



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry
Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1/2012
Ročník XVII.

Randox has been providing diagnostic solutions
for 30 years to laboratories
worldwide

*Revolutionising healthcare
through continuously improving
diagnostic solutions*



*Saving lives through early
intervention and diagnosis*



RANDOX

Randox S.R.O., Vilová 2, 851 01 Bratislava, Slovakia
T +421 2 6381 3324 F +421 2 6381 2482

Randox Laboratories Limited, 55 Diamond Road, Crumlin, County Antrim, BT29 4QY, United Kingdom
T +44 (0) 28 9442 2413 F +44 (0) 28 9445 2912 E marketing@randox.com I www.randox.com



cobas[®] 8000 – modulárna línia analyzátorov
Inteligentná sila v laboratóriu



Prvá inštalácia na Slovensku v apríli 2012!



Roche Slovensko, s.r.o., Diagnostics Division, Lazaretská 12, 811 08 Bratislava 1, www.roche.sk

cobas[®]

Life needs answers



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry

Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1/2012

Ročník XVII.

PRESEDA REDAKČNEJ RADY

Katarína Daňová

VÝKONNÝ REDAKTOR

Oliver Rácz

ODBORNÝ REDAKTOR

Ján Mocák

REDAKČNÁ RADA

Anna Stecová, bývalá predsedkyňa redakčnej rady

Ján Balla, bývalý výkonný redaktor

Pavol Blažíček, bývalý výkonný redaktor

Denisa Maceková, korektorka

Roman Alberty

Peter Božek

Ladislav Cebecauer

Jozef Čársky

Ivan Čižmár

Michal Farkaš

Drahošlav Gábor

Ján Lepej

Tomáš Lipšic

Vladimír Kohút

Peter Kubisz

Ivan Pecháň†

Hedviga Pivovarníková

Viera Spustová

Dagmar Syrová

Katarína Šebeková

Helena Šeboková

Ivana Šidlíková

Božena Švecová

Rastislav Valko

Juraj Volmut

OBSAH

KVALITA INFORMAČNÝCH SYSTÉMOV - NAOZAJ IBA INFORMATÍVNA PRÍLOHA NORMY, ALEBO AJ DÔLEŽITÝ PREDPOKLAD ĎALŠIEHO NAPREDOVANIA LABORATÓRNEJ DIAGNOSTIKY? <i>Marko Kapalla, Dagmar Kapallová</i>	5
HLADINA VITAMÍNU D3 AKO POTENCIÁLNY PREDIKTÍVNY MARKER VIACERÝCH OCHORENÍ <i>Gabriela Matysová, Peter Huba, Lucia Mesjarová, Marta Dobáková</i>	9
ČO VEDIA O LABORATÓRIU A KVALITE SÚČASNÍ ŠTUDENTI MEDICÍNY A AKÉ SÚ PERSPEKTÍVY V ĎALŠOM VZDELÁVANÍ <i>Ladislav Turecký</i>	19
PANCREATIC BETA CELL REGENERATION AS A PERSPECTIVE OF DEFINITIVE CURE OF DIABETES MELLITUS <i>Koska Péter, Kiss-Tóth Éva, Juhászné Szalai Adrienn, Kiss-Tóth Emőke, Szebení János, Rácz Olivér, Kováts L. Gábor, Barkai László, Fodor Bertalan</i>	23
ZNÍŽENIE PLAZMATICKÝCH HLDÍN BETA-KAROTÉNU U PACIENTOV SO SKLERÓZOU MULTIPLEX JE SPOJENÉ SO ZVÝŠENOU INTRATEKÁLNOU TVORBOU IgG A ZVÝŠENOU LIPOPEROXIDÁCIOU <i>Terézia Kalnovičová, Lubomír Kuračka, Jarmila Kucharská, Marta Ondrkalová, Peter Turčáni</i>	29
HODNOTENIE ZDRAVOTNÉHO STAVU MARGINALIZOVANÝCH RÓMSKYCH KOMUNÍT NA VÝCHODNOM SLOVENSKU. MOČOVÉ PARAMETRE <i>Beáta Hubková, Eva Ďurovcová, Anna Birková, Juraj Guzy, Mária Mareková, Oliver Rácz a ostatní spolupracovníci HEPA-META teamu</i>	38
HYPOXIA NOVORODENCA A BIOCHEMICKÉ MOŽNOSTI JEJ POSÚDENIA <i>Denisa Maceková, Oliver Rácz, Peter Dombrovský</i>	48
DIAGNOSTICKÝ POTENCIÁL AUTOFLUORESCENCIE KOŽE <i>Marcela Valko-Rokytovská, Anna Birková, Marianna Zábavníková, Beáta Hubková, Mária Mareková</i>	53
RESPIRAČNÝ KONTROLNÝ POMER VEZIKÚL CYTOCHRÓM C OXIDÁZY PRIPRAVENÝCH BEZ POUŽITIA DETERGENTU <i>Marek Stupák, Jana Mašlanková</i>	59
PRÍLOHY.....	65

**KVALITA INFORMAČNÝCH SYSTÉMOV - NAOZAJ IBA
INFORMATÍVNA PRÍLOHA NORMY, ALEBO AJ DÔLEŽITÝ PREDPOKLAD
ĎALŠIEHO NAPREDOVANIA LABORATÓRNEJ DIAGNOSTIKY ?**

**QUALITY OF INFORMATION SYSTEMS – SOLELY AN INFORMATIVE
ANNEX OF AN ISO NORM OR AN IMPORTANT PREREQUISITE FOR FURTHER
PROGRESS OF LABORATORY DIAGNOSTICS ?**

Marko Kapalla¹, Dagmar Kapallová²

¹European Association for Predictive, Preventive and Personalised Medicine, EPMA, Brussels, Belgium

²Negentropic Systems, s.r.o., Ružomberok, Slovakia

Kontakt: marko.kapalla@gmail.com, kapalla@epmanet.eu

ABSTRACT

Although the norm ISO 15189:2007 *Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence*, does not explicitly define the term “quality of information system”, it results of its diction that, according to this norm, the attribute of quality of information systems is particularly associated with the safety of stored data, data integrity, access protection, transmission security, regular maintenance of hardware and software, fast and accurate data recall and clarity of the data reported on the final report for the physician, or the patient, respectively.

All these attributes, however, we should take only as the fundamental ones, not sufficient for stimulating any significant increase in quality of information systems in clinical laboratories, nor they are sufficient for any progress in the field of laboratory diagnostics and for raising quality of healthcare.

In our opinion, as the attribute of quality we should take an *added value* for the particular patient in the particular case. Unambiguously, the implementation of predictive, preventive and personalized medicine in clinical laboratory and other healthcare information systems is becoming such an *added value* of rising importance.

However, in the terms of quality, what should always be put in the first place, and not just as an “*added*”, but the *essential value*, is the common sense. If we all, as a civilization, really use it, there can be no doubt that it is possible, in the relatively near future, to implement the vision of predictive, preventive and personalized medicine with the help of laboratory information systems of top quality.

ÚVOD

V našich predchádzajúcich článkoch a publikáciách na tému kvalita a jej komplexné chápanie v laboratórnej diagnostike sme opakovane zdôrazňovali dôležitosť informačných technológií pre ďalší rozvoj laboratórií [1-6]. Hoci norma ISO 15 189:2007, ako základná norma pre klinické laboratóriá, pojem „kvalita informačných systémov“ nedefinuje, z jej dikcie (viď body normy 4.13.3, 5.1.7, 5.1.8, 5.3.11, 5.3.14, 5.8, 5.8.7 a informatívnu prílohu B1–B8) vyplýva, že sa podľa tejto normy spája atribút kvality informačných systémov hlavne s **bezpečnosťou uložených dát, ich integritou, ochranou prístupu, bezpečnosťou prenosu, pravidelnou údržbou hardvéru a softvéru, ľahkou vyhľadateľnosťou dát a zrozumiteľnosťou získaných dát na záverečných správach** pre lekára, resp. pacienta, ako klientov laboratória.

Všetky tieto požiadavky by sa však mali chápať iba ako úplný základ, ktorý je síce nevyhnutný, ale určite nie je z pohľadu ďalšieho rozvoja laboratórnej diagnostiky a zvyšovania kvality poskytovaných služieb dostatočný. Podľa jednoduchého prieskumu (Tab. 1) téma kvality informačných systémov v klinických laboratóriách nepatrí medzi veľmi diskutované oblasti, napriek tomu, že kvalita informačných systémov všeobecne je relatívne frekvencovaná téma. Preto je potrebné o tejto téme hovoriť na odborných fórach.

Prevažnú väčšinu súčasných laboratórnych informačných systémov by sme mohli charakterizovať ako „pasívne“, t.j. také, ktoré okrem základného porovnania výsledku s referenčnými hodnotami ďalšie aktivity veľmi nevykazujú, a preto je možné z tohto pohľadu hovoriť o všeobecnej a pretrvávajúcej stagnácii kvality, napriek rastúcemu počtu akreditovaných laboratórií podľa predmetnej normy [7].

Tab. 1. Vyhľadávané frázy a ich variácie na tému „kvalita informačných systémov“. Z nízkych počtov nájdených relevantných odkazov vyplýva, že o kvalite informačných systémov v klinických laboratóriách je naozaj potrebné hovoriť.

Vyhľadávaná fráza cez www.google.com	Počet nájdených relevantných odkazov dňa: 15.10.2011
kvalita informačných systémov	2520
kvalita informačných systémov (so slovami „klinické“ a „laboratórium“)	0
kvalita laboratórnych informačných systémov	0
kvalita LIS	0
kvalita LIMS	0
atribúty kvality informačných systémov	0
quality of information systems	1 050 000
quality of information systems (so slovami „clinical“ a „laboratory“)	19 000
quality of laboratory information systems	1
quality of LIS (so slovami „clinical“ a „laboratory“)	3
quality of LIMS (so slovami „clinical“ a „laboratory“)	1
attributes of quality	157 000
quality attributes	557 000
quality attributes of information systems	2

INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV VYŠETRENÍ A KVALITNÉ INFORMAČNÉ SYSTÉMY

Prevažná väčšina dnešných laboratórnych výsledkov sa hodnotí podľa tzv. referenčných hodnôt, nesprávne tiež nazývaných „normy“, ktoré vychádzajú z meraní a štatistickej analýzy dát, získaných analýzou „zdravej“ populácie, či, lepšie povedané, populácie, ktorá sa iba blíži k tomu, aby mohla byť za naozaj zdravú považovaná. Štandardná interpretácia výsledkov, kde sa každý výsledok hodnotí jednotlivo, neberie do úvahy možné vzťahy medzi jednotlivými zložkami metabolizmu, a tak môže dôjsť k prehliadnutiu dôležitých zmien v klinickom stave daného pacienta. To znamená, že okrem porovnávania samotných hodnôt s referenčnými hodnotami **by sa výsledky mali posudzovať komplexnejšie, vo vzájomných súvislostiach a vo vzťahu k aktuálnym poznatkom. Práve tu by mal významnú úlohu plniť naozaj kvalitný informačný systém, prepojený so štruktúrovanou databázou relevantných a overených poznatkov.** Kvalitný informačný systém by mal lekárovi poradiť, kde hľadať

príčinu nezrovnalosti a svoj „názor“ (**second opinion**) spracovať do podoby relevantných predpovedí resp. interpretácií, ktoré môžu pomôcť skrátiť čas odozvy na zdravotný problém pacienta [5–8].

Takéto posudzovanie výsledkov nepatrí k bežnému štandardu nielen na Slovensku, ale ani vo svete. V lepšom prípade prácu počítača nahrádza kvalifikovaný odborník, ktorý výsledky kontroluje na základe svojich vlastných vedomostí a skúseností, v horšom prípade sa výsledky kontrolujú iba po formálnej stránke a v najhoršom prípade sa nekontrolujú vôbec, iba sa vytlačia, prípadne pošlú v elektronickej forme ošetrovateľovi lekárovi, ktorý ich posudzuje na základe svojich vlastných vedomostí.

Ďalšou alternatívou, ktorá sa začína postupne objavovať v niektorých informačných systémoch je automatická kontrola výsledkov na základe nastavených pravidiel. V tomto prípade je kvalita informačného systému a použitých algoritmov naozaj kľúčová, pretože zle nastavená automatická validácia môže spôsobiť väčšie vyvolané škody, ako je jej potenciálny prínos pri zvyšovaní efektivity práce kvalifikovaného odbor-

ného personálu. O to skôr, že, ako predpokladáme, primárnym cieľom automatickej validácie, z pohľadu prevažnej väčšiny manažmentov laboratórií je znižovanie osobných nákladov na kvalifikovaný personál a nie zvyšovanie kvality poskytovaných služieb pre pacienta. Na druhej strane, dobre implementovaná automatická kontrola, dáva možnosť, resp. priamo vyžaduje odborný rast a komplexné odborné znalosti, ktoré, pretransformované do informačného systému, jednoznačne zvyšujú kvalitu laboratórnej diagnostiky, ktorá je základom aj pre koncept PPPM.

ATRIBÚTY KVALITY INFORMAČNÝCH SYSTÉMOV V KLINICKOM LABORATÓRIU

Atribútom kvality, tak ako ju chápeme my, by mala byť pridaná hodnota, ktorú v pozitívnom zmysle pocíti v konečnom dôsledku konkrétny pacient, v konkrétnom prípade. Na základe doterajšej odozvy zo strany odborníkov z rôznych oblastí vedy, technológie aj politiky si dovoľme tvrdiť, že **takouto pridanou hodnotou sa jednoznačne stáva implementácia prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny (PPPM) do informačných systémov, používaných v laboratóriu aj v ambulancii [7].**

Z pohľadu konceptu PPPM sa kladie veľký dôraz práve na maximálne využitie potenciálu progresívnych informačných systémov, aby sa čo najviac využil potenciál informácií a zároveň, **aby sa lekárom umožnilo viac sa venovať pacientovi tam, kde jeho úlohu nie je možné nahradiť ani najkvalitnejšími informačnými technológiami - ľudský kontakt, intuícia, empatia, potenciálna vlastná skúsenosť so zdravotným problémom.**

Jednými zo základných atribútov kvality informačných systémov v laboratóriu aj v zdravotníctve všeobecne by sa mohli stať:

- **interaktívne elektronické výsledkové listy**, využívajúce vlastnosti xml formátu dát, schopné spracovávať číselné, textové, obrazové aj multimediálne výsledky zo všetkých odborov laboratórnej diagnostiky,
- **vyhodnocovanie trendov vo výsledkoch**, vyhodnocovanie štatistickej významnosti rozdielov dvoch výsledkov, odhady rizík,
- **vzdialený prístup pacienta aj lekára k elektronickému lekárske mu záznamu** odkiaľkoľvek, prostredníctvom prenosných zariadení typu "tablet", resp. mobilných telefónov poslednej generácie, s integrovanými funkciami, ktoré sú na takúto úlohu potrebné,
- **prepojenie informačných systémov na kontinuálne sa zdokonaľujúce databázy poznatkov** v oblasti lekárskech a súvisiacich vied, prístupné pre všetky zložky zdravotnej starostlivosti, vrátane pacienta,
- **využívanie umelej inteligencie pri komplexnej analýze dát** a poskytovaní podporného názoru tzv. „second opinion“,
- **využívanie dataminingových nástrojov na báze neurónových sietí,**

- **analýza vzťahov v súvislosti s novými klinickými informáciami** ako napr. geomarkery, stres skóre, skóre hodnotenia rizík životného štýlu a pod.,

- **interaktívne individuálne počítačové modely**, ako jedna z najvyšších úrovní z pohľadu kvality a pridanej hodnoty, umožňujúce modelovať špecifické situácie a následne hľadať ich možné medicínske riešenia pre konkrétneho pacienta.

Tieto a ďalšie vlastnosti a vízie, súvisiace s rozvojom informačných systémov sme podrobnejšie rozobrali v niekoľkých prácach [4,6-8].

ZÁVER

Norma ISO 15 189:2007 síce definuje základné požiadavky na informačný systém v akreditovanom laboratóriu, ale tieto požiadavky nie sú postačujúce na to, aby nejakým významným spôsobom stimulovali rast kvality informačných systémov, používaných v klinických laboratóriách. **Spojenie atribútu kvality informačných systémov s rozvojom konceptu prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny preto považujeme nielen za logické, ale aj nevyhnutné.** Samozrejme za predpokladu, že chceme, aby sa úroveň a kvalita zdravotnej starostlivosti zvyšovala, a zároveň sa nezvyšovali výdaje na takú zdravotnú starostlivosť, ktorá je výsledkom neznalosti, neschopnosti a neochoty **používať to, čo by malo byť v súvislosti s kvalitou všade na prvom mieste - zdravý rozum.** Ak ho budeme, ako civilizácia, naozaj používať, potom nemôžu byť nijaké pochybnosti o tom, že je možné v relatívne dohľadnej dobe realizovať vízie prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny aj s pomocou kvalitných informačných systémov v klinických laboratóriách.

LITERATÚRA

1. **Kapalla, M.:** Komplexnosť a kvalita - pohľad na indikátory kvality pre klinické laboratóriá. *Laboratórna diagnostika*, 1, 2007, **2007**, s. 64–65.
2. **Kapalla, M., Kapallová, D.:** Význam kvality v laboratóriu pre nový trend prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny. *Laboratórna diagnostika*, 1–2/2009, **2009**, s. 65–66.
3. **Kapallová, D., Kapalla, M.:** Začiatok nového smerovania medicíny v Európe, *Konzílium*, 1, **2009**, s. 14.
4. **Kapalla, M., Kapallová, D.:** Kľúčová úloha laboratórnej diagnostiky pre prediktívnu medicínu. In: **Nosálová, G. (ed.):** *Nové stratégie v systéme zdravotnej starostlivosti v Európe. Praktické aplikácie modernej laboratórnej diagnostiky.* Ružomberok, **2009**, 7–9.
5. **Kapalla, M., Matušková, D.:** Information systems as an essential component of prediction in the laboratory diagnostics, In **Golubnitschaja, O. (ed.):** *Predictive Diagnostics and Personalized Treatment: Dream or Reality.* Nova Publishers, New York, **2009**, 529–548.

6. **Kapalla, M.:** Healthcare Information Complexity and the Role of Informatics in Predictive, Preventive and Personalized Medicine: In **Niederlag, W., Lemke, H. U., Rienhoff, O.** (eds.): *Personalisierte Medizin und Informationstechnologie*. Health Academy, Band 15, Dresden, **2010**, 83–108.
7. **Kapalla, M., Kapallová, D.:** Interpretation of laboratory results in the complex predictive diagnostics: status quo and perspectives. *EPMA Journal*, 2 (Suppl. 1), **2011**, S185–S186.
8. **Kapalla, M., Kapallová, D.:** Simple rule for the computer assisted validation of laboratory data resulting from the analysis of correlations between serum levels of the particular model analytes. *Int. J. CARS*, 5 (Suppl. 1), **2010**, S250–S251.

HLADINA VITAMÍNU D3 AKO POTENCIÁLNY PREDIKTÍVNY MARKER VIACERÝCH OCHORENÍ

Gabriela Matysová, Peter Huba, Lucia Mesjarová, Marta Dobáková

Alpha medical, a.s.

Laboratórium klinickej biochémie a hematológie

Likavka, okr. Ružomberok

Kontakt: gabriela.matysova@alphamedical.sk

SÚHRN

Vitamín D je hormón rozpustný v tukoch, syntetizovaný zo 7-dehydrocholesterolu v koži pôsobením UV žiarenia. Zohráva dôležitú úlohu nielen v kostnom metabolizme, ale nové štúdie z rôznych krajín ukazujú, že vitamín D je jeden z mnohých faktorov, ktorý má rozhodujúcu úlohu v prevencii autoimunitných ochorení ako je cukrovka, autoimunitná tyreoiditída, reumatoidná artritída a iné, v prevencii kardiovaskulárnych, imunitných, infekčných ochorení, v prevencii rakoviny, osteoporózy, obezity, peľsatosti a mnohých ďalších ochorení.

Deficit vitamínu D je rozšírený na celom svete vrátane slovenskej populácie. Naše výsledky 2626 pacientov zo stredného Slovenska počas posledných troch rokov potvrdzujú, že 65,8% populácie má deficit vitamínu D (hladiny 25-OH-vitamínu D < 37 nmol/l, ECLIA, Elecsys 2010) a existujú významné rozdiely medzi rôznymi pohlaviami, ročnými obdobiami, medzi rôznymi vekovými skupinami a rôznymi regiónmi stredného Slovenska.

Na základe našich zistení sa prikláňame k tomu, že je potrebné odporúčať suplementáciu vitamínu D nielen u detí, ale u celej našej populácie, pretože sa zdá, že vitamín D, spolu s ďalšími faktormi, môže mať nezanedbateľný preventívny účinok pri vzniku mnohých ochorení a stanovovanie jeho hladiny je možné využiť na predikciu možných zdravotných komplikácií.

Kľúčové slová: 25-OH-vitamín D, slnečné svetlo, deficit vitamínu D, prediktívny marker

ABSTRACT

Vitamin D is a lipid-soluble hormone synthesized from 7-dehydrocholesterol in the skin when exposed to ultraviolet light. Vitamin D plays an important role not only in bone metabolism, but new studies from different countries show that vitamin D is one of several factors having a crucial role in the prevention of autoimmune diseases such as *diabetes mellitus*, autoimmune thyroiditis, rheumatoid arthritis and other, as well as in the prevention of cardiovascular, immunological, infectious diseases, in the prevention of cancer, osteoporosis, obesity, acromia and in many other diseases.

Vitamin D deficiency is prevalent worldwide, including Slovak population. Results of vitamin D levels in 2626 patients, central Slovakia residents, measured in the course of past three years show that approximately 65.8% of Slovak population has deficiency of vitamin D (levels of 25-OH-vitamin D below 37 nmol/l, ECLIA, Elecsys 2010) and gender differences, seasonal variations, age-related differences and region-related differences can also be observed.

In conclusion, general supplementation of vitamin D is necessary not only in children but in all population, because it seems that vitamin D together with another factors may have considerable preventive effect in many diseases, and determination of its level in the blood can be useful in predicting potential health complications.

Key Words: 25-OH-vitamin D, sunlight, deficiency of vitamin D, predictive marker

ÚVOD

V poslednej dobe narastá počet štúdií a publikácií na tému vitamín D, ktoré sú zamerané najmä na potvrdenie nedostatku vitamínu D (vit. D) v celosvetovej populácii, resp. opisujú nové, často prekvapivé, účinky vit. D pre organizmus (počet citácií o vit. D do októbra 2011: PubMed = 52 979, Google = 46 400 000 odkazov). V tomto článku sa pokúsime prehľadne zhrnúť najdôležitejšie údaje, ktoré sú známe o vit. D, zameriame sa na nové známe účinky vit. D pre organizmus, pozrieme sa bližšie na hladinu vit. D u pacientov žijúcich na strednom Slovensku a preberieme rôzne možnosti ako by sme mohli pre náš organizmus zabezpečiť dostatočné množstvo vit. D.

Čo je vitamín D?

Pod pojmom vitamín D rozumieme skupinu látok označovaných ako D1, D2, D3, D4 a D5 s ich provitaminmi, ktoré boli objavené v roku 1922 E.V. Collumom. Najviac zastúpené v organizme sú práve vitamíny D2 a D3, ktoré majú aj najväčšiu biologickú účinnosť. V krvi sa nachádza približne 95 % vit. D3 a len 5 % vit. D2 (Hart *a kol.*, 2006).

Vit. D3 (cholecalciferol) sa tvorí v koži pôsobením UVB žiarenia (290–315 nm) zo 7-dehydrocholesterolu. Vit. D3 a taktiež aj vit. D2 (ergocalciferol) môže organizmus prijať aj v potrave (rybí tuk, tresčia pečeň, ryby zo studených morí – lososy, makrely, slede, mliečne výrobky, vajčička, cereálie, huby sušené na slnku, rastlinné oleje, droždie, v rastlinnej potrave je však vit. D zastúpený vo veľmi malej miere). Cholecalciferol a ergocalciferol nie sú biologicky aktívne formy vit. D, slúžia iba ako prohormóny resp. prekursori pri syntéze vit. D. Vit. D3 vytvorený pri slnení v koži a vit. D (D2, D3) prijatý v potrave sú v krvi viazané na transkalciferín a transportované do pečene, kde dochádza k prvej hydroxylácii za vzniku 25-OH vit. D, v proximálnych tubuloch obličiek dochádza ďalej k druhej hydroxylácii za vzniku 1,25-(OH)₂ vit. D (Holick *a kol.*, 2002). Konečným produktom syntézy vit. D je hormón 1,25-(OH)₂ vit. D (kalcitriol), ktorý je biologicky aktívny.

Stanovenie vitamínu D v laboratóriách

V laboratóriách klinickej biochémie sa ale namiesto konečného produktu syntézy vit. D 1,25-(OH)₂ vit. D častejšie stanovuje 25-OH vit. D (total vit. D = D3 + D2), ktorý je najlepší indikátor hladiny vit. D v organizme, lebo v sére má asi 1000× väčšiu koncentráciu ako 1,25-(OH)₂ vit. D (jeho biologická účinnosť je však asi 1000× nižšia ako 1,25-(OH)₂ vit. D), hladina 25-OH vit. D veľmi dobre koreluje s klinickými symptómami nedostatku resp. nadbytku vit. D (Hart, 2004). Medzi najčastejšie používané metódy pri stanovení vit. D patria najmä separačné (HPLC, LC-MS/MS), imunochemické (ECLIA, CLIA) a RIA metódy. Každá z týchto metód má svoje výhody aj nevýhody, separačné metódy vedú

veľmi presne stanoviť jednotlivé množstvá D2 a D3, sú časovo náročnejšie a vyžadujú väčší objem séra na stanovenie oproti imunochemickým metódam. Pri interpretácii výsledkov vit. D je potrebné zohľadniť typ metódy, ktorou sa vit. D stanovuje a neodporúča sa porovnávať výsledky stanovené na rôznych analyzátoroch rôznymi metódami pretože medzi metódami existujú významné rozdiely. Napr. výsledky vit. D stanovené HPLC sú cca o 14 % vyššie oproti ECLIA (Stecová *a kol.*, 2009), to znamená ak HPLC metódou stanovíme hladinu vit. D v sére napr. 57 nmol/l, metódou ECLIA je to len 50 nmol/l. Pri výsledkoch vit. D stanovených LC/MS/MS voči HPLC sa vyskytuje bias cca 18 % a cca 5 % je bias pri imunochemickej metóde Liaison voči HPLC (Friedecký a Vávrová, 2011). Dôležité teda je správne nastaviť referenčné hodnoty resp. „cut off“ hodnotu pre danú metodiku tak, aby laboratórium neposkytovalo falošne nízke alebo vysoké výsledky vit. D.

Stöckl *a kol.* v metrologicky zameranej publikácii vypočítali, že bias -10 % pôsobí nárast falošne pozitívnych klinických klasifikácií o 40–60 %, zatiaľ čo bias +10 % naopak pôsobí nárast falošne negatívnych klasifikácií o 14–23 %. Bolo by potrebné, aby reprodukovateľnosť merania neprekročila hodnotu CV = 10 % a bias merania neprekročil hodnotu 5 % (Stöckl *a kol.*, 2009). Podmienkou porovnateľnosti výsledkov vit. D medzi rôznymi metódami by mohla byť šandarizácia merania na referenčný materiál (NIST-SRM 972) a nadväznosť na referenčnú metódu NIST (National Institut of Standards and Technology), ktorou by mohla byť LC-MS/MS s použitím ionizácie APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), kalibrovanú pomocou certifikovaného referenčného materiálu SRM NIST 972 (Tala Bedner, 2010, Friedecký a Vávrová, 2011). Aby nedošlo ku chybnéj interpretácii výsledkov vit. D, je potrebné porovnávať výsledky pacienta stanovené na tom istom analyzátoe tou istou metódou a zároveň si uvedomiť, ktorú formu vit. D stanovujeme (D2, D3, total vit. D, -OH formu vit. D, alebo -(OH)₂ formu vit. D).

Funkcie vitamínu D v organizme

Vitamín D pôsobí na reguláciu metabolizmu dvomi spôsobmi: na úrovni plazmatickej membrány cez VDR receptor (Vitamin D nuclear receptor) a na úrovni génovej expresie tým, že ovplyvňuje množstvo génov v organizme. Aktívny vitamín D je v tele transportovaný do viacerých orgánov (mozog, srdce, koža, gonády, prostata, prsia, črevo, obličky, kosti, prítitné telieska, monocyty, T a B bunky...), kde pôsobí prostredníctvom VDR receptora v jadre bunky. Keďže vit. D si organizmus vie vyrábať sám a jeho pôsobenie v organizme je prostredníctvom receptora, ide skôr o hormón ako o vitamín. Účinok vit. D je v úzkom spojení s metabolizmom kalcia, fosforu, parathormónu, kalcitonínu a nadobličkových hormónov v organizme, tvorbu vit. D ovplyvňujú aj esenciálne omega-3 mastné kyseliny, ktoré sú zodpovedné okrem iného aj za produkciu cholesterolu.

Vitamín D sa v organizme zúčastňuje na mineralizácii kostného tkaniva, zvyšuje resorpciu kalcia a fosforu v tenkom čreve a v obličkách, je dôležitý pre stavbu kostí, zubov, metabolizmus kalcia, svalovú činnosť, nervový systém...

Z novšie známych účinkov vit. D publikovaných vo vybranej literatúre by sme dali do pozornosti najmä nasledovné účinky:

- Je dôležitý pre správnu činnosť imunitného systému, pôsobí na fagocytózu a na niektoré funkcie B- a T-lymfocytov, aktivuje bunky imunitného systému. Ak sa stretne s chrípkou v stave nedostatku vit. D, náš imunitný systém je takmer bezbranný, vit. D je účinný v boji proti infekčným ochoreniam, či už bakteriálnym alebo vírusovým ako je EBV, pneumónie, zubné kazy, paradentóza, bakteriálne zápaly pošvy, vit. D indukuje produkciu látok (catelicidíninu a defenzínov), ktoré majú antimikrobiálne a antiendotoxínové účinky (Hewison, 2010, Aranow, 2011, Hewison, 2011).

- Pomáha ochraňovať organizmus pred vznikom alergií tým, že zvyšuje účinok kortikosteroidov, čo autori štúdie dokázali sériou laboratórnych experimentov na vzorke kultivovaných imunitných buniek s dexamethazónom a následne s prednostne aplikovaným vit. D. V jednom z prípadov bolo simultánne podanie oboch látok až 10× účinnejšie ako samotný kortikosteroid. Podobne boli inkubované imunitné bunky so stafylokokovým toxínom, aby indukovali steroidovú rezistenciu, pričom vitamín aktivitu dexamethazónu obnovil. Deti s dostatočným príjmom vit. D mali menej alergických ochorení vrátane astmy a ekzémov oproti deťom s insuficienciou vit. D (Searing a Leung, 2010, Paul a kol., 2011).

- Zúčastňuje sa pri sekrécii inzulínu z beta buniek pankreasu, u pacientov s DM I. a II. typu boli zaznamenané nižšie hladiny vit. D oproti zdravej kontrolnej vzorke pacientov, u pacientov so zle kompenzovaným DM boli zaznamenané znížené hladiny vit. D oproti pacientom s dobre kompenzovaným diabetom (Bonakdaran a Varasteh, 2009, Kostoglou-Athanassiou a kol., 2010, Mathieu, 2010)

- Vit. D pomáha ochraňovať organizmus pred vznikom nádorových ochorení, štúdie ukazujú, že zvýšenie príjmu vit. D na 4 000–8 000 IU/denne môže znížiť riziko vzniku rakoviny prsníka a hrubého čreva až na polovicu (Kang a kol., 2011, Pazdiora a kol., 2011). Taktiež pomáha znižovať riziko vzniku rakoviny prostaty a kože (Varsavsky a kol., 2011, Donkena a kol., 2011, Denzer a kol., 2011). Antikarcinogénny účinok vit. D sa dáva do súvislosti s tým, že pomáha spúšťať apoptózu nádorových buniek a tiež redukuje angiogénu v okolí nádorov a redukuje výskyt metastáz.

- Pomáha ochraňovať organizmus pred vznikom autoimunitných ochorení ako je reumatoidná artritída (Merlino a kol., 2004), autoimunitná tyreoiditída, systémový lupus erythematoses atď., u pacientov postihnutých niektorou z autoimunitných chorôb boli dokázané nižšie hladiny vit. D ako pri kontrolnej zdravej vzorke pacientov (Fletcher a kol., 2011).

- Je účinný pri liečbe niektorých kožných ochorení (psoriáza) vďaka tomu, že dokáže stimulovať rast a rozvoj buniek pokožky a zabraňuje deleniu keratinocytov (Gisoni a kol., 2011, Okuro a Morimoto, 2011).

- Ovplyvňuje funkciu vlasových folikulov, nízke hladiny vit. D boli dokázané pri plešatosti (Amor a kol., 2010, Malloy a kol., 2011). Podľa epidemiologických štúdií až vyše 40% mužov vo veku 18–50 rokov má stredný až ťažký stupeň plešatosti.

- Ochraňuje organizmus pred rozvojom obezity, u ľudí s vysokým BMI boli zaznamenané nižšie hladiny vit. D ako pri kontrolnej zdravej vzorke pacientov (Brock a kol., 2010, Garanty-Bogacka a kol., 2011).

- U tehotných dopĺňanie vit. D zabezpečuje správny vývoj kostry plodu a predchádza nízkej pôrodnej váhe novorodenca. Prevencia rachitídy teda začína už v prenatálnom období, pretože vit. D z tela matky môže voľne prechádzať placentou, najintenzívnejšie v poslednom trimestri, zohľadňujúc najvyššie potreby rýchlo rastúceho plodu. V období dojčenia vit. D zvyšuje tvorbu materského mlieka (Saadi a kol., 2007, Mulligan a kol., 2010, Bischoff-Ferrari, 2011, Thomas a kol., 2011).

- Pomáha spomaľovať starnutie. Výskum bol robený v Anglicku na 2 160 ženách, pričom ženy, ktoré mali nižšiu hladinu vit. D vykazovali viac príznakov biologického starnutia a mali kratšie teloméry oproti ženám s normálnymi hladinami vit. D. Tento rozdiel zodpovedal približne 5 rokom ľudského života. S pribúdajúcim vekom sa teloméry postupne skracujú a DNA bunky sa stáva menej stabilnou. Táto štúdia prispieva k vysvetleniu, prečo má vit. D ochranný účinok pred chorobami spojenými s vekom ako sú srdcovo-cievne a nádorové ochorenia, tento fakt je ale potrebné overiť na väčšej vzorke pacientov. Ak by sa tento záver potvrdil, malo by toto zistenie značný dopad na svetovú medicínu (Richards a kol., 2007, Zhu a kol., 2011).

- Niekoľkými štúdiami (USA, Kanada, západná Európa, krajiny Beneluxu) sa zistilo, že ak by naša populácia mala viac vit. D, mohla by sa znížiť úmrtnosť až o 7–15% a tiež ekonomická záťaž chorôb v dôsledku menšieho počtu civilizačných ochorení ako sú srdcovo-cievne ochorenia, nádory, autoimunitné ochorenia. Už užívanie 300–2 000 IU vit. D/denne po dobu aspoň 6 rokov znižuje úmrtnosť o 7% (výskum je z roku 2007 na 57 000 jedincoch!), (Luong a Nguyen, 2006, Bjelakovic a kol., 2011, Lim a kol., 2011, Grant, 2011, Covic a Apetrii, 2011).

