

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Problematika, přínosy a omezení stanovení stopových prvků ve vlasech

bakalářská práce

Autor práce: Věra Žižková
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Ing. Václav Senft
Konzultant: Prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.

Datum odevzdání práce: 3. 5. 2013

Abstrakt

Tématem práce je zhodnotit vlastní zkušenosti se stanovením stopových prvků ve vlasech a současně shromáždit literární údaje z této oblasti a pokusit se odpovědět na otázku, zda je stanovení stopových prvků ve vlasech vždy relevantní a přínosné, či zda má svoje omezení.

Stanovení stopových prvků ve vlasech přináší řadu výhod (snadný neinvazivní odběr, trvanlivé vzorky, malé potřebné množství) a umožňuje získat jinak jen těžko dostupné retrospektivní informace o stavu organismu v dlouhém časovém období až několika let.

Stanovení stopových prvků ve vlasech má ale i svá úskalí a vyžaduje vyřešení mnoha problémů. Potenciálně negativní vliv má např. používání vlasové kosmetiky. Vždy také hrozí možnost kontaminace vlasů z vnějšího životního či pracovního prostředí. Prvním krokem analýzy vlasů proto musí být čištění (mytí) vlasů vhodným postupem tak, aby se maximálně odstranilo vnější znečištění vlasů, ale současně se jen minimálně ovlivnil endogenní obsah prvků ve vlasech. Velmi často se používá metodika dle IAEA zahrnující opakované mytí vodou a acetonem.

Druhým nezbytným krokem je mineralizace vlasů, tj. převedení do roztoku. Obecným rizikem při mineralizaci je na jedné straně možná ztráta prvku způsobená např. vytěkáním při zahřívání, na druhé straně hrozí kontaminace vzorku použitými reagensy. Optimálním postupem se zdá být tlaková mikrovlnná mineralizace s přidávkem koncentrované HNO_3 a H_2O_2 .

Vlastní analýzu lze realizovat polarograficky nebo hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem. Nejčastěji používaným principem stanovení je ale atomová absorpční spektrometrie. Při dostatečně vysoké koncentraci s plamenovou atomizací, při nízkých koncentracích s elektrotermickou atomizací.

Pro získávání relevantních informací je dále nezbytná validace a standardizace metody. Například přesnost je vhodné prověřit mezilaboratorní kontrolou (u nás bohužel zatím téměř nedostupnou) nebo použitím některého dostupného referenčního materiálu (např. BCR CRM 397). Preciznost lze relativně snadno určit opakováním analýzy homogenního vzorku.

Velmi obtížným a dosud nedořešeným problémem se ale jeví určení referenčního intervalu. Obsah prvků ve vlasech a výsledky analýzy totiž závisí na velkém množství faktorů (velké interindividuální rozdíly, časový průběh expozice a stavu organismu, délka a pozice analyzované části vlasů atd.)

Ještě obtížnější je odpovídající interpretace výsledků, protože jsou zatím jen velmi omezené informace o souvislostech koncentrace ve vlasech a vlivu na cílový orgán a zdravotní stav.

Uvedené problémy zatím prakticky znemožňují získávat pomocí stanovení koncentrace stopových prvků ve vlasech detailní informace spojené s malými nevýznamnými expozicemi toxických prvků nebo s drobnými změnami v přísunu biogenních prvků do organismu. To ovšem nevylučuje využití a přínosy u skutečně významných expozic a intoxikací. V práci je uvedena řada příkladů z vlastní praxe.

S diskutovanými problémy poněkud kontrastují komerčně laděné inzeráty slibující bezproblémové, jednoduché až zázračné zmapování stavu organismu, jednoznačné zhodnocení a doporučení například různých doplňků stravy. Vše pochopitelně podmíněné zaplacením (nejlépe opakovaným) příslušné finanční částky.

Jak tedy po shrnutí údajů z literatury a vlastních zkušeností odpovědět na základní nadnesenou otázku, tj. zda je analýza vlasů přínosná a obecně použitelná?

V řadě případů lze odpovědět, že ano. Ve sdělení jsou uvedeny příklady úspěšného využití při získávání retrospektivních údajů u vysokých expozic Pb, Ni, Cd, Hg a Fe: intoxikace pacientky olovem obsaženým v dlouhodobě užívaném bylinném koncentrátu, několika týdenní monitorování niklu ve vlasech dobrovolníka po týdenní expozici při výrobě NiSO₄, prověřování ztrát Fe u pacientky z hematologie, intoxikace celé rodiny olovem po dlouhodobém používání nekvalitní keramiky, intoxikace olovem restaurátorů historických maleb.

Komerční využití u individuálních výsledků běžné populace se ale jeví stále jako velmi problematické a odpověď na základní otázku zní, že ne, tj. že pro takové zadání zatím stanovení koncentrace stopových prvků ve vlasech není zcela přínosné a ani není jednoduše obecně použitelné.

Abstract

The thesis focuses on an evaluation of own experience in determining trace elements in hair and on gathering literature data from this area. The thesis concurrently attempts to answer the question of whether the determination of trace elements in hair is always relevant and beneficial or whether it poses certain limitations.

The determination of trace elements in hair presents a number of advantages (i.e. easy and non-invasive sample collection, sample durability, small quantity) and it allows researchers to obtain otherwise hardly accessible retrospective information on the condition of the human body over a longer time horizon, often extending over several years.

However, the determination of trace elements in hair also has its drawbacks and it requires researchers to resolve multiple problems. The use of hair cosmetics, for example, may have a potentially negative effect and there is the possible risk of hair contamination in the external or working environment. Therefore, when performing hair analysis, the first step is to clean (wash) the hair in an adequate manner so that external contaminants are removed as much as possible while endogenous elements are left intact. For this purpose, the methods recommended by IAEA, which include repeated washing and rinsing with the use of water and acetone, are often applied.

The second critical step is hair mineralization, i.e. conversion to a solution. The common risks associated with this procedure are possible element loss due to e.g. evaporation caused by heat on one side and sample contamination by used reagents on the other side. Microwave mineralization with concentrated HNO_3 and H_2O_2 additives seems as an ideal procedure in this respect.

The own hair analysis may be effected by means of polarography or mass spectrometry with inductively coupled plasma. Nevertheless, the most frequently implemented method employs atomic absorption spectroscopy, namely flame atomisation for sufficiently high concentrations and electrothermal atomisation for low concentrations.

Furthermore, method validation and standardisation are necessary for obtaining relevant information. For example, trueness should be verified through interlaboratory

crosschecks (almost unavailable in the Czech Republic for the time being) or by using available reference material (e.g. BCR CRM 397). Precision is verified rather easily by repetitive homogenous sample analysis.

The determination of the reference range remains a complex and so far unresolved problem. The element content in hair and the analyses results depend on a wide variety of factors (large interindividual differences, exposition timeline, health condition, length and position of analysed hair sample, etc.)

Relevant interpretation of the results is even more difficult as only limited information is currently available on the connection between element concentration in hair and the influence on the specific body organ and the health condition.

At present, the outlined problems practically prevent researchers from acquiring detailed information on minor and negligible expositions to toxic elements or on minor changes in the supply of biogenic elements to the human body by means of determining the concentration of trace elements in hair. This, however, does not exclude relevant application and benefits with significant expositions and intoxications. The thesis presents a number of examples of relevant application in practice.

In contrast to the discussed issues, commercial advertisements promise trouble-free, simple and easy, and sometimes even miraculous mapping of the health condition with distinct results and recommendations in the form of various food supplements. All may be naturally obtained after the payment of a specific amount (often paid repeatedly).

How to answer, after summarizing data gathered from literature and own experience, the presented basic question on whether hair analysis is beneficial and generally applicable.

In many cases, the answer may be *yes*. The thesis details examples of successful application when obtaining retrospective data on high expositions to Pb, Ni, Cd, Hg, and Fe: lead intoxication in a patient due to the long-term intake of a herbal concentrate containing lead, multiple-week monitoring of nickel content in the hair of a volunteer after a one-week exposition in an NiSO₄ production environment, verification of Fe loss in a hemato-oncology patient, lead intoxication of an entire family as a result of long-term use of poor quality tableware, lead intoxication in historical painting conservators.

As regards the commercial use of the individual result of the general population, it still seems rather problematic and the answer to the basic question is *no*. The determination of trace elements in hair is not beneficial and it cannot be generally applied that easily.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2013

.....

Věra Žížková

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří mi poskytli podmínky pro vypracování této práce. Děkuji Prof. MUDr. J. Rackovi, DrSc. za poskytnuté konzultace, zvláště pak děkuji Ing. V. Senftovi za odborné vedení a rady, které mi poskytoval po celou dobu studia.

Obsah

Seznam použitých zkratek	11
Úvod	12
1 Anatomie a fyziologie vlasů.....	13
1.1 Anatomie a funkce kůže.....	13
1.2 Vrstvy kůže	13
1.2.1 Pokožka (epidermis)	14
1.2.2 Škára (dermis).....	15
1.2.3 Podkožní vazivo (hypodermis)	15
1.3 Kožní adnexa.....	15
1.3.1 Zrohovatělé deriváty (vlasy).....	15
1.3.1.1 Stavba vlasu	16
1.3.1.2 Vlasy z makroskopického hlediska	19
1.3.1.3 Chemické a fyzikální vlastnosti vlasu	20
1.3.1.4 Vlasová výměna	20
1.3.2 Kožní žlázy.....	21
2 Výhody a přínosy stanovení stopových prvků ve vlasech	22
2.1 Snadný odběr.....	22
2.2 Snadný transport a dlouhodobé uchování	22
2.3 Možnost nahlédnutí do historie organismu.....	22
3 Nevýhody a některé problémy spojené s analýzou vlasů.....	23
3.1 Problémy preanalytické	23
3.2 Problémy analytické	23
3.3 Problémy postanalytické	24
4 Metodika analýzy vlasů.....	25
4.1 Odběr a mytí vlasů před analýzou	25

4.2 Mineralizace vlasů	26
4.3 Analýzy zmineralizovaných vlasů	27
4.3.1 Polarografie	27
4.3.2 ICP-MS = hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.....	28
4.3.3 AAS = atomová absorpční spektrometrie	29
4.3.3.1 Atomizace plamenem	29
4.3.3.2 Elektrotermická atomizace (ETA)	29
4.3.3.3 Hydridová technika	30
4.4 Konkrétně používaná metodika	30
5 Příklady aplikací z vlastní praxe	36
5.1 Stanovení Pb ve vlasech pacientky užívající preparát Femikalp	36
5.2 Stanovení Ni ve vlasech dobrovolníka po týdenní expozici při výrobě NiSO ₄	37
5.3 Prověřování ztrát Fe u pacientky z hematookologie.....	37
5.4 Další příklady využití analýzy vlasů.....	38
6 Diskuze	40
6.1 Faktory ovlivňující výsledek a jeho interpretaci	40
6.2 Komerčně zaměřené aplikace analýzy vlasů.....	45
Závěr	47
Seznam informačních zdrojů:	48

Seznam použitých zkratek

Mg = hořčík (latinsky Magnesium)

Ca = vápník (latinsky Calcium)

Zn = zinek (latinsky Zincum)

Cu = měď (latinsky Cuprum)

Se = selen (latinsky Selenium)

Pb = olovo (latinsky Plumbum)

Hg = rtuť (latinsky Hydrargyrum)

Cd = kadmium (latinsky Cadmium)

Fe = železo (latinsky Ferrum)

Mn = mangan (latinsky Manganum)

EDTA = chelaton 2 (zkratka pro organickou sloučeninu kyselinu ethylendiamintetraoctovou)

HNO₃ = kyselina dusičná

H₂O₂ = peroxid vodíku

HClO₄ = kyselina chloristá

AAS = atomová absorpční spektrometrie

ICP-MS = hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

ETA = elektrotermická atomizace

BET = biologické expoziční testy

Úvod

Některé stopové prvky (Mg, Ca, Zn, Cu, Se,...), označované jako biogenní, jsou pro organismus v určitém optimálním rozsahu koncentrací nezbytné. Nedostatek, ale i přebytek, ovšem může negativně ovlivňovat zdravotní stav. V zájmu organismu je proto dobré sledovat koncentraci těchto biogenních prvků v organismu a v případě potřeby vhodně regulovat velikost příjmu (denní dávky). Existují ale i stopové prvky (Pb, Hg, Cd...), které v jakékoli koncentraci působí na organismus negativně, toxicky. Také u těchto nežádoucích prvků je přínosné sledování jejich koncentrace v organismu s cílem odhalit nebo omezit expozici těmito prvky. Stanovení koncentrace stopových prvků v běžně používaných biologických materiálech jako je krev či moč dokáže určit pouze aktuální situaci, v jaké se organismus nachází. Někdy je ale zapotřebí určit dlouhodobější historii příjmu či expozice stopových prvků. Nahlédnutí do historie (někdy až několik let zpětně) umožňuje využití analýzy jiného biologického materiálu a to vlasů.

