ZDRAVOTNÍCKE LISTY

2014 Ročník 2 Číslo 4

Edičná séria:

OŠETROVATEĽSTVO

FYZIOTERAPIA

- LABORATÓRNA MEDICÍNA
- VEREJNÉ ZDRAVOTNÍCTVO

Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne

Fakulta zdravotníctva

Zdravotnícke Listy

Vedecký recenzovaný časopis, ročník 2, číslo 4.
Scientific peer-reviewed journal, volume 2, number 4.

2014

Časopis je indexovaný v *Bibliographia medica Slovaca* a zaradený do citačnej databázy *CiBaMed*

REDAKČNÁ RADA / EDITORIAL BOARD

PREDSEDA REDAKČNEJ RADY / CHAIRMAN OF THE EDITORIAL BOARD

doc. MUDr. Ján Bielik, CSc.

ŠÉFREDAKTOR / EDITOR IN CHIEF

RNDr. Zdenka Krajčovičová, PhD.

ČLENOVIA REDAKČNEJ RADY / MEMBERS OF THE EDITORIAL BOARD

Baňárová Patrícia, Mgr.
Botíková Andrea, doc., PhDr., PhD.
Bučková Ľudmila, MUDr., MPH.
Čelko Juraj, doc., MUDr., CSc.
Fábryová Viera, doc., MUDr., CSc.
Gerlichová Katarína, PhDr., PhD.
Habánik Jozef, doc., Ing., PhD.
Kaščák Marián, MUDr., PhD.
Kaščák Peter, MUDr., PhD.
Král Lubomír, PaedDr., PhD.
Kutnohorská Jana, doc., PhDr., CSc.
Litvová Slavka, PhDr.
Mastiliaková Dagmar, doc., PhDr., PhD.
Matišáková Iveta, PhDr., PhD.
Meluš Vladimír, RNDr., PhD., MPH.
Netriová Jana, Ing., PhD.
Oleár Vladimír, doc. MUDr., CSc.
Ondrušová Adriana, prof., MUDr., PhD.
Otrubová Jana, doc., PhDr., PhD.
Poliaková Nikoleta, PhDr., PhD.
Slobodníková Jana, doc., MUDr., CSc.
Šimurka Pavol, MUDr., PhD.
Štefkovičová Mária, doc., MUDr., PhD., MPH.
Zelisková Helena, Bc.

Vydavateľ nenesie zodpovednosť za údaje a názory autorov jednotlivých článkov alebo inzerátov. Reprodukcia obsahu je povolená iba s priamym súhlasom redakcie.

Publisher is not responsible for the information and opinions of authors of the articles or advertisements. Reproduction of content is permitted only with direct permission of the editors.

VYDAVATEĽ – REDAKCIA
PUBLISHER- EDITORIAL OFFICE

Fakulta zdravotníctva
Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne
Študentská 2
91101 Trenčín
IČO 31118259

Registrácia MK SR pod číslom EV 4755/13
Vychádza štyrikrát ročne.
Náklad: 200 ks
Dátum vydania: december 2014

ISSN1339-3022

© Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín

OBSAH

Editoriál 5

LABORATÓRNA MEDICÍNA

Lovětinská Šlamborová I., Exnar P., Vatahová I., Danilová I., Holý P.
Křemičitá nanovlákna pro léčbu chronických ran
Silica nanofibers for treatment of chronic wounds 6

Beňo E., Góra R., Hutta M.
Stanovenie amino cukrov vo vzorkách krvného séra metódou RP-HPLC
Determination of amino sugars in blood serum samples by RP-HPLC method . . 14

Komorowska V., Hutta M.
Štúdium separácie ľudského inzulínu a inzulínových analógov v systéme RP-HPLC
Study of retention of human insulin and its recombinant analogues in RP-HPLC . . 20

Komorowska V., Božek P., Fábryová V., Netriová J., Hutta M.
Separácia klinicky významných ľudských hemoglobínov v systéme vysokoúčinnej iónovovýmennej kvapalinovej chromatografie a problémy s ňou súvisiace
Separation of clinically significant human hemoglobins in high performance ion-exchange liquid chromatography system and a relevant issues . . . 26

Schreiber Ľ., Nagyová A., Marrero S. C., Halko R.
Separácia purínov hydrofílne interakčnou chromatografiou
Separation of purines by hydrophilic interaction chromatography . . . 30

Procházková S., Božek P., Halko R.
Analytické metódy na stanovenie medi v ľudskom moči
Analytical methods for determination of copper in human urine 35

Radičová M., Vojs Staňová A., Marák J.
Analýza a identifikácia metabolitov ibuprofénu v ľudskom moči kombináciou techník kvapalinovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie
Analysis and identification of ibuprofen metabolites in human urine with combination of liquid chromatography and mass spectrometry 42

Múčková Ľ., Netriová J.
Vzájomné porovnanie rovníc využívaných pre odhad glomerulárnej filtrácie (Grubb, Stevens, MDRD) u pacientov s ochorením diabetes mellitus
Intercomparisons of equations used for estimation of the glomerular filtration rate (Grubb, Stevens, MDRD) in patients with diabetes mellitus 48

Netriová J.
Ako rýchlo sa eliminuje morfín u onkologických pacientov?
How fast can be morphine eliminated in oncology patients? 53

Boháčová I., Oravec A., Halko R.
Analýza prírodných výživových doplnkov obsahujúcich kyanogénny glykozid amygdalín
Analysis of natural food nutritional supplements containing cyanogenic glycoside amygdalin 57

VEREJNÉ ZDRAVOTNÍCTVO

Šefcová J., Kašlíková K., Meluš V., Krajčovičová Z.
Bakteriálna mikroflóra osídľujúca vysokoškolské internáty a jej laboratórna diagnostika
Bacterial microflora colonizing university colleges and its laboraotry diagnostics . . 64

Kašlíková K., Ďuríčková T., Krajčovičová Z., Meluš V.
Pôvodcovia alimentárnych ochorení izolovaných zo sterov z potravinárskych prevádzok
Originators of alimentary diseases isolated from swabs from food establishments . 69

Tirpáková M.
Faktory životného štýlu v etiológii karcinómu krčka maternice
vo vybranej populačnej skupine
Lifestyle factors in the etiology of cervical cancer in selected population group. . . 75

Thóthová J., Netriová J.
Životný štýl a ochorenia pečene
Lifestyle and liver diseases 81

Benková Ľ.
Prieskum rizikových faktorov chronických ochorení, nefarmakologická intervencia
u klientov poradne zdravia v regióne Liptova
Risk factors research of chronic diseases, nonpharmacological intervention
in clients of health promotion centre in the region Liptov 89

Vadovičová P., Ochaba R., Račková A., Kadličeková P., Herdová O.
Vplyv zdravotného uvedomenia na konzumáciu potravín
Impact of health awareness on food consumption 96

EDITORIÁL

Laboratórne vyšetrovacie metódy v svetle vízií Fukuyamu a Huntingtona

Ak by niekto chcel vyjadriť minulosť, súčasnosť a perspektívy laboratórnych vyšetrovacích metód v zdravotníctve, nečakanú paralelu môže prekvapivo nájsť vo filozofii a politike. Dvaja významní myslitelia zverejnili svoje rozdielne vízie smerovania osudu sveta. Francis Fukuyama pod dojmom konca studenej vojny predkladá koncept konca dejín, ktorý je charakterizovaný konečným víťazstvom liberálnej demokracie a ekonomiky. Samuel Huntington naopak vidí budúcnosť sveta v konfliktoch civilizácií, pričom podľa jeho názoru je spoločnosť na hranici úpadku práve vtedy, ak v nej prevláda pocit, že dejiny dospeli k svojmu koncu.

Pri výučbe i každodennej práci v laboratórnych vyšetrovacích metódach v zdravotníctve so samozrejmosťou používame odborné výrazy. Bežne znejú slová antigén, titer protilátky, onkomarker, rezistencia k antibiotiku, mikroskop, virulencia, penicilíny, kalibračná krivka, kontagiozita, očkovanie... Lenže tie slová tu neboli vždy, niekto musel objaviť jav, ktorý svojim významom popisujú. Vedci nasadzovali často vlastný život, aby našli spôsob, ako dostať pod kontrolu pôvodcov ochorení, ktoré boli dovtedy synonymom istej smrti. Mnohí z nich zaplatili za svoju snahu odmietaním, nepochopením, pohŕdaním a vlastným životom. Dospel dnes vývoj laboratórnej medicíny ku svojmu vrcholu? Dnešné medicínske laboratóriá pripomínajú organizáciou prevádzky, dizajnom prístrojov, odevom personálu materializované sci-fi filmy spred niekoľkých desiatok rokov. Laboratórna diagnostika dokáže vyšetriť u pacientov obrovskú paletu parametrov, ku ktorým pribúdajú stále ďalšie, sofistikovanejšie. Mohlo by sa zdať, že vývoj laboratórnej diagnostiky je na svojom maxime a ďalej bude sprevádzaný iba stereotypom pokroku a úspechov.

Bohužiaľ, nie je to také jednoznačné. Aj po zavedení penicilínu a následnom masívnom pokroku v boji proti tuberkulóze a iným infekčným ochoreniam sa zdalo, že je tu víťazný koniec časti dejín. Po pár desaťročiach musíme priznať, že nebol. Laboratóriá museli začať vyšetrovať rezistenciu k antibiotikám, novým patogénom ako sú HIV alebo Ebola a stanovenie nádorových markerov nemôže byť bežne využité na skríning ochorenia.

Aká teda bude budúcnosť laboratórnej medicíny? Presne to nevie povedať nikto, ale zdá sa, že bude veľmi dynamická a zaujímavá. Sledujeme významný pokrok v nanotechnológiách, suchej chémii, vo vývoji prenosných testovacích analyzátorov, v molekulovej biológii... Hyperbarická oxygenoterapia je príkladom možností skúmať vplyv pozmenených fyzikálnych podmienok na laboratórne parametre zdravotného stavu pacientov.

Myslím si však, že napriek enormnému nástupu technológií bude aj oblasti laboratórnej diagnostiky úspech závisieť vždy iba od ľudí, profesionálov. Na ich erudovanosti, profesionalite, svedomí a cti. Preto je také dôležité kvalitne vzdelávať študentov - budúce generácie laboratórnych pracovníkov, ktorí budú mať osud odboru v rukách nasledovné desiatky rokov. Ak sa to podarí, laboratórne vyšetrovacie metódy v zdravotníctve budú prínosom pre dobro ľudí bez ohľadu na to, či v politike nastane koniec dejín alebo stret civilizácií.

RNDr. Vladimír Meluš, PhD., MPH.

KŘEMIČITÁ NANOVLÁKNA PRO LÉČBU CHRONICKÝCH RAN
SILICA NANOFIBERS FOR TREATMENT OF CHRONIC WOUNDS

LOVĚTINSKÁ ŠLAMBOROVÁ Irena[1,2], EXNAR Petr[2], VATAHOVÁ Lenka[1,3], DANILOVÁ Iveta [1,3], HOLÝ Petr[2]

[1] *Ústav zdravotnických studií, Technická Univerzita v Liberci, Liberec, Česká Republika*
[2] *Katedra chemie, Fakulta přírodovědně humanitní a pedagogická, Technická Univerzita v Liberci, Liberec, Česká Republika*
[3] *Fakulta textilní, Technická Univerzita v Liberci, Liberec, Česká Republika*

ABSTRAKT
Textilní krytí ran ve formě obvazů nebo náplastí je historicky známé a široce používané v medicínských aplikacích. Současná textilní krytí v sobě skýtají řadu terapeutických problémů jako je špatné přilnutí k ráně, přisychání obvazu ke spodině rány, vysoká nasákavost, a tím zatížení rány. Tyto problémy řeší nanovlákenné substráty se strukturou blízkou oxidu křemičitému, které mají kromě velkého měrného povrchu řadu dalších terapeutických výhod. Jedná se například o schopnost kopírovat povrch rány, o velmi dobrou snášenlivost a o biodegradabilitu. Křemičitá nanovlákna se připravují pomocí metody sol-gel, následným elektrostatickým zvlákněním a získaná vlákna jsou dále tepelně stabilizována. Na jejich povrch je možno imobilizovat různé typy biomolekul (antibiotika, enzymy, dezinfekční látky), které se zvláště uplatňují při léčbě těžce se hojících ran. Velkou výhodou křemičitých nanovláken je jejich pomalé rozpouštění v tělních tekutinách a tím postupné uvolňování imobilizovaných biomolekul.

Klíčová slova: Křemičitá nanovlákna. Antibiotika. Enzymy. Imobilizace.

ABSTRACT
Textile wound covering such as bandages or plasters are well known and widely used in medical care. A current textile covering has many therapeutic problems, particularly poor adhesion to wound, dry adhesion of dressing to a wound bed, high water absorption leading to the wound deterioration. These problems could be solved by an application of nanofiber substrates structurally closed to silicon dioxide. Due to the large surface to volume ratio and other advantageous properties silica nanofibers have big therapeutic potential. We can highlight a tracing of wound surface, biodegradability and very good biocompatibility. Silica nanofibers are prepared by sol-gel method. Nanofibers obtained by electrospinning are finally thermally stabilized. There is the possibility to immobilize at their large surface different types of biomolecules (antibiotics, enzymes, disinfectants), which are customary applied in a treatment of hard-to-heal wounds. The great advantage of silica nanofibers is their slow dissolving in tissue fluids, which brings along a slow and gradual release of immobilized molecules.

Key words: Silica nanofibers. Antibiotics. Enzymes. Immobilization.

ÚVOD

Nanovlákna jsou obecně specifikována jako vlákna o průměru ve stovkách nanometrů, většinou pod 300 nm. O vláknech s průměrem mezi 300 nm a 1 μm se často mluví jako submikronových. Nanovlákna mají specifické vlastnosti vyplývající z jejich malého průměru, jako jsou relativně velký specifický povrch (dosahující 10 až 50 m^2/g), velká porozita nanovlákenné vrstvy a malé rozměry pórů mezi nanovlákny v nanovlákenné vrstvě.

V posledních desetiletích jsou intenzivně zkoumány křemičité nanomateriály pro biomedicínské aplikace, a to především díky výše uvedeným vlastnostem. Další velkou výhodou je možnost chemické modifikace jejich povrchu. V biomedicíně jsou tyto materiály podrobně zkoumány jako účinné transportní systémy léků pro širokou skupinu látek například při léčbě diabetu, nádorových onemocnění nebo pro léčbu kostí a šlach (Fu, C. et al., 2013).

Základním postupem přípravy nanovláken je elektrostatické zvlákňování (elektrospinning), které je založené na zvlákňování polymerních roztoků nebo polymerních tavenin v elektrostatickém poli. Tímto postupem lze zvláknit řadu přírodních nebo syntetických organických polymerů (Jirsák, O. et al., 2003, Deitzl, J.M. et al., 2001). Dlouhou dobu bylo elektrostatické zvlákňování prováděno pouze v laboratorním měřítku postupy vycházejícími z patentu Formhalse (Formhals A., 1930). Nejpoužívanějším postupem bylo zvlákňování z jedné nebo několika jehel. Získané množství nanovlákenné vrstvy dostačovalo pouze pro výzkumné účely. Až objev způsobu výroby nanovlákenné vrstvy Jirsákem a kol. (Jirsák, O. et al., 2004) elektrostatickým zvlákňováním ze struny použitelným v průmyslovém měřítku dovolil praktické rozšíření nanovlákenných materiálů do technických a zdravotnických aplikací.

Nagamine a kol. (Nagamine, S. et al., 2014) pro přípravu křemičitých nanovláken používali jako pomocný polymer polyakrylonitril (PAN) a dále cetyltrimethylammonium chlorid (CTAC), Yue a kol. (Yue, X. et al., 2012) polyvinylalkohol (PVA) a Patel a kol. (Patel, P.A. et al., 2009) poly(ethylen imin) (PEI) a poly(vinyl pyrrolidon) (PVP). Chen a kol. (Chen, W.S. et al., 2014) popisují laboratorní přípravu křemičitých nanovláken s povrchovou modifikací aminoskupinami pro tkáňové inženýrství nervové soustavy, používá však klasickou metodu z jehly, která nemá předpoklady pro průmyslovou výrobu.

Pro navázání různých biomolekul na silikátovou matrici bylo studováno mnoho způsobů, v zásadě se jedná o tvorbu kovalentní vazby, využití nekovalentních interakcí a o adsorpci (Anglin, E. et al., 2008).

V roce 2013 byl udělen patent (Murakami, Y. et al., 2013) na vynález způsobu přípravy nanovlákenné struktury, která je tvořena nanovlákny se strukturou blízkou kysličníku křemičitému povrchově modifikovaným aminoalkyltrialkoxysilanem. Na povrchové aminoskupiny lze imobilizovat kovalentními vazbami (tvorbou iminoskupin s karbonylovými funkcemi nebo peptidickou vazbou s karboxylovými skupinami), nebo nekovalentně (vodíkovými vazbami nebo prostou adsorpcí) různá organická agens, jako jsou léčiva nebo enzymy.

Křemičité nanomateriály jsou vhodným kandidátem pro medicínské aplikace, protože jsou schopny vyhovět řadě velmi přísných kritérii (nízká toxicita, vysoká porozita a relativně vhodný povrch pro následnou funkcionalizaci). Díky vazbám Si–O představují tyto materiály atraktivní matrici pro vazbu a uvolnění biomolekul hned ze dvou důvodů. Za prvé se jedná o časový rámec, ve kterém je vysoce porézní silikátová matrice stabilní ve vodném roztoku, který je shodný s běžnou krátkodobou aplikací léčiv (od 20 min. po několik hodin). Za druhé jsou křemičitá nanovlákna připravena bez stabilizačních látek a nevykazují žádné toxické ani antigenní vedlejší účinky. Pokud je žádoucí delší stabilita ve vodných roztocích (například prodloužené uvolňování léku), matrice se stabilizuje ve vyšších teplotách (nad 700 °C).

Řízené a lokalizované uvolňování léčiva jsou klíčovými aspekty pro zvýšení účinnosti a snížení možných vedlejších účinků léčiv, například antibiotik. Křemičitá nanovlákna s navázaným širokospektrým antibiotikem se proto zdají být ideálním krycím materiálem pro léčení chronických ran. U těžce se hojících ran bývá vedle infekční zátěže problémem odstranění nekrotické tkáně, která brání hojení. Takové vyčištění rány označujeme jako debridement. Nejčastěji používanou metodou je i v dnešní době chirurgický debridement prováděný pomocí exkochleačních lžiček a skalpelu. U některých proteolytických enzymů byly prokázány velmi dobré katalytické vlastnosti při hojení popálenin, proleženin, velkých ran kůže nebo debridementů (Protease, 2011). Proti velmi razantní chirurgické metodě je odstranění nekrotické tkáně pomocí enzymů nejen výrazně šetrnější, ale zejména netraumatizuje spodinu rány a okolní zdravé tkáně. Rychlost enzymatického debridementu závisí na dodaném množství aktivních enzymů do rány. I pro tento případ se jeví jako perspektivní řešení imobilizace enzymu na křemičitou nanovlákennou matrici. Tím lze dosáhnout nejen lokálního působení enzymu přímo v ráně, ale i jeho déledobou aktivitu, neboť bylo zjištěno, že kovalentní navázání biomolekul (např. enzymů, antibiotik) na povrch nanovláken zvyšuje aktivitu a stabilitu biomolekul (Sahay, R. et al., 2012).

CÍLE PRÁCE

Tato studie se zabývá přípravou křemičitých nanovláken, jejich následnou funkcionalizací a způsobem navázání některých biomolekul (antibiotik, enzymů) na tuto nanovlákennou matrici. Na přípravu takto modifikovaných nanovláken navazují analýzy sledující výsledky imobilizace těchto agens. V závěru jsou popsány vlastnosti připravených materiálů a zhodnoceny předběžné výsledky jejich praktického uplatnění.

Příprava křemičitých nanovláken

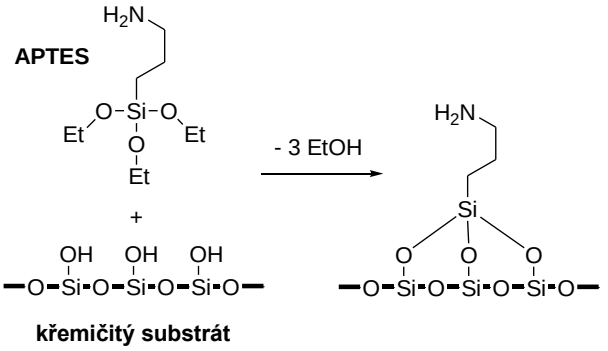
Způsob výroby spočívá v syntéze výchozího solu z tetraalkoxysilanu metodou sol-gel, elektrostatickým zvlákněním tohoto solu na zařízení podle patentu (Jirsák O. et al., 2004), tepelnou stabilizací připravené nanovlákenné vrstvy a povrchovou modifikací této vrstvy roztokem aminoalkyltrialkoxysilanu. Proti vlastnostem řady křemičitých nanovláken publikovaných v literatuře má výše uvedený postup řadu výhod. Základní výhodou je možnost převedení do průmyslové výroby. Z hlediska použití ve zdravotnictví je velmi důležité, že při výrobě výsledného produktu

(nanovlákenné vrstvy s imobilizovaným léčivem) se nepoužívají žádné chemikálie, jejichž residua by mohla způsobovat zdravotní rizika. Jako rozpouštědla se používají jednoduché alkoholy (ethanol nebo isopropylalkohol). Vedle vody a katalytického množství HCl jsou surovinami již pouze tetraethoxysilan (TEOS) jako zdroj křemičité kostry a aminopropyltriethoxysilan (APTES) jako činidlo pro modifikaci povrchu. Žádná jiná rozpouštědla, pomocné organické polymery ani smáčedla, která by zákonitě kontaminovala produkt, nejsou používána.

Funkcionalizace povrchu křemičitých nanovláken

Pro kovalentní vazbu aktivních substancí na křemičitá nanovlákna je nejprve nutné funkcionalizovat povrch nanovlákna. Povrch křemičitých materiálů může být modifikován různými organickými skupinami. Pro navázání řady biomolekul jsou výhodná činidla s 3-aminopropylovou skupinou, se kterou navazované biomolekuly mohou tvořit kovalentní vazbu (Šlamborová, I. et al., 2013). Obecně nukleofilní primární amin může být použit jako spojka mezi povrchem oxidu křemičitého a jakýchkoliv organických sloučenin s vhodnou odstupující skupinou při nukleofilní substituční reakci (Luechinger, M. et al., 2005).

Mezi běžně používané aminoalkoxysilany patří (3-aminopropyl)triethoxysilan (APTES) nebo (3-aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS). Schéma funkcionalizace křemičitých nanovláken pomocí APTES je na obrázku 1.



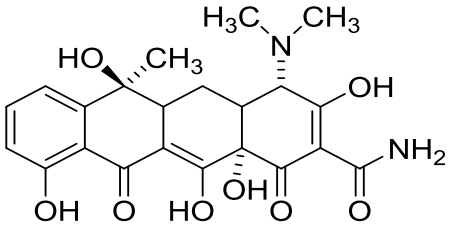
Obrázek 1 Schéma funkcionalizace povrchu křemičitého nanovlákna (3-aminopropyl)triethoxysilanem (APTES)

Funkcionalizační reakce začíná fyzikální adsorpci aminoalkylakoxysilanů na povrch silikátového substrátu, následuje rychlá hydrolýza alkoxyskupin za vzniku hydroxyskupin, které vytvářejí kovalentní vazbu se silanolovými skupinami na povrchu nanovláken. Praktické provedení spočívá v ponoření nanovláken do roztoku APTES, resp. APTMS, v alkoholu (ethanol nebo isopropylalkohol), následným oplachem přebytku činidla a vysušením.

IMOBILIZACE BIOAKTIVNÍCH AGENS NA KŘEMIČITÁ NANOVLÁKNA

Imobilizace tetracyklinu

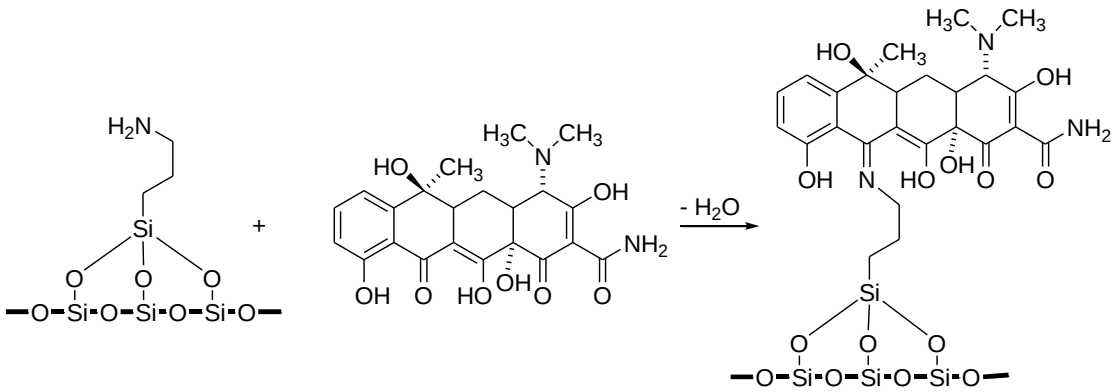
Tetracyklin (obrázek 2) patří mezi širokospektré antibiotikum, s bakteriostatickým účinkem proti gramnegativním, grampozitivním anaerobním i aerobním bakteriím, chlamydiím a spirochétám. Lokálně se používá ve 2-3% koncentraci (nižší koncentrace může způsobit rezistenci) (Aispl, 2014).



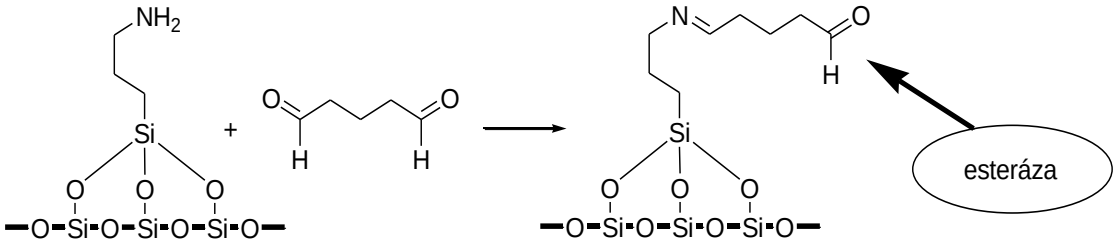
Obrázek 2 Struktura tetracyklinu

Molekula tetracyklinu tvoří s aminoskupinou Schiffovu bázi pomocí karbonylové skupiny na kruhu sousedícím s benzenovým jádrem. Tato vazba je dostatečně pevná na to, aby při následné aplikaci nanovlákenné struktury s imobilizovaným organickým agens docházelo pouze k jeho místnímu působení bez rychlého vyplavování z nanovlákenné struktury. Postupné uvolňování vázaného antibiotika je spojeno s pomalým rozpouštěním nanovlákenné struktury. Tím je umožněno dosažení dlouhodobé, kontaktní a vysoké koncentrace organických agens v místě aplikace (Šlamborová, I. et al., 2013). Na funkcionalizovaných křemičitých nanovláknech byla provedena imobilizace tetracyklinu ponořením nanovláken do ethanolového roztoku antibiotika o různých koncentracích.

Schéma imobilizační reakce je znázorněno na obrázku 3.



Obrázek 3 Schéma imobilizační reakce antibiotika tetracyklinu na funkcionalizovaná nanovlákna



Obrázek 4 Schéma imobilizace enzymu esterázy

Imobilizace enzymů

Pro ověření možnosti širšího využití nanovlákenné silikátové matrice pro léčení těžko se hojících ran jsme využili tento materiál jako nosiče enzymů pro enzymatický debridement. Jako modelový enzym jsme zvolili esterázu z prasečích jater.

Imobilizace tohoto enzymu v prvním stupni vycházela ze stejného funkcionalizovaného materiálu (obrázek 1) jako pro imobilizaci tetracyklinu. V dalším stupni reagovaly aminoskupiny křemičité matrice s jednou funkční skupinou glutaraldehydu, jehož druhá aldehydická skupina se uplatnila při kovalentním navázání enzymu esterázy (obrázek 4).

METODY

Příprava křemičitých nanovláken

Tetraethoxysilan byl rozpuštěn v isopropylalkoholu a byly přidány voda a HCl tak, aby molární poměr k = [H_2O]/[tetraalkoxysilan] byl k = 2,3 a molární poměr m = [HCl]/[tetraalkoxysilan] byl m = 0,01. Po proběhnutí hydrolyzačních a polykondenzačních reakcí byl sol zahuštěn odpařením rozpouštědla na obsah 36 hmot. % SiO_2.

Připravený sol byl použit k elektrostatickému zvlákňování ze struny na poloprovozním zařízení Superlab firmy Elmarco Liberec při napětí 50 kV a vzdálenosti elektrody od sběrného povrchu nanovláken 15 cm. Střední průměr takto vyrobených nanovláken byl 250 nm. Výsledná nanovlákenná struktura byla ve formě vrstvy nanovláken tepelně stabilizována při 180°C po dobu 2 hodin.

Funkcionalizace povrchu křemičitých nanovláken

K funcionalizaci byl použit roztok 3-aminopropyltriethoxysilanu APTES (Sigma-Aldrich, 98%) v 2-propanolu o koncentracích 2 hmot.% nebo 10 hmot.% Po silanizaci byla nanovlákna 2× omyta destilovanou vodou a po dobu 10 minut ponořena do 0,1% kyseliny octové. Následně byla vlákna sušena při teplotě 30 °C po dobu 2,5 hod.

Imobilizace tetracyklinu

Pro navázání antibiotika byl použit roztok tetracyklinu v absolutním ethanolu ve třech koncentracích 1g/l, 2,5g/l a 5g/l. Funkcionalizovaná nanovlákna byla v ethanolových roztocích o uvedených koncentracích ponořena při laboratorní teplotě v prostředí bez přístupu světla po dobu 24 hod.

Imobilizace enzymu esterázy

Pro imobilizaci esterázy byl použit roztok glutaraldehydu (GA) stupeň II (Sigma-Aldrich, 25%

ve fosfátovém pufru (pH = 7,2). Použitá koncentrace glutaraldehydu byla 4 ml GA/ 46 ml fosfátového pufru. Křemičitá nanovlákna byla ponechána namočena v roztoku s GA po dobu 10 minut, poté byla vyjmuta a několikrát opláchnuta v čistém fosfátovém pufru. Esteráza z prasečích jater (Sigma-Aldrich, ≥15 jednotek/mg pevné látky) byla rozpuštěna ve fosfátovém pufru (koncentrace 10 mg esterázy/ml fosfátového pufru). Upravená nanovlákna byla ponořena v tomto roztoku 10 minut za současného promíchávání, poté byla dvakrát opláchnuta čistým fosfátovým pufrem a vysušena při laboratorní teplotě.

Kvantitativní stanovení tetracyklinu metodou HPLC

Kvantitativní stanovení tetracyklinu metodou HPLC bylo provedeno na přístroji Dionex Ultimate 3000 Firmy Dionex. Navážky nanovláken s navázaným tetracyklinem byly po přídavku 2 ml ethanolu po dobu 2 min. vortexovány. Poté byly vzorky centrifugovány při 4600 ot/min po dobu 5 min. Supernatant (1 ml) byl naředěn vodnou mobilní fází (0,01M kyselina aminooctová, 0,05M kyselina trifluoroctová, voda) a použit k analýze množství adsorbovaného tetracyklinu na nanovlákenný substrát. Zbylá nanovlákna byla několikrát promyta ethanolem a po vysušení zvážena a rozpuštěna ve směsi 5M kyseliny fluorovodíkové, 1M kyseliny chlorovodíkové a 5M hydroxidu amonného. Tento roztok byl naředěn vodnou mobilní fází a následně použit pro stanovení kovalentně vázaného tetracyklinu. Separace probíhala na koloně Kinetex 2,6 u PFP. 100 R s délkou 150 mm a vnitřním průměrem 4,6 mm firmy Phenomenex. Byla použita mobilní fáze o koncentraci 50 mM kyseliny trifluoroctové a 10 mM octanu amonného jednak ve vodě a jednak v 20% methanolu pro vytvoření gradientu (od vodné do organické fáze). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,7 ml/min. Detekce byla provedena DAD detektorem. Pro vyhodnocení plochy píků byla použita absorbance měřená při vlnové délce 270 nm.

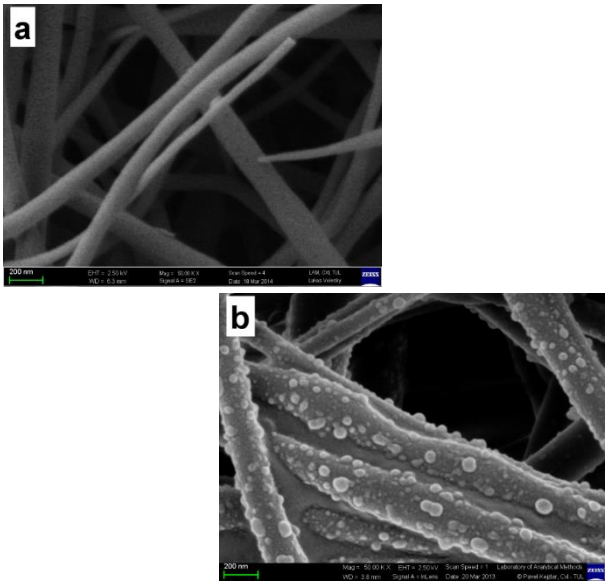
VÝSLEDKY

Výsledky imobilizace tetracyklinu

Tabulka 1 shrnuje výsledky úspěšné imobilizace antibiotika tetracyklinu (TCK) na křemičitý nanovlákenný substrát. Pro experimenty byly použity dvě koncentrace jak funkcionalizačního činidla (APTES) a 3 koncentrace tetracyklinu. Použitý způsob stanovení tetracyklinu na nanovláknech metodou HPLC umožnil rozlišení adsorpcí zachyceného antibiotika a antibiotika kovalentně navázaného. Nalezená množství jsou udávána ve váhovém množství v mg vztaženém na 1 g nanovlákna a také v µg na plochu 1 cm^2 pro posouzení množství aplikovaného antibiotika při krytí rány. Z výsledků vyplývá, že u všech vzorků převažuje množství adsorbovaného tetracyklinu nad kovalentně vázaným tetracyklinem. Obsah adsorbovaného tetracyklinu se zvýšil při vyšší koncentraci použitého roztoku tetracyklinu. Také množství kovalentně vázaného tetracyklinu bylo výrazně vyšší po funkcionalizaci nanovlákna 10% roztokem APTES než při aplikaci 2% roztoku. Tato zjištění jsou důležitá nejen pro další optimalizaci postupu imobilizace, ale i pro ovlivnění poměru adsorbovaného a kovalentně vázaného antibiotika.

Charakteristika křemičitých nanovláken s imobilizovaným enzymem esteráza

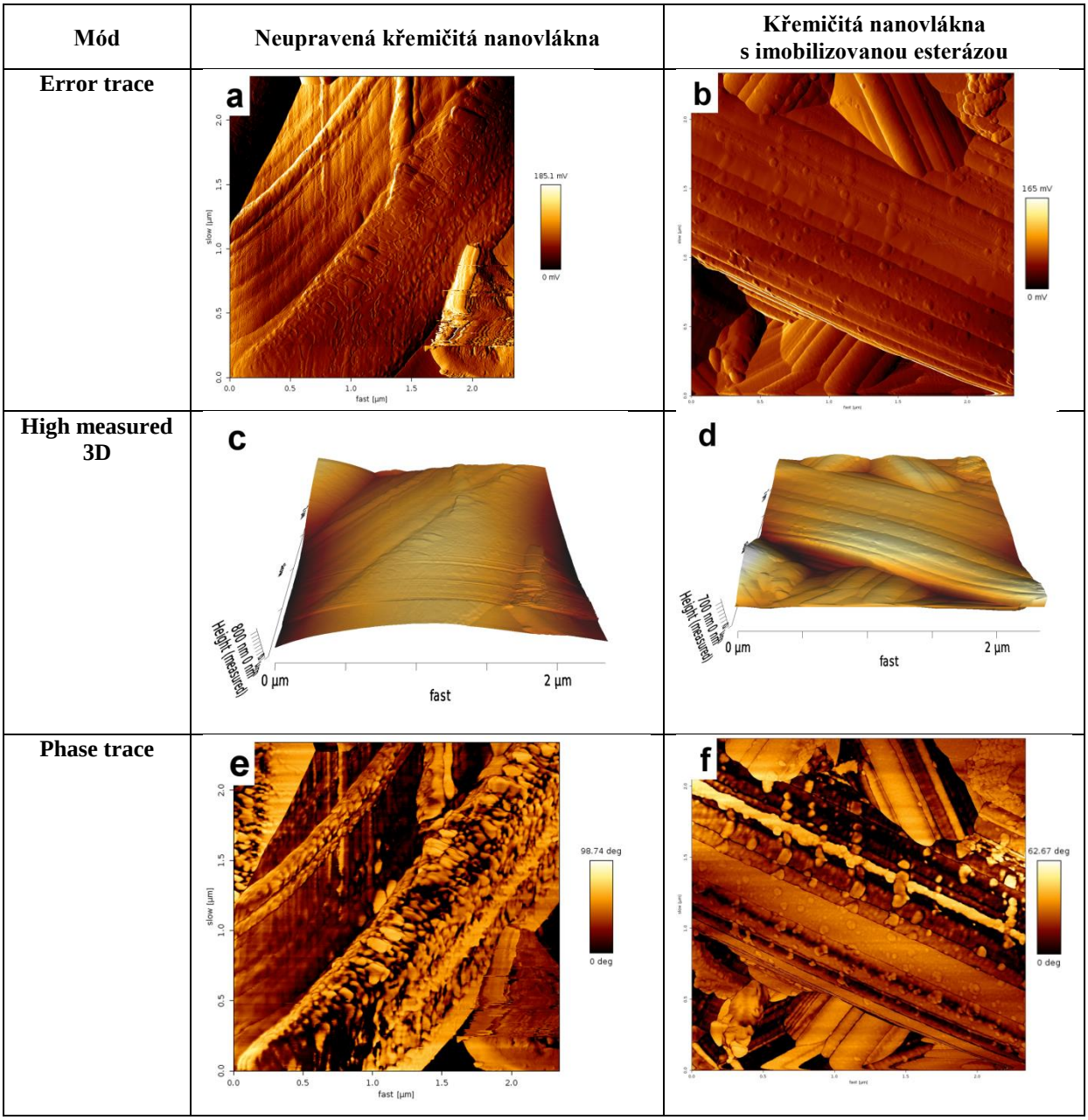
Vytvořený materiál byl vizualizován, charakterizován a kvantifikován pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (obrázek 5), mikroskopu atomárních sil (obrázek 6), histochemického barvení a optického mikroskopu. Obrázek 5 ukazuje, že povrch vláken se navázáním enzymu změnil, oproti hladkému povrchu (5a) jsou na obrázku 5b jasně viditelné struktury o velikosti 10 až 40 nm kontinuálně pokrývající celý povrch nanovlákna.



Obrázek 5 Snímky skenovacího elektronového mikroskopu pořízené u křemičitých nanovláken bez imobilizovaného enzymu (a) a s imobilizovanou esterázou (b). Zvětšení 50000x (Danilová, I. et al., 2014)

Tabulka 1 Výsledky kvantitativní analýzy vláken s navázaným tetracyklinem

konc. APTES (%)	konc. TCK (%)	Stanovené množství tetracyklinu			
		adsorbovaný TCK		vázaný TCK	
		mg/g	µg/cm^2	mg/g	µg/cm^2
2	1,0	3,42	9,91	0,575	1,66
2	2,5	5,41	15,68	0,424	1,23
2	5,0	14,07	40,82	0,576	1,67
10	1,0	6,81	19,75	1,07	3,10



Obrázek 6 Snímky pořízené Mikroskopem atomárních sil NanoWizard III v bezkontaktním režimu, módy error trace, high measured 3D a phase trace. Neupravená křemičitá nanovlákna (a, c, e), vlákna s imobilizovanou esterázou (b, d, f). Skenovací plocha byla vždy 2,3 × 2,3 µm (Danilová, I. et al., 2014).

Mikroskop atomárních sil NanoWizard III byl použit pro lepší charakterizaci povrchu nanovláken. Byly zvoleny 3 módy snímání vždy v bezkontaktním režimu (obrázek 6). Pomocí mikroskopu atomárních sil a následné analýzy snímků v programu JPK DataProcessing bylo možno lépe charakterizovat povrch upravených nanovláken. Na povrchu upravených nanovláken se objevily po imobilizaci pravidelné útvary shluků esterázy o velikosti 10 až 40 nm (Danilová, I. et al., 2014).

Všechny výsledky potvrdily imobilizaci enzymu na povrch křemičitých nanovláken. Při zachování aktivity a stability imobilizovaného proteolytického enzymu na nanovlákna vznikl velmi kvalitní materiál, který je možný použít na ránu k bezbolestnému odstranění nekrózy, což je primární krok k úspěšné léčbě různých druhů obtížně léčitelných ran.

ZÁVĚR

Křemičitá nanovlákna jsou pro své jedinečné vlastnosti novým a velmi perspektivním nanovlákenným materiálem. Příprava nanovláken je chráněna Českým i Evropským patentem. Bylo prokázáno, že na jejich povrch je možno poměrně jednoduchým způsobem imobilizovat různé typy biomolekul. Získaný materiál je jednoznačně určen jako nový typ obvazového materiálu pro léčbu různých typů chronických ran.

Slibným krokem se zdá také příprava funkcionalizovaných křemičitých nanovláken již při jejich výrobě modifikací složení solu před elektrostatickým zvlákňováním. To by zajistilo vznik reaktivních skupin na povrchu vytvořeného nanovlákenného materiálu už v procesu zvlákňování. Tento postup by otevíral možnosti nového způsobu vysoce efektivní kovalentní imobilizace proteolytických enzymů a jiných bioaktivních molekul.

Poděkování

Výsledky byly získány za finančního přispění projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy "Národní program udržitelnosti I" LO 1201 a projektu OP VaVpI Centrum pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace CZ.1.05/2.1.00/01.0005.

SEZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZŮ

AISPL, Automatizovaný informační systém léčivých přípravků, https://www.aislp.cz/cs/, přístupové heslo Krajské nemocnice Libere, a.s.

ALEX, D. et al. 2014. *Esterases immobilized on aminosilane modified magnetic nanoparticles as a catalyst for biotransformation reactions.* Bioresour. Technol. 2014. Dostupné z: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.110.

ANGLIN, E, L. CHENG, W. FREEMAN et al. 2008. *Porous silicon in drug delivery devices and materials*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2008-08-17, 60, 11, 1266-1277. DOI: 10.1016/j.addr.2008.03.017. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X08001002

CHEN, W.S., P.H. HSIEH, W.N. YANG et al. 2014. Chemically *modified electrospun silica nanofibers for promoting growth and differentiation of neural stem cells*. J. Mater. Chem. B, 2(9), 2014, 1205-1215.

DANILOVÁ, I., I. LOVĚTINSKÁ-ŠLAMBOROVÁ, V. ZAJÍCOVÁ et al. 2014. *Immobilization of esterase enzyme onto silica nanofibers for biomedical applications.* Vlákna a textil. 2014, č. 2.

DEITZL, J.M., J. KLEINMEYER, J.K. HIRVONEN et al. 2001. *Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers.* Polymer 42, 2001, 8163-8170.

FORMHALS, A. *Process and apparatus for preparing artificial threads.* Patent US 1975504, 5.12.1930, 2.10.1934.

FU, C., T. LIU, L. LI et al. 2013. *The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes.* Biomaterials. 2013, vol. 34, issue 10, s. 2565-2575. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.043.

JIRSAK, O., D. LUKAS, F. SANETRNÍK et al. 2003. Production *and Properties of Nanofibres. In: International Conference Nano´03 Brno.* Brno, VÚT 2003, 142-147. ISBN 80-214-2527-X.

JIRSÁK, O., F. SANETRNÍK, D. LUKÁŠ et al. *Způsob výroby nanovláken z polymerního roztoku elektrostatickým zvlákňováním a zařízení k provádění způsobu.* Patent CZ 294274, 8.9.2003, 10.11.2004. Patent US 7585437, 8.9.2004, 8.9.2009.

LUECHINGER, M., R. PRINS a G.D. PIRNGRUBER. 2005. *Functionalization of silica surfaces with mixtures of 3-aminopropyl and methyl groups.* Microporous and Mesoporous Materials. 2005, vol. 85, 1-2, s. 111-118. DOI: 10.1016/j.micromeso.2005.05.031.

Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387181105002234

MURAKAMI, Y., H. USAMI., T. NISHIKAWA et al. 2013. *Process of manufacturing inorganic nanofibers*. Patent US 8562895 B2, 23.12.2009, 22.10.2013.

NAGAMINE, S., K. KOSAKA, S. TOHYAMA et al. 2014. *Silica nanofiber with hierarchical pore structure templated by a polymer blend nanofiber and surfactant micelle.* Materials Research Bull. 50, 2014, 108–112.

PATEL, P.A., J. ECKART, M.C. ADVINCULA et al. 2009. *Rapid synthesis of polymer-silica hybrid nanofibers by biomimetic mineralization.* Polymer 50, 2009, 1214–1222.

Protease. 2011. University at Buffalo [online]. 2011 [cit. 2014-04-08]. Dostupné z: http://www.acsu.buffalo.edu/~sjpark6/pednotes/Protease.pdf.

SAHAY, R., P.K. SURESH, R. SRIDHAR et al. 2012. *Mater. Chem.* 22, 2012, pp. 12953-12971

ŠLAMBOROVÁ I., V. ZAJÍCOVÁ, P. EXNAR et al. 2013. *Nanovlákenná struktura s imobilizovaným organickým agens a způsob její výroby* [patent]. Česká republika. 303911, B6.

TALBERT, J.N., J.M. GODDARD, H. YANG et al. 2012. *Enzymes on material surfaces.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [online]. 2012, vol. 93, s. 8-19 [cit. 2014-04-05]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.01.003. Dostupné z:http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776512000288.

VODRÁŽKA, Z., P. RAUCH a J. KÁŠ. 1991. *Enzymologie.* 2. přeprac. vyd. Praha: Academia, 1991, 245 s. ISBN 80-708-0124-7.

YOO, H.S., T.G. KIM a T.G. PARK. 2009. *Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery.* Advanced Drug Delivery Reviews [online]. 2009, vol. 61, issue 12, s. 1033-1042 [cit. 2014-02-22]. DOI: 10.1016/j.addr.2009.07.007. Dostupné z:http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X09002324.

YUE, X., S. FENG, S. LI et all. 2012. *Bromopropyl functionalized silica nanofibers for effective removal of trace level dieldrin from water.* Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 406, 2012, 44–51.

STANOVENIE AMINO CUKROV VO VZORKÁCH KRVNÉHO SÉRA METÓDOU RP-HPLC
DETERMINATION OF AMINO SUGARS IN BLOOD SERUM SAMPLES BY RP-HPLC METHOD

BEŇO Erik, GÓRA Róbert, HUTTA Milan

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Bratislava

ABSTRAKT

Východiská: Amino cukry ako zlúčeniny syntetizované priamo v organizme predstavujú zložky významných biologických štruktúr, napr. polysacharidov, glykoproteínov, glykolipidov alebo antibiotík, vzhľadom na čo majú terapeutický potenciál pri liečbe rôznych ochorení, napr. osteoartritídy, ochorenia čriev alebo pri zápaloch.

Ciele: Cieľom práce bolo vyvinúť RP-HPLC metódu na separáciu vybraných amino cukrov (glukozamín, galaktozamín, mannozamín) a ich stanovenie vo vzorke krvného séra.

Súbor a metódy: Vzorky krvného séra boli dodané Lekárskou fakultou Univerzity Komenského v Bratislave. Na separáciu a stanovenie vybraných amino cukrov vo vzorke bola použitá RP-HPLC metóda s predkolónovou derivatizáciou pomocou činidla DEEMM.

Výsledky: Vo vzorke krvného séra sme stanovili dva amino cukry na koncentračných úrovniach 1,03 – 3,34 mg L^{-1}.

Záver: Vyvinutou RP-HPLC metódou sme dokázali separovať zmes amino cukrov a aminokyselín a stanoviť amino cukry vo vzorke krvného séra.

Kľúčové slová: Amino cukry. Krvné sérum. RP-HPLC. DEEMM.

ABSTRACT

Objectives: Amino sugars as compounds synthesized directly in the body are components of important biological structures, e.g. polysaccharides, glycoproteins, glycolipids or antibiotics and therefore they have therapeutic potential in the treatment of various diseases, such as osteoarthritis, intestinal disorders and inflammations.

Goals: The aim of this work was to develop a novel RP-HPLC method for the separation of selected amino sugars (glucosamine, galactosamine, mannosamine) and their determination in blood serum sample.

Sample and methods: The blood serum samples were obtained from the Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava. For the separation and determination of amino sugars in sample, RP-HPLC method with pre-column derivatization by DEEMM reagent was used.

Results: We determined two amino sugars at concentration levels 1.03 – 3.34 mg L^{-1} in blood serum sample.

Conclusion: We were able to separate mixture of amino sugars and amino acids, and determine amino sugars in blood serum sample by developed RP-HPLC method.

Key words: Amino sugars. Blood serum. RP-HPLC. DEEMM.

ÚVOD

Amino cukry alebo aminosacharidy predstavujú skupinu sacharidov, najmä hexóz, v štruktúre ktorých je jedna alebo viac hydroxylových skupín substituovaných za amino skupinu (Miljkovic, 2009). Nachádzajú sa v spojivových tkanivách, gastrointestinálnych sliznicach a sú súčasťou biologických štruktúr, ako sú polysacharidy, glykoproteíny, glykolipidy a antibiotiká. Z klinických vzoriek amino cukry obsahujú napr. krvná plazma, krvné sérum, materské mlieko, synoviálna tekutina alebo mozgovomiechový mok (Varma, 1983).

Amino cukry sú syntetizované priamo v organizmoch premenou glukózy na glukozamín (GlcN), ktorý sa katalytickými reakciami transformuje na svoje deriváty a zároveň vytvára izoméry ďalších amino cukrov, z ktorých najdôležitejšími sú galaktozamín (GalN) a mannozamín (ManN) (Anderson et al., 2005, Zubay, 1995). Všetky tri spomínané aminocukry sú široko užívané ako výživové doplnky pri pacientoch s osteoartritídou a glukozamín, ako prvý z radu amino cukrov má aj terapeutický potenciál pri liečbe ochorení čriev a pri zápaloch (Zhu et al., 2005).

Ako z prehľadu literatúry vyplýva, stanovenie glukozamínu a ďalších amino cukrov v biologických tekutinách bolo predmetom niekoľkých štúdii, z ktorých výrazná väčšina využívala na separáciu analytov metódu reverzno-fázovej vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (RP-HPLC) v spojení s predkolónovou derivatizáciou vzorky (Zhang et al., 2006, Coppa et al., 2011) a tiež spojenie kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS, LC-MS/MS) (Guan et al., 2011, Persiani et al., 2007). Predkolónová derivatizácia vzoriek po použití vhodného reagentu umožňuje, aby amino cukry, ktoré sú zlúčeniny s výrazne hydrofilným charakterom, mohli byť separované za reverzno-fázových podmienok. Avšak samotná derivatizácia je často krát časovo náročná úpravná technika (Zhong, 2007), a počas nej tiež môže dôjsť k derivatizácii potenciálne

prítomných zložiek matrice s podobnou molekulovou štruktúrou ako majú amino cukry (amino kyseliny, biogénne amíny). Najčastejšie používané derivatizačné činidlá, ktoré sa používajú na úpravu štruktúry látok, ktoré vo svojej molekule obsahujú primárnu alebo sekundárnu amino skupinu sú fenylisotiokyanát (PITC) (Osswald, 1995, Tekko, 2006), o-ftaladehyd (OPA) (Configliacchi et al., 1996, Song et al., 2012), 9-fluorenylmetoxykarbonyl chlorid (FMOC-Cl) (Zhu et al., 2005, Li et al., 2013).

CIEĽ

- Vývoj novej gradientovej RP-HPLC metódy s použitím predkolónovej derivatizácie na separáciu vybraných amino cukrov.
- Stanovenie vybraných amino cukrov (glukozamín, galaktozamín, mannozamín) vo vzorkách krvného séra, po použití predkolónovej derivatizácie činidlom dietyl etoxymetylénmalonátom (DEEMM).

SÚBOR

Vzorky krvného séra boli zabezpečené Lekárskou fakultou Univerzity Komenského v Bratislave.

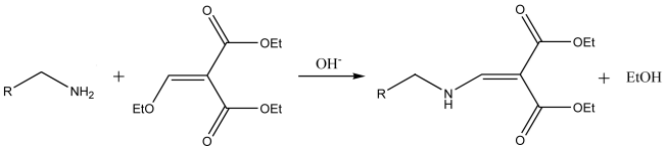
METODIKA

Chemikálie

Štandardy amino cukrov glukozamín hydrochlorid (GlcN HCl) a galaktozamín hydrochlorid (GalN HCl) boli zakúpené od spoločnosti Merck KGaA (Darmstadt, Nemecko) a štandard mannozamín hydrochlorid (ManN HCl) bol zakúpený od spoločnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Čistota štandardov amino cukrov bola 98 – 99%. Derivatizačné činidlo dietyl etoxymetylénmalonát pre syntézu (DEEMM) bolo produktom Schuchardt OHG (Merck) (Hohenbrunn, Nemecko).

Príprava roztokov štandardov amino cukrov

Zásobné roztoky štandardov amino cukrov o koncentrácii 2000 mg L^{-1} boli pripravené rozpustením jednotlivých analytov v roztoku tetraboritanu sodného. Do odmerných baniek s objemom 25 mL bol zo zásobných roztokov odpipetovaný 1 mL, pridalo sa 5 mL roztoku tetraboritanu sodného a 100 µL derivatizačného činidla DEEMM. Roztoky štandardov amino cukrov boli následne derivatizované počas 60 min vo vodnom kúpeli vyhriatom na 55°C. Derivatizačná reakcia je uvedená na obrázku 1. Po prebehnutí derivatizačnej reakcie a vychladnutí boli ku každému roztoku štandardu pridané 2 mL metanolu a objem roztokov v banke bol doplnený do 25 mL deionizovanou vodou. Koncentrácia takto pripravených roztokov štandardov amino cukrov po derivatizácii bola 80 mg L^{-1}.



Obrázok 1 Derivatizačná reakcia amino skupiny s činidlom DEEMM

Príprava roztokov vzoriek krvného séra

Vzorky krvného séra boli zmrazené a udržiavané pri teplote -80°C až do ich úpravy a následnej RP-HPLC analýzy. Po rozmrazení boli vzorky séra centrifugované (10 min, 13,4 rpm) a derivatizované analogickým postupom ako roztoky štandardov amino cukrov. Pred RP-HPLC analýzou boli derivatizované vzorky krvného séra znova centrifugované a prefiltrované cez 0,45 µm PTFE mikrofiltre.

Chromatografický systém

Použitý kvapalinový chromatografický systém LaChrom Merck-Hitachi (Merck, Darstadt, Nemecko) bol zložený z modulov; spektrofotometrický detektor s radom diód (DAD) L-7450A, kolónový termostat L-7300, automatický dávkovač L-7200, vysokotlaková pumpa L-7100, prietokový vákuový odplyňovač mobilných fáz L-7612 a komunikačné rozhranie D-7000. Zber a vyhodnocovanie nameraných údajov bol zabezpečený pomocou softwaru HSM (verzia 4.0).

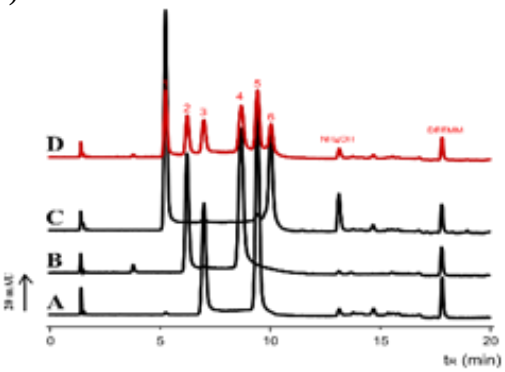
Chromatografické podmienky

Separácia a stanovenie amino cukrov vo vzorkách krvného séra boli uskutočnené na kolóne monolitového typu Chromolith Performance RP-18e (100 x 4,6 mm) s predkolónou Chromolith Guard RP-18e (5 x 4,6 mm). Mobilná fáza bola zložená z fosforečnanového tlmivého roztoku a metanolu. Kolónový termostat bol vyhriaty na 40°C a prietok mobilnej fázy bol 1,0 mL min^{-1}. Chromatografické záznamy, získané použitím spektrofotometrickej (DAD) detekcie, boli vyhodnotené pri vlnovej dĺžke 280 nm.

