku. Vzorky lze takto uchovat až jeden rok.

Při zjišťování vlivu různých teplot na vzorky s HIV byla zkoumána senzitivita ELISA testu a dalších metod. Bylo zjištěno, že ani teplotou 56 °C po dobu 30 minut nezmění stabilitu Anti-HIV protilátky v séru a ani opakované zmrazení a rozmrazení nemělo vliv. [24]

Odběr vzorku by měl proběhnout ideálně ráno v den odevzdání. Pro vyšetření je nutné, aby pacient odebral ze své stolice alespoň vzorek o velikosti lískového oříšku.

Pokud pacient trpí akutním průjmem, mohou být výsledky pankreatické elastázy 1 falešně negativní. Průjem je porucha v normálním vyměšování nevstřebaných nebo odpadových látek střevem a je velmi úzce spjat s pohybem vody a elektrolytů v trávicím ústrojí. Základní příčinou průjmu či případně zácpy je proto porucha vyváženosti příjmu, vylučování a zpětného vstřebávání vody a elektrolytů. [4]



## 3. Praktická část

### 3.1. Přístrojové vybavení a materiál

#### 3.1.1 Přístroje

K měření byly použity tyto přístroje, které jsou v seznamu seřazené dle postupu využití:

1. Analytické váhy od firmy Mettler, které mají označení H10T(obr. 3.1)



Obr. 3.1 Analytické váhy(Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN)

2. Třepačka MS2 minishaker od firmy IKA s frekvenci třepání 0–2500/min(obr. 3.2)



Obr. 3.2 Třepačka(Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN)

3. Multikanálová pipeta Pipetman Neo 8 x 200 od firmy Pipetman Neo s nastavitelným objemem 20 – 200  $\mu\text{l}$ (obr. 3.4)



Obr. 3.4 Multikanálová pipeta( <http://www.labmark.cz/image.php?file=pipetman-neo-multichannel.jpg&size=1>)

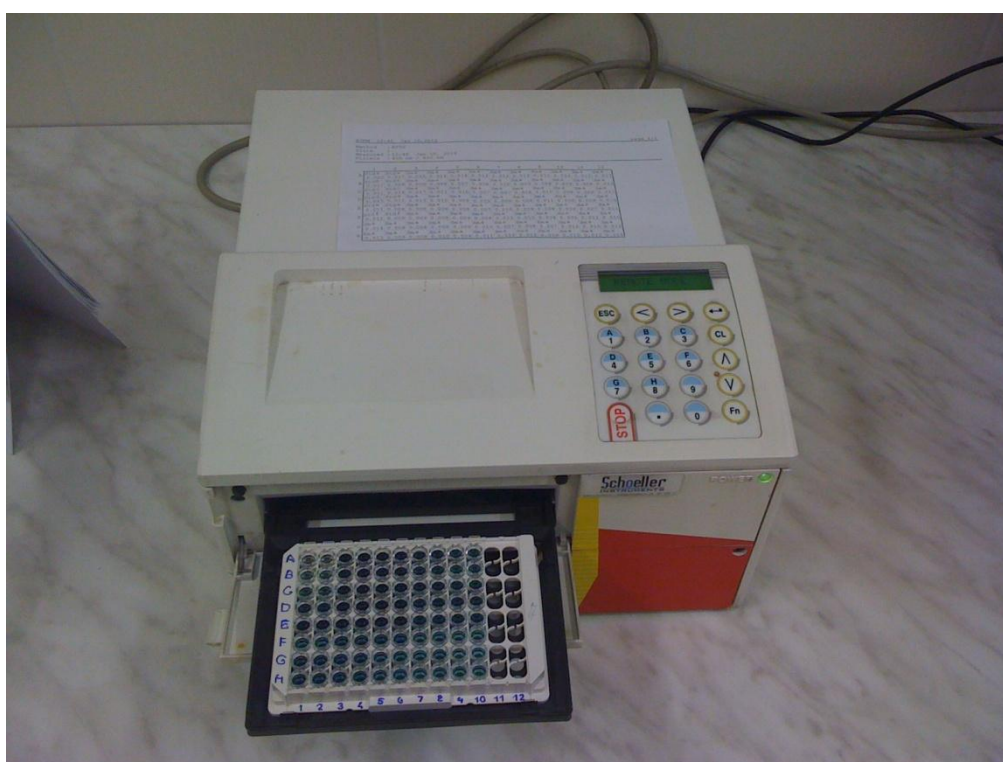
4. Automatická promývačka na mikrotitrační destičky ELx50 Microplate Strip Washer od firmy BioTek, který zvládne formát destičky 96/384/stripy. Jeho rychlost promývání je 105 s (3 cykly), má objem 25 – 3 000  $\mu\text{l}$  na jamku a přesnost dávkování do 3 %. Promývačka potřebuje ke své funkci přístup k destilované vodě. (obr 3.5) [17]



Obr. 3.5 Automatická promývačka(Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN)

5. Fotometr pro měření absorbance Tecan Spektra II Microplate Reader je luminometr od firma: SLT Labinstruments(dnes Tecan). Způsob detekce hodnot vzorků je absorbance, která je detekována pomocí 12 diod. Zdroj světla je halogenová lampa. Dokáže zpracovat formát destičky obsahující 96 jamek. Rychlost jeho čtení je 8s při dvou vlnových délkách a 6s při jedné.

Nastavení jeho vlnových délek se mění filtry a jejich kapacita je 6. Rozsah vlnových délek je 380 – 900 nm s pásmem propustnosti: 10 nm. Má dynamický rozsah: 0 – 4,0 OD(optical density) s rozlišením 0,001 OD.



Obr. 3.6 Fotometr (Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN) na fotografii s připravenými vzorky pro týdenní měření

6. PC s uživatelským softwarem KIMW(plně lokalizován do českého jazyka) pro vyhodnocení výsledků na mikrotitračních destičkách. Dokáže definovat destičku, měřit kvalitu a kvantitu, provádět výpočty a měření v režimu end – point, ale nemá již softwarovou podporu.

### 3.1.2 Materiál

1. Odběrové nádobky pro odběr a uchování vzorku(příloha 1.)
2. Laboratorní zkumavky nebo Eppendorfovy zkumavky pro uchování již naváženého vzorku
3. Materiál použitý setem firmy ScheBo® je uveden v tabulce 3.1[8]

Český název	Anglický název	Množství	Popis
ELISA destička se stripy	Microwell plate with strips	12x8 jamek	Potažené monoklonální protilátkou k pankreatické elastáze 1 (E1)
Ředící/promývací roztok	Sample/Washing Buffer Concentrate	100 ml	5 x koncentrovaný pH 7,2 PBS s detergentem
Extrakční pufr	Extraction Buffer	100 ml	Pro vzorky stolice pH 7,2 5 x koncentrovaný PBS s detergentem a azidem sodným
Elastáza 1 kalibrátory 1-4	E1 Standards	700 µl	Lidská pankreatická elastáza 1 ve vodném roztoku azidu sodného.
Kontroly 1-2	Control	700 µl	Lidská pankreatická elastáza 1 ve vodném roztoku azidu sodného.
Komplex anti-E1-bio-POD-Streptavidin	Anti-E1-bio-POD-Streptavidin complex	8 ml	Sekundární monoklonální protilátka proti E1 konjugovaná na biotin
ABTS Substrát	Substrate Solution	12 ml	ABTS ve vodném roztoku. K přímému použití. Chránit před světlem
Stopovací roztok	Stop Solution	12 ml	K přímému použití. Vodný roztok zásady.
Sáček se sušidlem	1 + 1		Pro nepoužité stripy

Tabulka 3.1 Materiál v setu firmy ScheBo®. Koncentrace kalibrátorů jsou: kalibrátor-1 15 µg/g, kalibrátor-2 50 µg/g, kalibrátor-3 150 µg/g, kalibrátor-4 500 µg/g a Kontroly jsou: pozitivní kontrola-1 140 µg/g +/- 20 %, pozitivní kontrola-2 200 µg/g +/- 15 %, P – vzorky vyšetřovaných.

4. Deionizovaná nebo destilovaná voda
5. Odměrný válec
6. Makropipety a mikropipety

## 3.2 ELISA souprava a způsob provedení testu

### Metody detekce a princip stanovení

ELISA je metoda sandwichového typu se dvěma monoklonárními protilátkami vysoce specifickými proti lidské pankreatické elastáze 1.

ELISA destičky jsou potaženy monoklonální protilátkou, která je specifická k lidské pankreatické elastáze 1. Pankreatická elastáza 1 ze vzorků a standardů se váže na protilátku, která je biotinylovaná a zůstává zachycena na destičce. Komplex monoklonální anti-elastázy, biotinu a peroxidázy(POD)-streptavidinu se na pankreatickou elastázu 1 váže během následující inkubace. Peroxidáza oxiduje ABTS, která se barví na tmavě zeleno. Koncentrace zoxidované ABTS se stanoví fotometricky. [8]

### Uchovávání a stabilita soupravy

Všechny součásti soupravy jsou stabilní po dobu použitelnosti uvedenou na obale, pokud jsou uchovávány při teplotě 4 až 8 °C. Před použitím je nutné vytemperovat všechny reagenty, včetně destičky se stripy na laboratorní teplotu. Po použití musí být uloženy ihned do lednice s teplotou 4 až 8 °C. [8]

Nepoužité stripy musí být uchovávány v uzavřeném plastickém sáčku se sušidlem, který je součástí soupravy. [8]

### Příprava reagentů

#### Příprava ředícího/promývacího roztoku

Do 100 ml koncentrovaného ředícího roztoku přidáme 400 ml redestilované vody. Takto rozpuštěný pufr je stabilní 6 měsíců, pokud je uchován při teplotě 4 až 8 °C. [8]

#### Příprava extrakčního roztoku

Do 100 ml koncentrovaného extrakčního pufru přidáme 400 ml redestilované vody. Takto rozpuštěný pufr je stabilní 6 měsíců, pokud je uchován při teplotě 4 až 8 °C. [8]

### Příprava ELISA platíčka

Před otevřením obalu je nutné vytemperovat stripy na laboratorní teplotu. Vyjme se počet stripů podle množství vzorků. Nepoužité stripy je možno uchovat v dobře uzavřeném

plastovém sáčku se sušidlem. Není možné dotýkat se spodní části stripů, tam je navázána monoklonární protilátka k pankreatické elastáze 1 a mohlo by dojít k znehodnocení. [8]