Tématem práce je zhodnotit vlastní zkušenosti se stanovením stopových prvků ve vlasech a současně shromáždit literární údaje z této oblasti a pokusit se odpovědět na otázku, zda je stanovení stopových prvků ve vlasech vždy relevantní a přínosné, či zda má svoje omezení.

1 Anatomie a fyziologie vlasů

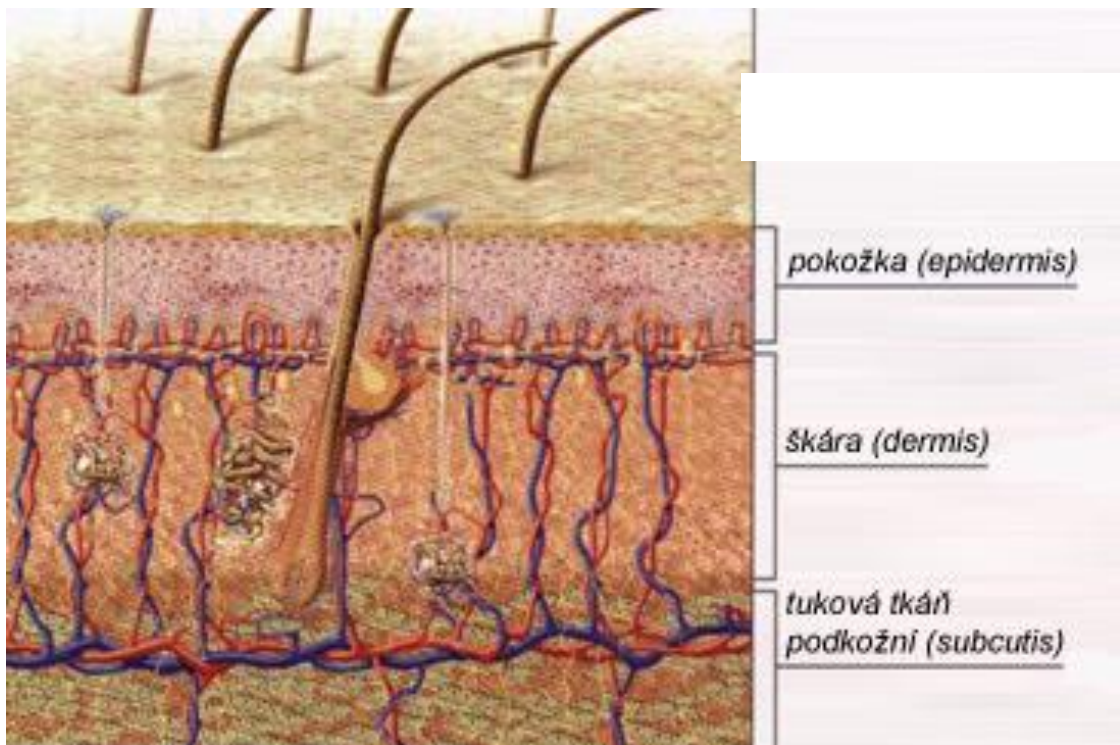
1.1 Anatomie a funkce kůže

Kůže kryje zevní povrch těla. Jde o dvojrstevný protektivní systém, který zároveň zajišťuje individualitu svého nositele. Může se rozdělit na dva velké oddíly. První je vlastní kůže, druhý pak představují přídatné kožní orgány též kožní adnexa (tedy: vlasy, chlupy, nehty, receptory, nervy a žlázy). Vlastní kůže tvoří ochranný obal těla, bývá přirovnávána k silné bláně pokrývající celý povrch lidského těla. „Její plošný rozsah je proto shodný s velikostí tělního povrchu a měří podle velikosti těla 1,5 až 2 m²“ (7 s. 3). O barvě kůže rozhoduje obsah pigmentu (melaninu). U téhož jedince může být barva kůže na různých částech těla odlišná a často se mění během života.

Kůže zastává celou řadu důležitých funkcí. Jedna z nejvýznamnějších je funkce *ochranná*. Kůže slouží jako mechanická ochrana orgánů, zajišťuje malou propustnost vůči vodě, tvoří ochranu především proti ultrafialovému záření a vytváří bariéru proti mikroorganismům. Prostřednictvím kožních receptorů zajišťuje funkci *smyslovou* a tukem uloženým v podkožním vazivu funkci *zásobní*. Podílí se na *termoregulaci*, je i důležitou *zásobárnou krve* a nepostradatelnou roli hraje také při *látkové výměně*. Má totiž schopnost vylučovat a vstřebávat některé látky a zároveň vytvářet provitamin D.

1.2 Vrstvy kůže

Kůže je tedy největším orgánem lidského těla, její hmotnost tvoří čtvrtinu celkové tělesné váhy a platí, že se mění společně s věkem. Skládá se z pokožky (epidermis), která je původem z ektodermu a ze škály (dermis), původem z mezenchymu. Podkožní vazivo (hypodermis) je vrstvou, která zajišťuje spojení kůže s podkladem, síla této vrstvy je závislá na stavu výživy. Všechny její vrstvy mají specifické postavení.



Obrázek 1: Stavba kůže

< <http://www.studioamadeus.cz/o-vlasech.html>>

1.2.1 Pokožka (epidermis)

Obsahuje několik vrstev epitelových buněk a je tvořena mnohvrstevným dlaždicovým epitelem, vrstvy na jejím povrchu jsou zrohovatělé. Pokožka je vrstvou velmi odolnou a to především proti chemickým a mechanickým vlivům, její nejvýznamnější funkcí je funkce ochranná. Nejčtenějšími buňkami jsou keratinocyty, které se dělením neustále obnovují. Epidermis hraje důležitou roli v mechanické odolnosti kůže. Je totiž díky pevnému spojení mezi keratinocyty vzduchotěsná a pro vodu oběma směry nepropustná. Zároveň epidermis představuje bariéru proti pronikání mikroorganismů. Keratinocyty jsou důležité pro vlasy, chlupy a nehty - tvoří jejich základ.

1.2.2 Škára (dermis)

Přechod mezi pokožkou a škárkou není rovný, z pokožky jsou do škárky vysílány bradavčité výběžky tzv. papily. Tuto vrstvu kůže tvoří vazivo, které obsahuje kolagenní a elastická vlákna. Ty zajišťují mechanickou pevnost a pružnost kůže a současně se významně podílejí na její štěpitelnosti. Škára bývá silná asi 3 mm a má několik vrstev, vrstvu papilární a síťovitou. Ve škáře jsou dále obsaženy vlasové folikuly, potní a mazové žlázy a krevní cévy.

1.2.3 Podkožní vazivo (hypodermis)

Škára postupně přechází v poslední vrstvu, kterou je podkožní vazivo (hypodermis). Tvoří ho kolagenní a elastická vlákna, mezi kterými se nacházejí vazivové buňky. Síla podkožního vaziva je závislá na množství podkožní tukové tkáně, která tvaruje tělo a určuje jeho hmotnost.

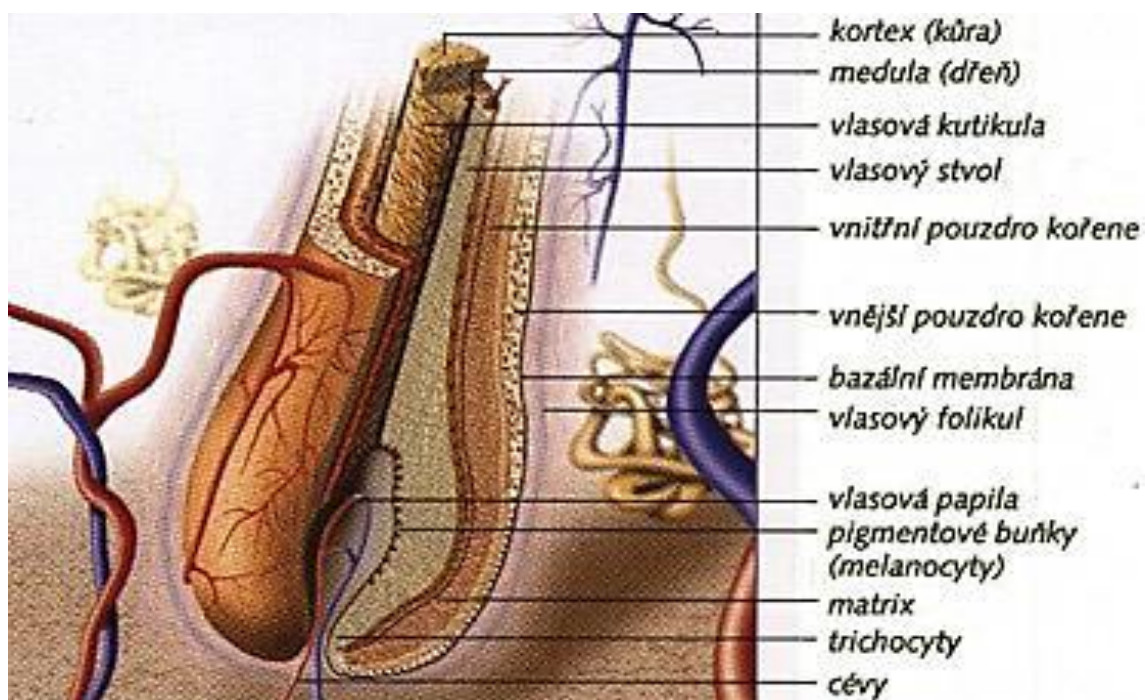
1.3 Kožní adnexa

Kožní adnexa můžeme rozdělit do dvou kategorií. První z nich jsou zrohovatělé deriváty pokožky, druhou tvoří kožní žlázy. Mezi zrohovatělé deriváty patří chlupy, vlasy a nehty, které zdokonalují ochrannou funkci kůže.

1.3.1 Zrohovatělé deriváty (vlasy)

Tvorba vlasů je složitý biologický proces. Skutečným vlasovým orgánem je vlasový folikul, který je tvořen kořenem obaleným vnější a vnitřní epitelovou pochvou. Jeho součástí jsou mazové žlázy, potní žlázy a cévní zásobení. Kolem vnější epitelové pochvy se vyskytuje vazivová pochva a mezi oběma vrstvami se nacházejí kapiláry a nervová vlákna.

Stěna folikulu přechází v dolní části ve vlasovou papilu, která ve formě pupene, zasahuje do vnitřku folikulu a dále přechází v dolním úseku v úzký krček. To je útvar vazivového charakteru, který zajišťuje buňkám výživu svými cévami. Vazivovou pochvu folikulu a papilu vyplňuje uvnitř sklovitá blanka (membrana vitrea), která tvoří hranici mezi epiteliální a vazivovou vrstvou. Nejsilnější je ve středu folikulu. Krček je nejužší částí folikulu, kde vazivová pochva končí.



Obrázek 2: Stavba vlasu

< <http://www.studioamadeus.cz/o-vlasech.html>>

Vlasové folikuly nejsou do kůže uloženy kolmo, ale spíše šikmo. Na straně většího úhlu je uložena mazová žláza ústící mezi vlas a vnější epiteliální pochvu. Tento prostor je přepažen snopečkem hladkého svalu (musc. arrector pili), který se jednou stranou upíná k dolní části vazivové pochvy folikulu a na druhé straně končí v povrchových vrstvách škály. Smrštěním tohoto svalu dochází na povrchu kůže k tzv. husí kůži (cutis anserina). Dochází zároveň ke zmenšení prostoru, kde je lokalizovaná mazová žláza a maz se tak vytlačuje do krčku folikulu. Folikul, mazová žláza a hladký sval tvoří společně vlasové ústrojí.