VÝSLEDKY

Separácia zmesi štandardov amino cukrov

Vzhľadom na to, že v prírode sa amino cukry (GlcN, GalN, ManN) vyskytujú v dvoch anomerických formách (α- a β- anoméry), vo vodných roztokoch sú obvykle prítomné obidva izoméry. Tento jav je možné pozorovať na chromatografických záznamoch štandardov amino cukrov a ich zmesí (Obr. 2), kde sa potvrdil predpokladaný výskyt dvoch píkov patriacich pravdepodobne jednotlivým anomérom aminosacharidov, podobne ako bolo pozorované aj v uverejnených prácach niektorých autorov (Zhu, et al., 2005, Hubert et al., 2010).

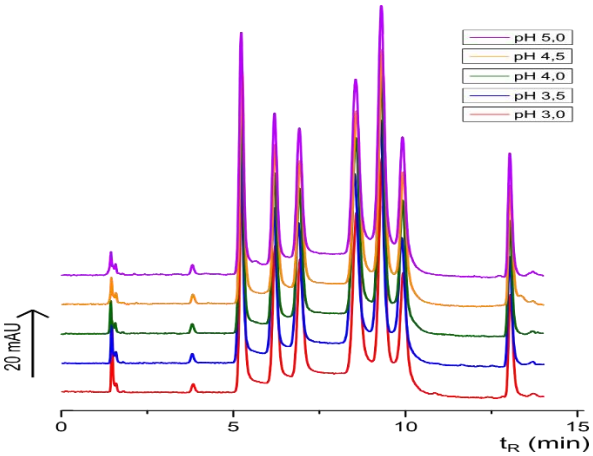


Obrázok 2 Chromatografické záznamy štandardu glukozamínu (A), galaktozamínu (B), mannozamínu (C) a zmesi štandardov amino cukrov (D) pred optimalizáciou mobilnej fázy, vyhodnotené pri 280 nm (1 - ManN 1, 2 - GalN 1, 3 - GlcN 1, 4 - GalN 2, 5 - GlcN 2, 6 - ManN 2)

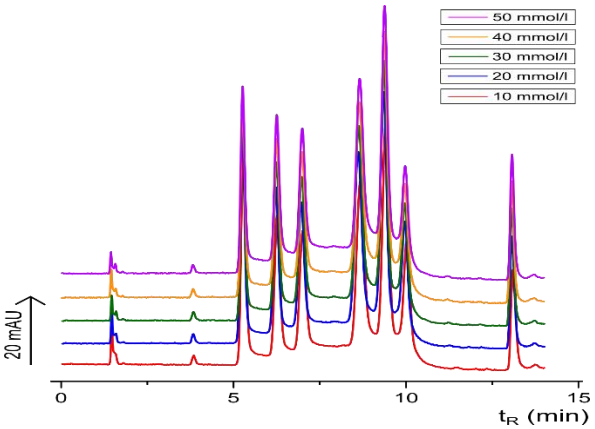
V snahe dosiahnuť čo najlepšie rozdelenie analytov s potrebným rozlíšením sme sa sústredili na optimalizáciu zloženia mobilnej fázy a priebehu gradientovej elúcie. Vzhľadom na charakter analytov, uskutočnené experimenty boli zamerané najmä na štúdium vplyvu pH a iónovej sily fosforečnanového tlmivého roztoku na priebeh separácie. Na optimalizáciu pH vodnej zložky mobilnej fázy; fosforečnanového tlmivého roztoku o koncentrácii 10 mmol L^{-1} sme pripravili sériu experimentov, kde sme postupne zmenili hodnotu pH tlmivého roztoku v intervale 3,0 - 5,0. Po porovnaní chromatografických záznamov (Obr. 3) sme dospeli k názoru, že zmena pH vodnej zložky mobilnej fázy výrazne neovplyvnila priebeh separácie zmesi štandardov aminocukrov a pre ďalšie experimenty sme si zvolili hodnotu pH tlmivého roztoku na 3,6.

Na štúdium vplyvu iónovej sily mobilnej fázy na priebeh separácie sme pripravili fosforečnanový tlmivý roztok s koncentráciami 10, 20, 30, 40 a 50 mmol L^{-1}, a vo všetkých prípadoch bolo pH roztoku nastavené na hodnotu 3,5. Po vyhodnotení chromatografických záznamov (Obr. 4) sme dospeli k záveru, že za optimálnu koncentráciu fosforečnanového tlmivého roztoku bude zvolená koncentrácia 10 mmol L^{-1}.

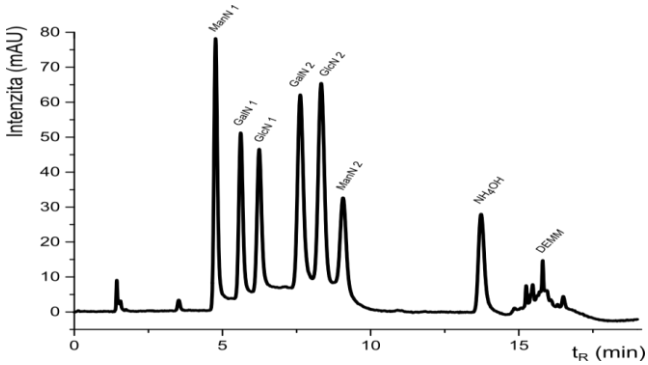
Chromatografický záznam na Obr. 5 znázorňuje separáciu zmesi štandardov amino cukrov po optimalizácii zloženia mobilnej fázy.



Obrázok 3 Chromatografické záznamy separácie zmesi štandardov amino cukrov získané DAD detektorom pri rôznom pH fosforečnanového tlmivého roztoku (10 mmol/l)



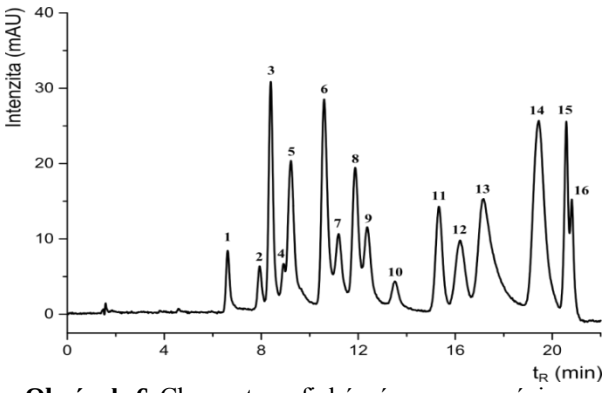
Obrázok 4 Chromatografické záznamy separácie zmesi amino cukrov získané DAD detektorom pri rôznej koncentrácii fosforečnanového tlmivého roztoku (pH 3,5)



Obrázok 5 Chromatografický záznam separácie zmesi štandardov amino cukrov po optimalizácii mobilnej fázy

Separácia zmesi štandardov amino cukrov a aminokyselín

Vzhľadom na charakter vzorky je pravdepodobné, že sa vo vzorkách krvného séra nachádzajú aj iné zlúčeniny, ktoré vo svojej molekule obsahujú primárne alebo sekundárne amino skupiny, napr. aminokyseliny a biogénne amíny. Tieto látky môžu súčasne s amino cukrami podliehať derivatizačnej reakcii s činidlom DEEMM, čím predstavujú potenciálny zdroj interferentov pri stanovení aminocukrov. Tento fakt nás viedol overiť správanie sa niektorých aminokyselín a amínov v chromatografickom systéme. Zamerali sme najmä na aminokyseliny s hydrofilným charakterom a chromatografický záznam separácie zmesi štandardov amino cukrov a aminokyselín (Obr. 6), poukazuje na veľmi podobné elučné charakteristiky niektorých aminokyselín so sledovanými amino cukrami a potenciálny negatívny vplyv na stanovenie v prípade ich prítomnosti v analyzovaných vzorkách krvného séra.



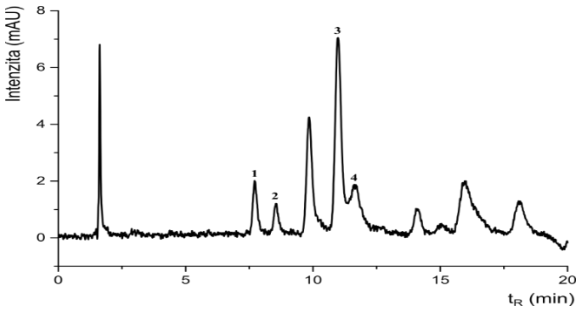
Obrázok 6 Chromatografický záznam separácie zmesi amino cukrov a aminokyselín, (1 - ManN 1, 2 - GalN 1, 3 - His, 4 - GlcN 1, 5 - Asn, 6 - Ser, 7 - GalN 2, 8 - Gln, 9 - GlcN 2, 10 - ManN 2, 11 - Arg, 12 - Asp, 13 - Gly, 14 - Cit, 15 - Thr, 16 – Glu)

Po separácii zmesi štandardov amino cukrov a aminokyselín a vylúčením ich vzájomnej koelúcie sme zostrojili sedem bodové kalibračné krivky (koncentrácie 1, 2, 7, 12, 17, 22 a 26 μg mL^{-1}) pre zmes amino cukrov. Rovnice kalibračných kriviek a koeficienty determinácie jednotlivých amino cukrov sú uvedené v Tab. 1.

Tabuľka 1 Rovnice kalibračných kriviek a koeficienty determinácie jednotlivých amino cukrov

Amino cukor	Rovnica kalibračnej krivky	R^2
ManN 1	y = 14024x – 621,07	0,9990
GalN 1	y = 12233x – 4630,9	0,9996
GlcN 1	y = 13846x – 9142,7	0,9993
GalN 2	y = 21362x – 14578	0,9990
GlcN 2	y = 22626x – 15786	0,9991
ManN 2	y = 12522x – 7981,3	0,9985

Počas úpravy vzorky krvného séra sme sa zamerali najmä na precipitáciu proteínov a odstránenie prebytočných chloridov na kolónkach silného anexu. Obrázok 7 znázorňuje chromatografický záznam analýzy vzorky krvného séra.



Obr. 7 Chromatografický záznam krvného séra (1 – GalN 1, 2 – GlcN 1, 3 – GalN 2, 4 – GlcN2)

Koncentračné úrovne amino cukrov vo vzorke krvného séra sme vypočítali použitím metódy prídavku štandardu, kedy sme k 200 μL vzorky postupne pridali 10, 20, 50 a 100 μL zmesi štandardov amino cukrov.

DISKUSIA

Stanovenie amino cukrov vo vzorkách krvného séra ukázalo potrebu venovať sa aj úprave vzorky, kedy sme analyzovali vzorku krvného séra po úprave rôznymi technikami. Ako optimálna úpravná technika bola priama derivatizácia vzorky činidlom DEEMM, pretože po precipitácii proteínov

a odstránení prebytočných chloridov na kolónkach silného anexu, vo vzorke nezostal žiadny pík prislúchajúci amino cukru.

Na základe dosiahnutých výsledkov, derivatizačné činidlo DEEMM má uplatnenie pri separácii a stanovení zlúčenín s primárnou alebo sekundárnou amino skupinou, a tiež derivatizácia štandardov aj vzoriek je rýchla a jednoduchá.

ZÁVER

Vo vzorke krvného séra pacienta s diagnózou sklerózy multiplex sme vyvinutou metódou RP-HPLC stanovili anoméry dvoch amino cukrov, glukozamínu a galaktozamínu. Anoméry glukozamínu sme na základe metódy prídavku štandardu stanovili na koncentračných úrovniach 1,034 μg mL^{-1} a 1,704 μg mL^{-1} a anoméry galaktozamínu na koncentračných úrovniach 1,277 μg mL^{-1} a 3,343 μg mL^{-1}. Dosiahnutý limit detekcie (LOD) pre amino cukry bol 0,75 – 1,36 mg mL^{-1} a limit kvantifikácie (LOQ) bol 2,29 – 4,13 mg mL^{-1}. LOD a LOQ boli vyhodnotené z kalibračných kriviek amino cukrov pre dávkovaný objem 10 μL. Vyvinutou RP-HPLC metódou sme dokázali separovať a stanoviť amino cukry vo vzorke klinického pôvodu.

Poďakovanie

Tento príspevok je výsledkom realizácie projektu (ITMS 26240220061) podporeného OPVaV financovaného ERDF.

Acknowledgements

This contribution is the result of the project implementation (ITMS 26240220061) supported by the OPRaD funded by the ERDF.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

ANDERSON, J.W., NICOLOSI, R.J., BORZELLECA, J.F. 2005. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. In *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2005, 43, 2 [cit. 3.12. 2014]. Dostupné na internete: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691504003321. ISSN 0278-6915.

CONFIGLIACCHI, E., RAZZANO, G., RIZZO, V., et al. 2006. HPLC methods for the determination of bound and free doxorubicin, and of bound and free galactosamine, in methacrylamide polymer-drug conjugates. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2006, 15, 1 [cit. 6.12. 2014]. Dostupné na internete: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0731708596018250. ISSN 0731-7085.

COPPA, G., GALEOTTI, F., ZAMPINI, L. et al. 2011. High-throughput determination of urinary hexosamines for diagnosis of mucopolysaccharidoses by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. In *Analytical Biochemistry* [online]. 2011, 411, 1 [cit. 4.12. 2014]. Dostupné na internete: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269710007876. ISSN 0003-2697.

GUAN, Y., TIAN, Y., LI, Y. et al. 2011. Application of a liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method to a kinetic study of derivative glucosamine in healthy human urine. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2011, 55, 1 [cit. 4.12. 2014]. Dostupné na internete: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708511000379. ISSN 0731-7085.

HUBERT, C., HOUARI, S., LECOMTE, F. et al. 2010. Development and validation of a sensitive solid phase extraction/hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry method for the accurate determination of glucosamine in dog plasma. In *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, 1217, 19 [cit. 6.12. 2014]. Dostupné na www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967310000610. ISSN 0021-9673.

LI, B., ZHANG, J., BU, F., et al. 2013. Determination of chitosan with a modified acid hydrolysis and HPLC method. In *Carbohydrate Research* [online]. 2013, 366, 5 [cit. 7.12. 2014]. Dostupné na internete: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621512004624. ISSN 0008-6215.

MILJKOVIC, M. 2009. *Carbohydrates: Synthesis, Mechanisms, and Stereoelectronic Effects*. New York: Springer, 2009. 543. ISBN 978-0387922645.

OSSWALD, W.F., JEHLE, J., FIRL, J. 1995. Quantification of Fungal Infection in Plant Tissues by Determining the Glucosamine Phenylisothiocyanate Derivative Using HPLC Techniques. In *Journal of Plant Physiology* [online]. 1995, 145, 4 [cit. 5.12. 2014]. Dostupné na internete: http://www.sciencedirect.com/

science/article/pii/S0176161711817608. ISSN 0176-1617.

PERSIANI, S., ROTINI, R., TRISOLINO, G. et al. 2007. Synovial and plasma glucosamine concentrations in osteoarthritic patients following oral crystalline glucosamine sulphate at therapeutic dose. In *Osteoarthritis and Cartilage* [online]. 2007, 15, 7 [cit. 5.12. 2014]. Dostupné na internete: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458407000556. ISSN 1063-4584.

SONG, M., HANG, T-J., WANG, Ch., et al. 2012. Precolumn derivatization LC–MS/MS method for the determination and pharmacokinetic study of glucosamine in human plasma and urine. In *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2012, 2, 1 [cit. 6.12. 2014]. Dostupné na internete: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177911000293. ISSN 2095-1779.

TEKKO, I.A., BONNER, M.C., WILLIAMS, A.C. 2006. An optimized reverse-phase high performance liquid chromatographic method for evaluating percutaneous absorption of glucosamine hydrochloride. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2006, 41, 2 [cit. 6.12. 2014]. Dostupné na internete: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708505007648. ISSN 0731-7085.

VARMA, R., VARMA S.R. 1983. *Mucopolysaccharides – Glycosaminoglycans – of body fluids in health and disease*. New York: W. de Gruyler, 1983. 666. ISBN 978-3110084719.

ZHANG, L., HUANG, T., FANG, X. et al. 2006. Determination of glucosamine sulfate in human plasma by precolumn derivatization using high performance liquid chromatography with fluorescence detection: Its application to a bioequivalence study. In *Journal of Chromatography B* [online]. 2006, 842, 1 [cit. 3.12. 2014]. Dostupné na internete: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023206003801. ISSN 1570-0232.

ZHONG, S., ZHONG, D. CHEN, D. 2007. Improved and simplified liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized glucosamine in human plasma. In *Journal of Chromatography* B [online]. 2007, 854 1-2 [cit. 5.12. 2014]. Dostupné na internete: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023207003406. ISSN 1570-0232.

ZHU, X., CAI, J., YANG, J. et al. 2005. Determination of glucosamine in impure chitin samples byhigh-performance liquid chromatography. In *Carbohydrate Research* [online]. 2005, 340, 10 [cit. 3.12. 2014]. Dostupné na internete: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621505002144. ISSN 0008-6215.

ZUBAY, G., PARSON, W., VANCE, D. 1995. *Principles of Biochemistry*. Dubuque: William C Brown Pub, 1995. 989. ISBN 0-697-24171-8.

ŠTÚDIUM SEPARÁCIE ĽUDSKÉHO INZULÍNU A INZULÍNOVÝCH ANALÓGOV V SYSTÉME RP-HPLC

STUDY OF RETENTION OF HUMAN INSULIN AND ITS RECOMBINANT ANALOGUES IN RP-HPLC

KOMOROWSKA Veronika, HUTTA Milan

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Bratislava

ABSTRAKT
Za účelom zlepšenia terapie diabetu boli vyvinuté viaceré syntetické analógy ľudského inzulínu. Tieto analógy sa líšia v sekvencii aminokyselín len mierne, čo je veľkou výzvou pre analytickú chémiu. V predkladanej práci bol študovaný vplyv vybraných termodynamických a kinetických faktorov separácie ľudského inzulínu a jeho štyroch syntetických rekombinantných analógov v systéme RP-HPLC s rýchlou spektrofotometrickou detekciou (DAD).

Kľúčové slová: ľudský inzulín. Inzulínové analógy. Proteíny. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na obrátených fázach.

ABSTRACT
For improvement of therapy of diabetes were developed some synthetic analogues of human insulin. These analogues differ only slightly in the amino acid sequence, what is a great challenge for analytical chemistry. Within this work were examined some selected thermodynamic and kinetic factors of separation of human insulin and it´s four synthetic recombinant analogues in RP-HPLC system.

Key words: human insulin. Insulin analogues. Proteins. Reverse phase high performance liquid chromatography.

ÚVOD

Diabetes mellitus je choroba, ktorá v súčasnosti postihuje až 5% svetovej populácie. Hoci bola táto choroba známa už pred našim letopočtom, prvé úspešné liečebné postupy vznikli až v neskorom novoveku objavom inzulínu v roku 1921 kanadským chirurgom Frederickom Bantingom a jeho študentom Charlesom Herbertom Bestom. Inzulín bol prvým sekvenovaným proteínovým hormónom, prvou látkou stanovovanou pomocou rádioimunologickej analýzy a tiež prvou zlúčeninou produkovanou rekombinantnou DNA technológiou pre praktické použitie (Sacks, 2006).

Ľudský inzulín a jeho rôzne suspenzie s protamínom a zinočnatými katiónmi ako varianty s dlhotrvajúcejším účinkom, majú obmedzený farmakokinetický profil, kvôli čomu nie je možné ich podaním dosiahnuť optimálnu simuláciu kontroly glykémie ako u fyziologických procesov zdravých ľudí, čo je nevyhnutné pre zníženie výskytu a progresie rôznych zdravotných komplikácií spojených s cukrovkou ako sú neuropatia, nefropatia a retinopatia. Lepšie možnosti kontroly glykémie ponúkajú rôzne inzulínové analógy, produkované DNA rekombinantnými technikami, ktoré majú rozšírené farmakokinetické profily a možnosti režimov, vďaka ktorým je možné verne napodobniť fyziológiu ľudského tela. Prvým schváleným inzulínovým analógom sa v júli 1996 stal lispro (http://www.orion-group.net/journals/Journals/vol28_01_September2007/498.htm). Rôzne firmy rýchlo vyvinuli ďalšie inzulínové analógy a v súčasnosti je schválených celkom 5 druhov inzulínových analógov.

Z hľadiska analytickej chémie je potrebný vývoj nových metód na stanovenie ľudského inzulínu a jeho syntetických analógov v rôznych matriciach a zmesiach z viacerých aplikačných hľadísk. Okrem analýzy týchto proteínových hormónov vo farmaceutických produktoch za účelom kontroly kvality, je ich stanovenie v rôznych telesných tekutinách potrebné tiež na účely kriminalistické (forenzné), klinické a v posledných rokoch aj pre účely dopingovej kontroly (Haunschmidt et al., 2010). Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) je popri imunochemických metódach a kapilárnej elektroforéze najpoužívanejšou metódou na analýzu inzulínu a inzulínových analógov, a to vo všetkých dostupných matriciach vzoriek (Ho et al., 2008; Ojanpera et al., 2013; Moein, Javanbakht and Akbari-Adergani, 2014; Hess et al., 2012; Van Uyfanghe et al., 2007).

V predkladanej práci sme sa venovali štúdiu vybraných kinetických a termodynamických aspektov separácie ľudského inzulínu a dostupných inzulínových analógov. Práca bola tiež zameraná na vývoj novej metódy vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie na báze obrátených fáz (RP-HPLC) vhodnej na separáciu daných proteínových látok.

MATERIÁLY A METÓDY

Prístroje a zariadenia

Na skúmanie možností separovať a detegovať vybrané analyty bol využitý HPLC systém od Agilent Technologies, ktorý pozostával z nasledujúcich modulov: vákuový odplyňovač mobilných fáz (G1379B), dvojkanálová vysokotlaková binárna pumpa (G1312B), automatický dávkovač (G1329B), kolónový termostat (G1316B), detektor DAD (G1315), vyhodnocovací program Agilent ChemStation.

Súčasťou systému bola kolóna Zorbax 300SB-C18 (dĺžka kolóny 150 mm; 4,6 mm vnútorný priemer; 5µm sférické častice; priemer pórov 30 nm).

Roztoky a chemikálie

Ultračistá voda Simplicity (Molsheim, Francúzko), kyselina mravčia 98-100% p.a., acetonitril (ACN) 99,9% p.a., metanol (MeOH) 99-100% p.a., vodný roztok amoniaku 28-30% p.a., (všetko Merck, Darmstadt, Nemecko), m-krezol, etanol (EtOH) spektrofotometricky čistý (Lachema, Brno, Česká republika), ľudský inzulín pod komerčným názvom Insuman rapid, inzulínový analóg glulizín pod komerčným názvom Apidra, inzulínový analóg glargín pod komerčným názvom Lantus Solostar (Sanofi, Paríž, Francúzsko), inzulínový analóg aspart pod komerčným názvom Novomix 30 (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dánsko), inzulínový analóg lispro pod komerčným názvom Humalog Mix 25 (Eli Lilly, Indianapolis, USA).

Príprava roztoku vzorky

Vzorka ľudského inzulínu a inzulínových analógov bola pripravená zriedením komerčného roztoku v adekvátnom objeme ultračistej vody na 0,01 %-nú koncentráciu (w/w).

Príprava mobilnej fázy

Mobilná fáza A pozostávala z tlmivého roztoku kyselina mravčia/mravčan amónny (pH 3,0). Tlmivý roztok bol pripravený z 1litra ultračistej vody, do ktorého bola zriedená kyselina mravčia na látkovú koncentráciu 50 $mmol \cdot l^{-1}$. Následne sa pomocou pH metra s kombinovanou sklenou/chloridostriebornou elektródou titroval roztok kyseliny roztokom amoniaku na požadovanú hodnotu pH.

Mobilná fáza B pozostávala z ACN resp. MeOH alebo EtOH a vody v pomere 90/10. K mobilnej fáze B bol pridaný taký objem kyseliny mravčej a roztoku amoniaku, aký sa spotreboval na prípravu mobilnej fázy A.

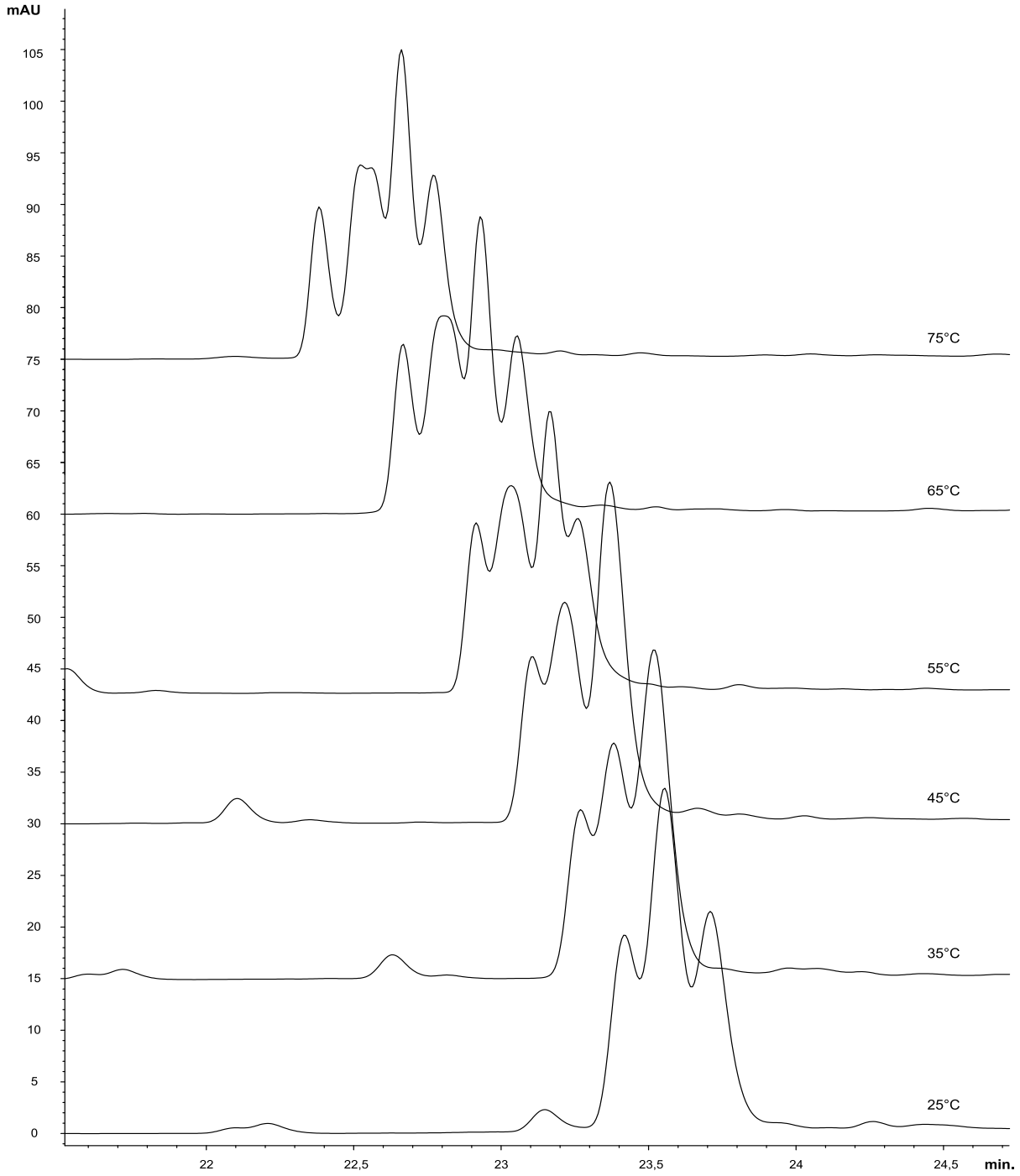
VÝSLEDKY

Štúdium vplyvu teploty a typu organického modifikátora mobilnej fázy na termodynamiku a kinetiku separácie ľudského inzulínu a dostupných inzulínových analógov

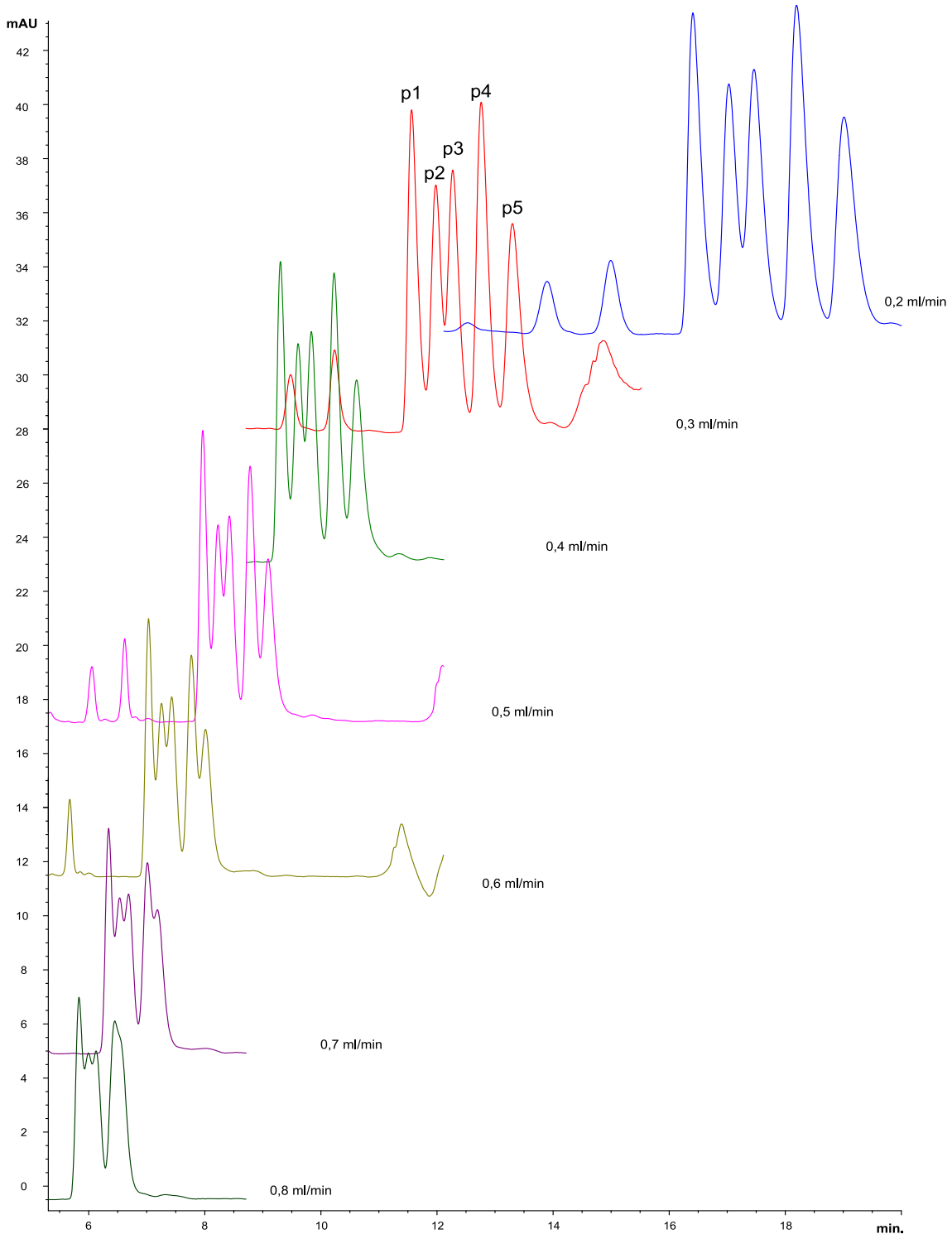
Na štúdium boli zvolené teploty od 25°C do 75°C a tri rôzne organické modifikátory mobilnej fázy [acetonitril (ACN), metanol (MeOH) a etanol (EtOH)]. Z nameraných údajov sa zistilo, že zloženie mobilnej fázy má značný vplyv na retenčné správanie sa skúmanej látky pri rôznych teplotách. Pri separácii s mobilnou fázou obsahujúcou ACN dochádza so zvyšovaním teploty kolóny k zvýšeniu retencie ľudského inzulínu ako aj všetkých skúmaných inzulínových analógov. Pri použití MeOH a EtOH, ale retencia daných látok so stúpajúcou teplotou klesala (tabuľka 1).

Tabuľka 1 Retenčné charakteristiky ľudského inzulínu a inzulínových analógov vo vybraných rozpúšťadlách pri najnižšej a najvyššej použitej teplote kolóny

látka	t (°C)	ACN			MeOH			EtOH		
		t_R (min.)	Max. zmena retencie (min.)	k	t_R (min.)	Max. zmena retencie (min.)	k	t_R (min.)	Max. zmena retencie (min.)	k
lispro	25	14,87	0,82	8,59	23,57	0,97	14,21	16,88	0,67	9,89
	75	15,69		9,12	22,60		13,58	16,21		9,46
aspart	25	14,89	0,75	8,61	23,55	1,02	14,19	16,85	0,69	9,87
	75	15,64		9,09	22,53		13,53	16,16		9,42
ľudský inzulín	25	14,98	0,75	8,66	23,71	1,04	14,30	16,98	0,70	9,95
	75	15,73		9,15	22,67		13,63	16,28		9,51
glargín	25	14,77	0,65	8,53	23,43	1,03	14,12	16,76	0,77	9,81
	75	15,42		8,95	22,40		13,45	15,99		9,32
glulizín	25	14,98	0,84	8,66	23,60	0,81	14,23	16,81	0,42	9,85
	75	15,82		9,20	22,79		13,70	16,40		9,58



Obrázok 1 Porovnanie chromatogramov zmesi pozostávajúcej z ľudského inzulínu a štyroch inzulínových analógov získaných pri rôznych teplotách kolóny v mobilnej fáze s MeOH. Chromatografická kolóna Zorbax 300SB-C18 vyhrievaná na pracovnú teplotu (25, 35, 45, 55, 65 a 75 °C), injektovaný objem roztoku vzorky 50 µl, mobilná fáza A: 50mM kyselina mravčia a mravčan amónny (pH 3,0), mobilná fáza B: MeOH/H_2O (90:10,V/V) + 50 mM kyselina mravčia a mravčan amónny, gradient pri prietoku 0,5 ml·min $^{-1}$, UV detekcia pri 280 nm, program gradientu: 2 min. izokratická elúcia s 5% B v A, od 2.-25. min. lineárny vzostup z 5% B v A na 100% B, nasledovala 3 min. izokratická elúcia so 100% B, od 28.-29. min. lineárny pokles zo 100 % B na 5% B v A, nasledovala 11 min. izokratická elúcia s 5 % B v A.



Obrázok 2 Porovnanie chromatogramov zmesi pozostávajúcej z ľudského inzulínu a štyroch inzulínových analógov získaných pri použití rôznych rýchlostí prietoku mobilnej fázy cez kolónu (0,8- 0,2 ml·min^{-1}). Identifikácia píkov: p1- glargín, p2- aspart, p3- lispro, p4- ľudský inzulín, p5- glulizín. Chromatografická kolóna Zorbax 300SB-C18 vyhrievaná na pracovnú teplotu 65 °C, injektovaný objem roztoku vzorky 50 µl, mobilná fáza A: 50 mM kyselina mravčia/ mravčan amónny (pH 3), mobilná fáza B: MeOH/H_2O (90:10,V/V) + 50 kyselina mravčia a mravčan amónny, 96 s izokratická elúcia so 60% B v A nasledovaná izokratickou elúciou so 65% B v A, prietok (0,8- 0,2 ml·min $^{-1}$), UV detekcia pri 280 nm.

Maximálna zmena retencie ľudského inzulínu a inzulínových analógov vypočítaná ako rozdiel retencie pri najnižšej a najvyššej skúmanej teplote predstavuje na chromatografickom zázname maximálne jednu minútu vo všetkých použitých rozpúšťadlách (tabuľka 1).

Podľa literatúry (Chen, Mant, Hodges; 2003) denaturácia vyvolaná zvýšením teploty počas RP-HPLC separácie vedie k značným zmenám separačnej selektivity. Zmenu selektivity separácie so zvýšením teploty sme pozorovali pri všetkých nami použitých organických modifikátoroch mobilnej fázy. So zvyšovaním teploty dochádzalo spravidla k zvýšeniu selektivity separácie ľudského inzulínu a inzulínových analógov (obrázok 1).

Z nameraných údajov (nie sú v práci uvedené) vyplýva, že plocha píkov žiadneho z analytov sa s rastúcou teplotou nemení ani pri jednom z použitých organických modifikátorov mobilnej fázy. So zvyšovaním teploty kolóny sa však zvyšuje výška píkov analytov, z čoho je zrejmé, že teplota má vplyv na účinnosť separácie daných látok.

Štúdium vplyvu rýchlosti prietoku mobilnej fázy cez kolónu na termodynamiku a kinetiku separácie

Podľa predpokladu, so znížením rýchlosti prietoku mobilnej fázy cez kolónu sa znížila účinnosť transportu analytov, ale zároveň sa zvýšila selektivita separácie, a tým aj rozlíšenie proteínových látok (obrázok 2). Zo skúmaných rýchlostí prietoku mobilnej fázy sa ako optimálna javí rýchlosť 0,3 $ml \cdot min^{-1}$, pretože pri tejto rýchlosti je rozlíšenie píkov najlepšie vzhľadom na zachovanie dostatočnej účinnosti transportu analytov, ktorá sa už pri nižších rýchlostiach prietoku nedosahuje. Nevýhodou takejto relatívne malej rýchlosti prietoku mobilnej fázy je potreba dlhšieho času separácie, ktorý je pri tejto rýchlosti prietoku a daných chromatografických podmienkach 14 minút.

Štúdium vplyvu iónovej sily pH tlmivých látok mobilnej fázy na termodynamiku separácie inzulínov a ich analógov

Z nameraných údajov sme zistili, že pri separácii v RP-HPLC má iónová sila zložiek mobilnej fázy značný vplyv na retenciu a selektivitu separácie proteínových látok (inzulínov). So zvyšovaním iónovej sily zložiek mobilnej fázy dochádza k zvyšovaniu ich retencie, čo môže byť spôsobené vysoľovaním a tiež tým, že s vyššou iónovou silou mobilnej fázy je lepšie potlačená ionizácia ionizovateľných skupín proteínu, a tým znížená molekulová solvatácia, vďaka čomu môžu hydrofóbne časti proteínu silnejšie interagovať so stacionárnou fázou.

Selektivita separácie proteínových látok je iónovou silou tlmivých látok tiež značne ovplyvnená . Zvýšením koncentrácie kyseliny mravčej v mobilnej fáze z 25 mM na 50 mM sa zlepšilo rozlíšenie inzulínového analógu aspart a lispro. Ďalšie zvýšenie koncentrácie kyseliny z 50 mM na 75 mM viedlo k zhoršeniu rozlíšenia prvých troch píkov (inzulínové analógy glargín, aspart, lispro). Zmena iónovej sily tlmivých zložiek mobilnej fázy v skúmanom intervale hodnôt nespôsobovala zmenu poradia eluovaných látok.

ZÁVER

V experimentálnej časti sme sa venovali štúdiu vplyvu vybraných chromatografických parametrov na kinetiku a termodynamiku separácie ľudského inzulínu a dostupných inzulínových analógov v systéme RP-HPLC.

Zmenu selektivity separácie ľudského inzulínu a dostupných inzulínových analógov sme pozorovali so zvýšením teploty pri všetkých nami použitých organických modifikátoroch mobilnej fázy. So zvyšovaním teploty dochádzalo spravidla k zvýšeniu selektivity separácie daných látok. Z použitých organických modifikátorov mobilnej fázy bol vzhľadom na selektivitu separácie najvhodnejší metanol. Zmena rýchlosti prietoku mobilnej fázy cez kolónu a iónová sila mobilnej fázy mali na selektivitu separácie daných proteínových látok tiež značný vplyv. Znižovaním rýchlosti prietoku mobilnej fázy sa selektivita zvyšovala. Iónová sila mobilnej fázy vykazovala vzhľadom na selektivitu separácie proteínových analytov optimálnu hodnotu v strede skúmaného intervalu hodnôt. Zmena vyššie spomenutých chromatografických parametrov nespôsobovala zmenu vzájomného poradia elúcie ľudského inzulínu a inzulínových analógov ani pri jednom študovanom parametri.

Najlepšie rozlíšenie ľudského inzulínu a všetkých štyroch dostupných inzulínových analógov ako analytov sme dosiahli za optimalizovaných podmienok, ktoré predstavovala izokratická elúcia za zvýšenej teploty kolóny na 65°C a použitia metanolu ako organického modifikátora mobilnej fázy, ktorá mala iónovú silu s hodnotou 50 mM, pričom

bola nastavená relatívne malá rýchlosť prietoku mobilnej fázy cez kolónu a to 0,3 ml·min^{-1}.

Poďakovanie
Práca bola finančne podporená projektom APVV-0583-11 a projektom ŠF EU Priemyselný výskum nových liečiv na báze rekombinantných proteínov ITMS: 26240220034.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

HAUNSCHMIDT M. et al. 2010. Investigations on the migration behavior of insulin and related synthetic analogues in CZE, MEKC and MEEKC employing different surfactants. In: *Electrophoresis*, 2010, 31(9): 1560-1564.

HESS C. et al. 2012. Simultaneous determination and validated quantification of human insulin and its synthetic analogues in human blood serum by immunoaffinity purification and liquid chromatography-mass spektrometry. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 404(6-7):1813-1822.

HO E.N. et al. 2008. Doping control analysis of insulin and its analogues in equine plasma by liquid chromatography-tandem mass spektrometry. In: *Journal of Chromatography A*, 2008, 1201(2): 183-190.

CHEN Y., MANT C.T. and HODGES R.S. 2003. Temperature selectivity effects in reversed-phase liquid chromatography due to conformation differences between helical and non-helical peptides. In: *Journal of Chromatography A*, 2003, 1010(1): 45-61.

MOEIN M. M., JAVANBAKHT M. and AKBARI-ADERGANI B. 2014. Molecularly imprinted polymer cartridges coupled on-line with high performance liquid chromatography for simple and rapid analysis of human insulin in plasma and pharmaceutical formulation. In: *Talanta*, 2014, 121:30-36.

OJANPERA I. et al. 2013. Post-mortem vitreous humour as potential specimen for detection of insulin analogues by LC-MS/MS. In: *Forensic Science International*, 2013, 233(1-3): 328-332.

SACKS D.B. 2006. *Carbohydrates;* In Burtis C.A., Ashwod E.R. and Bruns D.E. *Clinical chemistry and molecular diagnostics*. Philadelphia, Elsevier Saunders, pp. 843-853, ISSN/ISBN 0-7216-0189-8.

VAN UYFANGHE K. et al. 2007. New liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry measurement procedure for quantitative analysis of human insulin in serum. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, 21(5): 819-821.

Internetové zdroje

http://www.orion-group.net/journals/Journals/vol28_01_September2007/498.htm (k dátumu 07. 08. 2014).

SEPARÁCIA KLINICKY VÝZNAMNÝCH ĽUDSKÝCH HEMOGLOBÍNOV V SYSTÉME VYSOKOÚČINNEJ IÓNOVO-VÝMENNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE A PROBLÉMY S ŇOU SÚVISIACE

SEPARATION OF CLINICALLY SIGNIFICANT HUMAN HEMOGLOBINS IN HIGH PERFORMANCE ION-EXCHANGE LIQUID CHROMATOGRAPHY SYSTEM AND A RELEVANT ISSUES

KOMOROWSKA Veronika[1], BOŽEK Peter[1,2], FÁBRYOVÁ Viera[2], NETRIOVÁ Jana[2,3], HUTTA Milan[1]

[1] *Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Bratislava*
[2] *Nemocnica sv. Michala a.s., Bratislava*
[3] *Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín*

ABSTRAKT
Predložená práca sa zaoberá separáciou klinicky významných hemoglobínov pomocou vysokoúčinnej iónovo-výmennej kvapalinovej chromatografie. Analyzované boli vzorky krvi zdravých ľudí a pacientov s talassémiou. Na chromatogramoch bolo možné pri týchto vzorkách pozorovať zmenu percentuálneho podielu hemoglobínov HbA, HbF a HbA_2 hemoglobínov oproti krvi zdravých ľudí. Pri skúmaní opakovateľnosti separácie boli identifikované viaceré problémy, ktoré sú v práci diskutované a riešené.

Kľúčové slová: Ľudský hemoglobín. Talassémia. Vysokoúčinná iónovo-výmenná chromatografia.

ABSTRACT
This work was primarily focused on separation of clinically significant hemoglobins by high performance ion-exchange liquid chromatography. For the study were used blood samples of patients with thalassemia and blood samples of healthy people. It was observed, that the percentage of normalized peak area of hemoglobins HbA, HbF and HbA_2 vary compared to the blood of healthy people. There were identified several problems by examining repeatability of separation, which are discussed and addressed at work .

Keywords: Human hemoglobin. Thalassemia. High performance ion-exchange liquid chromatography.

ÚVOD

Ľudské hemoglobíny sú tetramérne metaloproteíny s nekovalentne naviazaným hemom, ktorých 4 polypeptidové reťazce sú konvenčne označované ako α, β, γ a δ reťazec. Červené krvinky dospelého zdravého jedinca obsahujú približne: 92% (V/V) hemoglobínu A (α,β), 3% (V/V) hemoglobínu A_2 (α, δ), 1% (V/V) fetálneho hemoglobínu F (α, γ) a 4% (V/V) glykovaných a acetylovaných hemoglobínov (Higgins 2006).

Medzi geneticky podmienené poruchy tvorby hemoglobínu patria talassémie, ktorých príčinou je nedostatočná syntéza α alebo β globínových reťazcov. Ďalšou skupinou geneticky podmienených porúch tvorby hemoglobínu sú hemoglobínopatie, ktoré vznikajú ako dôsledok mutácií v globínových génoch, ktoré podmieňujú substitúcie v primárnej štruktúre globínových reťazcov a tvorbu abnormálnych druhov hemoglobínov (hemoglobín S, C a ďalších viac ako 1000 štrukturálnych variant). Abnormálne hemoglobíny sa však na Slovensku vyskytujú veľmi vzácne (Fábryová et al., 2014; Perrine, Pace and Faller , 2014; Kósa et al., 2012).

Stanovenie hemoglobínu A_2 a F má zásadnú informačnú hodnotu pre diferenciálnu diagnostiku najčastejšej dedičnej anémie - talassémie. Správna diagnóza týchto typov anémie je obzvlášť dôležitá kvôli vylúčeniu nevhodnej medikamentóznej liečby a kvôli prenatálnej prevencii. Vzhľadom na nízke koncentrácie oboch minoritných hemoglobínov, ich správne a presné stanovenie umožňujú len elektroforetické a chromatografické separačné metódy. Aj keď na separáciu a stanovenie hemoglobínu existuje niekoľko komerčných HPLC prístrojov a prístrojov pre kapilárnu elektroforézu, ich separácia nie je optimálna (Merono et al., 2011; Gosselin, Carlin and Dwyre, 2011; Winichagoon et al., 2002).

Predložená práca sa zaoberá separáciou klinicky významných hemoglobínov pomocou vysokoúčinnej iónovo-výmennej kvapalinovej chromatografie a popísaním a riešením rôznych problémov v súvislosti s použitím nižšie uvedených separačných podmienok.

MATERIÁLY A METÓDY

Prístroje a zariadenia

Na analýzu sa použil HPLC systém od Agilent Technologies, ktorý pozostával z nasledujúcich modulov: vákuový odplyňovač mobilných fáz

(G1379B), dvojkanálová vysokotlaková binárna pumpa (G1312B), automatický dávkovač (G1329B), kolónový termostat (G1316B), detektor DAD (G1315), vyhodnocovací program Agilent ChemStation. Súčasťou systému bola kolóna: PolyLC (dĺžka kolóny 50 mm, veľkosť častíc 5µm; vnútorný priemer 4,6 mm; veľkosť pórov 100 nm; PolyLC Inc.; Columbia; USA).

Roztoky a chemikálie

HCl 37% (V/V) a KCN od Merck (Darmstadt, Nemecko), NaCl a Bis-tris od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) všetko v analytickej čistote. $KMnO_4$ a EDTA od Lachema (Brno, Česká republika). Vzorky krvi zdravých ľudí a pacientov s geneticky potvrdenou talassémiou boli odobrané a dodané z Nemocnice sv. Michala a.s. (Bratislava, Slovenská republika). Všetky vodné roztoky boli riedené ultračistou vodou produkovanou zariadením Millipore Simplicity (Molsheim, Francúzsko).

Príprava roztoku vzorky

Krv sa odobrala do skúmaviek obsahujúcich chelatonát draselný ako antikoagulans. Následne sa centrifugovala pri 13400 otáčkach za minútu po dobu 10 minút. Precipitát sa ďalej čistil fyziologickým roztokom. Fyziologický roztok s červenými krvinkami sa pretrepal a opäť centrifugoval pri 13400 otáčkach za minútu po dobu 10 minút. Purifikácia s fyziologickým roztokom sa opakovala dvakrát. Následne sa precipitát červených krviniek o objeme 100 µl nechal hemolyzovať v 300 µl ultračistej vody po dobu 15 minút. Nakoniec sa hemolyzát prefiltroval cez 0,22 µm mikrofilter a injektoval na kolónu.

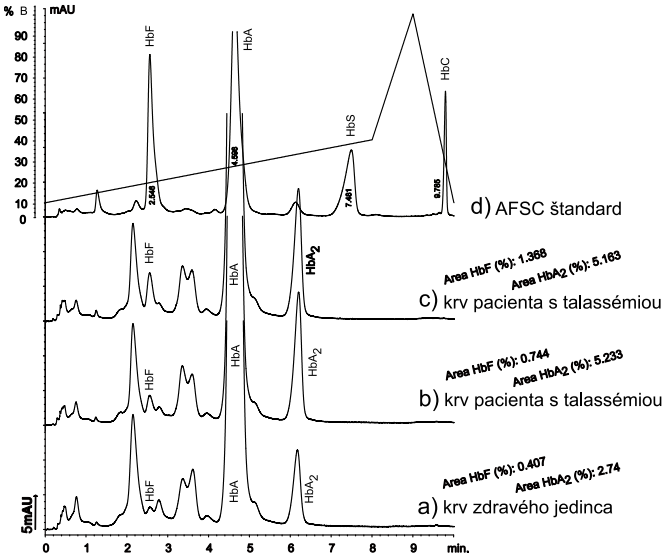
VÝSLEDKY

Separácia hemoglobínov vo vzorkách krvi dospelých zdravých jedincov a pacientov s geneticky potvrdenou talassémiou

Vzorky krvi pacientov s talassémiou vykazujú v porovnaní s krvou zdravých jedincov vyšší plošný percentuálny obsah HbA_2 a HbF, zatiaľ čo množstvo HbA je menšie (obrázok 1 a tabuľka 1). Táto skutočnosť je spôsobená nedostatočnou syntézou β-globínových reťazcov (pri β-thalassémii), čo vedie k zvýšenej produkcii takých hemoglobínov, ktorých štruktúra neobsahuje β-globínové reťazce. Nárast podielu HbA_2 a HbF v krvi je pri jednotlivých pacientoch rozdielny. Napríklad na chromatograme b na obrázku 1 je vidieť, že nad normu je zvýšený iba podiel HbA_2 (viac ako 3 percentá), zatiaľ čo podiel HbF je nor-málny (do 1 percenta). Na chromatograme c, ktorý predstavuje separáciu hemoglobínov vo vzorke krvi iného pacienta, sú už množstvá oboch spomínaných hemoglobínov zvýšené nad limit.

Tabuľka 1 Plošný percentuálny obsah klinicky významných hemoglobínov v niektorých meraných vzorkách krvi

Vzorky krvi zdravých jedincov		Vzorky krvi pacientov s talassémiou	
HbF (%)	**HbA_2 (%)**	**HbF (%)**	**HbA_2 (%)**
0,5	2,0	2,0	4,7
0,5	2,8	1,3	4,5
0,4	1,9	2,8	4
0,3	2,9	1,4	4,8
0,4	2,3	3,4	5,6
0,9	2,5	0,7	2,8
0,7	1,9	0,9	5,1
0,7	2,3	8,2	2,4
0,9	2,7	2,3	5,1
1,1	2,7	2,1	4,3



Obrázok 1 Chromatogramy zo separácie vzoriek krvi zdravého jedinca a pacientov s talassémiou. Chromatografická kolóna PolyLC (dĺžka kolóny 50 mm, veľkosť častíc 5µm; vnútorný priemer 4,6 mm; veľkosť pórov 100 nm); mobilná fáza A: pH 6,96; 20mM Bis-Tris, 2mM KCN; mobilná fáza B: pH 6,65; 20mM Bis-Tris, 2mM KCN, 200mM NaCl, gradient pri prietoku 1,7 ml min^{-1}; injektovaný objem 8 µl, UV detekcia pri 210 nm.

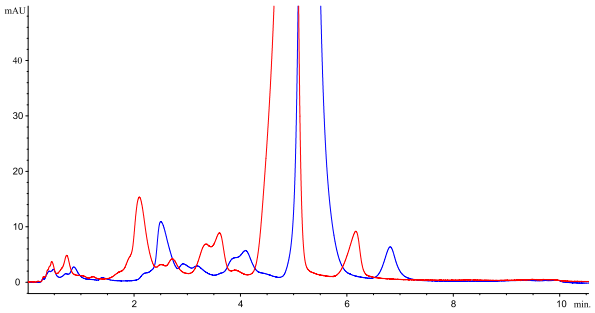
Problém s opakovateľnosťou retenčných časov analytov

Pri skúmaní opakovateľnosti separácie alebo opakovateľnosti retenčných časov analytov boli identifikované problémy súvisiace s ťažko dosiahnuteľnou opakovateľnosťou prípravy najmä mobilnej fázy A, kvôli jej nedostatočnej iónovej sile, ktorá nezabezpečovala ustálenie rovnováhy na pH elektróde. Nedostatočná opakovateľnosť pH mobilnej fázy A spôsobovala posun retenčných časov analytov (obrázok 2). Odchýlka v príprave pH mobilnej fázy však nebola natoľko významná, aby sa prejavila na zmene selektivity separácie. Preto bolo možné vykonať identifikáciu jednotlivých analytov cez relatívnu retenciu analytov voči hlavnému píku, ktorý predstavoval hemoglobín A. Výhodou takéhoto postupu pri identifikácii analytov je, že nie je potrebné pri každej separácii vzorky krvi, ktorá je vykonaná pomocou čerstvo pripravenej mobilnej fázy, separovať aj štandardnú zmes hemoglobínov, čo by bolo časovo a ekonomicky náročné.

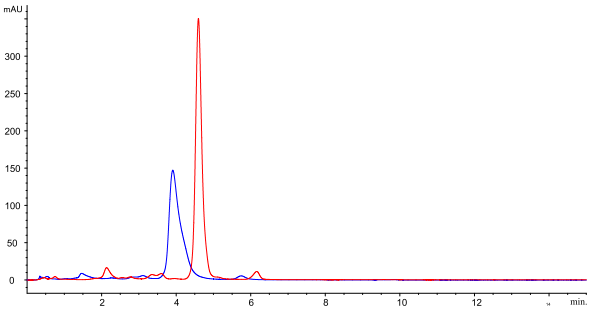
Problém so znižovaním symetrie píkov a účinnosti chromatografickej kolóny

Symetria píkov, účinnosť transportu analytov v kolóne a tým aj reprodukovateľnosť meraní bola po určitom čase negatívne ovplyvnená sorpciou katiónov železa v chromatografickom systéme. Negatívne vplyvy sa prejavili po troch dňoch meraní na kolóne bez prepláchnutia roztokom EDTA (obrázok 3).

Po premytí celého systému 40 mmol·dm^{-3} roztokom EDTA sa symetria píkov a účinnosť separácie vrátila do normálneho stavu.



Obrázok 2 Chromatogramy vzoriek krvi namerané pomocou mobilných fáz pripravených v rôznych dňoch. Chromatografické podmienky viď. obrázok 1.



Obrázok 3 Chromatogram vzorky krvi (červený) a chromatogram nameraný po troch dňoch (modrý) na rovnakej kolóne s rovnakou mobilnou fázou. Chromatografické podmienky viď. obrázok 1.

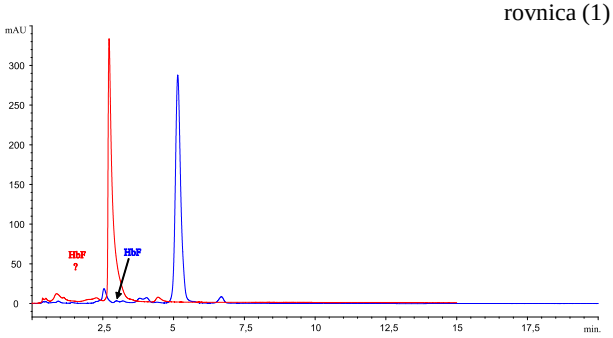
Pravidelné premývanie chromatografického systému roztokom EDTA zabezpečovalo obnovenie účinnosti kolóny približne po dosiahnutí 250 analýz, čo predstavuje štvrtinu z celkového počtu nástrekov (analýz), na ktoré deklaroval výrobca kolóny jej stabilitu. Po prekročení uvedeného počtu analýz klesla účinnosť kolóny natoľko, že nebolo možné separovať HbF od ostatných hemoglobínov (obrázok 4).

