

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNE

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

BAKALÁRSKÁ PRÁCA

BRNO, 2020

Monika Molnárová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

ANALÝZA BIOCHEMICKÝCH A HEMATOLOGICKÝCH DAT U SPORTOVců

THE ANALYSIS OF BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL DATA IN ATHLETES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Monika Molnárová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Daniela Chlíbařová, Ph.D

BRNO 2020

Semestrální práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Monika Molnárová

ID: 203676

Ročník: 3

Akademický rok: 2019/20

1 NÁZEV TÉMATU:

Analyza biochemických a hematologických dat u sportovců

2 POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte rešerši používaných metod pro zpracování fyziologických vzorků v podmínkách laboratoře i terénního výzkumu. Zaměřte se na přístrojovou technologii v laboratoři i přístroje přenosného charakteru. 2) Porovnejte různé metody zpracování dat. Porovnejte časovou a finanční náročnost různých metod i jejich reliabilitu a možnost použití v praxi terénního výzkumu. 3) Seznamte se s reálnými daty z výzkumu prováděného na CESA VUT v Brně. Navrhněte postup pro statistickou analýzu dat. 4) Vytvořte nástroj pro načtení, prohlížení a statistické vyhodnocení dat. 5) Proveďte analýzu dat sportovců. 6) Porovnejte výsledky s dostupnými údaji z literatury. Dosažené výsledky interpretujte a podrobně diskutujte.

3 DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] ZIMA, T., et al. Laboratorní diagnostika, Galén, Praha, 2007, 906 s. ISBN 9788072623723.

[2] JAN, J. Medical Image Processing, Reconstruction and Restoration: Concepts and Methods. Boca Raton, FL, USA, Taylor & Francis CRC Press, 2006.

[3] GONZALES, RC. Digital image processing: using MATLAB. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2004. 609 s. ISBN 01-300-8519-7.

Termín zadání: 3.2.2020

Termín odevzdání: 5.6.2020

Vedoucí práce: Mgr. Daniela Chlíbařková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Marina Ronzhina, Ph.D.

4 PROF. ING. IVO PROVAZNÍK, PH.D.

předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor semestrální práce nesmí při vytváření semestrální práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Táto práca sa venuje analýze biologických parametrov krvi a moči bežcov. Popisuje diagnostické princípy analýzy biologického materiálu v laboratóriu aj v teréne a porovnáva jednotlivé prístroje, ktoré sa k analýze využívajú. Pomocou štatistických testov vyhodnocuje vzťahy medzi jednotlivými parametrami. Spearmanovým korelačným koeficientom sú určované a hľadané významné závislosti, ktoré by umožnili predikciu určitého parametra na základe vzťahu s inými parametrami. V ďalšej časti práce je navrhnuté programové riešenie predikcie s využitím Neural network Toolboxu, s popisom testovania úspešnosti a ďalšie možnosti zlepšenia predikcie.

Kľúčové slová

Laboratórna diagnostika, automatické analyzátory, korelácia, predikcia, umelé neurónové siete

Abstract

This thesis is focused on blood and urine analyses of runners after the competition. It describes the principles of analysis and laboratory testing not only in laboratories, but also in terrain conditions. The thesis includes statistical testing and evaluation of hematological and biochemical parameters. With the use of Spearman correlation coefficient are determined the relations between the parameters. The goal of the thesis is finding a way to predict biological parameters by using a group of other parameters. In the practical part of the work is described the algorithm for prediction with Neural network Toolbox the network testing results and other ways to improve the prediction algorithm.

Key words

Laboratory diagnostict, automated analyzers, correlation, predistion, artificial neural networks

Bibliografická citácia:

MOLNÁROVÁ, Monika. Analýza biochemických a hematologických dat u sportovců [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-05-27]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/126713>.
Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce Daniela Chlíbařová.

Prehlásenie

„Prehlasujem, že svoju záverečnú prácu na téma Analýzy biochemických a hematologických dat u športovcov som vypracovala samostatne pod vedením vedúcej bakalárskej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autorka uvedenej záverečnej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto záverečnej práce som neporušila autorská práva tretích osôb, nezasiahla som nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobnostných a som si plne vedomá následkov porušenia ustanovení § 11 a nasledujúcich autorského zákona č. 121/2000 Sb., vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovení časti druhej, hlavy VI. diel 4 Trestného zákonníka č. 40/2009 Sb.

V Brne dňa **5. júna 2020**

podpis autorky

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie partí vedúcej bakalárskej práce Mgr. Daniele Chlíbkovej, Ph.D. za trpezlivosť a odborné vedenie počas vypracovávania práce. Taktiež ďakujem Ing. Marine Ronzhine, Ph.D. za užitočné rady a upozornenia pri spracovaní dát.

V Brne dňa **6.mája.2020**

podpis autorky

Obsah

1	ÚVOD	11
2.	METÓDY SPRACOVANIA VZORIEK	12
2.1.	LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA.....	12
2.1.1.	<i>Vyšetrenie biochemických ukazovateľov rýchlými testami</i>	12
2.1.2.	<i>Morfológia</i>	12
2.1.3.	<i>Fotometrické stanovenie látok</i>	14
2.1.4.	<i>Refraktometria</i>	14
2.1.5.	<i>Automatické analyzátory</i>	15
2.2.	POINT OF CARE DIAGNOSTIKA.....	16
2.3.	SPRACOVANIE BIOLOGICKÝCH VZORIEK V TERÉNNYCH PODMIENKACH.....	18
2.3.1.	<i>Terénne analyzátory</i>	18
3.	KOMPARÁCIA PRÍSTROJOVEJ TECHNOLOGIE	21
3.1.	KOMPARÁCIA PRÍSTROJOV PODĽA METÓDY A PRESNOSTI MERANIA.....	21
3.2.	KOMPARÁCIA PRÍSTROJOV VZHLADOM K ČASOVEJ A FINANČNEJ NÁROČNOSTI.....	22
3.3.	KOMPARÁCIA PRÍSTROJOV NA ZÁKLADE VŠEOBECNEJ RELIABILITY A VYUŽITIA V TERÉNE.....	23
4.	BIOLOGICKÉ PARAMETRE SLEDOVANÉ PRI FYZICKOM VÝKONE	24
4.1.	METABOLICKÉ PARAMETRE.....	24
4.2.	PARAMETRE SVALOVEJ ČINNOSTI.....	24
4.3.	KRVNÝ OBRAZ POČAS ZÁŤAŽOVEJ ČINNOSTI.....	25
5.	ANALÝZA DÁT ŠPORTOVCOV	27
5.1.	POPIS DÁT.....	27
5.2.	PREDSPRACOVANIE DÁT.....	27
5.3.	ŠTATISTICKÁ ANALÝZA DÁT.....	28
5.3.1.	<i>TEST NORMALITY</i>	28
5.3.2.	<i>KORELAČNÁ ANALÝZA</i>	28
6.	PROGRAMOVÉ RIEŠENIE PREDIKCIE	32
6.1.	ARCHITEKTÚRA UMELEJ NEURÓVEJ SIETE.....	32
6.2.	UČENIE UMELEJ NEURÓNOVEJ SIETE.....	33
6.3.	TESTOVANIE UMELEJ NEURÓNOVEJ SIETE.....	36
7.	DISKUSIA	37
8.	ZÁVER	39
9.	LITERATÚRA	40
10.	ZOZNAM PRÍLOH	44

Zoznam obrázkov

Obrázok 1 Prenosný analyzátor moču [13]	19
Obrázok 2 Biochemický analyzátor ADVIA Chemistry XPT [16]	22
Obrázok 3 Graf závislosti hemoglobínu a erytrocytov	30
Obrázok 4 Graf korelácie neutrofilov a lymfocytov	31
Obrázok 5 Nastavenie parametrov učenia.....	34
Obrázok 6 Graf procesu učenia.....	35
Obrázok 7 Graf regresnej analýzy.....	35
Obrázok 8 Výpočet chyby siete	36
Obrázok 9 Regresná analýza testovania siete.....	36
Obrázok 10 Trénovanie siete pri nastavení počtu neurónov: 20	38
Obrázok 11 Regresia testovania pri nastavení $\mu=1$	38
Obrázok 12 Regresia testovania pri nastavení $\max_fail=30$	38

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 Veľkosť útvarov v počítačovej mriežke Bürkerovej komôrky.....	13
Tabuľka 2 Klinická aplikácia Poin of Care systémov [10]	18
Tabuľka 3 Výsledok analýzy Pearsonovho korelačného koeficientu	31

1 ÚVOD

Pri súčasnom trende vývoja prístrojovej techniky je viac než potrebné vytvárať nové, zjednodušené postupy a metódy analýzy. Vytvárať programy a algoritmy schopné rýchlejšieho a lepšieho hodnotenia výsledkov. V posledných rokoch narastá tento trend aj v laboratórnej diagnostike. V tejto práci som sa snažila priblížiť jednotlivé metódy laboratórnej diagnostiky a upútať pozornosť na tzv. vreckové analyzátory, ktoré už nevyžadujú umiestnenie iba v priestoroch laboratórií. Časom sa tieto prístroje dostávajú bližšie k obyčajným ľuďom.

V prvej časti sa táto práca zaoberá prístrojovou technikou v laboratóriách až k prístrojom, ktoré je možné využívať aj mimo zaužívaných priestorov a ich porovnanie. Ide o miniaturizované analyzátory, ktoré urýchľujú diagnostiku a zjednodušujú prácu obsluhujúceho pracovníka.

Ďalšia časť práce sa venuje štatistickej analýze laboratórnych výsledkov bežcov a jednotlivých vzťahov medzi parametrami. Rozoberá myšlienku predikcie určitého parametru na základe iných, jednoduchšie stanoviteľných, korelovaných parametroch.

Následná predikcia prebieha v prostredí matlab využitím Neural network Toolboxu. V práci je prítomný popis architektúry a parametrov používanej umelej neurónovej siete, jej testovanie aj možnosťami na ďalšie zlepšenie algoritmu.

2. METÓDY SPRACOVANIA VZORIEK

2.1. Laboratórna diagnostika

2.1.1. Vyšetrenie biochemických ukazovateľov rýchlymi testami

Pre rýchle zhodnotenie a orientačné vyšetrenia sa využívajú diagnostické indikačné papieriky. Ide o stanovenie vybraných biochemických skriningových parametrov krvi v teréne metódou suchej chémie. Využívajú sa diagnostické testovacie prúžky PHAN ako multiscreeningové indikátory. Na základe typu diagnostického prúžku je možné stanoviť rôzne parametre krvnej plazmy alebo moči, alebo kombináciu parametrov. Výhodou diagnostických prúžkov je jednoduchosť a rýchlosť stanovenia, výsledky sú získané počas 1-2 minút. Špecifická a senzitivita vyšetrenia je pomerne vysoká, ale je ovplyvnená prítomnosťou niekoľkých faktorov, ako je napríklad veľké vychýlenie pH a prítomnosťou liekov a iných účinných látok vo vyšetrovanej vzorke, ktoré interferujú s reagujúcou látkou.

Diagnostické prúžky pracujú na princípe chemickej reakcie medzi látkou prítomnou v skúmanej vzorke a reagensiou naviazanou na indikačných poliach. Pri ponorení diagnostického prúžku do vzorky dochádza k chemickej reakcii medzi týmito látkami, čo vedie k zmene farby. Výsledná farba je porovnávaná s priloženou štandardnou farebnou škálou, pričom zmena farby je priamo úmerná množstvu stanovovanej látky.[1,2]

2.1.2. Morfológia

Krv alebo iný cytologický materiál sa pred morfológickým stanovením riedi v určitom pomere s riediacim, farbiacim či fixačným roztokom, ktorý zvýrazní počítanú krvnú bunku a ostatné elementy potlačí alebo rozruší. Stanovený počet krvných buniek sa prepočíta na 1 liter krvi. Erytrocyty sa stabilizujú Hayemovým roztokom, čo je roztok $HgCl_2$. U erytrocytov sleduje sa tvar, pigmentácia, rozloženie a ich počet. U leukocytov je využívaný Thürkrov roztok, zložený z ľadovej kyseliny octovej a genciánovej violete, kde kyselina octová rozruší erytrocyty a trombocyty, neporuší však leukocyty a genciánová violet' ofarbí na modro jadrá leukocytov. Ďalej sa v preparáte sleduje zastúpenie jednotlivých typov leukocytov, ako aj ich stav, aktivita, diferenciácia a celkové zastúpenie v krvi.