#### Příprava vzorků stolice

Po převzetí vzorku od pacienta je nutné vzorek označit, aby nedošlo k záměně. Pokud byly vzorky před použitím uchovávány zmrazené, je nutné je rozmrazit na laboratorní teplotu. [8]

#### Vážení vzorku stolice

Při půlročním měření a v normální klinické praxi se váží 20 mg stolice a přidává se 2 ml extrakčního pufru do laboratorních zkumavek. Ty se překryjí parafilmem a uchovají 24 hodin v lednici před vlastním měřením. Pro týdenní měření musely být vzorky uzavřeny v Eppendorfových zkumavkách, které mají neprodyšný uzávěr, ale objem pouhých 1,5 ml. Proto se vážilo 10 mg stolice a přidal se 1 ml extrakčního pufru. Po přidání extrakčního pufru do vzorku stolice vzniká extrakt. [8]

Vážení probíhá takto:

- 1) Zkumavka, do které bude umístěn patientský vzorek, musí být jasně označena.
- 2) Analytické váhy se vynulují na hodnotu prázdné zkumavky, zaaretují se a zkumavka se vyndá
- 3) Dřevěnou špejlí se patientský vzorek nanese do zkumavky
- 4) Měří se hmotnost vzorku ve zkumavce

#### Homogenizace a extrakce vzorků stolice

Extrakt musí být dobře homogenizován ve třepačce, aby byla zajištěna úplná extrakce pankreatické elastázy 1. Po extrakci je nutné počkat alespoň 5 minut, poté opět zamíchat. Následně je nutno nechat vzorek několik minut odstát. Po usazení částic je možné provést diluci. [8]

Výrobce navrhuje, že vzhledem k velké stabilitě pankreatické elastázy je možné provést diluci do 24 hodin, pokud je vzorek extraktu uchován při 4 až 8 °C. V klinické praxi se ovšem čeká před vlastní analýzou 24 hodin od připravení extraktu. [8]

#### Diluce extraktu stolice

Do 10 µl extraktu stolice přidáme 12,5 ml ředícího/promývacího roztoku. Normálně se vzorky ředí 10 µl extraktu stolice a 2,5 ml ředícího roztoku. [8]

## Provedení testu [8]

1. Napipetovat pomocí osmikanálové pipety 50 µl ředícího/promývacího roztoku do obou jamek pro blank. Při každém pipetování pipetujeme do dolní třetiny jamky.
2. Napipetovat 50 µl kalibrátorů a kontrol do příslušných jamek.
3. Napipetovat 50 µl naředěných vzorků stolice do příslušných jamek.
4. Inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě.
5. Vyklepat obsah jamek a promýt třikrát 250 µl promývacího roztoku. Poklepem na savý materiál důkladně vysušit. Při každém promývání je nutno dbát na to, aby nedošlo k přelití obsahu ze sousedních jamek a mezi jednotlivými promytími 1 až 2 minut počkat, než je promývací roztok odstraněn.
6. Do všech jamek přidat 50 µl připraveného komplexu anti-E1-bio-POD-Streptavidin a inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě ve tmě.
7. Vyklepat obsah jamek a promýt třikrát 250 µl promývacího roztoku. Poklepem na savý materiál důkladně vysušit.
8. Do všech jamek přidat 100 µl ABTS substrátu a inkubovat 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě.
9. Barevnou reakci ukončit přidáním 100 µl stopovacího roztoku do každé jamky. Případné bubliny v takto připravených vzorcích je zapotřebí odstranit čistou jehlou.
10. V intervalu 5 až 30 minut po ukončení reakce stopovacím roztokem odečíst absorbanci při 405 nm s použitím 492 nm jako referenční vlnové délky. Před měřením je nutno dobře promíchat obsah jamek, aby došlo k rovnoměrnému rozložení barviva.

## Tabulka příkladu provedení testu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	BL	BL	P5	P5								
<b>B</b>	STD1	STD1	P6	P6								
<b>C</b>	STD2	STD2	P6	P6								
<b>D</b>	STD3	STD3	P8	P8								
<b>E</b>	STD4	STD4	P9	P9							P40	P40
<b>F</b>	P1	P1									K1	K1
<b>G</b>	P2	P2									K2	K2
<b>H</b>	P3	P3									K2	K2

BL – blank, STD – kalibrátory, K - pozitivní kontroly, P – vzorky vyšetřovaných

## Bezpečnostní opatření

Souprava pro stanovení pankreatické elastázy 1 je určena pouze pro in-vitro diagnostiku. Extrakční pufr, standardy, kontroly a anti- E1-bio obsahují 0,05 - 0,1% azidu sodného jako

konzervační činidlo, proto není možno pipetovat ústy. Během práce je nutné používat jednorázové rukavice. [8]

### 3.3. Vlastní měření a statistika

Vlastní měření se skládalo ze dvou částí a u obou byl použit set firmy ScheBo<sup>®</sup>. První částí je vyhodnocení měření čtyř zdravých osob po dobu šesti měsíců, kde byla zjišťována míra variability výsledků u každé osoby.

V druhé části je vyhodnocení stability pankreatické elastázy 1 za různých teplotních podmínek u dvou osob. Byla skladována stolice a z ní připravené extrakty ve čtyřech různých prostředích: v mrazáku, lednici, termostatu a při laboratorní teplotě po dobu sedmi a tří dnů. K porovnání výsledků takto připravených vzorků byl použit extrakt připravený v den analýzy dle návodu výrobce. Stabilita, jen s malými výkyvy teplotních podmínek, byla kontrolována senzory připojenými na dané přístroje a v laboratoři. Mrazák, lednice i termostat jsou připojeny i na záložní elektrický okruh. Toho bylo zapotřebí v průběhu tohoto měření, kdy vlivem vytopení elektrické rozvodné skříně vypadl běžný okruh na několik hodin.

Skupina pro půlroční měření čítala čtyři osoby: tři muže a jednu ženu ve věku mezi 23 až 24 let bez onemocnění pankreatu. Týdenní měření bylo provedeno u dvou mužů ve věku 24 let bez onemocnění pankreatu.

Protože výsledky všech vzorků přesahovaly kalibrační mez, musely být 5krát zředěny. V klinické praxi jsou významné výsledky pod 200 µg/g a vzorky se proto dopočítávají vzorcem:  $\{(první\ hodnota\ absorbance\ vzorku + druhá\ hodnota\ absorbance\ vzorku) / [(první\ hodnota\ absorbance\ kontroly + druhá\ hodnota\ absorbance\ kontroly) / 2]\} * 500$ . Pro statistické účely této práce, však tuto metodu vyhodnocení výsledků, v případě naměřených vysokých hodnot, nelze použít.

V případě půlročního měření jsou všechny tabulky s daty uvedeny v příloze 2 a u týdenního měření jsou uvedeny v příloze 3.

#### Statistické metody

Výsledky měření byly zpracovány pomocí Microsoftu Excel 2010 a jeho doplňku analýzy dat a byly v něm také vytvořeny grafy.

#### Pojmy:

- 1) Průměr - používáme, když čísla můžeme opravdu sčítat, tj. znaky jsou kvantitativní, měřené na číselné stupnici. [25]



- 2) Medián - hodnota, která rozdělí pozorování na dvě stejně velké skupiny. [25]
- 3) Směrodatná odchylka - je druhá odmocnina z rozptylu (průměr čtverců odchylek od průměru). Je využívána častěji, než rozptyl. [25]
- 4) Variační koeficient - je užitečnou mírou relativního rozptýlení dat. Počítá se jako podíl směrodatné odchylky k průměru v procentech. Variační koeficient se často používá při statistické kontrole kvality laboratorních testů. [25]
- 5) Korelační koeficient (Pearsonův korelační koeficient) - vyjadřuje, jak těsný je (lineární) vztah mezi dvěma veličinami. Je bezrozměrný a nabývá hodnot od  $-1$  do  $+1$  (není definovaný, pokud některá ze směrodatných odchylek ve jmenovateli je nulová, tj. když jedna z veličin je v souboru konstantní). Hodnot  $-1$  nebo  $+1$  korelační koeficient nabývá pouze v případě, že všechna data (při zobrazení pomocí xy-bodového grafu) leží přesně na přímce (znaménko korelačního koeficientu pak závisí na tom, jestli přímka má kladný, nebo záporný sklon.) Korelační koeficient je mírou koncentrace dat kolem přímky (konkrétně kolem regresní přímky stanovené metodou nejmenších čtverců) nebo jinými slovy mírou (lineární) závislosti mezi veličinami. [26]

Pearsonův korelační koeficient někdy není ideálním nástrojem pro vyšetřování síly závislosti mezi veličinami. Důvody mohou být následující:

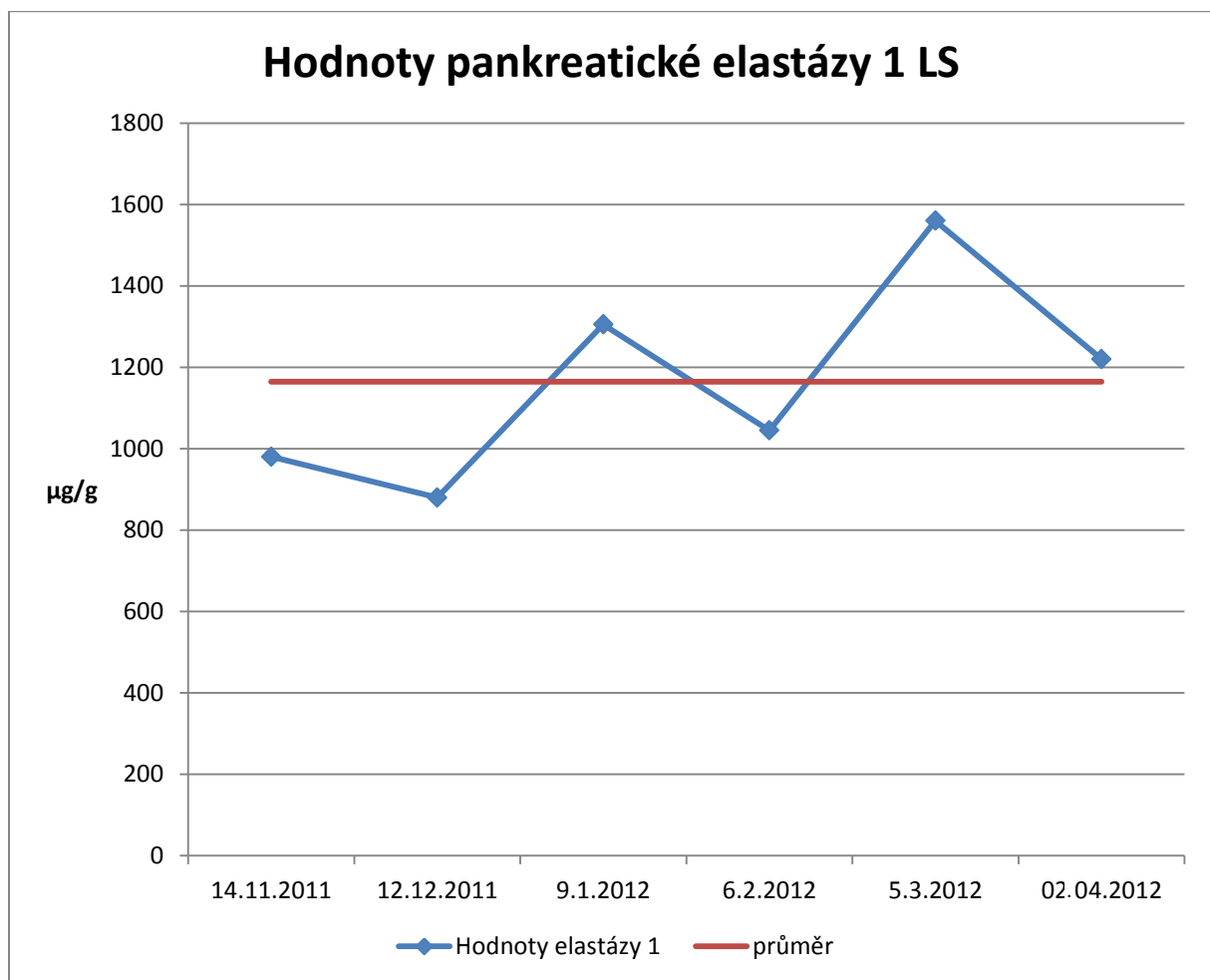
- Studované veličiny nemají normální rozdělení.
  - V datech jsou odlehlé hodnoty.
  - Mezi studovanými veličinami lze předpokládat vztah, který je sice monotónní, ale ne lineární.
  - Data jsou svou povahou ordinální. [26]
- 6) Dixonův Q-test - je vhodný pro soubor s malým počtem paralelních stanovení pro odhalení hrubé chyby. Používá rozpětí  $R = x(\max) - x(\min)$ , což je rozdíl mezi největším a nejmenším výsledkem v sérii stanovení a testují se dva sousední výsledky v posloupnosti hodnot. [27]

### 3.4. Vyhodnocení půlročního měření

V této části budou uvedeny popisy jednotlivých měření vyšetřovaných a jejich grafy (graf 3.2 až 3.4) a také graf celkového rozdílu jednotlivých měření od jejich průměrů v procentech (graf 3.5). Vzorčky jsou označeny iniciály každého vyšetřovaného.

LS

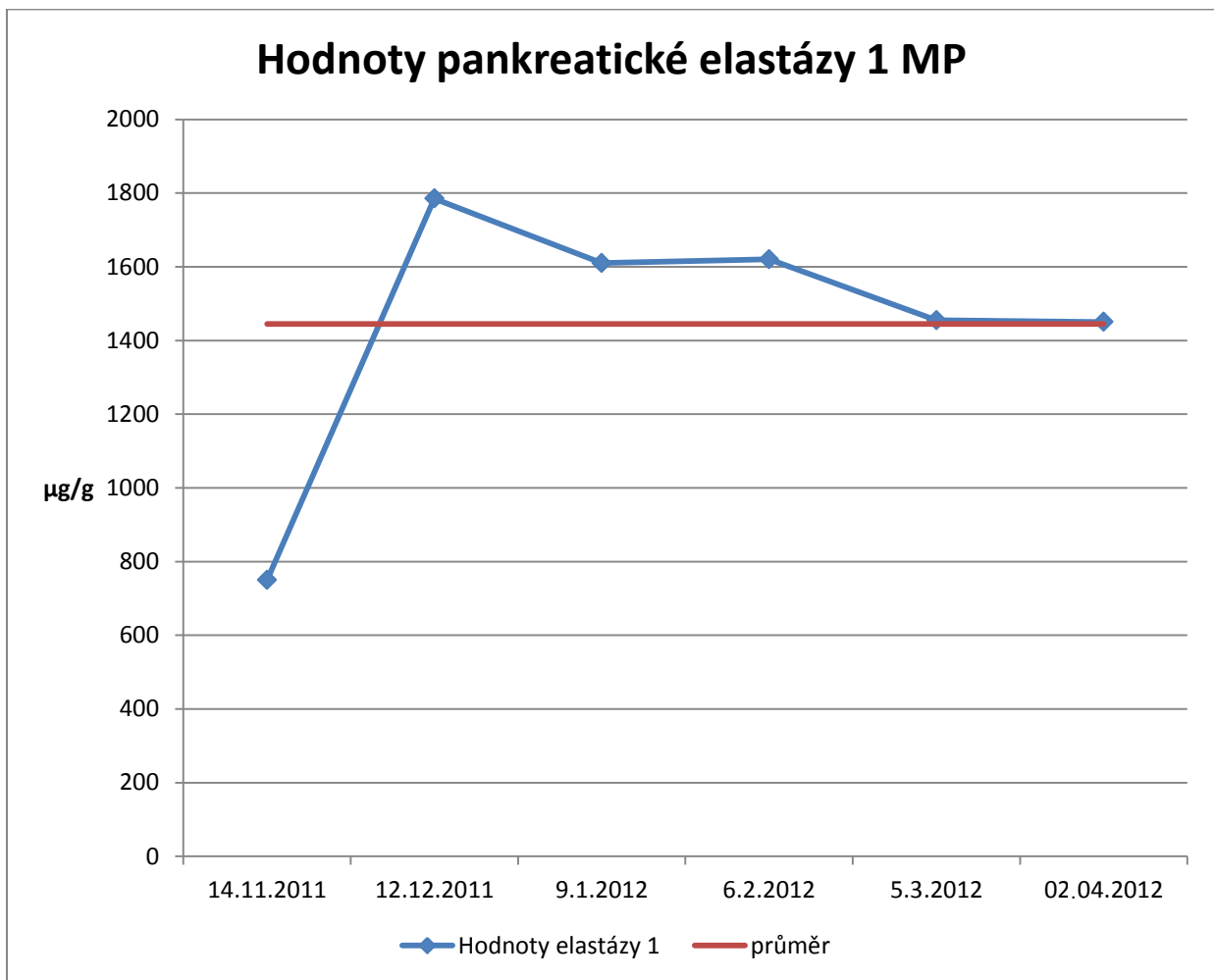
Vyšetřovaná je žena stará 23 let. Na grafu 3.2 jsou vyneseny na ose x data měření a na ose y jsou hodnoty pankreatické elastázy 1 v  $\mu\text{g/g}$ . Její průměrná hodnota pankreatické elastázy během půlročního sledování je  $1165 \mu\text{g/g}$  a medián  $1132,5 \mu\text{g/g}$ , kde maximum jejích hodnot činilo  $1560 \mu\text{g/g}$  a minimum  $880 \mu\text{g/g}$ . Hodnota směrodatné odchylky je  $248,39 \mu\text{g/g}$  a variační koeficient je 21,3 %.



Graf 3.2 Výsledky hodnot půlročního měření LS

MP

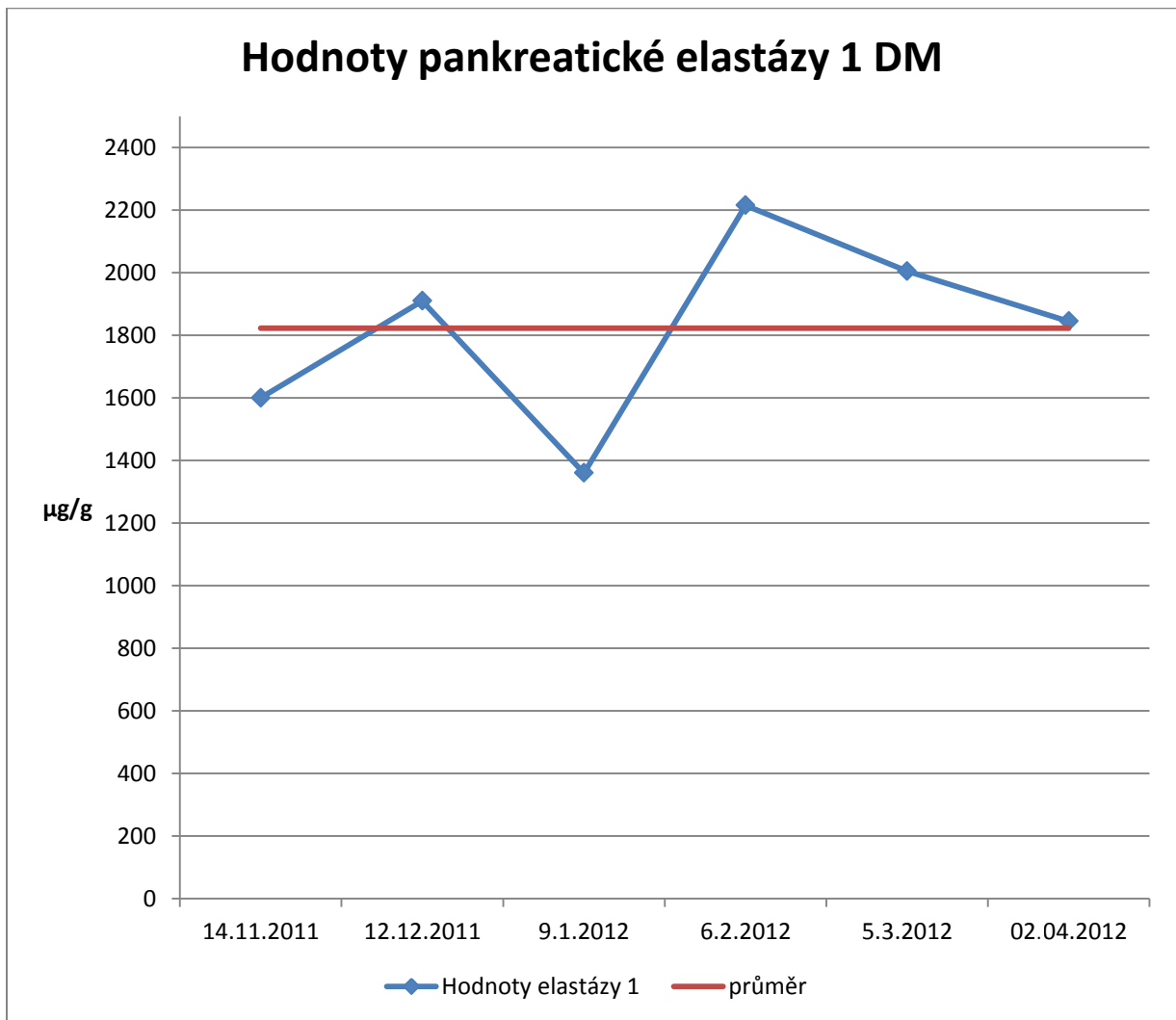
Vyšetřovaný je muž starý 24 let. Na grafu 3.3 jsou vyneseny na ose x data měření a na ose y jsou hodnoty pankreatické elastázy 1 v  $\mu\text{g/g}$ . Jeho průměrná hodnota elastázy 1 během půlročního sledování je  $1445 \mu\text{g/g}$  a medián  $1532,5 \mu\text{g/g}$ , kde maximum jeho hodnot činilo  $1785 \mu\text{g/g}$  a minimum  $750 \mu\text{g/g}$ . Hodnota směrodatné odchylky je  $362,38 \mu\text{g/g}$  a variační koeficient je  $25,1 \%$ . První hodnota mohla být ovlivněna chybou (například odběru).