Problém s toxicitou mobilnej fázy

Mobilná fáza bola na analýzu hemoglobínov modifikovaná prídavkom KCN. Keďže je táto látka silne toxická látka (akútna toxicita LD_{50} je odhadovaná na 2 - 3,3 mg/kg telesnej hmotnosti perorálne), je vhodné odpad zo separácie zhromažďovať a zneškodňovať túto látku, pretože je nebezpečná pre životné prostredie. KCN je možné jednoducho oxidovať pomocou $KMnO_4$ na KOCN (viď. rovnica 1).

$$2\ KMnO_4 + 3\ KCN + H_2O \rightarrow 2\ MnO_2 + 2\ KOH + 3\ KOCN$$

rovnica (1)



Obrázok 4 Porovnanie chromatogramov vzorky krvi pri nízkom počte analýz na danej kolóne (modrý chromatogram) a po prekročení 200 analýz (červený chromatogram). Chromatografické podmienky viď. obrázok 1.

Kyanatan draselný je takmer 215-krát menej toxický ako KCN [LD_{50} je odhadovaná na 567 mg/kg telesnej hmotnosti perorálne (internetové zdroje)]. Zneškodnenie odpadu sa realizuje jednoducho pridaním nadbytku $KMnO_4$ do odpadovej nádoby v ktorej sa zbiera odpad z HPLC analýzy.

ZÁVER

Použitou HPLC metódou sa dosiahlo lepšie rozlíšenie HbA_2 a HbF ako pri komerčných HPLC automatických analyzátoroch (BioRad, Tosoh), a zároveň táto metóda dáva možnosť ďalej optimalizovať separačné podmienky a zlepšiť rozlíšenie hlavne pre HbF. Jej zavedenie bude vyžadovať ďalšie štúdie optimalizácie separačného procesu a definovanie predanalytickej fázy.

Poďakovanie

Práca bola finančne podporená projektom APVV-0583 -11 a dopytovo orientovaným projektom ITMS 26240220061.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

FÁBRYOVÁ V. et al. 2014. In *Interná medicína*, 2014, 1: 6-11.

GOSSELIN R. C., CARLIN A. C. and DWYRE D. M. 2011. Comparison of the BioRad Variant and Primus Ultra2 high-pressure liquid chromatography (HPLC) instruments for the detection of variant hemoglobins. In: *Internatioal Journal of Laboratory Hematology,* 2011, 33(2): 159-167.

HIGGINS T., BEUTLER E., DOUMAS B.T. 2006. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (Ed) *Clinical chemistry and molecular diagnostics*, Philadelphia, Elsevier Saunders, s. 1165-120, ISSN/ISBN 0-7216-0189-8.

KÓSA Z. et al. 2012. Decreased blood catalase activity is not related to specific beta-thalassemia mutations in Hungary. In: *Internatioal Journal of Laboratory Hematology,* 2012, 34(2): 172-178.

MERONO F. et al. 2011. Analytical evaluation of the Tosoh HLC-723 G8 automated HPLC analyzer for hemoglobin analysis in beta-thalassemia mode. In: *Clinical Biochemistry*, 2011, 44(5-6): 441-443.

PERRINE S.P., PACE B.S. and FALLER D. V. 2014. Targeted Fetal Hemoglobin Induction for Treatment of Beta Hemoglobinopathies. In: *Hematology / Oncology Clinics of North America*, 2014, 28(2): 233–248.

WINICHAGOON P. et al. 2002. Application of automated HPLC in prenatal diagnosis of Thalassemia. In: *Laboratory Hematology*, 2002, 8(1): 29-35.

Internetové zdroje

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=MFCD00011411&interface=MDL%20No.&N=0&mode=partialmax&lang=en&region=SK&focus=product

SEPARÁCIA PURÍNOV HYDROFÍLNE INTERAKČNOU CHROMATOGRAFIOU
SEPARATION OF PURINES BY HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY

SCHREIBER Ľ. [1], NAGYOVÁ A.[1], MARRERO S. C.[2], HALKO R.[1]

[1] *Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzity Komenského v Bratislave, Slovenská republika*
[2] *Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, University of Alicante, Spain*

ABSTRAKT
Puríny sú základné jednotky nukleových kyselín a tieto látky sa zúčastňujú mnohých biologických procesov v ľudskom organizme. Pre ich separáciu a stanovenie bolo vyvinutých viacero vysokoúčinných separačných analytických metód ako napríklad: kapilárna elektroforéza (CE), plynová chromatografia (GC) a kvapalinová chromatografia (LC). V LC metóde prevažuje prístup separácie purínov na rozdeľovacom zákone s využitím reverzne-fázových stacionárnych fáz (RP-LC). Alternatívou k RP-LC môže byť hydrofilne interakčná chromatografia (HILIC), ktorá je vhodná na separáciou veľmi polárnych zlúčenín za použitia mobilných fáz o rovnakom zložení ako v RP-LC. Cieľom tejto práce bolo vyvinúť lacnú, rýchlu a spoľahlivú analytickú metódu pre simultánnu separáciu zmesi deviatich vybraných purínov: kofeín, teobromín, purín, adenín, hypoxantín, xantín, guanín, isoguanín a kyselina močová. Pre tento účel bola vybraná zwitteriónová HILIC stacionárna fáza. Separácia všetkých purínov bola uskutočnená do 18 minút. Nami vyvinutá metóda môže byť použitá na stanovenie purínov v biologických vzorkách s využitím spektrofotometrickej detekcie v UV oblasti alebo hmotnostnej spektrometrie.

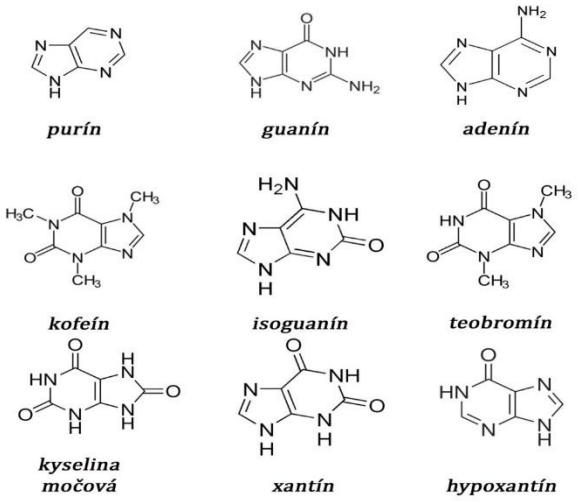
Kľúčové slová: Puríny. Separácia. Kvapalinová chromatografia. Hydrofilné interakcie.

ABSTRACT
Purines are the basic units of nucleic acids and these compounds are involved in a variety of biochemical processes. A number of high performance separation methods have been developed for separation and determination of purines, including capillary electrophoresis (CE), gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC). The LC method approach prevails separation of purines using reversed-phase liquid chromatography (RP-LC). Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) can be good alternative to RP-LC. HILIC is suitable for the separation of very polar compounds using mobile phases of the same composition as in RP-LC. This work presents simultaneous separation of the nine purines: caffeine, theobromine, purine, adenine, hypoxanthine, xanthine, guanine, isoguanine, uric acid. Zwitterionic HILIC stationary phase was selected for this purpose. A required separation of analytes was achieved within 18 minutes. The developed method can be successfully used for determination of purines in biological samples using spectrophotometric detection or mass spectrometry.

Key words: Purines. Separarion. Liquid chromatography. Hydrophilic interaction.

ÚVOD

Vo všeobecnosti sa ako puríny označujú organické látky zložené z pyrimidínového a imidazolového jadra. Chemické štruktúrne vzorce deviatich purínov sú znázornené na obrázku 1. V prípade väzby s ribózou im hovoríme nukleozidy, pri konjugácii s ribózou a zvyškom kyseliny fosforečnej nukleotidy. Puríny sa zapájajú do mnohých homeostatických mechanizmov a ich distribúcia a funkcia v ľudskom tele je rôznorodá. Najdôležitejšiu úlohu hrajú v centrálnej nervovej sústave a kardiovaskulárnom systéme. Z farmakologického hľadiska majú terapeutický a diagnostický potenciál pri ochoreniach ako artritída, ischémia, hypertenzia, Parkinsonová choroba, psychózy, poruchy spánku, epilepsia, astma, rakovina, závislosť na omamných látkach a iné [1 - 16].



Obrázok 1 Štruktúrne vzorce vybraných purínov

V súčasnosti je separácia a stanovenie purínov stále aktuálnou témou vzhľadom k tomu, že tieto látky sa zúčastňujú mnohých biologických procesov v ľudskom organizme. V poslednom desaťročí sa uskutočnilo viacero štúdií, ktoré sa zaoberajú uvedenou problematikou [1]. Pre tieto účely bolo vyvinutých viacero vysokoúčinných separačných analytických metód ako napríklad: kapilárna elek-

troforéza (CE) [2], plynová chromatografia (GC) [3] a kvapalinová chromatografia (LC) [4].

Spomedzi vyššie spomenutých separačných metód je najpoužívanejšou LC a to najmä z dôvodu reprodukovateľnosti, selektívnosti, citlivosti a ľahkej automatizovateľnosti. Prevažná väčšina aplikácií využíva rozdeľovaciu chromatografiu v reverzne-fázovom separačnom móde (RP-LC) na bežne dostupných analytických kolónach s chemicky viazanou fázou typu C18 [6]. V tomto type chromatografie separácia látok prebieha rozdeľovaním ich molekúl medzi stacionárnu (nepohyblivú) a mobilnú (pohyblivú) fázu, pričom sa tu okrem rozdeľovacieho zákona uplatňujú aj viaceré sekundárne interakcie, ako napríklad dipól-dipól, vodíkové väzby, iónové interakcie a podobne. RP-LC však neposkytuje optimálne riešenie problému separácie purínových látok.

Alternatívnym prístupom separácie týchto látok môže byť použitie hydrofílne interakčnej chromatografie (HILIC) [5]. Prednosťou HILIC v porovnaní s RP-LC je možnosť separácie aj veľmi polárnych, iónových alebo iónogénych látok za použitia rovnakých mobilných fáz ako v RP-LC.V posledných rokoch vzrastá počet aplikácií HILIC na separáciu a stanovenie purínov a im podobných zlúčenín, hlavne z dôvodu neustáleho vývoja nových typov HILIC stacionárnych fáz.

Cieľom tejto práce bolo prvej časti stručná charakteristika a rozdelenie HILIC stacionárnych fáz podľa funkčných skupín, ktoré by mohli byť vhodné pre separáciu purínov a im podobných látok HILIC metódou. V druhej časti sa práca zaoberá vývojom HILIC metódy na simultánnu separáciu vybraných deviatich purínov, použitím zwiterionickej HILIC stacionárnej fázy.

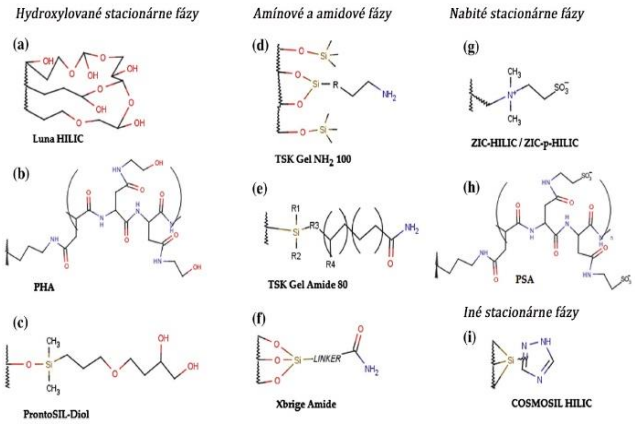
ROZDELENIE HILIC STACIONÁRNYCH FÁZ PODĽA FUNKČNÝCH SKUPÍN

1. Nemodifikovaný silikagél

Najjednoduchším typom stacionárnej fázy pre HILIC chromatografiu je nemodifikovaný silikagél. Typickým separačným mechanizmom na silikagély je rozdeľovanie látok medzi na vodu bohatšiu stacionárnu fázu a na vodu chudobnejšiu mobilnú fázu tvorenú prevažne acetonitrilom alebo inými vodno-organickými rozpúšťadlami. V rámci eluo-tropného radu rozpúšťadiel: voda < metanol < etanol, sa dá nahradiť voda aj jednoduchými alkoholmi. V takomto prípade sa stacionárna fáza nazýva pseudostacionárna fáza. V prípade separácie purínov je nevýhodou silikagélu relatívne nízka selektivita a retencia purínov. Typické zloženie mobilnej fázy je acetonitril a voda v pomere 90:10 (v/v) [7].

2. Hydroxylované stacionárne fázy

Zvýšenie selektivity a hodnôt retenčných faktorov purínov ako polárnych látok je možné uskutočniť jednoduchým naviazaním polárnej skupiny na silikagélový skelet. Jednou z možností je naviazanie alkylového reťazca s hydroxylovou skupinou. Tým sa vytvorí možnosť sekundárnych interakcií, vďaka prítomnosti vodíkových väzieb, čím sa zvýši selektivita separácie. V súčasnosti sa používajú rôzne typy komerčných kolón s modifikovanými hydroxylovanými stacionárnymi fázami ako napríklad Luna-HILIC s priečne naviazanými diolovými skupinami, polyhydroxyletylén-aspartámové (PHA) a Pronto-SIL-DIOL kolóny (obrázok 2a-c) [8, 9].



Obrázok 2 Vybrané typy HILIC stacionárnych fáz

3. Amínové a amidové stacionárne fázy

Modifikáciou silikagélu s využitím amínových alebo amidových funkčných skupín, ako v predchádzajúcom prípade, sa zvýši selektivita separácie spôsobená prítomnosťou hydrofilných interakcií. Tieto skupiny umožňujú vytváranie vodíkových väzieb, ktorých tvorba je závislá od pH [10, 11]. Zmenou pH mobilnej fázy sa aktívny povrch stacionárnej fázy "dokáže" nabíjať pozitívnym alebo negatívnym nábojom, čo umožňuje iónovým interakciám vplývať na selektivitu a retenciu separovaných látok. Stacionárne fázy využívajúce tento typ modifikácií obsahujú v komerčnom názve skratky NH_2 alebo Amide (obrázok 2d-f).

4. Nabité stacionárne fázy

Medzi najmodernejšie komerčne dostupné HILIC stacionárne fázy patria silikagélové fázy modifikované alkylovými reťazcami obsahujúce funkčné skupiny nesúce náboj. Väčšinou sú týmito funkčnými skupinami síranový anión a kvartérny amín. V prípade ak sú zastúpené obe spomenuté skupiny hovoríme o zwiteriónových kolónach (ZIC-HILIC) (obrázok 2g) [12]. Viacero autorov popísalo zanedbateľný vplyv veľkosti funkčnej skupiny na zníženie možných interakcií analytu so stacionárnou fázou [13, 14]. Na druhej strane vplyv rôzne nabitých funkčných skupín je badateľný aj pri separácii purínov resp. nukleotidov. Kladne nabité bázické látky majú vyššie hodnoty retenčných faktorov, zatiaľ čo pri záporne nabitých nukleotidoch sa uplatňujú tzv. elektrostatické repulzne hydrofilné interakcie (ERLIC, angl. electrostatic repulsion-hydrophilic interactions), kde dochádza k separácii látok na základe opačne nabitých látok, alebo analytov obsahujúcich rôzne nabité funkčné skupiny [15]. Ďalšími funkčnými skupinami môžu byť naviazané na silikagél polysulfoetylénové (PSA) skupiny (obrázok 2h).

METODIKA PRÁCE

Použité prístroje a zariadenia

Na chromatografické analýzy sme používali UHPLC systém 1200 SL od Agilent Technologies, ktorý pozostával z nasledujúcich modulov: odplyňovač mobilnej fázy (G1379B), vysokotlaková binárna pumpa (G1312B), termostatovaný automatický dávkovač so zásobníkom (G1329B), kolónový termostat (G1316B), spektrofotometrický DAD detektor (G1315), kvadrupólový hmotnostný detektor a softvér Agilent ChemStation B.04.03. Na separáciu purínov bola používaná HPLC kolóna ZIC®-HILIC, 150 × 4.6 mm s veľkosťou častíc stacionárnej fázy 5 µm.

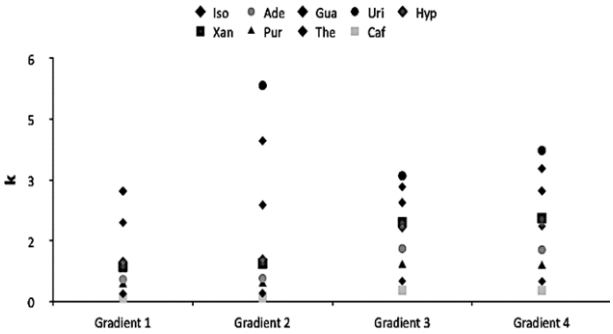
Chemikálie a roztoky

Na analýzy sa používali chemikálie a štandardy najvyššej čistoty. Štandardy purínov boli zakúpené u firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Roztoky analytov boli pripravované jednotlivo, podľa rozpustnosti v rozličných roztokoch. Na prípravu vodných roztokov bola používaná ultra čistá deionizovaná voda pripravovaná pomocou systémov Labconco (Water Pro PS, Cansas City, USA) a Milli-Q (Millipore, Billerica, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Optimalizácia separácie

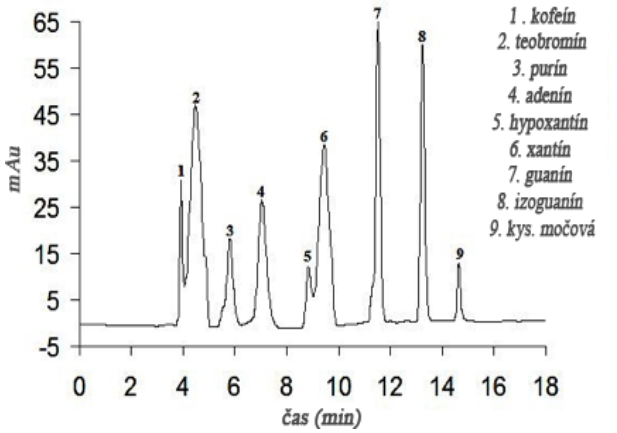
V prvej časti našej experimentálnej práce sme sa zaoberali štúdiom rôznych programov gradientovej elúcie na čo najlepšieho odseparovanie vybraných deviatich purínov: kofeín, teobromín, purín, adenín, hypoxantín, xantín, guanín, izoguanín a kyselina močová. Použité boli rôzne sklony gradientu s rôznym percentom acenotrilu v mobilnej fáze. Pre nájdenie optimálneho tvaru gradientu sme študovali niekoľko chromatografických parametrov ako napríklad retenčný faktor (k), selektivitu (α) a rozlíšenie (R_s). Na obrázku 3 je znázornené porovnanie retenčných faktorov separovaných purínov pre rôzne typy gradientov. Pri gradiente č. 1 a č. 2 sme pozorovali koelúciu a väčšie rozmytie eluovaných píkov separovaných analytov, preto sme ich v ďalšej fáze našej experimentálnej práce vylúčili.



Obrázok 3 Porovnanie retenčných faktorov purínov pre rôzne typy gradientov

Selektivita a rozlíšenie patria medzi kvalitatívne parametre na hodnotenie kvality separácie látok zo zmesi. Zatiaľ čo selektivita poskytuje informáciu o separácii dvoch vedľa seba eluujúcich látok v definovanom separačnom systéme, rozlíšenie nám poskytuje presnejšiu informáciu o "kvalite" separácie dvoch látok. Na základe porovnania retenčných faktorov zvyšných dvoch gradientov, gradient č. 4 poskytuje lepšie podmienky na separáciu purínov ako gradient č. 3. Pri týchto separačných podmienkach je jediným kritickým párom dvojica látok kofeín/teobromín. Hodnoty rozlíšenia pre ostatné separované látky bolo vyššie ako 1,5. Gradient č. 4 bol vybraný ako najvhodnejším vzhľadom na retenciu, selektivitu a rozlíšenie separovaných látok (obrázok 4). Pre potvrdenie kritickej dvojice látok sa dá v našom prípade využiť aj doplnková spektrálna analýza za pomoci DAD resp. MS detekcie.

Medze detekcie (LOD) a medza stanovenia (LOQ) stanovovaných látok boli vypočítané metódou pomeru signál/šum (S/N), pričom pre LOD bola uvažovaná hodnota pomeru S/N = 3 a pre LOQ S/N = 10 (tabuľka 1). Opakovateľnosť sme určili ako relatívnu smerodajnú odchýlku (RSD) štyroch meraní rovnakej koncentrácie počas jedného dňa (tabuľka 1).



Legenda: Elučné poradie purínov: 1 - kofeín, 2 - teobromín, 3 - purín, 4 - adenín, 5 - hypoxantín, 6 - xantín, 7 -guanín, 8 - izoguanín, 9 - kyselina močová. Experimentálne podmienky: Mobilná fáza: (A) octánový tlmivý roztok pH = 6,8 a (B) acetonitril; lineárny gradient od 90 % B do 55 % B po 15 min., následne 90 % B do 20 min, prietok mobilnej fázy: 0,5 mL min^{-1}; teplota chromatografickej kolóny: 30 ± 0,1 °C; dávkovaný objem: 10 µL a UV detekcia: 275 nm.

Obrázok 4 Separácia zmesi deviatich purínov na ZIC-HILIC kolóne

Tabuľka 1 LOD, LOQ a opakovateľnosť pre separované puríny

	LOD (mg L^{-1})	LOQ (mg L^{-1})	RSD[a] (%)
Kofeín	0,40	1,40	0,90
Teobromín	0,50	1,60	0,50
Purín	0,70	2,30	0,70
Adenín	0,70	2,30	0,20
Hypoxantín	1,20	4,10	0,10
Xantín	0,20	0,80	0,00
Guanín	0,20	0,50	1,00
Izoguanín	0,30	0,90	0,40
Kyselina močová	3,10	10,40	4,80

ZÁVER

Môžeme konštatovať, že nami vyvinutá HILIC metóda je vhodná pre simultánnu separáciu vybraných deviatich purínov (kofeín, teobromín, purín, adenín, hypoxantín, xantín, guanín, izoguanín a kyselina močová) s použitím ZIC-HILIC chromatografickej kolóny. Všetky uvedené analyty sa nám podarilo úspešne odseparovať do 18 minút. Vypočítané medze detekcie resp. stanovenia pre stanovované látky boli rozmedzí 0,02 - 3,10 mg L^{-1} resp. 0,50 - 10,40 mg L^{-1} pre spektrofotometrickú detekciu pri 275 nm. Opakovateľnosť plochy elučných píkov analytov sa pohybovala v rozmedzí 0,00 - 4,80 %. V ďalšej našej práci sa zameriame na stanovenie purínov v biologických vzorkách s využitím detekcie hmotnostným spektrometrom.

Poďakovanie

Práca bola uskutočnená v rámci Operačného programu Veda a Výskum (ITMS 26240220061). Práca vznikla za finančnej podpory grantovej agentúry MŠ SR VEGA, grant č. 1/0852/13 a Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0583-11.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

[1] TAVAZZI, B., LAZZARINO, G., LEONE, P., AMORINI, A. M., BELLIA, F., JANSON, C. G., GIARDINA, B. 2005. Simultaneous high performance liquid chromatographic separation of purines, pyrimidines, N-acetylated amino acids, and dicarboxylic acids for the chemical diagnosis of inborn errors of metabolism. Clinical Bio-chemistry, ISSN 0009-9120, 2005, č. 38, 997–1008.

[2] FENG-QING YANG et al. 2009. Determination of nucleosides and nucleobases in different species of Cordyceps by capillary electrophoresis–mass spectrometry, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, ISSN 0731-7085, 2009, č. 50, 307–314.

[3] GAYE-SEYE, M. D., AARON, J. J. 1994. Analysis of mixtures of purines and pyrimidines by synchronous room-temperature phosphorescence spectroscopy, Analytica Chimica Acta, ISSN 0003-2670, 1994, č. 290, 166–171.

[4] KAZOKA, H. 2001. Separation of Inosine, Hypoxanthine, and Guanosine by High-Performance Liquid Chromatography on Silica,

Journal of Chromatographic Science, ISSN 0021-9665, 2001, č. 39, 265–268.

[5] MARRUBINI, G. 2010. Separation of purine and pyrimidine bases and nucleosides by hydrophilic interaction chromatography, Journal of Separation Science, ISSN 1615-9314, 2010, č. 33, 803–816.

[6] D. GARCIA-GOMEZ et al. 2013. Stationary phases for separation of nucleosides and nucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography, Trends in Analytical Chemistry, ISSN 0165-9936, 2013, č. 47, 111-128.

[7] W. BICKER et al. 2008. Main Interactions and Influences of the Chromatographic Pa-rameters in HILIC Separations. Journal of Separation Science, 2008, ISSN 1615-9314, č. 31, 2971-2987.

[8] G. SCHUSTER, W. LINDNER. 2011. Chocolate HILIC phases: development and characterization of novel saccharide-based stationary phases by applying non-enzymatic browning (Maillard reaction) on amino-modified silica surfaces, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, ISSN 1618-2650, č. 400, 2539-2554.

[9] R.N. EASTER et al. 2010. Separation and identification of oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS), Analyst, 2010, ISSN 1364-5528, č. 135, 2560-2565.

[10] K. INOUE et al. 2010. Development and Application of an HILIC-MS/MS Method for the Quantitation of Nucleotides in Infant Formula, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, ISSN 0021-8561, č. 58, 9918-9924.

[11] D.V. MCCALLEY et al. 2010. Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography, Journal of Chromatography A, 2010, ISSN 0021-9673, č.1217, 3408-3417.

[12] E. RODRIGUEZ-GONZALO et al. 2011. Study of retention behaviour and mass spectrometry compatibility in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography for the separation of modified nucleosides and nucleobases, Journal of Chromatography A, 2011, ISSN 0021-9673, č.1218, 3994-4001.

[13] ZHENGJIN JIANG et al. 2009. Novel zwitterionic polyphosphorylcholine monolithic column for hydrophilic interaction chromatography, Journal of Chromatography A, 2009, ISSN 0021-9673, č. 1216, 2439-2448.

[14] S. DI PALMA et al. 2011. Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (ZIC-HILIC and ZIC-cHILIC) Provide High Resolution Separation and Increase Sensitivity in Proteome Analysis, Analytical Chemistry, 2011, ISSN 1520-6882, č. 83, 3440-3447.

[15] A.J. ALPERT. 2007. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics, Analytical Chemistry, 2007, ISSN 1520-6882, č. 80, 62-76.

[16] CHARLES H. V. HOYLE, GEOFFREY BURNSTOCK. 1996. Principles of Medical Biology, ISBN 978-0-7623-1124-8, č. 4, JAI Pres Inc, 1996, 49-75.

ANALYTICKÉ METÓDY NA STANOVENIE MEDI V ĽUDSKOM MOČI
ANALYTICAL METHODS FOR DETERMINATION OF COPPER IN HUMAN URINE

PROCHÁZKOVÁ Simona, BOŽEK Peter, HALKO Radoslav

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Bratislava

ABSTRAKT
Táto práca popisuje vývoj dvoch jednoduchých metód na stanovenie medi v ľudskom moči na nízkych koncentračných úrovniach: 1. extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (CPE) kombinovaná s atómovou absorpčnou spektrometriou (FAAS) a 2. reverzne-fázová kvapalinová chromatografia so spektrofotometrickou detekciou vo viditeľnej oblasti spektra (VIS). V obidvoch metódach bol použitý 2,9-dimetyl-1,10-fenantrolín (neokuproín) ako selektívne chelatotvorné činidlo ktorý s Cu(I) vytvára žlto-oranžový hydrofóbny chelát. Na redukciu Cu(II) na Cu(I) bolo použité adekvátne množstvo kyseliny askorbovej. Obe vyvinuté analytické metódy sú vhodné na stanovenie medi v ľudskom moči na nízkych koncentračných úrovniach.

Kľúčové slová: Meď. Ľudský moč. Analýza. kvapalinová chromatografia. Atómová spektrometria.

ABSTRACT
This work characterizes two newly developed simple methods for the determination of trace concentration of copper in human urine: 1. cloud point extraction combined with flame atomic absorption spectrometry and 2. reversed-phase liquid chromatography with spectrophotometric detection. These methods were based on the reaction of neocuproine with Cu(I) which forms orange-yellow, hydrophobic chelate. Cu(II) was reduced to Cu(I) ions by appropriate amounts of ascorbic acid. The developed analytical methods were applied to the determination of trace copper in human urine samples.

Key words: Copper. Human urine. Analysis. Liquid chromatography. Atomic spectrometry.

ÚVOD

Náš organizmus využíva len niekoľko tisícin respektíve miliónti gramov biologicky významných prvkov, avšak ich prítomnosť v organizme je pre udržanie zdravia nevyhnutná. V posledných niekoľko desiatok rokov sa všeobecne zvyšuje záujem o stanovenie týchto prvkov na stopových alebo ultrastopových koncentračných úrovniach v rôznych biologických matriciach.

Meď je príkladom kovu, ktorý je pre človeka esenciálny, ale v nadbytku je pre organizmus toxický (Linder, 1996). Najvyššia koncentrácia medi bola objavená v mozgu, pečeni a v srdci (Gibson, 2005). Tento prvok je nevyhnutný pre správny rast, integritu kardiovaskulárneho systému, neuroendokrinné funkcie a pre metabolizmus železa (Uauy, 1998). Okrem metabolizmu železa sa zúčastňuje i metabolizmu cholesterolu, glukózy, syntézy myelínu a melanínu. Podieľa sa aj na početných reakciách v imunitnom systéme a pri syntéze väzivového tkaniva (Zhang, 2006). Meď je funkčnou súčasťou niekoľkých základných enzýmov metabolizmu, ako je napríklad cytochróm c oxidáza v mitochondriách, lysyl oxidáza v spojivových tkanivách, dopamín monooxygenáza v mozgu, superoxid dismutáza, ktorá patrí medzi účinné antioxidanty a ceruloplazmín v sére (Hellman, 2000). Správna funkcia každej bunky ľudského organizmu je ovplyvnená prítomnosťou medi. V organizme je tento prvok viazaný pomocou bielkoviny ceruloplazmínu, pretože voľná meď je toxická. Ceruloplazmín bol prvýkrát izolovaný z plazmy v roku 1948 Holmbergom a Laurellom (Holmberg, 1948). Neskôr sa podarilo Scheinbergovi a Gitlinovi v roku 1952 preukázať biochemickým testovaním jeho zvýšenú koncentráciu v sére u pacientov s Wilsonovou chorobou (Scheinberg, 1952). Meď naviazaná na ceruloplazmín tvorí až 95% celkového množstva medi cirkulujúcej v tele (Hellman, 2002).

Zvýšená koncentrácia medi v ľudskom organizme sa prejaví pri genetickom ochorení metabolizmu, Wilsonovej chorobe (Wilson, 1912). Táto choroba vychádza z mutácie génu ATP7B na chromozóme 13. Choroba nesie meno britského lekára Samuela Alexandera Kinnier Wilsona, neurológa, ktorý v roku 1912 popísal ochorenie postihujúce pečeň a centrálny nervový systém vo svojej práci (Wilson, 1912). Za fyziologických okolností je proteín ATP7B zodpovedný za translokáciu medi do Golgiho aparátu s následnou inkorporáciou do apoceruloplazmínu a za vylúčenie medi do sekrečných vačkov s nadväzujúcou sekréciou do žlčových kanálikov (Huster, 2010). Pacienti s Wilsonovou chorobou majú tento mechanizmus vylučovania medi narušený, meď sa kumuluje v cytoplazme hepatocytov, vedie k ich oxidatívnemu poškodeniu, deštrukcii a uvoľneniu medi do obehu (Lalioti, 2010). Keď je ale hladina medi nadlimitná oproti hodnotám fyziologickým je ATP7B trans-

portovaný do membrán žlčových kanálikov, kde dochádza k rozptýleniu toxických hladín medi. Včasne diagnostikované a adekvátne liečené ochorenie má dobrú prognózu, neliečené ireverzibilné poškodenie mozgu a pečene končí väčšinou fatálne (Kaňková, 2005).

Pri Wilsonovej chorobe sa mobilizácia medi z pečene drasticky znižuje, lebo produkcia ceruloplazmínu je nízka. Nízky ceruloplazmín a vysoký obsah medi v pečeni sú typické známky Wilsonovej choroby. Ale zníženie ceruloplazmínu nie je primárny defekt pri Wilsonovej chorobe. Vylučovanie medi do žlče vyžaduje adenozíntrifosfát dependentný transportný proteín. Príčinou Wilsonovej choroby sú mutácie génu pre tento transportný proteín. Tieto mutácie spôsobujú zníženú syntézu ceruloplazmínu. Koncentrácia ceruloplazmínu pri Wilsonovej chorobe môže byť znížená aj normálne. V laboratórnom obraze u cca 60% pacientov dominuje znížená koncentrácia transportnej bielkoviny pre meď – ceruloplazmínu (normálna hladina ceruloplazmínu však nevylučuje diagnózu).

Základné vyšetrenie na určenie množstva medi v organizme sa vykonáva meraním obsahu ceruloplazmínu v krvi, to však nie je dostačujúce. Voľná, na ceruloplazmín neviazaná meď vyvoláva zvýšené vylučovanie medi močom. Priame stanovenie obsahu medi v ľudskom moči predstavuje lepšiu alternatívu, pretože za 24 hodín sa močom vylúči okolo 1,5 μmol medi.

Obsah medi v moči nakazených Wilsonovou chorobou je niekoľkonásobne vyšší a to až na úrovni okolo 5–10 μmol za 24 hodín (Wilson, 1966). Táto choroba u polovice chorých vo veku od desiatich rokov spôsobuje symptómy poukazujúce na poruchy pečene. Chorý môže mať akútny alebo chronický zápal pečene (hepatitída) alebo tvrdnutie pečene (cirhóza). Jednotlivé symptómy, ktoré poukazujú na ochorenie, sú veľmi variabilné, ale v podstate je jednoduché rozlíšiť najčastejšiu – hepatálnu, neurologickú a psychiatrickú formu (Angelova, 2011). V súčasnosti je veľká potreba vyvinúť jednoduchú, citlivú, selektívnu a v neposlednom rade lacnú metódu pre priebežné sledovanie katiónov medi v biologických matriciach na nízkych koncentračných úrovniach.

V súčastnosti sa na stanovenie medi v ľudskom moči využívajú rôzne analytické metódy ako napríklad molekulová spektrofotometria (Chen, 2007), atómová absorpčná spektrometria s elektrotermickou atomizáciou (ETAAS) (Lemos, 2009) alebo atómovou emisná spektrometria s indukčne viazanou plazmou (ICP-AES) (Nixon, 1986), resp. hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou (ICP-MS) (Giokas, 2004).

Každá z uvedených metód má svoje výhody a nevýhody. Napríklad, použitím posledných troch techník (ETAAS, ICP-AES a ICP-MS) možno dosiahnuť nízke medze detekcie (LOD) pod 0,002 μmol L^{-1} medi v ľudskom moči bez toho, aby bolo použité zakoncetrovanie analytu. Na druhej strane vyššie obstarávacie náklady a náklady spojené s prevádzkou prístrojov nedovoľujú ich bežné používanie v laboratóriach na stanovenie medi v ľudskom moči. Preto je veľká potreba vyvinúť jednoduchú, citlivú, selektívnu a v neposlednom rade lacnú metódu na stanovenie medi v biologických matriciach na nízkych koncentračných úrovniach.

V tejto práci prezentujeme nami vyvinuté dve jednoduché analytické metódy a to 1. spojenie extrakcie s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (CPE) s atómovou absorpčnou spektrometriou s plameňovou atomizáciou (FAAS) a 2. reverzne-fázovú kvapalinovú chromatografiu so spektrofotometrickou detekciou vo viditeľnej oblasti (RP-LC-VIS), ktoré môžu slúžiť na stanovenie nielen medi v ľudskom moči ale v iných druhoch matríc.

CIEĽ

Cieľom predkladanej práce bol vývoj jednoduchých analytických metód na stanovenie medi v ľudskom moči.

Pre naplnenie tohto cieľa sme využili: 1. spojenie metód CPE a FAAS a 2. RP-LC-VIS metódu s predkolónovou derivatizáciou medi. V oboch spomenutých metódach bolo použité selektívne chelatotvorné činidlo 2,9-dimetyl-1,10-fenantrolín (neokuproín), ktoré s jednomocným katiónom medi vytvára hydrofóbny chelát.

SÚBOR

Základný súbor tvorili univerzitní študenti vo veku 22–24 rokov z rôznych slovenských regiónov. Vzorky ľudského moču od pacientov vo veku (22 a 42) trpiacich Wilsonovou chorobou boli odobraté v Nemocnici svätého Michala v Bratislave na príslušnom oddelení. V oboch prípadoch sa odoberal prvý ranný moč, zo stredného prúdu, do vopred označených čistých polyetylénových nádob.

METODIKA PRÁCE

Použité prístroje a zariadenia

Na stanovenie medi sme si zvolili atómový absorpčný spektrometer firmy PERKIN-ELMER model 1100B (USA) s plameňovou atomizáciou a s deutériovou lampou na korekciu pozadia. Výbojka s dutou katódou pre meď bola dodaná firmou PERKIN-ELMER (NORWALK, USA). Ako oxidovadlo sme použili vzduch a ako palivo acetylén. Zdrojom žiarenia bola výbojka s dutou katódou, napájací prúd výbojky bol 25 mA, vlnová dĺžka 324,8 nm a šírka štrbiny 0,7 nm. Vyhodnotenia sme robili z integrovaných hodnôt absorbancie. Druhým použitým prístrojom bol chromatografický systém Elite LaChrom (Merck – Hitachi, Darmstadt, Nemecko), ktorý sa skladal z pumpy L-2130, automatického dávkovača L-2200, termostatu L-2300 a L-2400 UV/VIS detektora. Systém je kompatibilný so softvérom EZChrom Elite ver. 3.1.3.

Chemikálie a roztoky

Kalibračné roztoky Cu(II) sme pripravili postupným riedením zásobného roztoku Cu(II) s koncentráciou 1000 ± 2 mg L^{-1}. Roztok chelátotvorného činidla, neokuproínu, sme pripravili rozpustením adekvátneho množstva (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko) v 20% (v/v) metanole (Merck, Darmstadt, Nemecko) a následne doliali na požadovaný objem deionizovanou vodou. Pre úpravu pH sme použili tlmivý roztok s hodnotou pH 5,9 ktorý sme pripravili z kyseliny askorbovej (Calbiochem, USA a Kanada) a požadované pH sme dosiahli titráciou roztokom octanu amónneho (Merck, Darmstadt, Nemecko). Ako neiónový tenzid pre metódu CPE sme použili oktyl-fenoxy-polyetoxy-etanol (Triton X-114), (Fluka, Buchs, Švajčiarsko). Štandardné referenčné materiály ľudského moču (Assayed Urine Control, Level 2 a Level 3) sme získali od firmy Randox (Crumlin, United Kingdom). Všetky použité chemikálie boli definovanej analytickej čistoty a na prípravu roztokov sme použili deionizovanú vodu pripravenú systémom Water Pro PS (Labconco, USA).

Príprava reálnych vzoriek ľudského moču a štandardných referenčných materiálov pre CPE-FAAS metódu

Experiment CPE si vyžadoval nasledovné kroky: alikvotná časť roztoku obsahovala Cu(II), 0,1 mmol.L^{-1} neokuproín a 0,1% (v/v) Triton X-114, pH sme upravili tlmivým roztokom, ktorý bol zložený z 2,8 mmol L^{-1} kyseliny askorbovej a 65,0 mmol L^{-1} octanu amónneho, pH = 5,9). Pripravený roztok sme zahrievali pri teplote 70°C po dobu 20 min. vo vodnom kúpeli. Oddelenie dvoch fáz sme urýchlili za pomoci centrifugácie, 15 min. pri 3000 rpm. Po centrifugácii sme zmes ochladili v ľadovom kúpeli (10 min.). Tenzidom obohatená fáza bola vysoko viskózna, na odstránenie vodnej fázy sme použili dekantáciu. Pre zníženie viskozity sme daný objem tenzidom obohatenej fázy rozpustili v metanole, ktorý obsahoval 1% (v/v) HNO_3. Vzorky ľudského moču sme spracovali nasledujúcim spôsobom (LEMOS, 2009). Následne potrebný objem ľudského moču pre všetky vzorky vrátane štandardného referenčného materiálu prešiel rovnakým postupom ako je uvedené vyššie.

Optimalizácia podmienok stanovenia medi pre CPE-FAAS metódu

Pre dosiahnutie maximálnej výťažnosti extrakcie je potrebné optimalizovať všetky možné experimentálne parametre ako vplyv pH extrakčného prostredia, koncentrácie chelatotvorného činidla, koncentrácie neiónového tenzidu, extrakčnej teploty a trvanie času extrakcie.

Vplyv pH extrakčného prostredia

Hodnota pH prostredia hrá jedinečnú úlohu pri tvorbe chelátu a jeho následnej extrakcii. Extrakcii iónov kovov technikou CPE predchádza tvorba stabilného chelátu s dostatočnou hydrofóbnosťou, ktorý sa prednostne vyextrahuje do malého objemu tenzidom obohatenej fázy. Na zmenu pH pri CPE v rozmedzí od 2,5 do 6,5 sme použili tlmivý roztok kyselina askorbová/octan amónny. Maximálnu výťažnosť extrakcie sme dosiahli pri hodnote pH = 5,9, ktorú sme použili pre ďalšie merania.

Vplyv koncentrácie chelatotvorného činidla (neokuproínu)

Výber vhodného chelatotvorného činidla v CPE súvisí hlavne s tvorbou dostatočne hydrofóbneho chelátu. V našom prípade sme použili vysoko selektívne činidlo, neokuproín, ktorý s meďným katiónom vytvára stabilný hydrofóbny chelát. V našej štúdii sme sledovali rozsah koncentrácií neokuproínu v rozmedzí od 0,01 to 0,70 mmol L^{-1}. Z nameraných výsledkov sme si pre nasledujúce

merania zvolili optimálnu koncentráciu neokuproínu 0,10 mmol L^{-1}.

Vplyv koncentrácie neiónového tenzidu (Tritonu X-114)

Neiónový tenzid Triton X-114 sme si vybrali z dôvodu jeho komerčnej dostupnosti, vysoko čistej homogénnej forme, nízkym toxikologickým vlastnostiam a nízkym nákladom. Navyše jeho nízka teplota zákalu micelárneho roztoku (CPT) 23–25°C a vysoká hustota tenzidom obohatenej fázy nám umožnila rýchle a účinne oddelenie tenzidom obohatenej fázy od vodnej fázy. Vplyv koncentrácie neiónového tenzidu Triton X-114, na výťažnosť extrakcie medi, sme odmerali v rozmedzí 0,025-0,25% (v/v). Z nameraných výsledkov vyplývalo, že najvyššie účinnosti CPE pre meď boli dosiahnuté pri koncentrácii 0,10% (v/v) Tritonu X-114.

Vplyv extrakčnej teploty a času ustaľovania rovnováhy

Výťažnosť extrakcie je silne ovplyvnená aj teplotou zahrievania micelárneho roztoku a optimálnym časom ustaľovania rovnováhy. Preto v ďalšej časti našej práce sme sa rozhodli sledovať vplyv zmeny extrakčnej teploty ako aj vplyv času ustaľovania rovnováhy na výťažnosť extrakcie. Z literatúry je známe že pri CPE je lepšie použiť vyššie teploty ako je deklarovaná CPT. Nami zvolené teploty sa pohybovali od 30°C do 80°C. Najvyššiu výťažnosť extrakcie sme dosiahli pri teplote 70°C. Čas ustaľovania rovnováhy pri CPE sa najčastejšie pohybuje v rozmedzí 5–35 min. V našom prípade pri čase 20 minút sme dosiahli najvyššie hodnoty výťažnosti extrakcie.

VÝSLEDKY A DISKUSIA PRE CPE-FAAS METÓDU

Linearita FAAS metódy pre kvantitatívne stanovenie medi bola testovaná v rozsahu koncentrácií medi 1. od 0,5 do 100,0 μg L^{-1} s použitím CPE a 2. od 10 do 2000 μg L^{-1} bez použitia CPE. Lineárne regresné rovnice pre kalibračné roztoky štandardov medi mali nasledujúce hodnoty 1. $y = 1{,}2484x - 0{,}0013$ s CPE a 2. $y = 0{,}0364x + 0{,}009$ bez CPE. Hodnota RSD (%) bola pre 10 opakovaných stanovení menšia ako 5%. V snahe kvantifikovať nižšie koncentrácie sledovaného analytu bolo potrebné CPE dosiahnuť vyššiu hodnotu koncentračného faktora ako 20. Koncentračný faktor pri CPE, počítaný ako pomer smerníc kalibračných kriviek pre kalibračné roztoky s CPE a bez CPE úpravného kroku bol 34 (pri objeme použitých vzoriek 10 mL). Dosiahnutý LOD bol bez CPE 0,44 μg L^{-1}, s CPE 0,01 μg L^{-1}. Zároveň bola vykonaná štúdia, v ktorej sme sa zaoberali rušivými vplyvmi cudzích iónov na stanovenie medi v ľudskom moči. Dospeli sme k záveru, že tolerančné medze rôznych druhov iónov na stanovenie medi v ľudskom moči sú zanedbateľné. Správnosť vyvinutej metódy sme si overili na štandardnom referenčnom materiáli ľudského moču (Assayed Urine Control, Level 3), so zvýšenou koncentráciou medi 258 ± 51 μg L^{-1}. Stanovená koncentrácia medi mala hodnotu 245 ± 24 μg L^{-1}. Výsledky stanovenia koncentrácie medi, ktoré sme dosiahli CPE-FAAS metódou (tabuľka 1) poukazujú, že nami vyvinutá metóda je presná, správna a reprodukovateľná. Zároveň v (tabuľka 2) uvádzame stanovenú koncentráciu medi v ľudskom moči u pacientov trpiacich Wilsonovou chorobou.

Tabuľka 1 Stanovenie medi v ľudskom moči u zdravých osôb (univerzitní študenti)

Vzorka ľudského moču	Koncentrácia medi (μg L^{-1}) (n = 2)	
	Pridané	Stanovené
1. Žena	0	15,0 ± 0,7
	50	71,1 ± 0,5
	75	93,2 ± 0,2
2. Muž	0	79,3 ± 0,4
	50	131,2 ± 0,2
	75	158,5 ± 0,1

Tabuľka 2 Stanovenie medi v ľudskom moči u pacientov trpiacich Wilsonovou chorobou

Vzorka ľudského moču	Koncentrácia medi (μg L^{-1}) (n = 2)	
	Pridané	Stanovené
1. Žena	0	656 ± 11
	25	692 ± 10
	50	670 ± 23
2. Muž	0	534 ± 25
	25	583 ± 14
	50	576 ± 17

Príprava reálnych vzoriek ľudského moču a štandardných referenčných materiálov pre RP-LC-VIS metódu

Každá vzorka pripravená na meranie obsahovala 8 mL ľudského moču, 28 μmol kyseliny askor-

bovej, 650 µmol octanu amónneho a 21 µmol neokuproínu. Vzorky sme premiešali, nechali odstáť 15 minút a následne sme ju nadávkovali do chromatografického systému. Štandardné referenčné materiály ľudského s dvoma koncentračnými úrovňami medi (normálna 1,62 µmol L^{-1} a vysoká 4,06 µmol L^{-1}) boli pripravené rozpustením v 10 mL ultračistej vody. Derivatizácia týchto štandardných referenčných materiálov bola vykonaná rovnakým postupom ako pri CPE-FAAS metóde.

Optimálne separačné podmienky pre RP-LC-VIS metódu

Separáciu medi od ďalších zložiek moču sme uskutočnili na analytickej kolóne Chromolith Performance RP-8e (100 × 4,6 mm) s predkolónou Chromolith Guard Cartridges RP-8e (5 × 4,6 mm) od firmy Merck (Darmstadt, Germany). Potrebné zloženie mobilnej fázy sme dosiahli zmiešaním dvoch fáz. Prvá fáza obsahovala tlmivý roztok zložený z kyseliny askorbovej 2,8 mmol L^{-1} a octanu amónneho 64,87 mmol L^{-1}, s hodnotou pH = 5,9. Druhou fázou bol metanol, ktorý sme použili ako elučné činidlo. Na separáciu bola použitá gradientová elúcia s konštantným prietokom mobilnej fázy 2 mL min^{-1}. Kolónový priestor bol vyhrievaný na teplotu 30±0,1 ºC. Dávkovaný objem bol 20 µL. Detekcia odseparovaných látok bola uskutočnená pri vlnovej dĺžke 453 nm.

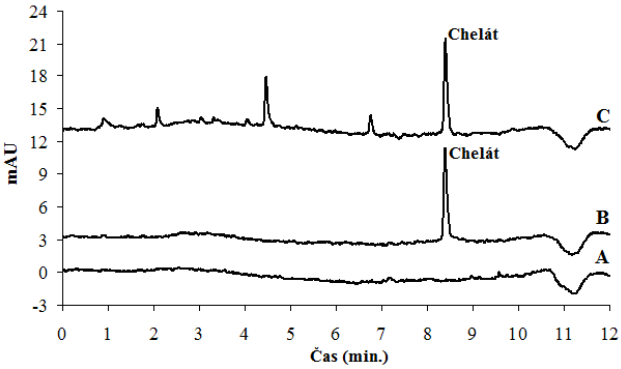
VÝSLEDKY A DISKUSIA PRE RP-LC-VIS METÓDU

Za účelom separácie chelátu (Cu(I):neokuproín) od iných žltých komponentov ľudského moču sme použili RP-LC metódu. Ako vidieť zo separácie biologickej vzorky – ľudského moču (obrázok 1), pri našich optimálnych chromatografických podmienkach, sa nám všetky potenciálne interferenty ľudského moču podarilo dostatočne odseparovať od samotného chelátu. Môžeme konštatovať, že chelát (elučný čas 8,41 min.) bol dostatočne oddelený od všetkých žltých zložiek ľudského moču do 9 minút.

Linearita RP-LC-VIS metódy bola testovaná v rozsahu koncentrácií medi od 0,09 až 11,50 µmol L^{-1}. Lineárna regresná rovnica pre kalibračné roztoky štandardov medi mala hodnotu:

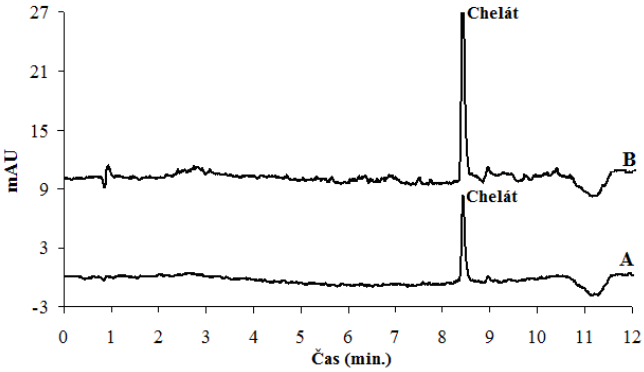
$y = 27{,}043\ x + 43\ 583$ a $y = 21{,}829x + 40\ 141$

pre vzorky ľudského moču. Korelačný koeficient (R^2) v oboch prípadoch nebol nižší ako 0,9997. LOD a medza stanovenia (LOQ) mali hodnoty pre kalibračné roztoky štandardov medi (0,06 µmol L^{-1} a 0,20 µmol L^{-1}) a pre vzorky ľudského moču (0,07 µmol L^{-1} a 0,30 µmol L^{-1}).



Obrázok 1 Chromatografický záznam A – slepý pokus; B – štandard medi vo vodnom roztoku; C – reálne vzorka ľudského moču; po predkolónovej derivatizácii s chelatotvorným činidlom – neokuproínom

Správnosť vyvinutej metódy sme si overili na dvoch štandardných referenčným materiálov ľudského moču (Assayed Urine Control, Level 2 a Level 3). Na nasledujúcom obrázku (obrázok 2) je zobrazený záznam chromatografickej separácie uvedených referenčných materiálov. Výsledky stanovenia koncentrácie medi v štandardných referenčných materiálov, ktoré sme dosiahli metódou RP-LC-VIS (tabuľka 3) poukazujú, že nami vyvinutá metóda je správna.



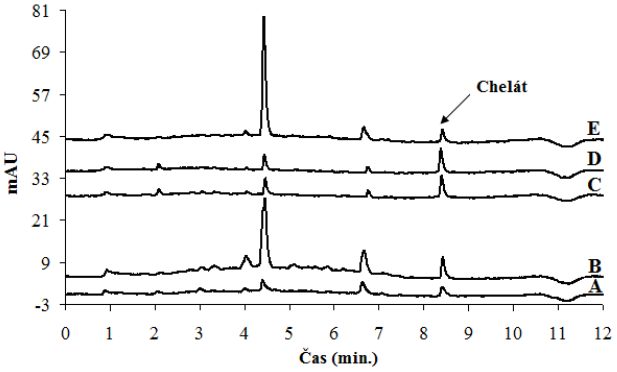
Obrázok 2 Záznam chromatografickej separácie štandardných referenčných materiálov A – URN ASY CONTROL 2; B – URN ASY CONTROL 3 (zvýšená koncentrácie medi)

Na obrázku 3 je zobrazený záznam chromatografickej separácie 5 reálnych vzoriek ľudského moču od zdravých osôb (univerzitní študenti).

Tabuľka 3 Stanovenie medi v štandardných referenčných materiáloch ľudského moč

Štandardný referenčný materiál ľudského moču	Referenčný rozsah (µmol L^{-1})	Deklarovaná hodnota (µmol L^{-1})	Stanovená koncentrácia ± SD (µmol L^{-1}) (n = 5)	
			LC	ETAAS
URN ASY CONTROL Level 2	1,16–1,74	1,45	1,36 ± 0,11	1,63 ± 0,06
URN ASY CONTROL Level 3	2,76–4,14	3,47	3,10 ± 0,80	4,27 ± 0,10

Nižšie uvedená tabuľka 4 obsahuje stanovené koncentrácie medi v ľudskom moči, vo vzorkách od zdravých osôb.



Obrázok 3 Záznam chromatografickej separácie reálnych vzoriek ľudského moču od zdravých osôb

Tabuľka 4 Stanovenie medi v 5 vzorkách ľudského moču

Ľudský moč	Stanovená koncentrácia ± SD (µmol L^{-1}) (n = 5)
Vzorka A (žena)	1,13 ± 0,13
Vzorka B (muž)	1,47 ± 0,11
Vzorka C (žena)	1,58 ± 0,15
Vzorka D (žena)	1,68 ± 0,15
Vzorka E (muž)	0,92 ± 0,18

ZÁVER

Výsledky, ktoré sme získali pri analýze vzoriek ľudského moču ukázali, že nami navrhované metódy CPE-FAAS a RP-LC–VIS s predkolónovou derivatizáciou môžu byť úspešne použité pre rýchle stanovenie medi v ľudskom moči. V konečnom dôsledku môžu nami vyvinuté metódy byť použité aj pre detailnejšie štúdium komplexotvorných rovnováh medzi iónom a chelátotvorným činidlom resp. pre stanovenie medi v iných druhoch matríc.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla za finančnej podpory grantovej agentúry MŠ SR VEGA, grant č. 1/0852/13 a Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0583-11 pod záštitou centra excelencie VVCE-0070-07.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

ANGELOVA, M. - ASENOVA, S., NEDKOVA, V. - et. el. 2011. Copper in human organism. In: *Trakia Journal Sciences*. 2011; 9 (1): 88–98. ISSN 1313-7050.

GIBSON, R.S. 2005. *Principles of nutritional assessment*. 2nd ed. New York : Oxford University Press, 2005. 908 s. ISBN 0-19-517169-1.

GIOKAS, D.L. - EKSPERIANDOVA, L.P. - BLANK, A.B. et. al. 2004. Comparison and evaluation of cloud point extraction and low-temperature directed crystallization as preconcentration tools for the determination of trace elements in environmental samples. In: *Analytica Chimica Acta*. 2004; 505 (1): 51–58. ISSN 0003-2670.

HELLMAN, N.E. - GITLIN, J.D. 2002. Ceruloplasmin metabolism and function. In: *Annual Review of Nnutrition*. 2002; 22: 439–458. ISSN 0199–9885.

HOLMBERG, C.G. - LAURELL, C.B. 1948. Investigations in serum copper: II. Isolation of the Copper containing protein, and a description of its properties. In: *Acta Chemica Scandinavica*. 1948; 2: 550–556. ISNN 0001-5393.

HUSTER, D. 2010. Wilson disease. In: *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2010; 24 (4): 531–539. ISSN 1521-6918.