Na počítanie krvných elementov mikroskopicky sa využívajú špeciálne komôrky s definovaným kalibrovaným vnútorným objemom. V hematológii sa najčastejšie využíva Bürkerova komôrka, ale môžu sa využiť aj iné podľa typu počítaných buniek príkladom ďalších využívaných komôrok sú Fuchsova-Rosentalova komôrka, Neubaerova alebo komôrka Nageotte. Bürkerova komôrka je 5mm hrubé zabrúsené sklo dlhé 70mm a široké 30mm. Jeho horná plocha je uprostred rozdelená na dve proti sebe ležiace plochy, na týchto plochách sa nachádza mriežka uložená 0,1mm nižšie ako okolie, tým po prekrytí polí krycím sklíčkom vzniká 0,1 mm vysoký priestor, v ktorom sa po naplnení počítajú krvinky. Krycie sklíčko musí byť rovné a obrúsené a musí pevne sedieť, preto je ku komôrke prichytené dvoma úchytkami. Samotné počítanie prebieha na počítacej ploche tvorenej sieťou jemných vrypov o známych rozmeroch. Počítacia plocha je trojitými čiarami rozdelená na deväť veľkých štvorcov s objemom $1mm^2$, dvojitémi čiarami na 144 stredných štvorcov o objeme

1/25 mm² a ďalej na 169 malých štvorcov ktoré majú objem 1/400 mm². Medzi dvojitými stranami tak vznikajú obdĺžniky, ktorých plocha je rovná ploche štyroch malých štvorcov

	Rozmer [mm]	Plocha [mm²]	Objem [mm³]
Veľký štvorec	1 x 1	1	0,1
Stredný štvorec	0,2 x 0,2	0,04	0,004
Malý štvorec	0,05 x 0,05	0,0025	0,00025

Tabuľka 1 Veľkosť útvarov v počítacej mriežke Bürkerovej komôrky

Pri počítaní rôznych krvných elementov sa využíva rôzny počet a tvar plošných obrazcov. Výsledný počet buniek sa vypočíta podľa vzorca[3,4]:

$$\text{počet} \frac{\text{buniek}}{1} = \frac{\text{zistený počet buniek}}{(\text{objem} \cdot \text{riedenie vzorku})}$$

Optický mikroskop

Mikroskop je centrovaná sústava dvoch zložených spojných šošoviek. Obe šošovky sú zložené korigované sústavy skladajúce sa z viacerých šošovkových elementov, pričom sa kladú vysoké požiadavky na vykorigovanie rôznych aberácii jednotlivých šošovkových členov. Základná optická časť mikroskopu je objektív. Objektívy sa dokonale korigujú na určitú pevne zadanú optickú dĺžku konštrukcie tubusu a na zadanú hrúbku krycieho sklíčka pri pozorovaní preparátov na prechod svetla.

Objektívy sú namontované na revolverovej hlavici. Optické systémy okulárov slúžia ako lupy k zväčšeniu obrazu premietnutého objektívom tak, aby sa využila maximálna rozlišovacia schopnosť objektívu pri pozorovaní malých detailov predmetu. Výsledkom je zväčšený, prevrátený a neskutočný obraz.

Zväčšenie je obmedzené rozlišovacou medzou mikroskopu, tzv. difrakčná bariéra. K ohybu vlnenia dochádza keď sa veľkosť objektu blíži vlnovej dĺžke použitého vlnenia, alebo je menšie. Z tohto dôvodu nie je možné optickým mikroskopom zobrazit' detaily menšie než 500 nm. Vzdialenosť dvoch ešte rozlíšiteľných bodov δ , je daná vzťahom:

$$\delta = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

Kde λ je vlnová dĺžka svetla, n je index lomu prostredia medzi objektívom a krycím sklíčkom preparátu a α je uhol, ktorý zvierá optická os mikroskopu s plášťom kužeľa cez ktorý vstupujú paprsky do objektívu. Pre získanie detailnejšieho zobrazenia optickým mikroskopom sa využívajú imerzné objektívy. Pri použití imerzného oleja sa medzi čelom objektívu a krycím sklíčkom vytvára prostredie o rovnakom indexe lomu ako má krycie

sklíčko. Tým sa zvyšuje uhol α a obmedzuje sa možnosť úplného odrazu svetla na hornej strane krycieho sklíčka.

Bádateľské mikroskopy sú vybavené digitálnymi kamerami, ktoré umožňujú pozorovať zväčšený obraz na monitore a uložiť ho do pamäte počítača. Záznam je potom možné hodnotiť s použitím špecializovaných počítačových programov. Digitalizácia obrazu umožňuje úpravu kontrastu a jasú a numericky analyzovať zobrazené štruktúry, čoho sa využíva pri automatickej digitálnej morfológii.[5,6]

2.1.3. Fotometrické stanovenie látok

Absorpčná spektrofotometria

Spektrofotometria je základom pre väčšinu prístrojov používaných v klinickej biochémií. Spektrofotometry sú prístroje používané predovšetkým na stanovenie prítomnosti a koncentrácie látok absorbujúcich infračervené, viditeľné alebo ultrafialové svetlo. Spektrálna závislosť absorpcie svetla v látkach, ktorá odráža ich elektrónovú štruktúru je meraná pomocou absorpčných spektrofotometrov. Hlavnými komponentmi absorpčného spektrofotometra je zdroj svetla, monochromátor a miesto pre vkladanie kvety a z detektoru svetla.

Zdroj žiarenia vysiela zväzok polychromatického svetla. Ten vstupuje do vstupnej štrbiny monochromátora, kde sa po prechode kondenzorom odráža od zrkadla a dopadá na odrazovú mriežku. Mriežku je možné otáčať a sústrediť tak na výstupnú štrbinu monochromátora svetlo potrebnej vlnovej dĺžky. Do cesty takto upraveného zväzku žiarenia sa vloží kveta naplnená skúmanou látkou. Fotoelektrický detektor umiestnený za kvetou vyhodnocuje veľkosť časti žiarenia, po prechode kvetou. Na výstupe detektoru je elektrický signál, ktorý je úmerný energii, ktorá dopadla na detektor.

Vlnová dĺžka je nastavovaná ručne alebo automaticky, čo umožňuje získanie absorpčnej krivky, čiže závislosť absorpcie svetla vo vzorku na vlnovej dĺžke svetla. Absorpčná spektrofotometria vychádza z Lambert-Beerovho zákona:

$$I = I_0 10^{-\epsilon c x}$$

Po dosadení Lambert-Beerovho zákona do vzorca absorpcie získame vzťah:

$$A = \epsilon c x$$

Ktorý hovorí, že absorpcia je priamo úmerná koncentrácii roztoku c a hrúbke absorpčnej vrstvy x . [6, 7]

2.1.4. Refraktometria

Refraktometria je optická metóda na zisťovanie indexu lomu látok v kvapalnom, alebo tuhom skupenstve. Merajú Brix, index lomu, teplotu alebo koncentráciu látky. Brix stupnica sa využíva na stanovenie obsahu čistej sacharózy vo vode.

Základnou podmienkou pre meranie refrakcie je prítomnosť svetelného lúča. Svetlo sa v látkach s rozdielnou hustotou pohybuje odlišnou rýchlosťou. Lúč svetla pri prechode hladinou skúmanej kvapaliny mení svoj uhol dopadu a pokračuje v pohybe pod novým uhlom. Lom svetla popisuje Snellov zákon, ktorý je vyjadrený ako pomer uhlu dopadu a uhlu lomu svetla.

$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}$$

Kde n vyjadruje relatívny index lomu α uhol dopadu lúča v prostredí 1, β uhol lomu v prostredí 2.

Index lomu n je optická fyzikálna veličina, ktorá charakterizuje rýchlosť šírenia svetla v skúmanom prostredí, buď vzhľadom k vákuu, alebo vzhľadom k inému prostrediu. Ak uvažujeme opticky izotropne prostredie, index lomu takýchto prostredí nezávisí na smere šírenia svetla, ale závisí od teploty a koncentrácie meranej látky a od vlnovej dĺžky použitého monochromatického svetla. Ak svetelný lúč prechádza z opticky hustejšieho prostredia do prostredia opticky redšieho, pri lome svetla existuje uhol dopadu, pri ktorom svetlo už nevnikne do redšieho prostredia. Tento uhol sa nazýva hraničný uhol. Na základe merania hraničného uhla je možné týmto prístrojom merať index lomu.

K najuniverzálnejším refraktometrom patrí Abbeho refraktometer. Je to prvý a najpresnejší typ refraktometru. V laboratóriách sa využívajú digitálne refraktometre, ale v zdravotníctve tiež nachádzajú využitie ručné refraktometre. Pre presnejšie výsledky sa používajú polarimetre na meranie optickej rotácie roztokov sacharózy.[8]

2.1.5. Automatické analyzátory

Krvinkové analyzátory

Aspirácia je vykonávaná pomocou aspiračnej striekačky s dvoma senzormi, ktoré sledujú množstvá a integritu biologického materiálu počas aspirácie. Niektoré analyzátory sú vybavené zariadením na prepichnutie uzáveru skúmavky, a tak sú schopné pracovať v uzavretom systéme. Krv sa po vstupe do analyzátora rozdelí do dvoch ciest. Erytrocyty a trombocyty sú izovolumicky sférované výrazným riedením. V ceste leukocytov dochádza k lýze erytrocytov. Nariadená suspenzia krvných elementov je vákuom nasávaná do otvoru, kde dochádza k fokusácii krvných buniek do radu za sebou, aby nedošlo ku koincidencii. Fokusácia môže prebiehať na magnetickom alebo hydrodynamickom princípe. V nových analyzátoroch je využívaná hydrodynamická fokusácia laminárním tokom tekutiny.

Hematologické analyzátory sa delia podľa základného princípu stanovenia na optické a impedančné, prípadne kombinované.

Impedančný princíp stanovenia

Počty a veľkosť krvných elementov sú dané meraním zmeny elektrického odporu pri prechode jednotlivých buniek v prietokovej meracej kvete medzi dvoma elektródami. Na elektródach je polarizované jednosmerné elektrické pole, a pri každom meraní dochádza k prepólovaniu nábojov na elektródach. Vzniká impedančný impulz, po jeho analýze prístroj

vydáva kvantitatívne (počet impulzov)a kvalitatívne (veľkosť impulzov) informácie o jednotlivých bunkách. Meranie môže byť ešte doplnené vysokofrekvenčnou analýzou, pri ktorej je jednosmerné elektrické pole superpolované vysokofrekvenčným elektrickým poľom, ktoré prenikne cytoplazmou a zmeria vysokofrekvenčnú vodivosť bunky. Častica, ktorá prejde štrbinou spôsobí zmenu vodivosti úmernú objemu častice. Táto zmena je meraná ako napäťový pulz H_p :

$$H_p = \frac{V \cdot p \cdot i \cdot f}{\pi^2 \cdot R^4}$$

kde V je objem častice, p je vodivosť, i prúd, f kalibračný faktor a R je priemer štrbiny. Nevýhodou impedančného systému je možná interferencia s čiastočkami prachu, bublinkami a ďalšími čiastočkami prostredia.

Optický princíp stanovenia

Tento princíp je založený na prietokovej cytometrii, pri ktorej sa po interakcii bunky s laserovým lúčom deteguje rozptýlené svetlo alebo fluorescenciu. Prietoková cytometria slúži ako metóda pre analýzu jednotlivých buniek v buncnej suspenzii. Pri prechode buniek kyvetou pomocou hydrodynamickej fokusácie, prechádza jednotlivými bunkami laserový lúč, ktorý je po prechode podrobený analýze. Deteguje sa svetelný lúč v smere 0° , ktorý udáva počet buniek analýzou rozptýleného svetla.

Digitálny morfológický analyzátor

Diferenciálne stanovenie krvného obrazu je možné mikroskopicky alebo na špeciálnych analyzátoroch. Ide hlavne o stanovenie diferenciálneho rozpočtu bielych krviniek, ale sleduje sa aj zafarbenie a tvar erytrocytov. Ide o elektronické hodnotenie celej krvi alebo krvného náteru, ktoré sú opracované stabilizačnými roztokmi. Vo väčšine prípadov sú krvné nátery pred analýzou ofarbené Pappenheimovou panoptickou metódou na zvýraznenie krvných elementov. Na tieto úkony sa môžu použiť špeciálne náterové a farbiace automaty, ktoré sú často súčasťou analyzátorov alebo linky.

K stanoveniu počtu a jednotlivých typov leukocytov sa využívajú rôzne detekčné systémy. Najčastejšie sa používajú metódy na princípe rozptylu laserového lúča alebo polarizovaného laserového lúča. Analyzátory určujúce päťpopulačný diferenciál bielych krviniek majú špeciálne softwarové programy, ktoré teoreticky triedia krvné bunky. Väčšinou vytvárajú plošné bodové grafy tzv. scattegramy pre jednotlivé morfológické charakteristiky a typy leukocytov. Morfológické analyzátory rozlišujú lymfocyty, monocyty, eozinofily, bazofily, neutrofilné tyčky a segmenty, erytrocyty a trombocyty. Morfológické analyzátory sú väčšinou vybavené optickým systémom kamier, ktoré umožňujú vizuálnu kontrolu a opravu roztriedenia krvných buniek. [3,9]

2.2. Point of Care diagnostika

Nevýhodou laboratórnej diagnostiky je potreba transportu vzoriek, čo spomaľuje proces spracovania a vyhodnotenia. POC systémy sú definované ako klinické diagnostické testovanie pri posteli pacienta alebo v jeho priamej blízkosti. POC analýzy umožňujú rýchlu analýzu vzoriek, čo znižuje predanalytické chyby vznikajúce pri prevoze vzoriek. Tento systém má

veľmi rozsiahle využitie, a k jeho rozvoju sa zaslúžila miniaturizácia meracej a diagnostickej techniky. Výsledky laboratórných testov z centrálnych laboratórií sú dostupné do 30 minút až 2 hodín, čo je pri život ohrozujúcich situáciách nedostatočné. Metódy Point of Care sú navrhnuté tak, aby poskytovali okamžité, vhodné a jednoduché diagnostické testovanie.

Využitie týchto systémov sa stále rozširuje počnúc oddelením urgentného príjmu až po ambulanciu lekára. POC systémy sa tiež využívajú na vlastný monitoring pacienta, hlavne u diabetikov alebo pri domácej liečbe. Najčastejšie meranými parametrami sú krvná glukóza a krvné plyny avšak stále sa rozširujú aj biochemické, hematologické a hemostatické testy. Technológie využívané v POC vychádzajú zo systémov využívaných v centrálnych laboratóriách, avšak sú optimalizované a miniaturizované, s ohľadom na rýchlosť a jednoduchosť použitia. Významnou komponentov týchto systémov je kontrolný subsystém, ktorý kontroluje priebeh všetkých analytických procesov vrátane nasávania reagensí, kontroly teploty a inkubácie. Je tiež vybavený systémom na detekciu zrazenín a hemolýzy. Kalibrácia a kontrola kvality prebiehajú automaticky. Prístroje sú vybavené dotykovou obrazovkou a zjednodušeným užívateľským prostredím, niektoré prístroje sú vybavené skenerom čiarového kódu pre identifikáciu pacienta. Namerané dáta sú ukladané do pamäti, alebo sú prepojené s lekársnym a nemocničným systémom. Významnú rolu v POC systémoch zohrávajú technológie senzorov plnej krvi, ktoré umožňujú výkon prietokových testov s veľmi krátkym trvaním a z malej vzorky krvi. Počas procesu je prietok možné regulovať pomocou kapilárnych síl alebo elektroosmotických efektov.

