

JAK JSEM PROŽÍVAL 50 LET V OBORU KLINICKÉ BIOCHEMIE

Jaroslav Masopust

Do oboru klinické biochemie jsem vstoupil právě před padesáti lety, tedy v roce 1957, kdy jsem složil atestaci, tehdy s názvem *laboratorní vyšetřovací metody*. Pracoviště našeho oboru se ještě nenazývala odděleními klinické biochemie ale *ústřední laboratoře*. To už však byla doba, kdy laboratorní diagnostika překonala počáteční obtíže, se kterými se setkává každý nový obor. Jeho počátky ve světové medicíně se datují sice do poloviny 19. století, ale ještě na počátku století minulého se mnoho laboratorních testů nedělalo. Byla to především kvalitativní vyšetření moče nebo mikroskopické vyšetření krve, stolice a močového sedimentu. Kvantitativní chemická analýza vycházela totiž především z metod používaných tehdy v průmyslu, jako byly klasické metody vážkové, volumetrické, gasometrické, které ale vyžadovaly velká množství materiálu. Hlavními zdroji informací o zdravotním stavu pacienta byly tehdy pro ošetřujícího lékaře anamnéza a fyzikální vyšetření. V roce 1920 dr. Volhardt uváděl, že na tyto dva zdroje vyšetřování připadá v průměru 90 % informací, a že zbytek – 10 % - tvoří tzv. *pomocná vyšetření*, která se dělí na přístrojová a laboratorní. Rozvoj kolorimetrických a fotometrických technik rozšířil možnosti analytických metod pro vyšetřování metabolitů a dalších látek v tělových tekutinách, vyskytujících se i v nízkých koncentracích. Na začátku třicátých let minulého století (1931) vyšla vynikající kniha „*Clinical Chemistry*“ od amerických autorů *Peterse* a *Van Slyka* ve dvou dílech – „*Methods*“ a „*Interpretation*“, která položila skutečný základ jak analytiky, tak hodnocení výsledků biochemických testů.

Zakladatelem laboratorních vyšetřovacích metod v tomto pojetí byl u nás asistent kliniky vnitřního lékařství profesora MUDr. Karla Hynka v Praze, MUDr. *Jaroslav Hořejší*, pozdější profesor a ředitel Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze. Jednotlivé laboratoře při interních nebo dětských odděleních vznikaly v naší republice zejména po 2. světové válce na více místech. Pro práci v těchto laboratořích bylo důležité vychovat pracovníky tj. laboranty a lékaře - specializované odborníky. Toho úkolu se ujal také profesor Hořejší; zorganizoval v Praze výuku zdravotních laborantů a spolu s profesorem *Niederlandem* v Bratislavě postgraduální výuku lékařů z oboru laboratorních vyšetřovacích metod (společnou pro lékaře v Česku a na Slovensku). Pro rozvoj klinické biochemie v naší zemi přispěly další významné osobnosti. Na prvním místě bych jmenoval profesora *Jiřího Homolku*, který už v roce 1948 jako asistent profesora Švejcara založil na I. dětské klinice v Praze *Centrální laboratoř*, v níž spojil jednotlivé malé biochemické a hematologické laboratoře tehdejší Dětské nemocnice v Praze na Karlově. Homolkův význam pro rozvoj laboratorní medicíny byl však mnohem větší než sjednocení laboratoří. On totiž s několika málo spolupracovníky - laboranty vypracoval, odzkoušel a uvedl do laboratorní praxe *mikrometody* (a *ultramikrometody*). Jejich soubor publikoval nejprve v malé brožuře (1950), později v knižní příručce pod názvem „*Chemická diagnostika v dětském věku*“ (1956). Tuto publikaci i další rozšířené vydání (dvoudílné) používali všichni laboratorní pracovníci jako „bibli“ laboratorních vyšetřovacích metod nejen u nás, ale v překladech v Polsku a NDR. Na dětských klinikách v Praze se běž-

