



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry
Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1/2015

Ročník XX.

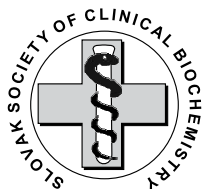
15. VEDECKO-PEDAGOGICKÁ KONFERENCIA UČITEĽOV
BIOCHEMICKÝCH ODBOROV LEKÁRSKYCH FAKÚLT V SR A ČR

21.–23. MÁJA 2015

PREDNÁŠKY

SÚHRNY

IN EXTENSO ČLÁNKY



LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry
Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1/2015

Ročník XX.

PREDESDA REDAKČNEJ RADY

Oliver Rác

REDAKČNÁ RADA

Anna Stecová, bývalá predsedkyňa redakčnej rady

Ján Balla, bývalý výkonný redaktor

Pavol Blažíček, bývalý výkonný redaktor

Silvia Huličová, korektorka

Roman Alberty

Peter Božek

Ladislav Cebecauer

Jozef Čársky

Ivan Čižmár

Michal Farkaš

Drahoslav Gábor

Ján Lepej

Tomáš Lipšic

Vladimír Kohút

Peter Kubisz

Hedviga Pivovarníková

Peter Sečník

Viera Spustová

Dagmar Syrová

Katarína Šebeková

Helena Šeboková

Ivana Šidlíková

Božena Švecová

Rastislav Valko

Juraj Volmut

Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pre SLS

Povolené Ministerstvom Kultúry SR pod reg. č. 1531/96

ISSN 1335-2644

OBSAH

PREDNÁŠKY

ČÁRSKY, J.: ZAČIATKY LEKÁRSKEJ CHÉMIE, BIOCHÉMIE A KLINICKEJ BIOCHÉMIE NA SLOVENSKU (1922–1968)	13
KOVÁČ, G. PORUBENOVÁ, A.: LABORATÓRNA MEDICÍNA V PREGRADUÁLI?.....	22
KOVÁČ, G., PORUBENOVÁ, A., HERIBAN V., ONDZÍKOVÁ, J., KADLEČÍK, J., HUDECOVÁ, L.: POZNÁMKY K VÝUČBE MEDICÍNSKEJ CHÉMIE A BIOCHÉMIE V PREGRADUÁLI NA LF SZU	26
MAREKOVÁ M., GUZY J.: VÝVOJ POSTAVENIA CHEMICKÝCH VIED V ŠTÚDIU VŠEOBECNÉHO LEKÁRSTVA NA LF V SR A ČR V POSLEDNOM DESAŤROČÍ.....	30

ABSTRAKTY

BALÍNOVÁ, P., FONTANA, J., KVASNICOVÁ, V., TRNKA, J.: VYUŽITÍ KLINICKÝCH DETEKTIVNÍCH PŘÍBĚHŮ VE VÝUCE BIOCHEMIE V 1. A 2. ROČNÍKU NA 3. LF UK.....	35
BIRKOVÁ A., HUBKOVÁ B.: RETROGRÁDNE HODNOTENIE VÝUČBY LEKÁRSKEJ BIOCHÉMIE OČAMI LEKÁROV	35
ČIERNY, D., HÁNYŠOVÁ, S., MICHALIK, J., KURČA, E., ŠKEREŇOVÁ, M., DOBROTA, D., LEHOTSÝ, J.: ASOCIÁCIA SRAGE S RIZIKOM VZNIKU A RÝCHLOSŤOU PROGRESIE SCLEROSIS MULTIPLEX	36
DOBROTA D., BITTŠANSKÝ M., SIVÁK, Š., KURČA E.: MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY IN PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS	36
DOBROTA, D.: VÝUČBA BIOCHÉMIE, PATOBIOCHÉMIE, KLINICKEJ BIOCHÉMIE A LABORATÓRNEJ MEDICÍNY NA JESSENIOVEJ LEKÁRSKEJ FAKULTE UNIVERZITY KOMENSKÉHO V MARTINE	37
ĎURFINOVÁ M., OREŠANSKÁ K., PROCHÁZKOVÁ E., BARTOVÁ R., LÍŠKA B.: PARAMETRE OXIDAČNÉHO STRESU A NEURONÁLNEHO POŠKODENIA V LIKVORE PACIENTOV SO SKLERÓZOU MULTIPLEX.....	37
ĎUROVCOVÁ E., MOLČÁNYIOVÁ A.: JE MOŽNÁ SPOLUPRÁCA KLINICKÉHO LABORATÓRIA PRI VÝUČBE ŠTUDENTOV MEDICÍNY?.....	39
FONTANA, J., LAVRÍKOVÁ, P., BALÍNOVÁ, P., KVASNICOVÁ, V., PAVLÍČEK, V., TRNKA, J., SAMCOVÁ, E.: FUNKCE BUNĚK A LIDSKÉHO TĚLA - MULTIMEDIÁLNÍ SKRIPTA PRO VÝUKU LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE, FYZIOLOGIE A HISTOLOGIE ČLOVĚKA	39
HATOK, J., BABUŠÍKOVÁ E., TATARKOVÁ Z., KAPLÁN P.: STIMULÁCIA ŠTUDENTOV NA PRAKTICKOM CVIČENÍ LEKÁRSKEJ BIOCHÉMIE PROSTREDNÍCTVOM E-LEARNINGU.....	40
HUBKOVÁ, B., MAŠLANKOVÁ, J., BIRKOVÁ, A., BÓDY, G., BOLERÁZSKA, B., GUZY, J.: STANOVENIE KYSELINY A-HYDROXYHIPPUROVEJ V SKUPINE S VYSOKOU PREVALENCIOU INFEKcie HEPATITÍDY B	40
CHMÁTALOVÁ, Z., SKOUMALOVÁ, A., VYHNÁLEK, M., LACZÓ, J., HORT, J.: PRODUKTY LIPOPEROXIDACE JAKO POTENCIÁLNÍ BIOMARKERY ALZHEIMEROVY CHOROBY	41
KLIKOVÁ, K., ŠTEFANIKOVÁ, A., PILCHOVÁ, I., HATOK, J., CHUDÝ, P., CHUDEJ, J., DOBROTA, D., RAČAY, P.: BORTEZOMIB NEPRIATEĽ BIELKOVINY HSP90B	42
KOHUTIAR, M., WILHELM, J.: VLIV TERT-BUTYLHYDROPEROXIDU A PEROXYNITRITU NA OXIDAČNÍ POŠKOZENÍ MITOCHONDRÍ.....	43
KOSTECKÁ, Z., HEINOVÁ, D.: VÝUČBA PATOBIOCHEMICKÝCH A KLINICKO-BIOCHEMICKÝCH PREDMETOV NA UVLF V KOŠICIACH.....	44
LAUBERTO VÁ, L., KOŇARIKOVÁ, K., ĎURAČKOVÁ, Z., ŽITŇANOVÁ, I.: PROTEKTÍVNY ÚČINOK OLEJA Z VLAŠSKÝCH ORECHOV PRED HYPERGLYKÉMIOU INDUKOVANÝM OXIDAČNÝM STRESOM	45

MATÁKOVÁ, T., HALAŠOVÁ, E.: VYUŽÍVANIE GENOMIKY V PERSONALIZOVANEJ TERAPII.....	46
MUCHOVÁ, J., ANDREZÁLOVÁ L., ORSZÁGHOVÁ Z. A TURECKÝ, L.: VÝUČBA LEKÁRSKEJ CHÉMIE NA LEKÁRSKYCH FAKULTÁCH U NÁS A V ZAHRANIČÍ.....	46
PILCHOVÁ, I., KLIKOVÁ, K., ŠTEFANIKOVÁ, A., KLAČANOVÁ, K., DIBDIAKOVÁ, K., SAKSONOVÁ S., RAČAY, P.: PROTEAZOMÁLNY STRES: KAT S DVOMI TVÁRAMI.....	47
RAČAY, P., KAPLÁN, P., LEHOTSKÝ, J., DOBROTA D.: VÝUČBA LEKÁRSKEJ CHÉMIE A BIOCHÉMIE PRE ŠTUDENTOV ZUBNÉHO LEKÁRSTVA NA JLF UK MARTIN.....	48
RABAJDOVÁ M., MAREKOVÁ M.: VÝUČBA CHEMICKY ORIENTOVANÝCH PREDMETOV V ODBORE VEREJNÉ ZDRAVOTNÍCTVO	48
RAJDL D., RACEK J., DASTYCH M., ŠAFARČÍK K., PRŮŠA R., FEBEROVÁ J., ZIMA T.: EFEKTIVNÍ VÝUKA MEDICÍNY – MŮŽE NÁM POMOCI E-LEARNING?	49
STUPÁK, M., MAŠLANKOVÁ, J., TOMEČKOVÁ, V., MAREKOVÁ, M.: LEKÁRSKA CHÉMIA A BIOCHÉMIA VO VÝUČBE ŠTUDENTOV ZUBNÉHO LEKÁRSTVA NA LF UPJŠ V KOŠICIACH.....	49
VEJRAŽKA, M.: KAZUISTIKY VE VÝUCE LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE.....	50
VELIKÁ, B., BÓDY, G., BILECOVÁ-RABAJDOVÁ, M., TOMEČKOVÁ, V., BOLERÁZSKA, B. KISKOVÁ, T., ŠTEFFEKOVÁ, Z.: RESVERATROL V PREVENCIÍ RAKOVINY PRSNÍKA	50

IN EXTENSO ČLÁNKY

BARTOVÁ, R., VALENTOVÁ, N., GÓRA, R., TURECKÝ, L., ĎURFINOVÁ, M.: OPTIMALIZÁCIA RP-HPLC METÓDY NA STANOVENIE ZVOLENÝCH NEUROTRANSMITEROV AMINOKYSELINOVEJ POVAHY V CEREBROSPINÁLNO M LIKVORE	55
BENCKOVÁ, M., SABO, J.: PROTEOMICKÁ ANALÝZA MOČU A MOČOVÝCH EXOZÓMOV.....	64
ČIŽMÁRIKOVÁ, M.: „GELRED™“ VERZUS ETÍDIUM BROMID PRI GÉLOVEJ ELEKTROFORETICKEJ ANALÝZE DNA.....	78
ČIŽMÁRIKOVÁ, M.: VÝZNAM P-GLYKOPROTEÍNU A JEHO JEDNONUKLEOTIDOVÝCH POLYMORFIZMOV V LIEČBE DEPRESIE.....	85
MACKO, O., KAIFEROVÁ, J.: REPARÁCIE POŠKODENEJ ZUBNEJ DRENE U ZUBOV S NEUKONČENÝM VÝVINOM	91
HEINOVÁ, D., KOSTECKÁ, Z., CSANK, T.: IZOENZÝMY LAKTÁTDEHYDROGENÁZY V TKANIVÁCH A SÉRE MORIEK SEPAROVANÉ IZOELEKTRICKOU FOKUSÁCIU	105
KREMPASKÁ, K., VAŠKOVÁ, J., ŽATKO, D., VAŠKO, L.: VPLYV HUMÍNOVÝCH KYSELÍN A OLOVA NA AKTIVITU NIEKTORÝCH ANTIOXIDANTOV V MITOCHONDRIÁCH PEČENE A OBLÍČIEK	111
LAKATOŠOVÁ, K., BOLERÁZSKA, B., BIRKOVÁ, A.: ČO PONÚKA POINT OF CARE TESTING.....	118
LAKATOŠOVÁ, K., BIRKOVÁ, A., MAREKOVÁ, M.: PROBLEMATIKA MERANIA GLUKOMETRAMI V REŽIME POCT	126
MAŠLANKOVÁ, J., STUPÁK, M., HUBKOVÁ, B., MAREKOVÁ, M.: METABOLIZMUS A BIOLOGICKÉ ÚČINKY VITAMÍNU D.....	133
MATÁKOVÁ, T., HALAŠOVÁ, E.: VYUŽÍVANIE GENOMIKY V PERSONALIZOVANEJ TERAPII.....	138
PÁLOVÁ E., SABO J.: ZMENY V METABOLIZME TROMBOCYTOV – POTENCIONÁLNE BIOMARKERY SUICIDALITY?.....	145
ŠTEFFEKOVÁ, Z., BIRKOVÁ, A., MAREKOVÁ, M.: ANALÝZA NATÍVNEJ FLUORESCENCIE PRI DIAGNOSTIKE NÁDOROVÝCH OCHORENÍ	155
ŠŤOVÍČKOVÁ, L., LOGEROVÁ, H., TATARKOVIČ, M., KOCOURKOVÁ, L., VAVŘINEC, J., SETNÍČKA, V.: DIAGNOSTIKA DIABETU 1. TYPU S VYUŽITÍM POKROČILÝCH SPEKTROSKOPICKÝCH METOD.....	161
VAVÁKOVÁ, M., KATREČÍKOVÁ, B., TREBATICÁ, J., ĎURAČKOVÁ, Z., PADUCHOVÁ, Z.: STANOVENIE OXIDAČNÉHO POŠKODENIA DNA POMOCOU KOMÉTOVEJ METÓDY ZO ZMRAZENEJ KRVI U DETÍ A ADOLESCENTOV TRPIACICH DEPRESÍVNOU PORUCHOU.....	169
ŽATKO, D., VAŠKOVÁ, J., KREMPASKÁ, K., MAJOR, P., VAŠKO, L.: ÚČINOK HUMÍNOVÝCH KYSELÍN NA ANTIOXIDAČNÝ STATUS V MITOCHONDRIÁCH SRDCA A V PLAZME POTKANOV POČAS CHRONICKEJ INTOXIKÁCIE OLOVOM.....	177
VELIKÁ, B.: VYUŽITIE UV/VIS SPEKTROSKOPIE PRI STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÝCH VLASTNOSTÍ P-HYDROXYBENZOOVEJ KYSELINY A JEJ ESTEROV PRI REAKCII S HYDROXYLOVÝM RADIKÁLOM.....	182

UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH



LEKÁRSKA FAKULTA
ÚSTAV LEKÁRSKEJ A KLINICKEJ BIOCHÉMIE

15. vedecko-pedagogická konferencia
učiteľov biochemických odborov
lekárskych fakúlt v SR a ČR

21 - 23. 5
2015
Košice



Ústav lekárskej a klinickej biochémie

v spolupráci s

Medirex, a.s., člen MEDIREX GROUP

**Východoslovenskou pobočkou Slovenskej spoločnosti pre biochémiu
a molekulárnu biológiu,**

Slovenskou spoločnosťou klinickej biochémie

organizujú

15. vedecko-pedagogickú konferenciu učiteľov biochemických odborov lekárskech fakúlt v SR a ČR

21.–23. máj 2015
Košice, UPJŠ LF

Vedecký výbor konferencie:

prof. Ing. Mária Mareková, CSc. – prednostka Ústavu lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF
prof. Ing. Juraj Guzy, CSc. – zástupca prednostu Ústavu lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF
doc. RNDr. Peter Javorský, DrSc. – predseda Východoslovenskej pobočky SSBMB
doc. MUDr. Oliver Rácz, CSc. – predseda Slovenskej spoločnosti pre klinickú biochémiu

Organizačný výbor konferencie:

prof. Ing. Mária Mareková, CSc.
doc. RNDr. Marek Stupák, PhD.
Mgr. Peter Urban, PhD.
RNDr. Jana Mašlanková, PhD.
Ivana Silvášiová
Mgr. Anna Zimová

Konferenciu podporili:

spoločnosti: PRO MEDICINAE, n.f.; Medirex, a.s.; BIOTECH s.r.o., ITES Vranov, s.r.o.
jednotlivci: MUDr. Cuľba, MUDr. Jánošík



Ústav lekárskej a klinickej biochémie

15. vedecko-pedagogická konferencia učiteľov biochemických odborov lekárskech fakúlt v SR a ČR

Termín konania: **21.–23. máj 2015**

Miesto konania: **Poslucháreň P2, UPJŠ LF, Tr. SNP 1, Košice**

PROGRAM KONFERENCIE

21. máj 2015

- 13:00–13:10 Otvorenie konferencie (prof. Mareková).
13:10–13:20 Úvodné slovo dekana fakulty.
13:20–13:30 Pozdravy hostí.
13:30–14:00 **Čársky, J.:** Začiatky lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie na Slovensku (1922–1968).
14:00–14:30 *Prestávka*
15:00–16:00 Prehliadka laboratórií spoločnosti Medirex, a. s.
16:00–18:00 **Prednáškový blok I** – Klinická biochémia a Vedecké príspevky.
predsedníctvo: prof. Racek, prof. Dobrota
16:00–16:10 **Đurovcová, E., Molčányiová, A.:** Je možná spolupráca klinického laboratória pri výučbe študentov medicíny?
16.10–6:20 **Rajdl, D., Racek, J., Dastyh, M., Šafarčík, K., Průša, R., Feberová, J., Zima, T.:** Efektívni výuka medicíny – môže nám pomoci e-learning?
16:20–16:30 **Bálinová, P., Fontana, J., Kvasnicová, V., Trnka, J.:** Využití klinických detektivních příběhů ve výuce biochemie v 1. a 2. ročníku na 3. LF UK.
16.30–16:40 **Bartová, R., Valentová, N., Góra, R., Turecký, L., Ďurfinová, M.:** Optimalizácia RP-HPLC metódy na stanovenie zvolených neurotransmitterov aminokyselinovej povahy v cerebrospinálnom likvore.
16.40–16:50 **Bencková, M., Sabo, J.:** Proteomická analýza moču a močových exozómov.
16:50–17:00 **Čierny, D., Hányšová, S., Michalik, J., Kurča, E., Škereňová, M., Dobrota, D., Lehotský**

- J.: Asociácia sRAGE s rizikom vzniku a rýchlosťou progresie sclerosis multiplex.
17:00–17:10 **Ďurfinová, M., Orešanská, K., Procházková, L., Bartová, R., Líška, B.:** Parametre oxidačného stresu a neuronálneho poškodenia v likvore pacientov so sklerózou multiplex.
17:10–17:20 **Chmátalová, Z., Skoumalová, A., Vyhnanák, M., Laczó, J., Hort, J.:** Produkty lipoperoxidácie jako potenciální biomarkery Alzheimerovy choroby.
17:20–17:30 **Matáková, T., Halašová, E.:** Využívanie genomiky v personalizovanej terapii.

Diskusia

- 18:00 *Uvítacia recepcia*
20:00 Prehliadka podvečerných Košíc s Milanom Kolcunom – pre záujemcov.

22. máj 2015

- 8:30–9:15 **Prednáškový blok II** – Vedecké príspevky
predsedníctvo: prof. Ďuračková, prof. Kaplán
8:30–8:40 **Kohutiar, M., Wilhelm, J.:** Vliv tert-butylhydroperoxidu a peroxynitritu na oxidační poškození mitochondrií.
8:40–8:50 **Klíková, K., Štefaníková, A., Pilchová, I., Hatok, J., Chudý, P., Chudej, J., Dobrota, D., Račay, P.:** Bortezomib nepriateľ bielkoviny hsp90β.
8:50–9:00 **Laubertová, L., Koňariková, K., Ďuračková, Z., Žitňanová, I.:** Protektívny účinok oleja z vlašských orechov pred hyperglykémiou indukovaným oxidačným stresom.
9:00–9:10 **Pálová, E., Sabo, J.:** Zmeny v metabolizme trombocytov – potencionálne biomarkery suicidalít?

- 9:10 – 9:20 **Pilchová, I.**, Kliková, K., Štefaniková, A., Klačanová, K., Dibdiaková, K., Saksonová S., a Račay, P.: Proteazomálny stress: kat s dvomi tvármi.
- 9:20–9:30 **Šteffeková, Z.**, Birková, A., Mareková, M.: Analýza natívnej fluorescencie pri diagnostike nádorových ochorení.
- 9:30–9:40 **Šťovíčková, L.**, Logerová, H., Tatarkovič, M., Kocourková, L., Vavřinec, J., Setnička, V.: Diagnostika diabetu 1. typu s využitím pokročilých spektroskopických metód.
- 9:40–9:50 **Vaváková, M.**, Katrenčíková, B., Trebatická, J., Ďuračková, Z., Paduchová, Z.: Stanovenie oxidačného poškodenia DNA pomocou kométovej metódy zo zmrazenej krvi u detí a adolescentov trpiacich depresívnou poruchou.

Diskusia

- 10:00–10:30 *Prestávka*
- 10:30–12:00 **Diskusný blok I.** – Pedagogická sekcia – Lekárska chémia, biochémia.
Predsedenstvo: prof. Štípek, prof. Dobrota
- Štípek, J.**, Borovanský J.: Z čeho se studovala lékařská chemie a biochemia v Praze.
 - Muchová, J.**, Andrežalová, L., Országhová, Z., Turecký, L.: Výučba lekárskej chémie na lekárskech fakultách u nás a v zahraničí.
 - Hatok, J.**, Babušíková, E., Tatarková, Z., Kaplán, P.: Stimulácia študentov na praktickom cvičení lekárskej biochémie prostredníctvom e-learningu.
 - Fontana, J.**, Lavříková, P., Balínová, P., Kvasnicová, V., Pavlíček, V., Trnka, J., Samcová, E.: Funkce buněk a lidského těla – multimediální skripta pro výuku lékařské biochemie, fyziologie a histologie člověka.
 - Mareková, M.**, Guzy, J.: Vývoj postavenia chemických vied v štúdiu všeobecného lekárstva na LF v SR a ČR v poslednom desaťročí.
 - Vejražka, M.**: Kazuistiky ve výuce lékařské biochemie.

Diskusia

- 12:00–13:00 *Obed*
- 13:00–14:30 **Diskusný blok II.** – Pedagogická sekcia – Zubné lekárstvo, nelekárske študijné odbory, doktorandské štúdium.
Predsedenstvo: prof. Průša, prof. Lehotský
- Dobrota, D.**: Výučba biochémie, patobiochémie, klinickej biochémie a laboratórnej medicíny na JLF UK v artine.

- Kostecká, Z.**, Heinová, D.: Výučba patobiochemických a klinicko-biochemických predmetov na uvlf v košiciach.
- Ráčay, P.**, Kaplán, P., Lehotský, J., Dobrota, D.: Výučba lekárskej chémie a biochémie pre študentov zubného lekárstva na JLF UK Martin.
- Stupák, M.**, Mašlanková, J., Tomečková, V., Mareková, M.: Lekárska chémia a biochémia vo výučbe študentov zubného lekárstva na UPJŠ LF v Košiciach.
- Birková, A.**, Hubková, B.: Retrográdne hodnotenie výučby lekárskej biochémie očami lekárov.
- Rabajdová, M.**, Mareková, M.: Výučba chemicky orientovaných predmetov v odbore verejné zdravotníctvo.

Diskusia

- 14:30–15:00 *Prestávka*
- 15:00–17:00 **Prednáškový blok** – Vedecké príspevky III
Predsedenstvo: prof. Mareková, doc. Drgová
- Lakatošová, K.**, Bolerázska, B., Birková, A.: Čo ponúka point of care testing.
 - Krempaská, K.**, Vašková, J., Žatko, D., Vaško, L.: Vplyv humínových kyselín a olova na aktivitu niektorých antioxidantov v mitochondriách pečene a obličiek.
 - Hubková, B.**, Mašlanková, J., Birková, A., Bódy, G., Bolerázska, B., Guzy, J.: Stanovenie kyseliny alfa hydroxyhippurovej v skupine s vysokou prevalenciou infekcie hepatitídy B.
 - Heinová, D.**, Kostecká, Z., Csank, T.: Izoenzýmy laktátdehydrogenázy v tkanivách a sére moriek separované izoelektrickou fokusáciou.
 - Veliká, B.**, Bódy, G., Bilecová-Rabajdová, M., Tomečková, V., Bolerázska, B., Kisková, T., Šteffeková, Z.: Resveratrol v prevencii rakoviny prsníka.
 - Žatko, D.**, Vašková, J., Krempaská, K., Major, P., Vaško, L.: Účinok humínových kyselín na antioxidantný status v mitochondriách srdca a v plazme potkanov počas chronickej intoxikácie olovom.

Diskusia

- 18:00 *Spoločenský večer*
- 23. máj 2015**
- 9:00–19:00 *Lubovniansky hrad, skanzen, Hniezdne – pre záujemcov*

PREDNÁŠKY

ZAČIATKY LEKÁRSKEJ CHÉMIE, BIOCHÉMIE A KLINICKEJ BIOCHÉMIE NA SLOVENSKU (1922–1968)

ČÁRSKY, J.

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie,
Lekárska fakulta UK, Bratislava

Kontakt: jozef.carsky@fmed.uniba.sk

ÚVOD

V historickom pohľade sa nachádzajú dôkazy už v antickom období, ktoré poukazujú na snahy filozoficky vyjadriť javy v prírode pomocou vzťahov abstraktných „princípov“ – tepla, chladu, sucha a vlhkosti (Empedokles, Aristoteles). Kombináciou ich dvojíc a spojením s prvopočiatočnou hmotou odvodil Aristoteles štyri základné prvky: **zem** (kombinácia chladu a sucha), **ohň** (kombinácia sucha a tepla), **vzduch** (kombinácia tepla a vlhkosti) a **vodu** (kombinácia chladu a vlhkosti). Neskôr, v období alchymie, sa už začalo spájať teoretické myslenie s chemickou praxou (Galenos, Avicenna). Cieľom bola premena málo ušľachtilých „nemocných“ kovov na kovy ušľachtilé, najmä zlato, v zmysle Aristotelových „princípov“, pomocou „kameňa mudrcov“ a zázračného omladzujúceho „elixíru vitae“ [1], [2], [3], [4].

Nový obsah alchymii dala **iatrochémia**, ktorá za hlavný cieľ vytýčila skúmanie chemických látok, s cieľom ich uplatnenia v medicínskej praxi. „Uzdravovanie“ kovov, resp. premenu neušľachtilých kovov na ušľachtilé (zlato) nahradila prípravou liečivých látok, čím sa stala

neoddeliteľnou súčasťou stredovekej medicíny. Hlavným predstaviteľom iatrochémie bol **Paracelsus** (Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim) – švajčiarsky lekár a alchymista (1493–1541), ktorý hlásal, že *„životné javy zdravého i chorého ľudského tela sú prejavom chemických procesov, preto poruchy zdravia sú dôsledkom prevládnutia jedného alebo druhého prvku a musia sa dať odstrániť pomocou patričného chemického prostriedku.“* Týmto svojim učením sa stal Paracelsus zakladateľom nielen lekárskej, resp. fyziologickej chémie, ale aj patológie a terapie, a zavedeným nových liekov aj reformátorom stredovekej farmácie [2], [3], [4], [5].

V dobe rozkvetu stredovekej iatrochémie (v 16. až začiatkom 19. storočia) sa vytvoril úzky vzťah medzi chémiou a medicínou, preto významnými chemikmi v tomto období sa stávali lekári a lekárnici (Becher, Kunckel, Stahl, Hoffmann, Cavendish, Priestly, Scheele, Berzelius, Wöhler, Liebig a i.) [6]. Na slovenskom území (v rámci Rakúsko-Uhorska) bol v tomto období aktuálny výskum prírodných minerálnych vôd, ich chemická analýza a liečivé účinky (Paracelsus – vody v Smolníku, Agricola-Bauer – vody v Sliachi, J. Wernher –

vody Spiša, T. Jordan z Kluže – Trenčianske Teplice, Piešťany a Korytnica, K. O. Moller (tvorca školy pre analýzu minerálnych vôd), A. Hermann – Trenčianske Teplice, Piešťany, J. J. Törkös – vody Tekova, A. Rayman – vody Šariša, J. Lisschovini – Turčianske Teplice a i.). Boli to spravidla profesori Lekárskej fakulty Trnavskej univerzity, Baníckej akadémie v Banskej Štiavnici, alebo absolventi Lekárskej fakulty v Halle – žiaci prof. F. Hoffmanna, veľkej authority balneologického výskumu v Európe [7], [8]. V 18. storočí tento výskum vyplynul z nariadenia panovníčky Márie Terézie (r. 1763), podľa ktorého sa museli analyzovať a opísať liečivé účinky všetkých minerálnych vôd na území monarchie. Celkový súbor poznatkov potom spracoval H. J. N. Crantz [9].

VZNIK LEKÁRSKEJ (FYZIOLOGICKEJ) CHÉMIE

Hlavný podiel na vzniku samostatného odboru – lekárskej chémie (tiež fyziologickej, patologickej alebo biologickej chémie) – mali výsledky vedeckého bádania najmä na lekárske fakultách. Rozvoj klinickej medicíny v 19. storočí a na začiatku 20. storočia, ktorý vyplynul zo snahy objektivizovať symptómy chorôb, nastal uplatňovaním laboratórnych chemických metód v klinickej praxi. Tento trend súčasne znamenal prírodovednú orientáciu medicíny najmä k chémii. Pri klinikách vznikali chemické laboratória a medicínska prax si vynútila zavádzanie nových poznatkov chemického výskumu. Lekárske fakulty tým získali predstih v tejto oblasti pred fakultami s prírodovedným zameraním.

Zriadenie prvých klinicko-chemických laboratórií v Berlíne (F. Simon; Charité, r. 1840) a vo Viedni (J. F. Heller; Allgemeine Krankenhaus, r. 1844) bolo spojené aj so založením odborných časopisov zameraných prevažne na využitie chémie v praktickej medicíne. Boli to časopisy *Beitrag zur physiologischen und pathologischen Chemie und Mikroskopie in ihrer*

Anwendung auf die praktische Medizin (Viedeň) a *Archiv für physiologische und pathologische Chemie und Mikroskopie* (Berlín). Príbuznú problematiku však prezentovali aj dávnejšie založené periodiká, napr. *Liebigs Annalen*, *Müllers Archiv* a *Virchows Archiv*. Dôležitú úlohu v ďalšom vývoji fyziologickej chémie mali zborníky, ktoré vydával F. Hoppe-Sayler (od r. 1866) – *Medizinische Untersuchungen aus dem Laboratorium für angewandten Chemie zu Tübingen*, neskôr premenovaného na *Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie* [10].

Na lekárskej fakulte v Prahe (Karolinum) prvé samostatné pracovisko, ktoré zahrnulo chémiu do výučby predmetu „chémiu živočíchov“ vzniklo v r. 1811. Spojené bolo s menom J. Ch. Freymutha (1786–1819), prvého profesora všeobecnej a farmaceutickej chémie. Na jeho katedre pôsobilo viacero významných osobností, ktoré zabezpečovali výučbu i výskum v odbore fyziologicko-patologickej chémie (A. M. Pleischl – nástupca Freymutha, J. F. Heller, J. Redtenbacher, J. U. Lerch, J. S. Presl, V. Šafařík, A. Bělohoubek a i.). J. Redtenbacher (nástupca Pleischla) ako prvý začal prednášať fyziologicko-patologickú chémiu. Na jeho podnet bolo v r. 1845 zriadené laboratórium pre klinicko-biochemické vyšetrenia (vedúcim sa stal J. U. Lerch). Na fyziologickom ústave Lekárskej fakulty, J. E. Purkyně zaradil chemické metódy na prvé miesto medzi fyziologickými metódami. V predmete „špeciálna fyziológia“ prednášal fyziku, chémiu, dynamiku a farmakológiu. Fyziologickú chémiu obohatil najmä svojim objavom proteolytickej schopnosti pankreasu. Niektoré jeho cytologické objavy dali neskôr základ pre skúmanie biochemických zákonitostí na bunkovej úrovni.

Aktualizáciu fyziologickej chémie znamenala reforma štúdia v Rakúsko-Uhorsku z. r. 1872 s požiadavkou, aby na všetkých lekárske fakultách bolo zavedené vyučovanie „užitej chémie“. Vedúcim pražskej katedry užitej (lekárskej) chémie sa vtedy stal K. H. Huppert, ktorý sa výskumne zaoberal analýzou krvi a moču. Jeho medzinárodnú prestíž dokazuje

členstvo v redakčnej rade časopisu *Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie*. Na tejto katedre realizovali svoje vedecké aktivity významné osobnosti, napr., E. Meixner, F. Hoffmeister, B. Rayman a i. [11].

Po rozdelení pražskej univerzity na českú a nemeckú (r. 1882) chemický trend v rámci fyziológie uplatňoval najmä prof. F. Mareš, zaoberajúci sa metabolizmom dusíkatých látok – močoviny a kyseliny močovej [11], [12], [13], [14]. V roku 1883 vznikol prvý český ústav lekárskej chémie – *Ústav pro lučbu lékařskou*, a jeho prvým profesorom sa stal J. Horbaczewski (1854–1942), žiak E. Ludwiga na viedenskej univerzite, ktorý sa preslávil syntetickou prípravou kyseliny močovej. Na základe svojich experimentálnych výskumov prehlásil, že prekursorom tejto kyseliny v organizme sú nukleové kyseliny bunkových jadier. Touto teóriou sa dostal do sporu s prof. F. Marešom, zástancom tzv. „fyziologickej energie“, resp. „fyziologického potenciálu“, ktoré sa uplatňujú pri biosyntetických reakciách. Vzájomná neústupčivosť a nezmieriteľnosť týchto dvoch osobností zabránila zrejme príležitosti v predstihu skúmať progresívnu problematiku nukleových kyselín [11].

Na Horbaczewského ústave pôsobilo viacero významných klinických pracovníkov, napr. L. Haškovec (profesor neuropatológie), L. Syllaba (profesor vnútorného lekárstva), V. Mrázek – (balneológ), ďalej profesori lekárskej chémie – K. Černý, E. Formánek (nástupca Horbaczewského), A. Hamsík (nástupca E. Formánka) a i. Pre potrebu výučby napísal J. Horbaczewski trojdielnu učebnicu lekárskej chémie, ktorej 3. diel – *Chemie fysiologická* bola už učebnicou biochémie, aj keď sa v nej termín „biochémia“ nevyskytuje. Učebnica znamenala vyvrcholenie Horbaczewského snahy o presadenie chemického spôsobu myslenia do medicíny. Podarilo sa mu dosiahnuť, že výučba lekárskej chémie prešla ako samostatný predmet na lekársku fakultu (medici predtým robili skúšku z anorganickej a organickej chémie na filozofickej fakulte a fyziologická chémia bola súčasťou

skúšky z fyziológie na lekárskej fakulte) [11], [12], [13], [14].

V tomto období v USA už vychádzal časopis *Journal of Biological Chemistry*, v Anglicku *The Journal of Biochemistry*, vo Francúzsku *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, v Japonsku *The Journal of Biochemistry* (Tokio) a v bývalom Sovietskom Zväze od r. 1937 *Ukrajinskij biochimičnyj žurnal*).

V roku 1945 vznikol na pražskej LF II. *Ústav pro lékařskou chemii*, z bývalého chemického ústavu nemeckej lekárskej fakulty, na ktorom pôsobilo viacero významných nemeckých profesorov (R. Ritter von Zeynek, F. Lippich, F. Haurowicz, Z. Stary). Prednostom nového ústavu sa stal prof. A. Hamsík, významný bádateľ v oblasti chémie krvného farbiva a jeho derivátov a autor osvedčenej 5-dielnej učebnice lekárskej chémie. Vedenie pôvodného českého ústavu, už ako *I. ústavu lékařské chemie*, prevzal Hamsíkov žiak prof. K. Kácl. Ďalší dvaja jeho žiaci boli poverení vedením nových ústavov lekárskej chémie na LF v Olomouci (A. F. Richter) a na LF v Plzni (J. Šůla) [15], [16], [17].

Klinická biochémia na LF Univerzity Karlovej v Prahe zapustila korene na I. internej klinike zásluhou prof. MUDr. Jaroslava Hořejšího, ktorý počiatočnú erudíciu v biochémii a klinickej biochémii získal počas študijného pobytu u prof. E. C. Doddsa na Biochemickom ústave v Middlesex-Hospital v Londýne. Získané skúsenosti využil pri budovaní Ústavu hematologie a krevní transfuse, na ktorom sa školilo a pôsobilo viacero významných osobností českej a slovenskej biochémie a klinickej biochémie [45].

ZAČIATKY BIOLOGICKEJ APLIKÁCIE CHÉMIE NA LF V BRATISLAVE

Je zrejmé, že začiatky aplikácie chémie do biologických disciplín a medicíny na Slovensku treba chápať v kontexte s vyššie uvedeným vývojom, predovšetkým na pražskej lekárskej

fakulte. V Bratislave v predvojnovom období existovala Alžbetínska univerzita s lekárskou fakultou (na farmaceutickom ústave pôsobil Albert Szent-Györgyi von Nagyrápolyt, objaviteľ vitamínu C a laureát Nobelovej ceny za medicínu v r. 1937). Po rozpade Rakúsko-Uhorska a vzniku Československa bola založená nová univerzita v Bratislave – Univerzita Komenského (1919). K prvým fakultám patrila Lekárska fakulta, ktorá prevzala časť klinických pracovísk Alžbetínskej univerzity. Výučba však mohla začať len vyššími ročníkmi, pretože teoretické ústavy boli dobudované až v školskom roku 1922–1923 [18].

Prvým prednostom Ústavu pre lekársku chémiu (1922–1938) sa stal olomoucký rodák **prof. MUDr. Jan Buchtala**, absolvent Lekárskej fakulty univerzity v Štajerskom Hradci (dnešný Graz). Po ukončení štúdia medicíny pôsobil na ústave lekárskej chémie ako asistent a neskôr docent u prof. Hoffmanna, neskôr sa stal vedúcim toxikologického laboratória. Medzinárodné uznanie získal výsledkami štúdia aminokyselinového zloženia proteínov (keratínu) a analýzy žľčových kyselín. Spolupracoval s F. Preglom, neskorším laureátom Nobelovej ceny za chémiu (v r. 1923), s ktorým publikoval prácu „*O možnostiach izolácie špecifických galénových (žľčových) kyselín*“ [19]. Pred nástupom na funkciu prednostu ústavu pôsobil ako inšpektor Ústavu pre skúmanie potravín v Bratislave.

Historicky prvá prednáška z lekárskej chémie na LF v Bratislave odznela 18. októbra 1923 pod názvom „*Jaký význam má chemické studium a chemické myšlení pro lékaře*“ (v plnom znení bola publikovaná v Bratislavských lekárskech listoch [20]). Prof. Buchtala výklad organickej chémie spájal s fyziologickou chémiou, pričom zdôrazňoval, že „*jej hlavnou úlohou je štúdium látkovej výmeny ľudského tela, pretože každá nemoc je spojená so zmenou látkovou v organizme.*“. V podmienkach počiatočného budovania ústavu výskum zamerl na súdnu chémiu a toxikológiu, a na analýzu niektorých minerálnych prameňov na Slovensku [21], [22],

[23], [24], [25]. Pozornosť vzbudila jeho práca o mechanizme periodickej erupzívnej činnosti studenodného gejzíru v Herľanoch [26].

Ústav pre lekársku chémiu LFUK v Bratislave bol v tom čase jediným vysokoškolským chemickým pracoviskom a prof. Buchtala jediným profesorom chémie na Slovensku. V tejto súvislosti je pochopiteľné, že bol zapojený aj do organizovanej činnosti chemikov a zastával funkciu predsedu bratislavskej Odbočky Československej spoločnosti chemickej. Organizoval celoštátny zjazd chemikov v Bratislave v r. 1938, ktorý sa však neuskutočnil v dôsledku politicko-spoločenských zmien. Pôsobenie prof. Buchtalu na LFUK v Bratislave skončilo v r. 1939, kedy odišiel na brnenskú univerzitu. Po zatvorení českých vysokých škôl sa vrátil na Slovensko a pôsobil ako praktický lekár [23].

Záujem o biochémiu na LF v Bratislave v medzivojnových rokoch sa výraznejšie prejavoval na klinikách – propedeutickej (prof. Sumbál) a internej (prof. Netoušek), kde vyústil aj do príslušného vedeckého bádania. V tejto súvislosti treba uviesť najmä činnosť **prof. MUDr. Františka Šimera** (1899–1943), absolventa LFUK v Bratislave, ktorý už v začiatkoch svojej medicínskej praxe prišiel k poznaniu, že bez dôkladnejších vedomostí z fyziológie a biochémie nemožno úspešne pokračovať v medicínskom výskume, ani v medicínskej praxi.

Motiváciu k biochémiu získal počas študijného pobytu na biochemickom ústave v Middlesex-Hospital v Londýne (v r. 1929–1931) u vynikajúceho predstaviteľa európskej biochémie prof. E. C. Doddsa. Vedecká biochemická činnosť prof. Šimera dodnes nestratila na aktuálnosti. Medzinárodný ohlas vzbudila najmä séria experimentálnych prác o metabolizme sacharidov v normálnom a nádorovom tkanive, ktoré publikoval ako spoluautor s F. Dickensom z Middlesex-Hospital v medzinárodnom biochemickom periodiku [27], [28], [29], [30], [31]. V klinickej praxi sa sústredil na metabolické poruchy, reguláciu dýchania a krvného obehu, kde mohol využiť svoju vedeckú erudíciu.

V roku 1938, v dôsledku politicko-spoločenských zmien odchádza zo Slovenska a pôsobí v plzenskej nemocnici ako ošetrojúci lekár. Zapája sa do ilegálneho protifašistického hnutia. Po odhalení tejto činnosti bol v r. 1943 popravený [32], [33], [34].

Počas vojnových rokov sa prednostom Ústavu pre lekársku chémiu na LFUK stal

prof. Ing. Dr. techn. František Valentin, absolvent Českého vysokého učení technického v Prahe. Po promócií pracoval ako asistent a blízky spolupracovník prof. E. Votočku, vedca svetového mena na Ústave všeobecnej, anorganickej a organickej chémie. Medzinárodné uznanie získal sériou prác (samostatne, alebo v spoluautorstve s prof. Votočkom) o sacharidoch, za štúdie ich konštitúcie a optických vlastností, ktorými obohatil chémiu týchto látok a ich derivátov o nové teoretické poznatky. Ako prvý podal dôkaz o kryštalickej enantiomérii u sacharidov (D- a L-ramnitolu) [35]. Počas pôsobenia na LF v Bratislave (1939–1947) sa stal popredným predstaviteľom vedy a školstva na Slovensku, zastávajúc špičkové funkcie – predsedu Slovenskej akadémie vied a umení, rektora SU a i. [36]. V prednáškach medikom, okrem všeobecnej, anorganickej a organickej chémie, prednášal aj fyziologickú chémiu, kapitoly o prírodných látkach, najmä sacharidoch, ku ktorým mal veľmi blízky výskumný vzťah. Publikoval sériu článkov o vitamíne C, látke štruktúrne blízkej sacharidom, v ktorých komplexne spracoval dovtedy známe poznatky. Charakterizoval aj biologickú funkciu vitamínu C – vzťah ku krvnému obrazu, pigmentovému metabolizmu, krvácaniu, tvorbe melanómov, pohlavnej funkcii a skorbutu [37]. V snahe zabezpečiť jeho terapeutické využitie podieľal sa na vypracovaní metódy syntetickej prípravy [38], čo sa viaže ešte k jeho študijnému pobytu na Sorbonskej univerzite v Paríži, Institut de Biologie Physico-chimique (1938). Aktuálnou problematikou vitamínu C sa na LF v Bratislave zaoberal aj J. Mělka, docent na fyziologickom ústave (prednosta V. Hons).

V povojnovom období v r. 1948–1972) sa

prednostom Ústavu pre lekársku chémiu (neskôr katedry chémie) stal **prof. RNDr. Ján Kubis**, absolvent Prírodovedeckej fakulty UK v Prahe, žiak a spolupracovník prof. J. Křepelku na ústave pre všeobecnú, anorganickú a súdnu chémiu. Okrem všeobecnej, anorganickej a organickej chémie sa prednášala v rámci predmetu lekárská chémia kapitola o sacharidov a lipidoch. Výskum ústavu bol zameraný v tom čase prevažne na súdnu chémiu a analýzu toxických látok v biologickom materiáli, v neskoršom období aj na prírodné látky (N. Lišková, J. Čársky) a neurochémiu (E. Porges).

V tomto období zosilnela požiadavka uplatňovania poznatkov biochémie na LF v klinickej praxi i vo výskume, čo už malo určitú tradíciu na propedeutickej a internej klinike zásluhou prof. F. Šimera, a tiež na ústave experimentálnej patofyziológie (R. Korec, G. Bárdoš). Vznikla snaha zaradiť do teoretickej prípravy medikov výučbu biochémie. Z podnetu vtedajšieho dekana fakulty prof. L. Dérera bola táto požiadavka riešená najprv vytvorením oddelenia biochémie v rámci ústavu pre lekársku chémiu. Vedením oddelenia a výučbou biochémie, ako samostatného predmetu od v šk. r. 1949/50, bol poverený MUDr. R. Korec, vtedy už autor dvoch experimentálnych biochemických prác [39], [40].

Vznikom lekárskej fakulty v Košiciach, na výzvu jej predstaviteľov, prešlo viacero pracovníkov z bratislavských teoretických ústavov budovať novú fakultu, medzi nimi aj MUDr. R. Korec, ktorý sa stal profesorom a prednostom ústavu patologickej fyziológie a autorom prvej monografie biochémie na Slovensku [41]. Bol aj iniciátorom pravidelných diabetologicko-biochemických konferencií v Bardejovských Kúpeľoch.

Z ústavu lekárskej chémie vtedy prešiel na LF v Košiciach aj MUDr. Anton Neuwirth, ako vedúci rovnomenného ústavu, ktorý už predtým absolvoval študijný pobyt na univerzite v Zürichu u prof. P. Karrera, laureáta Nobelovej ceny za chémiu, kde bol zapojený do výskumu stavebnej jednotky karotenoidov a vitamínu A,

z čoho vznikla spoločná publikácia v medzinárodnom vedeckom periodiku [42]. Nádejné pôsobenia A. Neuwirtha na LF v Košiciach bolo politicky znemožnené v r. 1953, kedy bol zatknutý a vo vykonštruovanom procese odsúdený za protištátnu činnosť na 12 rokov väzenia. Po amnestii (1960) pôsobil ako klinický biochemik v nemocniciach v Martine a Čadci.

Vedúcim Ústavu lekárskej chémie na LF UPJŠ v Košiciach sa stal MUDr. P. Mäsiar (člen vedeckej školy prof. Niederlanda), ktorý sa vrátil zo študijného pobytu na Ústave Maxa Plancka v Mníchove, počas ktorého určil primárnu štruktúru hemoglobínu opice *Macacus rhesus*. V dôsledku jeho odchodu do zahraničia, funkciu prednostu ústavu prevzal prof. Konštantín Barna, autor prvej slovenskej monografie lekárskej chémie [43].

VZNIK ÚSTAVU VŠEOBECNEJ A KLINICKEJ BIOCHÉMIE NA LFUK V BRATISLAVE

Po odchode MUDr. R. Korca na LF UPJŠ v Košiciach, vedenie oddelenia a výučbu biochémie na LF v Bratislave prevzal **doc. MUDr. T. R. Niederland**, absolvent Lekárskej fakulty UK v Prahe, ktorý sa práve vrátil zo študijného pobytu na Washingtonovej univerzite v Saint Louis, kde pôsobil v biochemicko-farmakologickom laboratóriu u prof. C. F. Coriho a jeho manželky G. Coriovej, neskorších laureátov Nobelovej ceny. Habilitoval v r. 1949 v odbore patológia a terapia chorôb vnútorných a v r. 1952 bol menovaný profesorom všeobecnej a klinickej biochémie.

Zaradenie biochémie do teoretickej prípravy medikov vytvorilo vhodné podmienky pre vznik samostatného **Ústavu všeobecnej a klinickej biochémie**, prvého s takýmto zameraním na lekárske fakultách v Československu. Predpokladalo sa, že vysokoškolský pracovníci toho ústavu, okrem teoreticko-biochemickej praxe, budú vykonávať aj klinickú prax, s cieľom komplexnejšieho chápania existujúcich problémov

medicíny. Na druhej strane išlo o prenášanie problémov klinickej praxe do výskumnej biochemickej činnosti. Prof. Niederland od začiatku existencie ústavu zabezpečil vykonávanie intenzívnej pedagogickej i vedecko-výskumnej činnosti. Napísal učebné texty zo všeobecnej a klinickej biochémie a príručku k laboratórnym cvičeniam z biochémie. Ústav zabezpečoval výučbu biochémie aj na novovzniknutej Farmaceutickej fakulte UK.

Prvými spolupracovníkmi prof. Niederlanda boli: MUDr. T. Turský (ako jediný asistent) a ešte ako poslucháči medicíny, neskorší profesori: E. Brixová, J. Gvozdják, P. Mäsiar a V. Mézeš. Ako absolventi pribudli MUDr. R. Dzúrik a Ing. P. Kovács. Ústav mal vypracovaný výskumný program zameraný na štúdium metabolizmu salicylanov a ich účinku na organizmus, terapeutického využitia digitálistu a strofantínu, hepatálnych patologických stavov, štandardizácie biochemických metód, využitie enzýmov v klinike a i. Profesor T. R. Niederland vytvoril významnú biochemickú školu na Slovensku, ktorej členovia mali významný podiel na budovaní ďalších biochemických pracovísk – na JLF UK v Martine (prof. V. Mézeš), LF UPJŠ v Košiciach (prof. T. Turský, ktorého zakrátko vystriedal prof. Mäsiar), Farmaceutickej fakulte UK v Bratislave (prof. P. Kovács). Niektorí sa stali vedúcimi klinických oddelení (prof. J. Gvozdják, prof. E. Brixová) a klinických laboratórií (prof. R. Dzúrik) a pracovísk SAV. Od r. 1964 bol ústav školiacim pracoviskom postgraduálneho štúdia (pre internú a externú aspirantúru) a pre diplomantov z farmaceutickej a prírodovedeckej fakulty v odbore biochémie. Členovia biochemickej školy prof. Niederlanda sa podieľali na vzniku odborných spoločností, v ktorých potom zastávali vrcholné funkcie – v Slovenskej biochemickej spoločnosti (prof. Turský, prof. Mézeš, prof. Kovács). Významným počinom bolo založenie a vedenie časopisu Československej lekárskej spoločnosti J. E. Purkyně: *Biochemica Clinica Bohemoslovaca*, ktorý vychádzal na Slovensku (vedúcim redaktorom sa stal prof. Niederland).

V r. 1954 bol ústav poverený zabezpečením pedagogických a personálnych podmienok pre konštituovanie katedry klinických a vyšetrovacích metód, v rámci Inštitútu pre doškoľovanie lekárov a farmaceutov. Aby sa toto doškoľovanie mohlo realizovať pri lôžku pacienta, došlo k prepojeniu ústavu na laboratórium II. Internej kliniky LF UK v Bratislave. V roku 1957, keď vznikli podmienky pre vznik samostatného klinicko-biochemického pracoviska, prechodne sa utvorila katedra lekárskej biochémie, ktorá sa v šk. r. 1957/58 rozdelila na dve samostatné pracoviská – katedru biochémie v rámci teoretických ústavov LF UK (vedúcim sa stal **doc. MUDr. T. Turský**) a katedru klinickej biochémie v rámci novovzniknutej III. Internej kliniky, pod vedením prof. T. R. Niederlanda [34], [44], [45]. Pod jeho vedením vzniklo na klinike niekoľko oddelení spojených s laboratóriami, ktoré zabezpečovali prepojenosť experimentálnej a klinickej práce, a umožňovali uplatňovať klinicko-biochemický prístup k rozvoju internej medicíny. Podľa vyjadrenia profesora Niederlanda: „aplikácia biochémie do medicínskych odborov neznamena len istú fázu vývoja, ale je to princíp, ktorý musí byť trvalou súčasťou biochémie i medicíny„.

Odborná činnosť teoretického pracoviska sa orientovala na základný výskum, najmä v oblasti neurochémie, so zameraním na metabolizmus aminokyselín, proteínov, nukleotidov a niektorých skupín lipidov. Z iniciatívy katedry bol zriadený **Biochemický ústav UK** (v r. 1967), za účelom integrácie a koordinácie biochemického výskumu biochemických pracovísk UK. Tento ústav sa konštituoval ako základňa pre rozvoj biochémie a kvalifikačný rast biochemikov na Slovensku. Okrem toho, to bola účasť na vytvorení Pobočky Čsl. spoločnosti biochemickej pri ČSAV na Slovensku (1957). Výskumom v oblasti neurochémie vytvorilo pracovisko podmienky pre rozvoj tohto mladého odboru v rámci Československa. Z jeho iniciatívy vznikla aj sekcia neurochémie v rámci Čsl. biochemickej spoločnosti, z ktorej sa neskôr vytvorila samostatná odborná spoločnosť

združujúca českých a slovenských neurochemikov [46].

Záujem o biochémiu (teoretický i praktický) v povojnovom období sa začal prejavovať aj na iných pracoviskách, resp. inštitúciách na Slovensku. V r. 1951 vznikol v Bratislave Výskumný ústav pre farmáciu a biochémiu, ktorý bol neskôr začlenený do Chemického ústavu SAV. Zriadenie a činnosť tohto ústavu je spojené s doc. Ing. J. Tamchynom. Biochemické zameranie v rámci SAV v tom čase malo aj laboratórium pre výskum hospodárskych zvierat v Ivanke pri Dunaji (Dr. L. Landau, doc. M. Gažo), z ktorého neskôr vznikol Ústav fyziológie hospodárskych zvierat. Na Chemicko-technologickú fakultu SVŠT v Bratislave bola v r. 1952 zriadená katedra technickej mikrobiológie a biochémie (prof. P. Nemeč), na ktorej sa vyprofilovalo viacero popredných biochemikov (doc. L. Drobnička, prof. V. Betina, prof. B. Škárka, prof. Ing. M. Miko). Na Prírodovedeckú fakultu UK vznikol ústav, neskôr katedra biochémie (vedúci Doc. J. Tamchyna), na ktorej sa kreovala významná biochemická škola pod vedením prof. RNDr. L. Kováča. Uviest' treba aj vznik samostatnej katedry biochémie na Farmaceutickej fakulte UK v Bratislave (prof. A. Jindra, prof. Ing. P. Kovács), ďalej biochemické pracovisko na Vysokej škole veterinárskej v Košiciach (prof. M. Bartík) a Vysokéj škole poľnohospodárskej v Nitre (prof. Ing. Š. Ivanko) [46].

LITERATÚRA

1. **Autorenkollektiv** (herausgegeben von Dr. Karl Heinig), **1970**: Biographien bedeutender Chemiker. Eine Sammlung von Biographien. 2. Aufl. Volk und Wissen Volkseigener Verlag. Berlin, 312 s.
2. **Schreiber, E., 2009**: Dějiny Alchymie. Nakladatelství Brana (český preklad: Geschichte der Alchemie). Praha **2009**, 263 s., ISBN 978-80-7243-388-9.
3. **Jesenský, M., 2009**: História alchymie na Slovensku. Balneotherma Bratislava, 177 s., ISBN 978-80-970156-3-3.