CHEN, J.- CHEN, H. - CHEN, S. et. al. 2007. Determination of ultratrace amounts of copper(II) in water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry after cloud point extraction. In: *Chemical Research in Chinese Universities*. 2007; 23 (2): 143–147. ISSN 1005-9040.

KAŇKOVÁ, K. 2005. *Vybrané kapitoly z patologické fyziologie: poruchy metabolizmu a*

výživy. 1. vyd. Brno : Vydavatelství MU, 2005. 59 s. ISBN 80-210-3670-2.

LALIOTI, V. - SANDOVAL, I. - CASSIO, D., et. al. 2010. In Molecular pathology of Wilson`s disease: a brief. In: *Journal of Hepatology*. 2010; 53: 1151–1153. ISSN 0168-8278.

LEMOS, V. – NOVAES, G.D. - DE CARVALHO, A.L. – GAMA, E.M. – SANTOS, A.G. 2009. Determination of copper in biological samples by flame atomic absorption spectrometry after precipation with Me-BTAP. In: *Environmental Monitoring and Assessment*. 2009; 148 (1–4): 245–253. ISSN 0167-6369.

LINDER, M.C. - HAZEGHAZAM M. 1996. Coper biochemistry and molecular biology. In: *American Journal of Clinical Nutrition*. 1996; 63 (5): 797–811. ISSN 0002-9165.

NIXON, D.E. - MOYER, T.P. - JOHNSON, P. 1986. Routine measurement of calcium, magnesium, copper, zinc, and iron in urine and serum by inductively coupled plasma emission-spectroscopy. In: *Clinical Chemistry*. 1986; 32 (9): 1660–1665. ISSN 0009-9147.

SCHEINBERG, I.H. - GITLIN, D. 1952. Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). In: *Science.* 1952; 116 (3018): 485–485. ISSN 0036-8075.

UAUY, R. - OLIVARES, M. - GONZALEZ M. 1998. Essentiality of copper in humans. In: *American Journal of Clinical Nutrition*. 1998; 67 (5): 952S–959S. ISSN 0002-9165.

WILSON J.F. - KLASSEN W.H. 1966. Spectrophotometric determination of urinary copper. In: *Clinica Chimica Acta.* 1966; 13 (6): 766–774. ISSN 0009-8981.

WILSON, S.A.K. - M.D. - EDIN, B.S.C. - LOND, M.R.C.P. 1912. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. In: *The Lancet.* 1912; 179 (4626): 1115–1119.

ZHANG, H.D. - CHEN, H.C. - SHAN, L.F. 2006. Study on the relationship between copper, lysyl oxidase and premature rupture of membranes. In: *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2006; 41 (1): 7–11. ISSN 0529-567X.

ANALÝZA A IDENTIFIKÁCIA METABOLITOV IBUPROFÉNU V ĽUDSKOM MOČI KOMBINÁCIOU TECHNÍK KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNEJ SPEKTROMETRIE

ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF IBUPROFEN METABOLITES IN HUMAN URINE WITH COMBINATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY

RADIČOVÁ Monika, MARÁK Jozef, VOJS STAŇOVÁ Andrea

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Bratislava

ABSTRAKT

Farmakokinetická analýza je dôležitou súčasťou procesu výskumu a vývoja liečiv. Počas nej sa kvantitatívne stanovuje jedna alebo viac cieľových látok. Získané farmakokinetické parametre sa aplikujú aj v toxikologických štúdiách na pochopenie vzťahov medzi pôsobením liečiva a jeho toxicitou. Ibuprofén patrí medzi najpoužívanejšie voľne dostupné liečivá na svete a v organizme je značne metabolizovaný. Ibuprofén a jeho metabolity sú z tela vylučované predovšetkým v moči. Touto cestou sa teda priamo dostávajú do odpadových vôd. Liečivá a ich metabolity sú väčšinou veľmi polárne zlúčeniny, ktoré ľahko prechádzajú cez čističky odpadových vôd. Z tohto dôvodu sa monitoringu liečiv a ich metabolitov prikladá stále väčší význam.

Kľúčové slová: Ibuprofén. Metabolity. LC-MS. Moč.

ABSTRACT

Pharmacokinetic analysis is an important part of drug discovery and development. During this process, one or more target substances are determined. Obtained pharmacokinetic data are applied also in toxicology studies to understanding of drug action and its toxicity. Ibuprofen belongs to most used freely available drugs and in the organism is considerably metabolized. Main excretion route of ibuprofen and its metabolites is in urine and this way they are discharged directly to wastewaters. Drugs and their metabolites are generally very polar compounds which readily pass through the treatment plant. Therefore, monitoring of drugs and their metabolites attach more and more importance.

Key words: Ibuprofen. Metabolites. LC-MS. Urine.

ÚVOD

Techniky založené na kombinácii vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou (HPLC-MS) ponúkajú unikátne možnosti v oblasti farmaceutickej analýzy. HPLC-MS techniky sú aplikovateľné na širokú oblasť zlúčenín zaujímavých pre farmaceutický priemysel a majú množstvo analyticky významných vlastností (citlivosť, selektivita, rýchlosť analýzy, cenová efektívnosť). Tieto vlastnosti sa stále zlepšujú, čo má za následok jednoduchšie používanie prístrojov a ich vyššiu spoľahlivosť. Výsledkom tohto vývoja je, že HPLC-MS sa stala preferovanou analytickou metódou pre analýzu látok na stopových koncentračných úrovniach prítomných v zložitých zmesiach. Hlavný potenciál HPLC-MS inštrumentácie spočíva v poskytnutí podstatne lepších analytických možností pre analýzu vo farmaceutickom priemysle ako môže poskytnúť spojenie plynovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS) alebo vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s inými typmi detektorov [1].

Farmaceutické látky sú predovšetkým syntetické chemikálie, navrhnuté produkovať farmakologickú odozvu na špecifických miestach účinku v cieľovom organizme. Od farmaceutík sa vyžaduje určitá chemická stabilita za účelom dosiahnutia týchto miest v organizme v nezmenenej forme. Ich metabolická stabilita je environmentálne preukázaná počas čistenia odpadových vôd, nakoľko sú odolné voči environmentálnej degradácii. Stabilita farmaceutík spolu s ich kontinuálnym prísunom vedie k detegovateľným koncentráciám v povrchových vodách, čo môže predstavovať hrozbu pre vodný ekosystém a potenciálne zdravotné riziko pre ľudí konzumáciou pitnej vody [2 - 4]. Metabolity liečiv si zasluhujú špeciálnu pozornosť, pretože sa môžu vyskytovať vo vyšších koncentráciách ako nezmenené farmaceutiká a ich stanovenie je dôležité pre pochopenie environmentálneho zániku pôvodnej zlúčeniny. Tieto biotransformačné produkty sú obvykle polárnejšie ako pôvodná zlúčenina. Nedostatok komerčne dostupných štandardov však spôsobuje problém pri kvantitatívnej analýze metabolitov [5].

Nesteroidné protizápalové liečivo ibuprofén patrí medzi najpoužívanejšie voľne dostupné liečivá na svete [6]. V skupine neacetylovaných salicylátov patrí medzi neselektívne inhibítory cyklooxygenázy [7]. Používa sa na liečbu rôznych reumatických a muskuloskeletálnych porúch [8], bolesti a horúčky [9]. Je to chirálne liečivo a hoci sa používa vo forme racemickej zmesi, jeho protizápalový účinok je spojený hlavne s S-enantiomérom [8].

Ibuprofén je v organizme značne metabolizovaný [8]. Iba 15% prijatého liečiva sa vylúči ako pôvodná zlúčenina, 26% sa vylúči ako hydroxy- a 43% ako karboxy-ibuprofén [6]. U ľudí pôvodné liečivo ako aj metabolity prechádzajú do fázy II metabolizmu liečiv, kde prebieha ich konjugácia s kyselinou glukurónovou v reakcii, ktorá je stereoselektívna pre S-enantiomér. Dva hlavné metabolity ibuprofénu, 2-hydroxy-ibuprofén a karboxy-ibuprofén, a ich konjugáty s kyselinou glukurónovou sa nachádzajú v moči v množstve približne 58% podanej dávky ibuprofénu, kým dva menšinové metabolity, 1-hydroxy-ibuprofén a 3-hydroxy-ibuprofén a ich glukuronidy sa nachádzajú iba vo veľmi malých koncentráciách [10, 11]. Glukuronidácia je u cicavcov hlavnou metabolickou cestou pre detoxikáciu a elimináciu mnohých xenobiotík. Acylglukuronidové metabolity sa tvoria konjugáciou karboxylovej skupiny liečiva alebo metabolitu s kyselinou glukurónovou. Acylglukuronidy obsahujú esterovú skupinu, ktorá umožňuje hydrolýzu a intramolekulárnu migráciu acylovej skupiny. Hydrolýza acylglukuronidov ich mení na aglykóny. Migrácia acylovej skupiny znamená jej prenos z pozície 1β do pozície C-2, C-3 alebo C-4 vzhľadom na polohu kruhu kyseliny glukurónovej [12]. Navyše α, β anoméry uvedených izomerických acylglukuronidov sa môžu tvoriť mutarotáciou [13]. Konjugácia s kyselinou glukurónovou je katalyzovaná uridínglukuronozyltranferázou. Tieto izomérické acylglukuronidy tvoria kovalentné adukty s proteínmi. Tento jav predstavuje toxikologický problém, pretože v mnohých prípadoch sú vysoko reaktívne a môžu spúšťať imunotoxické reakcie [12].

ODBER A SPRACOVANIE BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

Od 5 zdravých dobrovoľníkov (na základe ich prehlásenia) vo veku 23 až 50 rokov bol pred užitím lieku odobraný moč, ktorý slúžil ako blank. Následne po odbere moču užili dobrovoľníci 1 tabletku lieku Nurofen® StopGrip s obsahom 200 mg ibuprofénu. Od každého dobrovoľníka bola odoberaná vzorka moču v konštantných časových úsekoch (1 hodina) po dobu 6 hodín. Zo získaných vzoriek moču bolo do plastových skúmaviek odobratých 500 µl, ktoré boli zmiešané s 500 µl acetonitrilu a 20 µl 1% kyseliny mravčej. Vzorky boli centrifugované 5 minút pri 10000 rpm a prefiltrované cez striekačkové PVDF mikrofiltre s priemerom pórov 0,45 µm priamo do vialky. Z takto upravenej vzorky bolo do HPLC-MS systému injektovaných 10 µl.

EXPERIMENTÁLNE PODMIENKY

HPLC-MS analýzy vzoriek boli uskutočnené s využitím LCMS-IT-TOF™ analyzátora (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Použitý hmotnostný spektrometer v sebe kombinuje trojdimenzionálnu iónovú pascu (IT), analyzátor doby letu (TOF) a ionizáciu elektrosprejom (ESI). Toto spojenie umožňuje vykonávať citlivé a presné $MS\text{-}MS^n$ merania s vysokým rozlíšením iónov. MS experimenty boli uskutočnené s využitím ESI ionizácie v pozitívnom aj v negatívnom móde. Dáta boli zberané v rozsahu hodnôt m/z 50-1000 a na fragmentáciu v MS^2-MS^3 stupni bol použitý automatický výber iónu v pozitívnom aj v negatívnom móde.

VÝSLEDKY

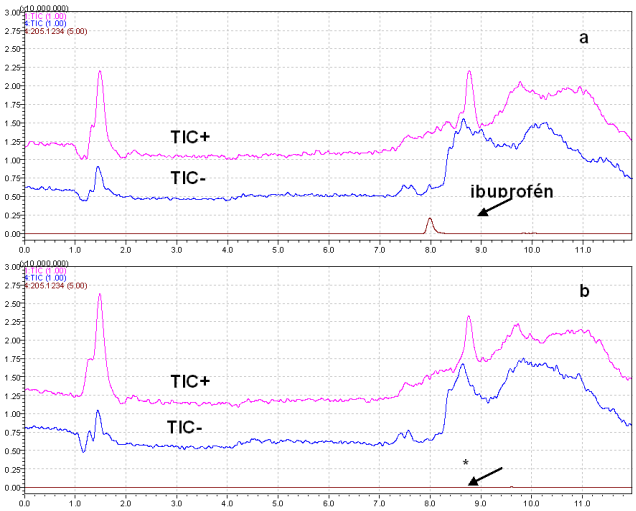
Na identifikáciu potenciálnych metabolitov bol použitý program MetID Solution (Shimadzu), kde ako vstupné údaje slúžia sumárny vzorec metabolizujúcej látky a dáta získané z $MS\text{-}MS^3$ analýz vzoriek moču odobraného v jednotlivých časoch metabolického procesu. Program MetID Solution spracoval všetky HPLC-MS dáta získané analýzou vzoriek moču každého dobrovoľníka, pričom výsledkom tohto procesu bol zoznam potenciálnych očakávaných metabolitov (metabolity, ktoré môžu vzniknúť na báze známych metabolických reakcií vo Fáze I a II metabolických ciest, ktorými sa odbúravajú xenobiotiká [14]) a zoznam neočakávaných metabolitov. Výstupy z programu MetID Solution poskytujú pre daný potenciálny metabolit informáciu o jeho výskyte v jednotlivých vzorkách ako aj v kontrolnej vzorke. Zoznam potenciálnych metabolitov bol dôkladne skontrolovaný, pretože tu je riziko falošne pozitívnych výsledkov. Do úvahy sme preto brali len tie potenciálne metabolity, ktoré sa nachádzali vo vzorkách minimálne troch dobrovoľníkov. Pre každý metabolit je možné zobraziť chromatografický záznam zo vzorky, kde bol daný metabolit zistený, chromatografický záznam z kontrolnej vzorky ako aj izotopický profil daného potenciálneho metabolitu a zhodu tohto izotopického profilu s očakávaným izotopickým profilom metabolitu. Potvrdenie, či sa naozaj jedná o daný očakávaný metabolit sa dá získať z biotransformačných výstupov programu MetID Solu-

tion. Vyhodnotením výstupov programu MetID Solution sme zistili, že hlavnými metabolitmi ibuprofénu, ktoré sa nachádzajú vo vzorkách všetkých dobrovoľníkov, sú hydroxy-ibuprofén a karboxy-ibuprofén vznikajúce vo fáze I metabolizmu liečiv a ibuprofénglukuronid, hydroxy-ibuprofénglukuronid, karboxy-ibuprofénglukuronid a konjugát ibuprofénu s taurínom vznikajúce vo fáze II.

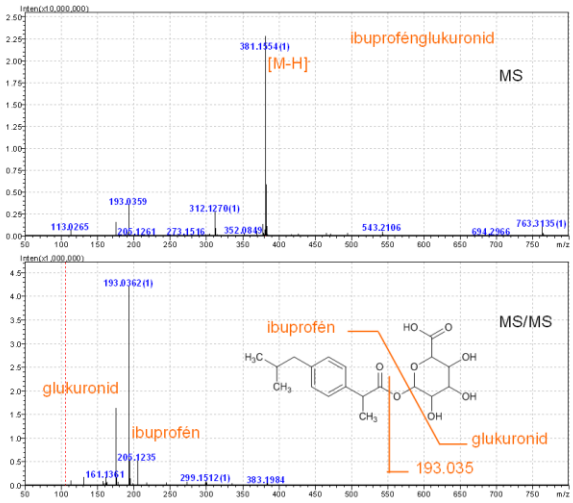
HPLC-MS analýzy boli uskutočnené v obidvoch módoch ionizácie, ale v tejto práci sú vzhľadom na charakter analytov uvádzané iba MS a MS/MS spektrá získané v negatívnom ionizačnom móde. Na obrázku 1 je ukázaný záznam z HPLC-MS analýzy vzorky moču s prídavkom štandardu ibuprofénu (c = 18,1 µmol/L) (obr. 1a) a vzorky moču pred užitím tablety Nurofen® StopGrip (obr. 1b).

Na obrázku 2 je MS a MS/MS spektrum pre metabolit ibuprofénglukuronid. V MS spektre je vidieť dominantný pík s m/z 381,1554, ktorý zodpovedá hmote $[M-H]^-$ iónu ibuprofénglukuronidu. V MS spektre je vidieť aj ióny s m/z 205,1261 a m/z 175,0252, ktorých intenzita je veľmi nízka. Prítomnosť týchto iónov svedčí o rozpade iónu m/z 381,1554 na ión ibuprofénu s m/z 205,1261 a zvyšok molekuly s m/z 175,0252, čo zodpovedá iónu glukuronidu. O tejto hypotéze svedčí aj MS/MS spektrum získané s iónom m/z 381,1554 ako prekurzorom. Prítomnosť iónu s m/z 193,0362 v MS/MS spektre sa dá vysvetliť štiepením molekuly ibuprofénglukuronidu v mieste karboxylovej skupiny ako je ukázané na obrázku 2.

Na obrázku 3 je MS a MS/MS spektrum metabolitu hydroxy-ibuprofénglukuronid. V MS spektre je vidieť dominantný pík s m/z 397,1500, ktorý zodpovedá hmote $[M-H]^-$ iónu hydroxy-ibuprofénglukuronidu. Ako prekurzor pre MS/MS spektrum bol vybraný ión s m/z 397,1500.



Obrázok 1 Totálne iónové chromatogramy (TIC) v pozitívnom a negatívnom móde a extrahovaný iónový chromatogram ibuprofénu v negatívnom ionizačnom móde získané HPLC-MS analýzou ľudského moču s prídavkom ibuprofénu (a) a vzorky moču pred užitím tablety Nurofen® StopGrip (b).



Obrázok 2: MS a MS/MS spektrum zodpovedajúce metabolitu ibuprofénglukuronid získané HPLC-MS analýzou vzorky moču dobrovoľníka č.5 získanej 3 hodiny po aplikácii 1 tablety Nurofen® StopGrip. Na MS/MS analýzu bol vybraný ión m/z 381,1554. MS a MS/MS spektrá boli získané v negatívnom móde ionizácie.

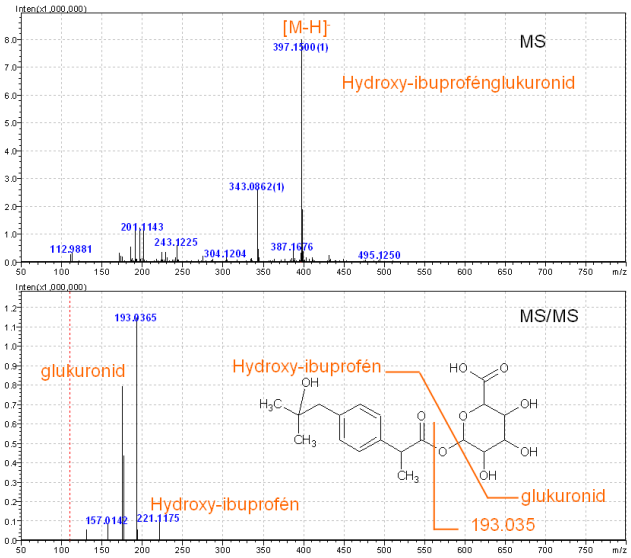
Jeho fragmentáciou bolo získané spektrum, v ktorom dominuje ión s m/z 193,0365. Prítomnosť tohto iónu v spektre svedčí o tom, že ión m/z 397,1500 musí mať vo svojej štruktúre glukuronid a že štiepenie molekuly metabolitu sa deje pravdepodobne v mieste karboxylovej skupiny. V MS/MS spektre sú vidieť tiež píky zodpovedajúce iónom s m/z 221,1175 (hydroxyibuprofén) a m/z 175,0253 (glukuronid).

Analogicky sme postupovali pri rozbore MS a MS/MS spektier zvyšných metabolitov.

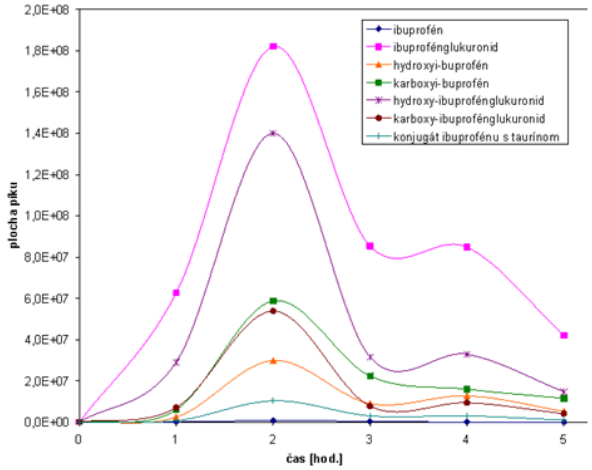
Napriek nemožnosti uskutočniť kvantitatívnu analýzu jednotlivých metabolitov vo vzorkách moču (kvôli nedostupnosti analytických štandardov jednotlivých metabolitov), môžeme považovať odozvu detektora pri MS analýzach s ionizáciou ESI úmernú koncentrácii analytu vo vzorke [15]. Z tohto dôvodu boli z plôch píkov prislúchajúcich

jednotlivým hodnotám m/z pre každý potenciálny metabolit u každého dobrovoľníka zostrojené farmakokinetické krivky (PK-krivky), ktoré sú ukázané na obrázkoch 4 a 5.

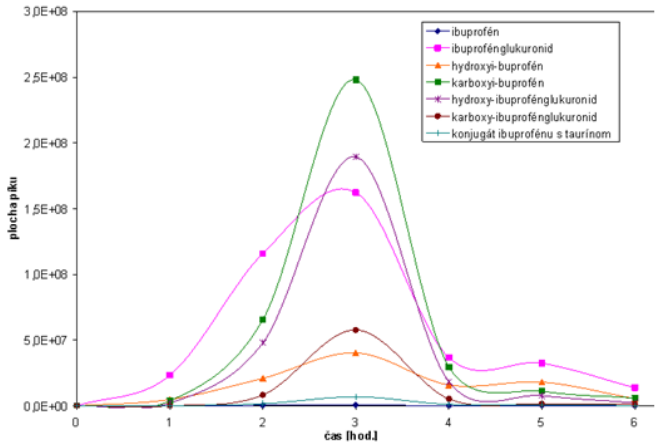
Z farmakokinetických kriviek zostrojených pre jednotlivé metabolity vo vzorkách moču každého dobrovoľníka je zrejmá variabilita ľudského metabolizmu. U obidvoch mužských dobrovoľníkoch (č. 2 a 4) je prevládajúcim metabolitom ibuprofénglukuronid (m/z 381,1555) a za ním nasleduje hydroxy-ibuprofénglukuronid (m/z 397,1504). Dvaja dobrovoľníci sú však príliš malá vzorka na to, aby sa tento poznatok dal zovšeobecniť. U troch ženských dobrovoľníkov (č. 1, 3 a 5) je prevládajúcim metabolitom hydroxyibuprofénglukuronid a o málo menšie hodnoty poskytuje ibuprofénglukuronid. Výnimkou je dobrovoľník č.3, kde dominuje karboxyibuprofén (m/z 235,0976), ale dodatočne sa zistilo, že dotyčný dobrovoľník užíval výživový doplnok na zlepšenie metabolizmu (probiotikum Swiss Natural Sources® s obsahom piatich kmeňov laktobacilov), čomu by nasvedčovala aj prítomnosť najviac oxidovanej formy ibuprofénu.



Obrázok 3: MS a MS/MS spektrum zodpovedajúce metabolitu hydroxy-ibuprofénglukuronid získané HPLC-MS analýzou vzorky moču dobrovoľníka č.5 získanej 3 hodiny po aplikácii 1 tablety Nurofen® StopGrip. Na MS/MS analýzu bol vybraný ión m/z 397,1500. MS a MS/MS spektrá boli získané v negatívnom móde ionizácie.



Obrázok 4 Farmakokinetické krivky ibuprofénu a jeho metabolitov vo vzorkách moču dobrovoľníka č.2



Obrázok 5: Farmakokinetické krivky ibuprofénu a jeho metabolitov vo vzorkách moču dobrovoľníka č.3

U všetkých dobrovoľníkov je vidieť, že pôvodné liečivo sa vylučuje močom vo veľmi nízkej koncentrácii a že dominantné metabolity sú práve potenciálne toxické acylglukuronidy. Najskôr vylučovaným metabolitom je ibuprofénglukuronid, ktorého maximum PK-krivky je posunuté približne o 0,5 hodiny k nižším časom ako sú maximá PK-kriviek ostatných metabolitov. Maximá PK-kriviek u dobrovoľníkov č.1, 2 a 5 sú približne v 2 hodinách po užití tablety Nurofen® StopGrip. Maximá PK-kriviek u dobrovoľníkov č.3 a 4 sú približne v 3 hodinách po užití liečiva, čo môže súvisieť s pomalším metabolizmom v dôsledku veku alebo prípadných zdravotných problémov.

ZÁVER

V tejto práci sme sa zaoberali analýzou liečiva ibuprofén a jeho metabolitov v moči piatich zdravých dobrovoľníkov použitím techniky HPLC-MS^n

po užití 1 tablety Nurofen® StopGrip. Pomocou programu MetID boli spracované HPLC-MS^n dáta získané analýzou všetkých vzoriek a na základe biotranformačných výstupov z tohto programu boli identifikované potenciálne metabolity ibuprofénu, ktorými sú hydroxy-ibuprofén (m/z 221,1183) a karboxy-ibuprofén (m/z 235,0976) vznikajúce vo fáze I metabolizmu látok a ibuprofénglukuronid (m/z 381,1555), hydroxy-ibuprofénglukuronid (m/z 397,1504), karboxy-ibuprofénglukuronid (m/z 411,1297) a konjugát ibuprofénu s taurínom (m/z 312,1275), ktoré vznikajú vo fáze II. Tieto metabolity boli následne potvrdené prostredníctvom MS a MS/MS spektier vo vzorkách moču všetkých piatich dobrovoľníkov.

Pre každý metabolit u každého dobrovoľníka boli zostrojené farmakokinetické krivky z plôch píkov prislúchajúcich jednotlivým metabolitom. Kvantitatívna analýza nebola možná kvôli nedostupnosti štandardov metabolitov. Z farmakokinetických kriviek všetkých dobrovoľníkov vyplýva, že pôvodné liečivo sa vylučuje močom veľmi málo a že dominujúce metabolity sú práve potenciálne toxické acylglukuronidy. Najskôr vylučovaným metabolitom je ibuprofén-glukuronid.

Poďakovanie

Táto práca je výsledkom realizácie projektu (ITMS 26240220061) podporeného OPVaV financovaného ERDF.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

[1] LEE, M. S. 2002, LC/MS applications in drug development, New York: John Wiley & Sons, Inc., 2002. 256. 978-0-471-40520-7.

[2] KOSJEK, T., HEATH, E., PÉREZ, S., PETROVIĆ, M., BARCELÓ, D. 2009. Metabolism studies of diclofenac and clofibric acid in activated sludge bioreactors using liquid chromatography with quadrupole - time-of-flight mass spectrometry. In *Journal of Hydrology*. 0022-1694, 2009, 372, 1-4, 109-117.

[3] STÜLTEN, D., ZÜHLKE, S., LAMSHÖFT, M., SPITELLER, M. 2008. Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. In *Science of the Total Environment*. 0048-9697, 2008, 405, 1-3, 310-316.

[4] STÜLTEN, D., LAMSHÖFT, M., ZÜHLKE, S., SPITELLER, M. 2008. Isolation and characterization of a new human urinary metabolite of diclofenac applying LC–NMR–MS and high-resolution mass analyses. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 0731-7085, 2008, 47, 2, 371-376.

[5] PÉREZ, S., BARCELÓ, D. 2007. Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. In *Trends in Analytical Chemistry*. 0165-9936, 2007, 26, 6, 494-514.

[6] WEIGEL, S., BERGER, U., JENSEN, E., KALLENBORN, R., THORESEN, H., HÜHNERFUSS, H. 2004. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. In *Chemosphere*. 0045-6535, 2004, 56, 6, 583-592.

[7] KATZUNG, B. G. (Ed.) 2007. Basic & Clinical Pharmacology, 10. vydanie, New York: McGraw-Hill Companies, Inc., 2007. 1088. 0071451536.

[8] BONATO, P. S., DEL LAMA, M. P. F.M., DE CARVALHO, R. 2003. Enantioselective determination of ibuprofen in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. In *Journal of Cromatography B*. 1570-0232, 2003, 796, 2, 413-420.

[9] AUGUSTI, D. V., AUGUSTI, R. 2005. Determination of the enantiomeric composition of ibuprofen solutions via a rapid and sensitive mass spectrometry method. In *Tetrahedron: Asymmetry*. 0957-4166, 2005, 16, 10, 1881-1885.

[10] DE OLIVEIRA, A. R. M., DE SANTANA, F. J. M., BONATO, P. S. 2005. Stereoselective determination of the major ibuprofen metabolites in human urine by off-line coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography. In *Analytica Chimica Acta*. 0003-2670, 2005, 538, 1-2, 25-34.

[11] HAMMAN, M. A., THOMPSON, G. A., HALL, S. D. 1997. Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human cytochrome P450 2C. In *Biochemical Pharmacology*. 0006-2952, 1997, 54, 1, 33-41.

[12] KORFMACHER, W.A. (Ed.) 2005. Using mass spectrometry for drug metabolism studies.

New York: CRC PRESS, 2005. 384. 978-0-471-75158-8.

[13] BAILEY, M. J., DICKINSON, R. G. 2003. Acyl glucuronide reactivity in perspective: biological consequences. In *Chemico-Biological Interactions*. 0009-2797, 2003, 145, 2, 117-137.

[14] CRAIG, C. R., STITZEL, R. E. 2004. Modern pharmacology with clinical applications,6. vydanie. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 824. 978-0-7817-3762-1.

[15] ARDREY, R. E. 2003. Liquid chromatography - mass spectrometry: An introduction, Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2003. 300. 978-0-471-49801-8.

VZÁJOMNÉ POROVNANIE ROVNÍC VYUŽÍVANÝCH PRE ODHAD GLOMERULÁRNEJ FILTRÁCIE (GRUBB, STEVENS, MDRD) U PACIENTOV S OCHORENÍM DIABETES MELLITUS

INTERCOMPARISONS OF EQUATIONS USED FOR ESTIMATION OF THE GLOMERULAR FILTRATION RATE (GRUBB, STEVENS, MDRD) IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS

MÚČKOVÁ Ľubica[1], NETRIOVÁ Jana[2,3]

[1] *Fakulta vojenského zdravotnictví, Centrum pokročilých štúdií, Hradec Králové, Česká republika*
[2] *Nemocnica sv. Michala, a.s., Bratislava, Slovenská republika*
[3] *Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alxeandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín, Slovenská republika*

ABSTRAKT
Diabetická nefropatia sa radí medzi mikrovaskulárne komplikácie ochorenia diabetes mellitus. V laboratórnej diagnostike sme sa zamerali na parametre cystatín C a kreatinín. Glomerulárnu filtráciu (GF) sme odhadli rovnicami podľa Grubba, Stevensa a MDRD. Rovnice podľa Grubba a Stevensa využívajú pre odhad GF cystatín C, MDRD rovnice využívajú kreatinín, ureu a albumín. Parametre sme hodnotili v súbore 183 pacientov. Pacientov s diabetom 1. typu bolo 49 a s diabetom 2. typu 134. Hlavným cieľom práce bolo zhodnotiť jednotlivé rovnice využívané pre odhad GF, určiť ich výhody a nevýhody a porovnať GF (Grubb, Stevens a MDRD) navzájom. U pacientov s DM1 sme zistili mierne silnú závislosť medzi GF podľa Grubba, Stevensa a MDRD. V druhom súbore (DM2) sme zistili veľmi silnú závislosť medzi GF (Grubb, Stevens) a MDRD.

Kľúčové slová: diabetická nefropatia, glomerulárna filtrácia, kreatinín, cystatín C

ABSTRACT
Diabetic nephropathy is microvascular complication of disease diabetes mellitus. In laboratory diagnostic we focussed on parameters cystatin C and creatinine. We estimated a glomerular filtration with Grubb, Stevens and MDRD equations. The Grubb and Stevens equations use cystatin C to determine the glomerular fitrlation rate (GFR), MDRD equations use creatinine, albumin and urea. The parameters were measured in file of 183 patients. Number of pacients with diabetes I.type was 49 and with diabetes II.type was 134. The main intention of this work was to evaluate equations used for determination of GFR, to compare their pros and cons and put them in contrast. In case of the patients suffering from DM1, the moderate correlation between GFR according to Grubb, Stevens and MDRD was established. In second file (DM2) we observed very strong correlation between GFR (Grubb, Stevens) and MDRD.

Key words: diabetic nephropathy, glomerular filtration, cystatin C, creatinine

ÚVOD

Diabetická nefropatia (DN) je chronická komplikácia oboch základných typov diabetu (DM1 a DM2). Predstavuje najčastejšiu príčinu konečného štádia ochorenia obličiek (End Stage Renal Disease - ESRD) a zodpovedá za vysokú mortalitu diabetických pacientov. Je to syndróm charakterizovaný pretrvávajúcou albuminúriou - > 300mg / 24h, ktorá musí byť preukázaná minimálne v dvoch stanoveniach, medzi ktorými uplynula doba približne 3 až 6 mesiacov. Pre DN je charakteristický stabilný pokles glomerulárnej filtrácie (GF) a zvýšenie krvného tlaku [1]. V závislosti od množstva vylúčeného albumínu obličkami rozoznávame normoalbuminúriu, mikroalbuminúriu a makroalbuminúriu (Tab. 1) [2].

Tabuľka 1 Rozdelenie albuminúrie

	µg/min	mg/24h
Normoalbuminúria	< 20	< 30
Mikroalbuminúria	20 – 200	30 – 300
Makroalbuminúria	> 200	> 300

Najnovšie rozdelenie DN bolo publikované v roku 2010 v časopise Journal of the American Society of Nephrology. Na podklade nálezov biopsie obličiek rozdelila skupina lekárov DN na:

- trieda I – zhrubnutie glomerulárnej bazálnej membrány,
- trieda II s podtriedami IIa (mierna mezangiálna expanzia) a IIb (závažná mezangiálna expanzia),
- trieda III – Kimmelstielove - Wilsonove lézie (nodulárna skleróza),
- trieda IV – diabetická glomerulosklerózа v pokročilom štádiu [3].

Pri laboratórnej diagnostike DN je možné využitie viacerých rovníc, ktoré pre odhad GF využívajú rôzne parametre, ako albumín, ureu, kreatinín a taktiež cystatín C. Tieto rovnice sú často korigo-

vané faktormi, ktoré sa vzťahujú na vek, pohlavie a aj etnickú príslušnosť pacienta. Jednou z najčastejšie využívaných rovníc pre odhad GF je rovnica, ktorá bola prevzatá z multicentrickej štúdie zaoberajúcej sa vplyvom nízkoproteínovej diéty na rýchlosť rozvoja chronického ochorenia obličiek (Modification of Diet in Renal Disease – MDRD). Autormi štúdie bol navrhnutý vzorec pre odhad GF, ktorý vychádza z analýzy na podklade koncentrácie kreatinínu, močoviny a albumínu v sére spolu so základnými demografickými veličinami. Na základe počtu laboratórnych parametrov, ktoré sa použijú, možno použiť jedno-, dvoj- alebo trojparametrovú modifikáciu rovnice MDRD [4].

Tabuľka 2 MDRD rovnice pre výpočet GF [4]

3-parametrová (MDRD1)	GFR = 2,83 x (S-Krea x 0,0113)$^{-0,999}$ x vek$^{-0,176}$ x (S-Urea x 2,8)$^{-0,17}$ x (S-Alb/10)^{0,318} x F
2-parametrová (MDRD2)	GFR = 4,5 x (S-Krea x 0,0113)$^{-1,007}$ x vek $^{-0,180}$ x (S-Urea x 2,8)$^{-0,169}$ x F
1-parametrová (MDRD3)	GFR = 3,1 x (S-Krea x 0,0113)$^{-1,154}$ x vek$^{-0,203}$ x F

Legenda: S-Krea je hladina sérového kreatinínu udávaná v µmol/l, S-Urea je hladina močoviny v sére udávaná v mmol/l a S-Alb je hladina sérového albumínu udávaná v g/l, faktor F je v modifikácií MDRD1 a MDRD2 pre mužov 1,0 a pre ženy 0,762. V modifikácií MDRD3 je tento faktor pre mužov taktiež 1,0, ale pre ženy 0,742.

Ďalším možným parametrom, ktorý možno použiť pre stanovenie GF je cystatín C (CysC). CysC je nízkomolekulárny neglykozylovaný proteín zložený zo 120 aminokyselín. CysC je voľne filtrovaný cez glomerulus. Podobne ako ostatné nízkomolekulárne proteíny je reabsorbovaný v proximálnom tubule. Nepodlieha tubulárnej sekrécií a jeho extrarenálna eliminácia je minimálna. Preto je jeho koncentrácia v krvi plne závislá od stavu GF. Hladina CysC v krvi nie je ovplyvnená stravou, nutričným stavom, zápalovými alebo malígnymi ochoreniami. Jeho koncentrácia nie je závislá na svalovej hmote, pohlaví, veku a rase. Z týchto dôvodov je možné používať CysC ako alternatívu kreatinínu a klírensu kreatinínu k stanoveniu GF. Rôzne štúdie potvrdili, že CysC má vyššiu citlivosť pre odhad zníženej GF ako kreatinín. Koncentrácia CysC v sére sa zvyšuje už pri mierne zníženej GF, koncentrácia začína pomerne rýchlo stúpať aj pri akútnom poškodení obličiek [5, 6]. Pre odhad GF pomocou sérovej koncentrácie CysC existuje veľké množstvo rovníc. Najbežnejšie používanou je rovnica, ktorú modifikoval Grubb v roku 2005 [7]:

$$\mathbf{GFR\ (ml/s) = 1{,}4115 \times S\text{-}CysC^{-1{,}680} \times F \times D}$$

kde GFR je glomerulárna filtrácia, S-CysC je cystatín C udávaný v mg/l, F (0,948) je faktor pre ženy, D (1,384) je faktor pre dieťa do 14 rokov.

Grubb modifikoval danú rovnicu aj pre určenie GF v ml/min s prepočtom na štandardný povrch tela [8]:

$$\mathbf{GFR\ (ml/min/1.73\ m^2) = 84.69 \times S\text{-}CysC^{-1{,}68} \times D}$$

kde GFR je glomerulárna filtrácia, S-CysC je cystatín C udávaný v mg/l, D (1,384) je faktor pre dieťa do 14 rokov.

Ďalšie rovnice pre výpočet GF pomocou cystatínu C formuloval Stevens. Prvá rovnica podľa Stevensa je bez akejkoľvek korekcie:

$$\mathbf{GFR\ (ml/s) = 1{,}28 \times S\text{-}CysC^{-1{,}19}}$$

kde GFR je glomerulárna filtrácia, S-CysC je cystatín C v sére udávaný v mg/l

Ďalšia rovnica, ktorú modifikoval Stevens obsahuje už korekcie na vek, pohlavie a etnikum [9]:

$$\mathbf{GFR\ (ml/s) = 2{,}18 \times S\text{-}CysC^{-1{,}17} \times vek^{-0{,}13} \times F}$$

kde GFR je glomerulárna filtrácia, S-CysC je cystatín C v sére udávaný v mg/l, vek je udávaný v rokoch a F je faktor, ktorý je pre ženy 0,91 a pre černochov 1,06.

MATERIÁL A METÓDY

Výberový súbor bol tvorený 183 pacientmi z diabetologickej ambulancie s ochorením diabetes mellitus. Pre posúdenie funkcie obličiek boli u pacientov stanovené CysC, Krea, Alb a Urea v sére. Analýzy vzoriek krvi boli realizované na Oddelení klinickej biochémie a hematológie Nemocnice svätého Michala, a. s. v Bratislave od 15.7.2013 do 2.8.2013. Pre analýzu biologického materiálu bol použitý analyzátor COBAS 6000 a metódy, ktoré

boli použité k stanoveniu sledovaných parametrov, boli založené na imunoturbidimetrickom alebo fotometrickom princípe.

VÝSLEDKY

V prvom kroku sme rozdelili pacientov na základe ich diagnózy. Z celkového množstva 183 pacientov bolo 49 diabetikov 1. typu (E10.9) a 134 diabetikov 2. typu (E11.9). Pacientov s diagnózou E10.9 sme rozdelili na základe ich GF. Z MDRD rovníc sme pre toto porovnanie vybrali rovnicu MDRD1, nakoľko je v bežnej praxi najčastejšie používaná. V tabuľke 3 sme GF získanú z rovnice podľa Grubba a MDRD1 delili podľa toho, či bola normálna, zvýšená alebo znížená.

Popisná štatistika súboru pacientov s DM1 vzhľadom na GF je v tabuľke 4.

Tabuľka 3 Rozdelenie pacientov (E10.9) na základe ich GF (Grubb vs. MDRD1, Stevens vs. MDRD1)

GF Grubb	MDRD1				GF Stevens	MDRD1		
	N	↑	↓			N	↑	↓
N	2	1	20		N	4	1	28
↑	6	2	10		↑	4	2	3
↓	0	0	8		↓	0	0	7

Legenda: GF Grubb – glomerulárna filtrácia vypočítaná zo sérovej koncentrácie CysC rovnicou podľa Grubba, GF Stevens - glomerulárna filtrácia vypočítaná zo sérovej koncentrácie CysC rovnicou podľa Stevensa, N – normálna GF, ↑ - zvýšená GF, ↓ - Znížená GF

Tabuľka 4 Popisná štatistika súboru DM1 na základe vypočítanej GF (CysC a MDRD)

Súbor	Parameter	n	$\bar{x}$	Sd	x_m	min.	max.
DM1	GF Grubb	49	1,64	0,80	1,29	0,46	3,85
	GF Stevens	49	1,38	0,48	1,20	0,56	2,60
	MDRD1	49	1,23	0,46	1,30	0,43	2,94

Legenda: n – počet, $\bar{x}$ - priemer, Sd – smerodajná odchýlka, x_m – medián, min. – minimálne GF (ml/s), max. – maximálna GF (ml/s)

Následne sme testovali zhodu a vzájomnú závislosť parametrov GF voči MDRD. Zhodu vlastností sledovaných premenných sme testovali neparametrického Wilcoxonovho testu. Vzájomnú závislosť sme odhadovali na základe výpočtu neparametrického Spearmanovho korelačného koeficientu.

Výsledky testovania súboru DM1 sú uvedené v tabuľke 5. Z údajov v tabuľke vidno, že rozdiely medzi GF Stevens a MDRD 1-3 boli štatisticky veľmi významné ($p < 0,01$), pričom korelačný koeficient sa pohyboval v rozmedzí 0,49 – 0,52. Testovanie GF Grubb s uvedenými parametrami MDRD 1 - 3 vykazovalo v podstate rovnaké hodnoty, ako pri štatistickom porovnaní glomerulárnej filtrácie odhadnutej pomocou rovnice podľa Stevensa a rovníc MDRD. Na základe získaných výsledkov možno skonštatovať, že v súbore DM1 hodnoty GF získanými pomocou rovníc podľa Grubba a Stevensa sú v porovnaní s hodnotami MDRD vyššie, čo sa týka aritmetického priemeru (tab. 4), v prípade mediánu je to vyvážené. Z uvedených výsledkov vyplýva, že parametre majú rôzne vlastnosti a medzi nimi existuje iba stredne silná závislosť.

Tabuľka 5 Porovnanie GF Grubb a GF Stevens s MDRD1-2-3 v skupine DM1

Štatistické testovanie	GF Grubb versus:			GF Stevens versus:		
	MDRD1	MDRD2	MDRD3	MDRD1	MDRD2	MDRD3
P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,009	0,004	0,002
R	0,50	0,49	0,47	0,52	0,50	0,49

Legenda: *p*-hodnota testovacieho kritéria neparametrického párového Wilcoxonovho testu; *R* – neparametrický Spearmanov korelačný koeficient.

Aj pacientov s DM2 sme rozdelili na základe ich zmeny v GF (normálna, zvýšená, znížená) (Tab. 6).

Popisná štatistika súboru pacientov s DM2 vzhľadom na GF je v tabuľke 7.

Tabuľka 6 Rozdelenie pacientov (E11.9) na základe ich GF (Grubb vs. MDRD1, Stevens vs. MDRD1)

GF Grubb	MDRD1				GF Stevens	MDRD1		
	N	↑	↓			N	↑	↓
N	1	0	44		N	3	1	56
↑	18	4	44		↑	16	3	31
↓	0	0	23		↓	0	0	24

Legenda: GF Grubb – glomerulárna filtrácia vypočítaná zo sérovej koncentrácie CysC rovnicou podľa Grubba, GF Stevens - glomerulárna filtrácia vypočítaná zo sérovej koncentrácie CysC rovnicou podľa Stevensa, N – normálna GF, ↑ - zvýšená GF, ↓ - Znížená GF

Tabuľka 7 Popisná štatistika súboru DM2 na základe vypočítanej GF (Cys-C a MDRD)

Súbor	Parameter	N	$\bar{x}$	Sd	x_m	min.	max.
DM2	GF Grubb	134	1,9	0,97	1,72	0,12	4,15
	GF Stevens	134	1,54	0,59	1,45	0,22	2,79
	MDRD1	134	1,18	0,37	1,22	0,16	1,99

Legenda: n – počet, $\bar{x}$ - priemer, Sd – smerodajná odchýlka, x_m – medián, min. – minimálne GF (ml/s), max. – maximálna GF (ml/s)

Výsledky testovania súboru DM2 sú čiastočne zhodné so súborom DM1 v prípade štatisticky významných rozdielov medzi GF (Grubb a Stevens) a MDRD ($p < 0,01$) (tab. 8), aritmetický priemer aj medián parametrov GF (Grubb a Stevens) väčšie ako u MDRD. Významným rozdielom je zvýšenie miery závislosti medzi všetkými sledovanými premennými, ktorá sa pohybuje v rozmedzí korelačného koeficienta 0,72 - 0,76. Môžeme hodnotiť, že v súbore DM2 sú rozdiely medzi GF (Grubb a Stevens) a MDRD parametrami štatisticky veľmi významné, avšak pomerne silne vzájomne závislé.

Tabuľlka 8 Porovnanie GF Grubb a GF Stevens s MDRD1-2-3 v skupine DM2

Štatistické testovanie	GFR Gubb versus:			GFR Stevens versus:		
	MDRD1	MDRD2	MDRD3	MDRD1	MDRD2	MDRD3
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
R	0,74	0,73	0,75	0,75	0,73	0,76

Legenda: *p*-hodnota testovacieho kritéria neparametrického párového Wilcoxonovho testu; *R* – neparametrický Spearmanov korelačný koeficient.

DISKUSIA

Za hlavný cieľ predkladanej práce sme stanovili porovnanie jednotlivých rovníc, ktoré sú využívané pre odhad GF. V práci sme sa zamerali na rovnice podľa Grubba a Stevensa, ktoré využívajú pre určenie GF CysC a na rovnice MDRD 1, 2, 3, ktoré využívajú sérové koncentrácie kreatinínu, urey a albumínu. Dôležité je podotknúť, že rovnice MDRD sú nastavené prísnejšie, čo sa týka odhadu GF [9]. To však môže viesť k neskorému záchytu počiatočných štádií poškodenia glomerulárneho filtra. U pacientov s DM1 v našom súbore sme zistili, že podľa MDRD mala zníženú GF už väčšina pacientov v porovnaní s Grubbovou aj Stevensovou rovnicou, kedy bola GF ešte normálna po prípade už zvýšená. Rovnaký jav sme mohli pozorovať aj u skupiny pacientov s DM2 (tab. 3, 6) Táto výrazná citlivosť rovnice MDRD môže viesť k tomu, že sa prehliadnu počiatočné štádiá poškodenia glomerulárneho filtra, kedy sa GF začína najskôr zvyšovať a až potom postupne znižovať. V skupine diabetikov 2. typu je možné pozorovať aj jav, kedy sa GF vypočítaná podľa Grubba a Stevensa začína zvyšovať, zatiaľ čo podľa rovníc MDRD bola normálna po prípade znížená (tab. 6). Na základe tohto zistenia by sme mohli tvrdiť, že CysC je citlivejším markerom pre odhad počiatočných štádií obličkového zlyhávania. Avšak nemôžeme si dovoliť vyvodiť určitý záver, nakoľko nami vyšetrovaný súbor nebol tvorený veľkým počtom pacientov. K záveru, že CysC je citlivejším markerom pre odhad počiatočných štádií zlyhávania obličiek dospeli vo svojich publikáciach aj iní autori [10 - 12]. Dôležité je upozorniť aj na fakt, že hlavnou nevýhodou rovníc MDRD je, že sérové hladiny kreatinínu, albumínu a urey nie sú len funkciou glomerulárneho filtra. Sú ovplyvňované ďalším nerenálnymi faktormi.

Ako je známe z viacerých zdrojov, v prípade kreatinínu je to hlavne svalová hmota, mäsitá strava, zvýšená fyzická námaha. V prípade albumínu môže jeho koncentráciu ovplyvňovať (zníženie) hlavne poškodenie pečene, zápalové a nádorové ochorenia, septické stavy. Koncentrácia močoviny je taktiež závislá na viacerých faktoroch. K zvýšeniu dochádza hlavne pri zvýšenom odbúravaní bielkovín v organizme, pri nadmernom príjme bielkovinovej stravy, k zníženiu pri nedostatočnom príjme proteínov a pri nedostatočnej funkcii pečene. Oproti tomu sérové hladiny CysC nie sú skresľované toľkými nerenálnymi faktormi. Nevýhodou CysC môže byť hlavne vyššia cena stanovenia oproti kreatinínu, urey a albumínu. Jednou z nevýhod môže byť aj ovplyvnenie sérovej koncentrácie CysC funkciou štítnej žľazy. Avšak táto interferencia by nemala byť výrazným problémom pri odhade GF, nakoľko ošetrujúci lekár má záznamy o svojom pacientovi a môže v prípade vedomosti o hypertyreodizme alebo hypotyreodizme tento vplyv ozrejmiť.

ZÁVER

V závere predkladanej práce môžeme konštatovať, že v laboratórnej diagnostike poškodenia obličiek je ešte stále mnoho otáznikov. Oba parametre – cystatín C aj kreatinín – majú svoje obmedzenia, výhody a nevýhody. Z toho vyplýva, že stále nie je k dispozícií ideálny marker pre odhad poškodenia glomerulárneho filtra. Je nutné pri každom pacientovi posudzovať všetky získané hodnoty glomerulárnych filtrácií individuálne a brať ohľad aj na ich celkovú anamnézu a klinický priebeh ochorenia. Interpretácia laboratórnych nálezov by mala brať do úvahy všetky poznatky o oboch najčastejšie využívaných parametroch, čo sa týka hlavne ich špecifity. Dôležité je zamerať na sa aj nízku senzitivitu MDRD voči skorým štádiám poškodenia glomerulárneho filtra a rovnako aj prísnejšie hodnotenie rozvoja diabetickej nefropatie. Z toho dôvodu by sa mal častejšie využívať v bežnej klinickej praxi aj CysC, ktorý umožňuje presnejší záchyt skorých štádií zlyhávania obličiek. Ako sme zistili v experimentálnej časti, medzi parametrami (CysC a kreatinín) sú značné rozdiely, preto by mohla byť najvhodnejšou alternatívou pre stanovenie odhadu GF u pacientov s diabetom kombinácia oboch týchto biomarkerov.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

[1] JENNETTE J. Ch. (2007) Heptinstall's Pathology of the Kidney, Lippincott Williams & Wilkins, USA, str. 803 – 804

[2] SHAW K. M., CUMMINGS M. H (2012) Diabetes: Chronic complications, John Wiley & Sons, United Kingdom, str. 36

[3] KRČMÉRY S. a kol. (2012) Novšie aspekty antihypertenzívnej liečby u pacientov s diabetickou nefropatiou, Forum diab 2012; 1 (1): 32 - 35

[4] TEPLAN V. a kol. (2010) Akutní poškození a selhání ledvin v klinické medicíne, Grada Publishing a.s., Praha, str. 92 - 95

[5] HERGET-ROSENTHAL S. a kol. (2007) How to estimate GFR-serum creatinine, serum cystatin C or equations, Elsevier, Clinical Biochemistry 40 (2007) 153–161, Dostupné z: http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.10.014

[6] BISHOP M. L., FODY E. P., SCHOEFF L. E., (2013) Clinical Chemistry: Principles, Techniques and Corelations, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, str. 220, 229, 252 – 256

[7] JABOR A. a kol. (2008) Vnitřní lékarství, Grada Publishing a.s., Praha, str. 234 - 235

[8] SHARMA A. P. a kol. (2011) Diagnostic Accuracy of Cystatin C–Based eGFR Equations at Different GFR Levels in Children, Clin J Am Soc Nephrol 6: 1599–1608, 2011. (DOI: 10.2215/CJN.10161110)

[9] RÁCZ a kol. (2010) Je stanovenie glomerulárnej filtrácie naozaj také jednoduché?, Labor Aktuell 04/10, Košice, str. 7 – 13

[10] MUSSAP M. a kol. (2002) Cystatin C is a more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients, Kidney International 61, 1453 – 1461, (DOI:10.1046/j.1523-1755.2002.00253.x)

[11] SHIMIZU – TOKIWA A. a kol. (2002) Serum cystatin C is a more sensitive marker of glomerular function than serum creatinine, Nephron; 92: 224 – 226, (DOI:10.1159/000064453)

[12] CHRISTENSSON A. a kol. (2003), Serum cystatin C is a more sensitive and more accurate marker of glomerular filtration rate than enzymatic measurements of creatinine in renal transplantation, Nephron Physiol 2003; 94:p19–p27 (DOI:10.1159/000071287)

AKO RÝCHLO SA ELIMINUJE MORFÍN U ONKOLOGICKÝCH PACIENTOV?
HOW FAST CAN BE MORPHINE ELIMINATED IN ONCOLOGY PATIENTS?

NETRIOVÁ Jana

[1] *Oddelenie klinickej biochémie a hematológie, Nemocnica svätého Michala, Bratislava*
[2] *Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alxeandra Dubčeka v Trenčíne*

ABSTRAKT
Prioritné postavenie v liečbe stredne silnej a silnej, hlavne nádorovej bolesti, zaujíma morfín, ktorý je základným liekom na treťom stupni analgetickej stupnice vypracovanej Svetovou zdravotníckou organizáciou. Cieľom práce bolo zistiť, či existujú rozdiely v rýchlosti eliminácie morfínu pri detoxikačnej liečbe a pri zmene analgetickej liečby onkologického pacienta. Rýchlosť odburávania morfínu (M) a jeho dvoch základných metabolitov morfín-3-glukuronidu (M3G) a morfín-6-glukuronidu (M6G) sa nám podarilo sledovať u dvoch pacientov s onkologickým ochorením v analgetickej liečbe opiátmi. V porovnaní s rýchlosťou odbúravania sledovaných analytov u zdravých dobrovoľníkov sme zistili, že rýchlosť eliminácie M, M3G a M6G bola asi polovičná.

Kľúčové slová: Morfín. Morfín-3-glukuronid. Morfín-6-glukuronid.

ABSTRACT
Priority in the treatment of moderate to severe, particularly cancer pain, takes morphine, which is essential medicines for the third stage of the analgesic scale developed by the World Health Organization.The aim of the study was to determine whether there are differences in the rate of elimination of morphine in detoxification treatment and when changing analgesic therapy in cancer patients. The degradation rate of morphine (M) and its two metabolites morphine-3-glucuronide (M3G) and morphine-6-glucuronide (M6G), we managed to track in two patients with cancer in the treatment of opioid analgesic. Compared to the degradation rate of the analyte in healthy volunteers, we determined that the rate of elimination M, M3G and M6G was about half.

Key words: Morphine. Morphine-3-glucuronide. Morphine-6-glucuronide.

ÚVOD

Pri zvládnutí bolesti sprevádzajúcej ochorenia sú základom liečby analgetické prípravky. Liečebná stratégia spočíva v aplikácii analgetík podľa postupov upravených pre potreby jednotlivých pacientov.

Prioritné postavenie v liečbe stredne silnej a silnej, hlavne nádorovej bolesti, zaujíma morfín, ktorý je základným liekom na treťom stupni analgetickej stupnice vypracovanej Svetovou zdravotníckou organizáciou. Ako analgetikum sa začal používať v roku 1884, ale v ambulantnej praxi dlhé roky nenašiel širšie uplatnenie. Až nové poznatky z oblasti farmakokinetiky a výsledky štúdií zaoberajúcich sa toxicitou, viedli k jeho opätovnému návratu do praxe. V súčasnosti je morfín jeden z najpoužívanejších opioidov.

Farmakologické efekty morfínových analgetík vznikajú ich naviazaním na opioidové receptory nachádzajúce sa po celom ľudskom tele. Na vyvolanie analgetického účinku sa za najdôležitejšie považujú μ- a κ-receptory.

Doteraz publikované farmakologické štúdie neukázali žiaden priamy vzťah medzi plazmatickou koncentráciou morfínu a jeho analgetickým pôsobením, ale môžeme v nich nájsť vzťahy medzi vyvolanou analgéziou alebo rezistenciou na morfín v dôsledku metabolizácie aplikovaného liečiva.

