



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Vyšetření hemoglobinu ve stolici u dětí a adolescentů

Investigation of Hemoglobin in Faeces in Children and Adolescents

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: doc. Ing. Karel Kotaška, Ph.D.

Tereza Černá

Kladno, květen 2018

Zadání bakalářské práce

Student: **Tereza Černá**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Vyšetření hemoglobinu ve stolici u dětí a adolescentů**
Téma anglicky: Investigation of Hemoglobin in Faeces in Children and Adolescents

Zásady pro vypracování:

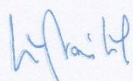
Předmětem bakalářské práce bude stanovení koncentrace hemoglobinu kvantitativní imunochemickou metodou ve stolici u dětí a adolescentů a porovnání s jejich diagnózou. V teoretické části práce budou diskutovány základní biochemické charakteristiky hemoglobinu (struktura, funkce, metabolismus, syntéza a odbourání) a také analytické možnosti stanovení hemoglobinu ve stolici. Nedílnou součástí a jedním z hlavních cílů práce bude objasnit klinický význam stanovení hemoglobinu ve stolici u dětí a adolescentů s ohledem na jejich onemocnění. V praktické části budou diskutovány analytické možnosti stanovení hemoglobinu ve stolici za pomoci kvantitativní imunochemickou metodou. Pro vyhodnocení získaných výsledků budou použity základní statistické metody.

Seznam odborné literatury:

- [1] MURRAY, Robert K., Harperova ilustrovaná biochemie, ed. 1., Galén, c2012, 750 s., ISBN 978-80-7262-907-7
- [2] ŠTERN, Petr, Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia, ed. 2., Praha: Karolinum, 2011, 269 s., ISBN 978-80-246-1979-8
- [3] ZIMA, Tomáš, Laboratorní diagnostika, ed. 3., Praha: Galén, c2013, 1146 s., ISBN 978-80-749-206-22

Zadání platné do: 13.09.2019

Vedoucí: doc. Ing. Karel Kotaška, Ph.D.



.....
vedoucí katedry / pracoviště



.....
děkan

V Kladně dne 25.10.2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Vyšetření hemoglobinu ve stolici u dětí a adolescentů vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 18.05.2018

.....
podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce, panu doc. Ing. Karlovi Kotaškovi, Ph.D. za jeho cenné rady, kritické a konstruktivní připomínky, ale hlavně za jeho trpělivost a ochotu věnovat mé práci svůj čas. Dále bych chtěla poděkovat úsekové laborantce, která mi pomáhala během měření vzorků.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie, 2. lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Motole za umožnění realizace praktické části mé bakalářské práce.

Abstrakt

Předmětem bakalářské práce bylo stanovení koncentrace hemoglobinu ve stolici u dětí a adolescentů pomocí kvantitativní imunochemické metody.

Teoretická část se věnuje struktuře, fyziologickým variantám a metabolismu hemoglobinu, zmiňuje základní poznatky o vyšetření stolice a zánětlivých biomarkerů, pojednává o kolorektálním karcinomu, jeho screeningu a diagnostice. Stěžejní jsou kapitoly o krvácení do gastrointestinálního traktu a o analytických možnostech stanovení hemoglobinu ve stolici.

Praktická část popisuje metodický postup od odběru po stanovení hemoglobinu ve stolici. Experimentální část popisuje vyšetření hemoglobinu ve stolici v souboru 201 dětských pacientů s onemocněními gastrointestinálního traktu i negastrointestinálního původu s následným statistickým vyhodnocením výsledků. Byly nalezeny statisticky významné výsledky mezi oběma skupinami pacientů.

Z vyhodnocení výsledků je zřejmé, že vyšetření hemoglobinu ve stolici u dětí a adolescentních pacientů má diagnostický význam.

Klíčová slova

Vyšetření hemoglobinu ve stolici; analytické metody stanovení; krvácení do gastrointestinálního traktu; vyšetření stolice; hemoglobin.

Abstract

The subject of the bachelor thesis was to determine the hemoglobin concentration in faeces in children and adolescents using a quantitative immunochemical method.

The theoretical part was concerned to the structure, physiological variants, and the metabolism of hemoglobin, summarizes the basic knowledge about investigations of faeces and inflammatory biomarkers. It also discussed colorectal cancer, it's screening, and diagnostics. The most important aspect of the theoretical part is the chapter on gastrointestinal bleeding and the analytical possibilities of determining hemoglobin in faeces.

The practical part describes the method from the collection of samples to the determination of hemoglobin in faeces. The experimental part describes the examination of hemoglobin in faeces in a group of 201 pediatric patients with gastrointestinal and non-gastrointestinal diseases, followed by statistical evaluation of the results. Statistically significant results were found between these two groups of patients.

The evaluation results show that the investigation of hemoglobin in faeces in children and adolescents may have diagnostic importance.

Keywords

Investigation of hemoglobin in faeces; analytical determination methods; bleeding into the gastrointestinal tract; examination of the stool; hemoglobin.

Obsah

1	Úvod	9
2	Současný stav.....	10
2.1	Hemoglobin – struktura a funkce.....	10
2.2	Fyziologické hemoglobiny	13
2.3	Syntéza a odbourání hemoglobinu	14
2.3.1	Syntéza hemoglobinu	14
2.3.2	Degradace hemoglobinu	17
2.4	Hemoglobinopatie	19
2.5	Hemoglobin a vyšetření stolice	21
2.5.1	Vyšetření stolice	21
2.5.2	Vyšetření zánětlivých biomarkerů ve stolici	22
2.5.3	Stanovení hemoglobinu ve stolici.....	23
2.5.3.1	Kolorektální karcinom	23
2.5.3.2	Screening kolorektálního karcinomu	26
2.5.3.3	Diagnostika kolorektálního karcinomu.....	27
2.5.4	Krvácení do gastrointestinálního traktu.....	28
2.5.4.1	Krvácení do horní části gastrointestinálního traktu	28
2.5.4.2	Krvácení do dolní části gastrointestinálního traktu.....	30
2.6	Analytické metody stanovení hemoglobinu ve stolici	32
2.6.1	Chemická stanovení.....	33
2.6.2	Imunochemická stanovení	34
2.6.3	Stanovení Hemoporfyrinu	35
3	Cíl práce	37

4	Metodika	38
4.1	Charakteristika souboru pacientů	38
4.2	Stanovení hemoglobinu ve stolici za pomoci imunochemické metody s latexovou aglutinací na bázi turbidimetrie.....	38
4.2.1	Charakteristika metody	39
4.3	Odběr biologického materiálu	40
4.4	Biologický materiál, reagentie, kontroly a spotřební materiál	41
4.5	Analyzátor OC-Sensor μ	42
4.6	Pracovní postup	43
4.7	Statistická analýza.....	44
5	Výsledky.....	45
5.1	Stanovení koncentrace hemoglobinu ve stolici u dětí a adolescentů.....	45
5.2	Porovnání koncentrací hemoglobinu ve stolici u jednotlivých diagnóz a porovnání získaných výsledků s dostupnými literárními údaji	46
6	Diskuze.....	48
7	Závěr.....	52
8	Seznam použitých zkratk	53
9	Seznam použité literatury	55
10	Seznam použitých obrázků	65
11	Seznamu použitých tabulek	66

1 ÚVOD

Kvantitativní stanovení koncentrace hemoglobinu ve stolici je důležitým diagnostickým ukazatelem postižení gastrointestinálního traktu (GIT). Využívá se v současné době převážně pro screening kolorektálního karcinomu u dospělých. Je definován diagnostický rozhodovací limit 15 μg Hb/g stolice pro odlišení zdravých jedinců a pacientů s podezřením na kolorektální karcinom, kteří jsou indikováni ke kolonoskopii. Výskyt kolorektálního karcinomu u dětských a adolescentních pacientů je vzácný, přesto však lze nalézt zajímavé uplatnění vyšetření hemoglobinu ve stolici také u dětí a adolescentů s krvácením do gastrointestinálního traktu [1; 2].

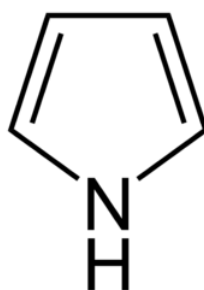
Nejčastějšími příčinami krvácení jsou bakteriální enteritidy, anální fisury, chronické střevní záněty, peptické vředy, střevní polypy, nebo koagulační poruchy. Při vyšetření hemoglobinu u pacientů s krvácením do GIT je třeba rozlišit, v jaké části traktu k postižení dochází. Rozlišujeme krvácení z horní části traktu, kde je částečně degradovaný hem a úplně degradovaný globin, a krvácení z dolní části traktu, kde hem ani globin degradovaný není. Vyšší hodnoty koncentrace lze očekávat při krvácení z horní části traktu [1; 3].

Tato skutečnost a současné poznatky ukazují, že hodnota diagnostického rozhodovacího limitu definovaná a používaná v rutinní praxi u dospělých pacientů s kolorektálním karcinomem není použitelná pro diagnostiku dětských pacientů s gastrointestinálním onemocněním. Hledání diagnosticky významných koncentrací hemoglobinu ve stolici u dětských pacientů s různými příčinami onemocnění GIT je v současné době předmětem mnoha studií [1]. Jedním z cílů předkládané bakalářské práce je porovnání vlastních naměřených hodnot koncentrací hemoglobinu ve stolici u pacientů s GIT a jejich provnání se současně publikovanými literárními údaji.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Hemoglobin – struktura a funkce

Hemoglobin je heterodimer složený ze čtyř nekovalentně spojených globinových řetězců, kdy vždy dvojice má shodné aminokyselinové složení [4; 5]. Každý řetězec nese jeden hem [6]. Chemicky se jedná o substituovaný tetrapyrrol. Tetrapyrroly se rozdělují na porfyriny, které mají cyklickou strukturu, a biliny s lineární strukturou [7]. Pyrrol (1-aza-2,4-cyklopentadien) je nenasycená pětičlenná heterocyklická sloučenina, kdy se z ní postupným nasycením jejích vazeb stává pyrrolin či pyrrolidin [6].

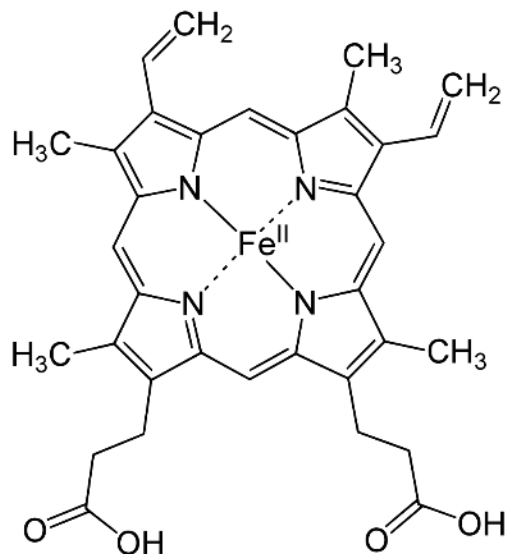


Obrázek 1 - Struktura pyrrolu [8]

Převzato z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4a/Pyrrole_simple_structure.png/177px-Pyrrole_simple_structure.png

Tetrapyrroly se vyskytují v přírodních pyrrolových barvivech se čtyřmi pyrrolovými jádry, která jsou spojena jednouhlíkovými můstky [6]. Tato barviva se dělí podle typu spojení mezi jádry na porfyriny, které jsou spojeny methinovými můstky, a porfyrinogeny, vznikající při biosyntéze hemu nebo chemickou redukcí porfyrinů, kde je spojení mezi pyrrolovými jádry zprostředkováno methylenovými můstky [6; 4]. Proto se u porfyrinogenů nevyskytují konjugované dvojně vazby a na rozdíl od porfyrinů jsou bezbarvé a nefluoreskují [6].

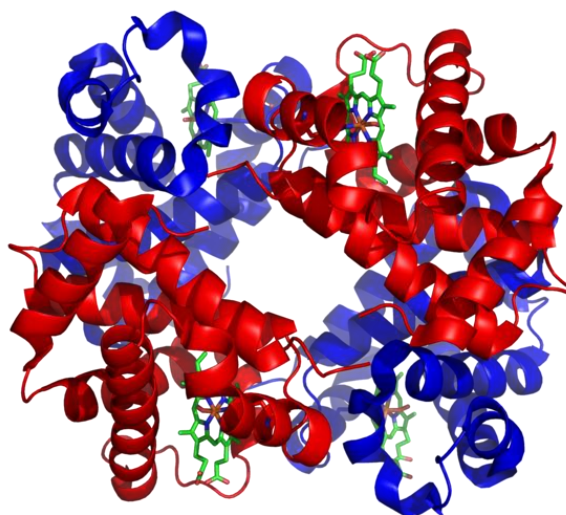
Základní funkční podjednotkou hemoglobinu je hem (viz obrázek 2) obsahující tetrapyrrolovou strukturu s konjugovaným atomem dvojmocného železa, jehož přítomnost dává hemoglobinu charakteristické červené zbarvení [5].



Obrázek 2 - Vzorec hemu s navázaným železem [9]

Převzato z: https://eluc.kr-olomoucky.cz/uploads/images/15322/content_620px-Heme_b.svg.png

Hem se váže v místě hydrofobní kapsy na proximální histidinový zbytek globinu His F8 [4].