4. **Jesenský, M., 2011:** Alchymia v Čaplovičovej knižnici. Vydavateľstvo Magma, Čadca, 207 s., ISBN 978-80-970780-0-3.
5. **Ozábalová, L., 2000:** Paracelsus – lekár a zakladateľ iatrochémie. In Z dejín vied a techniky na Slovensku. XVIII., Historický ústav SAV, Bratislava, s. 87–94.
6. **P. Vágner, P., 1987:** Vytváranie predstav o predmete chémie od XVIII. do konca XVIII. storočia. DVT 20, č. 4, s. 233–248.
7. **Bokesová-Uherová M., Fundárek, R., 1964:** Počiatky vedeckého záujmu o kúpele a liečivé pramene na Slovensku. In Z dejín vied a techniky na Slovensku III. Historický ústav SAV, Bratislava, s. 265–296.
8. **Zálešáková, J., 1999:** Almanach slovenských liečebných kúpeľov a žriedel. SERAIL a. s. Bratislava, 55 s., ISBN 80-968163-4-9.
9. **Crantz, H.J., 1777:** Gesundheitbrunnen der Oestereichischen Monarchie. Wien.
10. **Štrbáňová, S., 1982:** Vývoj biochemických časopisov v rokoch 1840–1930. DVT 15, č. 2, s. 88–101.
11. **Štrbáňová, S., 1976:** Počiatky biochémie na pražskej lekárskej fakulte. DVT 9, s. 206–219.
12. **Kolektív I. LFUK Praha, 1994:** 110 let české lekárskej chémie a biochémie. Galen Praha, 122 s.
13. **Kácl, K., 1973:** K počiatku lekárskej chémie na Univerzite Karlovej. I. Výuka. Chem. Listy 67, č. 8, s. 825–829.
14. **Večerek, B., Taizich, J., 1976:** Výuka chémie na lekárskej fakulte pražskej univerzity. Chem. Listy 70, s. 980–1015.
15. **Kácl, K., 1982:** Rozvoj lekárskej chémie v rokoch 1945–1960. Věda v Československu 1945–1960. Sborník. Ústav čsl. a svetových dejin. ČSAV Praha, s. 549–559.
16. **Duchoň, J., 1966, 1996:** 50 let II. Ústavu pro chemii lékařskou University Karlovy v Praze. Sborník lékařský 67, č. 1, s. 1–15; 97, č. 4, s. 545–552.
17. **Vodrážka, Z., 1982:** Rozvoj biochémie v ČSR v rokoch 1945–1960. Věda v Československu 1945–1960. Sborník. Ústav čsl. a svetových dejin. ČSAV Praha, s. 39–46.
18. **Beniak M., Tichý, M., 1992:** Dejiny lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. I. časť. UK Bratislava, 236 s.
19. **Pregl, F. Buchtala, H., 1911:** Erfahrungen über die Isolierung der spezifischen Gallensäuren. Z. phys. Chemie LXX, s. 198–211.
20. **Buchtala, J., 1924:** Jaký význam má chemické štúdium a chemické myslenie pre lekára. Bratisl. lek. Listy (BLL) 3, č. 7, s. 337–343.
21. **Tichý, M., Bergendi, L., Čársky, J., 1987:** K začiatku Ústavu pre lekársku chémiu na Lekárskej fakulte UK v Bratislave. DVT 20, č. 1, s. 29–39.
22. **Buchtala, J., 1928:** Kriminálne otravy na Slovensku v posledných 5 rokoch. BLL 8, č. 5, s. 247–250.
23. **Heřmanová, D., 2000:** Ústav pre lekársku chémiu Lekárskej fakulty UK v Bratislave v rokoch 1923–1938. In Z dejín vied a techniky na Slovensku XVIII. Historický ústav SAV Bratislava, s. 87–94.
24. **Hensel, J., 1942:** O otázke zastaralých chemických rozborov minerálnych prameňov slovenských kúpeľných miest. BLL 22, č. 2, Príloha 2, s. 22–26.
25. **Heřmanová, D., Čársky J., Tichý, M., 1994:** Lekári-chemici a výskum liečivých prameňov. Zborník. Medzinárodné sympóziu dejinám medicíny a farmácie. Vysoké Tatry, s. 157–158.
26. **Buchtala, J., 1938:** Herlanský gejzír. Chem. Listy 32, č. 18, s. 345–351.
27. **Šimer, F., 1929:** Oxidace uhlovodanů v diabetickej organizme. Čas. lék. čes., č. 8, s. 271–273.
28. **Dikens, F., Šimer, F., 1929:** Observation on Tissue Glycolysis: The Effect of Fluorine and some other Substances. Biochem. J. 23, s. 936–958.
29. **Dickens, F., Šimer, F., 1930:** Glykolýza tkání normálních a neoplastických. BLL 10, s. 249–272.
30. **Šimer, F., 1930:** Katabolismus uhlovodanů v živočišných tkáních. (K teorii diabetu). BLL 10, s. 575–584 a 623–647.
31. **Dickens, F., Šimer, F., 1930, 1931, 1932:** Carbohydrate metabolism of Normal and Tumor Tissue. I–V. Biochem J. 24, s. 905–913 a 1301–1309; 25, s. 973–984 a 985–993; 26, s. 90–98.
32. **Hulín, I., Tichý, M., 1989:** Prof. MUDr. František Šimer – významná osobnosť Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. BLL 90, č. 2, s. 153–145.
33. **Turský, T., Čársky, J., 1999:** 100 rokov od narodenia prof. MUDr. F. Šimera. Medicínsky monitor 1999, č. 3, s. 40.

34. Čársky, J., Heřmanová, D., 2000: K začiatkom biochémie na Slovensku (v medzinárodnom kontexte). In Z dejín vied a techniky na Slovensku. XVII. Historický ústav SAV, Bratislava, s. 71–85.
35. Valentin, F., 1930: Sur une nouvelle forme des deux rhamnites antipodes. Coll. Czech. Chem. Commun. II, s. 689–696.
36. Čársky, J., Heřmanová, D., Tichý, M., 1992: Sto rokov od narodenia prof. Ing. Dr. techn. Františka Valentína. BLL 93, č. 5, s. 219–221.
37. Valentin, F., 1942: O vitamíne C. BLL 12, s. 149–166, 215–223, 265–280, 289–298 a 418–432.
38. Valentin, F., 1941: Modelové pokusy v syntéze vitamínu C. Acta Physiographica Slovaca, s. 34–42.
39. Korec, R., 1947: K problému alkaptonúrie. BLL 27, č. 3, s. 170–175.
40. Korec, R., 1948: Otrava barbiturátmi, nátrium sukcinát a sukcinátdehydrogenáza. BLL 28, č. 11, s. 829–834.
41. Korec, R., 1955: Metabolizmus. Vydavateľstvo SAV Bratislava, 230 s.
42. Karrer, P., Schwyzer, R., Neuwirth, A., 1948: Oxydation von 4-Methyl-o-benzochinon zu cis-cis- β -Methylmuconsäure-anhydrid. Helv. Chim. Acta 31, s. 1210–1214.
43. Barna, K., 1975: Úvod do lekárskej chémie. vydavateľstvo Osveta, Martin, 968 s.
44. Niederland, T. R., 1993: Začiatky biochémie a klinickej biochémie na Slovensku. Prednáška na seminári k 70. výročiu Ústavu pre lekársku chémiu LFUK v Bratislave (Archív ústavu).
45. Hořejší, J., 1995: Jak u nás začínala a vyvíjela se klinická biochemie. Klin. biochem. metab. 3, č. 1, s. 49–51.
46. Čársky, J., 2006: Vývoj biochémie na Slovensku 1956–2006. (50 rokov organizovanej činnosti biochemikov). Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu, Bratislava, 39 s.

LABORATÓRNA MEDICÍNA V PREGRADUÁLI?

KOVÁČ, G. PORUBENOVÁ, A.

Ústav chémie, klinickej biochémie
a laboratórnej medicíny (ÚCHKBLM), Lekárska fakulta
Slovenská zdravotnícka univerzita (SZU), Bratislava

ÚVOD

Cieľom príspevku je analýza súčasnej situácie výučby laboratórnej diagnostiky v pregraduáli na LF SZU v Bratislave a návrh na jej možné riešenie.

- HLA
- hematológia
- koagulácia
- mikrobiológia
- imunopatológia
- transfuziológia.

METÓDA

Postupne diskutujeme:

- analýzu učebných náplní
- existujúce medzery
- náplň predmetu „Laboratórna medicína
- zaradenie predmetu do sústavy predmetov.

Oblasti zaradované do učebných náplní v predmete vnútorné lekárstvo (2)

- infektológia
- molekulárna biológia, genetika
- Imunológia
- výživa
- gastroenterológia
- pečeň, pankreas
- hematológia
- onkológia
- reumatológia
- nefrológia
- vnútorné prostredie a acidobáza
- pneumológia
- urgentná medicína
- toxikológia
- environmentálna medicína
- endokrinológia
- diabetes a metabolizmus
- neurológia

VÝSLEDKY

Analýza učebných náplní

Učebná náplň laboratórnej medicíny v postgraduáli (1)

- klinické laboratórium
- molekulárna patológia
- klinická biochémia
- mikroskopia a analýza moča
- cytogenetika

- psychologická medicína
- dermatológia.

Tab. 1. POROVNANIE RELEVANTNÝCH OBLASTÍ UČEBNÝCH NÁPLŇÍ LABORATÓRNEJ MEDICÍNY A VŠEOBECNÉHO LEKÁRSTVA

Laboratórna medicína	Všeobecné lekárstvo
Klinické laboratórium	absentuje
Molekulárna patológia	biológia
Klinická biochémia	chémia, biochémia
Mikroskopia	histológia, pat. anatómia
Cytogenetika	biológia, interna
HLA	interna
Hematológia	imunológia, interna
Koagulácia	Interna
Mikrobiológia	Infekológia
Imunopatológia	Imunológia
Transfuziológia	interna

Existujúce medzery

Klinické laboratórium

Definícia

- biologický materiál
- inštrumentácia.

Aplikácia vo výučbe klinickej problematiky (3)

- indikácia (4)
- interpretácia.

Učebná náplň predmetu „Laboratórna medicína,,

Laboratórne princípy a operácie

- všeobecné laboratórne postupy, techniky a bezpečnosť
- biologický materiál a iné predanalytické veličiny

Inštrumentácia

- spektrofotometria
- emisné techniky
- rádioizotopové techniky
- elektrochemické techniky
- elektroforéza
- chromatografy a MS
- enzymológia
- imunochémia
- nukleové kyseliny
- automatizácia.

Racionálna laboratórna diagnostika

Racionálna indikácia

- čo sa musí
- čo by sa malo
- čo by sa mohlo.

Interpretácia

- laboratórny výsledok a klinický kontext
- diagnostická validita.

Zaradenie predmetu „Laboratórna medicína“ do sústavy existujúcich predmetov

Predmet by sa vyučoval v rámci výučby vnútorného lekárstva v 5–6 ročníku v nasledujúcom rozsahu:

Laboratórne princípy a operácie

- 8 hodín

Inštrumentácia

- 8 hodín.

Racionálna laboratórna diagnostika

- infektológia, molekulárna biológia, genetika, imunológia, gastroenterológia, pečeň, pankreas, hematológia, onkológia, reumatológia, nefrológia, vnútorné prostredie a acidobáza, pneumológia, urgentná medicína, toxikológia, endokrinológia, diabetes a metabolizmus, neurológia
- po 1 hodine: *Spolu* 12 hodín.

DISKUSIA

K analýze učebných náplní

- Učebná náplň postgraduálneho štúdia laboratórnej medicíny je akreditovaná a v súlade s definíciou predmetu v rámci EFLM/EUMS
- učebná náplň štúdia všeobecného lekárstva je akreditovaná v súlade s kritériami procesu akreditácie všeobecného lekárstva.

Na oboch učebných náplniach v zásade netreba nič meniť: je však potrebné vyplniť existujúcu medzeru vedomostí a zručností v oblasti využitia klinického laboratória v klinickej praxi vnútorného lekárstva.

K existujúcim medzerám

Skutočnosťou je, že absolventi štúdia všeobecného lekárstva nemajú ucelený pohľad na klinické laboratórium: ako funguje a hlavne na to ako ho v praxi účelne využívať: pritom ho budú ako internisti, či praktickí lekári využívať celý život.

K učebnej náplni predmetu laboratórna medicína

Laboratórne princípy a operácie

- by mali poskytnúť ucelený pohľad na princípy fungovania klinického laboratória.

Inštrumentácia

- by mala poskytnúť ucelený pohľad ako a čím sa jednotlivé laboratórne parametre vyšetrujú.

Racionálna laboratórna diagnostika

- by mala poskytnúť ucelený pohľad na problematiku ako účelne laboratórne parametre v klinickej praxi používať a využívať (ktoré, ako a ako často).

K zaradeniu predmetu do sústavy existujúcich

Výučba laboratórnej medicíny

- si nevyžaduje zriadenie nového osobitného predmetu: problematiku je možné

vyučovať v rámci výučby vnútorného lekárstva (prípadne ostatných „veľkých“ klinických odborov).

Pokiaľ ide o čas – problematika je rozpočítaná na 28 hodín:

- učebnice
- existujú vlastné materiály o klinickom laboratóriu a racionálnej indikácii [3], [4].

Harmonogram – existujú dve možnosti:

- osobitne vyčlenený blok pre danú problematiku: zdá sa nám ako nevhodný
- zaradenie problematiky laboratórnej diagnostiky vždy na konci klinického bloku: v trvaní cca 1 hodiny: zdá sa nám vhodný.

ZÁVERY

Z analýzy učebných náplní vyplýva, že

- postgraduálne štúdium laboratórnej medicíny má najbližšie k štúdiu vnútorného lekárstva v piatom a 6. ročníku štúdia všeobecného lekárstva v pregraduáli.

Existujúce medzery

- Medzi oboma odbormi spočívajú v absencii vzájomnej previazanosti ako aj absencii ucelenej predstavy o princípoch funkcie a účelného využívania klinického laboratória v klinickej praxi, ktoré hlavne internisti a všeobecní lekári, ale aj lekári z ostatných klinických odborov využívajú po celý život.

Náplň predmetu „Laboratórna medicína„

- sa sústreďuje v rámci výučby pregraduálu len v minimálnej miere na laboratórne princípy, operácie a inštrumentáciu, jeho ťažisko spočíva v racionálnej laboratórnej diagnostike a účelnom využívaní klinického laboratória v klinickej praxi.

Zaradenie predmetu „Laboratórna a medicína“ do systému existujúcich predmetov

- si nevyžaduje zriadenie nového predmetu, ale spočíva v jeho včlenení do výučby vnútorného lekárstva (prípadne ďalších „veľkých“ klinických disciplín – chirurgia, gynekológia, pediatria) na záver jednotlivých klinických blokov.

DOPORUČENIA

V rámci ďalšieho postupu odporúčame diskusiu o

- definícii položiek a časových „tarifov“
- ich porovnaní so zahraničnými učebnými náplňami
- ďalšej identifikácii potenciálnych medzier medzi laboratóriom a klinikou
- redefinícii potrieb a nadväzujúcej reštrukturalizácii položiek a náplne predmetu
- včleňovaní predmetu do existujúcich klinických blokov.

Najdôležitejšie je uvedomiť si, že 50 % všetkých chemikálií tečie v rámci laboratórnej diagnostiky v súčasnosti zbytočne do umývadla. Zaradenie výučby o problematike racionálneho využitia klinického laboratória by prispelo k zahataniu prietrže plytvania zdrojov na laboratórne vyšerenia.

LITERATÚRA

1. **Kováč, G., Pecháň, I.:** Klinická biochémia pre praktického lekára, 2 vydanie, Herba, Bratislava, 2002, 1–126.
2. **Kováč, G.:** Manažment v laboratórnej medicíne, 1 vydanie, Herba Bratislava, 2005, 1–152.
3. **Kováč, G., Porubenová, A., Drakulová, M., Trupl, J.:** Laboratórna medicína: rozšírené sylaby a poznámky, 1. vydanie, Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava, 2012, 1–381.
4. **Kováč, G., Porubenová, A., Hrušovský, Š., Gurtler, E.:** Racionálna indikácia laboratórných parametrov, 1. vydanie, Herba, Bratislava, 2015, 1–184.

POZNÁMKY K VÝUČBE MEDICÍNSKEJ CHÉMIE A BIOCHÉMIE V PREGRADUÁLI NA LF SZU

KOVÁČ, G., PORUBENOVÁ, A., HERIBAN V.
ONDZÍKOVÁ, J., KADLEČÍK, J., HUDECOVÁ, L.

Ústav chémie, klinickej biochémie
a laboratórnej medicíny (ÚCHKBLM), Lekárska fakulta
Slovenská zdravotnícka univerzita (SZU), Bratislava

ÚVOD

Cieľom príspevku je popis okolností vzniku a súčasného stavu výučby medicínskej chémie a biochémie na Lekárskej fakulte Slovenskej zdravotníckej univerzity v Bratislave. Nadväzujúce vysvetľujúce poznámky uvádzajú veci na správnu mieru.

METÓDA

V príspevku popisujeme:

- okolnosti vzniku
- súčasný stav
- vysvetľujúce poznámky k výučbe medicínskej chémie a biochémie v pregraduáli.

VÝSLEDKY

Okolnosti vzniku

Hlavnou úlohou SZU počas takmer 70 rokov jej činnosti bolo postgraduálne vzdelávanie lekárov, iných zdravotníckych pracovníkov a laborantov v klinickej biochémii a počas posledných 10–15 rokov aj v laboratórnej medicíne.

K výučbe medicínskej chémie a biochémie v pregraduáli nás prinútila zmena legislatívneho prostredia, ktorá nastavila systém postgraduálneho vzdelávania tak, že v súčasnosti môže postgraduálne vzdelávanie poskytovať len tá inštitúcia, ktorá v súčasnosti poskytuje aj pregraduálne vzdelávanie. Vyššie uvedené skutočnosti si za posledných cca 10 rokov vyžiadali zmenu orientácie a v nadväznosti nutnosť vyvinúť nesmierne úsilie na vytvorenie podmienok zabezpečenia pregraduálneho štúdia medicínskej chémie a biochémie v oblasti:

- personálneho zabezpečenia
- priestorového a prístrojového vybavenia
- učebných textov

v prostredí nedostatku personálnych, materiálnych a finančných zdrojov: všetko na úkor kvality postgraduálnej výučby.

Súčasný stav

Študijné programy

V súčasnosti zabezpečujeme štúdium:

- medicínskej chémie pre všeobecných lekárov, stomatólogov v slovenčine a zahraničných študentov v angličtine
- medicínskej biochémie pre všeobecných

lekárov, stomatológov v slovenčine a zahraničných študentov v angličtine.

Priestorové a prístrojové vybavenie

T.č. máme k dispozícii:

- 1 výučbové laboratórium pre výučbu praktík v medicínskej chémii a biochémi na ÚCHKBLM LF SZU vybavené základnými laboratórnymi pomôckami a prístrojovým vybavením (pipety, laboratórne sklo, centrifúgy, trepačky, pH metre, fotometre, POCT technika)
- 2 prednáškové miestnosti, ktoré zdieľame v rámci priestorového zabezpečenia výučby s ostatnými predmetmi štúdia všeobecného lekárstva, stomatológia a zahraničných študentov na LF SZU.

Učebné texty

Za uplynulé obdobie sme stihli pripraviť, vypracovať, zohnať financie a vydať vlastné učebné texty z:

- medicínskej biochémiie pre výučbu v 2. ročníku [1]
- chémie pre príjmacie pohovory [2]
- chemické výpočty pre príjmacie pohovory [3].

V súčasnosti sú v príprave na vydanie učebné texty:

- medicínskej chémie,
- praktík z medicínskej chémie
- praktík z medicínskej biochémiie obsahujúce vysvetlenia na odpovede na 1200 otázok na príjmacie pohovory.

DISKUSIA

Vysvetľujúce poznámky

Na dokreslenie situácie treba uviesť tieto skutočnosti:

Finančné zabezpečenie činnosti SZU

- za posledné 4 roky SZU má k dispozícii rozpočet cca 5 mil EUR na rok, čo

je polovica z pôvodných 10 miliónov, na ktoré „bola zvyknutá“ z predchádzajúceho obdobia

- uvedená redukcia sa udiala náhle, bez prípravy a diskusie: to bola hrubá chyba. Druhou vecou je, že SZU neprispôbila za uplynulé svoje aktivity novému finančnému rámcu
- podotýkam, že SZU nemá žiadne príspevky na študenta, ako je zvykom na LF pod gesciou MŠ SR: LF SZU je odkázaná len na vyššie uvedené finančné zdroje.

Personálne zabezpečenie činnosti ÚCHKBLM LF SZU

Pregraduálnu výučbu pre 70 študentov všeobecného lekárstva v slovenčine, cca 20 študentov stomatológie a cca 25 študentov všeobecného lekárstva v angličtine v každom ročníku zabezpečujú:

- prof. MUDr. RNDr. Gustáv Kováč, Csc MBA
- RNDr. Jozef Kadlečík, asistent
- Ing. Lucia Hudecová, asistent.

Postgraduálnu výučbu, ktorá prebieha v 5 akreditovaných študijných špecializačných programoch:

- v klinickej biochémiie pre povolanie lekár
- v laboratórných a diagnostických metódach z klinickej biochémiie pre povolanie laboratórny diagnostik a laborant s vysokoškolským vzdelaním
- v laboratórnej medicíne pre povolanie lekár
- v laboratórnej medicíne pre povolanie laboratórny diagnostik
- vo vyšetrovacích metódach z klinickej biochémiie pre povolanie laborant s vyšším odborným vzdelaním a „laborant bakalár,“.

Pre cca 90 študentov zaradených do špecializačného štúdia podľa vyššie uvedených kategórií zabezpečujú:

- prof. MUDr. RNDr. Gustáv Kováč, CSc MBA

- MUDr. Anna Porubenová MPH, odborný asistent, špecialista v laboratórnej medicíne a súčasne zástupkyňa prednostu ústavu.

Pre potreby postgraduálneho štúdia boli vypracované pripravené a vydané vlastné:

- učebné texty „Laboratórnej medicíny“ [4]
- monografia o „Racionálnej indikácii“ [5],

Aj na vydanie vyššie uvedených publikácií si autori museli svojpomocne získať finančné zdroje.

Oddelenia „Toxických polutantov“ a „Metalomiky„

Tieto oddelenia boli zaradené administratívnym opatrením vedenia SZU do štruktúry ÚCHKBLM LF SZU: zabezpečujú vedeckovýskumnú činnosť na medzinárodných projektoch a súčasne zápasia s každodenným zabezpečením prevádzky vyplývajúcej z existujúcej finančnej situácie a spomínanej nepripravenej a náhlej redukcie personálu a financií spred 4 rokov: z týchto dôvodov sa na pedagogickej činnosti ÚCHKBLM LF SZU v pre a postgraduáli nepodieľajú.

ZÁVERY

ÚCHKBLM LF SZU zabezpečuje:

- pregraduálne štúdium v 3 študijných programoch a 6 predmetoch rozdelených do dvoch ročníkov pre viac ako 100 študentov pre každý ročník s 2 asistentmi na plný úväzok a 1 profesorom na 0,5 úväzku
- postgraduálne štúdium v 5 akreditovaných študijných programoch pre cca 90 študentov s 1 odborným asistentom na plný úväzok a 1 profesorom na 0,5 úväzku.

Zabezpečenie štúdia prebieha v kontexte organizačných zrážok a nedostatku

- finančných
- materiálnych
- personálnych

zdrojov vyplývajúcich jednak z existujúcej ekonomicko-politickej situácie na strane jednej, ale aj z neuvážených rozhodnutí na úrovni MZ SR, vedenia SZU, ako aj vedenia LF SZU za posledné 4 roky.

Napriek tomu sa podarilo za existujúcej situácie zabezpečiť vydanie

- 4 učebných textov
- 1 monografie.

Zachovanie kontinuity štúdia v pre a postgraduáli

- považujeme za danej situácie z osobitný úspech sám o sebe.

DOPORUČENIA

Hlavné odporúčanie: upozorňovať na nedostatky, žiadať vyvodenie zodpovednosti, ale hlavne ďalej koncepčne pracovať: vyššie uvedené okolnosti (hlavne nedostatok financií a personálnych zdrojov) majú okrem spomínaných problémov a nepríjemností v sebe aj niečo pozitívne: prinútili nás maximálne efektívne využívať disponibilné zdroje v rámci:

Pedagogického procesu

- kde sa snažíme o čo najvyšší možný stupeň univerzálnosti toho mála pedagógov, ktorých máme k dispozícii.

Prípravy učebných textov, kde sa usilujeme o:

- prepojenie teórie a kliniky v rámci výučby medicínskej chémie a biochémie pre pregraduál
- maximálnu integráciu a konsolidáciu postgraduálnej výučby klinickej biochémie, molekulárnej biológie, hematológie, imunológie, klinickej mikrobiológie v rámci postgraduálu.

Na podrobnosti odkazujeme na kapitoly:

- obsah, pedagogický kontext, systém štúdia, biochemický a klinický kontext z učebných textov „Medicínska biochémia„

- na učebné texty „Laboratórna medicína,,
- na predslov, doslov a obsah monografie „Racionálna indikácia laboratórných parametrov,,.

LITERATÚRA

1. Kováč, G., Porubenová, A.: Medicínska biochémia, Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava, 1. vydanie, 2012, 1–258.

2. Kováč, G., Porubenová, A.: Chémia pre prípravu na príjmacie pohovory, SZU, Bratislava, 1. vydanie 2012, 1–73.

3. T. Kepencay: Chemické výpočty, Bratislava, SZU, 1. vydanie, 2012, 1–69.

4. Kováč, G., Porubenová, A., Drakulová, M., Trupl, J.: Laboratórna medicína: rozšírené sylaby a poznámky, 1. vydanie, Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava, 2012, 1–381

5. Kováč, G., Porubenová, A., Hrušovský, Š., Gurtler, E.: Racionálna indikácia laboratórných parametrov, 1. vydanie, Herba, Bratislava, 2015, 1–184.

VÝVOJ POSTAVENIA CHEMICKÝCH VIED V ŠTÚDIU VŠEOBECNÉHO LEKÁRSTVA NA LF V SR A ČR V POSLEDNOM DESAŤROČÍ

MAREKOVÁ M., GUZY J.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie
UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta

e-mail: maria.marekova@upjs.sk

Chemické vedy, ako súčasť lekárskeho štúdia, sa v kurikulách lekárskeho štúdia objavili začiatkom 20. storočia (pred viac ako 100 rokmi). Od pôvodnej náplne predmetu, ktorú predstavovala predovšetkým anorganická a organická chémia, sa postupne záujem i náplň predmetu posúva k tzv. fyziologickej chémii ako sa pôvodne biochémia na LF nazývala. V druhej polovici 20. storočia sa predovšetkým vďaka obrovskému rozvoju biochémie náplň štúdia presúva a zameriava na biochemickú podstatu fungovania ľudského organizmu.

Predmet lekárska chémia nadväzuje vo svojich osnovách na znalosti, ktoré študenti získali na strednej škole. Pre mnohých študentov je to predmet náročný, pretože nevidia jeho bezprostredný klinický význam. Posledné roky charakterizuje snaha vynechať tento predmet, predovšetkým poukazujúc na skutočnosť, že študenti mali chémiu na strednej škole a úspešne absolvovali prijímacie skúšky. Tento trend je viditeľný aj z Tabuľky 1, ktorá jasne potvrdzuje túto skutočnosť. Je to ale naozaj tak? Väčšina učiteľov LF by odpovedala, že predmet Lekárska chémia nie je iba opakovaním stredoškolskej látky. Síce stavia na vedomostiach získaných na strednej škole, ale rozširuje ich smerom k ve-

domostiam potrebným pre lepšie pochopenie procesov prebiehajúcich v ľudskom organizme. Tvorí tak statickú časť biochémie a v tejto podobe sa vyučoval aj na LF, ktoré tento predmet zrušili resp. ho vyučujú ako súčasť biochémie.

Po veľkých objavoch súvisiacich so štruktúrou NK a po identifikácii ľudského genómu, celkový vývoj smeruje k zvýšeniu podielu štúdia biochemických procesov na molekulej úrovni. V súčasnosti Lekárska biochémia predstavuje dynamický odbor predklinického štúdia medicíny, ktorý sa neustále vyvíja na základe nových poznatkov orientovaných na hlbšie pochopenie molekulej podstaty mechanizmov fungovania živých systémov. Spoločne s ďalšími predmetmi v rámci prvých dvoch ročníkov štúdia vytvára rámec pre ostatné predklinické a klinické predmety. Ako však máme učiť molekulej podstatu procesov prebiehajúcich v organizme človeka, keď mnohí študenti netušia čo je napr. kyselina hyalurónová, kolagén, či želatína?

Ak porovnáme počty hodín lekárskej chémie a biochémie v roku 2003 a v roku 2013, je viditeľný trend začleňovania výučby lekárskej chémie do biochémie, často aj na úkor hodín lekárskej biochémie (Tabuľka 2).

**TAB. 1. POČET HODÍN LEKÁRSKEJ CHÉMIE A BIOCHÉMIE
ZA SEMESTER NA JEDNOTLIVÝCH LF**

Fakulta	Lekárska chémia		Biochémia	
	2003	2013	2003	2013
1. LF UK Praha	180	V	150	270
2. LF UK Praha	75	–	225	224
3. LF UK Praha	89	V	209	162
LF UK Hradec	0	V	270	270
LF UK Plzeň	84	90	204	210
LF UP Olomouc	60	75	210	195
LF MU Brno	75	75	150	165
LF OU Ostrava	–	75	–	195
LF UK Bratislava	72	84	132	154
JLF Martin	70	84	182	182
LF UPJŠ Košice	70	V	154	182
LF SZU Bratislava	–	84	–	136

V – voliteľný predmet

**TAB. 2. POROVNANIE POČTU HODÍN LEKÁRSKEJ
CHÉMIE A BIOCHÉMIE ZA SEMESTER NA LF**

Fakulta	Lekárska chémia a Biochémia	
	2003	2013
1. LF UK Praha	330	270
2. LF UK Praha	300	224
3. LF UK Praha	298	162
LF UK Hradec	270	270
LF UK Plzeň	288	300
LF UP Olomouc	270	285
LF MU Brno	225	240
LF OU Ostrava	–	270
LF UK Bratislava	204	238
JLF Martin	252	266
LF UPJŠ Košice	224	182
LF SZU Bratislava	–	220

Zatiaľ čo priemerný počet hodín chemických predmetov v roku 2003 na LF v ČR predstavoval 283 a na LF v SR 227 hodín, v roku 2013 poklesol priemerný počet hodín na LF ČR na 253 hodín a v SR sa prakticky nezmenil, najmä vďaka značnému poklesu hodín na LF UPJŠ. Kým v roku 2003 bola lekárska chémia povinná takmer na všetkých LF (okrem LF v Hradci Králové), v súčasnosti je povinná iba na šiestich z pôvodných 11 LF. Najnižší podiel výučby chemických vied je už dlhodobo na slovenských LF. Zatiaľ čo pred desiatimi rokmi viedla v najnižšom počte hodín LF UK v Bratislave, teraz získala prvenstvo LF UPJŠ v Košiciach.

Prudký rozvoj diagnostických metód v oblasti klinickej biochémie a poznanie biochemických zmien počas patologických stavov (aj na molekulej úrovni) sa odrazil koncom 80. rokov minulého storočia v zaradení klinickej biochémie a patobiochémie do výučbových programov takmer na všetkých lekárskech

TAB. 3. POČET HODÍN KLINICKEJ BIOCHÉMIE A PATOBIOCHÉMIE ZA SEMESTER NA JEDNOTLIVÝCH LF

Fakulta	Klinická biochémia		Patobiochémia	
	2003	2013	2003	2013
1. LF UK Praha	–	25	30	15
2. LF UK Praha	40	25	40	25
3. LF UK Praha	20	–	14	–
LF UK Hradec	30	15	30	30 V
LF UK Plzeň	30	30	30	30 V
LF UP Olomouc	18	25	14	14 V
LF MU Brno	30	30 V	30	–
LF OU Ostrava	–	42	–	–
LF UK Bratislava	24	28	–	–
JLF Martin	–	18	28	28
LF UPJŠ Košice	28	28	–	–
LF SZU Bratislava	–	–	–	–

V – voliteľný predmet

fakultách. Aktuálne je klinická biochémia vyučovaná ako povinný alebo povinne voliteľný predmet takmer na všetkých LF v SR a ČR (Tabuľka 3). Patobiochémia je vyučovaná ako predmet povinný na troch LF, ako voliteľný na ďalších troch LF a nevyučuje sa na 4 LF (vrátane UPJŠ LF).

Údaje v tabuľkách prezentovali zástupcovia jednotlivých fakúlt na pravidelnom stretnutí učiteľov v roku 2003 v Danišovciach a v roku 2013 v Plzni. Počítané hodiny sú za semester a ak sú predmety povinné alebo povinne voliteľné, nie je to uvádzané. Vzhľadom na odlišný spôsob výučby a tým aj iný spôsob počítania hodín na 3. LF UK v Prahe, niektoré údaje nie sú kompletne uvedené.

Štúdium medicíny je stále atraktívne aj napriek tomu, že patrí k tým najnáročnejším. Na túto skutočnosť poukazuje aj fakt, že

v poslednom období vznikli ďalšie dve LF: jedna v ČR a jedna na Slovensku (LF OU v Ostrave a LF SZU v Bratislave).

Lekárska chémia či biochémia na LF patrí stále skôr k nutnému zlu ako k favorizovanému predmetu, ktorý by oslovil väčšinu študentov. Napriek tejto skutočnosti je miesto chemických predmetov v zväzku teoretických – predklinických disciplín neodškriepiteľné a nezastupiteľné. Chemické vedy sú tradičnou súčasťou výučby budúcich lekárov už viac ako jedno storočie a je len na nás, ako sa nám podarí pretaviť do výučby zrýchľujúci sa inovačný proces, ktorý výrazne zvyšuje nároky na kvalitu prípravy absolventov univerzít. Trend je jasný od lekárskej chémie ku klinickej biochémií a patobiochémií. Nesmieme však zabudnúť, že práve poznanie mechanizmov je nevyhnutné na to, aby sme pochopili akúkoľvek poruchu, či zmenu.

ABSTRAKTY

VYUŽITÍ KLINICKÝCH
DETEKTIVNÍCH PŘÍBĚHŮ VE VÝUCE
BIOCHEMIE V 1. A 2. ROČNÍKU
NA 3. LF UK

BALÍNOVÁ, P., FONTANA, J.
KVASNICOVÁ, V., TRNKA, J.

Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie
3. LF UK, Praha

e-mail: pavla.balinova@lf3.cuni.cz

Klinické detektivní příběhy (kazuistiky) na různá biochemická témata byly zavedeny do výuky biochemie v akademickém roce 2011/2012. Cílem těchto příběhů je samostatné řešení klinicky orientovaného problému s důrazem na získání širšího pohledu na metabolismus buňky a na využití biochemických znalostí v klinické praxi.

V rámci modulu Buněčné základy medicíny (1. ročník) se studenti zabývají detektivními příběhy na téma Mitochondrie, Metabolismus buňky, Signalizace, Glykémie a Anémie. Modul Struktura a funkce těla (2. ročník) obsahuje kazuistiky Poruchy acidobazické rovnováhy a Biochemie srdce a cév.

Skupina studentů je při řešení zadaného tématu rozdělena do dvou pracovních podskupin, z nichž každá řeší jinou kazuistiku. V semináři studenti aktivně prezentují své výsledky formou diskuze s vyučujícím a spolužáky. Účast a aktivita studenta je monitorována učitelem a stala se jednou z podmínek pro udělení zápočtu.

Z výsledků evaluace vyplývá, že důležitým aspektem kazuistik je motivace studentů zabývat se detailně biochemickými vztahy v organizmu. Kazuistiky jsou náplní učebních osnov i dalších oborů – molekulární biologie, genetiky a histologie.

RETROGRÁDNE HODNOTENIE VÝUČBY
LEKÁRSKEJ BIOCHÉMIE OČAMI LEKÁROV

BIRKOVÁ A., HUBKOVÁ B.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie
UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta

e-mail: anna.birkova@upjs.sk

Lekár by za ideálnych okolností mal byť neomylný prírodovedno-technicky ladený polyhistor. S narastajúcim množstvom informácií v oblasti medicíny sa táto predstava čoraz viac vzdáľuje od reality, čo v praxi vedie k stále užšej špecializácii. Výučba študijných predmetov by na akejkoľvek škole mala zohľadňovať potreby v neskoršej praxi. Výučba na lekárske fakultách má niekoľko špecifík, napríklad empirický prístup a dogmatizmus. Niektoré informácie podávané študentom v reálnom čase sú neskôr inovované, zmenené, prípadne vyvrátené, čo spolu s nepísaným zákonom, že v medicíne neplatí nič na 100 percent, vedie u absolventov lekárske fakulty k pocitu nepripravenosti na svoje ďalšie povolanie. Teoretický predmet lekárska biochémia by mal byť pre absolventov jedným z dielikov skladačky nazwanej všeobecná medicína. Cieľom štúdie je predovšetkým retrográdne hodnotenie výučby predmetu lekárska biochémia lekármi a posúdenie využitia získaných vedomostí v ich aktuálnej praxi.

Výskum prebiehal dotazníkovou metódou. Dotazník tvorilo 20 otázok a distribuovaný bol formou elektronickej komunikácie a sociálnych sietí. Cieľovou skupinou sú absolventi Lekárskej fakulty UPJŠ v Košiciach, ktorí promovali v rokoch 2001–2007. Prevažnú časť respondentov tvorili už atestovaní lekári.

Za najvýznamnejšie zistenie možno považovať to, že väčšina respondentov si z lekárskej biochémie pamätá málo, v práci vedomosti z biochémie využíva málo a to čo využíva, nevie dostatočne. Predmet lekárska biochémia si vyslúžil celkové hodnotenie „potrebný pre lekára“. Vzhľadom na malý súbor respondentov nie je možné vyvodzovať ďalekosiahle závery, ale je potrebné zamyslieť sa nad obsahom a formou výučby.

Predmet lekárska biochémia má svoje stále a nezastupiteľné miesto v príprave medikov na ich budúce povolanie a je len na nás, ako sa bude vyvíjať obsah i forma predovšetkým po vzájomnej diskusii učiteľov a samotných lekárov.

ASOCIÁCIA SRAGE S RIZIKOM VZNIKU A RÝCHLOSŤOU PROGRESIE SCLEROSIS MULTIPLEX

ČIERNY, D.¹, HÁNYŠOVÁ, S.¹, MICHALIK, J.²
KURČA, E.², ŠKEREŇOVÁ, M.³, DOBROTA, D.¹
LEHOTSKÝ, J.¹

¹Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta
v Martine, UK v Bratislave

²Neurologická klinika, Univerzitná nemocnica
Martin, JLF v Martine, UK v Bratislave

³Ústav klinickej biochémie, Univerzitná nemocnica
Martin, JLF v Martine, UK v Bratislave

dacierny@gmail.com

Úvod

Receptor RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) je transmembránový receptor zohrávajúci úlohu v signálnych dráhach zápalu. Solubilná forma RAGE (sRAGE) je schopná vychytávať cirkulujúce ligandy RAGE, čím môže blokovat ich funkciu. Niektoré štúdie potvrdzujú úlohu sRAGE v patogenéze sclerosis multiplex (SM), ale aj iných zápalových, autoimunitných a neurodegeneratívnych ochorení. Cieľom našej práce bolo analyzovať sérovú hladinu sRAGE vo vzťahu k vzniku a priebehu SM.

Materiál a metódy

V našej práci sme sérovú hladinu sRAGE vyšetřili pomocou ELISA analýzy u 44 pacientov so sclerosis multiplex (16 žien, 28 mužov, priemerný vek : 44,6 ± 8,9 rokov) a u 32 kontrolných jedincov (12 mužov, 20 žien, priemerný vek : 43,9 ± 7,9 rokov). Rýchlosť progresie ochorenia bola hodnotená pomocou skóre závažnosti sclerosis multiplex (MSSS). Súbor pacientov pozostával z 22 jedincov s rýchlou progresiou SM (MSSS = 7,30 ± 1,00) a u 22 jedincov s pomalou progresiou SM (MSSS = 1,92 ± 0,74).

Výsledky

Sérová hladina sRAGE v celej skupine pacientov so SM bola signifikantne vyššia v porovnaní so skupinou kontrolných jedincov (1071,2 ± 519 pg/ml vs. 797,4 ± 460,3 pg/ml; p = 0,003), no neodlišovala sa medzi skupinou pacientov s pomalou a rýchlou progresiou ochorenia.

Záver

Výsledky našej práce svedčia pre úlohu sRAGE v etiopatogenéze SM a jeho možné využitie v klinickej praxi. Vzťah sRAGE k rýchlosti progresie ochorenia sme nepotvrdili. Predpokladáme, že zvýšená sérová hladina sRAGE môže byť markerom dobrej odpovede pacientov so SM na imunomodulačnú liečbu.

Práca bola podporená grantmi: VEGA 1/0213/12, 2012/30-UKMA-7.

MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY IN PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

DOBROTA D.¹, BITTŠANSKÝ M.¹,
SIVÁK, Š.², KURČA E.²

¹Department of Medical Biochemistry

²Clinic of Neurology, Jessenius Faculty of Medicine,
Comenius University, Martin, Slovakia

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease caused by degeneration of motor neurons in motor cortex, brainstem and spinal cord. Proton magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS) allows the quantitative assessment of neuronal integrity in chosen CNS regions. Eleven patients with clinical diagnosis of ALS underwent a single-voxel ¹H-MRS of both precentral gyri, pons, medulla oblongata, and occipital lobe. The amplitudes of N-acetylaspartate (NAA), choline (Cho), creatine (Cr), and their ratios were compared between the patient and the control group. Patient clinical state was measured using the Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS) and correlated with ¹H-MRS values. Significant differences in the metabolite amplitudes between the patient and the control groups were found in both motor cortices, pons and medulla oblongata (p < 0,05). No differences in occipital lobe were present (p > 0,05). ¹H-MRS is sensitive to detect CNS metabolite changes in ALS patients. There is some evidence of a significant correlation between ¹H-MRS and clinical findings. However, more patients must be studied for more precise correlation between MRS and clinical state.

VÝUČBA BIOCHÉMIE, PATOBIOCHÉMIE, KLINICKEJ BIOCHÉMIE A LABORATÓRNEJ MEDICÍNY NA JESSENIOVEJ LEKÁRSKEJ FAKULTE UNIVERZITY KOMENSKÉHO V MARTINE

DOBROTA, D.

Ústav lekárskej biochémie JLF UK
Ústav klinickej biochémie UNM, Martin

Výučba biochémie, patobiochémie a klinickej biochémie predstavuje integrálnu a veľmi dôležitú súčasť študijných programov všeobecného lekárstva v jazyku slovenskom, v jazyku anglickom, ako aj študijného programu zubné lekárstvo. Predmet biochémia sa tiež vyučuje v rámci nelekárskych študijných programov, a to v ošetrovatelstve, pôrodnej asistencii a verejnom zdravotníctve. Výučba biochémie v programe všeobecné lekárstvo začína v prvom ročníku predmetom lekárska chémia v rozsahu 1,5 hodiny prednášok a 1 hodina cvičení týždenne v zimnom, ako aj letnom semestri. Obsahom výučby v zimnom semestri je nadstavba anorganickej a organickej chémie na vedomosti zo strednej školy a obsahom výučby v letnom semestri je statická biochémia a molekulárna biológia. Predmet je ukončený skúškou po letnom semestri. V druhom ročníku prebieha výučba lekárskej biochémie v zimnom semestri v rozsahu 2 hodiny prednášok a 3 hodiny cvičení týždenne. V letnom semestri je rozsah výučby 4 hodiny prednášok a 4 hodiny cvičení týždenne. Obsahom výučby v zimnom semestri sú jednotlivé metabolické dráhy a obsahom výučby v letnom semestri je funkčná biochémia. Výučba patobiochémie a klinickej biochémie a laboratórnej je realizovaná v štvrtom ročníku štúdia formou povinne voliteľných predmetov. Rozsah výučby je jedna hodina prednášky a jedna hodina cvičenia týždenne. Spôsob ukončenia je udelenie príslušného počtu kreditov s klasifikáciou podľa priebežného hodnotenia. V nelekárskych študijných odboroch sa základy biochémie vyučujú v rámci združeného predmetu spoločne s biofyzikou a rádiológiou. Výučba je realizovaná v prvom ročníku štúdia v rozsahu 2 hodiny prednášok a 1 hodina cvičenia v zimnom semestri a 1 hodina prednášok a 1 hodina cvičenia v letnom semestri. Výučba je ukončená skúškou. Na Jesseniovej lekárskej fakulte UK v roku 2012

bol otvorený študijný program zubné lekárstvo. Výučba sa uskutočňuje v prvom ročníku pod názvom predmetu Lekárska chémia pre zubné lekárstvo v zimnom semestri v rozsahu 2 hodiny prednášok a 3 hodiny cvičení. Predmet je ukončený skúškou. Výučba pokračuje v druhom ročníku štúdia pod názvom predmetu Lekárska biochémia pre zubné lekárstvo v zimnom aj v letnom semestri v rovnakom rozsahu 2 hodiny prednášok a 3 hodiny cvičení. Predmet je ukončený skúškou. Pre posúdenie celkového rozsahu a počtu hodín výučby biochémie, patobiochémie a klinickej biochémie je potrebné uviesť, že dĺžka zimného aj letného semestra je 15 týždňov. Z toho 14 týždňov je priama kontaktná výučba (prednášky, cvičenia a semináre) a jeden týždeň je venovaný náhradným cvičeniam. V rámci 3. stupňa vysokoškolského vzdelávania naša fakulta má akreditovaný študijný odbor 7.1.28. lekárska, klinická a farmaceutická biochémia. Štúdiu tohto odboru v dennej forme trvá 4 roky a externej forme 5 rokov. V júli 2013 bol na Jesseniovej lekárskej fakulte UK tiež akreditovaný špecializačný študijný program v zdravotníckom povolání lekár v špecializačnom odbore klinická biochémia.

PARAMETRE OXIDAČNÉHO STRESU A NEURONÁLNEHO POŠKODENIA V LIKVORE PACIENTOV SO SKLERÓZOU MULTIPLEX

ĎURFINOVÁ M.¹, OREŠANSKÁ K.¹
PROCHÁZKOVÁ E.², BARTOVÁ R.¹, LÍŠKA B.¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, LF UK, Bratislava

²II. Neurologická klinika LF UK a UNB, Bratislava

e-mail: monika.durfinova@fmed.uniba.sk

Úvod

Skleróza multiplex (SM) je chronické zápalové ochorenie CNS charakterizované demyelinizáciou a poškodením neurónov. V patogenéze ochorenia hrá významnú úlohu oxidačný stres aktivovaný voľnými kyslíkovými a dusíkovými radikálmi (ROS/RNS), ktoré zapríčínajú zmeny v priepustnosti hematoencefalickej bariéry, nástup prozápalo-

vých procesov a poškodenie lipidov, proteínov a nukleových kyselín v nervovom tkanive⁽¹⁾. Práca bola zameraná na posúdenie hladín 8-izoprostánov (IsoF₂) v CSL pacientov so SM vo vzťahu k hladine malondialdehydu (MDA) a antioxidačnej kapacity likvora. Posúdené boli aj vybrané parametre neurálneho poškodenia – 3',5'-cAMP-fosfodiesteráza (PDE) – nešpecifický marker, neurón-špecifická enoláza (NSE) – špecifický parameter poškodenia neurónov.

Materiál a metódy

Vybrané parametre oxidačného stresu boli stanovené v CSL pacientov s diagnostikovanou SM podľa McDonalových kritérií a kontrolnej skupine neurologických pacientov s nezápalovými ochoreniami. Koncentrácia antioxidantov bola stanovená spektrofotometricky metódou podľa Re a kol.⁽²⁾ Na stanovenie IsoF₂ a koncentrácie NSE boli použité špecifické EIA kity od Cayman Chemical. Aktivita PDE bola stanovená spektrofotometricky podľa Cheung⁽³⁾. Koncentrácia MDA bola stanovená po reakcii s kyselinou tiobarbiturovou podľa Ohkawa⁽⁴⁾ metódou HPLC.

Výsledky

Koncentrácia MDA v likvore pacientov so SM bola signifikantne zvýšená v porovnaní s kontrolnými vzorkami (1,23 nmol/ml vs. 0,6 nmol/ml). Hladina MDA sa štatisticky významne líšila aj medzi formami ochorenia SP-SM (3,27 nmol/ml) a RR-SM (1,13 nmol/ml). Po 30 minútovej inkubácii pri zvýšenej teplote v *in vitro* podmienkach nedošlo k ďalšej tvorbe MDA v likvore pacientov so SM. Tento nález však nekorešpondoval s hladinou IsoF₂ ktorých hladina v CSL sa signifikantne nelíšila medzi kontrolami a pacientami so SM, ani medzi jednotlivými formami ochorenia.

Aktivita PDE – cytosolového enzýmu metabolizmu cAMP u pacientov so SM bola zvýšená v porovnaní s kontrolnou skupinou (38,8 µcat/ml vs. 13,5 µcat/ml). Nezaznamenali sa žiadne výrazné rozdiely koncentrácie NSE medzi experimentálnymi skupinami.

Záver

Dva rôzne parametre oxidačného poškodenia lipidov stanovené v CSL neurologických pacientov poukazujú na ich rôzne využitie ako prognostického markera. Zdá sa, že IsoF₂ môžu slúžiť ako špecifické indikátory nástupu SM, zatiaľ čo MDA je skôr markerom priebehu ochorenia. Úlohu môže zohrávať aj rôzna biosyntéza týchto parametrov; izoprostány môžu byť produkované taktiež indukovateľnou formou cyklooxygenázy (COX2) z kyseliny arachidónovej počas zápalovej reakcie⁽⁵⁾. V patogenéze SM dochádza viac, alebo menej aj k deštrukcii iných buniek, a nie len neurónov, na čo poukazuje signifikantný rozdiel v aktivite PDE u pacientov so SM oproti pacientom bez zápalového demyelinizačného procesu, zatiaľ čo neboli zaznamenané zmeny v aktivite špecifického markera pre poškodenie neurónov.

Podakovanie

Projekt bol finančne podporený grantom MZ SR 2012/2-UKBA-2.

Literatúra

1. Haider, L., Fischer, M. T., Fischer, J. M. et al.: Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 2011; 134: 1914–1924.
2. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.: Antioxidant activity applying an improved ABRS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 26: 1231–1237.
3. Cheung, W. Y.: Properties of cyclic 3'5'-nucleotide phosphodiesterase from rat brain. *Biochemistry* 1967; 6: 1079–1087.
4. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yogi, K.: Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–358.
5. Mignetti, L.: Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory and Degenerative Brain Diseases. *Journal of Neuro-pathology and Experimental Neurology* 2004; 63(9): 901–910.

JE MOŽNÁ SPOLUPRÁCA KLINICKÉHO LABORATÓRIA PRI VÝUČBE ŠTUDENTOV MEDICÍNY?

ĎUROVCOVÁ E.^{1,2}, MOLČÁNYIOVÁ A.^{1,2}

¹MEDIREX, a.s., Magnezitárska 2/C, Košice

²Ústav lekárskej a klinickej biochémie
UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta,
Tr. SNP 1, Košice

e-mail: eva.durovcova@medirex.sk

Laboratórna diagnostika je na UPJŠ LF súčasťou iných predmetov, najmä vnútorného lekárstva a pediatrie, nízka úroveň znalostí o správnom výbere laboratórných testov a najmä o ich interpretácii viedla pred deviatimi rokmi k zavedeniu klinickej biochémie ako samostatného predmetu. Klinická biochémia sa na UPJŠ LF vyučuje ako povinne voliteľný predmet formou blokového vyučovania v 5. ročníku. Vyučovanie zabezpečujú v rámci spoločnej výučbovej základne lekári s dlhoročnou klinickou aj laboratórnou praxou. Blok pozostáva zo 14-tich hodín prednášok a 14-tich hodín seminárov orientovaných na praktickú demonštráciu laboratórných nálezov a ich interpretácie formou klinických kazuistík, ako aj samostatných alebo skupinových rozborov problémových nálezov. Vzhľadom na limitovaný rozsah hodín sa výučba zameriava na vybrané témy prevažne z oblasti vnútorného lekárstva a intenzívnej medicíny (voda a elektrolyty, acidobázické poruchy, ochorenia obličiek, pečene, diabetes mellitus, srdcové a zápalové markery a pod.). Ročne tento predmet absolvuje priemerne 200 slovenských a 90 zahraničných študentov. Je potrebné konštatovať, že názory študentov, ktorí predmet absolvovali, sú viac ako pozitívne. Na základe našich niekoľkoročných skúseností a požiadaviek študentov o ďalšie témy by bolo vhodné uvažovať o zvýšení počtu hodín a v súvislosti s tým aj o zvýšení počtu kreditov.

FUNKCE BUNĚK A LIDSKÉHO TĚLA – MULTIMEDIÁLNÍ SKRIPTA PRO VÝUKU LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE, FYZIOLOGIE A HISTOLOGIE ČLOVĚKA

FONTANA, J., LAVRÍKOVÁ, P.
BALÍNOVÁ, P., KVASNICOVÁ, V., PAVLÍČEK, V.,
TRNKA, J., SAMCOVÁ, E.

Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie
3. LF UK, Praha

Kontaktní e-mail: josef.fontana@lf3.cuni.cz

V roce 2013 vznikla na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze spoluprací pedagogů a studentů multimediální skripta Funkce buněk a lidského těla (FBLT), jež si kladla za cíl pokrýt vybrané kapitoly z lékařské biochemie, fyziologie a histologie člověka. Naším záměrem bylo, aby se stala účelným spojením výukového textu, názorných schémat, obrázků, animací a doprovodných výukových videonahrávek. Na závěr kapitol jsme umístili úlohy na procvičování a hlubší pochopení dané problematiky.

Cílovou skupinou našich skript jsou studenti magisterských a bakalářských oborů, jež studují lékařskou biochemii, fyziologii či histologii člověka. A to i v integrované formě, jak jsou tyto předměty vyučovány na některých lékařských fakultách. Skripta jsou volně přístupná na webových stránkách www.fblt.cz a uzpůsobená i pro prohlížení na mobilních zařízeních. Díky jejich souběžnému převezení do anglického jazyka je mohou ke své přípravě využívat i zahraniční studenti, jež v hojném počtu studují na lékařských fakultách v ČR a SR.

Dle ohlasů studentů z naší i z některých dalších lékařských fakult se prezentovaná skripta stala oblíbeným výukovým materiálem studentů magisterského i bakalářského studia. Tito oceňují zejména ucelený pohled jednotlivých kapitol na probíranou oblast, což usnadňuje její pochopení. Skripta jsou využívána nejen studenty prvních dvou ročníků (kdy se zmíněné předměty primárně probírají), ale i studenty vyšších ročníků jako volně dostupný souhrnný materiál sloužící ke zopakování základních poznatků z teoretických oborů. V letošním roce jsme proto přistoupili k rozšíření skript o deset nových podkapitol, jež nebyly v první verzi skript dostatečně pokryty.

