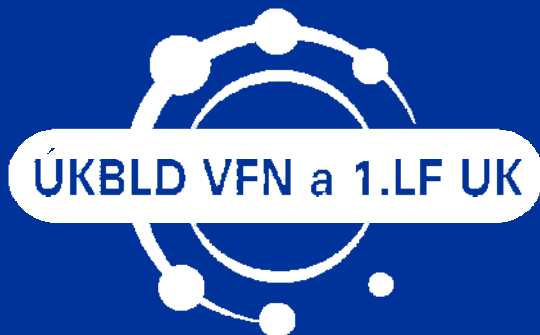


Co lze poznat z kapky krve

Tomáš Zima

Praha 2. února 2012



Historie I

- vyšetření tělesných tekutin - moče okolo roku 400 př.n.l.
- Hippokratova doktrína spočívala v patologii tělních tekutin – šťáv
- hematurie byla popsána Rufusem z Dresu okolo roku 50 jako známka poruchy ledvin.
- Uroskopie je hlavním znakem středověké medicíny.
- Paracelsus (1493-1541) zdůrazňuje význam chemických látek v medicíně.
- mikroskop Antonem van Leeuwenhoekem (1632-1723)
- 17. století je provedena gravimetrická analýza moče, později byla popsána bílkovina v moči a vyšetřování moče postupovalo na vědeckém podkladě.
- Thomas Willis (1621-1675) poprvé popsal změny moče u diabetes mellitus a insipidus..

Historie II

- 18. století se objevují znalosti poruch při srážení krve Williamem Hewsonem (1739-1774) a jsou předchůdcem testů INR, protrombinového času
- 1776 - sladkost moče a krve je dána cukry
- 1780 Francis Home vytvořil kvasinkový test na průkaz cukrů v diabetické moči.
- V 19. století vznikají první laboratoře a rozvíjejí se zejména oblast bakteriologie a virologie s rozvojem mikroskopie.
- Koncem 19. století první laboratoře (Guys Hospital v Londýně), v Americe jsou to laboratoře s mikroskopem u lékaře
- 1898 Sir William Osler - první učebnici klinické chemie a založil v John Hopkins Hospital laboratoř.

Přístroje v laboratoři : 1920

Moderní nemocnice (200-300 lůžek) v USA má být vybavena:

- t Váhy
- t Mikroskop
- t Centrifuga
- t Bunssenův kahan
- t Kolorimeter



Přístroje v laboratoři : 1970

- ◆ Váhy
- ◆ Spektrofotometr
- ◆ Plamenový fotometr
- ◆ Van Slykův přístroj
- ◆ Kolorimetr
- ◆ Centrifuga



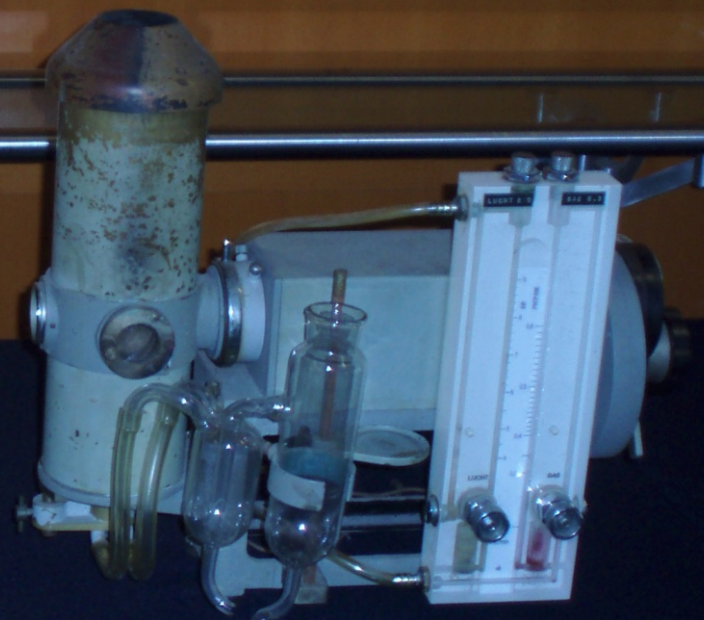
1

VERGEGENST. MET. CHEMIE. VERKEER. DEEL N. N. N. 1870
 DEEL N. N. N. 1870. DEEL N. N. N. 1870.

Ervaringen met de Vlammetometers volgens Lange
 door H. J. P. van der Vliet.

De Vlammetometers volgens Lange zijn een soort van gasometers, die gebruikt worden om de hoeveelheid gas te meten, die bij de verbranding van een bepaalde hoeveelheid brandstof wordt afgegeven. De meting wordt gedaan door de gasdruk te meten, die op een bepaalde hoogte in een kolom van water of olie wordt afgelezen.

De Vlammetometers volgens Lange zijn een soort van gasometers, die gebruikt worden om de hoeveelheid gas te meten, die bij de verbranding van een bepaalde hoeveelheid brandstof wordt afgegeven. De meting wordt gedaan door de gasdruk te meten, die op een bepaalde hoogte in een kolom van water of olie wordt afgelezen.



2

Heating or incubation in order to bring the reaction to a level of completion were performed during continuous passage through a lengthy glass coil. Photometric measurement was performed by monitoring transmitted light of a flow-through cuvette at a given wavelength. It took Technicon more than 3 years of engineering and fine-tuning before the first single channel AutoAnalyzer was launched commercially in 1957 (fig 3).

A new marketing strategy was developed in order to promote a machine that was a true revolution in laboratory instrumentation. Technicon decided to market the AutoAnalyzer as a complete system – instrument, reagents, and instruction. It was decided to perform clinical evaluations (unusual at that time) and to promote the AutoAnalyzer at professional meetings and through scientific papers.

Later developments

The first 10 AutoAnalyzers were sold in the USA for \$ 3200 each, an extremely high price. Nevertheless, Technicon soon had many orders to fill.

Fig 4 Recordings of a multiple sequential analyzer

The development of clinically oriented AutoAnalyzers stepped with the sale of Technicon to Bayer in 1967 while the industrial branch was sold to Biotec and Lathby. The latter company continued to improve the concept of continuous flow analysis by launching in 1967 the AutoAnalyzer 3 and, in 1968, the QuAAuto. For want, the introduction of Technicon's continuous flow in 1957, profoundly changed the character of the clinical laboratory and was the beginning of a new era. In 1957 it was estimated that the AutoAnalyzer could fill a potential market of 250 units. At the time Technicon was sold to Bayer, this figure was estimated to be more than 50,000 around the world.