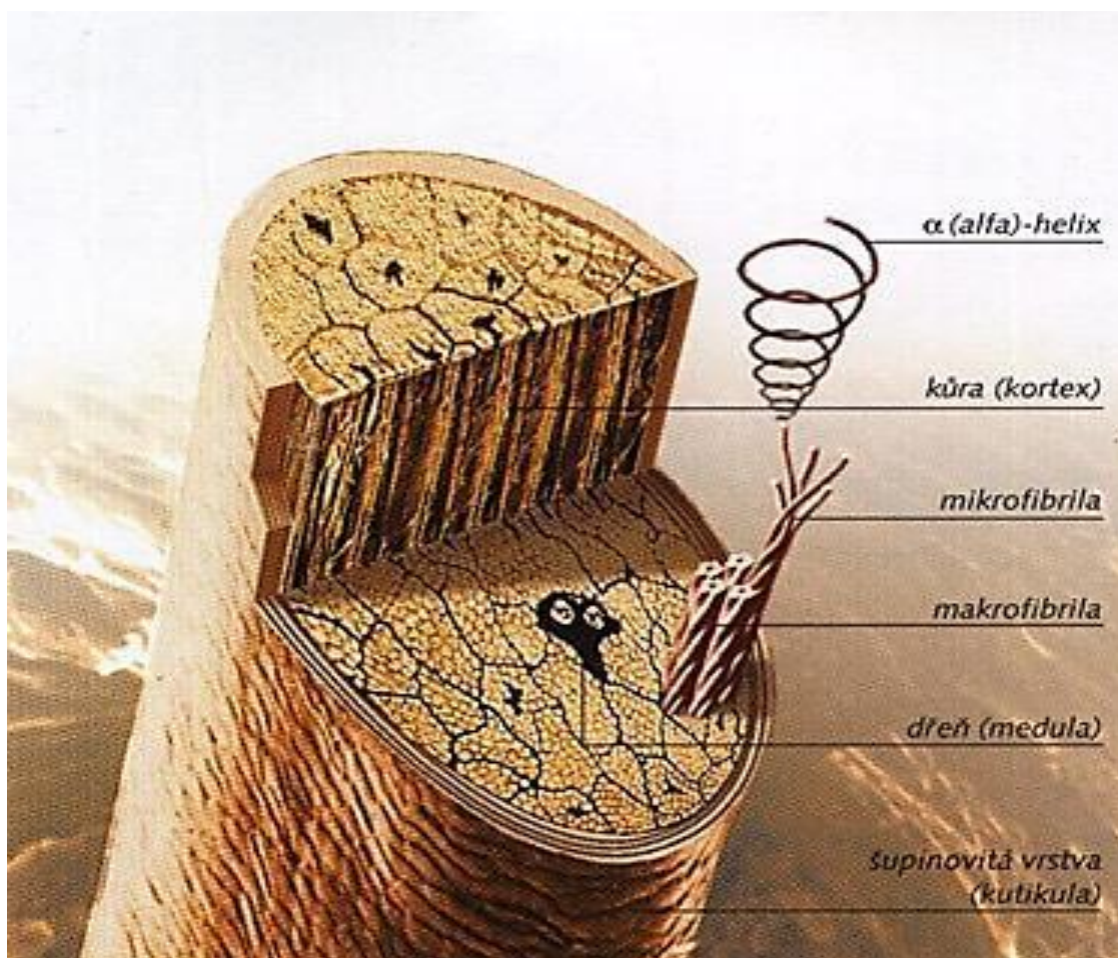
1.3.1.1 Stavba vlasu

Podstatou tvorby vlasů je přeměna měkkých elementů na elementy tvrdé a suché. Jde o keratinizaci neboli rohovatění. Vlas je tvořen epiteliálními vlasotvornými buňkami, které se procesem keratinizace mění, rohovatí. Platí, že v každém úseku epitelu probíhá keratinizace jiného druhu. A proto nemůže být vlas mikroskopicky

jednotný. Lze rozlišit dřeň, kůru a povrchní blanku (kutikulu). Jejich odlišnost spočívá nejen v mikroskopickém obrazu, ale také ve fyzikálních vlastnostech.

V buňkách *dřeň* (medully) probíhá keratinizace epidermálního typu, pro niž je typické vytvoření zrn keratohyalinu, vymizení jader a vytvoření intracelulárního tuku. Definitivně utvořená dřeň je složena z řad zrohovatělých buněk nepravidelné, hvězdicovité nebo zoubkované formy. Buňky se dají přirovnat k vyschlým váčkům vyplněným vzduchem. Kromě vzduchu obsahuje dřeň také zrnka tuku. U dlouhých vlasů se dřeň nachází jen v oblasti kořene, chybí ve špičkách vlasů, naopak dobře bývá vyvinuta u silných vlasů (vousy, řasy, ochlupení na ohanbí).

Kůra (též kortex) je vláknitá vrstva, která představuje $\frac{3}{4}$ vlastní vlasové hmoty. Buňky kůry jsou charakteristické nápadným obsahem pigmentu a prodlužují se podél osy vlasu. Asi v polovině vlasového kořene jádra mizí a buňky úplně rohovatí. Probíhá zde keratinizaci rohového typu. Definitivně vytvořená vlasová kůra se skládá z protáhlých, zrohovatělých buněk vřetenovitého zploštělého tvaru. Jednotlivá vlákna tvoří nejmenší stavební jednotky tzv. mikrofibřily, ty se kruhovitě seskupují a tím vznikají snopečky, které představují další stavební jednotky tzv. makrofibřily. Mezi sebou jsou navzájem spojeny buněčnými membránami a proteinovým tmelem. V této vrstvě se shlukují pigmentová zrna. Ty se jeví jako tmavé skvrnky mezi fibrilami.



Obrázek 3: Stavba vlasu

<<http://www.studioamadeus.cz/o-vlasech.html>>

Vlasová kutikula je šupinatý, přirozený obal vlasu. Buňky této povrchní blanky se oplošťují, ztrácí svá jádra a rohovatí v šupinky. Opět se zde jedná o keratinizaci rohového typu. Šupinky se navzájem kryjí jako tašky na střeše. Jsou to v podstatě souběžně a stříškovitě uspořádané odumřelé buňky, které na sebe těsně přiléhají. Jejich úkolem je chránit vlas před poškozením z vnějšku, za normálního fungování mazových žláz se vytváří na povrchu kutikuly vrstva, díky níž vlas méně propouští vodu a škodliviny. Jedná se o vrstvu s velkým obsahem keratinu.

Současně s tvorbou vlasu probíhá tvorba vnitřní epiteliální pochvy. I zde je možné rozeznat 3 vrstvy, které jsou navzájem mikroskopicky odlišné. První vrstvou je *kutikula*, která vzniká keratinizací rohového typu. Jde o ploché, zrohovatělé šupinky, které se

mezi sebou kryjí. Volné okraje šupinek směřují dolů, obě blanky do sebe zoubkovitě zapadají a tím pádem spolu pevně drží. Další vrstva se nazývá *Huxleyova vrstva*, často bývá také označována jako vrstva střední. Začíná od malých buněk, které se postupně směrem vzhůru mění ve velké polyendrické buňky. Poslední třetí vrstvou je *Henleova vrstva*. Zrohovatělé buňky zde tvoří nesouvislou vrstvu uspořádanou z podélně prodloužených buněk s můstky. Jako celek představuje vnitřní pochva dutý válec, jehož obsah vyplňuje vlas.

Vnější epitelální pochva se směrem dolů postupně ztenčuje, až nakonec přechází do škáry. Obsahuje velké buňky bohaté na glykogen.

1.3.1.2 Vlasy z makroskopického hlediska

Makroskopicky jsou vlasy velmi rozmanité a to nejen svou barvou a délkou, ale též tvarem a distribucí. „Makroskopické odchylky, např. hustoty a distribuce vlasů, změny struktury a pigmentace vlasových stvolů mohou vzniknout v důsledku složitých vnitřních příčin, např. metabolických, endokrinních a jiných, podmíněných geneticky nebo později vzniklým patologickým procesem“ (3 s. 11).

Látka, která způsobuje přirozené zbarvení vlasů je melanin. Jedná se o makromolekulární barvivo, vyskytující se ve formě malých zrn. Barva vlasů tak závisí na jejich počtu. Melanin se skládá z barevné části a bílkovinného nosiče. Barevná složka se projevuje buď jako světlý feomelanin, nebo jako tmavý eumelanin. Tmavý melanin se nachází hlavně v černých vlasech, světlý melanin obsahují výhradně velmi světlé vlasy, tmavší odstíny vznikají kombinací světlého s tmavým melaninem. Šedá nebo stříbrná barva vlasů má spojitost se snížením produkce barevných pigmentů a utvářením dutinek ve vlasovém kortexu. Obvykle se jedná o součást změn, přicházejících s přibývajícím věkem. Pokles melaninu současně s kumulací vzduchových bublin mezi buňkami vlasového kmene způsobuje šedivění. V pokročilém věku přestávají fungovat buňky, které melanin tvoří a vlas zůstává celý bílý.

Vzácností nebývají lidé, jejichž vlasy mají rozdílnou barevnost v různých lokalitách těla. V tomto případě hovoříme o heterochromii.

1.3.1.3 Chemické a fyzikální vlastnosti vlasu

Z chemického hlediska je základní složkou vlasů keratin (rohovina), což je stavební bílkovina. Patří mezi skleroproteiny s vláknitou strukturou, je nerozpustný ve vodě. Jedná se o proteiny s dlouhým řetězcem aminokyselin, jež jsou vzájemně propojeny a zpevněny disulfidickými můstky, iontovými vazbami a současně vodíkovými můstky. Z krve se do vlasů dostává řada stopových prvků, ať již biogenních (měď, železo, zinek, jód) či toxických (olovo, kadmium, rtuť).

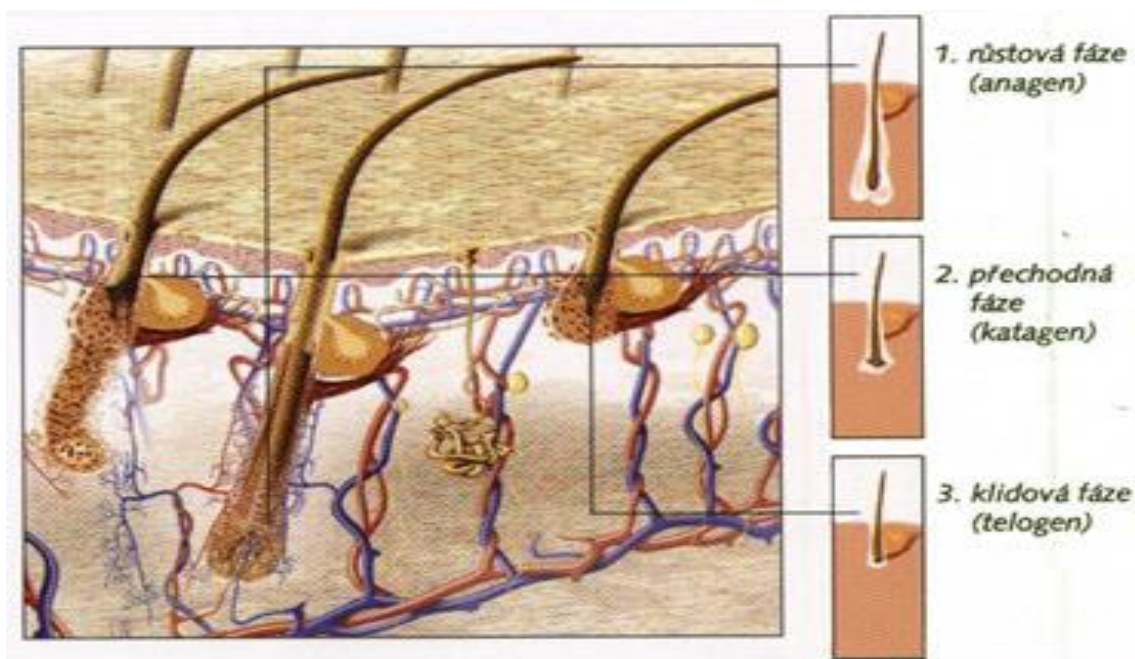
Nejpodstatnější fyzikální vlastností vlasového keratinu a tím i samotného vlasu je pak rozhodně jeho tažnost, pevnost, nasákavost a odolnost vůči vnějšímu tlaku.

1.3.1.4 Vlasová výměna

Každý lidský jedinec má 2 až 5 milionů vlasových váčků a to bez ohledu na pohlaví. Jejich počet a druh jsou dány již od narození. Vlasová výměna je dynamickým a kontinuálním procesem začínajícím již během embryonálního vývoje. Všechny typy vlasů procházejí určitou dobu stádiem růstu, následně vypadávají a jsou vyměněny další vlasovou generací. Růst a následná výměna vlasů probíhá ve třech stádiích a ty se periodicky v témže folikulu opakují. Jde o: anagen, katagen a telogen.