PodĎkování

Kolektív autorů skript děkuje za podporu grantových projektů FRVŠ 637/2013 a 236078/IPUK/2015, jež umožnily jejich vznik.

STIMULÁCIA ŠTUDENTOV NA PRAKTICKOM CVIČENÍ LEKÁRSKEJ BIOCHÉMIE PROSTREDNÍCTVOM E-LEARNINGU

HATOK, J., BABUŠÍKOVÁ E.
TATARKOVÁ Z., KAPLÁN P.

Ústav lekárskej biochémie
JLF v Martine, UK v Bratislave

Moderné počítačové technológie umožňujú interaktívne učenie a aktívnu účasť študentov vo výučbe. Jednou z možností je využitie e-learningu, ktorý motivuje študenta k priebežnému štúdiu počas semestra a ďalšou je vytváranie virtuálnych experimentov, ktoré uľahčujú študentom pochopenie zdĺhavých biochemických metód. V súčasnosti používame vo výučbovom procese tieto aplikácie:

- prezentácia a tvorba vybraných biochemických dráh;
- demonštrácia laboratórnych postupov a techník virtuálny spôsobom;
- tvorba tematických otázok pomocou interaktívnej tabule;
- tvorba otázok pre kreditné testy v systéme moodle.

Počas výučbovej hodiny je študent vystavený on line kurzu, pričom hneď získava spätnú odpoveď, či zvládol požadované učivo a je schopný pokračovať v praktickom cvičení. Tento výsledok sa samozrejme nezarátava do jeho celkového hodnotenia. Počas cvičenia ďalej využívame aj schematické on line biochemické procesy s pod otázkami orientovanými na ich reguláciu. Pri vysvetľovaní niektorých molekulárno-biochemických metodík, ktoré sú časovo náročnejšie sme používali aj „interaktívne laboratórium“, čím si študent mohol danú metodiku študovať virtuálne a komplexnejšie. Novinkou v klasifikácii študentov je zavedenie elektronického systému výberu otázok počas kreditných testov. Z databázy veľkého počtu otázok má tak každý študent individuálny test a svoj výsledok sa dozvie priamo po odoslaní odpovedí do systému. Použitím moderných didaktických prostriedkov tak prispievame ku

kvalite výučby, čím sa môže rozvíjať kritické myslenie študentov, ktoré je zásadné pre efektívne učenie.

PodĎkovanie

Táto práca bola podporená projektom „Virtuálna a simulačná výučba ako nová forma vzdelávania na JLF UK v Martine“, ITMS kód projektu: 26110230071 spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho sociálneho fondu.

STANOVENIE KYSELINY α -HYDROXYHIPUROVEJ V SKUPINE S VYSOKOU PREVALENCIOU INFEKČIE HEPATITÍDY B

HUBKOVÁ, B., MAŠLANKOVÁ, J., BIRKOVÁ, A,
BÓDY, G., BOLERÁZSKA, B., GUZY, J.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie
UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta

e-mail: beata.hubkova@upjs.sk

Úvod

Cirhóza pečene je nezvratným konečným štádiom neliečeného akútneho alebo chronického ochorenia pečene. Výskyt cirhózy pečene má celosvetovo stúpajúci trend, častejšie postihuje osoby zo sociálne slabších vrstiev spoločnosti, akými sú imunokompromitované a marginalizované rómske skupiny. Najnovšie vedecké štúdie vyzdvihujú význam stanovenia kyseliny α -hydroxyhipurovej v moči ako vhodného markera cirhózy pečene po prekonaní hepatitídy typu B (Wang, et al., 2012). Cieľom našej štúdie bolo zistiť vhodnosť detekcie kyseliny α -hydroxyhipurovej v moči probandov s potvrdenou hepatitídou typu B.

Materiál a metódy

Experimentálna časť práce vychádza z výsledkov priezbovej štúdie realizovanej HEPA-META tímom v roku 2011, ktorej hlavným cieľom bolo zmapovanie výskytu vírusovej hepatitídy B/C a metabolického syndrómu v populácii Rómov žijúcich v segregovaných rómskych osadách v porovnaní s výskytom týchto zdravotných ukazovateľov u majoritnej populácie. Z pôvodného počtu 843 uchádzačov poskytlo kompletný potrebný biologický materiál

770 probandov. Vyšetrenie markerov vírusov hepatítid bolo vykonané v akreditovanom a certifikovanom laboratóriu Medirex a.s. Hladiny kyseliny α -hydroxyhippurovej v moči sme stanovili vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou na reverznej fáze (RP-HPLC, Shimadzu, Japan) s UV/Vis a fluorescenčnou detekciou.

Výsledky

V našej štúdii sme pre vysoký počet Rómov s prekonanou infekciou hepatítidy typu B (viššie 40%; Veselíny et al., 2014) predpokladali zmenenú koncentráciu kyseliny α -hydroxyhippurovej v porovnaní s majoritnou populáciou. Vyššie hladiny kyseliny α -hydroxyhippurovej u Rómov oproti majoritnej populácii sme síce zaznamenali, neboli však štatisticky signifikantné.

Záver

Z výsledkov vyplýva, že kyselina α -hydroxyhippurová nie je vhodným markerom prekonania hepatítidy typu B. V štúdii nám chýbali údaje o tom, u akého podielu osôb s prekonanou hepatítidou sa vyvinula cirhóza. Vzhľadom na rozdiely v hladinách kyseliny α -hydroxyhippurovej u ľudí s vysokou prevalenciou hepatítidy B v porovnaní s majoritou by bolo vhodné hlbšie štúdium metabolizácie kyseliny hippurovej v spojení s patologickými procesmi prebiehajúcimi v pečeni.

Podakovanie

Práca vznikla pri riešení projektov CEMIO-ITMS: 26220120058/1.4 (50 %) a VEGA 1/0115/14 (50 %).

Literatúra

1. VESELÍNY, E. et al.: High hepatitis B and low hepatitis C Prevalence in Roma Population in Eastern Slovakia. In *Central European Journal of Public Health*. ISSN 1210-7778. 2014, Vol. 22, Supplement 2014, p. S51–S56.

2. WANG X. et al.: Urinary metabolite variation is associated with pathological progression of the post-hepatitis B cirrhosis patients. In *Journal of Proteome Research*. 2012, vol. 11(7), pp. 3838–47, doi: 10.1021/pr300337s.

PRODUKTY LIPOPEROXIDACE JAKO POTENCIÁLNÍ BIOMARKERY ALZHEIMEROVY CHOROBY

CHMÁTALOVÁ, Z.¹, SKOUMALOVÁ, A.¹
VYHNÁLEK, M.², LACZÓ, J.², HORT, J.²

¹ÚLCHKB 2. LF UK, Praha

²Neurologická klinika FN Motol, Praha

e-mail: zuzana.chmatalova@seznam.cz

Úvod

Alzheimerova choroba (ACH) je neurodegeneratívny onemocnění charakterizované postupným zhoršovaním kognitívnych funkcií v dôsledku odumírání neuronů. Stádium nesoběstačnosti zvané demence je předcházeno stádiem mírné kognitivní poruchy (mild cognitive impairment, MCI), kdy má pacient objektivní narušení kognitivních funkcií, ale je ještě soběstačný. Dle postižení paměti na neuropsychologickém vyšetření dělíme MCI na 2 podskupiny: amnestickou (aMCI) a neamnestickou (NaMCI). Vznik i rozvoj ACH je doprovázen zvýšeným oxidačním stresem v mozkové tkáni, jehož důsledkem je rozvoj oxidačního poškození biomolekul a kumulace koncových produktů. Tyto koncové produkty oxidačního poškození jsou označovány jako lipofuscinoidní pigmenty (LFP) a je možné je detekovat i v krvi. Cílem naší práce bylo analyzovat LFP z erytrocytů a plazmy u pacientů s MCI a demencí při ACH a zjistit, zda se množství LFP u jednotlivých skupin pacientů a kontrolních dobrovolníků liší a bylo by tedy možné využít měření LFP jako pomocný biochemický diagnostický nástroj.

Materiál a metody

Celkem bylo analyzováno 82 vzorků erytrocytů (ACH 19, aMCI 27, NaMCI 20, kontrolní 16) a 58 vzorků plazmy (ACH 11, aMCI 17, NaMCI 14, kontrolní 16). LFP v erytrocytech i v plazmě byly extrahovány do směsi chloroformu a 2propanolu. Extrakty LFP byly analyzovány pomocí spektrofotometru AMINCO-Bowman Series 2. Po podrobné kvantitativní analýze obsahu LFP v extraktech byla významnost rozdílů ve sledovaných parametrech vyhodnocena statistickým programem StatView, ANOVA metodou s post hoc testem a Bonferroni/Dunn kritériem.

Výsledky

Vyšetrené skupiny se významně statisticky lišily v množství LFP v erythrocytech i v plazmě. Nejpatrnější rozdíly byly u synchronních spekter. Statisticky významné rozdíly v množství LFP v membránách erythrocytů byly nalezeny ve fluorescenčních maximech 285/335 nm (excitace/emise) (ACH: 122 % kontrol, $P=0,0002$; aMCI: 126 % kontrol, $P<0,0001$; NaMCI: 120 % kontrol, $P=0,0007$) a 350/400 nm (aMCI: 114 % kontrol, $P=0,0016$; NaMCI: 113 % kontrol, $P=0,0036$). U LFP v plazmě bylo nalezeno statisticky významné maximum pro 330/380 nm (excitace/emise) (NaMCI: 127 % kontrol, $P=0,0025$) a 350/400 nm (aMCI: 127 % kontrol, $P<0,0001$).

Závěr

Z našich výsledků vyplývá, že množství LFP se v průběhu onemocnění mění a že je u pacientů s MCI i ACH významně zvýšené v porovnání se zdravými kontrolami jak v erythrocytech, tak i v plazmě. Lze shrnout, že ačkoliv zatím neznáme přesné kvalitativní složení LFP, mohlo by být v budoucnu možné využít stanovení LFP v erythrocytech nebo plazmě jako pomocný biochemický marker při určování diagnózy ACH a to především v jejích počátečních stádiích.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (grant č.236213) a 2. Lékařskou fakultou Univerzity Karlovy.

BORTEZOMIB NEPRIATEĽ BIELKOVINY HSP90B

KLIKOVÁ, K.¹, ŠTEFANIKOVÁ, A.¹
PILCHOVÁ I.¹, HATOK, J.¹, CHUDÝ, P.²
CHUDEJ, J.², DOBROTA, D.¹, RAČAY, P.¹

¹Ústav lekárskej biochémie
Jesseniova lekárska fakulta v Martine, UKv Bratislave

²Klinika hematológie a transfuziológie
Univerzitná nemocnica Martin

e-mail: klikova@jfmed.uniba.sk

Úvod

Pochopenie biológie nádorovej bunky je kľúčovým bodom pre vývoj nových liečiv s protinádorovým mechanizmom účinku. Jedným z cieľov je zameranie sa na proteazomálny systém nádorovej bunky. Prvým proteazomálnym inhibítorom schváleným v roku 2003, ktorý sa využíva v klinickej praxi je Bortezomib (Velcade®, PS-341). Rezistencia nádorových buniek voči PS-341 ako inhibítora s chymotrypín podobnou aktivitou, ktorý inhibuje 20S podjednotku proteazómu, je ovplyvňovaná aj zvýšenou expresiou bielkovín tepelného šoku (HSPs). Indukcia HSPs je jednou z bunkových odpovedí na proteazomálny stres alebo inhibíciu proteazomálneho systému indukovaného bortezomibom. PS-341 sa ukázal vhodným liečivom aj v liečbe relapsovanej a refraktórnej akútnej leukémie. Jedným z našich cieľov bolo sledovať vplyv bortezomibu na citlivosť, prežívanie a na zmeny hladín vybraných bielkovín u dvoch leukemických línii HL-60 a K-562.

Materiál a metódy

Leukemické bunky HL-60 s koncentráciou $0,5 \cdot 10^6$ b/ml a K-562 s koncentráciou $0,2 \cdot 10^6$ b/ml sme kultivovali v kultivačnom médiu IMDM s 10 % príp. 20 % FBS, 1 % PNC/STR pri štandardných kultivačných podmienkach 37°C a 5 % CO₂ atmosfére. Výmenu média sme robili každé 3 dni. Na sledovanie citlivosti a prežívania buniek sme využili MTT test, zmenu hladín vybraných bielkovín sme sledovali western blotovou analýzou a získané výsledky sme vyhodnotili prostredníctvom štandardných štatistických metód (ANOVA, Studentov t-test).

Výsledky

Kým bunky HL-60 reagovali na bortezomib pomerne rýchlo a citlivo, bunky K-562 boli voči bortezomibu rezistentnejšie. Účinok bortezomibu na indukciu bunkovej smrti u oboch typov leukemických buniek sa spájal s proteolytickým štiepením bielkovín HSP90 β na 50 kDa veľký fragment, proteolytickou aktiváciou prokaspázy 3 u HL-60 a proteolytickou degradáciou prokaspázy 3 u K-562 bez tvorby p17 fragmentu aktívnej kaspázy 3. Z našich výsledkov vyplýva, že inkubácia bunkovej línie HL-60 s bortezomibom sa spája s aktiváciou kaspázy 3 sprostredkovanou nielen kaspázou 9, nakoľko inhibícia kaspázy 9 zabránila aktivácii kaspázy 3, ale aj s kaspázou 8, čo je v súlade s názorom, že iniciácia a následná exekúcia mitochondriálnej apoptózy predstavuje hlavný mechanizmus bortezomibom indukovanej smrti buniek.

Záver

Rozdielna kinetika indukcie a exekúcie bunkovej smrti u leukemických línii je pravdepodobne podmienená vysokými hladinami bielkovín HSP90, HSP70 a HSP27 v bunkách K-562. Naša štúdia odhalila esenciálnu úlohu kaspázy 8 v štiepení HSP90 β indukovanom bortezomibom ako u HL-60 tak aj u K-562.

Podakovanie

Táto práca bola podporená projektom: „Zvýšenie možnosti kariérneho rastu vo výskume a vývoji v oblasti lekárskeho vied“ ITMS kód 26110230067.

VLIV TERT-BUTYLHYDROPEROXIDU A PEROXYNITRITU NA OXIDAČNÍ POŠKOZENÍ MITOCHONDRÍÍ

KOHUTIAR, M.^{1,2}, WILHELM, J.²

¹Ústav lekárskej chemie a klinickej biochemie

2. LF UK a FN Motol

²Fyziologický ústav AV ČR

e-mail: matej.kohutiar@lfmotol.cuni.cz

Úvod

Mitochondrie patrí medzi hlavné zdroje voľných radikálov v bunke. Produkovaný superoxidový radikál reaguje s oxidom dusnatým za vzniku peroxynitritu (PeN). Rozklad peroxynitritu na hydroxylový a NO₂ radikál hraje rolu v indukci membránovej lipoperoxidácie. Medzi sekundárnymi produktmi peroxidácie patrí reaktívne aldehydy malondialdehyd a 4-hydroxynonenal. Membránové proteíny jsou oxidovány za vzniku karbonylovaných derivátů.

3-Nitrotyrozin (3-NT) je používaný jako marker oxidačného poškodení vyvolaného reaktívnymi molekulami dusíku. Tert-butylhydroperoxid (tBHP) je zdrojem vol-

ných radikálov v *in vitro* štúdiách a vykazuje efekty srovnateľné s peroxidem vodíku.

Materiál a metódy

Suspenze izolovaných mitochondrií byla rozdělěna na dvě části a inkubována s oxidačním činidlem v řadě 0,05 mM; 0,2 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM a 3 mM. Reaktivní aldehydy byly stanoveny spektrofotometricky reakcí s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) a karbonyly po derivatizaci 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Množství 3-NT bylo stanoveno metodou ELISA. Po hydrolyze proteinů byl stanoven podíl 3-NT v rozpustné i nerozpustné frakci. Elektroforetická separace byla provedena metodou SDS-PAGE. Nitrované a oxidované proteiny byly detekovány metodou western blot. Statistické vyhodnocení bylo provedeno metodou ANOVA.

Výsledky

Oxidace tBHP i PeN vedla k významnému zvýšení TBA reaktivních molekul při koncentraci oxidačního činidla 1, 2, 3 mM a v případě tBHP i 0,05 mM. K maximálnímu nárůstu dochází při koncentraci PeN 1 mM. Se zvyšující se koncentrací PeN (2 a 3 mM) je množství produktů po 24 h srovnatelné s autooxidací. 1 mM PeN zvyšuje produkci karbonylů okamžitě, po 1 h více než čtyřnásobně ve srovnání s tBHP. V nerozpustné frakci pouze 3 mM PeN indukoval signifikantní zvýšení koncentrace 3-NT okamžitě po přidání oxidačního činidla. Množství 3-NT v rozpustné frakci bylo 10krát vyšší než v nerozpustné. 2 mM tBHP i PeN vedl k oxidaci a nitraci proteinů s vyšší molekulovou hmotností. Po 24 h inkubace tyto proteiny vymizeli a změny byly pozorovány u proteinů s nižší molekulovou hmotností.

Záver

Rozdíly v naměřených parametrech naznačujú variabilitu mechanizmů oxidačného poškodení mitochondrií vyvolaného tBHP a PeN.

Podakovanie

Tato práce je podporována grantem GAČR P303/11/0298.

VÝUČBA PATOBIOCHEMICKÝCH A KLINICKO-BIOCHEMICKÝCH PREDMETOV NA UVLF V KOŠICIACH

KOSTECKÁ, Z., HEINOVÁ, D.

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
zuzana.kostecka@uvlf.sk

Výučba patobiochemických a klinicko-biochemických predmetov (Tab. 1) na Ústave biochémie Katedry chémie, biochémie a biofyziky UVLF v Košiciach má svoje špecifiká z hľadiska ročníka, študijného programu, typu študijného predmetu, rozsahu a typu výučby. Najviac skúseností (od akademického roku 2005/2006) máme so zabezpečením povinne voliteľného predmetu Patologická biochémia (pre 3.VVL a 3.HP), ktorý bol pôvodne nazvaný Molekulové mechanizmy metabolických a vrodených chorôb. Rok na to sme zavádzali povinne voliteľný predmet Klinická biochémia (pre 4. VVL a 4. HP) a od roku 2009/2010 anglické verzie uvedených predmetov.

Od budúceho akademického roku bude výučba povinného predmetu Klinická a patologická biochémia pre 2. F už v réžii pedagógov nášho ústavu. Od zavedenia študijného programu farmácia (2007/2008) rozbíhali výučbu tohto predmetu externí pedagógovia - naši kolegovia z Lekárskej fakulty UPJŠ v Košiciach. Tento akademický rok predstavuje pomyselné odovzdávanie štafetového kolíka - na zabezpečovaní prednášok participovali externí učitelia a seminárne cvičenia už vyučovali interní učitelia.

Jednotlivé prezentácie všetkých kapitol sú k dispozícii na intranetovej stránke univerzity <http://intranet.uvlf.sk/personal-pages/biochemistry/share.php>. Študenti majú možnosť sa oboznámiť s prezentáciou každej kapitoly vopred, prípadne si ju vytlačiť a výklad na prednáške počúvať aktívne, dopĺňať si poznámky, komentáre a súvislosti, na ktoré upozorňuje prednášajúci. Naším cieľom je notebooky v seminárnej miestnosti využiť na uloženie schém, výučbových filmov a animácií na popis patogenézy vrodených a metabolických porúch na molekulovej úrovni, čo umožní študentom pochopiť súvislosť medzi klinickým príznakom pacienta a biochemickými zmenami v organizme.

Tabuľka 1 Prehľad patobiochemických a klinicko-biochemických predmetov

Ročník/Študijný program	Študijný predmet	Typ predmetu	Rozsah a typ výučby
3. VVL	Patologická biochémia	PV	3sc
3. GVM	Pathological Biochemistry	PV	3sc
4. VVL	Klinická biochémia	PV	3sc
4. GVM	Clinical Biochemistry	PV	3sc
3. HP	Patologická biochémia	PV	3sc
4. HP	Klinická biochémia	PV	3sc
2. Farmácia	Klinická a patologická biochémia	P	2p/2sc

VVL-všeobecné veterinárske lekárstvo; GVM-General Veterinary Medicine; HP-hygiena potravín; P-povinný; PV-povinne voliteľný; p-prednáška; sc-seminárne cvičenie

Študenti povinne voliteľného predmetu Klinická biochémia majú k dispozícii kazuistiky, t.j. prípady pacientov, teda údaje z chorobopisov v elektronickej forme, ktoré predstavujú výsledky klinického a laboratórneho vyšetrenia pacienta, na základe ktorých potvrdzujú, resp. vylučujú suspektné diagnózy. Táto forma prípadovej výučby je veľmi obľúbená a cenená, pretože študenti veterinárnej medicíny sú „defacto“ po prvýkrát v pozícii veterinárneho diagnostika, prehľbujú si takto schopnosti spájania nadobudnutých vedomostí nielen z biochemických disciplín (biochémia, patologická biochémia a klinická biochémia), ale aj z predmetov prevažne biologického zamerania (anatómia, fyziológia, výživa, patologická fyziológia, parazitológia, farmakológia a pod.).

PROTEKTÍVNY ÚČINOK OLEJA Z VLAŠSKÝCH ORECHOV PRED HYPERGLYKÉMIOU INDUKOVANÝM OXIDAČNÝM STRESOM

LAUBERTOVÁ, L., KOŇARIKOVÁ, K.
ĎURAČKOVÁ, Z., ŽITŇANOVÁ, I.

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie,
Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Sasinkova 2
813 72 Bratislava, Slovenská republika

e-mail: lucia.laubertova@fmed.uniba.sk

Úvod

Diabetes mellitus je hlavným invalidizujúcim metabolickým ochorením súčasnosti. Hyperglykémiou-indukovaný oxidačný stres a zápal zohrávajú významnú úlohu v progresii tohto ochorenia a rozvoji diabetických komplikácií. Alternatívne prístupy založené na nutričnej terapii môžu prestavovať jeden z možných spôsobov ako zlepšiť život diabetických pacientov. Olej z vlašských orechov je zdrojom polynenasýtených mastných kyselín (kyselina linolová, kyselina linolénová) a antioxidantov ako je α -tokoferol, kyselina elagová, kyselina galová, kyselina kávová, vanilová a jablčná. Taktiež obsahuje mikronutrienty ako je kyselina listová, meď, horčík, jód, vláknina, fytochemikálie a rastlinné steroly. Presentovaná štúdia popisuje vplyv hyperglykémie na markery oxidačného stresu a produkciu pro-zápalových cytokínov, ako aj potenciálne protektívne vlastnosti oleja z vlašských orechov pred hyperglykémiou-indukovaným oxidačným stresom a zápalom v monocytoch/makrofágoch.

Materiál a metódy

Ludské monocyty U937 a makrofágy diferencované z monocytov U937 sme kultivovali po dobu 72 ho-

dín v normoglykemických alebo hyperglykemických (35 mmol/l glukózy) podmienkach, s/bez prítomnosti oleja z vlašských orechov. Proliferáciu buniek sme sledovali MTT testom. Antioxidačnú kapacitu buniek v normo- a hyperglykemických podmienkach sme stanovili pomocou TEAC metódy. Aktivitu superoxidodismutázy (SOD), glutatiónperoxidázy (GPx) sme stanovili spektrofotometricky, oxidačné poškodenie DNA enzýmovo modifikovanou kométovou metódou, markery oxidačného poškodenia proteínov (karbonyly proteínov) a lipidov (izoprostány), ako aj hladiny prozápalových cytokínov (TNF, IL-6, IL-8, MCP-1) produkovaných makrofágmi sme stanovili pomocou ELISA metódy.

Výsledky

Hyperglykémia znížila antioxidačnú kapacitu buniek, indukovala oxidačné poškodenie DNA a znížila GPx aktivitu. Na druhej strane nemala vplyv na bunkovú proliferáciu, superoxidodismutázovú aktivitu, oxidačné poškodenie proteínov a lipidov. Olej z vlašských orechov významne zvýšil antioxidačnú kapacitu buniek, ako aj SOD a GPx aktivitu, znížil oxidačné poškodenie lipidov, ale nemal žiadny vplyv na bunkovú proliferáciu a neprejavil žiadny ochranný účinok pred oxidačným poškodením DNA a proteínov. Hyperglykémia indukovala zvýšenú produkciu pro-zápalových cytokínov. Olej z vlašských orechov preukázal prozápalové ako aj protizápalové vlastnosti závislé od použitej koncentrácie a času inkubácie s bunkami.

Záver

Pre rozšírenie liečebných možností diabetu je dôležité hľadať nové látky modulujúce oxidačný stres a zápal. Naše *in vitro* výsledky naznačujú, že olej z vlašských orechov môže znížiť oxidačný stres prostredníctvom svojich anti-oxidačných vlastností. Avšak nemôžeme potvrdiť, že daný olej dokáže ochrániť DNA a proteíny pred oxidačným poškodením. Dokázali sme však, že pri použití nižších koncentrácií olej vykazuje proti-zápalové vlastnosti.

VYUŽÍVANIE GENOMIKY V PERSONALIZOVANEJ TERAPII

MATÁKOVÁ, T.¹, HALAŠOVÁ, E.²

¹UK v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta
v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin

²UK v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta
v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin

Kontakt: matakova@jfmmed.uniba.sk

Súhrn

Personalizovaná medicína je multidisciplinárny vedný odbor, ktorý sa (na rôznych úrovniach) zaoberá optimalizáciou liečebných a diagnostických postupov u konkrétneho pacienta s využitím moderných metód. Personalizovaná medicína býva často uvádzaná ako „správna diagnostika, správna liečba pre správneho pacienta v správnom čase“. Intenzívny výskum v klinickej oblasti priniesol za ostatné desaťročia nielen nové liečivá ale aj prediktori liečebnej odpovede predovšetkým v onkológii. Tieto poznatky umožňujú personalizovať terapiu na základe genetických/expresných zmien. Markery ako HER2, EGFR, KRAS, BRAF a ALK, sú v súčasnej dobe neoddeliteľnou súčasťou rutínnej diagnostiky a ich testovanie má zásadný vplyv na voľbu adekvátneho terapeutického postupu a skvalitnenia života konkrétneho pacienta.

Medicína sa teda stáva vedou o informáciách, vyžadujúcich systémový holistický prístup, kde sa už nezaobídeme bez metodiky analytických technológií – matematických počítačových a fyzikálnych. Výstupy nových vedeckých poznatkov z oblasti genomiky, proteomiky, interaktomiky, metabolomiky a všetkých ďalších „-omics“ je nevyhnutné správne prepojiť a urobiť z nich súvislý systém údajov, ktorý by s využitím informačných technológií mohli priniesť nové pohľady na celú situáciu v personalizovanej medicíne. Genetika poskytuje cenné údaje avšak s prihliadnutím a vedomím, že veľmi veľa je možné ovplyvniť environmentálnymi faktormi vonkajším prostredím alebo fenotypovou expresiou.

Kľúčové slová: perssonalizovaná medicína, molekulo-
vá cieleňá terapia, polymorfizmus, onkomarkery toxicity

Podakovanie

*Táto práca vznikla za podpory grantov: MZ SR 2012/25-
UKMA-2 (50%) a APVV-0412-11 (50%).*

VÝUČBA LEKÁRSKEJ CHÉMIE NA LEKÁRSKYCH FAKULTÁCH U NÁS A V ZAHRANIČÍ

MUCHOVÁ, J., ANDREZÁLOVÁ L.
ORSZÁGHOVÁ Z. A TURECKÝ, L.

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie
LF UK Bratislava

e-mail: jana.muchova@fmed.uniba.sk

Lekárska chémia je jedným z nosných predmetov prvého ročníka štúdia medicíny na Lekárskej fakulte UK. Jej cieľom je osvojenie poznatkov o vzťahu štruktúry, vlastností a biologických funkcií biogénnych látok k efektívnemu štúdiu a komplexnému chápaniu metabolických procesov v ľudskom organizme a ich regulácie, ako aj získavanie praktických skúseností v oblasti fyzikálno-chemických, chemických a biochemických metód využívaných v laboratórnej a klinickej praxi. Lekárska chémia pre všeobecné aj zubné lekárstvo je podmieňujúcim predmetom pre kurz Lekárska biochémia v daných odboroch, ktorý prebieha v oboch semestroch druhého ročníka štúdia.

Napriek tomu, že si všetci uvedomujeme význam výučby Lekárskej chémie na lekárske fakultách stále sa vracia návrh zrušenia tohto predmetu. Podobná situácia sa vyskytla na našej fakulte minulý rok, kedy staré vedenie LFUK za podpory klinických pracovísk predložilo a schválilo návrh zmeniť výučbu chemických disciplín na fakulte z hľadiska zaradenia predmetu do programu výučby, ako aj z hľadiska jeho hodinovej dotácie. Toto nás viedlo k tomu, aby sme analyzovali výučbu lekárskej chémie na lekárske fakultách v našom regióne (stredoeurópska oblasť) a porovnali ju so situáciou na našej fakulte.

Zosumarizovali sme nasledovné údaje: výučba Lekárskej chémie, ročníky a semester, v ktorých sa tento predmet vyučuje a poskytnutá hodinová dotácia. Analyzovali sme výučbu na 31 lekárske fakultách v našom regióne, kde je obdobná aj príprava na stredných školách. Vyhodnotili sme situáciu na slovenských a českých lekárske fakultách a zo zahraničia sme hodnotili výučbu na fakultách v Poľsku, Maďarsku, v krajinách bývalej Juhoslávie a v Nemecku.

Výučba lekárskej chémie predchádzala výučbu lekárskej biochémie na 28 fakultách, z toho na 24 fakultách bola v rozsahu 1 semestra a na 4 fakultách v rozsahu 2 semestrov. Len na troch fakultách nemali samostatný predmet Lekárska chémia.

Výsledok našej analýzy potvrdzuje všeobecný názor, že výučba predmetu Lekárska chémia má na lekárskech fakultách svoje opodstatnenie. Súvisí to aj so skutočnosťou, že významnou časťou obsahu lekárskej chémie je chémia prírodných látok, ktorá v skutočnosti predstavuje úvod do biochémie a uľahčuje štúdium metabolických dráh intermediárneho metabolizmu v bunkách tkanív ľudského organizmu.

Tento názor nakoniec akceptovalo aj nové vedenie LF UK v Bratislave a súhlasilo so zachovaním predmetu Lekárska chémia v plnom rozsahu, avšak kurz bude presunutý z letného do zimného semestra 1. ročníka.

PROTEAZOMÁLNY STRES: KAT S DVOMI TVÁRAMI

PILCHOVÁ, I., KLIKOVÁ, K., ŠTEFANIKOVÁ, A.
KLAČANOVÁ, K., DIBDIAKOVÁ, K., SAKSONOVÁ S.,
RAČAY, P.

Ústav lekárskej biochémie
Jesseniova lekárska fakulta v Martine
UK v Bratislave, Martin

e-mail: iv.pilchova@gmail.com

Úvod

Oneskorená smrť selektívne citlivých neurónov po ischemickom inzulte predstavuje atraktívny terapeutický cieľ najmä pre dostatočne dlhý časový interval nástupu bunkovej smrti, ktorý by mohol byť využiteľný pre terapiu. Avšak napriek intenzívnemu štúdiu dodnes nie je objasnená podstata tohto mechanizmu. Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv agregácie bielkovín na mechanizmus indukcie bunkovej smrti, ktorá sa považuje za jednu z možných príčin vzniku oneskorenej smrti neurónov.

Materiál a metódy

Vplyv proteazomálneho stresu účinkom bortezomi-

bu bol testovaný na bunkových líniiach SH-SY5Y a T98G. Citlivosť a viabilita buniek voči inhibítoru bola stanovená MTT testom. V celobunkových lyzátoch aj v mitochondriálnych frakciách boli metódou *western blot* analýzy stanovené relatívne hladiny vybraných bielkovín. Kvantitatívnu *real-time* PCR na TLDA platniach bola z celkovej RNA stanovená expresia génov zapojených do mechanizmu apoptózy. Výsledky boli vyhodnotené štandardnými metódami štatistiky a bioinformatiky.

Výsledky

Výrazný letálny efekt bortezomibu sa v bunkách SH-SY5Y bol pozorovaný podstatne skôr (20 nmol/l, 48h) v porovnaní s líniiou T98G (100 nmol/l, 72h). V oboch líniiach bola prítomnosť polyubikvitinovaných agregátov bielkovín potvrdená už po 4h inkubácii, kedy ešte nedochádzalo ku zmenám vo viabilite buniek. V bunkách T98G dochádzalo po 24h ku výraznému zvýšeniu relatívnych hladín bielkovín Hsp70 (723%) a Hsp90 (362%), zatiaľ čo v bunkách SH-SY5Y sa po 24h hladina Hsp70 zvýšila len na 276% a hladina Hsp90 sa znížila (45%). V bunkách SH-SY5Y sme zaznamenali aktiváciu kaspázy 3, zvýšenie hladiny bielkovín Noxa a Puma a uvoľnenie cytochrómu c do cytoplazmy. Naopak v bunkách T98G nedochádzalo ku aktivácii kaspáz 3 a 9, ale zvýšila sa hladina prokaspázy 4 a taktiež sme pozorovali hromadenie Ikb-a (inhibitor NFkB). Ku uvoľneniu cytochrómu c do cytoplazmy v bunkách T98G nedochádzalo.

Záver

Z našich výsledkov vyplýva, že bortezomibom indukovaná agregácia bielkovín spôsobuje iniciáciu bunkovej smrti s dlhším časovým odstupom. Bunky SH-SY5Y na proteazomálny stres reagujú senzitívnejšie a predpokladáme, že odumierajú mitochondriálnou dráhou apoptózy. Naopak, bunky T98G, ktoré sú rezistentnejšie, vykazujú intenzívnejšiu stresovú odpoveď a mechanizmus ich bunkovej smrti je od apoptózy odklonený. Predpokladáme, že k tomu prispieva inhibícia NFkB signálnej dráhy. Za kľúčový regulačný komponent rozdielnej senzitivity testovaných línii považujeme bielkovinu tepelného šoku Hsp70.

Podakovanie

Práca bola podporená grantom Agentúry na podporu vedy a výskumu APVV-0245-11.

VÝUČBA LEKÁRSKEJ CHÉMIE A BIOCHÉMIE PRE ŠTUDENTOV ZUBNÉHO LEKÁRSTVA NA JLF UK MARTIN

RAČAY, P., KAPLÁN, P.
LEHOTSKÝ, J., DOBROTA D.

Ústav lekárskej biochémie JLF UK, Martin

e-mail: racay@jfmed.uniba.sk

Výučba študentov odboru zubné lekárstvo na JLF UK v Martine začala v školskom roku 2012/13. Podobne ako u študentov všeobecného lekárstva je výučba chemických predmetov rozdelená do dvoch ročníkov. V prvom ročníku je orientovaná na lekársku chémiu a na rozdiel od všeobecného lekárstva je vyučovaná len v zimnom semestri a ukončená skúškou. Na výučbu sú vyčlenené 2 hodiny prednášok a 2 hodiny seminárov alebo praktických cvičení za týždeň. Náplňou prednášok je všeobecná chémiu, statická biochémia, enzymológia, biochémia membrán a membránového transportu a biochémia uchovávaní a prenosu genetickej informácie. V druhom ročníku pokračuje výučba študentov odboru zubné lekárstvo predmetom lekárska biochémia. V zimnom semestri je výučba orientovaná na intermediárny metabolizmus pričom sylabus a rozsah výučby je totožný so sylabom a rozsahom pre študentov odboru všeobecné lekárstvo a to 2 hodiny prednášok a 3 hodiny seminárov a praktických cvičení za týždeň. Semester je ukončený klasifikovaným zápočtom. V letnom semestri, ktorý je ukončený skúškou, sa rozsah a sylabus výučby výrazne líši od rozsahu a sylabu pre odbor všeobecné lekárstvo. Pre odbor zubné lekárstvo je rozsah výučby taký istý ako v zimnom semestri (2/3) pričom je obsah prednášok zameraný na signálne molekuly a hormonálnu reguláciu ale hlavne na tkanivovú biochémiu s dôrazom na biochémiu ústnej dutiny. Vzhľadom na krátkosť výučby a tým pádom nízku spätnú väzbu, je v súčasnosti rozsah a sylabus výučby chemických predmetov pre študentov JLF UK odboru zubné lekárstvo stabilný pričom nie je vylúčená ich možná modifikácia v budúcnosti.

Podakovanie

Podporené projektom ŠF EÚ „Zubné lekárstvo – nový študijný program na JLF UK v Martine“. ITMS kód projektu: 26110230066 (100% podiel).

VÝUČBA CHEMICKY ORIENTOVANÝCH PREDMETOV V ODBORE VEREJNÉ ZDRAVOTNÍCTVO

RABAJDOVÁ M., MAREKOVÁ M.

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie
UPJŠ LF v Košiciach

Štúdium odboru verejné zdravotníctvo začalo na Lekárskej fakulte UPJŠ v Košiciach v ak. roku 2005/2006. Vyučujeme predmety Základy biochémie a Vyšetrovacie metódy vo verejnom zdravotníctve pre bakalársky študijný program a Klinická biochémia pre magisterský študijný program. Predmet Základy biochémie je vyučovaný v letnom semestri 1. ročníka v rozsahu 1 hodina prednášok a 2 hodiny praktických cvičení týždenne. Po úspešnom zvládnutí skúšky získavajú študenti 3 kredity. Študijnú literatúru pre daný predmet tvoria knižné publikácie Základy bioorganickej chémie autorov: Mareková, Guzy, Chovanová a Základy biochémie a klinickej biochémie autorov: Mareková, Birková, Guzy, Kron. Vedomosti z predmetu základy biochémie môžu študenti využiť pri štúdiu ďalších predklinických a klinických predmetov.

V 3. ročníku bakalárskeho štúdia prebieha výučba predmetu Laboratórne vyšetrovacie metódy vo verejnom zdravotníctve v rozsahu 1 hodina prednášky, 2 hodiny praktických cvičení a 1 hodina kontrolovaných praktických výstupov. Náplňou prednášok a cvičení je poskytnúť študentom teoretické a praktické vedomosti o laboratórnych metódach a technikách, spracovaní biologického materiálu a interpretácii dosiahnutých výsledkov. Po úspešne absolvovanej skúške (písomnou formou) získavajú študenti 2 kredity. Absolvovaním predmetu študenti získajú základné informácie o laboratórnych metódach využívaných vo verejnom zdravotníctve (napr. aplikácia biologických expozičných testov, objektivizácia faktorov prostredia).

V prvom roku magisterského stupňa je vyučovaný predmet Klinická biochémia v rozsahu 1 hodina prednášok a jedna hodina praktických cvičení týždenne. Predmet sa zameriava na aplikovanú biochémiu pre praktické potreby absolventov verejného zdravotníctva.

EFEKTIVNÍ VÝUKA MEDICÍNY – MŮŽE NÁM POMOCI E-LEARNING?

RAJDL D., RACEK J., DASTYCH M.
ŠAFARČÍK K., PRŮŠA R., FEBEROVÁ J., ZIMA T.

Univerzita Karlova v Praze Masarykova univerzita v Brně
Ostravská univerzita v Ostravě

e-mail: rajdl@fnplzen.cz

Ve výuce klinických lékařských oborů (např. vnitřní lékařství, chirurgie, pediatrie...) jsou logicky preferovány pedagogické metody založené na přímém kontaktu s pacientem. E-learning bývá v tomto kontextu považován za nepřínosný, podřadný a neadekvátní. Na 3 praktických příkladech (výuka kritického myšlení a zdravého životního stylu ve výukové kuchyni, pregraduální kurz Klinické biochemie a postgraduální vzdělávání v portálu CEVA [<http://www.ceva-edu.cz>]) si budeme demonstrovat výhody a nevýhody použití e-learningových metod při výuce medicíny.

LEKÁRSKA CHÉMIA A BIOCHÉMIA VO VÝUČBE ŠTUDENTOV ZUBNÉHO LEKÁRSTVA NA LF UPJŠ V KOŠICIACH

STUPÁK, M., MAŠLANKOVÁ, J.
TOMEČKOVÁ, V., MAREKOVÁ, M.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF, Košice

e-mail: marek.stupak@upjs.sk

Lekárska chémia a Biochémia ústnej dutiny 1 a 2 je pre študentov odboru Zubné lekárstvo a Dental medicine povinná. Výučba Lekárskej chémie prebieha v zimnom semestri v rozsahu 2 hodín prednášok a 3 hodín praktických cvičení za týždeň, čo predstavuje spolu 70 hodín v semestri. Je ukončená skúškou. Náplňou prednášok je všeobecná chémia, vlastnosti roztokov, prvky, chemická stavba kostí a zubov, zubné cementy, základy organickej chémie a statická biochémia. Od akademického roku 2011/2012 sú súčasťou náplne prednášok kovové prvky a zliatiny v zubnom lekárstve, dentálne plasty a odtlačkové hmoty, vďaka čomu môžu študenti lepšie pochopiť chemickú podstatu dejov prebiehajúcich pri používaní dentálnych materiálov. Okrem toho si študenti v prvom ročníku môžu zvoliť výberový predmet Bioorganická chémia v medicíne, ktorého náplňou je rozšírené štúdium organickej chémie, s dôrazom na heterocyklické zlúčeniny a organické liečivá. Výučba Bioorganickej chémie prebieha v letnom semestri v rozsahu 1 hodina prednášok a 1 hodina praktických cvičení za týždeň. V letnom semestri prvého roku štúdia prebieha výučba predmetu Biochémia ústnej dutiny 1. Rozsah výučby predstavuje 2 hodiny prednášok a 3 hodiny praktických cvičení týždenne. Náplň prednášok Biochémie ústnej dutiny 1 predstavuje úvod do štúdia biochémie, základy enzymológie, metabolismus sacharidov a lipidov. Semester je ukončený kolokviom, na ktorom je na základe výsledkov troch priebežných testov písaných v rámci semestra a zvládnutia vylosovanej praktickej úlohy študentom pridelené záverečné hodnotenie. Štúdium biochémie pokračuje v nasledujúcom semestri v nezmenenom rozsahu a je ukončené skúškou. Tematicky je prvej polovici orientované na metabolizmus aminokyselín a nukleových kyselín, následne pokračuje špecializovanými metabolickými pochodmi vo vybraných tkanivách so zameraním na biochémiu a patobiochémiu ústnej dutiny a tvrdých tkanív. Výučba uvedených predmetov na LF UPJŠ prebieha s väčšími alebo menšími obmenami týkajúcimi už niekoľko rokov a na základe spätnej väzby predstavuje dobrý základ do štúdia dentálne orientovaných predmetov vo vyšších ročníkoch.

KAZUISTIKY VE VÝUCE LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE

VEJRAŽKA, M.

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky
1. lékařská fakulta UK v Praze

e-mail: martin.vejrazka@lf1.cuni.cz

Úvod

Na konferenci učitelů biochemie v r. 2004 v Danišovcích jsme prezentovali zkušenosti s tehdy novým volitelným biochemickým předmětem pro preklinické ročníky založeným na reálných kazuistikách. Kazuistická výuka v preklinických ročnících tehdy byla vnímána jako kontroverzní.

Za více než deset let absolvovalo volitelný předmět více než 200 studentů. Kazuisticky orientované semináře jsou určeny pro posluchače, kteří absolvovali povinnou výuku lékařské biochemie. Původně byl předmět určen pouze pro studenty 3. ročníku. Pro značný zájem studentů z vyšších ročníků byl později otevřen posluchačům 3.-6. ročníku.

Metody

Cílem předmětu je integrovat a prohloubit dosavadní znalosti z biochemie a připravit studenty pro podrobnější studium klinické biochemie a dalších klinických oborů. Předmět se nesnaží výuku klinické biochemie suplovat, spíše jde o prohlubování a doplňování informací získaných v rámci praktických cvičení z lékařské biochemie ve druhém ročníku studia.

Výuka probíhá ve skupinách po nejvýše 10 studentech. Základem je reálná kazuistika pacienta, jehož stav vyžadoval hospitalizaci. V první fázi se studenti pod vedením učitele pokoušejí o rozvahu, jaká onemocnění nebo poruchy jakých systémů by mohly vést k prezentovaným obtížím nemocného. Poté se pokusí navrhnout laboratorní vyšetření, jež by měla vést k diagnóze. Následuje výklad vybrané biochemické problematiky a hodnocení laboratorních nálezů. Ty slouží jako podklad pro opakování biochemické podstaty laboratorních odchylek u konkrétních stavů.

Výsledky

Kazuisticky orientované semináře z lékařské biochemie získaly mezi studenty značnou oblibu, předmět získává

pravidelně velmi dobrá hodnocení ve studentské anketě a zájem o něj převyšuje nabízenou kapacitu. Zavedení kazuistik do výuky působí jako *výrazný motivační faktor*, který usnadní *výuku* podrobnějších biochemických témat.

Záver

Použití kazuistik ve výuce působí jako *výrazný motivační faktor*, který usnadní *výuku* podrobnějších biochemických témat. Studenti vyhledávají kazuisticky orientovanou výuku, díky čemuž je lze motivovat i ke studiu dosud méně oblíbených kapitol.

RESVERATROL V PREVENCI RAKOVINY PRSNÍKA

VELIKÁ, B.¹, BÓDY, G.¹
BILECOVÁ-RABAJDOVÁ, M.¹, TOMEČKOVÁ, V.¹,
BOLERÁZSKA, B., KISKOVÁ, T.², ŠTEFFEKOVÁ, Z.³

¹UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta
Ústav lekárskej a klinickej biochémie
Tr. SNP 1, Košice, Slovakia

²UPJŠ v Košiciach, Prírodovedecká fakulta
Ústav biologických a ekologických vied,
Moyzesova 11, Košice, Slovakia

³UVLF, Ústav chémie, biochémie a biofyziky
Komenského 73, Košice, Slovakia

e-mail: beata.velika@upjs.sk

Úvod

Rakovina prsníka je najčastejšie diagnostikované neoplastické ochorenia u žien. Pochopenie mechanizmov vzniku rakoviny by mohlo pomôcť v rozvoji viacerých prevenčných stratégií. Resveratrol (RES) je prirodzene sa vyskytujúci polyfenol s antioxidantnými a protinádorovými účinkami. V našej práci sme testovali preventívny potenciál resveratrolu na priebeh chemicky indukovanej rakoviny prsníka samíc potkanov kmeňa Sprague-Dawley.

Materiál a metódy

V experimente (16 týždňov) boli použité samice potkanov Sprague-Dawley (n=22). Zvieratá boli rozdelené

do troch skupín. Prvú skupinu predstavovali zdravé jedinice (INT; n = 6). Karcinogéza zvyšným jedincom bola indukovaná chemickým karcinogénom N-metyl-N-nitrozourea (NMU) v dávke 50 mg/kg telesnej hmotnosti na 43. a 50. postnatálny deň. Neliečená skupina s podaným karcinogénom bola nazvaná NMU (n=8), poslednej skupine s podaným NMU bol denne podávaný resveratrol v dávke 100 mg/kg hmotnosti (RES; n=8).

Mitochondrie boli izolované z tkaniva mliečnej žľazy metódou podľa Johnsona a Lardyho (1967) a rozriedené v respiračnom médiu (pH 7,4) na konečnú koncentráciu 2 µg/ml. Autofluorescencia mitochondrií bola následne stanovená metódou synchronného fluorescenčného fingerprintu, pomocou Perkin-Elmer LS 55. Táto metóda je vhodná k odhaleniu zmien týkajúcich sa autofluoreskujúcich látok pri formovaní mikroprostredia nádoru.

Výsledky

Celkové množstvo proteínov v nádorovom tkanive zvierat NMU skupiny bolo podľa očakávaní významne zvýšené v porovnaní s INT mliečnou žľazou ($p < 0,001$).

Aj napriek zvýšenej hladine proteínov v nádoroch RES skupiny oproti INT ($p < 0,05$), výrazné zníženie množstva proteínov o 40 % po dennom podávaní RES nastalo oproti NMU skupine. Fluorescencia NADH + H⁺ bola vyššia v oboch experimentálnych skupinách v porovnaní s INT skupinou ($p < 0,01$ NMU a RES $p < 0,001$).

Záver

RES je známy svojimi chemoterapeutickými účinkami v rôznych typoch nádorových ochorení vrátane rakoviny prsníka. Naše výsledky ukázali, že RES v koncentrácii 100 mg/kg hmotnosti znižuje celkové množstvo proteínov, čím by mohol prispievať k zníženiu objemu nádorov a v konečnom dôsledku znížiť metastatický potenciál nádorov.

Podakovanie:

Táto publikácia bola vytvorená v rámci plnenia vnútorných grantových programov UPJŠ VVGS (2013-97; 2013-77) a pri realizácii projektu Medicínsky univerzitný park v Košiciach (MediPark, Košice) ITMS:26220220185.

IN EXTENSO
ČLÁNKY

OPTIMALIZÁCIA RP-HPLC METÓDY NA STANOVENIE ZVOLENÝCH NEUROTRANSMITEROV AMINOKYSELINOVEJ POVAHY V CEREBROSPINÁLNO M LIKVORE

BARTOVÁ, R.¹, VALENTOVÁ, N.¹, GÓRA, R.²
TURECKÝ, L.¹, ĎURFINOVÁ, M.¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta
Univerzita Komenského, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava; radka.bartova@fmed.uniba.sk

²Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava

SÚHRN

Práca je zameraná na optimalizáciu a štandardizáciu gradientovej metódy RP-HPLC (vysokoučinná kvapalinová chromatografia na obrátených fázach) s fluorescenčnou detekciou na simultánnu detekciu neurotransmitterových aminokyselín – kyselina asparágová, kyselina glutámová, glycín, kyselina γ -aminomaslová (GABA). Aminokyseliny boli derivatizované s *o*-ftaldialdehydom v prítomnosti 2-merkaptotetanolu v alkalickom prostredí. Metóda je jednoduchá a rýchla – umožňuje dokonalú separáciu všetkých 4 aminokyselín za menej ako 40 min. Reproducibilita v rámci jedného dňa bola 98,8 %; 98,2 %; 99,0 % a 97,4 % pre aspartát, glutamát, glycín a GABA. Vďaka limitu detekcie 5 pmol/mL je aplikovateľná na cerebrospinálny likvor so stopovými koncentráciami aminokyselín.

Kľúčové slová: HPLC, cerebrospinálny likvor, aspartát, glutamát, glycín, GABA

SUMMARY

The paper is focused on optimization and standardization of the gradient RP-HPLC method (reversed-phase high-performance liquid chromatography) with fluorescence detection for the simultaneous detection of neurotransmitters — aspartate, glutamate, glycine, γ -aminobutyrate (GABA). Amino acids were derivatized with *o*-phthaldialdehyde in the presence of 2-mercaptoethanol under alkaline conditions. The method is quick and easy — allows perfect separation of all four amino acids in less than 40 minutes. Intraday reproducibility was 98,8 %; 98,2 %; 99,0 % a 97,4 % for aspartate, glutamate, glycine and GABA, respectively. With the detection limit of 5 pmol/mL is applicable to the cerebrospinal fluid with trace concentrations of amino acids.

Key words: HPLC, cerebrospinal fluid, aspartate, glutamate, glycine, GABA

ÚVOD

Skleróza multiplex (SM) je autoimunitné chronické ochorenie centrálneho nervového systému s charakteristickými znakmi zápalu, demyelinizácie a astrogliózy. U pacientov s SM sa pravidelne vyskytujú aj jemné psychické príznaky, najmä labilita nálady a eufória. V neskorších štádiách sa však vyvíja, ako pri všetkých organických poškodeniach mozgu aj demencia. Práve tieto psychické poruchy by mohli byť výsledkom zmenených hladín neurotransmitterov v CNS. Vhodným médiom, ktoré najlepšie odráža prípadné zmeny v metabolizme či štruktúre nervových buniek je cerebrospinálny likvor. Zmeny hladín excitačných a inhibičných neurotransmitterov resp. ich pomeru by mohli byť zaujímavé napr. pri monitorovaní priebehu progresie ochorenia resp. ako prognostický marker. Cieľom štúdie bolo optimalizovať metódu RP-HPLC na stanovenie aminokyselín v biologických tekutinách neurologických pacientov.

Častou voľbou analytických chemikov zao-

berajúcich sa analýzou aminokyselín (AMK) alebo amínov je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) analytov po derivatizácii s *o*-ftaldialdehydom (OPA) (Hanczkó, 2006). Aminokyseliny reagujú s OPA svojou primárnou aminoskupinou v prítomnosti tiolového aditíva v alkalickom prostredí – v našom prípade 2-merkptoetanolu (ME) v prostredí tlmivého roztoku boraxu (Schéma 1). Úloha ME je stabilizovať vzniknutý derivát, ktorý je inak nestabilný a podlieha spontánnej hydrolýze rovnako ako samotný OPA (Dorresteijn a kol., 1996). Tento zložitý reakčný mechanizmus naznačuje, že na zabezpečenie optimálnych podmienok pre tvorbu derivátu je potrebné kalibrovať viacero parametrov (Hanczkó a Molnár-Perl, 2003). Pri prvotnom nastavení podmienok derivatizácie a separácie derivátov sme vychádzali zo štúdie Doušu a kol. (2012), v ktorej bola táto metóda použitá na stanovenie aliskirénu (inhibítora renínu) a jeho degradačných produktov pomocou metódy HILIC (*hydrophilic interaction liquid chromatography*).