Table T-6
Continuous flow system
Technicon AutoAnalyzer

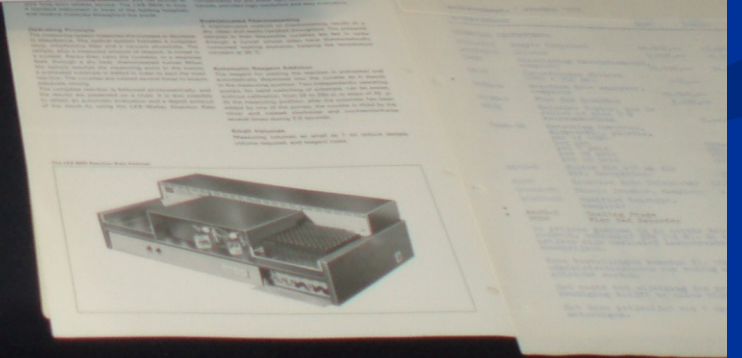


Table T-9

Kinetic enzyme analysis,
Fluorimetry

1 LKB 8600

2 Perkin Elmer
Fluorescence
Spectrophotometer





Ortho-Clinical Diagnostics
a Johnson & Johnson company

Table T-10

Dry Chemistry

Kodak DT 60

INTERFEROGRAPHS

GUIDE TO INTERFERENCES IN
CLINICAL CHEMISTRY INSTRUMENTS
SECOND EDITION

MELVIN R. GACK, P.L.D.
NETH W. RYAN, M.D.,
STARLA J. GILK, M.D.

dry chemistry
analysis
reagents

03044000



Laboratorní testy

- Vliv na 70 - 80 % zdravotnických rozhodnutí v nemocnici
- Tvoří 3 - 5 % nákladů ve zdravotnictví

Důvody požadování laboratorních vyšetření:

- prevence či diagnostika onemocnění
- posouzení aktivity a stádia choroby
- sledování účinnosti terapie
- odhalení asymptomatického onemocnění
(cholesterol u pacienta s rizikem ICHS, okultní krvácení u kolorektálních karcinomů)
- detekce komplikací
- screening
- výzkum

Důvody požadování laboratorních vyšetření:

- Ovlivní výsledek moji pracovní diagnózu?
- Ovlivní výsledek průběh léčby?
- Bude mít výsledek vliv na můj odhad pacientovy prognózy?
- Může patologický proces, po kterém pátrám, probíhat u pacienta bez klinických projevů?
Jestliže ano, může být závažný a lze ho léčit?



genes

regulatory proteins, histones

NF- κ B, AP-1, PPARs

Bcl2, p53, Ras, MAPK, STAT, JAK

cAMP, cGMP, PKC, IP₃, phospholipases

cytokines, adhesion molecule, soluble receptors, growth factors

hormones, binding proteins, enzymes

Ca²⁺, K⁺, glucose, cholesterol, Apo-AI, CRP, transferrin

Nové trendy v 21. století

- Laboratorní automatizace, robotika a informatika
- konsolidace laboratoří
- akreditace laboratoří
- molekulární diagnostika
- POCT
- zobrazovací analýza

Molekulárně biologické nádorové markery

Stanovení prognózy a predikce u karcinomu mléčné žlázy

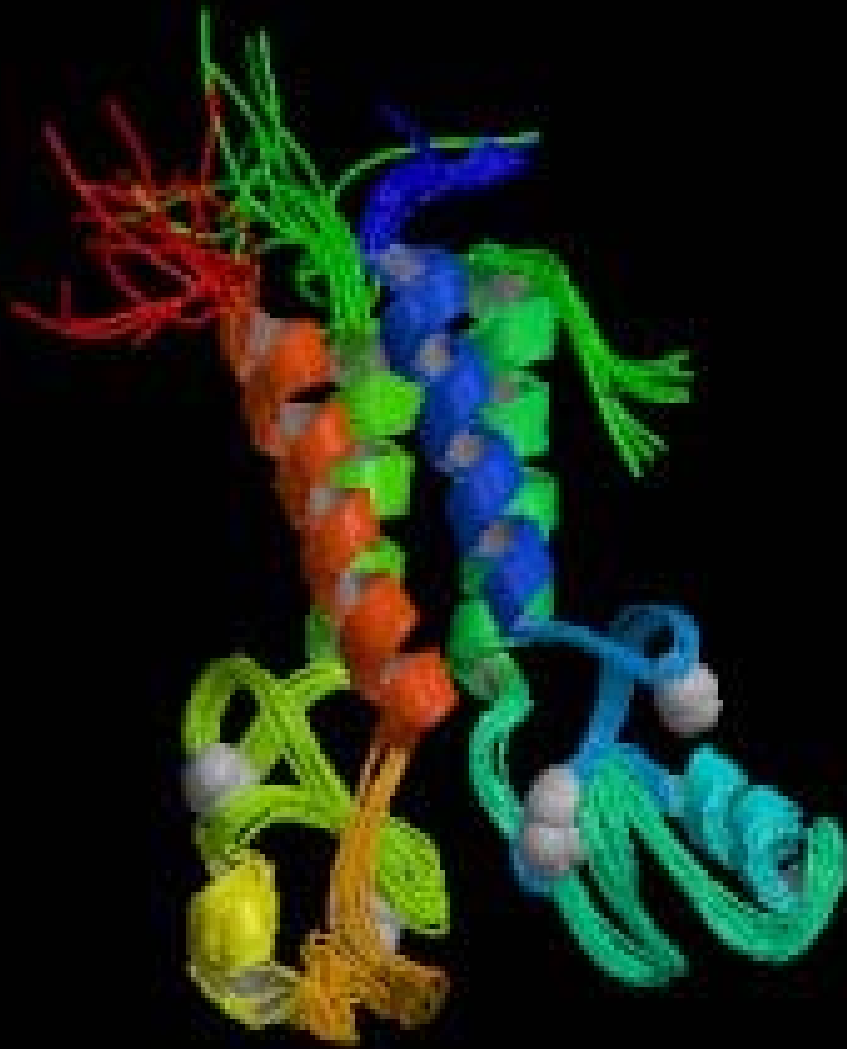
- Mutace RAS, MYC
- Mutace p53
- Amplifikace HER2/neu (c-erbB-2)
- Mutace BRCA1,2
- Stanovení BCL-2 - anti-apoptotický protein – vyšší exprese – lepší prognóza
- Stanovení estrogenových a progesteronových receptorů
- Stanovení proliferační aktivity

BRCA Geny

■ BRCA 1 a BRCA 2

- Známy jako rizikové geny karcinomu prsu a ovárií
- Tumor supresorové geny
 - Regulují cyklus buněčného dělení
 - Inhibují růst buněk
- Mimo jiné kontrola DNA replikace a oprava poškození

BRCA 1



Mutace BRCA1 – 80% riziko
nositele k rozvoji karcinomu
prsu, zvýšené riziko
ovariálního karcinomu

BRCA 2



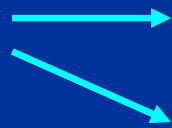
- Mutace BRCA2 – pozdější projev karcinomu, riziko zvýšené pro trávicí trakt, prostatu a melanomy
- Vyšší riziko mužského karcinomu prsu