Obrázek 3 - 3D projekce struktury hemoglobinu, zeleně je zvýrazněn hem [10]

Převzato z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3d/1GZX_Haemoglobin.png/274px-1GZX_Haemoglobin.png

Primární funkcí hemoglobinu (Hb) je přenos molekuly kyslíku z plic do periferních tkání a transport CO_2 opačným směrem. Jak bylo zmíněno výše, hemoglobin je tetramer, je tedy schopný rychle (během jedné až dvou sekund) vázat čtyři molekuly kyslíku na centrální Fe^{2+} iont [4; 5]. Pokud však dojde k oxidaci a změně Fe^{2+} na Fe^{3+} , ztratí hemoprotein schopnost vázat kyslík [4]. Bylo popsáno, že při poklesu pH se výrazně snižuje pevnost vazby kyslíku na hemoglobinu [11]. Hemoglobin jako allostetický protein jeví kooperativní vazebnou kinetiku, což je jedinečná schopnost multimerních proteinů. Jedná se o navázání a uvolnění maximálního množství kyslíku [4; 5].

Hb má také důležitou pufrovací funkci, kdy přenášením vodíkového iontu udržuje konstantní pH krve a zamezuje vzniku acidobazické nerovnováhy [4; 12].

2.2 Fyziologické hemoglobiny

Nejzastoupenější je hemoglobin dospělého typu A označovaný jako HbA₁, který má $\alpha_2\beta_2$ řetězce. Dále se minoritně vyskytuje HbA₂ s $\alpha_2\delta_2$. Třetím typem je HbF složený z $\alpha_2\gamma_2$. HbF je fetální hemoglobin, který v okamžik porodu představuje 50-60 % celkového hemoglobinu, avšak vysoké množství šest měsíců po porodu, je patologické. HbF má vyšší afinitu ke kyslíku. V krvi dospělého člověka je HbF nízké [4; 5].

Glykovaný hemoglobin (HbA_{1c}) vzniká neenzymatickou glykací hemoglobinu [5]. Hodnoty glykovaného hemoglobinu se vyjadřují v procentech a hodnota glykované frakce Hb se pohybuje okolo 5 % z celkového množství Hb [5; 13]. Měřením glykovaného hemoglobinu získáme informaci o průměrné glykémii v posledních 6-8 týdnech, což nám pomáhá s léčbou diabetes mellitus [5; 13].

Karboxylhemoglobin (HbCO) vzniká obsazením železa oxidem uhelnatým místo O₂. Vazba oxidu uhelnatého je reverzibilní, ale asi 200krát silnější než vazba s kyslíkem [4; 6]. Zpětná přeměna HbCO na Hb je pomalá, urychluje se hyperbarickým kyslíkem [4]. Vzdávající koncentrace HbCO brzdí schopnost transportu kyslíku do tkání, zpomalí se tím aerobní glykolýza a začne se hromadit laktát a ketolátky [4; 6]. Otrava oxidem uhelnatým může vést až k udušení [4].

Separace jednotlivých forem hemoglobinu se nejčastěji provádí pomocí iontoměničové chromatografie, nebo elektroforézy v agarózovém gelu v kyselém prostředí [5; 13].

Tabulka 1 - Fyziologické hemoglobiny člověka [5]

Ontogeneze	Typ Hb	Polypeptidové řetězce
Plod	HbF	$\alpha_2\gamma_2$
Dítě	↓ HbF	$\alpha_2\gamma_2$
	↑ HbA ₁	$\alpha_2\beta_2$
Dospělý	HbA ₁	$\alpha_2\beta_2$
	HbA ₂	$\alpha_2\delta_2$

2.3 Syntéza a odbourání hemoglobinu

Jak již bylo zmíněno výše, základní stavební jednotkou hemoglobinu je hem.

Tvorba hemu probíhá ve skoro všech živočišných buňkách obsahující mitochondrie. Největší tvorba hemu je ve vývojových stádiích erytrocytů v kostní dřeni, dále pak v hepatocytech [5].

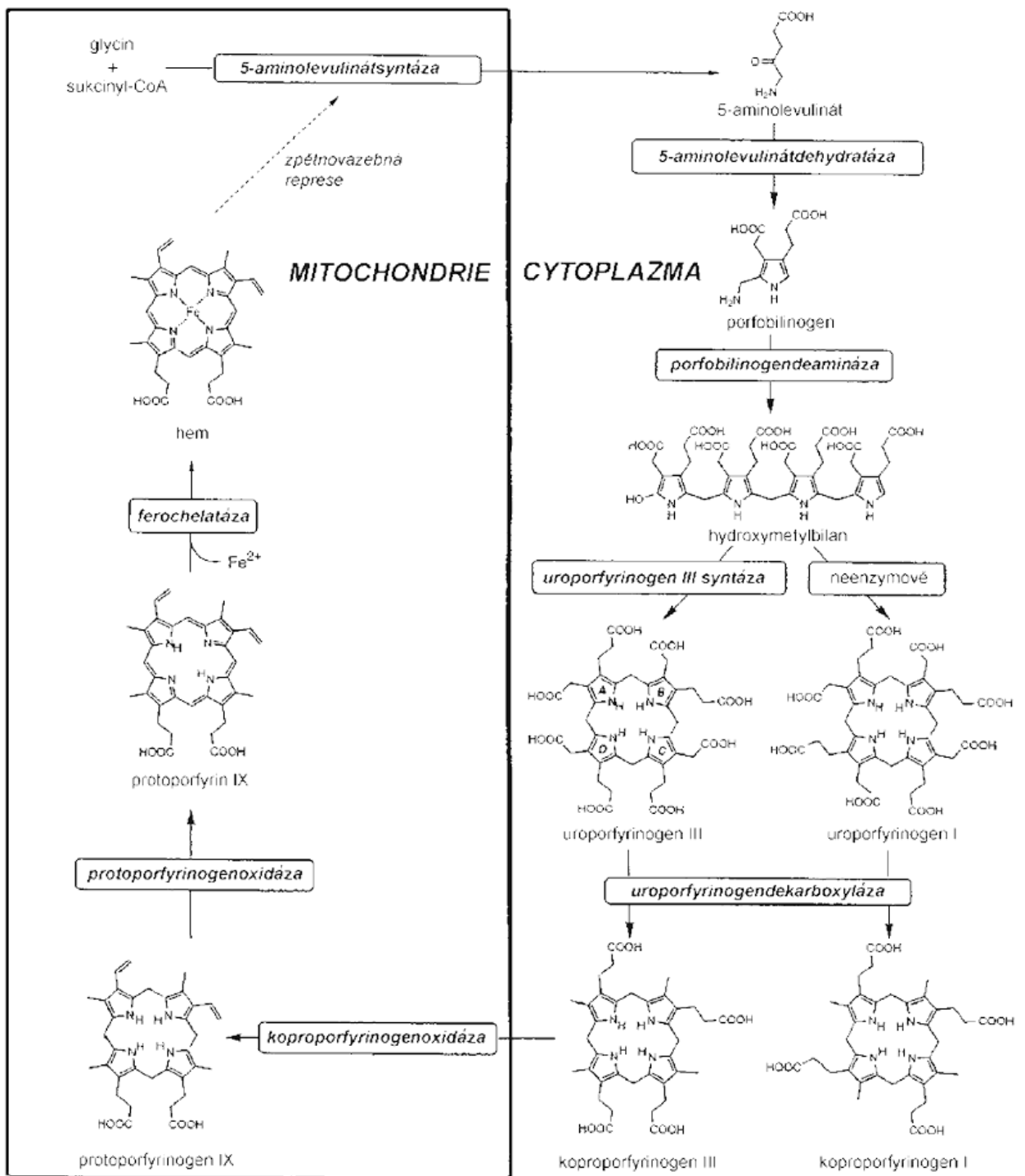
2.3.1 Syntéza hemoglobinu

Syntéza hemu vychází ze dvou látek – sukcinyl-CoA, který pochází z citrátového cyklu neboli Krebsova cyklu, a aminokyseliny glycinu. V mitochondrii je glycin aktivován reakcí s pyridoxalfosfátem za pomoci ALA-synthasy, vzniká tak kyselina α -amino- β -ketoamidová. Ta je následně dekarboxylována za vzniku kyseliny α -aminolevulové (ALA) [4; 5]. Reakce může být inhibována některými léky a je citlivá na nedostatek vitamínu B₆ [6]. Poté se vzniklý α -aminolevulát přesouvá do cytosolu, kde jsou jeho dvě molekuly katalyzovány ALA-dehydratázou za vystoupení vody a vzniku porfobilinogenu (PBG) [4; 5]. Dehydratací se zkonduzovalo pyrrolové jádro a vytvořily se vedlejší řetězce, zbytky kyseliny octové a propionové [4].

Kondenzací čtyř PBG vzniká hydroxymethylbilan (HMB), tato reakce je katalyzována uroporfyrinogenem-I-synthasou. Cyklizace HMB může vzniknout spontánně, kdy vznikne uroporfyrinogen I, nebo enzymaticky, což je nejčastější cesta, kdy vznikne uroporfyrinogen III katalýzou uroporfyrinogen-III-synthasou. Koproporfyrinogen III vznikne dekarboxylací acátových skupin z uroporfyrinogenu III za katalýzy uroporfyrinogendekarboxylasy, která je samozřejmě schopná vytvořit koproporfyrinogen I z uroporfyrinogenu I [5]. Koproporfyrinogen se tedy liší od porfobilinogenu a uroporfyrinogenu strukturou vedlejších řetězců. Na rozdíl od nich neobsahuje zbytky kyseliny octové, ale methyl [4].

Závěrečný úsek syntézy hemu se přesouvá zpět do mitochondrie, kde je vzniklý koproporfyrinogen III katalyzován mitochondriální koproporfyrinogenoxidase. To vede k dekarboxylaci a oxidaci dvou propionových postranních řetězců a vzniku protoporfyrinogenu III obsahujícího ve své struktuře čtyři methyly, dva propionové zbytky a dva vzniklé vinylové zbytky. Oxidace protoporfyrinogenu III na protoporfyrin III, označován také jako protoporfyrin IX, je za pomoci protoporfyrinogenoxidasy [4; 5]. Posledním krokem syntézy je začlenění iontu Fe^{2+} chelátovou vazbou za pomoci ferrochelatasy (hemsynthasy), kdy tímto spojením vznikne hem. Hotový hem pak mitochondrii opustí a zabuduje se do hemoglobinu, myoglobinu, cytochromů a jiných pyrrolových sloučenin [4]. Hemoglobin je pak hlavní součástí erytrocytů.

Souhrn syntézy Hemu naleznete na obrázku 4.



Obrázek 4 - Schéma syntézy hemoglobinu [14]

Převzato z knihy KALOUSOVÁ, Marta. Patobiochemie ve schématech. 1. vydání. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1522-8.

2.3.2 Degradace hemoglobinu

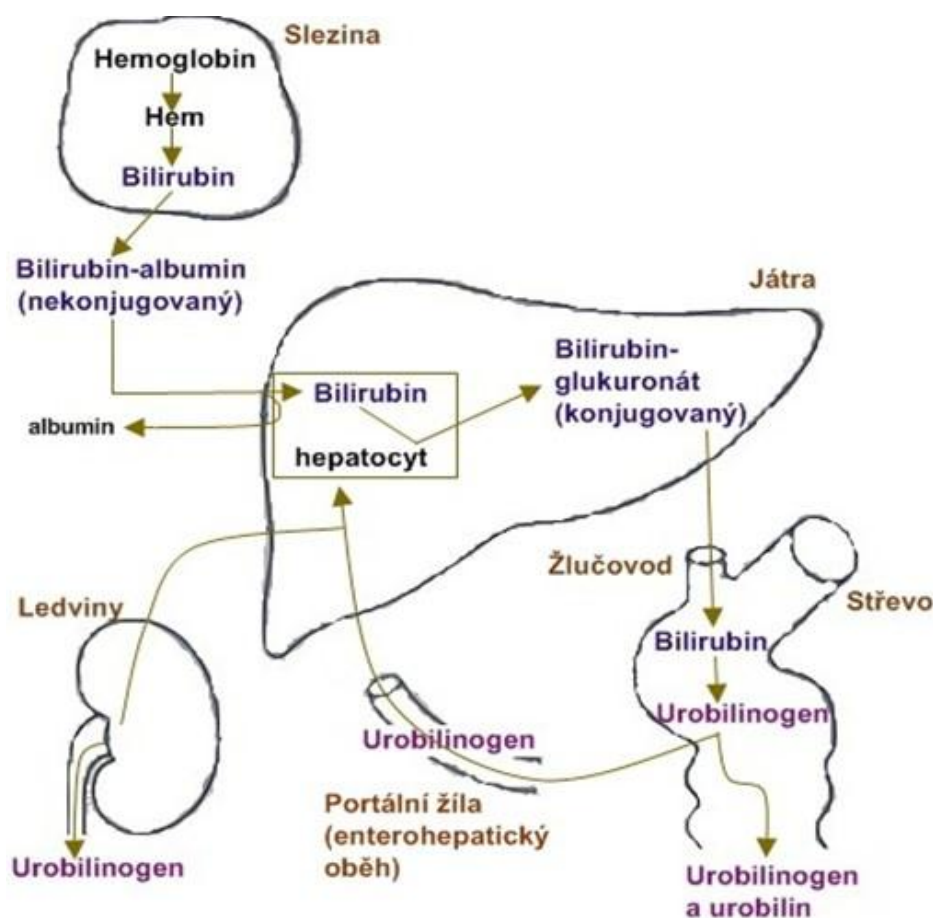
Průměrná životnost erytrocytu od doby, kdy vstoupí do krve jako retikulocyt, je 110 až 130 dní [4; 6]. Poté se erytrocyty rozpadají, místem zániku jsou buňky monocyto-makrofágového systému (MSS) sleziny, kostní dřeně a jater. Jen asi 3-7 % erytrocytů se rozpadá přímo v cirkulaci, kdy se hemoglobin uvolní do plazmy a naváže na haptoglobin. Poté se tento komplex transportuje do jater, kde se odbourává [4]. Odštěpený hem z hemoglobinu v cirkulaci se váže na bílkovinu hemopexin [6].