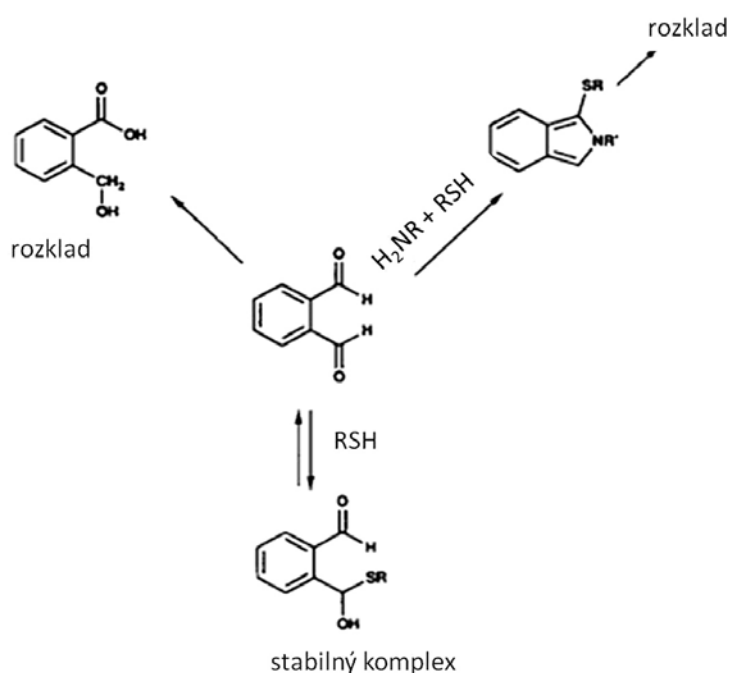


Schéma 1. Zjednodušená schéma možných reakcií *o*-ftalaldehydu (OPA) s aminokyselinami (H_2NR) a 2-merkptoetanolom (RSH = ME): hydrolýza OPA, stabilizácia OPA ME a reakcia OPA s ME a aminokyselinami produkujúca nestabilné fluorescenčné deriváty, ktoré podliehajú spontánnemu rozkladu (modifikované podľa Dorresteijn a kol., 1996)

PACIENTI A METÓDY

Spracovanie vzoriek CSL

Pacienti II. Neurologickej kliniky LF UK boli po odbere vzorky CSL (cerebrospinálny likvor) rozdelení do dvoch skupín:

- A) pacienti s SM a inými demyelinizačnými ochoreniami, ktorých neurologická diagnostika bola robená podľa McDonaldových kritérií revidovaných v roku 2010,
- B) pacienti zaradení do skupiny neurologických kontrol, pacienti s bližšie nešpecifikovanými bolesťami hlavy, chrbta, otrasmi mozgu, ochrnutím mozgu, duševnými poruchami, svalovými poruchami, zlomeninou stehrovej kosti, poruchami vestibulárnej funkcie a inými poruchami mozgu, miechy a nervového systému. Lumbálnou punkciou odobratý CSL bol centrifugovaný 10 min. pri 1000 rpm, uskladnený pri -80°C až do použitia na analýzu.

HPLC súprava

Na HPLC analýzy štandardnej zmesi AMK a vzoriek CSL bol použitý chromatografický systém LaChrom (Merck-Hitachi, SRN), ktorý sa skladal z dvoch púmp L-7100, FL detektora s meniteľnou vlnovou dĺžkou L-7480, nastrekovacieho ventilu s dávkovacou slučkou 20ml, typ 7725i (Rheodyne, USA) a vyhodnocovacieho programu Clarity Lite pre PC (AzetChrom s. r. o., SR). Na delenie bola použitá kolóna Purospher Star RP-18e (5 μm ; Merck, SRN) s náplňou LiChroCART (250 mm \times 4 mm) spojenú s predkolónou a zakolónou.

Stanovenie aminokyselín metódou HPLC

Aminokyseliny boli analyzované modifikovanou HPLC metódou s gradientovou elúciou (Douša a kol., 2012). Zo zásobných roztokov AMK GABA (9,7 mM), Glu (10 mM), Gly (10 mM), Asp (10 mM), Gln (10 mM) boli pripravené pracovné roztoky v koncentračnom rozsahu 0,04 μM –30 μM . K 20 mL metanolického roztoku 6 mM *o*-ftaldialdehydu

(OPA) bolo pridaných 20 μL 28 mM 2-merkaptoetanolu (RSH) a 960 μL 50 mM boraxu pH 10 (prefiltrovaný). Takto pripravené derivatizačné činidlo (DČ) bolo zmiešané v pomere 1:1 (v/v) s pracovným roztokom zmesi všetkých aminokyselín/vzorkou/vodou. Roztok bol následne inkubovaný 15 min. pri laboratórnej teplote a následne bolo 20 μL injektovaných na kolónu. Deriváty aminokyselín boli separované po optimalizácii metodiky v našich podmienkach na chromatografickej kolóne. Aplikovaná bola technika gradientovej elúcie, zloženie mobilnej fázy pri prietoku 1 mL/min. bolo dosiahnuté miešaním (A) acetonitrilu a (B) 10 mM fosforečnanového tlmivého roztoku KH_2PO_4 (pH 5,8) podľa programu: min. (% B): 0 (95); 5 (95); 25 (70); 28 (30); 29 (30); 32 (95); 38 (95). Na detekciu bol použitý fluorescenčný detektor s excitačnou a emisnou vlnovou dĺžkou 330 nm a 440 nm.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Optimalizácia podmienok separácie a detekcie derivátov

Zmes štandardov kyseliny asparágovej (Asp), kyseliny glutámovej (Glu), glutamínu (Gln), glycínu (Gly) a kyseliny γ -aminomaslovej (GABA) bola derivatizovaná 1/1 (v/v) s DČ s pomerom $[\text{ME}]/[\text{OPA}] = 0,47$ (Douša a kol., 2012) v alkalickom prostredí 50 mM boraxu pH 9,5 (Egger a kol., 1994). Produkty derivatizácie boli spočiatku eluované mobilnou fázou 10 mM KH_2PO_4 pH 7,2 (7,4)/ACN v pomere 4/1 pri prietoku 0,8 mL/min. Fluorescenčný detektor bol po premeraní excitačných a emisných spektier nastavený na 330/440 nm (Busto a kol., 1995). Nevýhodou takto nastavených podmienok bola dĺžka jednej analýzy (55 min.) Po pripojení ďalšej pumpy do HPLC systému bola izokratická technika elúcie nahradená gradientovou (Lookhart a Jones, 1985), pri ktorej boli jednotlivé zložky mobilnej fázy, po optimalizácii s ohľadom na dostatočné rozlíšenie pík ($R \geq 1,5$), miešané v pomeroch

uvedených v časti Pacienti a metódy (Graf 6). Tento aspekt po optimalizácii umožnil skrátiť dobu analýzy z 55 min. na 38 min.

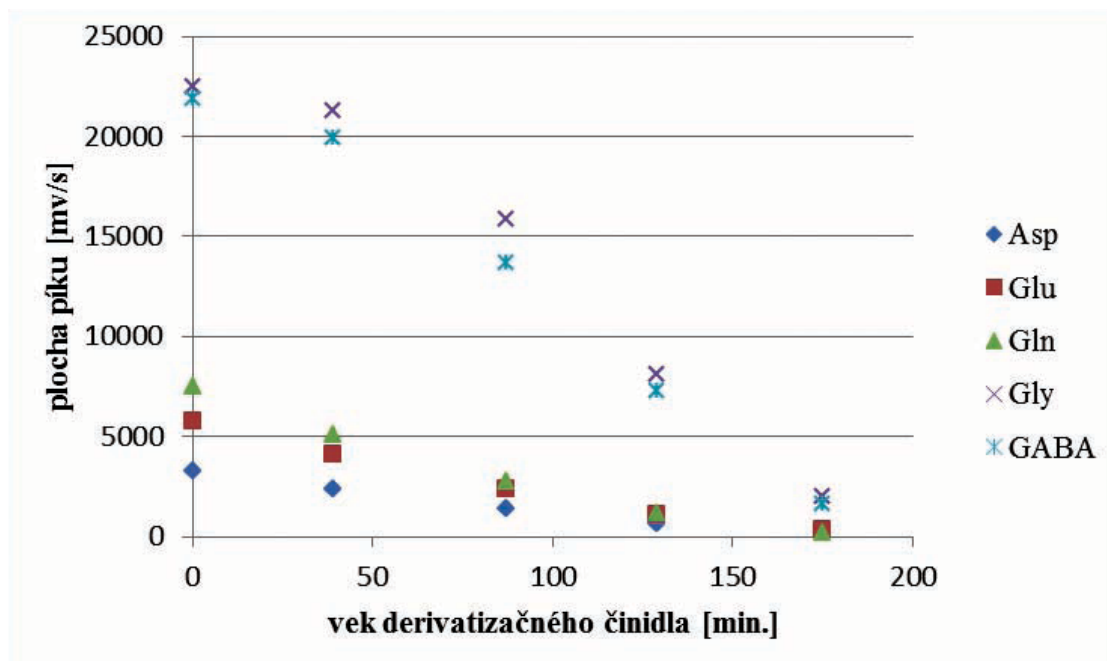
Optimalizované bolo pH fosfátového pufru v mobilnej fáze ($10 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$) v rozmedzí pH 5,34–7,4 (s ohľadom na disociačné konštanty AMK), pričom najoptimálnejšia odozva GABA bola zaznamenaná pri **pH 5,8** (výsledky nie sú spracované graficky).

Po zostrojení kalibračnej krivky v koncentračnom rozpätí 1–100 μM bolo množstvo glutamínu v CSL pacientov s SM nachádzal v koncentrácii približne 2× vyššej ako najvyšší bod krivky (1826,75 ng/mL). Aj tento fakt mohol byť príčinou neschopnosti detekovať súčasne v CSL stopové koncentrácie GABA (Mann a kol., 2014) pod najnižším bodom krivky. Naším cieľom bolo stanoviť hladiny zvolených excitačných a inhibičných neurotransmiterov ako aj ostatných AMK v CSL, a preto boli ďalšie podmienky (derivatizácia aminokyselín) metódy optimalizované bez

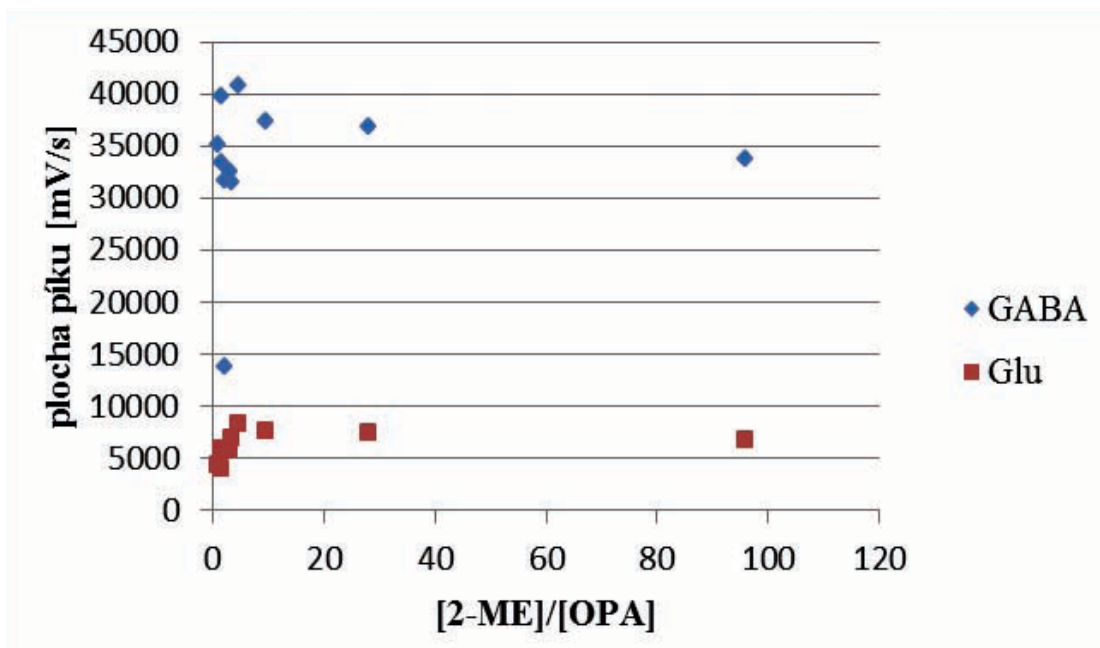
glutamínu, aby sme boli schopní detekovať aj nízke hladiny GABA.

Optimalizácia podmienok derivatizácie aminokyselín

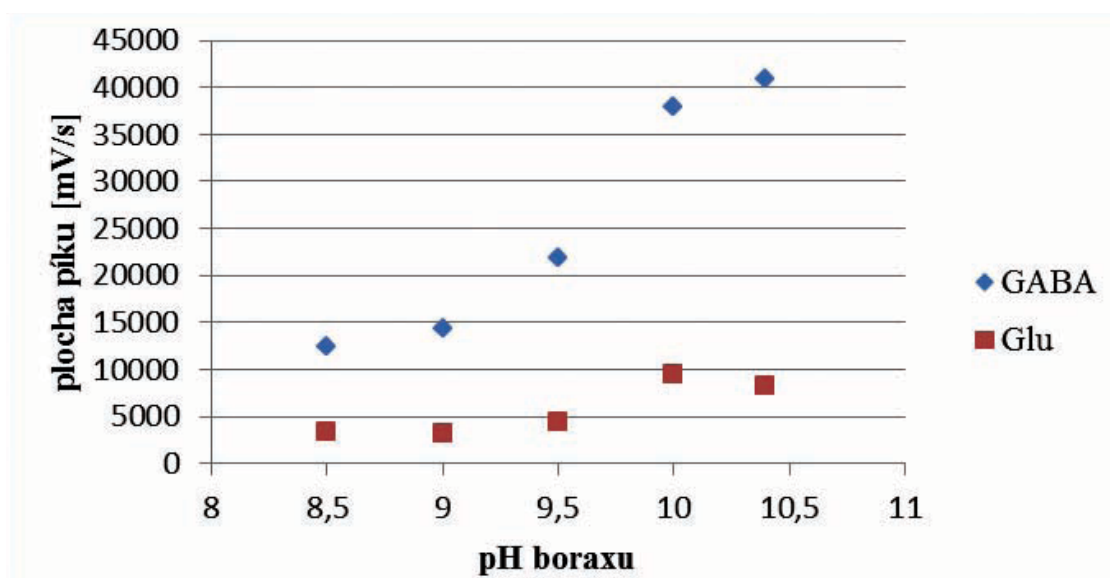
Koncentrácia ME je dôležitým faktorom stability komplexu OPA-ME, a teda aj miery interferencie produktov hydrolýzy OPA. Jedná sa o rovnovážnu reakciu, pri ktorej prídavok ME redukuje množstvo OPA, ktoré je k dispozícii pre reakciu s aminokyselinami, a zároveň redukuje interferenciu pozadia (Dorresteijn a kol., 1996). Douša a kol. (2012) použili ako DČ zmes 6 mM OPA a 28 mM ME v 50 mM boraxe pH 10,5 s molárnym pomerom $[\text{ME}]/[\text{OPA}] = 0,47$. S vekom DČ síce klesala interferencia pozadia, ale zároveň klesala aj koncentrácia vznikajúcich derivátov (Graf 1), preto bolo pripravované čerstvé pred každou derivatizáciou. Počnúc týmto pomerom (0,47) boli na základe literárnych údajov (Hanczkó a Molnár-Perl, 2003) testované ďalšie pomery



Graf 1. Závislosť plochy derivátov 10 μM Asp, Glu, Gln, Gly a 9,7 μM GABA od veku derivatizačného činidla. Zmesi AMK boli derivatizované 1/1 (v/v) činidlom, ktoré obsahovalo 6 mM OPA a 28 mM ME ($[\text{ME}]/[\text{OPA}] = 0,47$) a 50 mM borax pH 9,5. Analyty boli eluované zmesou acetonitril (A)/10 mM KH_2PO_4 pH 5,8 (B), ktoré boli miešané v pomere – min. (% B): 0 (95); 5 (95); 25 (70); 28 (30); 29 (30); 32 (95); 38 (95) pri prietoku mobilnej fázy kolónou 1 mL/min a dávkovaným objemom 20 μL . Detekcia prebiehala pri exc./emis. vlnovej dĺžke 330/440 nm



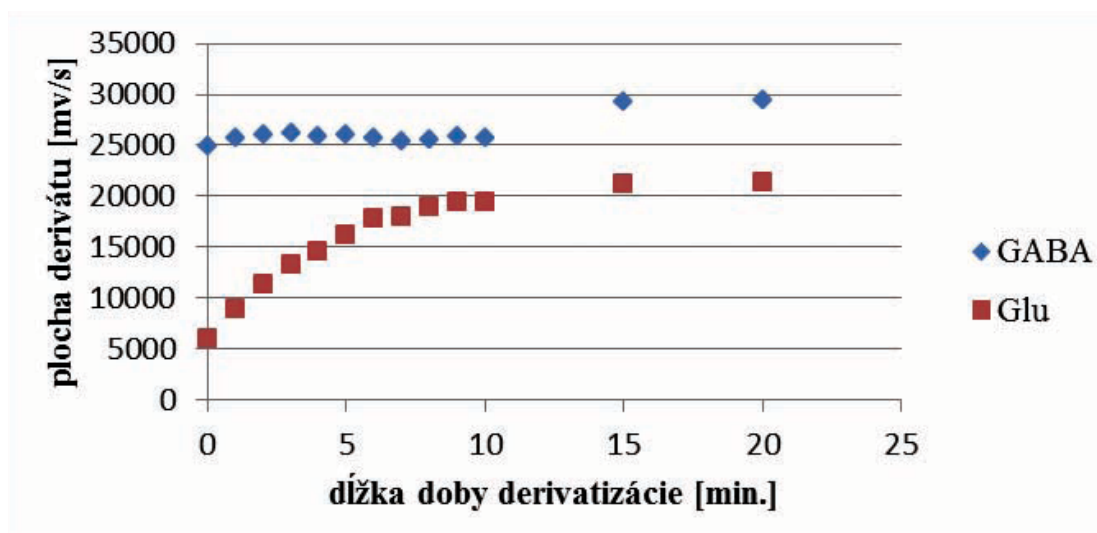
Graf 2. Závislosť plochy derivátov 4,85 μM GABA a 5 μM Glu od pomeru [ME]/[OPA] (50 mM borax pH 10,4; GABA + Glu + H_2O /DČ (v/v) = 1). Analyty boli eluované mobilnou fázou 10 mM KH_2PO_4 (pH 7,2)/ACN v pomere 4/1 pri prietoku 0,8 mL/min. Na kolónu bolo injektovaných 20 μL roztoku. Detekcia prebiehala pri exc./emis. vlnovej dĺžke 330/440 nm



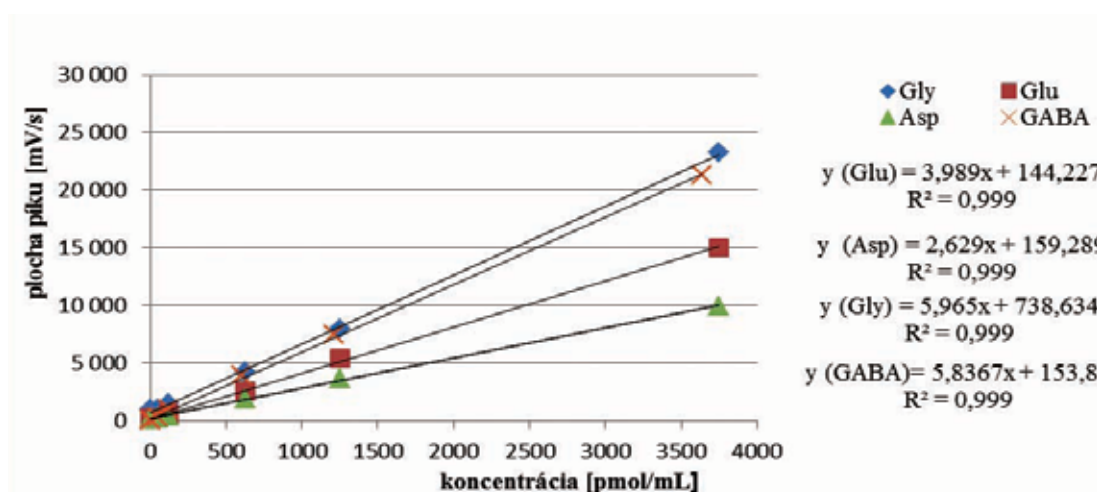
Graf 3. Závislosť plochy derivátov 4,85 μM GABA a 5 μM Glu od pH boraxu (50 mM; [ME]/[OPA] = 4,67). Analyty boli eluované mobilnou fázou 10 mM KH_2PO_4 (pH 7,2)/ACN v pomere 4/1 pri prietoku 0,8 mL/min. Na kolónu bolo injektovaných 20 μL roztoku. Detekcia prebiehala pri exc./emis. vlnovej dĺžke 330/440 nm

[ME]/[OPA] v rozpätí 0,058–95,9 na štandarde GABA pri jej koncentrácii v nástrekovom roztoku 48,5 μM ; 24,25 μM a 4,85 μM a pri po-

meroch [OPA]/[GABA] 1,237; 2,474; 12,371. Najviac derivátu (16042 mV/s) pri danom pH boraxu (9,4) sa vytvorilo pri použití DČ



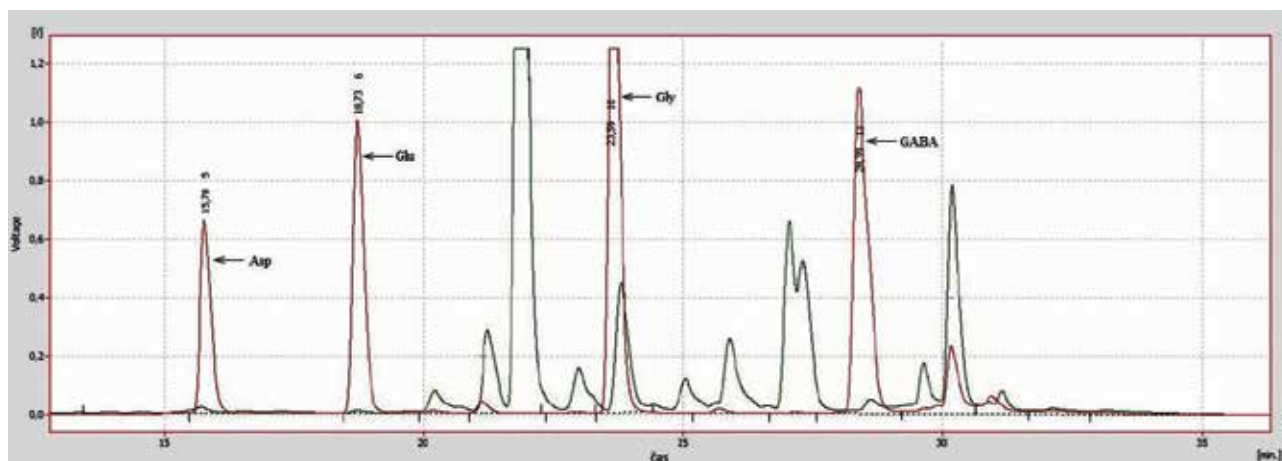
Graf 4. Závislosť plochy derivátov 4,85 uM GABA a 5 uM Glu od dĺžky doby derivatizácie (50 mM borax pH 10, [ME]/[OPA] = 4,67). Analyty boli eluované zmesou acetonitril (A)/10 mM KH_2PO_4 pH 5,8 (B), ktoré boli miešané v pomere – min. (% B): 0 (95); 5 (95); 25 (70); 28 (30); 29 (30); 32 (95); 38 (95) pri prietoku mobilnej fázy kolónou 1 mL/min a dávkovaným objemom 20 μL . Detekcia prebiehala pri exc./emis. vlnovej dĺžke 330/440 nm



Graf 5. Kalibračná krivka zmesi aminokyselín. (50 mM borax pH 10, [ME]/[OPA] = 4,67). Analyty boli eluované zmesou acetonitril (A)/10 mM KH_2PO_4 pH 5,8 (B), ktoré boli miešané v pomere – min. (% B): 0 (95); 5 (95); 25 (70); 28 (30); 29 (30); 32 (95); 38 (95) pri prietoku mobilnej fázy kolónou 1 mL/min a dávkovaným objemom 20 μL . Detekcia prebiehala pri exc./emis. vlnovej dĺžke 330/440 nm

s pomerom $[\text{ME}]/[\text{OPA}] = 1,49$, následne so stúpajúcim množstvom ME plocha derivátu klesala (pri pomere 2,33 takmer o 14 %). Optimalizácia pomeru $[\text{ME}]/[\text{OPA}]$ pokračovala pridaním ďalšej aminokyseliny – Glu pri pH boraxu aj 10,4 (Buteau a kol., 1984). Odozva bola najvyššia pri pH 10,4 a pomere 4,67 (Graf 2).

Rýchlosť každej z predpokladaných reakcií je pravdepodobne optimálna pri určitom pH. Hľadané bolo také pH tlmivého systému (50 mM borax), pri ktorom bude rýchlosť produkcie fluoreskujúcich derivátov oveľa vyššia ako rýchlosť ich hydrolýzy. Pri optimalizovanom pomere $[\text{ME}]/[\text{OPA}]$ 4,67 bolo testované pH boraxu v rozmedzí 8,5–10,4 (Hanczkó a Molnár-Perl,



Graf 6. Chromatografický záznam zmesi štandardov 3,75 μM Asp, Glu, Gly a 3,64 μM GABA a CSL pacienta s SM. Aminokyseliny, CSL a voda boli derivatizované 1/1 (v/v) činidlom, ktoré obsahovalo 6 mM OPA a 28 mM ME ([ME]/[OPA] = 4,67) a 50 mM borax pH 10. Výsledný roztok bol inkubovaný 15 min. pri lab. tep. a následne v objeme 20 μL injektovaný na kolónu. Analyty boli eluované zmesou acetonitril (A)/10 mM KH_2PO_4 pH 5,8 (B), ktoré boli miešané v pomere - min. (% B): 0 (95); 5 (95); 25 (70); 28 (30); 29 (30); 32 (95); 38 (95) pri prietoku mobilnej fázy kolónou 1 mL/min. Detekcia prebiehala pri exc./emis. 330/440 nm

2003) s najvyššou plochou píku GABA pri pH 10,4 a Glu pri pH 10,0 (Graf 3). Zvolené bolo **pH 10**, pri ktorom bola výška píku Glu a GABA približne rovnaká.

Pre zabezpečenie priebehu kompletnej reakcie OPA s aminokyselinami je dôležitý aj reakčný čas. Zmes bola inkubovaná 0–10, 15 a 20 min. pri laboratórnej teplote (Hanczkó a Molnár-Perl, 2003). Najviac derivátu sa vytvorilo ak derivatizácia prebiehala **15 minút pri laboratórnej teplote** (Graf 4). V tomto kroku sme začali pracovať s ďalšími dvomi aminokyselinami – Asp a Gly (Graf 6).

Za podmienok optimalizovaných uvedenými krokmi:

- DČ: 20 μL 6 mM OPA + 20 μL 28 mM ME + 960 μL 50 mM borax pH 10
- 100 μL št. Asp + 100 μL št. Glu + 100 μL št. Gly + 100 μL št. GABA + 400 μL DČ
- inkubácia 15 min. pri lab. tep. (25 °C)
- mobilná fáza: A: ACN, B: 10 mM KH_2PO_4 pH 5,8; prietok 1 mL/min
- gradientový program: min. (% B): 0 (95); 5 (95); 25 (70); 28 (30); 29 (30); 32 (95); 38 (95)
- fluorescenčný detektor: excitácia/emisia 330/440 nm

bola zostrojená kalibračná krivka pre aminokyseliny Asp, Glu, Gly GABA v rozsahu 0,04–30 μM zodpovedajúca 5–3750 nM = pmol/mL v nástreku (Graf 5). Následne bola metóda testovaná aj na vzorkách CSL pacientov s SM a kontrolnej skupiny neurologických pacientov (Graf 6). Z predbežných výsledkov možno konštatovať, že koncentrácie Gly sú v CSL približne 2 \times vyššie u SM (asi 1,8 μM), GABA približne 3 \times vyššie u SM (150 nM), Asp približne rovnaké u oboch skupín (20 nM), glutamát nedetekovateľný u SM, u kontrol približne 10 nM.

ZÁVER

Optimalizovaná bola metóda RP-HPLC na stanovenie aminokyselín v ľudskom likvore s fluorescenčnou detekciou a gradientovou elúciou. Stanovenie AMK v biologickom materiáli sa zvyčajne robí v krvi, resp. v tkanivách experimentálnych zvierat (de Freitas Silva a kol., 2009). CSL vďaka svojej tesnej interakcii s mozgovým tkanivom lepšie ako krv odráža situáciu v mozgu, no napriek tomu metód na stanovenie stopových koncentrácií

aminokyselín v CSL je málo (Spreux-Varoquaux a kol., 2002; Eckstein a kol., 2008) a v súvislosti s SM ešte menej (Sarchielli a kol., 2003). V CSL sa nám podarilo po optimalizácii stanoviť 2 excitačné (Asp, Glu) a 2 inhibičné neurotransmitery (Gly, GABA).

GABA je jeden z hlavných inhibičných neurotransmitterov v CNS, ktorý má kľúčovú úlohu pri normálnej činnosti mozgu (Klueva a kol., 2008). Poruchy metabolizmu GABAergného systému boli demonštrované pri mnohých neurologických a neuropsychických ochoreniach napr. v patofyziológii depresie a anxiety (Mann a kol., 2014). Štúdií spájajúcich GABA s SM je pomerne málo (Tajouri a kol., 2003; Kuroda a kol., 1982). Koncentrácia GABA v CSL zdravých ľudí sa uvádza rádovo v desiatkach až stovkách pmol/mL (nM) (Mann a kol., 2014; Kuroda a kol., 1982; Naini a kol., 1993), čo je v súlade s našimi výsledkami (50 nM).

Glycín je hlavný inhibičný neurotransmitter v mieche a zároveň umocňuje účinok excitačných AMK na úrovni NMDA receptorov (Davidoff, 1990).

V CSL sa nám podarilo identifikovať aj pík s obrovskou plochou nad detekčným limitom metódy – glutamín, ktorý môže spolu s pyroglutamátom do veľkej miery prispievať k metabolizmu glutamátu (Eckstein a kol., 2008).

Glutamát je hlavný excitačný neurotransmitter v CNS (Ozawa a kol., 1998), okrem toho má množstvo funkcií spojených s metabolickou reguláciou a zánikom neurónov na podklade excitotoxicity (Yi a Hazell, 2006). Intracelulárna koncentrácia glutamátu za fyziologických podmienok je 100 mM, ale len 1–3 μM v extracelulárnom priestore (Storm-Mathisen a kol., 1992). Hladina glutamátu v CSL neurologických kontrol (bolesť hlavy, krčnej a driekovej chrbtice) sa pohybuje okolo $1,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (Stover a kol., 1997). Hladina glutamátu a aspartátu je v CSL pacientov bez ochorenia CNS a PNS $3,399 \pm 1,16 \mu\text{M}$ a $2,63 \pm 0,68 \mu\text{M}$ (Sarchielli a kol., 2003). Tieto hodnoty sú o dva rády vyššie ako v prípade našich vzoriek CSL, čo môže byť spôsobené niekoľkými mechaniz-

mami (Goldsmith a kol., 1987), ktorými sa v budúcnosti plánujeme zaoberať.

K týmto odchýlkam mohol prispieť aj približne polovičný spätný návrat pri koncentrácií štandardov 5–50 nmol/L oproti 98,4 %, 101,1 %, 98,7 %, 105,5 % pre Asp, Glu, Gly a GABA pre koncentrácie 125–3750 nmol/L. V budúcnosti preto plánujeme pokračovať v optimalizácii metodiky pre dosiahnutie požadovanej presnosti aj pri stopových koncentráciách Asp a Glu.

POĎAKOVANIE

Projekt bol finančne podporený grantom MZSR 2012/2-UKBA-2.

LITERATÚRA

- 1. Busto, O., Guasch, J., Borrull, F., 1995:** Improvement of a solid-phase extraction method for determining biogenic amines in wines. In *J. Chrom. A*, Vol. 718, No. 2, pp. 309–317.
- 2. Buteau, C., Duitschaeffer, C. L., Ashton, G. C., 1984:** High-performance liquid chromatographic detection and quantitation of amines in must and wine. In *J. Chromatogr.*, Vol. 284, pp. 201–210.
- 3. Davidoff, R. A., 1990:** In *The Origin and Treatment of Spasticity*, R. Benecke, M. Emre, and R. Davidoff (eds.), USA (1990), pp. 63–91.
- 4. de Freitas Silva, D. M., Ferraz, V. P., Ribeiro, A. M., 2009:** Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. In *J. Neurosci. Met.*, Vol. 177, No. 2, pp. 289–293.
- 5. Dorresteyn, R. C., Berwald, L. G., Zomer, G., de Gooijer, C. D., Wieten, G., Beuvery, E. C., 1996:** Determination of amino acids using *o*-phthalaldehyde – 2mercaptoethanol derivatization. Effect of reaction conditions. In *J. Chrom. A*, Vol. 724, pp. 159–167.
- 6. Douša, M., Břicháč, J., Svoboda, J., Klvaňa, R., 2012:** Rapid HILIC method with fluorescence detection using derivatization reaction utilizing *o*-phthalaldehyde for determination of degradation

product of aliskiren. In *J. Pharm. & Biomed. Anal.*, Vol. 66, pp. 359–364.

7. **Eckstein, J. A., Ammerman, G.M., Reveles, J.M. Ackermann, B.L., 2008:** Analysis of glutamine, glutamate, pyroglutamate, and GABA in cerebrospinal fluid using ion pairing HPLC with positive electro spray LC/SM/SM. In *J. Neurosci. Met.*, Vol. 171, No. 2, pp. 190–196.

8. **Egger, D., Reisbach, G., Hültner, L., 1994:** Simultaneous determination of histamine and serotonin in mast cells by high-performance liquid chromatography. In *J. Chromatogr. B*, Vol. 662, No. 1, pp. 103–107.

9. **Goldsmith, R. F., Earl, J. W., Cunningham, A. M., 1987:** Determination of γ -aminobutyric acid and other amino acids in cerebrospinal fluid of pediatric patients by reversed-phase liquid chromatography. In *Clin. Chem.*, Vol. 33, No. 10, pp. 1736–1740.

10. **Hanczkó, R., 2006:** PhD. Dissertation. Institute of Chemistry. Department of Analytical Chemistry. L. Eötvös University, Budapest.

11. **Hanczkó, R., Molnár-Perl, I., 2003:** Derivatization, stability and chromatographic behavior of *o*-phthaldialdehyde amino acid and amine derivatives: *o*-phthaldialdehyde/2-mercaptoethanol reagent. In *Chromatographia*, Vol. 57, No. 1S, pp. S103–S113.

12. **Klueva, J., Meis, S., de Lima, A. D., Voigt, T., Munsch, T., 2008:** Developmental downregulation of GABAergic drive parallels formation of functional synapses in cultured mouse neocortical networks. In *Dev. Neurobiol.*, Vol. 68, No. 7, pp. 934–949.

13. **Kuroda, H., Ogawa, N., Yamawaki, Y., Nukina, I., Ofuji, T., Yamamoto, M., Otsuki, S., 1982:** Cerebrospinal fluid GABA levels in various neurological and psychiatric diseases. In *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry*, Vol. 45, No. 3, pp. 257–260.

14. **Lookhart, G. L., Jones, B. L., 1985:** High performance liquid chromatography analysis of amino acids at the picomole level. In *Cereal Chem.*, Vol. 62, No. 2, pp. 97–102.

15. **Mann, J. J., Oquendo, M. A., Watson, K. T., Boldrini, M., Malone, K. M., 2014:** Anxiety

in major depression and cerebrospinal fluid free gamma-aminobutyric acid. In *Depress Anxiety*, Vol. 31, No. 10, pp. 814–821.

16. **Naini, A. B., Vontzalidou, E., Côté, L. J., 1993:** Isocratic HPLC assay with electrochemical detection of free gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid. In *Clin. Chem.*, Vol. 39, No. 2, pp. 247–250.

17. **Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K., 1998:** Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. In *Prog. Neurobiol.*, Vol. 54, No. 5, pp. 581–618.

18. **Sarchielli, P., Greco, L., Floridi, Ard., Floridi, Ale., Gallai, V., 2003:** Excitatory amino acids and multiple sclerosis. In *Arch. Neurol.*, Vol. 60, No. 8, pp. 1082–1088.

19. **Spreux-Varoquaux, O., Bensimon, G., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P. F., Le Forestier, N. et al., 2002:** Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. In *J. Neurol. Sci.*, Vol. 193, No. 2, pp. 73–78.

20. **Storm-Mathisen, J., Danbolt, N. C., Rothe, F., Torp, R., Zhang, N. et al, 1992:** Ultrastructural immunocytochemical observations on the localization, metabolism and transport in normal and ischemic brain tissue. In *Prog. Brain Res.*, Vol. 94, pp. 225–241.

21. **Stover, J. F., Lowitzsch, K., Kempfski, O. S., 1997:** Cerebrospinal fluid hypoxanthine, xanthine and uric acid levels may reflect glutamate-mediated excitotoxicity in different neurological diseases. In *Neurosci. Lett.*, Vol. 238, No. 1–2, pp. 25–28.

22. **Tajouri, L., Mellick, A. S., Ashton, K. J., Tannenberg, A. E., Nagra, R. M., Tourtellotte, W. W., Giffiths, L. R., 2003:** Quantitative and qualitative changes in gene expression patterns characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. In *Brain Res. Mol. Brain Res.*, Vol. 119, No. 2, pp. 170–183.

23. **Yi, J. H., Hazell, A. S., 2006:** Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. In *Neurochem. Int.*, Vol. 48, No. 5, pp. 394–403.

PROTEOMICKÁ ANALÝZA MOČU A MOČOVÝCH EXOZÓMOV

BENCKOVÁ, M., SABO, J.

Ústav lekárskej a klinickej biofyziky
UPJŠ LF, Trieda SNP 1, 040 01 Košice

e-mail: jan.sabo@upjs.sk

ABSTRAKT

Proteomika, zaoberajúca sa štúdiom proteínov prítomných v telesných tkanivách a tekutinách, si v súčasnej dobe získava čoraz väčšiu pozornosť, pretože množstvo a typ proteínov nachádzajúcich sa v telesných tkanivách a tekutinách odzrkadľuje fyziologické resp. patofyziologické podmienky v organizme. Záujem o proteomickú analýzu moču v posledných rokoch neustále rastie, pretože na rozdiel od telesných tkanív a iných telesných tekutín, môže byť moč získavaný neinvazívnym spôsobom, vo veľkých množstvách a jeho odber sa dá veľmi ľahko zopakovať. Veľký záujem sa začína venovať aj proteomickej analýze exozómov, pretože proteíny obsiahnuté v týchto malých vezikulách môžu byť potenciálnymi biomarkermi nielen ochorení obličiek a urogenitálneho traktu ale aj rôznych distálnych orgánov.

Kľúčové slová: proteomika, biomarker, moč, exozómy,

ABSTRACT

Proteomics, dealing with the study of proteins present in body tissues and fluids, is gaining more and more attention because the amount and type of proteins found in body tissues and fluids reflect physiological or pathophysiological conditions in the organism. In recent years the interest about proteomic analysis of urine is growing because unlike body tissues and other body fluids, urine can be obtained non-invasively, in large quantities and its collection can be easily repeated. Great interest has started to focus on the proteomic analysis of exosomes because proteins present in these small vesicles may be potential biomarkers of kidney diseases and diseases of urogenital tract as well as various diseases of distal organs.

Key words: proteomics, biomarker, urine, exosomes

ÚVOD

Proteomika je vedná disciplína, ktorá sa zaoberá štúdiom proteínov, ktoré sú prítomné

v rôznych tkanivách a telesných tekutinách v určitom čase a za určitých podmienok (Barbosa a kol., 2012; Mauri a Scigelova, 2009). Každá bunka prítomná v živých organizmoch vytvára tisícky proteínov, ktorých súbor sa označuje ako proteóm (Ali a kol., 2010). Proteóm je časovo a bunkovo špecifický a zahŕňa všetky proteíny prítomné v bunke v danom čase, vrátane proteínových izoformiem a rovnako aj ko- a post-translačne modifikované formy proteínov (Neverova a Van Eyk, 2005). Množstvo a typ prítomných proteínov sa mení s fyziologickým stavom bunky alebo tkaniva v ktorom sa proteíny nachádzajú (Mitulović a Mechtler, 2006). Zmeny v koncentráciách a štruktúrach proteínov pravdepodobne odzrkadľujú zmeny v ochorení, a tým sa proteíny stávajú atraktívnymi kandidátmi v procese objavovania biomarkerov (Zhao a Lin, 2014).

Biomarkery sú biologické molekuly, ktoré môžu byť sledované kvôli zisteniu prítomnosti alebo absencie patologických procesov. Ideálny tumorový marker by mal mať vysokú citlivosť a špecifitu, mal by byť praktický, finančne nenáročný a minimálne invazívny na testovanie. Avšak nie je možné aby jeden biomarker spĺňal všetky ideálne kritériá a preto môže byť nevyhnutné použitie viacerých biomarkerov na detekciu ochorenia (Larkin a kol., 2010). V budúcnosti by ciele proteomická analýza mala umožňovať rýchlu verifikáciu a validáciu biomarkerov aplikovaných na dostatočne veľkú skupinu vzoriek, ktorá je potrebná v rozsiahlych klinických štúdiách (Mauri a Scigelova, 2009).

Cieľom proteomiky je komplexná identifikácia proteínov, ktoré poskytujú pohľad do bunkových signálnych ciest ochorení a napomáha pri objavovaní nových biomarkerov, ktoré by boli prospešné pri skorej detekcii ochorenia, pri určovaní prognózy a predpovedaní odpovedí organizmu na špecifickú liečbu. Skorá diagnostika ochorenia je neraz rozhodujúca pre zvýšenie miery prežitia pacientov a objavovanie špecifických biomarkerov môže byť preto používané pri zlepšovaní presnosti klinickej diagnózy (Zhao a Lin, 2014).

V posledných rokoch sa proteomika čoraz viac sústreďuje na objavovanie potenciálnych biomarkerov ochorení v telových tekutinách, pretože v porovnaní s analýzou tkanív, analýza biologických tekutín poskytuje možnosť pracovať s väčšími množstvami vzoriek, ktoré sú získavané neinvazívnymi alebo menej invazívnymi postupmi (Pin a kol., 2013). Preto sledovanie biomarkerov ochorení v telových tekutinách, ktoré sú získavané neinvazívnym spôsobom, sa javí byť dobrou alternatívou pre možný skrining (Hessels a Schalken, 2013).

Komplexnosť proteómu a veľký dynamický koncentračný rozsah proteínov v biologickej vzorke predstavujú problém pri proteomickej analýze. Na odkrytie proteínov prítomných v komplexných vzorkách v malých množstvách je potrebná separácia proteínov najčastejšie prostredníctvom metód jedno- a dvoj- rozmernej gélovej elektroforézy alebo metód kvapalinovej chromatografie (Mauri a Scigelova, 2009). Na identifikáciu rozseparovaných proteínov prítomných v biologickej vzorke sa najčastejšie používa hmotnostná spektrometria. Viacero identifikovaných proteínov má často potenciál biomarkerov ochorení (Barbosa a kol., 2012).

PROTEOMICKÁ ANALÝZA MOČU

Moč je pravdepodobne druhá najvýznamnejšia telová tekutina po krvi, ktorá sa využíva vo všeobecných proteomických štúdiách (Thongboonkerd, 2007 a). Moč je veľmi atraktívny zdroj potenciálnych klinických biomarkerov, pretože vzorky moču sú získavané neinvazívnym spôsobom, vo veľkých množstvách a sú stabilnejšie ako vzorky tkanív alebo krvi (Giusti a Dolo, 2014; Mistry a kol., 2013). Proteomická analýza moču poskytuje pohľad nielen na biologické procesy prebiehajúce v rámci obličiek a urogenitálneho traktu, ale vzhľadom ku glomerulárnej filtrácii krvi môžu byť v ňom identifikované aj cirkulujúce biomarkery (Mistry a kol., 2013). Proteíny prítomné v moči boli použité ako markery pre ochorenia

obličiek (diabetickej nefropatie, akútneho poškodenia obličiek, obštruktívnej nefropatie), urogenitálneho traktu (karcinómu prostaty, karcinómu močového mechúra), rovnako ako aj pre ochorenia distálnych, periférnych orgánov, akými sú mozog a črevá (Kentsis a kol., 2009; Marimuthu a kol., 2011). Okrem kvantitatívnych zmien v exkrécii močových proteínov, niektoré obličkové alebo systémové ochorenia môžu zapríčiniť aj kvalitatívne zmeny vo vylučovaní močových proteínov (Thongboonkerd, 2007 b). Analýza proteómu moču môže byť takto použitá pri diagnostike ochorenia, liečebnom sledovaní a pri prognóze (Sun a kol., 2005).

Pretože zbieranie moču je neinvazívne, záujem lekárskej spoločnosti sa sústreďuje na používanie moču ako diagnostického prostriedku pre identifikáciu proteínových a peptidových biomarkerov (Khan a Packer, 2006). Nanešťastie existuje niekoľko bariér, ktoré brzdia úspech v tejto oblasti a analýza proteómu moču nie je jednoduchou úlohou, pretože moč obsahuje nízku koncentráciu proteínov, vysoké množstvo solí alebo iných interferujúcich zložiek a najdôležitejšie, je charakterizovaný vysokým stupňom intra- aj inter- individuálnej variability. Napriek tomu, proteomika moču je jednou z najatraktívnejších sub-disciplín v klinickej proteomike (Thongboonkerd, 2007 c). Hlavnými cieľmi nedávnych močových proteomických štúdií sú: 1. charakterizácia normálneho močového proteómu (snaha identifikovať všetky typy a tvary močových proteínov) a zhotovenie mapy proteómu moču, 2. objavovanie biomarkerov a diagnostika ochorení a 3. lepšie pochopenie (patofyziológie obličiek (Thongboonkerd, 2007 b).

Zloženie moču nie je konštantné a koncentrácia proteínov prítomných v moči sa môže meniť a pohybovať sa od mg/L až g/L v závislosti od času odberu vzorky, stravy, cvičenia a zdravotného stavu. Taktiež je veľmi dôležité spomenúť dennú intra- a inter- individuálnu variabilitu proteómu moču (Rodríguez-Suárezová a kol., 2014). Molina a kol. vo svojej práci poukázali na skutočnosť, že popri „verejnom“

proteóme moču, ktorý je spoločný u zdravých jedincov súčasne ko-existuje „súkromný“ močový proteóm, ktorý je viac špecifický pre každého jedinca (Molina a kol., 2011).

Komplexnosť močového proteómu sa rýchlo rozvíja s vývojom MS metód a doteraz bolo detegovaných viac ako 3500 proteínov, ktoré boli vylučované za rôznych podmienok (Mistry a kol., 2013).

CHARAKTERISTIKA EXOZÓMOV A INÝCH EXTRACELULÁRNÝCH VEZIKÚL

Eukaryotické bunky okrem intracelulárnych organel obsahujú aj extracelulárne organely (vezikuly), ktoré sú uvoľňované do extracelulárneho priestoru a medzi ktoré patria exozómy, ektozómy a apoptické pluzgieriky. Tieto rôzne typy extracelulárnych vezikúl sa navzájom od seba líšia mechanizmom, ktorým sú uvoľňované do extracelulárneho priestoru (Mathivanan a kol., 2010; Akers a kol., 2013). V tabuľke 1 sa nachádza prehľad vlastností jednotlivých extracelulárnych vezikúl.

Exozómy sú malé vezikuly (priemer 30-100 nm) endozomálneho pôvodu, ktoré sú uvoľňované do extracelulárneho priestoru rozmanitými typmi buniek za fyziologických aj patofyziologických podmienok (Fang a kol., 2013; Dimov a kol., 2009). Tieto nanovezikuly sú prítomné v širokom rozsahu telových tekutín, ako je moč, plazma, sliny, materské mlieko, synoviálna tekutina, plodová voda a v mnohých ďalších (Fang a kol., 2013; Moon a kol., 2011). Exozómy sú zložené z lipidovej dvojvrstvy s transmembránovými proteínmi a z hydrofilného jadra, ktoré obsahuje proteíny, mRNA a mikroRNA (miRNA) (Fang a kol., 2013). Proteomická analýza exozómov sa čoraz častejšie stáva cieľom viacerých výskumných skupín, pretože proteíny prítomné v exozómoch môžu byť potenciálnymi biomarkermi rôznych ochorení.

TAB. 1. VLASTNOSTI EXTRACELULÁRNYCH VEZIKÚL
(Akers a kol., 2013; Fang a kol., 2013; Mathivanan a kol., 2010; Moon a kol., 2011)

Vlastnosť	Exozómy	Ektozómy	Apoptické pluzgieriky
veľkosť (priemer)	30–100 nm	100–1000 nm	500–4000 nm
morfológia	homogénne – v tvare pohára	heterogénne-rôzne tvary	heterogénne
spôsob uvoľnenia do extracelulárneho priestoru	regulovaný	regulovaný	regulovaný
zloženie	proteíny, lipidy, mRNA, mikroRNA	proteíny, mRNA, mikroRNA	proteíny, mRNA, mikroRNA, DNA
proteínové markery	Alix, TSG101, HSC70, CD63, CD81, CD9	selektíny, integríny, CD40, metaloproteinázy	históny, annexin V, trombospondin

Biogenéza exozómov

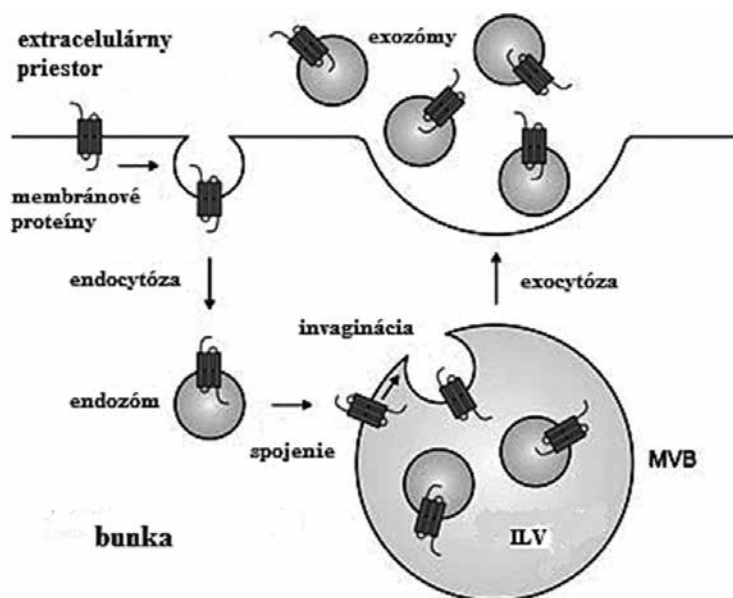
Mechanizmus vylučovania exozómov môže byť popísaný niekoľkými krokmi. V prvom kroku procesu, apikálne membránové proteíny podliehajú endocytóze. V druhej fáze je endozóm nasmerovaný do multivezikulárnej organely (MVB). Signál, ktorý má na starosti označovanie plazmatických membránových proteínov pre ich začlenenie do MVB je monoubiquitinácia. V tretej fáze sa endozóm spája s MVB. Následne sú apikálne plazmatické membránové proteíny segregované vo vonkajšej membráne MVB a následne sú internalizované membránovou invagináciou. V tejto fáze vznikajúce intralumenálne vezikuly (ILV) zachytávajú proteíny, mRNA a mikroRNA cytoplazmy bunky. V poslednej fáze sa vonkajšia membrána MVB spája s apikálnou plazmatickou membránou a dochádza k uvoľneniu ILV, ktoré sa po uvoľnení do priestoru moču nazývajú exozómy. Exozómy obsahujú membránové aj cytosolické proteíny bunky (Hoorn a kol., 2005; Moon a kol., 2011; Mathivanan a kol., 2010). Mechanizmus tvorby a uvoľňovania exozómov z buniek je zobrazený na obrázku 1.

Zloženie exozómov závisí od pôvodnej bunky. Avšak, všetky exozómy obsahujú ur-

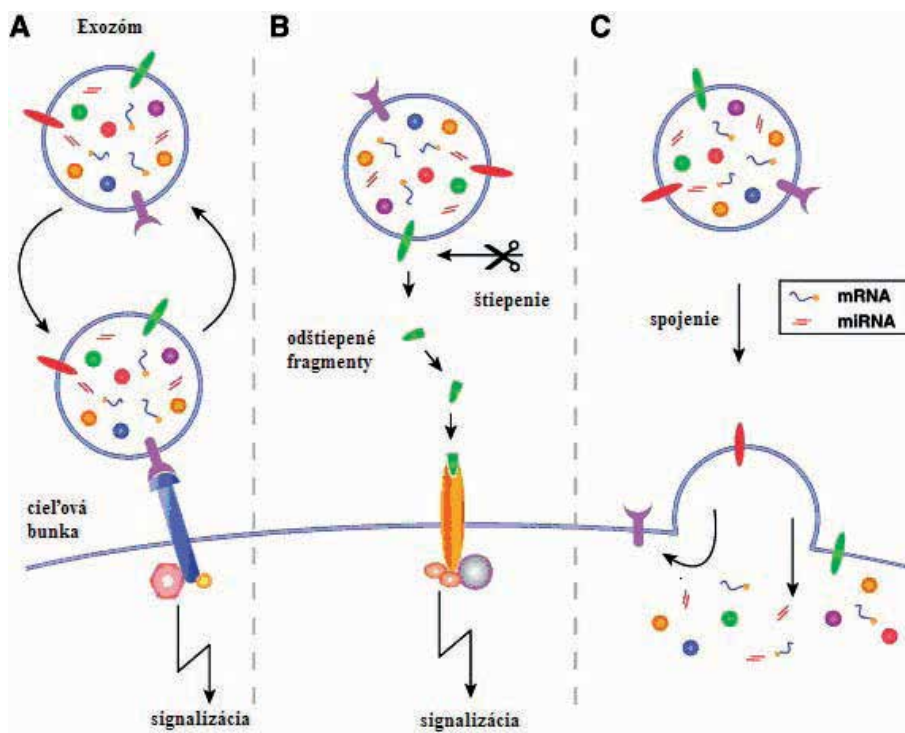
čité množstvo spoločných proteínov, medzi ktoré patria CD63, CD9, Alix a TSG101. Alix a TSG101 sú cytosolické proteíny zapojené v multivezikulárnej endozomálnej biogenéze. CD63 a CD9 sú molekuly, ktoré sa zúčastňujú pri bunka-bunka adhézii a fúzii. V exozómoch taktiež boli objavené proteíny, ktoré sú špecifické pre konkrétne bunky a ktoré pravdepodobne odzrkadľujú biologickú funkciu rodičovskej bunky (Man a Flores, 2012; Chen a kol., 2013; Moon a kol., 2011).

Úloha exozómov v medzibunkovej komunikácii a ďalšie funkcie exozómov

Exozómy zohrávajú kľúčovú úlohu pri medzibunkovej komunikácii, pri ktorej dochádza k prenosu genetickej informácie z jednej bunky do druhej bunky (Fang a kol., 2013; Akers a kol., 2013; Valadi a kol., 2007). V súčasnosti je známych niekoľko mechanizmov, ktoré sa uplatňujú pri interakcii exozómov s cieľovými bunkami: **1)** exozomálne membránové proteíny môžu interagovať s receptormi cieľových buniek a tak vyvolať intracelulárnu signalizáciu; **2)** exozomálne membránové proteíny môžu byť rozštiepené protézami v extracelulárnom priestore a odštiepené fragmenty môžu potom vystupovať ako rozpustné ligandy, ktoré sa viažu na povrchový receptor cieľovej bunky.