Molekulární cytogenetická analýza

Specifikace nádoru

Identifikace prognózy

Monitorace léčby

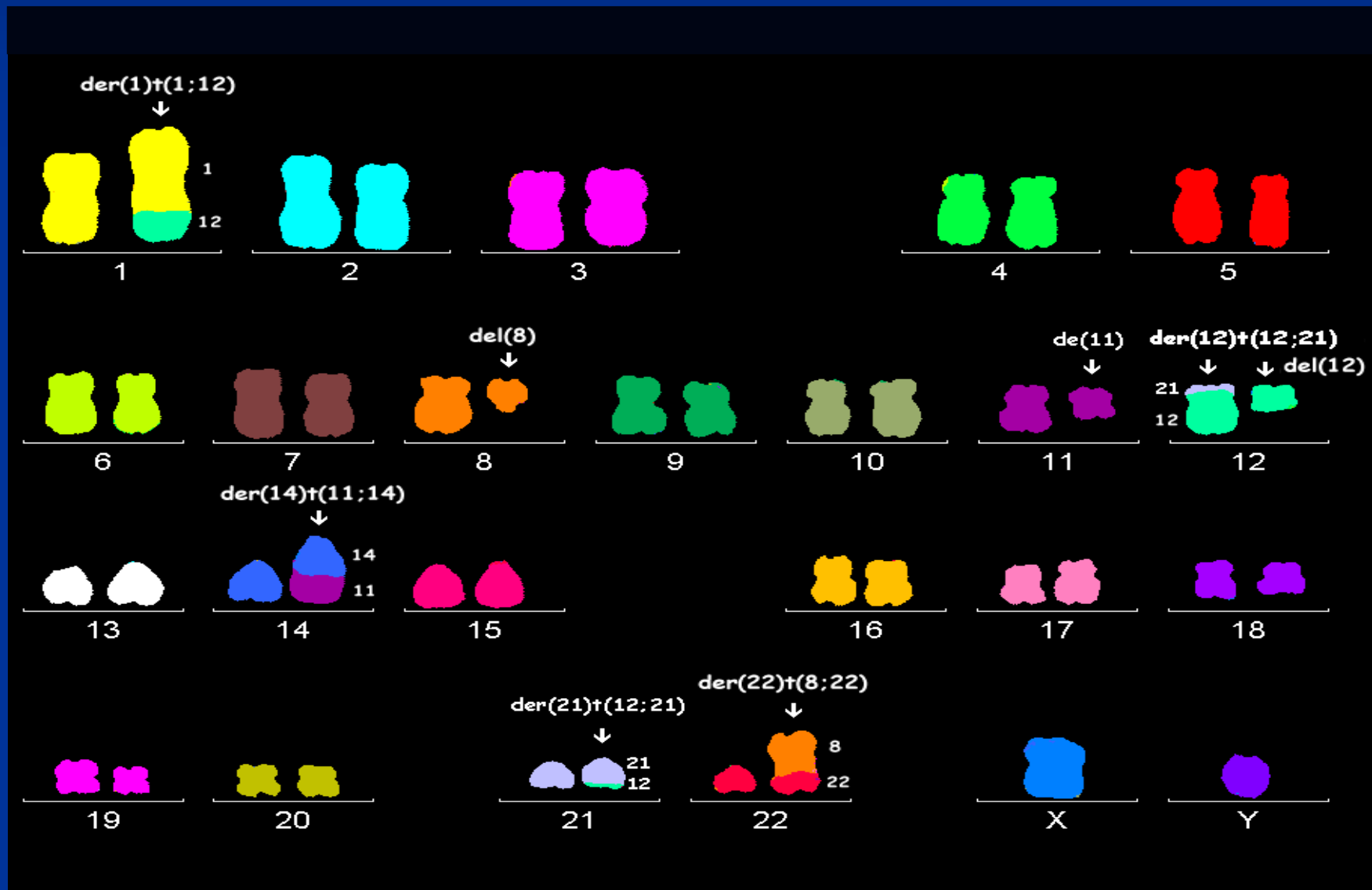


determinace remise

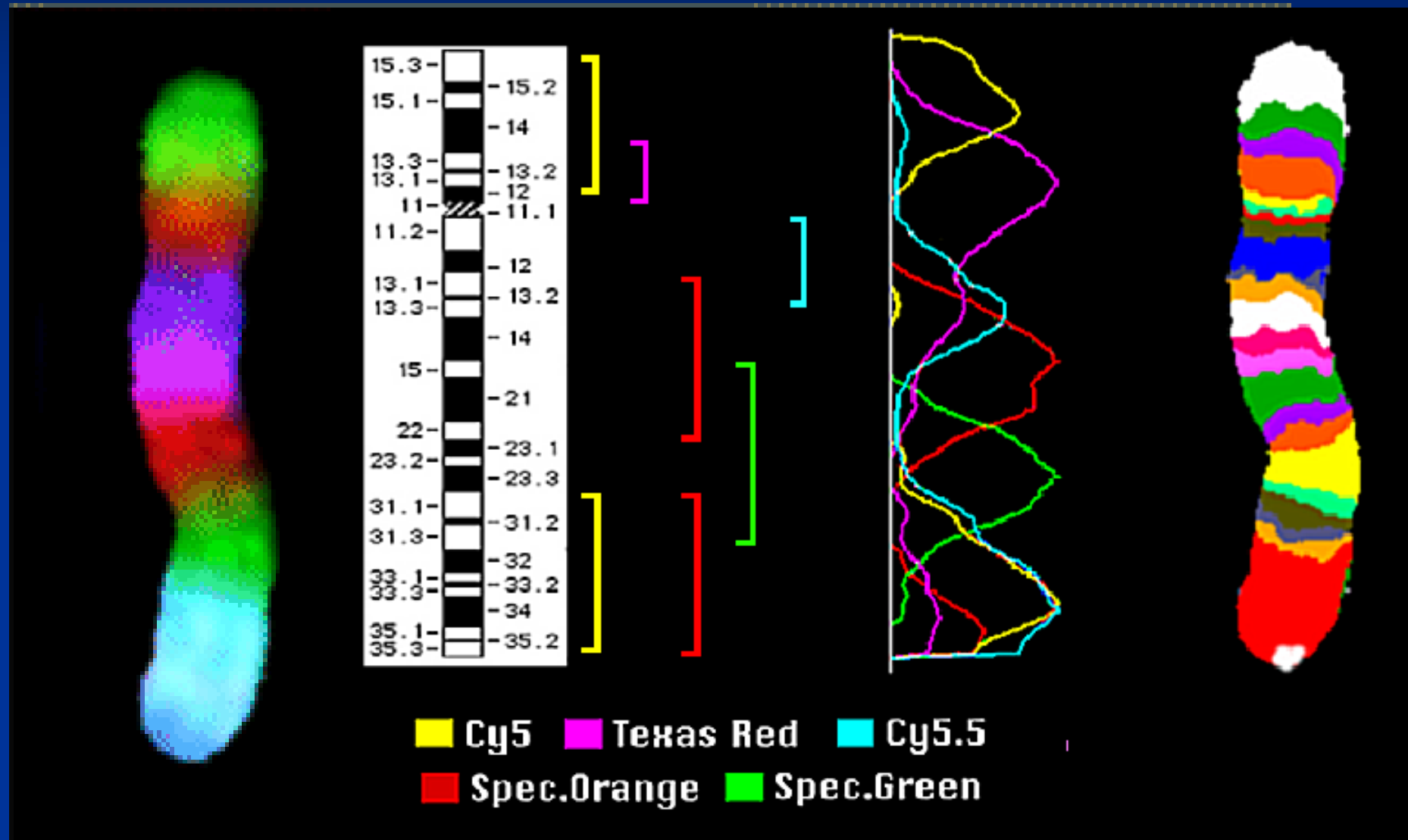
časná diagnostika relapsu

Multicolor FISH

The mFISH software analyzes the color information and identifies the chromosomal origin of each individual pixel within the image