Hemoglobin je nejdříve rozdělen na globinové řetězce a hem, řetězce jsou hydrolyzovány na aminokyseliny a hem podléhá oxidačnímu štěpení za přítomnosti komplexu enzymů hemoxygenasy s účastí NADPH [4; 6; 12]. Hemoxygenasa oxiduje hem na hemin, uvolňuje železo a současně napadá α -methinový můstek, který spojuje pyrrolová jádra nesoucí vinylové skupiny. Tím se přeruší můstek a tetrapyrrolový kruh se otevře. Je to jediná reakce v těle, která vytváří oxid uhelnatý. Ale v nepatrném množství, které není nebezpečné a snadno se vydýchá plícemi. Rozvolněním tetrapyrrolového kruhu vzniká lineární tetrapyrrol biliverdin, který je zeleně zbarvený [4; 6]. Ten stále obsahuje dvojně vazby [12]. Biliverdin je následně redukován enzymem biliverdinreduktázou na hlavní degradační produkt katabolismu hemu, oranžově žlutý bilirubin [4; 6; 12].

Bilirubin má lipofilní charakter a je tedy špatně rozpustný ve vodě, proto se v krvi transportuje navázaný na albumin krevní plazmy, který ho přenáší ze sleziny a kostní dřeně do jater. Tento komplex je označován jako nekonjugovaný bilirubin. Nekonjugovaný bilirubin se v Disseho prostoru rozpadá na složky a uvolněný bilirubin se váže na transportní proteiny. Díky těmto transportním proteinům je dopraven k endoplazmatickému retikulu, kde dochází ke konjugaci s jednou nebo dvěma molekulami kyseliny glukuronové enzymem UDP-glukoronyltransferázy.

Reakcí vznikne bis-glukosiduronát bilirubinu neboli konjugovaný bilirubin. Ten je následně transportován do žlučových cest a poté se dostává do střev. [4; 12]

Ve střevech je bilirubin dekonjugován, následně činností bakteriální β -glukuronidasy zbaven glukuronátových molekul [4; 12]. Část barviva je absorbována a vrací se zpět do jater, neabsorbované barvivo podléhá redukujícímu působení střevních bakterií, kde je postupnou hydrogenací výsledkem bezbarvý urobilinogen [4]. Část urobilinogenu je resorbována a transportována zpět do jater, odkud se v nízké koncentraci dostává do moče [4; 12]. Vyšší hydrogenací urobilinogenu vzniká sterkobilinogen. Oba produkty se v distálních segmentech střev oxidují na barevné produkty urobilin a sterkobilin. Tato barviva snadno polymerují a způsobují hnědé zbarvení stolice [4].



Obrázek 5 - Degradace hemoglobinu [15]

Převzato z: <http://slideplayer.cz/slide/5643226/>

2.4 Hemoglobinopatie

Mutací genů kódujících řetězce α a β , mohou vzniknout hemoglobinopatie. Jedná se o případy, kde změna řetězce změní funkci hemoglobinu [4; 5]. Některé hemoglobinopatie jsou závažné a mohou vést k úmrtí v embryonálním období [4].

V hemoglobinu S (HbS) je nepolární zbytek Val nahrazen polárním zbytkem Glu6 β -podjednotky, čímž vznikne lepivý úsek. Molekuly agregují v dlouhé fibrilární svazky, prostupující celou délku erytrocytu, čímž ovládají jeho tvar a vytváří místo normálního bikonkávního tvaru tvar srpku [4; 5; 16]. Krvinky tohoto tvaru blokují mikrocirkulaci a tím vzniká infarkt postižených orgánů [16]. Také snadno hemolyzují a mají krátkou dobu života [4]. Hemoglobin S vytváří srpkovitou anémii. Existují dvě formy, homozygotní a heterozygotní [16]. V současnosti můžeme srpkovitou anémii diagnostikovat již prenatálně [4]. Selektivní ochrana proti tropické malárii v důsledku srpkovatění erytrocytů má pozitivní význam pro nositele heterozygotní formy [4; 16]. Tropická malárie vyvolávaná parazitem *Plasmodium malariae* v erytrocytu méně často napadá krvinky s HbS [4].

Thalasémie je dědičné onemocnění s genetickým defektem, které je charakterizováno sníženou nebo chybějící syntézou určitého řetězce – α nebo β [4; 5; 16]. Genetická příčina není zcela jasná. Jedná se o bodové mutace, méně často o delecii globinového genu. U β -thalasémie se jedná s největší pravděpodobností o redukci přepisu DNA do mRNA [16]. Bylo identifikováno na 750 mutací, kde jsou běžné jen tři [5]. α -řetězce jsou syntetizovány 4 různými geny umístěny na 16. chromozomu. Jakákoli porucha jednoho z těchto genů dává za vznik α -thalasémii. Chybění tří genů vytváří chorobu s hemoglobinem H, chybění všech čtyř genů zase vytváří hemoglobin Barts, kde jsou čtyři γ -řetězce. Tento hemoglobin má vysokou afinitu ke kyslíku. Většinou dochází ve 24.-34. týdnu těhotenství k úmrtí plodu [16]. β -thalasémie je většinou způsobena mutacemi regulací 2 genů kódující β -řetězec, které jsou uloženy na krátkém raménku 11. chromozomu.

Rozlišujeme dvě formy podle klinického obrazu, minor a major. Major je homozygotní forma a má těžký klinický průběh. Na rozdíl od ní, minor je heterozygotní forma bez či s lehkým klinickým průběhem [16]. Nejčastější je β -thalasémie tvořená čtyřmi α podjednotkami. Vyznačuje se hypochromní hemolytickou anémií [4].

V hemoglobinu M (HbM) je proximální histidin F8 nahrazen tyrosinem [4; 5]. Železo na hemoglobinu M vytváří těsný iontový komplex s fenolátovým aniontem tyrosinu. Výsledkem je stabilizace formy Fe^{3+} s vytvořením methemoglobinu, který není schopen přenášet kyslík [4; 6; 5]. Vzniká působením některých jedů, jako jsou např. chlorečnany, dusičnany, nitrobenzen a další. Methemoglobinémie může být i dědičná z důvodu deficitu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy [4].

Hemoglobin C (HbC) je autozomálně recesivní dědičné onemocnění, u kterého dochází ke záměně kyseliny glutamové za Lys v β -řetězci. Kvůli mutaci je méně rozpustný a tím snižuje flexibilitu červené krvinky. Vytváří anémii s terčovitými erytrocyty [16].

Existuje mnoho různých druhů onemocnění z hemoglobinu D (HbD), který má stejné vlastnosti jako hemoglobin G (HbG). Z tohoto důvodu nelze tyto dva hemoglobiny od sebe odlišit. Je popsáno asi 11 variant mutací na β -řetězci, méně častější jsou mutace na α -řetězci. Nejznámějším druhem hemoglobinu D je HbD Los Angeles a HbD Punjab, u hemoglobinu G je to HbG Philadelphia [17].

Hemoglobin E (HbE) je klinicky podobný thalasémii minor. V Evropě se před příchodem migrantů z jihovýchodní Asie nevyskytoval [16].

Tabulka 2 - Souhrn defektních hemoglobinů [17]

Defektní hemoglobin	Mutace
Hemoglobin S	$\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}}$
Thalasémie	α^0/α^+ nebo β^0/β^+
Hemoglobin H	α
Hemoglobin Barts	β_4
Hemoglobin M	$\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$
Hemoglobin C	$\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}}$
Hemoglobin D	$\alpha_2\beta_2^{121\text{Glu}\rightarrow\text{Gly}}$
Hemoglobin E	$\alpha_2\beta_2^{26\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}}$

2.5 Hemoglobin a vyšetření stolice

2.5.1 Vyšetření stolice

Komplexní vyšetření stolice je často první diagnostickou metodou k vyšetření nejen gastrointestinálního systému, ale i jiných, díky její neinvazivnosti [18; 19]. Jedná se o makroskopické posouzení, stanovení objemu, struktury, pH a analytické stanovení laboratorních markerů. Dříve bylo největší problematikou vyšetření vysoké riziko preanalytické chyby [19].

Klinicky nejčastější je stanovení změny barvy stolice. Zde můžeme rozlišovat melénu, kdy je ve stolici přítomna natrávená krev a stolice má černou dehtovitou konzistenci. Dále potom enterorhagie, kdy je ve stolici přítomna čerstvá krev, acholická stolice žluté až bílé barvy v důsledku absence žlučových barviv, steatorhae, objemná, kašovitá a nepříjemně zapáchající stolice způsobená nadměrným množstvím nenatrávených tuků a v neposlední řadě hlen ve stolici, který je často prvním příznakem nespecifického střevního zánětu [18].

Pro stanovení struktury stolice se využívá Bristolská škála, která rozděluje strukturu do sedmi skupin: [18]

1. oddělené, tvrdé hrudky (bobky), podobné ořechu
2. tvar jitrnice s naznačeným hrudkováním
3. tvar jitrnice s rýhami na povrchu
4. tvar jitrnice či hada, vyhlazená na povrchu
5. hladké hrudky, jasně oddělené okraje
6. kypré částičky s členitými okraji, kašovitá stolice
7. vodnatá, bez pevných kousků

Rozvoj analytických metod nabídl široký rozsah analytů, které můžeme stanovovat ve stolici. Jedná se např. o průkaz antigenu *Helicobacter pylori*, kvantitativní stanovení hemoglobinu, kalprotektinu, lactoferinu, amylázy, chymotrypsinu či elastázy-1 [18; 19].

Kromě aspekce stolice a chemického vyšetření na enzymy a protilátky, můžeme stolici vyšetřit i na bakterie a parazity. Bakteriologické kultivační vyšetření prokazuje běžnou bakteriální flóru, ale i patogenní agens infekčních průjmů [18]. Nejčastějšími původci infekčních průjmů jsou *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia Coli*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* či *Clostridium difficile* [18; 20]. Parazitologické vyšetření se provádí z nativního vzorku. Mikroskopicky můžeme zachytit vajíčka helmintů nebo cysty prvoků [18].

2.5.2 Vyšetření zánětlivých biomarkerů ve stolici

Kalprotektin je vazebný protein z cytosolu neutrofilních leukocytů s antimikrobiální aktivitou. Jedná se o marker, stanovovaný ve stolici, vhodný k diagnostice střevních onemocnění, jako je ulcerózní kolitida, Crohnova nemoc či nekrotizující enterokolitida u dětí [19; 21]. Stanovení zabraňuje zbytečným kolonoskopiím [22]. Kalprotektin se rovněž stanovuje u kolorektálního karcinomu,

kdy se jeho hodnoty vždy stanovují společně s koncentrací hemoglobinu ve stolici [19].

Jako další marker zánětlivých onemocnění lze stanovit **lactoferin**, který má mnohem vyšší senzitivitu než kalprotektin. Pro stanovení kalprotektinu i lactoferinu existují již komerčně připravované ELISA testy a rapid-testy [19]. Stanovení fekálního kalprotektinu je využíváno na rozlišení pacientů s idiopatickými střevními záněty (IBD) a pacienty se syndromem dráždivého tračníku (IBS). Pacienti s IBD mají koncentraci vyšší než pacienti s IBS. U dětí je koncentrace fekálního kalprotektinu oproti dospělým zvýšená [22]. Výsledky studií ukazují, že stanovení kalprotektinu ve stolici je senzitivní i specifický marker sledující riziko relapsu ulcerózní kolitidy. Pro Crohnovu chorobu je marker senzitivní, nikoli dostatečně specifický [21].

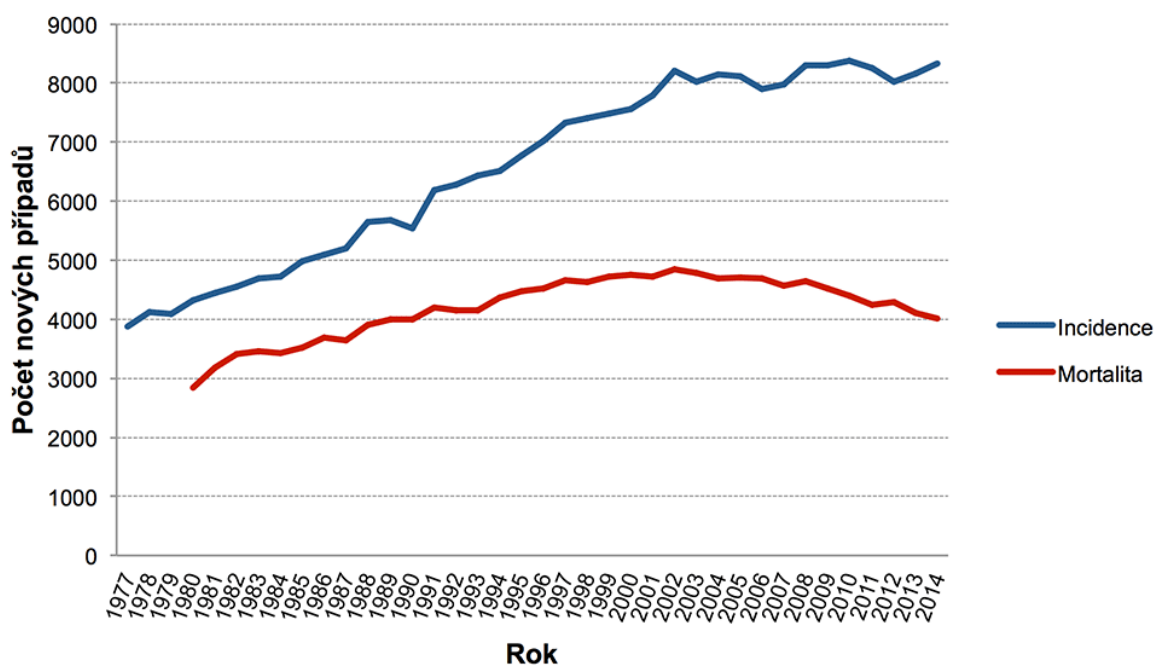
2.5.3 Stanovení hemoglobinu ve stolici

Indikace stanovení hemoglobinu ve stolici je často kvůli krvácení do gastrointestinálního traktu, ať už z horní či dolní části traktu. Při podezření na skryté neboli okultní krvácení, způsobené vředem, nádorem, polypem ale i bakteriální infekcí, prokazujeme ve stolici přítomnost celé krve nebo hemoglobinu z rozpadlých erytrocytů [23]. Tato podkapitola je zaměřena na krvácení do gastrointestinálního traktu a kolorektální karcinom, jeho incidenci a diagnostiku.