Deficit vitamínu D na Slovensku

Deficit vitamínu D je na Slovensku veľmi rozšírený. Bližšie sme sa pozreli na situáciu s hladinami tohto vitamínu na strednom Slovensku. Naše výsledky v skupine 2 626 pacientov zo stredného Slovenska počas posledných troch rokov potvrdzujú, že 65,8% populácie má deficit vitamínu D (hladiny 25-OH-vitamínu D < 37 nmol/l, ECLIA, Elecsys 2010, do štatistiky neboli zahrnuté deti do 3 rokov, ktoré sú suplementované Vigantomom

Tab. 1. Hladiny vitamínu D u žien a mužov stredného Slovenska.
Medzi pohlaviami existujú štatisticky významné zmeny ($p = 0,0295$)

	Ženy	Muži
počet pacientov	1686	649
medián	27,12 nmol/l	29,49 nmol/l

Tab. 2. Hladiny vitamínu D v zime a v lete u pacientov stredného Slovenska.
Medzi ročnými obdobiami existujú štatisticky významné zmeny ($p < 0,0001$)

	ZIMA (október-apríl)	LETO (máj-september)
počet pacientov	1761	574
medián	25,23 nmol/l	36,89 nmol/l

Tab. 3. Hladiny vitamínu D u rôznych vekových skupín pacientov stredného Slovenska

vek [roky]	počet pacientov	medián vit.D3
< 1	43	118,6 nmol/l
1-2	62	70,0 nmol/l
3-10	230	43,6 nmol/l
11-20	321	30,6 nmol/l
21-30	154	32,9 nmol/l
31-40	167	30,1 nmol/l
41-50	193	31,0 nmol/l
51-60	378	29,6 nmol/l
61-70	311	29,7 nmol/l
71-80	184	28,6 nmol/l
81-90	37	25,7 nmol/l

Tab. 4. Hladiny vitamínu D u pacientov z rôznych regiónov stredného Slovenska

mesto	počet pacientov	medián vit.D3
Ružomberok	122	29,6 nmol/l
Martin	143	29,0 nmol/l
Trstená	422	35,9 nmol/l
Dolný Kubín	450	33,7 nmol/l
Námestovo	132	25,9 nmol/l
B. Bystrica	123	36,1 nmol/l
Dubnica n/V.	156	21,3 nmol/l
Turč. Teplice	114	47,4 nmol/l
Bytča	112	18,5 nmol/l
Čadca	69	30,6 nmol/l

Tab. 5. Stav vit. D v celosvetovej populácii (prehľad publikácií).

Prevodný vzťah medzi jednotkami je nasledovný: ng/ml * 2.496 = nmol/l

publikácia	krajina	počet osôb	záver
Vaňuga, P. a kol. (2009)	Slovensko	162 žien (25-40 r.)	vit. D u 49.38 % žien < 30 µg/l (75 nmol/l), rozdiely medzi regiónmi neboli zistené
Zgaga, L. a kol. (2011)	Škótsko	2235 osôb	insuficiencia vit. D bola u 63.4 % osôb
Horani, M. a kol. (2011)	USA, Kalifornia	151 osôb	nedostatok vit. D bol u 19.2 % osôb
Nanri, A. a kol. (2011)	Japonsko	529 osôb	deficiencia vit. D bola u 9.3 % osôb v júli a u 46.7 % v novembri
Kremer, R. a kol. (2009)	Kanada	90 žien	59 % ženskej populácie má nedostatok vit. D
Chailurkit, L. O. a kol. (2011)	Thajsko	2641 osôb	v hlavnom meste Bangkok - insuficiencia vit. D bola u 64.6 % osôb, v ostatných regiónoch Thajska 33.5 %
Batieha, A. a kol. (2011)	Jordánsko, Juhozá- padná Ázia	5640 osôb	insuficiencia vit. D bola u 37.3 % žien a len u 5.1 % mužov, extrémny rozdiel medzi pohlaviami autori dávajú do súvislosti so štýlom obliekania (ženy v Jordánsku chodia zahalené v čiernych habitoch)
Forrest, K. Y., Stuhldreher, W. L. (2011)	USA	4495 detí	insuficiencia vit. D bola u 41.6 % adolescentov
Akman, A. O. a kol. (2011)	Turecko	849 detí	insuficiencia vit. D bola u 33.5 % detí
Absoud, M. a kol. (2011)	Veľká Británia	1102 detí	insuficiencia vit. D u 35 % detí, medzi pohlaviami neboli zistené rozdiely
Suzuki, T. (2011)	Japonsko	1393 žien starších ako 75r.	insuficiencia vit. D u 35.2 % žien

a pacienti s obličkovými a pečeniými diagnózami v obličkách a v pečeni dochádza počas metabolizmu vit. D k hydroxylácii, tieto skupiny pacientov by mohli skresliť uvedené výsledky). Zistili sme, že existujú významné rozdiely medzi rôznymi pohlaviami (tab. 1), ročnými obdobiami (tab. 2), medzi rôznymi vekovými skupinami (tab. 3) a medzi rôznymi regiónmi stredného Slovenska (tab. 4). Za povšimnutie stojí veková kategória detí do 2–3 rokov, ktoré sú suplementované od narodenia Vigantolom, čo sa prejavuje normálnymi hladinami vit. D v organizme.

Z celkového množstva sledovaných pacientov sme ďalej zisťovali, aké majú pacienti s deficitom vit. D (< 37 nmol/l) najčastejšie diagnózy. Na prvých miestach skončili imunodeficientné diagnózy (D84, D80, D81) – 21.9 %, ochorenia obličiek (N08, N11, N18, N28) – 21.7 %, IDDM a NIDDM (E10, E11) – 17.4 %, alergie a astma (J30, J45) – 10.3 %, reumatoidná artritída a osteoporóza (M05, M80, M81) – 9.5 %. Vo všeobecnosti sa hladiny vit. D < 37 nmol/l (< 15 ng/ml) označujú ako ťažká deficiencia vit. D, hladiny v rozpätí 37–75 nmol/l (15–30 ng/ml) ako insuficiencia vit. D a za optimálne sa považujú hladiny vit. D v rozpätí 75–200 nmol/l (30–80 ng/ml). Vzhľadom na extrémne nízke hladiny vit. D v celosvetovej populácii by sa mali hladiny vit. D pohybovať aspoň na úrovni 50–80 nmol/l (20–32 ng/ml).

Deficit vitamínu D ako globálny problém

Deficit vit. D je rozšírený nielen na Slovensku, ale na celom svete.

V tabuľke č. 5 sú zhrnuté na ukážku niektoré z množstva štúdií, ktoré boli na tému deficitu vit. D publikované. Jednotlivé údaje potvrdzujú fakt, že deficit vit. D je rozšírený nielen v severských krajinách, kde je menej slnka, ale aj v slnečných krajinách, aj keď v oveľa menšej miere. Nedostatok vit. D sa prejavuje dráždivosťou, nervozitou, depresiami, pesimizmom, návalmi tepla, nočným potením, kŕčami v nohách. Vitamín D je jeden z mnohých faktorov, ktorý má rozhodujúcu úlohu v prevencii autoimunitných ochorení kardiovaskulárnych, imunitných, infekčných ochorení, v prevencii rakoviny, osteoporózy, obezity, plešatosti a mnohých ďalších ochorení.

Príčiny nedostatku vitamínu D a jeho suplementácia

Prečo je taký rozšírený nedostatok vit. D v celosvetovej populácii? Treba poznamenať, že to nie je chyba analytiky, laboratórne výsledky podliehajú pravidelnej internej a externej kontrole kvality. Nedostatok vit. D sa dáva do súvislosti s tým, že máme nedostatok slnečného žiarenia resp. sa nesprávne slníme, žijeme v uzavretých priestoroch ako sú práca, byty, posilňovne, nákupné centrá a pod. pod umelým osvetlením a máme stravu chudobnú na vit. D. Príroda je však taká dokonalá, že prináša účinnú pomoc pre obyvateľov severských oblastí, kde je menej slnka a to v podobe tučných severských rýb obsahujúcich väčšie množstvo prirodzenej formy vit. D v rybom tuku. Niektoré krajiny pristúpili

za účelom minimalizovania deficitu vit. D v populácii k fortifikácii potravín (Houghton *a kol.*, 2011), v Kanade sa fortifikuje všetko tekuté mlieko. U nás fortifikácia potravín podlieha Nariadeniu Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1925/2006 (novelizácia nariadenia č. 108/2008), ktorého cieľom je regulovať pridávanie fortifikantov do potravín. Fortifikanty sa nesmú pridávať do nespracovaných potravín ako je ovocie, zelenina, mäso, alkohol... Potraviny, ktoré sú fortifikované musia byť riadne označené, čiže by sa nám nemalo stať, že kúpime výrobok, ktorý je fortifikovaný a nevedeli by sme o tom. Na Slovensku sú z potravín fortifikované vitamínom D napr. rastlinné maslá ako je Rama, Perla, Flóra, detské mlieko Nutrilon, syrokrem Karička a iné. Živočíšne maslá (Liptov, Rajo), mlieko (Tatra, Rajo, Lactel, Acidko, Rajo-vanilka, Tesco), cereálie (4 druhy), syrokremy Lunex a Bambino atď. fortifikované vit. D nie sú. Neznamená to ale, že by sme mali teraz uprednostňovať potraviny fortifikované vit. D, len preto aby sme pre náš organizmus zabezpečili viac vit. D. Je potrebné zamerať sa na prirodzenú formu dopĺňania vit. D do organizmu ako je dostatočné a správne slnenie a strava bohatá na vit. D, jedná sa najmä o ryby zo severských morí (lososy, slede, sardinky, tresky), tresčiu pečeň, vajíčka, huby sušené na slnku a pod. Čo pre nás znamená dostatočne a správne sa slniť? Dostatočne sa slniť znamená 2–3 ×/týždeň cca 15–30 min., ľudské telo si vie za takýto čas vyrobiť približne 10 000–12 000 IU vit. D, takáto zásoba vit. D vydrží pre organizmus asi na 2–4 mesiace (Godar *a kol.*, 2011). Pri dostatočnom slnení človek nepotrebuje prijímať vit. D vo forme vitamínových doplnkov. Čo pre nás znamená správne sa slniť? Vit. D sa vstrebáva cez kožu do tela len za určitých podmienok: ak vzduch nie je príliš vlhký, ak sme sa pred a po slnení neumývali, krémy na opaľovanie blokujú produkciu vit. D v koži (už opaľovací krém s faktorom 8 znižuje syntézu vit. D o 95 %), preto by sme sa mali natierať opaľovacími prípravkami až po 15–30 min. slnenia. Vitamín D vytvorený pri opaľovaní nie je pre organizmus toxický, pretože nadbytočné množstvo takto vytvoreného vit. D sa v pokožke okamžite rozkladá. Smog a mraky znižujú účinnosť UV žiarenia, preto obyvatelia miest s vysokou automobilovou dopravou by mali zvýšiť množstvo prijatého vit. D v potrave, alebo zabezpečiť vhodnú suplementáciu vit. D pre organizmus vo forme vitamínových doplnkov, taktiež sa to týka aj ľudí pracujúcich v noci alebo v tme (baníci) (Chailurkit *a kol.*, 2011). Zaujímavé je, že ľudia so svetlejšou pokožkou môžu využiť až 70 % slnečného žiarenia, s tmavšou pleťou iba 3–30 %, výskumy to aj potvrdzujú, u černochovo a Hispáncovo bol zaznamenaný väčší deficit vit. D ako u belochovo (u ľudí s tmavšou pleťou pôsobí pokožka ako filter) (Farrar *a kol.*, 2011, Van Horn *a kol.*, 2011). Obezita ovplyvňuje nedostatok vit. D v organizme, pretože vit. D je rozpustný v tukoch, takže obézni ľudia nezabezpečia pre organizmus dostatočné množstvo vit. D len slnením (Moy, 2011). Schopnosť organizmu

syntetizovať vit. D slnením sa znižuje so zvyšujúcim sa vekom, čo potvrdzujú aj naše výsledky. Preto u starších ľudí je potrebné zväziť okrem stravy obsahujúcej dostatok vit. D aj suplementáciu vitamínovými doplnkami.

Optimálne dávky vitamínu D

Denná dávka vit. D sa nedá presne stanoviť, lebo tvorba vit. D v tele prostredníctvom slnečného žiarenia je závislá od mnohých ťažko odhadnuteľných faktorov ako je intenzita slnečného žiarenia, pigmentácia pokožky, dĺžka slnenia, preto je potrebné dávkovanie vit. D voliť individuálne a súčasne zohľadniť fakt, že variácia koncentrácie medzi dňami je cca 20%. Doporučená denná dávka pre ľudí do 50 rokov je min. 200 IU vit. D/denne, od 50–70 rokov je to 400 IU a nad 70 rokov je to 600 IU denne, zvýšená dávka tolerovaná v EÚ aj v USA je aj 2 000 IU vit. D denne t.j. 50 µg (prevodný vzťah je nasledovný: 40 IU * 0.025 = 1 µg vit. D). Klinické testy však ukazujú, že tieto dávky sú veľmi nízke, stačia na zabránenie deformácií chrbtice a opornej sústavy, ale v praxi by mala byť dávka vit. D zvýšená až na organizmom dobre tolerovanú dávku 125–250 µg/denne (5 000–10 000 IU/denne). Nemusíme sa báť, že by sme sa predávkovali, pretože syntetický vit. D môže byť pre dospelý organizmus toxický pri konzumácii dávky 25 000–40 000 IU/deň vo veľmi dlhých periódach po dobu niekoľkých týždňov až mesiacov (Binkley a kol., 2011; Cogan, 2011; Parvaiz a kol., 2011; Sainaghi a kol., 2011; Toss a Magnusson, 2011). Pozor, u malých detí môže príznaky hypervitaminózy vyvolať už dlhodobá denná dávka vit. D v množstve 1 800 IU, najzávažnejšie sa potom prejavuje postihnutím obličiek (predčasne narodené deti by mali byť suplementované max. 200–400 IU vit. D/denne, deti do 6 mesiacov by mali užívať max. 1 000 IU/denne, deti od 6–12 mesiacov max. 1 500 IU vit. D/denne) (Hatun a kol., 2007; Ferenczová a Podracká, 2010; Gallo a kol., 2010; Mutlu a kol., 2011). Na Slovensku podľa najnovších odporúčaní aplikujeme deťom profylakticky 600–800 IU vit. D/denne už od 2. týždňa života optimálne až do 3 rokov života dieťaťa, čo potvrdzuje aj naše vyhodnotenie hladín vit. D v jednotlivých vekových kategóriách. Opatrne je potrebné voliť aj suplementáciu vit. D u tehotných, malo by to byť 400–800 IU vit. D/denne, v poslednom trimestri aj 1 000 IU/denne (Ringrose a kol., 2011). Vedci z Južnej Karolíny síce zistili, že ani užívanie vit. D v množstve 2 000–6 000 IU/denne pre tehotné nemalo žiadne negatívne účinky, napriek tomu je vhodné pri týchto rizikových kategóriách ako sú deti a tehotné zvažovať dávkovanie vit. D veľmi triezvo. V tomto výskume z roku 2009 vedci zistili, že vit. D môže znížiť aj riziko predčasného pôrodu. Prvej skupine tehotných podávali 4 000 IU vit. D/denne počas troch mesiacov tehotnosti, druhej skupine len 400 IU/denne podľa odporúčaní vlád USA a Veľkej Británie. Účastníčky boli monitorované prostredníctvom krvných testov a vzoriek moča tak, aby sa zaručili hladiny vápnika a vit. D v rámci bezpečných limitov. U žien, ktoré

užívali 4 000 IU vit. D/denne sa znížilo riziko predčasného pôrodu o polovicu v porovnaní s druhou skupinou, ktorá užívala 400 jednotiek vit. D/denne (Finer a kol., 2011). Nadbytok resp. predávkovanie vit. D sa prejavuje nechutenstvom, stratou hmotnosti, svalovou slabosťou, kovovou chuťou v ústach, bolesťami hlavy a brucha, hnačkou, apatiou, spavosťou. Nadbytok vit. D v organizme má za následok nadmerné zadržiavanie kalcia a fosforu a ukladanie vápenatých solí v mäkkých tkanivách (tepny, obličky, srdce, pľúca), kde tvoria zväpenatené ložiská spôsobujúce trvalé poškodenie týchto orgánov.

ZÁVER

Záverom možno konštatovať, že väčšina celosvetovej populácie vrátane Slovenska (viď tab. 1, 2, 3 a 4) trpí nedostatkom vit. D, ktorý je spôsobený najmä „moderným životným štýlom“, nesprávnym slnením a stravou chudobnou na vit. D. Vitamín D by v konečnom dôsledku mohol slúžiť ako jeden z viacerých potenciálnych preventívnych markerov pri diagnostike viacerých ochorení, resp. by mohol spolu s ďalšími faktormi znižovať riziko vzniku týchto ochorení. Netreba však zabúdať na pravidlo „Všetko s mierou!“, pretože tak, ako je nebezpečné slnenie v poludňajších hodinách, tak je nebezpečné aj nadmerné užívanie vitamínov, preto je vhodnejšie zamerať sa na prirodzenú formu suplementácie vit. D vo forme stravy bohatej na vit. D a na zdravé slnenie mimo poludňajších hodín, vitamín D sa často označuje aj ako „sunshine vitamin“. Na základe množstva citácií sa zdá, že vit. D by bol v skutočnosti lepším liekom, resp. prevenciou proti množstvu ochorení ako samotné lieky vyvinuté pre tento účel, ale odstránenie deficitu vit. D v populácii by pravdepodobne výrazne zredukovalo zisky farmaceutického priemyslu, ktorý, ako sa zdá, dnes ovláda západnú medicínu. Len čas ukáže, či problematika vitamínu D je iba ďalší „boom v laboratórnej diagnostike“, alebo sa jedná v skutočnosti o nedocenený vitamín, ktorý súvisí s množstvom ochorení. Vitamín D niektorí autori úsmevne prirovnávajú „k starému vínu v novej fľaši“. Vzhľadom na fakt, že deficit vitamínu D je rozšírený u ľudí na celom svete, je snahou rôznych štúdií zmapovať aký dopad môže mať tento deficit na zdravie obyvateľstva. Je teda na každom z nás, ako sa k vitamínu D postavíme.

Na základe nameraných hladín vit. D v našej populácii a ďalších zistení v odbornej literatúre sa prikláňame k tomu, že je potrebné odporúčať suplementáciu vitamínu D nielen u detí, ale u celej populácie, pretože sa zdá, že vitamín D, spolu s ďalšími faktormi, môže mať nezanedbateľný preventívny účinok pri vzniku, resp. rozvoji mnohých ochorení a stanovovanie jeho hladiny je možné využiť pri predikcii možných zdravotných komplikácií.

Aj keď sa niekomu môže zdať, že vit. D je „liek na všetko“, netreba zabúdať na fakt, že samotný vit. D nie je všemocný a bez dodržiavania správneho ži-

votného štýlu ako je zdravá strava, pravidelný pohyb resp. cvičenie a minimalizovanie stresu by sme ťažko mohli čakať prevratné úspechy, na druhej strane však množstvo štúdií o vit. D len dokazuje skutočnosť, že vit. D môže mať pre náš organizmus neoceniteľný úžitok.

LITERATÚRA

1. Absoud, M., Cummins C., Lim, M. J., Wassmer E., Shaw N. (2011): Prevalence and predictors of vitamin D insufficiency in children: a Great Britain population based study. *PLoS One*, Jul 2011, 6(7): e22179.
2. Amor, K. T., Rashid, R. M., Mirmirani, P. (2010): Does D matter? The role of vitamin D in hair disorders and hair follicle cycling. *Dermatol. Online J.*, Feb 15, 16(2): 3.
3. Aranow, C. (2011): Vitamin D and the immune system. *J. Investig. Med.* Aug, 59(6): 881–886.
4. Batieha, A., Khader, Y., Jaddou, H., Hyassat, D., Batieha, Z., Khateeb, M., Belbisi, A., Ajlouni, K. (2011): Vitamin D status in Jordan: dress style and gender discrepancies. *Ann. Nutr. Metab.* 58(1): 10–18.
5. Bjelakovic, G., Gluud, L. L., Nikolova, D., Whitfield, K., Wetterslev, J., Simonetti, R. G., Bjelakovic, M., Gluud, C. (2011): Vitamin D supplementation for prevention of mortality in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.*, Jul, 6(7): CD007470.
6. Binkley, N., Gemar, D., Engelke, J., Gangnon, R., Ramamurthy, R., Krueger, D., Drezner, M. K. (2011): Evaluation of ergocalciferol or cholecalciferol dosing, 1,600 IU daily or 50,000 IU monthly in older adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Apr, 96(4): 981–988.
7. Bischoff-Ferrari, H. A. (2011): Vitamin D-role in pregnancy and early childhood. *Ann. Nutr. Metab.* 59(1): 17–21.
8. Bonakdaran, S., Varasteh, A. R. (2009): Correlation between serum 25-hydroxy vitamin D3 and laboratory risk markers of cardiovascular diseases in type 2 diabetic patients. *Endocrine Abstracts*, 20: p. 371.
9. Brock, K., Huang, V. V. Y., Fraser, D. R., Ke, L., Tseng, M., Stolzenberg-Solomon, R., Peters U., Ahn, J., Purdue, M., Mason, R. S., McCarty, C., Ziegler, R. G., Graubard, B. (2010): Low vitamin D status is associated with physical inactivity, obesity and low vitamin D intake in a large US sample of healthy middle-aged men and women. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Jul, 121 (1–2): 462–466.
10. Cogan, E. (2011): Vitamin D supplementation: why and how? *Rev. Med. Brux.*, Sep., 32(4): 353–361.
11. Covic, A., Apetrii, M. (2011): Vitamin D receptor activation: clinical outcomes. *Contrib. Nephrol.*, May 23, 171: 166–171.
12. Denzer, N., Vogt, T., Reichrath, J. (2011): Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and skin cancer: A systematic review. *Dermatoendocrinol.*, Jul 3(3): 205–210.
13. Donkena, K. V., Young, C. Y. (2011): Vitamin D, sunlight and prostate cancer risk. *Adv. Prev. Med.* 2011: 281863, Epub 2011 Jun 8.
14. Farrar, M. D., Kift, R., Felton, S. J., Berry, J. L., Durkin, M. T., Allan, D., Vail, A., Webb, A. R., Rhodes, L. E. (2011): Recommended summer sunlight exposure amounts fail to produce sufficient vitamin D status in UK adults of South Asian origin. *Am. J. Clin. Nutr.*, Nov, 94(5): 1219–1224.
15. Ferenczová, J., Podracká, E. (2010): Antirachitický účinok vitamínu D – praktické odporúčania pre pediatrickú prax. *Pediatr. prax*, 11(1): 22–24.
16. Finer, S., Khan, K. S., Hitman, G. A., Griffiths, C., Martineau, A., Meads, C. (2011): Inadequate vitamin D status in pregnancy: evidence for supplementation. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, Oct 18.
17. Fletcher, J. M., Basdeo, S. A., Allen, A. C., Dunne, P. J. (2011): Therapeutic Use of Vitamin D and its Analogues in Autoimmunity. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, Nov. 28.
18. Friedecký, B., Vávrová, J. (2011): Stanovení 25-hydroxyvitamínu D v séru/plazmě – minireview. *Klin. Biochem. Metab.*, 19 (40), No. 3: 149–154.
19. Forrest, K. Y., Stuhldreher, W. L. (2011): Prevalence and correlates of vitamin D deficiency in US adults. *Nutr. Res.*, Jan 31(1): 48–54.
20. Gallo, S., Jean-Philippe, S., Rodd, C., Weiler, H. A. (2010): Vitamin D supplementation of Canadian infants: practices of Montreal mothers. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, Jun, 35(3): 303–309.
21. Garanty-Bogacka, B., Syrenicz, M., Goral, J., Krupa, B., Syrenicz, J., Walczak, M., Syrenicz, A. (2011): Serum 25-hydroxyvitamin D (25-OH-D) in obese adolescents. *Endocrinol. Pol.*, 62(6): 506–511.
22. Gisondi, P., Rossini, M., Di Cesare, A., Idolazi, L., Farina, S., Beltrami, G., Peris, K., Girolomoni, G. (2011): Vitamin D status in patients with chronic plaque psoriasis. *Br. J. Dermatol.*, Oct. 20.
23. Godar, D. E., Pope, S. J., Grant, W. B., Holick, M. F. (2011): Solar UV Doses of Young Americans and Vitamin D3 Production. *Environ. Health Perspect.*, Aug 18.
24. Grant, W. B. (2011): An estimate of the global reduction in mortality rates through doubling vitamin D levels. *Eur. J. Clin. Nutr.*, Sept, 65(9): 1016–1026.
25. Hart, G. R. (2004): Medical conditions Associated with Vitamin D Deficiency and the Clinical Consequences. *Review Series Volume 1*, Sept. P.1–8.
26. Hart, G. R., Furnis, J. L., Laurie, D., Durham, S. K. (2006): Measurement of vitamin D Status: background, clinical use and methodologies. *Clin. Lab.*, 52 (7–8): 335–343.
27. Hatun, S., Bereket, A., Ozkan, B., Coskun, T., Köse, R., Calikoglu, A. S. (2007): Free vitamin D supplementation for every infant in Turkey. *Arch. Dis. Child.*, 92: 373–374.
28. Hewison, M. (2010): Anti-bacterial action of vitamin D. *Endocrine abstracts*, 21: p. 5.2.
29. Hewison, M. (2011): Vitamin D and immune function: an overview. *Proc. Nutr. Soc.*, Aug 18:1–12.

30. Holick, M., (2002): Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes*, 9 (1): 87–98.
31. Horani, M., Dror, A., Holland, D., Caporaso, F., Sumida, K. D., Frisch, F. (2011): Prevalence of vitamin D3 deficiency in orange county residents. *J. Community Health*, Oct 36(5): 760–764.
32. Houghton, L. A., Gray, A. R., Szymlek-Gay, E. A., Heath, A. L., Ferguson, E. L. (2011): Vitamin D-fortified milk achieves the targeted serum 25-hydroxyvitamin D concentration without affecting that of parathyroid hormone in New Zealand toddlers. *J. Nutr.*, Oct., 141(10): 1840–1846.
33. Chailurkit, L. O., Aekplakorn, W., Ongphiphadhanakul, B. (2011): Regional variation and determinants of vitamin D status in sunshine-abundant Thailand. *BMC Public Health*, Nov 10, 11(1): 853.
34. Kang, W., Lee, S., Jeon, E., Yun, Y. R., Kim, K. H., Jang, J. H. (2011): Emerging role of vitamin D in colorectal cancer. *World J. Gastrointest. Oncol.*, Aug 15, 3(8):123–127.
35. Kremer, R., Campbell, P. P., Reinhardt, T., Gilsanz, V. (2009): Vitamin D status and its relationship to body fat, final height and peak bone mass in young women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Jan 94(1): 67–73.
36. Kostoglou-Athanassiou, I., Badila, R. A., Athanassiou, P., Michou, A., Chronaiou, A., Stefanopoulos, D., Terzi, T., Karfi, A. (2010): Vitamin D and glycemic control, *Endocrine Abstracts*, 22: p. 338.
37. Lim, S., Shin, H., Kim, M. J., Ahn, H. Y., Kang, S. M., Yoon, J. W., Choi, S. H., Kim K. W., Song J. H., Choi S. I., Chun, E. J., Shin, C. S., Park, K. S., Jang, H. C. (2011): Vitamin D Inadequacy is Associated with Significant Coronary Artery Stenosis in a Community-Based Elderly Cohort: The Korean Longitudinal Study on Health and Aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Oct. 19.
38. Luong, K. V., Nguyen, L. T. (2006): Vitamin D and cardiovascular disease. *Curr. Med. Chem.*, 13(20): 2443–2447.
39. Malloy, P. J., Feldman, D. (2011): The role of vitamin D receptor mutations in the development of alopecia. *Mol. Cell Endocrinol.*, Dec 5, 347(1–2): 90–96.
40. Mathieu, Ch. (2010): Vitamin D and diabetes. *Endocrine Abstracts*, 22: p. 14.1.
41. Merlino, L. A., Curtis, J., Mikuls, T. R., Cerhan, J. R., Criswell, L. A., Saag, K. G. (2004): Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum.*, 50(1): 72–77.
42. Moy, F. M. (2011): Vitamin D status and its associated factors of free living Malay adults in a tropical country, Malaysia. *J. Photochem. Photobiol. B.*, sept 2, 104(3): 444–448.
43. Mulligan, M. L., Felton, S. K., Riek, A. E., Beranl-Mizrachi, C. (2010): Implication of vitamin D deficiency in pregnancy and lactation. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, May, 202(5):429.
44. Mutlu, G. Y., Kusdal, Y., Ozsu, E., Cizmecioglu, F. M., Hatun, S. (2011): Prevention of vitamin D deficiency in infancy: daily 400 IU vitamin D is sufficient. *Int. J. Pediatr. Endocrinol.*, 2011(1): 4.
45. Nanri, A., Foo, L. H., Nakamura, K., Hori, A., Poudel-Tandukar, K., Matsushita, Y., Mizoue, T. (2011): Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and season-specific correlates in Japanese adults. *J. Epidemiol.*, Sept. 5, 21(5): 346–53.
46. Okuro, M., Morimoto, S. (2011): Frontiers in Vitamin D, Basic Research and Clinical Application. Activated vitamin D in psoriasis. *Clin. Calcium.*, Nov., 21 (11): 1621–1626.
47. Parvaiz, A. K., Sheikh, H. A., Feroze, A., Rafi, A. J., Shah, S. U., Khan, U. H. (2011): Vitamin D toxicity in adults: a case series from an area with endemic hypovitaminosis, D. *Oman. Med. J.*, May, 26(3): 201–204.
48. Paul, G., Brehm, J., Alcorn, J. F., Holguin, F., Aujla, S., Celedón, J. C. (2011): Vitamin D and Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Oct. 20.
49. Pazdiora, P., Svobodova, S., Fuchsova, R., Kucera, R., Prazakova, M., Vrzalova, J., Narsanska, A., Strakova, M., Treskova, I., Pecen, L., Treska, V., Holubec, L. Jr., Pesek, M., Finek J., Topolcan, O. (2011): Vitamin D in colorectal, breast, prostate and lung cancer: a pilot study. *Anticancer Res.*, Oct. 31(10): 3619–3621.
50. Richards, J. B., Valdes, A. M., Gardner, J. P., Paximadas, D., Kimura, M., Nessa, A., Lu, X., Surdulescu, G. L., Swaminathan, R., Spector, T. D., Aviv, A. (2007): Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women. *Am. J. Clin. Nutr.*, Nov. 86(5): 1420–25.
51. Ringrose, J. S., Paus Jenssen, A. M., Wilson, M., Blanco, L., Ward, H., Wilson, T. W. (2011): Vitamin D and hypertension in pregnancy, Jun 1, 34(3): E147–54.
52. Saadi, H. F., Dawodu, A., Afandi, B. O., Zayed, R., Benedict, S., Nagelkerke, N. (2007): Efficacy of daily and monthly high-dose calciferol in vitamin D-deficient nulliparous and lactating women. *Am. J. Clin. Nutr.*, Jun, 85(6): 1565–1571.
53. Sainaghi, P. P., Bellan, M., Carda, S., Cerutti, C., Sola, D., Nerviani, A., Molinari, R., Cisari, C., Avanzi, G. C. (2011): Hypovitaminosis D and response to cholecalciferol supplementation in patients with autoimmune and non-autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatol. Int.*, Nov. 2.
54. Searing, D. A., Leung, D. Y. (2010): Vitamin D in atopic dermatitis, asthma and allergic diseases. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, Aug., 30(3): 397–409.
55. Stecová, A., Bátorová, E., Dobáková, E., Kilán, P. (2009): Comparison of two analytical methods for 25(OH)-vitamin D3 measurement. *Clinical Chemistry and laboratory medicine* 47 (EUROMEDLAB Innsbruck 2009 abstracts): p. 122.
56. Stöckl, D., Slusss, P. M., Thienpont, L. M. (2009): Specification of trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma hydroxyvitamin D analysis. *Clin. Chim. Acta*, 408: 8–13.
57. Tai, S. S., Bedner, M. (2010): Development of a candidate reference measurement procedure for the determi-

- nation of 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 82: 1942–1948.
58. **Thomas, S. D., Fudge, A. N., Whiting, M., Coates, P. S. (2011):** The correlation between third-trimester maternal and newborn-serum 25-hydroxy. Vitamin D in a selected South Australian group of newborn samples. *B. M. J.*, Jan.1, 1(2): e000236.
59. **Toss, G., Magnusson, P. (2011):** Is daily supplementation with 40 microgram vitamin D3 sufficient? A randomised controlled trial. *Eur. J. Nutr.*, Nov. 16.
60. **Van Horn, L. V., Bausermann, R., Affenito, S., Thompson D., Striegel-Moore, R., Franko, D., Albertson, A. (2011):** Ethnic differences in food sources of vitamin D in adolescent American girls: the National Heart, Lung and Blood Institute Growth and Health study. *Nutr. Res.*, Aug, 31(8): 579–585.
61. **Vaňuga, P., Killinger, Z., Masaryk, P., Tomková, S., Kmecová, Z., Spustová, V., Stecová, A., Payer, J. (2009):** Vitamin D levels in young healthy premenopausal females in Slovakia. *Endocrine Abstracts*, 20: p. 266.
62. **Varsavsky, M., Reyes-García, R., Cortés-Berdonces, M., García-Martin, A., Rozas-Moreno, P., Muñoz-Torres, M. (2011):** Serum 25 OH vitamin D concentrations and calcium intake are low in patients with prostate cancer. *Endocrinol. Nutr.*, Oct. 18.
63. **Zgaga, L., Theodoratou, E., Farrington, S. M., Agakov, F., Tenesa, A., Walker, M., Knox, S., Wallace, A. M., Cetnarskyj, R., McNeill, G., Kyle, J., Porteous, M. E., Dunlop, M. G., Campbell, H. (2011):** Diet, environmental factors and lifestyle underlie the high prevalence of vitamin D deficiency in healthy adults in Scotland, and supplementation reduces the proportion that are severely deficient. *J. Nutr.*, Aug, 141(8): 1535–1542.
64. **Zhu, H., Guo, D., Li, K., Pedersen-White, J., Stallmann-Jorgensen, I. S., Huang, Y., Parikh, S., Liu, K., Dong, Y. (2011):** Increased telomerase activity and vitamin D supplementation in overweight African Americans. *Int. J. Obes.*, Oct. 11.

ČO VEDIA O LABORATÓRIU A KVALITE SÚČASNÍ ŠTUDENTI MEDICÍNY A AKÉ SÚ PERSPEKTÍVY V ĎALŠOM VZDELÁVANÍ

Ladislav Turecký

Ústav lekárskej chémie, biochémie
a klinickej biochémie LF UK, Bratislava

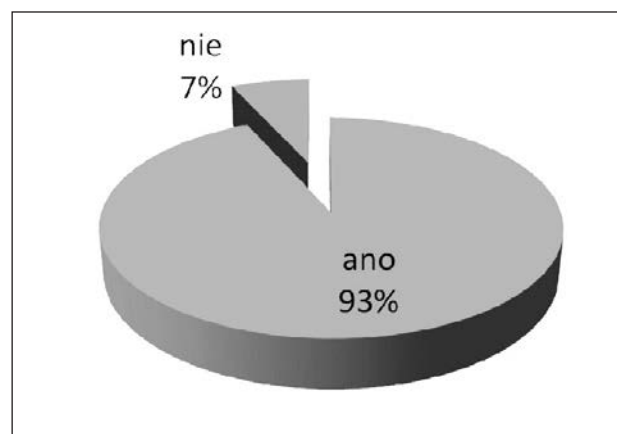
Kontakt: Prof. MUDr. Ladislav Turecký, CSc.
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK
Sasinkova 2, 813 72 Bratislava

Klinická biochémia je jedným zo základných lekárskejších odborov. Ide o aplikovanú formu biochémie, ktorá za pomoci znalostí z patobiochémie a na základe zistenia zmien hladín rôznych analytov v telových tekutinách, prispieva ku stanoveniu diagnózy ochorenia, jeho prognózy i monitorovania úspešnosti liečby. Klinická biochémia tak zohráva dôležitú úlohu v diagnostickom procese. Podiel informácií poskytovaných klinicko-biochemickými vyšetreniami predstavuje až 70% zo všetkých informácií získavaných laboratórnymi vyšetreniami.