Multicolor banding - mBAND



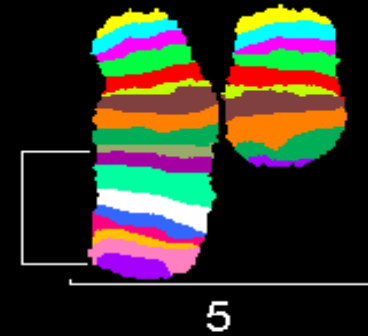
General University Hospital Prague



$\text{del}(5)(\text{q}12\text{q}33.3)$



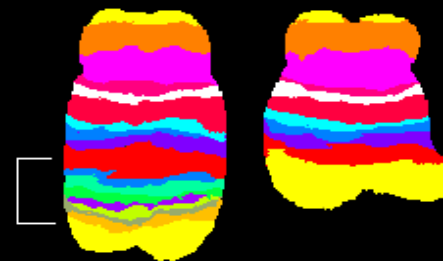
$\text{del}(5)(\text{q}13.3\text{q}33.3)$



$\text{del}(5)(\text{q}13.3\text{q}35.1)$



$\text{del}(5)(\text{q}21\text{q}34)$



$\text{del}(5)(\text{q}21\text{q}33.3)$

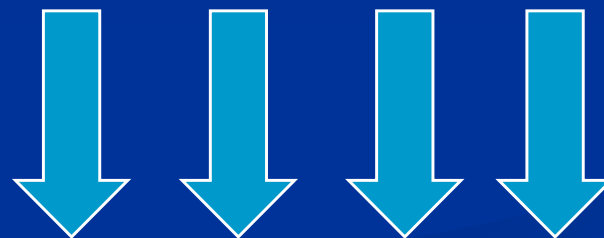
MOLEKULARNÍ DIAGNOSTIKA

Analýza jedné buňky

Geny a nemoci

■ Jeden gen

■ Více genů



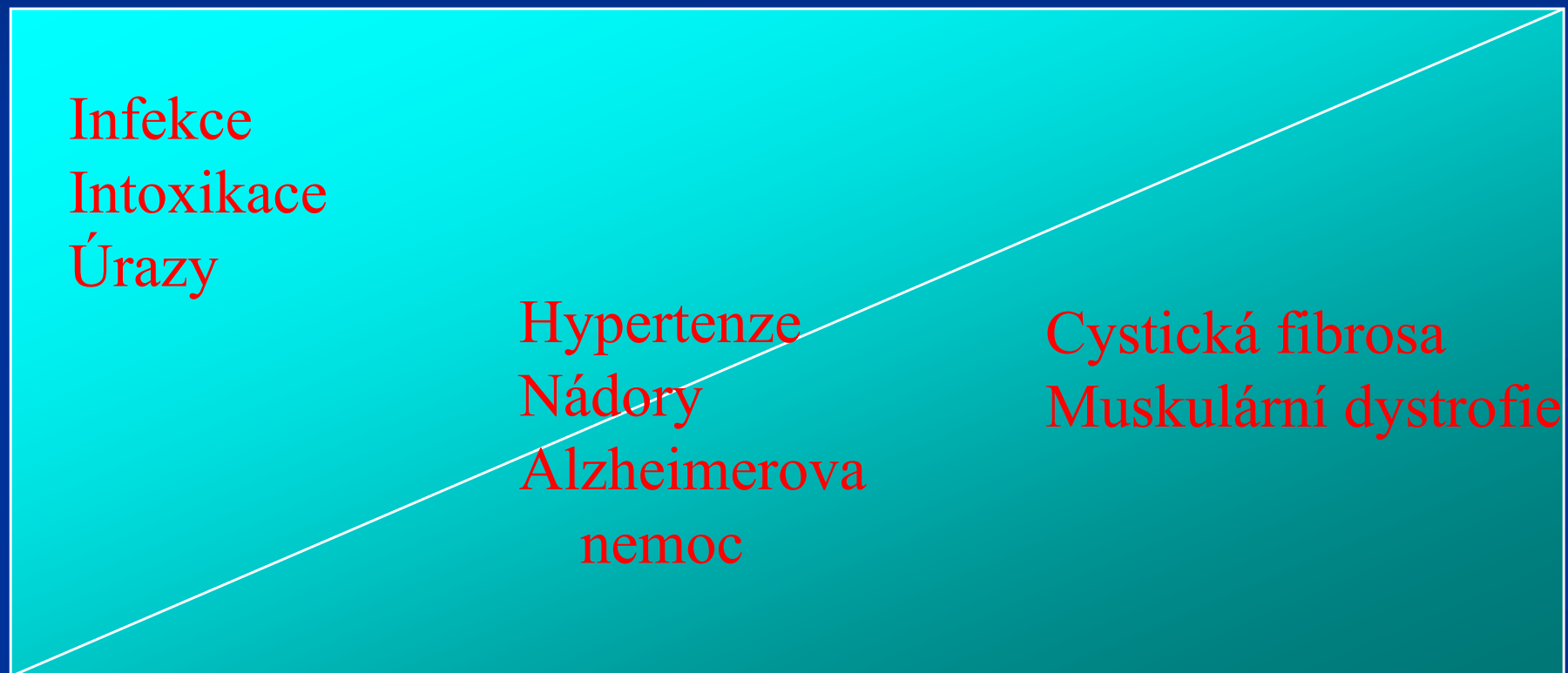
GENETICKÁ PREDISPOSICE

PROSTŘEDÍ

Nemoci

prostředí

geny



Infekce

Intoxikace

Úrazy

Hypertenze

Nádory

Alzheimerova

nemoc

Cystická fibrosa

Muskulární dystrofie

Získané

komplex

Polymorfismy SNPs

Monogenní

mutace

PREIMPLANTAČNÍ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA

Alternativa k tradiční metodě
prenatální diagnostiky jako je analýza
choriopvých klků a amniocentéza.
možnost výběru embryí před implantací
a snížení vzniku genetických vad