Point of Care testovanie je potrebné rozdeliť na dve rozličné časti a to domáce testovanie pacienta a POC diagnostika vykonávaná v nemocnici- ktorú vykonávajú medicínsky pracovníci. V prvej kategória je obmedzená zväčša na vyhodnotenie glukózy v krvi a koagulácie na monitorovanie diabetických pacientov alebo pacientov s predpísanou antikoagulačnou liečbou . Druhá kategória je limitovaná len minimálne a väčšinu testov vykonávaných v laboratóriách je možné vykonať aj na týchto prístrojoch. Na intenzívnych jednotkách sú POCT prístroje integrované k veľkým monitorovacím systémom, aby mohli byť parameter ako krvné plyny, koncentrácia elektrolytov a vitálne parameter ako EKG a krvný tlak neustále dostupné. [10]

Parametre a klinické aplikácie	Parametry
Krvné plyny a homeostáza	pH, pCO ₂ , pO ₂
Elektrolyty	Na ⁺ ,K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺
Metabolity	Cholesterol, HDL, triglyceridy, kreatinin, močovina, kyselina močová, bilirubín, laktát
Enzýmy	Amyláza, CK, ALT, AST, γ -glutamyltransferáza
Koagulácia	
Hematológia	Hemoglobín, hematokrit, ERY, LEU, diferenčný krvný obraz
Kardiálne markery	Troponin T, myoglobín, CK, interleukíny
Diabetes mellitus	Glukóza, hemoglobín, β -hydroxybutyrát
Alergické a zápalové markery	IgE, C-reaktívny proteín
Screening liekov a drog	Lieky, alkohol, canabinoidy, opiáty, barbituráty, kokaín, benzodiazepín
Infekčné choroby	HIV, infekčná mononukleóza, chrípka, streptokoky skupiny A a B
Analýza moču a stolice	Vyhodnotenie testovacích prúžkov, mikroalbumín, okultné krvácanie

Tabuľka 2 Klinická aplikácia Point of Care systémov [10]

2.3. Spracovanie biologických vzoriek v terénnych podmienkach

Pri terénnom výskume sa často využívajú prístroje primárne konštruované na použitie Point of Care. Základným predpokladom terénnych analyzátorov je prenosnosť a jednoduchosť používania , roztoky a reagensie ktoré sú potrebné na vyšetrenie by mali byť jednoduché na použitie a dobre uskladniteľné. Kvalita výsledkov a rýchlosť vyšetrenia by sa nemala meniť v závislosti od okolitých podmienok. Medzi ďalšie dôležité parametre prenosných analyzátorov je ich veľkosť a jednoduchosť manipulácie a premiestňovania. Taktiež finančná náročnosť ako prístroja, tak aj reagensií a pomôcok potrebných k prevedeniu analýzy vzorku.

Pri vyšetrení v teréne je potrebné brať ohľad na druh a množstvo materiálu potrebného na získanie plnohodnotných výsledkov. A tiež potrebný personál na odber materiálu a obsluhu analyzátoru. Odber venózne krvi na hematologickú a biochemickú analýzu, môže vykonávať len zdravotnícky pracovník plne vyškolený na túto činnosť. Neprávne prevedený odber krvi môže výrazne skresliť výsledok vyšetrenia, poprípade znemožniť vyšetrenie niektorých parametrov.[11]

2.3.1. Terénne analyzátory

Základným predpokladom terénnych analyzátorov je prenosnosť a jednoduchosť používania , roztoky a reagensie ktoré sú potrebné na vyšetrenie by mali byť jednoduché na použitie a dobre uskladniteľné. Kvalita výsledkov a rýchlosť vyšetrenia by sa nemala meniť

v závislosti od okolitých podmienok . Medzi ďalšie dôležité parametre prenosných analyzátorov je ich veľkosť a jednoduchosť manipulácie a premiestňovania. Taktiež finančná náročnosť ako prístroja, tak aj reagensí a pomôcok potrebných k prevedeniu analýzy vzorku.[11]

Biochemické analyzátory

Jednoducho využiteľné v terénnej diagnostike sú diagnostické prúžky, ktoré boli zmienené už vyššie. Pre vyššiu presnosť a rýchlosť metódy sú na vyhodnotenie farebnej zmeny používané biochemické analyzátory. Analyzátory pracujú na princípe odrazu svetla a jeho následného dopadu na fotodiódu. Zdrojom svetla je LED dióda. Analyzátor má schopnosť vyhodnotiť veľké množstvo analytov vo veľmi krátkom čase, v závislosti od použitého diagnostického prúžku. Analyzátor môže byť vybavený vstavanou centrifúgou, čo umožňuje okamžité vyšetrenie aj z plnej krvi priamo na mieste odberu. Analyzátory diagnostických prúžkov na vyšetrenie moču sú vybavené špeciálnymi kompenzačnými mechanizmami farby, teploty a špecifickej hmotnosti . Tieto analyzátory dosahujú veľmi malých rozmerov, až tzv. vreckových analyzátorov.[12,13]



Obrázok 1 Prenosný analyzátor moču [13]

Analyzátor krvných plynov

Analyzátory krvných plynov sa používajú v biochemických a patologických laboratóriách v nemocniciach na analýzu hladín CO_2 a kyslíka v krvi s cieľom zistiť prípadné respiračné a metabolické poruchy. Väčšina analyzátorov krvných plynov je schopných analyzovať okrem parametrov krvných plynov aj hladinu a stav hemoglobínu, acidobázickú rovnováhu a iónový stav organizmu. Na vyšetrenie je potrebná vzorka kapilárnej krvi. Na odber kapilárnej krvi sa používajú rôzne druhy lancet, prípadne pomôcky, ktorá umožňuje zaistenie štandardného vpichu ako napríklad injekčná ihla. Odber sa vykonáva najčastejšie zo strany prstového bruška, pričom tento odber môže vykonávať aj nelekársky zdravotnícky pracovník. K zachyteniu vytekajúcej kapilárnej krvi slúži odberová kapilára. Po priložení kapiláry k okraju kvapky krvi dochádza k nasiaknutiu krvi do kapiláry, ktorá je následne uzavrie pomocou uzáveru. Táto kapilára s krvou je po odstránení uzáveru vložená do plne automatizovaného analyzátoru. Prístroj poskytuje spojitú kontrolu kvality v reálnom čase, čoho výsledkom je vysoká presnosť.

Prístroje z tejto rady môžu mať prispôsobiteľné nastavenie kaziet a rozšírené testovacie menu, čo umožňuje výber parametrov na vyšetrenie. Vďaka tomu prístroj nákladovo efektívne šetrí a skracuje sa čas analýzy.

Merané analyty: pH, pCO₂ , pO₂ , Na⁺, K⁺, Cl⁻, glukóza, laktát, hematokrit, hemoglobín, nasýtenosť hemoglobínu, methemoglobín, rada ďalších parametrov sa dopočítava. [14,15]

Poloautomatický elektrolytový analyzátor

Analyzátor elektrolytov je rýchly a jednoduchý prístroj na analýzu elektrolytov. Je schopný analyzovať koncentráciu iónov v celej krvi, krvnej plazme, sére aj v moči.

Na vyšetrenie je potrebné veľmi malé množstvo materiálu (od 22 µl). Prístroj funguje na princípe potenciometrie. Biosenzorsenzor obsahuje tri páry ionoselektívnych elektród, na ktoré sa kvapne vzorka materiálu a vloží do prístroja. Prístroj automaticky vyhodnotí . Koncentrácia iónov vo vzorke sa vyhodnotí na základe rozdielu potencie medzi vzorkou a referenčným roztokom v rovnakom objeme. Výhodou tohto typu prístrojov je malá veľkosť a váha, pričom rýchlosť samotného merania je okolo 1-2 minút. [12]

3. KOMPARÁCIA PRÍSTROJOVEJ TECHNOLÓGIE

3.1. Komparácia prístrojov podľa metódy a presnosti merania

Hematologické analyzátory sú často založené na princípe prietokovej cytometrie. Bližší princíp fungovania hematologických analyzátorov je popísaný v podkapitole Automatické analyzátory.

Prístroje ADVIA Hematology system ktoré ponúka Siemens navyše využívajú peroxidázovú reakciu na cytochemickú diferenciáciu myeloidu a lymfoidných buniek, čo prispieva k presnosti diferenciácie a intracelulárne meranie hemoglobín u na špecifikáciu morfológie erytrocytov. Tieto analyzátory majú vysokú presnosť, poskytuje tiež sekundárny celkový počet leukocytov, čo má účinok ďalšej interenej kontroly na monitorovanie integrity vzorku. Minimálny objem krvi potrebný k vyšetreniu je 175 μ l.

Menšie hematologické systémy ako ADVIA 560 od Siemensu využívajú optickú a impedančnú metódu na diferenciáciu krvného obrazu a absorpčnú spektrofotometriu na analýzu koncentrácie hemoglobínu. Sú schopné merať 26 parametrov a päťpopulačnú diferenciáciu. Výsledky a priebežná kontrola kvality sú graficky a farebne vykresľované pomocou histogramov a scattegramov. Minimálny objem krvi na správnu aspiráciu je 110 μ l. Tieto prístroje majú v porovnaní s plne automatizovanými analyzátormi nižšiu precizitu.

Základné analyzátory využívané v biochemických laboratóriách pracujú na princípe fotometrického merania. Biochemický analyzátor Cobas 11c od Roche má ďalej dostupnú voliteľnú jednotku iónsektívnej elektródy na meranie elektrolytov. Kompaktnejšie stolové analyzátory ako Indiko Plus od firmy Thermo Fisher Scientific QY majú ISE jednotku zabudovanú. Systémy sa vyznačujú vysokou stabilitou kalibrácií.

V niektorých systémoch je možné merať biochemické parameter z plnej krvi a mozgomiešneho moku. U uvedených prístrojoch sú biologické vzorky vhodné na analýzy sérum, plazma a moč.

Na testy vykonávané priamo pri posteli pacienta sa využíva väčšinou plná krv alebo moč. Vďaka krátkemu času spracovania sa odber krvi môže vykonať bez potreby antikoagulačného činidla, ktorý môže v prípade niektorých testov interferovať až znehodnotiť vzorku.

Systémové rozdiely medzi laboratórnou analýzou, prenosnými a POC prístrojmi sú kontrolované špecializovanými pracovníkmi, ktorých úlohou je uistiť sa že rozdiely vo vyšetreniach nemôžu viesť k nesprávnej interpretácii výsledkov. Prenosné prístroje podliehajú požiadavkám presnosti merania a musia spĺňať rovnaké požiadavky ako centrálné laboratórne prístroje. Z pohľadu pacienta je to veľmi dôležitý aspekt, pretože tieto prístroje sú často používané v situáciách kedy nie je nedostatok času na laboratórne testovanie. A výsledky tak majú priami vplyv na rozhodovanie o ďalšom postupe lekára.

3.2. Komparácia prístrojov vzhľadom k časovej a finančnej náročnosti

Využitie automatických analyzátorov výrazne urýchľuje proces analýzy biologických materiálov. Rýchlosť vyšetrenia je 60-150 vzoriek za hodinu. Ekonomický benefit rýchlosti spracovania vzoriek analyzátorami je podmienený vyšším počtom vyšetrených pacientov za čas, čo urýchľuje diagnózu a následnú liečbu. Tým sa skraca aj celkový čas pobytu pacienta v nemocnici a jeho spokojnosť.

Automatické hematologické analyzátory v centrálnych laboratóriách sú schopné vyšetriť okolo 120 vzoriek za hodinu. Menšie hematologické analyzátory ako ADVIA 560 od Siemensu majú kapacitu okolo 60 vzoriek za hodinu. Centrálné plne automatizované biochemické analyzátory ako na obrázku č. 2 sú schopné vykonať až 2400 testov za hodinu, z toho 1800 testov za hodinu fotometricky a 600 testov pomocou ión-selektívnych elektród.



Obrázok 2 Biochemický analyzátor ADVIA Chemistry XPT [16]

V nemocniciach s moderným systémom doručovania výsledkov analýzy sú výsledky dostupné pre lekára veľmi rýchlo. V najmodernejších nemocniciach je požiadavka na test odoslaná online a výsledky sú dostupné v lekárskom systéme ihneď po uvoľnení.

Výsledky laboratórnej diagnostiky sú však v priemernej nemocnici dostupné do tridsiatich minút až dvoch hodín. Pri využití služieb súkromných laboratórií sa môže tento čas ďalej predlžovať. Pre lekára ktorý rozhoduje o nasledujúcom postupe liečby alebo potrebe zákroku nemusí byť tento čas dostatočný, preto je dôležitá prítomnosť POCT prístrojov, ktoré umožňujú testovanie priamo pri lôžku pacienta. Pri život ohrozujúcich situáciách majú okamžite dostupné výsledky testov priamy dopad na stav pacienta a rozhodnutia lekárov o ďalšom postupe. Pri spolupráci centrálnych laboratórií a prístrojov POCT môže dôjsť k

celkovému urýchleniu chodu nemocnice. Nevyhnutné úkony je možné vykonávať priamo pri posteli pacienta a tým sa nezaťažuje centrálny laboratórny systém vykonávajúci rutinné a špecializované vyšetrenia.