Tyto stádia trvají různě dlouhou dobu a to v závislosti na věku člověka a typu folikulů. *Anagen* (období aktivního růstu) trvá až 5 let a normálně se v něm nachází téměř 90% vlasů. Je to období vlasové produkce, aktivity folikulu. Končí ve chvíli, kdy se zastaví mitotická aktivita matrix. Na něj navazuje *katagen*, což je stádium dediferenciace buněčných částí v bulbu a zánik dolní části folikulu. Je označován také jako fáze přechodná involuční - trvá jen několik týdnů. Postupně při něm odumírá vlasová papila. *Telogen* (klidové stadium) je asi tříměsíční. Vlas se pomalu uvolňuje a pod ním vyrůstá vlas nový. V této fázi se normálně nachází cca 10% vlasů. Telogen je údobím klidu, v podstatě v něm existuje jen horní část folikulu a nerostoucí vlas, který je už připravený k vypadnutí. Celý cyklus vývoje folikulu a produkce vlasu se opakuje. Člověku během jednoho dne vypadne asi 70 - 100 vlasů a to v případě, že nemá s vlasy žádné problémy. Nárůst vlasu za 24 hodin je v průměru cca 0,05 mm, tj. cca 1 cm za

měsíc. Růst a výměna vlasů probíhá pravidelně již od dětství, po překonání puberty se vlasy už příliš nemění.



Obrázek 4: Vlasový vývojový cyklus

< <http://www.studioamadeus.cz/o-vlasech.html> >

Vypadávání vlasů může být vratné, nebo nevratné. Vratné vypadávání může být způsobeno stresem, těhotenstvím nebo nedostatkem vitamínů, o nevratném vypadávání hovoříme v souvislosti s činností mužských hormonů testosteronu a dihydrotestosteronu.

1.3.2 Kožní žlázy

Kožní žlázy můžeme podle jejich funkce a stavby rozčlenit do 2 kategorií – na žlázy mazové a potní. Kožní maz, produkováný mazovou žlázou, se dostává stahem hladkých svalů do vlasového folikulu a odtud na povrch pokožky. I pot je vypuzován do oblasti vlasového folikulu a prostřednictvím vlasové pochvy na povrch pokožky. Právě pot i maz mohou ovlivnit analýzu vlasů, proto je velmi důležité důkladné omytí vlasů před vlastní analýzou.

2 Výhody a přínosy stanovení stopových prvků ve vlasech

Stanovení stopových prvků ve vlasech přináší řadu potenciálních výhod a přínosů. Mezi ně patří snadný neinvazivní odběr vzorku, stabilita odebraného vzorku a především možnost nahlédnout do vzdálenější historie organismu.

2.1 Snadný odběr

Odběr vlasů je neinvazivní. Stříhá se několik praménků vlasů v celé délce, co nejbliže povrchu hlavy, nejčastěji z temene. Potřebné množství vlasů pro analýzu je cca 200 mg (někdy se uvádí jako názorný příklad naplněná polévková lžice). Vlasy jsou po odběru stabilní, lze počkat a analyzovat celé soubory vzorků najednou.

2.2 Snadný transport a dlouhodobé uchování

Odebraný materiál se vloží jednotně (tj. konce vlasů od hlavy vždy na stejné straně) do PE sáčku nebo obálky a řádně se označí. Vyplní se průvodní žádanka a materiál se odešle do laboratoře. Zde je uchováván při laboratorní teplotě neomezenou dobu až do zpracování.

2.3 Možnost nahlédnutí do historie organismu

Určitě jedním z hlavních přínosů analýzy vlasů je svým způsobem unikátní možnost nahlédnout do vzdálenější historie organismu, podle typu účesu i několik let zpětně, což běžné materiály typu krve či moči neumožňují. Můžeme tak zjistit, zda byl před určitou dobou organismus exponován nějakým toxickým prvkem nebo zda mělo tělo před půl rokem dostatečný přísun nějakého biogenního prvku.

3 Nevýhody a některé problémy spojené s analýzou vlasů

Bohužel, s analýzou vlasů je spojena i celá řada nevýhod a problémů. Problémy, které ovlivňují relevantnost výsledků lze rozdělit na: preanalytické, analytické a postanalytické.

3.1 Problémy preanalytické

Velká *interindividuální variabilita* je způsobená barvou vlasů, věkem a rasou. Enormní je závislost výsledku na *odebrané části vlasů*. Vlasy rostou rychlostí cca 1 cm/měsíc. Je velmi důležité synchronizovat odebíranou část vlasů se zájmovým časovým obdobím. Když se např. chce nahlédnout do situace organismu před 6 měsíci, musí se analyzovat část vlasů vzdálená od hlavy 6 cm. Z uvedeného plyne, že odpovídající výsledek se získá nejdříve po získání cca 1 cm části vlasů od hlavy, čili zhruba po měsíci, během kterého vlas poporoste právě o cca 1 cm.

Závažný problém představuje možná *vnější kontaminace vlasů* z životního prostředí a především z používané vlasové kosmetiky (šampony, barvy).

3.2 Problémy analytické

Problémem je rozlišit *endogenní* (tj. množství prvků, které se do vlasů dostane přes vlasové kořínky z krve) a *exogenní* (tj. vnější kontaminace vlasů např. z kosmetiky nebo z životního či pracovního prostředí) původ prvků. Nedílnou součástí metodiky je proto *mytí vlasů před analýzou*. Parametry mytí je obtížné nastavit tak, aby se na jedné straně spolehlivě odstranilo vše exogenní, ale na druhé straně se plně zachovala endogenní část.

Dalším analytickým problémem jsou velké *interlaboratorní rozdíly* ve výsledcích analýzy stejných vzorků. Jako důvody rozdílů byly mimo jiné udávány: nehomogenní vzorky, různé způsoby mytí a mineralizace, zkrátka nestandardní metodiky. Nejpodstatnějším faktorem, který způsobil rozdíly mezi laboratořemi, bylo mytí vzorků před analýzou.

Problematické je také *převedení vlasů do roztoku*, čili jejich mineralizace. Při mineralizaci dochází k několika rizikům. Jedním je riziko vytěkání stanovovaných prvků (důvod přechodu z otevřených systémů na uzavřené), druhým kontaminace z

pomocných přidávaných reagensů. Důležité je proto používat při mineralizaci co nejčistší přidavné reagenty (kyseliny, peroxid) a to v co nejmenším možném objemu. Proto v současnosti již naprosto převládá princip tlakové mikrovlnné mineralizace v teflonových nádobkách.

Po mineralizaci již následuje *vlastní analýza*. Dříve se používaly např. polarografické a fotometrické techniky. V současnosti je prakticky vše realizováno buď principem atomové absorpční spektrometrie – AAS s elektrotermickou atomizací, hydridovou technikou nebo principem indukčně vázané plazmy, často výhodně spojené s hmotnostní spektrometrií - ICP-MS. Vlastní analýza je již bez podstatných problémů. Používané analyzátory dosahují vysoké úrovně preciznosti i pravdivosti.

Jedním ze zásadních problémů je nedostatek *kvalitních referenčních materiálů*, což ztěžuje kontrolu pravdivosti výsledků.

3.3 Problémy postanalytické

V této oblasti je především problém s *určením odpovídajících referenčních (normálních) hodnot* a to vzhledem k uváděným preanalytickým i analytickým faktorům.

Očekávané hodnoty, referenční rozsahy, nebo referenční limity jsou nezbytné k tomu, aby lékaři mohli správně aplikovat analytické údaje v poskytování zdravotní péče. Referenční rozsahy se stanovují z výsledků referenčních populací nebo z prováděných statistických analýz. Mohou být ověřeny ostatními laboratořemi, nebo zveřejněním údajů klinického výzkumu nebo obou a to prostřednictvím srovnání dat testů pacientů. Referenční hodnoty mohou být testovány i v samotné klinické referenční laboratoři.

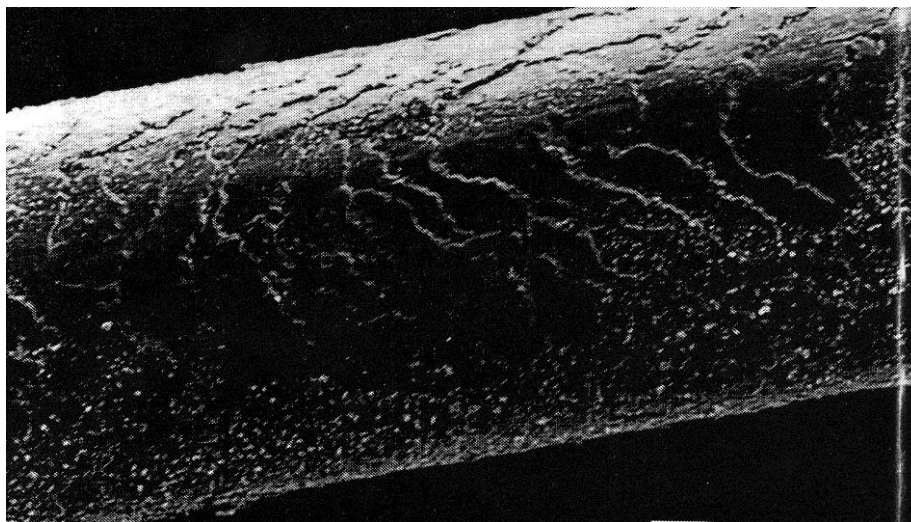
4 Metodika analýzy vlasů

Metodika analýzy vlasů zahrnuje celou řadu nezbytných kroků a procesů (odběr, mytí, mineralizace, analýza...), které všechny rozhodují o preciznosti, přesnosti a vůbec relevantnosti získaných výsledků, tj. koncentrací stopových prvků v analyzovaných vlasech.

4.1 Odběr a mytí vlasů před analýzou

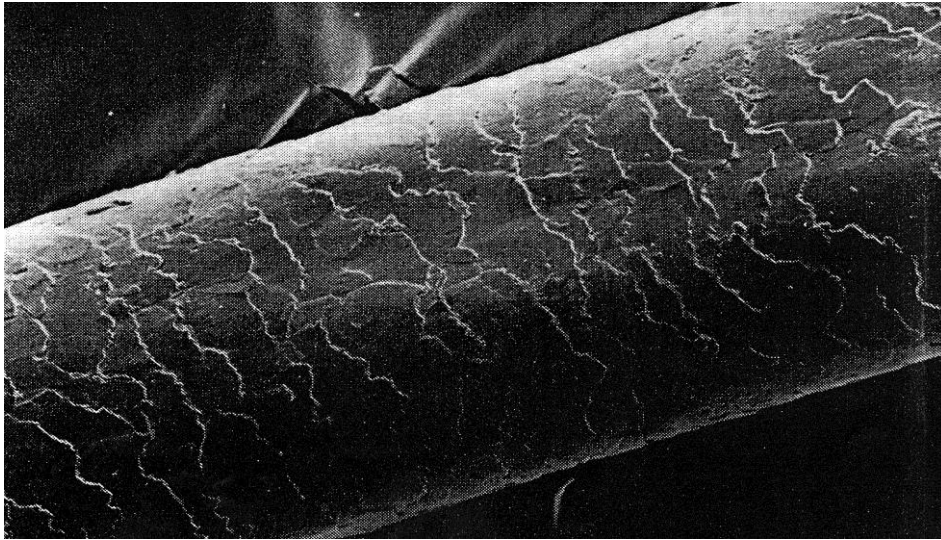
Odběr vlasů pro analýzu se provádí nejčastěji z temene hlavy, jak již bylo zmíněno. Odebírá se několik praménků vlasů v celé délce co nejbližší povrchu hlavy. K analýze je potřebné získat optimálně vlasy v množství cca 200 mg .

Před vlastním stanovením se odstraňují nečistoty a kosmetické přípravky, aby konečný výsledek nebyl ovlivněn exogenními prvky ze znečištěného vlasu. Na Obrázku 5 je ilustrační fotografie zaprášeného vlasu před umytím, kde jsou dobře patrné prachové částičky na povrchu vlasu, na Obrázku 6 je pak ilustrační fotografie již umytého vlasu, zbaveného nečistot.



Obrázek 5: Zaprášený vlas před umytím

< <http://www.studioamadeus.cz/o-vlasech.html> >



Obrázek 6: Vlas po umytí

< <http://www.studioamadeus.cz/o-vlasech.html>>

Mytí lze provádět různými způsoby. Používá se mytí organickými rozpouštědly - aceton, metanol, detergenty - TRITON X-100, komplexotvornými látkami - EDTA. Nejčastěji se používá postup dle Rjabuchina IAEA s organickou fází (aceton) a vodnou fází (destilovaná voda).