Graf 3.3 Výsledky hodnot půlročního měření MP

DM

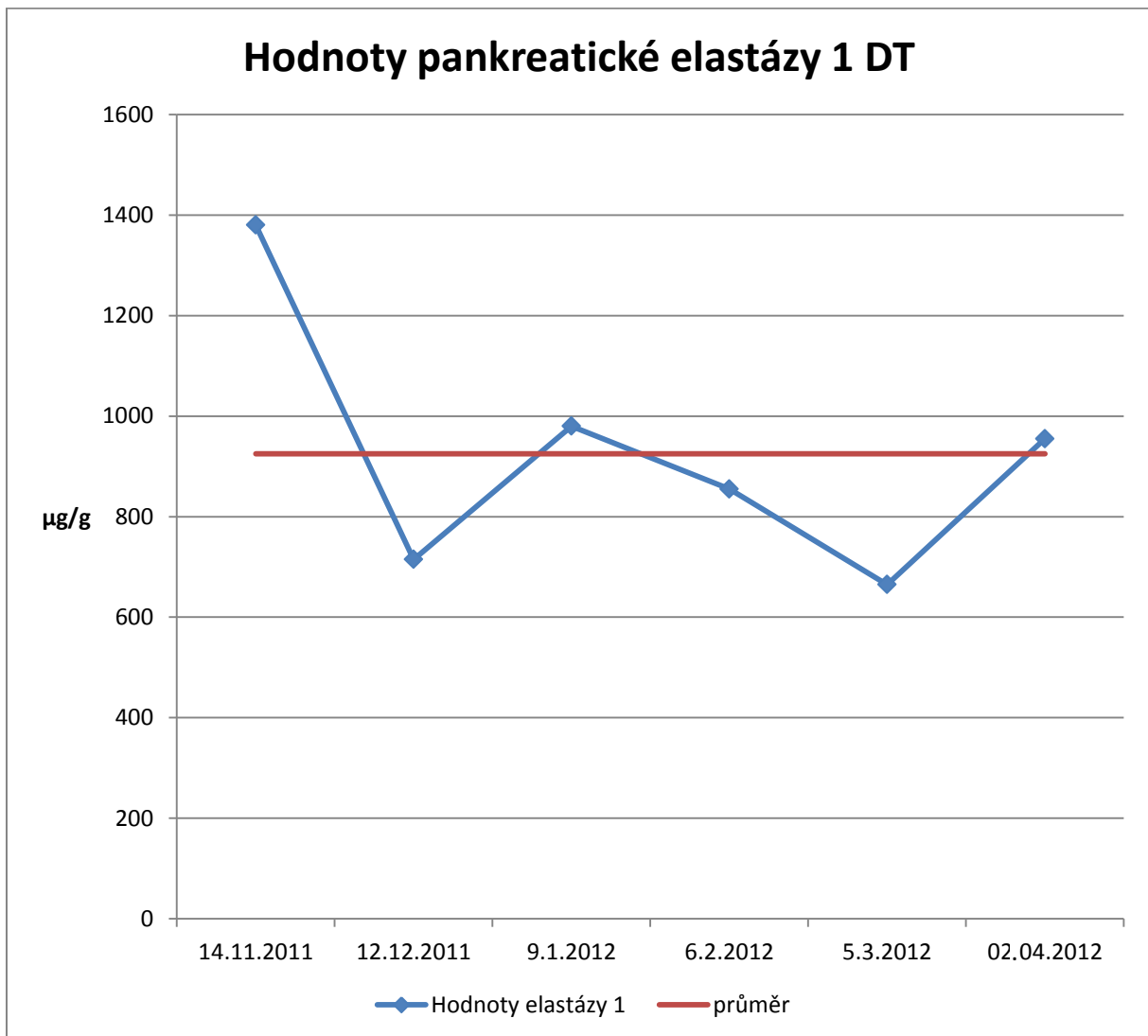
Vyšetřovaný je muž starý 24 let. Na grafu 3.3 jsou vyneseny na ose x data měření a na ose y jsou hodnoty pankreatické elastázy 1 v  $\mu\text{g/g}$ . Jeho průměrná hodnota elastázy 1 během půlročního sledování je  $1822,5 \mu\text{g/g}$  a medián  $1532,5 \mu\text{g/g}$ , kde maximum jeho hodnot činilo  $2215 \mu\text{g/g}$  a minimum  $1360 \mu\text{g/g}$ . Hodnota směrodatné odchylky je  $302,96 \mu\text{g/g}$  a variační koeficient je 16,6 %.



Graf 3.3 Výsledky hodnot půlročního měření DM

DT

Vyšetřovaný je muž starý 24 let. Na grafu 3.3 jsou vyneseny na ose x data měření a na ose y jsou hodnoty pankreatické elastázy 1 v  $\mu\text{g/g}$ . Jeho průměrná hodnota elastázy 1 během půlročního sledování je  $925 \mu\text{g/g}$  a medián  $905 \mu\text{g/g}$ , kde maximum jeho hodnot činilo  $1380 \mu\text{g/g}$  a minimum  $665 \mu\text{g/g}$ . Hodnota směrodatné odchylky je  $255,94 \mu\text{g/g}$  a variační koeficient je  $27,7 \%$ . U něj mohl mít vliv na snížení elastázy 1 u data 5.3.2012 předchozí měsíční dovolená v Thajsku.



Graf 3.2 Výsledky hodnot půlročního měření DT

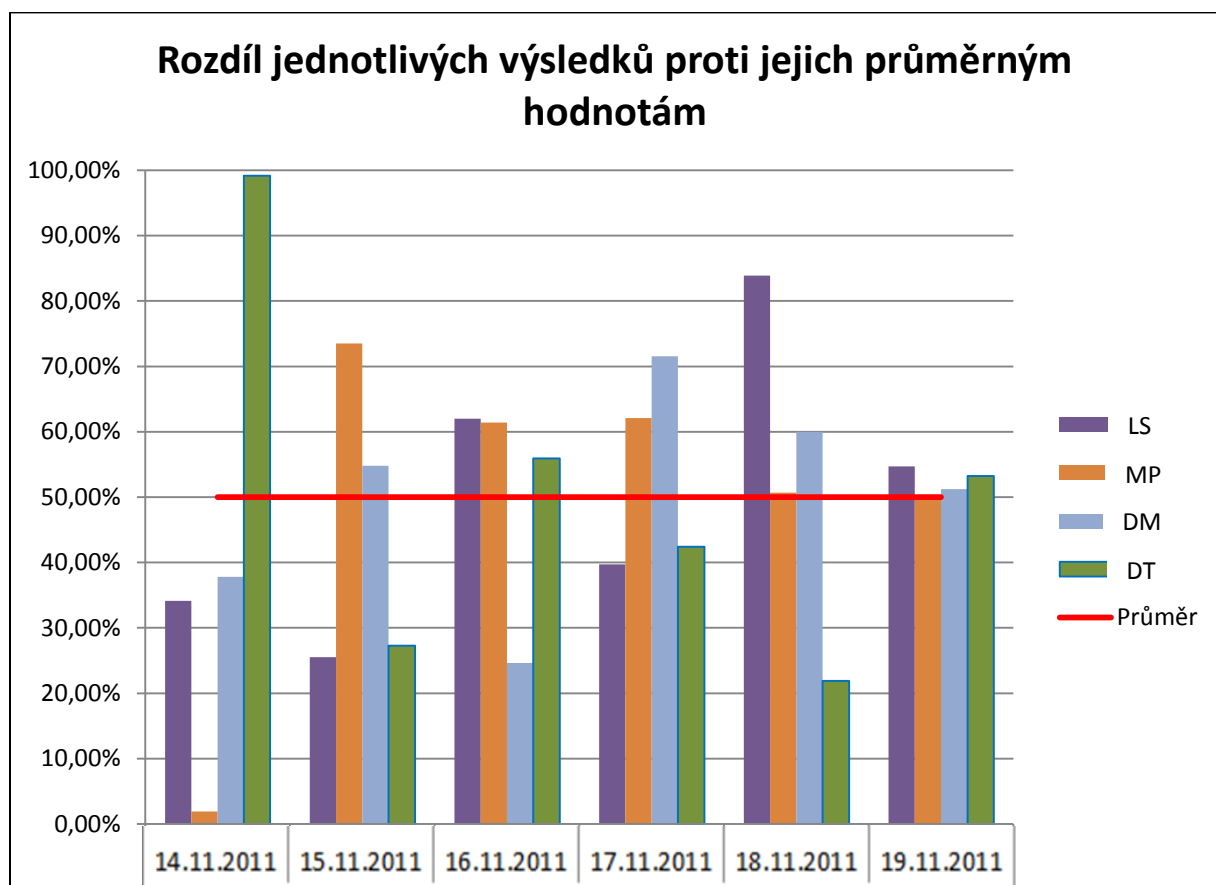
## Rozdíl jednotlivých výsledků proti jejich průměrným hodnotám

Tabulka 3.5 shrnuje všechny výsledky. Na ose x jsou data měření a na ose y jsou procenta. Ve sloupcích jsou uvedeny hodnoty jednotlivých měření proti své průměrné hodnotě výsledků.