2.5.3.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (KRK) je jedním z nejčastějších zhoubných nádorů ve vyspělých zemích. Česká republika byla již desetiletí řazena mezi přední místa v mezinárodních srovnáních v incidenci a mortalitě kolorektálního karcinomu [24; 25; 26]. Česká tisková kancelář (ČTK) vydala v lednu 2018 zprávu, že Česká republika už nemá nejvyšší výskyt kolorektálního karcinomu na světě díky

screeningovému vyšetření za pomoci, kterého jsme klesli ve výskytu na 6. příčku a v úmrtnosti na 11. příčku [27].



Obrázek 6 - Incidence a mortalita pacientů se zhoubným novotvarem (ZN) tlustého střeva, rektosigmoideálního spojení, konečníku, řiti a řitního otvoru [28]

Převzato z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-cr>

KRK je multifaktoriální onemocnění, kde hraje důležitou roli genetický podklad, ale i střevní mikrobiota [24; 26]. V gastrointestinálním traktu dospělého člověka je cca 100 triliónů mikrobiálních buněk. Z toho je asi 800 druhů bakterií a zde vzniká problém laboratorní kultivace, pomocí které můžeme identifikovat kolem 80 % mikrobiálních druhů. Proto se v současnosti nahrazují kultivační metody metodami molekulárně genetickými, které jsou založené na hodnocení sekvence 16S rRNA bakteriálních genů [26].

Kolorektální karcinom se vyskytuje sporadicky. Udává se, že přibližně 10 % pacientů je nositelem dědičného genetického syndromu [25; 2]. Nejčastěji je zastoupen Lynchův syndrom, jinak nazývaný nepolypózní kolorektální karcinom [2]. „Jedná se o dědičné onemocnění způsobené zárodečnými mutacemi mismatch repair

(MMR) genů (MSH2, MLH1, PMS1 a PMS2), které za normálních podmínek opravují chyby vzniklé při replikaci DNA.“ [2, s. 243] Další familiární formou nádoru je adematózní polypóza, která se bez léčby vyvine v kolorektální karcinom [2].

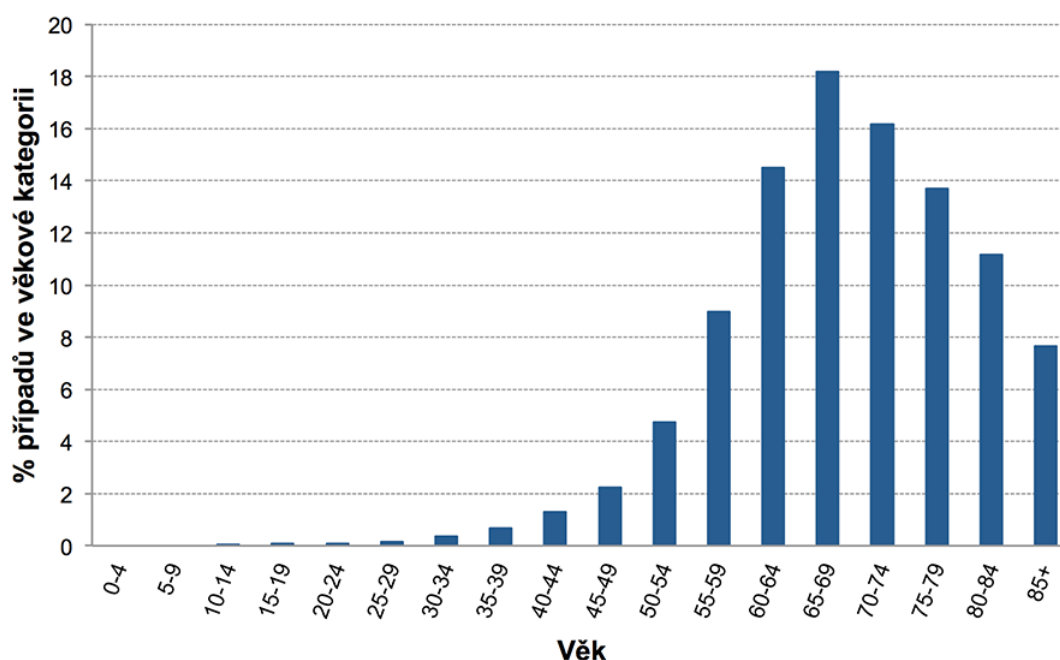
Kromě genetického podkladu a střevní mikrobiotě se uplatňují i vnější faktory, způsob života a dietní zvyklosti, zejména zvýšený podíl živočišných tuků v potravě, smažené potraviny, nedostatek vápníku v potravě, chemické látky v podobě léků, nedostatek pohybu, kouření, alkohol a další faktory. Zvýšené riziko je i u pacientů trpící diabetes mellitus 2. typu [25; 29]. Při vzniku KRK u pacientů diabetes mellitus 2. typu je rizikovým faktorem inzulinová rezistence. Inzulin, kromě toho, že snižuje hladinu cukru v krvi, se také podílí na stimulaci proliferace buněk kolorektálního karcinomu. Je popsána také významná role růstového faktoru IGF-1 v kancerogenezi [29].

Jsou známy také protektivně působící faktory, například pravidelná fyzická aktivita, konzumace rybího masa a tuku, dostatečný příjem kalcia a vitamínu D. Příznivý vliv má i suplementace folátu, methioninu, vitamínu C a dalších látek [29].

V procesu malignizace dochází k přeměně normální sliznice tlustého střeva na karcinom. Kancerogeneze trvá 8-10 let a díky screeningovým metodám můžeme zachytit premaligní stadia neboli adenomy a zabránit vzniku karcinomu [24].

Kolorektální karcinom je u dětí vzácný a představuje méně než 1 % dětských nádorů. Dvakrát častěji jsou postiženy dívky než chlapci, na rozdíl od dospělých pacientů. Pacienti bývají starší 10 let, nicméně byl kolorektální karcinom popsán i u 9 měsíčního dítěte. U dětských pacientů je vysoká úmrtnost, 12-40 %. Příčinou je především pozdní diagnóza a také častější diagnostika histopatologických subtypů kolorektálního karcinomu, adenokarcinom mucinózní nebo karcinom z prstenčitých buněk [2].

U dětí a dospívajících pacientů bývají postiženy všechny části tlustého střeva rovnoměrně, postižení většinou sestupného tračníku a rekta převládá u dospělých pacientů [2].



Obrázek 7 - Věková struktura pacientů se ZN tlustého střeva, rektosigmoideálního spojení, konečníku, řiti a řitního kanálu [28]

Převzato z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-cr>

2.5.3.2 Screening kolorektálního karcinomu

Screeningové metody byly definovány v roce 1940 pro identifikaci nerozpoznatelných nemocí za pomoci aplikace jednodušších procedur. [30] V letech 1979–1984 byly provedeny první studie s g-FOBT testem. V České republice je screening kolorektálního karcinomu od roku 2003 součástí národního programu onkologického screeningu a od roku 2014 bylo vyšetření modifikováno na populační screening pro kolorektální karcinom [24].

„Cílem screeningu je snížit morbiditu i mortalitu na sledované onemocnění.“ [25, s. 38] Plošný screening kolorektálního karcinomu je založen buď na testech okultního

krvácení do stolice, nebo na primární screeningové kolonoskopii. Lidé ve věku 50-54 let mohou u svých praktických lékařů dostat test na okultní krvácení do stolice, vyšetření by se mělo provádět jednou ročně. Lidé starší 55 let si mohou, podle doporučení jednou za dva roky, nechat provést test na okultní krvácení. Druhou možností této věkové skupiny je provedení primární screeningové kolonoskopie, kterou stačí provést jednou za deset let. [25]

Primární screening kolonoskopie se zavedl v roce 2009. Provádí se jen na akreditovaných pracovištích. Při negativním nálezů se další vyšetření odkládá na 10 let. Při pozitivním nálezů se postupuje podle lékaře a výsledků histopatologického vyšetření [25].

2.5.3.3 Diagnostika kolorektálního karcinomu

Při podezření na kolorektální karcinom se provádí mnoho vyšetřovacích metod. Kompletní krevní obraz, biochemické vyšetření a kolonoskopie, protože je nutné histopatologické vyšetření tkáně. U biochemického vyšetření se včetně jaterních enzymů vyšetřují i specifické nádorové markery, především karcinoembryonální antigen (CEA) a karbohydrátový antigen (CA 19-9), nicméně nejsou nádorové markery tolik specifické pro stanovení diagnózy [2]. *„Nádorové markery mohou sloužit k monitoraci onemocnění a včasnému zachytu, i když Angel a spol. konstatuje, že CEA není vhodný marker u dětí. U 9 z 23 pacientů v jeho skupině nekorespondovaly hladiny CEA s reziduální nemocí či s progresí onemocnění.“* [2, s. 242]

Mezi další kompletní vyšetření patří rentgen hrudníku, břicha a pánve, dále scintigrafie skeletu. Při podezření se využívá i sonografie, počítačová tomografie a magnetická rezonance [2].

U metastatických pacientů s kolorektálním karcinomem se v současné době provádějí molekulárně genetická vyšetření tkáně. Jedná se o mutační stav rodiny onkogenů RAS, K-ras a N-ras [2].

2.5.4 Krvácení do gastrointestinálního traktu

Krvácení do gastrointestinálního traktu (GIT) se může vyskytnout kdekoli, a proto je diagnóza a lokalizace obtížná [3]. Krvácení rozlišujeme na akutní, trvající nejdéle tři dny, a chronické, kdy se jedná o pomalou ztrátu krve [31]. U krvácení do gastrointestinálního traktu rozlišujeme krvácení do horní a dolní části traktu a za formální rozhraní je považován duodeno-jejunální přechod, tzv. Treitzovo ligamentem [32; 33].

2.5.4.1 Krvácení do horní části gastrointestinálního traktu

Krvácení do horní části gastrointestinálního traktu je život ohrožující stav, jedná se o akutní typ krvácení. Také je to nejčastější akutní příhoda v gastroenterologii. Mezi hlavní příznaky akutního krvácení patří zvracení čerstvé nebo natrávené krve, nazývané jako hematemeze a meléna, stolice černé barvy dehtovitě zapáchající, kdy je nutná minimální ztráta 50-100 ml krve. Při větší ztrátě krve, až 1 000 ml, se jedná místo melény o enteroragii, kde je krev čerstvá a nenatrávená [32; 33]. Další příznaky krvácení bývají často nenápadné, jedná se např. o synkopy, presynkopy, difuzní bolesti břicha, bolest epigastria a další [32].

Nejčastějšími onemocněními způsobující krvácení do horní části gastrointestinálního traktu bývají onemocnění jícnu, žaludku nebo dvanáctníku. [33] Asi polovinu případů způsobují vředové choroby gastroduodena, kolem 15 % se jedná o léze jícnu, přesněji o refluxní ezofagitidu a Mallory-Weissův syndrom [32; 33]. Časté je krvácení z jícnových, vzácněji z žaludečních varixů [33]. Jícnové varixy vznikají asi u poloviny pacientů s jaterní cirhózou [32]. Nádory a angiodysplazie horní části gastrointestinálního traktu tvoří vzácné případy [33].

Vředová choroba gastroduodena je léta spojována s agresivním vlivem žaludeční kyseliny chlorovodíkové, kdy je ale známo, že její přítomnost není příčinou vzniku vředu, ale podmínkou. Peptický vřed je slizniční defekt vyskytující

se v trávicí trubici tam, kde je přítomna tato kyselina. Významnou roli při vzniku zánětu sliznice, takzvané gastritidy, je bakterie *Helicobacter pylori*. Hlavní komplikací při tomto onemocnění je právě krvácení do gastrointestinálního traktu projevující se buď jako hemateméze, nebo jako meléna. Častými komplikacemi jsou i penetrace do okolí, perforace do dutiny břišní či stenózy a obstrukce pylorického kanálu [34; 35].