V ideálnej situácii sa výrobcovia usilujú o stále efektívnejšie metodické postupy a lacnejšie prístroje. Reagencie využívané prenosnými a POC prístrojmi sú často niekoľkonásobne drahšie ako cena analýzy v centrálnych laboratóriách. Použitie POC prístrojov navyše pridáva prácu ošetrovateľskému a lekárskeho personálu, prípadne je potrebné prijať nových pracovníkov pre obsluhu a kontrolu týchto prístrojov, čím sa zvyšujú ďalšie náklady. Niektoré vyšetrenia vykonané na POC systémoch je potrebné tiež spätne kontrolovať v centrálnych laboratóriách, tento postup sa nazýva paralelná diagnostika. [16,17,18]

3.3. Komparácia prístrojov na základe všeobecnej reliability a využitia v teréne

Automatické analyzátory sa vyznačujú vysokou presnosťou a reliabilitou. Táto vlastnosť je zapríčinená častými kontrolami kvality, presnými kalibráciami a prítomnosťou riadiacej a monitorovacej jednotky. Monitorovacia jednotka má za účelom detekciu hladiny a ochranu proti zaneseniu zaisťujúcu integritu výsledkov. Plne automatizované analyzátory sú tiež vybavené systémom automatického riadenia vzoriek, čím sa znižuje zásah personálu do procesu diagnostiky a tým aj chyba ľudského faktoru.

Stabilita reagentov na palube analyzátora je pre väčšinu 4-6 týždňov. Automatické systémy sa tiež vyznačujú vysokou stabilitou kalibrácií.

Laboratórne automatické analyzátory nie sú vhodné na použitie v teréne. Plne automatizované analyzátory majú váhu okolo 200 kg a sú často priamo napojené na nemocničné systémy. Nemajú externý zdroj energie a vyžadujú stály prívod deionizovanej vody potrebnej na premývanie a prípadné riadenie vzoriek. Menšie hematologické analyzátory majú váhu okolo 30 kg a väčšinou taktiež nie sú prispôsobené na fungovanie v exteriéry. Využívajú sa väčšinou v malých laboratóriách alebo ako záloha veľkých laboratórií.

Zjednodušením laboratórnych testov prichádzajú výhody testovania v priestoroch mimo nemocníc a ordinácie praktických lekárov. Základom terénnych prístrojov je malá veľkosť a jednoduchosť ovládania.

U biochemických analyzátoroch dochádza k stálemu zmenšovaniu a je dostupná veľká škála tzv. "vreckových" prenosných analyzátorov. Medzi najznámejšie vreckové analyzátory patria analyzátory na meranie a monitoring glykémie a analyzátory na vyhodnocovanie diagnostických prúžkov.

Spoločnosť Roche ponúka flexibilné prístroje určené na meranie niektorých z kľúčových parametrov. Napríklad prístroj Acutrend Plus je schopný merať celkový cholesterol, triglyceridy, glukózu a laktát použitím kapilárnej krvi. Na kalibráciu sa používa kalibračný prúžok. Množstvo krvi potrebnej na vyšetrenie je 10-50 µl a následné výsledky sú ukladané do pamäti. V pamäti môže byť uložených až sto rôznych meraní s dátumom a časom. [16,17,18]

4. BIOLOGICKÉ PARAMETRE SLEDOVANÉ PRI FYZICKOM VÝKONE

4.1. Metabolické parametre

Pri krátkodobej záťaži nastane výrazný odsun tekutiny z intravazálnych priestorov, čo sa prejaví úbytkom plazmatického objemu až o 16%. Znamená to zvýšenie hodnôt hematokritu, koncentrácie hemoglobínu a plazmatických bielkovín. Z iónov najvýraznejšie stúpa hladina K^+ , čo súvisí s glykolýzou a úbytkom glykogénu, pričom vzrast koncentrácie Na^+ v plazme je malý. Aby sa vyrovnal osmotický tlak medzi červenými krvinkami a krvou dochádza k presunu Cl^- do erytrocytov, namiesto uvoľňovaného bikarbonátu. Presuny iónov sa dejú hlavne medzi extracelulárnym a intracelulárnym priestorom, kvôli vyrovnaniu osmotických zmien. K výrazným stratám vody a iónov počas krátkodobej záťaže nedochádza. Zmenami distribúcie krvi počas záťaže sú výrazne ovplyvnené obličky. Prietok krvi obličkami je značne obmedzený. Po skončení maximálnej záťaže sa rýchlo obnovuje normálne prekrvenie obličiek a diuréza sa normalizuje. Toto obnovenie činnosti obličiek je veľmi dôležité pre rýchle vylúčenie katabolitov a úpravu vnútorného prostredia. Hladina K^+ v priebehu dlhodobej záťaže po počiatocnom náraste klesá, v súvislosti s fosforylačnými dejmi pri obnovovaní glykogénu už počas záťaže. K ďalšiemu poklesu iónov dochádza zvýšeným vylučovaním v moči a potom. Podstatné znížením diurézy je považovaný za výhodný kompenzačný mechanizmus za situácie, kedy organizmus stráca potením značné množstvo vody. Tento mechanizmus pomáha udržať množstvo cirkulujúcej krvi na prijateľnej úrovni. Zároveň s vodou sú zadržované i minerály, prednostne natrium a chloridy, pretože ich zásoba v organizme sa stráca potením. Takto môže dôjsť k značnej strate draslíku, čoho prejavom sú poruchy vodivosti a kontraktility myokardu, pokles svalovej sily, únava až zmätenosť. [19,20]

4.2. Parametre svalovej činnosti

Sval využíva ku krytiu energetickej spotreby iba energiu uvoľňujúcu sa pri chemických reakciách. Ide o štiepenie zložitejších organickým zlúčenín na zlúčeniny jednoduchšie, za súčasnej tvorby makroergických fosfátov. Makroergické fosfáty a substráty sú látky z ktorých tkanivá získavajú energiu pre svoju činnosť. Makroergické substráty vytvorené pri odbúravaní živín sú prijímané ADP, ktorý sa tým premieňa na ATP. Rozštiepením makroergických väzieb ATP dochádza k uvoľneniu chemickej energie a zároveň k jej transformácii na inú energiu. Podľa potreby prechádza makroergný fosfát z ATP na kreatín, alebo sa priamo využíva ako energia pre svalovú činnosť. Koncentrácia ATP v svaloch je pomerne vysoká a jeho obsah sa takmer nemení ani po dlhotrvajúcej svalovej práci. Je to spôsobené tým, že rozpadajúca sa ATP je okamžite obnovovaná z vytvoreného ADP a nového makroergického fosfátu, ktorý ADP prijíma od kreatinfosfátu, z glykolýzy alebo z oxidácie živín. Kreatinfosfát slúži v svalových bunkách ako dočasný zdroj ATP. Tvorí sa z ATP a kreatínu v nepracujúcom svale, v reakcii katalyzovanej kreatinkinázou. Veľmi ľahko sa štiepi na kreatín a makroergický fosfát, pričom malý podiel kreatínu sa mení na anhydrid

kreatinu označovaný ako kreatinín. Táto látka je stálou zložkou krvi a je vylučovaný obličkami. Množstvo kreatinínu vylúčeného močou závisí na veľkosti svalovej hmoty jedinca.



Pri poškodení svalu dochádza k prieniku intracelulárneho obsahu svalových vlákien do extracelulárnej tekutiny. Syndróm rozpadu priečne pruhovaného svalstva sa nazýva rhabdomyolýza. Najcitlivejším indikátorom svalového poškodenia je kreatínkináza. Rhabdomyolýzu rozdeľujeme na genetickú, idopatickú a získanú. Získanou príčinou rhabdomyolýzy môžu byť metabolické poruchy stavu organizme napríklad hypokaliémii alebo hyperosmolalita, tiež ischemia svalov a teplotné preťaženie. Pri všetkých príčinách rhabdomyolýzy dochádza k poškodeniu svalu a zlyhaniu energetického prísunu do vnútra svalovej bunky. Dochádza k zvýšeniu voľného intracelulárneho vápnika, čo vedie k aktivácii kalcium-dependetných proteáz, ktoré spôsobujú deštrukciu svalových proteínov. Dochádza k uvoľneniu intracelulárneho obsahu svalového vlákna, vyplavuje sa K^+ , urea, kreatinín, myoglobín a svalové enzýmy ako kreatínkináza (CK), laktátdehydrogenáza (LD) a aminotransferázy. [21,22,23,24]

4.3. Krvný obraz počas záťažovej činnosti

Pri telesnej práci nastávajú v krvi rôzne zmeny. Počet červených krviniek sa počas záťaže výrazne nemení. Priebeh zmien u erytrocytov je zložitý. V prvej polovici výkonu počet rastie, dochádza k vyplaveniu erytrocytov z krvných zásobární. Podnetom k vyplaveniu je predovšetkým nedostatok kyslíka, ktorý vyvoláva reflexné humorálne zmeny. Vyplavuje sa viac katecholamínov z drene nadobličiek, čo stimuluje vyplavovanie aj menej zrelých erytrocytov z kostnej drene. Tomu svedčí zvýšenie počtu retikulocytov cca o 0, 7%. Po dosiahnutí maxima rozmnoženia erytrocytov sa toto zvýšenie udržiava alebo sa môže znižovať v ďalšom priebehu výkonu. Pri intenzívnej dlhodobej práci je možné zníženie aj na hodnoty nižšie ako predzáťažová hodnota. K návratu k pôvodným hodnotám dochádza 0,5-2 h po ukončení záťaže. Tieto zmeny sa pohybujú paralelne so zmenami koncentrácie krvnej plazmy a majú povahu relatívnych zmien.

Celkový počet bielych krviniek pri telesnej práci stúpa. Pracovná leukocytóza je závislá na intenzite konanej práce. Dochádza k zvýšeniu na hodnoty 12-20. 10^9 /l, pri veľmi intenzívnej a vyčerpávajúcej záťaži môže dôjsť až k zvýšeniu cez 30. 10^9 krviniek v litri krvi. Vplyvom podnetov na začiatku práce, dochádza k rýchlemu vyplaveniu bielych krviniek zo sleziny, lymfatických uzlín a ďalších retikuloendoteliálnych tkanív. Ďalším podnetom na vyplavenie leukocytov sú chemické látky vzniknuté priamo pri činnosti svalov. Zmeny počtu bielych krviniek súvisia bezprostredne s prácou svalov, teda hovoríme o myogénnej reakcii. Metabolity kyslej povahy pôsobia vo vyšších koncentráciách toxicky a vyvolávajú rovnakú odpoveď imunitného systému ako intoxikácie a infekcie. Preto zmena počtu leukocytov pretrváva po dobu vyplavovania a oxidácie metabolitov. Počas leukocytózy dochádza aj k zmenám v počtu jednotlivých druhov leukocytov. U psychického vzrušenia pri štartovnom stave dochádza k dráždeniu sympatoadrenálnej sústavy, čo podmieňuje vyplavenie lymfocytov a tým stúpa ich absolútny počet. V priebehu záťaže zvolna stúpa počet

neutrofilných leukocytov spolu s mladými granulocytmi, pretože dochádza k ich vyplaveniu z krvotvorných orgánov. Stúpa absolútny aj relatívny počet, a tak ich podiel môže dosiahnuť 80-95% z celkového počtu bielych krviniek. U vytrvalostných výkonoch strednej intenzity dochádza k poklesu počtu eozinofilných leukocytov v krvnom obeh v súvislosti s vzostupom kortikoidov v krvi činnosťou nadobličiek. Pri krajne vyčerpávajúcich výkonoch je zisťovaná absolútna a relatívna neutrofília a lymfopénia. [25]

5. ANALÝZA DÁT ŠPORTOVCOV

5.1. Popis dát

Dáta použité v tejto práci sa skladajú z reálnych laboratórnych výsledkov 47 športovcov zo závodu MUM z roku 2015 a 2016. Rozloženie dát je 37 mužov a 10 žien. Vzorky boli odobraté športovcom priebežne počas závodu po prvej, štvrtej a siedmej etape. Následne boli vzorky spracované v laboratóriu. Parametre merané vo vzorkách krvi a moči športovcov sú uvedené aj s referenčnými hodnotami v prílohe A. Laboratórne výsledky nie sú úplne, pretože v niektorých vzorkách došlo k vzniku zrazeniny a následne nemohli byť spracované. Z dôvodu dostatočného množstva dát pre potreby štatistickej analýzy a následnej predikcie boli dáta z troch etáp rozdelené, pričom každá etapa je považovaná za jednotlivý závod. Týmto spôsobom bolo získaných 127 samostatných výsledkov, celkovo 102 mužov a 25 žien.

Obdržané dáta obsahujú v niektorých laboratórnych výsledkoch chýbajúce parametre a extrémne hodnoty spôsobené chybou v meraniach, ktoré nemohli byť zopakované. Preto sú dáta pred analýzou predzpracované metódou zhlukovania.

5.2. Predspracovanie dát

Pred začiatkom analýzy a programového spracovania dát bolo potrebné dáta predspracovať. Korelačnú analýzu môžu ovplyvniť odľahlé hodnoty, ktoré spôsobia, že koreláciu nájdeme aj medzi dátami, medzi ktorými v skutočnosti žiadny vst'ah nie je. Môžu tiež spôsobiť, že korelácia bude menej významná alebo až nevýznamná u dát, ktoré sú závislé.