Na tomto grafu je vidět jak moc se jednotlivé výsledky liší od svého průměru. V prvním měření se liší velmi významně. Rozdíl u vzorků DT a MP proti jejich průměru je takřka 50 %. Naopak v posledním měření jsou všechny výsledky měření do 5 % od jejich průměrných hodnot. Největší rozdíl mezi hodnotami je u vzorků DT(77,2 %). Následují vzorky MP(71,6 %), LS(58,3 %) a DM(46,9 %).

Mezi šesticemi měření subjektů DT a PM vyšla korelace statisticky významná na hladině 5 %, která ale jde evidentně pouze na vrub odlehlých hodnot prvního měření a navíc je záporná. Z této významné korelace proto nevyplývá, že by se hodnoty naměřené u DT a PM vyvíjely v čase shodně. Dixonův Q-test nedetekuje v datech žádné odlehlé hodnoty s výjimkou prvního měření vyšetřovaného MP, které hodnotí jako odlehlé na hladině spolehlivosti 95 %.

Variační koeficient se u čtyř vyšetřovaných pohyboval v rozmezí od 16,6 % do 27,7 % s průměrem 22,7 % a mediánem 23,3 %.



Graf 3.5 Rozdíl jednotlivých výsledků proti jejich průměrným hodnotám

### 3.5. Vyhodnocení týdenního měření

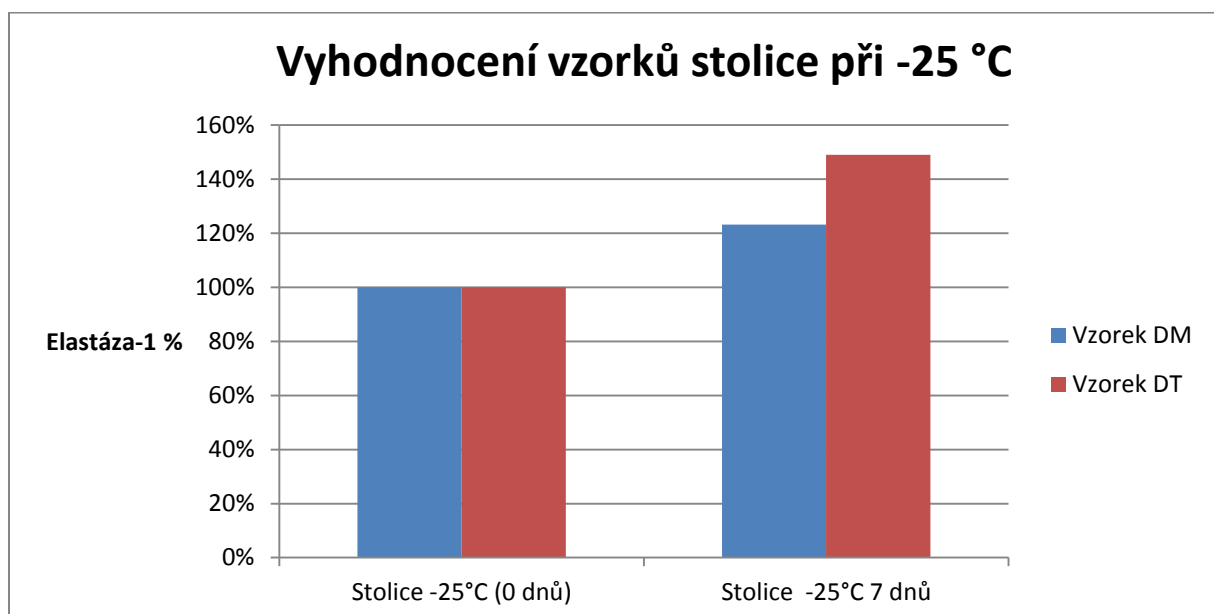
Vyhodnocení vzorků stolice při -25 °C (graf 3.6)

Vzorky stolice byly uchovávány v mrazáku při teplotě -25 °C. Na grafu je demonstrována hodnota pankreatické elastázy 1 a jak se změnila její hodnota vlivem této teploty. Na ose X je popis sledovaného vzorku a doba uchovávání při dané teplotě. Osa Y je hodnota pankreatické elastázy 1 v procentech.

Za 100 % hodnotu je určen vzorek extraktu pankreatické elastázy 1 dle doporučení výrobce. Tento referenční vzorek (označen jako Stolica -25 °C (0 dnů)) byl připraven jako extrakt v den měření. Druhý vzorek byl sedm dnů v mrazáku, připraven dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku den před měřením a poté den uložen v lednici po dobu 24 hodin.

Sloupce vyznačují hodnotu pankreatické elastázy 1 při teplotě -25 °C a jejich porovnáním je možné pozorovat rozdíl ve stabilitě proti výrobcem doporučenému postupu.

Oba měřené vzorky vykazují nejvyšší hodnoty ze všech měření. Vzorek DM má o 23,1 % vyšší hodnoty a vzorek DT o 48,9 % vyšší hodnoty, než vzorky měřené přesně dle instrukcí výrobce setu. U vzorku DM i u vzorku DT jsou hodnoty podobné jako při uchování stolice při 8°C pod dobu 7 dnů a po dobu 3 dnů se shoduje se vzorkem DT.



Graf 3.6 Vyhodnocení vzorků stolice při -25 °C

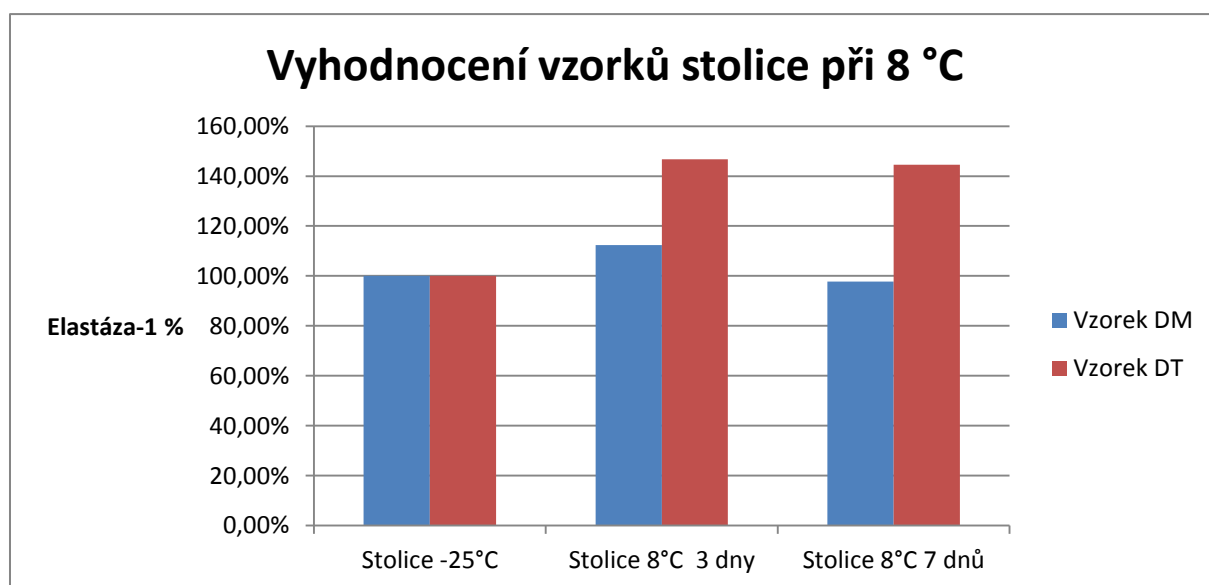
## Vyhodnocení vzorků stolice při 8 °C(graf 3.7)

Vzorky stolice byly uchovávány v lednici při teplotě 8 °C. Na grafu je demonstrována hodnota pankreatické elastázy 1 a jak se změnila její hodnota vlivem této teploty. Na ose X je popis sledovaného vzorku a doba uchovávání při dané teplotě. Osa Y je hodnota pankreatické elastázy 1 v procentech.

Za 100 % hodnotu je určen vzorek extraktu pankreatické elastázy 1 dle doporučení výrobce. Tento referenční vzorek(označen jako Stolica -25 °C (0 dnů)) byl připraven jako extrakt v den měření. Druhý vzorek byl po sedm dnů v lednici, připraven dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku den před měřením a poté den uložen v lednici po dobu 24 hodin. Třetí vzorek byl vytažen z mrazáku čtvrtý den, přesunut do lednice na tři dny a poté připraven dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku den před měřením a poté den uložen v lednici po dobu 24 hodin.

Sloupce vyznačují hodnotu pankreatické elastázy 1 při teplotě 8 °C a jejich porovnáním je možné pozorovat rozdíl ve stabilitě proti výrobcem doporučenému postupu.