Po podaní sa morfín (M) metabolizuje v pečeni za vzniku dvoch hlavných metabolitov, a to analgeticky neúčinného morfín-3-glukuronidu (M3G), ktorého produkcia prevláda nad analgeticky účinným morfín-6-glukuronidom (M6G). Ďalšími metabolitmi sú morfím-3-sulfát, normorfín a morfín-N-oxid.

Pri morfínovej terapii tíšenia bolesti M3G a M6G zohrávajú dôležitú úlohu. M6G má podobnú afinitu k opioidovým receptorom ako M a vykazuje analgetický účinok, M3G má veľmi nízku afinitu alebo nemá žiadnu afinitu k týmto receptorom, preto sa u neho analgetický účinok neprejavuje.

Účinná sérová koncentrácia morfínu pre tlmenie bolesti sa pohybuje v rozsahu 17 – 60 ng/ml.

Veľkou nevýhodou použitia morfínu je jeho krátke pôsobenie (3 – 6h), čo vyžaduje opakované podávanie. Injekčné a bežne perorálne podávané prípravky sa najčastejšie dávkujú v 4-hodinovom intervale.

Zavedenie morfínových tabliet s riadeným uvoľňovaním, pri ktorých je odporúčaný dávkovací interval 8 – 12 hodín, predstavuje pre liečbu bolesti pri nádorových ochoreniach podstatný pokrok. I napriek tomu sa pridružujú určité nevýhody ako je kolísanie koncentrácie morfínu.

CIEĽ

Cieľom predkladanej práce bolo zistiť, či existujú rozdiely v rýchlosti eliminácie morfínu pri detoxikačnej liečbe a pri zmene analgetickej liečby onkologického pacienta.

METÓDA

Na stanovenie morfínu a jeho glukuronidov v sére bola použitá metóda HPLC. Separácia bola uskutočnená na Symmetry C18 kolóne, mobilná fáza obsahovala 8% ACN a 92% (30 mmol/l KH_2PO_4, pH 3,0) s ión-párovým činidlom, prietok bol 0,80 ml/min. Na detekciu bol použitý UV detektor pri 210 nm. Sérové proteíny boli odstránené SPE na kolónkach Chromabond C18ec.

VÝSLEDKY

Sledovanie rýchlosti eliminácie morfínu a jeho glukuronidov pri zahájení detoxikačnej liečby

Sledovali sme, či M, M3G a M6G sa odbúravajú podľa kinetickej závislosti 1. poriadku:

$$\ln c/c_o = f(t),\ \tau = \ln 2/k$$

alebo podľa kinetickej závislosti 2. poriadku:

$$1/c = f(t),\ \tau = 1/k.c_o$$

Z nameraných hodnôt boli lineárnou regresiou vypočítané lineárne závislosti (y = a + bx) pre 1. a 2. poriadok odbúrania sledovaných analytov. Vypočítané parametre sú uvedené v tabuľke 1a a 1b.

Absolútna hodnota korelačného koeficientu kinetickej závislosti 1. poriadku je väčšia ako absolútna hodnota korelačného koeficientu kinetickej závislosti 2. poriadku pre všetky sledované parametre. Z toho vyplýva, že preloženie priamky nameranými bodmi podľa kinetickej závislosti 1. poriadku bolo lepšie („tesnejšie“) a možno usudzovať, že M, M3G aj M6G sa odbúravajú podľa kinetickej závislosti 1. poriadku.

O nevhodnosti voľby modelu odbúrania M, M3G a M6G podľa kinetickej závislosti 2. poriadku vypovedajú aj vypočítané hodnoty biologického polčasu (tab. 1b), ktoré boli záporné, čo je v rozpore s realitou.

Tabuľka 1 Parametre krivky kinetickej závislosti: **a** 1. poriadku pre M, M3G a M6G ($\ln c = c_o - kt$), **b** 2. poriadku pre M, M3G a M6G ($1/c = 1/c_o + kt$)

1a

Analyt	a	$s_a = \pm$	b (h)	$s_b = \pm$	r	k (h^{-1})	τ (h)	$s_\tau = \pm$
M	5,48	0,003	- 0,116	$1,184.10^{-3}$	- 0,992	0,116	5,98	0,09
M3G	11,37	0,045	- 0,146	$1,900.10^{-3}$	- 0,994	0,146	4,74	0,06
M6G	9,49	0,030	- 0,145	$4,320.10^{-3}$	- 0,996	0,145	4,78	0,14

1b

Analyt	a ($ml.ng^{-1}$)	$s_a = \pm$	b ($ml.ng^{-1}.h^{-1}$)	$s_b = \pm$	r	k ($ml.ng^{-1}.h^{-1}$)	τ (h)
M	$- 4,23.10^{-3}$	$0,370.10^{-3}$	$2,536.10^{-3}$	$0,110.10^{-3}$	0,938	$2,536.10^{-3}$	- 1,68
M3G	$- 0,07.10^{-3}$	$0,002.10^{-6}$	$0,018.10^{-3}$	$0,001.10^{-3}$	0,852	$0,018.10^{-3}$	- 3,88
M6G	$- 0,37.10^{-3}$	$0,005.10^{-3}$	$0,104.10^{-3}$	$0,450.10^{-6}$	0,883	$0,104.10^{-3}$	- 3,56

Legenda: M - morfín, M3G - morfín-3-glucuronid, M6G - morphín-6-glucuronid, a - úsek lineárnej závislosti ($a = c_o$), s_a - smerodajná odchýlka úseku, b - smernica lineárnej závislosti (b = - k), s_b - smerodajná odchýlka smernice, k - rýchlostná konštanta, r - korelačný koeficient, τ - biologický polčas ($\tau = \ln 2/k$), c_o - počiatočná koncentrácia

Rýchlosť eliminácie M u sledovaného pacienta popisuje rovnica ($c_M = c_{oM} . e^{-0,116.t}$), M3G rovnica ($c_{M3G} = c_{oM3G} . e^{-0,146.t}$) a M6G rovnica ($c_{M6G} = c_{oM6G} . e^{-0,145.t}$). V porovnaní s rýchlosťou odbúrania sledovaných analytov u zdravých dobrovoľníkov bola rýchlosť odbúrania M, M3G a M6G asi polovičná. Biologický polčas rozpadu M u zdravých jedincov sa pohybuje v intervale 1,5 – 3,6 h, pre M3G sa pohybuje v intervale 2,0 – 2,3 h a pre M6G sa pohybuje v intervale 1,6 – 2,8 h. U sledovaného onkologického pacienta počas detoxikačnej liečby bol zistený polčas rozpadu pre M (5,98 ± 0,09) h, pre M3G (4,74 ± 0,06) h a pre M6G (4,78 ± 0,14) h.

Určenie rýchlosti eliminácie morfínu a jeho glukuronidov u onkologického pacienta

65-ročnej pacientke s inoperabilným karcinómom žalúdka s oseálnymi metastázami panvy a chrbtice bol na tlmenie intenzívnej bolesti dlhodobo podávaný MST Continus (Morphinum sulphate) v kombinácii s antireumatikami a spazmolytikami. Priemerná úľava bolesti bola dosiahnutá pri dennej dávke 360 mg (120 mg a` 8 hod). Pridružená nauzea a zvracanie boli potláčané antiemetikami, ale

nie veľmi úspešne. Preto perorálne podávaný MST Continus bol nahradený Durogesicom (100 µg/h) - fentanylom zabezpečujúcom kontinuálnu aplikáciu opioidnej analgézie transdermálnym systémom.

Pred prvou aplikáciou Durogesicu bol pacientke MST Continus vysadený, preto bolo možné počas 24 hodín sledovať zmeny koncentrácie M, M3G a M6G v sére v závislosti od času a určiť rýchlostnú konštantu eliminácie M a jeho glukuronidov. Namerané výsledky, ktoré predstavujú priemer z troch meraní, sú v tabuľke 2.

M, M3G a M6G sa odbúrávajú podľa kinetickej závislosti 1. poriadku. Vypočítané parametre krivky popisujúce túto závislosť sú v tabuľke 3.

Tabuľka 2 Zmena koncentrácie M, M3G a M6G v sére onkologického pacienta po vysadení preparátu s obsahom morfínu

P	*Čas* (h)	*Koncentrácia v sére*			*Pomer*		
		M (ng/ml)	*M3G* (ng/ml)	*M6G* (ng/ml)	*M3G/M*	*M6G/M*	*M3G/M6G*
1	0	95,36 ± 1,30	18 222 ± 4,00	3 641 ± 5,00	191,07	38,18	5,00
2	6	45,80 ± 1,40	9 243 ± 2,00	1 714 ± 3,00	201,81	37,42	5,39
3	12	24,77 ± 0,61	5 286 ± 5,29	962 ± 3,51	213,40	38,84	5,50
4	18	nd	2 429 ± 4,00	421 ± 4,00	-	-	5,77
5	24	nd	985 ± 6,02	162 ± 2,08	-	-	6,08

Legenda: M - morfín, M3G - morfín-3-glucuronid, M6G- morphín-6-glucuronid, nd - nedetegované, P - poradie merania

Tabuľka 3 Parametre krivky kinetickej závislosti 1. poriadku pre M, M3G a M6G ($\ln c = c_o - kt$)

Analyt	a	$s_a = \pm$	b (h)	$s_b = \pm$	r	k (h^{-1})	τ (h)	$s_\tau = \pm$
M	4,54	$17{,}00 .10^{-3}$	- 0,112	$3{,}33.10^{-3}$	- 0,998	0,112	6,19	0,180
M3G	9,87	$1{,}70 .10^{-3}$	- 0,119	$4{,}04.10^{-4}$	- 0,996	0,119	5,82	0,018
M6G	8,25	$4{,}30 .10^{-3}$	- 0,127	$6{,}55.10^{-4}$	- 0,996	0,127	5,46	0,026

Legenda: M - morfín, M3G - morfín-3-glucuronid, M6G - morphín-6-glucuronid, a - úsek lineárnej závislosti ($a = c_o$), s_a - smerodajná odchýlka úseku, b - smernica lineárnej závislosti ($b = - k$), s_b - smerodajná odchýlka smernice, k - rýchlostná konštanta, r - korelačný koeficient, τ - biologický polčas ($\tau = \ln 2/k$), c_o - počiatočná koncentrácia

Podobne ako u pacienta počas detoxikačnej liečby, aj u tejto pacientky bola rýchlosť odbúrania M, M3G a M6G v porovnaní s rýchlosťou odbúrania u zdravých jedincov polovičná. U pacientky bol zistený polčas rozpadu pre M (6,19 ± 0,180) h, pre M3G (5,82± 0,018) h a pre M6G (5,46 ± 0,026) h. Rýchlosť eliminácie M popisuje rovnica ($c_M = c_{oM} . e^{-0,112.t}$), M3G rovnica ($c_{M3G} = c_{oM3G} . e^{-0,119.t}$) a M6G rovnica ($c_{M6G} = c_{oM6G} . e^{-0,127.t}$).

ZÁVER

Rýchlosť odbúrávania morfínu a jeho dvoch základných metabolitov morfín-3-glukuronidu a morfín-6-glukuronidu sa nám podarilo sledovať u dvoch pacientov s onkologickým ochorením v analgetickej liečbe opiátmi. V porovnaní s rýchlosťou odbúravania sledovaných analytov u zdravých dobrovoľníkov sme zistili, že rýchlosť eliminácie M, M3G a M6G bola asi polovičná.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

[1] World Health Organization, Cancer Pain Relief, 2nd ed. Geneva,World Health Organization, 1986

[2] WALL P. D., MELRAK R., Textbook of pain, Churchill Livingston, London, 1994, 952.

[3] NETRIOVÁ J., BLAHOVÁ E., BRAND-ŠTETEROVÁ E. HLPC analýza morfínu a jeho metabolitov v biologických vzorkách.. In: *Farmaceutický obzor* 2003, 72 (9-10): 219-228.

[4] *PICHINI S., PACIFICI R., PELLEGRINI M.*, MARCHEI E., PEREZ-ALARCON E., PUIG C., VALL O., GARCIA-ALGAR O. Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry assay for the determination of opiates and cocaine in meconium. In: *J. Chromatogr*. B 2003; 794 (2) : 281-292.

[5] NETRIOVÁ J. et al. HPLC determination of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in human serum of oncological patients after administration of

morphine drugs. In: *Pharmazie* 2006; 61: 528 – 534.

[6] DANUTA SZKUTNIK-FIEDLER et al. HPLC-UV determination of morhine in human plasma and its aplication to the clinical study. In: *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research.* ISSN 0001-6837, 2011, 68 (4): 473 – 479.

ANALÝZA PRÍRODNÝCH VÝŽIVOVÝCH DOPLNKOV OBSAHUJÚCICH KYANOGÉNNY GLYKOZID AMYGDALÍN

ANALYSIS OF NATURAL FOOD NUTRITIONAL SUPPLEMENTS CONTAINING CYANOGENIC GLYCOSIDE AMYGDALIN

BOHÁČOVÁ Iveta, ORAVEC Andrej, HALKO Radoslav

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Bratislava

ABSTRAKT

V súčasnosti sa pri liečbe rakoviny okrem tradičných medicínskych postupov využívajú aj alternatívne metódy liečenia. Jednou z nich je aj používanie výživových doplnkov, ktoré obsahujú prírodné aktívne látky. Problémom je, že prírodné výživové doplnky neprechádzajú prísnymi analytickými a klinickými testami, preto existujú pochybnosti ohľadom ich efektívnosti a bezpečnosti pre ľudský organizmus. Jednou skupinou látok vyskytujúcich sa v prírodných výživových doplnkov sú kyanogénne glykozidy. Medzi najznámejší kyanogénny glykozid patrí amygdalín tzv. vitamín B17, ktorý sa používal ako alternatívny nástroj na liečbu rakoviny. Na stanovenie amygdalínu v rôznych vzorkách sa využívajú viaceré analytické metódy, prevažne vysokoúčinné separačné metódy v kombinácii s rôznymi detekčnými technikami. Medzi tieto analytické metódy patrí plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS), micelárna elektrokinetická chromatografia so spektrofotometrickou detekciou v ultrafialovej oblasti (MEKC-UV) a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) v kombinácii s rôznymi detekčnými technikami. V našej štúdií bola na stanovenie amygdalínu v prírodných výživových doplnkoch použitá HPLC so spektrofotometrickou detekciou v ultrafialovej oblasti (UV) a odparovacím detektorom s rozptylom svetla (ELSD). Separácia amygdalínu prebehla na kolóne XSelect^{TM} HSS C18 XP 2,5 µm (150 × 2,1 mm) použitím izokratickej elúcie. Mobilná fáza sa skladala z kyseliny mravčej a acetonitrilu. Navrhnutá metóda sa ukázala byť presná, citlivá a spoľahlivá pri stanovení amygdalínu vo vybraných prírodných výživových doplnkoch.

Kľúčové slová: Analýza. Kyanogénne glykozidy. Amygdalín. Výživové doplnky. Kvapalinová chromatografia.

ABSTRACT

Currently, different types of treatment are available for patients with cancer. Some treatments are standard, and some are alternative methods. One of alternative method is the use of nutritional food supplements containing natural active substances. The problem is that these supplements do not undergo strictly analysis and clinical trials. Therefore there are doubts about their effectiveness and safety for the human body. Cyanogenic glycosides are one class of substances occurring in natural nutritional food supplements. Amygdalin is the most famous cyanogenic glycoside, which is used as an alternative tool for cancer therapy. Several analytical methods are used for the determination of amygdalin in various samples, mainly high performance separation methods in combination with different detection techniques. These analytical methods include gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS), micellar electrokinetic chromatography with spectrophotometric detection (MEKC-UV) and high performance liquid chromatography (HPLC) in combination with different detection techniques. In our study, HPLC method with spectrophotometric detection and evaporative light scattering detection was developed for the separation of amygdalin in natural nutritional food supplements. Separation of amygdalin was carried out on silica XSelect^{TM} HSS C18 XP 2.5 µm (150 × 2.1 mm) using isocratic elution. The mobile phase consisted of formic acid and 10% (v/v) acetonitrile. The proposed method has proven to be accurate, sensitive and reliable in determining the amygdalin in selected natural nutritional food supplements.

Key words: Analysis. Cyanogenic glycosides. Amygdalin. Nutritional food supplements. Liquid chromatography.

ÚVOD

Amygdalín sa používal ako nástroj tradičnej medicíny predovšetkým kvôli širokej škále liečivých účinkov pri potláčaní bolesti a kašľu, zmierňovaní horúčky a zaháňaní smädu a v neposlednom rade aj pri liečbe a prevencii rakoviny. Účinky amygdalínu boli sledované veľmi intenzívne od konca 70-tych rokov do polovice 80-tych rokov 20. storočia a výsledkom bolo, že amygdalín selektívne zabíja rakovinové bunky bez orgánovej toxicity a efektívne potláča bolesť u pacientov s rakovinou. V tomto období neboli prevádzané hĺbkové štúdie, a preto potenciálne užitočné látky pri liečbe rôznych ochorení, vrátane nádorových, boli testované prakticky vždy v podmienkach *in vivo* za použitia zvieracích modelov. Preto Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (angl. Food and Drug Administration, FDA, USA) neschválil amygdalín ako protirakovinovú látku kvôli nedostatočným klinickým dôkazom, ktoré by preukázali jeho efektívnosť pri liečbe nádorových ochorení, prípadne potvrdili jeho toxické účinky na ľudský organizmus (Dorr, Paximos, 1978). Aj napriek nedostatočným klinickým testom, ktoré by demonštrovali protirakovinové účinky amygdalínu v USA a v Európe, pokračuje sa v jeho produkcii a využívaní ako protirakovinovej terapie najmä v Severnej Európe a Mexiku (Chang et al., 2006; Kwon, et.al.,

2010). Keďže amygdalín je súčasťou výživových doplnkov, často bez uvedeného deklarovaného obsahu, je potrebné stanovovať jeho obsah v týchto prípravkoch, pretože nadmerné užitie amygdalínu môže viesť k otrave organizmu uvoľnením kyanidom.

Predkladaná štúdia sa zaoberá charakteristikou amygdalínu a jeho metabolizmom v ľudskom tele, sumarizuje analytické metódy, ktoré sa používajú na separáciu a identifikáciu amygdalínu. Ďalej sa zaoberá vývojom HPLC metódy na separáciu amygdalínu a jeho stanovením v prírodných výživových doplnkoch stravy.

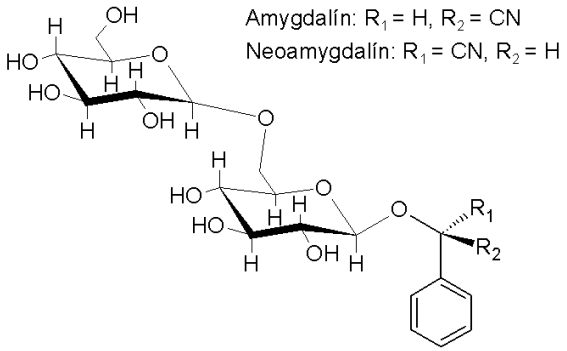
Kyanogénne glykozidy

Glykozidy sú malé sekundárne rastlinné metabolity, ktoré sa skladajú z dvoch častí, cukornatej zložky nazývanej glykón a necukornatej zložky nazývanej aglykón (genín). Aglykón je k cukru viazaný prostredníctvom O-glykozidovej resp. S-glykozidovej väzby. Jednou z možností klasifikácie glykozidov je na základe chemickej povahy aglykónovej časti. Sem zaraďujeme kyanogénne glykozidy, medzi ktoré patrí aj amygdalín. V ich štruktúre sa nachádza kyanidová skupina, ktorá sa pôsobením enzýmov môže odštiepiť, čím dôjde k uvoľneniu toxického kyanovodíka.

Amygdalín (D-mandelonitril-β-D-genciobiozid, vit B_{17}, $C_{20}H_{27}NO_{11}$) sa skladá z dvoch molekúl β-glukózy (spojené β-1, 6 glykozidovou väzbou), jednej molekuly benzaldehydu a jednej kyseliny kyanovodíkovej. Kým benzaldehyd indukuje analgetický účinok, kyselina kyanovodíková je zodpovedná za neoplastické účinky amygdalínu (Chang et al., 2006). Z hľadiska izomérie amygdalín môže existovať v dvoch rozdielnych konfiguráciách, pričom prírodný amygdalín má pravotočivú konfiguráciu (*R*), ktorá je považovaná za aktívnu formu a neoamygdalín (*S*) (L-mandelonitril-β-D-genciobiozid) je jeho neaktívna forma (obr. 1).

Metabolizmus amygdalínu v ľudskom tele

β-D-glukozidáza, jeden z enzýmov, ktorý katalyzuje uvoľnenie kyanovodíka z amygdalínu, sa nachádza v ľudskom tenkom čreve a v rôznych potravinách (Strugala et al., 1995). V podmienkach *in vivo* je amygdalín degradovaný prírodným enzýmovým komplexom emulzínom, obsahujúcim enzýmy β-D-glukozidázu, benzokyanázu a iné, na štyri zlúčeniny: kyselinu kyanovodíkovú, benzaldehyd, prunazín a mandelonitril, ktoré sú absor-

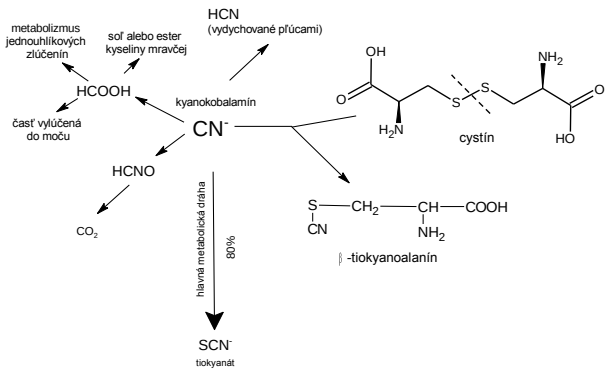


Obrázok 1 Chemická štruktúra amygdalínu a neoamygdalínu

bované do lymfy a portálneho obehu (Chang, Zhang, 2012). Kyanid, enzymaticky uvoľnený z kyanogénneho glykozidu pomocou β-glukozidázy prítomnej v bakteriálnych bunkách črevnej mikroflóry, je následne metabolizovaný enzýmami metabolickej dráhy určenej pre kyanid. Kyanid je detoxifikovaný pomocou enzýmu rodanázy v prítomnosti tiosulfátu na tiokyanát, ktorý je z organizmu vylúčený močom (Conn, 1979, A; Oke, 1979, A). Rodanáza je obyčajne lokalizovaná v mitochondriách rôznych tkanív. Enzým rodanáza obsahuje aktívnu disulfidovú skupinu, ktorá reaguje s tiosulfátom a kyanidom. Rodanáza je kódovaná tzv. senescentným génom, ktorý patrí medzi tzv. gény starnutia. Keďže nádorové bunky podliehajú rýchlemu deleniu a rastu a v minimálnom množstve starnú a odumierajú, nedochádza v nich k účinnej detoxifikácii kyanidu, čo vedie k ich usmrteniu, lebo neobsahujú enzým rodanázu (Lang, 1933).

Celková rýchlosť *in vivo* detoxifikácie kyanidu môže byť ovplyvnená niekoľkými minoritnými reakciami. Cystín môže priamo reagovať s kyanidom, pričom vytvára kyselinu 2-iminotiazolidín-4-karboxylovú, ktorá sa vylučuje do slín a moču. Stopové množstvo kyanovodíka sa môže nachádzať aj v expirovanom vzduchu, slinách, moči alebo v pote. Malé množstvo môže byť konvertované do kyseliny mravčej, ktorá sa môže vylúčiť do moču alebo môže vstúpiť do metabolickej dráhy zlúčenín s jedným atómom uhlíka. Minoritná detoxifikačná dráha, ktorá sa podieľa na detoxifikácii kyanidu, kombinuje kyanid s hydroxykobalamínom (vitamín B12), pričom sa formuje kyanokobalamín, ktorý je vylúčený buď do žlče alebo do moču. Kyanokobalamín sa môže reabsorbovať

pomocou tzv. vnútorného faktora (angl. intrinsic factor) na úrovni ilea, čo umožňuje efektívnu recirkuláciu vitamínu B12 (obr. 2) (JECFA, 1993).



Obrázok 2 Metabolizmus amygdalínu v ľudskom tele

V prípade benzaldehydu ide o účinný induktor extramitochondriálnej tvorby peroxidu vodíka, reaktívnej látky, ktorá spôsobuje oxidačný stres a môže bunky usmrtiť. V zdravých bunkách je benzaldehyd oxidovaný na kyselinu benzoovú (a následne na kyselinu hippurovú) alebo na izoméry kyseliny salicylovej. Kyselina benzoová je známym analgetikom a antiseptickou látkou, preto pomáha pri tlmení bolesti. Okrem toho, zdravé bunky omnoho efektívnejšie eliminujú oxidačný stres v porovnaní s nádorovými bunkami.

Kvôli viacerým faktorom ovplyvňujúcim hydrolýzu kyanogénnych glykozidov a príjmu látok, ktoré vplývajú na hladinu kyanidu v ľudskom tele (riboflavín, vitamín B12, metionín), ľudské prípadové štúdie a epidemiologické štúdie chronických toxikologických efektov ukázali veľmi variabilné výsledky. Navyše, údaje pochádzajúce z týchto štúdií sú zriedkavo kvantitatívneho charakteru (Conn, 1979, A; Oke, 1979, A; Rossling, 1987).

Analytické metódy na separáciu a stanovenie amygdalínu

V súčasnej dobe môžu byť prírodné látky identifikované a kvantifikované niekoľkými metódami. Aplikované môžu byť mikroskopické alebo biochemické prístupy, ale tie nie sú dobre prispôsobené na analýzu rastlinných zmesí, na analýzu ktorých sa vyžadujú vysokoúčinné separačné metódy. Amygdalín je možné stanoviť vo vzorke buď nepriamo cez degradačný medziprodukt alebo priamo s využitím fyzikálno-chemickej vlastnosti molekuly.

Na stanovenie amygdalínu bolo vyvinutých niekoľko chromatografických (Chassagne et al., 1996; Balkon, 1982; Bard, Tawfik, 2010) a elektroseparačných metód (Kang et al., 2000; Isozaki, et. al, 2001).

Z elektroseparačných metód, ktoré poskytujú viaceré výhody (vysoká účinnosť, krátke časy analýz, atď.) pri stanovení sacharidov a rastlinných sekundárnych metabolitov (El Raasi, Nashabet, 1995), bola doteraz použitá pri analýze kyanogénnych glykozidov len micelárna elektrokinetická chromatografia (MEKC), ktorá sa ukázala byť veľmi selektívnou metódou pri analýze týchto zlúčenín a ich izomérov pridaním chirálnej fázy do tlmivého roztoku.

Kang a kol. (Kang et al., 2000) vyvinuli jednoduchú, rýchlu a reprodukovateľnú MEKC metódu pre stanovenie D-amygdalínu a jeho epiméru v extrakte z marhuľových jadier a to bez úpravy vzorky. Isozaki a kol. (Isozaki, et. al, 2001) uverejnili, že metóda vyvinutá Kangom a kol. nie je dostačujúca na analýzu amygdalínu a jeho epiméru v prírodných produktoch, akými sú prípravky tradičnej čínskej medicíny (TCM). Preto vyvinuli novú MEKC metódu na analýzu amygdalínu a jeho epiméru v prírodných extraktoch a v prípravkoch TCM. Zlepšenie rozlíšenia separácie izomérov dosiahli použitím cyklodextrínom modifikovanej micelárnej elektrokinetickej chromatografie (CD-MEKC).

Z chromatografických metód Chassagne a kol. resp. Balkon a kol. aplikovali plynovú chromatografiu v spojení s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS) na identifikáciu a kvantifikáciu amygdalínu a prunazínu v plodoch marakuje resp. stanovenie amygdalínu v biologických tkanivách a tekutinách.

Ďalšou chromatografickou metódou, ktorá bola využitá pri analýze amygdalínu, je vysokoúčinná tenkovrstvová chromatografia (HPTLC). Badr a kol. vyvinuli HPTLC metódu so spektrofotometrickou detekciou v ultrafialovej oblasti (UV) na stanovenie amygdalínu v jadrách marhúľ odrody Prunus armeniaca. Hlavným nedostatkom vyššie spomenutých vyvinutých GC-MS metód a HPTLC metódy je nutná a náročná úprava vzoriek. V tomto ohľade bola MEKC metóda výhodnejšia, pretože vyžadovala len minimálnu úpravu vzorky. Navyše MEKC metódy v porovnaní s GC-MS alebo HPTLC poskytovali nižšie medze detekcie.

Jednou z najrozšírenejších separačných metód na stanovenie amygdalínu v rôznych matriciach je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). Pri stanovení amygdalínu HPLC v rôznych matriciach sa využíva hlavne reverzne-fázová vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (RP-HPLC). Ako stacionárna fáza sa najčastejšie používa silikagél chemicky modifikovaný naviazanými nepolárnymi alkylovými reťazcami (C-18). Mobilnou fázou býva najčastejšie zmes organického modifikátora (metanol alebo acetonitril) a tlmivého roztoku. V niektorých štúdiách sa namiesto tlmivého roztoku používa len čistá voda v zmesi s organickým modifikátorom (Gómez et al., 1998; Bolarinwa, 2014). Preferovaným typom elúcie je vo väčšine publikovaných prác izokratická elúcia. Na analýzu komplexných zmesových extraktov obsahujúcich amygdalín bol použitý gradientový typ elúcie (Liu et al., 2010; Gao et al., 2011).

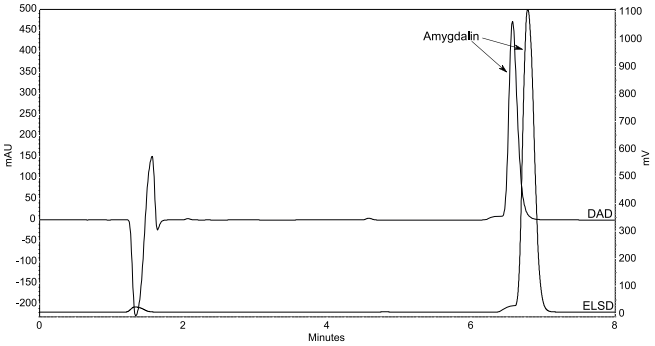
Detekčné techniky pri stanovení amygdalínu

Vzhľadom na štruktúru molekuly amygdalínu je možné pri jeho stanovení využiť viaceré detekčné techniky. Najpoužívanejšími detekčnými technikami pri analýze amygdalínu je spektrofotometrická detekcia, ktorá bolo použitá pri stanovení a detekcii amygdalínu v rôznych matriciach. Keďže molekula amygdalínu obsahuje dve molekuly glukózy, dá sa na priamu analýzu využiť aj refraktometrický detektor (RID) (Oomah et al., 1992). V porovnaní so spektrofotometrickou detekciou (LOD ≈ 1 ng) poskytuje vyššie medze detekcie (LOD ≈ 100 ng), čo je aj hlavnou limitáciou RID detektora.

Ďalším detektorom, ktorý je vhodný pri analýze amygdalínu, je odparovací detektor rozptýleného svetla (ELSD) (Gao et al., 2011). Výhodou ELSD detektora je, že je detektorom univerzálnym, pretože deteguje všetky látky, ktoré môžu vytvárať aerosól, bez ohľadu na ich spektrálne a fyzikálnochemické vlastnosti. ELSD detektor má výhodu v zabezpečení stabilnejšej základnej línie aj pri pou-žití gradientovej elúcie v porovnaní s UV detek-ciou (Li et al., 2001). V porovnaní s RID je ELSD detektor citlivejší a poskytuje nižšie medze detek-cie (LOD ≈ ng). V súčasnosti je jednou z najpoužívanejších detekčných techník hmotnostná spektrometria (MS). Spojenie HPLC s MS kombinuje separáciu zložiek zmesi s kvantitatívnou analýzou a identifikáciou, a tým poskytuje účinný prostriedok pri analýze vzoriek komplexných zmesi. Z tohto dôvodu bola táto identifikačná technika využitá aj pri analýze vzoriek obsahujúcich amygdalín. Jej veľkou prednosťou sú tiež nízke medze detekcie (LOD ≈ ng).

Separácia amygdalínu vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou

V našej štúdií sme na separáciu amygdalínu použili HPLC v kombinácií s UV a ELSD detekciou. Separácia prebehla na kolóne C-18 XSelect^{TM} HSS C18 XP 2,5 µm (150 × 2,1 mm) (Waters, Massachusetts, USA) spolu s predkólonou XSelect^{TM} HSS C18 VanGuard Pre-Column 2,5 µm (2,1 × 5 mm) (Waters, Massachusetts, USA).



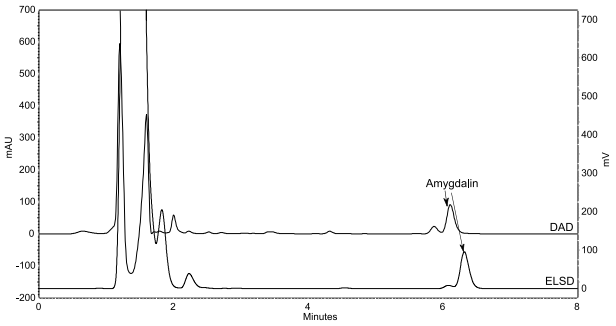
Obrázok 3 Chromatografický záznam separácie štandardného roztoku amygdalínu. Podmienky: mobilná fáza 0,05% kyselina mravčia a acetonitril (90:10 v/v), teplota kolóny 30°C, prietok 0,3 mL.min^{-1}, vlnová dĺžka DAD 215 nm, teplota ELSD detektora 60°C. Koncentrácia amygdalínu 100 mg.L^{-1}.

Mobilná fáza pozostávala z kyseliny mravčej a 10% (v/v) acetonitrilu. Na separáciu bola použitá izokratická elúcia. Teplota kolóny bola nastavená na 30°C a prietok mobilnej fázy na 0,3 mL min^{-1}. Do chromatografického systému bolo dávkovaných 20 µL analytu. Spektrofotometrická detekcia amygdalínu bola uskutočnená pri 215 nm. Teplota ELSD detektora bola nastavená na 60°C. Získané chromatografické záznamy štandardného roztoku amygdalínu pri UV a ELSD detekcii sú zobrazené na obrázku 3.

Linearita tejto analytickej metódy bola vyhodnotená z kalibračnej krivky preložením plochy elučného píku ku koncentrácií analytu. Hodnota korelačného koeficienta (R^2) pre obidve detekčné metódy bola vyššia ako 0,999, čo znamená že závislosť plochy elučných píkov od koncentrácie je lineárna v nami študovanom rozsahu. Pre UV detekciu sme získali nižšie medze detekcie oproti

Tabuľka 1 Validačné parametre

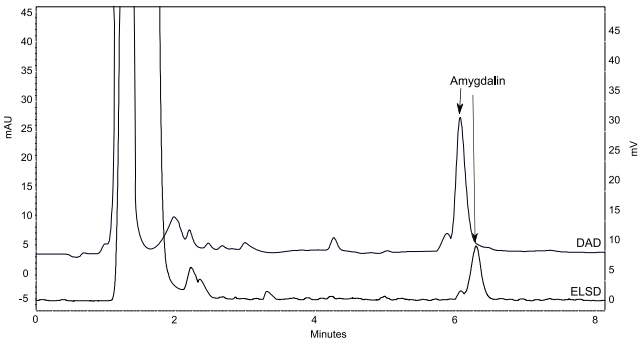
	Lineárny rozsah [mg L^{-1}]	**R^2**	**LOD** [mg L^{-1}]	**LOQ** [mg L^{-1}]	**RSD** [%]
DAD	5 - 300	0,999	0,019	0,064	0,87
ELSD	5 - 100	0,999	0,133	0,444	3,19



Obrázok 4 Chromatografický záznam stanovenia amygdalínu vo výživovom doplnku B 17 Apricarc Podmienky viď. obr. 3

Tabuľka 2 Koncentrácie amygdalínu vo výživových doplnkoch

Vzorka	**DAD** [mg L^{-1}]	**ELSD** [mg.L^{-1}]
B17 Apricarc	285,3	291,5
Hunza	205,9	198,6



Obrázok 5 Chromatografický záznam stanovenia amygdalínu vo výživovom doplnku Hunza Podmienky viď. Obr. 3

ELSD detekcii z čoho môžeme usudzovať, že UV detekcia je citlivejšia pre stanovenie amygdalínu. Hodnoty medze detekcie a stanovenia, lineárneho rozsahu ako aj relatívnej smerodajnej odchýlky (RSD) sú pre obidve detekčné techniky uvedené v tabuľke 1.

Analýza výživových doplnkoch

Amygdalín bol stanovovaný v dvoch komerčne dostupných výživových doplnkoch B17 Apricarc a Hunza. Amygdalín bol zo vzoriek extrahovaný pomocou metanolu v ultrazvukovej vani po dobu 30 min. Následne bol roztok prefiltrovaný cez membránový filter (0,22 µm) a pred nadávkovaním do chromatografického systému bol 10 x nariedený.

Na obrázkoch 4 resp. 5 sú zobrazené chromatografické záznamy výživových doplnkov B 17 Apricarc resp. Hunza. Koncentrácie amygdalínu vo výživových doplnkoch boli stanovené metódou kalibračnej krivky a ich hodnoty sú uvedené v tabuľke 2.

ZÁVER

V tejto štúdií sme sa zaoberali štúdiom kyanogénneho glykozidu amygdalínu ktorý sa v dnešnej dobe predáva ako prírodný výživový doplnok slúžiaci pri potláčaní bolesti a kašľu, zmierňovaní horúčky a pri prevencii onkologických ochorení. Vyvinuli sme citlivú HPLC metódu v kombinácii s UV a ELSD detekciou sna separáciu a stanovenie amygdalínu vo výživových doplnkoch. UV detekcia sa ukázala byť citlivejšia oproti ELSD detekcii. V budúcnosti sa budeme venovať stanoveniu a identifikácií sekundárnych zložiek obsiahnutých v prírodných výživových doplnkoch pomocou hmotnostnej spektrometrie.

Poďakovanie

Práca vznikla za finančnej podpory grantovej agentúry MŠ SR VEGA, grant č. 1/0852/13 a Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0583-11 pod záštitou centra excelencie VVCE-0070-07.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

BADR, J.M. – TAWFIK, M.K. 2010. Analytical and pharmacological investigation of amygdalin in *Prunus armeniaca* L. kernels. In: *Journal of Pharmacy Research*. ISSN 0974-6943, 2010, r. 3, č. 9, s. 2134-2137.

BALKON, J. 1982. Methodology for the detection and measurement of amygdalin in tissues and fluids. In: *Journal of analytical toxicology*. ISSN 0146-4760, 1982, r. 6. č. 5, s. 244-246.

BOLARINWA, I.F., ORFILA, C., MORGAN, M.R.A. 2014. Amygdalin content of seeds, kernels and food products comercially-available in the UK. In: *Food Chemistry*. ISSN 0308-8146, 2014, r. 152, s. 133-139.

CONN, E.E. (A) 1979. Cyanide and cyanogenic glycosides. In: *Herbivores: Their interaction*

with Secondary Plant Metabolites. 1st ed., Rosenthal, G.A – Janzen, D.H., Eds., Academic Press, Inc., New York – London, 1979. 387-412 s. ISBN 0-08-092545-5.

DORR, R.T. – PAXINOS, J. 1978. The current status of laetrile. In: *Annals of Internal Medicine*. ISSN 0003-4819, 1978, r. 89, č. 3, s. 389-397.

EL RASSI, Z. – NASHABET, W 1995. In: Carbohydrate Analysis: High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. El Rassi, Z., Ed., Elsevier, Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford.Shannon-Tokyo, 1995. *Journal of Chromatography Library*, r. 58, ISBN 0-444-89981-2.

GAO, Y., GAO, W.Y., GUO, P. et. al. 2011. Simultaneous Determination of Nine Active Components in Traditional Chinese Medicine „Xue-Fu-Zhu-Yu“ Capsule by HPLC-ELSD. In: *Latin American Journal of Pharmacy*. ISSN 0326-2383, 2011, r. 30, č. 2, s. 281-288.

GÓMEZ E., BURGOS, L., SORIANO, C. et. al. 1998. Amygdalin content in the seeds of several apricot cultivars. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*. ISSN 0022-5142, 1998, r. 77, č. 2, s. 184-186.

CHANG, H.K., SHIN, M.S., YANG, H.Y. et. al. 2006. Amygdalin induces apoptosis through regulation of Bax and Bcl-2 expressions in human DU145 a LNCaP prostate cancer cells. In: *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. ISSN 0918-6158, 2006, r. 29, č. 8, s. 1597-1602.

CHANG, J. – ZHANG, Y. 2012. Catalytic degradation of amygdalin by extracellular enzymes from *Aspergillus niger*. In: *Process Biochemistry*. ISSN 1359-5113, 2012, r. 47, č. 2, s. 195-200.

CHASSAGNE, D., CROUZET, J.C., BAYONOVE, C.L. et. al. 1996. Identification and quantification of passion fruit glycosides. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ISSN 0021-8561, 1996, r. 44, č. 12, s. 3817-3820.

ISOZAKI, T., MATANO, Y., YAMAMOTO, K. et. al. 2001. Quantitative determination of amygdalin epimers by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. In: *Journal of Chromatography A*. ISSN 0021-9673, 2001, r. 923, č. 1-2, s. 249-254.

JECFA 1993. Joint Expert Committee on Food Additives. Cyanogenic glycosides. WHO Food Additives Series 30.

KANG, S.H., JUNG, H., KIM, N. et. al. 2000. Micellar electrokinetic chromatography for the analysis of D-amygdalin and its epimer in apricot kernel. In: *Journal of Chromatography A*. ISSN 0021-9673, 2000, r. 866, č. 2, s. 253-259.

KWON, H.J et. al. 2010. Improvement of the Extraction Efficiency of D-amygdalin from Armeniacae Semen Powder Through Inactivating Emulsin and Suppressing the Epimerization of D-amygdalin. In: *Archives of Pharmacal Research*. ISSN 0253-6269, 2010, r. 33, č. 1, s. 81-86.

LANG, K. 1933. Die Rhodanbildung im Tierkörper. In: *Biochemische Zeitschrift*. ISSN 0366-0753, 1933, vol. 259, p. 243-256.

LI, S.L., LIN, G., CHAN, S.W. et. al. 2001. Determination of the major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. In: *Journal of Chromatography A*. ISSN 0021-9673, 2001, r. 909, č. 2, s. 207-214.

LIU, E.H., QI L.W., CHENG, X.L. et. al. 2010. Simultaneous determination of twelve bioactive constituents in Buyang Huanwu decotion by HPLC-DAD-ELSD and HPLC-TOF/MS. In: *Biomedical Chromatography*. ISSN 0269-3879, 2010, r. 24, č. 2, s. 125-131.

LU, Y, - FO, L.Y. 1998. Constitution of some chemical components of apple seed. In: *Food Chemistry*. ISSN 0308-8146, 1998, r. 61, č. 1-2, s. 29-33.

OKE, O.L. (A) 1979. Some aspects of the role of cyanogenic glycosides in nutrition. In: *World Review of Nutrition and Dietetics*. ISSN 0084-2230, 1979, r. 33, s. 70-103.

OOMAH, B.D., MAZZA, G., KENASCHUK, E.O. 1992. Cyanogenic Compounds in Flaxseed. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. ISSN 0021-8561, 1992, r. 40, č. 8, s. 1346-1348.

ROSSLING, H. 1987. Cassava toxicity and food security. A report for UNICEF African Household Food Security programme. 2nd ed., Rosling, H, Ed., Uppsala, Sweden: *Tryck Kontakt*, 1980, 3-40 s. ISBN 9-1971-0290-3.

RIBEIRO, A.A. 1990. ^{1}H and ^{13}C NMR analysis of D-amygdalin: oligosaccharide assignment and sequencing. In: *Magnetic Resonance in Chemistry*. ISSN 0749-1581, 1990, r. 28, č. 9, s. 765-773.

STRUGALA, G.J., STAHL, R., ELSENHANS, B. et. al. 1995. Small-intestinal transfer mechanism of prunasin, the primary metabolite of the cyanogenic glycoside amygdalin. In: *Human Experimental Toxicology*. ISSN 0144-5952, 1995, r. 14, č. 11, s. 895-901.

THYGESEN, L.G., LOKKE, M.M., MICKLANDERE, E. et. al. 2003. Vibrational microspectroscopy of food. Raman vs. FT-IR. In: *Trends in Food Science & Technology*. ISSN 0924-2244, 2003, r. 14, č. 1, s. 50-57.

BAKTERIÁLNA MIKROFLÓRA OSÍDĽUJÚCA VYSOKOŠKOLSKÉ INTERNÁTY A JEJ LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA
BACTERIAL MICROFLORA COLONIZING UNIVERSITY COLLEGES AND ITS LABORAOTRY DIAGNOSTICS

ŠEFCOVÁ J.[1], KAŠLÍKOVÁ K.[2], MELUŠ V.[1], KRAJČOVIČOVÁ Z.[1]

[1] *Fakulta zdravotníctva Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne*
[2] *Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Trenčíne, Trenčín*

ABSTRAKT
V našej štúdii sme sa zamerali na zisťovanie bakteriálnej mikroflóry, ktorá osídľovala vysokoškolské internáty a študentské privátne ubytovania. Sledovali sme výskyt *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli* a vyhodnocovali sme mie-ru výskytu týchto patogénov na vytypovaných odberových miestach, ktoré boli rovnaké vo všetkých internátoch a podľa nich sme vyhodnotili ich hygienickú situáciu. Samotný odber vzoriek bol zrealizovaný na 7 internátoch, na ktorých bolo odobratých celkovo 56 vzoriek. Stery boli odobraté a spraco-vané sterovou metódou, ktorá sa používa pri vyšetrovaní vzoriek sterov z prostredia. Laboratórna diagnostika bola vykonaná v laboratóriách Regionálneho úradu verejného zdra-votníctva Trenčín podľa platných štandardných pracovných postupov. Súčasťou práce bol samokonštrukčný dotazník, ktorého sa zúčastnilo 40 respondentov. Zamerali sme sa na vyhodnotenie ich hygienických návykov, vzťah k dezinfekcii a upratovaniu. Z našich výsledkov jednoznačne vyplýva, že hygiena na sledovaných internátoch je nedostatočná a výskyt sledovaných patogénov netreba brať na ľahkú váhu, vzhľadom k tomu aké závažné ochorenia dokážu vyvolať.

Kľúčové slová: Bakteriálna mikroflóra osídľujúca internáty. Laboratórna diagnostika. Hygienická situácia vo vyšetrovaných internátoch.

ABSTRACT
Our study was focused on detection a bacterial microbiome which colonized university dormitories and students accommodations. We were monitoring *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli* and evaluated an amount of the incidence of pathogens on places where samples were taken which were equal in all university dormitories and according to them we evaluated their hygienic situation. The collection of samples was realized in 7 university dormitories where were taken 56 samples, overall. The samples were taken and processed by the method which is used for the investigation of samples from the environment. The laboratory diagnosis was made in laboratories of Regional Authority of Public Health in Trenčín according to standard operating procedures. The questionnaire was filled out by 40 respondents and the questionnaire is a part of the study. We were focused on the evaluation of their hygienic habits, their relation to the prevention of infection and the cleaning. Our results are processed in charts and diagrams and is obvious from the results that the hygiene which was monitored on university dormitories is insufficient and occurrence of pathogens is not to be taken lightly because of diseases which can cause.

Key words: Bacterial microflora occuring in hostels. Laboratory diagnostics. Hygienic situation in tested hotels.

ÚVOD

Dodržiavanie hygienických zásad a upratovanie domácností, internátov, príp. ubytovní, by malo byť úplnou samozrejmosťou každého človeka, ktorý sa chce v danom prostredí dobre cítiť. Významom dodržiavania týchto zásad je, aby boli zabezpečené slušné podmienky na bývanie a v prvom rade neohrozili zdravie človeka baktériami, ktoré si hlavne na rukách, predmetoch, príp. oblečení prinesie domov z vonkajšieho prostredia. Preto je nesmierne dôležité pri príchode domov si umyť ruky, pretože sú dôležitým faktorom prenosu baktérií.

Tým, že baktérie sú všade prítomné a niektoré majú za vhodných podmienok schopnosť delenia každých 20 min., proces ich šírenia je veľmi rýchly [1-3]. V prípade nedodržiavania základných hygienických zásad ako neumývanie rúk po príchode domov alebo po použití toalety je možné kontaminovať veľké množstvo predmetov a nástrojov každodennej potreby v domácnosti [4,5]. Je pochopiteľné, že baktérií sa úplne zbaviť nemožno, ale používaním dezinfekčného mydla na umývanie rúk, Sava a dezinfekčných utierok v prostredí sa dá zabrániť ich množeniu. Pri upratovaní si treba uvedomiť, že nestačí umývať len veľké plochy ako napr. podlahy, ale treba čistiť aj kontaktné miesta ako vypínače, kľučky dverí, opierky a držiaky, splachovadlo, vodovodné batérie, často vymieňať kuchynské špongie a v neposlednom rade treba čistiť aj počítačovú myš, tablet i mobily.

Aj keď sa píše, že v domácom prostredí vzniká viac ako 50% infekcií, treba si uvedomiť, že niektoré infekcie môžu ľudia sami ovplyvniť tým, že po kýchnutí si umyjú ruky a baktérie, príp.

vírusy neroznášajú ďalej, po práci so surovým mäsom, vajcami vyčistia kuchynskú pracovnú dosku, nákupné tašky nekladú na stôl a pravidelne čistia všetky kontaktné miesta, z ktorých by sa mohli baktérie a vírusy ďalej roznášať.

Dodržiavanie základných hygienických zásad, by malo byť bežným štandardom každého človeka, v každej domácnosti, aby sa predišlo rôznym infekciám, ktoré niekedy môžu mať ťažký klinický priebeh a môžu skončiť fatálne. Treba mať stále však na pamäti, že rôzne dezinfekčné prípravky (dezinfekčné mydlo, ústne vody), v preexponovanej miere použitia ničia aj mikroorganizmy, ktoré sú pre ľudský organizmus prospešné.

CIELE ŠTÚDIE

Zámerom našej štúdie bolo:

- vyšetrenie vzoriek sterov z prostredia internátov na prítomnosť *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli* a ich laboratórna diagnostika,
- zhodnotenie hygienickej situácie na internátoch - vyhodnotenie výskytu sledovaných patogénov na vybraných konkrétnych odberových miestach,
- vyhodnotenie hygienických návykov populácie respondentov s využitím dotazníka vlastnej konštrukcie.

MATERIÁL A METÓDY

Odber sterov sme vykonali detoxikačným sterilným tampónom, ktorým sa zotrie plocha asi 10x10 cm [6]. Ster sa musí urobiť rázne po celom povrchu predmetu. Detoxikačným sterilným tampónom sa pritom otáča, aby bola zužitkovaná celá jeho plocha. Včasné prenesenie sterov do kultivačného média, nám zaručí úspešnosť kultivácie mikroorganizmov získaných touto metódou. Po zotretí plochy sa kontaminovaná časť detoxikačného tampónu zalomí a zvyšok sa vloží do dvoch skúmaviek:

- so Sabouraudovým bujónom na kultiváciu plesní a kvasiniek – inkubuje sa pri 25°C, 10 dní,
- s tioglykolátovým bujónom na stanovenie aeróbnych tyčiniek a kokov a anaeróbnych baktérií (klostridií) – inkubuje sa pri 37°C, 10 dní.

V prípade tvorby zákalu sa vzorka vyočkuje:

- zo Sabouraudovho bujónu na Sabouraudov agar – inkubuje sa pri 25°C, 3-5 dní. Plesne sa potvrdzujú natívnym preparátom a kvasinky farbeným podľa Grama,
- z tioglykolátového bujónu na krvný agar a Endov agar – inkubujú sa aeróbne pri 37°C, 24 hodín a na VL krvný agar – inkubuje sa anaeróbne, pri 37°C, 24 hodín.

V prípade porovnávania numerických hodnôt sme použili popisnú štatistiku, danú celkovým počtom vyšetrených vzoriek (*n*), aritmetickým priemerom (*x*), smerodajnou odchýlkou (*sd*), mediánom (*xm*) a rozsahom, určenými minimálnou (*min*) a maximálnou (*max*) hodnotou. Ak boli originálne dáta upravené do podoby numerických dát (napr. v prípade výstupov z dotazníka), na ich spracovanie boli použité neparametrické testy. Mann-Whitneyov test sme použili na porovnanie vlastností sledovaných premenných dvoch nezávislých súborov. Rozdiely medzi súbormi sme pokladali za štatisticky významné, ak výsledok p-hodnoty testovacieho kritéria bol menší ako 0.05 ($p<0,05$) [7-10].

Súčasťou práce bol samo-konštrukčný dotazník. Pýtali sme sa respondentov ženského aj mužského pohlavia v rôznych vekových skupinách a s rôznym stupňom formálneho vzdelania na otázky dezinfekcie domácnosti a hygienických návykov.

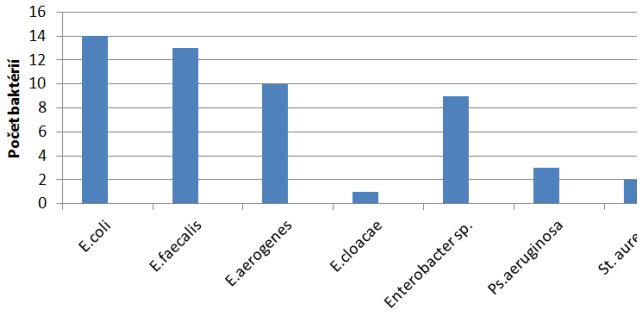
VÝSLEDKY

Celkovo bolo hodnotených 7 internátov, pričom v každom bolo vytypovaných 8 odberových miest, čo bolo spolu 56 vzoriek sterov z prostredia.

Odberové miesta boli konkrétne vytypované, vo všetkých internátoch rovnaké. Vzhľadom k tomu, že sú to kontaktné miesta, denne používané, je tu pravdepodobnosť rizika vzniku infekcie v prípade pozitívneho nálezu.

Z celkového počtu 56 vyšetrených vzoriek bol v 14 prípadoch záchyt *Escherichia coli*, čo bol aj najčastejšie vyskytovaný sa patogén (25%). Mierou výskytu 23,2% bol na druhom mieste *Enterococcus faecalis* v počte 13 pozitívnych vzoriek. Z ďalších sledovaných patogénov bol záchyt *Enterobacter aerogenes* v 10 vzorkách (17,9%), *Enterobacter sp*. v 9 vzorkách (16,1%), *Pseudomonas aeruginosa* v 3 vzorkách (5,4%), *Staphylococcus aureus* v 2 vzorkách (3,6%) a v 1 vzorke *Enterobacter cloacae* (1,8%) (graf.1).

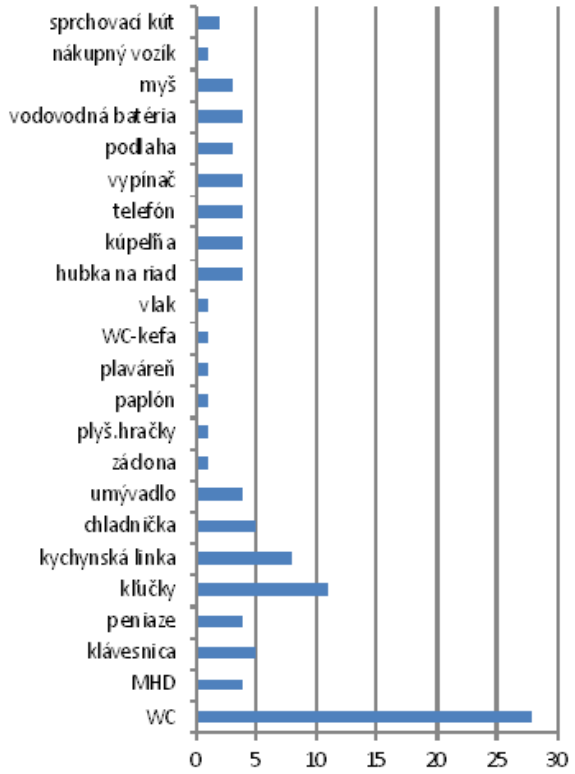
Podľa našich výsledkov najväčšie percento záchytu patogénov bolo na vodovodnej batérii v kuchyni (19,6%) a úchytke mikrovlnnej rúry (17,9%).



Graf 1 Záchyt sledovaných patogénnych mikroorganizmov

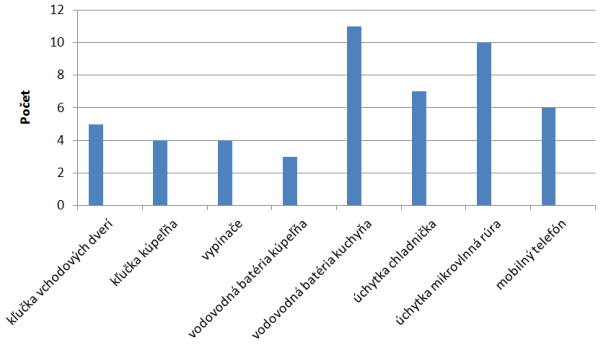
V štúdii sme sa zamerali aj na vyhodnotenie dotazníka, ktorého sa zúčastnilo 40 respondentov, z toho bolo 20 mužov a 20 žien.