Obr. 1. Mechanizmus tvorby a uvoľňovania exozómov z buniek (upravené podľa Hoorna a kol., 2005)



Obr. 2. Možné mechanizmy uplatňované pri medzibunkovej komunikácii sprostredkovanej exozómami (upravené podľa Mathivanana a kol., 2010)

Následne sa týmto mechanizmom aktivuje signálačná kaskáda v cieľovej bunke; 3) exozómy sa môžu spojiť s membránami cieľových buniek a uvoľnia svoj obsah do príjemcovskej bunky neselektívnym spôsobom. Povrchová

membrána cieľových buniek môže byť takto modifikovaná pridaním nových membránových receptorov (z membrán exozómov) a rôznych lipidov. Exozómové molekuly (proteíny, mRNA a mikroRNA) môžu následne aktivovať viacero

signalizačných udalostí v príjemcovskej cieľovej bunke (Mathivanan a kol., 2010; Camussi a kol., 2010). Spomenuté mechanizmy medzibunkovej komunikácie uskutočňovanej prostredníctvom exozómov sú znázornené na obrázku 2.

Exozómy taktiež zohrávajú dôležitú úlohu pri neklasickom spôsobe vylučovania rôznych fyziologicky dôležitých proteínov (napr. β -katenínu) a pri vylučovaní nepotrebných alebo poškodených proteínov. Exozómy uvoľňované bunkami imunitného systému zohrávajú dôležité úlohy v rámci normálneho imunitného systému ale aj pri tumorovej imunomodulácii, pretože exozómy sú schopné poskytovať antigény získané z patogénov alebo vykonávať imunosupresívne alebo cytotoxické funkcie. Patogény môžu využívať exozómy ako prostriedok medzibunkového šírenia a komunikácie, pretože exozómy sú schopné prenášať vírusové proteíny, ktoré môžu podporovať patogenézu alebo únik bunky z imunitného systému. Počas vývoja tumoru interagujú tumorové bunky so svojím okolitým mikroprostredím tak, že podporujú rast, prežitie a inváziu tumoru. Exozómy získané z tumorových buniek sú dôležitými sprostredkovateľmi mnohých týchto procesov, vrátane proliferácie tumorových buniek, angiogenézy, metastáz, prestavby strómy a modulácie imunitného systému (Fang a kol., 2013). Objavujúce sa údaje poukazujú aj na spojenie exozómov s rôznymi ochoreniami, vrátane zápalu, obličkových ochorení, Alzheimerovho ochorenia, bakteriálnych a vírusových infekcií a alergií (Man a Flores, 2012; Camussi a kol., 2010).

Proteomická analýza exozómov

Proteomická analýza exozómov moču (LC-MS/MS) identifikovala proteíny pochádzajúce z obličkových epitelií, konkrétne glomerulárnych podocytov (podocín, podokalyxín), proximálneho tubulu (napr. megalín, AQP1, γ -glutamyltransferáza), vzostupného ramena Henleho slučky (napr. THP, CD9), distálneho stočeného kanálíka a zberného kanálíka (napr.

AQP2, mucín-1). Navyše, boli identifikované aj vysoko abundantné proteíny pochádzajúce z prechodového epitelia močového mechúra (uroplakín-1 a uroplakín-2). Preto proteomická analýza moču môže potenciálne poskytovať pohľad na fyziologické alebo patofyziologické procesy prebiehajúce vo všetkých typoch epitelových buniek, ktoré sú súčasťou vylučovacej sústavy (Pisitkun a kol., 2004). Izolácia močových exozómov môže napomôcť analýze dôležitých látok, pretože zvyšuje koncentráciu močových proteínov, mRNA a miRNA, ktoré sú prítomné v moči v malých množstvách a ktoré majú potenciálny patofyziologický význam. Preto analýza močových exozómov môže poskytovať informácie o patofyziologickom stave buniek močového traktu (Fang a kol., 2013).

Exozómy izolované z moču môžu byť dobrým materiálom pre objavovanie biomarkerov ochorenia vylučovacej sústavy v klinických vzorkách vďaka ich atraktívnym charakteristikám ako je ich pôvod z buniek lemujúcich močový trakt, nízka komplexnosť proteínov a obsah cytosólických a membránových proteínov darcovských buniek. Avšak jedným z problémov s ktorým sa stretávame pri exozómoch je ten, že proteíny prítomné v exozómoch sa izolujú ťažšie v porovnaní s rozpustnými proteínmi prítomnými v moči (Moon a kol., 2011).

Metódy izolácie a čistenia exozómov

Na izoláciu močových exozómov sa najčastejšie používajú bežné metódy akými sú ultracentrifugácia alebo filtrácia, alebo kombinácia oboch metód. Väčšina štúdií využíva dvojkrokovú diferenciálnu centrifugáciu, pri ktorej sa v prvom kroku používa nízkorychlostná sekvenčná centrifugácia, pri ktorej dochádza k odstraňovaniu buniek a bunkových sutí (močový sediment) z moču, pričom exozómy zostávajú v supernatante. V druhom kroku sa použije ultracentrifugácia supernatantu pri 100 000-200 000 g rýchlosti, kedy dochádza k sedimentácii exozómov. Hlavnými nedostatkami tohto postupu je vysoká úroveň

kontaminácie spôsobená uromodulínom a nedostatočná separácia exozómov od ostatných EV a membránových častíc (Man a Flores, 2012). Taktiež sa na izoláciu exozómov veľmi často používa imunoizolácia, pri ktorej sa používajú magnetické guľičky s naviazanými protilátkami, ktoré sú špecifické pre proteíny nachádzajúce sa na exozómoch (imunoafinitný princíp) (Akers a kol., 2013; Mathivanan a kol., 2010).

Exozómy sú často znečistené inými membránovými vezikulami, akými sú ektozómy a apoptické pľuzgieriky (Mathivanan a kol., 2010; Akers a kol., 2013). Na získavanie čistejších frakcií močových exozómov je vzorka, ktorá je získaná po použití metódy dvojkrokovej diferenciálnej centrifugácie, ďalej spracovaná použitím sacharózovej gradientovej centrifugácie. Sacharózová gradientová centrifugácia môže byť vykonaná v lineárnych alebo v krokových gradientoch a typicky používané koncentrácie sacharózy sú v rozmedzí 2,0 M–0,25 M. Sacharózová gradientová centrifugácia takto vedie k lepšej separácii exozómov od vezikul s rôznymi hustotami (ektozómy, apoptické pľuzgieriky) v porovnaní s diferenciálnou centrifugačnou metódou. Avšak táto metóda nerieši problém súvisiaci s odstraňovaním uromodulínu (Man a Flores, 2012).

Uromodulín, nazývaný aj Tamm-Horsfallov glykoproteín (THP), je vylučovaný bunkami obličiek, konkrétne vzostupným ramenom Henleho slučky (Man a Flores, 2012; Pisitkun a kol., 2006). Uromodulín je najabundantnejším proteínom v moči a môže dosiahnuť koncentrácie až 1,5 mg/mL moču a jeho úlohou je chrániť močový trakt pred patogénmi a taktiež môže zohrávať úlohu pri potláčaní tvorby kameňov v presýtenom moči (Chen a kol., 2013; Pisitkun a kol., 2006). Uromodulín sa v moči zhromažďuje do intracelulárnych vlákien, ktoré majú tendenciu vytvárať trojrozmernú vláknovú sieť. Táto vláknová sieť zachytáva exozómy a zabraňuje ich účinnej izolácii a čisteniu pri používaní tradičných

metód a tak značne znižuje výťažnosť vzorky a reprodukovateľnosť analýzy (Man a Flores, 2012). Na depolymerizáciu a odstránenie uromodulínu môžu byť použité redukčné činidlá, akým je (Pisitkun a kol., 2006) ditiotreitól (DTT), ktorý redukuje intermolekulárne disulfidické väzby uromodulínu (Man a Flores, 2012), alebo CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) dimetylamonio]-1-propánsulfonát). CHAPS je jemnejším detergentom v porovnaní s DTT a je lepší v udržiavaní funkčnej proteínovej integrity (Musante a kol., 2012).

Na proteomickú analýzu exozómov pochádzajúcich z rôznych typov buniek a telových tekutín sa zvyknú používať hmotnostná spektrometria, Western blotting, fluorescenčne aktivované triedenie buniek, FACS s imunoznačením a imunoelektrónová mikroskopia (Mathivanan a kol., 2010; Man a Flores, 2012).

V poslednom čase badať veľký záujem o používanie močových exozómov v klinickej proteomike ako nový zdroj pri objavovaní biomarkerov: na skorú detekciu ochorenia, klasifikáciu, na predpovedanie závažnosti ochorenia, záverov a odpovede na liečbu. Používanie močových exozómov pri objavovaní biomarkerov má viacero dôležitých výhod: 1. izolácia exozómov redukuje komplexnosť proteómu moču, pretože napomáha minimalizovať vysokoabundantné proteíny v moči a tiež obohatiť sub-proteóm o proteíny, ktoré sú prítomné v exozómoch, 2. exozómy obsahujú dôležité informácie o rôznych typoch epitelových buniek močovej sústavy a môžu byť preto použité pri skúmaní fyziologických alebo patofyziologických procesov prebiehajúcich prakticky v každom type epitelových buniek, ktoré čelia močovému priestoru a 3. exozómy obsahujú mnoho proteínov spájaných s ochorením (biomarkery) a preto sa proteomický výskum močových exozómov stáva jedným z nových trendov v oblasti objavovania biomarkerov v moči (Hoorn a kol., 2005; Moon a kol., 2011).

SÚČASNÝ STAV PROTEOMICKEJ ANALÝZY MOČU A EXOZÓMOV

Súčasný stav analýzy proteómu moču

Prehľad doteraz najúspešnejších štúdií zaoberajúcich sa proteomickou analýzou moču, čo sa týka množstva identifikovaných proteínov, sa nachádza v tabuľke 2. Vo všetkých týchto štúdiách boli proteíny identifikované prostredníctvom hmotnostnej spektrometrie, pri ktorej bol použitý tandem 2 hmotnostných analyzátorov, LTQ-Orbitrap alebo LTQ-FT, ktoré sa prezentujú vysokým rozlíšením a hmotnostnou presnosťou.

Adachi a kol. vo svojej práci na separáciu a frakcionáciu proteínov použili jednorozmernú elektroforézu v polyakrylamidovom gély obsahujúcom dodecylsírany sodný a HPLC na reverzných fázach. Frakcionované proteíny boli štiepené v gély alebo v roztoku a vzniknuté peptidy boli analyzované s LTQ-FT a LTQ-Orbitrapom. Podarilo sa im identifikovať 1543 proteínov z moču 10 zdravých ľudských jedincov. Takmer polovica identifikovaných proteínov patrila podľa génovej ontológie (GO) k membránovým proteínom. Navyše boli v moči identifikované aj extracelulárne, lyzozomálne proteíny a proteíny plazmatickej membrány. Proteíny pochádzajúce z plazmatickej membrány buniek sú pravdepodobne prítomné v moči v exozómoch (Adachi a kol., 2006).

Li a kol. použili na identifikáciu proteómu a fosfoproteómu moču hmotnostný spektrometer s LTQ-Orbitrap analyzátorom a podarilo sa im identifikovať 1310 proteínov zo vzoriek zdravých ľudí. Táto práca rozšírila poznanie modifikácií močových proteínov a ich potenciálny biologický význam (Li a kol., 2010).

Marimuthu a kol. vykonali komplexnú analýzu proteómu ľudského moču zdravých jedincov. Na separáciu peptidov použili HPLC na reverzných fázach (C_{18}) s nano prietokom a na identifikáciu bol použitý hmotnostný spektrometer s ESI ionizáciou a s tandemom hmotnostných analyzátorov, konkrétne LTQ-Orbitrap. Dokopy sa im podarilo identifikovať 1823 proteínov, z ktorých 671 proteínov nebolo predtým identifikovaných v ľudskom moči. Vytvorili tak komplexný referenčný zoznam proteínov pre ďalšie štúdie, ktoré by sa zaoberali identifikáciou a charakterizáciou močových biomarkerov rôznych ochorení (Marimuthu a kol., 2011).

Kentsis a kol. rozšírili proteóm ľudského moču použitím rozsiahlej frakcionácie moču, pri ktorej použili ultracentrifugáciu, gélovú elektroforézu, iónovo-výmennú chromatografiu a chromatografiu na reverzných fázach a tým znížili komplexnosť zmesi. Na identifikáciu použili hmotnostný spektrometer s LTQ-Orbitrapom a podarilo sa im identifikovať 2362 proteínov v 12 vzorkách získaných od detí a mladých ľudí (1-18 rokov), pričom vzorky pochádzali od zdravých kontrolných

TAB. 2. PREHĽAD DOTERAZ NAJÚSPEŠNEJŠÍCH ŠTÚDIÍ TÝKAJÚCICH SA KOMPLEXNEJ PROTEOMICKEJ ANALÝZY MOČU

Výskumné skupiny	Počet identifikovaných proteínov	Použité proteomické postupy	Hmotnostný spektrometer
Kentsis a kol. (2009)	2362	SDS-PAGE-LC-MS/MS	LTQ-Orbitrap
Marimuthu a kol. (2011)	1823	LC-MS/MS	LTQ-Orbitrap
Adachi a kol. (2006)	1543	SDS-PAGE-LC-MS/MS	LTQ-Orbitrap a LTQ-FT
Li a kol. (2010)	1310	LC-MS/MS	LTQ-Orbitrap

jedincov, pacientov s akútnou apendicitídou a pacientov s abdominálnou bolesťou ale bez dôkazu apendicitídy (Kentsis a kol., 2009).

Na charakterizáciu proteómu ľudského moču bolo použitých viacero rôznych analytických postupov a metód a počet identifikovaných proteínov vo vzorkách moču zdravých ľudských jedincov postupne rástol.

Thongboonkerd a kolektív porovnávali vo svojej práci 2 metódy na izoláciu proteínov z moču zdravých ľudských jedincov: metódu zrážania proteínov acetónom a metódu ultracentrifugácie. Následne boli vyzolované proteíny separované dvojrozmernou polyakrylamidovou gélovou elektroforézou (2D-PAGE) a na identifikáciu proteínov bola použitá hmotnostná spektrometria (MALDI-TOF). Celkovo sa im podarilo identifikovať 67 proteínových foriem

47 unikátnych proteínov pričom zistili, že pri zrážaní acetónom dochádzalo prednostne k zrážaniu kyslých a hydrofilných proteínov, zatiaľ čo pri ultracentrifugácii dochádzalo skôr k frakcionácii zásaditých, hydrofóbných a membránových proteínov (Thongboonkerd a kol., 2002).

Smith a kol. opísali metódu pre spracovanie vzoriek moču pre dvojrozmernú gélovú elektroforézu. Pri príprave vzoriek moču použili SPE kolóny. 2D gély vytvorené pri tejto metóde boli vysoko kvalitné a bolo detegovaných takmer 500 spotov. Na identifikáciu rozseparovaných proteínov bola použitá hmotnostná spektrometria (MALDI-TOF/TOF) a podarilo sa im identifikovať takmer 50 proteínov, ktoré ponúkli pohľad na proteóm moču zdravých ľudí (Smith a kol., 2005).

TAB. 3. PREHLAD ŠTÚDIÍ ZAOBERAJÚCICH SA OBJAVOVANÍM BIOMARKEROV OCHORENÍ V MOČI

Ochorenie	Použitá základná analytická metóda	Referencie
<i>Akútne poškodenie obličiek</i>	2DE	Varghese a kol. (2010)
	CE-MS	Metzger a kol. (2010)
<i>Diabetická nefropatia</i>	CE-MS	Zürbigová a kol. (2012)
	MALDI-MS	Lapollová a kol. (2009)
<i>IgA nefropatia</i>	2DE	Rocchettiová a kol. (2008)
<i>Urolitiáza</i>	LC-MS/MS	Wright a kol. (2011)
<i>Karcinóm močového mechúra</i>	2D-DIGE	Li a kol. (2012)
	LC-MS/MS	Yang a kol. (2011)
	CE-MS	Schiffer a kol. (2009)
<i>Karcinóm prostaty</i>	2DE	Kiprijanovská a kol. (2014)
	2D-DIGE	Davaliyevová a kol. (2015)
<i>Mozgová príhoda</i>	CE-MS	Dawson a kol. (2012)
<i>Preeklampsia</i>	CE-MS	Carty a kol. (2011)
<i>Akútna apendicitída u detí</i>	LC-MS/MS	Kentsis a kol. (2010)
<i>Ochorenie koronárnej artérie</i>	CE-MS	Delles a kol. (2010)

Sun a kol. vo svojej práci použili na charakterizáciu proteómu moču zdravých jedincov tri rôzne metódy: 1D SDS-PAGE separáciu za ktorou nasledovala RPLC-MS/MS, 1D LC-MS/MS (RP) a 2D LC-MS/MS (SCX-RP). Celkovo sa im podarilo identifikovať 226 proteínov (Sun a kol., 2005).

Tyan a kol. použili pri príprave vzoriek moču zdravých jedincov rôzne čistiace metódy a na separáciu a identifikáciu proteínov prítomných v moči bola použitá RP-HPLC s nano prietokom, ktorá bola napojená na hmotnostný spektrometer s ESI ionizáciou a ako analyzátor bola použitá iónová pasca. Podarilo sa im pozorovať 2283 peptidov, ktoré odpovedali 311 unikátnym proteínom (Tyan a kol., 2006).

Khan a Packer vyvinuli jednoduchú a účinnú metódu na prípravu vzoriek moču pre dvojrozmernú gélovú elektroforézu, ktorá zahŕňala zrážanie proteínov so súčasným odsolovaním. Ak sa na zrážanie použil acetonitril, vznikali 2D mapy, ktoré mali najvyššie rozlíšenie a najväčší počet proteínových spotov v porovnaní s inými organickými rozpúšťadlami. Táto metóda bola použitá na sledovanie zmien v proteóme moču počas 6 týždňov a na vytvorenie referenčnej mapy zdravého jedinca. Celkovo sa im podarilo identifikovať 339 proteínov zo 159 génov vo vzorke moču zdravého muža použitím metódy odtlačku prsta (MALDI-TOF) (Khan a Packer, 2006).

V súčasnej dobe sa pozornosť vedeckej spoločnosti sústreďuje na štúdium proteómu moču s cieľom identifikovať a validovať biomarkery rôznych ochorení. V tabuľke 3 sa nachádza prehľad niektorých štúdií, ktoré sa venovali objavovaniu biomarkerov obličkových, urogenitálnych a neurogenitálnych ochorení.

Súčasný stav proteomickej analýzy exozómov

Prvá zmienka o exozómoch bola zaznamenaná v roku 1983 Johnstonovou a jej kolegami, ktorí zistili, že pri dozrievaní retikulocytov z oviec dochádza k selektívnemu uvoľňovaniu transferínového receptora a ďalších membrá-

nových proteínov v cirkulujúcich vezikulách získaných z multivezikulárnej organely bunky a tieto cirkulujúce vezikuly nazvali exozómy (Pan a Johnstonová, 1983; Lin a kol., 2015).

Exozómy prítomné v moči boli prvýkrát identifikované Pisitkunom a jeho spolupracovníkmi v roku 2004. Pisitkun a kol. použili na izoláciu exozómov z moču diferenciálnu centrifugáciu a na proteomickú analýzu exozómov použili imunoelektrónovú mikroskopiu a LC-MS/MS a dokázali, že aquaporín-2 (AQP2) a iné apikálne plazmatické membránové proteíny sú vylučované z buniek v exozómoch. Celkovo sa im podarilo identifikovať 295 proteínov a niektoré z týchto proteínov boli spájané so špecifickými renálnymi ochoreniami alebo s reguláciou krvného tlaku. Táto štúdia poukazuje na potenciál použitia exozómov izolovaných z moču pri objavovaní biomarkerov ochorení (Pisitkun a kol., 2004).

Gonzalesová a kol. na analýzu proteómu exozómov z ľudského moču použili LC-MS/MS s LTQ hmotnostným analyzátorom a podarilo sa im identifikovať 1132 proteínov. Taktiež svoju prácu rozšírili o fosfoproteomickú analýzu. Na demonštrovanie potenciálneho využitia analýzy exozómov na identifikáciu genetického renálneho ochorenia, Gonzalesová a kolektív vykonali imunoblotting exozómov získaných zo vzoriek moču pacientov s klinickou diagnózou Bartterovho syndrómu typu I a pozorovali absenciu Na-K-Cl kotransportéra (NKCC2) u pacientov s týmto ochorením v porovnaní so vzorkami moču získaných od zdravých jedincov (Gonzalesová a kol., 2009).

Alvarezová a kol. sa usilovali nájsť najlepšie metódy pre izoláciu exozómov z moču zdravých jedincov pre proteomickú analýzu a RNA profilovanie. V práci porovnali účinnosť 6 rôznych protokolov, z ktorých tri boli založené na ultracentrifugácii, jeden protokol využíval nanomembránový ultrafiltračný koncentrátor a dva protokoly používali komerčný reagent pre zrážanie exozómov. Najväčší výťažok exozómov bol získaný pri použití nimi modifikovaného protokolu pre zrážanie exozómov a táto me-

tóda poskytla najväčšie množstvá mikroRNA a mRNA a preto je táto metóda najvhodnejšia pre sekvenčné RNA profilovanie. Dva protokoly založené na použití ultracentrifugačných metód boli lepšou voľbou pri izolácii exozómov pre proteomickú analýzu v porovnaní s ich modifikovaným protokolom pre zrážanie exozómov a na záver zhodnotili, že tento nimi modifikovaný protokol môže poskytovať jednoduchú, rýchlu a účinnú alternatívu pre izoláciu exozómov a môže uľahčiť identifikáciu exozomálnych biomarkerov prítomných v moči (Alvarezová a kol., 2012).

Wang a kolektív vykonali proteomickú analýzu močových exozómov metódou viacrozmernej proteínovej identifikačnej technológie (MudPIT) a porovnávali štiepenie proteínov trypsínom v roztoku s trifluóretanolom (TFE) so štiepením proteínov trypsínom v gély. Celkovo sa im podarilo identifikovať 3280 proteínov vo vzorkách 9 zdravých ľudských jedincov. Táto práca poskytla veľmi cenné informácie o proteínoch prítomných v exozónoch v ľudskom moči a poskytla hodnotný referenčný materiál pre budúce štúdie (Wang a kol., 2012).

ZÁVER

Moderné a neustále sa vyvíjajúce proteomické metódy nám poskytujú obrovské množstvo informácií o proteónoch telových tekutín a tkanív. Ochorenia sú často objavované v pokročilých štádiách kvôli nedostatočnej citlivosti a špecificity biomarkerov. Skorá diagnostika ochorenia je neraz rozhodujúca pre zvýšenie šance na prežitie pacienta a preto je potrebné venovať pozornosť objavovaniu nových biomarkerov ochorení. Pretože sa choroba často prejavuje kvalitatívnymi a kvantitatívnymi zmenami proteínov, význam proteomickej analýzy klinických vzoriek neustále rastie. V nasledujúcich rokoch by mala proteomika zaznamenať ďalší vývoj nielen čo sa týka vylepšenia metód prípravy biologických vzoriek a prístrojového vybavenia ale aj pri objavovaní nových biomarkerov,

ktoré by našli svoje uplatnenie pri diagnostike a prognóze ochorenia v klinickej praxi.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla s podporou projektu so štrukturálneho fondu EÚ: Kompetenčné centrum pre výskum a vývoj v oblasti diagnostiky a terapie onkologických ochorení, ITMS: 26220220153 (100 %).

LITERATÚRA

1. **ADACHI, J. et al.:** The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. In *Genome biology*, 2006, Vol. 7, No. 9, article R80.
2. **AKERS, J.C. et al.:** Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. In *Journal of neuro-oncology*, 2013, Vol. 113, No. 1, p. 1–11.
3. **ALI, I. et al.:** Separation of biological proteins by liquid chromatography. In *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2010, Vol. 18, No. 2, p. 59–73.
4. **ALVAREZ, M.L. et al.:** Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. In *Kidney International*, 2012, Vol. 82, No. 9, p. 1024–1032.
5. **BARBOSA, E.B. et al.:** Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. In *Revista da Associação Médica Brasileira*, 2012, Vol. 58, No. 3, p. 366–375.
6. **CAMUSSI, G. et al.:** Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. In *Kidney international*, 2010, Vol. 78, No. 9, p. 838–848.
7. **CARTY, D.M. et al.:** Urinary proteomics for prediction of preeclampsia. In *Hypertension*, 2011, Vol. 57, No. 3, p. 561–569.
8. **DAVALIEVA, K. et al.:** Proteomics analysis of urine reveals acute phase response proteins as candidate diagnostic biomarkers for prostate cancer. In *Proteome science*, 2015, Vol. 13, No. 1.

9. **DAWSON, J. et al.:** Urinary proteomics to support diagnosis of stroke. In *PloS one*, 2012, Vol. 7, No. 5, e35879.
10. **DELLES, C. et al.:** Urinary proteomic diagnosis of coronary artery disease: identification and clinical validation in 623 individuals. In *Journal of hypertension*, 2010, Vol. 28, No. 11, p. 2316–2322.
11. **DIMOV, I. et al.:** Urinary exosomes. In *The Scientific World Journal*, 2009, Vol. 9, p. 1107–1118.
12. **FANG, D. Y. et al.:** Exosomes and the kidney: Blaming the messenger. In *Nephrology*, 2013, Vol. 18, No. 1, p. 1–10.
13. **GIUSTI, I., DOLO, V.:** Extracellular vesicles in prostate cancer: new future clinical strategies? In *BioMed Research International*, 2014, Vol. 2014.
14. **GONZALES, P. A. et al.:** Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. In *Journal of the American Society of Nephrology*, 2009, Vol. 20, No. 2, p. 363–379.
15. **HESSELS, D., SCHALKEN, J. A.:** Urinary biomarkers for prostate cancer: a review. In *Asian Journal of Andrology*, 2013, Vol. 15, No. 3, p. 333–339.
16. **HOORN, E. J. et al.:** Prospects for urinary proteomics: Exosomes as a source of urinary biomarkers. In *Nephrology*, 2005, Vol. 10, No. 3, p. 283–290.
17. **CHEN, C. Y. et al.:** Purification of exosome-like vesicles from urine. In *Methods in enzymology*, 2013, Vol. 524, p. 225–241.
18. **KENTZIS, A. et al.:** Discovery and validation of urine markers of acute pediatric appendicitis using high-accuracy mass spectrometry. In *Annals of emergency medicine*, 2010, Vol. 55, No. 1, p. 62–70.
19. **KENTZIS, A. et al.:** Urine proteomics for profiling of human disease using high accuracy mass spectrometry. In *PROTEOMICS-Clinical Applications*, 2009, Vol. 3, No. 9, p. 1052–1061.
20. **KHAN, A., PACKER, N. H.:** Simple urinary sample preparation for proteomic analysis. In *Journal of proteome research*, 2006, Vol. 5, No. 10, p. 2824–2838.
21. **KIPRIJANOVSKA, S. et al.:** Mapping and identification of the urine proteome of prostate cancer patients by 2D PAGE/MS. In *International journal of proteomics*, 2014, Vol. 2014.
22. **LAPOLLA, A. et al.:** Low molecular weight proteins in urines from healthy subjects as well as diabetic, nephropathic and diabetic-nephropathic patients: a MALDI study. In *Journal of mass spectrometry*, 2009, Vol. 44, No. 3, p. 419–425.
23. **LARKIN, S. E. T. et al.:** Proteomics in prostate cancer biomarker discovery. In *Expert Rev. Proteomics*, 2010, Vol. 7, No. 1, p. 93–102.
24. **LI, Q. R. et al.:** A comprehensive and non-prefractionation on the protein level approach for the human urinary proteome: touching phosphorylation in urine. In *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2010, Vol. 24, No. 6, p. 823–832.
25. **LI, F. et al.:** Identification of urinary Gc-globulin as a novel biomarker for bladder cancer by two-dimensional fluorescent differential gel electrophoresis (2D-DIGE). In *Journal of proteomics*, 2012, Vol. 77, p. 225–236.
26. **LIN, J. et al.:** Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis. In *Scientific World Journal*, 2015, Vol. 2015.
27. **MAN, T. K., FLORES, R. J.:** *Proteomics – Human Diseases and Protein Functions*. Rijeka: InTech, 2012. 450 p. ISBN 978-953-307-832-8.
28. **MARIMUTHU, A. et al.:** A comprehensive map of the human urinary proteome. In *Journal of proteome research*, 2011, Vol. 10, No. 6, p. 2734–2743.
29. **MATHIVANAN, S. et al.:** Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. In *Journal of proteomics*, 2010, Vol. 73, No. 10, p. 1907–1920.
30. **MAURI, P., SCIGELOVA, M.:** Multidimensional protein identification technology for clinical proteomic analysis. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2009, Vol. 47, No. 6, p. 636–646.
31. **METZGER, J. et al.:** Urinary excretion of twenty peptides forms an early and accurate diagnostic pattern of acute kidney injury. In *Kidney International*, 2010, Vol. 78, No. 12, p. 1252–1262.
32. **MISTRY, H. D. et al.:** Urine protein concentration estimation for biomarker discovery. In *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, 2013, Vol. 3, No. 4, p. 211–214.

- 33. MITULOVIĆ, G., MECHTLER, K.:** HPLC techniques for proteomics analysis — a short overview of latest developments. In *Briefings in functional genomics & proteomics*, 2006, Vol. 5, No. 4, p. 249–260.
- 34. MOLINA, L. et al.:** Analysis of the variability of human normal urine by 2D-GE reveals a „public“ and a „private“ proteome. In *Journal of proteomics*, 2011, Vol. 75, No. 1, p. 70–80.
- 35. MOON, P. G. et al.:** Urinary exosomes and proteomics. In *Mass spectrometry reviews*, 2011, Vol. 30, No. 6, p. 1185–1202.
- 36. MUSANTE, L. et al.:** Biochemical and physical characterisation of urinary nanovesicles following CHAPS treatment. In *PloS one*, 2012, Vol. 7, No. 7, e37279.
- 37. NEVEROVA, I., VAN EYK, J. E.:** Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. In *Journal of Chromatography B*, 2005, Vol. 815, No. 1, p. 51–63.
- 38. PAN, B. T., JOHNSTONE, R. M.:** Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor. In *Cell*, 1983, Vol. 33, No. 3, p. 967–978.
- 39. PIN, E. et al.:** The role of proteomics in prostate cancer research: Biomarker discovery and validation. In *Clinical biochemistry*, 2013, Vol. 46, No. 6, p. 524–538.
- 40. PISITKUN, T. et al.:** Discovery of urinary biomarkers. In *Molecular & Cellular proteomics*, 2006, Vol. 5, No. 10, p. 1760–1771.
- 41. PISITKUN, T. et al.:** Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, Vol. 101, No. 36, p. 13368–13373.
- 42. ROCCHETTI, M. T. et al.:** Urine protein profile of IgA nephropathy patients may predict the response to ACE-inhibitor therapy. In *Proteomics*, 2008, Vol. 8, No. 1, p. 206–216.
- 43. RODRÍGUEZ-SUÁREZ, E. et al.:** Urine as a source for clinical proteome analysis: From discovery to clinical application. In *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, Vol. 1844, No. 5, p. 884–898.
- 44. SCHIFFER, E. et al.:** Prediction of muscle-invasive bladder cancer using urinary proteomics. In *Clinical Cancer Research*, 2009, Vol. 15, No. 15, p. 4935–4943.
- 45. SMITH, G. et al.:** Development of a high-throughput method for preparing human urine for two-dimensional electrophoresis. In *Proteomics*, 2005, Vol. 5, No. 9, p. 2315–2318.
- 46. SUN, W. et al.:** Human urine proteome analysis by three separation approaches. In *Proteomics*, 2005, Vol. 5, No. 18, p. 4994–5001.
- 47. THONGBOONKERD, V. et al.:** Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. In *Kidney International*, 2002, Vol. 62, No. 4, p. 1461–1469.
- 48. THONGBOONKERD, V.:** *Proteomics of human body fluids: Principles, Methods, and Applications*. 1st ed. Totowa: Humana Press, 2007 a. 553 p. ISBN 978-1-58829-657-3.
- 49. THONGBOONKERD, V.** Recent progress in urinary proteomics. In *Proteomics-Clinical Applications*, 2007 b, Vol. 1, No. 8, p. 780–791.
- 50. THONGBOONKERD, V.:** Practical points in urinary proteomics. In *Journal of proteome research*, 2007 c, Vol. 6, No. 10, p. 3881–3890.
- 51. TYAN, Y. C. et al.:** Proteomic profiling of human urinary proteome using nano-high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. In *Analytica chimica acta*, 2006, Vol. 579, No. 2, p. 158–176.
- 52. VALADI, H. et al.:** Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. In *Nature cell biology*, 2007, Vol. 9, No. 6, p. 654–659.
- 53. VARGHESE, S. A. et al.:** Identification of diagnostic urinary biomarkers for acute kidney injury. In *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research*, 2010, Vol. 58, No. 4, p. 612–620.
- 54. WANG, Z. et al.:** Proteomic analysis of urine exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). In *Proteomics*, 2012, Vol. 12, No. 2, p. 329–338.
- 55. WRIGHT, C. A. et al.:** Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins influencing urolithiasis. In *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, Vol. 10, No. 8, M110.005686.

56. YANG, N. et al.: Urinary glycoprotein biomarker discovery for bladder cancer detection using LC/MS-MS and label-free quantification. In *Clinical Cancer Research*, 2011, Vol. 17, No. 10, p. 3349–3359.

57. ZHAO, Y. Y., LIN, R. C.: UPLC–MS^E application in disease biomarker discovery: The

discoveries in proteomics to metabolomics. In *Chemico-Biological Interactions*, 2014, Vol. 215, p. 7–16.

58. ZÜRBIG, P. et al.: Urinary proteomics for early diagnosis in diabetic nephropathy. In *Diabetes*, 2012, Vol. 61, No. 12, p. 3304–3313.

„GELRED™“ VERZUS ETÍDIUM BROMID PRI GÉLOVEJ ELEKTROFORETICKEJ ANALÝZE DNA

ČIŽMÁRIKOVÁ, M.

Ústav farmakológie UPJŠ LF v Košiciach

ABSTRAKT

Gélová elektroforéza je základnou biologicko-molekulárnou metódou na separáciu a analýzu DNA, pri ktorej sa na následnú vizualizáciu separovaných fragmentov DNA používa najčastejšie fluorescenčné farbivo známe pod názvom etídium bromid (EtBr). Táto látka pôsobí ako interkalačné činidlo, ktoré po ožiarení UV svetlom emituje oranžovú fluorescenciu. EtBr patrí vďaka tejto vlastnosti zároveň k silným mutagénom. Tento nedostatok vyvolal v súčasnosti zvýšený záujem o alternatívne farbivá DNA, ktoré by boli pri práci s nimi bezpečnejšie pre samotných vedeckých pracovníkov, ale aj pre životné prostredie. Nedávno bolo na trh uvedené nové fluorescenčné farbivo „GelRed™“, ktoré predstavuje senzitivnú, stabilnú a environmentálne bezpečnú náhradu EtBr-u pre farbenie dsDNA, ssDNA a RNA. Hlavným cieľom práce bolo posúdenie vhodnosti farbiva „GelRed™“ ako potenciálnej náhrady EtBr-u pri analýzach genetických polymorfizmov s využitím polymerázovej reťazovej reakcie s následnou analýzou dĺžky reštrikčných fragmentov (PCR-RFLP) pomocou agarózovej gélovej elektroforézy.

V predkladanej štúdii predstavoval „Gel-Red™“ vysoko senzitivnú náhradu EtBr-u pri hodnotení všetkých troch sledovaných polymorfizmov (*MDR1* G2677T, *GSTP1* A313G and *XRCC1* G399A) pri možnosti ponechania už existujúcich protokolov pre jednotlivé PCR-RFLP analýzy.

Kľúčové slová: elektroforéza, etídium bromid, bezpečnosť, farbivo, „GelRed™“, polymerázová reťazová reakcia s následnou analýzou dĺžky reštrikčných fragmentov

ABSTRACT

Gel electrophoresis is a basic molecular biological method for separation and analysis of DNA and ethidium bromide (EtBr) is the most widely used stain for consecutive DNA visualisation of DNA fragments. This compound acts as an intercalating agent to stain nucleic acids by marked fluorescent (orange) during exposure to UV light. However, EtBr is also a known powerful mutagen. Therefore, there has been increased interest in the use of alternative DNA stains that are considered to be safer for

research workers as well as for environment. Recently, „GelRed™“ stain was developed as a sensitive, stable and environmentally safe fluorescent nucleic acid dye designed to replace EtBr for staining dsDNA, ssDNA a RNA. The main aim was to evaluate the using of „GelRed™“ as suitable alternative to EtBr in polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of DNA using agarose gel electrophoresis.

In our study the „GelRed™“ was a highly sensitive alternative to EtBr for genotyping of all tested polymorphisms (*MDR1* G2677T, *GSTP1* A313G and *XRCC1* G399A), that can directly replace EtBr without changing existing protocols for PCR-RFLP analysis.

Keywords: electrophoresis, ethidium bromide, safety, stain, „GelRed™“, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis

ÚVOD

Gélová elektroforéza je jednoduchá, pomerne rýchla fyzikálno-chemická metóda vhodná pre separáciu a identifikáciu nukleových kyselín (DNA, RNA) a proteínov v závislosti od ich veľkosti, usporiadania a náboja, ako aj od podmienok prostredia a sily elektrického poľa. Najčastejšie používaným typom horizontálnej gélovej elektroforézy pre analýzy DNA je tzv. elektroforéza v agaróze, kedy sa záporne nabité molekuly DNA pohybujú v agarózovom géli v jednosmernom elektrickom poli od záporne nabitej katódy ku kladne nabitej anóde [1], [2]. Gél tvorí pomerne hustú sieť, cez ktorú väčšie molekuly prechádzajú pomalšie v porovnaní s menšími molekulami. Jednu z hlavných výhod tejto metódy predstavuje možnosť priamej detekcie DNA a jej fragmentov v ultrafialovom (UV) svetle po ich ofarbení s fluorescenčnými činidlami.

V molekulárnych laboratóriách je na farbenie DNA najčastejšie používaná interkalačná látka

známa pod názvom etídium bromid (EtBr), ktorá umožňuje vizualizovať v agarózovom géli už 10 ng DNA. Ide o interkalačné činidlo, ktoré sa dokáže pevne včleniť medzi nukleotidy molekuly DNA [3], [4]. Zóny jednotlivých frakcií DNA sú po ofarbení s EtBr-om a ožiarení UV svetlom z transluminátora vizualizované ako oranžové pásy na svetlooranžovom pozadí [5]. EtBr môže byť pridávaný buď priamo do roztoku gélu alebo sa farbenie uskutočňuje až po elektroforetickej separácii produktov DNA a následnom ponorení gélu na niekoľko minút do zriedeného pracovného roztoku EtBr-u (tzv. „post gel staining“). Na druhej strane schopnosť interkalácie do dvojzávitnice DNA môže viesť k vzniku rôznych mutácií a následne k vzniku rakoviny, čo vyžaduje dodržiavanie bezpečnostných opatrení pri manipulácii s touto látkou (ochranné pracovné prostriedky, špecifická dekontaminácia všetkých roztokov obsahujúcich EtBr) [6, 7]. Vysoké riziko toxicity preto podnietilo hľadanie nových, environmentálne bezpečnejších farbiacich látok.

Farbička 5,5'-(6,22-dioxo-11,14,17-trioxa-7,21-diazaheptakosan-1,27-diyl)bis(3,8-diamino-6-fenylfenantridín-5-ium) jodid („GelRed™“) od firmy Biotium sa dnes považuje za vysoko citlivú, menej toxickú náhradu EtBr-u [8], [9]. Ide takisto o oranžovo fluoreskujúce interkalačné činidlo, ktoré plne nahrádza EtBr pri farbení dsDNA, ssDNA aj RNA. Eliminácia vzniku genetických mutácií bola docielená zmenou chemickej štruktúry EtBr-u (2 podjednotky EtBr-u premostené lineárnym reťazcom), čím sa zminimalizovala možnosť prestupu „GelRed™-u“ latexovými rukavicami, ale takisto aj bunkovými membránami (minimalizovanie šancí na interakcie s genomickou DNA v živých bunkách) [10]. Nemutagénne a necytotoxické vlastnosti „GelRed™-u“ dovoľujú okrem bezpečnejšej práce tiež bezproblémovú likvidáciu jeho roztokov priamo do kanalizácie alebo komunálneho odpadu. EtBr a „GelRed™“ majú podobné absorpčné spektrá a na vizualizáciu NK sa preto používajú štandardné UV transluminátory alebo

gél dokumentačné systémy s využitím filtrov odporúčaných pre EtBr. Udáva sa, že senzitivita a fotostabilita „GelRed™-u“ je dokonca vyššia ako u EtBr-u. Farbivo je stabilné, čo umožňuje skladovanie jeho roztokov pri izbovej teplote. Vďaka vysokej termostabilite a stabilite vo vode môže byť „GelRed™“ pridávaný priamo do horúceho gélu alebo sa používa na „post gel staining“ podobne ako EtBr. Zásobný koncentrovaný roztok sa odporúča 10 000 krát zriediť na použitie pre priame farbenie gélu alebo 3 300 krát pre „post gel staining“. Na rozdiel od EtBr-u nie je nevyhnutné následné odfarbovanie gélov. Nespotrebovaný zriedený farbivý roztok pre „post gel staining“ je možné podľa pokynov výrobcu skladovať na tmavom mieste a znovu použiť najmenej 2–3×. Pred svetlom musí byť chránený rovnako aj zásobný roztok. Farbenie pomocou „GelRed™-u“ je vo všeobecnosti kompatibilné s ďalšími molekulárno-biologickými postupmi.

Senzitivita farbenia DNA, ako aj niektoré ďalšie vlastnosti tohto nového činidla boli v predkladanej práci sledované pri polymerázovej reťazovej reakcii s následnou analýzou polymorfizmov dĺžky reštrikčných fragmentov (PCR-RFLP). Táto metóda sa využíva napríklad pri mapovaní génov, pri detekcii mutácií alebo polymorfizmov a v humánnej a veterinárnej medicíne aj pri štúdiu asociačných vzťahov kandidátskych génov k riziku vzniku ochorenia alebo k liečebnej odpovedi (účinnosť a bezpečnosť farmakoterapie). Podstata PCR-RFLP analýzy spočíva v prvotnej amplifikácii cieľových úsekov genómovej DNA (napr. s hľadanou mutáciou alebo polymorfizmom), pričom získané produkty PCR sú následne vystavené účinku reštrikčných endonukleáz, ktoré štiepia molekulu DNA len v požadovaných špecifických cieľových sekvenciách [11]. Reštrikčným štiepením vznikajú v závislosti od genotypu rôzne dlhé fragmenty DNA. Veľkosť a počet fragmentov, ktoré charakterizujú jednotlivé alely sa detegujú elektroforézou v agarózovom géle.

MATERIÁL A METÓDY

Vhodnosť použitia „GelRed™-u“ ako náhrady EtBr-u sa v predkladanej práci hodnotila pri genotypizácii troch jednonukleotidových polymorfizmov (SNP): *MDR1* G2677T (Ala/Ser), *GSTP1* A313G (Ile/Val) a *XRCC1* G399A (Arg/Gln).

Celkovo bola genotypizácia ľudskej DNA uskutočňovaná v rámci viacerých etickou komisiou schválených klinických projektov, pričom všetci jedinci podpísali informovaný súhlas. DNA sa získavala pomocou komerčného izolačného kitu (Wizard® Genomic DNA Purification Kit; Promega) zo vzoriek periférnej venóznej krvi odoberanej do ependorfiek s protizrážavým činidlom (1 % Na₂EDTA).

Na detekciu polymorfizmov bola vo všetkých prípadoch použitá vyššie popísaná metóda PCR-RFLP. Reakčné zmesi pre PCR reakcie (primery – Sigma-Aldrich; termostabilná DNA polymeráza: HOT FIREPol® DNA Polymerase-Solis BioDyne; PCR pufo s MgCl₂ – Solis BioDyne; zmes nukleotidov: dNTP mix – Jena Bioscience; cca 200 ng genómovej DNA; sterilná voda) a pre štiepenie produktov PCR (PCR produkty; reštrikčné enzýmy a príslušný pufo – New England BioLabs; sterilná voda) obsahovali jednotlivé zložky v objemoch a koncentráciách špecifických pre jednotlivé SNP. Rovnako špecifické boli aj teplotné režimy pre PCR reakcie a reštrikčné štiepenie. Sekvencie primerov použitých na amplifikáciu požadovaných oblastí genómovej DNA, názvy použitých reštrikčných enzýmov, ako aj dĺžky fragmentov DNA vzniknutých po reštrikčnom štiepení sú pre sledované polymorfizmy uvedené v tabuľke 1.

Vzniknuté produkty štiepenia zmiešané s nanášacou zmesou obsahujúcou brómfenolovú modrú (20 µl štiepneho produktu + 2 µl nanášacej zmesi) boli nanášané do jamiek 3% agarózového gélu (veľkosť gélu: 140 x 110 mm; 2 rady po 14 jamiek). Pre posúdenie veľkosti jednotlivých fragmentov sa do jednej z jamiek gélu pridával vhodný molekulárny marker (DNA 100 bp ladder; Invitrogen).

TAB.1. PRIMERY, REŠTRIKČNÉ ENZÝMY A DĹŽKY FRAGMENTOV CHARAKTERISTICKE PRE GENOTYPIZÁCIU SLEDOVANÝCH POLYMORFIZMOV

Polymorfizmus	Primery (Reštrikčné enzýmy)	Genotypy
MDR1G2677T	F: 5'-TTACCCAGAATATAGCAAATCTTGG-3'	GG: 198 bp
	R: 5'-CATATTTAGTTTGACTCACCTTCTCAG-3'	GT: 198 bp, 173 bp
	(<i>Hpy188I</i>)	TT: 173 bp
GSTP1 A313G	F: 5'-GTAGTTTGCCCAAGGTCAAG-3'	AA: 329 bp
	R: 5'-AGCCACCTGAGGGGTAAG-3'	AG: 329 bp, 222 bp, 107 bp
	(<i>BsmAI</i>)	GG: 222 bp, 107 bp
XRCC1 G399A	F: 5'-TTGTGCTTTCTCTGTGTCCA-3'	GG: 374 bp, 221 bp
	R: 5'-TCCTCCAGCCTTTTCTGATA-3'	GA: 615 bp, 374 bp, 221 bp
	(<i>MspI</i>)	AA: 615 bp

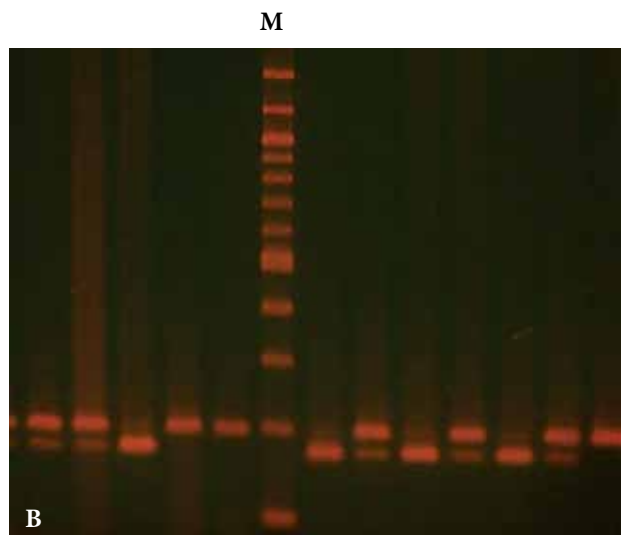
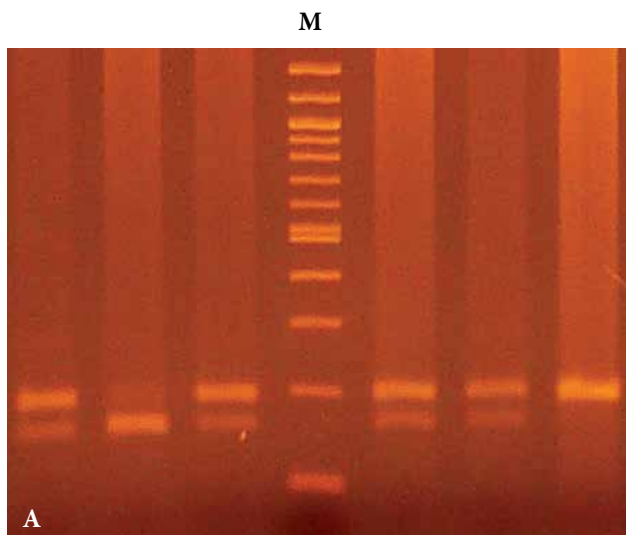
Elektroforéza prebiehala v 1x koncentrovanom TAE (tris-acetát-EDTA pufer), pri 140 V približne 60 min. Po ukončení separácie sa fragmenty DNA ofarbili ponorením gélu (cca 10-15 min.) do fluorescenčného farbiva EtBr-u (AMRESCO; koncentrácia pracovného roztoku: 0,5 µg/ml) s následným opakovaným vymývaním EtBr-u v závislosti od intenzity žiarenia na pozadí gélu (cca 30 min) alebo ponorením gélu (cca 15-30 min) do roztoku „GelRed™-u“ (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in Water; 0,5 ml; Biotium; zloženie pracovného roztoku: 20 µl/200 ml – roztok obsahoval 20 ml 1 molárneho NaCl) bez nutnosti vymývania. Zriedené pracovné roztoky oboch farbív boli skladované v sklenených nádobách obalených alobalom, ktorý zabraňoval prístupu svetla. Samotná vizualizácia a zdokumentovanie získaných fragmentov DNA boli vykonávané pomocou UV transluminátora a fotodokumentačného systému Kodak EDAS 120. Postupy a podmienky izolácie DNA, PCR reakcií, reštrikčného štiepenia a elektroforetickej separácie boli pre jednotlivé polymorfizmy vždy totožné pri oboch spôsoboch farbenia DNA.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

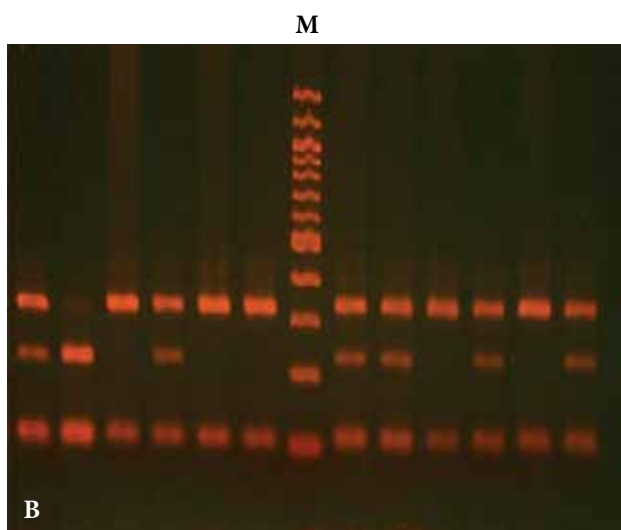
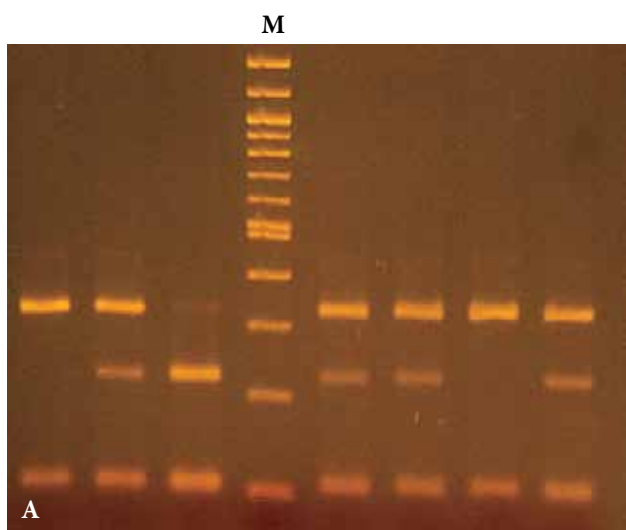
Genotypizácia pomocou metódy PCR-RFLP bola úspešne uskutočnená u všetkých nami sledovaných polymorfizmov pri oboch spôsoboch farbenia agarózových gélov, pričom senzitivita farbenia s „GelRed™-om“ bola porovnateľná s EtBr-om (obr. 1, obr. 2 a obr. 3). I keď v pracovných protokoloch výrobcu inovatívneho farbiva „GelRed™“ je na „post-gel staining“ odporúčané ofarbovanie gélov s roztokom 3 300× zriedeným (3× „GelRed™“), v predkladanej práci sme vzhľadom na výsledky testovania medzinárodnej siete laboratórií PulseNet [12] použili roztok zriedený až 10 000 krát (1× „GelRed™“). Toto riedenie bolo na vizualizáciu fragmentov DNA postačujúce aj pri analýzach pomocou metódy PCR-RFLP pri všetkých testovaných polymorfizmoch.

Pri nutnosti presnejšej identifikácie veľkosti fragmentov sa však v literatúre odporúča roztok s vyššou koncentráciou (100× „GelRed™“), ktorý negatívne neovplyvňuje motilitu bandov [13].