Základom predspracovania dát je potreba odstrániť odľahlé hodnoty vzniknuté anomáliami, ktoré by mohli ovplyvňovať výsledky analýzy. Dôležitým prvkom predspracovania bolo rozdelenie dát do podmnožín na základe pohlavia a etapy závodu. Dáta sa rozdelujú do podmnožín s čo najprezentatívnejšou povahou, aby bola korekcia odlahlých hodnôt čo najlepšia.

Predspracovanie dát prebehlo v prostredí matlab. V prvom kroku sa rozdelili dáta do podmnožín. Následne prebiehala analýza hodnôt samostatných parametrov, kde prebehla detekcia odlahlých hodnôt. Ako odľahlé hodnoty boli definované tie, ktorých hodnota bola vyššia než medián absolútnej výchyľky, počítaný ako medián absolútnej odchylky od mediánu celej množiny.

$$MAD = \text{medián}(|A_i - \text{medián}(A)|)$$

Premenná A je množina dát, kde A_i predstavuje jednotlivý prvok množiny. Medián je stredná hodnota množiny čísel alebo znakov, po usporiadaní všetkých prvkov z danej množiny. Určuje strednú hodnotu, od ktorej 50% dát leží nižšie a 50% dát vyššie.

Odhalené odlahlé hodnoty určitého parametru boli opravené na priemernú hodnotu daného parametru vrámci určenej skupiny. [26,27]

5.3. Štatistická analýza dát

5.3.1. Test normality

Normálne rozdelenie

Normálne rozdelenie je najznámejší model rozdelenia spojitej náhodnej veličiny používaný v technickej praxi. Má podstatný význam v teórii pravdepodobnosti a štatistiky, známa tiež ako Gaussova krivka. Normálne rozdelená náhodná veličina vzniká zložením väčšieho počtu náhodných zložiek, vplyvov a veličín, ktoré sú navzájom nezávislé.

Náhodná premenná X má normálne rozdelenie s parametrami strednej hodnoty μ a rozptylu σ^2 práve vtedy, ak jej funkcia hustoty má tvar:

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} \cdot e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad ; \quad X \sim N(\mu, \sigma^2)$$

Parametrické testy je možné vo väčšine prípadov použiť len vtedy, ak je splnený predpoklad o normálnom rozdelení základného súboru. Pre overenie normality existuje rad testov a grafických metód.

Shapiro-Wilkov test

Shapiro-Wilkov test sa používa na testovanie normality. Testovaná hypotéza H_0 hovorí, že náhodný výber pochádza z normálneho rozdelenia dát. Testuje sa teda nulová hypotéza H_0 značiaca, že empirické a normálne pravdepodobnostné rozdelenie sa štatisticky preukázateľne nelíšia oproti alternatívnej hypotéze, že sa líšia. Nulovú hypotézu H_0 o normálnom rozdelení základného súboru zamietame alebo prijímame na hladine významnosti α , spôsobom porovnania p-hodnoty s α . Ak je p-hodnota $\leq \alpha$, tak H_0 zamietame na hladine významnosti α a prijímame alternatívnu hypotézu.

5.3.2. Korelačná analýza

Korelácia je miera závislosti medzi dvoma alebo viacerými premennými. Štatistická závislosť dvoch náhodných premenných vyjadruje vzťah medzi zložkami m -rozmerného náhodného vektoru. Intenzita týchto vzťahov sa určuje korelačným koeficientom. Korelačný koeficient meria silu štatistickej závislosti medzi dvoma intervalovými premennými.

Pearsonov korelačný koeficient

Predpokladom na použitie metódy Pearsonovho korelačného koeficientu je normalita dát. Premenné musia byť spojité. Korelačný koeficient nezávisí od mierky, v ktorej boli premenné merané. Korelácia je vysoká, ak sa dá meranými bodmi v rovine metódou najmenších štvorcov preložiť regresnou priamkou. Korelačný koeficient r reprezentuje lineárnu závislosť medzi dvomi premennými. Ak r umocníme, získame koeficient determinácie, ktorý reprezentuje proporciu spoločného rozptylu, teda na koľko percent zmena jednej premennej ovplyvní druhú. Je to informácia o sile relácie medzi premennými a má prinajmenšom taký význam ako informácia o významnosti korelácie. Pearsonov korelačný koeficient je značne

ovplyvnený extrémnymi hodnotami. Extrémne hodnoty majú za následok nárast korelačného koeficientu, ale aj pokles akceptovateľnej korelácie. [28,29,30]

$$r = \frac{\overline{x \cdot y} - \bar{x} \cdot \bar{y}}{\sqrt{x^2 - (\bar{x})^2} \cdot \sqrt{y^2 - (\bar{y})^2}}$$

Pearsonov výberový korelačný koeficient $r_{x,y}$ meria tesnosť lineárnej závislosti medzi premennými X a Y, pričom \bar{x} a \bar{y} sú ich výberové priemery.

Spearmanov korelačný koeficient

Pre hodnotenie štatistickej závislosti náhodných premenných, ktoré nemajú normálne rozdelenie, Pearsonov korelačný koeficient nie je možné použiť. V týchto prípadoch sa používa Spearmanov korelačný koeficient alebo Kendallov korelačný koeficient. Tieto koeficienty umožňujú korelačnú analýzu dát ktoré nemajú nutne lineárny charakter. Spearmanov korelačný koeficient je založený na podobnosti poradia medzi znakmi. Test je vhodný pri veľkom množstve dát. Koeficient môže dosahovať hodnoty od -1 do 1.

Spearmanov korelačný koeficient je definovaný vzťahom:

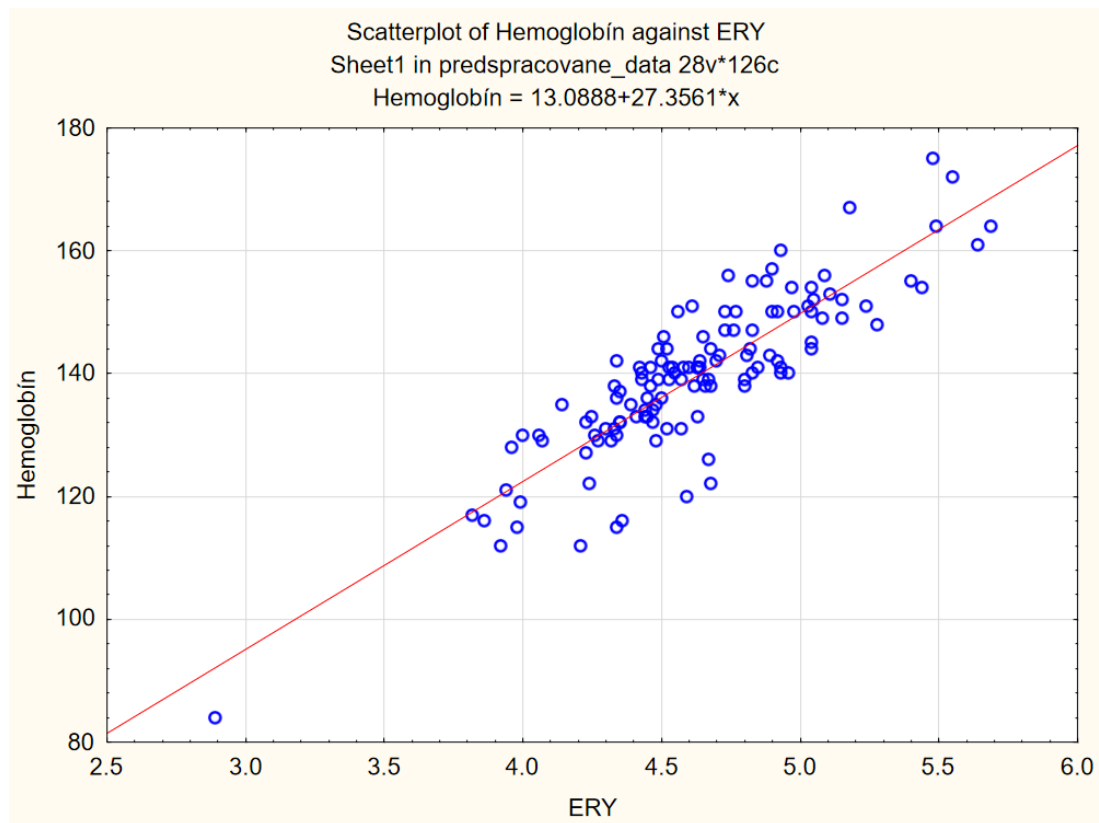
$$R = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

kde d_i sú rozdiely poradia a n je rozsah výberu. [26,27,28]

Výsledky korelačnej analýzy

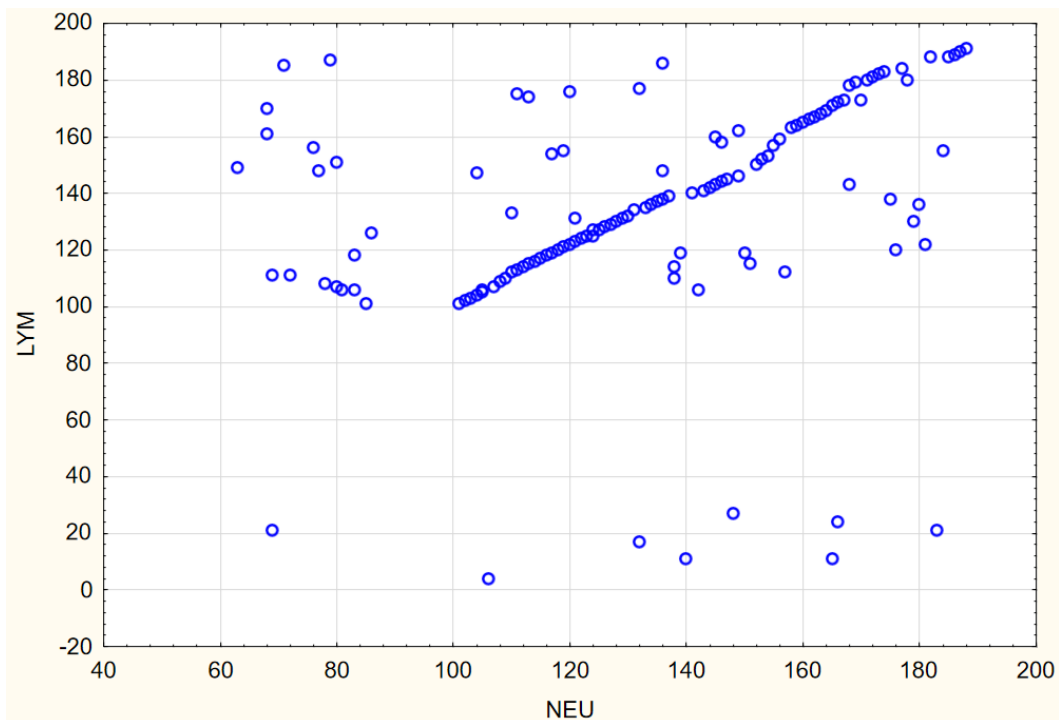
Výsledkom testovania normality dát Shapiro-Wilkovým testom bola hodnota p nižšia ako 5% takmer u všetkých skúmaných parametroch. Nulová hypotéza H_0 bola zamietnutá a na následnú analýzu dát tak bol použitý neparametrický test Spearmanovho korelačného koeficientu. Kompletná tabuľka Spearmanovej korelačnej analýzy je umiestnená v PRÍLOHE B.

Na analýzu bolo použitých 126 laboratórnych výsledkov bežcov po závode, ktoré boli vopred predpracované na odstránenie odlahlých hodnôt. Najvyššia miera korelácie bola zistená na erytrocytarnej rade so súvisiacim hematokritom a hemoglobínom. Táto závislosť hematokritu na koncentrácii erytrocytov bola očakávateľná, vzhľadom k povahe hemoglobínu a výpočtu hematokritu. Táto závislosť je natoľko vysoká, že tieto parametre boli zvolené ako vhodné na predikčné využitie v kapitole 6.



Obrázok 3 Graf závislosti hemoglobínu a erytrocytov

Parametre, ktoré javili normálne rozloženie boli otestované pomocou Pearsonovho korelačného koeficientu. Vysoká miera kovariancie bola zistená medzi neutrofilnými granulocytmi a lymfocytmi. Táto lineárna závislosť je zaujímavá vzhľadom k zistenej nepriamej úmere medzi týmito parametrami. To znamená že pri raste počtu neutrofilných granulocytov je možné takmer s určitosťou predpokladať pokles počtu lymfocytov. Vzorky biologického materiálu boli odobraté športovcom s malým časovým úsekom od konca závodu alebo etapy. To vysvetľuje výraznú neutrofíliu spôsobenú mobilizáciou leukocytov počas telesnej aktivity. Na začiatku zotavovania po závode dochádza k rapidnej redukcii počtu lymfocytov v krvi, sprevádzanú predĺženou neutrofíliou. Táto závislosť je zobrazená na obrázku č. 4.



Obrázok 4 Graf korelácie neutrofilov a lymfocytov

Variable	MCHC	NEU	LYM	LYM_abs	MON
MCHC	1.000000	0.045439	-0.032380	0.049507	-0.030900
NEU	0.045439	1.000000	-0.966850	-0.757860	-0.477117
LYM	-0.032380	-0.966850	1.000000	0.733250	0.260032
LYM_abs	0.049507	-0.757860	0.733250	1.000000	0.391145
MON	-0.030900	-0.477117	0.260032	0.391145	1.000000

Tabuľka 3 Výsledok analýzy Pearsonovho korelačného koeficientu

Prepojenie leukocytárnej rady buniek bolo ďalej štatisticky dokázané aj podľa Spearmanovho korelačného koeficientu, ktorý je vidieť v tabuľke č.4.