Klinická biochémia bola v prvých obdobiach súčasťou internej medicíny. Pribúdaním nových poznatkov, rozširovaním palety laboratórných vyšetrení ako aj búrlivým rozvojom analytických techník sa prejavila potreba osamostatnenia sa klinickej biochémie ako samostatného odboru. Tento trend sa výraznejšie prejavil v 50-tych a 60-tych rokoch. Klinická biochémia sa sformovala ako samostatný medicínsky odbor s vlastnými oddeleniami v zdravotníckych zariadeniach a s možnosťou postgraduálneho vzdelávania a získania samostatnej atestácie z odboru klinická biochémia. Napriek vytvoreniu samostatného medicínskeho odboru s postgraduálnou výchovou špecialistov v tomto odbore sa však klinická biochémia nedostávala výraznejšie do pregraduálnej výchovy nových lekárov. Jedným z faktorov, ktoré k tomu prispievali bolo aj relatívne malé zastúpenie lekárov na pracoviskách ústavov lekárskej biochémie na lekárskejších fakultách, a z toho aj vyplývajúce viac prírodovedné chápanie výuky biochémie pri výučbe medikov. Ďalším faktorom bola nevlá učiteľov klinických predmetov pre vytvorenie priestoru pre výučbu klinickej biochémie ako samostatného predmetu, lebo boli presvedčení, že oni sami sú schopní vyučovať klinickú biochémiu v rámci svojich predmetov.

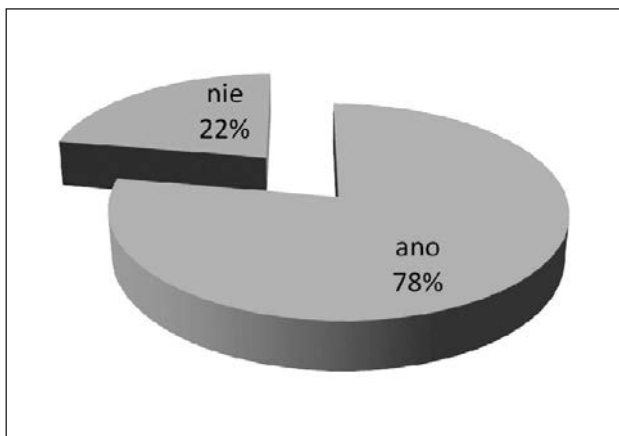
V tomto svojom príspevku by som sa chcel v krátkosti venovať analýze aktuálnych znalostí študentov z vyšších ročníkov Lekárskej fakulty UK v Bratislave o klinickej biochémii a kontrole kvality práce na oddeleniach klinickej biochémie.

Prezentované výsledky sme získali formou písomnej anonymnej ankety, ktorú sme uskutočnili v októbri 2011 medzi poslucháčmi 4. a 5. ročníka všeobecného lekárstva, ktorí sa prihlásili na povinne voliteľný predmet „Klinická biochémia“. išlo teda o študentov, ktorí aktívne prejavili záujem o problematiku klinickej biochémie. Bolo odovzdaných 76 anketových lístkov, ktoré boli vyhodnotené a v ďalšej časti by som si dovoľil prezentovať časť výsledkov tejto analýzy.



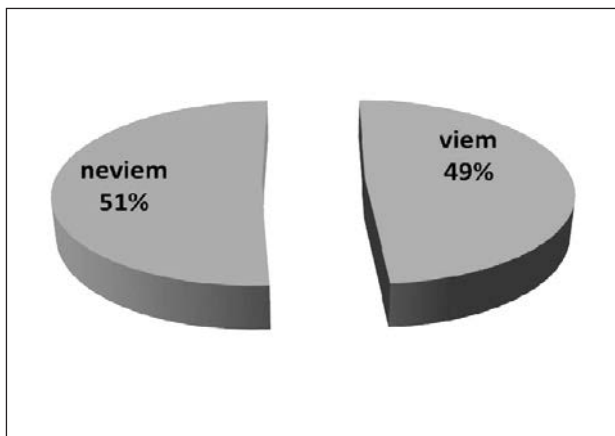
Otázka č.1

S problematikou klinicko-biochemických vyšetrení som sa stretol okrem biochémie aj na iných predmetoch.



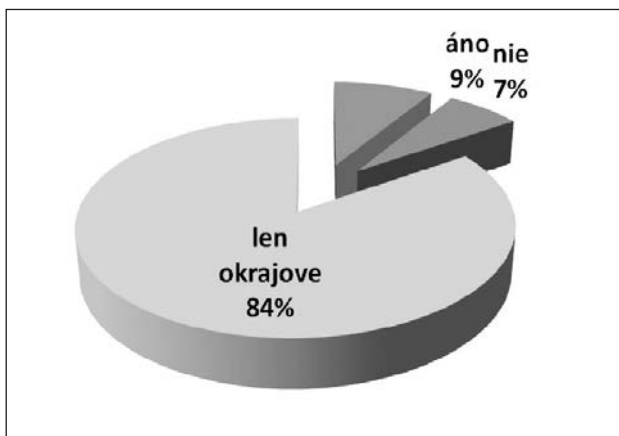
Otázka č. 2

O indikácii klinicko-biochemických vyšetrení nám hovoriť aj na iných predmetoch.



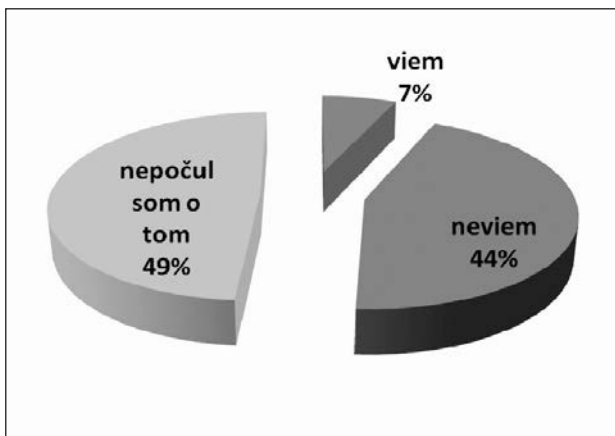
Otázka č. 5

Ako získavame referenčné hodnoty?



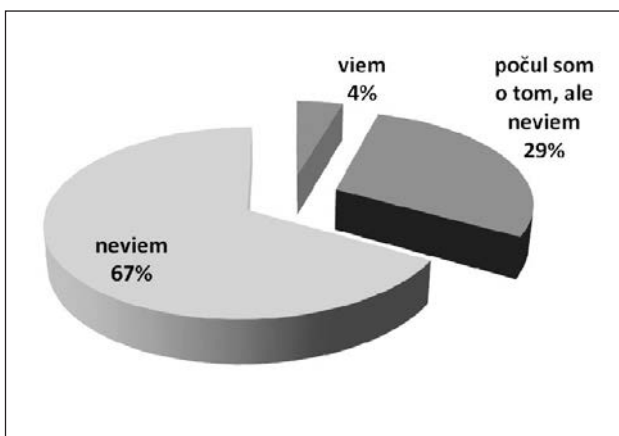
Otázka č. 3

Problematiku klinicko-biochemických vyšetrení nám širšie objasnili počas letnej praxe.



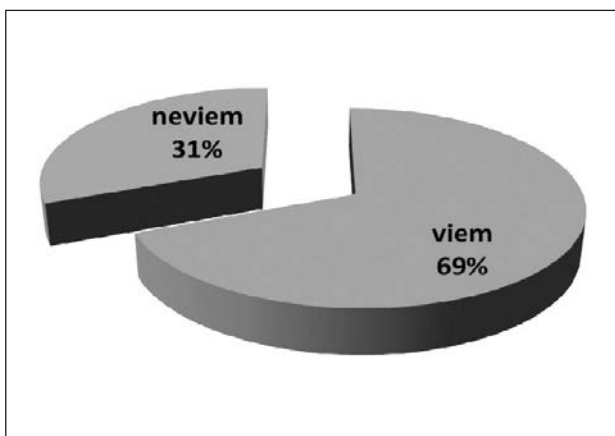
Otázka č. 6

Čo znamená presnosť vyšetrenia?



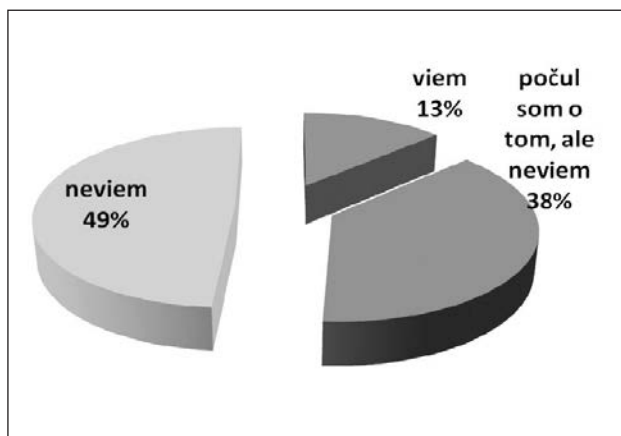
Otázka č. 4

Čo je predanalytická fáza vyšetrenia?

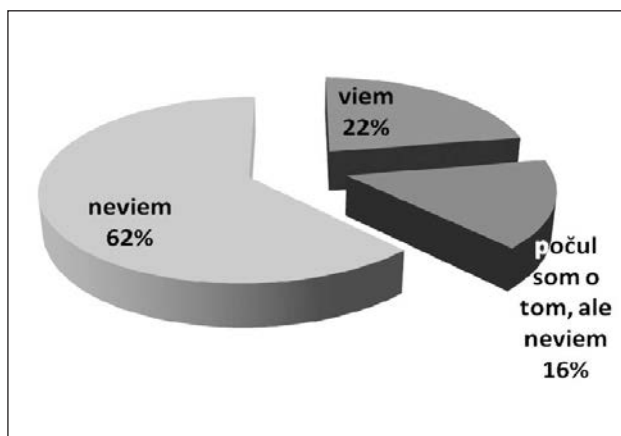


Otázka č. 7

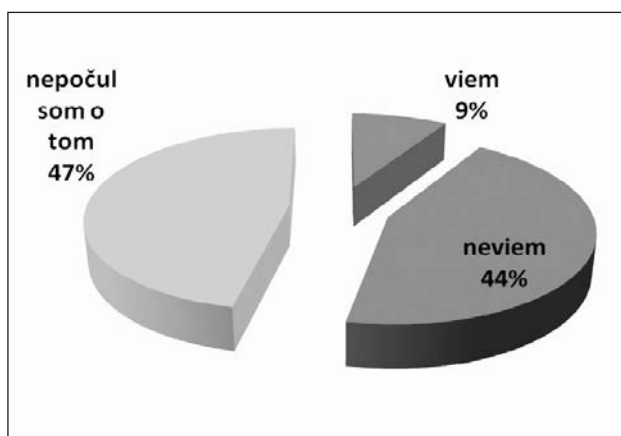
Čo je prediktívna hodnota vyšetrenia?



Otázka č. 8
Čo je „cito“ vyšetrenie?



Otázka č. 9
Čo je interná kontrola kvality na oddelení klinickej biochémie?



Otázka č. 10
Čo je externá kontrola kvality a ako sa robí?

Ako vidno z prezentovaných výsledkov, vedomosti študentov o pojmoch týkajúcich sa klinicko-biochemických vyšetrení sú pomerne slabé a vedomosti o kontrole kvality práce v klinicko-biochemickom laboratóriu sú prakticky mizivé (menej ako 10 % má o tom predstavu). Aj tieto fakty podporujú potrebu zabezpečiť výuku klinickej biochémie v pregraduálnej príprave nových lekárov.

Na Lekárskej fakulte UK v Bratislave sme začali s výučbou klinickej biochémie v školskom roku 1996/1997 vo forme povinnej voliteľného predmetu. Študenti 4. a 5. ročníka si povinne volia jeden voliteľný predmet v danom ročníku. Skutočnosť, že aj samotní študenti považujú klinickú biochémiu za predmet potrebný pre svoje ďalšie vzdelávanie, sa odráža na pomerne značnom počte študentov zapísaných na tento predmet. V súčasnosti je k dispozícii poslucháčom 4. a 5. ročníka LFUK 22 rôznych povinne voliteľných predmetov. Počet prihlásených študentov sa v posledných štyroch školských rokoch pohybuje okolo 100–140 študentov, čo predstavuje asi 20–25 % zo všetkých študentov zapisujúcich si povinne voliteľný predmet. V rámci výuky predmetu „Klinická biochémia“ ponúkame poslucháčom základy všeobecnej klinickej biochémie (predanalytická fáza vyšetrenia, hodnotenie výsledkov biochemického vyšetrenia a referenčné hodnoty, interná a externá kontrola kvality) ako aj základy indikácie a interpretácie jednotlivých laboratórnych vyšetrení (tab.1). Výuke povinne voliteľných predmetov je vymedzený 1 semester v rozsahu 24 hodín prednášok.

Naším ďalším cieľom je presadiť výuku klinickej biochémie ako povinného predmetu pre všetkých poslucháčov všeobecného lekárstva. Bohužiaľ, tento cieľ je ešte značne vzdialený, lebo celkový počet výučbových hodín je veľmi problematické zvyšovať a klinické predmety si pomerne húževnato strážia svoje hodiny a nejavia ochotu časť tohto priestoru poskytnúť pre zaradenie nového predmetu. Zároveň postavenie klinickej biochémie ako samostatného výučbového predmetu zhoršujú aj súčasné trendy v našom zdravotníctve, kde oddelenia klinickej biochémie boli sprivatizované a postupne strácajú charakter rovnocenného partnera pre klinické oddelenia a menia sa na jednoduché servisné zariadenia produkujúce len výsledky biochemických vyšetrení.

Tab. 1. Syllabus prednášok povinnej voliteľného predmetu „Klinická biochémia“

<u>1. týždeň</u> Základy všeobecnej klinickej biochémie. Predanalytická fáza vyšetrenia. Spôsoby hodnotenia výsledkov vyšetrení, referenčné hodnoty. Kontrola kvality práce.
<u>2. týždeň</u> Plazmatické bielkoviny. Využitie vyšetrenia plazmatických bielkovín v diagnostike.
<u>3. týždeň</u> Základy klinickej enzymológie. Klinicky dôležité enzýmy a ich význam v diagnostike.
<u>4. týždeň</u> Poruchy metabolizmu lipoproteínov. Hyperlipoproteinémia a ich diagnostika. Rizikové faktory aterosklerózy a ich vyšetovanie.
<u>5. týždeň</u> Poruchy regulácie glykémie. Využitie laboratórných vyšetrení pri diagnostike a monitorovaní liečby pacienta s <i>diabetes mellitus</i> .
<u>6. týždeň</u> Laboratórne vyšetrenia v diagnostike gastroenterologických ochorení.
<u>7. týždeň</u> Laboratórne vyšetrenia a ich význam v hepatológii.
<u>8. týždeň</u> Vyšetrenie moču a laboratórne vyšetrenia a ich význam pri ochoreniach obličiek.
<u>9. týždeň</u> Význam laboratórných vyšetrení u pacientov s onkologickými ochoreniami. Onkomarkery.
<u>10. týždeň</u> Poruchy acidobázickej rovnováhy a ich diagnostika.
<u>11. týždeň</u> Význam laboratórných vyšetrení v kardiológii. Enzýmové a neenzýmové kardiomarkery.
<u>12. týždeň</u> Základy laboratórnej diagnostiky v endokrinológii.

PANCREATIC BETA CELL REGENERATION AS A PERSPECTIVE OF DEFINITIVE CURE OF *DIABETES MELLITUS*

REGENERÁCIA BETA BUNIEK AKO PERSPEKTÍVA VYLIEČENIA *DIABETES MELLITUS*

Koska Péter¹, Kiss-Tóth Éva¹, Juhászné Szalai Adrienn¹, Kiss-Tóth Emőke³, Szebeni János¹
Rácz Olivér^{1,3}, Kováts L. Gábor⁴, Barkai László², Fodor Bertalan¹

¹Department of Nanobiotechnology and Regenerative Medicine
Faculty of Health Care, University of Miskolc, Hungary

²Department of Theoretical Health Sciences, Faculty of Health Care, University of Miskolc, Hungary

³Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Šafárik University, Košice, Slovakia

⁴Institute of Laboratory Medicine, Medical Faculty and Institute of Diagnostics
Health Science Faculty, University of Pécs, Hungary

Kontakt: koska.peterx.hu

ABSTRACT

The clinical manifestation pattern of both type 1 and type 2 diabetes is progressive because of the continuous decrease of pancreatic beta cell population. Although recent therapeutic strategies do not offer solution for arresting beta cell loss, several *in vitro* and preclinical studies support the fact that endocrine pancreas has a considerable ability of renewal and regeneration. Following partial destruction of the pancreas intense neogenesis of beta cells was observed in the remnant pancreas. New beta cells can be formed by beta cell replication, transdifferentiation of alpha cells or acinar cells, and via neogenesis from periductal precursor cells.

This overview provides an insight into the cell biology of the beta cell renewal in the pancreas. It can be the basis of future therapeutic strategies facilitating endogenous beta cell regeneration by pharmacological means. Therapeutic approaches focusing on preservation of the residual beta cells in already diabetic patients have great importance, too.

Successful regenerative therapies of *diabetes mellitus* are already on the horizon.

SÚHRN

Klinická manifestácia obidvoch hlavných typov *diabetes mellitus* má progresívny charakter zapríčinený

kontinuálnym poklesom počtu beta buniek. Hoci dnešné terapeutické stratégie neposkytujú riešenie na zastavenie straty beta buniek, mnohé *in vitro* a preklinické štúdie podporujú názor, že endokrinný pankreas má významnú schopnosť obnovy a regenerácie. Po čiastočnom zničení pankreasu je možné pozorovať intenzívnu neogenézu beta buniek v ponechanom tkanive. Nové beta bunky sa môžu tvoriť replikáciou beta buniek, transdiferenciáciou alfa alebo acinárnych buniek, alebo neogenézou z peridukálnych prekursorových buniek.

Tento prehľad poskytuje obraz o bunkovej biológii obnovy beta buniek v pankrease. Tento pochod môže byť základom budúcich terapeutických stratégií umožňujúcich ich endogénnu regeneráciu farmakologickou cestou. Terapia zameraná na zachovanie reziduálnych beta buniek u už diabetických chorých má takisto veľký význam.

Úspešná regeneratívna liečba *diabetes mellitus* je už na horizonte.

INTRODUCTION

Although the etiology and the clinical symptomatology of type 1 and type 2 diabetes are different, both are progressive pathophysiological conditions. In the course of these diseases the number of islet beta cells decrease gradually – the difference is in the etiology and the rate of the decrease. Type 1 *diabetes mellitus* manifests if more than 90 % of insulin-producing cells

are destroyed. In patients with impaired glucose tolerance the degree of the beta cell loss accounts about 50 percent, which reaches 65 % in the case of type 2 diabetes. (Gepts *et al.*, 1965; Meier *et al.*, 2005; Butler *et al.*, 2003)

Despite all recent progress in insulin treatment (including closed-loop delivery systems) and of oral antidiabetic therapy (introducing new types of drugs as e.g. incretins) the overall situation in glycaemic compensation of diabetic patients and in prevalence of vascular complication is far from satisfactory. There are many treatments of diabetes but the only cure is pancreas or islet cell transplantation.

An unanswered old question and yet unexploited possibility is the regeneration of islet cells. Several experimental data have demonstrated the fact that the pancreas has considerable regenerative capacity. In healthy persons beta cells continuously decay through apoptotic mechanism and the lost cells are replaced by newly formed ones (Scaglia *et al.*, 1997). Following experimental diabetes induced by chemical agents (alloxan, streptozotocin) or partial pancreatectomy newly formed beta cells have been observed in the remnant pancreas of the animals recovered from hyperglycemia (Gianini, 2011). The regeneration of the pancreas was the probably culprit already in Brunner's unsuccessful experiments to produce any disease after pancreatectomy in dogs in the 16th century (Brunner, 1683). Obesity and also physiologic pregnancy induce increase in the beta cell mass triggered by the excessive metabolic requirements in these conditions. The fact that regenerative capacity of pancreas is retained even in human type 1 diabetes is supported by the phenomenon of insulin independent "honeymoon" period shortly after onset of the disease. Residual beta cells have been observed in the autopsy specimens derived from long standing diabetes. Even these residual beta cells associated with minimal insulin secretion significantly decrease the risk of both short and long-term complications (ketoacidosis, hypoglycemia, nephropaty and neuropathy) of type 1 diabetes related to those patients lack of residual beta cells. (Martin *et al.*, 1992; Steffes *et al.*, 2003)

Recently new approaches have been investigated focusing on the restoration of endogenous insulin production by means of the regeneration of beta cells by administration of growth factors.

For this reason the main perspective goal of the new therapeutic strategies in both type 1 and type 2 diabetes is preventing the destruction of residual beta cell mass and if it is possible its restoration.

In this paper we review the cell biology of pancreatic regenerative processes and the preclinical and clinical studies focusing on beta cell preservation and regeneration.

Fetal and newborn pancreatic beta cell development

Beta cells can be detected as early as in the 9th week of the fetus development in the primitive ductal

epithelium. This observation suggests that new beta cells originate from the ductal precursor cells. Beta cell proliferation contributes also to the increasing beta cell mass in the fetal pancreas. After birth intensive beta cell proliferation can be observed for some time, which is interrupted by apoptotic waves (Gianini, 2011).

Formation of new beta cells in later life

Origin of the new beta cells after the period of their intensive postpartum proliferation is an object of intense dispute. Different research groups have been showed that beta cell proliferate by symmetric cell division, are formed by neogenesis from ductal precursor cells and also by transdifferentiation of alpha cells. Beta cell proliferation in the course of pancreatic regenerative process have been detected by means of BrDU incorporation (Dor *et al.*, 2006).

Using tissue specific tracing method beta cell division was also demonstrated following partial pancreatectomy and treatment with incretin analogue Exendin-4 (Collombat *et al.*, 2010). The role of cyclin-D2 (a cell cycle regulatory protein) in beta cell proliferation has been clarified by means of using cyclin-D2 knock-out mice. In cyclin-D2 deficient mice smaller islets and less beta cells have been observed with a concomitant decrease in the regenerative capacity of pancreas related to wild type counterparts. Cyclin dependent kinase (Cdk4) deficiency in mice leads to diabetes, in contrast those animals bearing constitutively active form of Cdk4 showed beta cell hyperplasia and hyperinsulinaemia (Georgia *et al.*, 2004; Kushner *et al.*, 2005; Rane *et al.*, 1999).

The proliferative capacity of islet beta cells drastically decreases during aging, however tenfold increase in beta cell replication rate were detected in regenerating pancreas after streptozotocin induced diabetes in mice. These results indicate that proliferative capacity of beta cells isn't lost irreversibly by aging and this phenomenon could be exploited in regenerative therapeutical strategies of diabetes (Teta *et al.*, 2005).

The age-related inhibition of beta cell division ability can be attributed to activation of some tumor suppressor genes. One of this is p16ink4a. The p16ink4a knock-out resulted in a significant increase of beta cell proliferation. The expression of this gene is tightly controlled by a gene silencing protein Bmi-1, which binds to the silencing sequence upstream of p16ink4a sequence. Knock-out of Bmi-1 gene resulted in p16ink4a overexpression which in turn lead to total blockade of beta cell proliferation (Dhawan *et al.*, 2009).

Beta cell neogenesis from the pancreatic stem like precursor cells and other cells

Recent studies strongly suggest that new beta cells may develop from ductal or acinar progenitor cells. In the course of beta cell neogenesis an array of genes are reactivated which orchestrate the embryonic and fetal development of the pancreas. One of this regulatory

peptide is the Neurogenin-3 (Ngn3). Ngn3 overexpression have been detected in the ductal epithelium of injured pancreas in mice. Ngn3 positive cells were isolated and then engrafted to Ngn3 knock-out mice. Engrafted cells differentiated to islet cells (Xu *et al.*, 2008).

Pancreatic acinar precursor cells can be the source of beta cell neogenesis, too. In a study acinar cancer cell line (AR42) was cultured with activine and glucagone from beta cells. The culture was transformed following this treatment, as glucagone and insuline producing cells were detected in the culture.

In another study primary culture of acinar cells from rats was treated with epidermal growth factor (EGF), and leukemia inhibitory factor (LIF). Three days after treatment the culture showed C-peptide-1, Pdx-1, Glut-2 positivity and produced insuline in a glucose dependent manner. The cells were harvested and implanted into alloxan treated diabetic mice, which recovered from hyperglycaemia after cell engraftment (Baeyens *et al.*, 2010).

A recent study revealed that cell division is not indispensable for beta cell neogenesis. Using tissue specific tracing method direct conversion of mature alpha cells were detected following chemically induced beta cell damage, and partial destruction of pancreas by duct ligation. (Thorel *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2010).

The phenomenon of intense cell proliferation in the periductal areas after partial destruction of pancreas by celophane wrapping had been known for a long time (Rosenberg *et al.*, 1983).

The key role of INGAP protein

The fact that an unidentified protein may have a role in this regenerative process was proposed by Terozano *et al.* in 1988. In a study in which they performed quantitative mRNA analysis from regenerating and normal pancreas based on a pancreatic cDNA library, they observed an mRNA overexpression which coded a protein consisting of 165 aminoacids in the specimen of the regenerating pancreas but not in liver or normal pancreas.

In a later study the cytosolic extract from duct ligated pancreas of hamster was given intraperitoneally to animals with streptozotocin diabetes. The cell extract treated animals recovered from hyperglycemia. By immunohistochemical analysis glucagon and insulin positive cells were found in the duct epithelium (Rosenberg *et al.*, 1996).

The gene of the growth factor islet neogenesis associated protein (INGAP) was cloned and sequenced by Rafaeloff *et al.* in 1997. Structural analysis of the protein revealed that its activity attributed to its centrally positioned domain consisting of 15 aminoacids. This pentadecapeptide portion showed the same regenerative characteristics as native INGAP (Rosenberg *et al.*, 2004).

The pentadecapeptide portion of INGAP enhances the proliferation and endocrine differentiation of ductal

primary cell culture and increases beta cell neogenesis from ductal precursors. Presence of INGAP in ductal cell was confirmed by immunohistochemical staining. INGAP were detected in acinar cells and non-endocrine islet cells, too (Lipsett *et al.*, 2007).

INGAP overexpression in transgenic mice potentiates glucose-induced insulin release and delays the onset of streptozotocin induced diabetes (Chang *et al.*, 2011). INGAP administration significantly improved glucose metabolism as assessed by homeostatic model indexes. Morphometric analyses of pancreatic tissue from INGAP treated animals revealed increased number and size of islets. An increase of Ngn-3 and PDX mRNA were detected also in INGAP treated animals related to the control. (Madrid *et al.*, 2009).

Regenerative effect of glucagon like peptide-1 (GLP-1)

Glucagon like peptide-1 increase insulin release through the activation of enteroinsular axis. In recent years accumulating body of evidence arised about the pivotal role of GLP-1 in the regeneration of beta cell mass, too. It was demonstrated that GLP-1 increases both beta cell proliferation and neogenesis and has also antiapoptotic activity. Treatment of primary beta cell cultures derived from both human and rodent specimens with GLP-1 showed cytoprotective effect against apoptotic agents like TNF- α , free fatty-acids, reactive oxigene species, and dexamethason (Li *et al.*, 2003).

The proliferative effect of GLP-1 was confirmed in primary islet cell cultures. Following treatment of the cultures with GLP-1 agonists cell proliferation was detected, which was possible to block by mitogene activated protein kinase (MAPK), phosphatidyl inositol-3 kinase (PI-3K) and PKA inhibitors (Friedrichsen *et al.*, 2006).

In addition beta cell neogenesis from ductal and acinar precursor cells can be also induced by GLP-1. Its receptors were detected in ductal cells derived from both human and rodent specimens. Primary cell culture of acinar and ductal cells treated with GLP-1 receptor agonist Exendin-4 were transformed to islet like cells which expressed PDX-1 transcription factor, beta cell type glucokinase, and glucose transporter (GLUT2). Furthermore they were able to produce insulin via glucose dependent manner (Zhou *et al.*, 1999).

In vivo estimation of beta cell mass function

Therapeutic strategies focusing on regeneration of beta cell mass should be evaluated through measurement or estimation of beta cell mass.

The main obstacles to direct visuallization of islets with conventional image diagnostic methods (CT, MMR) are the relatively little volume and size (2% of total pancreatic tissue; cca 200mm in diameter) as well as their scattered distribution in the pancreas. Furthermore there is little difference in echogenity between islet and exocrine tissue.

Under investigation are the possibilities of specific

marker labelled beta cells detected by positron emission tomography (PET), magnetic resonance imaging (MRI) or single photon emission CT. GLP-1 receptor, sulphonyl urea receptor (SUR) and vesicular amine transporter receptor-2 (VAMT-2) have been tested for labelling beta cells. VAMT-2 labelling seems to be well applicable and it was already tested in a clinical trial (Malaisse *et al.*, 2001).

Due to the inavailability of appropriate routine imaging method functional assays are used to estimate beta cell mass. In these assays insulin release is stimulated by different ways. Intravenous arginine stimulation of insulin secretion in hyperglycemia (IVAST) or glucagon stimulated insulin secretion are the possibilities. In these assays C-peptide is measured instead of insulin because it is not cleared in the liver after secretion in the portal circulation (Polonsky *et al.*, 1988; Roth *et al.*, 2012).

Beta cell regeneration in human type-1 diabetes mellitus

That regenerative processes exist also in human pancreas is suggested by a few case reports about recovery from severe hyperglycemic or ketoacidotic state although these old case reports are not fully documented according to recent guidelines (Copley *et al.*, 1963).

The transient remission of insulin dependent diabetes within days or weeks following onset of the illness is a common phenomenon. The honeymoon phase is defined when the insulin requirement decreases below 0,5 U/kg/day, and hemoglobin A_{1c} is less or equal to 6% (42 mmol/mol IFCC units).

Honeymoon phase is clearly an attempt of beta cell regeneration. Its intensity and duration is age-dependent (higher and longer in children older than 5 years at onset as compared with diabetes manifesting in very young children). Another factor is the beginning of therapy as soon as possible after appearance of symptoms (Lombardo *et al.*, 2002; Abdul-Rasoul *et al.*, 2006).

Signs of beta cell regeneration was observed also in an analysis of tissue specimens derived from patients with a history of long standing diabetes. Some residual beta cells with insulin positivity were detected in the sections. On the other side these residual beta cells showed positivity for apoptotic markers and leukocyte infiltration. The presence of residual beta cells with high apoptotic rate even in the older age of the patients suggests that new beta cells continuously arise in the pancreas of diabetic patients but they also die through apoptosis caused by inflammatory reactions (Meier *et al.*, 2005; Butler *et al.*, 2003; Gianini *et al.*, 2011)

Strategies for preservation of residual beta cell function in type-1 diabetes

Although restoration of endogenous insulin production by regeneration of beta cell mass seems to be feasible in the future but the preservation of residual

beta cell function can be a realistic goal. The fact that even the very low level of insulin secretion attributed to the residual beta cell population can decrease the development of diabetic complications have revealed by a trial published in 2003 (Steffes *et al.*, 2003).

Patients with type-1 diabetes in this trial were divided into groups defined by glucagon stimulated C-peptide secretion. ($\leq 0,03$; 0,04–0,20 and 0,21–0,50 nmol/l). The study revealed that C-peptide secretion above 20 nmol/l was associated with significantly lower occurrence of nephropathy and retinopathy but also fewer hypoglycemic episodes.

For this reason the main goal of the new therapeutic strategies is beta cell rescue, in other words prevention of total beta cell loss. These strategies are parts of primary, secondary and tertiary prevention phases depending on the progression state of the illness at the time of admission to the therapy. Application of primary strategies are possible in children whose parents have type-1 diabetes and the children are carriers the illness associated HLA-DQ/DR alleles. Although these alleles are associated with type-1 diabetes, further environmental or dietary factors need to be present for triggering the onset of the autoimmune reactions against the islet cells. Consumption of gluten containing food and cow milk before one year of age are supposed to be among them.

In clinical follow-up studies the risk of type-1 diabetes development is currently evaluated. The question is the if the disease could be prevented by feeding diabetes susceptible infants exclusively with human breast milk or with hydrolysate of cow milk. Gluten omission is examined. These studies have 10 years follow up duration (Rewers *et al.*, 2009).

Secondary prevention can be applied when islet antibodies are already present but the beta cell function is yet retained. The main goal of these strategy is to induce immune tolerance against islet antigens. Oral administration of insulin for development of immune tolerance have been tested. Although these trials were not able to arrest the progression of type 1 diabetes, they significantly reduced the frequency of ketoacidotic episodes at the onset of the illness (Type 1 diabetes study group).

Tertiary prevention can be applied in the case of individuals after onset of type-1 diabetes. The realistic aim can be the preservation of residual beta cell mass and function rather than beta cell regeneration. Vaccination strategies ranging from inducing immunetolerance against GAD65, proinsulin autoantigenes, to direct inhibition of cytotoxic T cell functions via anti CD-3, IL-1 receptor antibodies weretested in type-1 diabetes immunotherapy trials. Application of GLP-1 receptor agonist (Exenatid) and INGAP for treatment of type-1 diabetes are being tested in clinical trials phase IV and II respectively. The results are summarised in the paper of Rewers *et al.* (2009).