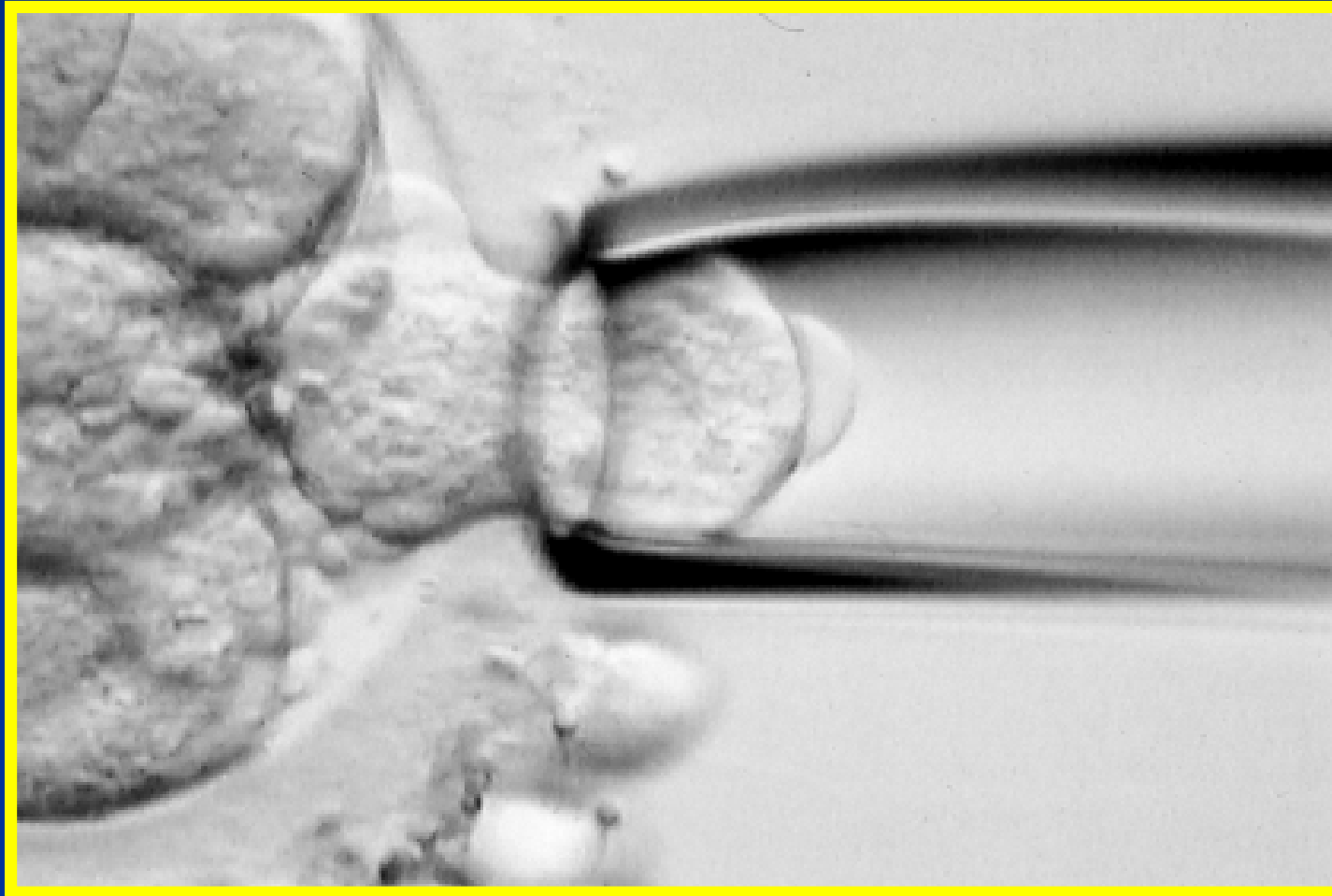
POSTUP

- ❖ Vzniklá embry při IVF cyklu
- ❖ Růst embryí ~8 buněk (den 3)
- ❖ Biopsie embryonálních buněk (blastomery) pro testování
- ❖ DNA - pro PCR testy nebo FISH testování

EMBRYO BIOPSY



EMBRYO BIOPSY



Etické aspekty

- Selekcce našich dětí ??!!
- Selekcce našich partnerů ??!!
- Selekcce pro naši práci ??!!
- Selekcce koho .. nebo pro co .. ??!!

“-OMICS” REVOLUCE

✓ Proteomika

✓ Farmakogenomika

✓ Fysiogenomika

✓ Nutrigenomika

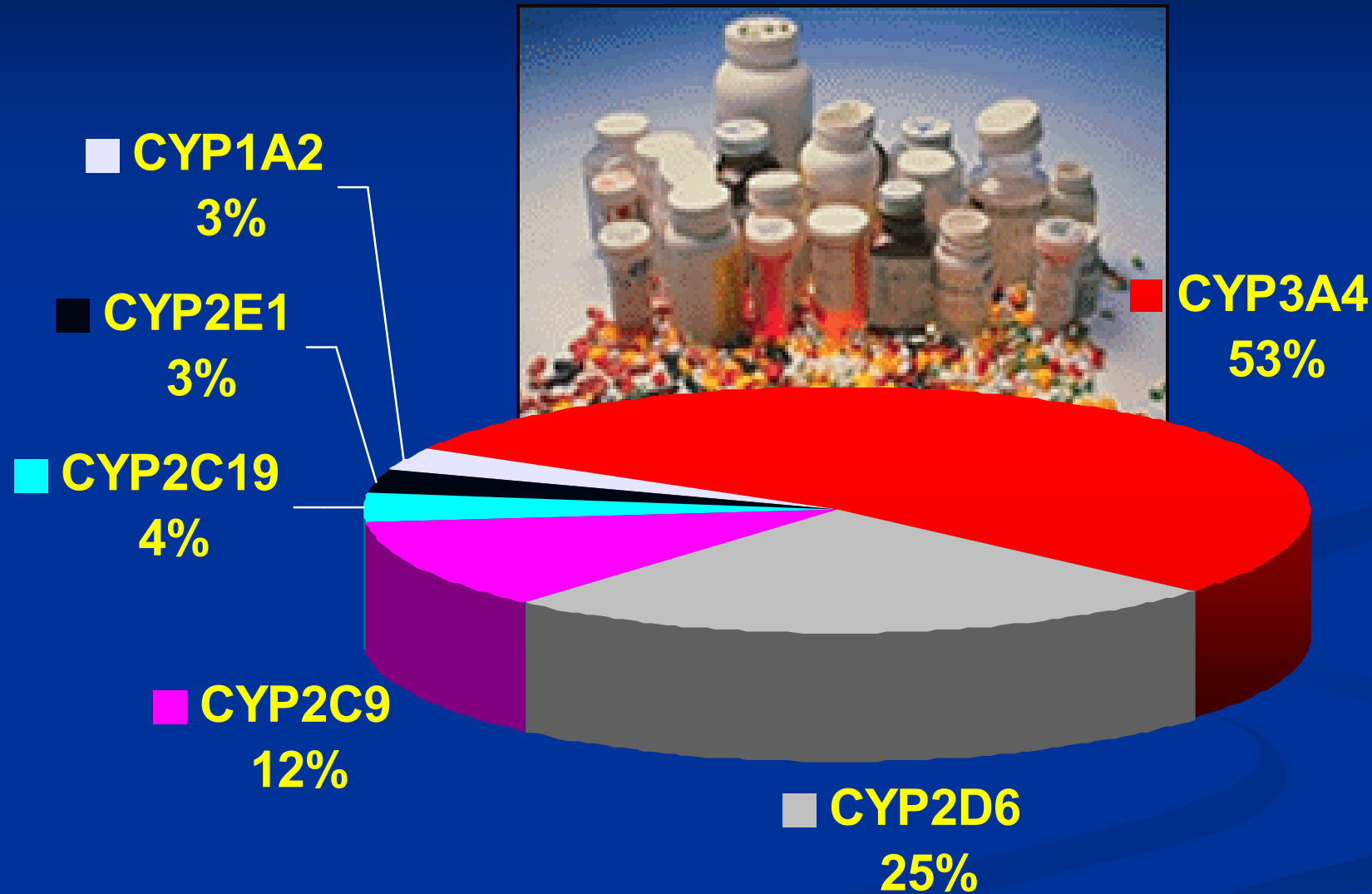
Farmakogenomika

- ❖ Mnoho enzymů přeměňuje léky
- ❖ Při rychlém nebo naopak pomalém metabolismu léku se mohou jejich metabolity akumulovat nebo naopak rychleji z organismu vylučovat
- ❖ Riziko předávkování nebo neúčinné léčby

Cytochrom P 450

- Enzymatický systém
 - Skupina stovek podobných proteinů s katalytickou funkcí
 - Vyskytuje se u zvířat, rostlin, hub i bakterií
- Biosyntéza steroidů, mastných kyselin
- Metabolismus endogenních a exogenních látek
 - Metabolická aktivace
 - Detoxifikace

Cytochrom P-450 a Metabolizmus Léčiv



Dávka a typ látky jsou klíčové



“Každá látka může být jedem, závisí jenom na dávce”

Paracelsus
(1493-1541)

Optimální léčba ...