Respondenti vo svojich odpovediach označili 23 kritických miest výskytu baktérií, pričom podľa ich názoru jednoznačne dominuje WC, nasledujú kľučky a kuchynská linka (graf.3).



Graf 3 Najkritickejšie miesta výskytu baktérií podľa názorov respondentov

Najmenej boli kontaminované kľučka dverí v kúpeľni a vodovodná batéria v kúpeľni. Podrobné výsledky z testovania odberových miest sú uvedené v grafe 2.



Graf 2 Vyhodnotenie pozitívnych odberových miest

Tabuľka 1 nám znázorňuje porovnávanie veku respondentov, ktorí ukončili vysokoškolské vzdelanie a stredoškolských respondentov, ktorých sme spojili s respondentmi, ktorí mali ukončené základné vzdelanie. Spojenie oboch skupín bolo dôsledkom nízkeho počtu respondentov so základným vzdelaním. Výsledky porovnávania testu podľa veku preukázali, že rozdiely medzi respondentmi sú štatistický nevýznamné (p = 0,35).

Tabuľka 1 Priemerný vek

Skupina	*n*	$\bar{x}$	*sd*	*min*	*max*	x_m	*p*
ZŠ+SŠ	30	32,6	11,3	20	56	31	0,35
VŠ	9	27,2	4,4	20	35	25	

Výsledky testovania Mann-Whitneyovým testom nepreukázali štatisticky významné rozdiely v umývaní rúk medzi testovanými skupinami (p = 0,28; tabuľka 2).

Tabuľka 2 Umývanie rúk

Skupina	*n*	$\bar{x}$	*sd*	*nim*	*max*	x_m	*p*
ZŠ + SŠ	30	1,6	0,6	0	2	2	0,28
VŠ	9	1,3	0,7	0	2	2	

Ak rozdelíme respondentov podľa formálneho vzdelania, výsledky poukazujú, že nie sú medzi nimi veľké rozdiely ani medzi frekvenciou upratovania (Mann-Whitneyov test; p = 0,6; tabuľka 3).

Tabuľka 3 Frekvencia upratovania

Skupina	*n*	$\bar{x}$	*sd*	*min*	*max*	x_m	*p*
ZŠ + SŠ	30	1,6	0,9	1	4	1	0,6
VŠ	9	1,7	0,7	1	3	2	

Podobné výsledky boli získané aj v prípade čistenia úchytiek mikrovlnnej rúry a chladničky (Mann-Whitneyov test; p = 0,3; tabuľka 4) aj napriek tomu, že tieto miesta boli samotnými respondentami označované za kritické.

Tabuľka 4 Čistenie úchytiek mikrovlnnej rúry a chladničky

Skupina	*n*	*x*	*SD*	*min*	*max*	*med*	*p*
ZŠ + SŠ	30	2,7	0,9	1	4	3	0,3
VŠ	9	3,1	0,8	2	4	3	

DISKUSIA

Zo získaných výsledkov sme vyhodnotili, že najviac frekventované patogény, ktoré sa nachádzali na internátoch boli *Escherichia coli a Enterococcus faecalis*. Jedná sa o koliformné a črevné baktérie, ktoré sú indikátorom podceňovania dezinfekcie na internátoch a privátoch. Je treba si uvedomiť, že odberové miesta, sú všetko prvotné kontaktné miesta, z ktorých je možné tieto baktérie „rozniesť“ po celom byte. Naopak najmenej izolovaný bol *Staphylococcus aureus*. Aj keď jeho nález bol „iba“ v dvoch prípadoch, vzhľadom na mieru jeho patogenity nemožno jeho nález brať na ľahkú mieru.

Čo sa týka vyhodnotenia miery kontaminácie odberových miest, najväčšie percento záchytu baktérií, sme našli na vodovodnej batérií v kuchyni (19,6%) a na mikrovlnnej rúre (17,9%). Vzhľadom k tomu, že sa jedná o odberové miesta v kuchyni je treba si uvedomiť riziko kontaminácie ďalších pracovných plôch, na ktorých dochádza k príprave potravín. Následná konzumácia kontaminovaného jedla, môže spôsobiť vážne alimentárne ochorenie.

Súčasťou tejto práce bol samo-konštrukčný dotazník, ktorý bol realizovaný na vzorke 40 respondentov ženského aj mužského pohlavia s rôznou vekovou skupinou a rôznym stupňom formálneho vzdelania. Pýtali sme sa na otázky dezinfekcie domácnosti a zistili sme, že často upratujú, ale nie dostatočne, neumývajú kľučky, úchytky mikrovlnnej rúry, chladničky a vodovodné batérie. Ďalším poznatkom, ktorý sme zistili bolo, že opýtaní respondenti nepoužívajú vhodne čistiace prostriedky. Jednou z otázok bolo aj ako často si respondenti umývajú ruky, veľmi príjemným zistením bolo že umývanie rúk sa stáva prvým krokom po príchode domov.

Výsledky, ktoré sme nadobudli nás presvedčili práve o tom, že vo vyšetrovaných internátoch je stále čo zlepšovať a zdokonaľovať, aby sme predišli výskytu patogénnych mikroorganizmov, s ktorými by sme si mohli priniesť aj nežiaduce závažne infekcie. Bolo by vhodné keby sa oveľa častejšie vykonávali kontroly, ktoré sledujú hygienickú situáciu na internátoch a tak predchádzali výskytu patogénnych mikroorganizmov a nimi súvisiacich infekcií.

ZÁVER

Z celkového počtu vyšetrovaných vzoriek 56 bol najväčší záchyt *Escherichia coli* (25%), nachádzala sa skoro na všetkých vyšetrovaných odberových miestach, okrem mobilu. Na druhom mieste s mierou výskytu je *Enterococcus faecalis* (23,2%), Tretie miesto sme priradili patogénu *Enterobacter aerogenes* (17,9%). Medzi ďalšie izolované baktérie patria *Enterobacter sp.* (16,1%), *Pseudomonas aeruginosa* (5,4%), *Staphylococcus aureus* (3,6%) a *Enterobacter cloacae* (1,8%).

Doterajšie zahraničné štúdie uvádzajú, že minimálne päťdesiat percent všetkých infekcií vznikne v domácnostiach a dve tretiny ľudí nedodržiavajú hygienické pravidlá ako je umývanie rúk po použití toalety, pred prípravou jedla a po kýchnutí. Na základe výsledkov našej štúdie možno skonštatovať platnosť uvedených záverov. Môžeme potvrdiť, že miera kontaminácie domácností baktériami je výrazná a reálna.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

[1] BAZOVSKÁ, S. a kol.: *Špeciálna epidemiológia,*1. Vyd. Bratislava: Univerzita Komenského, 2007. 340s. ISBN 978-80-223-2301-7.

[2] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK,A., VÁVRA, J.:*Lékařská mikrobiologie*. Marvil, s.r.o., Praha, 1996, 558s. ISBN-10: 80-2380-297-6.

[3] GÖPFERTOVÁ, D., JANOVSKÁ, D., DOHNAL, K., MELICHERČÍKOVÁ, V.: *Mikrobiologie, Imunologie, Epidemiologie, Hygiena pro strední a vyšší odborné zdravotnícke školy.* Praha: Triton, 2002. 147s. ISBN 80-7254-223-0.

[4] HAVLÍK, J., a. kol.: *Infektologie.* 2.vyd. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n.p., 1990. 377s. ISBN 80-201-0062-8.

[5] JURIŠ, P., MITERPÁKOVÁ, M.: *Hygiena prostredia*. 1.vyd. Prešov: Fakulta zdravot-

níctva a sociálnej práce, 2006. 88s. ISBN 80-969449-5-9.

[6] *Štandardný pracovný postup* – Mikrobiologické vyšetrenie sterov. Oddelenie mikrobiológie a biológie životného prostredia, regionálny úrad verejného zdravotníctva Trenčín.

[7] CHAJDIAK J., RUBLÍKOVÁ E., GUDÁBA M. Štatistické metódy v praxi. Statis Bratislava, 1997, 309s. ISBN 80-85659-08-5.

[8] CHAJDIAK J. Štatistika jednoducho. Statis Bratislava 2010, 194s. ISBN 978-80-856596-0-3.

[9] RIMARČÍK M. Štatistika pre prax. Marián Rimarčík 2007, 200s. ISBN 978-80-969813-1-1.

[10] ZVÁROVÁ J. Základy statistiky pro biomedicínské obory. Karolinum Praha 2007, 224s, ISBN 80-7184-786-1.

PÔVODCOVIA ALIMENTÁRNYCH OCHORENÍ IZOLOVANÝCH ZO STEROV Z POTRAVINÁRSKYCH PREVÁDZOK
ORIGINATORS OF ALIMENTARY DISEASES ISOLATED FROM SWABS FROM FOOD ESTABLISHMENTS

KAŠLÍKOVÁ K.[1], ĎURÍČKOVÁ T.[2], KRAJČOVIČOVÁ Z.[2], MELUŠ V.[2]

[1] *Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Trenčíne, Trenčín*
[2] *Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne*

ABSTRAKT
V našej práci sme vyhodnotili hygienickú situáciu v potravinových prevádzkach Trenčianskeho kraja v rokoch 2011 - 2013. Sledovanými ukazovateľmi boli *Escherichia coli*, *Staphyloccocus aureus* a *Salmonella sp*. Vzorky sterov z prevádzok odoberali a spracovali pracovníci z Oddelenia hygieny výživy a bezpečnosti potravín Regionálneho úradu verejného zdravotníctva so sídlom v Trenčíne. Výsledky poukazujú na značné nedostatky v kontrolovaných prevádzkach. Najviac zastúpená bola *Escherichia coli* (10,7%), potom *Staphylococcus aureus* (1%) a v 0,05% *Salmonella sp.*. Zo sledovaných typov prevádzok v počte pozitívnych nálezov boli na prvom mieste ázijské reštaurácie (26,7%), reštaurácie (21,3%), a pizzerie (16,7%). Pri vyhodnotení odberových miest najviac pozitívnych nálezov bolo na pracovnej doske na zeleninu (18x *E. coli*, 1x *St. aureus*), nasledovali ruky personálu (14x *E. coli*, 2x *St. aureus*) a stôl na expedíciu (11x *E. coli*, 4x *St. aureus*).

Kľúčové slova: *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. *Salmonella sp*. Stery z potravinových prevádzok. Laboratórna diagnostika.

ABSTRACT
In our work, we evaluated the sanitary situation in food services in Trenčín region in the years 2011 - 2013. The monitored indicators were *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella sp*. swab samples of plants collected and processed by staff from the Department of Hygiene Nutrition and Safety of Regional Public Health Authority in Trenčín. Results showed significant weaknesses in controlled facilities. The most frequently present were *Escherichia coli* (10.7%), and *Staphylococcus aureus* (1%) and *Salmonella sp* (0.05%). From the monitored food services the first place have taken Asian restaurants (26.7%), restaurants (21 3%), and pizza (16.7%). In the evaluation of sampling sites were the most positive findings of the working table for vegetables (18x *E. coli*, 1x *St. aureus*), followed hands of personnel (14x *E. coli*, 2x *St. aureus*) and the table for expedition (11x *E. coli*, 4x *St. aureus*).

Key words: *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. *Salmonella sp*. Indicators from greengrocery's subsidiaries. Laboratory diagnostics.

ÚVOD

Tak ako je dôležité vyšetrovanie vzoriek potravín a ich hygienická nezávadnosť, je dôležité vyšetrovanie vzoriek sterov z potravinových prevádzok. Mikrobiologická kontaminácia vytypovaných rizikových miest svedčí o hygienickej úrovni danej prevádzky. Je veľmi dôležité si uvedomiť, že zlá hygiena na prevádzke je jedným z možných faktorov prenosu baktérií na potraviny a z nich ďalej na človeka a tým spôsobiť závažnú alimentárnu infekciu, ktorých trend neustále stúpa. Potraviny sa môžu skontaminovať pri distribúcii, počas nedostatočného skladovania, vo výrobni ale aj pri samotnom procese prípravy jedla, kedy sa križujú pracovné plochy určené na jednotlivú prípravu pokrmu [1-3].

Alimentárne infekcie inak označované aj ako otravy a infekcie z potravín, sú ochorenia, ktoré sa prejavia po požití kontaminovaných potravín. Za vstupnou bránu nákazy sa považuje tráviace ústrojenstvo. Niektoré baktérie nespôsobujú ochorenie hneď, ale ich úlohou je produkovať za vhodných podmienok toxíny, ktoré vyvolávajú ochorenie. Pôvodcom alimentárnych ochorení môže byť: zviera, človek, ktorý je buď chorý alebo bacilonosič a vonkajšie prostredie, kde pôvodca prežíva [4]. Prenos nákazy sa môže uskutočniť aj nepriamou cestou - z kontaminovaných potravín, prostredníctvom hmyzu, roztočov. Článkonožce a hlodavce prenášajú choroboplodné zárodky, ktoré môžu kontaminovať potraviny.

Najčastejšou príčinou črevných infekčných ochorení sú baktérie *Salmonella sp., Shigella sp., Campylobacter sp., Escherichia coli, Staphylococcus aureus* alebo ich toxíny. Spôsobujú poškodenie tráviaceho systému, ktoré sa prejavuje ako gastritída (zápal žalúdka), enteritída (zápal tenkého čreva). Hlavným príznakom ochorenia je hnačka. Medzi najčastejšie alimentárne infekcie zaraďujeme: salmonelózu, stafylokokovú enterotoxikózu, botulizmus, infekcie spôsobené enterokokmi.

V dnešnej dobe sa podieľa na zabezpečovaní kritických kontrolných bodov a analýzu nebezpečenstva systém HACCP (*z angl. H*azard Analysis

and Critical Control), ktor bol vyvinutý v 60. rokoch minulého storočia v USA. Celý systém bol vybudovaný tak, aby vylúčil alebo na maximálne možnú mieru minimalizoval riziká, ktoré by mohli spôsobiť alimentárne infekcie [5].

Najdôležitejšia a najľahšia je aj tak v prvom rade prevencia, ktorej prioritou je hygienické dodržiavanie všetkých zásad a tým je samozrejme zníženie rizika vzniku nákazy z potravín. Pri nedostatkoch zistených počas Štátneho zdravotného dozoru a náleze pozitívnych patogénov zo vzoriek sterov z prevádzky je potrebné prehodnotiť osobnú hygienu na pracovisku, riadiť sa pokynmi uvedenými v prevádzkovom poriadku a dôslednejšie dodržiavať hygienické zásady plynúce z HACCP [5].

CIELE

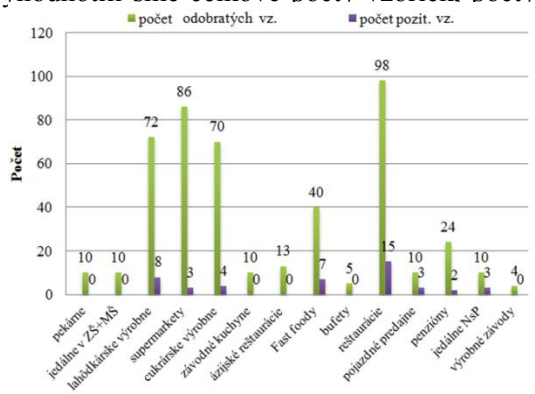
Cieľom práce bolo štatistické vyhodnotenie počtu pozitívnych vzoriek a pozitívnych odberových miest za roky 2011 - 2013 podľa typu prevádzky.

MATERIÁL A METÓDY

Stery z potravinových prevádzok boli odobraté pracovníkmi Oddelenia hygieny výživy a následne boli spracované v laboratóriách RÚVZ Trenčín na Oddelení mikrobiológie a biológie životného prostredia. Po príjme vzoriek sterov boli označené skúmavky s tampónmi naočkované na povrch krvného a Endo agaru. Následne sa tampón inkuboval v neselektívnom tekutom médiu a potom v selektívnom tekutom médiu. Po tomto pomnožení sa vyočkuje na selektívne pevné média, pričom sa sleduje prítomnosť patogénnych a podmienečne patogénnych baktérií, patriacich do čeľade *Enterobacteriaceae* [6-9].

VÝSLEDKY

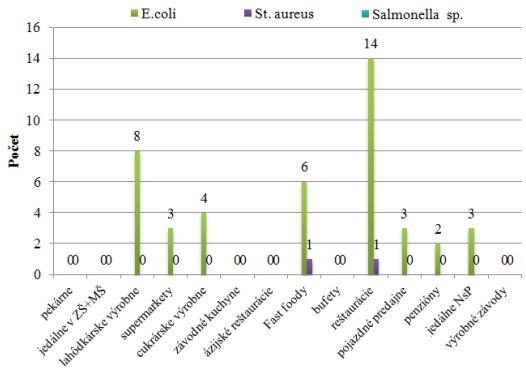
Nálezy v roku 2011 sú uvedené v grafoch 1 a 2. Vyhodnotili sme celkové počty vzoriek, počty pozitívnych vzoriek a pozitívne odberové miesta v sledovaných prevádzkach (tab. 1).



Graf 1 Počet odobratých vzoriek a počet pozitívnych vzoriek v jednotlivých prevádzkach v roku 2011

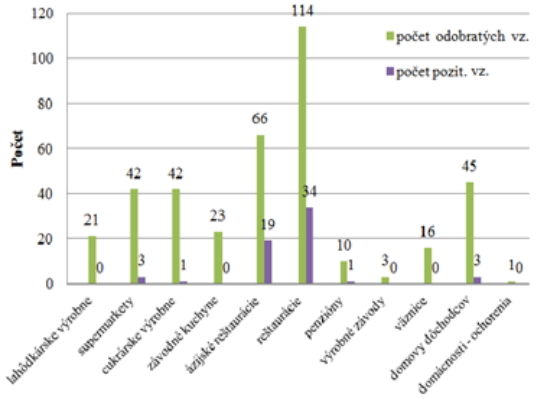
Tabuľka 1 Prehľad pozitívnych odberových miest v roku 2011

pozitívne odberové miesta	sledované patogény		
	E.coli	*St. aureus*	*Salmonella sp.*
vodovodná batéria	4	0	0
dodávkové kliešte	1	0	0
naberačka	3	0	0
manipulačné páky	2	0	0
chladnička	2	1	0
vedro na šaláty	1	0	0
čistá miska	4	0	0
plastový vandlík	1	0	0
štipec na zeleninu	1	0	0
úchytka rúry	1	0	0
váha	1	0	0
mikrovlnná rúra	1	0	0
nôž	1	0	0
miska s bryndzou	1	0	0
ruky personálu	1	0	0
nárezový stroj	1	0	0
krájač zeleniny	1	0	0
klát na mäso	1	0	0
pracovný stôl - expedícia	1	1	0
pracovný stôl - surové mäso	1	0	0
pracovný stôl - varené mäso	1	0	0
pracovný stôl - zelenina	1	0	0
pracovný stôl - príprava mix stravy	1	0	0
pracovná plocha	2	0	0
pracovná plocha - múčne jedlo	1	0	0
pracovná plocha- príprava cesta	1	0	0
pracovná doska - zelenina	5	0	0
pracovná doska - krájanie	1	0	0
celkový počet pozit. vzoriek	**43**	**2**	**0**

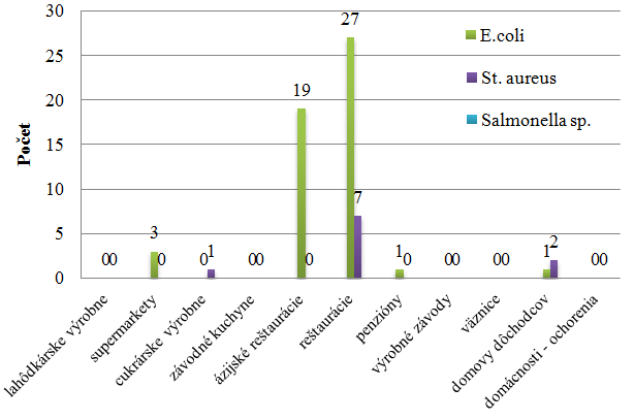


Graf 2 Počet pozitívnych nálezov v jednotlivých prevádzkach roku 2011

Nálezy v roku 2012 sú uvedené v grafoch 3 a 4. Aj pre toto časové obdobie sme vyhodnotili celkové počty vzoriek, počty pozitívnych vzoriek a pozitívne odberové miesta v sledovaných prevádzkach. Prehľad pozitívnych odberových miest v roku 2011 uvádza tabuľka 2.



Graf 3 Počet odobratých vzoriek a počet pozitívnych vzoriek v jednotlivých prevádzkach v roku 2012

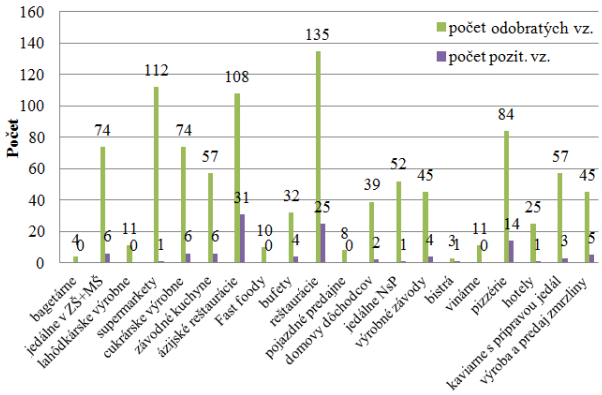


Graf 4 Počet pozitívnych nálezov v jednotlivých prevádzkach v roku 2012

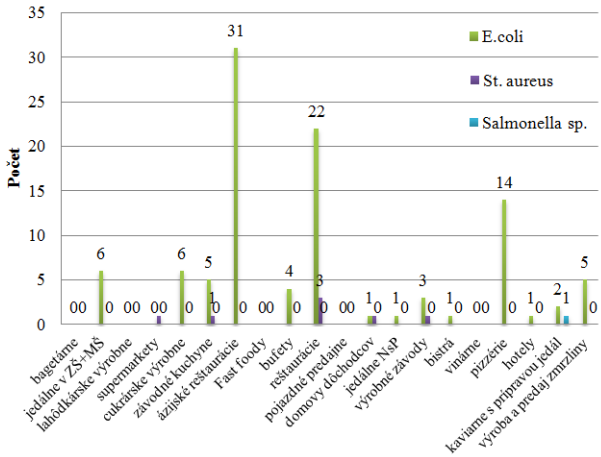
Tabuľka 2 Prehľad pozitívnych odberových miest v roku 2012

pozitívne odberové miesta	sledované patogény		
	E.coli	*St. aureus*	*Salmonella sp.*
vodovodná batéria	2	0	0
čistý tanier	3	0	0
naberačka	2	0	0
umývadlo - múčna príprava	0	1	0
kľučka konvektomatu	1	0	0
čistá miska	1	0	0
plastový vandlík	1	0	0
vedro s klobáskou	1	0	0
váha	1	1	0
nôž	2	0	0
mlynček	0	1	0
varnica	2	1	0
ruky personálu	4	0	0
rukavice	1	0	0
krájač zeleniny	1	0	0
pracovný stôl - expedícia	4	2	0
pracovná plocha - zelenina	5	0	0
pracovná plocha - výtlk vajec	2	0	0
pracovná plocha - varené mäso	3	1	0
pracovná plocha - teplý pult	2	0	0
pracovná plocha - predaj	1	0	0
pracovná plocha - pizza	1	0	0
pracovná plocha - rýchle občerstvenie	1	0	0
pracovná plocha - dohotovov. výrobkov	0	1	0
pracovná doska - zelenina	4	1	0
pracovná doska - surové mäso	2	1	0
pracovná doska - tepelne oprac. mäso	3	0	0
pracovná doska - neurčená	1	0	0
celkový počet pozit. vzoriek	**51**	**10**	**0**

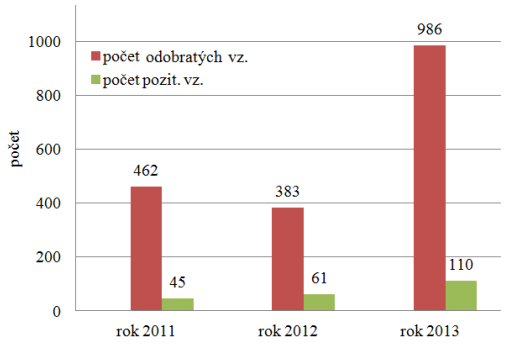
Údaje z roku 2013 sú uvedené v grafoch 5 a 6 a v tabuľke 3.



Graf 5 Počet odobratých vzoriek a počet pozitívnych vzoriek v jednotlivých prevádzkach v roku 2013



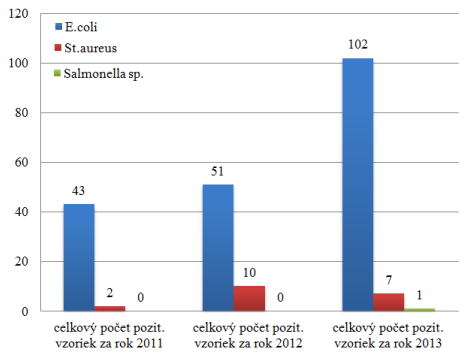
Graf 6 Počet pozitívnych nálezov v jednotlivých prevádzkach v roku 2013



Graf 7 Celkové počty odobratých vzoriek a pozitívnych vzoriek rokoch 2011-2013

Tabuľka 3 Prehľad pozitívnych odberových miest v roku 2013

pozitívne odberové miesta	sledované patogény		
	E.coli	*St. aureus*	*Salmonella sp.*
vodovodná batéria	5	0	0
porcovačka na zmrzlinu	1	0	0
nádoba na mäso	1	0	0
pohár	2	0	0
chladnička	4	0	1
čistý plech	1	1	0
čistá miska	3	0	0
miešač zeleniny	1	0	0
výrobník zmrzliny	1	0	0
váha	2	0	0
gastro nádoba, fritéza	3	0	0
nôž	2	0	0
úchytka mrazničky	3	0	0
ruky personálu	9	2	0
nárezový stroj	4	2	0
tanier čistý	4	0	0
odkladací stôl	1	0	0
pracovný stôl - expedícia	6	1	0
pracovný stôl - surové mäso	6	0	0
pracovný stôl - varené mäso	3	0	0
pracovný stôl - zelenina	8	1	0
pracovný stôl - múčna príprava	4	0	0
pracovná plocha - rýchle občerstvenie	1	0	0
pracovná plocha - použitý riad	1	0	0
prac. plocha- čistá príprava	2	0	0
prac. plocha - výtlk vajec	2	0	0
pracovná doska - zelenina	4	0	0
pracovná doska - tepelne oprac. mäso	5	0	0
pracovná doska - príručná	3	0	0
pracovná doska - surové mäso	4	0	0
pracovná doska - knedle	2	0	0
obklad steny	2	0	0
skrinky v šatni, pracovný odev	2	0	0
Celkový počet vzoriek	**102**	**7**	**1**



Graf 8 Celkový počet pozitívnych vzoriek podľa sledovaných ukazovateľov v rokoch 2011-2013

Celkové počty odobraných vzoriek v sledovanom období rokov 2011-2013 ako aj početnosti jednotlivých sledovaných patogénov sú uvedené v grafoch 7 a 8.

DISKUSIA

Problém alimentárnych ochorení nie je problémom týkajúcim sa len potravinových prevádzokh Trenčianskeho kraja. Alimentárne infekcie sú na svete veľmi rozšírené. Len na Slovensku je zaznamenaných 20 000 črevných infekcií za rok. Črevné infekcie existujú v priebehu celého roka a najčastejšie nákazy sa vyskytujú v teplých letných mesiacoch, kde dominuje salmonelóza.

V našej štúdii sme zistili veľké nedostatky v sledovaných prevádzkach. Počas sledovaného obdobia rokov 2011 – 2013 sme sa zamerali na sledovanie patogénov, ktoré sa najčastejšie vyskytovali na prevádzkach, a to *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* a *Salmonella sp.* Aj keď salmonela bola iba v jednom prípade pre závažnosť patogénu sme ju zahrnuli do tejto práce. Celkovo bolo odobratých spolu 1831 vzoriek sterov z potravinových prevádzok, z tohto počtu bolo 216 vzoriek pozitívnych v našich sledovaných ukazovateľoch, čo činilo 11,8%. V roku 2013 sa oproti predchádzajúcim dvom rokom vyšetril dvojnásobok vzoriek, čo bolo spôsobené mimoriadnymi úlohami, ktoré zadal hlavný hygienik Slovenskej republiky a boli po každé zamerané na kontrolu určitého typu prevádzok.

Najviac zastúpená bola *Escherichia coli* v 196 vzorkách (10,7%), na druhom mieste bol *Staphylococcus aureus* v 19 vzorkách (1%) a v jednom prípade sa vyskytla *Salmonella sp.* (0,05%), ktorá sa zachytila v chladničke v priestore na odkladanie vajec. Zdrojom boli kontaminované vajcia aj škrupiny, ktoré spôsobili domácu epidémiu

a samozrejme problémy na prevádzke, kde konala oslava.

V sledovanom období pracovníci Oddelenia hygieny výživy a bezpečnosti potravín vykonali kontroly v rôznych druhov stravovacích prevádzok, ktoré sme kvôli štatistickému vyhodnoteniu rozdelili na 22 typov stravovacích zariadení. Najviac vzoriek bolo odobratých v reštauráciách – 347, na druhom mieste v počte odobratých vzoriek 240 boli supermarkety. Na treťom mieste sa umiestnili ázijské reštaurácie (187 vzoriek). Kontrola v supermarketoch a ázijských prevádzkach bola cielená úloha vzhľadom k veľkým nedostatkom, ktoré sa v týchto prevádzkach nachádzajú.

Jedným z cieľov práce bolo vyhodnotiť pozitívne odberové miesta. Vzorky sterov z týchto miest sa odoberajú podľa typu a veľkosti prevádzky. Môže sa stať, že po príchode do prevádzky a zohľadnení hygienické stavu na prevádzke, nedostatkov, ktoré sú pomerne časté a špiny, napr. na policiach, pracovných plochách, kuchynskom náradí a pod., sa tieto odberové miesta môžu meniť.

Najhoršie výsledky sme zaznamenali v ázijských reštauráciách, kde sme v 50 prípadoch (26,7%) izolovali *Escherichia coli,* ktorá je indikátorom fekálnej kontaminácie. Hygiena v týchto zariadeniach je alarmujúca a zlepšenie nedostatkov v nedohľadne. Reštaurácie vykazovali 74 pozitívnych nálezov (21,3%) a na treťom mieste nevyhovujúcich prevádzok sa umiestnili pizzerie (16,7%). Čo sa týka prevádzok s najnižším percentom záchytu patogénov sa umiestnili supermarkety (2,9%). Toto číslo je pomerne nízke a veľmi priaznivé, vzhľadom k tomu, koľko ľudí sa tam vystrieda. Supermarkety boli kontrolované v rámci mimoriadnej úlohy hlavného hygienika SR, kde laboratórna diagnostika v ukazovateľoch *E. coli* a *Staphylococcus aureus* bola zameraná aj na ich kvantitatívne stanovenie. Odberovými miestami v týchto prevádzkach boli ruky pracovníkov, pracovné odevy, pásy na vykladanie tovaru pri pokladniach a samozrejmosťou boli aj nákupné vozíky. Medzi zariadenia s nulovým počtom pozitívnych vzoriek patrili bagetárne, vinárne a väznice. Aj keď výsledky u týchto prevádzok sú veľmi príjemným zistením, treba brať do úvahy celkový počet odobratých vzoriek v nich.

Na prvom mieste 33,1% pozitívnych vzoriek, ale dominujú bistrá, tam je treba vziať do úvahy celkový počet odobratých vzoriek a tie boli iba 3. Ostatné typy sledovaných prevádzok nemajú vysoké počty pozitívnych nálezov.

Podľa našich výsledkov najviac bola kontaminovaná pracovná doska na zeleninu – v 19 prípadoch (18x *E. coli,* 1x *St. aureus*), druhé najviac kontaminované boli ruky personálu – 16 vzoriek (14x *E. coli,* 2x *St. aureus*), na treťom mieste sa nachádza stôl na expedíciu – 15 pozitívnych vzoriek (11x *E. coli,* 4x *St. aureus*). Vodovodná batéria bola na štvrtom mieste v 11 prípadoch kontaminovaná *E. coli*.

ZÁVER

Naša práca po mikrobiologickej stránke poukazuje na veľké nedostatky na prevádzkach, v ktorých jednoznačnej dominuje v 196 prípadoch nález *Escherichia coli,* ktorá sa nachádza v črevách teplokrvných živočích a zostáva už iba na „zamyslenie“ odkiaľ sa môže vyskytovať v potravinových prevádzkach.

Celkovo bolo odobratých 1831 vzoriek sterov počas rokov 2011 – 2013. Z tohto počtu bolo 216 pozitívnych nálezov a to spomenutá *Escherichia coli* (196-krát), *Staphylococcus aureus* (19-krát) a *Salmonella sp.* (1 nález), čo činí 11,8% pozitívnych vzoriek.

Najviac pozitívnych vzoriek z celkového počtu sme zaznamenali v ázijských prevádzkach, reštauráciách a pizzeriách.

Preukázanie prítomností týchto baktérií v potravinárskych prevádzkach upozorňuje na nutnosť neustáleho dodržovania hygienických zásad na prevádzke, taktiež je potreba dodržiavať osobnú hygienu a nepodceňovať dezinfekciu pracovných plôch a pomocných zariadení.

V neposlednom rade je dôležité dodržiavať podmienky plynúce z prevádzkových denníkov a HACCP.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

[1] TRUSKOVÁ, I., KROMEROVÁ, K.: *Úradná kontrola potravín,* 1.vyd. Bratislava: Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky 2010. 110s. ISBN 978-80-7159-181-8.

[2] JURIŠ, P., MITERPÁKOVÁ, M.: *Hygiena prostredia*. 1.vyd. Prešov: Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce, 2006. 88s. ISBN 80-969449-5-9.

[3] ARPAI, J., BARTL, V.: *Potravinárska mikrobiológia*. Bratislava: Alfa, 1977. 280s. ISBNI 43-138-76

[4] http://www.epis.sk/InformacnaCast/Temy/AlimentarneNakazy.aspx [cit. 11.12.2013].

[5] http://haccpoint.sk/ [cit. 11.1.2014].

[6] *Štandardný pracovný postup* – Mikrobiologické vyšetrenie sterov. Oddelenie mikrobiológie a biológie životného prostredia, regionálny úrad verejného zdravotníctva Trenčín.

[7] *ENTEROTest24* – Návod na použitie a interpretáciu výsledkov. PLIVA – Lachema Diagnostika, s.r.o., Karásek 1, 621 33 Brno.

[8] VOTAVA, M. a kol.: *Lékařská mikrobiologie speciální*.1vyd. Brno: Neptun, 2001. 247s. ISBN 80-902896-2-2.

[9] http://www.hpl.sk/ponuka-hpl/vyroba-kultivacnych-medii [cit. 12.2.2014]

[10] LANGŠÁDL, L.: *Vybrané kapitoly z mikrobiológie, epidemiológie a hygieny*, 1.vyd. Trnava: Univerzita sv. Cyrila a Metoda, 2008. 94s. ISBN 978-80-8105-052-0.

FAKTORY ŽIVOTNÉHO ŠTÝLU V ETIOLÓGII KARCINÓMU KRČKA MATERNICE VO VYBRANEJ POPULAČNEJ SKUPINE
LIFESTYLE FACTORS IN THE ETIOLOGY OF CERVICAL CANCER IN SELECTED POPULATION GROUP

TIRPÁKOVÁ Michaela

Ústav verejného zdravotníctva, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Košice

ABSTRAKT

Východiská: Karcinóm krčka maternice je častým onkologickým ochorením v ženskej populácii vo veku 15 - 44 rokov. Vzorku tvorilo 240 respondentiek, z toho 120 prípadov žien s histopatologickým nálezom a 120 zdravých žien v kontrolnej skupine. Na identifikáciu a kvantifikáciu sa použili primárne somatické, funkčné, psycho-sociálne, socio-ekonomické parametre a histopatologické nálezy zo zdravotnej dokumentácie respondentiek.

Ciele: Na základe získaných údajov z anonymných dotazníkov a zdravotnej dokumentácie analyzovať jednotlivé parametre v skupine chorých a zdravých respondentiek a porovnať rozdiely.

Súbor a metódy: Získané údaje sa štatisticky spracovali v programe Excel a SPSS-14, štatistická významnosť parametrov medzi rizikovou skupinou chorých žien a kontrolnou skupinou sa testovala chí-kvadrát a Fisherovým exaktným testom.

Výsledky: Z analyzovaných výsledkov výskumu vyplýva, že negatívne riziko vzniku rakoviny krčka maternice ovplyvňuje aj spôsob stravovania, konzumácia alkoholu a fajčenie.

Záver: Prioritou je stabilizovať vzťah k upevneniu postojov v populácii k vlastnému zdraviu v rovine intervencie podpory zdravia. V budúcnosti v podobnej štúdii bude potrebné doplnenie sledovaných rizikových parametrov a bližšia špecifikácia už známych rizikových faktorov.

Kľúčové slová: Karcinóm krčka maternice. Rizikové faktory. Kvalita života. Fajčenie. Alkohol.

ABSTRACT

Background: Cervical cancer is a frequent cancer of the female population at age 15-44 years. Sample consisted of 240 respondents, of which 120 cases of women with histopathological findings and 120 healthy women in the control group. For identification and quantification were used primarily somatic, functional, psycho-social, socio-economic parameters and histopathological findings of the medical records of respondents.

Objectives: On the basis of the data obtained from anonymous questionnaires and medical documentation to analyze the different parameters in the group of patients and healthy female and compare the differences.

Materials and Methods: The data were statistically processed in Excel and SPSS-14 statistical significance of parameters between the risk group of women patients and the control group was tested by chi-square and Fisher's exact test.

Results: The analyzed results of research show that the negative risk of cervical cancer also affects diet, alcohol consumption and smoking.

Conclusion: The priority is to stabilize the relationship to the strengthening of attitudes in the population to their own health on the level of health promotion interventions. In future similar studies will be necessary to supplement the monitoring of risk parameters and more detailed specification already known risk factors.

Keywords: Cervical cancer. Risk factors. Quality of life. Smoking. Alkohol.

ÚVOD

Celosvetovo diagnostikovaných nádorov krčka maternice je približne 470 000 prípadov za jeden rok. Malignita predstavuje asi 10% všetkých onkologických ochorení v ženskej populácii. Pokrok v znižovaní úmrtnosti na rakovinu krčka maternice je brzdený práve prístupom k základnej zdravotnej starostlivosti a kvalitnej radiačnej terapii v rozvojových krajinách. Na celom svete v roku 2008 zomrelo asi 287 000 žien na následky malignity krčka maternice a očakáva sa nárast na 410 000 úmrtí (Thomas, 2011). Aj cez dobre definované a známe prednádorové stavy a dostupné metódy ich detekcie je výskyt tohto nádoru stále vysoký, incidencia je v SR vyššia ako v ostatných vyspelých krajinách. Počas jedného roka v SR počet nových diagnóz predstavuje asi 550 - 600 prípadov, pričom asi 200 - 250 žien tejto malignite ročne podľahne. Z etiologického hľadiska sa predpokladá multifaktoriálny priebeh spojený s nahromadením genetických zmien postihujúcich onkogény, tumorsupresorové a mutátorové gény, ktoré majú kľúčovú funkciu v bunkovej regulácii. Cytogenetické a genetické charakteristiky nádorov v korelácii s ostatnými biologickými parametrami upresňujú vedomosti o karcinogenéze. Malígne ochorenie sa vyvíja dlhšie obdobie od ľahko liečiteľných prekanceróz po vyššie štádiá (prognosticky relevantnejším klinickým štádiám) a v súčasnosti existujú adekvátne prebioptické metódy využiteľné v jeho skríningu.

Celoživotné riziko vzniku karcinómu krčka maternice je vyššie v krajinách bez rutinného skrínin-

gového programu, aj keď zavedenie skríningu znížilo incidenciu v niektorých krajinách až o 80% (Denny et al., 2005), tieto programy však nezabránia šíreniu infekcie HPV, ako najvýznamnejšieho etiologického faktora (Baseman, Koutsky, 2005). Medzi oblasti s najvyššou incidenciou patria najmä južná a východná Ázia, Melanézia, Karibská oblasť a stredná Amerika. Predpokladaná incidencia v rizikových oblastiach je viac ako 40 prípadov na 100 000 žien V rozvojových krajinách veľa žien nemá prístup k systémovému skríningovému vyšetreniu v rámci prevencie (Bosch et al., 2002). Dokonca aj v krajinách už so zavedeným skríningom existujú ženy, ktoré sa ho pravidelne nezúčastňujú, v týchto oblastiach až približne 50% prípadov diagnostikovaných karcinómov krčka maternice pripadá na ženy zanedbávajúce preventívny skríning. V civilizovaných krajinách sa podarilo v posledných 30 rokoch zmierniť výskyt ochorenia o viac ako polovicu. Je to následkom praktického uplatnenia skríningových programov a včasnej detekcie a terapie prekanceróz. K pozitívnym faktorom v dnešných epidemiologických štúdiách, ktoré mohli tiež zohrať úlohu v znížení incidencie, patrí pokles pôrodnosti, zlepšenie stravovania (vyššia konzumácia zeleniny a ovocia ako zdroja vitamínov a betakaroténu), ale i väčšia rozvážnosť v sexuálnych vzťahoch, obmedzenie fajčenia a iné faktory (Denny et al., 2005). Karcinóm krčka maternice sa najčastejšie objavuje v reprodukčnom (fertilnom) období medzi 30. - 50. rokom života (1/2 všetkých prípadov ochorení), prípadne v perimenopauze. Maximum výskytu je medzi 45 - 50 rokom života u žien. Druhý vrchol prevalencie sa začína objavovať 10 - 15 rokov po nástupe menopauzy. V rozvojových krajinách existuje určitá priama korelácia medzi incidenciou a mortalitou na karcinóm cervixu.

Za posledných 10 rokov je vo svete evidovaný nárast fajčiarov medzi ženami. Najvyššia prevalencia je u žien mladých s nízkym vzdelaním a manuálnou prácou. Podľa štúdie WHO v 10 európskych krajinách, ktorá skúmala výskyt fajčenia v ženskej populácii, až 1/3 dievčat si prvú cigaretu zapáli ešte pred 13. rokom života. Na Slovensku fajčí asi 26% žien, pre porovnanie v Austrálii fajčí 29% žien, v USA fajčí 22% žien. Podľa odborných hodnotení v posledných dvoch dekádach prispieva fajčenie 30% k úmrtnosti na rakovinu a má kľúčovú úlohu v stúpajúcej incidencii onkologických ochorení. Už v roku 1977 vyslovil Winkelstein hypotézu o kauzálnom vzťahu fajčenia a rizikom vzniku karcinómu krčka maternice na základe vysokej korelácie medzi geografickým výskytom karcinómu cervixu a karcinómom pľúc, ktorý naznačuje možnú expozíciu rovnakými faktormi v životnom prostredí. Tiež histologická zhoda bunkového typu nádoru (squamocelulárny) túto hypotézu podporovala. Ďalšie štúdie tento predpoklad potvrdili a vplyv fajčenia bol dokázaný aj po štandardizácii počtu sexuálnych partnerov a prítomnosti infekcie vyvolanej HPV (Slattery et al., 1989). Bolo dokázané, že nikotín sa selektívne koncentruje v cervikálnom tkanive a jeho koncentrácia v mukóznom sekréte dosahuje hodnoty až 1 000 ng/ml (v porovnaní s 15-50 ng/ml v krvnom sére). Za týchto podmienok dochádza k zvýšenej proliferácii všetkých typov cervikálnych buniek, ktoré pri súčasne pôsobiacom zápale vyvolanom infekciou HPV sú vnímavejšie na ďalšie malígne degeneratívne zmeny.

Význam výživy v súvislosti s onkologickými ochoreniami je v súčasnosti zo všeobecného hľadiska široko akceptovaný. Komplikovaný vzťah stravovania a rizika vzniku nádoru je hlavne daný účinkom na dvoch protichodných úrovniach, ako faktorov nepriaznivých (zvyšujúcich riziko vzniku nádoru) a ako faktorov protektívnych (ochranných pred vznikom rakoviny). Kvalita štúdií dokazuje asociáciu výživy a riziko vzniku nádorov, nie len na úrovni hypotéz, ale formuláciou konkrétnych odporúčaní. Jedným z výstupov štúdií je aj revízia kvantifikácie podielu výživy na etiológii nádorov, ktorý je dnes označovaný ako preventabilné faktory diéty. Na základe dôkazov bol tento podiel vypočítaný na 29,3 až 40,6% všetkých nádorov celkovo podľa dát AICR/WCRF vydaných v roku 1997 (American Institute for Cancer Research / World Cancer Research Fund) – „dietary indicators“. Podľa analyzovaných dát AICR/WCRF, ktoré hodnotili viac ako 4 500 odborných štúdií venovaných tejto problematike, je miera preventability karcinómu krčka maternice 10 až 20% v závislosti od zloženia potravy. V cigaretovom dyme sú len rizikové faktory, ale výživa síce môže obsahovať takéto karcinogénne faktory, ale na druhej strane obsahuje látky protektívne a ich nedostatok potom funguje ako faktor rizikový. Celkový efekt tak záleží na dosiahnutom stupni rovnováhy. Mnohé štúdie dokazujú, že častá konzumácia ovocia a zeleniny pomáha redukovať vznik nádorov epiteliálneho pôvodu (nádory hltana, hrtana, pľúc,

žalúdka, pažeráka, hrubého čreva a krčka maternice). Výrazne protektívny vplyv má konzumácia ovocia a zeleniny, ktoré sú považované za nenahraditeľné prírodné zdroje látok s protinádorovými účinkami, kde sa uplatňuje kombinácia vitamínov, vlákniny a minerálnych látok s tzv. bioaktívnymi látkami.

Pri hodnotení výsledkov odborných štúdií zaoberajúcich sa konzumáciou alkoholu sú presvedčivé dôkazy o zvyšovaní rizika vzniku nádorov. Riziko zvyšuje akýkoľvek alkoholický nápoj, bez ohľadu na druh a koncentráciu. Alkoholické nápoje boli klasifikované ako karcinogény prvej triedy, t.j. karcinogénne pre človeka (IARC). Predpokladaný mechanizmus účinku alkoholu môže byť rôzny, zahrňujúci priamy efekt na špecifické cieľové tkanivá a orgány, tak aj nepriamy efekt systémový (zmena hladiny estrogénov alebo nutričnú deficienciu).

CIELE PRÁCE

Cieľom bolo na základe získaných údajov z anonymných dotazníkov a zdravotnej dokumentácie analyzovať jednotlivé parametre v skupine chorých a zdravých respondentiek a porovnať rozdiely. Štatistickou analýzou zhodnotiť vplyv vybraných rizikových faktorov na rozvoj incidencie a charakter malígnych lézií krčka maternice, zistiť vzájomnú koreláciu negenetických rizikových faktorov vo vybranej vzorke slovenských žien s histopatologickým nálezom v skupine chorých žien a porovnať výskyt týchto etiologických faktorov v skupine zdravých žien.

SÚBOR A METODIKA

V štúdii „case-control“ boli retrospektívne sledované vybrané parametre, ako možné rizikové faktory pri vzniku rakoviny krčka maternice, v skupine chorých žien a v kontrolnej skupine zdravých žien. Ako základné parametre boli zo zdravotnej dokumentácie vybrané údaje o pacientke, resp. o probandke v kontrolnej skupine ako je vek, parita, diagnóza (histopatologický nález), spontánne a umelé potraty, pôrod pred 16. rokom života a vek menarché. Súbor rizikových chorých žien bol rozdelený do skupín, v závislosti od histopatologického nálezu v zdravotnom zázname: pacientky s invazívnym karcinómom ICA (35), CIN I (16), CIN II (26), CIN III (34) a s histopatologickou léziou carcinoma in situ CIS (9). Štúdia „prípad-kontrola“ zahŕňa spolu celkovo 240 žien, ktoré boli jednotlivo vyhodnotené a štatisticky porovnávané, kde požadované rizikové parametre boli zisťované formou anonymného dotazníka a korelované s následným výsledkom histopatologického vyšetrenia zo zdravotnej dokumentácie každej pacientky a aj zo zdravotnej dokumentácie zdravých žien, ktoré absolvovali skríningové vyšetrenie v gynekologickej ambulancii.

Dotazník bol schválený etickou komisiou Východoslovenského onkologického ústavu a. s. v Košiciach, kde boli pacientky vedené v zdravotníckej evidencii a liečené, a v dvoch súkromných gynekologických ambulanciách v Košiciach. Po osobnom pohovore s účastníčkami výskumu bol každej pridelený dotazník. Dotazník bol zameraný na nasledovné informácie:

- *osobné údaje* - vek, rodinný stav, počet súrodencov, bydlisko, forma vzdelania, zamestnanie, telesnú výšku a telesnú hmotnosť, BMI index, tlak krvi,
- *údaje o rizikových faktoroch* – fajčenie, fajčiarske prostredie, racionálna výživa, konzumácia alkoholu, kávy, užívanie drog, vitamínové prípravky, režim dňa, pracovné prostredie, neuropsychické napätie, fyzická aktivita, onkologická anamnéza v rodine,
- *gynekologická anamnéza* – vek nástupu menarché, vek pri prvom pohlavnom styku, pôrod pred 16 rokov života, počet detí, počet pôrodov, počet spontánnych potratov a umelých prerušení gravidity, gynekologické operácie a ochorenia, užívanie hormonálnej antikoncepcie a hormonálnej substitučnej terapie, sexuálne prenosné ochorenia, absolvovanie gynekologických prehliadok a mamografické vyšetrenie.

Výsledky dát sa štatisticky spracovali pomocou programu Excel a SPSS-14 programu. Štatistickú významnosť početnosti výskytu jednotlivých parametrov medzi rizikovou skupinou chorých žien a kontrolnou skupinou, sa testovala chí-kvadrát testom a Fisherovým exaktným testom, za štatisticky významnú hodnotu sa považovala hladinu významnosti alfa $< 0,05$. Pre porovnanie frekvenčného výskytu reprodukčných a sociobiometrických parametrov bolo použité tzv. OR „Odds Ratio“ ako pomer výskytu určitého faktora v skupine chorých žien a v kontrolnej skupine, a pre hodnotenie rizika vzniku rakoviny krčka maternice tzv. RR „Relative Rrisk“ pre jednotlivé parametre.

VÝSLEDKY

V rámci celého súboru bol priemerný vek v skupine pacientok 43,59 v intervale od 25 do 73 rokov, v kontrolnej skupine zdravých žien má priemerný vek hodnotu 44,77. V mestskej aglomerácii žije 64,27% pacientok v chorej skupine a 70,83 žien v kontrolnej skupine. Na vidieku uvádza bydlisko zo skupiny pacientok 35,73% a v kontrolnej skupine 29,16% žien. Stupeň vzdelania bol percentuálne porovnaný medzi oboma skupinami. Ukončenú základnú školu v skupine pacientok má 7,96% oproti 8,33% v kontrolnej skupine, strednú odbornú školu bez maturity uvádza 21,43% v skupine pacientok a 13,33 v kontrolnej skupine. Percento ukončenej strednej školy s maturitou bolo 58,06% v skupine pacientok a 62,50% v kontrolnej skupine. Vysokoškolské vzdelanie uvádza v kontrolnej skupine viac žien, kde hodnota bola 15,83%, v porovnaní so skupinou žien s prekanceróznami a karcinómom krčka maternice s 11,94%.

Z porovnania výsledkov vyplýva, že v skupine pacientok je vyššia hodnota žien, ktoré fajčia, t.j. 67,55%. V kontrolnej skupine tvorili fajčiarky len 19,16%. Pri hodnotení rokov fajčenia bola priemerná hodnota (19,95 rokov), vyššia v skupine pacientok oproti kontrolnej skupine (14,39). Pri porovnaní rokov fajčenia v jednotlivých skupinách celého súboru je najvyššie percento 24,44% v skupine pacientok s ICA a najnižšia hodnota 14,39% v kontrolnej skupine. Rovnako aj pri analýze počtu vyfajčených cigariet v priebehu jedného dňa, kde v skupine pacientok je to 14,99 kusov cigariet a v kontrolnej skupine 11,52, je evidentný rozdiel medzi skupinamiu. Priemerný vek začiatku fajčenia je v skupine pacientok 21,38 rokov a v kontrolnej skupine je neskorší začiatok fajčenia 24,47 rokov. Fajčiarske prostredie je percentuálne oveľa vyššie v skupine pacientok oproti kontrole a to 58,2% k hodnote 20%. Vyšší podiel v prekanceróznom štádiu CIN III majú pacientky fajčiarky v porovnaní s nefajčiarkami (24 vs. 10), rovnako aj pacientky s léziou CIN I (11 vs. 5), CIN II (18 vs. 8). Nezistili sme však rozdiel vo výskyte invazívneho karcinómu medzi fajčiarkami a nefajčiarkami (18 vs. 17).

Odborné štúdie dokazujú, že strava chudobná na mikronutrienty zvyšuje pravdepodobnosť rozvoja onkologického ochorenia krčka maternice. Z výsledkov vyplýva, že percento dodržiavania zásad racionálnej výživy 70,32% je vyššie v kontrolnej skupine oproti percentu 36,95% v skupine pacientok. Za zmenu stravovania v poslednom roku sme pokladali dietetické opatrenia vo výžive z dôvodov nadváhy, tráviacich ťažkostí, metabolických porúch alebo kardiologických ťažkostí. Z výsledkov je vidieť rozdiel v konzumácii alkoholu medzi skupinou pacientok, kde pozítívne odpovedalo 48,58% a kontrolnou skupinou, kde percento bolo nižšie a to 32,86%. Za konzumáciu alkoholu sme pokladali užitie viac ako 2 dl vína, resp. viac ako 0,5 dl tvrdého alkoholu, častejšie ako raz za týždeň. Z konzumovania alkoholu bola v súbore preferovaná konzumácia vína, okrem skupiny s léziou ICA, kde bola preferencia destilátov.

Rizikový podiel jednotlivých hodnotených etiologických parametrov na výskyt inavazívneho karcinómu krčka maternice a jednotlivých histopatologických lézií v celom súbore bol vyjadrený ako „Odds Ratio“ a „Relative Risk“.

Z analýzy pre rizikové parametre (reprodukčné, environmentálne a demografické) po detailnom vyhodnotení vyplývajú štatisticky signifikantné korelácie medzi závažnosťou histopatologického nálezu a fajčením, fajčiarským prostredím, konzumáciou alkoholu a konzumáciou vitamínových prípravkov.

Tabuľka 1 Korelačná analýza pre vybrané rizikové parametre s vyjadrením stupňa závislosti pomocou Fisher´s exact testu a s 95 % intervalom spoľahlivosti (CI) a vyjadrením úrovne štatistickej významnosti vzájomnej závislosti

faktor/parameter	P value signifik.	95 % CI	SD chor.	SD KO
fajčenie A/N	p<0,0001	0,3420-0,5983	25,46	52,33
fajčiarske prostredie	p<0,0001	0,2576-0,5179	11,31	50,91
racionálna výživa	p<0,0001	0,2167-0,4705	22,63	35,36
alkohol A/N	p=0,0079	0,05446-0,3142	4,24	33,94
vitamín. prípravky	p=0,0005	0,1143-0,3863	12,73	49,50

Tabuľka 2 „Odds Ratio“ a „Relative Risk“ sledovaných parametrov medzi oboma hodnotenými skupinami a štatistický význam pri vzniku rakoviny krčka maternice (Fisher´s exact test)

parameter	OR	95 % CI	RR	95 % CI	štat. význ.
fajčenie	7,832	4,344-14,12	2,556	1,943-3,362	***
fajčiarske prostredie	6,534	4,983-13,32	2,104	1,638-2,702	***
konzum. alkoholu	2,111	1,243-3,587	1,430	1,117-1,831	**
konzum. vitam. prípr.	0,3560	0,201-0,630	0,6270	0,494-0,796	***

Legenda: OR – odds ratio; RR – relative risk; CI – cinfidence interval; * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001; n.s. – no significant p> 0,05

Trend závislosti medzi rizikovými parametrami a histopatologickým nálezom v skupine pacientok bol nasledovný: s pozitívnou anamnézou fajčenia, fajčiarskeho prostredia a väčšou dĺžkou fajčenia a stúpajúcim množstvom konzumácie alkoholu sme zaznamenali vzostupný trend závažnosti histologického nálezu.