ně vyšetřovaly v té době i parametry vnitřního prostředí (Na^+ , K^+ emisní plamenovou fotometrií, Cl^- merkurimetricky a tzv. alkalická rezerva na Van Slykově manometru). To bylo velmi důležité pro diagnostiku poruch vodního a elektrolytového hospodářství, zejména u kojeneckých průjmů nebo u dětí s diabetickou ketoacidózou. Profesor Homolka začínal tuto práci s pěti laboranty a dvěma sanitářkami; za jeden rok (1948) provedli kolem 8000 kvantitativních vyšetření. Když to srovnáme se statistickým výkazem Ústavu klinické biochemie a patobiochemie 2. LF UK a FN Motol, který je vlastně pokračováním oné Homolkovy Centrální laboratoře, je to rozdíl diametrální. Kupř. v roce 2000 zde bylo provedeno 2 miliony 213 tisíc analýz s 60 pracovníky; v roce 2006 se tento počet zvýšil na 3 669 885 vyšetření. Znamená to přes 10 tisíc za 1 den. Vůbec z toho nevyplyvá, že by v roce 1948 měli laboranti málo práce nebo pohodlný laboratorní život. Spíše naopak: slovo „laborant“ pochází od latinského *laborare*, což znamená tvrdě pracovat, protože manuální technika s tehdejšími pomůckami a přístroji, stejně jako analytické metody, byly velmi pracné. Mnohdy jedno vyšetření trvalo hodiny i dny. Kupř. stanovení tzv. nebílkovinného (zbytkového) dusíku v séru vyžadovalo precipitaci bílkovin, centrifugaci, mineralizaci zahříváním s koncentrovanou kyselinou sírovou v pískové lázni a fotometrické vyhodnocení tzv. nesslerizací. Dnes tento test nahrazuje stanovení močoviny, které je možno vyšetřit do několika minut. Nebo to, čemu se říkalo „jaterní testy“ (Weltmannův koagulační pás, Takatova zkouška, kefalín-cholesterolový test), považovali laboranti i myčky za „jaterní testy“, protože to vyžadovalo moc pipetování a moc zkumavek pro jedno vyšetření.

Z dalších osobností bych jmenoval profesora MUDr. *Karla Maška* z centrální laboratoře v nemocnici Na Bulovce, který se zasloužil zejména o institucionalizaci klinické biochemie v systému zdravotní péče v České republice. Byl také jmenován jako první hlavním odborníkem MZ pro náš obor. Vypracoval (spolu s primářem Bedřichem Nejedlým) koncepci oboru, která se nejprve nazývala „Koncepce služeb klinické biochemie“. Důležitým krokem bylo zavádění počítačové techniky do práce biochemických laboratoří, jejímž průkopníkem byl právě profesor Mašek.

Další osobností, která se zasloužila významně o rozvoj oboru, byl už jmenovaný MUDr. *Bedřich Nejedlý*. Nezískal nikdy vědecko-pedagogický titul docent nebo profesor (z politických důvodů), ač by si ho velmi zasloužil. Jako primář okresní nemocnice v Kladně vypracoval, rozvinul a uvedl do klinické praxe diagnostiku a úpravu poruch vnitřního prostředí. Jeho kniha „Klinická biochemie vnitřního prostředí“ se stala teoretickým i praktickým návodem nejen pro klinické biochemiky, ale možná ještě více pro kliniky, jak tyto často život ohrožující situace včas odhalit, jak je adekvátně léčit a léčení kontrolovat. Možno bez nadsázky říci, že tato publikace položila teoretický základ pro později vytvořené jednotky metabolické péče a velmi pomohla lékařům na právě vznikajících odděleních anesteziologicko-resuscitačních nebo pooperačních jednotkách intenzivní péče.

Byl bych ale nespravedlivý, kdybych připomněl jen tyto známé osobnosti. Náš obor do dnešní podoby spoluvytvářelo za těch padesát let několik tisíc pracovníků, z různých profesí a s různým vzděláním. Poznal jsem jich osobně několik stovek. Mohu říci, že pro většinu byla práce v laboratořích chápána jako poslání i přesto, že jsme obor, který mezi známými medicínskými obory stojí v očích veřejnosti poněkud v pozadí; málokdy jsme vděčnými pacienty obdarováni květinami.

Ale vraťme se k té padesátileté historii. K jakým změnám docházelo v klinické biochemii v průběhu dalších let, se pokusím vylíčit podle rozvoje pěti hlavních oblastí, v kterých se obor vyvíjel.