Refluxní ezofagitida je onemocnění patřící do skupiny dysmotilit trávicí trubice. Je způsobené gastroezofageálním refluxem, kdy se jedná o nezávislý tok žaludečního obsahu do jícnu. U novorozenců a kojenců je to běžný fyziologický proces umožňující odřihnutí, postupně ale s věkem ustupuje. Může ale dojít k poškození sliznice jícnu nebo respiračního traktu a začít se rozvíjet refluxní choroba jícnu. To může vést k zánětu sliznice jícnu. U dětí se může refluxní choroba jícnu projevit jako život ohrožující událost, nebo syndrom náhlé smrti. Diagnóza je stanovena na základě anamnézy, doplněna o endoskopii a biopsii [34; 36].

Mallory-Weissův syndrom je krvácení z lacerace sliznice v ezofagogastrické oblasti následkem opakovaným úporným zvracením, kdy se poškodí sliznice kardie, což manifestuje ve zvracení krve nebo přítomnost krve ve stolici. Prognóza je dobrá, mortalita je nízká a recidiva raritní. Velkou komplikací je vznik masivního krvácení, který by pacienta ohrožoval na životě, proto je léčba založena na řešení problému, který vede ke vzniku tohoto onemocnění [34; 37].

Krvácení z varixů žaludku, asi 5 % všech případů krvácení, je klinicky závažnější než krvácení z jícnových varixů, které jsou prudké a běžně recidivují, z důvodu anatomicky obtížných podmínek pro úspěšnou endoskopickou léčbu [34]. Jícnové varixy bývají často projevem portální hypertenze v pokročilém stadiu, riziko krvácení je závislé na velikosti a místě uložení, hodnotí se i portální tlak [38].

2.5.4.2 Krvácení do dolní části gastrointestinálního traktu

Krvácení do dolní části gastrointestinálního traktu může být chronické i akutní. Chronické krvácení se projevuje pozitivním testem na okultní krvácení a hypochromní anémií. Příčinami krvácení do dolní části gastrointestinálního traktu jsou často divertikly, ischemie, idiopatické střevní záněty, angiodysplazie dolní části gastrointestinálního traktu a tumory [39].

Divertikulární nemoc tračníku představuje 20-40 % krvácení do dolní části gastrointestinálního traktu. Obvykle se krvácení spontánně zastaví, pokud ne, může toto onemocnění představovat život ohrožující stav. Divertikulární nemoc tračníku je lokalizována častěji v levé polovině tračníku. Děti jsou častěji postiženy Meckelovým divertiklem, kdy u 2-6 % obsahuje divertikl atopickou žaludeční sliznici, a to vede ke vzniku peptického vředu a krvácení [39; 40]. Meckelův divertikl je nejčastější vrozenou anomálií tenkého střeva. Příčinou vzniku je chybná obliterace ductus omphaloentericus v embryonálním období [40].

Angiodysplazie působí mnohem častěji chronická krvácení místo akutních. Onemocnění je lokalizováno nejčastěji v pravé polovině tračníku a často se objevuje u pacientů s koagulopatií a trombocytopenií [39].

Nejčastějšími anorektálními onemocněními jsou hemoroidy, které jsou u pacientů mladších 40 let zdrojem chronického krvácení. Krev se objevuje jasně červená, dalším příznakem je svědění v oblasti konečníku [39]. Dalším onemocněním jsou anální fisury, jinak anální trhliny. Tyto trhliny jsou častými příčinami krvácení z konečníku u dětí. Jedná se o povrchové poranění sliznice anu, často způsobeno tuhou stolicí nebo náhlým roztažením análního kanálu. Fisury jsou charakteristicky bolestivé [39; 41].

Záněty střev rozdělujeme na infekční a neinfekční střevní záněty známé etiologie, dále nespecifické střevní záněty, jinak zvané idiopatické a v neposlední řadě se sem řadí syndrom dráždivého tračníku. Nejčastějšími příznaky střevních zánětů jsou průjmy, zácpy a plynatost, často s přítomností krve. Nejtypičtější jsou zánětlivé průjmy, tzv. exudativní, kdy příčinou je strukturální poškození sliznice a tedy vznik zánětu. Infekční střevní záněty známé etiologie jsou stafylokokové enteroxikózy, kambylobakteriόzy, klostridiové enterotoxikόzy, salmonelόzy a další onemocnění. Onemocnění salmonelόzou a kampylobakteriόzou se vyskytují převážně u dětí [20; 42; 43]. Pod neinfekční střevní záněty známé etiologie patří střevní poškození jako radiační kolitida a diverzní kolitida. Dále sem patří postižení střeva při kardiopulmonální insuficienci, při AIDS a při portální hypertenzi. V neposlední řadě i další druhy kolitid, například ischemická kolitida, přechodná kolitida, alergická kolitida a neutropenická kolitida [43].

Infekční kolitidy doprovází průjmovité stolice s příměsí krve, které jsou způsobeny nejčastěji *Salmonellou species*, *Shigellou species*, *Campylobacter jejuni* a *Yersinii enterocoliticou*. Rotavirové infekce se vyskytují u dětí od 3 do 5 let [20; 39].

Mezi idiopatické střevní záněty patří ulcerózní kolitida, Crohnova choroba a dále jejich přechodný tvar označovaný jako neurčitá kolitida. První dvě onemocnění způsobují krvácení do stolice s průjmovým onemocněním, dále bolest břicha a malnutrici. [39; 44] Jedná se o střevní zánětlivá onemocnění postihující trávicí trakt. V současnosti je všeobecně přijímám názor, že tato onemocnění vznikají kvůli porušení geneticky determinované slizniční rovnováže, způsobené vnějším spouštěčem. Ulcerózní kolitida je hemoragický zánět sliznice tračníku, který se rozděluje podle rozsahu na různé podtypy. U dětí je nejčastějším podtypem pankolitida, kdy se jedná o extenzivní postižení tlustého střeva. Crohnova choroba je segmentární granulomatózní zánět celé stěny trávicího traktu [44; 45].

V neposlední řadě spadá pod střevní záněty syndrom dráždivého tračníku. Jedná se o onemocnění definované jako funkční střevní poruchu, u které se objevují břišní bolesti spojeny s problémy vyprazdňováním [42].

Klinicky patrné krvácení způsobené karcinomem gastrointestinálního traktu je často umístěné v levé polovině tračníku [39]. U dětí jsou časté neuroendokrinní nádory, non-Hodgkinové lymfomy, sarkomy, kdy se jedná především o gastrointestinální stromální nádor, a kolorektální karcinomy [46].

Neuroendokrinní nádory u dětí mají obvykle benigní chování. Gastrointestinální stromální nádory jsou lokalizovány v žaludku a primární abdominální non-Hodgkinův lymfom, který patří mezi nejrychleji rostoucí nádory, je lokalizovaný v oblasti céka a dobře reaguje na systémovou chemoterapii [46].

Příčiny krvácení do gastrointestinálního traktu se odlišují podle věku, v kojeneckém věku se objevují bakteriální enteritidy, alergie na bílkovinu kravského mléka či anální fisury. U starších dětí jsou hlavními příčinami bakteriální enteritidy, jícnové varixy, peptické vředy, střevní polypy nebo např. Meckelův divertikl. Mezi hlavní příčiny u adolescentů patří znovu bakteriální enteritidy, dále chronické střevní záněty, polypy, vředy nebo koagulační poruchy [3].

2.6 Analytické metody stanovení hemoglobinu ve stolici

Analytické metody pro stanovení můžeme rozdělit podle báze detekce na chemické, kam patří guajakový test a dále pak na imunochemické. Dle principů je můžeme členit na chemické, imunochemické a stanovení hemoporfyrinu [47].

Tabulka 3 - Porovnání guajakového a imunochemického testu [48]

Druh testu	Cena	Odběr	Dietní opatření	Interference s léky	Specifita	Senzitivita
Guajakový	nižší	složitější	ano	ano	90-98 %	35-80 %
Imunochemický	vyšší	jednodušší	ne	ne	okolo 95	70-90 %

2.6.1 Chemická stanovení

Sem řadíme guajakový test (g-FOBT) jako test 1. generace. Ten je založen na pseudoperoxidázové reakci hemoglobinu, částečně natráveného proteolytickými enzymy, s guajakovou pryskyřicí za přítomnosti peroxidu vodíku, kdy se tato pryskyřice reakcí mění z redukované bezbarvé formy na modrou oxidovanou formu [48; 49; 50].

Hodnocení tohoto testu je jen kvalitativní, a aby nedošlo k problémům s interferencí s rostlinnou peroxidázou, je vhodné test provést po 72 hodinách od odběru [48; 49]. g-FOBT reaguje s jakoukoli peroxidázou, která je přítomná ve stolici. Jde právě například o již zmiňovanou rostlinnou peroxidázu [48]. Test není schopen detekovat žádný z degradačních produktů hemu vznikajících ve střevech [50].

Falešně pozitivní výsledek může být pozorován u pacientů, kteří zkonsumovali větší množství červeného masa či některých léků. Naopak falešně negativní výsledek byl pozorován při konzumaci většího množství kyseliny askorbové [48]. Před testováním musí být pacient seznámen s příslušnou dietou, aby k těmto falešným výsledkům nedocházelo [49].

Tento test má nízkou senzitivitu k pokročilým adenomatózním polypům a karcinomům, k tomu má i nízkou specifitu k lidskému hemoglobinu [49]. I přesto se test pro svou ekonomičnost využívá pro plošný screening kolorektálního

karcinomu u dospělých. V případě positivity testu je indikována kolonoskopie [47]. Nejrozšířenějším typem je Haemoccult, který má senzitivitu okolo 50 % a specifitu kolem 98 % [50]. Od roku 2010 je postupně Haemoccult nahrazován senzitivnějším FIT testem [1].

2.6.2 Imunochemická stanovení

Pod imunochemická stanovení spadají testy 2. a 3. generace. Tato stanovení nejvíce využívají specifický lidský hemoglobin. Přesněji metody stanovují hemoglobin s polyklonální protilátkou k lidskému hemoglobinu. Zpočátku se imunochemická stanovení prováděla ELISou (enzyme-linked immunosorbent assay) či dvojitou imunodifuzí. Před asi deseti lety se vyvinuly nové metody jako je hemaglutinace a latexová imunoprecipitace. Často je také užívána metoda imunoafinitní chromatografie, ta je založena na interakci antigenu s protilátkou, která je imobilizována na sorbentu [47]. Detekce specifickou protilátkou eliminuje vlivy jiných zdrojů jako je například hemoglobin v potravě, díky tomu jsou testy specifitější [47; 50].

Po imunochemické reakci se test vyhodnocuje buď kvalitativně v případě využití home kitu, kdy se jedná o testovací sadu s barevným proužkem, nebo kvantitativně za pomoci analyzátoru, kdy se často proměřuje za pomoci turbidimetrie [47]. Analyzátory mají nastavené své rozhraní mezi normálními a patologickými hodnotami, takzvanými cut-off values. Tyto hodnoty odpovídají citlivosti daného analyzátoru a mohou se tím pádem lišit [48].

Problematika stanovení optimální cut-off hranice pro kvantitativní imunochemické stanovení se řeší po celé Evropě [24]. Právě toto nastavení zvyšuje citlivost a specifitu testu. Dříve se hodnoty vyjadřovaly koncentrací hemoglobinu v detekčním pufru, tedy ng/ml. Pro porovnání positivity výsledků provedených rozdílnými odběrovými kazetami, bylo nutné přepočítávat hodnoty koncentrace

na $\mu\text{g Hb/g}$ stolice. Tato jednotka byla později doporučena ČSKB jako klinicky významná a od roku 2015 je vyžadována v systému externí kontroly kvality [51].

Vyskytuje se řada souprav pro kvantitativní stanovení hemoglobinu ve stolici, např. jednokrokový test na stanovení okultního krvácení ve stolici (TOKS) od společnosti SureScreen Diagnostics Ltd., kvantitativní stanovení hemoglobinu ve stolici v odběrové nádobce OC-Auto Sampling od Dialab spol. s r.o. za pomoci analyzátoru OC-Sensor μ od společnosti Eiken Chemical Co., Ltd., nebo odběrová nádobka FOB Gold test od společnosti Sentinel Diagnostics [52; 53; 54].

Jednokrokový test na stanovení okultního krvácení ve stolici (TOKS) je kvalitativní chromatografický imunotest. Membrána na testovací linii je potažena protilátkami proti hemoglobinu, se kterými vzorek reaguje. Směs migruje kapilárním vztlínáním po membráně. Pozitivita se projeví přítomností barevné čáry v testovací zóně, opakem je projev negativy testu. Přítomnost barevné čáry v kontrolní zóně je nutností. Značí to správné provedení testu [52].

V mé práci se bude využívat kvantitativní imunochemické stanovení hemoglobinu s latexovou aglutinací na bázi turbidimetrie přístrojem OC-Sensor μ . Princip stanovení můžete nalézt v metodice, kapitola 4.

2.6.3 Stanovení Hemoporfyrinu

Tyto testy jsou řazeny do kategorie testů s detekcí na chemické bázi. Stanovení je založeno na detekci porfyrinů, takže detekují jak nezměněný hem, tak jeho degradační produkty. Stanovení hemoporfyrinu umožňuje kvantitativní stanovení hemoglobinu ve stolici, ale v praxi se nevyužívá často kvůli ekonomické nákladnosti a způsobu detekce na principu fluorescentní spektrofotometrie [47; 50]. Porfyrinovým testem je např. HemoQuantTM založený na detekci hemoporfyrinu silně absorbujícího při 420 nm s fluorescencí při 653 nm. Studie prokázaly,

že HemoQuant™ má větší spolehlivost než Haemoccult při krvácení z horní části gastrointestinálního traktu [55].