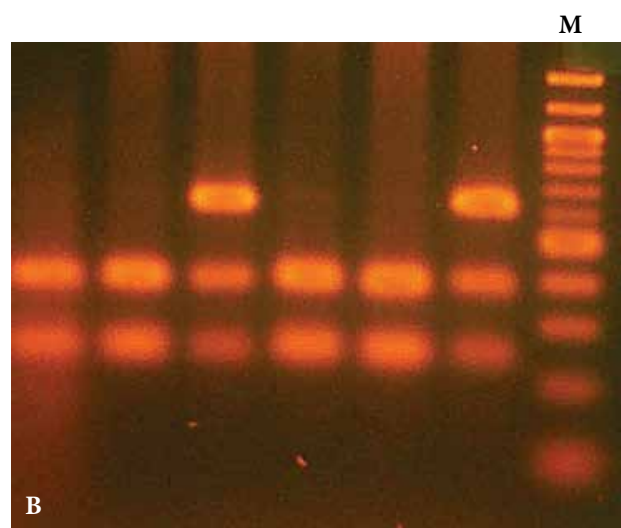
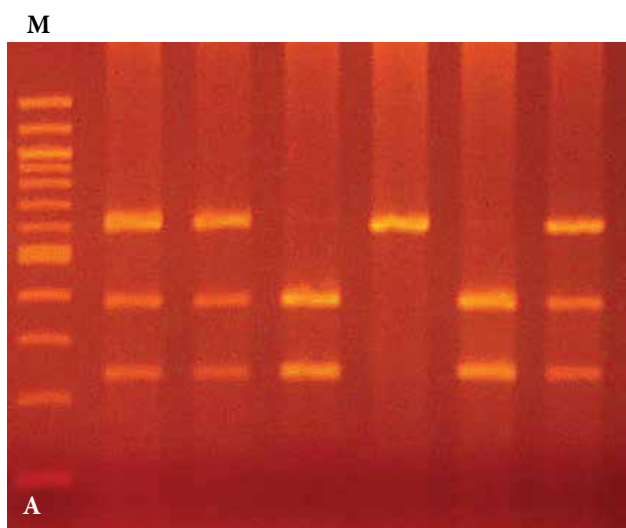
Čerstvo pripravený roztok „GelRed™-u“ si pri izbovej teplote zachovával stabilitu 7–10 dní



Obr. 1. Agarózová elektroforéza PCR produktu génu *MDR1* po štiepení *Hpy188I*
(A = farbenie pomocou etídiu bromidu, B = farbenie pomocou „GelRed™-u,, M = marker: DNA 100 bp ladder)



Obr. 2. Agarózová elektroforéza PCR produktu génu *GSTP1* po štiepení *BsmAI*
(A = farbenie pomocou etídiu bromidu, B = farbenie pomocou „GelRed™-u,, M = marker: DNA 100 bp ladder)



Obr. 3. Agarózová elektroforéza PCR produktu génu *XRCC1* po štiepení *MspI*
(A = farbenie pomocou etídiu bromidu, B = farbenie pomocou „GelRed™-u,, M = marker: DNA 100 bp ladder)

v závislosti od počtu farbení, čo je oproti EtBr-u menšia nevýhoda, keďže jeho roztok bol stabilný aj niekoľko týždňov. Pre EtBr je tiež typická nešpecifická fluorescencia pozadia, ktorá si vyžaduje niekoľko minútové vymývanie gélu. Fluorescencia pozadia výrazne závisí od čerstvosti roztoku a dĺžky expozície, preto čas expozície a vymývania musí byť niekoľkokrát upravovaný. „GelRed™“ nevytvára takmer žiadne pozadie aj pri vyšších časoch expozície, čím sú gély uniformnejšie a nevyžadujú pred vizualizáciou a dokumentáciou vymývanie. Pri nedostatočnom ofarbení je možné expozíciu zvýšiť dodatočným ponorením gélu do pracovného roztoku činidla. Čerstvo pripravený roztok „GelRed™-u“ sme pri našich analýzach použili s rovnakou úspešnosťou vždy minimálne 7×. Najdôležitejšou výhodou tohto nového farbiva je jeho nízka toxicita, ktorá umožňuje odstraňovanie roztokov a gélov obsahujúcich toto činidlo do bežného odpadu. Tým dochádza k ďalšiemu šetreniu času inak nevyhnutného na dekontamináciu EtBr-u. Hlavným nedostatkom, ktorý sme pozorovali pri našej práci bola vyššia cena „GelRed™-u“ (cca 100 EUR bez DPH) v porovnaní s EtBr-om (cca 12 EUR bez DPH), ktorú sme sa snažili kompenzovať použitím nižšej koncentrácie roztoku, ako aj jeho viacnásobným opakovaným používaním pri ofarbovaní. Keďže naše analýzy sa uskutočňovali len v určitých obdobiach, kedy bol nazberaný dostatočný počet vzoriek, preferovali sme tiež prípravu pracovného roztoku „GelRed™-u“ s menším objemom (200 ml), aby nedochádzalo k zbytočnému plytvaniu farbiva. Roztoky oboch farbív vyžadovali uskladnenie mimo dosahu svetla.

„GelRed™“ je s úspechom používaný pri PCR-RFLP analýzach aj v ďalších slovenských a zahraničných laboratóriách [14], [15], [16], [17].

Hoci na trhu existujú aj ďalšie environmentálne bezpečnejšie farbivá (ako napr. SYBR® Green I, GoldView®), najlepšia citlivosť bez ovplyvnenia motility fragmentov DNA v porovnaní s EtBr-om je pozorovaná práve pri farbičke

„GelRed™“ [13], [18]. Pre polyakrylamidové gély bola vyvinutá podobná farbička PAGE GelRed (Biotium) [19].

ZÁVER

V našej práci sa pri analýzach PCR-RFLP potvrdila senzitivita „GelRed™-u“ porovnateľná s EtBr-om pri všetkých troch nami sledovaných polymorfizmov (*MDR1* G2677T, *GSTP1* A313G a *XRCC1* G399A) za súčasnej možnosti zachovania štandardných protokolov pre príslušné PCR reakcie, reštrikčné štiepenie, elektroforetickú separáciu a vizualizáciu pomocou UV transluminátora používaných pri ofarbovaní pomocou EtBr-u. Za hlavnú nevýhodu používania „GelRed™-u“ bola považovaná nevyhnutnosť častejšej prípravy pracovných roztokov, ako aj vyššia cena tohto činidla. Napriek týmto nedostatkom je farbivo „GelRed™“ s obľubou používané vo viacerých laboratóriách hlavne pre svoju nízku toxicitu, vysokú senzitivitu so stabilnejším pozadím gélu, ľahkú manipuláciu bez potreby vymývacích krokov a bezproblémovú likvidáciu jeho roztokov priamo do odpadu. Cenový rozdiel medzi oboma farbivami je možné znížiť používaním nižších koncentrácií „GelRed™-u“, ktoré sú pri vizualizácii DNA rovnako účinné, ako aj častejším opakovaným používaním pripravených roztokov.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla za finančnej podpory grantu MZ SR 2005/46-VOUKE-01, VVGS 5/10-11 a grantovej agentúry ministerstva školstva Slovenskej republiky VEGA: 1/0715/11 a 1/0224/12.

LITERATÚRA

1. **SAMBROOK, J., 1989:** Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harb. Lab. Press, vols. 1–3.

2. **GÁBOR, M. a kol.:** Prehľad molekulárno-genetických metód používaných pri detekcii DNA polymorfizmu. Dostupné na internete: <http://kgpb.fapz.uniag.sk/sites/default/files/molgen1.pdf>.
3. **SOBELL, H. M. a kol., 1977:** Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. III. Unifying structural concepts in understanding drug-DNA interactions and their broader implications in understanding protein-DNA interactions. *J. Mol. Biol.*, 114, 333–365.
4. **GREEN, F. J., 1990:** Sigma Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators, p. 318.
5. **SABNIS, R. W., 2010:** Handbook of biological dyes and stains: synthesis and industrial application. Hoboken NJ: John Wiley & Sons, Inc.
6. **HENGGEN, P.N., 1994:** Methods and reagents: disposal of ethidium bromide. *Trends Biochem. Sci.*, 19, 257–258.
7. **Ethidium bromide disposal, Princeton University:** Dostupné na internete: <http://web.princeton.edu/sites/ehs/chemwaste/etbr.html>.
8. **Product Information, GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in Water,** Biotium. Dostupné na internete: http://www.babec.org/files/GelRed/Gel_Red_Product_Info.pdf.
9. **GelRed™ and GelGreen™ Safety Report:** Dostupné na internete: <http://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/GR-GG-Safety.pdf>.
10. **MAO, F., LEUNG, W. Y., 2010:** Methods of using dyes in association with nucleic acid staining or detection and associated technology, Biotium, USA, United States Patent Application Publication USA, 12/854,436. 2010-10-23.
11. **BOLTSTEIN, D. a kol., 1980:** Construction of a genetic linkage map in man using restriction length polymorphism. *Amer. J. Hum. Genet.*, 32, 314–331.
12. **Alternate DNA stains – results and recommendations, PulseNet.** Dostupné na internete: <http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/Underthemicroscope/pulsenettip-svol2.pdf>.
13. **HUANG, Q. a kol., 2010:** Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clin Lab*, 56, 149–152.
14. **KROČKO, M. a kol., 2011:** Optimization of PCR-RFLP Method to confirm the identification of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food samples. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 44, 421–427.
15. **BOUFANA, B. a kol., 2011:** Differential diagnosis of *Triaenophorus crassus* and *T. nodulosus* experimental infection in *Cyclops abyssorum praealpinus* (Copepoda) from the Alpine Lake Grundlsee (Austria) using PCR-RFLP. *Parasitol. Res.*, 109, 745–750.
16. **TRAKOVICKÁ A. a kol., 2012:** Analysis of the nebulin-related anchoring protein gene (NRAP) SNP polymorphism (C/T) in Slovak Warmblood Horse by PCR-RFLP method. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 45, 265–268.
17. **CERLIANI, M. B., RICHARD, S. M., 2013:** Polymorphism analysis of genes involved in xenobiotic metabolism and circadian rhythm in human breast cancer. *International Journal of Advance in Medical Science (AMS)*, 1, 57–64.
18. **HUANG, Q., FU, W.L., 2005:** Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 43, 841–842.
19. **PAGE GelRed™ and PAGE GelGreen™ flyer.** Dostupné na internete: <http://biotium.com/wp-content/uploads/2013/10/PAGE-Gel-Stains-GR-GG-flyer.pdf>.

VÝZNAM P-GLYKOPROTEÍNU A JEHO JEDNONUKLEOTIDOVÝCH POLYMORFIZMOV V LIEČBE DEPRESIE

ČIŽMÁRIKOVÁ, M.

Ústav farmakológie
UPJŠ LF v Košiciach

ABSTRAKT

Na základe výsledkov nedávnych štúdií sa predpokladá, že za časť interindividuálnych rozdielov v liečebnej odpovedi sú zodpovedné membránové transportéry. Jedným z nich je aj P-glykoproteín (P-gp). P-gp je efluxnou pumpou, ktorá plní dôležitú úlohu v bariérových tkanivách organizmu, vrátane hematoencefalickej bariéry, prostredníctvom selektívneho vypudzovania určitých endogénnych a exogénnych molekúl, čím obmedzuje ich vstup do mozgu a ďalších orgánov. V súčasnosti sa viaceré antidepresíva považujú za P-gp substráty a/alebo P-gp inhibítory. Predkladaný článok sumarizuje súčasné poznatky o funkcii P-glykoproteínu a význame jeho jednonukleotidových polymorfizmov vo vzťahu k liečbe depresie.

Kľúčové slová: P-glykoproteín, polymorfizmus, *MDR-1*, depresia, liečebná odpoveď

ABSTRACT

Recent studies have demonstrated that members of membrane transporters can contribute to inter-individual differences in drug

response. One of them, P-glycoprotein (P-gp) is an eflux pump and plays an important role in the function of the blood-brain barrier and other barrier tissues by selectively extruding certain endogenous and exogenous molecules, thus limiting the ability of its substrates to reach the brain or other organs. Currently, several antidepressants have been confirmed as P-gp substrates and/or P-gp inhibitors. The present article summarizes a current knowledge about the function of P-gp and the role of its single nucleotide polymorphisms in relation to depression therapy.

Keywords: P-glycoprotein, polymorphism, *MDR-1*, depression, therapeutic outcome

ÚVOD

Pre účinok antidepresív je nevyhnutný ich prestup do centrálnej nervovej sústavy (CNS), ktorý sa uskutočňuje cez hematoencefalickú bariéru (HEB). Tá predstavuje fyziologické rozhranie medzi krvným obehom a CNS. Je tvorená jednou vrstvou endotelových buniek, ktoré vytvárajú tzv. tesné spojenia (tight junctions). Navyše zvonka na obvod kapilár tesne priliehajú pericyty a výbežky astrocytov, čím je pohyb látok

medzi krvou a nervovým tkanivom obmedzený. Toto usporiadanie za normálnych okolností neumožňuje prienik látok cez intercelulárne priestory, a preto molekuly môžu prechádzať iba cez membrány endotelií. Endotelové bunky obsahujú množstvo špecifických transportérov, ktoré umožňujú regulovaný prenos látok do tkaniva mozgu, ale aj opačným smerom, z mozgového tkaniva do systémovej cirkulácie, kedy hovoríme o efluxe (vypudzovaní) látok von z bunky. Existencia efluxných transportérov v HEB, ktoré významne ovplyvňujú prestup liečiv a ďalších látok do CNS, je preto jednou z možných príčin zodpovedných za nedostatočnú odpoveď na antidepresíva. Látky používané v liečbe depresie sú predovšetkým substrátom transportéra nazývaného P-glykoproteín (P-gp).

Funkcia P-glykoproteínu

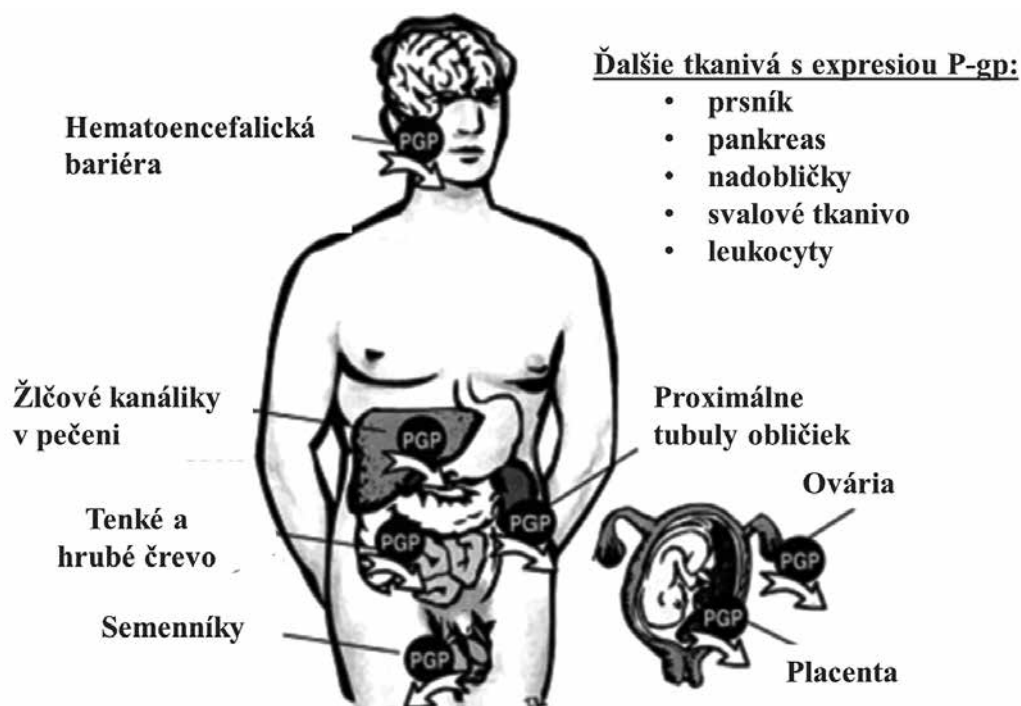
P-gp (ABCB1) je najznámejším a najlepšie charakterizovaným členom z radu tzv. ABC transportérov („ATP-Binding Cassette,“).

Ide o superrodinu 49 bunkových proteínov (7 podskupín: A-G) uložených v plazmatickej membráne (prípadne v intracelulárnych membránach), ktoré sú zodpovedné za transport širokého spektra endogénnych a exogénnych zlúčenín cez membrány proti koncentračnému gradientu s využitím energie vznikajúcej hydrolýzou ATP [1].

Medzi substráty P-gp zaraďujeme spomedzi xenobiotík aj mnohé chemickú štruktúrou a funkciou rôznorodé liečivá (niektoré anti-neoplastiká, antidepresíva, antiemetiká, blokátory kalciových kanálov, imunosupresíva, kardiotoniká a antidysrytmiká, opiáty, steroidné hormóny). Niektoré zo substrátov môžu byť zároveň inhibítormi P-gp.

Prítomnosť a funkcia P-gp boli potvrdené v mnohých tkanivách vrátane HEB [2] (obr. 1).

Na základe poznatkov o anatomickej lokalizácii P-gp na luminálnej membráne buniek orgánov a tkanív s eliminačnou a bariérovou funkciou sa predpokladá, že hlavnou fyziologickou úlohou tohto membránového transpor-



Obr. 1. Anatomická lokalizácia P-glykoproteínu
Upravené podľa [2]

téra je detoxikácia a ochrana organizmu voči xenobiotikám, ktoré sú prostredníctvom P-gp vylúčené do žlče, moču alebo črevného lumenu. Prítomnosť P-gp v bariérových štruktúrach zároveň chráni špecifické tkanivá organizmu (mozog, semenníky, ovária, plod). Celkovo však P-gp plní úlohu vo viacerých fyziologických a patologických procesoch [3], [4]. Dáva sa do súvisu s tzv. fenoménom mnohobočetnej liekovej rezistencie, ovplyvňuje farmakokinetiku a farmakodynamiku liečiv, vďaka bohatej substrátovej špecifickosti je zodpovedný za mnohé farmakologické interakcie, čo v konečnom dôsledku môže viesť k interindividuálnym rozdielom v liečebnom účinku a vo výskyte nežiaducich účinkov. P-gp ovplyvňuje tiež apoptózu a imunitné procesy a môže byť tiež zodpovedný za zvýšenú náchylnosť na niektoré ochorenia.

Experimentálne a klinické štúdie poukázali, že génová expresia a aktivita P-gp môžu byť ovplyvnené mnohými exogénnymi a endogénnymi činiteľmi, a to v závislosti od druhu jednotlivých tkanív, patologických podmienok a etnicity. V literatúre sa okrem farmakologických interakcií podrobnejšie popisuje predovšetkým vplyv genetiky a epigenetiky.

Genetické polymorfizmy P-glykoproteínu

P-gp je produktom génu pre mnohobočetnú liekovú rezistenciu 1 (*MDR-1*), ktorý je lokalizovaný na dlhom ramene 7. chromozómu (7q21.1). Je zložený z 29 exónov a 32 intrónov (celkovo 209 kb). Ide o vysoko polymorfný gén, pričom doposiaľ bolo identifikovaných viac ako 100 mutácií respektíve polymorfizmov. Iba časť týchto genetických variantov ovplyvňuje expresiu génu *MDR-1*, syntézu, množstvo, stabilitu, či funkciu P-gp. V súvislosti so zmenenou funkciou P-gp sa popisujú predovšetkým 3 jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) génu *MDR-1* (C3435T, G2677T/A a C1236T).

Najznámejším a najviac študovaným SNP je substitúcia cytozínu za tymín v exóne 26 (C3435T). Ide o tzv. „silent“ SNP (nemý SNP,

polymorfizmus nemeniaci zmysel). Napriek tomu sa zistilo, že v určitých prípadoch ovplyvňuje expresiu génu *MDR-1*, množstvo a/alebo transportnú funkciu P-gp. Po prvý krát bol tento súvis potvrdený v bunkách tenkého čreva, kedy u jedincov s genotypom CC boli zaznamenané približne 2 násobne zvýšené hladiny P-gp v porovnaní s genotypom TT [5]. Iní autori dokázali alelovo špecifické zmeny sekundárnej štruktúry mRNA, ktoré ovplyvňujú jej stabilitu, procesy zostrihu, spracovania a translačnej kontroly [6]. Nedávno publikovaná práca poukázala na rozdiely konformácie P-gp u jedincov homozygotných pre štandardnú alelu. Odlišné usporiadanie proteínu spôsobilo zmeny v štruktúre väzbových miest pre jednotlivé substráty P-gp [7]. Ďalším z možných vysvetlení je existencia väzbovej nerovnováhy s iným funkčným SNP akým je G2677T, keďže SNP C3435T, G2677 a C1236T sú súčasťou spoločného haplotypu [8].

V ďalšom študovanom polymorfizme G2677T/A, ktorý sa vyskytuje v exóne 21 dochádza zmenou tripletu k zámene aminokyselín (Ala893Ser/Thr). Rovnako variantné alely tohto polymorfizmu sa dávajú do súvisu so zmenenou expresiou, aktivitou a funkciou P-gp [9]. Zistilo sa, že jedinci nesúci alely T alebo A sú tiež častejšie rezistentní na liečivá [10].

Polymorfizmus v exóne 21 C1236T je nemým SNP podobne ako C3435T. Môže ovplyvňovať reguláciu translácie, stabilitu RNA prípadne ďalšie molekulárne mechanizmy alebo je vo väzbovej nerovnováhe s iným funkčným SNP génu *MDR-1*. V literatúre sa tiež popisuje znížená aktivita P-gp u genotypu TT v závislosti od druhu substrátu [11].

Z literatúry sú známe etnické rozdiely v genotypovej a alelovej distribúcii jednotlivých genotypov a alel daných SNP [12].

Vzťah P-glykoproteínu k účinku antidepresív

Podľa niektorých *in vitro* štúdií sa medzi substráty P-gp spomedzi antidepresív zaraďuje

fluvoxamín, sertralín a jeho metabolit desmetylsertralín, paroxetín, fluoxetín, citalopram a nortryptilín. Schopnosť inhibície P-gp bola dokázaná pre amitryptilín, citalopram, kломipramín, desipramín, doxepín, fluoxetín, imipramín, maprotilín, mianserín, nefazodón, paroxetín, sertralín a trimipramín. Údaje z *in vitro* štúdií sú však mnohokrát protichodné, čo sa pripisuje rozdielom v použitých metodikách ako aj v nedostatočnej senzitivite týchto metodík pre posúdenie komplexnosti funkcie HEB vo vzťahu ku P-gp [13].

In vivo štúdie preto predstavujú vhodnejší spôsob sledovania funkcie P-gp. Najčastejšie sa v týchto analýzách využívala inhibícia génu *MDR-1* (knock-out), ktorá potvrdila vplyv P-gp na koncentrácie antidepresív u amitryptilínu a jeho metabolitu, citalopramu, doxepínu a jeho metabolitu, fluoxetínu, fluvoxamínu, nortryptilínu, paroxetínu, trimipramínu a jeho metabolitu, venlafaxínu a jeho metabolitu, i keď boli publikované aj negatívne závery [14], [15], [16], [17]. Nejednoznačnosť výsledkov týchto analýz je vysvetľovaná rozdielnou dĺžkou podávania antidepresív a tiež rozdielmi v počte knock-outovaných génov. Význam P-gp sa nepotvrdil u mirtazapínu a sertralínu. Vplyv P-gp na antidepresíva sa *in vivo* hodnotil tiež pri súčasnom podávaní známych inhibítorov P-gp (verapamil, cyklosporín), pričom sa zistili rozdiely v pomere koncentrácií antidepresív v mozgu a plazme v závislosti od typu liečiva a anatomickej lokalizácie vyšetrovanej časti CNS [18, 19]. Navyše boli pozorované rozdiely v penetrácii dcérskych molekúl a ich metabolitov.

V literatúre sa pri vzniku depresie často popisuje význam hyperaktivity hypotalamo-hypofýzo-adrenálnej (HHA) osi v dôsledku porušenej spätnej väzby na hlavné endogénne kortikoidy (človek – kortizol, hlodavce – kortikosterón). Na základe starších prác, kde sa u myší po inaktivácii génu pre P-gp pozorovali nižšie plazmatické hladiny ACTH a kortikosterónu vznikla hypotéza, že v regulácii funkcie HHA osi má významnú úlohu práve P-gp. Predpokladalo sa, že za hyperaktivitu HHA

osi je zodpovedný znížený prienik endogénnych glukokortikoidov do CNS v dôsledku nedostatočnej funkcie P-gp v HEB [20]. Podľa niektorých autorov sa inhibícia P-gp v HEB považovala dokonca za jeden z možných mechanizmov účinku niektorých antidepresív [21]. Novšie práce túto hypotézu nepotvrdzujú [22], [23], [24]. V jednej klinickej štúdiu u pacientov s chronickou liečbou antidepresívami sa v porovnaní so zdravými kontrolami pozorovala naopak zvýšená funkcia P-gp [25].

Vzťah polymorfizmov P-glykoproteínu k účinku antidepresív

Význam vzťahu SNP génu *MDR-1* k liečebnej účinnosti antidepresív a k výskytu ich nežiaducich účinkov bol potvrdený v niekoľkých klinických štúdiách. V japonskej populácii sa signifikantne častejšia liečebná odpoveď pozorovala u jedincov s genotypmi *MDR-1* 2677 TT, TA a AA v porovnaní s homozygotmi 2677 AA a heterozygotmi 2677 GT a GA [26]. V rovnakej štúdiu sa pri haplotypovej analýze zistila signifikantne častejšia rezistencia na paroxetín pri haplotype 3435C-2677G-1236T. V slovenskej populácii bola liečebná odpoveď na paroxetín takisto častejšie zaznamenaná u nositeľov aspoň jednej alely T polymorfizmu G2677T/A [27]. Nemeckí autori potvrdili u depresívnych pacientov z 95 vyšetovaných SNP signifikantný vplyv na dosiahnutie remisie v dvoch intrónových polymorfizmov *MDR-1* (rs2032583 a rs2235015) iba u substrátov P-gp (citalopram, venlafaxín, amitryptilín) na rozdiel od mirtazapínu, ktorý sa v danej štúdiu pri knock-out analýzách neprejavil ako substrát P-gp [16]. Význam intrónových SNP (rs2032583 a rs2235040) bol nájdený aj pri analýzach liečebnej odpovede na paroxetín [28]. V štúdiu hodnotiacej účinnosť escitalopramu sa častejšia remisia pozorovala pri alele G (rs10256836) a pri alele T (polymorfizmy rs1045642 = C3435T a rs1882478) [29]. Signifikantne vyšší výskyt remisie v danej štúdiu bol tiež nájdený u jedincov s haplotypom T-T-T-C-C pri hodnotení

haplotypového bloku obsahujúceho 5 SNP (rs1882478-rs2235048-rs2235047-rs1045642-rs6949448). Alela T polymorfizmu rs1882478 sa spájala s výraznejším výskytom insomnie počas 1. týždňa terapie. V austrálskej populácii sa pri terapii escitalopramom pozoroval vzťah polymorfizmu *MDR-1* C3435T k dávke nevyhnutnej na dosiahnutie remisie. Jedinci s genotypmi TC a CC potrebovali na dosiahnutie remisie dávky 24 a 19 mg, zatiaľ čo nositelia genotypu TT iba 11 mg [30]. V ďalšej štúdii homozygoti pre alelu T polymorfizmu C3435T mali pri liečbe nortryptilínom signifikantne vyššie riziko vzniku posturálnej hypotenzie [31]. Iní autori vzťah polymorfizmov *MDR-1* vo vzťahu k liečbe antidepresívami nepotvrdili [32, 33, 34]. Je možné, že za protichodné rozdiely vo vplyve polymorfizmov génu *MDR-1* môžu byť zodpovedné interetnické rozdiely, ako aj rozdiely v dizajne jednotlivých analýz.

ZÁVER

Vzhľadom na protichodné závery jednotlivých štúdií musí byť skutočný význam P-gp a jeho polymorfizmov objasnený v novších a uniformnejšie štandardizovaných *in vitro* a *in vivo* analýzach, ako aj vo väčších prospektívnych klinických štúdiách uskutočnených vo viacerých populáciách a prostredníctvom metaanalýz.

LITERATÚRA

1. HUANG, Y., SADÉE, W., 2006: Membrane transporters and channels in chemoresistance and – sensitivity of tumor cells. *Cancer Lett.*, 239: 168–182.
2. MARZOLINI, C. a kol., 2004: Polymorphisms in human *MDR1* (Pglycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 75, 13–33.
3. SAKAEDA, T. a kol., 2002: *MDR1* Genotype-related pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 1391–1400.
4. MARCHETTI, S. a kol., 2007: Concise re-

view: clinical relevance of drug-drug and herb-drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (*MDR1*, p-glycoprotein). *Oncologist*, 12: 927–941.

5. HOFFMEYER, S. a kol., 2000: Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 3473–3478.

6. WANG, D., SADÉE, W., 2006: Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (*MDR1*). *AAPS J*, 8: 515–520.

7. KIMCHI-SARFATY, CH. a kol., 2007: „A silent“ polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity. *Science*, 315: 525–528.

8. HORINOUCI, M. a kol., 2002: Significant genetic linkage of *MDR1* polymorphisms at positions 3435 and 2677: functional relevance to pharmacokinetics of digoxin. *Pharmacol. Res.*, 19: 1581–1585.

9. SAKURAI, A. a kol., 2007: Quantitative structure-activity relationship analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporters ABCB1 (P-glycoprotein/*MDR1*). *Biochemistry*, 43:7678–93.

10. ANGLICHEAU, D. a kol., 2003: Association of the multidrug resistance-1 gene single nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14: 1889–96.

11. SALAMA, N.N. a kol., 2006: *MDR-1* haplotypes significantly minimize intracellular uptake and transcellular P-gp substrate transport in recombinant [LC-PK] cells. *J. Pharm. Sci.*, 95:2293–2308.

12. CASCORBI, I. A kol., 2001: Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter *MDR1* gene in white subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 69: 169–74.

13. O´BRIEN, F.E. a kol., 2012: Interactions between antidepressants and P-glycoprotein at the blood-brain barrier: clinical significance of *in vitro* and *in vivo* findings. *Br J Pharmacol*, 165: 289–312.

14. DORAN, A. a kol., 2005: The impact of P-glycoprotein on the disposition of drugs targeted

for indications of the central nervous system: evaluation using the MDR1A/1B knockout mouse model. *Drug Metab. Dispos.*, 33: 165–174.

15. UHR, M. a kol., 2007: Blood-brain barrier penetration and pharmacokinetics of amitriptyline and its metabolites in p-glycoprotein (abcb1ab) knock-out mice and controls. *J. Psychiatr. Res.*, 41: 179–188.

16. UHR, M. a kol., 2008: Polymorphisms in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression. *Neuron*, 57: 203–209.

17. KARLSSON, L. a kol., 2011: Effects on enantiomeric drug disposition and open-field behavior after chronic treatment with venlafaxine in the P-glycoprotein knockout mice model. *Psychopharmacology (Berl)*, 215: 367–377.

18. EJSING, T.B., LINNET, K., 2005: Influence of P-glycoprotein inhibition on the distribution of the tricyclic antidepressant nortriptyline over the blood-brain barrier. *Hum. Psychopharmacol.*, 20: 149–153.

19. CLARKE, G. a kol., 2009: Verapamil in treatment resistant depression: a role for the P-glycoprotein transporter? *Hum. Psychopharmacol.*, 24: 217–223.

20. MULLER, M. B. a kol., 2003: ABCB1 (MDR1)-Type P-glycoproteins at the blood-brain barrier modulate the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: implications for affective disorder. *Neuropsychopharmacology*, 28: 1991–1999.

21. PARIANTE, C.M. a kol., 2004: Do antidepressants regulate how cortisol affects the brain? *Psychoneuroendocrinology*, 29: 423–447.

22. MASON, B.L. a kol., 2008: A revised role for P-glycoprotein in the brain distribution of dexamethasone, cortisol, and corticosterone in wild-type and ABCB1A/B-deficient mice. *Endocrinology*, 149: 5244–5253.

23. MASON, B.L. a kol., 2011: Desipramine treatment has minimal effects on the brain accumulation of glucocorticoids in P-gp-deficient and wild-type mice. *Psychoneuroendocrinology*, 36: 1351–1360.

24. KALVASS, J.C., POLLACK, G.M., 2007: Kinetic considerations for the quantitative assess-

ment of efflux activity and inhibition: implications for understanding and predicting the effects of efflux inhibition. *Pharm. Res.*, 24: 265–276.

25. DE KLERK, O.L. a kol., 2010: Chronic stress and antidepressant treatment have opposite effects on P-glycoprotein at the blood-brain barrier: an experimental PET study in rats. *J. Psychopharmacol.*, 24: 1237–1242.

26. KATO, M. a kol., 2008: ABCB1 (MDR1) gene polymorphisms are associated with the clinical response to paroxetine in patients with major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol*, 32: 398–404.

27. VIDOVÁ, Z. a kol., 2012: Je možná farmakogenetická predikcia terapeutickej účinnosti paroxetínu? *Psychiatr. Prax*, 13: 66–68.

28. SARGINSON, J.E. a kol., 2010: ABCB1 (MDR1) polymorphisms and antidepressant response in geriatric depression. *Pharmacogenet. Genomics*, 20: 467–475.

29. LIN, K.M. a kol., 2011: ABCB1 gene polymorphisms are associated with the severity of major depressive disorder and its response to escitalopram treatment. *Pharmacogenet. Genomics*, 21: 163–170.

30. SINGH, A.B. a kol., 2012: ABCB1 polymorphism predicts escitalopram dose needed for remission in major depression. *Transl. Psychiatry* 2:1–6.

31. ROBERTS, R.L. a kol., 2002: A common P-glycoprotein polymorphism is associated with nortriptyline-induced postural hypotension in patients treated for major depression. *Pharmacogenomics J.* 2,191–196.

32. LAIKA, B. a kol., 2006: ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1) gene G2677T/a sequence variation (polymorphism): lack of association with side effects and therapeutic response in depressed inpatients treated with amitriptyline. *Clin. Chem.*, 52: 893–895.

33. MIHALJEVIC PELES, A. a kol., 2008: MDR1 gene polymorphism: therapeutic response to paroxetine among patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32: 1439–1444.

34. MENU, P. a kol., 2010: Antidepressants and ABCB1 gene C3435T functional polymorphism: a naturalistic study. *Neuropsychobiology*, 62, 193–197.

REPARÁCIE POŠKODENEJ ZUBNEJ DRENE U ZUBOV S NEUKONČENÝM VÝVINOM

MACKO, O., KAIFEROVÁ, J.

1. stomatologická klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice

kaiferova@gmail.com

ABSTRAKT

Vitálna zubná dreň je pre životnosť zubov s neukončeným vývinom nesmierne dôležitá, pretože zabezpečuje potrebnú výživu, slúži ako biosenzor na detekciu pôsobenia patogénnych stimulov a umožňuje dokončenie ich fyziologického vývinu. Zubná dreň má prirodzený potenciál odolávať miernym patologickým podnetom a v prípade závažnejších stimulov je potrebná vhodná terapia pre stimuláciu jej reparatívnych procesov. Nekróza zubnej drene však značne zhoršuje prognózu zubov s neukončeným vývinom hlavne komplikáciami vyplývajúcimi z konvečného endodontického ošetrenia. Apexifikácia umožňuje zaplnenie koreňového systému avšak z dlhodobého hľadiska sa spájajú tieto zuby s rizikom vyplývajúcim z predčasného ukončenia ich vývinu. Regeneratívne endodontické postupy predstavujú biologicky založené konzervačné ošetrenia zubov s neukončeným vývinom s nekrotickou zubnej drene navrhnuté pre regeneráciu zubnej drene s obnovením všetkých jej funkcií. Klinické aj rádiologické výsledky poukazujú na dokončenie vývinu koreňa s vysokou úspešnosťou a mierou prežitia

ošetrovaných zubov nasvedčujúce úspešnej regenerácii zubnej drene, avšak histologické výsledky sa značne rôznia, čo poukazuje na potrebu väčšieho riadenia regenerácie zubnej drene pre dosiahnutie predvídateľnejších výsledkov.

Kľúčové slová: zuby s neukončeným vývinom, vitálne ošetrenie zubnej drene, apexifikácia, revaskularizácia, regeneratívna endodontia

ABSTRACT

Vital pulp of immature teeth is extremely important for its viability, since it provides nutrition, acts as biosensor to detect pathogenic stimuli and allows to complete its physiological tooth development. Dental pulp has natural potential to withstand mild pathological stimuli, however, in case of progressive stimulus appropriate therapy is needed to stimulate its reparative processes. Necrosis of the pulp compromises prognosis of immature teeth challenging success of conventional endodontic treatment. Apexification allows filling of the root

canal system of immature teeth, however, in the long term prognosis those teeth represents risks from early termination of development. Regenerative endodontic procedures presents biologically based conservative treatment of immature teeth after pulpal necrosis designed for pulp regeneration with the renewal of all its functions. Clinical and radiological outcomes shows accomplishment of continued root development and increased success and survival rate of treated teeth indicating successful pulp regeneration, but histological outcomes vary considerably, suggesting the need for more controlled regeneration for more predictable outcomes achievement.

Key words: immature teeth, vital pulp therapy, apexification, revascularization, regenerative endodontics

ÚVOD

Cieľom tejto práce je prezentovať nové možnosti liečby trvalých zubov s neukončeným vývinom potom, ako dôjde k strate ich vitality. Nekróza zubnej drene vedie k zastaveniu vývinu koreňa zuba. Dlhodobá prognóza v zmysle zachovania zuba s krátkym koreňom a krehkými stenami je podstatne horšia ako u zubov, ktoré prešli kompletným vývinom. V najnovších odborných časopisoch sa stretávame s termínmi ako je revaskularizácia, revitalizácia či regenerácia zubnej drene, ktorých spoločným cieľom je to isté, a teda obnovenie fyziológie zubnej drene týchto zubov s dokončením zastaveného vývinu koreňov zubov, čím sa prognóza týchto zubov značne zlepšuje.

Charakteristika zubov s neukončeným vývinom

Zuby od prerezania do ústnej dutiny po uzatvorenie apexu koreňa sú charakterizované ako zuby s neukončeným vývinom. Predstavujú vyvíjajúci sa orgán, v ktorého apikálnej časti

dochádza k proliferácií a diferenciacií rôznych buniek, ktorých úlohou je dokončenie vývinu koreňa zuba. Histologický obraz vykazuje cievmi bohato zásobenú mladú zubnú dreň, čo umožňuje väčší prísun obranných látok a rýchlejšie odstraňovanie škodlivín. V ranom štádiu má charakter mezodermálnej zubnej papily s množstvom nediferencovaných kmeňových buniek, vďaka čomu má zubná dreň týchto zubov veľkú reparatívnu schopnosť po poškodení (Hargreaves, K. M. 2011).

Biologické základy regeneratívnej endodoncie

Regeneratívna endodoncia sa vyvinula zo skorých pokusov opierajúcich sa o význam krvnej zrazeniny v endodontickej terapii (Ostby, B. N. 1961), v spojení s pochopením, že revaskularizácia, alebo obnovenie cievného zásobovania existujúcej drene, je nevyhnutné pre pokračovanie vývinu koreňa po traumatickom poranení (Andreasen, J. O. et al. 2007). Ďalším faktorom bolo rozšírenie výskumu kmeňových buniek, najmä objav mezenchymálnych kmeňových buniek s potenciálom diferencovať do dentogenných bunkových línií produkujúcich dentín (Huang, G. T. et al. 2009).

Nakashima popísal 3 kľúčové zložky tkanivového inžinierstva, a to kmeňové bunky, biologickú mriežku a rastové faktory, ktorých správnym využitím budeme schopní vytvoriť mikroprostredie vedúce k úspešnej regenerácii tkanív. Pre využitie princípov tkanivového inžinierstva v oblasti regeneratívnej endodoncie je potrebné výskum zamerať na výber vhodných kmeňových buniek, rastových faktorov a materiálov zabezpečujúcich ich správne priestorové usporiadanie pre formovanie funkčného pulpo-dentínového komplexu (Nakashima, M. 2005). Na zubnú dreň môžeme pozerať ako na inervované a vaskularizované riedke spojivo, ktorého hlavným typom buniek sú fibroblasty. Spolu s krvnými, lymfatickými cievmi a neurónmi sú zavzaté do extracelulárnej matrix tvorenej kolagénom a inými typmi vlákien,

obkolesené zvonku vrstvou odontoblastov. Z toho vyplýva, že pre tvorbu tohto tkaniva je potrebný vývin niekoľkých typov buniek. Predpokladá sa, že mezenchymálne kmeňové bunky sú v dreni umiestnené v okolí ciev a v zóne bohatej na bunky, nachádzajúcej sa pod vrstvou odontoblastov a majú za úlohu ich náhradu v prípade poškodenia (Shi, S., Gronthos, S. 2003). U vyvíjajúcich sa zubov sa kmeňové bunky nachádzajú v oblasti apikálnej papily ako sú zdrojom primárnych odontoblastov počas vývinu (Nosrat, A., et al. 2014). Regenerácia riedkeho spojivového tkaniva vykazuje podobnosť s granulačnou fázou v procese hojenia rany. Svedčí o tom hlavne lokálne uvoľňovanie angiogénnych rastových faktorov, a to vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora – VEGF a doštičkového rastového faktora – PDGF, ktoré plnia kľúčovú úlohu pri riadení angiogenézy a rozvoja riedkeho spojivového tkaniva (Yokose, S., et al. 2004). Výhodou je fakt, že zubná dreň vyplňa relatívne malý objem, okolo 0,1–0,2 ml a v porovnaní s ostatnými orgánmi ma relatívne jednoduchú cytoarchitektúru, ktorú môžeme prirovnať k jadru z riedkeho spojivového tkaniva obkoleseného vrstvou odontoblastov pripojených k dentínu, čo by z hľadiska tkanivového inžinierstva mohlo byť jednoduchšie na regeneráciu (Hargreaves, K. M. 2011)

Iwaya, S. I., et al. (2001) ako aj Banchs, F., Trope, M. (2004) sa výsledkami svojich prác pričínili o zvýšený záujem o regeneratívnu endodonciu. Dezinfekciou nekrotického tkaniva s následnou antibiotickou medikáciou kanála docielili ukončenie vývinu koreňa so známami reinervácie (Law, A. S. 2013). Opierajúc sa o poznatky z traumatológie, regenerácia nekrotickej pulpy bola považovaná za možnú len v prípade luxácie trvalého zuba s neukončeným vývinom. Mladý zub má široko otvorený apex a keďže je krátky umožňuje to novému tkanivu prerastať do pulpálneho priestoru relatívne rýchlo. Pulpa je v tomto prípade nekrotická, ale zvyčajne nie je degenerovaná ani infikovaná, a preto slúži ako matrix, po ktorej môže nové

tkanivo rásť. Experimentálne bolo dokázané, že apikálna časť pulpy, ak pretrvá vitálna, dokáže po replantácii proliferovať koronárne nahrádzajúc nekrotickú časť pulpy (Trope, M. 2008). Doteraz bolo problémom zregenerovať infikované nekrotické pulpálne tkanivo u zubov s ireverzibilne zápalovo poškodenou zubnou dreňou. Ak by sa nám však podarilo vytvoriť podmienky podobné ako u luxovaného zuba, regenerácia by sa mohla objaviť, a to po efektívnej dezinfekcii koreňového kanála, vytvorení matrix, ktorá by umožňovala rast nového tkaniva a efektívnom utesnení a zaplnení koronárneho prístupu (Windley, W. et al. 2005).

Hoci tieto práce obsahovali klinický dôkaz ukončenia rastu koreňa, chýbal im histologický rozbor novovzniknutého tkaniva v koreňovom kanáli. Preto s pribúdajúcimi prezentovanými prípadmi sa začali viesť spory ohľadom terminológie popisujúcej klinické postupy a v konečnom dôsledku aj dosiahnuté výsledky (Geisler, T. M. 2012). Revaskularizácia nedostatočne popisuje pozorované zmeny, termín zaužívaný z traumatológie podľa definície predstavuje obnovenie cievneho zásobovania zubnej drene, a hoci angiogenéza a obnovenie cievneho zásobenia je kľúčové pre regeneráciu, je treba poznamenať, že v niektorých prípadoch došlo k pozitívnej odpovedi na test vitality (Hargreaves, K. M. et al. 2013). Revitalizácia zasa popisuje rast tkaniva, ktoré nie celkom zodpovedá pôvodnému tkanivu a regenerácia ako náhrada poškodených štruktúr, zahŕňajúc dentín a štruktúry koreňa ako aj bunky pulpo-dentínového komplexu (Law, A. S. 2013). Spoločným menovateľom zjednocujúcim všetky 3 popisované postupy ostáva kategória regeneratívnych endodontických postupov.

Postup pri regeneratívnej endodoncii

V prehľade regeneratívnych endodontických postupov sa stretávame s rôznymi variáciami liečebných protokolov spojených s úspešnými klinickými výsledkami, aj preto v súčasnosti nie je odporúčaný jediný postup (Tab. 1).

Z prezentovaných klinických prác vyplývajú niektoré spoločné pozorovania:

- Väčšinou išlo o mladých pacientov 6–18 ročných, čím sa predpokladá, že vek môže zohrávať dôležitú rolu pre regeneratívny potenciál.
- Ošetrované boli trvalé zuby s neukončeným vývinom, pretože krátke korene so široko otvoreným apexom sú viac prístupné prerastaniu tkaniva s možnosťou výskytu väčšieho počtu kmeňových buniek.
- Minimálna alebo žiadna mechanická preparácia s cieľom ponechania nekrotickej pulpy alebo indukcie krvnej zrazeniny, ktoré poslúžia ako mriežka.
- Aplikácia vnútrokanálového liečiva pre dezinfekciu kanála.
- Dokonalé baktériam odolné zapečatenie následované trvalou výplňou.

Odlišovali sa však:

- V type a koncentráciách použitých výplachových roztokov (1,25–5,25 % NaOCl, 3 % H₂O₂)
- V type a koncentráciách vnútrokanálového liečiva (Ca(OH)₂/antibiotická pasta)
- Počte ošetrovaní ako aj dĺžke medzi jednotlivými ošetreniami
- Tvorbe krvnej zrazeniny alebo použití iného typu mriežky (PRP)
- Type materiálu použitého na prekrytie pulpálneho priestoru
- Trvalej výplni.

Napriek týmto rozdielom, výsledkom takmer všetkých postupov bolo vyliečenie apikálnej patológie a dokončenie vývinu koreňa v zmysle jeho dĺžky aj hrúbky stien koreňového kanála.

Pri rozhodovaní sa pre regeneratívny endodontický postup je dôležitý výber vhodného pacienta. Súčasné odporúčania u zubov s nekrotickou zubnou dreňou a neukončeným vývinom nezohľadňujú etiológiu nekrózy zubnej drene, keďže štúdie evidujú nekrózu zubnej drene sekundárne po traume (Petrino, J.A. 2007), v dôsledku zubných anomálií (Banchs,

F., Trope, M. 2004), ako aj v dôsledku zubného kazu (Nosrat, A., et al. 2011). Reimplantácia luxovaných zubov s rádiologickým meziodistálnym priemerom apexu väčším ako 1 mm mala omnoho vyššiu úspešnosť revaskularizácie (Kling, M., et al. 1986), preto pravdepodobnosť úspechu regeneratívneho postupu u zubov s neukončeným vývinom s nekrotickou zubnou dreňou je závislá od veľkosti apikálneho otvoru umožňujúceho prerastanie cievneho zásobenia a kmeňových buniek do koreňového kanála (Law, A.S. 2013). V krvi zubov s neukončeným vývinom boli zároveň zaznamenané zvýšené hodnoty markerov mezenchymálnych kmeňových buniek (Lovelace, T.W., et al. 2011), čo nasvedčuje, že apikálna papila prítomná v periapikálnom priestore vyvíjajúcich sa zubov predstavuje zdroj potrebných kmeňových buniek (Huang, G.T., et al. 2008).

Liečebný protokol

Prvá fáza liečby

V prvom kroku sa zamieriavame na vytvorenie prístupu a šetrnú dezinfekciu pulpálneho priestoru (Geisler, T.M. 2012). Neoddeliteľnou súčasťou regeneratívnych postupov je kanálik bez prítomnosti baktérií (Hargreaves, K.M. 2011), pretože nekrotická, ale neinfikovaná pulpa v kombinácii s krvnou zrazeninou nám slúžia ako matrix pre migráciu kmeňových buniek a ich následnú diferenciáciu. Akonáhle však dôjde ku kontaktu tohto tkaniva s baktériami proces sa zastaví (Yanpiset, K., Trope, M. 2000).

Pri výbere vhodného výplachového roztoku na dezinfekciu kanála je dôležitá rovnováha medzi potrebou eliminácie baktérií a zachovania vitality kmeňových buniek. Hypochlóríd sodný – NaOCl (Essner, M.D., et al. 2011), ako aj chlorhexidín - CHX (Trevino, E.G., et al. 2011) napriek svojim prospešným antimikrobiálnym účinkom sa správajú cytotoxicky ku kmeňovým bunkám, a rovnako môžu denaturáciou proteínov redukovať uchytenie kmeňových buniek k dentínu (Ring, K.C., et al. 2008). Použitím

oboch týchto roztokov po sebe dochádza ku tvorbe precipitátu para-chlóranilínu, preto je rozumné medzi jednotlivými roztokmi kanálik vypláchnuť sterilnou vodou alebo fyziologickým roztokom na elimináciu tohoto precipitátu (Basrani, B.R., et al. 2007). Pre dezinfekciu koreňových kanálikov s neukončeným vývinom sa teda neodporúča výplach pomocou CHX. Vhodné je použitie 20 ml 1,25% NaOCl, teda dostatočného množstva výplachového roztoku, avšak v nižšej koncentrácii, kvôli minimalizácii cytotoxického účinku. Negatívny účinkok na uchytenie kmeňových buniek je možné zvrátiť použitím kyseliny etyléndiamintetraoctovej – EDTA (Galler, K.M., et al. 2011).

Po dôkladnej dezinfekcii pomocou výplachového roztoku a vysušení kanálika papierovým čapom sa odporúča aplikácia intraradikulárneho liečiva. Hydroxid vápenatý sa v endodoncii používa už dlhší čas, keďže okrem antimikrobiálnych účinkov je schopný rozpúšťať tkanivá, pôsobí inhibične v prípade intraradikulárnej resorpcie, funguje ako fyzicko-chemická bariéra a rovnako indukuje reparatívne pochody formovaním tvrdých tkanív. Dôležitú úlohu má dĺžka pôsobenia hydroxidu vápenatého v kanáliku, pretože aj keď bola dokázaná jeho schopnosť penetrácie do tubulov, došlo k zníženiu jeho pH, takže krátkodobé použitie nemusí byť dostatočne efektívne pre dezinfekciu koreňových kanálov (Siqueira, J.F., Jr., Lopes, H.P. 1999). V mnohých prípadoch regeneratívnych postupov s použitím Ca(OH)₂ došlo k tvorbe vnútrokanálových kalcifikácií, ktoré môžu brániť pokračujúcemu hrubnutiu dentínových stien (Chueh, L.H., Huang, G.T. 2006). Pre vysoké pH je známy svojou toxicitou aj na vitálne bunky a teda môže viesť k poškodeniu zvyškových buniek zubnej drene alebo aj kmeňových buniek, či k rozvratu apikálnej papily a jej príslušných kmeňových buniek, nevyhnutných pre pokračujúci vývin koreňa (Hargreaves, K.M., et al. 2008).

Mnoho autorov preto dáva prednosť trojitej antibiotickej paste. Keďže infekcia koreňového kanálika je považovaná za polymikrobiálnu in-

fekciu, je na jej elimináciu potrebná kombinácia liečiv. Hoshino, E., et al. (1996) skúmali účinnú kombináciu antibiotík na eradikáciu baktérií z infikovaného dentínu koreňových kanálov. Výskum na psoch u zubov s neukončeným vývinom a rádiologicky potvrdenou apikálnou parodontitídou preukázal veľkú účinnosť kombinácie ciprofloxacínu, metronidazolu a minocyklínu v pomere 1:1:1 pri dezinfekcii koreňových kanálikov, čo inšpirovalo viacerých autorov na aplikáciu tejto antibiotickej pasty v regeneratívnom postupe, vytvorením tak prostredia vhodného pre vrastanie ciev a buniek schopných diferenciácie. S aplikáciou antibiotík prichádzajú aj niektoré komplikácie v podobe alergickej reakcie, možnosti vzniku rezistencie určitých bakteriálnych kmeňov a z estetického hľadiska sfarbenia korunky (Reynolds, K., et al. 2009).

Následne je potrebné aplikované liečivo prekryť dočasnou výplňou a dohodnúť termín nasledujúceho ošetrenia. Časový rozstup medzi sedeniami je v jednotlivých prípadoch rôzny, no z pozorovaní úspešných klinických štúdií sa odporúča ponechať či už antibiotickú pastu alebo Ca(OH)₂ po dobu 2-4 týždňov (Law, A.S. 2013).

Druhá fáza liečby

V druhej fáze ošetrenia, je jednak potrebné vyhodnotiť odpoveď na iniciálnu fázu liečby a v prípade, že u pacienta perzistujú symptómy a/alebo sú prítomné známky infekcie v podobe opuchu, či pretrvávajúcej fistuly po abscese, je potrebná aplikácia rovnakého alebo rozdielného antimikrobiálneho liečiva v rámci dodatočného ošetrenia (Jung, I.Y., et al. 2008).