V oblasti **organizace zdravotní péče** to bylo ustanovení klinické biochemie jako oboru v rámci společných léčebných a vyšetřovacích složek, Zmínil jsem se, že prvním krokem bylo vytvoření ústředních laboratoří. Instrukce a prováděcí brožuru vypracoval pro ministerstvo zdravotnictví Karel Mašek. Legislativním podkladem pak byla *koncepte služeb klinické biochemie*, která zavedla „centralizovanou decentralizaci“ laboratorních vyšetření. V roce 1973 byla vypracována nová úprava - *koncepte oboru klinické biochemie*, kterou se stala klinická biochemie samostatným oborem v rámci oborů léčebně preventivní péče, s vlastní dvoustupňovou atestací. Pracoviště oboru se začala nazývat *oddělení klinické biochemie*; na území republiky byla členěna vertikálně i horizontálně jako součást tehdejších ústavů národního zdraví. Dostupnost laboratorních vyšetření byla velmi dobrá a jejich kvalita se postupně zlepšovala zaváděním unifikace a standardizace analytických postupů a pravidelnou kontrolou kvality, organizovanou krajskými (event. okresními) odborníky klinické biochemie.

V oblasti **analytiky** to byla cesta od vícestupňových reakcí trvajících i několik hodin až dní k reakcím jednostupňovým neboli „jednozkuškovým“. Zároveň byla postupně vyloučena všechna agresivní činidla nebo vysoké reakční teploty, které znemožňovaly použití automatů, a byla zaváděna enzymová činidla, která už nebyla agresivní a navíc se vyznačovala vysokou specifíčností. Mez detekce se snižovala z oblasti *milimolů* na úroveň *nanomolů* až *pikomolů* (tj. 10^{-12}) popřípadě *femtomolů* (10^{-15}). Zavedením metod molekulové biologie se postupovalo ještě dále, k *attomolům*; dokonce bylo nutné přidat další zlomky – *zeptomoly* a ještě menší *yoctomoly* (tj. 10^{-21} až 10^{-24} molu), tedy detekce jedné molekuly v 10 litrech (!). Byla zavedena „suchá chemie“, která umožňuje provádět testy přímo u pacienta pomocí diagnostických proužků. Vypracování *imunochemických metod*, zejména se značenými reaktanty (jako je RIA, ELISA, EIA, FIA apod.), znamenalo možnost rutinního vyšetřování látek, jako jsou hormony a další analyty, vyskytující se jen v nepatrném množství ve velmi komplexní směsi, jakou je biologický materiál. Rozšířila se komerční výroba diagnostických souprav pro jednotlivé analyty. Rozšířily se i možnosti vyšetření stále se zvětšující palety biochemických a imunologických testů. Odpadla někdy zdouhavá a náročná příprava reagensů, která před těmi padesáti lety zabírala hodně pracovního času; dnes lze už vše koupit, ale stojí to peníze. Jak výrazně se zjednodušilo a zpřesnilo vyšetření biochemických markerů, si můžeme ukázat na průkazu těhotenství. Před padesáti lety se tento test prováděl na základě specifické biologické reakce na ováriích králičích samic, kterým byl aplikován do dutiny břišní vzorek moče vyšetřované ženy. Pozitivní nález zvýšeného množství choriogonadotropinu se projevil drobnými hemoragiemi v oblasti peritonea kolem vaječníků pokusných zvířat. Vyšetření trvalo asi 3 dny a těhotenství se takto prokázalo mnohem později než je tomu dnes, kdy si průkaz může provést žena sama pomočením speciálního diagnostického proužku zakoupeného v lékárně. Výsledek zná do deseti minut. Vyšetření je možno provést už po několika dnech, kdy došlo k vynechání menstruačního krvácení. Převratem v laboratorní technologii byl *objev polymerázové řetězové reakce* (PCR) a dalších technik DNA a RNA analýzy. Ohlášením