3 CÍL PRÁCE

- Stanovení koncentrace hemoglobinu ve stolici u dětí a adolescentů kvantitativní imunochemickou metodou na automatickém analyzátoru OC-Sensor.
- Porovnání koncentrací hemoglobinu ve stolici u jednotlivých diagnóz a porovnání získaných výsledků s dostupnými literárními údaji.

4 METODIKA

4.1 Charakteristika souboru pacientů

Do studie bylo zařazeno 201 vzorků od dětských a adolescentních pacientů. Věkové rozmezí souboru pacientů bylo 1 měsíc až 18 let, průměrný věk 11 let. Skupinu pacientů tvořilo 101 dívek (průměrný věk 12 let, věkové rozmezí 1 měsíc až 18 let) a 100 chlapců (průměrný věk 11 let, věkové rozmezí 3 měsíce až 18 let). Pacienti byli dále rozděleni do dvou skupin (pacienti s onemocněním GIT a pacienti ostatní – bez gastrointestinálních onemocnění (neGIT)). Skupinu s GIT onemocněním tvořilo 75 pacientů, s neGIT onemocněním 126 pacientů.

Ve druhém experimentu byli pacienti rozděleni do čtyř podskupin podle diagnóz. První skupinu tvořilo 22 pacientů s nespecifickým střevním zánětem (např. ulcerózní kolitida, neurčitá kolitida). Druhou skupinu tvořilo 12 pacientů s krvácením z gastrointestinálního traktu (např. krvácení z řiti a konečníku, krvácení ze žaludku a střev). Třetí skupinu tvořilo 12 pacientů s akutní gastroenteritidou (např. zvracení, nespecifická gastroenteritida). Čtvrtou skupinu tvořilo 29 pacientů s jiným onemocněním gastrointestinálního traktu (např. nemoc střev, nemoc jater).

4.2 Stanovení hemoglobinu ve stolici za pomoci imunochemické metody s latexovou aglutinací na bázi turbidimetrie

Test je založen na latexové aglutinační reakci. Latexové činidlo je připraveno senzibilizací anti-h-HbA₀ protilátek na polystyrenových částicích, které jsou potaženy latexem. Když toto činidlo s protilátkami smícháme se vzorkem, začne jejich reakce s hemoglobinem za vytvoření latexového agregátu [56].

Změna absorbance za jednotku času je přímo úměrná koncentraci hemoglobinu ve vzorku [56].

4.2.1 Charakteristika metody

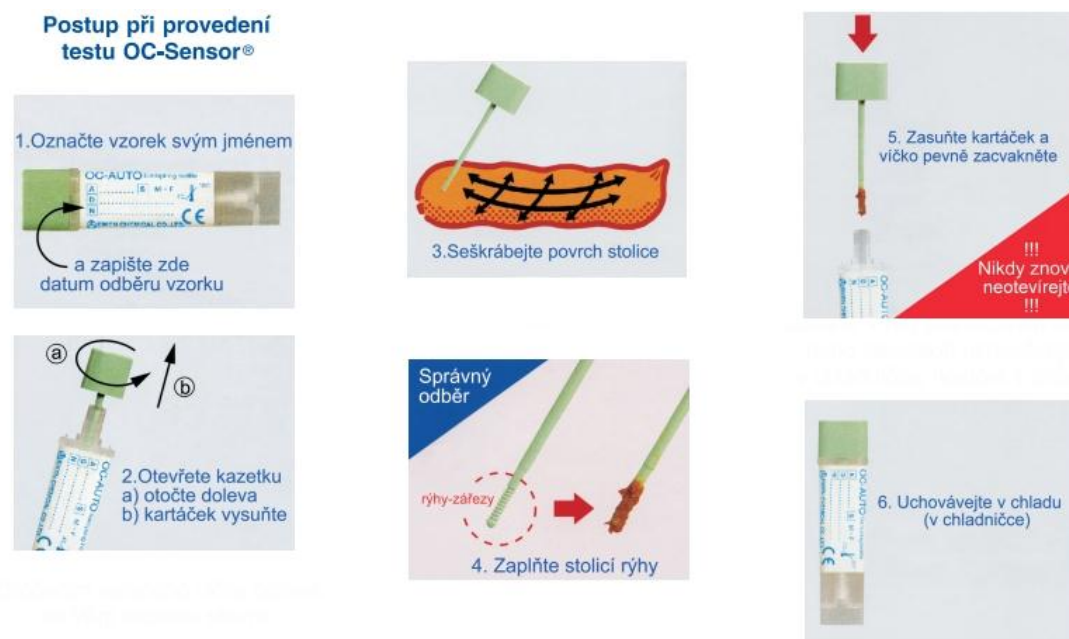
Rozsah měření je 50–1000 ng/ml čili 10–200 µg Hb/g stolice [56]. Analytické znaky metody byly verifikovány na dvou hladinách kontrol firmy Dialab (OC-Control LV1 a OC-Control LV2) [57].

Analytické charakteristiky metody jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 – Analytické charakteristiky metody a výsledky kontrolního materiálu [57]

	Hladina 1 (OC Control LV1) střední hodnota = 148,5 ng/ml (rozpětí 122-190)	Hladina 2 (OC Control LV2) střední hodnota = 453 ng/ml (rozpětí 385-521)
Počet měření	54	54
Aritmetický průměr	165,407	452,185
Směrodatná odchylka	14,006	21,017
Variační koeficient [%]	8,468	4,648
BIAS [%]	11,385	0,108
Relativní nejistota [%]	14,236	4,694
Celková chyba TE [%]	28,321	9,475

4.3 Odběr biologického materiálu

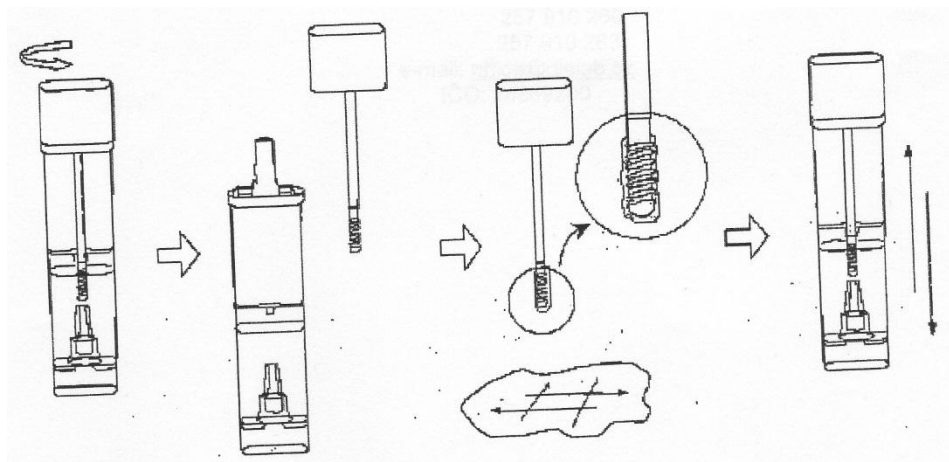


Obrázek 8 – Postup při odběru biologického materiálu do odběrové nádoby OC-Sensor [58]

Převzato z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/qi-fobt.pdf>

Postup odběru: [54]

1. Popíšeme štítek svým jménem a datem odběru na odběrovou nádobku.
2. Otočíme zeleným víčkem doleva a vysuneme kartáček.
3. Odebereme vzorek stolice opakovaným tahem z 5 až 6 míst na povrchu. Správně odebraná stolice má zaplnit rýhy kartáčku. Stolice nesmí být kontaminována močí, mohlo by dojít k falešně pozitivním výsledkům. Ženy nesmějí při odběru menstruuovat.
4. Zasuňeme kartáček se vzorkem a pevně zacvakneme víčko. Znovu už nikdy neotvíráme, aby nedošlo k porušení obsahu.
5. Lahvičkou několikrát zatřepeme, aby se všechen vzorek suspendoval do pufru.



Obrázek 9 - Odběr biologického materiálu do odběrové nádoby OC-Sensor [54]

Přibližně 10 mg z 20-200 mg odebrané stolice se extrahuje ve 2 ml stabilizujícího tlumiče. Analyzátor mechanickým tlakem kazetu se vzorkem stiskne, čím dojde k protlačení extraktu stolice pod aluminiovou fólii, která je později perforována a 25 μ l extraktu je jehlou aplikováno do měřicí kyvety [59].

Před transportem do laboratoře je nutné vzorek uchovávat v chladničce při 2–10 °C nejdéle 1 týden. Vzorek je nejlepší stanovit co nejdříve po odběru, aby nedošlo k rychlé denaturaci nebo degradaci hemoglobinu a tím pádem k falešně negativním výsledkům [54].

4.4 Biologický materiál, reagentie, kontroly a spotřební materiál

- vzorek stolice
- OC-AUTO 3 latex, 7 ml
 - o OC-AUTO 3 latex je imunologický reagent, který se používá v automatickém analyzátoru ke stanovení hemoglobinu ve stolici. Obsahuje latexové částice citlivé k anti-h-HbA₀ polyklonálním protilátkám.
 - o lahvička obsahuje 1,4 ml senzibilizovaných králičích anti-h-HbA₀ IgG na částicích latexu

- OC-AUTO 3 pufr, 200 ml
 - o lahvička obsahuje 2,38 g HEPES (N-2-hydroxyetylpiprazin-N'-2-etansulfonové kyseliny)
- OC-Control LV1, V-PH53 (c = 122-190 ng/ml)
- OC-Control LV2, V-PH54 (c = 385-521 ng/ml)
- OC-Calibrator 1, V-PH51, 3 ml
- mycí roztok (15% roztok chlornanu sodného), redestilovaná voda

4.5 Analyzátor OC-Sensor μ

Automatický analyzátor OC-Sensor μ (viz obrázek 10) je výrobek japonské firmy Eiken Chemical Co., LTD. pro kvantitativní analýzu hemoglobinu ve stolici. Dodavatelem analyzátoru v ČR je společnost Dialab spor. s.r.o. [59].



Obrázek 10 - Analyzátor OC-Sensor (obrázek autor)

Kalibrace analyzátoru je šestibodová a zahrnuje interní kontrolu kvality (viz obrázek 11).

```
OC-MICRO
2018.02.06
*****
CC DATA
*****
CC No. 1
STD NUMBER      =6
STD              OS
1      0ng/mL    18
      (0ng/mL)
2      62ng/mL   41
      (63ng/mL)
3      125ng/mL  75
      (122ng/mL)
4      250ng/mL 166
      (251ng/mL)
5      500ng/mL 546
      (499ng/mL)
6      1000ng/mL 1271
      (1000ng/mL)
CONTROL1        117
      186ng/mL
CONTROL2        465
      473ng/mL

CC TYPE          =2
CC DEGREE        =3
CC FORMULA
F(0)=-1.3900e+01
F(1)=2.0077e+00
F(2)=-2.7079e-03
F(3)=1.3815e-06
*****
```

Obrázek 11 - Kalibrace (obrázek autor)

Zakalení vzorku detekujeme pomocí křemíkové fotodiody. Analyzátor během jednoho měření proměří 10 vzorků, celkem je jeho kapacita 80 vzorků za hodinu [59].

4.6 Pracovní postup

Při měření byl využit uživatelský manuál dané laboratoře pro práci s analyzátozem OC-Sensor μ [56].

1. Umístíme latex a pufr do příslušných stojanů v přístroji a ujistíme se, že jsou ve výchozí pozici.
2. Zkontrolujeme hladiny redestilované vody, mycího roztoku, pufru a odpadní nádoby na roztoky. Popřípadě roztoky doplníme podle návodu.
3. Minimálně 3krát propláchneme hadičky přístroje.

4. Připravíme si stojan a hitachi kepy pro kalibrační křivku a změření kontrol. Vložíme spotřební kyvety do určené části.
5. Provedeme kalibraci podle návodu a posoudíme, zda je vyhovující.
6. Zadáme parametry měření.
7. Vložíme vzorky do racku a ten dále do určeného slotu v analyzátoru.
8. Vložíme spotřební kyvety do určené části.
9. Uzavřeme kryt a spustíme analýzu.
10. Po ukončení měření se automaticky vytisknout výsledky.

4.7 Statistická analýza

Ke statistickému hodnocení dat byl využit software GraphPad Prism 7. Hladina významnosti $p < 0,05$ byla zvolena jako statisticky významná. Normalita dat byla testována za pomoci D'Agostin-Pearsonova testu normality. Pro zhodnocení rozdílů mezi jednotlivými skupinami byl využit neparametrický Mann-Whitneyův U test. Pro porovnání naměřených koncentrací s publikovanými údaji byl využit neparametrický Wilcoxonův test.

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení koncentrace hemoglobinu ve stolici u dětí a adolescentů

Koncentrace hemoglobinu byly měřeny ve stolici v souboru 201 pacientů, kteří byli rozděleni do dvou skupin dle diagnóz. První skupinu tvořili pacienti s diagnózami onemocnění GIT, druhou skupinu tvořili pacienti s diagnózami jinými než onemocnění GIT (neGIT). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5 a 6. Hodnoty koncentrace hemoglobinu jsou uváděny jako průměr ($\mu\text{g Hb/g stolice}$). V tabulce 6 je tučně označen statisticky významný rozdíl mezi skupinami.