REFERENCES

1. **Abdul-Rasoul, M., Habib, H., Al-Khouly, M.:** The honeymoon phase in children with type 1 *diabetes mellitus*: frequency, duration, and influential factors. *Pediatric Diabetes*, 2006; 2: 101–107.
2. **Alhadj Ali, M., Dayan, C.M.:** The importance of residual endogenous beta-cell preservation in type 1 diabetes. *Br. J. Diabetes Vasc. Dis.*, 2009; 9: 248–253.
3. **Baeyens, L., Rooman, I., Bouwens, L.:** Generation of beta cells from acinar cells. *Stem Cell Biol. & Regenerative Med.*, 2010; 2: 153–166.
4. **Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., Butler, P.C.:** Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2003; 52: 102–110.
5. **Chang, J.T., Weaver, J.R., Bowman, A. et al.:** Targeted expression of islet neogenesis associated protein to beta cells enhances glucose tolerance and confers resistance to streptozotocin-induced hyperglycemia. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2011; 335: 104–109.
6. **Chung, C.H., Hao, E., Piran, R., Keinan, E., Levine, F.:** Pancreatic β -cell neogenesis by direct conversion from mature α -cells. *Stem Cells*, 2010, 9: 1630–1638.
7. **Collombat, P., Hu, X., Heimberg, H., Mansouri, A.:** Pancreatic beta-cells: From generation to regeneration. *Semin. Cell and Develop. Biol.*, 2010; 21: 838–844.
8. **Coplean, H.L.:** Diabetic acidosis and severe hyperlipemia with remission. *California Medicine*, 1963; 101: 472–478.
9. **Dhawan, S., Tschen, S.I., Bhusan, A.:** Bmi-1 regulates the Ink4a/Arf locus to control pancreatic beta cell proliferation. *Genes Dev.*, 2009; 23: 906–911.
10. **Dor, Y.:** Beta cell proliferation is the major source of new pancreatic beta cells. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metabol.*, 2006, 2: 242–243.
11. **Friedrichsen, B., Neubauer, N., Lee, C.Y. et al.:** Stimulation of pancreatic beta cell replication by incretins involves transcriptional induction. *J. Endocrinol.*, 2006; 188: 481–492.
12. **Georgia, S., Bhusan, A.:** Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J. Clin. Invest.*, 2004; 114: 963–8.
13. **Gepts, W.:** Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile *diabetes mellitus*. *Diabetes*, 1965; 14: 619–663.
14. **Gianini, R.:** Beta cell regeneration in human pancreas: *Semin. Immunopathol.*, 2011; 33: 23–27.
15. **Kang, G., Joseph, J.W., Chepurny, O.G. et al.:** Epac selective cAMP analog 8-ppCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺ induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic MIN6 beta cells. *Biochem. J.*, 2003; 369: 287–299.
16. **Kushner, J.A., Cyermerych, M.A., Sicinska, E. et al.:** Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta cell growth. *Mol. Cell Biol.*, 2005; 25: 3752–62.
17. **Li, Y., Hansotia, T., Yusta, B., Ris, F. et al.:** Glucagon like peptide-1 receptor signalling modulates beta cell apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 471–478.
18. **Lipsett, M., Hanley, S., Castellarin, M. et al.:** The role of Islet Neogenesis-Associated Protein (INGAP) in islet neogenesis. *Cell Biochem. Biophys.*, 2007; 48: 127–137.
19. **Lombardo, F., Valenzise, M., Wasniewska, M.:** Two-year prospective evaluation of the factors affecting honeymoon frequency and duration in children with insulin dependent *diabetes mellitus*: the key-role of age at diagnosis. *Diabetes, Nutrition & Metabolism*, 15; 2002, 246–251.
20. **Madrid, V., Héctor Del Zotto, H., Maiztegui, B. et al.:** Islet neogenesis-associated protein pentadecapeptide (INGAP-PP): Mechanisms involved in its effect upon β -cell mass and function. *Regulatory Peptides*, 2009; 157: 25–31.
21. **Malaisse, W.J.:** On the track to the beta-cell. *Diabetologia*, 2001; 44: 393–406.
22. **Martin, S., Pawlowski, B., Greulich, B. et al.:** Natural course of remission in IDDM during 1st year after diagnosis. *Diabetes Care*, 1992; 15: 66–74.
23. **Meier, J.J., Bhushan, A., Butler, A.E., Rizza, R.A., Butler, P.C.:** Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia*, 2005; 48: 2221–2228.
24. **Polonsky, K.S., Given, B.D., Hirsch, L. et al.:** Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J. Clin. Invest.*, 1988; 81: 435–441.
25. **Rafaeloff, R., Pittenger, G.L., Barlow, S. et al.:** Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters. *J. Clin. Invest.*, 1997; 99: 2100–2109.
26. **Rane, S.G., Dubus, P., Mettus, R.V. et al.:** Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nature Genet.*, 1999; 22: 44–52.
27. **Rewers, M., Gottlieb, P.:** Immunotherapy for the prevention and treatment of Type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2009; 32: 1769–1782.
28. **Rosenberg, L., Brown, R.A., Duguid, W.P.:** A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas. *J. Surg. Res.*, 1983; 35: 63–72.
29. **Rosenberg, L., Vinik, A.I., Pittenger, G.L. et al.:** Islet cell regeneration in the diabetic hamster pancreas with restoration of normoglycemia can be induced by a local growth factor(s). *Diabetologia*. 1996; 39: 256–262.
30. **Rosenberg, L., Lipsett, M., Yoon, J.W. et al.:** A pentadecapeptide fragment of islet neogenesis-associated protein increases beta-cell mass and reverses diabetes in C57BL/6J. *Mice Ann Surg.*, 2004; 240: 875–884.

31. Roth, J., Whitford, I., Dankner, R., Szulc, A.L.: How the immunoassay transformed C-peptide from a duckling into a swan. *Diabetologia*, 2012; 55: 865–869.
32. Scaglia, L., Cahill, C.J., Finegood, D.T., Bonner-Weir, S.: Apoptosis participates in the remodelling of the endocrine pancreas in the neonatal rats. *Endocrinology*, 1997; 138: 1736–1741.
33. Steffes, M., Sibley, S., Jackson, M., Thomas, W.: Beta cell function and the development of diabetes-related complications in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care*, 2003; 26: 832–836.
34. Terazono, K., Yamamoto, H., Takasawaz, S. *et al.*: A novel gene activated in regenerating islets. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263: 2111–2114.
35. Teta, M., Long, S.Y., Wartschow, L.M. *et al.*: Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes*, 2005; 54: 2557–2567.
36. Thorel, F., Népote, V., Avril, I. *et al.*: Conversion of adult pancreatic alpha cells to beta cells after extreme beta cell loss. *Nature*, 2010, 464: 1149–1154.
37. **Type 1 diabetes study group**: Effects of insulin in relatives of patients with type 1 *diabetes mellitus*. *N. Engl. J. Med.*, 2002; 346: 1685–1691.
38. Xu, X., D'Hoker, J., Stange, G. *et al.*: Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*, 2008; 132: 197–207.
39. Zhou, J., Wang, X., Pineyro, M.A., Egan, J.M.: Glucagon-like peptide 1 and Exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and Insulin-producing cells. *Diabetes*, 1999; 48: 2358–2366.

ZNÍŽENIE PLAZMATICKÝCH HLADÍN BETA-KAROTÉNU U PACIENTOV SO SKLERÓZOU MULTIPLEX JE SPOJENÉ SO ZVÝŠENOU INTRATEKÁLNOU TVORBOU IgG A ZVÝŠENOU LIPOPEROXIDÁCIOU

Terézia Kalnovičová¹, Ľubomír Kuračka², Jarmila Kucharská³
Marta Ondrkalová¹, Peter Turčáni¹

¹I. neurologická klinika LF UK, Bratislava

²Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK, Bratislava

³ Farmakobiochemické laboratórium III. internej kliniky LF UK, Bratislava

Kontakt: tkalnovicova@gmail.com

SÚHRN

Skleróza multiplex (SM) je chronické zápalové ochorenie centrálného nervového systému (CNS) asociované s patologickou autoimunitnou reakciou voči CNS myelínu. Typickým biochemickým nálezom v cerebrospinálnom likvore (CSF) u SM pacientov je intratekálna produkcia imunoglobulínov IgG s dôkazom prítomnosti oligoklonálnych pásov (OP). V tejto súvislosti nás zaujímalo, či zápalový proces prebiehajúci v CNS u SM pacientov v skorom štádiu ochorenia sa odrazí v metabolizme purinových nukleotidov a v antioxidačnej ochrane organizmu. U pacientov so sklerózou multiplex (n=27) sme stanovovali degradačné produkty purinových nukleotidov (adenozín inozín, hypoxantín, xantín a kyselina močová) v CSF, plazmatické hladiny lipofilných vitamínov alfa-tokoferolu a beta-karoténu a marker lipoperoxidácie malondialdehyd, vyjadrený ako TBARS (látky reagujúce s kyselinou tiobarbiturovou). Výsledky sme porovnávali s kontrolnou skupinou, ktorú tvorili neurologickí pacienti (n=17) s negatívnym likvorovým nálezom. Zistili sme, že v porovnaní s kontrolnou skupinou majú SM pacienti významne vyššie likvorové hladiny inozínu, hypoxantínu a xantínu a signifikantne nižšie hladiny adenozínu, zvýšené hodnoty TBARS v plazme a znížené, alebo hraničné plazmatické hodnoty beta-karoténu. Hladiny alfa-tokoferolu sa v plazme významne nelíšili. SM pacienti so zníženými plazmatickými hladinami beta-karoténu sa vyznačovali zvýšenou intratekálnou produkciou IgG a zvýšenou lipoperoxidáciou. Výsledky poukazujú, že deficit beta-karoténu v plazme u SM pacientov je asociovaný so zvýšenou lipoperoxidáciou a môže byť indikátorom zvýšenej intratekálnej tvorby IgG.

Kľúčové slová: plazma, TBARS, alfa-tokoferol, beta-karotén, cerebrospinálny likvor, adenozín, inozín, hypo-

xantín, xantín, kyselina močová, intratekálna produkcia IgG imunoglobulínov

SUMMARY

Multiple sclerosis is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) associated with a pathological autoimmune reaction against CNS myelin. Typical biochemical findings in cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients, intrathecal production of immunoglobulin IgG indicates the presence of oligoclonal bands (OB). In this regard, we wonder whether the ongoing inflammatory process in the CNS in MS patients with early stage disease will be reflected in purine nucleotide metabolism and antioxidant protection of organism. In patients with multiple sclerosis (n=27), we determined the degradation products of purine nucleotides (adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine, uric acid) in CSF and plasma levels of lipophilic vitamins alpha-tocopherol and beta-carotene and lipid peroxidation marker malondialdehyde expressed as TBARS (thiobarbituric acid reactive substances). Results were compared with controls, which included neurological patients (n=17, G43–G44) with negative CSF findings. We found that compared with the control group MS patients had significantly higher cerebrospinal fluid levels of inosine, hypoxanthine and xanthine and significantly lower levels of adenosine, increased levels of TBARS in plasma and low or borderline plasma levels of beta-carotene. Levels of alpha-tocopherol in plasma did not differ significantly. MS patients with lower plasma levels of beta-carotene are characterized by increased intrathecal IgG production and increased lipid peroxidation. The results indicate that the deficit of beta-carotene in plasma of MS patients is associated

with increased lipid peroxidation and may be an indicator of increased intrathecal IgG production.

Key words: plasma, TBARS, alpha-tocopherol, beta-carotene, cerebrospinal fluid, adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine, uric acid, intrathecal IgG production

ÚVOD

Skleróza multiplex (SM) je chronické, zápalové autoimunitné, neurodegeneratívne ochorenie centrálného nervového systému (CNS), pri ktorom dochádza k demyelinizácii a k axonálnej strate v CNS.

V patogeneze zápalu a demyelinizácie zohráva významnú úlohu oxidačný stres (4,19). Zvýšené energetické požiadavky axónov, zlyhanie mitochondrií spojené s následnou depléciou makroergických fosfátov je jednou z možných príčin axonálnej degenerácie

a disability pri SM. V tejto súvislosti nás zaujímalo do akej miery sa prebiehajúci zápalový proces u SM pacientov odráža v metabolizme purínových nukleotidov a v antioxidantnej ochrane organizmu proti prebiehajúcim voľnoradikálovým reakciám hodnotenej plazmatickými koncentraciami dvoch antioxidantných lipofilných vitamínov (alfa-tokoferol, beta-karotén) a plazmatickými hladinami produktov lipoperoxidácie.

PACIENTI A METÓDY

Analyzovaný súbor pozostával z 27 pacientov (21 Ž/6M, priemerný vek 37, 31 ± 11,6 (17-59 r.) s klinicky a laboratórne potvrdenou diagnózou skleróza multiplex (SM) a z kontrolnej skupiny, ktorá pozostávala zo 17 neurologických pacientov (13 Ž/4M, priemerný vek 38,1 ± 11,0 s diagnózou G43-G44 migréna a iné syndrómy bolesti hlavy) s negatívnym likvorovým nálezom.

Tab. 1. Likvorové hladiny degradačných produktov purínových nukleotidov a intratekálna tvorba IgG u pacientov so sklerózou multiplex (SM) v porovnaní s kontrolnou skupinou

Parameter	Kontrola (n = 17)	SM (n = 27)	Štatistická významnosť
Kyselina močová ($\mu\text{mol/L}$)	17,3 ± 5,8 (4,8 - 29,5) MED = 15,8	25,2 ± 16,4 (11,3 - 83,7) MED = 19,2	p = 0,0635
Hypoxantín ($\mu\text{mol/L}$)	2,4 ± 1,0 (0,8 - 4,1) MED = 2,3	3,4 ± 1,9 (0,6 - 2,8) MED = 3,0	p = 0,0377
Xantín ($\mu\text{mol/L}$)	1,6 ± 0,6 (0,7 - 3,0) MED = 1,5	2,6 ± 1,5 (0,1 - 6,5) MED = 2,2	p = 0,0094
Inozín ($\mu\text{mol/L}$)	1,0 ± 0,5 (0,3 - 2,4) MED = 0,9	1,3 ± 0,4 (0,7 - 2,2) MED = 1,2	p = 0,0636
Adenozín ($\mu\text{mol/L}$)	0,5 ± 0,3 (0,2 - 1,5) MED = 0,4	0,3 ± 0,2 (0,1 - 0,9) MED = 0,2	p = 0,0049
QAlb ref. hodnoty do 7,4	5,4 ± 1,6 (3,4 - 7,9) MED = 5,0	6,2 ± 3,6 (2,6 - 10,7) MED = 5,1	NS
IgG index ref. hodnoty do 0,66	0,45 ± 0,1 (0,1 - 0,57) MED = 0,46	6,2 ± 3,6 (0,7 - 2,4) MED = 5,1	p = 4,1.10 ⁻⁷
RIG ref. hodnoty 0 mg/L	0	34,7 ± 55,6 (0,3 - 262) MED = 17,1	p = 0,0000

Tab. 2. Plazmatické hladiny beta-karoténu a TBARS u pacientov so sklerózou multiplex (SM) v porovnaní s referenčnými hodnotami
 (-) percentuálne vyjadrenie počtu znížených
 (+) zvýšených hodnôt

Parameter	Referenčné hodnoty	SM (n = 27)
Beta-karotén	0,3 - 3,0 $\mu\text{mol/L}$	0,57 \pm 0,47 (0,05 - 1,68) MED = 0,37 (-)11/27 (40%)
Alfa-tokoferol	15 - 40 $\mu\text{mol/L}$	22,1 \pm 5,6 (14,9 - 38,3) MED = 21,1 (-)1/24 (4,2%)
TBARS	\leq 4,5 $\mu\text{mol/L}$	5,0 \pm 0,7 (3,6 - 6,7) MED = 5,0 (+) 22/27 (81%)

Intratekálna syntéza IgG sa zisťovala kvantitatívne (18) a kvalitatívne vyšetrením prítomnosti oligoklonálnych IgG pásov v sére a v CSF metódou izoelektrickej fokusácie na polyakrylamidovom géle. Kvantitatívne hodnotenie intratekálnej syntézy IgG sa vykonalo pomocou IgG indexu ($\text{IgGI} = \text{IgG}_{\text{CSF}} / \text{albumín}_{\text{CSF}} : \text{IgG}_s / \text{albumín}_s$) a tiež pomocou Reiberovho vzťahu (RIG) (21). Funkcia hematokorovej bariéry sa hodnotila pomocou albumínového kvocientu ($\text{Qalb} = \text{CSF albumín} / \text{albumín v sére}$).

Likvorové hladiny degradačných produktov purínových nukleotidov, kyseliny močovej (KM), hypoxantínu (HYP), xantínu (XAN), inozínu (INO) a adenosínu (ADO) sme stanovili pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s UV detekciou. Mobilná fáza obsahovala 60 mmol/L roztok dihydrogénfosforečnanu draselného upraveného kyselinou trihydrogénfosforečnou na pH 2,9 a 2% metanolu (v/v). Separované látky sa detegovali spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 254 nm.

Plazmatické hladiny alfa-tokoferolu a beta-karoténu sme stanovili modifikovanou HPLC metódou s UV detekciou pri 295 a 450 nm (11,14). Marker lipoperoxidácie MDA, vyjadrený ako TBARS (látky reagujúce s kyselinou thiobarbiturovou), sme stanovili spektrofotometricky pri 532 nm podľa Janero a Burghardt (8).

Výsledky boli hodnotené pomocou štandardných štatistických postupov (Kolmogoroffov-Smirnoffov test, Spearmanov korelačný test). Významnosť medzi priemermi bola testovaná pomocou *t*-testu.

VÝSLEDKY

Analýzovaný súbor pacientov so sklerózou multiplex (SM) sa vyznačoval patologicky zvýšenými likvorovými hladinami IgG, s dôkazom intratekálnej tvorby imunoglobulínu IgG vyjadrenej zvýšenými hodnotami IgG indexu a Reiberovho vzťahu (Tab 1). V porovnaní s kontrolnou skupinou mali SM pacienti zvýšené likvorové hladiny kyseliny močovej ($p = 0,063$), xantínu ($p = 0,0094$), hypoxantínu ($p = 0,038$), inozínu ($p = 0,064$) a signifikantne znížené likvorové hladiny adenosínu ($p = 0,005$) (Tab. 1). Plazmatické koncentrácie beta-karoténu u SM pacientov boli znížené (40% pacientov), alebo sa nachádzali v dolnom rozsahu referenčných hodnôt. Hladiny alfa-tokoferolu v plazme sa významne nelíšili (Tab. 2). Hodnoty TBARS, markera lipoperoxidácie, boli zvýšené u 81% SM pacientov (Tab. 2) Hodnoty TBARS signifikantne inverzne korelovali s likvorovými hladinami adenosínu ($r = -0,478$, $p = 0,045$). Po rozdelení súboru SM pacientov na pacientov so zníženými hladinami beta-karoténu (skupina 1, $n = 11$) a SM pacientov s fyziologickými hladinami beta-karoténu (skupina 2, $n = 16$) sa deficit beta-karoténu v skupine SM pacientov odrazil vo zvýšených likvorových hladinách IgG, zvýšenej hodnote RIG a vo vyšších plazmatických hladinách TBARS (Tab. 3). V skupine SM pacientov s deficitom beta-karoténu sa pozorovala aj zmena v korelácii medzi likvorovými hladinami adenosínu a likvorovými hladinami inozínu (Obr. 1).

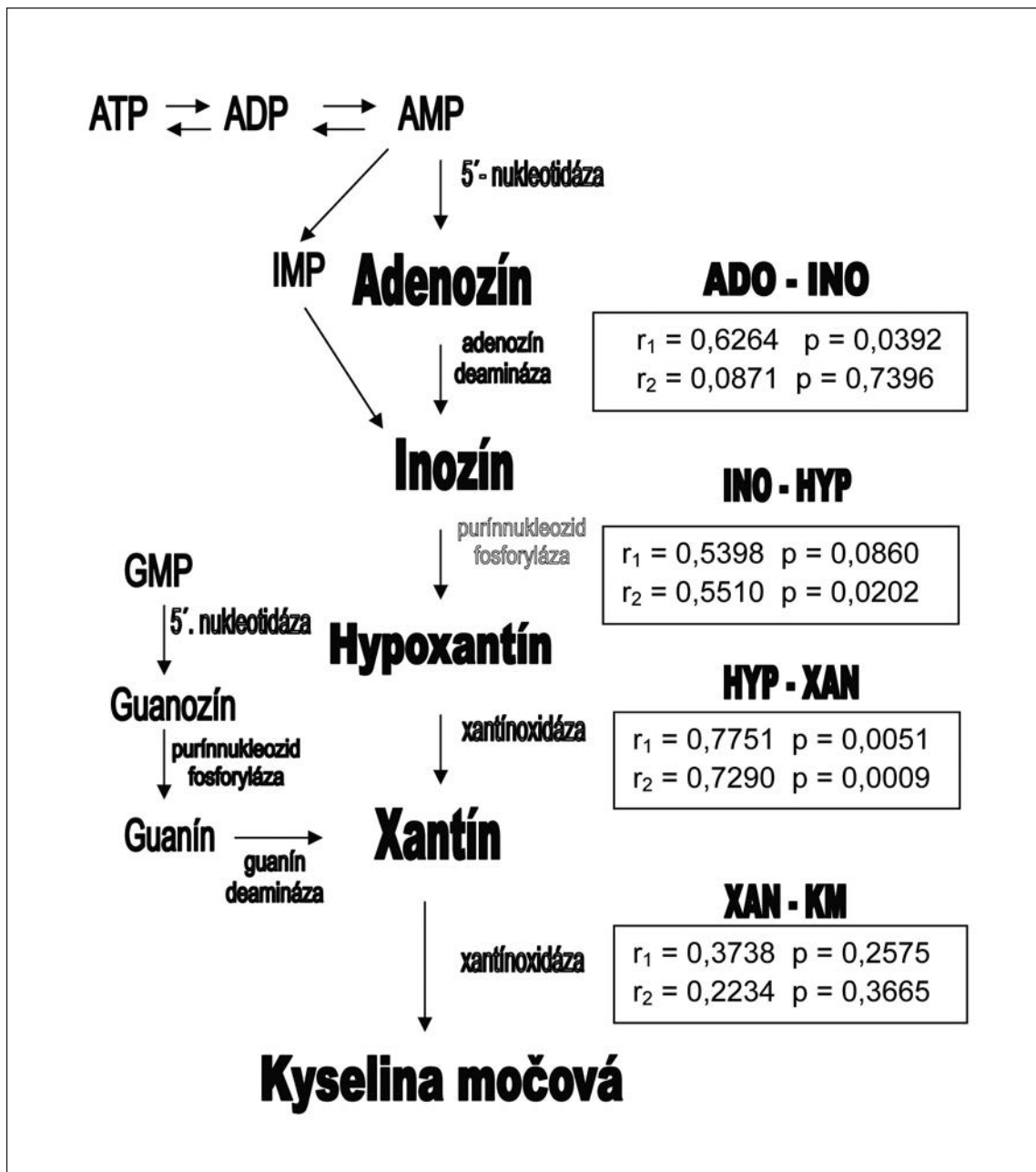
DISKUSIA

Charakteristickým likvorovým nálezom u pacientov so sklerózou multiplex je prítomnosť intratekálnej syntézy imunoglobulínov triedy IgG, ktorá sa môže vyjadriť kvantitatívne pomocou IgG indexu, alebo iných navrhnutých vzťahov, napr. podľa Reibera (RIG) (Reiber), a kvalitatívne pomocou dôkazu prítomnosti oligoklonálnych IgG pásov (OP) (15). U všetkých prezentovaných SM pacientov sme v likvore detegovali dva alebo viac OP, bez ich nálezu v krvnom sére, čo poukazuje, že u týchto pacientov prebieha v nervovom tkanive chronický imunopatologický proces asociovaný s intratekálnou produkciou IgG kvantitatívne vyjadrený zvýšenými hodnotami IgG indexu a Reiberovho vzťahu (RIG) (Tab. 1).

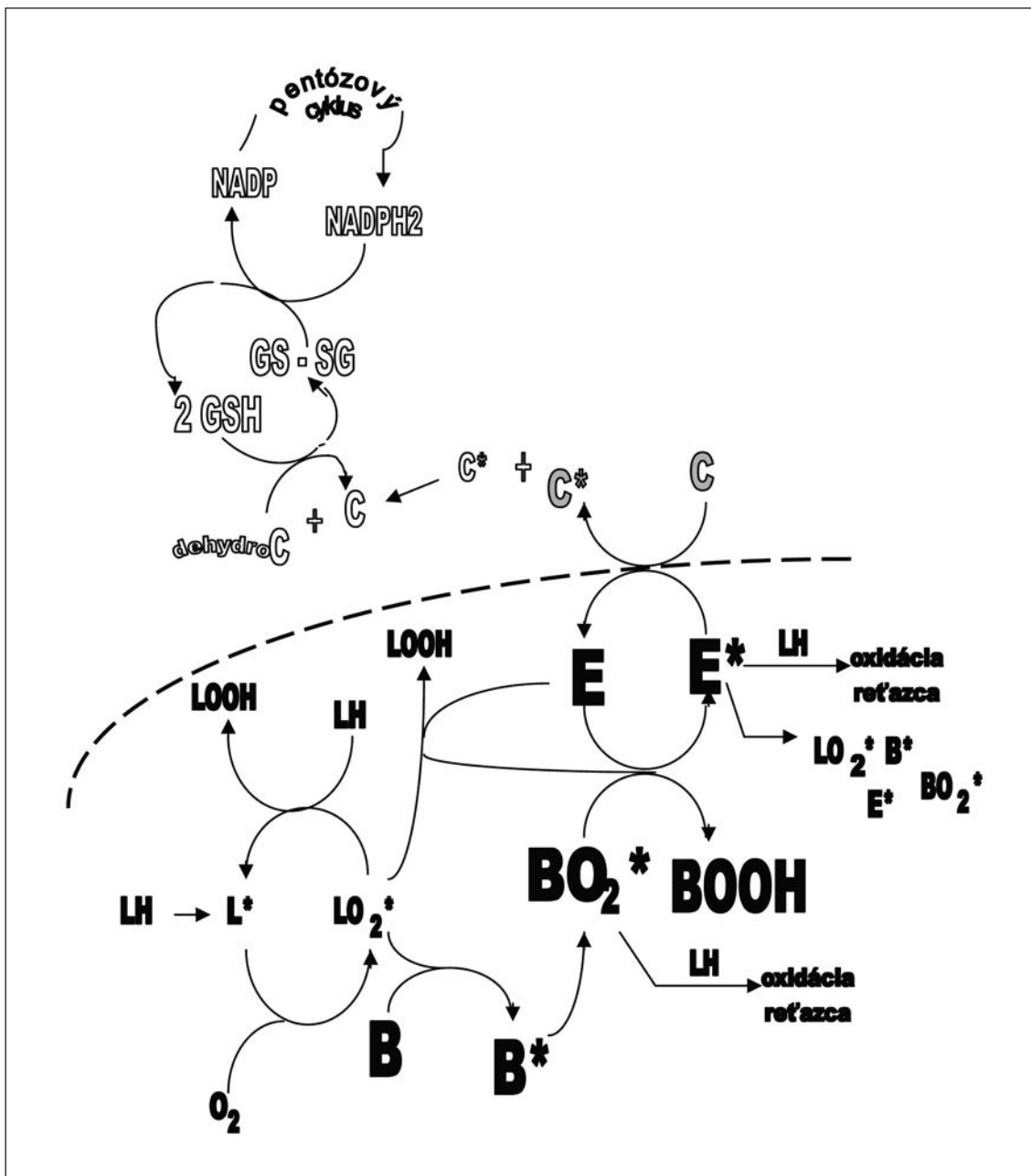
Za jednu z príčin ochorenia SM sa považuje insuficiencia modulačného mechanizmu zabezpečujúceho rovnováhu medzi prozápalovými a protizápalovými procesmi, ktorá v konečnom dôsledku vedie k demyelinizácii axónov, ich strate a neurodegenerácii. Tieto procesy sú spojené s oxidačným stresom a patologickou tvorbou voľných radikálov (4,19). Jednou z príčin axonálnej degenerácie a disability pri SM môžu byť zvýšené energetické požiadavky remyelinizovaných axónov a zlyhanie mitochondrií spojené s následným deficitom ATP. V tejto súvislosti nás zaujímalo, či sa imunopa-

Tab. 3. Likvorové hladiny degradačných produktov purinových nukleotidov, plazmatické hladiny TBARS a intratekálna tvorba IgG u pacientov so sklerózou multiplex (SM) pri znížených (skupina 1) a fyziologických (skupina 2) plazmatických hladinách beta-karoténu.

Parameter	Skupina 1 (n = 11)	Skupina 2 (n = 16)	Štatistická významnosť
Beta-karotén ($\mu\text{mol/L}$)	0,22 \pm 0,07 (0,1 - 0,27) MED = 0,24	0,85 \pm 0,5 (0,30 - 1,7) MED = 0,94	p = 0,00018
Vek (roky)	38,0 \pm 12,0 (22 - 56) MED = 36	38,5 \pm 11,1 (19 - 59) MED = 37	NS
TBARS ($\mu\text{mol/L}$)	5,5 \pm 0,7 (4,6 - 6,7) MED = 5,45	4,7 \pm 0,7 (3,6 - 5,6) MED = 4,8	p = 0,0139
Kyselina močová ($\mu\text{mol/L}$)	24,1 \pm 14,2 (14,9 - 58,7) MED = 17,7	22,7 \pm 11,8 (11,3 - 57,0) MED = 20,4	NS
Hypoxantín ($\mu\text{mol/L}$)	2,8 \pm 1,5 (0,6 - 5,3) MED = 2,7	3,2 \pm 1,6 (1,2 - 7,5) MED = 2,7	NS
Xantín ($\mu\text{mol/L}$)	2,3 \pm 1,1 (0,1 - 4,0) MED = 2,1	2,2 \pm 1,2 (1,1 - 6,1) MED = 1,8	NS
Inozín ($\mu\text{mol/L}$)	1,3 \pm 0,4 (0,8 - 2,2) MED = 1,1	1,2 \pm 0,4 (0,7 - 2,0) MED = 1,1	NS
Adenozín ($\mu\text{mol/L}$)	0,2 \pm 0,1 (0,1 - 0,4) MED = 0,2	0,3 \pm 0,2 (0,1 - 0,9) MED = 0,2	NS
IgG v CSF (mg/L)	0,09 \pm 0,06 (0,03 - 0,23) MED = 0,08	0,05 \pm 0,02 (0,02 - 0,1) MED = 0,06	p = 0,0254
RIG (mg/L)	45,8 \pm 50,2 (0,3 - 166,4) MED = 41,1	10,6 \pm 10,4 (1,9 - 38,2) MED = 5,6	p = 0,0009



Obr. 1. Korelačné vzťahy medzi degradačnými produktmi purinových nukleotidov v cerebrospinálnom likvore v skupine SM pacientov so zníženými (r₁) a fyziologickými (r₂) hladinami beta-karoténu v plazme.



Obr. 2. Schéma inhibície lipoperoxidácie membrán.

Vzájomná interakcia antioxidantných systémov - redukovaný glutathion (GSH) - kyselina L-askorbová (C) - alfa-tokoferol (E) - beta-karotén (B) - pri ochrane bunky pred jej poškodením voľnými radikálmi

B* - radikál beta-karoténu, BO_2^* - peroxylový radikál beta-karoténu, BOOH - hydroperoxid beta-karoténu, E* - radikál alfa-tokoferolu, C* - radikál kyseliny askorbovej, GS-SG - oxidovaný glutathion, LH - nenasýtená vyššia karboxylová kyselina (VKK), L* - radikál VKK, LO_2^* - peroxyradikál VKK, LOOH - hydroperoxid VKK

tologické deje prebiehajúce v nervovom tkanive u SM pacientov odrazia v degradácii purínových nukleotidov v CNS a v antioxidantnej kapacite plazmy vyjadrenou koncentráciou lipofilných vitamínov alfa-tokoferolu a beta-karoténu.

Výsledky poukazujú, že zvýšená intratekálna tvorba IgG ako odraz zápalového procesu prebiehajúceho v CNS je vo vyšetrovanej skupine SM pacientov asociovaná s alteráciami v metabolizme purínových nukleotidov, čo sa odrazilo vo zvýšení likvorových hladín kyseliny močovej ($p=0,063$), hypoxantínu ($p=0,038$), xantínu ($p=0,009$), inozínu ($p=0,064$) a štatisticky významným znížením likvorových hladín adenosínu ($p=0,005$) (čo pravdepodobne súvisí s jeho využitím na resyntézu ATP). (Tab. 1). U SM pacientov sme v porovnaní s kontrolnou skupinou ďalej zaznamenali aj zvýšenú lipoperoxidáciu (zvýšené plazmatické hladiny TBARS u 80 % pacientov) a znížené plazmatické hladiny beta-karoténu (40 % pacientov) (Tab. 2). Hladiny alfa-tokoferolu v plazme sa pohybovali v rámci fyziologických hodnôt (Tab. 2). K podobným výsledkom dospeli Besler *a spol.* (3) ktorí zistili u SM pacientov významné zníženie sérových hladín kyseliny askorbovej, alfa-tokoferolu, retinolu a beta-karoténu.

Vitamín E, ktorý sa vyskytuje vo forme alfa, beta, gama a delta tokoferolov sa vyznačuje antioxidantnou, protizápalovou a antikancerogénnou aktivitou (5,7). Hlavnou formou vitamínu E v krvi a v tkanivách je alfa-tokoferol, ktorého základnou funkciou je ukončiť reťazovú reakciu lipoperoxidácie a takto chrániť bunkové membrány a LDL častice pred oxidačnou dezintegráciou. Na jeho recykláciu sa zúčastňuje vitamín C a koenzým Q (16). Pri ochorení SM má alfa-tokoferol okrem antioxidantných účinkov, ktoré sa prejavujú v jeho antiapoptickom efekte a ochrane axónov pred demyelinizáciou, tiež pozitívny efekt na proces remyelinizácie endogénnymi progenitornými bunkami (5).

Beta-karotén stabilizuje organické peroxidové voľné radikály v ich konjugovanej alkylovej štruktúre. Je lipofilnejší ako alfa-tokoferol a preto vycytáva radikály v lipofilných kompartmentoch účinnejšie ako alfa-tokoferol (17). Beta-karotén má tiež protizápalovú aktivitu. Zápalový stimul, ako napr. IFN-gama aktivuje makrofágy k produkcii rozličných proinflamačných cytokínov (TN-Falfa, IL-1beta) a tiež zápalových mediátorov, ktoré sú syntetizované cyklooxygenázou (PGE₂) a indukovanou syntázou oxidu dusnatého (NO). Expresia týchto cytokínov a enzýmových génov môže byť regulovaná aktiváciou transkripčného faktora NF-kapaB. Beta-karotén pôsobí ako inhibítor redoxnej aktivácie tohto transkripčného faktora (2).

V súvislosti s antioxidantnými a imunoregulačnými vlastnosťami beta-karoténu nás zaujímalo, či sa pokles beta-karoténu u pacientov so sklerózou multiplex významnejšie prejaví v metabolizme purínových nukleotidov, v intratekálnej tvorbe IgG a v stupni lipoperoxidácie vyjadrenej plazmatickými hladinami TBARS. Z toho dôvodu sme SM pacientov rozdelili na 2 skupiny.

1. skupinu ($n=11$) tvorili SM pacienti s deficitom beta-karoténu v plazme, 2. skupinu ($n=16$) tvorili SM pacienti s nízkymi, ale ešte fyziologickými plazmatickými hodnotami beta-karoténu. Výsledky poukazujú (Tab. 3), že v porovnaní so skupinou 1 (normálne plazmatické hladiny beta-karoténu), v skupine 2 je deficit beta-karoténu asociovaný so zvýšenou lipoperoxidáciou (signifikantne zvýšené plazmatické hladiny TBARS, $p=0,0144$) a signifikantne zvýšenou intratekálnou tvorbou IgG vyjadrenou likvorovými hladinami IgG ($p=0,025$) a Reiberovým vzťahom (RIG, $p=0,0009$) (Tab. 3). Znížené hladiny beta-karoténu u SM pacientov môžu byť spôsobené rozkladom beta-karoténu. Zistilo sa, že počas oxidačných atakov sa tvoria rozkladné produkty karotenoidov (CBPs), vrátane vysoko reaktívnych aldehydov a epoxidov (22). Stimulované neutrofile sú schopné degradovať beta-karotén a tvoriť množstvo CBPs, ktoré inhibujú mitochondriálnu respiráciu, čo je sprevádzané redukciami obsahu proteínových sulfhydrilov, znížením hladín redukovaného glutationu (GSH) a redoxného stavu a zvýšenou akumuláciou malondialdehydu (MDA). Zmeny v mitochondriálnom membránovom potenciáli vedú k funkčnému zhoršeniu translokátora adenínových nukleotidov (2). Asociáciu medzi zápalom a poklesom beta-karoténu potvrdil aj van Herpen-Broekmans *a spol.* (24), ktorí zistili inverznú koreláciu medzi plazmatickými hladinami beta-karoténu a zápalovým markerom CRP.