rozluštění lidského genomu v roce 2000 nastala nová éra v biologických vědách, která přinesla zcela nové poznatky zejména pro medicínu. Jednou z technik, která přechází z výzkumu do laboratorní praxe s přímým klinickým využitím, je **technologie DNA-mikročipů**. Tato metodika, zakládající se na detekci genů a jejich mutací objevených u různých chorobných stavů, zejména pak u nádorových onemocnění pomocí genových sond umístěných v malinkých terčích (mikročipy) na ploše destičky, umožňuje rozpoznat přítomnost alterovaných genů ve vyšetřovaném vzorku biologického materiálu. Pomocí vybraných cDNA těchto genů lze připravit biomarkery, jimiž lze rychle a spolehlivě rozlišit podskupiny pacientů s různým histopatologickým a klinickým projevem. Výrazně se tím zlepšuje diferenciální diagnostika, určení prognózy, nastavení a monitorování optimální terapie.

V **přístrojové technice** to byla cesta od manuálních metod přes mechanizaci, vyšší mechanizaci až po *automatizaci a robotizaci*. Laborant na dnešních dobře vybavených pracovištích sedí před obrazovkou s řídicím panelem, dotýká se tlačítek a zadává tak automatickému analyzátoru, které testy se mají z malého vzorku materiálu provést. Vše za něho vlastně udělá „stroj“, zatímco laborant před 50 lety se dost naběhal, napipetoval, naměřil odečítáním ze stupnic měřicích přístrojů, napsal a ručně vypočítal výsledných dat. Zároveň se přístrojová technika zmenšovala, takže původní velké automaty, které vážily i několik set kilogramů a zabíraly velkou plochu, se nyní vejdou na laboratorní stůl; začíná se používat výše zmíněná *mikročipová technologie* a dokonce se uvažuje o nanotechnologii, to je „laborator“ ve formě biosenzoru velikosti zrnka rýže. Velký rozvoj zaznamenaly dělicí metody – chromatografie (vysokoučinná kapalinová chromatografie) a elektroforetické metody. Namísto zdlouhavé a pracné elektroforézy na papírových prouzcích se používá kapilární elektroforéza, při níž dělení proteinů i jiných látek trvá několik minut i s vyhodnocením výsledků. Hmotnostní spektrometrie v kombinaci s dělicími technikami umožňuje rozpoznání velké řady látek a jejich kvantifikaci v tak obrovské směsi látek jakou je plazma, moč, extrakty tkání (nádorů). Využití v diagnostice metabolických vad nebo v toxikologii jsou jen příklady možností. Přístroje s iontově selektivními elektrodami pro stanovení Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- nahrazují plamenové emisní fotometry nebo coulometry. Technologie biosenzorů se také začíná používat rutinně, ale jejich široké použití je teprve očekáváno. Zcela nový revoluční přístup v objasňování životních funkcí přináší metody molekulové biologie. Zmíněné genetické čipy umožňují určit kupř. vhodnost pacienta pro použití určitého léku; mohou upozornit na případnou nesnášenlivost. Zmíním ještě jeden příklad, který dokumentuje velký technologický pokrok v oblasti laboratorní diagnostiky. Před oněmi padesáti lety nechyběl v žádné lépe vybavené laboratoři polarograf; přístroj a metodika, za níž byla udělena Nobelova cena prvnímu československému vědci profesoru Jaroslavu Heyrovskému. Polarografie měla využití i ve zdravotnictví. Kromě stanovení stopových prvků jako měď, zinek, kobalt a především olovo a řady dalších, to byla tzv. Brdičkova polarografická reakce jako test na „rakovinu“. I když už Brdička sám upozorňoval, že test je pozitivní též u jiných onemocnění (záněty), přesto byl u nás velmi populární a z používaných laboratorních markerů tehdy vlastně jediný. Dnes se už na polarografickou reakci proteinů v roztoku trojmocné kobaltité soli, při níž se měřila výška charakteristické dvojnuly, kterou u Brdičkovy


filtrátové reakce způsoboval alfa1-kyselý glykoprotein (orosomukoid), zapomnělo. Ale neprávem: reakce volné sulfhydrylové skupiny v albuminu s trojmocným kobaltem se dnes používá ke stanovení tzv. ischemického albuminu (cobalt-binding albumin) jako nespecifického, ale velmi časného markeru akutního infarktu myokardu. Stanovení se neprovádí pomocí polarografu ale na fotometru.