Variable	NEU	NEU_abs	LYM	LYM_abs	EO	EO_abs	BAZ	BAZ_abs
NEU	1.000000	0.692949	-0.963314	-0.771915	-0.772362	-0.709549	-0.510035	-0.293702
NEU_abs	0.692949	1.000000	-0.745762	-0.169733	-0.554242	-0.360354	-0.372441	0.041237
LYM	-0.963314	-0.745762	1.000000	0.749123	0.711971	0.622848	0.490969	0.239747
LYM_abs	-0.771915	-0.169733	0.749123	1.000000	0.563130	0.633148	0.421240	0.455570
EO	-0.772362	-0.554242	0.711971	0.563130	1.000000	0.965407	0.440699	0.256718
EO_abs	-0.709549	-0.360354	0.622848	0.633148	0.965407	1.000000	0.413420	0.330608
BAZ	-0.510035	-0.372441	0.490969	0.421240	0.440699	0.413420	1.000000	0.880851
BAZ_abs	-0.293702	0.041237	0.239747	0.455570	0.256718	0.330608	0.880851	1.000000

Tabuľka 4 Spearmanov korelačný koeficient pre leukocytárny diferenciál

6. PROGRAMOVÉ RIEŠENIE PREDIKCIE

Na predikciu bola využitá umelá neurónová sieť, ktorá sa na základe vstupných dát zo známymi výstupmi dokáže tzv. učiť. Pri procese učenia dochádza k nastavovaniu váh a prahov, čo sú koeficienty reprezentujúce vzťah medzi vstupnými a výstupnými premennými.

Program je písaný využitím Neural Network toolboxu v programovacom prostredí matlab. Tento toolbox umožňuje vytváranie, úpravu a trénovanie umelých neurónových sietí pomocou zabudovaných funkcií, čím zjednodušuje programové riešenie úlohy.

Na predikciu boli zvolené erytrocyty, pretože javili najväčšiu mieru korelácie s dostupnými hematologickými a biochemickými parametrami. Ako vstupné parametre predikcie sú zvolené hemoglobín a hematokrit. Ich funkcia a biologická súvislosť s erytrocytmi pri športovom výkone je popísaná v kapitole 4.

6.1. Architektúra umelej neuróvej siete

Dôležitým problémom pri riešení programovej úlohy pomocou neurónových sietí je návrh vhodnej architektúry. Na túto úlohu bola využitá viacvrstvová dopredná sieť so spätným šírením chyby s trénovaciu funkciou Levenberg-Marquardt. Sieť sa chová ako aproximátor, ktorý adaptuje vlastný vnútorný model podľa vstupných informácií.

Neuróny v sieti sú usporiadané do niekoľkých vrstiev. Celková architektúra siete je zložená zo vstupnej, skrytej a výstupnej vrstvy. Počet neurónov na vstupnej a výstupnej vrstve je prispôbený počtu vstupov a výstupov trénovacej množiny dát. Na výpočet výstupu poslednej vrstvy bola zvolená lineárna aktivačná funkcia, ktorá sa často využíva v poslednej vrstve neurónovej siete, pretože dáva lineárny vzťah medzi vstupnými výstupnými hodnotami vrstvy.

$$f(\alpha) = \alpha$$

Na vstupnej vrstve má sieť tansigmoidálnu aktivačnú funkciu tiež nazývanú ako hyperbolický tangent. Výstupom tejto funkcie je číslo v intervale $f(\alpha) \in \langle -1, 1 \rangle$.

$$f(\alpha) = \frac{1}{1 + e^{-\frac{\alpha}{T}}}$$

Počet neurónov na skrytej vrstve ovplyvňuje adaptačný proces neurónovej siete. Podľa predpokladu s rastom počtu neurónov v skrytých vrstvách sa táto schopnosť bude zlepšovať. Táto úmera ale neplatí úplne, keďže od určitého počtu neurónov v skrytých vrstvách sa predikčná schopnosť neurónovej siete bude zhoršovať, čo je nežiaduci efekt. Experimentálne boli zvolené dve skryté vstvy s počtom neurónov desať v prvej skrytej vrstve, a s piatimi neurónmi na druhej skrytej vrstve. Aktivačné funkcie skrytých vrstiev sú taktiež tansigmoidálne. Každý neurón v skrytej vrstve počíta výstup podľa aktivačnej funkcie a následne ho pošle na vstup každého neurónu nasledujúcej vrstvy.[29,30,31]

6.2. Učenie umelej neurónovej siete

Na tréovanie neurónovej siete bolo použitých 100 dát, ktoré boli predspracované pomocou prostredia matlab, čím boli upravené extrémne hodnoty. V ďalšom kroku boli dáta vstupujúce do neurónovej siete normalizované. Na normalizáciu bola použitá lineárna transformácia dát tiež nazývaná ako min-max normalizácia na interвал <0,1>. Transformácia dát do intervalu <0,1> prebieha podľa nasledujúcej rovnice:

$$x'_i = \frac{x_i - \min(x)}{\max(x) - \min(x)}$$

kde $\min(x)$ a $\max(x)$ udávajú hodnotu najmenšieho a najväčšieho prvku v normalizovanej množine x a x_i reprezentuje transformovaný prvok množiny. Normalizácia bola aplikovaná na každý vstupný parameter samostatne. K zkesleniu normalizovaných dát môže dojsť v dôsledku prítomnosti anomálií v skúmaných dátach, ktoré sa objavujú ako extrémny, preto je vhodné dáta predzpracovať a odstrániť extrémne hodnoty.

Pred samotným procesom tréovania neurónovej siete je potrebné dáta rozdeliť. Delenie prebieha do dvoch skupín, na tréovacie a testovacie dáta. Toto delenie je dôležité z pohľadu možnosti nezávislého testovania natréovanej neurónovej siete. Tréovacia množina dát obsahuje väčšiu časť dát, v tomto prípade 80%. Táto množina tréovacích dát sa pri tréovaní ďalej rozdelí na podmnožiny tréovacích, validačných a testovacích dát. Samotné tréovanie siete prebiehalo pomocou tzv. učenia s učiteľom. Čo znamená, že počas tréovania sieť pozná predpokladané výstupy a porovnáva ich s aktuálnymi výstupmi. Podľa rozdielu medzi aktuálnymi a očakávanými výsledkami dochádza k prenasťavovaniu prahu a váh, za cieľom zníženia rozdielu medzi nimi.

Na dopredné viacvrstvé perceptróny je možné aplikovať metódu učenia pomocou spätného šírenia chyby (anglicky back propagation). Táto metóda umožňuje adaptáciu váhových koeficientov neurónov zo skrytej vrstvy. Princípom je predstava že chyba vo vrstve k sa spätne rozdelí medzi neuróny vrstvy $k-1$. Preto po prvotnom výpočte aktuálnych výstupov dochádza k výpočtu odchýlok na neurónov od požadovaného výstupu proti smeru šírenia informácie v neurónovej sieti. Následne sa znovu adaptujú váhy a prah všetky neurónov.

Na tréovanie siete bola použitá tréovacia funkcia Levenberg-Marquardt. Táto metóda funguje dobre pre aproximačné problémy a preto sa často využíva na predikciu. Je to najrýchlejšia metóda na tréovanie priemerne veľkých dopredných sietí a v prostredí Matlab je dobre použiteľná. Výhodou tejto metódy je veľmi presné tréovanie s malou strednou kvadratickou chybou (MSE). Nevýhodou tejto metódy je potreba veľkej pamäte úložiska a zníženie presnosti pri veľkom počte váh. Táto funkcia môže byť využitá pre všetky siete, ktorých váhy, vstupy a aktivačné funkcie majú derivačnú funkciu.[29,30,31,32]

Nastavenia parametrov učenia

Počiatočný stav inetrných koeficientov váh a prahu bol iniciovaný náhodne. Při nastavovaní parametrov siete boli využité defaultné nastavenia siete, v prípade počtu epoch, maximálneho počtu chýb validácie a mu boli tieto hodnoty zvolené experimentálne.

```
net.trainParam.epochs=500;      % maximálny počet epoch učenia
net.trainParam.goal=1.00e-5;    % cieľ učenia
net.trainParam.max_fail=15;     % maximálny počet chýb validácie
net.trainParam.min_grad=1e-7;   % minimálny gradient učenia
net.trainParam.mu=0.9;          % inicialne nastavenie mu
net.trainParam.mu_dec=0.1;      % faktor pokles mu
net.trainParam.mu_inc=10;       % faktor rastu mu
net.trainParam.mu_max=1e10;     % maximálne mu
net.trainParam.time=inf;        % čas tréovania
```

Obrázok 5 Nastavenie parametrov učenia

Parametre μ , μ_{dec} , μ_{inc} , μ_{max} súvisia s parametrom η vystupujúci v Levenberg Marquardtovej rovnici na výpočet zmeny hodnoty váh biasov.

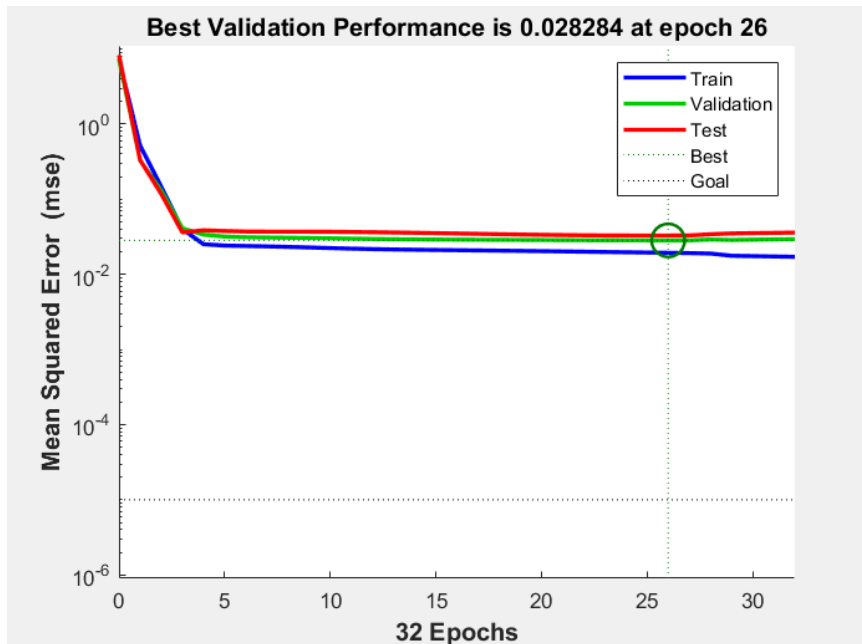
Proces učenia, teda tréovania siete končí ak je dosiahnutý maximálny počet epoch, minimálna hodnota gradientu, ak chyba validácie alebo mu dosiahne maximálnu hodnotu alebo je dosiahnutý cieľ. K ukončenie procesu učenia môže dôjsť aj na základe prekročenia nastaveného času, táto hodnota sa ale väčšinou nastavuje na nekonečno.

Výsledky učenia neurónovej siete

Počas učenia siete dochádza k znižovaniu strednej kvadratickej chyby, čo je možné vidieť aj v grafe na obrázku č. Stredná kvadratická chyba, označovaná skratkou MSE (anglicky Mean Squared Error), je chyba na výstupe siete. Počíta sa ako:

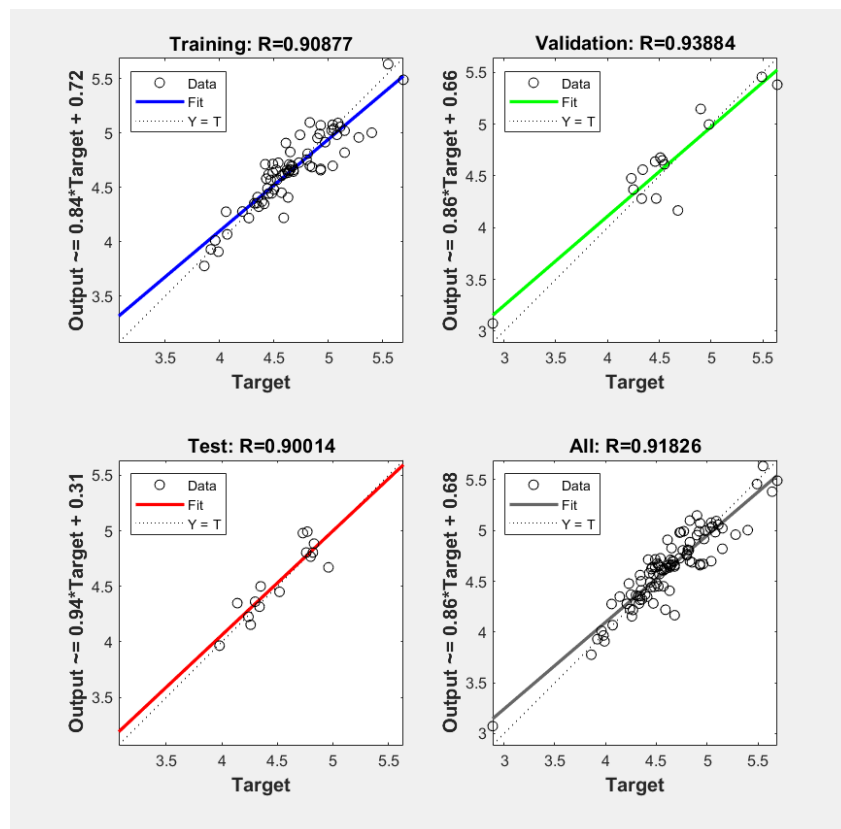
$$MSE = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M (d_i - y_i)^2$$

Kde M je počet objektov v množine x, d je požadovaný výstup a y je reálny výstup.