Hladiny degradačných produktov purínových nukleotidov v CSF sa medzi sledovanými skupinami SM pacientov významne nelíšili (Tab. 3). V porovnaní s SM pacientmi s fyziologickými hladinami beta-karoténu ($r=0,0871$; $p=0,739$), v skupine SM pacientov s deficitom beta-karoténu likvorové hladiny adenosínu významne korelovali s likvorovými hladinami inozínu ($r=0,626$; $p=0,039$) (Obr. 1.), čo nepriamo poukazuje na možnosť aktivácie procesu degradácie AMP prostredníctvom enzýmu 5'-nukleotidázy (Obr. 1).

Degradácia purínových nukleotidov je aktivovaná v situáciách, ktoré sú spojené s poklesom množstva ATP a s tým súvisiacim vzostupom hladiny adenosínmonofosfátu (AMP). AMP sa môže v bunkách odbúravať dvomi spôsobmi: a) deamináciou pôsobením enzýmu adenylátdaminázy na IMP a defosforyláciou na inozín, alebo b) defosforyláciou AMP enzýmom 5'-nukleotidáza na adenosín, a následnou deamináciou adenosíndeaminázou na inozín (Obr. 1). Pri fyziologických koncentráciách ATP je preferovaná deaminácia AMP na IMP, pretože ATP je silným inhibítorom 5'-nukleotidázy a aktivátorom adenylátdaminázy, ktorá je inhibovaná guanínovými nukleotidmi (GTP a GDP) (6).

V mozgu sa defosforylované produkty adenínových nukleotidov (adenosín, inozín, hypoxantín) neodplávajú krvným riečiskom, ale sa uvoľňujú do cerebrospinálnej tekutiny, odkiaľ sa za vhodných podmienok využívajú na resyntézu nukleotidov. Z degradačných produktov adenínových nukleotidov sa na tieto procesy využíva prednostne adenosín. Inkorporácia adenosínu v mozgu

je 7 násobne vyššia ako inkorporácia ďalších dvoch degradačných produktov, inozínu a hypoxantínu (25). Táto možnosť resyntézy nukleotidov z adenosínu má veľký význam v situácii, keď dochádza k celkovému poklesu celkových zásob týchto látok za vzniku väčšieho množstva adenosínu. Dôležitým faktom je, že adenosín, ktorý vznikol degradáciou nukleotidov v mozgovom tkanive sa po uvoľnení do CSF významne nemení na inozín a vzhľadom na nepriepustnosť mozgových kapilár pre adenosín nedochádza ani k jeho odplaveniu krvným obehom. Adenosín má okrem neuroprotektívnych vlastností vplyv na mnohé špecifické funkcie v CNS. V súvislosti s ochorením SM je zaujímavým faktom, že degradačné produkty adenínových nukleotidov ovplyvňujú niektoré procesy, ktoré môžu byť dôležité v imunologickej reaktivite organizmu (9,10,13) Pochopenie mechanizmov, ktoré vedú k poklesu likvorových hladín adenosínu a plazmatických hladín beta-karoténu u pacientov so sklerózou multiplex môže viesť k hlbšiemu poznaniu patogenézy tohto ochorenia a následne k účinnejším terapeutickým intervenciám.

ZÁVER

U pacientov so sklerózou multiplex (SM) chronický zápal v rannom štádiu ochorenia vedie k alteráciám v metabolizme purínových nukleotidov, k zníženiu plazmatických hladín beta-karoténu a k zvýšeniu plazmatických hladín TBARS. Deficit beta-karoténu v plazme je asociovaný so zvýšenou intratekálnou produkciou IgG, a následne v dôsledku neadekvátnej antioxidantnej ochrany s vyššou lipoperoxidačnou aktivitou. Znížené plazmatické hladiny beta-karoténu u pacientov so sklerózou multiplex môžu indikovať intenzívnejší zápalový proces.

LITERATÚRA

1. Aggarwal, S., Subberwal, M., Kumar, S., Sharma, M.: Brain tumor and role of beta-carotene, a-tocopherol, superoxide dismutase and glutathione peroxidase. *J. Cancer Res. Ther.*, 2006; 2(1): 24–2.
2. Bai, S.K., Lee, S.J., Na, H.J., Ha, K.S., Han, J.A., Lee, H., Kwon, Y.G., Chung, C.K., Kim, Y.M.: Beta-carotene inhibits inflammatory gene expression in liposaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. *Exp. Mol. Med.*, 2005; 37(4): 323–334.
3. Besler, H.T., Comoglu, S., Okcu, Z.: Serum levels of antioxidant vitamins and lipid peroxidation in multiple sclerosis. *Nutr. Neurosci.*, 2002; 5(3): 215–220
4. Butterfield, D.A., Castegna, A., Drake, J., Scapagnini, G., Calabrese, V.: Vitamin E and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress. *Nutr. Neurosci.*, 2002; 5(4): 229–239.

5. Goudarzvand, M., Javan, M., Mirnajafi-Zadeh, J., Mozafari, S., Tiraihi, T.: Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination process of hippocamp malformation of rats following local injection of ethidium bromide. *Cell Mol. Neurobiol.*, 2010; 30(2): 289–299.
6. Hartman, S.C.: Purines and pyrimidines. In Greenberg, D.M.(ed.): *Metabolic pathways*, IV. Academic Press, New York and London 1970, 499.
7. Chung, S.Y., Gang, L., Jihyeung, J., Guang, X.L.: Inhibition of inflammation and carcinogenesis in the lung and colon by tocopherols. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 2010; 1203: 29–34.
8. Janero, D.R., Burghardt, B.: Thiobarbituric acid-reactive malondialdehyde formation during superoxide-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. Influence of peroxidation conditions. *Lipids*, 1889; 24: 125–131.
9. Kalnovičová, T., Turčáni, P.: Kyselina močová a jej úloha v patogenéze sklerózy multiplex. *Lab. Diagnostika*, 2009; 14(1–2): 126–130.
10. Koprowski, H., Spitsin, S.V.: Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability, changes, and tissue damage in mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J.*, 2000; 14(5): 691–698.
11. Kucharská, J., Gvozdjaková, A., Mizera, S., Braunová, Z., Schreinerová, Z., Schrameková, E., Pecháň, I., Fabián, J.: Participation of coenzyme Q₁₀ in the rejection development of the transplanted heart: a clinical study. *Physiol. Res.*, 1998; 47: 399–404.
12. Kucharská, J.: *Vitamins in mitochondrial function*. In A. Gvozdjaková (ed.): *Mitochondrial medicine. Mitochondrial metabolism, diseases, diagnosis and therapy*. Amsterdam: Springer, 2008.
13. Kutzing, M.K., Firestein, B.L.: Altered uric acid levels and disease states. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008; 324(1): 1–7.
14. Lang, J.K., Gohil, L., Packer, L.: Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinol, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Anal. Biochem.*, 1986; 157: 106–116.
15. Link, H., Huang, Y.M.: Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J. Neuroimmunol.*, 2006; 180(1–2): 17–28.
16. Molyneux, S.L., Young, J.M., Florkowski, C.M., Lever, M., George, P.M.: Coenzyme Q10: is there a clinical role and a case for measurement? *Clin. Biochem. Rev.*, 2008; 29(2): 71–82.
17. Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H., Gotoh, N.: Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995; 62(suppl): 13225–13265.
18. Ondrkalová, M., Kalnovičová, T., Henkrichová, P., Turčáni, P.: Analýza oligoklonálnych pásov v cerebrospinálnom likvore u pacientov so suspektnou

- sklerózou multiplex. *Lab. Diagnostika*, 2009; 14(1–2): 83–87.
19. **Ortiz, G. G., Macias-Islas, M. A., Pacheco-Moisés, F. P., Cruz-Eramos, J. A., Sustersik, S., Barba, E. A., Aguayo, A.:** Oxidative stress is increased in serum from Mexican patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Dis. Markers*, 2009; 26(1): 35–39.
20. **Quasim, T., McMillan, D. C., Talwaaar, D., Sattar, N., O'Reilly, D. S. T. J., Kinsella, J.:** Lower concentrations of carotenoids in the critically ill patient are related to a systemic inflammatory response and increased lipid peroxidation. *Clin. Nutr.*, 2003; 22(5): 459–462.
21. **Reiber, H. H., Peter, J. B.:** Cerebrospinal fluid analysis: disease related data patterns and evaluation programs. *J. Neurol. Sci.*, 2001; 184: 101–122.
22. **Siems, W., Salerno, C., Crifo, C., Sommerburg, O., Wiswedel, I.:** Beta-carotene degradation products – formative, toxicity and preventive of toxicity. *Forum Nutr.*, 2009; 61: 75–86.
23. **Sies, H., Stahl, W.:** Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995; 62(suppl): 1315S–1321S.
24. **Van Herpen-Broekmans, W. M. R., Klopping-Ketelaars, I. A. A., Bots, M. L., Kluft, C. et al.:** Serum carotenoids and vitamins in relation to markers of endothelial function and inflammation. *Eur J. Epidemiol.*, 2004; 19: 915–921.
25. **Win, H. R., Park, T. S., Curnish, R. R., Rubio, R., Berne, R. M.:** Incorporation of adenosine and its metabolites into brain nucleotides. *Am. J. Physiol.*, 1980; 239: H212–H219.
26. **Yanagisawa, A., Suzuki, K., Kimura, A., Ito, Y., Hamajima N.:** Possible protective effect of serum beta-carotene levels on, the association between interleukin-1B C-R1 T polymorphism and hypertension in a Japanese population. *Clin. Nutr.*, 2009; 28: 198–202.

HODNOTENIE ZDRAVOTNÉHO STAVU MARGINALIZOVANÝCH RÓMSKYCH KOMUNÍT NA VÝCHODNOM SLOVENSKU. MOČOVÉ PARAMETRE

Beáta Hubková¹, Eva Ďurovcová¹, Anna Birková¹, Juraj Guzy¹
Mária Mareková¹, Oliver Rácz^{2, 3} a ostatní spolupracovníci HEPA-META tímu^{1*}

¹Univerzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta
Ústav lekárskej a klinickej biochémie a Labmed a. s.
Slovenská Republika

²Univerzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta, Ústav patologickej fyziológie
Slovenská Republika

³Univerzita Miskolc, Fakulta zdravotníctva
Ústav nanobiotechnológie a regeneratívnej medicíny
Maďarsko

Kontakt: beata.hubkova@upjs.sk

ABSTRACT

Health status of individual groups of the population creates a picture of the health status of the entire society, which in turn reflects the development of the country. The study is focused on the evaluation of health status of marginalized Roma communities in Eastern Slovakia generally regarded as the weakest link of society from the health, social and economic conditions. The evaluation was carried out on the basis of a comparison of the biochemical parameters of urine of probands of Roma ethnicity living in segregated settlements in Eastern Slovakia and of probands of the ethnicity of the majority living in – or outside – the Roma settlements. The results of the study show impaired hygienic and eating

habits of the Roma living in segregated settlements, which are shown in the increase in values of pH, presence of leukocytes without the deterioration of nitrites in the urine of Roma women and in the increased concentrations of urobilinogen especially in the urine of Roma men.

SÚHRN

Zdravotný stav jednotlivých skupín populácie vytvára obraz o zdravotnom stave celej spoločnosti, ktorý je odzrkadlením vývoja krajiny. Štúdia je zameraná na hodnotenie zdravotného stavu marginalizovaných rómskych komunít na východnom Slovensku, ktoré sú všeobecne považované za najslabší článok spoločnosti zo zdravotného, sociálneho ale aj ekonomického hľadiska. Hodnotenie bolo vykonané na základe porovnania biochemických parametrov moču probandov rómskeho etnika žijúcich v segregovaných osadách na východnom Slovensku a probandov majoritného etnika žijúcich v – resp. mimo – rómskych osád. Výsledky štúdie poukazujú na zhoršené hygienické a stravovacie návyky Rómov žijúcich v segregovaných osadách, ktoré sú preukázané zvýšením hodnôt pH, špecifickej hmotnosti, prítomnosťou leukocytov bez zvýšenia koncentrácie dusitanov v moči rómskych žien a zvýšenými koncentraciami urobilinogénu v moči rómskych mužov.

^{1*} HEPA-META team: Peter Jarčuška, Andrea Madarasová Gecková, Daniel Pella, Leonard Siegfried, Pavol Jarčuška, Lýdia Pastvová, Ján Fedáčko, Jana Kollárová, Peter Kolarčík, Daniela Bobáková, Zuzana Veselská, Ingrid Babinská, Sylvia Dražilová, Jaroslav Rosenberger, Ivan Schréter, Pavol Kristián, Eduard Veseliny, Martin Janičko, Ladislav Virág, Marta Kmetová, Monika Halánová, Darina Petrášová, Katarína Čariková, Viera Lovayová, Lucia Merkovská, Lucia Jedličková, Ivana Valková

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

ÚVOD A CIELE PRÁCE

Zdravotný stav obyvateľstva je výsledkom pôsobenia rôznych faktorov. Pôsobí naň nielen životospráva, ale aj ekonomická a sociálna situácia krajiny, od ktorej sa odvíja úroveň zdravotnej starostlivosti ale aj stav životného prostredia. Na druhej strane, zdravotný či duševný stav populácie podmieňuje vývoj a ekonomický rast krajiny.

Zo zdravotného hľadiska predstavujú marginalizované skupiny obyvateľstva najviac ohrozený článok spoločnosti. Spoločnou charakteristikou týchto skupín je ich sociálna izolácia spôsobená ich odlišnosťou od majoritnej spoločnosti. Dôvodom izolácie môže byť príslušnosť k určitej etnickej skupine, strata domova, zdravotné postihnutie, závislosť od návykových látok, nedostatočná prispôbitosť prostrediu a mnohé iné príčiny. V našom regióne najpočetnejšiu skupinu tvoria marginalizované rómske komunity, u ktorých sa niektoré vyššie menované činitele spravidla vyskytujú spolu.

Vyšetrenie moču patrí dodnes k základným vyšetreniam vykonávaným v ambulanciách lekárov prvého kontaktu aj odborných lekárov. Keďže ide o vyšetrenie neinvazívne odobratého biologického materiálu, je preferované nie len zo strany lekárov, ale aj zo strany samotných pacientov. Výsledky vyšetrenia moču poskytujú informácie nielen o ochoreniach urogenitálneho traktu, ale do určitej miery aj o celkovom stave organizmu.

Rýchlym, pomerne spoľahlivým a predovšetkým komfortným riešením je biochemické vyšetrenie moču močovými prúžkami, ktoré umožňujú nielen kvalitatívne ale aj semikvantitatívne vyhodnotenie niektorých biochemických parametrov a bunkových ukazovateľov moču. Medzi najčastejšie hodnotené znaky v moči patrí vyšetrenie prítomnosti glukózy, bielkovín, bilirubínu, urobilinogénu, ketolátok a dusitanov. K základnému vyšetreniu moču patrí okrem spomenutých aj stanovenie jeho špecifickej hmotnosti, pH a stanovenie prítomnosti krvi a leukocytov.

Cieľom predloženej práce je poskytnúť informácie o zdravotnom stave marginalizovaných rómskych komunít na východnom Slovensku na základe vyšetrenia biochemických parametrov moču. Probandami štúdie boli Rómovia žijúci na východe Slovenska v segregovaných osadách v Košickom regióne, ako aj nerómovia žijúci v tej istej, resp. v nespádovej oblasti. Respondenti boli oslovení v ambulanciách praktických lekárov, pričom štúdia bola zameraná na populáciu vo veku od 18 do 55 rokov.

METODIKA

1. Vyšetrení probandi

Do projektu boli zaradení Rómovia žijúci v segregovaných osidlách v Košickom regióne, ako aj nerómovia počas preventívnej prehliadky u svojho obvodného lekára. Celkový počet probandov bol 864. Konečný počet vyhodnotených výsledkov bol 764, ostatní boli

vyrazení kvôli nedodanému kompletnému biologickému materiálu.

Probandi boli na základe príslušnosti alebo nepríslušnosti k rómskemu etniku zaradení do jednotlivých kategórií nasledovne:

- **Kategória 1:** Rómovia, s trvalým pobytom v segregovanom osídli Rómskej komunity.

- **Kategória 2:** Nerómovia, s trvalým pobytom v spádovej oblasti segregovaného osídla Rómskej komunity (ďalej len spádová oblasť).

- **Kategória 3:** Nerómovia, s trvalým pobytom mimo spádovej oblasti segregovaného osídla Rómskej komunity (ďalej len nespádová oblasť).

Výsledky vyhodnotených parametrov probandov z kategórií 2 a 3 slúžili ako porovnávacie hodnoty oproti kategórii Rómov.

Probandi zaradení do projektu vyjadrili svoj súhlas so zaradením do projektu podpísaním informovaného súhlasu. Vypracovanie dotazníkov a odbery biologického materiálu boli realizované v súlade s pravidlami etickej komisie UPJŠ LF.

2. Odber materiálu a prehľad vyšetrených parametrov

Vzorky prvého ranného moču boli odobraté po dôkladnom poučení probanda a do stanovenia boli uchovávané v chlade. Analýza moču bola vykonaná 10-parametrovými močovými prúžkami *Dekaphan Leuco* od firmy Lachema do 4 hodín od odberu.

Semikvantitatívne boli hodnotené nasledujúce parametre: špecifická hmotnosť, pH, prítomnosť leukocytov, bielkovín, glukózy, ketolátok, urobilinogénu a krvi. Prítomnosť dusitanov a bilirubínu bola vyhodnotená kvalitatívne.

Špecifická hmotnosť moču (SG): vyjadruje pomer hmotnosti moču k jeho objemu, čo poukazuje na stav hydratácie organizmu a na koncentračnú schopnosť obličiek. Fyziologické hodnoty špecifickej hmotnosti prvého ranného moču sa pohybujú v rozmedzí 1,015 až 1,025 g/m³.

Nízka hodnota špecifickej hmotnosti moču (pod 1,010 g/m³) môže poukazovať na diabetes, alebo na poškodenie tubulointerstícia obličiek (pyelonefritída, akútna tubulárna nekróza). Vysoké hodnoty môžu signalizovať dehydratáciu, najčastejšie v dôsledku hnačky alebo zvracania.

Hodnota pH moču: je značne ovplyvnená zložením stravy, ako aj metabolickou činnosťou organizmu, pričom môže indikovať aj infekcie urogenitálneho traktu. Fyziologické hodnoty moču sa v priebehu dňa pohybujú v rozmedzí od 5,5 až 7,0; v prvom rannom moči sú hodnoty nižšie, v rozsahu od 5,0 do 6,0.

Nízke hodnoty pH (pod 5,0) signalizujú prítomnosť systémovej acidózy, napr. počas hladovania, nekompensovaného diabetu alebo závažných hnačiek, poukazovať môžu aj na mykobakteriálne infekcie. Kyslé pH moču môže viesť k vzniku urátovej alebo cystínovej litiázy. Keďže väčšina indikačných papierikov meria pH moču v rozmedzí od pH 5,0, litiázy ako ani mykobakteriálne

infekcie nie sú týmto spôsobom detegovateľné. Vysoké hodnoty pH môžu byť výsledkom prevažne vegetariánskej stravy, ako aj výsledkom tvorby amoniaku v dôsledku premnoženia baktérií štiepiacich močovinu (najmä rodu *Proteus* a *Pseudomonas*) pri uroinfekciách alebo pri nevhodnom skladovaní moču pred vyšetrením.

Prítomnosť leukocytov v moči: indikuje infekcie močových ciest, prostaty, ženských pohlavných orgánov alebo aj ochorenia obličiek. Leukocyty sa v moči bežne nenachádzajú, do moču sa dostávajú jedine ako následok infekcie, pri nesprávne vykonanom odbere moču alebo v prípade obštrukcií v močovom trakte.

Za pozitívne nálezy sa považujú hodnoty nad 10 leukocytov v 1 μ l.

Prítomnosť bielkovín v moči: podobne ako prítomnosť leukocytov, signalizuje najmä ochorenia obličiek, ale aj hemodynamické poruchy pri hypertenzii a infekcie močových ciest. Určité množstvo najmä nízkomolekulových bielkovín sa močom vylučuje aj za fyziologických podmienok, za pozitívny nález sa pri vyšetrení moču diagnostickými prúžkami považujú hodnoty nad 0,3 g bielkovín na 1 l moču. Prechodne zvýšené hodnoty sa objavujú aj pri telesnom a emočnom strese.

Prítomnosť glukózy v moči: je jednoznačným indikátorom glykozúrie, ktorá môže byť renálneho alebo extrarenálneho pôvodu. Glukóza sa v moči objavuje až po prekročení tzv. renálneho prahu pre glukózu, čo predstavuje individuálne variabilnú koncentráciu glukózy v krvi. Kým za renálnou glykozúriou stojí najčastejšie znížený exkretčný prah obličiek pre samotnú glukózu, toxické poškodenie obličiek alebo niektoré zriedkavé dedičné choroby, extrarenálna glykozúria sa objavuje pri zle kompenzovanom diabetes mellitus - pri glykémiiach 10 mmol/l a vyšších. Hodnoty glukózy pod 1,4 mmol/l moču sa považujú za negatívne.

Prítomnosť ketónov v moči: sa označuje ako ketonúria. Vyskytuje sa pri hladovaní, horúčkach, alebo pri celkovom metabolickom rozvrate organizmu, napríklad pri nekompenzovanom diabetes. Za pozitívny nález sa považujú hodnoty nad 0,19 mmol/l moču.

Prítomnosť urobilinogénu v moči: pod 17 μ mol/l nie je patologickým stavom. Až hodnoty nad touto hladinou poukazujú na ochorenia pečene (akútne alebo chronická cirhóza pečene, hepatitída) nadmernú deštrukciu červených krviniek (hemolytická anémia) alebo patologické zmeny v tráviacom trakte.

Koncentrácia bilirubínu v moči zdravého človeka je nízka. Hladiny nad 3,4 μ mol/l poukazujú na možné ochorenia pečene (cirhóza pečene, obštrukčná žltáčka, polycystóza pečene), ktoré sú sprevádzané konjugovanou hyperbilirubinémiou alebo na blokovanie močových ciest močovými kameňmi.

Prítomnosť krvi v moči: je za fyziologických podmienok častejšie detegovaná u žien ako nežiadúca kontaminácia (pri menštruácii). Za patologických podmienok môže poukazovať na infekcie obličiek, močových ciest, na prítomnosť nádorových ochorení močového mechúra, alebo na prítomnosť močových kameňov.

Prítomnosť dusitanov v moči: signalizuje konverziu dusičnanov na dusitany najmä pôsobením Gram-negatívnych baktérií obsiahnutých v moči. Množstvo dusitanov v moči je závislé nie len od množstva patogénov, ale aj od druhu, doby pôsobenia a od pôvodnej koncentrácie dusičnanov.

VÝSLEDKY

Etnické a vekové zloženie probandov

Do projektu bolo zaradených 764 probandov, z toho 419 rómskeho pôvodu, čo predstavovalo 55 % všetkých zúčastnených. Kontrolné skupiny tvorilo 345 probandov, z toho 125 s trvalým pobytom v spádovej oblasti rómskej komunity, 220 mimo spádovej oblasti.

Priemerný vek zúčastnených bol 33 rokov, s minimom 18 a maximom 55 rokov. Vekové zloženie probandov v jednotlivých kategóriách je znázornené v Tab. 1.

V skupine Rómov mierne prevládalo zastúpenie ženského pohlavia (vyše 63 %), čo bolo spôsobené väčším záujmom žien rómskeho pôvodu zúčastniť sa projektu. V porovnávacích skupinách bolo zastúpenie oboch pohlaví vyrovnané.

Prehľad vyhodnotených biochemických parametrov moču

Rozsah stanovených biochemických parametrov na základe špecifikácie výrobcu močových prúžkov je zhrnutý v Tab. 2. Fyziologické hodnoty udávané výrobcom sú zvýraznené, pričom fyziologická hodnota pH prvého ranného moču bola stanovená na základe údajov z dostupnej literatúry (Ball, 2007).

Po vyhodnotení jednotlivých biochemických parametrov v moči sa stanovil presný počet probandov s fyziologickými hodnotami moču všetkých skúmaných parametrov (Tab. 3). Najväčšie zastúpenie probandov s vyhovujúcimi parametrami moču (15 %) bolo stanovené v kontrolnej skupine 2. Najviac vzoriek s pozitívnymi

Tab. 1. Vekové zloženie probandov

Kate- gória	Počet proban- dov	Prie- merný vek	Mini- málny vek	Maxi- málny vek
1.M	155	34	18	53
1.Ž	264	35	18	55
2.M	61	33	20	55
2.Ž	64	36	21	55
3.M	112	33	20	44
3.Ž	108	33	19	46

Legenda: 1, 2, 3 - kategórie; M a Ž - muži a ženy

Tab. 2. Biochemické parametre stanovené močovými prúžkami *Dekaphan Leuco*

Semikvantitatívne hodnotené fyzikálne parametre									
Parameter				Fyziologická hodnota					
Špecifická hmotnosť	1,000	1,005	1,010	1,015	1,020	1,025	1,030		
	Fyziologická hodnota								
PH	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9
Semikvantitatívne hodnotené biochemické parametre									
Parameter	jednotka	fyziol. hodnota							
Leukocyty	leu/ μ l	Neg (< 10 leu/ μ l)	ca. 10-25	ca. 75	ca. 500				
Bielkoviny	g/l; mg/dl	Neg (< 0,15 g/l)	0,3/30	1/100	5/500				
Glukóza	mmol/l; mg/dl	Neg (< 1,4 mmol/l)	2,8/50	5,5/100	17/300			55/1000	
Ketóny	mmol/l; mg/dl	Neg (< 0,19 mmol/l)	1,5/16	5/52	15/156				
Urobilinogén	μ mol/l; mg/dl	Normal (< 17 μ mol/l)	17/1	51/3	102/6			203/12	
Krv	Ery/ μ l	Neg (< 5 Ery/ μ l)	ca. 5-10	ca. 50	ca. 250				
- hemoglobín	Ery/ μ l	-	ca. 10	ca. 50	ca. 250				
Kvalitatívne hodnotené biochemické parametre									
Dusitany	prítomnosť	Neg	Poz						
Bilirubín	prítomnosť	Neg (< 3,4 μ mol/l)	+		++	+++			

nálezmi (len 2 % vzoriek s vyhovujúcimi parametrami moču) bolo stanovených v skupine rómskych žien.

Najviac hodnôt mimo fyziologické hodnoty bolo stanovených pri vyhodnotení špecifickej hmotnosti moču (Tab. 4). Ani v jednej z kategórii sa nedosiahlo 50 % vyhovujúcich vzoriek s fyziologickou hodnotou tohto parametra. Naopak, napriek úzkej špecifickácii normálneho pH prvého ranného moču v rozmedzí pH 5,0 až 6,0 fyziologické hodnoty boli nájdené vo vyše 80 %-ách vzoriek (Tab. 5). Prítomnosť leukocytov v moči sa potvrdila len u 21 % probandov, najviac v kategórii žien rómskeho etnika. Výskyt leukocytov v moči u probandov mužského pohlavia bol nízky, len 5 %-ný (Tab. 6). Prekvapujúco

vysoké bolo zastúpenie pozitívnej proteinúrie, ktoré sa vo všetkých kategóriách probandov vyskytovalo nad 43 %. Koncentrácia bielkovín v moči probandov nerómskeho pôvodu bola maximálne do 1 g/l; v kategórii Rómov sa vyskytovali aj hodnoty nad 1 g/l (Tab. 7).

Krv bola detegovaná prevažne vo vzorkách moču žien, a to v rozsahu 48 až 55 % v jednotlivých kategóriách. U mužov má prítomnosť krvi v moči väčšiu výpovednú hodnotu, keďže výskyt falošne pozitívnych nálezov je nižší. Najviac vzoriek s pozitívnou hematúriou u mužov bolo stanovených v kategórii Rómov (32 %), zaujímavé je ale aj vysoké číslo 26 % v prípade kontrolných skupín (Tab. 11; kategória 2 a 3 spolu).

Tab. 3. Zastúpenie probandov s vyhovujúcimi všetkými skúmanými parametrami moču

kategória	n	v číslach	v %
1. M	155	15	10 %
1. Ž	264	6	2 %
2. M	61	9	15 %
2. Ž	64	8	13 %
3. M	112	10	9 %
3. Ž	108	7	6 %

Legenda: 1, 2, 3 - kategórie; M a Ž - muži a ženy

Tab. 4. Vyhodnotenie hodnôt špecifickej hmotnosti moču

Kategória	Počet probandov	Počet probandov/percentuálne zastúpenie v danom v rozsahu						Priemerná hodnota ± smerodajná odchýlka
		1,000-1,010		1,015-1,025		1,025-1,030		
1. M	155	17	11 %	64	41 %	74	48 %	1,024 ± 0,007
1. Ž	264	21	8 %	113	43 %	130	49 %	1,025 ± 0,007
2. M	61	7	11 %	29	48 %	25	41 %	1,023 ± 0,008
2. Ž	64	13	20 %	26	41 %	25	39 %	1,022 ± 0,009
3. M	112	25	22 %	44	39 %	43	39 %	1,021 ± 0,009
3. Ž	108	26	24 %	41	38 %	41	38 %	1,021 ± 0,009

Legenda: 1, 2, 3 - kategórie; M a Ž - muži a ženy

Tab. 5. Vyhodnotenie hodnôt pH moču

Kategória	Počet probandov	Počet probandov/percentuálne zastúpenie v danom v rozsahu				Priemerná hodnota ± smerodajná odchýlka
		5,0-6,0		nad 6,0		
1.M	155	135	87 %	20	13 %	6,0 ± 0,5
1.Ž	264	242	92 %	22	8 %	5,9 ± 0,5
2.M	61	51	84 %	10	16 %	6,1 ± 0,7
2.Ž	64	57	89 %	7	11 %	5,9 ± 0,5
3.M	112	94	84 %	18	16 %	6,0 ± 0,7
3.Ž	108	87	81 %	21	19 %	5,9 ± 0,7

Legenda: 1, 2, 3 - kategórie; M a Ž - muži a ženy

Tab. 6. Vyhodnotenie hodnôt leukocytov v moči

Kategória	Počet probandov	Počet probandov/percentuálne zastúpenie v danom rozsahu							
		0 leu/μl		ca 10-25 leu/μl		ca 75 leu/μl		ca 500 leu/μl	
1. M	155	146	94%	6	4%	2	1%	1	1
1. Ž	264	162	61%	33	13%	35	13%	34	13%
2. M	61	59	97%	2	3%	0	0%	0	0%
2. Ž	64	47	74%	6	9%	9	14%	2	3%
3. M	112	106	95%	4	3%	2	2%	0	0%
3. Ž	108	86	80%	7	7%	8	7%	7	6%

Legenda: 1, 2, 3 - kategórie; M a Ž - muži a ženy

Tab. 7. Vyhodnotenie hodnôt bielkovín v moči

Kategória	Počet probandov	Počet probandov/percentuálne zastúpenie v danom rozsahu							
		0 g/l		Nad 0,3 g/l		1 g/l		5 g/l	
1. M	155	87	56%	66	43%	2	1%	0	0%
1. Ž	264	113	43%	145	55%	1	0%	5	2%
2. M	61	42	69%	18	30%	1	2%	0	0%
2. Ž	64	38	59%	26	41%	0	0%	0	0%
3. M	112	59	53%	53	47%	0	0%	0	0%
3. Ž	108	60	56%	48	44%	0	0%	0	0%

Legenda: 1, 2, 3 - kategórie; M a Ž - muži a ženy

Tab. 8. Vyhodnotenie hodnôt glukózy v moči

Kategória	Počet probandov	Počet probandov/percentuálne zastúpenie v danom rozsahu									
		0 mmol/l		2,8 mmol/l		5,5 mmol/l		17 mmol/l		55 mmol/l	
1. M	155	148	95%	2	1%	2	1%	0	0%	3	2%
1. Ž	264	258	98%	2	1%	1	0%	1	0%	2	1%
2. M	61	60	98%	1	2%	0	0%	0	0%	0	0%
2. Ž	64	64	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
3. M	112	111	99%	0	0%	0	0%	1	1%	0	0%
3. Ž	108	108	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%

Legenda: 1, 2, 3 - kategórie; M a Ž - muži a ženy

Tab. 9. Vyhodnotenie hodnôt ketónov v moči

Kategória	Počet probandov	Počet probandov/percentuálne zastúpenie v danom v rozsahu							
		0 mmol/l		1,5 mmol/l		5 mmol/l		15 mmol/l	
1. M	155	150	97%	2	1%	1	1%	2	1%
1. Ž	264	258	98%	6	2%	0	0%	0	0%
2. M	61	58	95%	3	5%	0	0%	0	0%
2. Ž	64	63	98%	0	0%	1	2%	0	0%
3. M	112	109	97%	3	3%	0	0%	0	0%
3. Ž	108	105	97%	2	2%	0	0%	1	1%

Legenda: 1, 2, 3 - kategórie; M a Ž - muži a ženy

Tab. 10. Vyhodnotenie prítomnosti urobilinogénu v moči

Kategória	Počet probandov	Počet probandov/percentuálne zastúpenie v danom v rozsahu									
		0 µmol/l		17 µmol/l		51 µmol/l		102 µmol/l		203 µmol/l	
1. M	155	104	67%	46	30%	4	3%	1	1%	0	0%
1. Ž	264	177	67%	70	27%	15	6%	2	1%	0	0%
2. M	61	55	90%	5	8%	1	2%	0	0%	0	0%
2. Ž	64	58	91%	6	9%	0	0%	0	0%	0	0%
3. M	112	89	79%	22	20%	0	0%	1	1%	0	0%
3. Ž	108	90	83%	16	15%	1	1%	1	1%	0	0%

Legenda: 1, 2, 3 - kategórie; M a Ž - muži a ženy

Tab. 11. Vyhodnotenie prítomnosti krvi v moči

Kategória	Počet probandov	Počet probandov / percentuálne zastúpenie v danom v rozsahu							
		0 Ery/µl		ca 5-10 Ery/µl		ca 50 Ery/µl		ca 250 Ery/µl	
1. M	155	105	68%	41	26%	7	5%	2	1%
1. Ž	264	128	48%	68	26%	39	15%	29	11%
2. M	61	45	74%	13	21%	2	3%	1	2%
2. Ž	64	29	45%	24	38%	8	13%	3	5%
3. M	112	83	74%	27	24%	2	2%	0	0%
3. Ž	108	56	52%	27	25%	15	14%	10	9%

Legenda: 1, 2, 3 - kategórie; M a Ž - muži a ženy

Tab. 12. Vyhodnotenie prítomnosti dusitanov v moči

Kategória	Počet probandov	Počet probandov / percentuálne zastúpenie v danom v rozsahu					
		0		+		++	
1. M	155	152	98%	3	2%	0	0%
1. Ž	264	241	91%	6	2%	17	6%
2. M	61	60	98%	1	2%	0	0%
2. Ž	64	63	98%	1	2%	0	0%
3. M	112	112	100%	0	0%	0	0%
3. Ž	108	104	96%	4	4%	0	0%

Legenda: 1, 2, 3 - kategórie; M a Ž - muži a ženy

Tab. 13. Vyhodnotenie prítomnosti bilirubínu v moči

Kategória	Počet probandov	Počet probandov/percentuálne zastúpenie v danom v rozsahu							
		0		+		++		+++	
1. M	155	110	71%	41	26%	3	2%	1	1%
1. Ž	264	179	68%	77	29%	8	3%	0	0%
2. M	61	46	75%	15	25%	0	0%	0	0%
2. Ž	64	49	77%	15	23%	0	0%	0	0%
3. M	112	73	65%	35	31%	4	4%	0	0%
3. Ž	108	68	63%	34	31%	6	6%	0	0%

Legenda: 1, 2, 3 - kategórie; M a Ž - muži a ženy

Prítomnosť glukózy bola potvrdená len v 3 % Rómov a výskyt v kontrolných skupinách bol menší ako 1%. Ketolátky boli dokázané v 3 % probandov rómskeho aj nerómskeho etnika (Tab. 8 a 9). Fyziologické hodnoty urobilinogénu boli zistené u 67 % Rómov oproti 85 % výskytu v kontrolných skupinách (Tab. 10; kategória 2 a 3 spolu).