Ak je však pacient bez akýchkoľvek známk infekcie, môžeme pristúpiť k ďalšej fáze regeneratívneho endodontického procesu, aplikáciou lokálnej anestézie bez vazokonstrikčnej prísady, pretože nám môže brániť pri vyvolaní krvácania do koreňového kanála, čo je jedným z dôležitých krokov pre vytvorenie biologickej mriežky (Banchs, F., Trope, M. 2004) a prívod

**TAB. 1. PREHLAD ROZDIELOV V REGENERATÍVNYCH
ENDODONTICKÝCH POSTUPOCH**

Zdroj	Vek (roky)	Zub	Diagnóza	Výplach	Vnútrokanálové liečivo	Doba ponechania liečiva	Vyvolanie krvácania v kanáli	Zapečatenie kanála/ Dostavba
(Iwaya, S. I. et al. 2001)	13	45	CHAA	5 % NaOCl 3 % H ₂ O ₂	met+cip	5 týždňov	neudáva	Ca(OH) ₂ , SIC/FK
(Banchs, E., Trope, M. 2004)	11	45	CHAA	5,25 % NaOCl 0,12 % CHX	met+cip+min	26 dní	áno	MTA/FK
(Chueh, L. H., Huang, G.T. 2006)	10 10 10 9	35 45 35 45	CHAA AAA CHAA AAA	2,5 % NaOCl	Ca(OH) ₂ Ca(OH) ₂ Formokrezol Ca(OH) ₂	3 mesiace 8 týždňov 1 mesiac 5 týždňov	nie	Ca(OH) ₂ , Cavit/ amalgám
(Petrino, J. A. 2007)	8	11	CHAA	5,25 % NaOCl	met+cip+min	neudáva	áno	MTA/FK
(Thibodeau, B., Trope, M. 2007)	9	11	AAA	1,25 % NaOCl	met+cip+cef	11 týždňov	áno	wMTA/FK
(Cotti, E. et al. 2008)	9	11	CHAA	5 % NaOCl 3 % H ₂ O ₂	Ca(OH) ₂	2 týždne	nie	MTA/SIC, FK
(Jung, I. Y. et al. 2008)	9-14	9 zubov	CHAA AAA AP	5 % NaOCl 2,5 % NaOCl	met+cip+min ery+Ca(OH) ₂ Ca(OH) ₂	7-88 dní	áno/nie	Gutta-percha/FK MTA/FK
(Shah, N., et al. 2008)	9-18	14 zubov	CHAA AP	2,5 % NaOCl 3 % H ₂ O ₂	Formokrezol	neudáva	áno	SIC
(Chueh, L. H. et al. 2009)	6-14	23 zubov	CHAA AP AAA	2,5 % NaOCl	Ca(OH) ₂	1-25 mesiacov	áno	Gutta-percha/FK; Am MTA, gutta-percha/FK; Am amalgám
(Ding, R. Y. et al. 2009)	8-11	3 zuby	CHAA AAA	5,25 % NaOCl	met+cip+min	1 týždeň	áno	MTA/FK
(Reynolds, K. et al. 2009)	11	2 zuby	CHAA	6 % NaOCl 2 % CHX	met+cip+min	4 týždne	áno	MTA/FK

TAB. 1. POKRAČOVANIE

Zdroj	Vek (roky)	Zub	Diagnóza	Výplach	Vnútrokanálové liečivo	Doba ponechania liečiva	Vyvolanie krvácania v kanáli	Zapečatenie kanála/Dostavba
(Shin, S.Y. et al. 2009)	12	45	CHAA	6 % NaOCl 2 % CHX	žiadne	neudáva	áno	MTA/FK
(Kim, J.H. et al. 2010)	7	11	AP	3 % NaOCl	met+cip+min	6 týždňov	áno	MTA/SIC, FK
(Petrino, J.A. et al. 2010)	6-13	5 zubov	CHAA AP	5,25 % NaOCl 0,12 % CHX	met+cip+min	3 týždne	áno	MTA/FK
(Thomson, A., Kahler, B. 2010)	12	35	CHAA	1 % NaOCl	met+cip+min	6 týždňov	áno	MTA/SIC, FK
(Cehreli, Z.C. et al. 2011)	8-11	6 zubov	AP	2,5 % NaOCl	Ca(OH) ₂	3 týždne	áno	MTA/SIC, FK; Am
(Chen, M.Y. et al. 2012)	7-13	20 zubov	neudáva	5,25 % NaOCl	Ca(OH) ₂	max 4 týždne	áno	MTA/FK
(Iwaya, S. et al. 2011)	7	31	AAA	5 % NaOCl 3 % H ₂ O ₂	Ca(OH) ₂	6 týždňov	áno	Gutta-percha/FK
(Nosrat, A. et al. 2011)	9 8	36 46	AP	5,25 % NaOCl	met+cip+min	3 týždne	áno	CEM,SIC/ Am
(Torabinejad, M., Turman, M. 2011)	11	15	AP	5,25 % NaOCl	met+cip+min	22 dni	PRP	MTA/Cavit, Am
(Lenzi, R., Trope, M. 2012)	8	11 21	AP	2,5 % NaOCl	met+cip+min	35 dni	áno	MTA/FK
(Nosrat, A. et al. 2012)	14	11 21	AP	5,25 % NaOCl	met+cip+min	4 týždne	áno	MTA/neudáva
(Jeeruphan, T. et al. 2012)	12-18	20 zubov	neudáva	2,5 % NaOCl	met+cip+min	28-42 dni	áno	neudáva

Vysvetlivky CHAA – chronický apikálny absces, AAA – akútny apikálny absces, AP – apikálna parodontitída, met – metronidazol, cip – ciprofloxacín, min – minocyklín, cef – cefactor, ery – erytromycín, PRP – plazma bohatá na krvné doštičky, SIC – skloionomérny cement, FK – fotokompozit, Am – amalgám, CEM – cement obohatený o vápnik

kmeňových buniek (Lovelace, T. W. et al. 2011). Následná izolácia pomocou kofferdamu je nevyhnutná pre dodržanie striktných aseptických podmienok, ktoré majú vplyv na konečný výsledok. V rámci obozretnosti môžeme pred odstránením dočasnej výplne vykonať externú dezinfekciu pomocou chlórhexidínu. Po sprístupnení je potrebné opatrne vypláchnutie pre odstránenie antimikrobiálnej vložky z koreňového kanála. Keďže NaOCl a CHX môžu ovplyvniť výsledok, odporúča sa výplach sterilným roztokom, alebo 20 ml 17 % EDTA, čo vedie k odstráneniu smear layer, sprístupneniu dentínových tubulov a podmieni uvoľnenie rastových faktorov, ako napríklad TGF β z dentínu, s následným výplachom sterilnou vodou alebo fyziologickým roztokom (Galler, K. M. et al. 2011).

Kanálik zbavený akýchkoľvek baktérií je predpokladom pre tkanivovú regeneráciu, avšak do prázdneho priestoru nové tkanivo nepre rastie, v tom prípade, je nevyhnutné vytvoriť mriežku, po ktorej by nové tkanivo rástlo. Indukciou krvnej zrazeniny z periapikálneho priestoru s obsahom rastových a diferenciačných faktorov by mohli vzniknúť podmienky pre prerastanie tkaniva (Thibodeau, B., Trope, M. 2007). Vzhľadom ku svojej lokalizácii, je predpoklad, že tkanivo apikálnej papily dokáže vďaka kolaterálnemu obehu prežiť nekrózu zubnej drene, a slúži tak ako zdroj potrebných kmeňových buniek (Huang, G. T. et al. 2008). Poprepájané fibrínové vlákna krvnej zrazeniny tvoria cestu pre migráciu buniek z periapikálnej oblasti (Harrison, J. W., Jurosky, K. A. 1991). Vďaka prítomným rastovým a diferenciačným faktorom sa krvná zrazenina aktívne podieľa na procese hojenia (Marx, R. E. 2004). Pomocou endodontickej sondy alebo inštrumentu sa laceráciou apikálneho tkaniva indukuje krvácanie, kým nedosiahne cemento-sklovinné rozhranie (Banchs, F., Trope, M. 2004). V prípade, že sa krvácanie neobjaví, môže pomôcť namočenie sondy alebo pilníka do 17 % EDTA na zabránenie koagulácie krvnej zrazeniny, v opačnom prípade je

vhodné opakovať antimikrobiálnu medikáciu koreňového kanála, pre docielenie dodatočného hojenia a tvorby granulačného tkaniva (Law, A. S. 2013). V jednom z prípadov bola krv získaná zo susedného kanálíka a injikovaná do suchého kanálíka (Nosrat, A. et al. 2011). Alternatívami ku krvnej zrazenine sú krvná plazma bohatá na krvné doštičky – PRP (Iwaya, S. et al. 2011) a autológa fibrínová matrix – AFM, ktorých výhodou je kontrola úrovne krvnej zrazeniny, bez toho či v koreňovom kanáli bolo vyvolané krvácanie, dajú sa ľahko získať, poskytujú 3D mriežku a predstavujú koncentrovaný zdroj rastových faktorov (Geisler, T. M. 2012). Aj keď evidujeme prípad kedy namiesto vyvolania krvácania bola do kanála vstreknutá PRP, ktorej úlohou bolo pritiahnúť kmeňové bunky do kanálíka, potreba odberu krvi, môže byť v prípade detských pacientov odstrašujúca (Torabinejad, M., Turman, M. 2011).

Zostávajúcim problémom ostáva vytvorenie dostatočnej baktériam odolnej pečate koronárneho prístupu, ktorá zabráni invázií baktérií do pulpálneho priestoru pred docieľením regeneratívneho procesu. MTA (minerál trioxid agregát) sa vďaka svojim výhodným vlastnostiam úspešne používa na utesnenie koronárneho prístupu v postupoch vitálneho ošetrenia zubnej drene. (Son, A. R., et al.) MTA je na rozdiel od $\text{Ca}(\text{OH})_2$ biokompatibilné s prilahlým pulpálnym tkanivom, schopné indukovať proliferáciu buniek zubnej drene, udržiava si vysoké pH počas dlhého obdobia s výnimočnou marginálnou adaptáciou, čo ho predurčuje k zabezpečeniu efektívneho zapečatenia koreňových kanálikov. Preto sa odporúča aplikácia 3–4 mm MTA a následná dostavba pomocou skloionoméru a kompozitu alebo amalgámu. MTA môže byť kontraindikované v prípadoch kde sa vyžaduje estetika, kvôli sfarbovaniu dentínu, preto sa v týchto prípadoch odporúča použitie alternatívneho materiálu, napríklad skloinoméneho cementu (Shah, N. et al. 2008).

Sledovanie úspešnosti terapie pozostáva z klinického a rádiologického vyšetrenia. Pri klinickom vyšetrení sledujeme prítomnosť poklopovej a palpačnej bolestivosti ako aj prítomnosť opuchu či fistulácie. Röntgenologicky si všimame ústup apikálnej rádiolucencie, zhrubnutie stien koreňového kanála ako aj predĺženie koreňa. Napriek značným časovým rozdielom v objavení sa rádiologických zmien v publikovaných štúdiách, vo všeobecnosti možno očakávať vymiznutie pariapikálnej rádiolucencie medzi 6–12 mesiacom, predĺženie a zhrubnutie stien koreňa sa objavuje medzi 12–24 mesiacom po ošetrovaní (Law, A. S. 2013). Ďalším klinickým pozorovaním je vyšetrenie citlivosti, ktoré je jednou z požiadaviek pre regeneráciu, avšak chýbanie pozitívnej odpovede nemusí nutne znamenať chýbanie vitality. Bolesť, opuchy mäkkých tkanív alebo zvýšená rádiolucencia poukazujú na zlyhanie liečebného postupu a odporúčané sú alternatívne spôsoby ošetrovania ako apexifikácia, či chirurgická liečba (Geisler, T. M. 2012).

Výsledky terapie

Apexogenéza predstavuje stav po ošetrovaní zuba s vitálnou pulpou, u ktorého sa podarilo navodiť dokončenie fyziologického vývinu a sformovanie apexu koreňa zuba. Širším pojmom je maturogenéza, ktorý sa týka fyziologického vývinu celého koreňa, nielen výhradne jeho apexu, kedy je možné pozorovať pokračujúce ukladanie dentínu v celej dĺžke koreňa, čím sa dodáva vyššia pevnosť a odolnosť koreňa voči zlomenine (Weisleder, R., Benitez, C. R. 2003). Pri súčasných regeneratívnych endodontických postupoch práve tento termín najlepšie popisuje pozorované závery (Tab. 2) (Hargreaves, K. M. 2011). Medzi pozorovanými výsledkami bolo možné odlíšiť 5 odpovedí na terapiu, a to:

- zhrubnutie stien koreňového kanála s ukončením vývinu koreňa
- nejednoznačné ukončenie vývinu koreňa s uzatvorením apexu

- ukončenie vývinu koreňa s pretrvávajúcim široko otvoreným apikálnym otvorom
- obliterácia koreňového kanála
- sformovanie bariéry z tvrdého tkaniva medzi MTA a apexom koreňa (Nosrat, A. et al. 2011).

Rozsah predĺženia koreňa a zhrubnutia jeho stien je v jednotlivých prácach variabilný. Štúdiá porovnávajúca rozdiely v dĺžke a hrúbke koreňa po aplikácii odlišných vnútrokanálových liečiv preukázala signifikantne väčšie zmeny u zubov ošetrovaných pomocou trojitej antibiotickej pasty (Bose, R. et al. 2009). Dosiahnuté zmeny na koreni v niektorých prípadoch nasvedčujú docielenie regenerácie zubnej drene. Na základe nedostatku histologických dôkazov, však stále neviem povedať aké tkanivo sa nechádza v koreňovom kanáli. Nedávne práce s histologickým vyšetrením však odhalili obnovenie pulpe podobného tkaniva v kanáli ľudského extrahovaného zuba po regeneratívnom endodontickom ošetrovaní (Shimizu, E. et al. 2012 a Torabinejad, M., Faras, H. 2012). Aj keď postupy sa mierne líšia od doteraz prezentovaných, potvrdzujú možnosť regenerácie tkaniva prítomnosťou vitálneho pulpe podobného tkaniva (Torabinejad, M., Faras, H. 2012) a vitálneho riedkeho spojivového tkaniva s vrstvou oploštených odontoblastom podobných buniek pozdĺž predentínu (Shimizu, E. et al. 2012). Výskumy na zvieratách po regeneratívnych endodontických postupoch však stále prezentujú ukladanie cementu alebo kosti podobného tkaniva, čo vedie k nejasnostiam ohľadom diferenciacie periodontálnych tkanív namiesto zubnej drene (Geisler, T. M. 2012). Nedávna analýza 1200 zubov po traume a 370 autotransplantovaných zubov poskytuje informácie o možnostiach dosiahnutých výsledkov, keď autori popísali 4 typy pozorovaní:

- revaskularizáciu zubnej drene s urýchlenou tvorbou dentínu
- vrast cementu a peridontálnych ligament
- vrast cementu, preriodontálnych ligament a kosti

TAB. 2 PREHLAD VÝSLEDKOV REGENERATÍVNYCH ENDODONTICKÝCH POSTUPOV

Zdroj	Dĺžka sledovania	Vyliečenie apikálnej patológie (počet zubov)	Predĺženie koreňa (počet zubov)	Zhrubnutie stien koreňa (počet zubov)
Iwaya, S. I. et al. (2001)	30 mes.	vyliečené (1)	áno (1)	áno (1)
Banchs, F., Trope, M. (2004)	2 r.	vyliečené (1)	áno (1)	áno (1)
Chueh, L. H., Huang, G. T. (2006)	7 mes.– 5 r.	vyliečené (4)	áno (4)	áno (4)
Petrino, J. A. (2007)	8 mes.	vyliečené (1)	áno (1)	áno (1)
Thibodeau, B., Trope, M. (2007)	12,5 mes./ 16 mes	vyliečené (1)	áno (1)	áno (1)
Cotti, E., et al. (2008)	30 mes.	vyliečené (1)	áno (1)	áno (1)
Jung, I. Y. et al. (2008)	1–5 r.	vyliečené (8) zmiernenie (1)	áno (7) diskutabilné (2)	áno (9)
Shah, N. et al. (2008)	6 mes.– 3,5 r.	vyliečené (7) otázne (7)	nemožné určiť (14)	nemožné určiť (14)
Chueh, L. H. et al. (2009)	6–108 mes.	vyliečené (23)	dokončenie vývinu (23)	dokončenie vývinu (23)
Ding, R. Y. et al. (2009)	≥ 1 r.	vyliečené (3) vylúčený (6) neprišli na kontrolu (3)	dokončenie vývinu s uzatvorením apexu (3)	dokončenie vývinu s uzatvorením apexu (3)
Reynolds, K. et al. (2009)	18 mes.	vyliečené (2)	žiadne (2)	áno (2)
Shin, S. Y. et al. (2009)	19 mes.	vyliečené (1)	áno (1)	áno (1)
Kim, J. H. et al. (2010)	8 mes.	vyliečené (1)	áno (1)	áno (1)
Petrino, J. A. et al. (2010)	9–12 mes.	vyliečené (1)	áno (2) nie (4)	áno (2) nie (4)
Thomson, A., Kahler, B. (2010)	18 mes.	vyliečené (1)	áno (1)	nemožné určiť (1)
Cehreli, Z. C. et al. (2011)	9–10 mes.	vyliečené (6)	áno (6)	áno (6)
Chen, M. Y. et al. (2012)	6–26 mes.	vyliečené (20)	áno (20)	signifikantné dokončenie vývinu koreňa (15) nie (5)
Iwaya, S. et al. (2011)	30 mes.	vyliečené (6)	nemožné určiť (14)	áno (1)
Nosrat, A. et al. (2011)	15–18 mes	vyliečené (2)	áno (2)	áno (2)
Torabinejad, M., Turman, M. (2011)	5,5 mes	vyliečené (1)	nemožné určiť (14)	áno (1)
Lenzi, R., Trope, M. (2012)	21 mes.	vyliečené (2)	nemožné určiť (14)	áno (1) nie (1)
Nosrat, A. et al. (2012)	6 mes.	rádiolucencia (2)	sformovanie apexu bez predĺženia/ zhrubnutia (2)	sformovanie apexu bez predĺženia/ zhrubnutia (2)
Jeeruphan, T. et al. (2012)	14–22 mes.	vyliečené (16) lieči sa (4)	áno (19) nie (1)	áno (20)

- v rast kosti a kostnej drene (Andreasen, J. O., Bakland, L. K. 2012).

Tieto pozorovania poukazujú na rôznorodosť možností výsledkov a poukazujú na potrebu hľadania možností väčšieho riadenia regenerácie.

ZÁVER

Aj keď doteraz aplikované postupy nie vždy viedli k ideálnym výsledkom, vo väčšine prípadov zlepšujú prognózu zubov s neukončeným vývinom. Je dôležité podotknúť rozdiel medzi histologickým a klinickým úspechom. Aj keď histologické závery na zvieratách nepoukazujú na regeneráciu pulpálneho tkaniva, klinické výsledky poukazujú na vysokú úspešnosť prežitia zubov s neukončeným vývinom po regeneratívnom endodontickom ošetrovaní. Rôznorodosť výsledkov, nedostatok informácií o pôvode tkaniva vnutri koreňového kanála alebo pôvodu mineralizovaného tkaniva na stenách koreňa sú predmetom ďalšieho výskumu v tejto oblasti.

Doterajšie výskumy na zvieratách tiež ukazujú na isté nedostatky v neriadenom prívode kmeňových buniek a rastových faktorov v aplikovaných liečebných postupoch. Úspešná regenerácia pulpo-dentínového komplexu na zvieratách s využitím kompletných princípov tkanivového inžinierstva upozorňuje na potrebu väčšej kontroly regenerácie tkanív aplikáciou vhodných buniek, biologickej mriežky a konkrétnych rastových faktorov s ich presným priestorovým rozložením pre docelenie viac predvídateľných výsledkov. Preto je len otázkou času kedy sa tieto princípy úspešne zavedú do klinickej praxe.

LITERATÚRA

1. ANDREASEN, J. O. et al.: Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth.

Oxford, UK; Ames, Iowa: Blackwell Munksgaard; 2007. 897 p. ISBN 9781405129541.

2. ANDREASEN, J. O., BAKLAND, L. K.: Pulp regeneration after non-infected and infected necrosis, what type of tissue do we want? A review. In Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology ISSN 1600-9657 2012, 28, 1, s.13–18.

3. BANCHS, F., TROPE, M.: Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? In Journal of endodontics ISSN 0099-2399 2004, 30, 4, s.196–200.

4. BASRANI, B. R. et al.: Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. In Journal of endodontics ISSN 0099-2399 2007, 33, 8, s.966–969.

5. BOSE, R., NUMMIKOSKI, P., HARGREAVES, K.: A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. In Journal of endodontics ISSN 1878-3554 2009, 35, 10, s.1343–1349.

6. CEHRELI, Z. C. et al.: Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. In Journal of endodontics ISSN 1878-3554 2011, 37, 9, s. 1327–1330.

7. CHEN, M. Y. et al.: Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. In International endodontic journal ISSN 1365-2591 2012, 45, 3, s. 294–305.

8. CHUEH, L. H. et al.: Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth. In Journal of endodontics ISSN 1878-3554 2009, 35, 2, s. 160–164.

9. CHUEH, L. H., HUANG, G. T. :Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. In Journal of endodontics ISSN 0099-2399 2006, 32, 12, s. 1205–1213.

10. COTTI, E., MEREU, M., LUSSO, D.: Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. In Journal of endodontics ISSN 1878-3554 2008, 34, 5, s. 611–616.

- 11. DING, R. Y. et al.:** Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2009, 35, 5, s. 745–749.
- 12. ESSNER, M. D., JAVED, A., ELEAZER, P. D.:** Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an *in vitro* study. In *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* ISSN 1528-395X 2011, 112, 5, s. 662–666.
- 13. GALLER, K. M. et al.:** Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2011, 37, 11, s. 1536–1541.
- 14. GEISLER, T. M.:** Clinical considerations for regenerative endodontic procedures. In *Dental clinics of North America* ISSN 1558-0512 2012, 56, 3, s. 603–626.
- 15. HARGREAVES, K. M.:** Cohen's pathways of the pulp. St. Louis, Mo.: Mosby Elsevier; 2011. 952 p. ISBN 9780323064897.
- 16. HARGREAVES, K. M., DIOGENES, A., TEIXEIRA, F. B.:** Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2013, 39, 3 Suppl, s. 30–43.
- 17. HARGREAVES, K. M. et al.:** Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2008, 34, 7 Suppl, s. 51–56.
- 18. HARRISON, J. W., JUROSKY, K. A.:** Wound healing in the tissues of the periodontium following periradicular surgery. I. The incisional wound. In *Journal of endodontics* ISSN 0099-2399 1991, 17, 9, s. 425–435.
- 19. HOSHINO, E. et al.:** *In vitro* antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. In *International endodontic journal* ISSN 0143-2885 1996, 29, 2, s. 125–130.
- 20. HUANG, G. T., GRONTHOS, S., SHI, S.:** Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. In *Journal of dental research* ISSN 1544-0591 2009, 88, 9, s. 792–806.
- 21. HUANG, G. T. et al.:** The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2008, 34, 6, s. 645–651.
- 22. IWAYA, S., IKAWA, M., KUBOTA, M.:** Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. In *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology* ISSN 1600-9657 2011, 27, 1, s. 55–58.
- 23. IWAYA, S. I., IKAWA, M., KUBOTA, M.:** Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. In *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology* ISSN 1600-4469 2001, 17, 4, s. 185–187.
- 24. JEERUPHAN, T. et al.:** Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2012, 38, 10, s. 1330–1336.
- 25. JUNG, I. Y., LEE, S. J., HARGREAVES, K. M.:** Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2008, 34, 7, s. 876–887.
- 26. KIM, J. H. et al.:** Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2010, 36, 6, s. 1086–1091.
- 27. KLING, M., CVEK, M., MEJARE, I.:** Rate and predictability of pulp revascularization in therapeutically reimplanted permanent incisors. In *Endodontics & dental traumatology* ISSN 0109-2502 1986, 2, 3, s. 83–89.
- 28. LAW, A. S.:** Considerations for regeneration procedures. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2013, 39, 3 Suppl, s. 44–56.
- 29. LENZI, R., TROPE, M.:** Revitalization procedures in two traumatized incisors with different biological outcomes. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2012, 38, 3, s. 411–414.
- 30. LOVELACE, T. W. et al.:** Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2011, 37, 2, s. 133–138.

- 31. MARX, R. E.:** Platelet-rich plasma: evidence to support its use. In *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* ISSN 0278-2391 2004, 62, 4, 489–496.
- 32. NAKASHIMA, M.:** The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. In *Journal of endodontics* ISSN 0099-2399 2005, 31, 10, s. 711–718.
- 33. NAKASHIMA, M.:** Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. In *Cytokine & growth factor reviews* ISSN 1359-6101 2005, 16, 3, s. 369–376.
- 34. NOSRAT, A., HOMAYOUNFAR, N., OLOOMI, K.:** Drawbacks and unfavorable outcomes of regenerative endodontic treatments of necrotic immature teeth: a literature review and report of a case. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2012, 38, 10, s. 1428–1434.
- 35. NOSRAT, A. et al.:** Tissue engineering considerations in dental pulp regeneration. In *Iranian endodontic journal* ISSN 1735-7497 2014, 9, 1, s. 30–39.
- 36. NOSRAT, A., SEIFI, A., ASGARY, S.:** Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2011, 37, 4, s. 562–567.
- 37. OSTBY, B. N.:** The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. In *Acta odontologica Scandinavica* ISSN 0001-6357 1961, 19, s. 324–353.
- 38. PETRINO, J. A.:** Revascularization of necrotic pulp of immature teeth with apical periodontitis. In *Northwest dentistry* ISSN 0029-2915 2007, 86, 3, s. 33–35.
- 39. PETRINO, J. A. et al.:** Challenges in regenerative endodontics: a case series. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2010, 36, 3, s. 536–541.
- 40. REYNOLDS, K., JOHNSON, J. D., COHENCA, N.:** Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. In *International endodontic journal* ISSN 1365-2591 2009, 42, 1, s. 84–92.
- 41. RING, K. C. et al.:** The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2008, 34, 12, s. 1474–1479.
- 42. SEDGLEY, C. M., BOTERO, T. M.:** Dental stem cells and their sources. In *Dental clinics of North America* ISSN 1558-0512 2012, 56, 3, s. 549–561.
- 43. SHAH, N. et al.:** Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2008, 34, 8, s. 919–925.
- 44. SHI, S., GRONTHOS, S.:** Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. In *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH* 2003, 18, 4, 696–704.
- 45. SHIMIZU, E. et al.:** Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/regeneration procedure. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2012, 38, 9, s. 1293–1297.
- 46. SHIN, S. Y., ALBERT, J. S., MORTMAN, R. E.:** One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. In *International endodontic journal* ISSN 1365-2591 2009, 42, 12, s. 1118–1126.
- 47. SIQUEIRA, J. F., Jr., LOPES, H. P.:** Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. In *International endodontic journal* ISSN 0143-2885 1999, 32, 5, s. 361–369.
- 48. SON, A. R. et al.:** Odontoblast TRP channels and thermo/mechanical transmission. In *Journal of dental research* ISSN 1544-0591 2009, 88, 11, 1014–1019.
- 49. THIBODEAU, B., TROPE, M.:** Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. In *Pediatric dentistry* ISSN 0164-1263 2007, 29, 1, s. 47–50.
- 50. THOMSON, A., KAHLER, B.:** Regenerative endodontics-biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. In *Australian dental journal* ISSN 1834-7819 2010, 55, 4, s. 446–452.

51. TORABINEJAD, M., FARAS, H.: A clinical and histological report of a tooth with an open apex treated with regenerative endodontics using platelet-rich plasma. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2012, 38, 6, s. 864–868.

52. TORABINEJAD, M., TURMAN, M.: Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2011, 37, 2, s. 265–268.

53. TREVINO, E. G. et al.: Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. In *Journal of endodontics* ISSN 1878-3554 2011, 37, 8, s. 1109–1115.

54. WEISLEDER, R., BENITEZ, C. R.: Maturation: is it a new concept? In *Journal of endodontics* ISSN 0099-2399 2003, 29, 11, s. 776–778.

55. WINDLEY, W. et al.: Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. In *Journal of endodontics* ISSN 0099-2399 2005, 31, 6, s. 439–443.

56. YANPISET, K., TROPE, M.: Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after different treatment methods. In *Endodontics & dental traumatology* ISSN 0109-2502 2000, 16, 5, s. 211–217.

57. YOKOSE, S. et al.: Platelet-derived growth factor exerts disparate effects on odontoblast differentiation depending on the dimers in rat dental pulp cells. In *Cell and tissue research* 2004, 315, 375–384.

IZOENZÝMY LAKTÁTDEHYDROGENÁZY V TKANIVÁCH A SÉRE MORIEK SEPAROVANÉ IZOELEKTRICKOU FOKUSÁCIOU

HEINOVÁ, D.^A, KOSTECKÁ, Z.^A, CSANK, T.^B

^aKatedra chémie, biochémie a biofyziky

^bKatedra mikrobiológie a imunológie,

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

zuzana.kostecka@uvlf.sk

SÚHRN

Za použitia izoelektrickej fokusácie v rozsahu pH 3 až 9 bolo zistených päť izoenzýmov laktátdehydrogenázy v sére a tkanivách moriek. Boli pozorované tri odlišné skupiny tkanív: a) tkanivá, v ktorých prevládali anodické frakcie (srdce, obličky, pankreas, erythrocyty), predovšetkým laktátdehydrogenáza-1; b) tkanivá s prevahou katodických frakcií (prsna svalovina, krvné sérum) hlavne laktátdehydrogenáza-5 a c) tkanivá s pomerne vyrovnanou distribúciou izoenzýmov (pečeň, slezina, pľúca, mozog). Najvyššia špecifická aktivita bola stanovená v prsnej svalovine (3920 U/g), srdcovom svale (100 U/g), mozgu (73 U/g) a krvnom sére (111 U/g). Nízke aktivity boli detegované v obličkách (11 U/g), pečeni (25 U/g) a erythrocytoch (31 U/g). Obraz izoenzýmov laktátdehydrogenázy v tkanivách a krvnom sére moriek je podobný s obrazom u kurčiat, ale líši sa od obrazu izoenzýmov laktátdehydrogenázy v tkanivách cicavcov.

Kľúčové slová: izoenzýmy laktátdehydrogenázy; morka; vtáky; cicavce; izoelektrická fokusácia

SUMMARY

Five isoenzymes of lactate dehydrogenase were detected in serum and tissues of turkey using isoelectrofocusing method in a pH range of 3 to 9. Generally, three different groups were seen: a) those having an anodic domination (heart, kidney, pancreas, erythrocytes) with mainly lactate dehydrogenase-1 fraction, b) those having a cathodic domination (breast muscle and serum) with prevalence of lactate dehydrogenase-5 and c) those with a more uniform distribution (liver, spleen, lung, brain). The specific enzyme activity was the highest in the breast muscle (3920 U/g), followed by heart muscle (100 U/g), brain (73 U/g), and serum (111 U/L). Low activities were detected in kidney, liver and erythrocytes (11 U/g, 25 U/g, 31 U/g, respectively). It was concluded, that lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in turkey tissues and serum were similar to those of chicken and differed from profiles of some mammals.

Key words: lactate dehydrogenase isoenzymes; turkey; birds; mammals; isoelectrofocusing

ÚVOD

Laktátdehydrogenáza (EC 1.1.1.27, LDH) je cytosolový enzým ubikvitárne rozšírený v bunkách vertebrát, rastlín a baktérií. Zúčastňuje sa metabolizmu sacharidov, kde katalyzuje premenu kyseliny mliečnej a pyrohroznovej za účasti nikotínamidadenínindinukleotidu ako koenzýmu [1]. Z hľadiska štruktúry je to tetramér zložený zo štyroch podjednotiek s molekulovou hmotnosťou 35 000, ktorý u živočíchov a človeka je prítomný v piatich elektroforeticky odlišných formách známych ako izoenzýmy. V molekule LDH sú prítomné dva typy protomérov H a M. Sú kódované dvoma odlišnými génmi *ldhA* pre M a *ldhB* pre H podjednotku [2], [3], [4], [5], čo poskytuje päť typov laktátdehydrogenázy: H_4 , H_3M , H_2M_2 , HM_3 a M_4 . Srdcový sval, kostrový sval a pečeň sa vyznačujú tým, že sú bohaté na LDH, pričom sa líšia svojím izoenzýmovým obrazom. V srdcovom svale prevládajú LDH_1 a LDH_2 formy nad katodickými formami LDH_5 a LDH_4 , zatiaľ čo obraz kostrového svalu väčšiny vertebrát má opačný charakter s prevahou katodických izoenzýmov. U ďalších orgánov sú prítomné tiež hybridné formy LDH_2 , LDH_3 a LDH_4 s pomerne vyrovnanou distribúciou a relatívne nižšou katalytickou intenzitou.

Stanovenie celkovej aktivity laktátdehydrogenázy vo vtáčích sérach sa stalo rutinnou metódou v klinických laboratóriách veterinárnej medicíny. Bolo použité napríklad pri štúdiu metabolických ochorení pečene a svalu [6], [7], [8] ako aj pri štúdiu vývojových zmien spojivového tkaniva [9], [10]. Stanovenie celkovej aktivity bolo taktiež použité v mnohých toxikologických štúdiách, ktoré boli zamerané na pochopenie vplyvu rôznych environmentálnych faktorov na vtáčí organizmus. Napriek širokej aplikácii laktátdehydrogenázy vtáčieho pôvodu je jej použitie obmedzené na stanovenie celkovej enzýmovej aktivity. Príčinou tohto obmedzenia je pravdepodobne imobilita vtáčích molekúl LDH izoenzýmov v elektrickom poli za použitia anodického

tlmivého systému pri hodnote pH 8,6–8,8, t. j. pH hodnôt vhodných pre delenie cicavčích laktátdehydrogenáz. V predkladanej práci sme použili izoelektrofokusačnú techniku v pH gradiente 3 až 9 na separáciu izoenzýmov LDH moriek v rôznych tkanivách a sére.

MATERIÁL A METÓDY

Zvieratá a príprava vzoriek

60-dňové klinicky zdravé morky mali priemernú hmotnosť 3 kg ($n=8$). Po transporte zvieratá odpočívali 24 hodín. Krv bola odobratá z krídlovej žily 1) za použitia heparínu pre separáciu izoenzýmov erytrocytov, 2) bez antikoagulantu za účelom získania séra. Zvieratá boli odporazené dekapitáciou, po ktorej nasledoval odber vzoriek tkanív uložených do chladeného tlmivého roztoku. Zozbierané boli nasledujúce tkanivá: srdcový sval, kostrový sval, pečeň, slezina, pankreas, pľúca a mozog. Tkanivá boli rozstrihané na malé kúsky a premyté tlmivým roztokom kvôli odstráneniu prebytku krvi a spojivového tkaniva. 2 g tkaniva boli potom homogenizované v 10 objemoch chladeného tlmivého roztoku (0,05 mol/L Tris-HCl, pH 7,3 s obsahom 0,01 % EDTA). Homogenáty boli centrifugované pri 19 000 g po dobu 60 minút pri 4 °C a supernatant bol použitý na enzýmovú analýzu ako aj na elektroforetickú separáciu. Krv bola zozbieraná do skúmaviek s obsahom heparínu a centrifugovaná pri 450 g po dobu 10 minút pri 4 °C. Plazma bola zliata a erytrocyty opatrne premyté trikrát v dvoch objemoch s následným zliatím supernatantu. Bunky boli potom lyzované prídavkom troch objemov chladenej destilovanej vody a centrifugované pri 19 000 g po dobu 60 minút pri 4 °C. Stanovenie celkovej aktivity LDH ako aj separácia izoenzýmov prítomných v hemolyzátoch bolo robené v ten istý deň ako odber krvi.

Katalytická aktivita laktátdehydrogenázy bola stanovená kolorimetricky pri 37 °C za použitia laktátu ako substrátu a NAD^+ ako koenzýmu,

pričom bol meraný hnedočervený produkt reakcie (A_{505}). Koncentrácia bielkovín bola stanovená podľa Bradfordovej [11], špecifická aktivita bola vyjadrená v enzýmových jednotkách na gram bielkovín (U/g). Koncentrácia hemoglobínu bola stanovená kyanmethemoglobínovou metódou (Imuna, Šarišské Michalany, SR), aktivita LDH v erythrocytoch bola vypočítaná v enzýmových jednotkách na gram hemoglobínu (U/g hemoglobínu).

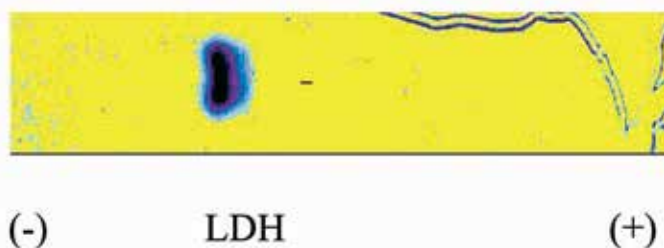
Elektroforetická separácia, detekcia a kvantifikácia vzoriek

Izoenzýmy LDH moriek boli rozdelené za použitia elektroforetického systému PhastSystem

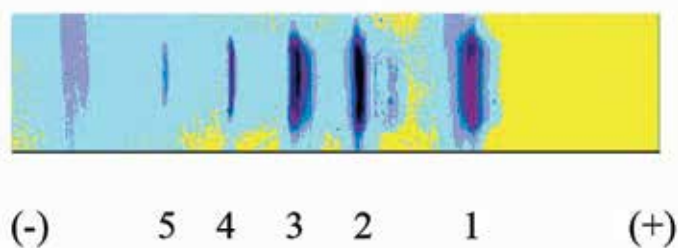
(Pharmacia LKB, Švédsko). Použitá bola technika izoelektrickej fokusácie (IEF) v rozsahu pH 3 až 9. Separčné podmienky 2000 V, 2,5 mA, 3,5 W, 15 °C, 30 minútová doba separácie.

Keďže elektroforézou sa separovali rôzne frakcie bielkovín, izoenzýmy LDH boli špecificky detegované za použitia nitroblue tetrazólia a laktátu sodného (Sigma USA) ako substrátu za použitia 0,1 mol/L glycín-NaCl-NaOH tlmiaceho roztoku pH 8,3. Na denzitometrické vyhodnotenie vzoriek (613 nm) a stanovenie relatívnej distribúcie frakcií izoenzýmov bol použitý PhastImage systém. Izoenzýmové frakcie boli vyjadrené v % z celkovej aktivity LDH. Pri identifikácii jednotlivých izoenzýmov LDH moriek na elektroforetogramoch bola frakcia

a)



b)



izoenzýmy laktátdehydrogenázy

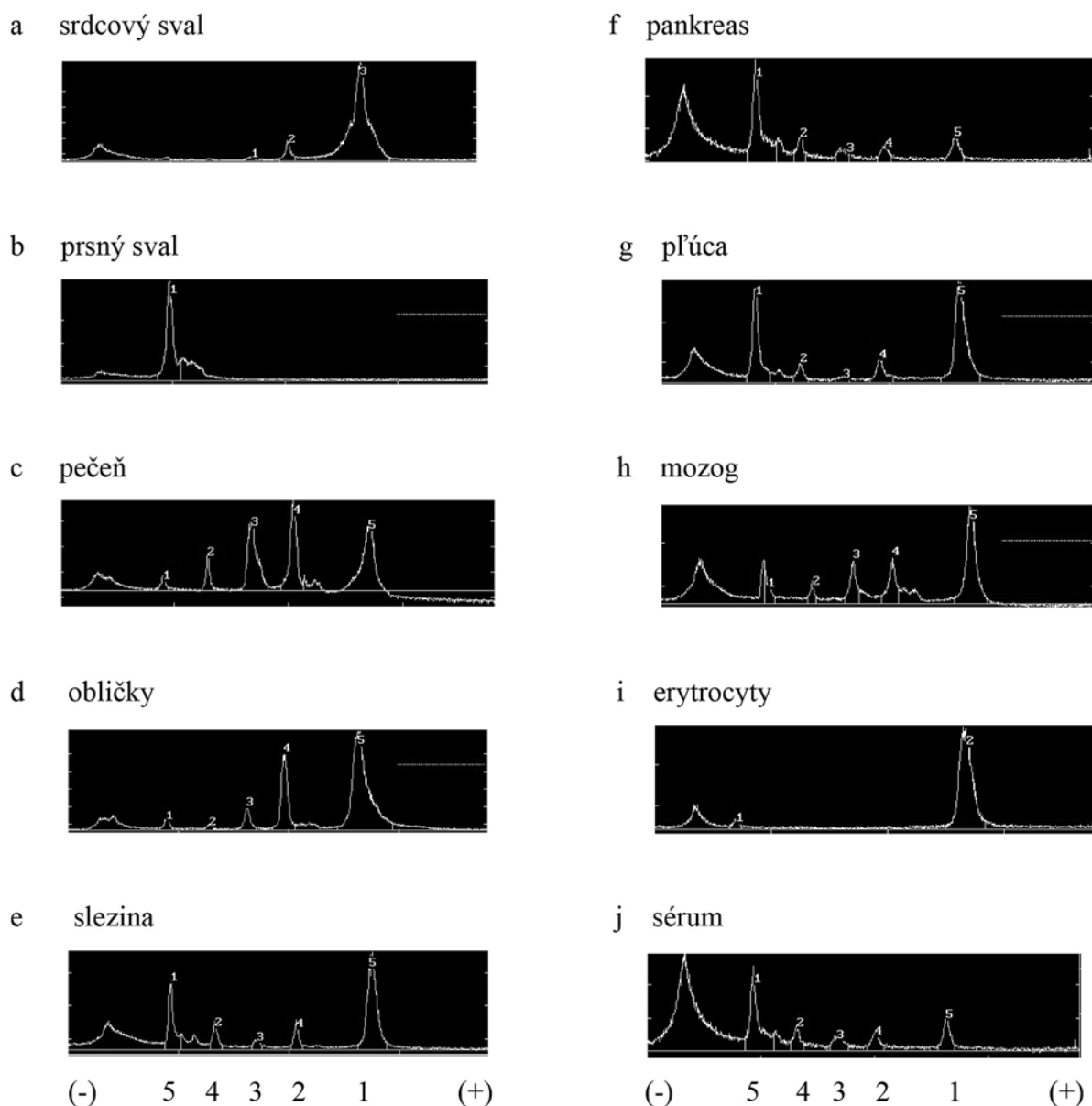
Obr. 1. Elektroforetický obraz izoenzýmov laktátdehydrogenázy moriek po ich separácii natívnou elektroforézou pri pH 8,8 (PAGE 8-25) (a) a izoelektrofokusáciou v gradiente pH 3,0 až 9,0 (IEF 3-9) (b). Podmienky separácie: 400 V, 10,0 mA, 45 minút doby separácie pri 4 °C, pH 8,8 (a); 2000 V, 2,5 mA, 15 °C, 20 minút doby separácie (b)

najbližšie k anóde označená LDH₁, frakcia najbližšia ku katóde – LDH₅.

VÝSLEDKY

Natívna elektroforéza v anodickom tlmivom systéme pH 8,8 neumožňovala rozdelenie

izoenzýmov laktátdehydrogenázy moriek (Obr. 1a). Z obr. 1b vidieť, že použitím techniky izoelektrickej fokusácie v gradiente pH 3 až 9 sme dosiahli dobré a zreteľné rozlíšenie všetkých piatich izoenzýmov LDH moriek. Ako príklad tejto separácie sme zvolili obraz LDH izoenzýmov pečene.



izoenzýmy laktátdehydrogenázy

Obr. 2. Densitometrické obrazy izoenzýmov laktátdehydrogenázy moriek v rôznych tkanivách, erythrocytoch a sére po ich separácii izoelektrickou fokusáciou v gradiente pH 3,0 až 9,0 (IEF 3–9). Podmienky separácie: 2000 V, 2,5 mA, 15 °C, 20 minút doba separácie. Čísla 1–5 predstavujú frakcie LDH₅–LDH₁

Denzitometrické obrazy tkanív, erytrocytov a séra po ich elektroforetickej separácii (Obr. 2) slúžili na stanovenie relatívnej distribúcie LDH izoenzýmov (%) v jednotlivých vzorkách tkanív (Tab. 1). Vidieť, že katalytická intenzita izoenzýmov LDH je rôzna a orgánovo charakteristická, pričom tieto obrazy možno rozdeliť do troch skupín:

a) skupina s prevahou anodických foriem;
 b) skupina s prevahou katodických foriem;
 c) skupina s pomerne vyrovnanou kvantitatívnou distribúciou. Prevalu anodických foriem (LDH₁) je vidieť v bunkách srdcového svalu, obličiek, pankreasu a v erytrocytoch, zatiaľ čo prevaha katodických foriem (LDH₅) je charakteristická pre prsný sval a sérum.

TAB. 1. CELKOVÉ AKTIVITY (U/G) LAKTÁTDEHYDROGENÁZY A RELATÍVNA DISTRIBÚCIA JEJ IZOENZÝMOV (%) V TKANIVÁCH, ERYTROCYTOCH A SÉRE MORKY (PRIEMERNÁ HODNOTA ± SMERODAJNÁ ODCHÝLKA)

Tkanivo	LDH [U.g ⁻¹]	Relatívna distribúcia izoenzýmov LDH [%]				
		LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
sérum	111 ^a (±2)	28,8 (±2,6)	9,7 (±1,3)	3,8 (±1,1)	10,7 (±0,9)	50,0 (±4,2)
srdcový sval	100 (±7)	94,2 (±0,4)	5,2 (±0,3)	0,5 (±0,1)	0	0
prsný sval	3920 (±157)	0	0	0	0	100
pečeň	25 (±1)	39,5 (±2,3)	25,4 (±1,3)	25,9 (±1,4)	6,2 (±1,0)	3,1 (±0,8)
obličky	11 (±1)	69,8 (±1,5)	21,6 (±1,0)	4,8 (±0,8)	0,3 (±0,1)	3,5 (±0,7)
slezina	38 (±1)	46,6 (±5,6)	9,0 (±0,4)	8,2 (±2,3)	13,5 (±2,4)	22,7 (±1,0)
pankreas	30 (±2)	80,7 (±1,0)	12,8 (±0,9)	0,7 (±0,2)	0	5,8 (±0,7)
plúca	38 (±2)	53,3 (±2,3)	7,7 (±0,9)	2,0 (±0,4)	9,1 (±1,2)	27,9 (±1,5)
mozog	73 (±3)	49,9 (±3,5)	15,8 (±1,3)	11,2 (±0,5)	5,1 (±0,6)	18,0 (±4,5)
erytrocyty	31 ^b (±6)	96,5 (±0,5)	0	0	0	3,5 (±0,5)

^a – U/L; ^b – U/g hemoglobínu

Pečeň, slezina, obličky a mozog poskytli obraz s vyrovnanjšou distribúciou všetkých piatich somatických izoenzýmov LDH s určitou anodickou tendenciou. Najvyššia špecifická aktivita LDH vyjadrená v enzýmových jednotkách na gram proteínu (U/g) bola pozorovaná v prsnom svalе (3920 ± 157 U/g) (Tab. 1), nasledoval sval srdcový (100 ± 7 U/g) a mozog (73 ± 3 U/g) (Tab. 1). Ostatné tkanivá obsahovali relatívne nízku aktivitu LDH (všetky pod 38 U/g). Sérum a erytrocyty vykazovali navzájom odlišný obraz izoenzýmov, kde v sére prevládala katodická forma a v erytrocytoch anodická.

ZÁVER

V tkanivách, erytrocytoch a sére moriek bola charakterizovaná kvantitatívna distribúcia izoenzýmov LDH. V sére prevládala LDH₅ frakcia pochádzajúca z prsného svalu, čo je v zhode s obrazom u kurčiat a líši sa od obrazu cicavcov, pre ktoré je charakteristická prevaha anodických LDH₁, LDH₂, LDH₃ izoenzýmov. Porovnanie obrazu izoenzýmov moriek s obrazom cicavčieho pôvodu odhalilo niektoré ďalšie odlišnosti, najmä s ohľadom na pečeň. Pokiaľ u väčšiny cicavcov v pečeni prevládajú katodické izoenzýmy (LDH₄ a LDH₅) u moriek je tento obraz opačný s prevahou anodických izoenzýmov (LDH₁, LDH₂, LDH₃). Tento obraz sa podobá obrazu kurčiat, pričom v oboch prípadoch boli zaznamenané relatívne nízke hladiny enzýmu. Zistenia v tejto štúdii môžu poskytnúť užitočný základ pre ich použitie v klinickej biochémií vtákov, kde izoenzýmy LDH slúžia ako cenný pomocný indikátor poškodenia tkanív resp. orgánov u moriek.

LITERATÚRA

1. WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E. L., 1973: Principles in Biochemistry. Fifth Edition by McGraw-Hill, Inc., p. 437–438.

2. TSOI, S. C. M. and Li, S. S. L., 1994: The nucleotide and deduced amino-acid sequences

of a cDNA encoding lactate dehydrogenase from mammals, birds, amphibian, fish, nematode, plants, bacteria, mycoplasma, and plasmodium. In *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 205, No. 1, pp. 558–564.

3. TSUJI, S. et al., 1994: Evolutionary relationships of lactate dehydrogenases (LDHs) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley, and bacteria: LDH cDNA sequences from *Xenopus*, pig and rat. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 91, pp. 9392–9396.

4. MANNEN, H. et al., 1997: The cDNA cloning and molecular evolution of reptile and pigeon lactate dehydrogenase isoenzymes. In *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 14, No. 11, pp. 1081–1087.

5. LI, Z. J. et al., 2002: Phylogenetic analysis of vertebrate lactate dehydrogenase (LDH) multi-gene families. In *Journal of Molecular Evolution*, Vol. 54, No. 5, pp. 614–624.

6. DIAZ, G. J. et al., 1999: The use of selected plasma enzyme activities for the diagnosis of fatty liver – hemorrhagic syndrome in laying hens. In *Avian Diseases*, Vol. 43, pp. 768–773.

7. SHIVAPRASAD, H. L. et al., 2002: Myopathy in brown pelicans (*Pelicanus occidentalis*) associated with rancid feed. In *The Veterinary Record*, Vol. 150, pp. 307–311.

8. YOST, J. K. et al., 2002: Influence of selection for the breast muscle mass on myosin isoform composition and metabolism of deep pectoralis muscles of male and female turkeys. In *Poultry Science*, Vol. 81, pp. 911–917.

9. ORTH, M. W. et al., 1999: Biochemical characterization of cartilage degradation in embryonic chick tibial explant cultures. In *Poultry Science*, Vol. 11, pp. 1596–1600.

10. NA, R. S. et al., 2010: Establishment and biological characteristics of Qingyuan partridge chicken fibroblast line. In *Poultry Science*, Vol. 89, pp. 1207–1216.

11. BRADFORD, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, pp. 248–254.

VPLYV HUMÍNOVÝCH KYSELÍN A OLOVA NA AKTIVITU NIEKTORÝCH ANTIOXIDANTOV V MITOCHONDRIÁCH PEČENE A OBLIČIEK

KREMPASKÁ, K., VAŠKOVÁ, J.
ŽATKO, D., VAŠKO, L.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie
Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach,
Lekárska fakulta, Tr. SNP 1, 040 66 Košice

janka.vaskova@upjs.sk

SÚHRN

Chronická expozícia olovu má na organizmus nepriaznivé účinky nakoľko vedie k narušeniu mechanizmov tvorby energie a poškodzovaniu tkanív najmä jeho väzbami na tiolové skupiny a kompetíciu o väzbové miesta so zinkom. Zamerali sme sa na overenie chelatačných a antioxidačných účinkov humínových kyselín pri expozícii potkanov v subletálnej dávke olova počas piatich týždňov. Podávanie olova výrazne ovplyvnilo hladiny glutatiónu a antioxidačných enzýmov s ním spojených. Prídavok humínových kyselín v krmnej zmesi počas piatich týždňov viedol vyrovnaniu hladín redukovaného glutatiónu na úroveň jedincov, ktorí neboli vystavení účinku olova.

Kľúčové slová: humínové kyseliny, olovo, antioxidačné enzýmy, oxidačný stres

SUMMARY

Chronic exposure to lead has adverse effects on the body as it leads to disruption of the

mechanisms of energy production and tissue damage particularly by its ties to the thiol groups and competition for binding sites with zinc. We focused on the verification of the chelating and antioxidant activities of humic acids on exposure to sub-lethal lead doses in rats for five weeks. Administration of lead significantly affect levels of glutathione and glutathione associated antioxidant enzymes. The addition of humic acids in the feed mixture over a period of five weeks balanced levels of reduced glutathione to level of subjects who were not exposed to the effects of lead.

Key words: humic acids, lead, antioxidant enzymes, oxidative stress

ÚVOD

Dosiaľ neexistuje žiadna jasná definícia, čo ťažkým kovom je. Vo väčšine prípadov sa za určujúci faktor považuje hustota. Potom sú ťažké kovy definované ako tie, ktorých špeciická hustota je väčšia ako 5 g.cm^{-3} . Pôsobením ťažkých kovov ako olovo, ortuť, kadmium ako aj polokovu arzenu dochádza k ohrozeniu ľud-

ského zdravia. Ľudská populácia je vystavená olovu zo vzduchu a potravy zhruba v rovnakom pomere. Emisie olova do ovzdušia sa týkajú najmä cestnej dopravy a preto sú v priestore pomerne rovnomerné. V minulom storočí tvorili značné znečistenie okolitého ovzdušia hlavne emisie z benzínu, do ktorého sa pridávalo tetraetylolovo. Pomerne významnými zdrojmi sú náterové hmoty, farby a sklenené obaly na potraviny. Obzvlášť citlivé na expozíciu olova v dôsledku vysokej gastrointestinálnej absorpcie a priepustnosti hematoencefalickej bariéry sú deti [9].

V krvi je olovo viazané na erytrocyty, eliminácia je pomalá a vylučuje sa močom. Olovo je akumulované v kostiach, odkiaľ sa uvoľňuje iba veľmi málo. Počas životnosti olova v krvi je približne mesiac ale v kostiach až 20–30 rokov. Otrava olovom vedie k poškodeniu nervového systému, zmenám citlivosti kože. Najvýraznejším znakom otravy olovom je narušenie syntézy hemoglobínu, ktoré pri dlhodobom pôsobení vedie k anémii. Akútna otrava vedie k poškodeniu proximálnych tubulov obličiek [24], pričom poškodenie obličiek koreluje s dĺžkou expozície olovu [14]. Na základe štúdií zvierat a ľudí bolo v roku 1987 olovo označené ako možný karcinogén. Odvtedy však bolo publikovaných iba niekoľko štúdií, ktoré síce predložili dôkazy ale len o veľmi nízkej karcinogenicite olova. Najpravdepodobnejšie je to rozvoj karcinómu pľúc, žalúdka a gliómov [20].

Jedným z toxických účinkov olova je indukcia oxidačného stresu zvýšením produkcie reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Rôzne ROS sú produkované aj v rámci normálneho metabolizmu všetkých aeróbnych organizmov, avšak predstavujú vážnu hrozbu pokiaľ sú produkované v nadmerných množstvách [18]. Olovo nie je redoxne aktívny kov ako napríklad železo, teda oxidačný stres indukovaný olovom je účinkom nepriamym. Prooxidačný stav je v bunkách vyvolaný znížením hladiny redukovaného glutatiónu (GSH), aktiváciou Ca^{2+} -dependentných systémov a ovplyvnením procesov sprostredkovaných železom [17]. Vy-

soká afinita olova k tiolovým skupinám, ktoré sa nachádzajú v aktívnych centrách enzýmov, spôsobuje ich inhibíciu [13].

Súčasťou povolenej klinickej intervencie je poskytnutie chelátorov, ktorý vytvoria s olovom nerozpustný komplex a odstránia ho zo zaťažených tkanív. Väčšina takýchto chelatačných činidiel má mnoho vedľajších účinkov. Častými vedľajšími účinkami sú hnačka, riedka stolica, nevoľnosť, zvracanie, nechutenstvo a kožná vyrážka. Jednou z povolených látok (US Food and Drug Administration), je 2,3-dimerkaptoantárová kyselina (DMSA). Hydrofilné a lipofóbne vlastnosti DMSA jej však neumožňujú prechádzať membránou. I keď sú jej chelatačné a aj antioxidantné účinky *in vivo* zdokumentované [3] voči olovom indukovanému oxidačnému stresu majú iba mierny účinok. Monoizoamyl DMSA (MiADMSA) je účinnejší pri mobilizácii olova v mozgu [23], avšak ani v prípade jeho použitia nie je dosiahnutá výrazná antioxidantná obrana [15]. Intravenózna liečba spočíva v podávaní etyléndiamíntetraoctovej kyseliny (EDTA), ktorej podávanie okrem iných vedľajších účinkov je sprevádzané pálením v mieste vpichu.

Nie je preto prekvapujúce, že hľadanie účinnej látky s výraznými chelatačnými a antioxidantnými vlastnosťami, ktorej podávanie by sprevádzalo aspoň nižšie množstvo vedľajších účinkov ako u doteraz používaných by bolo pre klinickú prax prínosom. Perspektívnymi sú humínové kyseliny (HA), u ktorých boli zdokumentované pozitívne účinky vychádzajúce z ich antioxidantných [16], [22] ako aj chelatačných vlastností [8], [25]. Cieľom tejto práce bolo zistiť antioxidantné účinky humínových kyselín pri chronickej otrave olovom u potkanov.