Responder identification – better drug efficacy



Optimal
treatment

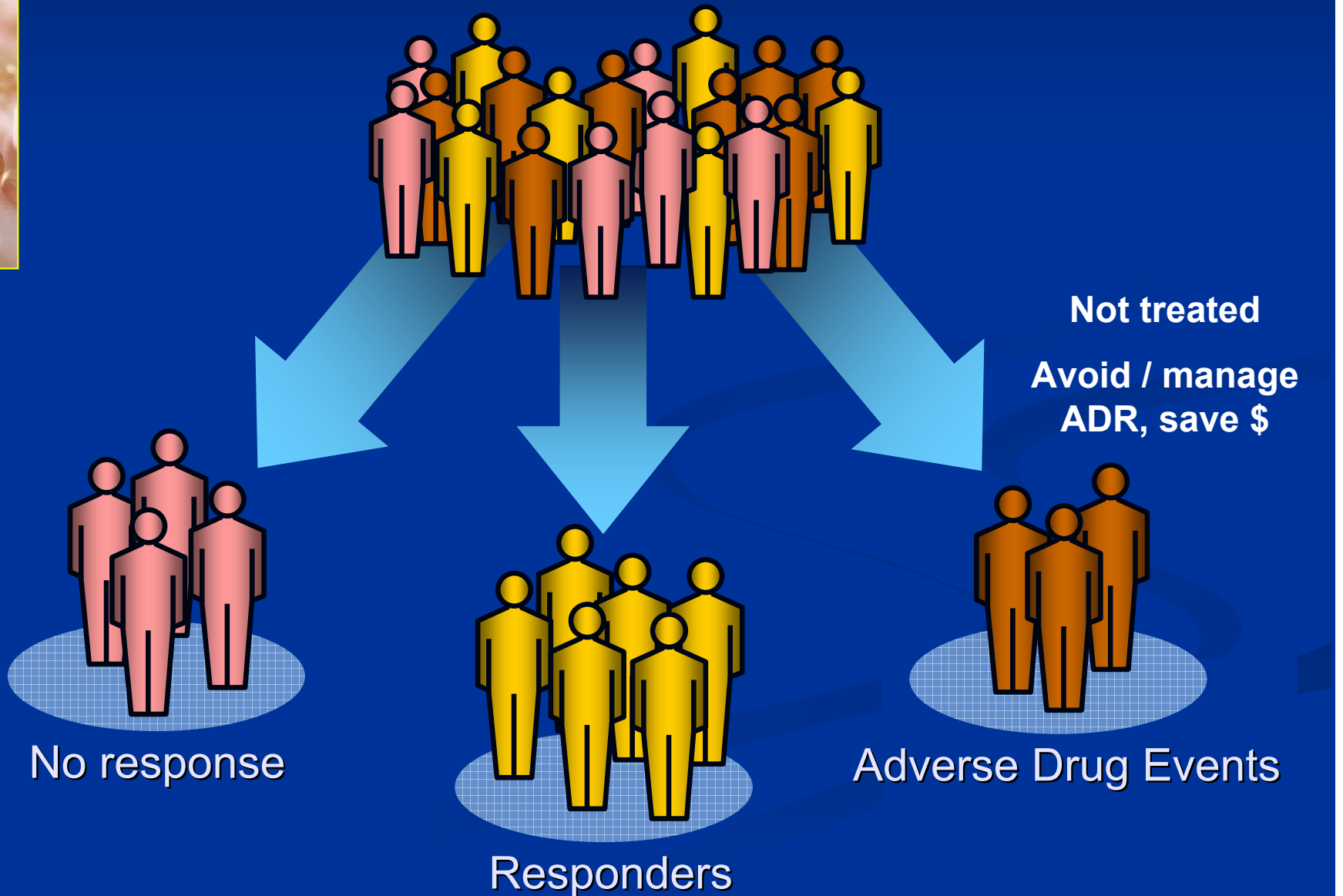
Not treated
No efficacy,
consider
alternatives,
save \$