4.2 Mineralizace vlasů

Dalším krokem je mineralizace (rozklad vzorku), během které se pevný vzorek převede na kapalný. Pracuje se s přesně naváženým množstvím umytých a vysušených vlasů. Samotná mineralizace může být provedena několika způsoby:

Suchá mineralizace – rozklad na vzduchu, v otevřeném systému a při atmosférickém tlaku. Skládá se ze čtyř základních kroků – sušení, zuhelnatění, zpopelnění a loužení popela, doplněné přidávkem pomocného činidla, které zvyšuje účinnost rozkladu. Sušení se provádí v horkovzdušných sušárnách, lyofilizátorech, na topných deskách. K zahřívání vzorku na vysokou teplotu dochází v platinovém či keramickém kelímku v muflové peci, vzniklý popel se převede do roztoku rozpuštěním ve zředěné kyselině. Výhodou je nízká hodnota slepého vzorku, nevýhodou je

nekontrolovatelná možnost vytěkání stanovovaného analytu během zahřívání na vysoké teploty.

Otevřená mineralizace – rozklad ve směsi koncentrovaných minerálních kyselin za zvýšené teploty a při atmosférickém tlaku. Skládá se ze dvou kroků – z rozrušení struktury matrice kyselou hydrolyzou a z následné oxidace meziproduktů. Rozklad probíhá za nižší teploty než u suché mineralizace, jako oxidační činidlo se používá hlavně HNO_3 . Mokrý rozklad může být s konvenčním nebo s mikrovlnným ohřevem. Při tomto rozkladu prováděném pod zpětným chladičem je nižší spotřeba reagensů a ve srovnání se suchou mineralizací se snižují možnosti ztráty analytu vytěkáním.

Tlaková mikrovlnná mineralizace – rozklad probíhá kombinovaným působením koncentrovaných kyselin, peroxidu vodíku, tlaku a mikrovlnné energie. Vzorek převrstvený koncentrovanou kyselinou a koncentrovaným peroxidem vodíku se zpracovává v teflonových nádobkách, které jsou těsně uzavřené. Celý postup probíhá pod tlakem. Při rozkladu dochází k velkému a rychlému uvolňování tepla, nedochází k odpařování mineralizačních látek, to znamená, že se nemusí doplňovat, stačí jich menší množství a tím se zajistí nízká hodnota slepého vzorku. Nemůže dojít ani k vytěkání stanovovaného analytu. Hlavní výhodou je rychlost rozkladu a nižší spotřeba činidel.

4.3 Analýzy zmineralizovaných vlasů

4.3.1 Polarografie

Polarografie se řadí mezi voltametrické metody, sleduje se závislost proudu na vloženém napětí v elektrochemickém článku, který se skládá z nepolarizované referenční elektrody (anoda) a z polarizované pracovní elektrody (katoda). Jako pracovní (měrná) se používá rtuťová kapková elektroda. Výsledkem závislosti proudu na plynule se zvyšujícím napětí je polarografická křivka. Kvalita látky (druh stanovovaného prvku) je dána půlvalnovým potenciálem, což je napětí, které odpovídá poloviční výšce vlny. Koncentrace stanovovaného prvku je úměrná výšce vlny. Kvantitativní vyhodnocení můžeme získat metodou kalibrační křivky, nebo metodou standardního přídatku.

Metoda kalibrační křivky se nejčastěji používá při sériových analýzách. Výšky vln správně zvolených roztoků, které mají vzrůstající koncentraci stanovovaného prvku, se zaznamenávají do kalibračního grafu, ze kterého se odečítá hodnota analyzovaného vzorku. Při této metodě je velice důležité dodržení standardních podmínek v průběhu celého měření.

Metodou standardního přídatku se stejným způsobem zpracovává analytický standard i vzorek. Při postupu se dvěma roztoky se shodným způsobem zpracovávají dvě odměrné baňky. Do obou baněk se vloží stejné množství analyzovaného vzorku, do jedné baňky se navíc přidá známé množství stanovovaného prvku. Po změření získáme dvě polarografické vlny a koncentrace stanovované látky se určí výpočtem z výšek obou vln. Při postupu s jedním roztokem se provede analýza vzorku a získá se polarografická vlna o určité výšce. Do stejného vzorku se přidá standardní roztok o známé koncentraci a stanovení se opakuje. Tím se získá další polarografická vlna o určité výšce. Koncentrace stanovované látky se získá opět výpočtem z výšek vln.

Dnešní moderní polarografy již umožňují pracovat bez použití toxické rtuti (rtuťová kapková elektroda je např. nahrazena rotační diskovou elektrodou). Ke zjednodušení a zrychlení práce přispělo nahrazení dříve používaných zapisovačů využitím počítačové techniky.

4.3.2 ICP-MS = hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Při této analýze je roztok analyzovaného vzorku zmlžen a veden proudem argonu do hořáku, kde je plazma udržována pomocí střídavého vysokofrekvenčního magnetického pole. Dochází k excitaci, ionty prochází přechodovou komorou, systémem elektromagnetických čoček se dostávají do kvadrupólového detektoru a v určitém časovém okamžiku dopadají na povrch zesilovače podle určité hmotnosti. Vzniklý elektrický proud je zesílen, změřen a převeden na koncentraci. Výhodou této metody je možnost současného stanovení řady prvků, nevýhodou je drahý provoz a vysoká spotřeba argonu na chlazení hořáku.

4.3.3 AAS = atomová absorpční spektrometrie

Jedná se o kvantitativní elementární analýzu založenou na specifické absorpci monochromatického záření volnými atomy sledovaného prvku v základním elektronovém energetickém stavu. Atomy v plynném stavu absorbují záření takových vlnových délek, které samy vyzařují. Absorpcí světelného kvanta se atom dostává do excitovaného stavu a jeho valenční elektrony přecházejí do vyšších energetických hladin. V tomto stavu je atom nestabilní, vrací se tedy do původního stavu a vyzařuje získanou energii ve formě fluorescenčního záření. Aby stanovovaný prvek mohl absorbovat energii, musí být v atomizovaném stavu, to znamená, že atomy stanovovaného prvku musí být ve vzorku uvolněny z vazby např. na proteiny. Tohoto stavu dosáhneme plamenovou atomizací, elektrotermální atomizací nebo hydridovou technikou.

4.3.3.1 Atomizace plamenem

Roztok vzorku se převádí na aerosol vzduchem nebo oxidem dusným v rozprašovači při nárazu na rozprašovací kuličku (Nebulizer). Po smíšení s plynným palivem (acetylen) proudí do hořáku se štěrbinovým ústím. Nad touto štěrbinou tvoří plamen absorpční prostředí, kterým prochází paprsek vstupujícího záření. Atomy stanovovaného prvku absorbují záření lampy a úbytek záření je úměrný koncentraci prvku ve vzorku. Při plamenové atomizaci se do plamene přivádí jen 10% nasátého roztoku, zbytek odtéká nerozprašen. Přesto je tento postup rozšířen pro svoji jednoduchost, stálost, reprodukovatelnost výsledků a vyhovující citlivost pro řadu prvků.

4.3.3.2 Elektrotermická atomizace (ETA)

Nepatrný objem vzorku (5-100 μ l) se dává do grafitové kyvety, obvykle na vloženou platformu (podložku). Kyveta je programově vyhřívána elektrickým proudem až na teplotu atomizace – až 3000°C. Dochází k vysušení vzorku stoupající teplotou, ke zpopelnění matrice vzorku a nakonec k atomizaci, tj. vytvoření obláčku volných atomů. Paprsek lampy prochází obláčkem volných atomů. Tyto volné atomy stanovovaného

prvku záření lampy absorbují. Při elektrotermické atomizaci nevzniká na rozdíl od kontinuální plamenové atomizace trvalý signál absorbance, ale signál přechodný, registruje se ostrý pik, jehož plocha nebo výška je úměrná množství stanovovaného prvku ve vzorku. Největší výhodou tohoto postupu je vysoká citlivost, mnohem vyšší než u postupu s plamenovou atomizací. Nevýhodou je pak práce s daleko nižšími koncentracemi, což vyžaduje větší náročnost na čistotu všech použitých reagentů, chemického nádobí i pomůcek.

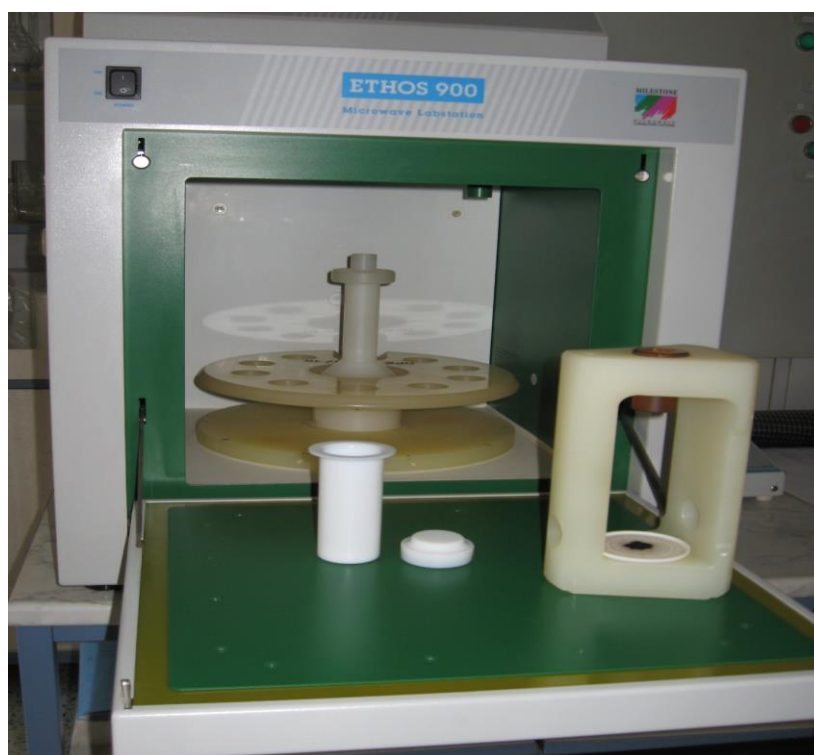
4.3.3.3 Hydridová technika

Hydridová technika je založena na schopnosti některých prvků vytvářet plynné hydridy, které vznikají v okyseleném vzorku po přidání redukčního činidla. Hydrid stanovovaného prvku se transportuje proudem argonu do měřicí křemenné kyvety, která je (s výjimkou stanovení Hg) vyhřívaná na 900°C. Teplem dochází k jeho rozložení a k uvolnění volných atomů prvku. Záření katodové lampy prochází kyvetou, kde je absorbováno atomy stanovovaného prvku a jeho úbytek je úměrný koncentraci atomů prvku v daném vzorku. Tento postup je výhodný především tím, že dokáže oddělit stanovovaný prvek od složité matrice vzorku, což zlepšuje specifickou stanovení, ale je použitelný jen pro určité prvky, např. arsen, selen, antimon, cín, bismut. Nejčastěji používaným redukčním činidlem je borohydrid sodný.

4.4 Konkrétně používaná metodika

Analýza vlasů se provádí konkrétním standardizovaným způsobem a zahrnuje všechny potřebné kroky: mytí vlasů, mineralizaci, vlastní stanovení. Odebrané vlasy se myjí postupem dle Rjabuchina s acetonem jako organickou fází a destilovanou vodou jako vodnou fází. Jednotlivé prameny vlasů se nastříhají na malé kousky (1-2 mm dlouhé částičky), vloží se do baňky a přelijí se acetonem tak, aby bylo vše ponořené. Baňka se protřepe, aceton se nechá 10 minut působit, baňka se opět protřepe a aceton se opatrně slije. Stejným způsobem se pokračuje s destilovanou vodou – promytí se provede 3x. Nakonec se vlasy opět promyjí acetonem a vysuší se v termostatu při 70°C.

Tím se odstraní případná vnější kontaminace. Usušené vlasy se promíchají a na analytických vahách se odváží potřebné množství, které se kvantitativně přeneso do rozkladné teflonové nádoby.



Obrázek 7: Zařízení pro tlakovou mikrovlnnou mineralizaci ETHOS 900

< vlastní fotografie >

Umyté vlasy se mineralizují principem tlakové mikrovlnné mineralizace v systému MILESTONE ETHOS. Rozklad vlasů probíhá kombinovaným působením koncentrovaných kyselin a peroxidu vodíku, tlaku a mikrovlnné energie. Ke vzorku do teflonové nádoby se přidají mineralizační činidla – kyselina dusičná a peroxid vodíku. Vlastní průběh mineralizace je popsán v Tabulce 1.