Obrovský rozmach zaznamenala **informatika** tedy technologie **zpracování dat** a rozvoj **počítačové komunikace**. Byla to cesta od „*tužky a papíru*“ přes logaritmické pravitko a kalkulačky, které se používaly pro výpočty výsledků, *k počítačům několika generací* s výrazně narůstající pamětí a rychlostí zpracování, se zmenšováním jejich rozměrů i hmotnosti. Budování *informačních systémů* ve zdravotnických zařízeních, jejichž součástí je *laboratorní informační systém*, stejně jako používání komunikace s pomocí celosvětových sítí jakou je kupř. INTERNET, je dnes samozřejmostí. Neznalost práce s počítačem se považuje za stejný nedostatek jako negramotnost v minulosti. Na začátku sedmdesátých let začal zavádět zpracování laboratorních dat profesor Mašek v nemocnici Na Bulovce. Tehdejší robustní počítače s velmi malou operační pamětí ukládaly údaje na děrných štítcích a páscích. Ty sloužily jako vstup pro z dnešního hlediska těžkopádné elektrické psací stroje. Výsledky se posílaly na oddělení pomocí poštu vyrazených dálnopisů. Já si vzpomínám, že ještě na konci osmdesátých let se laborantky na mém oddělení v Motole radovaly, když se poruchový počítač zasekl a bylo nutno se vrátit na nějaký čas k ručnímu zapisování. Když na počátku devadesátých let laboratoř dostala první stolní počítače, měly před nimi nejprve velký ostych a některým trvalo měsíce, než se s nimi trochu spřátelily. Pomohly k tomu jednoduché počítačové hry. Dnes by asi osazenstvo laboratoře dalo výpověď, kdybychom počítače sebrali.

Velký rozvoj zaznamenala klinická biochemie jako **medicínský vědní obor**. Za těch 50 let to byla, zjednodušeně řečeno, *cesta od Krebsova citrátového cyklu* k vysvětlení molekulových mechanismů buněčných funkcí jako je *cyklus dělení buňky*, *programovaný zánik buňky* nebo *signální transdukce*, a ten nejvýznamnější krok k odhalování podstaty chorobných stavů - bylo *zmapování lidského genomu*. Byly zavedeny další pojmy, kromě genomu a jemu odpovídající technologie, kterou je genomika, to je proteom a proteomika, a další jako transkriptom, kinom, metabolom apod. Znamená to desetitisíce nových názvů, které si nemůže žádný člověk zapamatovat (to by musel mít v mozku paměťovou jednotku na úrovni terrabytů). Ale na to máme výkonné počítače. Ty ale za nás neudělají všechno; k tomu je potřeba se učit, stále se učit, jak přibývá nových poznatků. V medicíně, jako ve všech oborech lidské činnosti, v kterých se zpracovávají fakta, je třeba naučit se správně myslet, ne memorovat. Správně vedená výuka klinické biochemie, která po roce devadesát byla zavedena do kurikula výuky na většině lékařských fakult jako povinný předmět, k tomu poskytuje velmi vhodnou příležitost ve formě interpretace laboratorních testů u jednotlivých pacientů. Dnes k tomu máme i u nás dobré učebnice a skripta; a co není v nich, můžeme nalézt v bibliografických databázích věhlasných zahraničních univerzit.

Co nás čeká, když nezničíme život na této planetě? Otevřela se nám cesta, na jejímž horizontu je zvládnutí takových nemocí jako je rakovina, diabetes, ateroskleróza a choroby s ní spojené, osteoporóza, stejně jako řada dalších dědičných nebo zís-

kaných onemocnění - a také prodloužení funkčního lidského života stále v dobrém zdraví, který nebude mít současné problémy vyššího věku. Klinická biochemie v tomto vědeckém projektu bude mít jistě významné místo. Je třeba však přesvědčit ty, kteří o tom budou rozhodovat, že: *chceme-li jít hlouběji za poznáním, musíme i hlouběji sáhnout do kapsy a že rozhodně je užitečnější věnovat prostředky na zachování života než na jeho ničení.*

A decorative graphic consisting of several overlapping, wavy, light gray lines that flow across the page from left to right, creating a sense of movement and depth.