Tabulka 5 – Porovnání četnosti a koncentrace hemoglobinu v hlavních skupinách

-	GIT onemocnění	neGIT onemocnění
Počet pacientů	75	126
Koncentrace hemoglobinu (rozpětí hodnot) [$\mu\text{g/g}$]	84,46 (0-1137)	30,75 (0-1080)
Směrodatná odchylka	220,03	129,91

Tabulka 6 – Rozdíl mezi hlavními skupinami

Statistická významnost	
GIT onemocnění vs. neGIT onemocnění	p <0,05

p <0,05 statisticky významný rozdíl

5.2 Porovnání koncentrací hemoglobinu ve stolici u jednotlivých diagnóz a porovnání získaných výsledků s dostupnými literárními údaji

Koncentrace hemoglobinu byly stanoveny ve stolici u pacientů, kteří byli rozděleni do čtyř podskupin. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 7 a 8. Hodnoty koncentrace hemoglobinu jsou uváděny jako průměr ($\mu\text{g Hb/g stolice}$). Tučně jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi skupinami. Jako kontrolní skupina při výpočtu statistické významnosti byla využita skupina pacientů bez gastrointestinálních onemocnění (neGIT).

Tabulka 7 - Porovnání četnosti a koncentrace hemoglobinu v podskupinách

-	Počet pacientů	Koncentrace hemoglobinu (rozpětí hodnot) [$\mu\text{g/g}$]	Směrodatná odchylka
Nespecifické střevní záněty	22	108,03 (0-957,6)	240,11
Krvácení z gastrointestinálního traktu	12	128,20 (0-904,4)	258,92
Akutní gastroenteritidy	12	135,55 (0-1137)	343,19
Jiná GIT onemocnění	29	27,35 (0-341,2)	79,65

Tabulka 8 – Rozdíl mezi jednotlivými podskupinami GIT onemocnění

-	Statistická významnost
Kontrolní skupina vs. Nеспецифické střevní záněty	p <0,05
Kontrolní skupina vs. Krvácení z gastrointestinálního traktu	p = 0,09
Kontrolní skupina vs. Akutní gastroenteritidy	p = 0,81
Kontrolní skupina vs. Jiná GIT onemocnění	p = 0,88

p <0,05 statisticky významný rozdíl

6 DISKUZE

Cílem práce bylo stanovit koncentraci hemoglobinu ve stolici u dětí a adolescentů a následně provést porovnání výsledků mezi jednotlivými diagnózami.

Do studie bylo zařazeno 201 vzorků, průměrný věk pacientů byl 11 let (viz kapitola 4.1). V prvním experimentu byla stanovena koncentrace Hb v souboru pacientů rozdělených do dvou skupin dle charakteru onemocnění (pacienti s GIT onemocněním a pacienti s onemocněním negastrointestinálního původu – neGIT).

Byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi pacienty s GIT onemocněním a s pacienty s neGIT onemocněním (84,46 μg Hb/g stolice vs. 30,75 μg Hb/g stolice, $p < 0,05$), jak je ukázáno v tabulkách 5 a 6. Statisticky významný rozdíl mezi těmito dvěma skupinami byl očekáván. Velké ztráty krve do stolice jsou především způsobeny gastrointestinálním onemocněním, ať již se jedná o krvácení z horní nebo dolní části traktu. Důležitým a očekávaným poznatkem je, že vysoké koncentrace u skupiny pacientů bez gastrointestinálního onemocnění měli pacienti s onemocněním krve, např. s anémií či s dědičným nedostatkem faktoru IX. U pacientů s onemocněním krve dosahovaly koncentrace hemoglobinu ve stolici velmi vysokých hodnot dosahujících až 1080 μg Hb/g stolice, které jsou obvyklé pro pacienty se závažným progredujícím kolorektálním karcinomem. Vzhledem k tomu, že se jedná o postižení krvetvorby, spojené s metabolismem hemu, jsou takto vysoké hodnoty očekávané. Chronické krvácení do gastrointestinálního traktu se často projevuje sideropenickou anémií. Jedná se o stav, kdy v organismu není dostatek železa [60; 61].

Druhý experiment byl zaměřen na vyhodnocení koncentrací hemoglobinu ve stolici u pacientů s různými gastrointestinálními onemocněními. Pacienti byli rozděleni do čtyř podskupin (viz kapitola 4.1) a byly testovány statistické rozdíly

v jednotlivých skupinách. Pacienti s ostatními onemocněními negastrointestinálního původu tvořili kontrolní skupinu. Byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi skupinami pacientů s nespecifickými střevními záněty a kontrolní skupinou (108,03 μg Hb/g stolice vs. 30,75 μg Hb/g stolice, $p < 0,05$). Výsledky viz tabulky 5, 7 a 8. Nespecifické střevní záněty, hlavně ulcerózní kolitida, se projevují průjemovitým onemocněním s příměsí krve [37; 42]. Jiná GIT onemocnění, např. nemoc střev, nemoc jater, nemají v klinické anamnéze krvácení do stolice. I zde byl očekáván statisticky významný rozdíl, který se potvrdil. Výsledky byly dále porovnány s výsledky referenční studie [1]. Pro porovnání rozdílů byl využit Wilcoxonův test. Výsledky porovnání jsou ukázány v tabulce 9.

Tabulka 9 – Porovnání našich výsledků se studií

Název studie	Skupina s gastrointestinálním onemocněním	Průměr (medián) koncentrace [$\mu\text{g/g}$]	Počet pacientů	Statistická významnost
Naše výsledky	Nespecifické střevní záněty	108,03 (5,1)	22	$p < 0,05$
	Krvácení z gastrointestinálního traktu	128,20 (2,6)	12	nehodnoceno
	Akutní gastroenteritidy	135,55 (0)	12	0,063
	Jiná GIT onemocnění	27,35 (0)	29	$p < 0,05$
Kocna, P. a kol. (2017) [1]	Nespecifické střevní záněty	- (102,3)	66	-
	Akutní gastroenteritidy	- (220,8)	17	-
	Jiná GIT onemocnění	- (48,9)	26	-

$p < 0,05$ statisticky významný rozdíl

Výsledky porovnání ukazují statisticky významné rozdíly ve skupině pacientů s nespecifickými střevními záněty ve srovnání s referenční skupinou (5,1 µg Hb/g stolice vs. 102,3 µg Hb/g stolice, $p < 0,05$). Signifikantní rozdíly byly zjištěny také v naší skupině pacientů s jinými GIT onemocněními ve srovnání s referenční skupinou (0 µg Hb/g stolice vs. 48,9 µg Hb/g stolice, $p < 0,05$). Vzhledem k tomu, že v naší práci jsme použili stejnou metodu stanovení, jaká byla použita i v referenční studii, může být signifikantní rozdíl ve výsledcích pravděpodobně způsoben rozdílnou charakteristikou souboru pacientů. Referenční studie zkoumá jen pacienty, kteří mají hodnoty nad detekční limit a gastrointestinální onemocnění [1]. Naše studie zkoumá všechny pacienty rozdělené na dvě hlavní skupiny, s gastrointestinálním onemocněním a bez gastrointestinálního onemocnění.

Jak již bylo zmíněno dříve (viz kapitola 2.5.3), vyšetření Hb ve stolici je primárně používáno pro screening KRK a pro tyto účely byla definována hodnota 15 µg Hb/g stolice jako rozhodovací limit u dospělých pacientů pro kolonoskopické vyšetření k vyloučení přítomnosti KRK. Hodnoty Hb stanovené v našem souboru pacientů ukazují, že u 37 pacientů, konkrétně u 21 pacientů s onemocněním GIT původu a 16 pacientů s jinými onemocněními, jsou koncentrace Hb vyšší než 15 µg Hb/g stolice. Je tedy pravděpodobné, že pro pacienty s jinými onemocněními nemá tato hodnota diagnostický význam a bude nutné provést další rozsáhlejší studie, které by určily rozhraní pro jednotlivé diagnózy [1].

Tabulka 10 - Počet pacientů s vyšší koncentrací než 15 µg Hb/g stolice

-	GIT onemocnění	neGIT onemocnění
Dívky	12	6
Chlapci	9	10
Celkem	21	16

7 ZÁVĚR

Studie byla zaměřena na stanovení koncentrace Hb ve stolici imunochemickou metodou v souboru dětských a adolescentních pacientů.

Statisticky významný rozdíl byl prokázán mezi koncentracemi pacientů s gastrointestinálními onemocněními a pacienty bez gastrointestinálních onemocnění.

Ve druhém experimentu, který byl zaměřen na porovnání pacientů s různými GIT onemocněními s naší kontrolní skupinou, byla nalezena statistická významnost. Přesněji se jednalo o statistickou významnost mezi pacienty s nespecifickými střevními záněty v porovnání s naší kontrolní skupinou.

Byl prokázán signifikantní rozdíl v koncentracích u podskupiny s nespecifickými střevními záněty a u pacientů s jinými GIT onemocněními ve srovnání s referenční studií.

Vyšetření hemoglobinu ve stolici u dětí a adolescentních pacientů za pomoci imunochemické metody s latexovou aglutinací na bázi turbidimetrie má diagnostický význam u vyšetření gastrointestinálních onemocnění.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AIDS	z anglického Acquired Immuno Deficiency Syndrome; syndrom získaného selhání imunity
ALA	α -aminolevulát; kyselina α -aminolevulová
ALA-synthasa	regulační enzym syntézy hemu
ALA-dehydratáza	enzym syntézy porfyrinů
CA 19-9	karbohydrátový antigen
CEA	karcinoembryonální antigen
CO ₂	oxid uhličitý
ČSKB	Česká společnost klinické biochemie
ČTK	Česká tisková kancelář
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	z anglického Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FIT	z anglického Faecal Immunochemical Test; imunochemický test okultního krvácení to stolice
FOBT	z anglického Faecal Occult Blood Test; průkaz okultního krvácení ve stolici
g-FOBT	guajakový test pro stanovení okultního krvácení
GIT	gastrointestinální trakt
Glu	glukóza
Hb	hemoglobin
HbA1	majoritní hemoglobin dospělého typu A
HbA1c	glykovaný hemoglobin
HbA2	minoritní hemoglobin dospělého typu A
HbC	hemoglobin C
HbCO	karbonylhemoglobin
HbD	hemoglobin D
HbE	hemoglobin E

HbF	fetální hemoglobin
HbG	hemoglobin G
HbM	hemoglobin M
HbS	hemoglobin S
HEPES	N-2-hydroxyetylpirazin-N'-2-etansulfonová kyselina
His	histidin
HMB	hydroxymethylbilan
IBD	z anglického Inflammatory Bowel Diseases; nespecifické střevní záněty
IBS	z anglického Irritable Bowel Syndrome; syndrom dráždivého tračníku
IGF-1	z anglického Insulin like growth faktor-1; inzulinu podobné růstové faktory
IgG	imunoglobulin G
KRK	kolorektální karcinom
Lys	lysin
MMR	missmatch repair geny
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
MSS	monocyto-makrofágový systém
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
PBG	porfobilinogen
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
TOKS	jednokrokový test na stanovení okultního krvácení ve stolici
Val	valin
ZN	zhoubný novotvar

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOCNA, Petr. Quantitative faecal haemoglobin test (FIT) in children with gastroenterological diagnosis. In: *1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy* [online]. Praha: Euromedlab Athens, 2017 [cit. 2018-01-25]. Dostupné z: http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/docum/fit_athens2017.pdf
- [2] POŠ, Lucie. Kolorektální karcinom v dětském věku. *Onkologie* [online]. Solen Medical Education, 2015, 9(5), 242-244 [cit. 2018-02-07]. ISSN 1803-5345. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2015/05/09.pdf>
- [3] STOŽICKÝ, František a Josef SÝKORA. *Základy dětského lékařství*. Vydání druhé. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-80-2462997-1.
- [4] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009, 546 s. ISBN 978-80-246-1414-4.
- [5] MURRAY, Robert. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Přeložil Bohuslav MATOUŠ. Praha: Galén, 2012, 730 s. ISBN 978-80-7262-907-7.
- [6] ŠTERN, Petr. *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2011, 269 s. ISBN 978-80-246-1979-8.

- [7] Tetrapyrrolová barviva. *Wikiskripta* [online]. Praha, Brno, Olomouc, Plzeň: Praha, Brno, Olomouc, Plzeň, 2009 [cit. 2017-10-29]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/w/Tetrapyrrolov%C3%A1_barviva
- [8] Pyrrole simple structure. In: *Wikimedia Commons* [online]. San Francisco: Wikimedia Commons, 2004 [cit. 2018-02-02]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4a/Pyrrole_simple_structure.png/177px-Pyrrole_simple_structure.png
- [9] Content_620px-Heme_b. In: *ELUC* [online]. Olomouc, b.r. [cit. 2018-01-23]. Dostupné z: https://eluc.kr-olomoucky.cz/uploads/images/15322/content_620px-Heme_b.svg.png
- [10] 274px-1GZX_Haemoglobin. In: *Wikipedia* [online]. b.r. [cit. 2018-01-23]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3d/1GZX_Haemoglobin.png/274px-1GZX_Haemoglobin.png
- [11] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: Academia, 1992. ISBN 80-200-0438-6.
- [12] 4. Metabolismus hemoglobinu a transport krevních plynů. *Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta* [online]. Praha: 3. LF UK, 2013 [cit. 2017-12-04]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/vi-dychaci-soustava/4-metabolismus-hemoglobinu-a-transport-krevnich-plynu/>
- [13] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.