Tabulka 1: Tlaková mikrovlnná mineralizace vlasů (Milestone)

Procedura	Množství	Poznámka
Navážka vlasů	Cca 200 mg	Do teflonové nádoby
Převrstvení konc. HNO ₃ a konc. H ₂ O ₂	2 ml konc. HNO ₃ 1 ml konc. H ₂ O ₂	Uzavřít nádobku až po cca 1 min
1. krok	2 min 250 W	V mikrovlnné peci
2. krok	2 min 0 W	V mikrovlnné peci
3. krok	7 min 300 W	V mikrovlnné peci
4. krok	5 min 400 W	V mikrovlnné peci

(parametry používané ve vlastní praxi)

Zmineralizovaný vzorek se dále kvantitativně převede do vhodné zkumavky a provede se konečná úprava - odpaření, doplnění do určitého objemu a redukce.

Vlastní stanovení se realizuje na AAS analyzátoch Perkin Elmer. Při dostatečně vysoké koncentraci na AANALYST 100 s plamenovou atomizací, při nízkých koncentracích na AANALYST 600 s elektrotermickou atomizací.



Obrázek 8: Prostor hořáku v AAS s plamenovou atomizací

< vlastní fotografie >



Obrázek 9: AAS analyzátor s plamenovou atomizací
< vlastní fotografie >



Obrázek 10: Kyvetový prostor s magnety u ETA AAS a část podavače vzorků
< vlastní fotografie >



Obrázek 11: AAS analyzátor s ETA atomizací

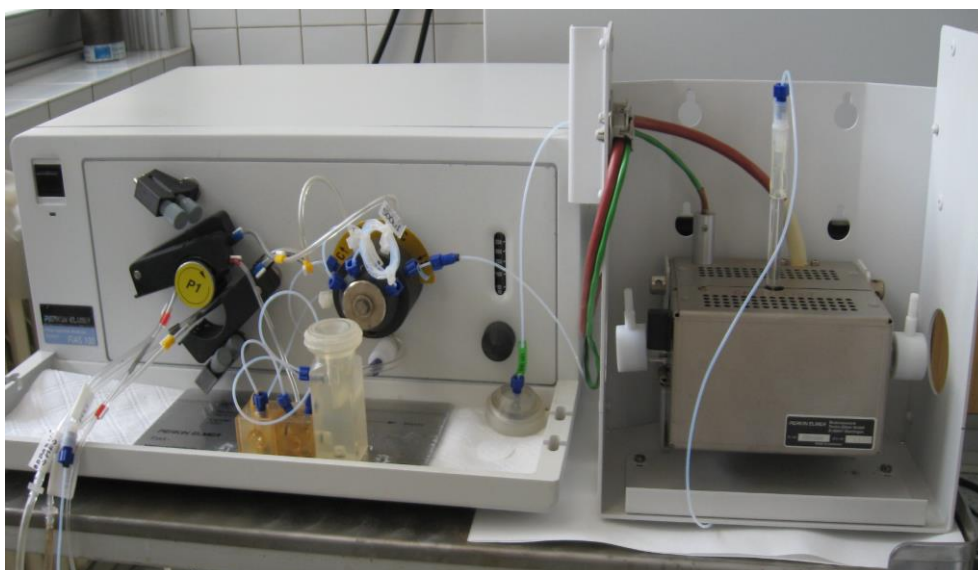
< vlastní fotografie >



Obrázek 12: Grafitová kyveta pro ETA atomizaci

< vlastní fotografie >

Doplňěk FIAS 100 umožňuje realizovat stanovení principem hydridové techniky.



Obrázek 13: Hydridový systém AAS

< vlastní fotografie >

Kontrolním materiálem je komerčně dostupný certifikovaný referenční materiál BCR (Community Bureau of Reference, European Commission) se známým obsahem analytu, který se zpracovává stejným způsobem jako běžné vzorky. Výsledky se zaznamenávají do kontrolních regulačních diagramů.

Tabulka 2: Příklad certifikovaného referenčního materiálu

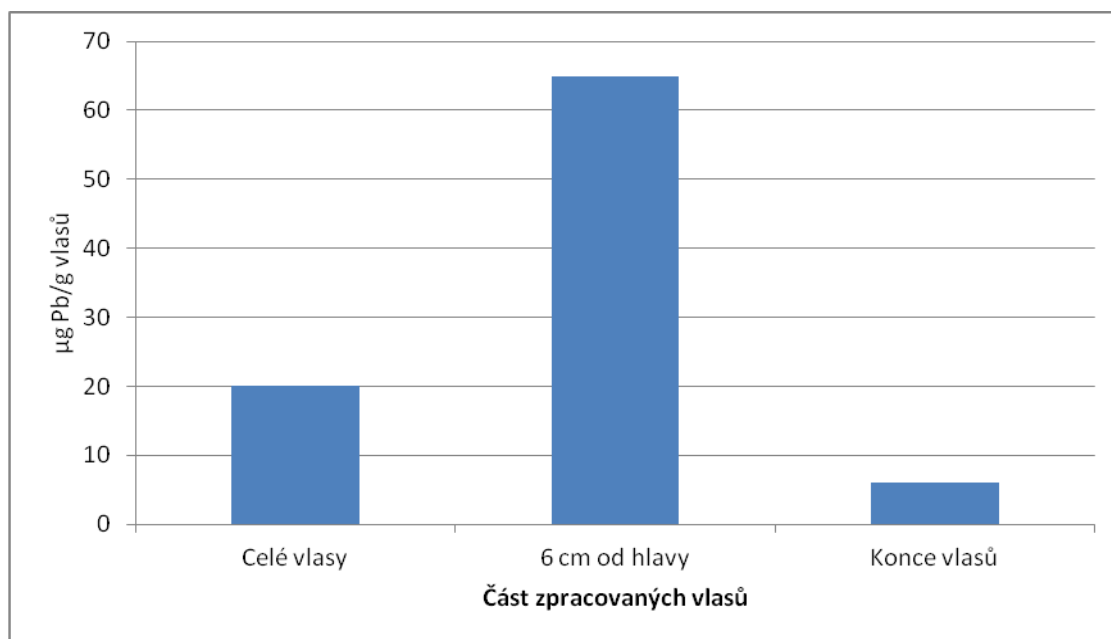
Certified reference material CRM 397: Trace elements in human hair		
Prvek	Obsah (µg/g)	Nejistota (µg/g)
Cd	0,521	0,024
Hg	12,3	0,5
Pb	33	1,2
Se	2	0,08
Zn	199	5

(příbalový leták referenčního materiálu)

5 Příklady aplikací z vlastní praxe

5.1 Stanovení Pb ve vlasech pacientky užívající preparát Femikalp

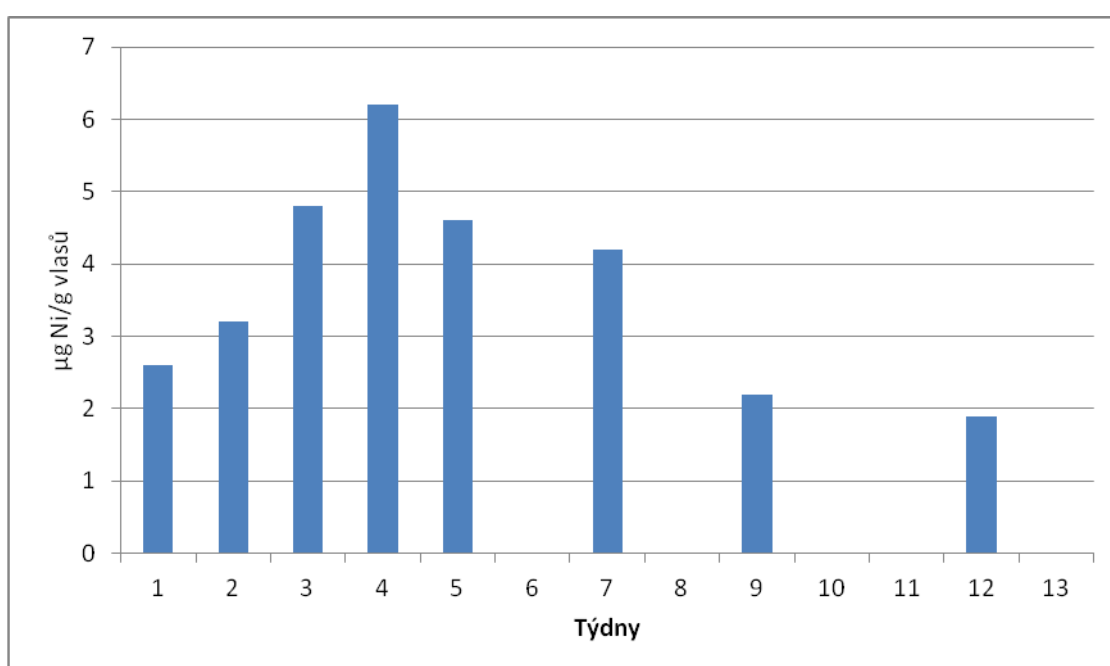
Při pátrání po zdroji zdravotních potíží pacientky, která měla výsledky základního interního vyšetření v normě, se dospělo až k hypotéze o potenciální otravě olovem. Přistoupilo se proto k prověření možné expozice olovem, a to využitím stanovení koncentrace olova ve vlasech. Odebrané vlasy se analyzovaly v celé délce, samostatně konce vlasů a 6centimetrová část vlasů od hlavy. Výsledky zachycené na Grafu 1 jasně ukazují zvýšenou koncentraci olova v 6centimetrové části vlasů od hlavy, což znamená vysokou expozici (přísun olova) v posledních 6 měsících před odběrem vzorku. Využití analýzy vlasů v tomhle případě jednoznačně potvrdilo intoxikaci pacientky olovem. Jako zdroj olova byl dalším pátráním specifikován preparát Astrum FE Femikalp. Dle údajů dodavatele se jedná o léčivé byliny z Indie. Preparát byl ale silně kontaminovaný olovem, pravděpodobně z výroby (mletí bylinek v mlýně pomocí olověných koulí).



Graf 1: Pb ve vlasech

5.2 Stanovení Ni ve vlasech dobrovolníka po týdenní expozici při výrobě NiSO₄

V tomto případě bylo provedeno stanovení niklu u studenta, který působil jako brigádník týden ve výrobě niklových sloučenin v chemické továrně poblíž Plzně. V rámci studie odevzdával v pravidelných intervalech vzorky vlasů, ve kterých byla stanovena hladina niklu. Z Grafu 2 je patrné, že maximální koncentrace ve vlasech byla zachycena zhruba po 4 týdnech, tj. v době, kdy do analýzy byla zahrnuta i část vlasů odpovídající době expozice (jak již bylo zmíněno, vlasy rostou cca 1cm/měsíc).

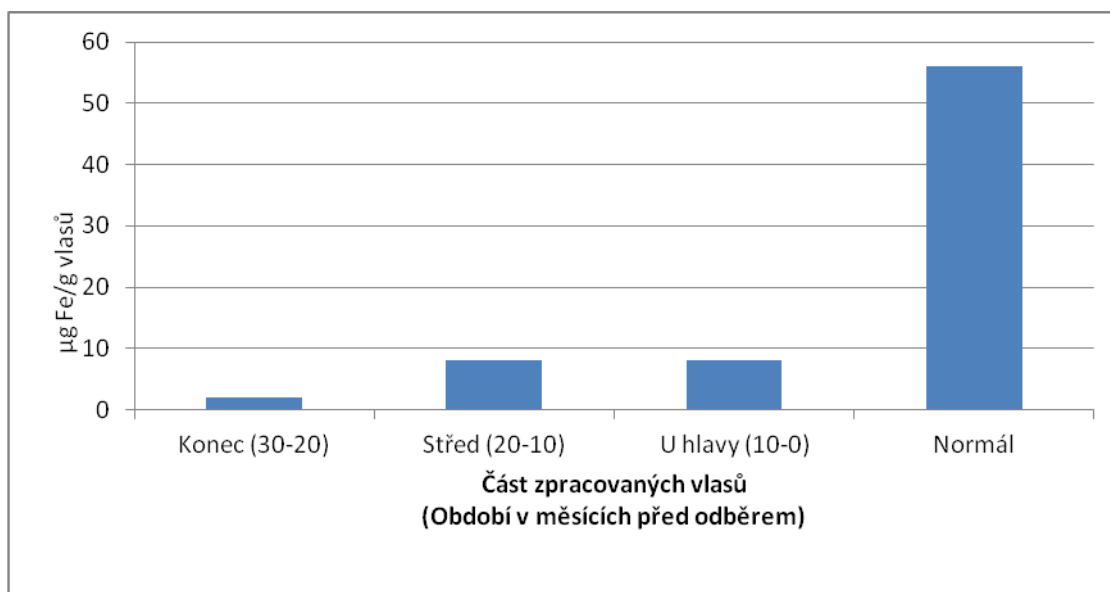


Graf 2: Ni ve vlasech

5.3 Prověření ztrát Fe u pacientky z hematoonkologie

Důvodem stanovení Fe ve vlasech u hematoonkologické pacientky byla extrémní ztráta železa. Pacientka během půlroční terapie dostala mnoho transfúzí a lékaři potřebovali zjistit, zda ztrácela železo před zahájením terapie nebo až po jejím ukončení. Jedinou možností jak zjistit odpověď bylo využití analýzy železa ve vlasech (stanovení Fe v séru ukáže jen situaci organismu v den odběru nebo maximálně pár dní před odběrem). Vlasy se analyzovaly v cca 10centimetrových úsecích, které

zachycovaly situaci odpovídající období 10 měsíců. Výsledky znázorněné v Grafu 3 jasně ukazují velmi nízký obsah železa ve všech třech analyzovaných částech vlasů. To znamená, že pacientka ztrácela železo již dávno před zmiňovanou invazivní terapií realizovanou 6 měsíců před odběrem. Lékaři tak dostali důležitou informaci umožňující volbu dalšího terapeutického postupu.