Hodnoty vzorku DT uchované v lednici po dobu tří i sedmi dnů vykazují takřka identické hodnoty jako při uchování stolice v mrazáku, tedy 46,7 % při třech dnech a 44,5 % při sedmi dnech. Hodnoty vzorku DM při třech dnech o 12,3 % vyšší, ale při skladování po dobu sedmi dnů nepatrně poklesly o 2,2 %.



graf 3.7 Vyhodnocení vzorků stolice při 8 °C



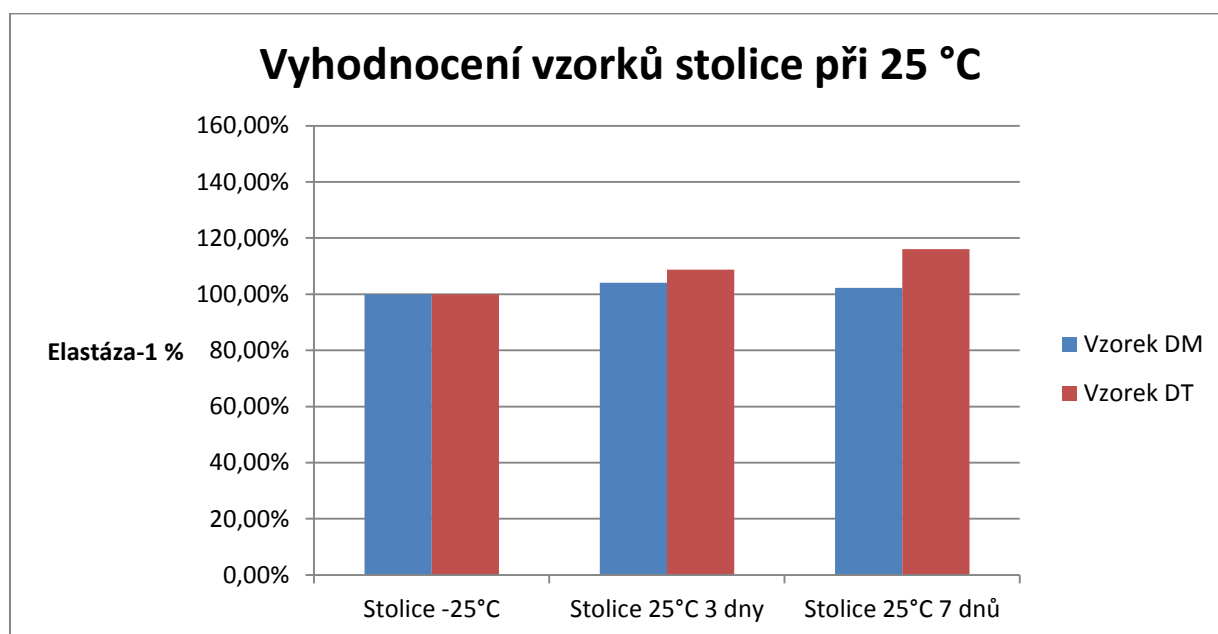
## Vyhodnocení vzorků stolice při 25 °C(graf 3.8)

Vzorky stolice byly uchovávány v laboratorní teplotě 25 °C. Na grafu je demonstrována hodnota pankreatické elastázy 1 a jak se změnila její hodnota vlivem této teploty. Na ose X je popis sledovaného vzorku a doba uchovávání při dané teplotě. Osa Y je hodnota pankreatické elastázy 1 v procentech.

Za 100 % hodnotu je určen vzorek extraktu pankreatické elastázy 1 dle doporučení výrobce. Tento referenční vzorek(označen jako Stolica -25 °C (0 dnů)) byl připraven jako extrakt v den měření. Druhý vzorek byl po sedm dnů v laboratorní teplotě, připraven dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku den před měřením a poté den uložen v lednici po dobu 24 hodin. Třetí vzorek byl vytažen z mrazáku čtvrtý den, přesunut do laboratorní teploty na tři dny a poté připraven a dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku den před měřením a poté den uložen v lednici po dobu 24 hodin.

Sloupce vyznačují hodnotu pankreatické elastázy 1 při teplotě 25 °C a jejich porovnáním je možné pozorovat rozdíl ve stabilitě proti výrobcem doporučovanému postupu.

Hodnoty sledovaných vzorků DM zůstávají pod dobu tří i sedmi dnů při laboratorní teplotě jen mírně(do 5 %) nad hodnoty referenčního vzorku. Hodnoty vzorku DT jsou při třech dnech proti hodnotě referenčního vzorku zvýšeny o 8,7 %, ale při uchování při sedmi dnech jsou zvýšeny o 16 %.



graf 3.8 Vyhodnocení vzorků stolice při 25 °C

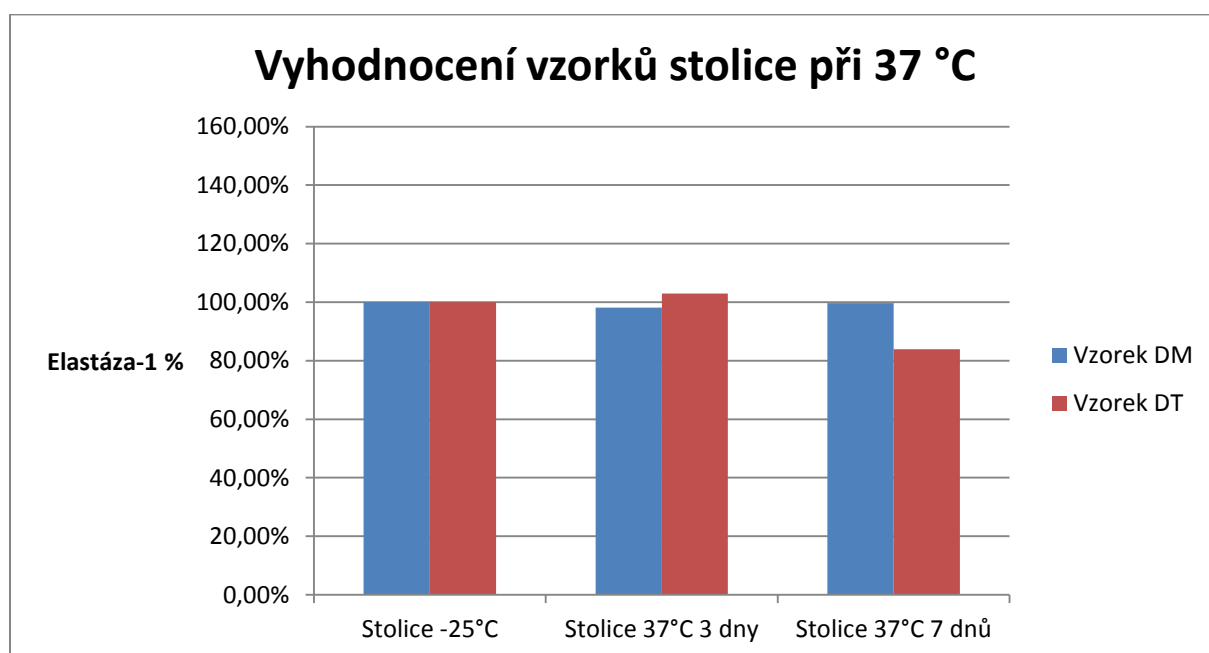
## Vyhodnocení vzorků stolice při 37 °C(graf 3.9)

Vzorky stolice byly uchovávány v termostatu při teplotě 37 °C. Na grafu je demonstrována hodnota pankreatické elastázy 1 a jak se změnila její hodnota vlivem této teploty. Na ose X je popis sledovaného vzorku a doba uchovávání při dané teplotě. Osa Y je hodnota pankreatické elastázy 1 v procentech.

Za 100 % hodnotu je určen vzorek extraktu pankreatické elastázy 1 dle doporučení výrobce. Tento referenční vzorek(označen jako Stolice -25 °C (0 dnů)) byl připraven jako extrakt v den měření. Druhý vzorek byl po sedm dnů v termostatu, připraven dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku den před měřením a poté den uložen v lednici po dobu 24 hodin. Třetí vzorek byl vytažen z mrazáku čtvrtý den, přesunut do termostatu na tři dny a poté připraven a dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku den před měřením a poté den uložen v lednici po dobu 24 hodin.

Sloupce vyznačují hodnotu pankreatické elastázy 1 při teplotě 37 °C a jejich porovnáním je možné pozorovat rozdíl ve stabilitě proti výrobcem doporučenému postupu.

Vzorky stolice uchovávané v termostatu po dobu tří dnů mají podobné hodnoty(rozdíl do 3 %), jako vzorek připravený dle stanov výrobce setu. Při teplotě 37 °C po dobu sedmi dnů zůstal vzorek DM stabilní, ale vzorek DT klesl proti hodnotám referenčně připraveného vzorku o 16 %.



graf 3.9 Vyhodnocení vzorků stolice při 37 °C

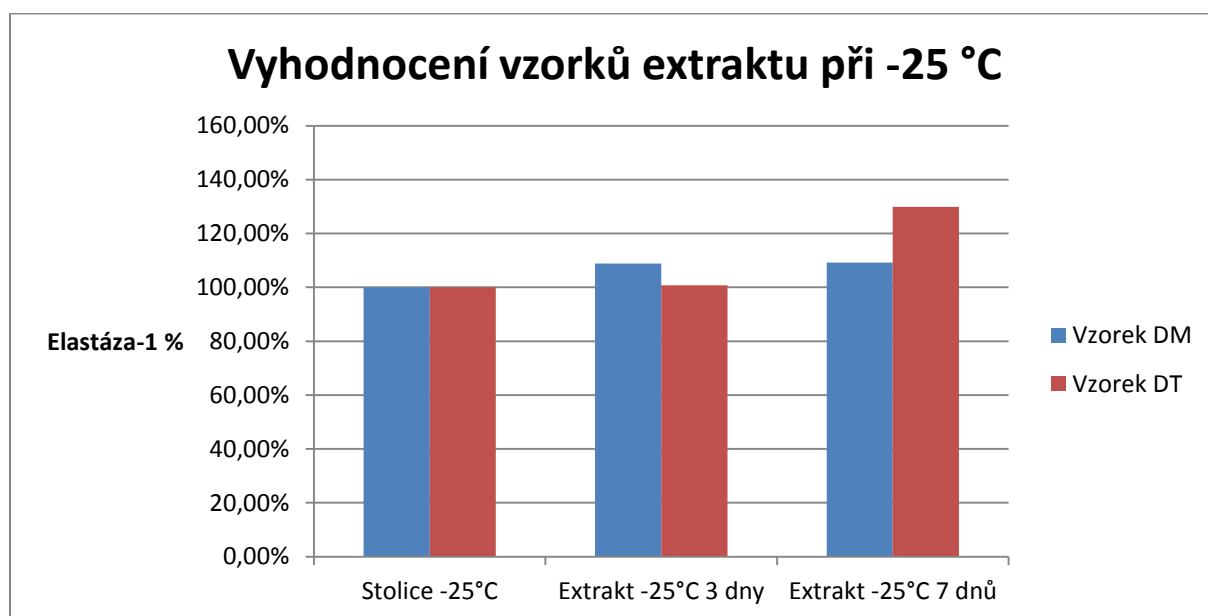
## Vyhodnocení vzorků extraktu při -25 °C(graf 3.10)

Vzorky extraktu byly uchovávány v mrazáku při teplotě -25 °C. Na grafu je demonstrována hodnota pankreatické elastázy 1 a jak se změnila její hodnota vlivem této teploty. Na ose X je popis sledovaného vzorku a doba uchovávání při dané teplotě. Osa Y je hodnota pankreatické elastázy 1 v procentech.