No response

Responders

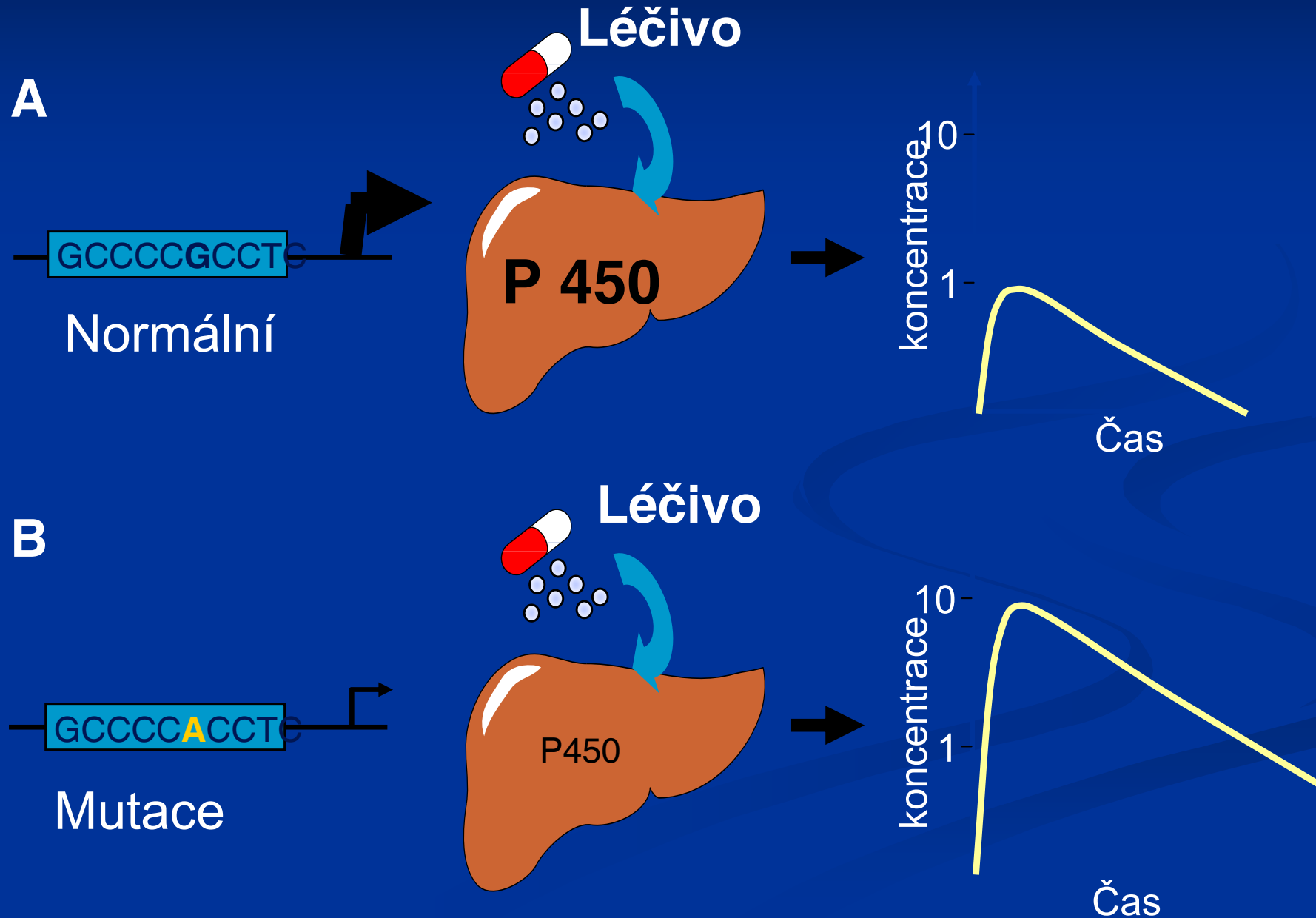
Not treated
Avoid / manage
ADR, save \$

Adverse Drug Events



Geneticky podmíněná variabilita metabolismu léčiv

Shodná dávka=rozdílné plazmatické koncentrace

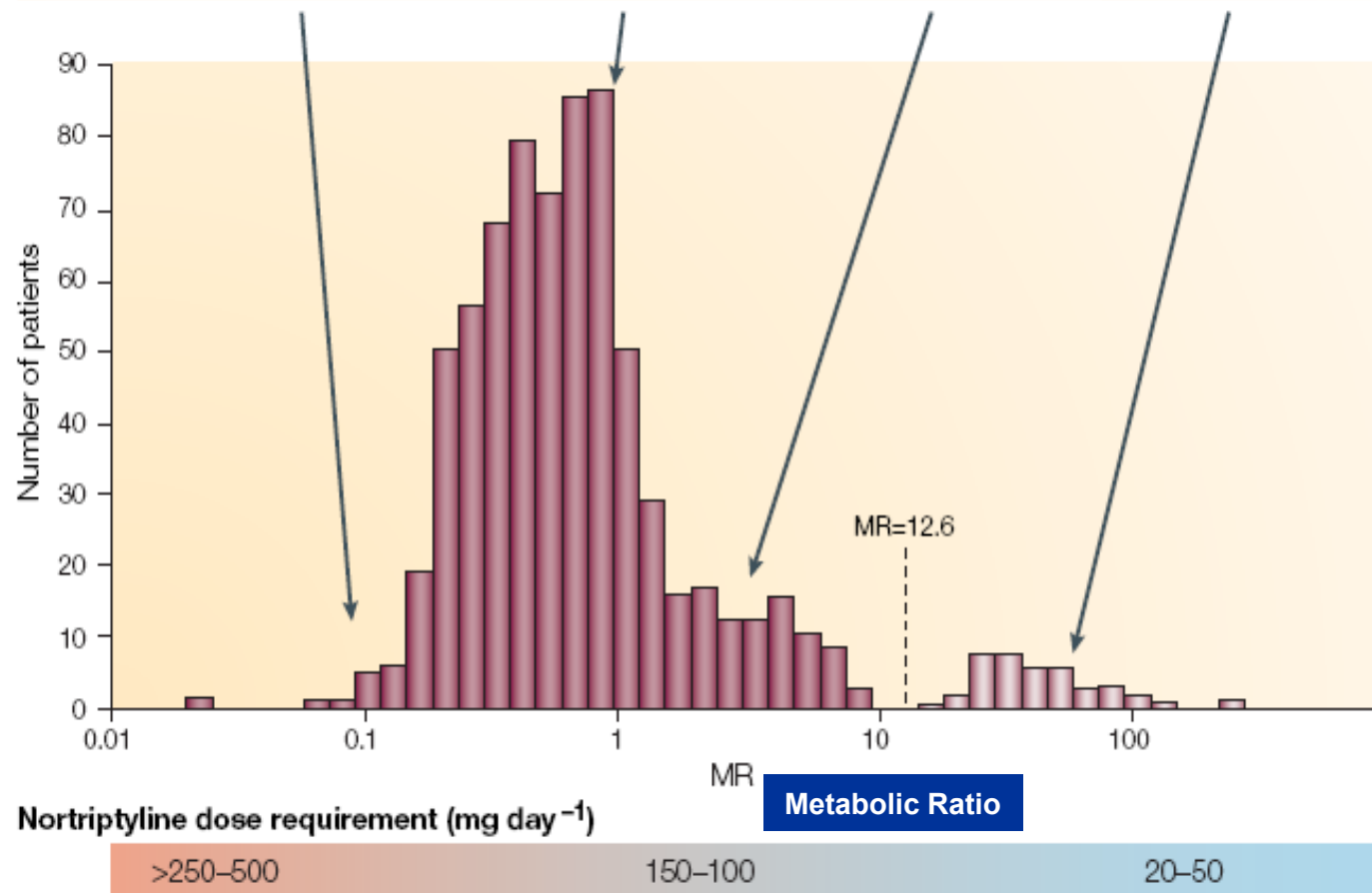


4 Typy metabolizérů

- **Ultrarychlí metabolizéři (UM)**
nosič více kopií (3-13) funkčních alel a produkce zvýšené enzymové aktivity
- **Extensivní metabolizéři (EM)**
zvýšení aktivity maximálně jedné funkční alely
- **Intermediální metabolizéři (IM)**
snížení aktivity maximálně jedné funkční alely nebo null alela
- **Pomalí (špatní) metabolizéři (PM)**
nosič dvou mutovaých alel vedoucí ke ztrátě aktivity

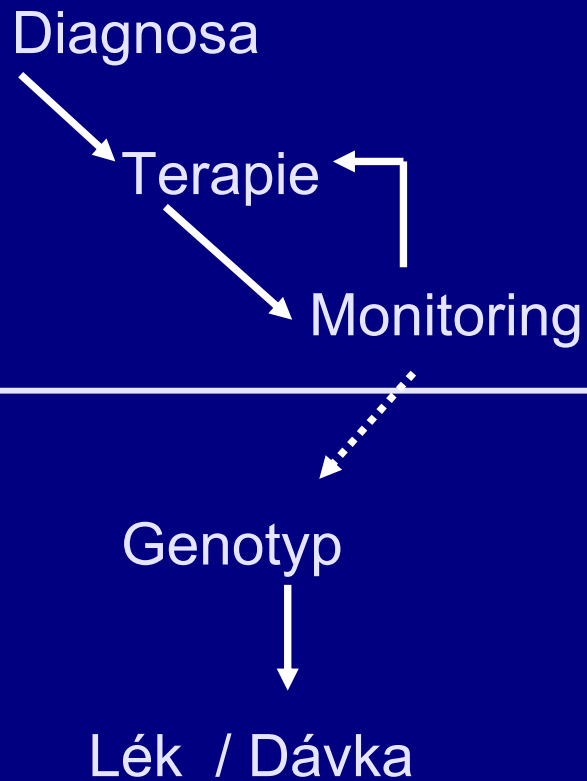
CYP2D6 – vztah genotyp – fenotyp CYP2D6 polymorfismů