Graf 3: Fe ve vlasech

5.4 Další příklady využití analýzy vlasů

V této podkapitole uvádím pouze heslovitě dva další případy úspěšné aplikace stanovení stopových prvků ve vlasech.

Prvním z nich je intoxikace olovem celé rodiny, která pila čaj s citronem, připravovaný v keramické konvici s olovenou glazurou. Nekvalitní glazura se v kyselém prostředí rozpouštěla a došlo k již zmíněné intoxikaci. Následovala terapie pomocí chelátových injekcí.

Druhý případ se týká skupiny restaurátorů. Tito pracovníci obnovovali historické malby v klášteře, při kterých se začaly projevovat zdravotní potíže. Analýza příznaků vedla k podezření na intoxikaci olovem. Následná analýza olova ve vlasech určila období zvýšeného přísunu olova, které se shodovalo s obdobím práce na uvedených

historických malbách. Používané speciální barvy totiž obsahovaly olovo a restaurátoři tedy vdechovali prach s jeho obsahem.

6 Diskuze

Jak již bylo zmíněno, využití vlasů přináší řadu potenciálních výhod a přínosů (snadný neinvazivní odběr vzorku, stabilita odebraného vzorku a především možnost nahlédnout do vzdálenější historie organismu) než umožňuje například analýza krve (5). Proto bylo realizováno množství studií, které se snaží pomocí stanovení toxických stopových prvků ve vlasech monitorovat expozici nebo stanovením biogenních prvků prověřovat zdravotní stav a správnou výživu lidí.

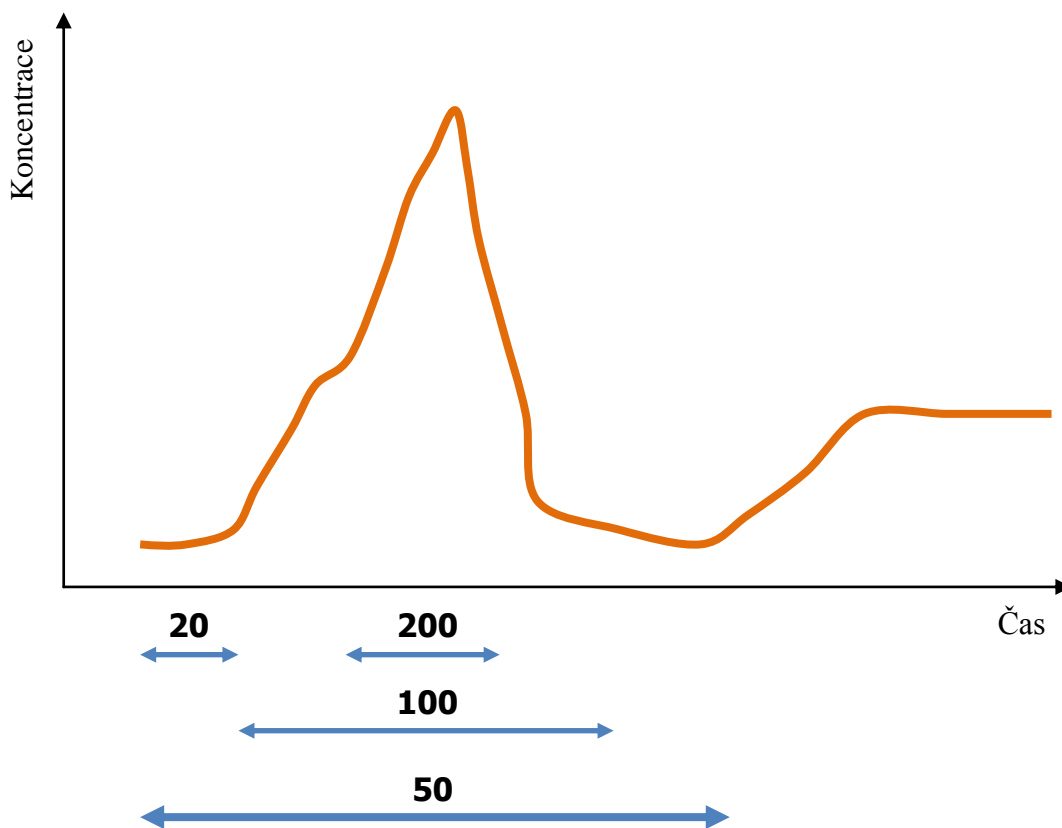
Tyto výhody a přínosy jsou ovlivněny řadou faktorů, které ztěžují nejen dosažení kvalitních, tj. precizních a pravdivých výsledků, ale i jejich správnou interpretaci.

6.1 Faktory ovlivňující výsledek a jeho interpretaci

Prvotními faktory, které byly prokázány v řadě studií, jsou *faktory biologické*. Ty mohou být způsobeny barvou vlasů, věkem, pohlavím, rasou či zdravotním stavem. Například v oblasti Benátek byla provedena analýza vlasů u 132 zdravých lidí pro zjištění rozdílů. Nejnižší koncentrace stopových prvků byly zjištěny u světlých vlasů, nejvyšší u černých. Z hlediska pohlaví byla u žen prokázána vyšší koncentrace než u mužů (32). Cílem další studie, prováděné v Rusku, bylo stanovení Pb u dětí. Byly odebrány vlasy a krev od 189 dětí z mateřských školek na stanovení olova. V krvi byla stanovena průměrná koncentrace 98 $\mu\text{g/l}$, ve vlasech 7,2 $\mu\text{g/g}$ – mez detekce metody byla 1,0 $\mu\text{g/g}$. Výsledky ve vlasech byly vyhodnoceny jako 57% senzitivity a 18% falešné negativity. Závěr byl takový, že vlasy nejsou vhodné pro monitorování expozice dětí olovem z životního prostředí (12). V práci z roku 2009 byl stanoven Mn ve vlasech 109 dětí žijících v okolí továrny na Fe-Mn slitiny v Brazílii. Ve srovnání s dětmi z kontrolní skupiny byla u těchto dětí zjištěna zvýšená hladina Mn. Rozdíl byl i v lokalitě bydliště, to znamená, že ve směru větru byly vyšší koncentrace než proti větru (20).

Dalším velmi důležitým faktorem je závislost výsledku na *odebrané části vlasů*. Odebírá se ta část vlasů, která je pro stanovení koncentrace stopových prvků důležitá vzhledem k časovému období, které je nutné prověřit. Rychlost růstu vlasů je cca 1 cm/měsíc. Graf 4 schematicky (bez určení jednotek) znázorňuje závislost

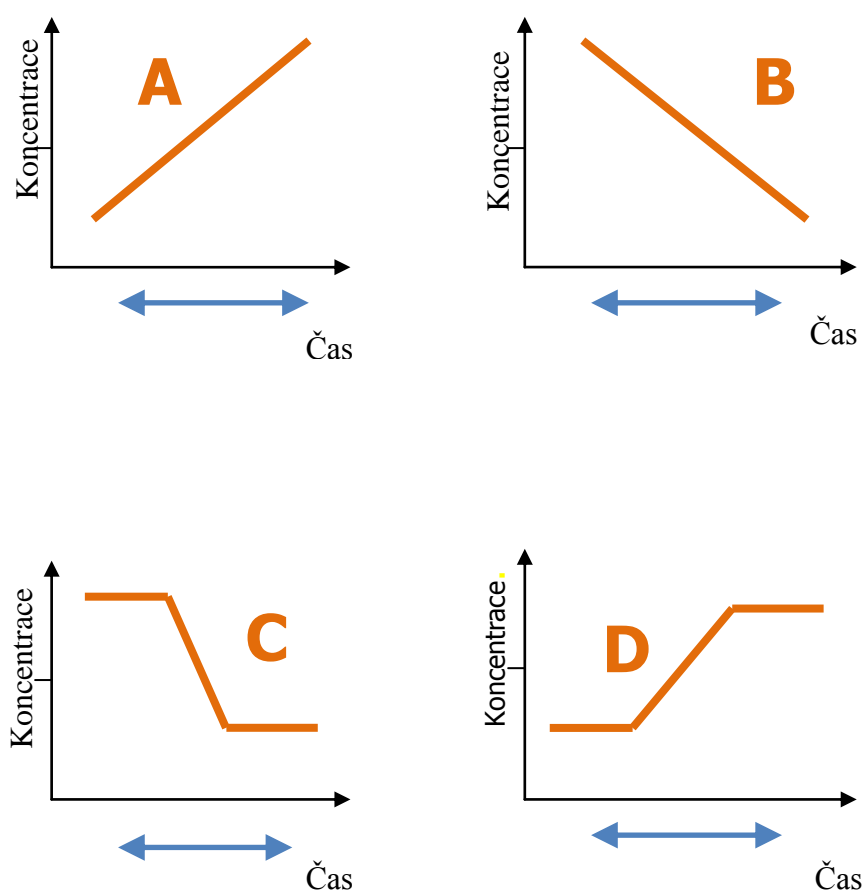
výsledku na části vlasu, která se použije k analýze při proměnlivé expozici. Pokud se odebere část zachycující vrchol píku, bude výsledek 200, zatímco když se zanalyzuje poslední úsek, bude výsledek jen 20. Modré vodorovné úsečky zobrazují část vlasů zpracovanou při analýze, hnědá křivka znázorňuje průběh expozice v čase a černá čísla vyjadřují odpovídající výsledek.



Graf 4: Schematická závislost výsledku na části vlasu vzaté k analýze

Z toho plyne, že vlasy nelze používat pro monitorování dějů mladších než cca 1 měsíc (23). Musí se počkat, až vlas poporoste minimálně o 1 cm. Tento 1 cm dlouhý úsek odebraný od hlavy potom odpovídá stavu organismu v průběhu měsíce před odběrem vzorku. Graf 5 schematicky upozorňuje na to, že situace může být ještě složitější. Lze získat stejný výsledek při úplně jiném časovém trendu. Např. část A znázorňuje situaci,

kdy koncentrace stanovovaného prvku v čase roste, tj. žádoucí v případě terapie nedostatečného přísunu biogenního stopového prvku, ale naopak nežádoucí při monitorování toxické expozice. Výsledek A by přitom byl zcela stejný jako v části B, kde by to ale bylo obráceně. Části C a D znázorňují obdobnou jen časově více členitou situaci.



Graf 5: Stejná koncentrace při různém časovém průběhu

Výsledek analýzy vlasů může být zásadně ovlivněný i *vnější kontaminací* z okolního pracovního a životního prostředí, především pak z používané vlasové kosmetiky (šampony, barvy, kondicionéry, laky). Například ve studii z Itálie autoři konstatovali, že není možné vyloučit vliv vlasové kosmetiky, protože je obtížné získat vzorky od žen, které by vlasovou kosmetiku nepoužívaly (32).