DISKUSIA

Vo vyspelých krajinách sveta sa v incidencii a mortalite za posledné roky výrazne prejavil pokles (Parkin et al., 2002), zatiaľ však v SR je trend poklesu incidencie iba minimálny. Prognóza priebehu malignity zreteľne vychádza zo štádia, v ktorom je zachytené (Chargui et al., 2006), preto jeho včasná detekcia je podkladom pre efektívnu adjuvantnú terapiu. K znižovaniu výskytu pokročilých prípadov malignít krčka maternice dnes prispieva kolposkopické a cytologické vyšetrenie subtypov HPV infekcie, priameho vyvolávateľa karcinómu maternicového krčka (Monsonego, 2006). Čoraz väčší úspech zaručuje efektívne zameranie sa na skupiny žien s rizikovým sexuálnym správaním, ženy fajčiarky, ženy užívajúce hormonálnu antikoncepciu a na ženy so zvýšeným rizikom, ktoré majú ovplyvnenú lokálnu imunitu pri periodických alebo chronických vaginálnych infekciách vírusového či bakteriálneho pôvodu.

Pri analýze už známych etiologických vplyvov na riziko vzniku tejto malignity netreba zabudnúť na elimináciu modifikovateľných rizikových faktorov v rámci efektívnej primárnej a sekundárnej prevencie. Sem môžeme zaradiť kampane zamerané na racionálnu životosprávu, zdravotnú uvedomelosť a aktívnu prevenciu v ženskej populácii. Zo sumarizácie výsledkov 217 medzinárodných štúdií približne 78% ukázalo signifikantné zníženie rizika onkologického ochorenia ako následok vyššieho príjmu aspoň jednej hodnotenej kategórie zeleniny a/alebo ovocia. V našej štúdii dodržiavanie zásad racionálneho stravovania v skupine chorých žien uvádzalo 36,95% oproti percentu v kontrolnej skupine 70,32%, čo znamená evidentný signifikantný rozdiel štatistickej významnosti medzi oboma skupinami v hodnotenom súbore p < 0,001.

Z výsledkov odborných štúdií zaoberajúcich sa alkoholom sú presvedčivé dôkazy o zvyšovaní rizika vzniku nádorov pri zvýšenej konzumácii alkoholu. Aj v našich výsledkoch vyššie percento konzumácie alkoholu (48,58% vs. 32,86%) je práve v skupine pacientok s prekancerózami a invazívnym karcinómom krčka maternice, oproti zdravým ženám v kontrolnej skupine, so štatistickou významnosťou p < 0,01.

Fajčenie je jedným z najzávažnejších celosvetových zdravotníckych problémov súčasnej doby. Podľa našich zistení v skupine chorých žien prevalencia fajčenia je až v 67,55% z opýtaných žien a v kontrolnej len 19,16%, signifikantný rozdiel medzi oboma skupinami má hodnotu p < 0,001. Aj v počte rokov fajčenia bola hodnota v skupine chorých žien vyššia ako v skupine zdravých žien (19,95 vs. 14,39). Počet vyfajčených cigariet denne 14,99 bol v skupine pacientok s prekancerózami a invazívnym karcinómom oproti 11,52 v kontrolnej skupine.

ZÁVER

Analýza výsledkov sa sčasti zhoduje so závermi výstupov odborných prác o prevalencii rizikových faktorov, ale v niektorých parametroch výsledky nášho výskumu demonštrujú opačnú závislosť, vzhľadom na vznik danej patológie. Výskum a výsledky priniesli určitý názor na rozsah vplyvu rizikových parametrov na vznik malignity krčka maternice a svojimi výsledkami sčasti určuje tendenciu, kam by mali smerovať aktivity odbornej verejnosti v eliminácii rizikových vplyvov pred vznikom onkologického ochorenia krčka maternice. V budúcnosti v podobnej štúdii bude potrebné doplnenie sledovaných rizikových parametrov a bližšia špecifikácia už známych riziko-

vých faktorov. Recipročná korelácia cytológie, histológie a lokálnej expresie onkoproteínov umožní pomocou mechanizmu interakcie medzi tumor-supresorovými génmi (p53, RB, p73) a virálnymi onkoproteínmi (E6 a E7) pochopiť celý proces karcinogenézy pre dané štádium premalígneho nálezu (Hajduch a kol., 2004). Skorá diagnostika a adekvátna účinná terapia prispeje k zníženiu celkových finančných nákladov a dáva chorým ženám viac nádeje na uzdravenie.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

BASEMAN J, KOUTSKY L. 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology* 2005; 32: 16-24.

BOSCH FX, LORINTZ A, MUNOZ N, et al. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.* 2002; 55, 244-265.

DENNY L, KUHN L, DE SOUZA M, POLLACK AE, DUPREE W, WRIGHT JR TC. 2005. Screen-and-treat approaches for cervical cancer prevention in low-resource settings: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005; 294: 2173-2181.

HAJDUCH M., JAROŠOVÁ M., TROCHANEC R. 2004. Cytogenetické a molekulárně biologické markery v onkologii solidních nádoru a hemetologických malignit. *Klin. Onkol.* 2004; 17, Suppl., 51-56.

CHARGUI R, DAMAK T, KHOMSI F et al. 2006. Prognostic factors and clinicopathologic characteristics of invasive adenocarcinoma of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194 (1): 43-48.

MONSONEGO J. 2006. Emerging issues on HPV infections. From science to practice. *Karger*, Basel, 2006; p.275.

PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J, PISANI P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55 (2): 74-108.

SLATTERY ML, ROBINSON LM, SCHUMAN KL. 1989. Cigarette smoking and exposure to passive smoke are risk factors for cervical cancer. *JAMA* 1989; 261: 1593-1644.

THOMAS G. 2011. Are we making progress in curing advanced cervical cancer? *Journal of Clinical Oncology* 2011;. 29 (13): 1654-1656.

ŽIVOTNÝ ŠTÝL A OCHORENIA PEČENE
LIFESTYLE AND LIVER DISEASES

THÓTHOVÁ Jana [1], NETRIOVÁ Jana [2,3]

[1] *Katedra verejného zdravotníctva, Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety, Bratislava,*
[2] *Oddelenie klinickej biochémie a hematológie, Nemocnica sv. Michala a.s., Bratislava*
[3] *Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín*

ABSTRAKT
Realizácia zdravého životného štýlu je významným pozitívnym faktorom pri prevencii i terapii hepatálnych ochorení napriek zvýšeným nárokom na compliance pacientov. Cieľom našej práce bolo overiť vplyv pohlavia, rodinnej predispozície, zlozvykov a stravy na ochorenia pečene. Realizovali sme dotazníkový prieskum 340 respondentov. Z výsledkov vyplýva, že rodinná anamnéza štatisticky významne súvisí s hepatálnymi ochoreniami (p=0,03), ostatné faktory nepresiahli p-hodnotu testovacieho kritéria p=0,05. Podpora a rozvoj osvety v rodinách ostáva prioritou verejného zdravotníctva a trvalej snahy o zlepšenie zdravotného stavu našej populácie.

Kľúčové slová: Životný štýl. Hepatálne ochorenia.

ABSTRACT
The implementation of a healthy lifestyle is an important positive factor in the prevention and treatment of liver diseases, despite the increased demand for patients´ compliance. The aim of our study was to verify the effect of gender, family history, bad habits and diet on liver disease. We realised a questionnaire survey of 340 respondents. The results show that the family history significantly related to hepatal disease (p = 0.03), other factors did not exceeded at a p-value of the test criterion P=0.05. Support and development of education in the families remain the priority of the public health and sustained efforts to improve the health status of our population.

Key words: Lifestyle. Liver diseases

ÚVOD

Realizácia zdravého životného štýlu predlžuje život, zvyšuje jeho kvalitu a zlepšuje celkový stav jedinca. Trvalejšie duševné a fyzické zdravie sa dá získať a udržiavať len správnou životosprávou a správnym životným štýlom. Naopak, absencia zdravého štýlu život skracuje, znižuje jeho kvalitu a zhoršuje celkový zdravotný stav. Zdravý životný štýl je v súčasnej uponáhľanej modernej dobe vysoko podceňovaný. Váhu ľudského zdravia si zvyčajne uvedomujeme až po prepuknutí chorobného stavu. Riešenie našich zdravotných problémov následne hľadáme u doktorov a v rozličných zdravotníckych zariadeniach. Najjednoduchším a najlacnejším riešením je prevencia. Tá spočíva v zdravom životnom štýle a prevencii škodlivých návykov.

Úlohou predkladanej práce je vyzdvihnúť postavenie životného štýlu v udržaní dobrého zdravia, poukázať ako súvisí životný štýl so vznikom a rozvojom hepatálnych ochorení a aký má na ne vplyv.

PRIESKUMNÁ VZORKA

Informácie o životnom štýle a stravovacích návykoch boli získané formou dotazníkového prieskumu. Prieskum sa uskutočnil medzi pacientmi odberového centra Oddelenia klinickej biochémie a hematológie (OKBH) Nemocnice svätého Michala v Bratislave a vo Fakultnej nemocnici v Nitre. Úlohou respondentov bolo vybrať čo najrealistickejšiu odpoveď na otázky v dotazníku. Dotazník bol anonymný, pozostával z dvanástich uzatvorených otázok s možnosťou krúžkovania jednej, alebo viac vhodných odpovedí. Cieľom prieskumu bolo získať informácie o stravovaní, životnom štýle a faktoroch poukazujúcich na možný vznik poškodenia pečene. Dotazník vyplnilo 340 jedincov.

Zber údajov z dotazníkového prieskumu sa uskutočnil v decembri 2013 a v priebehu januára a februára 2014.

Návratnosť dotazníkov nebola 100%-ná, čo prispelo k menšiemu počtu vyzbieraných dotazníkov. Neúplne vyplnené dotazníky, cca 25 kusov, sme museli z celkového počtu tiež vyradiť.

METÓDY SPRACOVANIA ÚDAJOV

Nominálne znaky sme testovali pomocou kontingenčnej tabuľky. Rozdiely medzi číselnými premennými sme testovali neparametrickým Kruskal-Wallisovým testom. V prípade, ak bola p-hodnota testovacieho kritéria štatistického testu $p < 0,05$, považovali sme rozdiely medzi testovanými súbormi za štatisticky signifikantné. Závislosť medzi testovanými premennými sme overovali neparametrickým Spearmanovým korelačným koefi-

cientom, ktorého hodnotu sme interpretovali v závislosti od povahy testovaných premenných.

Pri spracovaní údajov z dotazníkového prieskumu sme overovali nasledovné hypotézy:

- ochorenie pečene ovplyvňuje pohlavie jedinca,
- ochorenie pečene ovplyvňuje rodinná predispozícia,
- ochorenie pečene ovplyvňujú zlozvyky,
- ochorenie pečene ovplyvňujú požívané druhy potravín,
- životný štýl ovplyňuje ochorenie pečene.

VÝSLEDKY

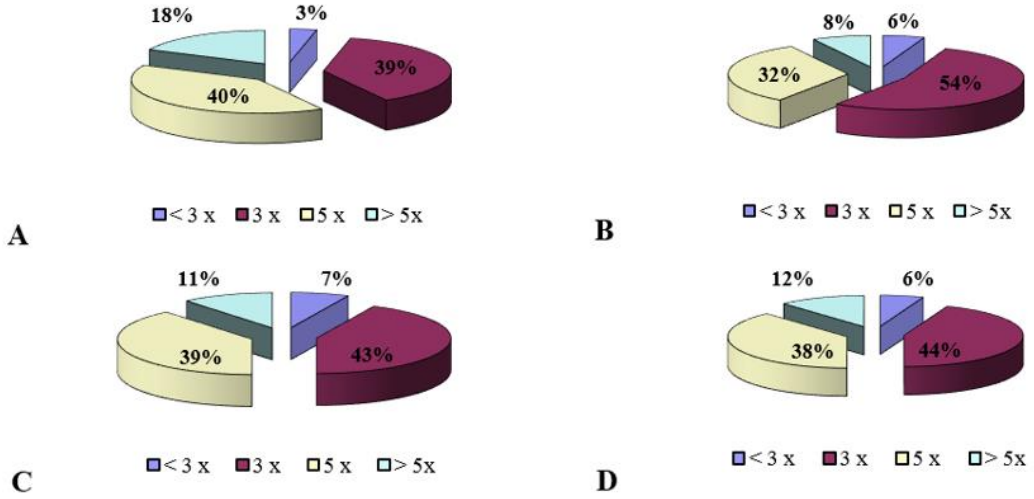
Dotazníkového prieskumu sa zúčastnilo 340 respondentov - 135 mužov (39,71%) a 205 žien (60,20%) vo veku od 18 do 100 rokov v štyroch vekových kategóriách. Najviac bola zastúpená najmladšia veková kategória od 18 do 30 rokov (34,41%), najmenej odpovedí bolo od respondentov vo veku 71 – 100 rokov (10,00%). Prevažná časť respondentov býva v meste (72,94%). Zastúpenie respondentov dotazníkového prieskumu jednotlivých vekových kategórií v závislosti od pobytu, pohlavia a veku je zaznamenané v tabuľke 1.

Tabuľka 1 Charakteristika skúmaného súboru

Kategória	Vek (roky)	Počet respondentov	Počet respondentov v [%]	Počet respondentov		
				muži (♂) ženy (♀)	z mesta	z dediny
A	18 - 30	117	34,41	♂: 36	27	9
				♀: 81	53	28
B	31 – 50	89	26,18	♂: 43	33	10
				♀: 46	37	9
C	51 – 70	100	29,41	♂: 41	32	9
				♀: 59	45	14
D	71 - 100	34	10,00	♂: 15	12	3
				♀: 19	9	10

Pre zdravý vývoj a fungovanie organizmu je potrebná správna životospráva, v primeranom množstve a kvalite. Je zaujímavé, že presne polovica respondentov (170) si myslí, že sa stravuje správne, druhá polovica považuje svoje stravovanie za nesprávne, pričom trikrát denne prijíma potravu 151 respondentov (44%) a viac ako päťkrát 43 respondentov, čo predstavuje 13%. Menej ako trikrát denne jedáva 18 respondentov.

Medzi pomerným zastúpením respondentov v jednotlivých vekových kategóriách ku frekvencii príjmu stravy v priebehu dňa nie je výrazný rozdiel. U najmladšej vekovej kategórii sa respondenti stravujú prevažne päťkrát (41%) v priebehu dňa, čo možno ľahko vysvetliť ich pomerne veľkým výdajom energie spotrebovanej na vývoj a fyzické – športové aktivity, resp. rýchlejší metabolizmus oproti starším vekovým skupinám (graf 1).



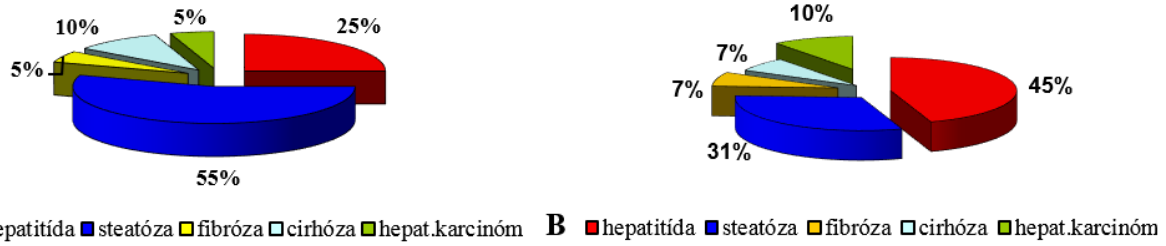
Graf 1 Frekvencia príjmu stravy v závislosti od veku respondentov: A – 18-30 rokov; B – 31–50 rokov; C – 51-70 rokov; D – 71-100 rokov

Mnohé stravovacie návyky sú odrazom samotného zdravia a vyberáme si to, čo nám prospieva.

Pred hodnotením výberu potravín vo vzťahu k ochoreniam sme potrebovali zistiť, či sa vo výberovej skupine už nachádzajú respondenti s nejakým ochorením pečene. Z celkového počtu 340 respondentov dotazníkového prieskumu uviedlo celkovo 47 prítomnosť nejakej choroby pečene: 18 respondentov uviedlo, že má diagnostikovanú hepatitídu (s neuvedením konkrétneho typu), steatózu uviedlo 20 respondentov, fibrózu 3, cirhózu 4 a hepatocelulárny karcinóm bol diagnostikovaný u štyroch jedincov. Celkovo bolo 49 odpovedí, lebo dvaja pacienti s hepatitídou zároveň uviedli aj prítomnosť steatózy resp. cirhózy.

U mužov prevládala steatóza (55%) nad hepatidídou (25%). U žien bol najväčší výskyt hepatitídy (45%), čo môže byť spôsobené aj prenesenou infekciou pri častejšom podávaní krvných derivátov (hlavne pri veľkých krvných stratách pri pôrode) (graf 2).

Zaujímavým fenoménom je rodinná anamnéza, resp. výskyt ochorenia u príbuzných, čo môže veľmi ovplyvniť celkovú životosprávu a životný štýl všetkých jedincov komunity. Z celkového počtu respondentov 3,53% sa nevyjadrilo k otázke, či niekto v rodine mal alebo má problémy s pečeňou. Štvrtina respondentov sa s ochorením stretla. Z odpovedí vyplynulo, že rodinná predispozícia štatisticky významne vplýva na manifestáciu hepatálnych ochorení (tabuľky 3, 4).



Graf 2 Zastúpenie hepatálnych ochorení u respondentov: A - u mužov; B - u žien

Tabuľka 3 Kontingenčná tabuľka – rodinná predispozícia a hepatálne ochorenia

Ochorenie v rodine	Ochorenia respondentov			Spolu
	Hepatitída	Steatóza, Fibróza, Cirhóza	Hepatocelulárny karcinóm	
Prítomné	10	9	4	23
Neprítomné	8	18	0	26
Spolu	18	27	4	49

Legenda: X^2=7,07, *df*=2, *p*=0,03

Tabuľka 4 Očakávané frekvencie ochorení v rodinách (podľa údajov z tabuľky 3)

Ochorenie v rodine	Ochorenia respondentov			Spolu
	Hepatitída	Steatóza, Fibróza, Cirhóza	Hepatocelulárny karcinóm	
Prítomné	8	13	2	23
Neprítomné	10	14	2	26
Spolu	18	27	4	49

Vplyv rodinnej predispozície sa prejavuje predovšetkým v oblasti neinfekčných ochorení pečene – fibrózy, steatózy, cirhózy a hepatocelulárneho karcinómu. Všetci respondenti s hepatocelulárnym karcinómom uviedli pozitívnu rodinnú anamnézu (tabuľka 3). Naopak, u pacientov s fibrózou, cirhózou i steatózou je uvedený počet pozitívne rodinnej anamnézy (n = 9) menší, ako očakávaný počet (n = 13) (tabuľka 4).

Výsledky štatistického testovania sú iba orientačné vzhľadom k nízkym očakávaným početnostiam v skupine pacientov s hepatocelulárnym karcinómom.

Zlozvyky, ktorým sa nevieme alebo nechceme vyhnúť – stres, pitie alkoholu, fajčenie alebo príjem mastných jedál - ovplyvňujú naše zdravie. K najpočetnejším patrí stres a pociťujú ho takmer trištvrtiny respondentov (71,47%). K fajčeniu (94

respondentov) a preferovaniu mastnejších jedál (95 respondentov) sa priznalo cez 27% opýtaných. Stále aktuálne je aj požívanie alkoholu, ktoré ako zlozvyk sa vyskytuje u 17,65% respondentov (60) dotazníkového prieskumu.

Testovali sme vplyv zlozvykov na hepatálne ochorenia. V našej prieskumnej vzorke sme však nepotvrdili súvislosť medzi poškodením pečene a zlozvykom (tabuľky 5 – 8).

Tabuľka 5 Vzťah konzumácie alkoholu k ochoreniu pečene respondentov

Rizikový faktor	Hepatitída	Steatóza, fibróza, cirhóza	Hepatocelulárny karcinóm	Spolu
Prítomný	4	9	0	13
Neprítomný	14	18	4	36
Spolu	18	27	4	49

Legenda: X^2=2,26, *df*=2, *p*=0,32

Tabuľka 6 Vzťah fajčenia k ochoreniu pečene respondentov

Rizikový faktor	Hepatitída	Steatóza, fibróza, cirhóza	Hepatocelulárny karcinóm	Spolu
Prítomný	6	7	1	14
Neprítomný	12	20	3	35
Spolu	18	27	4	49

Legenda: X^2=0,32, *df*=2, *p*=0,85

Tabuľka 7 Vzťah konzumácie mastných jedál k ochoreniu pečene respondentov

Rizikový faktor	Hepatitída	Steatóza, fibróza, cirhóza	Hepatocelulárny karcinóm	Spolu
Prítomný	5	14	2	21
Neprítomný	13	13	2	28
Spolu	18	27	4	49

Legenda: X^2=2,65, *df*=2, *p*=0,27

Tabuľka 8 Vzťah stresu k ochoreniu pečene respondentov

Rizikový faktor	Hepatitída	Steatóza, fibróza, cirhóza	Hepatocelulárny karcinóm	Spolu
Prítomný	15	18	2	35
Neprítomný	3	9	2	14
Spolu	18	27	4	49

Legenda: X^2=2,45, *df*=2, *p*=0,29

Z výsledkov vyplýva, že žiaden zlozvyk štatisticky významne nesúvisí s chorobami pečene u respondentov (konzumácia alkoholu: p = 0,32; fajčenie: p = 0,85; konzumácia mastných jedál: p = 0,27; stres: p = 0,29). Je to zrejme z dôvodu, že aj je už ochorenie diagnostikované a pacient je v liečebno-preventívnej starostlivosti, zásadne sa menia aj jeho návyky.

V prípade stresu, je tento prítomný aj po diagnostikovaní ochorenia práve v dôsledku ochorenia, zmeny zdravotného stavu pacienta, neistoty prognózy a socioekonomického statusu.

Podobne sme overili vzťah životného štýlu respondentov k ochoreniam pečene. Respondenti mali vybrať, ktoré z aktivít vykonávajú: cvičenie, zdravá strava, pozitívne myslenie, aktívny pohyb, resp. nič z uvedeného. Výsledky testovania sú uvedené v tabuľke 9.

Z výsledkov vyplýva, že medzi jednotlivými skupinami respondentov nie je štatisticky signifikantný rozdiel v strednej hodnote súčtu pozitívnych aktivít životného štýlu (p = 0,77). Signifikantný rozdiel v miere životných aktivít sme zistili porovnaním všetkých respondentov s ochoreniami pečene s ostatnými respondentmi (tabuľka 10).

Tabuľka 9 Vzťah životného štýlu respondentov k ochoreniam pečene

Ochorenie	n	Medián	Minimum	Maximum	Kruskal-Wallisov test
Hepatitída	18	1,5	0	3	p=0,77
Steatóza, fibróza, cirhóza	27	1	0	3	
Hepatocelulárny karcinóm	4	0,5	0	4	

Tabuľka 10 Rozdiely v miere aktivít životného štýlu medzi respondentmi

Respondenti	n	Medián	Minimum	Maximum	Mann-Whitneyov test
S ochorením pečene	47	1	0	4	p=0,03
Bez ochorenia pečene	293	1	0	4	

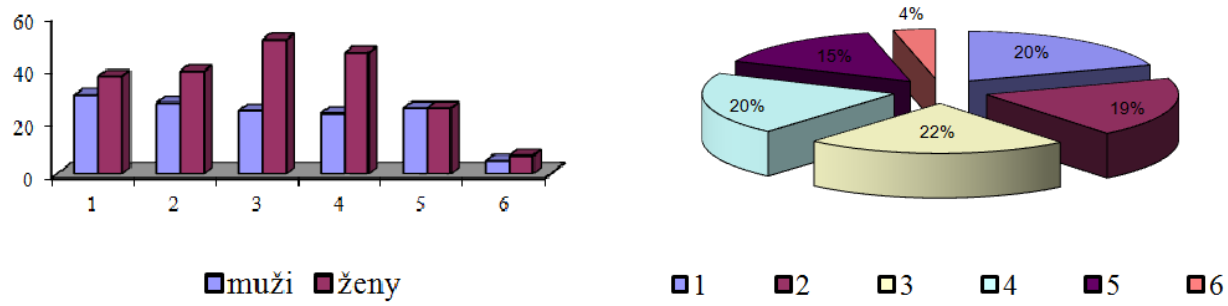
Hoci základné parametre (medián, minimálna a maximálna hodnota) sú v oboch súboroch totožné, predsa je medzi nimi viditeľný rozdiel. Celkový aritmetický priemer skupiny zdravých respondentov činí x = 1,6 ± 1,2, u respondentov s hepatálnymi ochoreniami predstavuje hodnotu x = 1,2 ± 1,1. Dá sa teda predpokladať, že celková charakteristika oboch skupín je rôzna s prirodzenou vyššou aktivitou respondentov, ktorí netrpia žiadnou chorobou pečene.

Ďalšou úlohou bolo overiť vzťah konzumovaných potravín k ochoreniu respondentov. Respondenti mali možnosť vybrať si zo zoznamu tie potraviny, ktoré konzumujú: jablká, chren, cesnak, mrkva, citrusové plody, žihľavový čaj.

V jedálničku respondentov sú zastúpené najviac jablká - 80,29% (273 odpovedí), citrusové ovocie - 64,41% (219 odpovedí) a cesnak - 60% (204 kladných odpovedí). Najmenej je preferovaný žihľavový čaj – konzumuje ho 50 (14,71%) účastníkov dotazníkového prieskumu, hoci má detoxikačné účinky.

Z ponúknutých zdravých potravín 20% respondentov konzumuje len jednu potravinu, všetky potraviny sú súčasťou jedálnička u 4% dotazovaných (graf 3a a 3b). U žien prevláda uprednostňovanie kombinácie troch zdravých potravín (22%), muži uprednostňujú len dvojkombináciu (20%) z ponúkaných potravín (graf 4).

Zaujímalo nás, či existujúce potvrdené ochorenie pečene výrazne ovplyvňuje stravovacie návyky. Preto sme porovnali skupinu respondentov s rôznym ochorením pečene navzájom ako aj skupinu respondentov s ochorením a bez ochorenia vo vzťahu k jednotlivým ponúkaným potravinám.



A **B**

Graf 3 Kombinácia zdravých požívatín v jedálničku s vyznačením kombinácie počtu jednej až šiestich zo 6 menovaných potravín (jablká, chren, cesnak, mrkva, citrusové plody a žihľavový čaj): A - porovnanie počtu zdravých požívatín v jedálnom lístku v závislosti od pohlavia; B - percentuálne zastúpenie zdravých potravín v jedálnom lístku u respontov

A **B**

Graf 4 Zastúpenie počtu zdravých potravín v jedálnom lístku zo 6 menovaných potravín (jablká, chren, cesnak, mrkva, citrusové plody a žihľavový čaj): A – u mužov a B – u žien

V tabuľke 11 je uvedený medián, ktorý udáva strednú hodnotu súčtov kladných odpovedí na jednotlivé položky z ponúknutého jedálnička.

Z výsledkov testovania neparametrickým Kruskal-Wallisovým testom vyplýva, že medzi respondentmi s ochoreniami pečene nie sú štatisticky významné rozdiely v konzumácii uvedených potravín. Podobne sme nezistili žiadne signifikantné rozdiely v miere konzumácie vybraných zdravých potravín medzi všetkými pacientmi s ochoreniami pečene a ostatnými respondentmi (tabuľka 12).

V súvislosti so životným štýlom nás zaujímal aj vzťah nadváhy k chorobám pečene. Zo 47 respondentov s chorobou pečene malo nadváhu 27 (57,45%), zo zdravých respondentov malo nadváhu 84 (28,67%).

Výsledky testovania ukázali štatisticky významnú spojitosť udávania nadváhy v dotazníkoch zároveň s kladnou odpoveďou na prítomnosť ochorenia pečene ($p < 0,001$), pričom relatívne riziko dosiahlo hodnotu 2,00 (95% interval spoľahlivosti: 1,48 - 2,72).

Tabuľka 11 Vzťah príjmu vybraných potravín k ochoreniu pečene

Ochorenie	n	Medián	Minimum	Maximum	Kruskal-Wallisov test
Hepatitída	18	2	1	5	$p = 0,55$
Steatóza, fibróza, cirhóza	27	3	1	6	
Hepatocelulárny karcinóm	4	3,5	1	6	

Tabuľka 12 Rozdiely v príjme vybraných potravín medzi testovanými skupinami respondentov

Respondenti	n	Medián	Minimum	Maximum	Mann-Whitneyov test
S ochorením pečene	47	3	1	6	$p = 0,95$
Bez ochorenia pečene	293	3	1	6	

Vykonali sme aj kontrolnú analýzu, ktorej cieľom bolo overiť vnútornú kohéziu odpovedí respondentov. S pomocou neparametrického Spearmanovho koeficientu sme overili závislosť medzi odpoveďou na otázku o presvedčení respondentov o svojom zdravom stravovaní a paletou vybraných zdravých jedál. Výsledný korelačný koeficient R = 0,09 (95% interval spoľahlivosti = -0,02 – 0,2) naznačuje, že presvedčenie respondentov svojom o zdravom / nezdravom stravovaní nijako nesúvisí s množstvom konzumovaných vybraných zdravých jedál. Rovnako sme zistili, že frekvencia konzumácie udávaná respondentmi nekoreluje s uvedenou nadváhou respondentov (R = 0,02; 95% interval spoľahlivosti = -0,1 – 0,13). Zo zís-kaných výsledkov vyplýva, že respondenti majú dostatočné kompenzačné mechanizmy, ktoré udržujú telesnú hmotnosť v medziach pri danom životnom štýle.

DISKUSIA

Úlohou dotazníkového prieskumu bolo potvrdiť alebo vyvrátiť stanovené hypotézy. Podarilo sa nám zozbierať 340 dotazníkov, čo nie je dostačujúce množstvo na vyvodenie všeobecných záverov. Preto získané výsledky sa vzťahujú len na nami sledovanú skupinu respondentov.

Zisťovali sme súvislosť medzi pohlavím a výskytom ochorenia pečene. Hrušovský (2004) uvádza, že viac alkoholických nápojov konzumujú muži, ale alkoholová hepatitída sa vyskytuje v rovnakom pomere u oboch pohlaví. Podľa Jarčušku (2006) sa u žien alkoholová hepatitída a cirhóza vyskytuje pri konzumácii častejšie ako u mužov. Na základe nášho prieskumu sme zistili, že hepatálne ochorenie sa vzhľadom na počet respondentov vyskytovalo častejšie u mužov.

Vplyv rodinnej predispozície na ochorenie pečene sme sledovali v rámci druhej dotazníkovej hypotézy. Výsledky prieskumu poukazujú na reálny vplyv rodinnej anamnézy, hlavne pri neinfekčných ochoreniach pečene. Oltman (2009) uvádza, že pôsobenie vonkajších a aj vnútorných negatívnych faktorov má výrazný vplyv na správnu funkciu pečene. Pokiaľ je prítomná ešte aj genetická predispozícia, zároveň aj pôsobenie vonkajších negatívnych faktorov a nesprávneho životného štýlu, vzniká veľké riziko ochorenia.

Tretia hypotéza je zameraná na pôsobenie zlozvykov. Za najhlavnejšiu príčinu ochorenia pečene považuje Oltman (2009) súčasný životný štýl, prejedanie sa a nedostatok fyzickej aktivity. V našom prieskume sa okrem fajčenia a pitia alkoholu najviac vyskytovalo pôsobenie stresového faktora. Nám sa nepodarilo potvrdiť vplyv uvedených faktorov na ochorenie. Dôvodom môže byť malá prieskumná vzorka.

Otázkou pôsobenia určitých druhov potravín sme sa zaoberali v ďalšej hypotéze. V dotazníku sme uviedli niekoľko druh potravín, ktorý môžu mať pozitívny a detoxikačný vplyv na pečeň. Zaujímalo nás, či ich konzumácia môže ovplyvniť vznik ochorenia pečene, prípadne či jedinci už s diagnostikovaným ochorením konzumujú tieto potraviny vo väčšej miere v záujme zlepšenia zdravotného stavu. Aj podľa Hlubíka a Opltovej (2004) môžu na základe nezdravej životosprávy vznikať hepatálne poruchy a zdravou životosprávou im možno predchádzať. Náš prieskum ukázal, že ženy viac dbajú na zdravé stravovanie. Vplyv spomenutých potravín na ochorenie pečene, ako aj ich častejšiu konzumáciu chorými pacientmi v porovnaní so zdravými sa nám nepodarilo dokázať. Do budúcnosti by bolo lepšie porovnať rovnaký počet dotazníkov od zdravých jedincov a od pacientov z hepatologickej ambulancie.

Vplyv životného štýlu, predovšetkým nezdravé stravovanie a s tým súvisiacu nadváhu sme sledovali v piatej hypotéze. Barsky a Deans (2007) vyzdvihujú zmenu správania a stravovania, hľadanie informácií o chorobe, obnovenie zdravých činností, celkovú psychickú pohodu, ovládanie svojho hnevu, náladovosti a úzkosti ako prevenciu hepatálnych ochorení. Prieskum poskytol informáciu ohľadom nadváhy respondentov, vyšší výskyt ochorení sme zistili u ľudí s nadváhou. K životnému štýlu patrí aj fyzická aktivita. Možností aktívneho pohybu je rovnako veľa v mestách ako aj na dedinách. Vidiecke oblasti poskytujú zdravšie prírodné prostredie na športové aktivity. Z našich respondentov pochádza väčšia časť z mesta, čo však nemalo vplyv na výskyt chorôb pečene v skúmanej vzorke.

Na základe získaných výsledkov by sme odporúčali tvorbu programov zameraných nielen na zdravý životný štýl, ale aj na súvislosti jednotlivých ochorení s jeho nedodržiavaním.

ZÁVER

Ochorenia pečene sú široko rozšíreným problémom po celom svete. Zlé stravovacie návyky a nedostatok fyzickej aktivity má veľký nepriaznivý vplyv na rozvoj ochorenia.

Pomocou realizovaného prieskumu sa nám podarilo dokázať vplyv niektorých faktorov na vznik ochorenia pečene. Aj pri menšej vzorke respondentov sa ukázal výrazný nedostatok udržiavania zdravého životného štýlu napriek diagnostikovanému a prebiehajúcemu ochoreniu. Najčastejšie vyskytujúcim zlozvykom je stres, ktorý sa nesprávne vníma ako súčasť pracovného života a jeho prevencia je podceňovaná.

Pri porovnaní výsledkov ženskej a mužskej vzorky respondentov sa objavujú výrazné rozdiely. Ženy majú väčší záujem o zdravé stravovanie a dostatok fyzickej aktivity. U mužov prevláda viac závislosť na alkohole a cigaretách, čo sa výraznejšie odzrkadľuje na ich zdravotnom stave.

Jedným z najdôležitejších spôsobov, ako predchádzať vplyvu negatívnych faktrov prostredia a zlému životnému štýlu je prevencia na všetkých úrovniach a tvorba programov a projektov v oblasti verejného zdravia zameraných predovšetkým na zdravé prostredie – životné, pracovné, školské i domáce a zdravý životný štýl v celej populácii.

Za rovnako dôležité pokladáme aj striedme predpisovanie farmaceutických produktov a predovšetkým upozorňovanie na opatrnejšie užívanie

výživových doplnkov, ktoré sú často užívané zbytočne a v nadmernom množstve.

Ochrana, podpora a rozvoj verejného zdravia majú nezastupiteľnú úlohu pre zdravie súčasnej populácie i nasledujúcej generácie a tak i pre zdravý, ekonomicky prosperujúci štát.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

BARSKY, A.,J., DEANS, E., C. 2007. *Jak lépe žít se zdravotními problémy*. Praha: Vydavateľstvo Portál, s.r.o., 2007, 189 s., ISBN 978-80-7367-298-0

BELOVIČOVÁ, M. 2009, Najčastejšie nádory pečene v klinickej praxi praktického lekára. In: *Via Practica*, ISSN 1336-4790, 2009, 6/2009, s. 474 – 378

GLASA, J., GLASOVÁ, H. 2008, Liekové poškodenie pečene v ambulancii praktického lekára. In: *Via Practica*. ISSN 1336-4790, 2008, 5/2008, s. 178 – 181

HLÚBIK, P., OPLTOVÁ,L. 2004. *Vitamíny*. Praha: Grada Publishing, a.s., ISBN 80-247-0373-4

HRUŠOVSKÝ, Š. 2004. *Praktická hepatológia.* Bratislava, Vydavateľstvo zdravotníckej literatúry HERBA, spol. s.r.o., 2004, ISBN 80-89171-00-1

JARČUŠKA, P. et al. 2006. Poškodenie pečene alkoholom a liekmi. In: *Via Practica*. ISSN 1336-4790, 2006, 3/2006, s. 461 – 466

OLTMAN, M. 2009. Pečeň je najväčší mierotvorca. In: *Petit Press*. [online]. 2009, [citované 2013-06-29]. Dostupné na internete: <http://primar.sme.sk/c/5163811/pecen-je-najvacsi-mierotvorca.html>

PRIESKUM RIZIKOVÝCH FAKTOROV CHRONICKÝCH OCHORENÍ, NEFARMAKOLOGICKÁ INTERVENCIA U KLIENTOV PORADNE ZDRAVIA V REGIÓNE LIPTOVA

RISK FACTORS RESEARCH OF CHRONIC DISEASES, NONPHARMACOLOGICAL INTERVENTION IN CLIENTS OF HEALTH PROMOTION CENTRE IN THE REGION LIPTOV

BENKOVÁ Ľubica

Oddelenie podpory zdravia, Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Liptovskom Mikuláši

ABSTRAKT

Úvod: Najväčšou verejnozdravotnou výzvou sú chronické, neprenosné ochorenia. Rizikové faktory spôsobu života (nesprávna výživa, nedostatočná pohybová aktivita, stres, drogy-tabakové výrobky a nadmerné užívanie alkoholu) sú známe a preventabilné. Jednou zo základných stratégií pre rozvoj verejného zdravia je podpora a posilňovanie zdravia u zdravých občanov.

Cieľ príspevku je prezentovanie aktivít Poradne zdravia v Lipt.Mikuláši. Činnost Poradne zdravia je zameraná na individuálnu intervenciu, ktorá bola koncentrovaná na zdravý spôsob života a podľa individuálnych potrieb klientov Poradne zdravia na špecifické rizikové faktory chronických ochorení. Súčasťou individuálnej intervencie bolo vyhľadávanie rizikových osôb s biologickými rizikovými faktormi.

Materiál a metódy: V príspevku sú vyhodnotené zvýšené hodnoty vybratých parametrov u 2449 klientov Poradne zdravia vybratých metódou náhodného výberu .

Výsledky: Boli zistené zvýšené hodnoty: aterogénneho indexu (CHOL/HDL) - 32% mužov a 20% žien, aterogénneho indexu 2 (TG/HDL) - 47% mužov a u 30% žien, sTK ≥140 u 42% mužov a 22% žien, diastolického tlaku krvi (nad 90 mmHg) - 30% u mužov a 17% u žien, WHR u 47% mužov a 40% žien. Rizikovo nízke hodnoty HDL cholesterolu: u 68% mužov a 51% žien. V súbore klientov fajčili viac muži - 21% ako ženy - 15%.

Záver: Činnosťami zameranými na podporu zdravia je možné dosiahnuť pozitívnu modifikáciu rizikových faktorov v prevencii chronických ochorení, ktoré majú za následok 86% zo všetkých úmrtí v Slovenskej republike.

Kľúčové slová: Rizikové faktory. Hyperlipidemia. Obezita. Fajčenie. Hypertenzia. Chronické choroby. Skríning. Individálna intervencia.

ABSTRACT

Background: Chronic, non-communicable (NCD)diseases represent the biggest public health challenge faced by Europe. Risk faktors of NCD (malnutrition, insufficient physical activity, stress, drugs - tobacco products, reduction of damages due to alkohol) are well known and preventable. The basic strategy of public health development is health promotion and improvement at healthy persons.

Aim is to present activities of the Health Promotion Centre (HPC) in The Public Health in Liptovský Mikuláš. Activities of HPC were concentrated on individual intervention on healthy life style and on specific risk factors of noncommunicable diseases by individual needs of HPC clients. Individual intervention was also aimed to aktive seeking to persóna in risk by levels of biological risk factors. The report evaluates the elevated values of representative parameters at the 2 449 clients who visited the Health promotion Centre . The data for reseach were collected from the biological factors of chronic diseases at obesity, hypertension, hyperlipidemia and smoking.

*Material and Methods:*The target population are the "healthy" candidates of the chronic diseases. The Method: Random selection of clients.

Results: Prevalence of increase values: Atherogenic index 1(CHOL/HDL) – 32% in men, 20% in women, Atherogenic index 2 (TG/HDL) – 47% in men, 30% in women, Systolic blood pressure (≥140 mmHg) – 42% in men, 22% in women, Diastolic blood pressure (≥ 90 mmHg) – 30% in men, 17% in women, WHR u 47% in men, 40% in women. Reduced levels HDL cholesterol – 68% in men, 51% in women. Prevalence of smoking – 21% in men, 15% in women.

Conclusion: Through health promotion activities is possible to achieve positive modification the risk factors in chronic diseases prevention, which resulted in 86% of all deaths in Slovak republic.

Key words: Risk factors. Hyperlipidemia. Obesity. Smoking. Hypertension. Oncommunicable diseases. Screening. Individual intervention.

ÚVOD

Jedným zo zameraní Poradní zdravia je poukázať rizikové faktory spôsobu života významne podmieňujúce vznik a vývoj chronických ochorení, ktoré sú najčastejšou príčinou negatívnych zmien zdravotného stavu obyvateľov SR [1]. Pracovníci Poradne zdravia RÚVZ so sídlom v Liptovskom Mikuláši sa podieľajú na zvyšovaní zdravotného uvedomenia obyvateľov regiónu Liptova v oblasti kľúčových determinantov zdravia ako je výživa, fyzická aktivita, tabak a alkohol prostredníctvom všeobecného a špecializovaného poradenstva. Všeobecné poradenstvo pozostáva z aktívneho vyhľadávania a stanovovania rizikových faktorov srdcovo-cievnych, nádorových a iných chronických neprenosných ochorení a zo sprostredkovania informácii zrozumiteľnou formou o zásadách správneho spôsobu života a motivácie k pozitívnym zmenám

pri predchádzaní najzávažnejším chronickým neprenosným ochoreniam [2]. Špecializované poradenstvo je poskytované v troch poradniach: poradňa zdravej výživy, poradňa optimalizácie pohybovej aktivity a odvykania od fajčenia.

CIELE

Cieľom príspevku je poukázať na výskyt vybraných rizikových faktorov chronických ochorení (hypertenzia, hyperlipidémia, obezita, fajčenie) u klientov Poradne zdravia RÚVZ v Liptovskom Mikuláši za roky 2007 – 2011. V príspevku sú prezentované výsledky sledovania vybratých biologických rizikových faktorov u občanov v okresoch Liptovský Mikuláš a Ružomberok.

MATERIÁL A METÓDY

Súbor vyšetrených osôb tvorilo 2 449 klientov, z čoho bolo 1 721 žien (70%) a 728 mužov (30%). Najpočetnejšie zastúpenie osôb bolo vo vekovej kategórii 25-54 rokov (68%) vyšetrených, prevažne so stredoškolským vzdelaním (48%).

Metódou náhodného výberu bola určená vzorka dospelej populácie okresov Liptovský Mikuláš a Ružomberok. Prieskum rizikových biologických faktorov u dospelej populácie v regióne Liptova bol realizovaný podľa návodov pre CINDI program [2]. Vyšetrenia boli realizované prevažne formou výjazdov na pracoviská úradov, škôl, hypermarketov a pod.

Na porovnanie žien a mužov sme použili chí kvadrát test v kontingenčných tabuľkách. Všetky testy sme robili na hladine významnosti $\alpha = 0,05$. Pracovali sme vo voľne šíriteľnom softvéri EpiInfo Version 6.

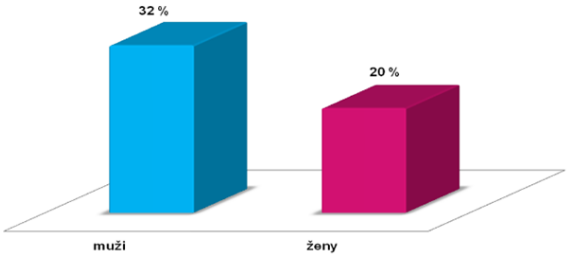
VÝSLEDKY

Nižšie uvedené výsledky prieskumu ukazujú na výskyt jednotlivých skúmaných rizikových hodnôt u návštevníkov Poradne zdravia v regióne Liptova.

RIZIKOVÉ FAKTORY – HYPERLIPIDÉMIA, HYPERGLYKÉMIA

Aterogénny index (CHOL/HDL)

Zvýšené hodnoty aterogénneho indexu (CHOL / HDL) boli zistené u 32% mužov a 20% žien v regióne Liptova. Muži mali v porovnaní so ženami štatisticky významne častejšie rizikové hodnoty aterogénneho indexu (p<0,001).



Graf 1 Rizikové hodnoty AI (TCHOL/HDL) u mužov (> 4) a žien (> 3,5)

Tabuľka 1 Aterogénny index (TCHOL/HDL)

Hodnoty (mmol/l)	Normálna ≤ 4		Riziková > 4	
	abs.	rel. (%)	abs.	rel. (%)
Muži (n=712)	485	68	227	32
Hodnoty (mmol/l)	**Normálna ≤ 3,5**		**Riziková > 3,5**	
	abs.	**rel. (%)**	**abs.**	**rel. (%)**
Ženy (n=1 711)	1371	80	340	20

HDL cholesterol

Nízke hodnoty HDL cholesterolu u mužov (< 1,0 mmol/l) a žien (< 1,2 mmol/l) boli zistené u 35% mužov a 26% žien. Hodnoty blízke optimálnej hodnote sa vyskytli u 33% mužov a 25% žien v súbore klientov Poradne zdravia. Muži mali v porovnaní so ženami štatisticky významne častejšie nízke hodnoty HDL (p<0,001).

Tabuľka 2 HDL cholesterol

Hodnoty (mmol/l)	Nízka < 1,0		Blízka optimálnej 1,0-1,4		Optimálna > 1,4	
	abs.	rel. (%)	abs.	rel. (%)	abs.	rel. (%)
Muži (n=727)	255	35	238	33	234	32
Hodnoty (mmol/l)	**Nízka < 1,2**		**Blízka optimálnej 1,2-1,6**		**Optimálna > 1,6**	
	abs.	**rel. (%)**	**abs.**	**rel. (%)**	**abs.**	**rel. (%)**
Ženy (n=1714)	445	26	423	25	846	49

Aterogénny index 2 - TG/HDL

Rizikové hodnoty aterogénneho indexu 2 (TG/HDL ≥ 1,0) boli namerané u 47% mužov a u 24% žien v súbore klientov. Každý tretí návštevník našej Poradne nemal hodnoty AI 2 v norme. Muži mali v porovnaní so ženami štatisticky významne častejšie kritické hodnoty aterogénneho indexu 2 (p<0,001).

Tabuľka 3 Aterogénny index 2 (TG/HDL)

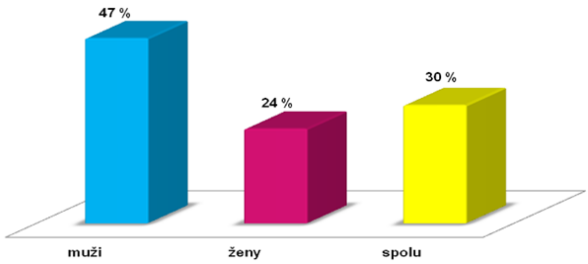
Hodnoty (mmol/l)	Kritická ≥ 1,0	
	abs.	rel. (%)
Muži (n=717)	335	47
Ženy (n=1707)	404	24
Spolu (n=2424)	739	30

Triglyceridy

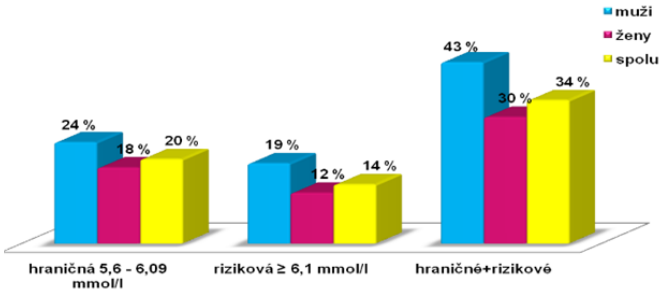
Zvýšené hodnoty triglyceridov (≥ 2,0 mmol/l) boli zistené u 18% všetkých návštevníkov Poradne zdravia (25% u mužov a 15% u žien). Muži mali v porovnaní so ženami štatisticky významne častejšie zvýšené hodnoty triglyceridov (p<0,001).

Glykémia

Hranične zvýšené a rizikové hodnoty glykémie boli namerané u 34% vyšetrených, u mužov v 43% a u žien v 30%.



Graf 2 Rizikové hodnoty AI 2 (TG/HDL ≥ 1,0) v súbore klientov



Graf 3 Rizikové hodnoty glukózy (≥ 5,6 mmol/l) v súbore klientov

Tabuľka 4 Triglyceridy

Hodnoty (mmol/l)	Normálna < 2,0		Hranične zvýšená 2,0-3,0		Vysoká > 3,0-5,5	
	abs.	rel. (%)	abs.	rel. (%)	abs.	rel. (%)
Muži (n=717)	539	75	119	17	59	8
Ženy (n=1707)	1453	85	209	12	45	3
Spolu (n=2424)	1992	82	328	14	104	4

Tabuľka 5 Glykémia

Hodnoty (mmol/l)	Norma ≤ 5,59		Hraničná 5,6-6,09		Riziková ≥ 6,1	
	abs.	rel. (%)	abs.	rel. (%)	abs.	rel. (%)
Muži (n=727)	417	57	175	24	135	19
Ženy (n=1714)	1192	70	316	18	206	12
Spolu (n=2441)	1609	66	491	20	341	14

RIZIKOVÝ FAKTOR – OBEZITA

Pandémia obezity predstavuje vážny zdravotný a spoločenský problém. Podľa výsledkov programu CINDI v populácii SR má nadváhu 46% mužov a 36,2% žien, obezitou trpí 23,3% mužov a 22,4% žien, teda cca 50% , čo sa zhoduje s údajmi ostatnej Európskej populácie.

Tukové tkanivo ako endokrinne aktívny orgán tvorí viac ako 50 bioaktívnych sekrečných proteínov tukového tkaniva – adipokínov. Adipokíny ovplyvňujú široké spektrum fyziologických funkcií: o.i. aj inzulínovú senzitivitu, metabolizmus lipidov, ako aj krvný tlak a zápalové procesy [3]. Pri obezite abdominálneho typu sa objavujú metabolické odchýlky a zvýšené množstvo LDL častíc prispievajúcich k rozvoju aterosklerózy. Odborný postup pre všeobecných praktických lekárov v článku: „Prevencia artériosklerotických kardiovaskulárnych ochorení“ v nižšie uvedenej schéme ukazuje na potrebu aktivít pri zmene životosprávy

pri zvýšených hodnotách BMI a existencii špecializovaných poradní [4].

Index WHR (pás/boky)

V súbore klientov Poradne zdravia boli zistené rizikové hodnoty WHR (u mužov > 0,9 a žien > 0,8) u 47% mužov a 40% žien. Muži mali v porovnaní so ženami štatisticky významne častejšie rizikové hodnoty WHR (p=0,001).

Rizikový faktor – hypertenzia

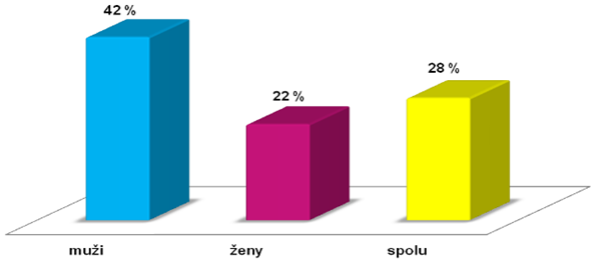
Vysoký tlak krvi je prvým z trojice hlavných rizikových faktorov aterosklerózy. Hodnoty sTK ≥ 140 mmHg boli zistené u 28% návštevníkov Poradne, z toho u 42% mužov a 22% žien. Muži mali v porovnaní so ženami štatisticky významne vyššie hodnoty systolického krvného tlaku (p<0,001).

Obrázok 1 Odporúčaný postup pre liečbu obezity [4]

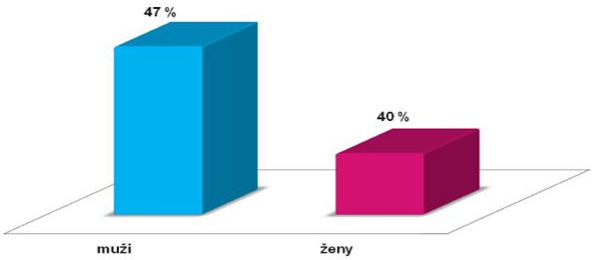
Zvýšené hodnoty diastolického tlaku krvi (nad 90 mmHg) boli namerané u 21% osôb – z toho 30% u mužov a 17% u žien. Muži mali v po-rovnaní so ženami štatisticky významne vyššie hodnoty diastolického krvného tlaku (p<0,001).

Tabuľka 6 Index WHR (pás/boky)

Hodnoty (mmol/l)	Norma ≤ 0,9		Riziková > 0,9	
	abs.	rel. (%)	abs.	rel. (%)
Muži (n=682)	360	53	322	47
Hodnoty (mmol/l)	**Norma ≤ 0,8**		**Riziková > 0,8**	
	abs.	**rel. (%)**	**abs.**	**rel. (%)**
Ženy (n=1643)	990	60	653	40



Graf 5 Rizikové hodnoty sTK (nad 140 mmHg) v súbore klientov



Graf 4 Rizikové hodnoty WHR u mužov (> 0,9) a žien (> 0,8)

Tabuľka 7 Systolický krvný tlak

TK systolický (mmHg)	Muži (n=727)		Ženy (n=1713)		Spolu (n=2440)	
	abs.	rel. (%)	abs.	rel. (%)	abs.	rel. (%)
< 120	94	13	659	38,5	753	30,9
120 – 129	150	20,6	374	21,8	524	21,5
130 – 139	175	24	301	17,6	476	19,5
140 – 159	218	30	262	15,3	480	19,7
160 – 179	63	8,7	82	4,8	145	5,9
≥ 180	27	3,7	35	2	62	2,5

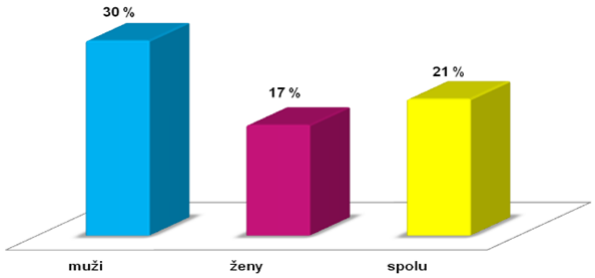
Zvýšené hodnoty diastolického tlaku krvi (nad 90 mmHg) boli namerané u 21% osôb – z toho 30% u mužov a 17% u žien.

V súbore klientov fajčili viac muži - 21% ako ženy - 15%.

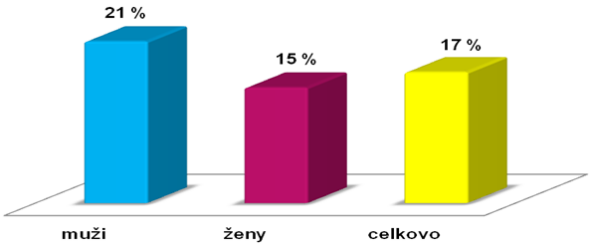
Sumárny graf č.8 ukazuje na celkovo nižší výskyt rizikových faktorov chronických ochorení u žien ako u mužov v Poradni zdravia v regióne Liptova (v percentách).

Tabuľka 8 Diastolický krvný tlak

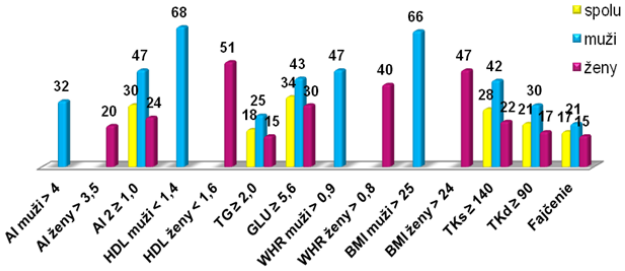
TK diastolický (mmHg)	Muži (n=726)		Ženy (n=1713)		Spolu (n=2439)	
	abs.	rel. (%)	abs.	rel. (%)	abs.	rel. (%)
< 80	261	35,9	919	53,7	1180	48,4
80 – 84	125	17,2	288	16,8	413	16,9
85 – 89	127	17,5	215	12,55	342	14
90 – 99	148	20,4	215	12,55	363	14,9
100 – 109	49	6,8	55	3,2	104	4,3
≥ 110	16	2,2	21	1,2	37	1,5



Graf 6 Rizikové hodnoty dTK (nad 90 mmHg) v súbore klientov



Graf 7 Výskyt fajčenia v súbore klientov



Graf 8 Výskyt rizikových faktorov chronických ochorení u klientov Poradne zdravia v regióne Liptova v percentách

Ovplyvniteľné rizikové faktory - intervencia

Klienti s rizikovo zvýšenými hodnotami sú vyzývaní k ozdraveniu výživových zvyklostí, zvýšeniu fyzickej aktivity a zanechaniu fajčenia.