Za 100 % hodnotu je určen vzorek extraktu pankreatické elastázy 1 dle doporučení výrobce. Tento referenční vzorek(označen jako Stolice -25 °C (0 dnů)) byl připraven jako extrakt v den měření. Druhý vzorek byl připraven dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku a po sedm dnů uložen zpět do mrazáku. Den před analýzou byl uložen v lednici po dobu 24 hodin. Třetí vzorek byl vytažen z mrazáku čtvrtý den, připraven dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku, přesunut zpět do mrazáku na tři dny a poté den uložen v lednici po dobu 24 hodin.

Sloupce vyznačují hodnotu pankreatické elastázy 1 při teplotě -25 °C a jejich porovnáním je možné pozorovat rozdíl ve stabilitě proti výrobcem doporučenému postupu.

Při uskladnění po dobu tří dnů v mrazáku si vzorek extraktu DM zachovává stejnou hodnotu jako u sedmi dnů, tedy o 9 % vyšší, než referenčně připravený vzorek. Naopak vzorek DT má při uchování po dobu tří dnů stejné hodnoty jako referenční vzorek, ale při uchování po dobu sedmi dnů má o 29,9 % vyšší hodnotu. Ani jeden ze vzorků extraktu se tak nepřiblížil hodnotám stolice uložené v mrazáku.



graf 3.10 Vyhodnocení vzorků extraktu při -25 °C

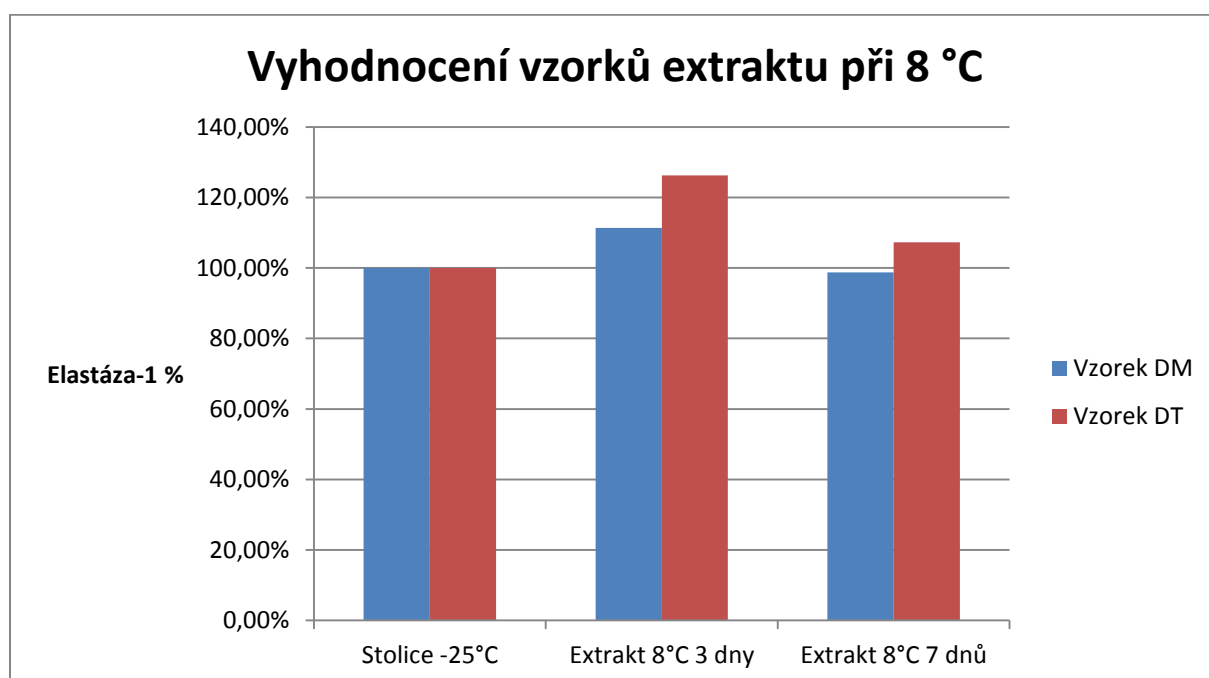
## Vyhodnocení vzorků extraktu při 8 °C (graf 3.11)

Vzorky extraktu byly uchovávány v lednici při teplotě 8 °C. Na grafu je demonstrována hodnota pankreatické elastázy 1 a jak se změnila její hodnota vlivem této teploty. Na ose X je popis sledovaného vzorku a doba uchovávání při dané teplotě. Osa Y je hodnota pankreatické elastázy 1 v procentech.

Za 100 % hodnotu je určen vzorek extraktu pankreatické elastázy 1 dle doporučení výrobce. Tento referenční vzorek (označen jako Stolice -25 °C (0 dnů)) byl připraven jako extrakt v den měření. Druhý vzorek byl připraven dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku a po sedm dnů uložen v lednici až do dne analýzy. Třetí vzorek byl vytažen z mrazáku čtvrtý den, připraven dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku, přesunut do lednice na tři dny až do dne analýzy.

Sloupce vyznačují hodnotu pankreatické elastázy 1 při teplotě 8 °C a jejich porovnáním je možné pozorovat rozdíl ve stabilitě proti výrobcem doporučovanému postupu.

Hodnota elastázy 1 u obou vzorků je při uchování po dobu tří dnů při teplotě 8°C znatelně zvýšená proti hodnotě referenčního vzorku (DM 11,4 % a DT 26,3 %). Hodnoty vzorků klesají při uchování po dobu sedmi dnů. U vzorku DM na hodnotu srovnatelnou s referenčním vzorkem a vzorek DT je zvýšen o 7,3 % proti hodnotě referenčního vzorku.



graf 3.11 Vyhodnocení vzorků extraktu při 8 °C

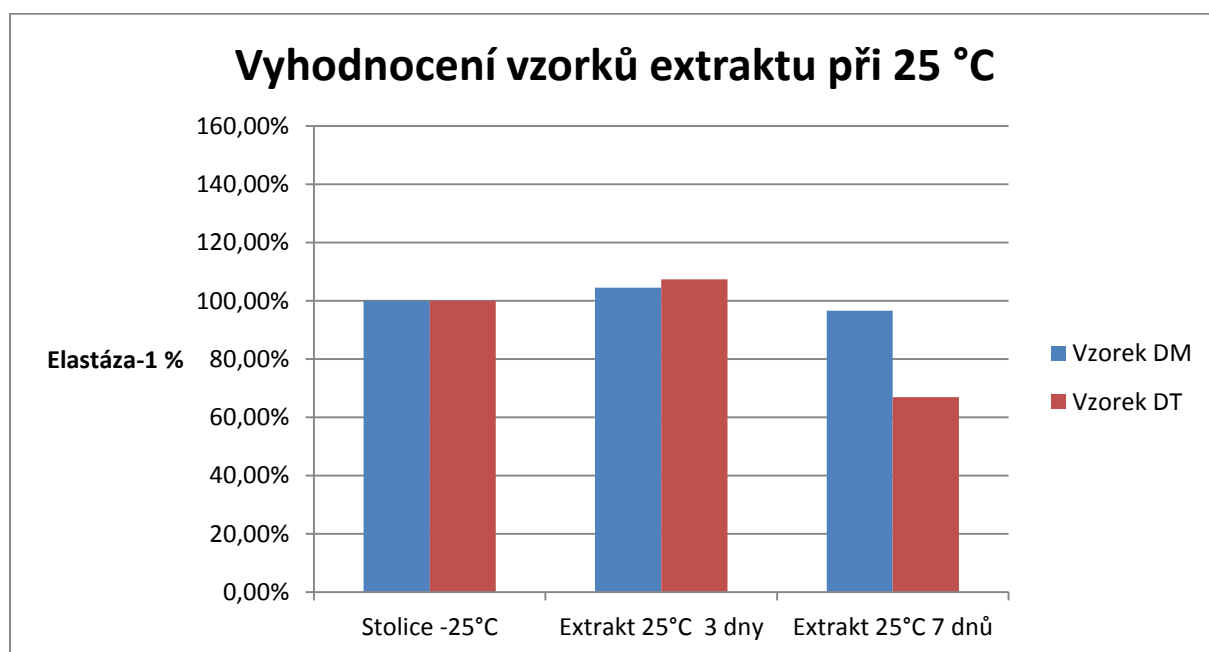
## Vyhodnocení vzorků extraktu při 25 °C(graf 3.12)

Vzorky extraktu byly uchovávány v laboratorní teplotě 25 °C. Na grafu je demonstrována hodnota pankreatické elastázy 1 a jak se změnila její hodnota vlivem této teploty. Na ose X je popis sledovaného vzorku a doba uchovávání při dané teplotě. Osa Y je hodnota pankreatické elastázy 1 v procentech.

Za 100 % hodnotu je určen vzorek extraktu pankreatické elastázy 1 dle doporučení výrobce. Tento referenční vzorek stolice (označen jako Stolice -25 °C (0 dnů)) byl připraven jako extrakt v den měření. Druhý vzorek byl připraven dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku a po sedm dnů uložen v laboratorní teplotě. Den před analýzou byl uložen v lednici po dobu 24 hodin. Třetí vzorek byl vytažen z mrazáku čtvrtý den, připraven dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku, přesunut do laboratorní teploty na tři dny a poté den uložen v lednici po dobu 24 hodin.

Sloupce vyznačují hodnotu pankreatické elastázy 1 při teplotě 25 °C a jejich porovnáním je možné pozorovat rozdíl ve stabilitě proti výrobcem doporučenému postupu.