Před vlastní analýzou se proto musí zpracovávané vlasy umýt, aby byla odstraněna případná vnější kontaminace. Způsob mytí je další z faktorů, který může zásadně ovlivnit výsledek. Pro mytí se používá několik postupů, porovnání jejich účinnosti bylo tématem řady prací. Například pro stanovení olova byly použity tři metody mytí vlasů a jako nejvhodnější se jevilo mytí detergent-aceton (29). Konstatování, že právě mytí vzorků před analýzou je nejpodstatnější faktor, bylo potvrzeno i klinickým výzkumem. Bylo provedeno srovnání kontrolních stanovení ve vlasech, při kterém byly zjištěny velké rozptyly, což vedlo autory k závěru, že analýza vlasů je nespolehlivá. Při systematické snaze přijít na důvod těchto rozptylů byl postupně prověřován vliv jednotlivých kroků analýzy vlasů. Ukázalo se, že když laboratoře měly vzorky umyté jednotným způsobem, byly rozptyly mnohem menší, dosažené výsledky byly dobře srovnatelné. Což dokazuje, že různé mycí kroky používané laboratořemi byly hlavním zdrojem chyb v původním testování (30). Z toho vyplývá, že metodika mytí vlasů musí být zvolena tak, aby se odstranila vnější kontaminace, ale aby se současně neovlivnil endogenní obsah prvků ve vlasech. Zvolená metodika musí být stabilně dodržována, tím je dána možnost porovnání výsledků.

V průběhu analýzy je jedním z faktorů, který může ovlivnit výsledek, také další nezbytný krok a to *mineralizace vzorku*. V literatuře jsou popsány různé metodiky: otevřená, uzavřená, suchá (spalování v platinovém kelímku) či mokrá (vaření s přísadkou kyselin). Například byl sledován vliv různých podmínek mineralizace pro stanovení Zn, Cu, Mn a Fe (14). Porovnávalo se, zda je suchá mineralizace vhodnou alternativou mokré mineralizace s HClO_4 : HNO_3 nebo samotnou HNO_3 pro následné stanovení atomovou absorpční spektrometrií. Koncentrace Zn, Cu a Mn nebyly typem mineralizace ovlivněny. U stanovení Fe došlo při suché mineralizaci k poklesu koncentrace, při mokré mineralizaci za použití HClO_4 : HNO_3 i samotné HNO_3 byly výsledky srovnatelné. Proto bylo doporučeno použít suchou mineralizaci ke stanovení Zn, Cu, a Mn, a mokrou mineralizaci s HNO_3 pro testy Fe. Lze tedy říct, že metodiku mineralizace je nutné zvolit tak, aby se co nejvíce omezilo potenciální riziko ztráty prvků způsobené na jedné straně např. vytěkáním a na druhé straně aby se maximálně

omezila možná kontaminace vzorku použitými reagensy. Za optimální se v současné době považují tlakové mikrovlnné mineralizační systémy (14).

Pro relevantní výsledky analýzy vlasů jsou samozřejmě obecně důležité dobré analytické vlastnosti použitých postupů. Pro dobrou preciznost je důležité používat kvalitní analyzátory a zachovávat zásady správné laboratorní praxe. Pro ověření pravdivosti je podmínkou dostupnost kvalitních kontrolních materiálů. Právě *nedostatek kvalitních referenčních materiálů* je dalším problémem spojeným s analýzou vlasů. V Tabulce 3 je uvedeno rozdílné hodnocení výsledků analýzy 19 prvků ve stejném referenčním materiálu v 6 renomovaných laboratořích z USA (28).

Tabulka 3: Interpretace výsledků u 19 prvků ve vlasech při mezilaboratorním srovnání

	Vybrané laboratoře - počet z celkem 19 prvků zařazených do 3 kategorií					
Kategorie	A	B	C	D	E	F
Zvýšená	1	1	2	1	1	0
Normální	4	14	14	13	10	14
Snížená	14	4	3	5	8	5

(Seidel, 2001)

Zatímco laboratoř A hodnotila jako normální nález jen u 4 prvků, tak např. laboratoře B, C a F vyhodnotili jako normální nález u 14 prvků, což je příkladem obtížné interpretovatelnosti plynoucí z nedostatečného určení referenčních mezí. Rozdíly v hodnocení byly právě způsobené tím, že jednotlivé laboratoře měly hodně rozdílné referenční hodnoty. V Tabulce 4 je vidět, že zatímco například laboratoř A udává u Se referenční meze 1,2 -2,3 µg/g vlasů, tak laboratoř B uvádí 10 – 30 µg/g vlasů. Obdobné rozdíly jsou také u ostatních prvků (28).

Tabulka 4: Rozdílné hodnoty referenčních mezí jednotlivých laboratoří

Prvek	Referenční meze vybraných prvků v µg/g vlasů v jednotlivých laboratořích					
	A	B	C	D	E	F
Al	< 9	8-28	< 7	< 8	< 10	< 17
As	< 4	0,4-2,8	< 0,06	< 0,1	< 1	< 1,12
Co	0,3-0,6	2,4-6	0,013-0,05	0,01-0,03	< 0,1	0,02-0,45
Fe	21-46	20-40	5,14-14	10-18	10-34	5,46-13,7
Pb	< 8	2-20	< 1	< 0,8	< 6	< 5
Mn	1,2-2,4	0,6-1,8	0,15-0,65	0,08-0,29	0,7-2,5	0,07-1
K	50-180	30-180	8-38	4-22	50-150	5-40
Se	1,2-2,3	10-30	0,95-1,7	0,9-1,5	0,4-1,2	0,21-5,46

(Seidel, 2001)

Určení relevantních referenčních mezí pro konkrétní populaci se věnuje řada výzkumných studií. Např. stanovení obsahu stopových prvků ve vlasech u 3556 dětí žijících v České republice bylo cílem studie prováděné v letech 1994-2011. Jejím závěrem bylo určení referenčních hodnot (4).

Konečně je nutné konstatovat, že dosud jsou jen *omezené znalosti souvislosti* mezi koncentrací biogenních stopových prvků ve vlasech a konkrétním zdravotním stavem, konkrétním ovlivněním jednotlivých orgánů a případným omezením funkcí vyšetřovaného organismu.

6.2 Komerčně zaměřené aplikace analýzy vlasů

S diskutovanými problémy poněkud kontrastují komerčně laděné internetové odkazy, které líčí analýzu stopových prvků ve vlasech jako jednoduchý, bezproblémový až zázračný systém umožňující dodání detailních informací o fungování celého těla z pohledu energetických procesů, určení typu metabolismu a doporučení vhodné stravy specifické pro daný organismus. Tato analýza má být vhodná zejména pro ty, kteří se

zajímají o své zdraví a chtějí pro sebe něco udělat. Výhodou je bezbolestný odběr a snadný transport stabilních vzorků. Je zřejmé, že se jedná z valné části o komerci, snahu získat od lidí peníze za opakovanou analýzu vlasů a současně je nasměrovat k nakupování různých doplňků stravy apod.

Závěr

Jak tedy odpovědět na základní otázku: Je analýza vlasů přínosná a obecně použitelná?

Odpověď založená jednak na údajích z literatury a jednak na vlastních praktických zkušenostech je:

Ano u případů s vysokou expozicí toxických prvků (vhodný BET), případně u pacientů s některými závažnými onemocněními.

Ne u individuálních výsledků biogenních prvků u zdravých jednotlivců z běžné populace. Mezi příčiny této negativní odpovědi patří: příliš velké interindividuální rozdíly způsobené mnoha faktory, problém normálu, zatím často nedostatečná analytická standardizace a jen velmi omezené informace o souvislostech koncentrací ve vlasech a vlivu na cílový orgán a zdravotní stav.

Seznam informačních zdrojů:

1. Analýza vlasů. *Analýza vlasů* [online]. 2007 [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <http://www.analyza-vlasu.cz/informace-o-analyze.html>
2. BARRETT, S. Commercial hair analysis. Science or scam? *JAMA*. 1985, 254(8), 1041-1045. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4021042>
3. BARTOŠOVÁ, L. A KOL. *Choroby vlasů a ovlášené kůže*. Praha: Avicenum, 1982.
4. BENEŠ, B., SLADKÁ, J., SPĚVÁČKOVÁ, V., ŠMÍD, J. Determination of normal concentration Levels of Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Se and Zn in hair of the child population in the Czech Republic. *Centr. Eur. J. Public. Health*. 2003, 11(4), 184-186. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14768779>
5. COOPER, G. A. Hair testing is taking root. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2011, 48(6), 516-530. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21868416>
6. ČECH, S., HORKÝ, D. *Histologie a mikroskopická anatomie pro bakaláře*. Brno: Masarykova universita, 2004. ISBN 80-210-3513-7.
7. DOKLÁDAL, M., PÁČ, L. *Anatomie člověka III. Systém kožní, smyslový, nervový*. Brno: Masarykova universita, 2000. ISBN 80-210-1169-6.
8. DOLEŽALOVÁ, V. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. Brno: idvpz, 1995. ISBN 80-7013-198-5.
9. DRUYAN, M. E., BASS, D., PUCHYR, R., UREK, K., QUIG, D., HARMON, E., MARQUARDT, W. Determination of reference ranges for elements in human scalp hair. *Biological Trace Element Research*. 1998, 62(3), 183-197. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9676882>
10. DYLEVSKÝ, I. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.
11. DYLEVSKÝ, I. *Základy funkční anatomie*. Olomouc: Poznání, 2011. ISBN 978-80-87419-06-9.
12. ESTEBAN, E., RUBIN, CH., JONES, R. L., NOONAN, G. Hair and blood as substrates for screening children for lead poisoning. *Archives of Environmental Health*. 1999, 54(6), 436-440. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10634234>
13. FEŘTEK, O., ADÁMEK, J. *Kosmetická problematika v dermatologické praxi*. Praha: Avicenum, 1987.

14. FRIEL, J. K., NGUYEN, C. D. Dry- and wet-ashing techniques compared in analyses for zinc, copper, manganese and iron in hair. *Clinical Chemistry*. 1986, 32(5), 739-742. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3698264>
15. HIRANO, Y., YAMAMURA, K., OGUMA, K., HARADA, K. Direct determination of vanadium in hair by graphite furnace atomic absorption spectrometry using air ashing in the graphite furnace. *Analytical Science*. 2001, 17(11), 1351-1354. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11759524>
16. HOLZBECHER, Z., CHURÁČEK, J. A KOL. *Analytická chemie*. Praha: SNTL, 1987.
17. KITTNAR, O. A KOL. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
18. KOLEKTIV. *Antropologie a somatologie pro posluchače biologie na přírodovědeckých fakultách*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1967.
19. LANGMEIER, M. A KOL. *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.
20. MENEZES-FILHO, J. A., PAES, C. R., PONTES, A. M., MOREIRA, J. C., SARCINELLI, P. N., MERGLER, D. High levels of hair manganese in children living in the vicinity of a ferro-manganese alloy production plant. *Neurotoxicology*. 2009, 30(6), 1207-1213. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393689>
21. MERKUNOVÁ, A., OREL, M. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1521-6.
22. MIEKELEY, N., DIAS CARNEIRO, M. T., DA SILVEIRA, C. L. How reliable are human hair reference intervals for trace elements? *The Science of the Total Environment*. 1998, 218(1), 9-17. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9718741>
23. NUTTALL, K.L. Interpreting hair mercury levels in individual patients. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 2006, 36(3), 248-261. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951265>

24. Ordinace přírodní psychosomatické léčby. *Analýza vlasů* [online]. 2008 [cit. 2013-04-22]. Dostupné z:
http://www.mudrkastnerova.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=31&Itemid=34
25. POPL, M. A KOL. *Základy instrumentální analýzy*. Praha: SNTL, 1982.
26. PROKOPEC, M. A KOL. *Antropologické praktikum*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1965.
27. ŘÍHOVÁ, V. *Vady a choroby vlasů*. Praha: Zdravotnické nakladatelství, 1951.
28. SEIDEL, S., KREUTZER, R., SMITH, D., MCNEEL, S., GILLISS, D. Assessment of commercial laboratories performing hair mineral analysis. *JAMA*. 2001, 285(1), 67-72. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11150111>
29. SEN, J., DAS CHAUDHURI, A. B. Brief communication: Choice of washing method of hair samples for trace element analysis in environmental studies. *American Journal of Physical Anthropology*. 2001, 115(3), 289-291. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11424080>
30. SHAMBERGER, R. J. Validity of hair mineral testing. *Biological Trace Element Research*. 2002, 87(1-3), 1 – 28. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117220>
31. Studio Amadeus cz. *Co byste měli vědět o vlasech* [online]. 2005 [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: <http://www.studioamadeus.cz/o-vlasech.html>
32. STURARO, A., PARVOLI, G., DORETTI, L., ALLEGRI, G., COSTA, C. The influence of colour, age, and sex on the content of zinc, copper, nickel, manganese and lead in human hair. *Biological Trace Element Research*. 1994, 40(1), 1-8. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7511917>
33. ZÝKA, J. A KOL. *Analytická příručka 2*. Praha: SNTL, 1980.