Poradenstvo pri znižovaní vybratých rizikových hodnôt u klientov Poradne zdravia RÚVZ so sídlom v Liptovskom Mikuláši.

Poradňa zdravej výživy

K vstupným informáciám klientom so zvýšenými hodnotami vyššie uvedených parametrov patria možnosti v stravovaní pri znižovaní samotnej hodnoty cholesterolu. Treba jasne deklarovať, že hladinu cholesterolu ovplyvňujú podľa poradia vplyvu:

- trans-formy mastných kyselín,
- nasýtené mastné kyseliny,
- cholesterol z potravy.

Nasýtené mastné kyseliny (NMK) sú zastúpené prevažne v živočíšnych tukoch ako súčasť mäsa, údenín, mlieka a mliečnych výrobkov. Najvyšší obsah NMK má mliečny tuk s vysokým aterogénnym potenciálom vedúcim k vzostupu celkového cholesterolu aj LDL cholesterolu. Druhým najvýznamnejším faktorom zvyšovania hladiny LDL cholesterolu v oblasti stravovania, je konzumácia potravín obsahujúcich trans-mastné kyseliny. Konzumovaním stravy obsahujúcej trans-MK sa zároveň znižuje hodnota HDL cholesterolu a zvyšuje hodnota triglyceridov v krvi. K zdrojom potravín, ktoré by bolo potrebné obmedziť z hľadiska zvyšovania príjmu trans-mastných kyselín patria:

- potraviny zahrievané a pražené v olejoch pri vysokých teplotách (hranolky, rezne, šišky apod.),
- potraviny obsahujúce stužené tuky (margaríny) napr. keksy, krekry, torty a iné sladké a slané pochutiny .

Pre klientov poradne so zvýšenými hodnotami sú dôležité aj informácie zamerané na predchádzanie oxidačného stresu v organizme. V etiopatogenéze aterosklerózy je potvrdená fagocytóza a následné ukladanie do steny cievy najmä oxidovaného cholesterolu. Klienti sú oboznámení s rizikovými faktormi podporujúcimi oxidačný stres v organizme. Z oblasti spôsobu života sú nimi fajčenie, prepálené tuky v strave, nedostatočná konzumácia

zeleniny a iných potravinových zdrojov obsahujúcich antioxidanty, stres, nadmerná konzumácia alkoholu a iné.

Z hľadiska úpravy hodnôt tukov v krvi má význam aj strava s dostatočným obsahom vlákniny (zdroje napr.: ovocie, zelenina, fazuľa, ovos, jačmeň).

Zvýšenie hodnôt HDL cholesterolu, zníženie hodnôt triglyceridov a LDL cholesterolu môžu klienti dosiahnuť zaradením potravín s obsahom n-3 mastných kyselín – rýb, orechov a olejnatých semien. Optimálny zdravý pomer n-3 mastných kyselín k n-6 MK by mal byť 3:1. Pokiaľ sa táto rovnováha posunie v prospech prílišnej konzumácie olejov omega-6 (mastné jedlá pripravené napr. na olejoch: slnečnicový, slnečnicový,sójový, kukuričný, sézamový) produkujú bunkové membrány blokovacie chemikálie, tzv. cytokíny, ktoré priamo spôsobujú zápaly. Dnešná strava obsahuje extrémny nepomer týchto olejov. Táto nerovnováha sa pohybuje medzi 15:1 až do 30:1 v prospech omega-6.

Poradenstvo v Poradni optimalizácie pohybovej aktivity

Optimálna pohybová aktivita z hľadiska dĺžky trvania a intenzity zvyšuje hladinu HDL cholesterolu v krvi. Pre udržanie zdravia sa odporúča najmenej 30 minút denne aktivitu strednej intenzity (okrem bežných pochôdzok a domácich prác).

Riziko psycho-sociálnych faktorov

Čoraz väčšie množstvo dôkazov o vplyvoch psycho-sociálnych faktorov na vznik chronických ochorení ukazuje, že je potrebné viac pozornosti venovať zlepšeniu duševnej zložky zdravia [5].

Vo výživových zvyklostiach klientov prevažnej väčšine absentuje denný príjem surovej zeleniny, veľmi často sa vyskytuje nedostatočná frekvencia konzumácie strukovín, celozrnných obilnín a rýb. Nie je ojedinelým javom, že klienti užívajúci lieky na pokles hladiny tukov v krvi majú nesprávne výživové zvyklosti, málo sa pohybujú, fajčia a nadmerne užívajú alkohol. Pohybová aktivita strednej intenzity minimálne pol hodiny denne je silným preventívnym prostriedkom pre rozvoj chronických ochorení. Na základe Európskych odporúčaní pre prevenciu KVO v klinickej praxi – 2012 je potrebné úpravu životného štýlu zaradiť aj ako súčasť liečby klientov so zvýšenými a vysokými hodnotami tlaku krvi.

Jedným z rizikových faktorov chronických ochorení je psycho-sociálny stres ovplyvňujúci hypertenziu, hyperlipidémiu, diabetes mellitus [6].

Hormóny nadobličiek (kortizol, adrenalín, noradrenalín) v stresovej situácii zvyšujú hladinu celkového cholesterolu. Vznikajúce voľné kyslíkové radikály oxidujú LDL cholesterol, klesá HDL cholesterol. Adrenalín zvyšuje veľmi rýchle hladinu glukózy v krvi mobilizáciou pečeňového glykogénu. Vysoká hladina glukózy v krvi vedie k tvorbe glykovaných LDL, ktoré sú viac oxidovateľné. Produkty glykácie sa podieľajú na tuhnutí aterosklerotických štruktúr. Pri DM hlavne 2 typu je veľmi nápadné zníženie HDL cholesterolu. Noradrenalín zreteľne zvyšuje krvný tlak, vyvoláva lipomobilizáciu. Katecholamíny ovplyvňujú aj hladinu cirkulujúcich triglyceridov viacerými spôsobmi: mobilizujú voľné mastné kyseliny z tukového tkaniva, ktoré následne slúžia ako substrát pre biosyntézu triglyceridov v pečeni, inhibujú uvoľňovanie triglyceridov z pečene, adrenalín aj noradrenalín inhibujú uvoľňovanie tyroxínu vyvolaného tyreotropným hormónom [7]. Chronický stres spôsobuje pokles činnosti imunitného systému: pokles IgA , pokles činnosti, B-lymfocytov, NK-buniek, pokles zastúpenia T-buniek a iné zmeny.

Chronický stres má nepriaznivý vplyv na zápalovú zložku aterogénneho procesu. Na poškodenom endoteli dochádza k adhézii monocytov, s následným prestupovaním cholesterolu do cievnej steny. Oxidovaný LDL je vychytávaný makrofágmi za vzniku penových buniek. Odolnosť voči stresu naopak zvyšuje pohyb, ktorý má pozitívny vplyv na lipidový profil. U fyzicky aktívnych osôb prevláda aktivita parasympatiku nad sympatikom. Zvýšená citlivosť inzulínových receptorov svalových buniek pri pohybe vedie aj k zmenám lipidového spektra: bolo dokázané zvýšenie hladiny HDL-cholesterolu, menej pokles LDL-cholesterolu a pokles TAG.

DISKUSIA

Aj keď sa nejedná o reprezentatívnu vzorku vyšetrených možno konštatovať, že u žien je štatisticky významne nižší percentuálny výskyt vyšetrených rizikových hodnôt v oblasti vybratých parametrov: lipidového profilu, glykémie, tlaku krvi, obezity aj fajčenia.

Jednou z možných príčin uvedených výsledkov je skutočnosť, že prevažnú väčšinu vyšetrených žien

(78%) tvorili ženy do 54 rokov. Estrogény u žien do menopazy priaznivo ovplyvňujú lipidový profil, glykémiu aj TK. V menopauze už stúpa napr. pomer LDL/HDL. U žien v postmenopauzálnom období sa v priemere zvyšuje hladina celkového cholesterolu v krvi, zvyšuje sa hladina LDL-cholesterolu, triacylglycerolov a klesá hladina ochranného HDL-cholesterolu, čo prispieva k zvyšovaniu ich rizikového profilu. Pribúda žien s nadhmotnosťou alebo obezitou, zvýšené ukladanie tuku najmä v oblasti brucha zvyšuje výskyt tzv. abdominálnej obezity – jedného z hlavných znakov metabolického syndrómu,ktorý významne zvyšuje riziko rozvoja srdcovo-cievneho ochorenia.

Muži majú výrazne vyššie riziko aterosklerózy ako ženy do menopauzy [8]. Na nižší výskyt predčasnej úmrtnosti na kardiovaskulárne ochorenia (vo veku 0-64 rokov) u žien (24%) ako u mužov (31%) ukazuje aj štruktúra príčin úmrtí v SR z roku 2009 [9].

Klienti s rizikovo zvýšenými hodnotami sú vyzývaní k ozdraveniu výživových zvyklostí, zvýšeniu fyzickej aktivity a zanechaniu fajčenia. Čoraz väčšie množstvo dôkazov o vplyvoch psycho-sociálnych faktorov na vznik chronických ochorení ukazuje, že je potrebné viac pozornosti venovať zlepšeniu duševnej zložky zdravia.

Činnosti Poradní zdravia na Slovensku sa výrazne orientujú na prevenciu rizikových faktorov chronických chorôb a to najmä srdcovocievnych. Intervenčné aktivity sa orientujú na ovplyvňovanie modifikovateľných rizikových faktorov vyplývajúcich zo životného štýlu.

Prieskum vyšetrovaných parametrov ukazuje na nižší percentuálny výskyt rizikových hodnôt u žien. Jednou z možných príčin uvedených výsledkov je skutočnosť, že prevažnú väčšinu vyšetrených žien (78 %) tvorili ženy do 54 rokov. Estrogény u žien do menopazy priaznivo ovplyvňujú lipidový profil, glykémiu aj TK. V menopauze už stúpa napr. pomer LDL/HDL.

ZÁVER

Prevalencia rizikových faktorov vo vybratej populácii regiónu Liptov naznačuje opodstatnenosť intervencií v oblasti podpory zdravia pre širokú verejnosť, s vyšším dôrazom na rizikovejšiu skupinu mužov v produktívnom veku.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

[1] Aktualizácia Národného programu podpory zdravia v Slovenskej republike. Bratislava: MZ SR, 2011. [online cit. 18-09-2012]. Dostupné na internete: http://www.uvzsr.sk/docs/info/podpora/2_vlastny_material_NPPZ.pdf

[2] GEROVÁ, Z. a kol. 2010. Poradne zdravia v Slovenskej republike. In. *Kamenský, G., Pella, D. 2010. Zdravý životný štýl.* Cesta k prevencii ochorení srdca a ciev. Bratislava: Akadémia vzdelávania, 2010. s. 121 – 123. ISBN 978-80-88880-88-2.

[3] UKROPCOVÁ, B., UKROPEC, J. a kol. 2008. Endokrinná funkcia tukového tkaniva. *Via pract.*, 2008, roč. 5 (3): 115–121. ISSN 1336-4790.

[4] LIPTÁK, P. 2012. Prevencia artériosklerotických kardiovaskulárnych ochorení a ich komplikácií – odborný postup pre všeobecných praktických lekárov. [online cit. 05-10-2012]. Dostupné na internete: http://www.vpl.sk/sk/kardiovaskularna-prevencia/

[5] Problematika duševného zdravia – vzťah psychiky a telesného zdravia. In. *Račková, A. a kol. 2010. Postupy v oblasti podpory zdravia II.* Bratislava: ÚVZSR, 2010. s. 15 – 19. ISBN 978-80-7159-190-0.

[6] SELKO, D. 2010. Stres a jeho zvládanie v prevencii ochorení srdca a ciev. In. *Kamenský, G., Pella, D. 2010. Zdravý životný štýl. Cesta k prevencii ochorení srdca a ciev*. Bratislava: Akadémia vzdelávania, 2010. s. 121 – 123. ISBN 978-80-88880-88-2.

[7] Účinky katecholamínov. [online cit. 05-10-2012]. Dostupné na internete: http://staryweb.fmed.uniba.sk/patfyz/STRESAADAPTACIA/kapitola11.pdf

[8] BOROVSKÝ, M., LATTÁKOVÁ, M. 2008. Možnosti prevencie kardiovaskulárnych ocho/rení u žien po menopauze. *Via pract*., 2008, roč. 5 (4/5): 186–187. ISSN 1336-4790.

[9] GINTER E., LAZAROVÁ, J. 2012. Súčasný stav úmrtnosti na Slovensku. In. *Lekárske listy*. Odborná príloha zdravotníckych novín. Interná medicína. Bratislava: SANOMA MAGAZINES SLOVAKIA s.r.o., 2012, č. 1, s. 3 – 4.

VPLYV ZDRAVOTNÉHO UVEDOMENIA NA KONZUMÁCIU POTRAVÍN
IMPACT OF HEALTH AWARENESS ON FOOD CONSUMPTION

VADOVIČOVÁ P. [1,2], OCHABA R. [1,3], RAČKOVÁ A. [1], KADLIČEKOVÁ P. [1], HERDOVÁ O.[1]

[1] *Úrad verejného zdravotníctva v Slovenskej Republike v Bratislave,*
[2] *Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Nitra*
[3] *Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave, Fakulta verejného zdravotníctva, Bratislava*

ABSTRAKT
Východiská: Dotazníkový prieskum Zdravotné uvedomenie a správanie sa obyvateľov SR v roku 2013 realizoval ÚVZ SR a RÚVZ v SR. Sledovanie zdravotného uvedomenia a správania sa obyvateľov SR bolo zamerané na najzávažnejšie rizikové faktory a ich výskyt v populácii.
Cieľ: Cieľom prieskumu bolo okrem iného aj zistiť vplyv zdravotného uvedomenia na konzumáciu potravín u občanov Slovenskej republiky v roku 2013.
Súbor a Metódy: Prieskum sa realizoval dotazníkovou metódou na celom území Slovenskej republiky. Výskumnú vzorku tvorilo 3679 respondentov (1840 mužov a 1839 žien) vo veku od 15 do 95 rokov. Výber respondentov podľa pohlavia a miesta bydliska (mesto/vidiek), taktiež počet respondentov pre príslušnú oblasť k RÚVZ v SR bol presne daný a rozdelený na 3 vekové kategórie: od 15 – 24 rokov, od 25 – 64 rokov a nad 65 rokov. Výsledky boli štatisticky spracované pomocou štatistického programu Epi Data 3.1. a SPPS 14 pre Windows.
Výsledky: U sledovanej vzorky sa zistilo, že viac žien ako mužov konzumuje každý deň/obdeň surovú zeleninu, ženy uprednostňujú viac ako muži konzumáciu kofeínových nápojov (kola, káva), so stúpajúcim vekom sa u respondentov znižuje konzumácia mlieka každý deň/obdeň, s pribúdajúcim vekom konzumácia údením 1 až 2-krát mesačne klesá. So stúpajúcim vekom sa u respondentov zvyšuje dodržiavanie diétneho režimu z dôvodu pretrvávajúceho ochorenia.
Záver: Uvedený prieskum zdravotného uvedomenia obyvateľov v Slovenskej republike priniesol význam k pokračovaniu zdravotnej výchove obyvateľov Slovenskej republiky s cieľom poskytnúť informácie o možnostiach a spôsoboch prevencie chorôb s dôrazom na motiváciu k zmene rizikového správania pri konzumácii potravín.

Kľúčové slová: Zdravotné uvedomenie. Prevencia. Zdravý životný štýl.

ABSTRACT
Background: Questionnaire survey of health awareness and behavior of inhabitants of Slovakia in 2013 was realized by the Public Health Authority and RPHA in Slovakia. Monitoring of health awareness and behavior of the inhabitants of Slovakia was aimed at the most serious risk factors and their incidence in population.
Objective: Aim of survey was to identify the impact of health awareness on food consumption among citizens of the Slovak Republic in 2013.
Sample and Method: The survey was conducted by questionnaires throughout the Slovak Republic. The research sample consisted of 3679 respondents (1840 males and 1839 females) aged 15-95 years. Selection of respondents by sex and place of residence (urban / rural), also the number of respondents for the area of RPHA SR was exactly set and divided into three age groups : 15-24 years , 25-64 years and over 65 years . The results were statistically processed using the statistical program Epi Data 3.1 and SPPS 14 for Windows.
Results: In our sample, it was found that more women than men consumed every day / every other day raw vegetables , women prefer more than men consumption of caffeinated beverages (cola, coffee) , with increasing age, the respondents reduced consumption of milk every day / every other day , with higher age consumption of smoked meat 1-2 times per month decreases . With increasing age, respondents increased compliance with dietary regimen because of persistent disease.
Conclusion: Mentioned survey of health awareness in population of the Slovak Republic brought the importance of continuation of health education of Slovak citizens to provide information about opportunities and ways to prevent diseases, with an emphasis on motivation to change risky behavior when consuming food.

Keywords: Health awareness. Prevention. Healthy lifestyle.

ÚVOD

Podľa aktualizovaného Programu ozdravenia výživy obyvateľov Slovenskej republiky (2008) výživovú situáciu na Slovensku už viac rokov charakterizuje nadmerný energetický príjem a nevyváženosť zastúpenia základných živín. V popredí je vysoký podiel tukov (presahuje priemerné odporúčané výživové dávky až o cca 40%) a súčasne deficitný príjem niektorých ochranných faktorov – vitamínov (vitamínu B2 a vitamínu C), minerálnych látok (vápnika) a stopových prvkov [1]. Na druhej strane je to zasa nedostatočná spotreba významných potravín, v popredí s nízkou spotrebou mlieka a mliečnych výrobkov, ovocia a zeleniny a tým podmieneného nízkeho prívodu viacerých ochranných výživových faktorov do organizmu.

CIEĽ

Cieľom prieskumu bolo okrem iného aj zistiť vplyv zdravotného uvedomenia na konzumáciu potravín u občanov Slovenskej republiky v roku 2013.

METÓDY A METODIKA

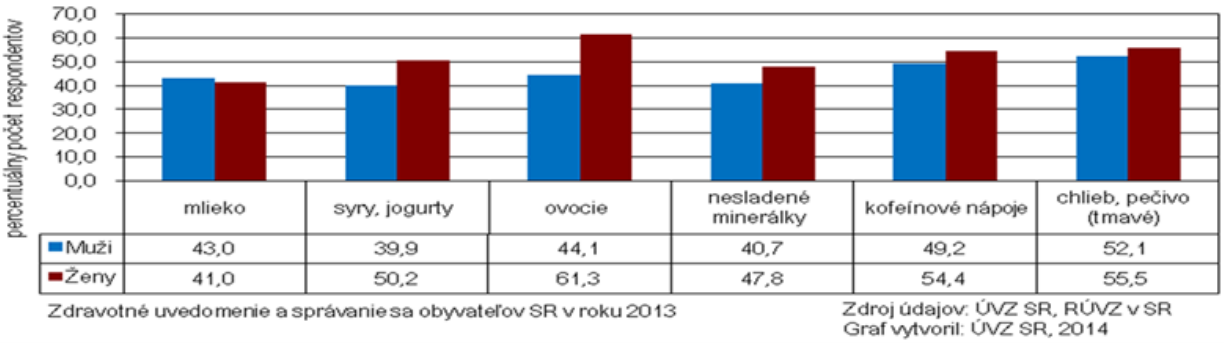
Prieskum sa realizoval dotazníkovou metódou na celom území Slovenskej republiky. Výber respondentov podľa pohlavia a miesta bydliska (mesto/vidiek), taktiež počet respondentov pre príslušnú oblasť k RÚVZ v SR bol presne daný a rozdelený na 3 vekové kategórie: od 15 – 24 rokov, od 25 – 64 rokov a nad 65 rokov. Výsledky boli štatisticky spracované pomocou štatistického programu Epi Data 3.1. a SPPS 14 pre Windows.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

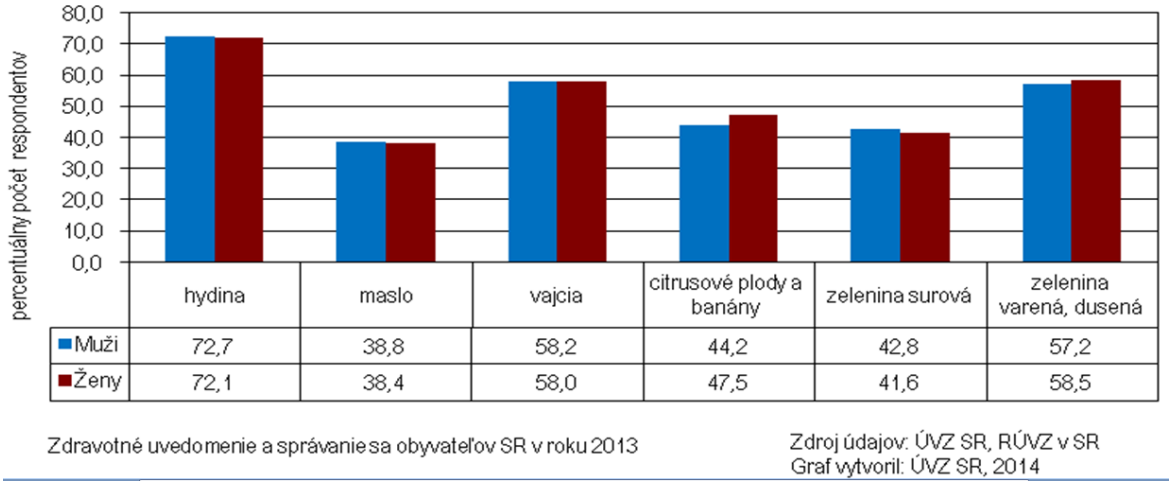
Výskumnú vzorku tvorilo 3679 respondentov (1840 mužov a 1839 žien) vo veku od 15 do 95 rokov. Prieskum uvádzaný v grafe č.1 zdravotného uvedomenia zistil, že polovica (42,0%) respondentov pije mlieko každý deň/obdeň. So stúpajúcim vekom sa u respondentov znižuje pitie mlieka každý deň/obdeň. Za pozoruhodné môžeme konštatovať, že viac (58,0%) mužov ako (48,1%) žien mladšej vekovej kategórie (menej ako 25 rokov) pije mlieko každý deň/obdeň. Klesajúci a kritický trend v spotrebe mlieka sa prejavuje v nedostatočnom krytí spotreby vápnika. Väčšina respondentov (45%) konzumuje syry a jogurty každý deň/obdeň a to viac (50,2%) žien ako (39,9%) mužov. So stúpajúcim vekom u respondentov sa znižuje každodenná/obdenná konzumácia syrov a jogurtov. Väčšina (58,1%) respondentov konzumuje takmer rovnako (58,2%) muži aj (58,0%) ženy 1 až 2-krát týždenne vajcia. Štatisticky významne viac (15,3%) mužov ako (12,4%) žien konzumuje vajcia každý deň/obdeň. Znižujúcim vekom sa zvyšuje konzumácia vajec na každý deň/obdeň. Mladší muži (28,4%) viac ako (18,9 %) ladé ženy vo veku menej ako 25 rokov konzumujú vajcia každý deň/obdeň ako to zobrazuje graf č.2.

Takmer rovnako (42,2%) respondentov konzumuje surovú zeleninu 1 až 2-krát týždenne. Viac žien (35,8%) ako mužov (26,2%) konzumuje každý deň/obdeň surovú zeleninu. Väčšina respondentov (57,8%) konzumuje varenú a dusenú zeleninu 1 až 2-krát týždenne. Napriek tomu každodennej / obdennej konzumácii varenej a dusenej zelenine neodolá štatisticky významne viac žien z mesta (20,5%) ako z vidieka (18,2%) oproti mužom z mesta (15,7%) a mužom z vidieka (13,9%).

Väčšina (52,7%) respondentov konzumuje ovocie každý deň. Ženy (61,3%) konzumujú ovocie častejšie ako (44,1%) muži. Potvrdilo sa, že mladšie vekové kategórie konzumujú častejšie každý deň/obdeň ovocie. Mladšie ženy (60%) vo veku menej ako 25 rokov častejšie konzumovali každý deň/obdeň ovocie ako muži (47,5%) v rovnakej vekovej kategórii. Väčšina respondentov (45,9%) konzumovalo citrusové plody a banány 1 až 2-krát týždenne. Štatisticky významne viac žien (27,2%) ako mužov (19,3%) konzumovalo každý deň / obdeň citrusové plody a banány. Vo vekovej kategórii od 25 - 64 rokov štatisticky významne viac žien (25,8%) konzumovalo citrusové plody a banány každý deň / obdeň ako muži (16,7%). So stúpajúcim vekom sa znižuje konzumácia citrusových plodov a banánov. Väčšina respondentov (40,8%) konzumuje chlieb a pečivo (svetlé) každý deň / obdeň a to viac (45,2%) mužov ako (36,4%) žien. So stúpajúcim vekom u respondentov sa znižuje každodenná / obdenná konzumácia svetlého chleba a pečiva. Respondenti na vidieku (43,1%) viac konzumujú svetlé pečivo a chlieb ako respondenti v meste (38,5%). Väčšina respondentov (53,8%) konzumuje chlieb a pečivo (tmavé) každý deň / obdeň a to viac (55,5%) žien ako (52,1%) mužov. So stúpajúcim vekom u respondentov klesá konzumácia tmavého chleba pečiva. Respondenti (55,9%) v meste viac konzumujú tmavé pečivo a chlieb ako respondenti (51,7%) na vidieku.



Graf 1 Percentuálne rozloženie odpovedí respondentov, ktorí uviedli konzumáciu uvedených potravinových komodít každý deň/obdeň podľa pohlavia



Graf 2 Percentuálne rozloženie odpovedí respondentov, ktorí uviedli konzumáciu uvedených potravinových komodít 1 – 2-krát týždenne podľa pohlavia

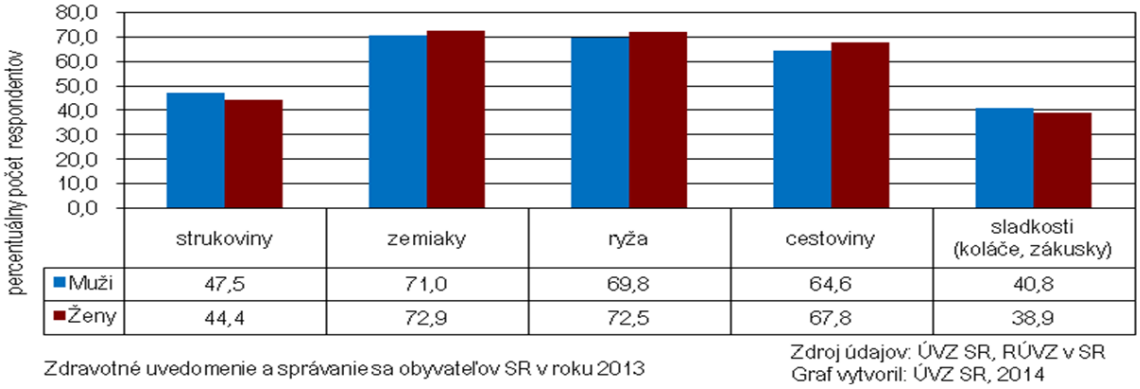
Väčšina respondentov (39,9%) konzumuje sladkosti (koláče, zákusky) 1 až 2-krát týždenne. Každodennú konzumáciu sladkostí preferuje 22,5%. So stúpajúcim vekom sa u respondentov znižuje každodenná konzumácia sladkostí. Až 12,7% respondentov, ktorí trpia diabetes mellitus konzumuje sladkosti každý alebo obdeň. Za negatívne môžeme považovať to, že respondenti sú si vedomí svojho ochorenia a aj napriek tomu konzumujú sladkosti každý deň alebo obdeň.

Väčšina (58,1%) respondentov konzumuje bravčové mäso 1 až 2 týždenne a to štatisticky významne viac mužov (64,3%) ako žien (51,9%). Väčšina respondentov (72,4%) konzumuje hydinu 1 až 2 krát týždenne. Respondenti vo veku od 25 - 64 rokov konzumujú častejšie 1 až 2-krát do týždňa (76,3%) hydinu ako respondenti vo veku menej ako 25 rokov (64,7%). V porovnaní s konzumáciu s bravčovým mäsom, hovädzie mäso konzumuje 1 až 2-krát týždenne podobne viac (37,2%) mužov ako (22,8%) žien.

Väčšina respondentov (36,6%) konzumuje údeniny 1 až 2-krát mesačne, a to takmer rovnako ženy (37,2%) a muži (36,0%). S pribúdajúcim vekom však konzumácia 1 až 2-krát mesačne údenín klesá. Možno konštatovať, že častejšiu konzumáciu údenín 1 až 2-krát týždenne preferujú muži (41,7%) ako ženy (25,6%). Štatistický významné je, že mladí muži vo vekovej kategórie menej ako 25 rokov častejšie konzumujú údeniny 1 až 2-krát týždenne ako muži ostatných vekových kategóriách.

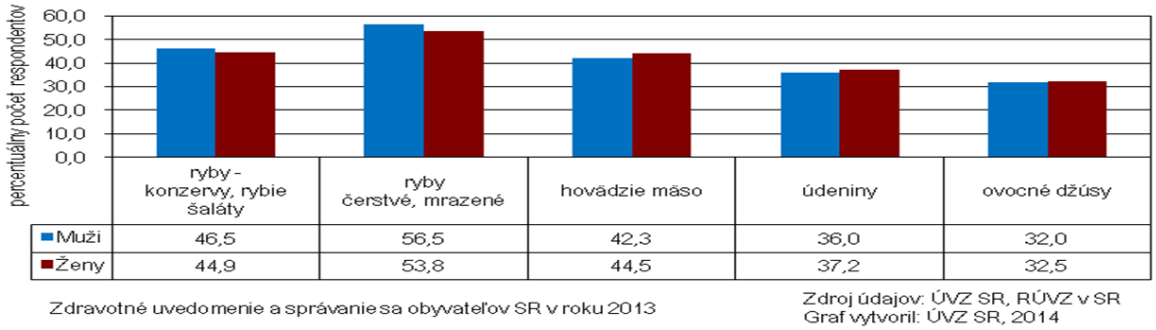
Za pozoruhodné považujeme konzumáciu rýb v mladšom veku (menej ako 25 rokov) 1 až 2-krát týždenne u mužov (30%) častejšie ako u žien (21,8%). Respondenti vo veku od 25 - 64 rokov konzumujú častejšie 1 až 2-krát mesačne (59,1%) ryby čerstvé, mrazené ako respondenti vo veku menej ako 25 rokov (51,2%). Väčšina (45,7%) respondentov konzumuje ryby – konzervy a rybie šaláty 1 až 2-krát mesačne a to viac muži (46,5%) ako ženy (44,9%). Za zaujímavé môžeme považovať, že vo vekovej kategórii 45 – 54 rokov štatisticky významne častejšie (51,7%) viac ženy ako (40,2%) muži toho istého veku konzumujú ryby – konzervy, rybie šaláty.

Väčšina respondentov (71,2%) konzumuje ryžu 1 až 2-krát týždenne. Respondenti vo veku od 25 - 64 rokov konzumujú ryžu (74,0%) častejšie 1 až 2-krát týždenne ako respondenti vo veku menej ako 25 rokov (69,0%). Väčšina respondentov (45,9%) konzumuje strukoviny 1 až 2-krát týždenne. So stúpajúcim vekom u respondentov sa zvyšuje konzumácia strukovín 1 až 2-krát týždenne. Väčšina (71,9%) respondentov konzumuje zemiaky 1 až 2-krát týždenne. Každodennú / obdennú konzumáciu zemiakov preferuje viac (18,3%) mužov ako (14,3%) žien ako to zobrazuje graf č. 3.



Graf 3 Percentuálne rozloženie odpovedí respondentov, ktorí uviedli konzumáciu uvedených potravinových komodít 1 – 2-krát týždenne podľa pohlavia

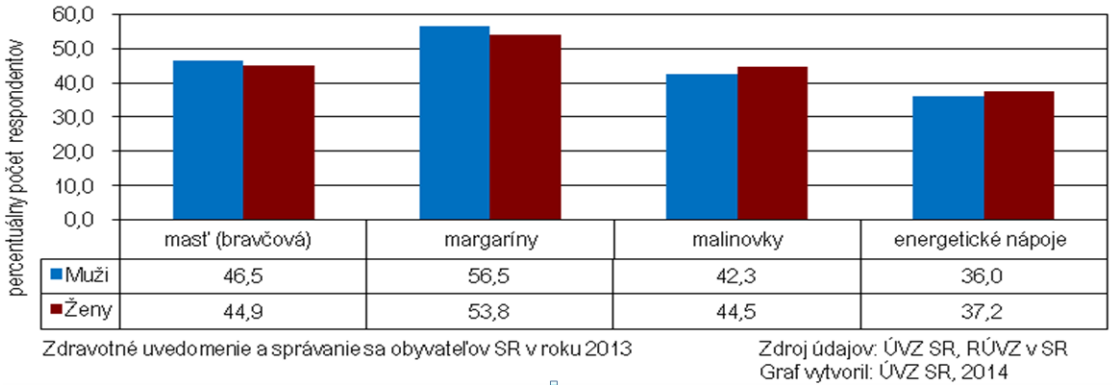
Väčšina respondentov (38,6%) konzumuje maslo 1 až 2-krát týždenne. Respondenti vo veku od 25 - 64 rokov konzumujú častejšie 1 až 2-krát do týždňa (43,3%) maslo ako respondenti vo veku menej ako 25 rokov (33,4%). Väčšina respondentov (39,6%) konzumuje margaríny zriedka alebo nikdy. Respondenti vo veku od 25 - 64 rokov (43,7%) konzumujú margaríny zriedka alebo nikdy častejšie ako respondenti vo veku menej ako 25 rokov (37,4%). Väčšina respondentov (44,8%) konzumuje bravčovú masť zriedka alebo nikdy a to viac (51,9%) žien ako mužov (37,7%). Vo veku 45 až 54 rokov sa zvyšuje konzumácia bravčovej masti viac u žien ako u mužov v ostatných vekových kategóriách.



Graf 4 Percentuálne rozloženie odpovedí respondentov, ktorí uviedli konzumáciu uvedených potravinových komodít 1 - 2-krát mesačne podľa pohlavia

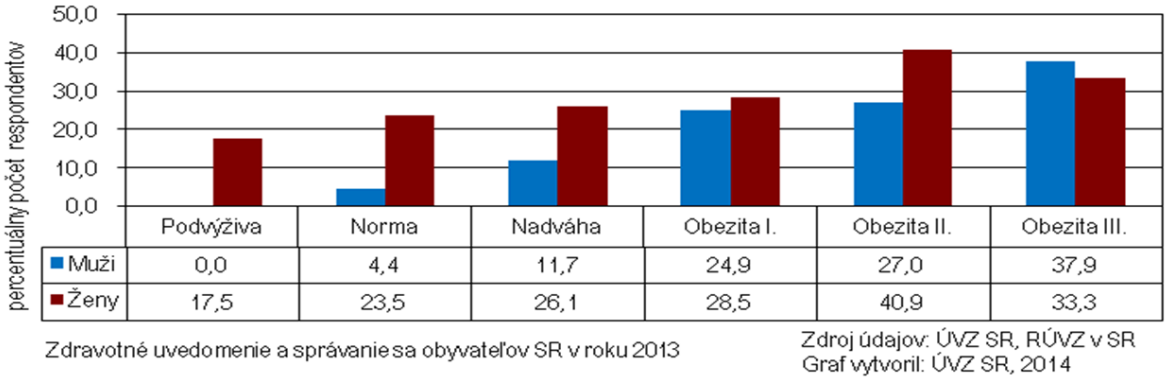
Väčšina (51,8%) respondentov pije kofeínové nápoje ako kola, káva každý deň/obdeň. Slovenské (54,4%) ženy uprednostňujú viac ako (49,2%) slovenskí muži pitie kofeínových nápojov (kola, káva). Každodenné / obdenné pitie kofeínových nápojov sa vekom zvyšuje od mladších vo veku menej ako 25 rokov a potom sa znižuje vo veku 65+ rokov (54,5%). Viac žien (73,6%) ako mužov (60,9%) veku od 25 do 64 rokov štatisticky významne pije každý deň/obdenné kofeínové nápoje (kola, káva). Až 57,7% respondentov, ktorí trpia vysokým krvným tlakom konzumujú kofeínové nápoje (kola, káva) každý alebo obdeň. Rozdiel je štatisticky významný. Za negatívne môžeme považovať to, že respondenti sú si vedomí svojho ochorenia a aj napriek tomu konzumujú kofeínové nápoje (kola, káva) každý deň alebo obdeň. Väčšina (40,8%) respondentov pije malinovky iba zriedka a nikdy, z toho viac žien (47,7%) ako mužov (33,8%). Za pozoruhodné môžeme skonštatovať, že muži (26,9%) pijú viac ako ženy (19,8%) malinovky 1 až 2-krát týždenne. So stúpajúcim vekom sa znižuje každodenné a obdenné pitie malinovky. Väčšina respondentov (44,2%) pije nesladené minerálky každý deň / obdeň. Štatisticky významne viac žien (47,8%) ako mužov (40,7%) pije nesladené minerálky každý deň/obdeň. Zo všetkých vekových kategórií respondentov najviac pijú nesladené minerálky každý deň/obdeň respondenti vo veku menej ako 25 rokov a od 35 do 44 rokov.

Väčšina (73,8%) respondentov konzumuje energetické nápoje zriedka alebo nikdy, avšak viac žien (81,3%) ako mužov (66,2%). Stúpajúcim vekom sa znižuje pitie 1 až 2-krát mesačne energetických nápojov. Viac mužov vo všetkých vekových kategóriách preferujú energetické nápoje 1 až 2-krát mesačne. Za zaujímavé možno konštatovať, že viac žien (96,4%) ako mužov (91,2%) vo veku 65+ pije energetické nápoje zriedka alebo nikdy ako to zobrazuje graf č. 5.



Graf 5 Percentuálne rozloženie odpovedí respondentov, ktorí uviedli konzumáciu uvedených potravinových komodít zriedka alebo nikdy podľa pohlavia

Až 81,6% respondentov nedržalo diétu za účelom zníženia hmotnosti počas uplynulého 1 roka. Štatisticky významne viac žien (24,9%) ako mužov (11,8%) držalo diétu za účelom zníženia hmotnosti počas uplynulého 1 roka. Môžeme konštatovať, že so stúpajúcim vekom u žien sa znižuje ich iniciatíva držať diétu za účelom zníženia hmotnosti počas uplynulého 1 roka. V porovnaní s BMI štatisticky významne viac žien, ktoré mali nadváhu až obezitu držalo diéty (18,4%) za účelom zníženia hmotnosti ako to zobrazuje graf č. 6.



Graf 6 Percentuálne rozloženie odpovedí respondentov, ktorí uviedli držanie diéty za účelom zníženia hmotnosti podľa pohlavia a BMI

Menej ako štvrtina (12,3%) respondentov dodržiavalo špeciálnu diétu z dôvodu pretrvávajúceho ochorenia z toho viac žien (13,7%) ako mužov (10,9%). So stúpajúcim vekom sa u respondentov zvyšuje dodržiavanie diétneho režimu z dôvodu pretrvávajúceho ochorenia.

DISKUSIA

Podľa Globálnej stratégii pre výživu, telesný pohyb a zdravie, výživa a telesná aktivita ovplyvňujú zdravie spoločne aj samostatne. Hoci účinky stravovania a telesnej aktivity na zdravie sa často ovplyvňujú, najmä vo vzťahu k obezite existuje dodatočný zdravotný úžitok, získaný z telesného pohybu, ktorý je nezávislý od stravovania a výživy; a zároveň existujú významné stravovacie riziká, ktoré sa nevzťahujú na obezitu [2]. Na základe výsledkov môžeme konštatovať, že až 81,6% respondentov nedržalo diétu za účelom znižovania hmotností počas uplynulého 1 roka.

V Slovenskej republike podľa štúdie EHES – European Health Examination Survey – Zisťovanie zdravia Európanov v Slovenskej republike u dospelej populácie vo veku od 15 do 64 rokov – 2011 trpí na Slovensku 13-15% detí vo veku od 11 do 15 rokov, nadváhou 20% vo vekovej kategórii od 18 do 24 rokov, obezitou 41,74% ľudí od 55 do 64 rokov, v skupine od 18 do 64 rokov trpí obezitou 25,6% a 36,2% nadváhou [3]. Dôsledky nadhmotnosti a obezity v Európe sú neúprosné: prevalencia obezity sa viac ako strojnásobila v mnohých európskych krajinách od roku 1980 a tento nárast je sprevádzaný nárastom neprenosných ochorení. Posledné odhady ukazujú, že približne 2,8 milióna úmrtí ročne v Európskej Únii vzniká v dôsledku príčin súvisiacich s nadhmotnosťou a obezitou [4]. Z výskumu môžeme konštatovať, že so stúpajúcim vekom sa u respondentov zvyšuje dodržiavanie diétneho režimu z dôvodu pretrvávajúceho ochorenia. Preto je potrebné apelovať na obyvateľov prostredníctvom osvetovej a preventívnej činnosti k zlepšeniu a posilneniu zdravia počas celého života a nielen už u vyskytujúcich sa zdravotných problémoch. Preventívne intervencie zamerané na deti a mladých ľudí znamenajú návratnosť investícií o 6-10%, ak sú intervencie implementované v rannom veku. Napriek tomu, súčasná ekonomická situácia v Európe a rastúce požiadavky zdravotnej starostlivosti na starnúce obyvateľstvo si budú vyžadovať potrebu ďalších investícií v tejto oblasti [5].

Podľa Rímskej deklarácie o výžive z 19.-21. 11.2014 vychádzajúc vrátane Globálnych cieľov Svetovej zdravotníckej organizácie pre oblasť výživy do roku 2025 a Celosvetového akčného plánu Svetovej zdravotníckej organizácie na prevenciu a kontrolu neprenosných ochorení pre roky 2013 – 2020 určité spoločenské a ekonomické zmeny a zmeny v životnom prostredí môžu mať dosah na modely stravovania a fyzickej aktivity, čo vedie k väčšej náchylnosti na vznik obezity a neinfekčných ochorení v dôsledku čoraz sedavejšieho spôsobu života a príjmu potravín s vysokým obsahom tukov, najmä nasýtených trans-mastných kyselín, cukrov a soli/sodíka [6]. Ako vyplýva z nášho výskumu väčšina respondentov (36,6%) konzumuje údeniny 1 až 2 krát mesačne a to takmer rovnako ženy (37,2%) a muži (36,0%). Taktiež väčšina respondentov (44,8%) konzumuje bravčovú masť zriedka alebo nikdy a to viac (51,9%) žien ako mužov (37,7%). Za pozoruhodné môžeme konštatovať, že väčšina (40,8%) respondentov pije malinovky iba zriedka a nikdy, z toho viac žien (47,7%) ako mužov (33,8%). Avšak za štatisticky významne viac žien (47,8%) ako mužov (40,7%) pije nesladené minerálky každý deň / obdeň. Dôležitý je však nielen vplyv prostredia, v ktorom respondenti žijú ale aj navyše sa predpokladá, že sledovanie televízie a využívanie internetu má škodlivé účinky na stravovacie návyky detí a mladých ľudí a býva spojené s väčšou spotrebou cukrom sladených nápojov a vystaveniu sa reklame na nezdravé produkty [7] Globálna stratégia pre výživu, telesný pohyb a zdravie poukazuje na občiansku spoločnosť a mimovládne organizácie, ktoré hrajú dôležitú úlohu pri ovplyvňovaní správania sa jednotlivcov a organizácií a inštitúcií, ktoré riešia problematiku zdravej výživy a fyzickej aktivity. Tieto môžu pomôcť, aby spotrebiteľ požadoval od štátu zabezpečenie podpory zdravého životného štýlu a aby potravinársky priemysel zabezpečil zdravé a finančne dostupné výrobky. Občianska spoločnosť a mimovládne organizácie môžu najmä: mobilizovať a odporúčať, aby sa zdravá výživa a telesný pohyb stali celospoločenskou agendou, podporovať rozsiahle rozširovanie informácií o prevencii neprenosných chorôb pomocou rovnováhy zdravej výživy a telesného pohybu; realizovať kampane, budovať siete a akčné skupiny na podporu dostupnosti zdravých potravín a možností pre fyzické aktivity; podporovať programy podporujúce zdravie a kampane vzdelávania o zdraví, zdôrazňovať úlohu vlád pri podpore verejného zdravia, zdravej výživy a fyzických aktivít; monitorovať pokrok pri dosahovaní cieľov; spolupracovať s ostatnými zúčastnenými stranami vrátane súkromného sektoru, hrať aktívnu úlohu pri podpore implementácie Globálnej stratégie pre výživu, telesný pohyb a zdravie. Dôležitý je dlhodobý a kontinuálny monitoring hlavných rizikových faktorov [2].

Takéto údaje tvoria základ pre analýzu zmien v rizikových faktoroch, čo môže prispieť k zmenám a podpore zlepšenia zdravia občanov.

ZÁVER

Z hodnotenia prieskumu môžeme konštatovať, že viac žien (35,8%) ako mužov (26,2%) konzumuje každý deň/obdeň surovú zeleninu. Väčšina respondentov (57,8%) konzumuje varenú a dusenú zeleninu 1 až 2-krát týždenne. Ženy (54,4%) uprednostňujú viac ako muži (49,2%) konzumáciu

kofeínových nápojov (kola, káva). So stúpajúcim vekom sa u respondentov znižuje konzumácia mlieka každý deň/obdeň. S pribúdajúcim vekom konzumácia údením 1 až 2-krát mesačne klesá. Za pozoruhodné považujeme konzumáciu rýb v mladšom veku (menej ako 25 rokov) 1 až 2-krát týždenne u mužov (30%) častejšie ako u žien (21,8%). So stúpajúcim vekom u žien sa znižuje ich iniciatíva držať diétu za účelom zníženia hmotnosti počas uplynulého 1 roka. Za pozitívne považujeme z pohľadu zdravotného uvedomenia, to že so stúpajúcim vekom sa u respondentov zvyšuje dodržiavanie diétneho režimu z dôvodu pretrvávajúceho ochorenia. Uvedený prieskumom zdravotného uvedomenia obyvateľov v Slovenskej republike priniesol význam k pokračovaniu zdravotnej výchove obyvateľov Slovenskej republiky s cieľom poskytnúť informácie o možnostiach a spôsoboch prevencie chorôb s dôrazom na motiváciu k zmene rizikového správania pri konzumácii potravín.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

[1] Program ozdravenia výživy obyvateľov Slovenskej republiky. 2008. cit.14.3.2014 Dostupné na internete:http://www.uvzsr.sk/index.php?option=com_content&view=article&id=605:aktualizovany-program-ozdravenia-vyivy&catid=66:vyiva-a-bezpenos-potravin&Itemid=72. Vláda Slovenskej republiky na svojom zasadnutí dňa 17.12.2008 prerokovala a schválila návrh aktualizovaného Programu ozdravenia výživy obyvateľov Slovenskej republiky.17.12.2008

[2] Globálna stratégia pre výživu, telesný pohyb a zdravie. 2013.cit. 10.12.2014 Dostupné na internete: http://who.sk/index.php/publications/strategyslov

[3] EHES – European Health Examination Survey – Zisťovanie zdravia Európanov v Slovenskej republike u dospelej populácie vo veku od od 15 do 64 rokov – 2011. cit. 09.12.2013 Dostupné na internete: http://www.uvzsr.sk/index.php?option=com_content&view=article&id=2066:odstra-obezitu&catid=106:aktualne

[4] World Health Oragnization. Global Status Report on Non-Communicable Diseases 2010. cit. 10.12.2014 Dostupné na internete: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/)

[5] DAVIES SC, LEMER C, STRELITZ J, WEIL L. Our children deserve better: prevention pays. Lancet. 2013 Oct, 382 (9902): 1383-84, Heckman J, Moon S, Pinto R, Savelyev P, Yavitz A. The rate of return to the High Scope Perry Preschool Program. J Public Econ. 2010, 94: 114-128.

[6] Rímska deklarácia o výžive. 2014. cit. 10.12.2014 Dostupné na internete: http://www.uvzsr.sk/docs/info/tb/Priloha_c1_deklaracia_SK.pdf

[7] OLAFSDOTTIR S, BERG C, EIBEN G, LANFER A. REISCH L, AHRES W, KOURIDES Y, MOLNAR D, MORENO LA, SIANI A, VEIDEBAUM T, LISSNER L. Young children s screen drink consumption and athropometry: results from a prospective European study. Eur J Clin Nutr. 2013 Nov doi: 10.1038/ejcn.2013.234.

POKYNY PRE AUTOROV

Časopis *Zdravotnícke listy* je vedecký recenzovaný časopis, ktorý sa zameriava na publikovanie príspevkov z oblasti zdravotníckych lekárskych i nelekárskych odborov. Časopis uverejňuje pôvodné práce, prehľadové referáty a recenzie odbornej literatúry, ktoré sa vyznačujú aktuálnosťou a obsahovou relevantnosťou.

Redakcia prijíma rukopisy v slovenskom, českom a anglickom jazyku, ktoré sa stávajú subjektom recenzného konania minimálne dvoch nezávislých recenzentov. Identita recenzentov môže byť utajená. V priebehu recenzného konania sa editori zaväzujú udržiavať v tajnosti informácie o autorstve posudzovaného príspevku pred recenzentmi, redakčnou radou a vydavateľom. Ďalej sa zaväzujú nepoužiť bez písomného súhlasu žiadnu časť nepublikovaného rukopisu. Za vedeckú a zároveň etickú úroveň časopisu zodpovedá predseda redakčnej rady spolu s vedúcim editorom a redakčnou radou.

Záverečné rozhodnutie vo veci akceptácie alebo zamietnutia článku na publikovanie zostáva v plnej kompetencii redakčnej rady. Za jazykovú korektúru (jazykovú a gramatickú stránku príspevku) zodpovedajú autori. Redakcia si vyhradzuje právo vykonávať drobné štylistické úpravy textu bez konzultácie s autorom, s ktorými sa autor oboznámi pri autorskej korektúre, ako aj na zamietnutie textu, ktorý obsahovo nezapadá do koncepcie časopisu alebo nebol schválený odborným recenzným posudzovaním. Práca s formálnymi nedostatkami sa vráti autorovi na prepracovanie.

Príspevky musia spĺňať základné etické princípy kladené na výskum na ľudskom subjekte. V rukopise je nutné uviesť, že štúdia, ktorej je príspevok súčasťou, bola schválená etickou komisiou (uviesť názov etickej komisie). Ďalej je potrebné uviesť, že účasť respondentov na štúdii bola dobrovoľná a údaje boli spracované dôverne. Autor má povinnosť uviesť prípadné zdroje financovania a vyjadriť sa k potenciálnemu konfliktu záujmov. Práca musí obsahovať prehlásenie, že nebola a v prípade akceptácie, nebude zaradená na publikovanie do iného časopisu, ktoré musí byť podpísané všetkými autormi na znak ich súhlasu s obsahom rukopisu. Prijaté práce sa stávajú trvalým vlastníctvom časopisu a bez písomného súhlasu vydavateľa nesmie byť reprodukovaná žiadna časť akceptovanej práce.

Formálna stránka rukopisu –

- rozsah rukopisu je obmedzený na 12 normostrán (21 600 znakov aj s medzerami).
- Odporúčané nastavenie pre MS Word - abstrakt: typ písma Times New Roman, veľkosť 12, riadkovanie 1,0, všetky okraje nastavené na 2,5 cm, zarovnanie doľava, nedeliť slová.
- Odporúčané nastavenie pre MS Word – vlastný text: typ písma Times New Roman, veľkosť 12, riadkovanie 1,5, všetky okraje nastavené na 2,5 cm, zarovnanie doľava, nedeliť slová.
- V texte nepoužívať tučné písmo (bold) a kurzívu (okrem citátov). Tučné písmo používať iba na označenie názvu príspevku a jeho jednotlivých častí, názvy tabuliek a obrázkov.
- Tabuľky, obrázky a grafy musia byť umiestnené na príslušnom mieste v článku (autor ich neposiela samostatne). Tabuľky, grafy a obrázky musia byť označené číslom a názvom a musí byť na ne uvedený odkaz v texte. Veľkosť písma v tabuľke a v grafe je stanovená 10pt.
- Titulná strana rukopisu by mala obsahovať nasledujúce údaje: názov v slovenskom, resp. českom a anglickom jazyku, meno a priezvisko autorov (uvádzať v plnom znení aj s titulmi), oficiálny úplný názov pracoviska aj s korešpondenčnou adresou každého autora, kontaktné údaje prvého autora, resp. autora určeného pre korešpondenciu.
- Štruktúra abstraktu je nasledovná:
    - Východiská
    - Ciele
    - Súbor a metódy/metodika
    - Výsledky
    - Záver

Práca teoretického charakteru by mala obsahovať nasledujúce časti:

- názov v slovenskom (resp. českom) a anglickom jazyku, štruktúrovaný abstrakt v slovenskom (resp. českom) a anglickom jazyku (rozsah do 250 slov), maximálne 5 kľúčových slov v slovenskom (resp. českom) a anglickom jazyku, úvod, vlastný text, (vrátane vymedzenia cieľov štúdie, príp. formulovanie sledovaných problémov), metodiku (spôsob výberu literárnych zdrojov, spôsob analýzy), výsledky (prezentácia vlastných výsledkov analýzy), záver a zoznam bibliografických odkazov.

Práca výskumného charakteru by mala obsahovať nasledujúce časti:

- názov v slovenskom (resp. českom) a anglickom jazyku, štruktúrovaný abstrakt v slovenskom (resp. českom) a anglickom jazyku (rozsah do 250 slov), maximálne 5 kľúčových slov v slovenskom (resp. českom) a anglickom jazyku, úvod, cieľ, súbor, metodiku, výsledky, diskusiu, záver a zoznam bibliografických odkazov.

Citovaná literatúra je zoradená tak, aby všetci autori citovaní v texte boli uvedení v Zozname bibliografických odkazov a naopak. V texte sa uprednostňuje citovanie podľa metódy prvého údaja a dátumu (vrátane uvedenia čísla strany, resp. strán), citovaná literatúra je v zozname bibliografických odkazov zoradená v abecednom poradí. Uvádzajú sa všetci autori, pri väčšom počte autorov ako 3 sa uvádza za menom tretieho autora skratka „et al.“.

Príklady citácie:

Monografické publikácie/knihy:
PRIEZVISKO, M. rok vydania. *Názov*: *Podnázov*. Vydanie. Miesto vydania: Názov vydavateľa, rok vydania. Počet strán. ISBN.
Kapitoly v monografiách/ knihách:
PRIEZVISKO, M. rok vydania. Názov. In Priezvisko, M. editorov. *Názov monografie*. Vydanie. Miesto vydania: Vydavateľ, rok vydania. ISBN, rozsah strán (strana od - do).
Článok v seriálovej publikácii:
PRIEZVISKO, M. rok vydania. Názov. In *Názov zdrojového dokumentu* (noviny, časopisy). ISSN, rok, ročník (číslo zväzku), číslo, rozsah strán.
Príspevok v zborníku:
PRIEZVISKO, M. rok vydania. Názov článku. In *Názov zborníka* [druh nosiča]. Miesto vydania : Vydavateľ, rok vydania, ISBN, rozsah strán (strana od – do).
Články v elektronických časopisoch a iné príspevky:
PRIEZVISKO, M. rok vydania. Názov. In *Názov časopisu*. [Druh nosiča]. rok vydania, ročník, číslo [dátum citovania]. Dostupnosť a prístup. ISSN.
Legislatívne dokumenty:
Označenie a číslo legislatívneho dokumentu/rok publikovania a skratka úradného dokumentu. Názov. Poznámky.

Rukopis je možné zaslať v elektronickej podobe na e-mailovú adresu: zdravotnicke.listy@tnuni.sk

Časopis ponúka priestor na reklamu a sponzorovanie časopisu, a to predovšetkým zameranú na zdravotnícke produkty a služby. Redakcia a vydavateľ majú právo odmietnuť reklamu alebo sponzorstvo, a to z akéhokoľvek dôvodu. Redakcia aj vydavateľ zaručujú, že edičná a reklamná činnosť sú na sebe nezávislé a zadávatelia reklamy a sponzori nemôžu ovplyvňovať publikačný a recenzný proces.

Adresa redakcie:
Fakulta zdravotníctva
Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne
Študentská 2, 911 01 Trenčín
tel.: +421 32 7400611
e-mail: zdravotnicke.listy@tnuni.sk
www.fz.tnuni.sk