Obrázok 6 Graf procesu učenia

Pri učení siete dochádza k aproximácii funkcie neurónovou sieťou a následnej predikcie na základe tejto aproximácie. Na obrázku č.7 je možné pozorovať regresiu v príbehu učenia. Na obrázku č. 7 sa nachádzajú 4 grafy, ktoré zobrazujú regresiu tréningovania, testovania a validácie.



Obrázok 7 Graf regresnej analýzy

6.3. Testovanie umelej neurónovej siete

Pri testovaní modelu bola využitá množina nových, nezávislých testovacích dát, ktoré neboli použité na učenie modelu. Tým sa zistila všeobecná generalizačná schopnosť modelu, teda jeho schopnosť správne reagovať na nové vstupné dáta. Počet testovacích dát bol 25.

Ako základná hodnota úspešnosti testovania siete je výpočet chyby siete. Chyba siete sa počíta na základe očakávaných a reálnych výsledkov siete.

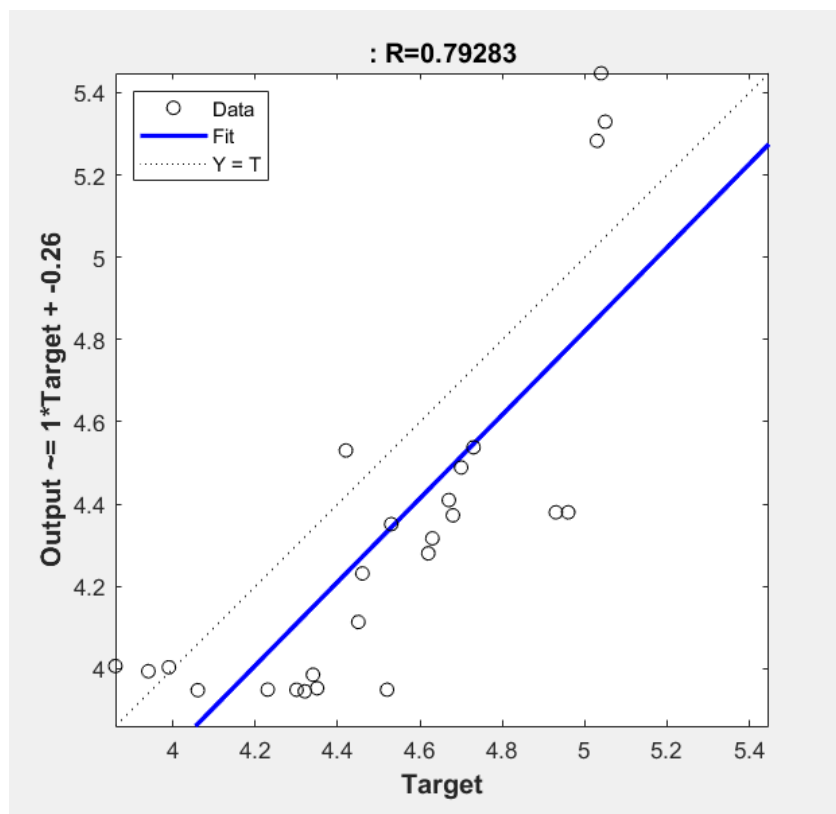
```
>> perf=perform(trained_net,net_output,output_test)

perf =

    0.0812
```

Obrázok 8 Výpočet chyby siete

Chyba siete 0,1043 môže byť z pohľadu medicínskeho využitia výrazná. Referenčné hodnoty erytrocytov sú $4,0-5,8 \cdot 10^{12}/l$. Údaje erytrocytov vstupujúce do siete boli udané v tomto merítke, čiže skutočnú chybu v počte erytrocytov je potrebné počítať tiež s úpravou $\cdot 10^{12}/l$. Regresia testovacích dát je zobrazená na obrázku č. 9.



Obrázok 9 Regresná analýza testovania siete

7. DISKUSIA

Závislosť erytrocytov hemoglobínu a hematokritu nie je otázna. Vyplýva to aj z ich funkcie a uloženia. Hematokrit je počítaná hodnota pomeru erytrocytov ku krvnej plazme, zatiaľ čo hemoglobín je hlavnou zložkou erytrocytov. Tieto parametre sa za laboratórnych podmienok merajú súčasne a preto nie je potrebná ich vzájomná predikcia. Erytrocyty ako predikovaný parameter som zvolila pre terénne podmienky. V terénnych podmienkach je diagnostika krvného obrazu stále náročná a prenosné analyzátory krvného obrazu nie sú dostupné v takom množstve a technických riešeníach ako biochemické analyzátory. Ich miniaturizácia je technicky náročná a je pre správnu funkciu analyzátora je potrebné splniť množstvom požiadavkou, konkrétne požiadavky sú popísané v kapitole 3.3.

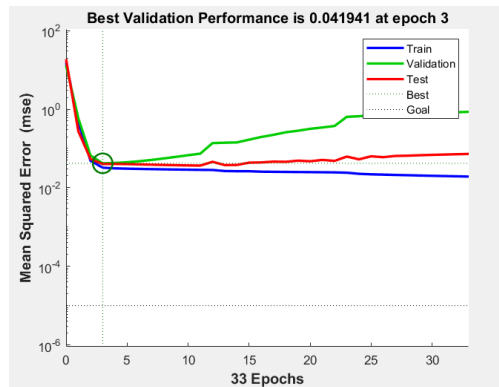
Hemoglobín, ktorý tvorí vstupný parameter v algoritme predikcie je často meraný súčasne s krvnými plynmi v analyzátoroch krvných plynov. Tiež existuje množstvo tzv. vreckových analyzátorov špeciálne na meranie hemoglobínu a neustále prebieha vývoj týchto prístrojov.

Erytrocyty sa v terénnych podmienkach, ak nie sú dostupné prenosné analyzátory, počítajú mikroskopicky, čo je namáhavé pre obsluhujúci personál a výsledky môžu byť výrazne ovplyvnené faktorom ľudskej chyby. Z týchto dôvodov by mohla byť predikcia erytrocytov prínosná pri terénnych podmienkach. Predikcia však môže prebiehať aj opačne.

Štatisticky významná závislosť bola zistená aj pri parametroch diferenciálneho krvného obrazu. Konkrétne ide o závislosť lymfocytov, neutrofilných granulocytov, eozinofilných granulocytov, bazofilných granulocytov a ich absolútnych hodnôt. Tieto parametre sa rovnako ako erytrocyty diagnostikujú v terénnych podmienkach veľmi namáhavo. Na predikciu som ich však nezvolila z toho dôvodu, že niele nich meranie, ale aj manuálne mikroskopické počítanie týchto parametrov prebieha súčasne. Ak by však ich predikcia bola potrebná je možné ich predikovať použitím algoritmu na predikciu erytrocytov po prevedení jednoduchých zmien.

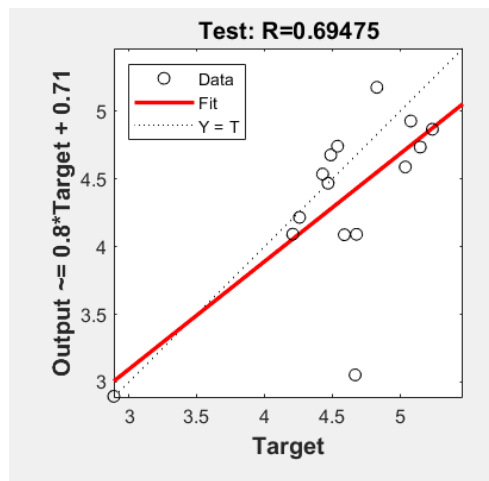
Použitie nastavenie siete nie je plne optimálne a zmenou parametrov umelej neurónovej siete je možné meniť úspešnosť predikcie. Pri tvorbe siete boli po rešerži v literatúre a experimentálnom vyhodnotení rôznych nastavení siete vybrané tie, ktoré generovali najlepší výsledok.

Počas nastavovania siete boli vyskúšané rôzne nastavenia parametrov siete. Najvýraznejšiu zmenu bolo vidieť pri zmene počtu neurónov na skrytých vrstvách. Podľa očakávania mala úspešnosť predikcie priamo úmerne rásť s počtom neurónov na skrytých vrstvách, avšak už pri počte 20 neurónov sa prejavoval jav zvaný overfitting, ktorý je možné vidieť na obrázku č. 10.



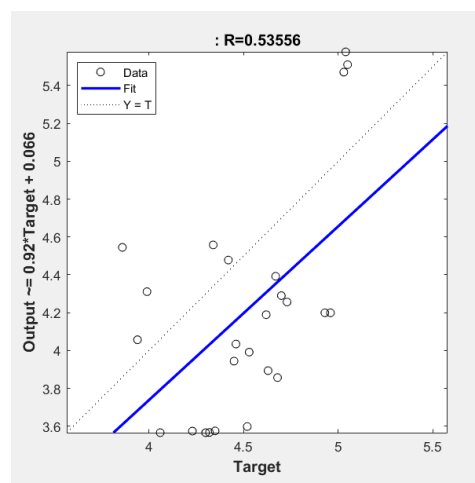
Obrázok 10 Trénovanie siete pri nastavení počtu neurónov: 20

Pri zmene nastavenia mu na vyššiu hodnotu dochádza počas procesu testovania k zníženiu úspešnosti testovania. V odbornej literatúre je táto hodnota odporúčaná v rozmedzí 0,8-1.



Obrázok 11 Regresia testovania pri nastavení $\mu=1$

Zmenou maximálnej chyby validácie, dopadol testovací proces rovnako, ale vo fáze testovania sa chyba predikcie zvýšila. Táto skutočnosť vyjadruje zníženie generalizačnej schopnosti siete. Výsledok zmeny maximálnej chyby validácie z 15 na 30 je zobrazený na obrázku č.12.



Obrázok 12 Regresia testovania pri nastavení $\text{max_fail}=30$

8. ZÁVER

Hemalologické a biochemické parametre sú merané jednak v nemocničnom prostredí v centrálnych laboratóriách, ale v množstve prípadov je nutné tieto parametre merať aj mimo tieto zariadenia, napríklad v súkromných ambulanciách a V urgentných situáciách nie je dostatok času na prevoz vzoriek do laboratórií a sú potrebné okamžité výsledky.

Práca sa zaoberá v prvých kapitolách práve týmito prístrojmi, ktoré sa využívajú na analýzu biologických vzoriek mimo laboratórií, porovnáva ich s laboratórnymi analyzátormi z rôznych ohľadov a určuje parametre, ktoré sú u nich vyžadované a musia byť dodržané.

Hlavnou úlohou práce bol vývoj algoritmu v prostredí matlab, schopný predikovať biologický parameter na základe korelovaných parametrov. Pred vytvorením algoritmu bolo potrebné dáta dostatočne predspracovať aby sa vyhlo prípadnému skresleniu výsledkov práce. Parametre vhodné na predikciu a ich vzťahy boli zistené štatistickou analýzou dát pomocou testov základných korelačných koeficientov.

Samotné programové riešenie predikcie prebieha v prostredí matlab využitím Neural network Toolboxu. Ako vhodný parameter na predikciu boli zvolené červené krvinky, ktoré javili najvyššiu mieru korelácie práve s hemoglobínom, ktorý je často meraný v teréne. Výsledky testovania algoritmu dopadli pomerne dobre a program je schopný predikovať hodnoty erytrocytov s 95% pravdepodobnosťou.

Výsledky predikcie sú vhodné pre približné stanovenie v praxi, kedy nie je potrebná vysoká presnosť. Chyba predikcie je natoľko malá, že by nemala ovplyvniť popis a diagnózu pacientovho stavu, alebo stavu športovcov po závode. Vhodným nastavením umelej neurónovej siete a rozšírením množiny dát je možné túto chybu ďalej minimalizovať. V ďalšom postupe by bolo prínosné doplniť ďalšie biochemické a hematologické parametre, čím by sa mohla rozšíriť množina predikovaných dát a zvýšiť úspešnosť predikcie.

LITERATÚRA

- [1] Accu-Chek® Inform II testovací proužky. *Roche Diagnostics.cz* [online]. [cit. 2020-01-02]. Dostupné z: <https://www.roche-diagnostics.cz/home/produkty.html>
- [2] Elektroanalytická chémia. *E-Analytická chémia*. Ústav analytickej chémie STU, 2006, 87.
- [3] PECKA, Miroslav a Milan BLÁHA. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art, 2010. ISBN 978-80-903871-9-5.
- [4] ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. Učebnice pro lékařské fakulty. ISBN 978-80-7262-372-3.
- [5] PLECENIK, Andrej. *Moderná mikroskopia a digitálne spracovanie obrazu: Skripta*. 2008. ISBN 978-80-89186-37-2.
- [6] MORNSTEIN, Vojtěch. *Lékařská fyzika a biofyzika*. Brno: Masarykova univerzita, 2018. ISBN 978-80-210-8984-6.
- [7] CHMELAŘ, Milan. *Lékařská laboratorní technika*. Brno: Vysoké učení technické, 2000. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-214-1770-6.
- [8] Refraktometre. *INTERTEC* [online]. [cit. 2020-05-30]. Dostupné z: <https://www.intertec.sk/analyticke-pristroje/refraktometre/>
- [9] PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [10] B.LUPPA, Peter a Ralf JUNKER, ed. *Point-of-Care Testing*. Nemecko: Springer, 440 s. DOI: 10.1007. ISBN 978-3-662-54497-6.
- [11] Existing and Emerging Technologies for Point-of-Care Testing. *Clin Biochem Rev.* [online]. 2014Aug, , 35(3) [cit. 2019-11-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25336761?report=docsum>
- [12] POCT - Point-of Care testing. *MEDISTA* [online]. [cit. 2019-12-05]. Dostupné z: <http://www.medista.cz/poct-point-of-care-testing/>
- [13] Automated analyzer for clinical chemistry SPOTCHEM EZ SP-4430. *ARKRAY* [online]. [cit. 2019-12-05]. Dostupné z: http://www.arkray.asia/english/products/patient_testing/clinical/sp-4430.html
- [14] *Werfen: Diagnostic solution for life* [online]. [cit. 2020-01-02]. Dostupné z: <https://cz.werfen.com/products-services/critical-care-diagnostics>
- [15] Aplikácie analytických laboratórií. *AirProducts* [online]. [cit. 2018-11-02]. Dostupné z: <http://www.airproducts.sk/Industries/Analytical-Laboratories/analytical-lab-applications/product-list/blood-gas-analysers-analytical-laboratories.aspx?itemId=C1BA7BD0FE4E4D03B1AFBECECBB0AD7F>
- [16] *Siemens Healthineers: Medical Solutions* [online]. [cit. 2020-05-30]. Dostupné z: <https://www.siemens-healthineers.com/>
- [17] Oblasti diagnostiky. *Roche* [online]. [cit. 2020-05-30]. Dostupné z: <https://www.roche.sk/sk/diagnostics2/lab-solutions.html>
- [18] Klinická biochemie. *Biovendor* [online]. [cit. 2020-05-30]. Dostupné z: <http://www.biovendor.sk/klinicka-biochemie/c-1117/>
- [19] ROUŠ, Jiří. *Tělovýchovné lékařství: určeno pro posl. fak. lékařské*. 7th ed. Brno: Univerzita J.E. Purkyně, 1985. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-246-0821-9.