Při uchování po dobu tří dnů měly oba vzorky vyšší hodnoty než referenční vzorek. Vzorek DM měl o 4,4 % vyšší hodnoty a vzorek DT o 7,3 % vyšší. Hodnoty vzorků DM i DT poklesly při uchovávání v extraktu po dobu sedmi dnů při laboratorní teplotě. U vzorku DM poklesly jen nepatrně o 3,5 % proti hodnotě referenčního vzorku, ale u vzorku DT poklesly hodnoty velmi výrazně 33,2 % proti hodnotě referenčního vzorku.



graf 3.12 Vyhodnocení vzorků extraktu při 25 °C

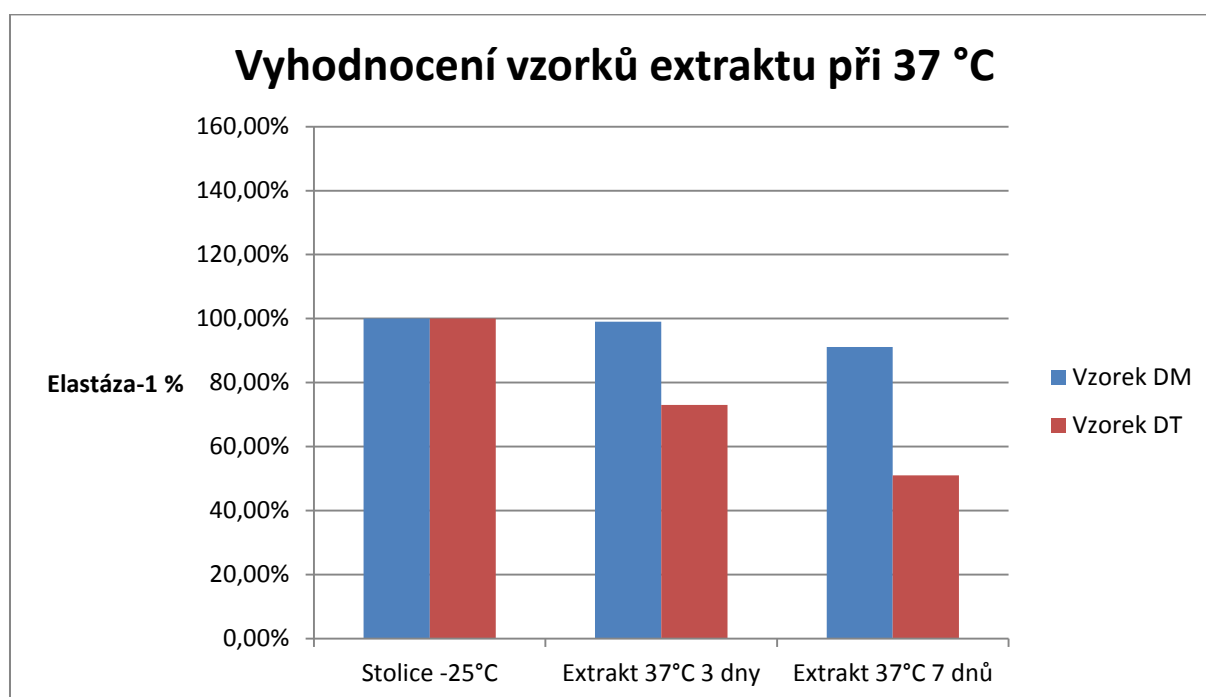
## Vyhodnocení vzorků extraktu při 37 °C(graf 3.13)

Vzorky extraktu byly uchovávány v termostatu při teplotě 37 °C. Na grafu je demonstrována hodnota pankreatické elastázy 1 a jak se změnila její hodnota vlivem této teploty. Na ose X je popis sledovaného vzorku a doba uchovávání při dané teplotě. Osa Y je hodnota pankreatické elastázy 1 v procentech.

Za 100 % hodnotu je určen vzorek extraktu pankreatické elastázy 1 dle doporučení výrobce. Tento referenční vzorek(označen jako Stolice -25°C (0 dnů)) byl připraven jako extrakt v den měření. Druhý vzorek byl připraven dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku a po sedm dnů uložen v termostatu při teplotě 37 °C. Třetí vzorek byl vytažen z mrazáku čtvrtý den, připraven dle pokynů výrobce pro extrakci vzorku, přesunut do termostatu na tři dny a poté den uložen v lednici po dobu 24 hodin.

Sloupce vyznačují hodnotu pankreatické elastázy 1 při teplotě 37 °C a jejich porovnáním je možné pozorovat rozdíl ve stabilitě proti výrobcem doporučenému postupu.

Při teplotě 37 °C v termostatu hodnota elastázy obou vzorků nejvíce klesla. Při třech dnech v termostatu zůstal vzorek DM stabilní, ale vzorek DT poklesl hodnot o 27,1 %. Při uchování po dobu sedmi dnů vzorek DM vykazuje pokles o 9,9 % a vzorek DT o 49 % proti hodnotě referenčního vzorku.



graf 3.13 Vyhodnocení vzorků extraktu při 37 °C

## 4. Diskuze

Pro vyšetření interindividuelní variability v půlročním sledování pankreatické elastázy 1 se podařilo sehnat čtyři zdravé dobrovolníky z 1. LF UK a Přírodovědecké fakulty UK. Ti byli také vyšetřováni dechovým testem na stanovení pankreatické elastázy pomocí C13. Toto měření je součástí další práce.

Po zpracování celého půlročního testu je jasné, že výkyvy pankreatické elastázy 1 u dané skupiny jsou velké. Hodnoty rozdílu mezi jednotlivými měřeními u dvou vyšetřovaných osob přesáhly hranici 70 procent. Mezi šesticemi měření subjektů DT a PM vyšla korelace statisticky významná na hladině 5 %, která ale jde evidentně pouze na vrub odlehlých hodnot prvního měření a navíc je záporná. Z této statisticky signifikantní korelace proto nevyplývá, že by se hodnoty naměřené u DT a PM vyvíjely v čase shodně. Dixonův Q-test nedetekuje v datech žádné odlehlé hodnoty s výjimkou prvního měření vyšetřovaného MP, které hodnotí jako odlehlé na hladině spolehlivosti 95 %. Variační koeficient se u vyšetřovaných pohyboval v rozmezí od 16,6 % do 27,7 % s průměrem 22,7 % a mediánem 23,3 %.

Tyto výsledky mohou být ovlivněny jak vlastní interindividuelní variabilitou, tak možnou chybou odběru vzorku stolice a také prudkou změnou geografického prostředí v případě jednoho měřeného. V klinicko diagnostické procesu jsou však rozhodující hodnoty pro určení patologických procesů pod 200  $\mu\text{g/g}$ .

Toto měření mohlo napovědět, jestli je vhodné měřit takto vysoké hodnoty pankreatické elastázy 1. Při dlouhodobém sledování pacientů by se mohlo prokázat postupné snižování funkce exokrinního pankreatu. Z výsledků této práce to však vyhodnotit nelze, protože rozdíly hodnot klesají a zase se zvyšují bez jasné souvislosti. Z výsledků tedy nelze soudit, zda je míra variability velká nebo malá, protože podobná studie doposud neproběhla. Samozřejmě, dlouhodobější sledování s větší skupinou, by mohlo výsledky této práce upřesnit.

Týdenní test u dvou měřených dobrovolníků mělo za cíl zjistit, jak se změní hodnota pankreatické elastázy 1 připravená ve stolici a extrakčním pufrem v různých teplotních podmínkách.

Hodnoty elastázy 1 byly naměřeny nejvyšší ve vzorcích stolice uložené po dobu sedmi dnů v mrazáku při teplotě  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , připravené den předem a uložené do lednice, kde byla teplota  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Důvodem, proč byla naměřena výrazně nižší hodnota u vzorku stolice, který byl připraven dle přesného dodržení návodu výrobce, může být nedostatečná extrakce vzorku stolice extrakčním pufrem. Elastáza 1 měla stejné nebo vyšší hodnoty než referenční vzorek ve vzorcích uložených v mrazáku v podobě extraktu.

V lednici elastáza 1 také dosahovala stejných nebo vyšších hodnot při uložení po dobu sedmi dnů. Jak v případě vzorků stolice, tak i v případě vzorků extraktu stoupla její hodnota při uložení po dobu tří dnů v lednici u DM.

V laboratorní teplotě se výsledky elastázy 1 nelišily u vzorků stolice a extraktu po dobu tří dnů – oba měly mírně vyšší hodnoty než hodnota referenčního vzorku. Ovšem když byly uloženy sedm dnů, tak hodnoty ve vzorku stolice byly naměřeny vyšší, ale hodnoty ve vzorku extraktu klesaly.

Při udržování vzorků stolice v termostatu byly hodnoty stejné při třech dnech jako referenční vzorek. Při sedmi dnech v termostatu klesl vzorek DT, ale hodnoty vzorku DM zůstaly stejné jako tří dnů. Při vystavení teplotě 37 °C pod dobu tří dnů zůstal vzorek extraktu DM stabilní, ale vzorek DT klesl o 27,1 % proti hodnotě referenčního vzorku. Vzorky extraktu v termostatu při sedmi dnech vykazaly ty nejnižší hodnoty ze všech vzorků. Vzorek extraktu DM měl o 9,9 % a vzorek o 49 % proti referenční hodnotě.

Tyto výsledky potvrdily, že klinická praxe v udržování vzorku stolice v mrazáku a připravením vzorku do extrakčního pufru den před samotnou analýzou, je dosahováno vyšších hodnot elastázy. Z výsledků je dále vidět, že je ideální mít v mrazáku vzorek stolice, protože hodnoty elastázy 1 v extraktu byly ve všech případech nižší.



## 5. Závěr

Pankreatická elastáza 1 byla stanovena pomocí metody ELISA ve stolici setem od firmy ScheBo<sup>®</sup>. Stanovování míry interindividuální variability bylo vyhodnocováno na čtyřech dobrovolnících, kteří odevzdávali vzorek stolice každý měsíc po dobu půl roku. Jejich výsledky byly zpracovány pomocí statistických metod.

Po zpracování celého půlročního testu je jasné, že výkyvy pankreatické elastázy 1 u dané skupiny jsou velké. Hodnoty rozdílu mezi jednotlivými měřeními u dvou vyšetřovaných osob přesáhly hranici 70 procent. Variační koeficient se u vyšetřovaných pohyboval v rozmezí od 16,6 % do 27,7 % s průměrem 22,7 % a mediánem 23,3 %.

U týdenního testu byl zkoumán vliv teploty a doby skladování na stabilitu pankreatické elastázy 1 ve vzorcích stolice a extraktu. Z celkových výsledků tohoto testu plyne, že klinická praxe, kdy je vzorek stolice po odebrání od pacienta zmražen a připraven do extrakčního pufru den před samotnou analýzou, dosahuje nejvyšších výsledků hodnot. Hodnoty elastázy ve stolici jsou však při porovnání s přesným postupem přípravy vzorku dle výrobce setu stabilní ve formě stolice i tři dny při teplotě 37 °C.