Genotype				
Phenotype	Ultrarapid metabolizers	Extensive metabolizers	Intermediate metabolizers	Poor metabolizers
Frequency (Caucasians)	5–10%	80–85%	10–15%	5–10%

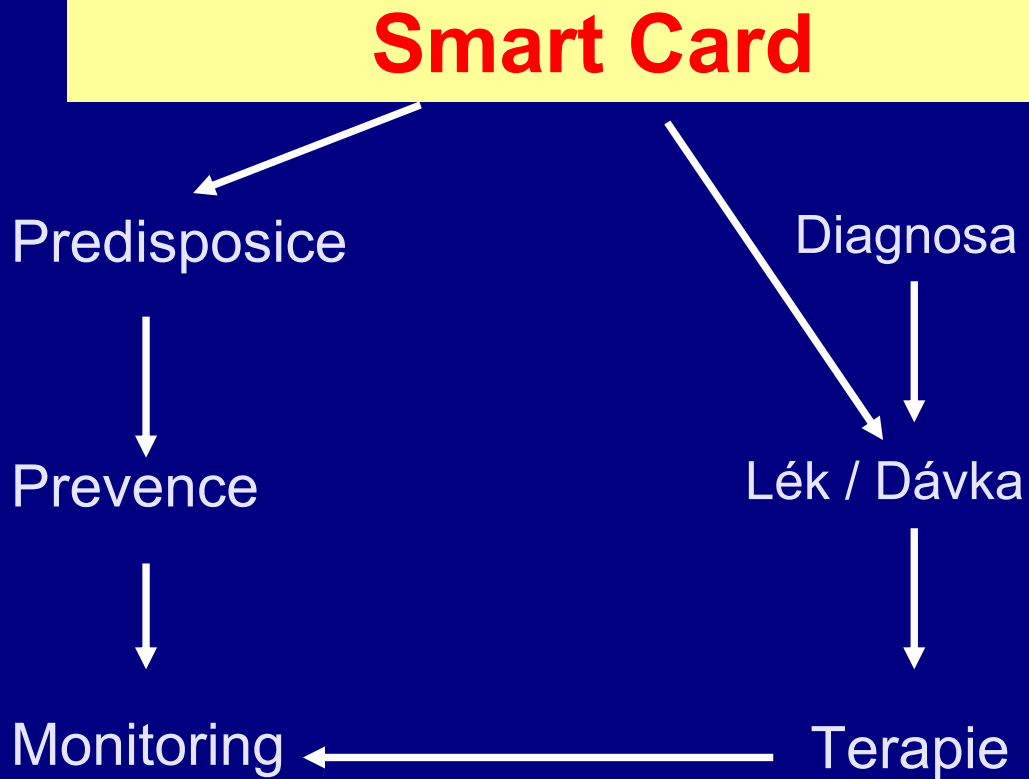


Farmakogenomika

Současnost



Budoucnost

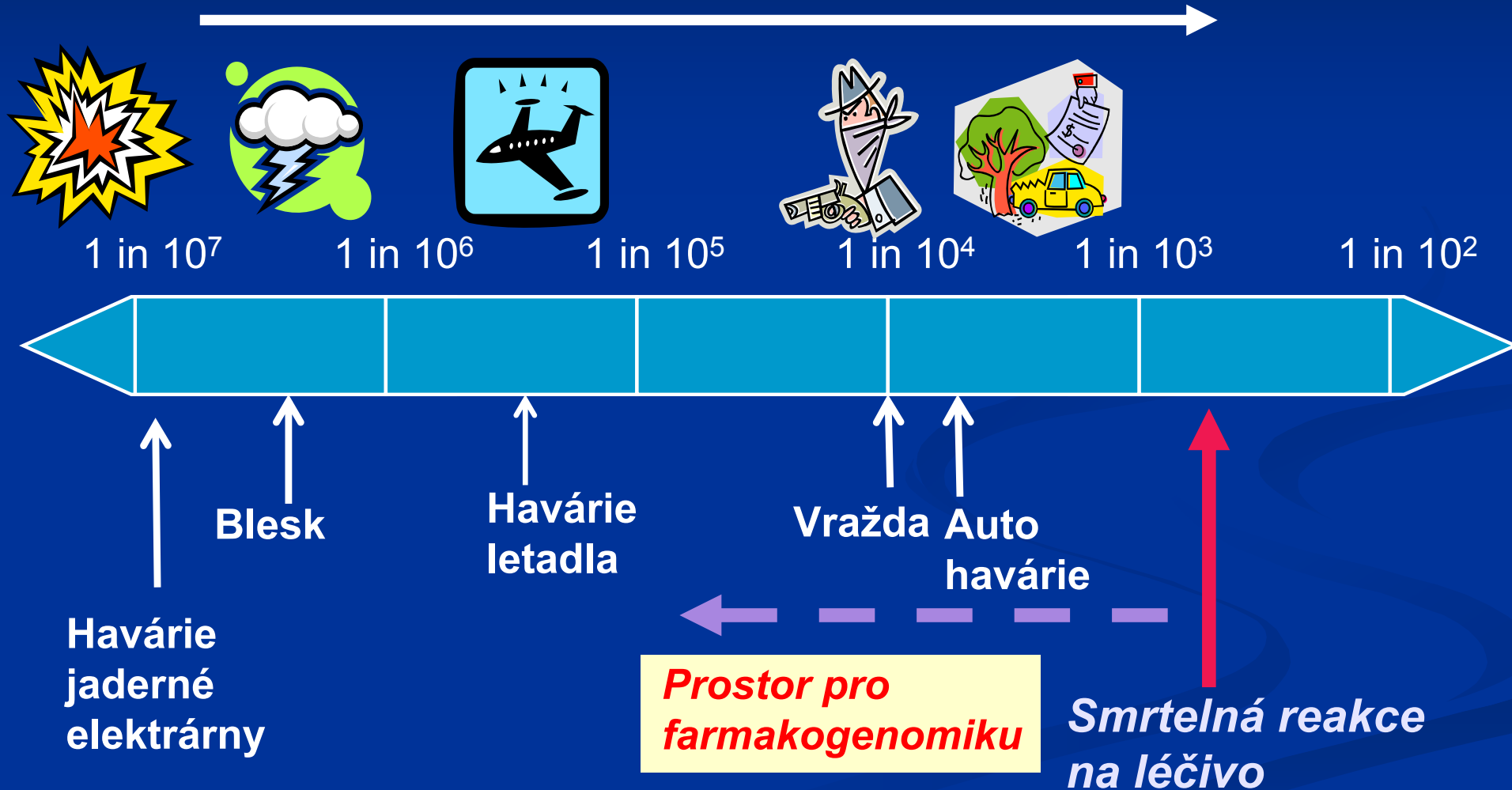


Podle diagnózy

Podle predispozice pacienta

Farmakogenetické testování redukuje riziko

Vzestup smrtelného rizika – roční



Tradiční dávkování léků: Jednotné pro všechny



Světový trend – personalizovaná medicína

- Každý pacient má odlišnou schopnost metabolisovat léky
- Vedlejší účinky nebo neúčinná léčba jsou významné komplikace
- Genotypové testování platí po celý život



Blízká budoucnost ?

**“Zde je moje
sekvence”**



Ad multos annos Václave