- [20] CINGLOVÁ, Lenka. *Vybrané kapitoly z tělovýchovného lékařství pro studenty FTVS*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0492-2.
- [21] DASTYCH, Milan a Petr BREINEK. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. 3. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7788-1.
- [22] *Lékařská chemie a biochemie: celostátní vysokoškolská učebnice pro studium lékařských fakult v ČSFR, studijní obor všeobecné lékařství, dětské lékařství a hygiena*. Praha: Avicenum, 1991. Učebnice pro lékařské fakulty. ISBN 80-201-0114-4.
- [23] DOSTÁL, Jiří. *Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů*. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-5020-4.
- [24] Rhabdomyolýza. *Neurologia pre prax* [online]. 28.2.2012, , 6 [cit. 2020-01-02].
Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz › pdfs › neu › 2012/04>
- [25] SELIGER, Václav a Zdeněk TREFNÝ. *Základy fyziologie tělesných cvičení*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1967. Učební texty vysokých škol.
- [26] MARKECHOVÁ, Dagmar, Beáta STEHLÍKOVÁ a Anna TIRPÁKOVÁ. *Štatistické metódy a ich aplikácie*. Univerzita konštantína filozofa v Nitre, 2011. ISBN 978-80-8094-807-8.
- [27] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. *Statistická analýza experimentálních dat*. Vyd. 2., upr. a rozš. Praha: Academia, 2004. ISBN 80-200-1254-0.
- [28] (Electronic Version): StatSoft, Inc. (2013). *Electronic Statistics Textbook*. Tulsa, OK: StatSoft. WEB: <http://www.statsoft.com/textbook/>.
- [29] Doc. Ing. Jiří Kozumplík, CSc. a Prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D. *Umělá inteligence v medicíně*. Brno, 2007.
- [30] Levenberg-Marquardt backpropagation. *MathWorks* [online]. [cit. 2020-04-05].
Dostupné z: <https://www.mathworks.com/help/deeplearning/ref/trainlm.html>
- [31] Function fitting neural network. *MathWorks* [online]. [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: <https://www.mathworks.com/help/deeplearning/ref/fitnet.html>
- [32] VLADIMÍR, Kvasnička a Beňušková LUBICA. *Úvod do teórie neurónových sietí*. STU. Bratislava.

ZOZNAM PRÍLOH

PRÍLOHA A

Tabulka A – Referenčné hodnoty skúmaných parametrov

Názov	Referenčná hodnota**	Jednotka
Erytrocyty	4,0-5,8*	10 ¹² /l
Hematokrit	0,40-0,50*	l
Hemoglobín	135-175*	g/l
MCV	82-98	fl
MCH	28-34	pg
MCHC	32-36	g/dl
Leukocyty	4-10	10 ⁹ /l
Neutrofilý	45-70	%
Eosinofily	< 5	%
Basofily	< 2	%
Monocyty	2-12	%
Lymfocyty	20-45	%
IgA	1,5-4,0	g/l
IgM	0,6-1,7	g/l
Alanínaminotransferáza (ALT)	7-56	U/l
Laktátdehydrogenáza (LDH)	140-280	U/l
Kretinkináza (CK)	26-308*	U/l
kreatinín v krvi	0,84-1,21*	mg/dl
kreatinín v moči	3,9-14,2*	mmol/l
Na v krvi	136-145	mmol/l
Na v moči	110-260	mmol/deň
K v krvi	3,60-5,40	mmol/l
K v moči	40,0-100,0	mmol/deň
Špecifická hmotnosť	1010-1030	g/l

* Referenčné hodnoty sú závislé na pohlaví

** Referenčné hodnoty môžu byť mierne rozdielne pre jednotlivé laboratória

PRÍLOHA B

Tabulka B – Výsledok analýzy Spearmanovho korelačného koeficientu

Spearman Rank Order Correlations (Sheet1 in predspracovane_data)							
MD pairwise deleted							
Marked correlations are significant at $p < .05000$							
Variable	ERY	Hemoglobin	Hematokrit	TRC	MCV	NEU	NEU_abs
ERY	1.000000	0.843555	0.852029	0.005420	-0.460898	-0.020651	0.271141
Hemoglobin	0.843555	1.000000	0.927756	-0.045475	-0.065697	0.077237	0.314283
Hematokrit	0.852029	0.927756	1.000000	-0.009609	-0.016377	0.054104	0.287855
TRC	0.005420	-0.045475	-0.009609	1.000000	0.049118	0.033431	0.193824
MCV	-0.460898	-0.065697	-0.016377	0.049118	1.000000	0.126491	-0.058676
NEU	-0.020651	0.077237	0.054104	0.033431	0.126491	1.000000	0.692949
NEU_abs	0.271141	0.314283	0.287855	0.193824	-0.058676	0.692949	1.000000
LYM	-0.009845	-0.092942	-0.078170	-0.015187	-0.117307	-0.963314	-0.745762
LYM_abs	0.236862	0.122815	0.134806	0.156744	-0.252922	-0.771915	-0.169733
EO	0.114073	0.037163	0.088147	-0.031113	-0.078166	-0.772362	-0.554242
EO_abs	0.191114	0.109203	0.159874	0.028165	-0.108294	-0.709549	-0.360354
BAZ	0.218310	0.089081	0.115012	0.169353	-0.177784	-0.510035	-0.372441
BAZ_abs	0.381111	0.236498	0.262398	0.258053	-0.223065	-0.293702	0.041237
CK	-0.443164	-0.399063	-0.403263	0.014482	0.252968	-0.135460	-0.404253
Na_b	0.109146	0.264371	0.297706	0.022337	0.312366	0.081093	0.163035
K_b	0.120263	0.005673	0.087358	0.129933	-0.018178	-0.045502	0.085503
CR_b	0.372369	0.421526	0.336966	-0.108350	-0.033537	0.334913	0.385129
Na_u	-0.043030	0.047886	0.070955	-0.209382	0.216941	-0.034448	-0.141974
K_u	-0.169261	-0.205542	-0.138004	-0.169743	0.046719	-0.025633	-0.144790
CR_u	0.129425	0.050998	0.056550	0.061777	-0.114765	0.205813	0.154813
hmotnost	-0.018610	-0.005557	0.044173	-0.029975	0.015673	0.019449	0.052355
MCH	-0.231483	0.256453	0.138420	0.008537	0.795663	0.161391	0.059933
MON_abs	0.284120	0.233870	0.201042	0.114044	-0.196755	0.035143	0.613137
MON	0.064685	0.018862	0.017568	-0.059833	-0.069819	-0.498859	-0.087743

Variable	LYM	LYM_abs	EO	EO_abs	BAZ	BAZ_abs	CK
ERY	-0.009845	0.236862	0.114073	0.191114	0.218310	0.381111	-0.443164
LEU	-0.092942	0.122815	0.037163	0.109203	0.089081	0.236498	-0.399063
Hb	-0.078170	0.134806	0.088147	0.159874	0.115012	0.262398	-0.403263
Hematokrit	-0.015187	0.156744	-0.031113	0.028165	0.169353	0.258053	0.014482
TRC	-0.117307	-0.252922	-0.078166	-0.108294	-0.177784	-0.223065	0.252968
MCV	-0.963314	-0.771915	-0.772362	-0.709549	-0.510035	-0.293702	-0.135460
MCH	-0.745762	-0.169733	-0.554242	-0.360354	-0.372441	0.041237	-0.404253
MCHC	1.000000	0.749123	0.711971	0.622848	0.490969	0.239747	0.123091
NEU	0.749123	1.000000	0.563130	0.633148	0.421240	0.455570	-0.162582
NEU_abs	0.749123	1.000000	0.563130	0.633148	0.421240	0.455570	-0.162582
LYM	0.711971	0.563130	1.000000	0.965407	0.440699	0.256718	0.192562
LYM_abs	0.622848	0.633148	0.965407	1.000000	0.413420	0.330608	0.097626
MON	0.490969	0.421240	0.440699	0.413420	1.000000	0.880851	-0.084007
MON_abs	0.239747	0.455570	0.256718	0.330608	0.880851	1.000000	-0.261900
EO	0.123091	-0.162582	0.192562	0.097626	-0.084007	-0.261900	1.000000
EO_abs	-0.126984	-0.033620	0.043480	0.098003	0.044109	0.098178	-0.140854
BAZ	-0.009909	0.149232	-0.005142	0.043861	0.028398	0.133859	-0.091897
BAZ_abs	-0.377337	-0.191314	-0.221304	-0.169309	-0.298267	-0.150441	-0.029447
CK	-0.004494	-0.132106	0.230502	0.218484	-0.095565	-0.177981	0.125882
Na_b	-0.033784	-0.145772	0.070722	0.038219	-0.120051	-0.208268	0.184696
K_b	-0.225137	-0.162501	-0.049445	-0.036866	-0.042184	-0.014366	0.139657
CR_b	-0.033567	0.003282	-0.014627	-0.008614	-0.168965	-0.141579	-0.083910
Na_u	-0.148372	-0.207642	-0.111925	-0.112699	-0.174435	-0.192494	0.121151
K_u	-0.224185	0.291341	-0.075113	0.104706	-0.100033	0.224846	-0.251279
CR_u	-0.224185	0.291341	-0.075113	0.104706	-0.100033	0.224846	-0.251279
hmotnost	0.285548	0.377576	0.335448	0.379228	0.127969	0.154827	0.055271

Variable	Na_b	K_b	CR_b	Na_u	K_u	CR_u	hmotnost
ERY	0.109146	0.120263	0.372369	-0.043030	-0.169261	0.129425	-0.018610
Hemoglobin	0.264371	0.005673	0.421526	0.047886	-0.205542	0.050998	-0.005557
Hematokrit	0.297706	0.087358	0.336966	0.070955	-0.138004	0.056550	0.044173
TRC	0.022337	0.129933	-0.108350	-0.209382	-0.169743	0.061777	-0.029975
MCV	0.312366	-0.018178	-0.033537	0.216941	0.046719	-0.114765	0.015673
NEU	0.081093	-0.045502	0.334913	-0.034448	-0.025633	0.205813	0.019449
NEU_abs	0.163035	0.085503	0.385129	-0.141974	-0.144790	0.154813	0.052355
LYM	-0.126984	-0.009909	-0.377337	-0.004494	-0.033784	-0.225137	-0.033567
LYM_abs	-0.033620	0.149232	-0.191314	-0.132106	-0.145772	-0.162501	0.003282
EO	0.043480	-0.005142	-0.221304	0.230502	0.070722	-0.049445	-0.014627
EO_abs	0.098003	0.043861	-0.169309	0.218484	0.038219	-0.036866	-0.008614
BAZ	0.044109	0.028398	-0.298267	-0.095565	-0.120051	-0.042184	-0.168965
BAZ_abs	0.098178	0.133859	-0.150441	-0.177981	-0.208268	-0.014366	-0.141579
CK	-0.140854	-0.091897	-0.029447	0.125882	0.184696	0.139657	-0.083910
Na_b	1.000000	0.116769	0.090561	0.497438	0.102800	-0.035796	-0.016227
K_b	0.116769	1.000000	0.141897	-0.205852	-0.005006	-0.090357	-0.113658
CR_b	0.090561	0.141897	1.000000	-0.087052	0.031728	0.472884	0.015945
Na_u	0.497438	-0.205852	-0.087052	1.000000	0.135694	-0.187380	0.273800
K_u	0.102800	-0.005006	0.031728	0.135694	1.000000	0.422091	0.285425
CR_u	-0.035796	-0.090357	0.472884	-0.187380	0.422091	1.000000	0.166480
hmotnost	-0.016227	-0.113658	0.015945	0.273800	0.285425	0.166480	1.000000
MCH	0.359015	-0.220690	0.098698	0.247230	-0.095808	-0.140373	-0.004595
MON_abs	0.123571	0.220382	0.247887	-0.075273	-0.061393	-0.043950	0.023953
MON	0.060828	0.201169	0.034405	0.029697	0.128490	-0.110704	0.045622

ZOZNAM SKRATIEK

POC	Point of Care systémy
ISE	Ión-selektívna elektroda
ATP	Adenozíntrifosfát
ADP	Adenozíndifosfát
MAD	Medián absolútnej výchyľky