Dusitany sa potvrdili len v prípade 4 % vzoriek všetkých probandov. Fyziologické koncentrácie dusitanov v moči sa nachádzali v 70 %-ách vzoriek, s rozptylom od 64 % (kategória 3) do 76 % (kategória 2) (Tab. 12).

Korelačná a chí kvadrátová analýza

Pri štatistickom vyhodnotení vzoriek sa stanovili hodnoty korelácie medzi jednotlivými parametrami navzájom použitím Pearsonovho korelačného koeficienta. Výsledky sú zhrnuté v Tab. 14, pričom štatis-

ticky významné korelácie nad 0,2 sú vyznačené. Pre vyhodnotenie pravdepodobnosti náhodného výskytu rozdielu v parametroch v jednotlivých kategóriách bola použitá metóda vyhodnotenia chí-kvadrátovým štatistickým signifikantným testom, ktorým sa určili hodnoty pravdepodobnosti náhodného vzniku daného rozdielu (p hodnoty, Tab. 15) (Weber, 1956).

DISKUSIA

História Rómov a rómskej kultúry na Slovensku siaha do obdobia po presídlení chudobných kočovníkov z indického polostrova do Európy v 9. až 13. storočí. Prijatie Rómov v Európe bolo spočiatku pohostinné. Situácia sa zmenila po exkomunikácii Rómov cirkvou v 15. storočí. Prenasledovanie vyvrcholilo počas druhej

Tab. 14. Korelácie biochemických parametrov moču II.

korelačný koeficient	špecifická hmotnosť	pH	leukocyty	bielkoviny	glukóza	ketóny	uro-bilinogén	krv	dusitany	bilirubín
špecifická hmotnosť	1,00	-0,43*	0,00	0,14	0,06	0,09	0,20	0,08	0,03	0,20*
pH	-0,43*	1,00	-0,01	0,01	-0,02	-0,03	0,04	-0,11	0,01	0,02
leukocyty	0,00	-0,01	1,00	0,08	-0,01	-0,02	0,02	0,15	0,27*	0,05
bielkoviny	0,14	0,01	0,08	1,00	0,04	0,08	0,26*	0,05	0,09	0,26*
glukóza	0,06	-0,02	-0,01	0,04	1,00	0,05	0,09	-0,04	-0,02	0,08
ketóny	0,09	-0,03	-0,02	0,08	0,05	1,00	0,08	0,03	-0,03	0,12
Uro-bilinogén	0,20	0,04	0,02	0,26*	0,09	0,08	1,00	-0,02	0,04	0,60*
krv	0,08	-0,11	0,15	0,05	-0,04	0,03	-0,02	1,00	0,07	0,03
dusitany	0,03	0,01	0,27*	0,09	-0,02	-0,03	0,04	0,07	1,00	0,00
bilirubín	0,20*	0,02	0,05	0,26*	0,08	0,12	0,60*	0,03	0,00	1,00

Legenda: * - štatisticky významná korelácia nad 0,2 pri n = 764

Tab. 15. Štatistické vyhodnotenie významnosti rozdielov biochemických parametrov medzi kategóriami

p hodnota	fyziológický moč - celkovo	špecifická hmotnosť	fyziológické pH	Leukocyty v norme	Bielkoviny v norme	Glukóza v norme	Ketóny v norme	uro-bilinogén v norme	Krv v norme	Dusitany v norme	Bilirubín v norme
1M:2M	0,285	0,849	0,504	0,447	0,086	0,314	0,553	0,001****	0,387	0,884	0,512
1M:3M	0,836	0,038*	0,465	0,875	0,576	0,087	0,796	0,026*	0,261	0,139	0,315
1Ž:2Ž	0,000****	0,015**	0,510	0,071	0,017**	0,224	0,724	0,000****	0,649	0,049*	0,172
1Ž:3Ž	0,045*	0,000****	0,002***	0,001****	0,025*	0,114	0,774	0,002***	0,555	0,091	0,370

Legenda: 1, 2, 3 - kategórie; M a Ž - muži a ženy
 p hodnota: hladina významnosti: * - p<0,05; ** - p < 0,025; *** - p < 0,01; **** - p < 0,001

svetovej vojny, no násilné a často neodborné pokusy o asimiláciu Rómov po roku 1945 ich situáciu nezlepšilo. Rómovia boli označovaní ako „sociálne retardovaná skupina, ktorú je potrebné prevychovať“ (Kumanová a kol., 2006). Presný počet Rómov žijúcich na Slovensku nie je známy, a to najmä z dôvodu, že väčšina Rómov rómsky pôvod neudáva, alebo sa hlási k iným menšinám. Na základe Súhrnnej správy o Rómoch z roku 2002 sa ich počet v Slovenskej Republike odhadoval na 365 tisíc, s predpokladom nárastu ich počtu na 515 tisíc ľudí do roku 2020 pri súčasnej populačnej krivke (Kumanová a kol., 2006; Vašečka a kol., 2003). V rámci Slovenska žije z geografického hľadiska

ka najviac Rómov na juhu stredného a východného Slovenska, väčšinou v separovaných a segregovaných osidlach (Kolarcik *et al.*, 2009; Rimárová, 2010; Vano, 2002).

Jednotlivé biochemické parametre alebo ich kombinácie stanovené v moči predstavujú užitočné skríningové vyšetrenie pre obličkové aj mimoobličkové ochorenia. Napriek tomu, že výpovedná hodnota močových parametrov je nižšia ako u parametrov meraných v krvi, môžu poskytovať dôležité informácie najmä v štúdiách o celkovom stave obyvateľstva (Rack, 1999). Biochemické vyšetrenie moču môže odhaliť zvýšený výskyt vyššie spomínaných ochorení v študovanej populácii

najmä v dôsledku nedostatočnej alebo v nesprávnej hygieny, nedostatočnej frekvencii močenia pri nesprávnom pitnom a stravovacom režime, ktoré sú determinované aj nízkou sociálnou úrovňou. Špecifikom našej práce je aj to, že parametre u marginalizovaných skupín Rómov boli porovnané s výsledkami podobne marginalizovanými probandmi majoritnej etnickej skupiny (kategória 2) ako aj s výsledkami probandov majoritnej populácie žijúcej mimo rómskych osád (kategória 3).

Štatisticky významné rozdiely ($p=0,002$) boli pozorované po vyhodnotení počtu probandov s fyziologickými hodnotami pH moču rómskych žien a žien v kategórii 3. Podobné výsledky boli potvrdené aj pri vyhodnotení fyziologických parametrov leukocytov ($p=0,001$), bielkovín ($p=0,025$) a urobilinogénu ($p=0,002$) medzi ženami v kategóriách 1 a 3. V kategórii 1 malo vyhovujúce skúmané biochemické parametre moču 6 žien (2% v rámci kategórie), v kategórii 3 len 7 žien (6% v rámci kategórie), čo bolo vyhodnotené ako štatisticky významný rozdiel ($p=0,045$), pričom v kategórii 2 bolo s rovnakými parametrami zistených až 8 žien (13% v rámci kategórie), čo predstavovalo štatisticky významný rozdiel s hodnotou pod $p=0,001$. Medzi ženami z kategórie 1 a 2 sa zistili štatistické rozdiely aj vo fyziologických hodnotách bielkovín, urobilinogénu a dusitanov.

Pri porovnaní fyziologických hodnôt sledovaných parametrov sa u mužov rómskej a nerómskej populácie štatisticky významný rozdiel potvrdil len v rozdieloch počtu probandov s fyziologickými hodnotami urobilinogénu ($p=0,001$ kategória 1 oproti kategórii 2, resp $p=0,026$ kategória 1 oproti kategórii 3).

Zaujímavé sú výsledky korelácie jednotlivých parametrov v súbore všetkých probandov, ktoré poukazujú na asociácie medzi hodnotami špecifickej hmotnosti a pH, resp. bilirubínu ($r=-0,43$, resp $r=0,20$) (pravdepodobnosť záchytu patologickej koncentrácie analytu v koncentrovanom moči je vyššia) a na koreláciu medzi hodnotami leukocytov a dusitanov ($r=0,27$); bielkovín a urobilinogénu resp. bilirubínu ($r=0,26$ v oboch prípadoch) a významnú koreláciu medzi hodnotami urobilinogénu a bilirubínu ($r=0,60$).

LITERATÚRA

1. **Balla, J. a kol., 2007:** Laboratórna príručka. Prešov: EUROMED-SLOVAKIA, s.r.o., 2007. 323 s. ISBN 978-80-969818-0-9.
2. **Kolarcik, P. et al., 2009:** To what extent does socioeconomic status explain differences in health between Roma and non-Roma adolescents in Slovakia? *Social Sci. Med.* (2009), 68: 1279–1284.
3. **Kumanová a kol., 2006:** *Rómovia*. [online]. Bratislava: Nadácia Milana Šimečku, 2006. 46s. [cit. 2012.03.05.] Dostupné na internete: <http://www.multikulti.sk/dok/kapitola-3.pdf>.
4. **Racek, J.:** Preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření. In **Racek, J. (Ed):** *Klinická biochemie*. Galén-Karolinum 1999, 23–31 ISBN 80-7262-023-1.
5. **Rimárová, K. 2010:** *The Health of the Roma People in Central and Eastern Europe*. Košice: Pavol Jozef Šafárik University, Slovakia, 2010. 100 s. ISBN 978-80-7097-822-1.
6. **Vašečka, M. a kol., 2003:** *Čačipen pal o Roma. Súhrnná správa o Rómoch na Slovensku*. Bratislava: IVO, 2003. 911 s. ISBN 80-88935-41-5.
7. **Vano, B., 2002:** *Projection of Roma population in Slovakia until 2025*. Bratislava: Institute of Informatics and Statistics, 2002. 38 s. 35-2002-A/10e.
8. **Weber, E., 1956:** *Grundriss der Biologischen Statistik*. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, 1956, Lizenznummer 261 215/11/55.

Publikácia vznikla so 100% podporou projektu CEMIO: Centrum excelentnosti pre výskum faktorov ovplyvňujúcich zdravie so zameraním na skupinu marginalizovaných a imunokompromitovaných osôb; ITMS kód projektu: 26220120058.

HYPOXIA NOVORODENCA A BIOCHEMICKÉ MOŽNOSTI JEJ POSÚDENIA

Denisa Maceková*, Oliver Rácz, Peter Dombrovský

Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

*Kontakt: macekova@gmail.com

ABSTRACT

Hypoxia of newborn is a serious medical problem also in present time, which can cause severe damage of various organs or even death of the newborn. The authors present some biochemical parameters in umbilical cord and in newborn's blood, maternal blood and amniotic fluid, which could indicate changes in fetal organism during pregnancy and newborn in perinatal period.

SÚHRN

Hypoxia novorodenca je dodnes závažným problémom medicíny. Jej následky môžu zapríčiniť vážne poškodenie orgánov, prípadne aj smrť novorodenca. Autori uvádzajú niektoré biochemické parametre v pupočnikovej krvi a krvi novorodencov, prípadne krvi matky a plodovej vode, ktoré by mohli poukazovať na zmeny v organizme plodu počas tehotenstva a novorodenca v perinatálnom období.

HYPOXIA NOVORODENCA

Hypoxia novorodenca, vzhľadom na jej následky pre život a fyziologický vývoj novorodenca, je závažným problémom súčasnej medicíny.

Jej následky môžu zapríčiniť vážne poškodenie, prípadne smrť novorodenca. Tieto dôvody sú príčinou stáleho hľadania dostatočného množstva informácií, ktoré by umožnili presné posúdenie stavu a závažnosti zmien v organizme novorodenca v perinatálnom období.

V tomto prístupe má dôležitú úlohu aj sledovanie biochemických parametrov, ktoré môžu informovať o rozvíjajúcich sa poruchách v období pred pôrodom, počas pôrodu alebo po pôrode.

Samostatné posudzovanie zmien v uvedených troch štádiách perinatálneho života novorodenca má svoje opodstatnenie z teoretického i praktického hľadiska. Prechod z intrauterinného života do prostredia, v ktorom sa musí uplatniť rýchla adaptácia na zásobovanie organizmu novorodenca kyslíkom, môže byť kritickým obdobím (Štípek a Měchurová, 1995). Je to tak preto, že čas tesne pred pôrodom, samotný pôrod a obdobie tesne po pôrode na seba úzko nadväzujú. V rýchлом časovom slede dochádza v organizme novorodenca, ale i matky k zmenám funkcie orgánov, ktoré sú podmienkou ďalšieho fyziologického vývoja novorodenca.

Tkanivá a organizmus dieťaťa sú v tomto období oveľa viac odolné voči nedostatku kyslíka ako tkanivá dospelého organizmu. Porušenie fyziologických procesov organizmu matky, ale aj v samotnom organizme novorodenca, môže viesť ku zmenám spojených s nedostatkom kyslíka. Toto môže zapríčiniť poruchy vývoja organizmu novorodenca po pôrode, kedy už je dostatočný prívod kyslíka.

Z hľadiska označenia porúch sa ako hypoxia označuje stav zníženého prívodu kyslíka, anoxia je jeho neprítomnosť. Zásobovanie plodu kyslíkom je rovnaké ako zásobovanie koncových tkanív. V placente dochádza k výmene plynov difúziou (Tomášová, 1990).

Transport kyslíka krvou je za patologických podmienok ovplyvnený koncentráciou hemoglobínu, teplotou, obsahom 2,3-difosfoglycerátu v erytrocytoch a zmenou pH. Alkalóza zhoršuje uvoľnenie kyslíka a acidóza zlepšuje jeho odovzdávanie do tkanív.

Pri nedostatku kyslíka sa začínajú zmeny na molekulovej úrovni potlačením aeróbnej oxidácie glukózy a aktivácie anaeróbnej glykolýzy. Toto však neumožní tvorbu dostatočného množstva ATP potrebného pre normálne funkcie buniek a tkanív novorodenca. Po vyčerpaní energetických zásob, čo pri úplnom nedostatku

kyslíka trvá niekoľko minút, dochádza v nasledujúcom časovom úseku k poruche funkcie a poškodeniu jednotlivých buniek a tkanív.

Rôzne typy buniek nie sú rovnako poškodzované hypoxiou. Neuróny sú poškodené už pri trvaní 10 minútovej anoxie, oproti tomu svalové bunky prežijú aj niekoľko hodín bez kyslíka. V tkanivách prebieha anaeróbna glykolýza, produktom ktorej je kyselina mliečna (laktát). Hromadením laktátu v tkanivách spôsobuje metabolickú acidózu a zmenu pH, ktorá ovplyvňuje funkčný stav organizmu a následne celkový stav dieťaťa.

Nedostatok kyslíka v tkanivách dieťaťa môže byť zapríčinený poruchami cirkulácie, ale v období po pôrode aj poruchami dýchania. Na nedostatok kyslíka organizmus reaguje zmenou pO_2 v krvi.

Pri fyziologickej hodnote parciálneho tlaku kyslíka (pO_2), ktorá je od 8 do 9 kPa, je saturácia krvi kyslíkom 90%. Pri poklese pO_2 na 3,46 kPa klesne saturácia na polovicu. Desaturácia krvi je rôzna v rôznych tkanivách, najvyššia je v krvi, mozgu a nižšia je v kostrových svaloch a obličkách (Tomášová, 1990).

U novorodenca môže dôjsť k poklesu pO_2 , ktorý má viaceré príčiny: poruchy adaptácie po pôrode, vrodené chyby, opakované apnoické pauzy, pneumónia. Znížená hodnota pO_2 ovplyvňuje dýchanie. Jeho pokles je spojený so snahou o zvýšenú ventiláciu, t.j. aj redukcii parciálneho tlaku CO_2 (pCO_2). Ak je tento proces znemožnený, primárnou príčinou poškodenia dýchania dochádza k vzostupu pCO_2 , na čo reaguje novorodenec hyperventiláciou. Vzostup pCO_2 vedie k respiračnej acidóze. Pri veľkom zvýšení pCO_2 a znižuje ventiláciu cv a dôjde k inhibícii dýchacieho centra a tým sa môže potenciovať asfyxia (Javorka a kol., 1996).

Ako asfyxiu označujeme stav dusenia, spojený s nedostatočnou funkciou pľúc. Perinatálna asfyxia predstavuje klinickú jednotku, pri ktorej je plod alebo novorodenec v stave porušenej výmeny dýchacích plynov. Môže byť úplná alebo čiastočná. Úplná znamená zastavenie prívodu kyslíka a vylučovanie CO_2 , čiastočná, znamená, že výmena dýchacích plynov je iba redukovaná, čo však môže spôsobiť poškodenie novorodenca (Tomášová, 1990).

Príčinou asfyxie môžu byť: zlyhanie respiračných centier, respiračné obštruktívne choroby, primárne poruchy (nervový systém, dýchacie svaly, neuromuskulárne spojenie), infekcia (Banagale a Donn, 1986).

Následkom nedostatku kyslíka dochádza k zmenám, ktoré postihujú tkanivá dieťaťa, pričom je najviac poškodené tkanivo CNS. Následky poškodenia CNS môžu mať rôznu formu a lokalizáciu.

Z hľadiska lokalizácie zmien sú poškodené hlavne nasledovné oblasti tkaniva CNS: kôrová a podkôrová hmota, subependymálna zárodočná matrix, periventriculárna biela hmota.

Ťažká hypoxia vyvoláva nekrózu mozgovej kôry a mozočku a ischemické zmeny, odumretie kôrových neurónov, motorickej a asociatívnej oblasti u donosených detí. U nedonosených ide hlavne o nekrózu bielej

hmoty. Všetky zmeny, ktoré tieto stavy navodzujú sú v klinike zahrnuté pod názvom „hypoxická ischemická encefalopatia“ (Mydlil a kol., 1990).

Klinicky sa takéto poškodenie môže prejavíť ako: porucha motoriky, porucha senzorická – zrak, sluch, mentálna retardácia, rôzne formy epilepsie.

I keď sa podarilo znížiť nebezpečenstvo niektorých porúch motoriky u nedonosených detí, zatiaľ sa nepodarilo vyriešiť tieto problémy u donosených novorodencov a zároveň do popredia vystúpili poruchy v psychickej oblasti, pričom sa dajú len ťažko rozlíšiť poškodenia spôsobené pred pôrodom a po pôrode.

Najväčšie riziko sa vyskytuje u novorodencov s anamnézou: dlhodobej umelej pľúcnej ventilácie, asfyxie s neurologickými prejavmi, vnútro maternicovej hypotrofie s asfyxiou, vnútrokomorového krvácania, neonatálnej meningitídy, neadekvátneho liečenia hyperbilirubinémie s hypoxiou (Mydlil a kol., 1990).

Ťažká pôrodná asfyxia postihuje nielen predčasne narodených, ale aj donosených a prenosných jedincov. Existuje široká paleta možných poškodení organizmu, pričom najväčším klinickým problémom je sekundárne poškodenie alebo odumretie funkčne dôležitých štruktúr CNS (Banagale a Donn, 1986).

BIOCHEMICKÉ PARAMETRE POUKAZUJÚCE NA HYPOXIU NOVORODENCA

V tejto časti je uvedený prehľad tých biochemických parametrov, ktoré odrážajú energetický metabolizmus tkanív a môžu tak poukazovať aj na hypoxický resp. asfyktický stav novorodenca. Tieto parametre sa môžu stanovovať v krvi novorodenca, pupočníkovej krvi, plodovej vode, krvi matky a mozgovomiechovej tekutine.

Kyslík a jeho parciálny tlak – pO_2

Na nedostatočné zásobovanie kyslíkom organizmus reaguje takmer okamžite zmenou pO_2 v krvi.

Parciálny tlak kyslíka v arteriálnej krvi novorodencov hneď po pôrode dosahuje hodnotu v rozpätí od 1,1 do 3,2 kPa. 5 minút po pôrode môže stúpať na hodnotu od 4,4 do 10 kPa. Hodinu po pôrode by mal byť pO_2 v rozpätí od 7,3 do 10,6 kPa (Meško a kol., 1998). V pupočníkovej krvi zdravých novorodencov je pO_2 približne 1,65 kPa (Tomášová, 1990).

Za fyziologických podmienok je hodnota pO_2 v plodovej vode okolo 1,82 kPa a závisí od prietoku krvi periférnymi žilami plodu a placenty. Táto hodnota sa však nemení výraznejšie ani pri smrti plodu. Množstvo kyslíka v plodovej vode preto nepredstavuje včasnú informáciu o oxygenácii plodu (Mydlil a kol., 1975).

CO_2 a jeho parciálny tlak – pCO_2

Oxid uhličitý je koncovým produktom metabolizmu, ktorý ovplyvňuje reguláciu dýchania a funkciu kardiovaskulárneho systému prostredníctvom parciálneho tlaku v arteriálnej krvi.

V krvi novorodencov sa za fyziologických podmienok hodnota $p\text{CO}_2$ pohybuje od 2,8 do 5,5 kPa. V plodovej vode sa uvádza koncentrácia CO_2 v 11. až 14. týždni gravidity 18,6 mmol.l⁻¹ a v 36. až 40. týždni 14,9 mmol.l⁻¹, pričom hodnoty $p\text{CO}_2$ dosahujú fyziologické hodnoty v 11. až 14. týždni gravidity 7,37 kPa a v 36. až 40. týždni 7,63 kPa (Tomášová a kol., 1990).

Krvné plyny O_2 a CO_2 sa do plodovej vody dostávajú z krvného obehu plodu alebo krvného obehu matky cez placentu. Z tohto dôvodu sa musí brať do úvahy pri interpretácii zmien hodnôt týchto parametrov nielen stav novorodenca, ale aj stav krvného obehu matky a placenty, čo do určitej miery komplikuje interpretáciu hodnôt $p\text{O}_2$ a $p\text{CO}_2$ vo vzťahu k hypoxii novorodenca (Mydlil a kol., 1975).

pH krvi

Fyziologická hodnota pH v arteriálnej pupočníkovej krvi je po pôrode okolo 7,26. V krvi novorodenca 1 hodinu po pôrode hodnota pH stúpa na 7,3 a 24 hodín po pôrode dosahuje hodnotu 7,4. pH krvi novorodencov starších ako 24 hodín sa pohybuje už v intervale od 7,35 do 7,45.

pH v arteriálnej pupočníkovej krvi nižšie ako 7,2 je vo všeobecnosti považované za acidémiu. Napriek tomu, že sa pri tejto hodnote pH predpokladá perinatálna asfyxia, nemusí byť u novorodencov tento stav sprevádzaný komplikáciami. Ani hodnota pH medzi 7,0 a 7,2, ktorá predstavuje klinicky významnú acidózu, nemusí znamenať hypoxické poškodenie organizmu novorodenca. Hodnota pH v pupočníkovej krvi nižšia ako 6,9 sa už považuje za hodnotu nezlúčiteľnú so životom novorodenca (Carter a kol., 1993). V plodovej vode dosahuje pH hodnoty v 1. trimestri 7,1 a v 3. trimestri 6,9. Počas gravidity sa teda pH v plodovej vode výraznejšie nemení.

Na začiatku pôrodu koncentrácia H^+ v krvi matky stúpa, čo sa prejavuje miernou acidémiou a pH dosahuje hodnoty 7,33 a môže klesať naďalej počas pôrodu. Na konci pôrodu môže pH dosiahnuť hodnotu 7,3, pričom sa metabolická acidóza kompenzuje respiračne (Mydlil a kol., 1975).

Bikarbonáty

Koncentrácia bikarbonátov (HCO_3^-) súvisí s pH prostredím organizmu. Pri respiračnej acidóze stúpa ich koncentrácia s klesajúcim pH krvi. V prípade respiračnej alkalózy ich koncentrácia klesá so stúpajúcim pH. Pri metabolickej acidóze klesá koncentrácia bikarbonátov s klesajúcim pH a pri metabolickej alkalóze ich koncentrácia stúpa so stúpajúcim pH (Javorka a kol., 1996).

V plodovej vode sa koncentrácia HCO_3^- počas tehotenstva v jednotlivých trimestroch gravidity mení nasledovne. V 1. trimestri dosahuje hodnoty 19,8 mmol.l⁻¹, v 2. trimestri 16,08 mmol.l⁻¹ a v 3. trimestri 15,5 mmol.l⁻¹ (Tomášová, 1990).

V krvi matky koncentrácia HCO_3^- dosahuje hodnoty v 1. trimestri 22 mmol.l⁻¹ a v 3. trimestri 20,4 mmol.l⁻¹. Počas pôrodu koncentrácia HCO_3^- v krvi matky klesá z 19,6 mmol.l⁻¹ na hodnotu 14,8 mmol.l⁻¹ na konci pôrodu (Pap a kol., 1980).

Kyselina mliečna – laktát

Laktát je dobrým ukazovateľom anaeróbného odbúravania glukózy. Glykolýza prebieha za účasti oxidovaného NAD^+ , ktorý sa v tomto procese redukuje na NADH_2 . Pri hypoxii sa NADH_2 hromadí v dôsledku zníženého transportu elektrónov na kyslík v terminálnej oxidácii. Pyruvát, koncový produkt glykolýzy, sa premieňa účinkom laktátdehydrogenázy na laktát a tým opäť vzniká oxidovaný NAD^+ , aby mohla prebiehať glykolýza.

V krvi jednodňových novorodencov sa koncentrácia laktátu pohybuje od 0,4 do 2,9 mmol.l⁻¹ (Tomášová, 1990). U donosených novorodencov bez príznakov hypoxie v krvi klesá laktát z hodnoty 2 mmol.l⁻¹ z prvého dňa po narodení na hodnotu 1,6 mmol.l⁻¹ na tretí deň po narodení. Na piaty deň sa už táto hodnota (1,50 mmol.l⁻¹) výraznejšie nemení (Jung a kol., 1985). U novorodencov so silnou hypoxiou je hladina laktátu 3,8 mmol.l⁻¹, čo je vyššia hodnota v porovnaní so zdravými novorodencami (Ruth a Raivio, 1984).

V pupočníkovej krvi novorodenca sa môže koncentrácia laktátu pohybovať od 1,1 do 3,3 mmol.l⁻¹ (Tomášová, 1990). Pokiaľ sa vyskytujú organické kyseliny v plodovej vode, nebol zatiaľ objasnený ich pôvod. Vyššie množstvo laktátu v plodovej vode v porovnaní s krvou pupočníka môže byť spôsobené vylučovaním z plodu alebo z placenty.

V jednotlivých trimestroch sa koncentrácia laktátu mení nasledovne. V prvom trimestri dosahuje laktát priemerné hodnoty 81,8 mg/100 ml plodovej vody. V druhom trimestri klesá množstvo laktátu na 66,9 mg/100 ml a v treťom trimestri znovu stúpa na hodnotu 102,4 mg/100 ml plodovej vody. Toto zvýšenie v treťom trimestri v porovnaní s druhým je možné vysvetliť vylučovaním laktátu do plodovej vody samotným plodom. Avšak diagnostikovanie asfyxie plodu na základe množstva laktátu v plodovej vode naráža na problémy variability hodnôt a sama zvýšená hodnota je málo spoľahlivá

V krvi matky sa množstvo laktátu v prvých dvoch trimestroch nemení (10 mg/100 ml). V treťom trimestri môže stúpnuť na 20 mg/100 ml krvi (Mydlil a kol., 1975).

Pomer laktátu ku pyruvátu

Pomer hodnôt laktátu ku pyruvátu (L/P) v krvi je dôležitým ukazovateľom energetického metabolizmu buniek. Fyziologická hodnota L/P pomeru v krvi je 10 (Meško a kol., 1998).

Príčinou zvýšeného kvocientu L/P môže byť: zmena pomeru ($\text{NADH} + \text{H}^+$)/ NAD^+ v cytoplazme bunky, šokový stav, kardiopulmoralný bypas, akútna hypoxémia, ťažká anémia, traumatické poškodenie mozgu (Tomášová, 1990).

Triacylglyceroly - TAG

Za fyziologických podmienok sa koncentrácia TAG v pupočníkovej krvi môže pohybovať od 0,45 do 1,00 mmol.l⁻¹.

Hypertriglyceridémia sa hodnotí ak je hladina TAG vyššia ako 0,8 mmol.l⁻¹. Zvýšená hladina TAG v pupočníkovej krvi sa vysvetľuje ako jav sprevádzajúci asfyxiu nedonosených jedincov. Pri hypoxii plodu pred pôrodom sa táto zvýšená hladina považuje len za časť metabolického obrazu, pretože okrem TAG sa zistila v pupočníkovej krvi aj vysoká hladina glycerolu a VKK a preto sa tieto zmeny vysvetľujú nasledovne.

Pri hypoxii klesá pH fetálnej krvi, stúpa CO₂, stimuluje sa sekrécia katecholamínov, ktoré spôsobujú lipolýzu TAG v tukovom tkanive. V cirkulácii stúpajú hladiny VKK a glycerolu, ktoré sa neoxidujú v dostatočnej miere a môžu sa dostať do cirkulácie matky alebo sa vychytávať pečeňou plodu. Po pôrode, kedy sa na metabolizme VKK už nepodieľa organizmus matky, dochádza preto k ich vzostupu v pupočníkovej krvi spolu s glycerolom. Feto-maternálny transport VKK je prerušený, a ich hladina ďalej stúpa spolu s TAG (Grossmann *a kol.*, 1984).

Fyziologické hodnoty VKK sa pohybujú v krvi novorodenca okolo 0,62 μmol.l⁻¹ a v pupočníkovej krvi okolo 0,38 μmol.l⁻¹ (Tomášová, 1990).

Ketolátky

Pri zvýšenej lipolýze sa zvyšuje ponuka VKK v krvi a v pečeni novorodencov vzniká vo zvýšenej miere acetylkoenzým A, ktorý sa potom ďalej premieňa na ketolátky. V krvi novorodencov je približne 10 násobne vyššia koncentrácia ketolátok ako v krvi dospelých. Za fyziologických podmienok je hladina ketolátok v krvi novorodencov v podobe beta-hydroxymaslovej kyseliny 260 - 1064 μmol.l⁻¹ a acetoctovej kyseliny 143 - 355 μmol.l⁻¹ (Tomášová, 1990).

Bielkoviny

Za fyziologických podmienok sa v pupočníkovej krvi pohybuje hladina bielkovín od 52 do 91 g.l⁻¹. V krvi zdravých novorodencov sa ich hladina pohybuje od 46 do 70 g.l⁻¹ (Džúrik *a kol.*, 1996).

U novorodencov s intrauterinnou hypoxiou sa uvádzajú nižšie hladiny bielkovín a tento pokles sa vysvetľuje zvýšeným katabolizmom za stresových podmienok a hypoxickým poškodením ciev s následným extravazálnym únikom (Grossmann *a kol.*, 1984).

V plodovej vode sa množstvo bielkovín v jednotlivých trimestroch mení. V prvom trimestri sa pohybuje hodnota okolo 154,4 mg/100 ml plodovej vody, v druhom trimestri okolo 256 mg/100 ml a v treťom trimestri okolo 206 mg/100 ml plodovej vody (Tomášová *a kol.*, 1971).

V prípade patologického priebehu tehotenstva resp. hypoxie plodu boli pozorované slabé korelácie proteínogramu matky a novorodenca, čo poukazuje na značnú nezávislosť syntézy bielkovín u plodu od matky (Grossmann *a kol.*, 1984).

Vápnik

V pupočníkovej krvi sa fyziologické hodnoty vápnika pohybujú v intervale od 2,25 do 2,75 mmol.l⁻¹. Koncentrácia vápnika nižšia ako 2 mmol.l⁻¹ v pupočníkovej krvi donosených a nižšia ako 1,75 mmol.l⁻¹ v krvi nedonosených novorodencov sa hodnotí ako hypokalciémia a ak je vyššia ako 2,75 mmol.l⁻¹ sa hodnotí ako hyperkalciémia (Grossmann *a kol.*, 1984).

V plodovej vode sa koncentrácia vápnika počas tehotenstva v jednotlivých trimestroch mení nasledovne: v prvom trimestri dosahuje hodnoty okolo 8,6 mg/100 ml, v druhom trimestri okolo 7,4 mg/100 ml a v treťom trimestri okolo 6,7 mg/100 ml plodovej vody (Mydlil *a kol.*, 1975).

Z týchto hodnôt vyplýva, že hladina vápnika v plodovej vode klesá so stúpajúcim gestačným vekom.

Grossmann *a kol.* (1984) zistili u 40% asfyktických novorodencov hyperkalciémiu, čo by mohlo poukazovať na to, že vápnik by mohol byť jedným z možných indikátorov hypoxického alebo asfyktického stavu novorodenca. Po pôrode nastáva výraznejší pokles vápnika u ohrozených novorodencov, tak ako aj u novorodencov bez perinatálnej asfyxie. U niektorých jedincov bola zistená hypokalciémia, ktorej príčinou bol podľa týchto autorov pravdepodobne funkčný hyperparatyroidizmus vplyvom hypoxie prišitých teliesok. Sprievodným javom pôrodnej asfyxie bola hyperfosfatémia a hypermagneziémia.

Anorganický fosfát

Hladina anorganického fosfátu v pupočníkovej krvi novorodencov sa za fyziologických podmienok pohybuje v rozpätí od 1,3 do 3,0 mmol.l⁻¹, pričom je vyššia ako v krvi dospelých. Tento rozdiel sa vysvetľuje ako odraz rastu kostí plodu počas intrauterinného vývoja (Ráček *a kol.*, 2006).

Hyperfosfatémia, ktorá bola zistená u niektorých hypoxických novorodencov, sa vysvetľuje ako súvis s obmedzenou funkciou novorodeneckých obličiek, ktoré mohli byť postihnuté hypoxiou (Grossmann *a kol.*, 1984).

V plodovej vode sa počas tehotenstva koncentrácia anorganického fosfátu mení v jednotlivých trimestroch nasledovne: v prvom trimestri dosahuje hodnotu okolo 4 mg/100 ml, v druhom okolo 2,7 mg/100 ml a treťom okolo 2,1 mg/100 ml plodovej vody.

Z týchto hodnôt vyplýva, že hladina anorganického fosfátu v plodovej vode klesá s gestačným vekom, pričom je približne o polovicu nižšia v treťom trimestri v porovnaní s prvým (Mydlil *a kol.*, 1975).

ZÁVER

Napriek tomu, že v súčasnosti sú pomerne dobre známe patofyziologické zmeny v organizme novorodencov vyvolaných hypoxiou, ostávajú ešte nevyriešené biochemické zmeny v organizme plodu počas intrauterinného

vývoja ako aj počas perinatálneho obdobia. Výsledky štúdií niektorých autorov síce naznačujú možnosti využitia niektorých biochemických parametrov (parametre acidobázickej rovnováhy, biekoviny, laktát, TAG, vápnik a anorganický fosfát) v pupečníkovej krvi a krvi novorodencov pre posúdenie hypoxie, avšak ostáva naďalej nevyriešená klinickobiochemická diagnostika perinatálnej hypoxie resp. asfyxie novorodenca a jej využitie v klinickej praxi.