- [14] KALOUSOVÁ, Marta. *Patobiochemie ve schématech*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1522-8.
- [15] SKOUMALOVÁ, Alice. Metabolismus hemu. In: *Slideplayer* [online]. b.r. [cit. 2018-02-27]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/5643226/>
- [16] PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu*. Český Těšín: FINIDR, 2006. ISBN 80-86682-00-5.
- [17] PENKA, Miroslav a Alena BULIKOVÁ. *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2299-3.
- [18] Metody při vyšetření stolice. *Interní propedeutika* [online]. Praha: 2.LF UK a FN v Motol, 2016 [cit. 2017-12-03]. Dostupné z: <http://new.propedeutika.cz/?p=489>
- [19] KOCNA, Petr. Vyšetření stolice. *Gastro Lab - MiniEncyklopedie laboratorních metod v gastroenterologii* [online]. Praha: 1. LF UK a VFN, 2002 [cit. 2017-12-03]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/glab/glency1.htm>
- [20] TÁBORSKÁ, Jana. Infekční průjemová onemocnění. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2005, 7(9), 414-416 [cit. 2017-12-04]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2005/09/10.pdf>
- [21] ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2013. ISBN 978-80-7492-062-2.

- [22] About Calprotectin. *Calprotectin* [online]. Velká Británie: Alpha Laboratories, c2013-2017 [cit. 2017-12-03]. Dostupné z: <https://www.calprotectin.co.uk/about-calprotectin/>
- [23] CHROMÝ, Vratislav. *Bioanalytika: analytické metody v klinické chemii a laboratorní medicíně. 2., přeprac. a dopl. vyd.* Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie, 2011. ISBN 978-80-904-539-3-7.
- [24] KOCNA, Petr. Kvantitativní analýza hemoglobinu ve stolici – význam pro screening kolorektálního karcinomu. *Onkologická Revue* [online]. Current Media, 2017, 4(6), 6-10 [cit. 2018-02-02]. ISSN 2464-7195. Dostupné z: http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/texty/onkol_revue2017.pdf
- [25] DIVIŠ, Petr, Kristýna DIVIŠOVÁ, Jana KATOLICKÁ a Simona ROTNÁGLOVÁ. Kolorektální karcinom – současný pohled na diagnostiku a léčbu. *Medicína pro praxi* [online]. 2016, 13(1), 34-38 [cit. 2018-02-07]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2016/01/07.pdf>
- [26] KOHOUTOVÁ, Darina a Jan BUREŠ. Střevní mikrobiota a kolorektální karcinom. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2013, 15(5), 167-169 [cit. 2018-02-07]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2013/05/07.pdf>
- [27] ČESKÁ TISKOVÁ KANCELÁŘ. ČR už nemá nejvyšší výskyt nádorů tlustého střeva na světě. *Kolorektum.cz: Program kolorektálního screeningu v České republice* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2018 [cit. 2018-05-

03]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-verejnost&aid=458>

- [28] GREGOR, J. Epidemiologie kolorektálního karcinomu v České republice. *Kolorektum.cz: Program kolorektálního screeningu v České republice* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2018 [cit. 2018-02-07]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-cr>
- [29] SCHNEIDEROVÁ, Michaela a Vladimír BENCKO. Kolorektální karcinom: současný pohled na rizikové a protektivní faktory, možnosti prevence. *Onkologie* [online]. 2015, 9(4), 178-182 [cit. 2018-05-03]. ISSN 1803-5345. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2015/04/06.pdf>
- [30] KOCNA, Petr, Zdislava VANICKOVA a Tomáš ZIMA. Laboratory screening markers in gastroenterology - state of the art. *BIOMEDICAL PAPERS* [online]. 2013, 157(2), 91-97 [cit. 2018-02-07]. DOI: 10.5507/bp.2013.027. ISSN 1213-8118. Dostupné z: <http://biomed.papers.upol.cz/pdfs/bio/2013/02/02.pdf>
- [31] EHRMANN, Jiří, Michal KONEČNÝ a Vlastimil PROCHÁZKA. Krvácení do dolní části gastrointestinálního traktu. *Zdravi.euro.cz - Zdravotnictví a medicína* [online]. Mladá Fronta a. s., 2018 [cit. 2018-02-11]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/krvaceni-do-dolni-casti-gastrointestinalniho-traktu-369030>

- [32] KOJECKÝ, Vladimír. Krvácení do proximální části trávicího traktu. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2014, 16(4), 152-154 [cit. 2018-02-11]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2014/04/06.pdf>
- [33] KONEČNÝ, Michal a Vlastimil PROCHÁZKA. Racionální diagnostický a terapeutický postup u akutního krvácení do horní části trávicího traktu. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2009, 11(10), 446-448 [cit. 2018-02-11]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2009/10/03.pdf>
- [34] HUSOVÁ, Libuše. Nejčastější příčiny akutního krvácení do horní části trávicí trubice – Diagnostika a léčba – II. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2001, 3(3), 117-119 [cit. 2018-04-07]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2001/03/04.pdf>
- [35] KREJČÍ, Ivona. Vředová choroba žaludku a duodena. *Medicína pro praxi* [online]. 2007, (5), 209-210 [cit. 2018-04-07]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/05/05.pdf>
- [36] KLUSÁČEK, Dalibor. Gastroezofageální reflux a refluxní choroba jícnu u dětí. *Pediatrica pre prax* [online]. 2006, 7(6), 300-303 [cit. 2018-04-07]. ISSN 1339-4231. Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/Klusacek.pdf>
- [37] ILENČÍKOVÁ, Tina. Mallory-Weissův syndrom: příčiny, příznaky, diagnostika a léčba. *Medlicker* [online]. 2013 [cit. 2018-04-07]. Dostupné z: <https://cs.medlicker.com/169-mallory-weissuv-syndrom-priciny-priznaky-diagnostika-a-lecba>
- [38] NOVÁKOVÁ, Ilona a Ivana KOZÁKOVÁ. Endoskopická léčba jícnových varixů. *Zdraví.Euro.cz* [online]. Mladá Fronta a.s, 2018 [cit. 2018-

04-07]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/sestra/endoskopicka-lecba-jicnovych-varixu-416078>

- [39] ADAMOVÁ, Zuzana a Radim SLOVÁČEK. Diagnostika a léčba krvácení do dolní části zažívacího traktu. *Medicína pro praxi* [online]. 2013, **10**(11-12), 380-382 [cit. 2018-02-11]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2013/11/06.pdf>
- [40] BORÁŇOVÁ, Simona, Michal ŽÁČIK a Jaromír BERNÁTEK. Meckelův divertikl. *Pediatric pro praxi* [online]. 2012, **13**(2), 116-117 [cit. 2018-04-06]. ISSN 1803-5264. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2012/02/12.pdf>
- [41] ŠKÁBA, Richard. Anální fisura u dětí. *Pediatric pro praxi* [online]. 2008, **9**(2), 119-120 [cit. 2018-04-06]. ISSN 1803-5264. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2008/02/10.pdf>
- [42] EHRMANN, Jiří. Záněty střev a dráždivý tračník. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2009, **11**(2), 71-76 [cit. 2018-04-07]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2009/02/05.pdf>
- [43] EHRMANN, Jiří a Michal KONEČNÝ. Léčba střevních zánětů. *Praktické lékařství* [online]. 2012, **8**(4), 156-160 [cit. 2018-04-07]. ISSN 1803-5329. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2012/04/02.pdf>
- [44] NEVORAL, Jiří. Současná terapie idiopatických střevních zánětů u dětí. *Pediatric pro praxi* [online]. 2007, **8**(6), 369-373 [cit. 2018-04-06]. ISSN

1803-5264. Dostupné z:

<https://www.pediatriepropraxi.cz/pdfs/ped/2007/06/09.pdf>

- [45] EHRMANN, Jiří a Michal KONEČNÝ. Diagnostika a léčba idiopatických střevních zánětů. *Medicina pro praxi* [online]. 2011, 8(10), 435-437 [cit. 2018-04-06]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/10/09.pdf>
- [46] BAJČIOVÁ, Viera. Gastrointestinální nádory u dětí a adolescentů – rozdíly od GI onkologie dospělých. *Onkologia* [online]. 2016, 11(4), 228-233 [cit. 2018-02-11]. ISSN 1339-4215. Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/7f4e3ed5d91974474adfa0b7b87698c5.pdf>
- [47] CHRASTINA, Jan. Principy testů určených k detekci okultního krvácení do stolice a jejich charakteristika. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2009, 11(4), 193-196 [cit. 2018-05-02]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2009/04/14.pdf>
- [48] ZAVORAL, Miroslav, Štěpán SUCHÁNEK a Přemysl FRIČ. Využití testů na okultní krvácení do stolice ve screeningu kolorektálního karcinomu. *Medicina pro praxi* [online]. 2008, 5(11), 417-419 [cit. 2018-05-02]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2008/11/04.pdf>
- [49] KOVAROVA, Jaroslava, Miroslav ZAVORAL, Tomas ZIMA et al. Improvements in colorectal cancer screening programmes – quantitative immunochemical faecal occult blood testing – how to set the cut-off for a particular population. *Biomedical Papers* [online]. 2012, 156(2), 143-150 [cit.

2017-11-09]. DOI: 10.5507/bp.2012.030. ISSN 12138118. Dostupné z:
<http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2012.030.html>

- [50] NIKLOVÁ, Karla. *Imunochemické stanovení krve ve stolici* [online]. Praha, 2005, 55 s. [cit. 2017-11-09]. Dostupné z:
http://ukb.lf1.cuni.cz/diplomky/dp_nikl05.pdf. Vedoucí práce Petr Kocna.
- [51] KOCNA, Petr. Stanovisko ke stanovení hemoglobinu ve stolici kvantitativní analýzou. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2015, 23(44), 78-81 [cit. 2018-02-02]. ISSN 2570-9402. Dostupné z:
<http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2015/2015-2/stanovisko-78.pdf>
- [52] *Jednokrokový test na stanovení okultního krvácení ve stolici (TOKS): Příbalový leták kat.č. FOBC*. SureScreen Diagnostics Ltd., b.r.
- [53] DUBSKÁ, L. a J. NECHVÁTAL. Kvantitativní stanovení hemoglobinu ve stolici. *FONS | Bulletin* [online]. 2009, 19(3), 13-15 [cit. 2018-02-02]. ISSN 1211-7137. Dostupné z: <http://www.bulletinfons.cz/32009/lab01.pdf>
- [54] DIALAB SPOL. S.R.O. *OC-Auto Sampling Bottle 3*. Praha, 2014.
- [55] DUŠEK, L. Kapitola 5: Hemoporfyrinový test detekce krve ve stolici. *Kolorektum.cz: Program kolorektálního screeningu v České republice* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2018 [cit. 2018-05-02]. Dostupné z:
<http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--e-learning--prukaz-okultniho-krvaceni-ve-stolici-fobt-screening-krca--hemoporfyrinovy-test-detekce-krve-ve-stolici>
- [56] EIKEN CHEMICAL CO., LTD. *Návod k použití*. Tokyo, 2015.

- [57] *IQFOBT / LV1, LV2 / FOBT*. 2. lékařská fakulta UK a Fakultní Nemocnice v Motole, 2018.
- [58] Postup při provedení testu OC-Sensor. In: *1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy* [online]. b.r. [cit. 2018-02-27]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/qi-fobt.pdf>
- [59] OC-Sensor: Nový vysoce citlivý screeningový test okultního krvácení ve stolici. In: *Dialab spol, s.r.o.* [online]. b.r. [cit. 2018-02-27]. Dostupné z: http://www.dialab.cz/static/_user/uploads/stahuj/oc-sensor_novy_test.9rvd1.pdf
- [60] PENKA, Miroslav, Igor PENKA a Jaromír GUMULEC. *Krvácení*. 1. vyd. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-0689-4.
- [61] NOVOTNÝ, Jan. Sideropenická anémie. *Medicina pro praxi* [online]. 2007, 4(11), 390-394 [cit. 2018-04-25]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/10/02.pdf>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Struktura pyrrolu [8]	10
Obrázek 2 - Vzorec hemu s navázaným železem [9]	11
Obrázek 3 - 3D projekce struktury hemoglobinu, zeleně je zvýrazněn hem [10]	12
Obrázek 4 - Schéma syntézy hemoglobinu [14]	16
Obrázek 5 - Degradace hemoglobinu [15]	18
Obrázek 6 - Incidence a mortalita pacientů se zhoubným novotvarem (ZN) tlustého střeva, rektosigmoideálního spojení, konečníku, řiti a řitního otvoru [28]	24
Obrázek 7 - Věková struktura pacientů se ZN tlustého střeva, rektosigmoideálního spojení, konečníku, řiti a řitního kanálu [28]	26
Obrázek 8 – Postup při odběru biologického materiálu do odběrové nádoby OC-Sensor [58]	40
Obrázek 9 - Odběr biologického materiálu do odběrové nádoby OC-Sensor [54]	41
Obrázek 10 - Analyzátor OC-Sensor (obrázek autor)	42
Obrázek 11 - Kalibrace (obrázek autor)	43

11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 - Fyziologické hemoglobiny člověka [5]	14
Tabulka 2 - Souhrn defektních hemoglobinů [17]	21
Tabulka 3 - Porovnání guajakového a imunochemického testu [48].....	33
Tabulka 4 – Analytické charakteristiky metody a výsledky kontrolního materiálu [57]	39
Tabulka 5 – Porovnání četnosti a koncentrace hemoglobinu v hlavních skupinách.....	45
Tabulka 6 – Rozdíl mezi hlavními skupinami	45
Tabulka 7 - Porovnání četnosti a koncentrace hemoglobinu v podskupinách.....	46
Tabulka 8 – Rozdíl mezi jednotlivými podskupinami GIT onemocnění	47
Tabulka 9 – Porovnání našich výsledků se studií	50
Tabulka 10 - Počet pacientů s vyšší koncentrací než 15 µg Hb/g stolice.....	51