LITERATÚRA

1. **Banagale, R. C., Donn, S. M.:** Asfyxia neonaterum. *J. Fam. Pract.*, 1986; 122 (6): 539–546.
2. **Carter, B. S., Haverkamp, A. D., Merenstein, G. B.:** The definition of acute perinatal asphyxia. *Clin. Perinatol.*, 1993; 20 (2): 287–304.
3. **Dzúrik, S. a kol.:** *Štandardná klinickobiochemická diagnostika*. 1996; Osveta Martin, 2.vyd., 465 s.
4. **Grossmann, J., Jánoš, M., Pallay, J., Vavřík, J., Čapková, M.:** Význam vyšetrenia niektorých biochemických parametrov v pupečníkovej krvi rizikových novorodencov. *Výskumná úloha MZ SSR č.07-01-04 „Zdravotný stav dieťaťa a jeho odchýlky“*. Okresný ústav národného zdravia, 1984; 49 s.
5. **Javorka, K. a kol.:** *Klinická fyziológia pre pediatrov*. 1996; Osveta Martin, 1. vyd., 487 s.
6. **Jung, D., Zinsmeyer, J., Grauel, E. L., Gross, J., Lun, A.:** The concentration of hypoxanthine and lactate in the blood of healthy and hypoxic newborns. *J. Perinatal. Med.*, 1985; 13: 43–49.
7. **Meško, D., Pullmann, R., Nosáľová, G.:** *Vademékum klinickej biochémie*. 1998; Osveta Martin, 1. vyd., 1647 s.
8. **Mydlil, V., Tomášová, H., Fuchs, V., Macek, M.:** *Plodová voda a vývoj plodu*. 1975; Avicenum Zdravotnícké nakladateľství Praha, s. 25–31.
9. **Mydlil, V., Tomášová, H., Zoban, P., Velemínský, M.:** *Hypoxie novorozence I.*, 1990; Nakladateľství „DT“ Domu techniky ČSVTS, České Budějovice, s. 37–40.
10. **Pap, A. G., Dashkevych, V. E., Gutman, L. B., Mokryk, H. A., Okhronchuk, V. K.:** State of blood acid-base balance of pregnant woman, fetus and newborn in normancy and with hypoxia and certain aspects of its regulation. 1980; *Ukr. Biokhím. Z.*, 52: 229–234.
11. **Racek, J. a kol.:** *Klinická biochémie*. 2006; Galén Praha, 2. vyd., 329 s.
12. **Ruth, V., Raivio, K. O.:** Purine metabolites and lactate as parameters of hypoxia in the newborn infant. *Ped. Res.*, 1984; 18 (4): 355–358.
13. **Štípek, S., Měchurová, A.:** Reaktivní formy kyslíku v mechanizmu perinatálních poruch. *Čes. Gynek.*, 1995; 60 (2): 112–116.
14. **Tomášová, H.:** Chemická kontrola hypoxie. In **Mydlil, V. a kol.:** *Hypoxie novorozence I.*, 1990; Nakladateľství „DT“ Domu techniky ČSVTS, České Budějovice, s. 92–98.
15. **Tomášová, H., Fuchs, V., Mydlil, V., Masopust, J.:** Plodová voda jako indikátor stavu plodu. *Čes. Ped.*, 1971; 26: 10.

DIAGNOSTICKÝ POTENCIÁL AUTOFLUORESCENCIE KOŽE

Marcela Valko-Rokytovská¹, Anna Birková¹
Marianna Zábavniková², Beáta Hubková¹, Mária Mareková*¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie a Labmed, a.s., Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

²Klinika plastickej a rekonštruktívnej chirurgie UN L. Pasteura a Lekárska fakulta UPJŠ, Košice
Rastislavova 43, 040 01 Košice

*Kontakt: maria.marekova@upjs.sk

SÚHRN

Rakovina kože patrí k najčastejším typom malígnych ochorení. Fluorescenčná spektroskopia poskytuje užitočné morfológické a biochemické informácie, využiteľné na rozlíšenie benígnych a malígnych kožných lézií. Táto neinvazívna metóda je založená na interakcii svetla s hmotou a ako ukazujú nedávne štúdie, fluorescenčná spektroskopia môže byť využitá ako vhodný diagnostický nástroj pre identifikáciu malignít *in vivo* a doplniť tak ostatné diagnostické metódy.

SUMMARY

Skin cancer is one of the most common types of malignant diseases. Fluorescence spectroscopy provides useful morphological and biochemical information that can be used to distinguish between benign and malignant skin lesions. It is a non-invasive method based on the interaction of light with matter, and as it is shown in published studies, fluorescence spectroscopy can be used as a suitable diagnostic tool for identifying cancers *in vivo* and to supply other diagnostic tools.

ÚVOD

Autofluorescencia kože sa už dlhú dobu používa v diagnostike ochorení, akými sú napríklad tinea hlavy, porfýrie, erytrazma alebo niektoré ochorenia pigmentácie (Fitzpatrick, 1987). Nedávno sa začala koža pomocou fluorescenčnej spektroskopie skúmať v súvislosti so stárnutím, na odlišenie biologického stárnutia od stárnutia vplyvom UV žiarenia (Leffel, 1988; Kollias,

1998). Kvôli zvyšujúcemu sa výskytu rakoviny kože je záujem využiť autofluorescenciu kožného tkaniva ako neinvazívnu finančne nenáročnú metódu pre včasnú diagnostiku. Obrovským prínosom by bolo, ak by sa dali týmto spôsobom odlišiť maligne lézie od zdravej kože. Na túto tému už existuje niekoľko pilotných prác (Lohman, 1988; Lohmann, 1991; Sterenborg, 1994; Sterenborg, 1995).

Rakovina kože

V súčasnej dobe je rakovina kože jedným z najčastejších typov malígneho ochorenia. Prejavy rastu vo forme hrbolčekov, ktoré môžu predstavovať neškodné zmeny alebo nezhubné nádory kože, môžu byť zároveň príznakmi vznikajúceho malígneho nádora. Včasná diagnostika zhubných nádorov kože je dôležitá z hľadiska liečby aj prognózy pacienta. Zmeny povrchu a farby kože sú preto prvými príznakmi, ktoré je možné odhaliť už samotnou inšpekciou.

Najčastejšie sa vyskytujúcimi druhmi nádorov kože sú:

1. **nemelanómové nádory**, ktoré sú najrozšírenejšími malignitami v kaukazskej populácii. Delíme ich na:
 - **bazocelulárny karcinóm (BCC)** – nádor vzniká z bazálnych buniek epidermy, vlasových folikulov a mazových žliaz,
 - **spinocelulárny karcinóm (SCC)** – nádor vzniká z buniek pokožky – keratinocytov,
2. **melanómové nádory**, ktorých je 18–20-krát menej ako nemelanómových nádorov (Šimaljaková, 2007) – vznikajú z buniek produkujúcich pigment v pokožke – melanocytov.

Na zvýšené riziko vzniku malígneho ochorenia kože poukazuje prítomnosť prekancerózných zmien. Veľmi častým druhom prekancerózy je aktinická keratóza (AK, Obr. 1, viď str. 67), ktorá sa vyskytuje až u 50 %

populácie (Chu, 1999). Prejavuje sa malými červenými alebo ružovými škvrnkami s drsným povrchom. Vyskytuje sa najmä na miestach, ktoré boli vystavené častému slnečnému žiareniu. AK sa môže malígne zvrhnúť (Jorizzo a kol., 2004), čo je zvyčajne sprevádzané pocitom napätia, zhrubnutím, rastom, exulceráciou. Tento druh prekancerózy sa zvyčajne podarí diagnostikovať včas. Skoré ošetrenie a prevencia AK môže zabrániť jej transformovaniu do prognosticky oveľa závažnejšieho spinocelulárneho karcinómu. Z tohto hľadiska by mala byť AK uznávaná ako začínajúci SCC (Ceilly, 2004, Oppel a kol., 2004). Odhaduje sa, že 6–10% nálezov AK sa môže rozvinúť do invazívneho SCC (Rossi a kol., 2007). Invazívny spinocelulárny karcinóm (spinalióm, skvamocelulárny karcinóm) sa vyskytuje častejšie u mužov ako u žien. Je dokázaný vzťah medzi jeho výskytom, expozíciou intenzívnemu ultrafialovému žiareniu a kožným fototypom. Postihuje predovšetkým pred slnkom nechránené časti tela, ako sú tvár, ušnice, kožu hlavy, chrbát ruky, predlaktie. Spinalióm prerastá do okolia, poškodzuje miesto vzniku a po dosiahnutí určitej veľkosti metastázuje, najprv do regionálnych lymfatických uzlín a neskôr aj do vzdialených orgánov.

Bazocelulárny karcinóm je najčastejšie sa vyskytujúci nádor spomedzi všetkých druhov rakoviny kože a tiež sa vyskytuje najmä na miestach pravidelne vystavených slnečnému žiareniu. Výskyt u mužov aj žien je približne rovnaký. Zvyčajne vyzerá ako malý ružový uzlík alebo škvrna, no môže tiež napodobovať kožnú atrofiu alebo jazvy. Ak sa nelieči, obnaží sa povrch lézie (eroduje), krváca, vytvárajú sa chrasty. Bazocelulárny karcinóm vzniká de novo, rastie pomaly a do iných oblastí tela sa šíri zriedkavo. Prejavuje sa lokálne infiltratívnym a deštruktívnym rastom, ale nemetastázuje a zvyčajne nepredstavuje život ohrozujúce riziko. Neliečený BCC však môže spôsobiť rozsiahle poškodenie v mieste svojho výskytu a závažnosť ochorenia závisí od lokality deštrukcie (Trakatelli a kol., 2007).

Malígnym melanómom patrí medzi najnebezpečnejšie typy rakoviny kože. Pokiaľ nie je liečený zavčas, môže sa rozšíriť do iných orgánov a spôsobiť smrť. Normálne pigmentové bunky – melanocyty, ktoré vytvárajú melanín, sú zvyčajne rovnomerne lokalizované v hlbokjej vrstve pokožky. Ak sa vyskytujú v hustejšom zoskupení, vytvárajú rôzne formy materských znamienok, tzv. névy, ktoré počas života môžu meniť tvar. Z plochých sa neskôr môžu stať vyčnievajúce benígne nádory kože. Od bežných pigmentových névov sa líšia tvarom, ohraničením a zafarbením dysplastické névy. Jedincov s dysplastickými névami, ale aj ich pokrvných príbuzných, treba považovať za rizikových, a preto by z dôvodu možného rýchleho vývoja zhubného melanómu mali byť pod pravidelným lekárske dozorom. Malígnym melanómom sa spočiatku prejavuje nepravidelne ohraničenou modročiernou, niekedy ružovou alebo šedou škvrnou, alebo ako znamienko, ktoré mení svoj tvar (Obr. 2, vid' str. 67). Jeho povrch býva často hr-

boľatý, laločnatý, ale môže byť aj úplne plochý. Často je mokvajúci a v pokročilejšom štádiu exulceruje a krváca. Melanóm sa správa agresívne. Na začiatku rastie plošne – má horizontálnu fázu rastu (Obr. 3, vid' str. 67), neskôr prechádza do vertikálnej fázy rastu, vytvára nodulus (Obr. 4, vid' str. 67), zasahuje do hlbších vrstiev kože a šíri sa lymfatickými a krvnými cestami aj do iných orgánov. Výskyt melanómu na celom svete narastá a podľa štatistických údajov sa počet diagnostikovaných melanómov každých 10–20 rokov zdvojnásobuje (Garbe a Leiter, 2009). Najdôležitejší prognostický determinant je diagnostikovať melanóm v horizontálnej fáze rastu, t.j. kým je tenký. Presná klinická diagnostika pigmentových nádorov nie je vždy jednoduchá. Je založená predovšetkým na súbore viacerých morfológických znakov (Chwirut a kol., 2001). Melanóm má síce typické znaky, ako čierna farba, veľkosť, asymetria, nepravidelné okraje lézie, ale rovnako môže svojim vzhľadom imitovať iný typ benígneho alebo malígneho kožného nádoru.

Fluorescencia zdravej kože a kože pri nenádorových ochoreniach

Fluorescencia patrí medzi univerzálne a spoľahlivé metódy štúdia živej hmoty a procesov v nej prebiehajúcich. Ide o neinvazívnu metódu založenú na interakcii svetla s hmotou. Nedávne štúdie ukázali, že optické metódy, zvlášť fluorescenčná spektroskopia, ktorá patrí medzi najcitlivejšie spektroskopické techniky, môžu byť použité pre včasnú detekciu nádorov a doplniť tak ostatné diagnostické metódy (Svanberg, 2004). Okrem citlivosti je ďalšou výhodou optických metód ich objektivita a reprodukovateľnosť kvalitatívnych meraní.

Fluorescenčná spektroskopia ľudskej kože poskytuje užitočné morfológické a biochemické informácie. Endogénna fluorescencia kože je spôsobená prítomnosťou špecifických fluorofórov ako sú aminokyseliny (napr. tryptofán a tyrozín), štruktúrne proteíny (napr. kolagén a elastín), koenzýmy (NADH – redukovaný nikotínamidadenín dinukleotid a FAD – flavínadenín dinukleotid), či porfyríny (Zeng a kol., 1998). Tieto látky po absorbovaní svetla s určitou vlnovou dĺžkou dokážu absorbované svetlo opäť vyžiariť. Každý fluorofór má charakteristické excitačné aj emisné spektrum. Fluorescenčné spektrum každého z fluorofórov sa môže zmeniť, ak sa zmení jeho molekulová štruktúra alebo prostredie fluorofóru. Autofluorescenčné spektrum kože sa skladá z prekryvajúcich sa spektier jednotlivých fluorofórov a v dôsledku prekrytia je náročné rozlíšiť a identifikovať zmeny v celkovom spektre (Richards-Kortum a kol., 1996). Problematika autofluorescencie je o to zložitejšia, že niektoré molekuly, napríklad melanín alebo hemoglobín narušujú fluorescenčný signál absorpciou (Anderson, 1989). Na fluorescenčnom spektre kože sa podieľa signál z epidermis aj dermis. Na a kol. (2000) študovali variabilitu autofluorescencie zdravej ľudskej kože na rôznych miestach tela a zistili, že sa podľa lokality výrazne odlišuje. Autofluorescenčné

spektrá získali *in vivo* od 17 pacientov z oblasti čela a zadku, s použitím piatich excitačných vlnových dĺžok: 340, 350, 360, 370 a 380 nm. Spektrá boli namerané v rozsahu od 400 do 800 nm a obsahovali tri dominantné píky s maximami pri vlnových dĺžkach 450, 520 a 625 nm, ktoré by mohli odpovedať fluorofórom NADH, FAD a porfyrinom. V nameraných spektrách sú však pri použitých excitačných vlnových dĺžkach pravdepodobne skryté aj iné fluorofóry, napríklad kolagén, elastín, či lipofuscín. Medzi autofluorescenciou kože čela a zadku boli zistené výrazné rozdiely. Na čele bola omnoho výraznejšia fluorescencia pri vlnovej dĺžke 625 nm spôsobená pravdepodobne fluorescenciou porfyrinov produkovaných baktériami prítomnými v mazových žľazách (napr. *Propionibacterium acnes*). Nižší fluorescenčný signál kože čela v porovnaní so zadkom v oblastiach 450 a 520 nm autori pripisujú vyššej pigmentácii tváre. Prítomné melaníny by mohli spôsobovať zhasenie fluorescencie.

Noordzij *a kol.* (2011) testovali vplyv hydratácie, vazokonstrikcie, hyperémie a rôznych kozmetických prípravkov na autofluorescenciu kože, ktorá bola meraná pred a po miestnej aplikácii telovým mliekom, krémom, opaľovacím krémom a tiež samoopaľovacím krémom. Na odstránenie týchto kozmetických prípravkov boli použité alkoholové tampóny a samotné umytie mydlom. Výsledky ukázali, že telové mlieko fluorescenciu zvýšilo o 18 %. Denný krém, krém na opaľovanie aj samoopaľovací krém spôsobil nárast o > 100 %. Až na telové mlieko, následné čistenie alkoholovými tampónmi a umytie mydlom, nevrátilo hodnoty fluorescencie na pôvodné. Vplyv samopaľovacieho krému pretrvával po dobu 2 týždňov a krému na opaľovanie 4 dni. Hyperémia spôsobená horúcim kúpeľom, paprikovou pastou a po postokluzívnej reaktívnej hyperémii spôsobili pokles fluorescencie o 18 %, 22 % a 2,3 %. Vazokonstrikcia v dôsledku ponorenia ruky do studenej vody spôsobila 10 % nárast intenzity fluorescencie. Hydratácia fluorescenciu kože neovplyvňuje. Meranie fluorescencie kože je teda silne ovplyvnené niektorými typmi pleťových prípravkov. Tento účinok často pretrváva niekoľko dní aj po aplikácii čistiacich alkoholových tampónov a následnom umytí mydlom. Označená hyperémia a vazokonstrikcia tiež ovplyvňuje autofluorescenciu kože.

Okrem doteraz spomínaných excitačných vlnových dĺžok je možné na štúdium používať aj nižšie vlnové dĺžky z UV oblasti, ktoré absorbujú proteíny obsahujúce tryptofán. Štúdie preukázali, že tryptofán a kolagény v koži môžu slúžiť ako kvantitatívne ukazovatele pre normálnu, chorú, chronicky starú a slnkom poškodenú kožu. Excitačné spektrum s maximom 295 nm je charakteristické pre tryptofán v kožnej vrstve epidermis. Excitačné spektrá pri 340 nm a 360 nm zodpovedajú kolagénu (http://www.jobinyvon.com/usadivisions/Fluorescence/applications/F19_App_Note_Human_Skin.pdf).

Endogénna fluorescencia kože bola skúmaná aj u pacientov so psoriázou (Gillies *a kol.*, 2000). Signál bol snímaný na volárnej strane predlaktia u 12

zdravých dobrovoľníkov a 12 pacientov s psoriázou na psoriatickom plaku aj mimo neho. Všetci dobrovoľníci mali kožný typ II alebo III. Štúdia bola doplnená aj o merania vzoriek získaných *ex vivo* z kadáverov na bližšie štúdium epidermis a dermis. Štúdia ukázala, že charakteristické znaky je možné vizualizovať vo fluorescenčnom spektre, ktoré sú spojené so špecifickými fluorofórmami nachádzajúcich sa v koži. Fluorescenčné excitačné spektrá boli namerané v oblasti 260–480 nm. V každom fluorescenčnom spektre kože je prítomné excitačné maximum pri 295 nm, ktoré je charakteristické pre tryptofán a pochádza z epidermis a ďalšie dve excitačné maximá pri 335 a 370 nm, prislúchajúce kolagénu prítomnému v dermis. Fluorescenčné spektrá získané zo zdravej kože sa odlišovali od spektier získaných z kože pacientov s psoriázou, u ktorých bol signifikantne zvýšený signál tryptofánu.

Fluorescencia kožných nádorov

Fluorescenčná spektroskopia môže byť v kombinácii s novými diagnostickými algoritmi použitá na rozlíšenie medzi benignými a malignými kožnými léziami (Borisova, 2006). Pre rozlíšenie fluorescencie normálneho a neoplastického tkaniva sa zvolila ako najvhodnejšia excitačná vlnová dĺžka 340 nm. Samotné štúdium predchádzali klinické vyšetrenia lézií skúsenými dermatológmi pomocou digitálneho epiluminescenčného mikroskopu, histologická klasifikácia lézií a overenie študovaných výsledkov. Získané spektrá endogénnej fluorescencie normálneho tkaniva, benigneho névu, dysplastického névu a malígneho melanómu ukázali signifikantné zmeny v intenzitách fluorescencie. Intenzity fluorescencie (maximá pri 480–490 nm) benigných a dysplastických névov boli podobné, ale ľahko odlišiteľné od melanómových lézií (Obr. 5, viď str. 67). Hypervaskularizácia malígnej neoplázie sa stala diagnostickým kritériom (Young, 1997) a má za následok zvýšené detegovanie prítomnosti hemoglobínu. Dokonca aj pri slabej fluorescencii malígnych melanómových lézií bola pozorovaná prítomnosť hemoglobínu. Efekt natívnych absorbérov nachádzajúcich sa v tkanive bol pri hodnotení nameraných spektier z dôvodu ich skreslenia akceptovaný. Algoritmus bol založený na hodnotách intenzity hlavného fluorescenčného maxima (480–490 nm) a výsledky z neho sú porovnateľné, ak nie lepšie, s výsledkami z iných neinvazívnych dermatologických diagnostických metód. Fluorescenčná detekcia benigných a malígnych pigmentových lézií môže byť využitá ako vhodný neinvazívny diagnostický nástroj pre identifikáciu malignít *in vivo*.

Nemelanómová rakovina kože (NMSC) je najčastejšou rakovinou u kaukazskej populácie a jej výskyt má epidemické rozmery po celom svete (English *a kol.*, 1997; Salasche, 2000; Diepgen *a kol.*, 2002; Trakatelli *a kol.*, 2007). Na zistenie skorých NMSC na tvári, krku, hrudníku, chrbte a rukách u pacientov, ktorí boli vystavení dlhodobému UV žiareniu, bola použitá fluorescenčná detekcia v kombinácii s kyselí-

nou 5-aminolevulénovou (5-ALA) (de Leeuw *a kol.*, 2009). U 93 pacientov s potvrdenými kožnými léziami bola pozitívna fluorescencia detegovaná u 61 pacientov. Po histologickej verifikácii išlo o 28 benigných lézií a 33 (pre-)maligných lézií (29 prípadov AK, 3 BCC a 1 SCC). Diagnostika kože pomocou fluorescencie s použitím 5-ALA a špecializovaný počítačový detekčný a vizualizačný systém ponúka možnosť detekcie NMSC v rannej, predklinickej fáze. Technika je vhodná na skúmanie veľkých plôch kože a je použiteľná pri kontrole a sledovaní liečby rakoviny kože.

In vivo a *ex vivo* autofluorescencia tkanív (endogénna fluorescencia) boli použité na zistenie prítomnosti markerov, ktoré by mohli detegovať abnormality tkanív a/alebo malignity (Brancaleon *a kol.*, 2001). Autofluorescencia normálnej kože a nádorov *in vivo* bola realizovaná na 18 pacientoch s diagnózou NMSC. Zistilo sa, že v bunkách bazocelulárneho karcinómu (BCC) a v spinocelulárnom karcinóme (SCC) bola endogénna fluorescencia tryptofánu silnejšia v nádore ako v normálnych tkanivách, pravdepodobne v dôsledku zosilnenia/zhrubnutia pokožky a/alebo hyperproliferácie. Naopak, intenzita fluorescencie súvisiaca s kožným kolagénom bola nižšia pri nádoroch ako v okolitých zdravých tkanivách. Pravdepodobne je to spôsobené degradáciou a eróziou spojivového tkaniva vzhľadom na pôsobenie kolagenázy uvoľnenej z tumorových tkanív (Yuan a Relue, 2008). Výsledky ukázali, že endogénna fluorescencia pri NMSC s excitáciou v UV oblasti, má charakteristické črty, ktoré sa líšia od normálneho tkaniva a môžu byť využité pre neinvazívnu diagnostiku a detekciu nádoru.

Van der Beek *a kol.* (2011) vo svojej štúdií na identifikáciu NMSC použili fluorescenciu protoporfyrínu IX (PpIX). Lipozomálne viazaná kyselina 5-aminolevulénová (5-ALA) bola použitá ako fotosenzitizér. Ich štúdia bola vykonaná na tridsiatich pacientoch podozrivých na NMSC, z toho 14 žien a 16 mužov, priemerný vek 62, typ kože I až III. Výsledky analýzy boli potvrdené dermatoskopicky a ukázali, že autofluorescencia PpIX môže byť významným markerom pre detekciu NMSC so senzitivitou 97 % a špecificitou 100 %. 5-ALA použili pri jednoduchom fluorescencnom diagnostikovaní rakoviny kože aj Hewett *a kol.* (2000). Krém obsahujúci 5-ALA sa nanášali v postihnutej oblasti, čím došlo k hromadeniu PpIX v nádorovom tkanive. Pri excitácii v oblasti 400 nm PpIX fluoreskoval pri 635 nm. Detekciou spomínanej fluorescencie bolo možné určiť presnú lokalizáciu a rozsah nádoru.

Malígna transformácia melanocytov je spojená so zmenami počas melanogenézy (Obr. 6, viď str. 68), preto by zmena autofluorescencie melanínu mohla byť informatívnym ukazovateľom (Leupold *a kol.*, 2011). Melanín v kožných tkanivách fluoreskuje veľmi slabo a jeho emisia je prekrytá emisiou iných endogénnych fluorofórov, ako sú napríklad NAD(P)H a flavonoidy (Teuchner *a kol.*, 1999; Zeng *a kol.*, 1995). Na základe toho bola vyvinutá nová metóda, pri ktorej

sa selektívne excituje melanín kožného tkaniva tzv. dvojfotónovou excitáciou. Eichhorn *a kol.* (2009) študovali fluorescenciu melanínu touto metódou s cieľom diferencovať rôzne pigmentové lézie. V porovnaní s benignou melanocytárnou léziou (napr. bežný névus) zaznamenali zreteľný rozdiel vo fluorescencii maligného melanómu (vrátane melanoma *in situ*). Špecifická fluorescencia bola zaznamenaná aj pre dysplastický névus. Podobné výsledky získali aj v štúdií na 167 pacientoch, ktorú vykonali Leupold *a kol.* (2011). Po dvojfotónovej excitácii melanínu pri melanóme a bežných melanocytárných névoch zaznamenali výrazne rozdiely v spektrách. Pre všetky typy bežných melanocytárných névov má melanín fluorescencné maximum pri 590 nm. Charakteristické fluorescencné maximum melanínu pri melanóme namerali pri 640 nm, bez ohľadu na typ melanómu. V sérii 167 prípadov bola citlivosť tejto novej metódy na diagnostiku melanómu 93,5 %, špecificita 80,0 % a diagnostická presnosť 82,6 %. Tieto rozdiely vo fluorescencných spektrách sú pravdepodobne spôsobené inými pomermi eumelanínu a pheomelanínu (Simon *a kol.*, 2009). Fluorescencná dvojfotónová excitácia je novou a unikátnou diagnostickou metódou, ktorá môže v budúcnosti doplniť dermatohistopatológiu.

ZÁVER

V súčasnosti je problematika vzniku zhubných nádorov stále veľmi aktuálna téma. Štatistiky výskytu zhubných kožných nádorov majú vzostupnú tendenciu. Stúpajúci trend je spôsobený predovšetkým trvalou redukciou ozónovej vrstvy zemskej atmosféry, čo umožňuje prienik väčšieho množstva ultrafialového žiarenia na zemský povrch a tiež zmenou životného štýlu, ktorý sa spája s dlhodobou expozíciou na slnku. Medicínske aplikácie fluorescencnej spektroskopie zahŕňajú včasné odhalenie zhubných nádorov, detegovanie zmien na cievach, koži alebo slizniciach. V súčasnosti je ešte diskutabilné, ktorá z metódik je najvhodnejšia pre detekciu a diferenciaciu kožných maligných lézií. Veľmi intenzívne a podrobne sa skúma metabolizmus a štruktúra melanínov. Doterajšie výsledky ukazujú, že odlišné optické vlastnosti rôznych kožných nálezov by mohli byť podkladom ich včasnej neinvazívnej diagnostiky.

LITERATÚRA

1. Anderson, R. R.: *In vivo* fluorescence of human skin. *Arch. Dermatol.*, 1989, 125, 999.
2. Borisova, E.: *Fluorescence detection improves malignant melanoma diagnosis*. The International Society for Optical Engineering. 2006.
3. Brancaleon, L., Durkin, A. J., Tu, J. H., Menaker, G., Fallon, J. D., Kollias, N.: *In vivo* Fluorescence Spectroscopy of Nonmelanoma Skin Cancer. *Photochemistry and Photobiology*, 2001, 73, 2, 178–183.

4. Ceilly, R. I.: Modalities and mechanisms of action. In *The field treatment of actinic keratosis. Skin Aging*. 2004, 3–5.
5. De Leeuw, J., Van der Beek, N., Neugebauer, W. D., Bjerring, P., Neumann, H. A. M.: Fluorescence Detection and Diagnosis of Non-Melanoma Skin Cancer at an Early Stage. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2009, 41, 96–103.
6. Diepgen, T. L., Mahler, V.: The epidemiology of skin cancer. *Br. J. Dermatol.*, 2002, 146(Suppl 61), 1–6.
7. Eichhorn, R., Wessler, G., Scholz, M., Leupold, D., Stankovic, G., Buder, S., Stücker, M., Hoffmann, K.: Early diagnosis of melanotic melanoma based on laser-induced melanin fluorescence. *J. Biomed. Opt.*, 2009, 14, 3.
8. English, D. R., Armstrong, B. K., Krickler, A., Fleming, C.: Sunlight and cancer. *Cancer Causes Control.*, 1997, 8, 271–283.
9. Fitzpatrick, T. B., Bernhard J. D.: The structure of skin lesions and Fundamentals of diagnosis, In Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., Freedberg I. M., Austen, K. F., eds.: *Dermatology in general medicine*. New York: McGraw-Hill, Inc. 1987, 20–47.
10. Garbe, C., Leiter, U.: Melanoma epidemiology and trends. *Clin. Dermatol.*, 2009, 27, 3–9.
11. Gillies, R., Zonios, G., Anderson, R. R., Kollias, N.: Fluorescence Excitation Spectroscopy Provides Information About Human Skin *In Vivo*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2000, 115, 704–707.
12. Hewett, J., McKechnie, T., Sibbett, W., Ferguson, J., Clark, C., Padgett, M.: Fluorescence detection of superficial skin cancers. *Journal of Modern Optics*, 2000, 47, 11.
13. http://www.jobinyvon.com/usadivisions/Fluorescence/applications/F19_App_Note_Human_Skin.pdf
14. Chu, A. C., Edelson, R. L.: *Malignant tumors of the skin*, Oxford Univ. Press Inc. NY. 1999, 425.
15. Chwirot, B. V., Chwirot, S., Sypniewska, N., Michniewicz, Z., Redzinski, J., Kurzawski, J., Ruka, W.: Fluorescence *In Situ* Detection of Human Cutaneous Melanoma: Study of Diagnostic Parameters of the Method. *J. Invest. Dermatol.*, 2001, 117, 1449–1451.
16. Jorizzo, J. L., Carney, P. S., Ko, W. T., Robins, P.: Treatment options in the management of actinic keratosis. *Cutis*, 2004, 74(S6), 9–17.
17. Kollias, N., Gillies, N., Moran, M., Kochevar, I. E., Anderson, R. R.: Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitative markers of aging and photoaging. *J. Invest. Dermatol.*, 1998, 111, 776–780.
18. Leffel, D. J., Stetz, M. L., Milstone, L. M., Deckelbaum, L. I.: *In vivo* fluorescence of human skin: a potential marker of photoaging. *Arch. Dermatol.*, 1988, 124, 1514–1518.
19. Leupold, D., Scholz, M., Stankovic, G., Reda, J., Buder, S., Eichhorn, R., Wessler, G., Stücker, M., Hoffmann, K., Bauer, J., Garbe, C.: The stepwise two-photon excited melanin fluorescence is a unique diagnostic tool for the detection of malignant transformation in melanocytes. *Pigment cell melanoma research*, 2011, 24,3, 438–445.
20. Lohman, W., Paul, E.: *In situ* detection melanomas by fluorescence measurements. *Naturwissenschaften*, 1988, 75, 201–202.
21. Lohmann, W., Nilles, M., Bödeker R. H.: *In situ* differentiation between nevi and malignant melanomas by fluorescence measurements. *Naturwissenschaften*, 1991, 78, 456–457.
22. Mašlanková, J., Stupák, M., Mihálik, J., Mareková, M.: Katecholamíny - fyziológia a patológia. *Ateroskleróza*, 2011, XV (1-2), 117–126.
23. Na, R., Stender, I. M., Ma, L., Wulf, H. Ch.: Autofluorescence spectrum of skin: component bands and body site variations. *Skin Research and Technology*, 2000, 6, 112–117.
24. Noordzij, M. J., Lefrandt, J. D., Graaff, R., Smit, A. J.: Dermal factors influencing measurement of skin autofluorescence. *Diabetes Technol. Ther.*, 2011, 13, 2, 165–70.
25. Oppel, T., Korting, H. C.: Actinic keratosis: The key event in the evolution from photodaged skin to squamous cell carcinoma. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 2004, 17, 67–76.
26. Richards-Kortum, R., Sevick-Muraca, E.: Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu Rev. Phys. Chem.*, 1996, 47, 555–606.
27. Rossi, R., Mori, M., Lotti, T.: Actinic keratosis. *Int. J. Dermatol.*, 2007, 46, 895–904.
28. Salasche, S. J.: Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2000, 42, 4–7.
29. Simon, J. D., Peles, D., Wakamatsu, K., Ito, S.: Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma*, 2009, 22, 563–579.
30. Sterenborg, H. J. C. M., Thomsen, S., Jacques, S. L.: *In vivo* fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumours. *Dermatol Surg.*, 1995, 21, 821–822.
31. Sterenborg, H. J. C. M., Motamedi, M., Wagner Jr., R. F., Thomsen, S., Jacques, S. L.: *In vivo* fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumors. *Lasers in Medical Science*, 1994, 9, 191–201.
32. Svanberg, S.: Environmental and medical applications of photonic interactions. *Physica Scripta*, 2004, 110 39–50.
33. Šimaljaková, M., Schwarczová, Z.: Nové trendy v liečbe nemelanómových nádorov kože. *Via pract.*, 2007, 4(6), 291–294.
34. Teuchner, K., Freyer, W., Leupold, D., Volkmer, A., Birch, D. J., Altmeyer, P. *et al.*: Femtosecond two-photon excited fluorescence of melanin. *Photochem. Photobiol.*, 1999, 70, 146–151.
35. Trakatelli, M., Ulrich, C., del Marmol, V., Euvrard, S., Stockfleth, E., Abeni, D.: Epidemiology

- of nonmelanoma skin cancer (NMSC) in Europe: accurate and comparable data are needed for effective public health monitoring and interventions. *Br. J. Dermatol.*, 2007 156 3, 1–7.
36. **Van der Beek, N., De Leeuw, J., Demmendaal, C., Bjerring, P., Neumann, H. A.:** PpIX fluorescence combined with auto-fluorescence is more accurate than PpIX fluorescence alone in fluorescence detection of non-melanoma skin cancer: An intra-patient direct comparison study. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2011.
37. **Young, A. R.:** Chromophores in human skin. *Phys. Med. Biol.*, 1997, 42(5), 789–802.
38. **Zeng, H., MacAulay, C., McLean, D. I., Palcic, B., Lui, H.:** The Dynamics of Laser-Induced Changes in Human Skin Autofluorescence-Experimental Measurements and Theoretical Modeling. *Photochemistry and Photobiology*, 1998, 68, 2, 227–236.
39. **Zeng, H., MacAulay, C., McLean, D., Palcic, B.:** Spectroscopic and microscopic characteristics of human skin autofluorescence emission. *Photochem. Photobiol.*, 1995, 61, 39–645.

RESPIRAČNÝ KONTROLNÝ POMER VEZIKÚL CYTOCHRÓM C OXIDÁZY PRIPRAVENÝCH BEZ POUŽITIA DETERGENTU

Marek Stupák*, Jana Mašlanková
Vladimíra Tomečková, Mária Mareková

Ústav lekárskej a klinickej biochémie a Labmed a.s., Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

*Kontakt: marek.stupak@upjs.sk

SÚHRN

V prezentovanej práci uvádzame metódu prípravy fosfolipidových vezikúl s obsahom cytochróm *c* oxidázy bez použitia detergentu. Podstatou tejto metódy oproti doteraz používaným je priama fúzia izolovaných mitochondriálnych membrán s vopred pripravenými vezikulami azolektínu. V našej štúdii sme stanovili respiračný kontrolný pomer týchto vezikúl v závislosti od koncentrácie použitého azolektínu a sledovali vplyv zmeny pH na hodnotu tohto pomeru. Takto pripravené proteolipozómy je možné následne použiť pri štúdiu procesu protónového transportu.

SUMMARY

We present a method of preparation of cytochrome *c* oxidase vesicles based on the fusion of isolated mitochondrial membranes with small preformed asolectin vesicles. In this study we have determined respiratory control ratio of these vesicles as a function of asolectin concentration. We have followed also the effect of the pH changes on this ratio. These proteoliposomes can be potentially used in studies of the proton translocation processes.

Key words: cytochrome *c* oxidase (CcO), respiratory control ratio (RCR), vesicles, asolectin

ÚVOD

Mitochondriálna biológia a biochémia, štúdium vlastností a funkcií mitochondrií na molekulovej úrovni, je najrýchlejšie sa rozvíjajúcou oblasťou genetiky

a medicíny, spájajúcou vedecké disciplíny zaoberajúce sa embryológiou, jednotlivými stupňami vývoja, ktoré môžu vyústiť do rozličných patologických stavov, najmä rakoviny. Dnes už vieme, že poruchy mitochondriálneho metabolizmu nehrajú významnú úlohu len v detstve, ale prejavujú sa aj v iných obdobiach rastu organizmu a zahŕňajú rôzne formy, napr. srdcových chorôb, diabetu, Parkinsonovej choroby, či demencie (Naviaux, R., 1997). Detailné pochopenie metabolizmu mitochondrií a schopnosť ovplyvňovať ho má potenciál podstatne ovplyvniť aj stratégiu terapie.

Mitochondrie sú energetické centrá a druhé najväčšie organely bunky. Podieľajú sa na rôznych fyziologických procesoch: termoregulácii, bunkovej signalizácii, udržiavaní redoxného potenciálu. Sú zdrojom reaktívnych foriem kyslíka, spúšťajú a regulujú bunkovú smrť (Wallace, 1999). Predstavujú unikátne bunkové organely guľovitého alebo elipsovitého tvaru lokalizované v cytosole všetkých eukaryotických buniek, ktoré obsahujú vlastnú DNA, tzv. mitochondriálnu DNA (mtDNA). Množstvo mitochondrií v jednotlivých bunkách závisí od typu bunky a momentálnej potreby energie, mení sa od desiatok až po tisícky. Pri elektrónoptickom vyšetrení sa môžu javiť ako samostatné organely s veľkosťou 0,5–4 μm, ale v skutočnosti tvoria v bunkách mitochondriálnu sieť (Mannella, 2006).

Hlavnou úlohou mitochondrií je premena energie uvoľnenej počas metabolických procesov v mitochondriálnej matrix do formy ATP. Transmembránové proteínové komplexy dýchacieho reťazca vytvárajú elektrochemický gradient pozdĺž vnútornej mitochondriálnej membrány. Elektróny sú transportované z molekuly NADH na komplex I (*NADH-CoQ-reduktázu*) a odtiaľ na koenzým Q; v prípade sukcinátu sú prenášané na komplex II (*sukcinát-CoQ-reduktázu*) a odtiaľ na koenzým Q.

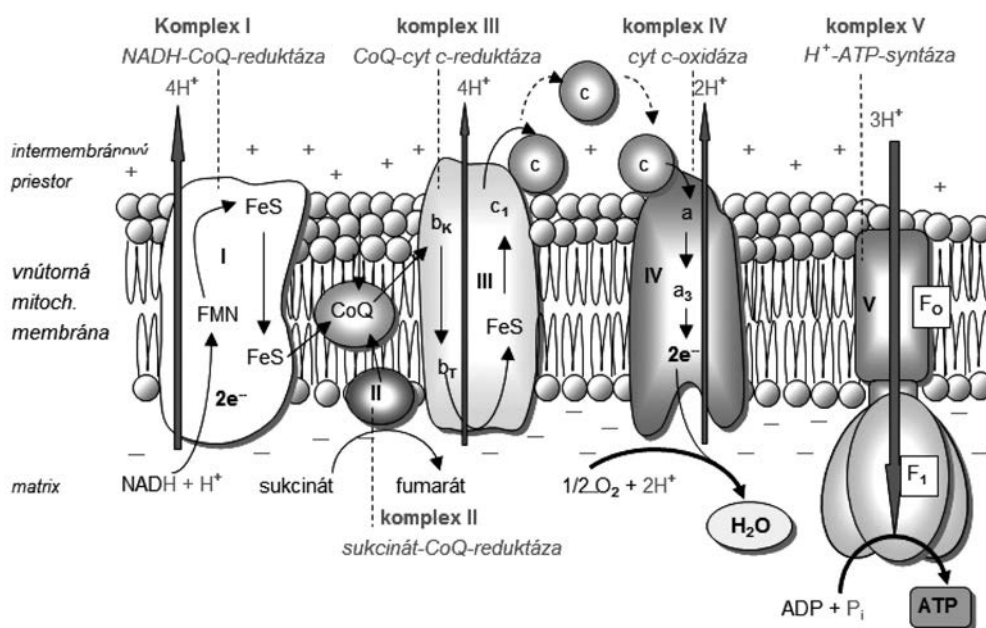
Z koenzýmu Q prechádzajú na komplex III (*CoQ*-cytochróm *c*-reduktázu), ďalej na periférny elektrónový prenášač cytochróm *c* a následne na komplex IV (cytochróm *c* oxidázu), z ktorej prechádzajú na konečný akceptor, molekulový kyslík. Komplexy I, III a IV sú tiež protónovými pumpami, čo znamená, že spoločne vytvárajú elektrochemický protónový gradient, ktorý využíva komplex V (*F1F0*-ATP syntáza) k produkcii ATP. Tento spriahnutý prenos elektrónov a protónov zohráva primárnu úlohu pri premenách energie v živých systémoch a je považovaný za kľúčový proces v bioenergetike dýchania (obr. 1).

V ostatných rokoch sa dosiahol značný pokrok v pochopení štruktúry a funkcií viacerých mitochondriálnych a bakteriálnych protónových prenášačov na molekulovej úrovni. Pravdepodobne najväčšou výzvou v tejto oblasti je štúdium vlastností koncových enzýmov dýchacieho reťazca, keď obsahujúcich hemových oxidáz. Tieto molekulové komplexy sú „skonštruované“ nielen za účelom katalyzovania redukcie molekúl kyslíka na molekuly vody, ale zároveň aj na tvorbu membránového protónového gradientu využitím voľnej energie uvoľnenej pri redukcii kyslíka, pričom v týchto procesoch nenastáva uvoľňovanie toxických kyslíkových intermediátov do okolia (Hosler *a kol.*, 2006; Branden *a kol.*, 2006; Yoshikawa *a kol.*, 2006). Koncovým komplexom mitochondriálneho a väčšiny bakteriálnych dýchacích reťazcov je cytochróm *c* oxidáza (*CcO*), ktorá katalyzuje reakciu: $4 \text{ cyt } c^{2+} + 8 \text{ H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ cyt } c^{3+} + 2 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ H}^+$, kde H^+ reprezentuje protóny pochádzajúce zo záporne nabitej (N-strana) strany vnútornej mitochon-

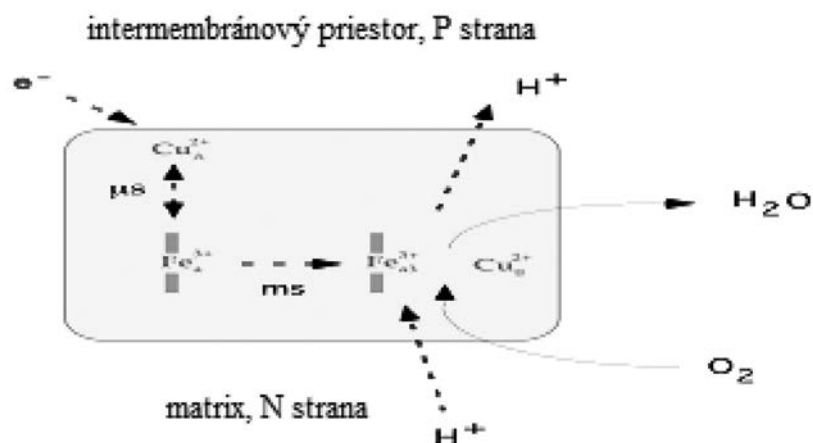
driálnej membrány (mitochondriálny matrix) a cytoplazmatickej oblasti bakteriálnej membrány, H^+ sa vzťahuje k protónom, ktoré sú uvoľnené na pozitívnu stranu (P-strana) vnútornej mitochondriálnej membrány (medzimembránový priestor v mitochondriách), alebo do perioplazmatického priestoru v baktériách, cyt c^{3+} a cyt c^{2+} predstavujú oxidovanú a redukovanú formu cytochrómu *c*. Každý prenos elektrónu prostredníctvom *CcO* na O_2 je spriahnutý s odobratím dvoch protónov z N-strany membrány a uvoľnením jedného protónu na P-stranu (obr. 2). Protóny transportované pozdĺž membrány sa nazývajú pumpované protóny a protóny použité v procese vzniku vody sa označujú ako skalárne, alebo chemické protóny (Hosler *a kol.*, 2006; Branden *a kol.*, 2006; Yoshikawa *a kol.*, 2006).

CcO je integrálny membránový proteín majúci rôzny počet subjednotiek v závislosti od zdroja, z ktorého pochádza (od 3 subjednotiek vo väčšine baktérii (Saraste, 1990; Trumpover a Gennis, 1994), až po 13 polypeptidov u cicavcov (Kadenbach *a kol.*, 1983). Aminokyselinové zloženie subjednotiek I a II, ktoré obsahujú aktívne redoxné centrá, je značne podobné pre rôzne druhy. V minulom desaťročí bola určená kryštálová štruktúra pre *CcO* z hovädzích srdc (Tsukihara *a kol.*, 1995, 1996).

Pri štúdiu metabolizmu mitochondrií, najmä pri popise terminálnych častí dýchacieho reťazca, sa volí postup práce s vhodnými modelmi so zabudovanou *CcO* do lipidových vezikúl, ktoré takto simulujú membránu mitochondrie. Na rozdiel od popisovaných spôsobov, ktoré pri príprave vezikúl s *CcO* vyžadujú prítomnosť



Obr. 1. Znázornenie komplexov dýchacieho reťazca a oxidačnej fosforylácie v mitochondriách



Obr. 2. Cesta elektrónu z cytochrómu c je najprv do binukleárneho meďnatého centra (CuA). Elektrón potom prechádza cez hém na hém a3, kde hém a3 predstavuje druhé binukleárne centrum s iónom meďi CuB. V binukleárných centrách je elektrón delokalizovaný. Kyslík ako terminálny akceptor elektrónu sa viaže v blízkosti CuB centra. Otázkou s veľkou výzvou je, ako je táto redoxná reakcia spojená s prenosom protónu cez membránu.

detergentu (Hinkle *a kol.*, 1972), zvolili sme stratégiu bez neho a sledovali závislosť takto pripravených vezikúl od koncentrácie použitého lipidu (azolektín) a od pH. V týchto spomenutých prípadoch sme použili metódu stanovenia hodnoty respiračného kontrolného pomeru (RCR). Stanovenie hodnoty RCR sa považuje za vhodnú metódu overenia úspešného zabudovania *CcO* do vezikúl (Mills a Ferguson-Miller, 2002). RCR vezikúl so zabudovanou *CcO* sa líši v závislosti od zdroja enzýmu. Je známe, že napr. pri použití *CcO* z *Paracoccus denitrificans* a *E. coli bo3*, sa dosahujú nízke hodnoty RCR okolo 3-5 (Ludwig, 1992, Verkhovskaya *a kol.*, 1997), zatiaľ čo napr. vezikuly so zabudovanou *CcO* z *Thermus thermophilus* majú RCR na úrovni okolo 40 (Kannt *a kol.*, 1998). Pri vysvetľovaní rozdielov

sa uprednostňujú skôr štruktúrne zmeny medzi týmito oxidázami, než technické ťažkosti spojené s ich zabudovaním do vezikúl (Mills a Ferguson-Miller 2002). V našej práci sme použili *CcO* z mitochondrií z kravských srdc, najmä kvôli ľahkej dostupnosti zdroja.

MATERIÁL A METÓDY

Všetky použité chemikálie boli od firmy Sigma-Aldrich. Jednotlivé roztoky boli pripravené vždy čerstvé pred jednotlivými experimentmi.

Mitochondrie a *cytochróm c oxidáza* boli izolované modifikovanou metódou podľa Soulimana a Buseho (1995) z čerstvých kravských srdc.

Tab. 1. RCR vezikúl so zabudovanou *CcO* v závislosti od koncentrácie azolektínu

oxidáza [μmol/l]	Koncentrácia azolektínu [mg/ml]								
	20	40	60	80	100	120	140	160	180
1	1.5	2.4	3.2	4.0	4.3	4.9	4.4	3.4	3.7
2	1.4	2.2	2.5	2.9	3.3	3.8	3.0	3.2	3.0
4	1.1	1.4	1.6	1.6	2.1	2.9	2.3	2.5	2.6

Tab. 2. Závislosť RCR vezikúl *CcO* od pH

oxidáza [μmol/l]/pH	8.5	7.6
1	3.2	5.8
2	3.5	8.5
4	3.5	7.3
6	3.7	3.3

Vezikuly *cytochróm c oxidázy* (COV) boli pripravené metódou prudkého zmrazenia a rozmrazenia z vopred izolovaného proteínu ako aj z čistých mitochondrií použitím rozličných koncentrácií azolektínu. Potrebné množstvo azolektínu bolo rozsuspendované v príslušnom objeme 10 mmol// MOPS, príp. 10 mmol// TAPS-tlmivého roztoku obsahujúceho 0,1 mmol// EDTA, pH 7,6; resp. 8,5. Následne bol tento roztok sonikovaný ponorným typom sonikátora počas 3 min ($2 \times 1,5$ min) pri 20 °C. Sonikáciou došlo spravidla k poklesu hodnoty pH, ktorá bola upravená použitím minimálneho objemu koncentrovanej kyseliny na pôvodnú hodnotu. K takémuto roztoku bol pridaný izolovaný enzým, resp. čisté mitochondrie do výslednej koncentrácie 1, 2, 4 a 6 μ mol// *cytochróm c oxidázy*, po čom nasledovala krátka, 10-pulzová sonikácia. Koncentrácia enzýmu bola sledovaná spektrofotometricky. Zmes bola po rýchlom zmrazení (počas 20 sekúnd) v kvapalnom dusíku a rozmrazení pri izbovej teplote znova sonikovaná 20 pulzami. Celý proces zmrazenia/rozmrazenia/sonikácie sa zopakoval ešte raz (Stupák, 2011). Takto pripravené vezikuly boli použité v ďalšom štúdiu.

RCR sme sledovali spektrofotometricky ako pomer rýchlosti rozpojenej a spojenej oxidácie ferrocycytochrómu *c* použitím spektrofotometra Hewlett Packard HP 8452A. RCR je definovaný ako pomer rýchlostí oxidácie ferrocycytochrómu *c* v ustálenom stave v prítomnosti ionofórov - akými sú napr. nigericín alebo karbonylkyanid-m-chlórphenylhydrazín a valinomycín (rozpojený stav) - a stavu bez prítomnosti ionofórov (spojený stav), t.j. pomer rýchlostí pozorovaných v podmienkach, keď je membrána totálne priepustná pre ióny oproti situácii, keď je permeabilita membrány rýchlosť limitujúcim faktorom elektrónového transportu (Hinkle *a kol.*, 1972).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Myšlienka zabudovať *CcO* do vezikúl nie je nová. Hinkle *a kol.* v roku 1972 prvýkrát navrhli takýto postup a ukázali, že takto pripravené vezikuly sú vynikajúcim modelom pre kvantitatívne vyšetrenie respirácie mitochondrií. Respiračný kontrolný pomer (RCR) vezikúl pripravených s izolovaným enzýmom sa pohybuje okolo 10 (Brunori *a kol.*, 1985). My sme na prípravu vezikúl použili na jednej strane vopred izolovaný enzým, ako aj membránové komponenty mitochondrií. Navyše sme sa pokúsili pripraviť ich bez prítomnosti detergentu, keďže ani v samotných, prirodzene sa vyskytujúcich mitochondriách, sa detergent nenachádza. Vie sa, že *CcO* sa v prítomnosti detergentu vyskytuje v dimérnej forme, majúcej štyri rozličné kovové centrá na každú monoméru jednotku (Wikström *a kol.*, 1981; Malmström, 1979; Brunori a Wilson, 1982).

V našom prípade boli izolované mitochondrie z kravských srdiec intenzívne premyté v izotonickom a hypotonickom tlmivom roztoku za účelom získania

čistých membránových komponentov. Respiračný kontrolný pomer takýchto membrán sa pohybuje okolo hodnoty 1. Ak sú tieto, pre protóny priepustné mitochondriálne membrány, sonikované v prítomnosti vopred pripravených fosfolipidových azolektínových vezikúl, je výsledkom vznik vezikúl s pozorovaným nárastom RCR (Tab. 1). Stanovenie hodnoty RCR sa považuje za vhodnú metódu overenia úspešného zabudovania *CcO* do vezikúl (Mills a Ferguson-Miller, 2002). Pre detailné následné sledovanie protónového pumpovania sa vyžaduje RCR s čo najvyššou hodnotou. V našom experimente zameranom na vplyv zvyšujúcej sa koncentrácie lipidovej časti (azolektínu) pozorujeme nárast hodnoty RCR až do hodnoty koncentrácie azolektínu 120 mg/ml, za ktorou pozorujeme pokles RCR. Samotný azolektín predstavuje lipid, ktorý obsahuje zhruba rovnaké množstvá lecitínu, kefalínu a fosfatidylinozitolu spolu s malým množstvom iných fosfolipidov a polárnych lipidov. Je dobrým zdrojom mastných kyselín, obsahuje približne 24 % nasýtených mastných kyselín, 14 % nenasýtených mastných kyselín s jednou dvojitou väzbou a 62 % polynenasýtených mastných kyselín. Pozorovaný pokles hodnoty RCR nad 120 mg/ml azolektínu môže súvisieť so zvyšovaním nepolárnej oblasti vezikuly, ktorá výrazne zníži rýchlosť elektrónu prichádzajúceho z ferrocycytochrómu *c* ako donoru a takto ovplyvní pomer rýchlosti spojenej a rozpojenej oxidácie ferrocycytochrómu *c*. Na druhej strane, pri nízkych koncentráciách azolektínu je možné uvažovať nedostatočné ukotvenie *CcO* v membráne, čo sa prejavuje nízkym RCR. So zvyšujúcou sa koncentráciou azolektínu sa ukotvenie *CcO* v membráne zlepšuje a RCR sa zvyšuje. Pri vysokých koncentráciách azolektínu je pravdepodobne enzým natoľko vnorený v lipidovej vrstve, že je nedostatočne prístupný pre tvorbu komplexu s cyt *c*, čo sa v konečnom dôsledku manifestuje znížením respiračného kontrolného pomeru. Ideálna hodnota RCR pre sledovanie protónového pumpovania a metabolizmu mitochondrií sa pohybuje v rozmedzí hodnôt 4-5.

Zaujímavým pozorovaním bolo znižovanie RCR s rastom koncentrácie *CcO* pri akomkoľvek pomere azolektín/*oxidáza*. V tomto prípade by bol očakávaným skôr opak. Uvedený jav si vyžaduje v budúcnosti samostatné preskúmanie.

V našej štúdii sme sa zamerali aj na vplyv pH na RCR vezikúl so zabudovanou *CcO*. Je známe, že aktivita enzýmu pumpujúceho protóny cez mitochondriálnu membránu je ovplyvnená hodnotou pH. Zo štúdie dvojice Faxén a Brzezinski (2007) sa vie, že hodnota pH v rozmedzí 6-9,5 na vnútornej strane vezikúl výrazne ovplyvňuje rýchlosť protónového pumpovania a kinetiku katalytického cyklu *CcO*. Vo všeobecnosti katalytická aktivita *CcO* s poklesom pH rastie. Táto závislosť je však relatívne veľmi komplikovaná a predpokladá sa, že existujú minimálne tri protolytické skupiny s rozdielnymi hodnotami pK, ktoré kontrolujú resp. regulujú rýchlosť protónového transportu a kinetiku katalytického cyklu

v *CcO*. Naše výsledky týkajúce sa závislosti RCR na pH a koncentrácii *CcO* sú prezentované v tabuľke 2. Výber hodnoty pH=7,6 súvisí so snahou čo najviac sa priblížiť fyziologickým podmienkam a hodnota 8,5 slúži na porovnanie. Je evidentné, že zmena pH o 1 má výrazný vplyv na hodnotu RCR, ktorá z relatívne vysokej hodnoty (5–6), vhodnej pre sledovanie protónového pumpovania (viď vyššie), klesá na hodnotu okolo 3 pri pH=8,5. Tento rozdiel je možné vysvetliť nasledujúcim spôsobom. Pri pH=8,5 je na vonkajšej strane vezikúl koncentrácia protónov približne desaťkrát nižšia ako pri pH=7,6. Počas katalytického cyklu *CcO* pumpuje protóny zvnútra vezikuly do vonkajšieho okolia, pričom pri vyššom pH toto pumpovanie prebieha „proti“ nižšej koncentrácii protónov. Táto skutočnosť vedie k tomu, že rýchlosť oxidácie cyt *c*, ktorá súvisí s rýchlosťou protónového transportu v *CcO*, v spojených a rozpojených vezikulách bude menej rozdielna v prípade pH=8,5 ako pri pH=7,6, kedy k pumpovaniu protónov dochádza „proti“ vyššej koncentrácii protónov. Tento fenomén sa manifestuje nižším pomerom rýchlosti oxidácie cyt *c* v „rozpojených“ a „spojených“ vezikulách a teda nižšou hodnotou RCR pri pH=8.5.

ZÁVER

V prezentovanej práci uvádzame metódu prípravy vezikúl *cytochróm c oxidázy* bez detergentu, ktorým je najčastejšie cholát. Použitie detergentu však pri modelovaní procesov prebiehajúcich za fyziologických podmienok predstavuje zavedenie určitej poruchy do fyziologického systému. Nami prezentovaná metóda zjednodušuje daný proces na priamu fúziu mitochondriálnych membrán s malými, vopred pripravenými azolektínovými vezikulami. Takto, bez detergentu pripravené vezikuly sa vyznačujú hodnotami RCR v rozmedzí 6–8 a je možné ich použiť pri štúdiu protónového transportu. Ukázali sme aj značnú závislosť RCR takto pripravených vezikúl od pH. Veríme, že aj tieto výsledky pomôžu pri detailnejšom štúdiu katalytického mechanizmu *CcO*.

LITERATÚRA

1. **Branden, G., Gennis, R. B., Brzezinski, P. (2006):** Transmembrane proton translocation by cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1757, 2006, 1052–1063.
2. **Brunori, M., Sarti, P., Colosimo, A., Antonini, G., Malatesta, F., Jones, M. G., Wilson, M. T. (1985):** Mechanism of control of cytochrome oxidase activity by the electrochemical-potential gradient, *The EMBO Journal*, 4 (9), 2365–2368.
3. **Brunori, M., Wilson, M. T. (1982):** Cytochrome *c* oxidase, *Trends Biochem. Sci.*, 7, 295–299.
4. **Faxén, K., Brzezinski, P. (2007):** The inside pH determines rates of electron and proton transfer in

vesicle-reconstituted cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1767, 381 – 386.

5. **Hinkle, P. C., Kim, J. J., Racker, E. (1972):** Ion transport and respiratory control in vesicles formed from cytochrome oxidase and phospholipids, *J. Biol. Chem.*, 247, 1338–1339.
6. **Hosler, J. P., Ferguson-Miller, S., a Mills, D. A. (2006):** Energy Transduction: Proton Transfer Through the Respiratory Complexes, *Annu. Rev. Biochem*, 75, 165–187.
7. **Kadenbach, H., Jarausch, J., Hartmann, R., Merle, P. (1983):** Separation of mammalian cytochrome *c* oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure, *Anal. Biochem.*, 129, 517–521.
8. **Kannt, A., Soulimane, T., Buse, G., Becker, A., Bamberg, E., Michel, H. (1998):** Electrical current generation and proton pumping catalyzed by the *ba3*-type cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*, *FEBS Lett.*, 434, 17–22.
9. **Ludwig, B. (1992):** Terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1101, 195–197.
10. **Malmstrom, B. G. (1979):** Cytochrome *c* oxidase. Structure and catalytic activity, *Biochim. Biophys. Acta*, 549, 281–303.
11. **Mannella, C. A. (2006):** Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae, *Biochim. Biophys. Acta*, 1763, 542–548.
12. **Mills, D. A., Ferguson-Miller, S. (2002):** Influence of structure, pH and membrane potential on proton movement in cytochrome oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1555, 96–100.
13. **Naviaux, R. K. (1997):** The spectrum of mitochondrial disease, In *Mitochondrial and metabolic disorders – a primary care physician's guide*, Psy-Ed Corp., Oradell, NJ, 3–10.
14. **Saraste, M. (1990):** Structural features of cytochrome oxidase, *Quart. Rev. Biophys.*, 23, 331–366.
15. **Soulimane, T., Buse, G. (1995):** Integral cytochrome-*c* oxidase. Preparation and progress towards a three-dimensional crystallization, *Eur. J. Biochem.*, 227, 588–595.
16. **Stupák, M. (2011):** *The RCR value of cytochrome c oxidase vesicles prepared by new method, 7th International Conference Structure and stability of Biomacromolecules*, Book of contributions, 104–105.
17. **Trumpover, B. L., Gennis, R. (1994):** Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation, *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 675–716.
18. **Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S. (1995):** Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å, *Science*, 269, 1069–1074.
19. **Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima,**

- R., Yaono, R., Yoshikawa, S. (1996): The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å, *Science*, 272, 1136–1144.
20. Verkhovskaya, M. L., Garcia-Horsman, A., Puustinen, A., Rigaud, J. L., Morgan, J. E., Verkhovsky, M. I., Wikstrom, M. (1997): Glutamic acid 286 in subunit I of cytochrome bo3 is involved in proton translocation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 10128–10131.
21. Wallace, D. C. (1999): Mitochondrial diseases in man and mouse, *Science*, 283, 1482–1488.
22. Wikstrom, M. R. F., Krab, K., Saraste, M. (1981): *Cytochrome Oxidase*. A Synthesis, published by Academic Press, NY.
23. Yoshikawa, S., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K., Aoyama, H., Tsukihara, T., Ogasawara, T., Shimokata, K., Katayama, Y., Shimada, H. (2006): Proton pumping mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1757, 395–400.

PRÍLOHY



Obr. 1. Solárna aktinická keratóza (Klinika plastickej a rekonštrukčnej chirurgie UPJŠ LF v Košiciach)



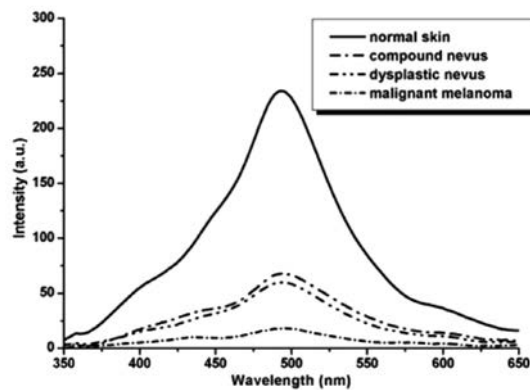
Obr. 2. Lentigo malígny melanóm (Klinika plastickej a rekonštrukčnej chirurgie UPJŠ LF v Košiciach)



Obr. 3. Povrchovo rastúci melanóm (Klinika plastickej a rekonštrukčnej chirurgie UPJŠ LF v Košiciach)

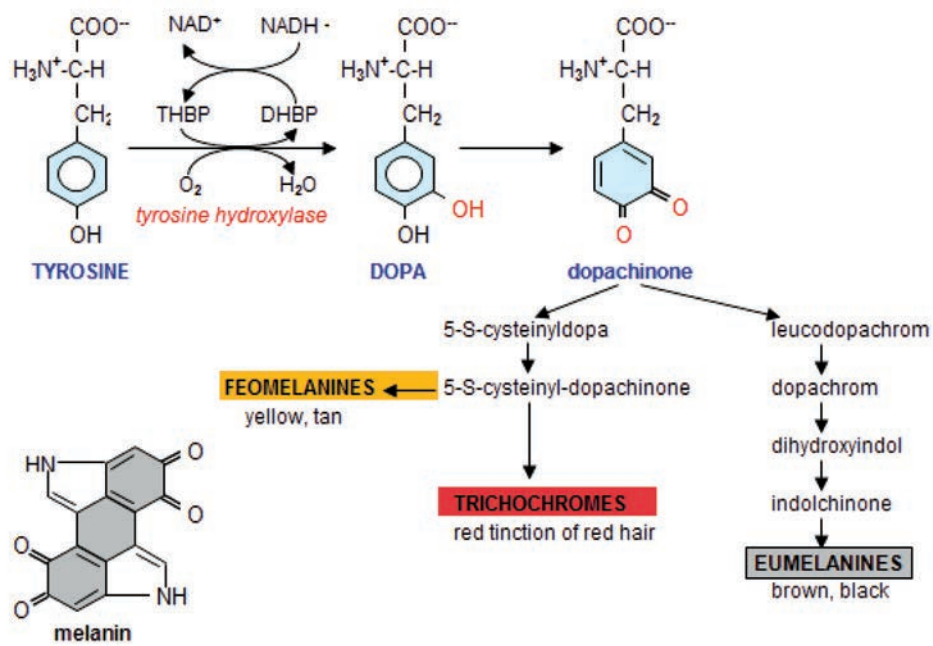


Obr. 4. Nodulárny melanóm (Klinika plastickej a rekonštrukčnej chirurgie UPJŠ LF v Košiciach)



Obr. 5. Fluorescenčné spektrá zdravej kože a rôznych pigmentovaných lézií (Borisova, 2006)

Marcela Valko-Rokytovská, Anna Birková, Marianna Zábavniková, Beáta Hubková, Mária Mareková:
 DIAGNOSTICKÝ POTENCIÁL AUTOFLUORESCENCIE KOŽE (viď str. 37)



Obr. 6. Melanogenéza (Mašlanková a kol., 2011)

Marcela Valko-Rokytovská, Anna Birková, Marianna Zábavníková, Beáta Hubková, Mária Mareková:
 DIAGNOSTICKÝ POTENCIÁL AUTOFLUORESCENCIE KOŽE (viď str. 37)

Kvalitní a spolehlivé řešení pro laboratoře a POCT



Libovolná kombinace parametrů • Jednoduchá obsluha • Minimální údržba

ACIDOBÁZE

pH	cCl ⁻	cGlu	ctHb
cH ⁺	cCa ²⁺	cLac	sO ₂
pCO ₂	cK ⁺	cCrea	FO ₂ Hb
pO ₂	cNa ⁺	ctBil	FCOHb
			FMetHb
			FHHb
			FHbF

IMUNOCHEMIE

Troponin I, T
CK-MB
Myoglobin
NT-proBNP
CRP
βhCG
D-dimer

Simpler, faster, better

RADIOMETER s.r.o.

Zastoupení pro ČR a SR

Křenova 3, 162 00 Praha 6, tel: +420 220 400 300
email: office@radiometer.cz, web: www.radiometer.com

Obchodní zástupce pro SR

Ing. Jiří Hiemer, Ph.D., tel: +420 725 730 156
email: jiri.hiemer@radiometer.cz

RADIOMETER 



...riešenie pre Vaše laboratórium

Profesionálne vybavenie, pre profesionálne laboratórium

CENTRIFÚGY

LAMINÁRNE BOXY, DIGESTORY

CHOVNÉ BOXY PRE
LABORATÓRNE ZVIERATÁ

MRAZIACE A CHLADIACE BOXY

TERMOSTATY, VODNÉ KÚPELE
SUŠIARNE, AUTOKLÁVY

BOXY S ANAERÓBNOU
ATMOSFÉROU

LABORATÓRNE UMÝVAČKY, SUŠIČKY

MOLEKULÁRNA BIOLÓGIA

MIKROPLATNIČKOVÁ
INŠTRUMENTÁCIA

BIO-IMAGING a ANALÝZA

KONCENTRÁTORY, LYOFILIZÁTORY

POČÍTAČE KOLÓNÍ a INHIBIČNÝCH
ZÓN

MONITORING TEPLOTY, VLNKOSTI

PURIFIKÁCIA VODY

PIPETY, PLASTY

Prístroje a spotrebný materiál na analýzu, prípravu a skladovanie vzoriek

Svojim zákazníkom poskytujeme kvalifikované služby - poradenstvo, predaj laboratórnych prístrojov a spotrebného materiálu, vrátane inštalácií, školení, záručného a pozáručného servisu, preventívnych kontrol a validácií.

VÝHRADNÝ ZÁSTUPCA FIRIEM PRE SR A ČR:

THERMO SCIENTIFIC - divízia laboratórnych produktov
(Jouan / Heto-Holten / Heraeus / H+P / Forma / Savant
/ Sorvall / Barnstead / TKA / Labsystems / Finnzymes)

EVERmed - ARCTIKO - LANCER - RUSKINN
- SYNGENE - SYNBIOSIS - ERLAB
- TECNIPLAST COMET System
- TUTTNAUER



Kontakt:

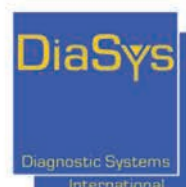
TRIGON, s.r.o.
Štefunkova 13
821 03 Bratislava 2

tel.: 02 635 31 241, 0905 728 896
e-mail: mail@trigon-plus.sk
web: www.trigon-plus.sk

DIASYS

- biochemické reagentie nemeckej kvality
- biochemické analyzátory Response 910, Response 920 a BioMajesty
- technická a aplikačná podpora

BioMajesty



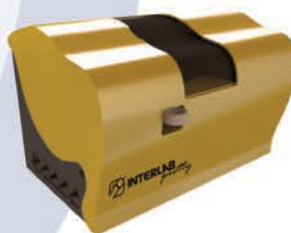
TECAN

- spektrofotometre, ELISA premývačky
- multifunkčné prístroje (fluorescencia, absorbanca, luminiscencia)
- microarray systémy - hybridizačná stanica, skenery
- robotické pipetovacie automaty



INTERLAB

- automatizované elektroforetické systémy Easy Interlab G26 a Interlab G26
- nový kompaktný automatický elektroforetický systém Interlab pretty
- agarózové gély na sérové proteíny, imunofixácia acid blue, acid violet
- široká paleta ďalších vyšetrení vrátane proteinúrie a CSF
- možnosť porovnania staršieho vyšetrenia pacienta s aktuálnym v jednom grafe



SIEMENS

- distribúcia kompletného portfólia SIEMENS pre biochémiu, imunochémiu, hematológiu, koaguláciu a POCT
- dlhoročné skúsenosti a expertná podpora aplikácií

SIEMENS

Siemens Medical Solutions Diagnostics



**Kto mi naozaj dokáže
pomôcť rásť?**

**Len Siemens má inovatívne riešenia, ktoré potrebuje vaše
laboratórium, aby dosiahlo na vrchol a víziu, ktorá vás
na ňom udrží.**

Plánovanie budúcnosti vášho laboratória začína už dnes výberom správneho partnera pre diagnostiku. Siemens poskytuje komplexné riešenia prispôbitel'né potrebám zákazníkov, takže laboratórni a klinickí pracovníci dokážu každodenne zlepšovať svoju produktivitu. Vďaka 130-ročnej tradícii v inováciách nám môžete dôverovať – stále stojíme na čele najnovších trendov a technológií. Spolu s nami dokážete v najbližších rokoch vytvoriť nové trendy v starostlivosti o pacienta.

www.siemens.com/diagnostics

Answers for life.

SIEMENS