MATERIÁL A METÓDY

Experiment bol schválený Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR, Ro-2575/14-221. Do experimentu bolo zaradených

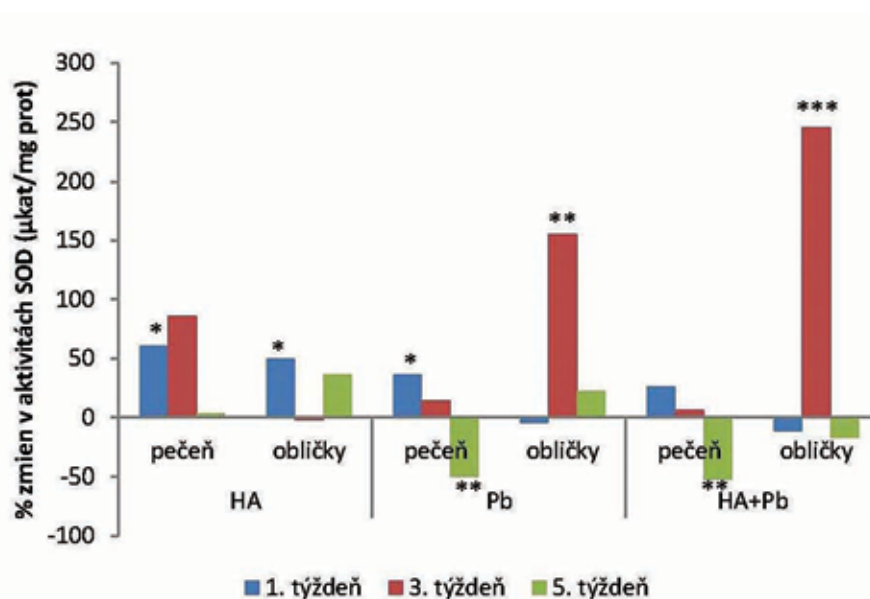
72 kusov laboratórných potkanov, samcov kmeňa Sprague – Dawley. Zvieratá boli rozdelené na štyri skupiny po 18 zvierat. Pokus prebiehal päť týždňov. Všetky zvieratá mali prístup k rovnakej kŕmnej zmesi a pitnej vode *ad libitum*. Prvá skupina bola kontrolná (K), bez podávania látok. Druhá skupina (HA) dostávala kŕmnu zmes s prídavkom 1 % HA (Humac Natur®, Humac s. r. o. Košice). Zvieratám v tretej pokusnej skupine (Pb) bol podávaný octan olovnatý 79.2 mg/deň/kg (1/30 LD₅₀) v pitnej vode. Štvrtej skupine (Pb+HA) bol podávaný octan olovnatý 1/30LD₅₀ v pitnej vode a kŕmna zmes s 1 % HA. Zvieratá boli usmrčované podaním ketamínu, po 1., 3. a 5. týždni chovu. Následne sme odobrali orgány – pečeň, obličky, z ktorých boli pri 4 °C izolované mitochondrie podľa Fernández-Vizarra a kol. [5]. Koncentrácia celkových bielkovín bola stanovená kyselinou bicinchoinovou. Aktivity glutatióperoxidázy (GPx, E.C. 1.19.1.9) a glutatióreduktázy (GR, E.C. 1.8.1.7) boli stanovené prostredníctvom kitov (Sigma-aldrich, Nemecko). Aktivita superoxid-dismutázy (SOD, E.C. 1.15.1.1) bola meraná prostredníctvom SOD-Assay Kit-WST (Fluka, Japonsko). Redukovaný glutatión (GSH) sme

stanovili metódou podľa Floreani a kol. [6]. Aktivity enzýmov boli prepočítané na mg proteínu v ml homogenátu.

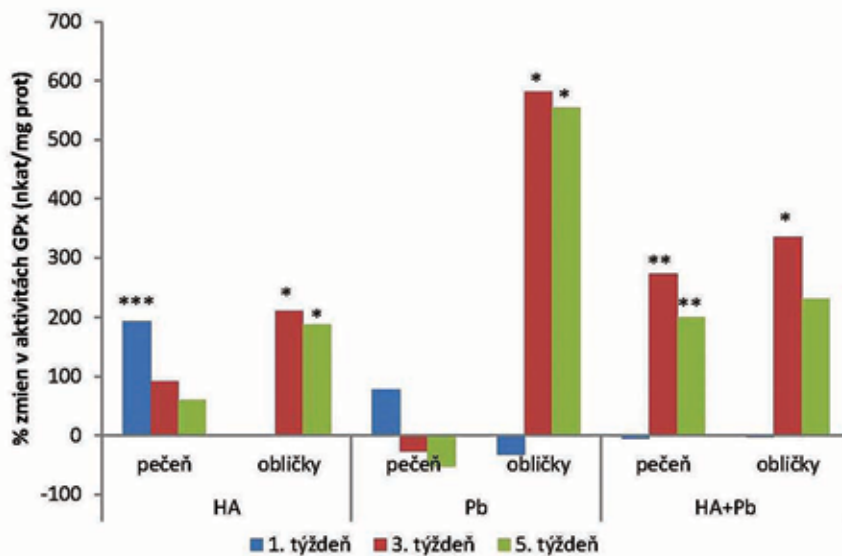
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Olovo je toxickou látkou v životnom prostredí, ktorá ovplyvňuje pečeň, obličky a spôsobuje v nich patobiologické zmeny [2]. Mechanizmy toxicity olova boli popísané na bunkovej [7] ako aj molekulárnej úrovni [21]. Olovo sa koncentruje v mitochondriách, ktoré poškodzuje, čím narúša energetický metabolizmus a zvyšuje produkciu voľných radikálov [12]. Účelom tejto práce bolo preto zistiť účinok humínových kyselín s potenciálne chelatačným účinkom pri chronickej otrave olovom na mitochondrie pečene a obličiek u potkanov v priebehu piatich týždňov.

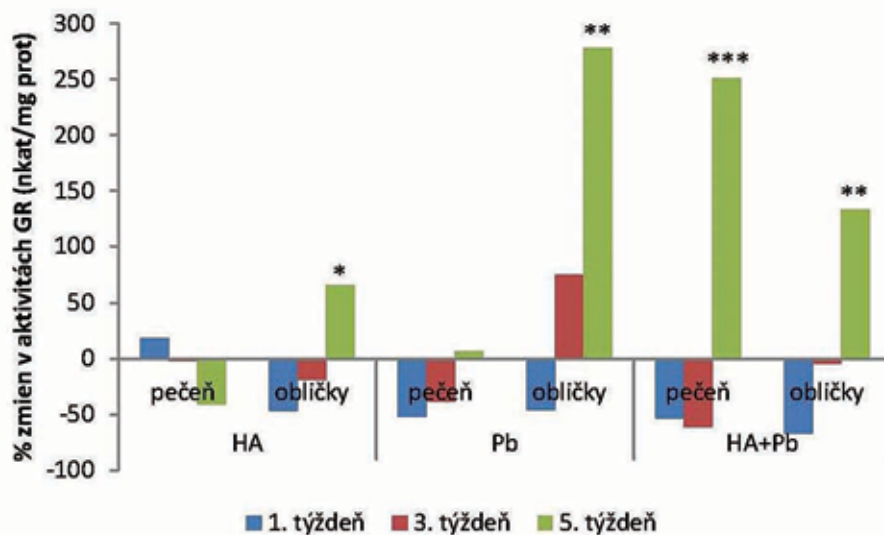
Aktivity SOD po 7. a 21. dňoch podávania humínových kyselín boli v mitochondriách pečene signifikantne zvýšené ($p < 0.05$), po piatich týždňoch sa od hodnôt v kontrolnej skupine nelíšili (Obr. 1). U skupín, kde bol podávaný octan olovnatý ako aj HA v kombinácii s octanom olovnatým boli aktivity SOD v pečeni naopak po



Obr. 1. Zmeny v aktivitách superoxid-dismutázy (%) počas piatich týždňov v experimentálnych skupinách v porovnaní s kontrolnou skupinou. * štatisticky významné rozdiely ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$)



Obr. 2. Zmeny v aktivitách glutatióneroxidázy (%) počas piatich týždňov v experimentálnych skupinách v porovnaní s kontrolnou skupinou. * štatisticky významné rozdiely ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

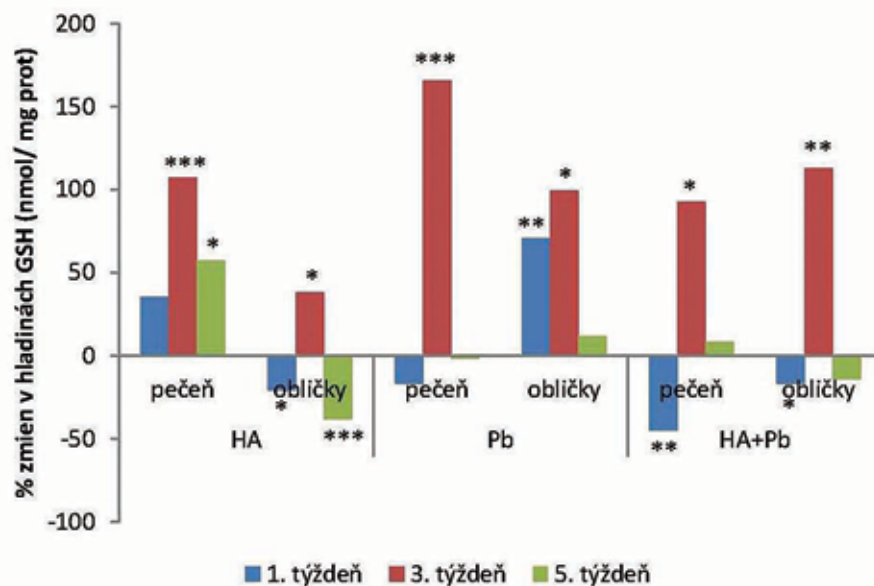


Obr. 3. Zmeny v aktivitách glutatiónereduktázy (%) počas piatich týždňov v experimentálnych skupinách v porovnaní s kontrolnou skupinou. * štatisticky významné rozdiely ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

piatich týždňoch signifikantne vyššie ($p < 0.01$). Obdobne sme pozorovali zvýšenie aktivity SOD v mitochondriách obličiek po 1. týždni v skupine HA ale neskôr, v 3. týždni v skupinách Pb ($p < 0.01$) a Pb + HA ($p < 0.001$). Významné zdravotné riziká z pôsobenia olova vyplývajú najmä z jeho schopnosti nahradiť Ca^{2+} a Zn^{2+} v molekulárnych mechanizmoch prebiehajúcich

v organizmoch. Basha a kol. [1] zistili, že Pb konkuruje Zn o väzbové miesta v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach. Súčasne s pozorovanou zvýšenou aktivitou antioxidantných enzýmov, podobne ako sme zistili v našej štúdiu, bola zistená aj zvýšená peroxidácia lipidov [11].

Podávanie HA viedlo k zvýšeniu aktivít GPx v mitochondriách pečene (Obr. 2) iba po prvom



Obr. 4: Zmeny v hladinách redukovaného glutatiónu (%) počas piatich týždňov v experimentálnych skupinách v porovnaní s kontrolnou skupinou. * štatisticky významné rozdiely (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

týždni. Podávanie olova nemalo výrazný vplyv na aktivity GPx v pečeni počas celého experimentu. Naopak v mitochondriách obličiek sme u oboch skupín, HA aj Pb zistili zvýšené aktivity GPx ($p < 0.05$). U skupiny Pb+HA aktivity GPx stúpili v porovnaní s kontrolnou skupinou na 3. a 5. týždeň v pečeni. V mitochondriách obličiek sme však už na piaty týždeň významný rozdiel v aktivitách nezistili. Zvýšené aktivity GPx pri chronickej expozícii Pb boli ako adaptačný mechanizmus organizmu potvrdené viacerými štúdiami [4], [10] avšak súčasne ako dôsledok toxického pôsobenia Pb bol opísaný aj pokles v aktivitách GR a zvýšenie hladín oxidovaného glutatiónu [19]. V aktivitách GR sme pozorovali signifikantné zvýšenie až v piatom týždni (Obr. 3) a to u všetkých skupín v obličkách, pričom v skupine Pb+HA bolo toto zvýšenie najvýraznejšie ($p < 0.01$). V tejto skupine boli aktivity GR výrazne zvýšené aj v mitochondriách pečene ($p < 0.001$).

Hladiny GSH v mitochondriách pečene boli zvýšené pri podávaní HA v 3. a 5. týždni (Obr. 4). V skupine Pb sme vzostup zaznamenali v 1. a 3. týždni ($p < 0.01$ a $p < 0.05$). Kiran

Kumar a kol. [11] potvrdzujú, že expozícia Pb vedie k zvýšeniu hladín GSH ako aj enzýmov asociovaných s GSH. Podávanie HA s Pb viedlo v 5. týždni k vyrovnaniu hladín, ktoré boli porovnateľné s kontrolnou skupinou. V mitochondriách obličiek hladiny GSH do 5. týždňa signifikantne klesli ($p < 0.05$), naopak v skupine s podávaným olovom sme pozorovali štatisticky významný nárast hodnôt do 3. týždňa ($p < 0.01$). Kombinácia oboch látok mala za následok spočiatku výrazný pokles v hladinách GSH (1. týždeň). V 3. týždni boli hladiny GSH už vyššie ako v kontrolnej skupine a v 5. týždni sme v porovnaní s kontrolnou skupinou nezaznamenali rozdiely.

ZÁVER

Porovnanie aktivít SOD v skupinách po piatich týždňoch nepoukazuje na výraznú tvorbu superoxidových radikálov. Prídavok humínových kyselín v množstve 1% po piatich týždňoch v pečňových mitochondriách nepreukázal schopnosť inhibície pravdepodobnej kompetície

Zn a Pb v aktívnom centre enzýmu. Zvyšovanie aktivity GPx ako obranný mechanizmus organizmu voči toxicite Pb by sme mohli pripísať aj 4 selenocysteínovým zvýšením, na ktoré sa Pb kvôli afinite k tiolovým skupinám viaže, ale zároveň svojou aktivitou predchádza aj peroxidácii organických substrátov. Protektívnu funkciu podávania HA bolo možné sledovať pri zvýšení aktivít GR v súčinnosti s detekovanými vyššími hladinami glutatiónu po 21. dňoch podávania až k normalizácii ich hladín k 35. dňu. Závery z našich pozorovaní bude potrebné overiť detekciou hladín Pb v týchto vzorkách.

POĎAKOVANIE

Experiment bol financovaný s podporou grantov: 17/GSD/2012, 20 %, VEGA 1/1236/12, 60 %, VEGA 1/0782/15, 20 %.

LITERATURA

- 1. BASHA, M.R., et al. 2003:** Lead-induced developmental perturbations in hippocampal Sp1 DNA-binding are prevented by zinc supplementation: *In vivo* evidence for Pb and Zn competition. In *International Journal of Developmental Neuroscience*, Vol. 21, pp. 1–12.
- 2. BECK, B. D., 1992:** An update on exposure and effects of lead. *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 261, pp. 1–16.
- 3. ERCAL, N. et al. 1996.** *In vivo* indices of oxidative stress in lead exposed c57bl/6 mice are reduced by treatment with meso 2,3-dimercaptosuccinic acid or n-acetylcysteine. In *Free Radical Biology and Medicine*, 21, 2, 157–161.
- 4. ERGURHAN-ILHAN, I. et al. 2008:** Level of oxidative stress and damage in erythrocytes in apprentices indirectly exposed to lead. In *Pediatrics International*, Vol. 50, No. 1, pp. 45–50.
- 5. FERNÁNDEZ-VIZARRA, E. et al. 2010:** Isolation of mitochondria for biogenetical studies: An update. In *Mitochondrion*, Vol. 10, No. 3, pp. 253–262.
- 6. FLOREANI, M. et al. 1997:** A comparison between different methods for the determination of reduced and oxidized glutathione in mammalian tissues. In *Free Radical Research*, Vol. 26, No. 5, pp. 449–455.
- 7. GARZA, A. et al. 2006:** Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. In *Medical Science Monitor*, Vol. 12, No. 3, pp. 57–65.
- 8. ISKENDER, H. et al. 2014:** Effect of humic acid on lead poisoning on liver tissue in chickens. In *Cell membranes and free radicals research*, Vol. 6, No. 1, pp. 392–393.
- 9. JÄRUP, L., 2003:** Hazards of heavy metal contamination. In *British Medical Bulletin*, Vol. 68, pp. 167–182
- 10. KASPERZYK, S. et al. 2004:** Activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase and lipid peroxidation in erythrocytes in workers exposed to lead. In *Biological Trace Element Research*, Vol. 102, pp. 61–72.
- 11. KIRAN KUMAR, B. et al. 2008:** Lead-induced increase in antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in developing rat brain. In *Biometals*, Vol. 21, No. 1, pp. 9–16.
- 12. LIDSKY, T.I., SHNEIDER, J.S., 2003:** Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. In *Brain*, Vol. 126, No. Pt 1, pp. 5–19.
- 13. MATEO, R. et al., 2003:** Relationship between oxidative stress, pathology and behavioural sign of lead poisoning in mallards. In *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Vol. 66, No. 14, pp. 1371–1379.
- 14. MORTADA, W. I. et al. 2001:** Study of lead exposure from automobile exhaust as a risk for nephrotoxicity among traffic policemen. In *American Journal of Nephrology*, Vol. 21, No. 4, pp. 274–279.
- 15. PANDE, M., FLORA, S. J. S., 2002:** Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of lipoic acid and succimers in rats. In *Toxicology*, Vol. 177, No. 2-3, pp. 187–196.
- 16. PANT, K. et al. 2012:** A humic matter panacea for cancer. In *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, Vol. 4, No. 2, pp. 17–25.

17. PINTO, E. et al. 2003: Heavy metals – induced oxidative stress in algae. In *Journal of Phycology*, Vol. 39, No. 6, pp. 1008–1018.
18. SHARMA, P., DUBEY, R. S. 2005: Lead toxicity in plants. In *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Vol. 17, no.1, pp. 35–52.
19. SCHWARTZ, B.S. et al. 2000: Associations of blood lead, dimercaptosuccinic acid chelatable lead and tibia lead with polymorphisms in vitamin D receptor and 5-aminolevulinic acid dehydratase genes. In *Environmental Health Perspectives*, Vol 108, No. 3, pp. 949–954.
20. STEENLAND, K., BOFFETTA, P., 2000: Lead and cancer in humans: where are we now? In *American Journal of Indian Medicine*, Vol. 38, No. 3, pp. 295–299.
21. TOSCANO, C.D. et al. 2005: Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. In *Brain Research Reviews*, Vol. 49, No. 3, pp. 529–554.
22. VAŠKOVÁ, J. et al. 2011: Effects of humic acids *in vitro*. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Animal*, Vol. 47, No. 5-6, pp. 376-382.
23. WALKER, E. M. et al. 1992: Mobilization of lead in mice by administration of monoalkyl esters of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid. In *Toxicology*, Vol. 76, No. 1, pp. 79–87.
24. WHO, 1995: Lead. In *Environmental Health Criteria*, Vol. 165, Geneva: World Health Organization.
25. ZRALÝ Z., PÍSAŘÍKOVÁ, B., 2010: Effect of sodium humate on the content of trace elements in organs of weaned piglets. In *Acta Veterinaria Brno*, Vol. 79, No. 1, pp. 73–79.

ČO PONÚKA POINT OF CARE TESTING

LAKATOŠOVÁ, K.^{1, 2}, BOLERÁZSKA, B.²
BIRKOVÁ, A.²

¹Nemocnica s poliklinikou, Kráľovský Chlmec
²Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ v Košiciach
Lekárska fakulta, Tr. SNP 1, Košice

anna.birkova@upjs.sk

SÚHRN

Dnešná doba so sebou priniesla aj výdobytky akými sú *in vitro* diagnostické pomôcky, ktoré možno používať mimo laboratórií, pričom ich dizajn je vopred navrhnutý tak, že s nimi môžu pracovať aj osoby, ktoré na vykonávanie laboratórnej práce nemajú kvalifikáciu. Využitie POC zariadení je odbornou verejnosťou stále diskutované a kontroverzné. Presnosť a kvalita metód POCT je založená na predpoklade správneho zavedenia a používania systému. Spektrum komerčne ponúkaných POCT technológií neustále narastá a sú vypracované viaceré normy a usmernenia regulujúce ich zavedenie a správne používanie. Používanie niektorých POC testov v praxi neprinieslo všetky očakávané pozitíva a pre mnohé zatiaľ nie sú zadefinované podmienky, za akých je ich použitie prínosom.

klúčové slová: POCT, výhody a obmedzenia použitia

SUMMARY

Modern times bring advances such as *in vitro* diagnostic devices that can be used outside the laboratory, and their design is planned so that they can work with persons who carry out laboratory work without educational prerequisites and qualifications. The use of POC devices is controversial. The accuracy and quality of the methods is based on the assumption of correct implementation and use of the system. The spectrum of commercially available POC technologies is constantly increasing and are drawn multiple standards and guidelines governing their deployment and proper use. Using some POC tests in practice did not produce the intended positive and for many are not yet defined the conditions under which their use is useful.

Key words: POCT, advantages and restrictions of method

ÚVOD

Point of care tests today are not a new novelty and belong to commonly used. Ne-

vyžadujú trvalo vyhradený priestor a sú vykonávané mimo zariadení klinických laboratórií. K základným patria napríklad: domáci glukomer, domáce zariadenie na meranie INR (International Normalized Ratio) u warfarinizovaných pacientov, pohotovostné HIV testy na oddeleniach, merače krvných plynov na JIS, domáci test na okultné krvácanie. Pre označovanie týchto *in vitro* testovaní mimo laboratórnych podmienok sa používajú mnohé synonymá: point of care testing, near patient testing, bed-side-testing, off-site testing, ancillary testing, satellite testing, home testing, remote testing, self-management, atď., z ktorých sa najčastejšie uvádza termín **Point of Care Testing**, v skratke POCT. Ich použitím sa znižujú náklady na prepravu, balenie, manipuláciu, skladovanie a sledovanie vzorky do centrálného laboratória, znižuje sa tým aj pravdepodobnosť kontaminácie vzorky, zámery vzorky, straty alebo jej degradácie (Lee-Levandrowski, 2009). Napomáhajú monitorovaniu rozšírenia infekčných ochorení v reálnom čase. Umožňujú aj rýchlu identifikáciu kontaminácie jedla a vody. Poskytujú možnosť diagnostiky na odľahlých miestach, ale aj v pohodlí domova a pre prvorespondentov.

Legislatíva

Prístroje a pomôcky v režime POCT spadajú do kategórie IVD (*in vitro* diagnostic) zariadení. Platí pre nich nariadenie vlády SR 569/2001 Z. z., ktorým sa ustanovujú podrobnosti o technických požiadavkách a postupoch posudzovania zhody diagnostických zdravotníckych pomôcok *in vitro*, s novelami 610/2008 Z. z. a 177/2012 Z. z. Implementovaná slovenská technická norma STNENISO22870 označuje takéto meranie ako „vyšetrenie v mieste starostlivosti (VVMS)„.

Spektrum komerčne ponúkaných POCT technológií neustále narastá, a to si vyžiadalo vypracovanie viacerých mezinárodných normatívnych a iných dokumentov regulujúcich ich zavádzanie a správne používanie. Najrozsiahlejším dokumentom zaoberajúcim sa

POCT je smernica NACB (National Academy of Clinical Biochemistry, USA) s názvom „Evidence-Based Practice for Point-of-Care Testing“ z roku 2007, ktorá POCT definuje ako: „klinické laboratórne vyšetrenie uskutočňované blízko miesta starostlivosti o pacienta, typicky vykonávané zdravotníckym personálom bez primárneho laboratórneho vzdelania alebo pacientom (samotestovanie). Medzi najnovšie dokumenty (03/2014), ktoré zdieľa aj Slovenská spoločnosť klinickej biochémie, patrí prehľad Medzinárodnej federácie klinickej chémie a laboratórnej medicíny (IFCC) s názvom „Čomu je potrebné venovať pozornosť pri zavádzaní laboratórnej diagnostiky v mieste poskytovania zdravotnej starostlivosti“ (http://www.sskb.sk/portal/httpwww-sskb-skportalwp-content/uploads/201502/ifcc-dokument_comu-je-potrebne-venovat-pozornost-pri-zavadzani-laboratornej-diagnostiky-na-mieste-poskytovania-zdravotnej-starostlivosti_10-1-2015/).

Klinická prax

V klinickej praxi sa od zavedenia POCT zariadenia očakávajú ekonomickejšie, efektívnejšie a rýchlejšie spôsoby získania hodnôt laboratórnych parametrov. Pri správnom prevedení, či už v rámci on-line monitoring laboratórnych parametrov (pH, K⁺) na operačných sálach, jednotkách intenzívnej starostlivosti, oddeleniach pre príjem pacientov na hospitalizáciu alebo ako mini-laboratórium v pracovni všeobecného lekára, by mal pacient z POCT profitovať, pretože poskytuje rýchly výsledok a tým skracuje čas rozhodovania sa pre vhodnú terapiu. Od nasadenia POCT technológie sa očakáva rýchla a spoľahlivá informácia bezprostredne využiteľná pre určenie diagnózy, posúdenie zdravotného stavu, skrining chorôb, alebo zahájenie či monitorovanie liečby. Jej využitie je podmienené správnou interpretáciou výsledkov a rešpektovaním patofyziológie biochemických markerov. Napríklad, pre POCT elektrolytov sa uvádza doba odozvy asi o 14 % kratšia v porovnaní s vyšetrením v centrálnom laboratóriu

(Winter, 2003). Zároveň však bola zistená skutočnosť, že POCT je asi o 9 % nákladnejšia. Čo sa týka rýchlosti získania výsledkov POCT technológie sú nezastupiteľné a zdá sa, že táto skutočnosť býva aj najčastejšou argumentáciou pri ich nasadzovaní. Nezanedbateľnou výhodou týchto testov je aj použitie neinvazívne získaného biologického materiálu, akým je slina. Ku komerčne dostupným testom v zahraničí (niektoré aj u nás) patrí : detekcia protilátok proti HIV (Ora Sure Technologies), steroidných hormónov (Salivary assay – Salivary cortisol Salimetrics), alkoholu a drog (Dräger USA-Home), rovnako ako aj foreznú a genetickú analýzu (IFI Independent Forensics, Hillside, IL, USA) (literatúra).

Pri výbere metodík a odporúčaní sa vychádza z odborných, technických i ekonomických faktorov. Najčastejším spôsobom realizácie sú metódy tzv. suchej chémie (chemikálie imobilizované na stripe).

Pravidelné kontroly za účelom udržania presnosti a spoľahlivosti sú u týchto zariadení nevyhnutnosťou a za ideálnych podmienok by mali byť vykonávané v spolupráci s centrálnym laboratóriom.

MOŽNOSTI POCT

Použitie POCT zariadení je napriek mnohým výhodám kontroverzné. V literatúre možno nájsť na zástancov analýz v laboratóriách, ktorí poukazujú na nedostatočnú analytickú presnosť či príliš vysokú cenu, a zdôrazňujú množstvo chýb a faktorov, ktoré vplývajú na výsledky. Opakom sú štúdie, v ktorých autori dokazujú, že POC testovanie mnohých parametrov je pri zachovaní správnych postupov výhodnejšie ako v laboratóriu pre jeho dostupnosť, rýchlosť, väčšinou menšiu invazivitu a porovnateľnú presnosť. Mnohé sú odporúčané za špecifických okolností. POCT pomôcky možno zaradiť do niekoľkých kategórií. V nasledujúcej tabuľke (Tabuľka 1) je prehľad vybraných možností POCT vyšetrení a ich najvýznamnejšie výhody a obmedzenia.

Vedecké trendy „laboratória pri lôžku pacienta“ → „From chips-in-a-laboratory to lab-on-a-chip„

Za posledné desaťročie sa výskumné tímy pokúšajú spojiť sily pri vývoji zariadenia, ktoré by dokázalo skombinovať a využiť nanomateriály, mikrofluidné inžinierstvo a mikroelektroniku pre praktické vytvorenie miniatúrnych senzorov (Ali a kol., 2005) Dôležité je, že doterajšie výsledky použitia týchto miniatúrnych senzorov korelujú s doteraz využívanými štandardnými laboratórnymi metódami. Výsledkom tejto snahy by mal byť vývoj PoCT zariadenia, ktoré by obsahovalo modulárny a zmenšený detekčný systém, univerzálny analyzátor, ktorý by integroval mechanické a optické rozhrania, flexibilnú architektúru, dokázali by ho obsluhovať aj klinici a vyhovoval aj ďalším potrebám vedeckej komunity (Miller a kol., 2010). Flexibilita architektúry znamená, že po malej úprave by prístroj dokázal analyzovať iný laboratórny parameter.

Táto vedecká oblasť je tiež často označovaná ako Micro-total analysis (uTAS) alebo Lab-on-a-chip (LoC). K hlavným dvom cieľom LoC patrí automatizácia laboratórnych postupov s cieľom zlepšiť paralelitu výskumu a druhým je práve vytvorenie autonómneho, plne integrovaného PoCT zariadenia, ktorý môže byť často len na jedno použitie a bolo by zamerané na testovanie jedného alebo niekoľkých analytov v relatívne krátkej dobe (Paegel a Joyce, 2010).

ZÁVER

Existencia širokého spektra ponúkaných POCT vyšetrení je obrovským prínosom napríklad pri diagnostike infekčných ochorení v Afrike, kde je zlá dostupnosť laboratórií, ale aj pri manažmente pacientov na kardiochirurgickom oddelení. Všetky dokumenty zaoberajúce sa smernicami a odporúčaniami sa zhodujú, že POCT technológie sú súčasťou modernej laboratórnej diagnostiky.

TAB. 1. VÝHODY A OBMEDZENIA VYBRANÝCH MOŽNOSTÍ
POCT VYŠETRENÍ

POC TEST	CIEĽOVÁ SKUPINA	VÝHODY	NEVÝHODY	ODPORÚČANIE	POZN.
Transkutánný bilirubinometer	Novorodenci	Neinvazivita	Vyhnuť sa použitiu u nezrelých, chorých alebo ošetrovaných fototerapiou	Lokalita: čelo, sternum	Nie je dôkaz, že použitie zlepšuje klinický stav, alebo skracuje dĺžku hospitalizácie
Akútny koronárny syndróm: Myoglobín Kreatínkináza –MB frakcia Troponín T Troponín I Natriuretické peptidy (BNP, NT-proBNP)	Pacienti s bolesťou na hrudníku alebo symptómami akútneho koronárneho syndrómu Tn -prognostický marker	Skrátenie diagnostického protokolu efektívnejšie obsadzovanie oddelení poskytujúcich urgentnú starostlivosť	Plná krv s antikoagulačným činidlom	Pri nedostupnosti výsledkov z laboratória do 1h sa odporúča použiť POCT Preferovať by sa mali POC zariadenia, ktoré poskytujú kvantitatívne výsledky	
Koagulácia: ACT aPTT PT PT/INR D-diméry	Pacienti na kardiochirurgii a intervenčnej kardiológii Monitorovanie hemostázy, účinnosti antikoagulačnej terapie Pacienti s trombo-embolickým rizikom	Odber kapilárnej krvi Self-management a self-testing u pacientov s antikoagulačnou liečbou		Pri použití mimotelového obehu	
Neodkladná starostlivosť: pO ₂ , pCO ₂ , pH glukóza, laktát O ₂ sat., HbCO MetHb Htc Mg ²⁺ Na ⁺ K ⁺ Cl ⁻ Ca ²⁺	Pacienti s ťažkým orgánovým poškodením, vážnou traumou, polytraumou, perioperačne a počas veľkých operácií, transplantácie, počas anestézie, s ťažkou sepsou, popáleninami a mnohými inými život ohrozujúcimi stavmi, u novorodencov s vrodenými vadami	Urychlenie terapeutickej intervencie Odber malého množstva krvi		Krvné plyny a ABR na kardiochirurgii, ARO a JIS, pri použití mimotelového obehu, pri použití umelej ventilácie Meranie glukózy u kriticky chorých pacientov bez ohľadu na anamnézu diabetes mellitus Meranie laktátu, O ₂ sat., HbCO, MetHb u kriticky chorých, na oddeleniach ARO, JIS, chirurgických sálach Z elektrolytov je na urgentných oddeleniach prínosné predovšetkým meranie K ⁺ a Ca ²⁺	Nie je dôkaz, že POC meranie Mg ²⁺ u kriticky chorých prispieva k zlepšeniu klinického stavu POCT stanovenie Na ⁺ , Cl ⁻ nevedie k rýchlejšiemu zásahu do liečby
Markery poškodenia obličiek: NGAL KIM-1 Cystatin C IL-18 L-FABP	Deti po operáciách srdca				
Krvný obraz: Htc Hb WBC MCHC Granulocyty %granulocytov Lymfo+monocyty %Lymfo+monocytov Trombocyty					
Pečeň: Albumín Bilirubín Enzýmy: ALT AST ALP GGT	Posúdenie funkcie pečene				

TAB. 1. POKRAČOVANIE

POC TEST	CIEĽOVÁ SKUPINA	VÝHODY	NEVÝHODY	ODPORÚČANIE	POZN.
Enzýmy: Amyláza LDH					
Diabetes mellitus Glukóza HbA1 Fruktózamín Ketolátky Albumín v moči	Pacienti s diabetes mellitus	Odber malých objemov Self-manažment a self-testing	Množstvo interferencií	Pri použití POCT glukometra, má sa klásť veľký dôraz na kvalitu prístroja, edukáciu používateľa a správne prevedenie testu POCT meranie HbA1 u diabetológov	Nie je dostatočný dôkaz o výhodnosti rutinného používania POCT glukometrov Nie je dostatočný dôkaz o prospešnosti self-testing HbA1 Neexistujú štúdie, ktoré by potvrdili klinický prínos merania fruktózamínu, ketolátok alebo albumínu v moči
Drogy a etanol: Etanol Efedra Extáza Hydrokodón Oxykodón Heroin Morfín Kokaín (crack) Benzoyllegonín Tetrahydrokanabinol Amfetamín Metamfetamín Metyléndioxyamfetamín Fentermín Fencyklidín Tricyklické antidepresíva Barbituráty Benzodiazepíny Metadon ...a ďalšie	Predpoklad použitia drogy	Rýchlosť Väčšinou z moču, potrebný objem od niekoľko kvapiek do 30 ml	Kvalitatívne Skrížené reakcie s potravinami, voľno-predajnými liekmi, liekmi na predpis, Pri stanovení drogy možná prítomnosť metabolitov, ktoré POCT nedeteguje Možnosť cieľného použitia prípravkov, ktoré spôsobia falošne negatívne výsledky (napr. Stealth pre marihuanu, LSD, morfín.; antihelmintikum levamisol pre kokaín)	Z biologických matric sa odporúča moč	POC testovanie je vhodné pri poskytovaní informácií na účely terapeutickej intervencie. Na právne účely je nevyhnutné potvrdenie laboratóriom. Detekcia možná 1-12 hodín od užitia drogy podľa druhu drogy Pozitivita trvá 1-21 dní podľa druhu drogy
Infekčné ochorenia: Streptococcus A Streptococcus B B.anthraxis C.botulinum F.tularensis H. pylori C.difficile C.trachomatis N.gonorrhoeae T.vaginalis C.albicans T.pallidum P.falciparum HIV EBV Virus influenza A Virus influenza B RSV Virus Ebola	Pacienti s infekčným ochorením	Rýchlosť	Test na dôkaz N.gonorrhoeae je určený len pre mužov	Dôkaz EBV len u detí nad 12 rokov Dôkaz STD sa odporúča u pacientov, u ktorých sa nepredpokladá, že sa ešte vrátia na ošetrenie (bezdomovci a pod.) Dôkaz streptokoka skupiny A, u všeobecných lekárov a pediátrův Dôkaz vírusu chrípky a RSV počas epidémií u všeobecných lekárov a pediátrův	V tomto čase dôkaz C. difficile pomocou POCT neodporúča pre náročnú mnohokrokovú predprípravu vzorky
Zápal: CRP hs-CRP	Pacienti s respiračnými infekciami Hodnotenie rizika KVS ochorení	Redukcia atb preskripcie		U všeobecných lekárov a pediátrův	Úloha hs-CRP pri stratifikácii KVS rizika sa stále skúma

TAB. 1. POKRAČOVANIE

POC TEST	CIEĽOVÁ SKUPINA	VÝHODY	NEVÝHODY	ODPORÚČANIE	POZN.
Lipidy: TAG Cholesterol HDL LDL VLDL	Posúdenie lipidového stavu				
Imunológia Špecifické IgE Zmiešaný panel IgE					
Okultné krvácanie:	Asymptomatický pacienti nad 50 r. v rámci skríningu kolorektálneho karcinómu	Rýchle, lacné, bez rizika pre pacienta	Falošná pozitivita		
Parathormón:	Real-time analýza počas operácie prištítných teliesok pre primárnu hyperparatyreózu Reoperácie			Odber po 5 a 10 min. po resekcii	
Štítina žľaza: TSH					
Obličkové funkcie: Urea Kreatinín Osmolalita Kys. močová				Stanovenie močoviny a kreatinínu sa neodporúča na AR oddeleniach	
Reprodukcia: hCG LH pH/nitrazín FSH	Ženy vo fertilnom veku, tehotné ženy	POC testovanie LH má excelentnú citlivosť			pH/nitrazínový test sa javí ako nedostatočne citlivý u žien so susp. predčasným odtokom plodovej vody
pH papierik	Testovanie pozície nasogastrickej sondy				
Analýza moču prúžkami: špecifická hmotnosť pH glukóza bielkoviny dusitaný leukocyty ketolátky urobilinogén bilirubín erytrocyty hemoglobín kys. askorbová kreatinín			Množstvo interakcií Kvalitatívne/ semikvantitatívne	Neodporúča sa stanovenie proteínov prúžkovým vyšetrením v súvislosti s renálnymi funkciami, preeklampiou	

Upravené podľa:

Cody a Valtier, 2001; Oh a kol., 2005; Song a kol., 2007; Chang a kol., 2010; Owusu-Edusei a kol., 2011; Polloc a kol., 2012; Casolari a kol., 2013; Kapoor a kol., 2014; Nayer a kol., 2014; Rooney a Schilling, 2014; Singhal a Saha, 2014; St John a Price, 2014; Yazawa a kol., 2014; Hunter a kol., 2015

Napriek tomu, že pomocou týchto technológií je možné vyšetriť celú škálu parametrov, smernica NACB, ale aj iné dokumenty odporúčajú iba niektoré. Mnohé vyšetrenia vykonávané v mieste starostlivosti sú napriek ich výhodám s odstupom času vyhodnotené ako neefektívne, pretože ich použitie napriek rýchlosti dosiahnutia výsledku nevedie k rýchlejšiemu terapeutickému zásahu, prípadne k úprave liečby. U mnohých vyšetrení získaných prostredníctvom POCT zariadení nie sú na základe doterajších kvalitných štúdií dôkazy o jednoznačnom prínose.

LITERATÚRA

1. **ALI, M. F., KIRBY, R., GOODEY A. P. et al.:** DNA hybridization and discrimination of single-nucleotide mismatches using chip-based microbead arrays, *Anal. Chem.*, 2003, 75(18), p. 4732–4739.
2. **CASOLARI, S., RODA, B., MIRASOLI, M., ZANGHERI, M., PATRONO, D., RESCHIGLIAN, P., RODA, A.:** Gravitational field-flow fractionation integrated with chemiluminescence detection for a self-standing point-of-care compact device in bioanalysis, *Analyst.*, 2013, 7; 138(1), p. 211–219. doi: 10.1039/c2an36041a.
3. **CODY, J. T., VALTIER, S.:** Effects of Stealthadulterant on immunoassay testing for drugs of abuse, *J. Anal. Toxicol.*, 2001, 25(6), p. 466–470.
4. **HUNTER, R.:** Cost-effectiveness of point-of-care C-reactive protein tests for respiratory tract infection in primary care in England. *Adv. Ther.*, 2015, 32(1), p. 69–85. doi: 10.1007/s12325-015-0180-x.
5. **CHANG, A., OSTERLOH, J., THOMAS, J.:** Levamisole: a dangerous new cocaine adulterant, *Clin Pharmacol Ther.*, 2010, 88(3), p. 408–411. doi: 10.1038/clpt.2010.156. Epub 2010 Jul 28.
6. **KAPOOR, D., SRIVASTAVA, M., SINGH, P.:** Point of care blood gases with electrolytes and lactates in adult emergencies. *Int. J. Crit. Illn. Inj. Sci.*, 2014, 4(3), p. 216–222, doi: 10.4103/2229-5151.141411.
7. **LEE-LEWANDROWSKI, E., LEWANDROWSKI, K.:** Perspectives on cost and outcomes for point of-care testing, *Clin. Lab. Med.*, 2009, 29, p. 479–489.
8. **MILLER, C. S., FOLEY, J. D., BAILEY, A. L., CAMPELL, C. L., HUMPHRIES, R. L., CHRISTODOULIDES, N., FLORIANO, P. N., SIMMONS, G., BHAGWANDIN, B., JACOBSON, J. W., REDDING, S. W., EBERSOLE, J. L., MCDEVITT, J. T.:** Current developments in salivary diagnostics, *Biomark Med.*, 2010, 4(1), p. 171–89.
9. **NAYER, J., AGGARWAL, P., GALWANKAR, S.:** Utility of point-of-care testing of natriuretic peptides (brain natriuretic peptide and n-terminal pro-brain natriuretic peptide) in the emergency department, *Int. J. Crit. Illn. Inj. Sci.*, 2014, 4(3), p. 209–215, doi: 10.4103/2229-5151.141406.
10. **OH, S. W., MOON, J. D., PARK, S. Y., JANG, H. J., KIM, J. H., NAHM, K. B., CHOI, E. Y.:** Evaluation of fluorescence hs-CRP immunoassay for point-of-care testing, *Clin. Chim. Acta.*, 2005, 356(1–2), p. 172–177.
11. **OWUSU-EDUSEI, K. Jr, GIFT, T. L., BALLARD, R. C.:** Cost-effectiveness of a dual non-treponemal/treponemal syphilis point-of-care test to prevent adverse pregnancy outcomes in sub-Saharan Africa, *Sex Transm Dis.*, 2011, 38(11), p. 997–1003, doi: 10.1097/OLQ.0b013e3182260987.
12. **PAEGEL, B. M., JOYCE, G. F.:** Microfluidic compartmentalized directed evolution, *Chem. Biol.*, 2010, 17, p. 717–724.
13. **POLLOCK, N. R., ROLLAND, J. P., KUMAR, S., BEATTIE, P. D., JAIN, S., NOUBARY, F., WONG, V. L., POHLMANN, R. A., RYAN, U. S., WHITESIDES, G. M.:** A paper-based multiplexed transaminase test for low-cost, point-of-care liver function testing, *Sci. Transl. Med.*, 2012, 19(4), p. 152.
14. **ROONEY, K. D., SCHILLING, U. M.:** Point-of-care testing in the overcrowded emergency department – can it make a difference? *Critical Care*, 2014, 18(692), doi: 10.1186/s13054-014-0692-9.
15. **SINGHAL, N., SAHA, A.:** Bedside biomarkers in pediatric cardio renal injuries in emergency, *Int. J. Crit. Illn. Inj. Sci.*, 2014, 4(3), p. 238–246. doi: 10.4103/2229-5151.141457.

- 16. SONG M. J., YUN D. H., MIN N. K., HONG S. I.:** Electrochemical biosensor array for liver diagnosis using silanization technique on nanoporous silicon electrode, *J. Biosci. Bioeng.*, 2007, 103(1), p. 32–37.
- 17. ST JOHN A., PRICE CH.P.:** Existing and Emerging Technologies for Point-of-Care Testing, *Clin. Biochem. Rev.*, 2014, 35(3), p. 155–167.
- 18. WINTER W. E.:** Point-of-care testing of diabetes mellitus. In Nichols, J. H. *Point-of-care testing. Performance improvement and evidence-based outcomes.* Marcel Dekker, Inc.: New York, Basel, 2003, p. 235–292; ISBN 0-8247-0868-7.
- 19. YAZAWA Y., OONISHI T., WATANABE K., SHIRATORI A., FUNAOKA S., FUKUSHIMA M.:** System-on-fluidics immunoassay device integrating wireless radio-frequency-identification sensor chips. *J. Biosci. Bioeng.*, 2014, 118(3), p. 344–9. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.02.010.
- 20.** <https://www.aacc.org/~/media/practice-guidelines/point-of-care-testing/poct-entire-lmpg.pdf?la=en>.
- 21.** <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/healthcare-us/laboratories/safe-specimen-management.html>
- 22.** <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfIVD/Search.cfm>.
- 23.** <http://www.poct.co.uk/products/pdfs/888-1103E-ENG%20Rev.B%20MED%20INLAY%20PANEL%20MENU.pdf>.
- 24.** http://www.sskb.sk/portal/httpwww-sskb-skportalwp-content/uploads/2015/02/ifcc-dokument_comu-je-potrebn-venovat-pozornost-pri-zavadzani-laboratornej-diagnostiky-na-mieste-poskytovania-zdravotnej-starostlivosti_10-1-2015/.

PROBLEMATIKA MERANIA GLUKOMETRAMI V REŽIME POCT

LAKATOŠOVÁ, K.^{1, 2}, BIRKOVÁ, A.²
MAREKOVÁ, M.²

¹Nemocnica s poliklinikou, Kráľovský Chlmec
²Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ v Košiciach
Lekárska fakulta, Tr. SNP 1, Košice

maria.marekova@upjs.sk

SÚHRN

Sledovanie glykémie je jedným zo základných biochemických parametrov. Použitie glukometra poskytuje možnosť stanoviť hladinu glukózy mimo laboratória. Táto voľnosť so sebou prináša aj negatíva, akými sú vnášanie subjektívnych chýb, či problém s interpretáciou mnohých možných interakcií. V prípade stanovovania glykémie sa veľký podiel analýz presúva do domáceho prostredia. Edukácia koncových používateľov glukometrov by mala patriť medzi základné podmienky správneho používania glukometra.

Kľúčové slová: glukometer, POCT, glykémia

SUMMARY

Monitoring of blood glucose is one of the fundamental biochemical parameters. Use the glucometer provides the ability to determine glucose levels outside the laboratory. This freedom also brings negative aspects, such as steal more subjective error or a problem with the interpretation of many possible in-

teractions. In the case of determination of glycemia, much of the analysis moves to the home environment. Education of end users glucose monitors should be one of the basic conditions for the proper use of the meter.

Key words: glukometer, POCT, glycemia

ÚVOD

Diabetes mellitus je metabolické ochorenie, ktoré vyžaduje komplexný manažment. Súčasťou by mala byť možnosť sledovať pacienta ambulantne aj bez využitia centrálného laboratória, prípadne aktivita pacienta v zmysle self-testovania alebo self-manažmentu. V smernici NACB z roku 2007, ktorá hodnotí z pohľadu EBM (Evidence-Based Medicine), sa v kapitole o diagnostike a manažmente diabetes mellitus uvádza, že v diagnostike diabetes mellitus systém POCT nehrá žiadnu úlohu, ale pripúšťa jeho využitie v skríningu predchádzajúceho laboratórne testovanie. Kým význam sledovania glykovaného hemoglobínu v ambulancii diabetológa považuje za jednoznačný, o POC testovaní glykémie uvádza, že o tom, že by z rutinného

self-monitoringu glykémie glukometrami v režime POCT pacienti profitovali, zatiaľ nie je dostatočný dôkaz. Ich označenie na odporúčanie typu „I – insufficient“ sa vzťahovalo na pacientov s diabetom mellitus typu I, typu II aj s gestačným diabetom. Pre využitie POC merania glykémie v nemocnici má z hľadiska profitu pre pacienta rovnaké stanovisko „I-insufficient“ a z ekonomického hľadiska používanie glukometrov v porovnaní s stanovovaním glykémie v laboratóriu vyslovene neodporúča ([https://www.aacc.org/~media/practice-guidelines/point-of-care-testing/poct-entire-lmpg.pdf?la=en](https://www.aacc.org/~/media/practice-guidelines/point-of-care-testing/poct-entire-lmpg.pdf?la=en)).

Česká spoločnosť klinickej biochémie v odporúčaní „Správné zavádění a používání prostředků POCT“ z roku 2011 uvádza, že glukometre sa nesmú používať u pacientov s poruchami periférneho obehu (dehydratácia, hyperglykemicko-hyperosmolárny stav, hypotenzia, šok), s kyslíkovou terapiou, s liečbou vysokými dávkami redukujúcich látok, u dialyzovaných pacientov, novorodencov a pacientov s výraznou hyperlipidémiou. Pacienti na inzulínovej pumpe alebo s rýchlymi zmenami potreby inzulínu musia mať glykémiu stanovenú v klinickom laboratóriu. Taktiež všetky hodnoty nad 15 mmol/l a pod 3 mmol/l musia byť overené v klinickom laboratóriu. Glukometer sa musí pravidelne kontrolovať (minimálne raz ročne) a odchýlky glykémie meranej glukometrom oproti koncentrácii glukózy stanovenej laboratóriom musia byť menšie ako 0,8 mmol/l pri glykémii < 5,6 mmol/l a maximálne 15 % pri glykémii ≥ 5,6 mmol/l (ČSKB. Správné zavádění a používání prostředků POCT. *Klin. Biochem. Metab.*, 19 (40), 2011, No. 4, p. 225–227, online: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-4/KBM-2011-4-dop-POCT.pdf>).

Za kontroverzné možno považovať odporúčanie americkej endokrinologickej spoločnosti z roku 2012 (Umpierrez a kol., 2012). Odporúčajú vyšetřovať glykémiu u každého hospitalizovaného pacienta bez ohľadu na anamnézu diabetu a pri hodnotách hyperglykémie nad

7,8 mmol/l majú byť 24 až 48 hodín monitorovaní práve pomocou POCT glukometra. Toto odporúčanie sa mnohým odborníkom javí ako nepresvedčivé a za jedinú výhodu použitia POCT glukometrov považujú rýchlosť vyšetřenia (<https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2012/february/glucose-testing>). Kvalitu vyšetřenia glykémie POCT glukometrov teda nepovažujú za rovnocennú so stanovením v laboratóriu. Nemecké TNO a americké NACB/ADA kritéria kvality sa javia ako prísnejšie v porovnaní s ISO 15197 (Gijzen a kol., 2012).

V roku 2014 FDA navrhla odlišiť štandardy pre voľno predajné domáce glukometre na self-monitoring a POC glukometre používané pri poskytovaní zdravotnej starostlivosti určené pre viacerých pacientov (<http://labtestsonline.org/news/140313glucose-meters/>).

Výnos Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky č. 09812/2008-OL z 10. septembra 2008 o minimálnych požiadavkách na personálne zabezpečenie a materiálno-technické vybavenie jednotlivých druhov zdravotníckych zariadení (s poslednou zmenou 12/2014) určuje, že glukometer má byť súčasťou vybavenia tašky pre návštevnú službu pre sestru, a ďalšieho vybavenia nasledujúcich zdravotníckych zariadení: diabetologickej ambulancie, endokrinologickej ambulancie, agentúry domácej ošetrovateľskej starostlivosti, lôžkovej časti vnútorného lekárstva, JIS a metabolickej JIS oddelenia vnútorného lekárstva, lôžkovej časti pediatrického oddelenia, na jednotkách intenzívnej starostlivosti na oddeleniach chirurgie, na oddelení geriatrickej, na oddelení pre dlhodobých chorých, na oddelení kardiológie, na koronárnej jednotke, na JIS oddelení neurológie, lôžkovej časti oddelenia psychiatrie, psychiatrickej JIS, lôžkovej časti oddelenia medicíny drogových závislostí, oddelení reumatológie, angiologickej JIS, liečebne pre dospelých. Z uvedeného vyplýva, že POCT glukometre sú v SR už dlhšiu dobu považované za bežnú/potrebnú súčasť vybavenia mnohých zdravotníckych zariadení, pravdepodobne rovnocennú s vyšetřením glykémie v laboratóriu. Štátny ústav pre kontrolu

liečiv SR má aktuálne v databáze registrovaných zdravotníckych pomôcok 121 glukometrov.

Prístroje na meranie glykémie

Na stanovovanie glukózy sa môže použiť rozmanitá konštrukcia prístrojovej techniky POCT. Prenosné glukometre využívajú detekčné prúžky založené väčšinou na elektrochemickom, menej často fotometrickom princípe. Výhodou elektrochemických detekcií je vyššia presnosť (na rozdiel od fotometrie výsledok nezávisí od veľkosti kvapky krvi). Prúžky sú jednorazové. Tieto prístroje nepotrebujú k prevádzke žiadne roztoky ani odpadové nádoby. Moderné detekčné elektrochemické prúžky sú tvorené z plastovej podložky a aspoň dvoma elektródami, komôrkou o malom objeme, ktorá je kapilárnymi silami naplnená kvapkou krvi a obsahuje chemické zložky – enzým, stabilizátor enzýmu, mediátor a povrchovo aktívne látky (k minimalizácii času potrebného na naplnenie komôrky). Mediátor je malá molekula schopná existencie v oxidovanej aj v redukovanej forme, môžu byť organické, anorganické alebo organokovové a používajú sa na prenos elektrónov. Nevýhodou použitia mediátorov je nižšia selektivita, pretože mediátor môže v niektorých prípadoch prenášať aj elektróny z interferujúcich reakcií. Vyšetrenie je rýchle (doba reakcie 5–15 s) a prúžky vyžadujú malý objem krvi (0,3–4,0 μ l). Komerčne dostupné prúžky môžu mať radu dodatočných funkcií, ako je automatická detekcia plnenia, možnosť plnenia prúžku kvapkou krvi ešte do určitého časového limitu a integrovanú korekciu na hematokrit. Údržba v podstate pozostáva v očistení a dezinfekcii glukometra, dobíjaní batérií a aktualizácii údajov šarží prúžkov, napríklad kontrolného materiálu. Jedným z nedostatkov je absencia softvéru v slovenčine prípadne v češtine, nakoľko nie je legislatívne žiadaná napriek tomu, že pri osobných glukometroch by to mala byť podmienka.

Najčastejšie interferencie a chyby pri stanovení glukózy

Stanovenie hladiny glykémie môže ovplyvniť celá rada faktorov. S rastúcou hodnotou hematokritu sa zvyšuje vizkozita krvi, čo spomaľuje difúziu všetkých zložiek a znižuje prúd v ampérometrických senzorochoch. Vysoké hodnoty hematokritu môžu byť spojené s podhodnotením skutočnej koncentrácie, kým nízke hodnoty môžu spôsobiť nadhodnotenie glukózy. Niektoré glukometre sú vybavené korekciou na hematokrit. Bežné prístroje poskytujú neskreslené výsledky pri hematokrite 22–55 %, prístroje vybavené impedančnou elektródou môžu pracovať v rozsahu hematokritu 0–70 %. Pri elektrochemickej detekcii môže celá rada látok interferovať poskytovaním elektrónov. Tieto elektróny sa pridávajú k elektrónom z oxidácie glukózy a namerané hodnoty sú potom následne falošne vysoké. Pokiaľ interferencia na hornej hranici referenčného rozmedzia nepresahuje 10 %, považuje sa za prijateľnú. V prípade použitia prúžkov využívajúcich glukózaoxidázu, môže zvýšený parciálny tlak kyslíka tak isto viesť k podhodnoteniu výsledku koncentrácie glukózy. Príčina spočíva v kompetícii kyslíka a mediátorov. Pri pO_2 nad 13,3 kPa, môže byť glukóza podhodnotená o 0,8 mmol/l na hladinách < 5,5 mmol/l alebo o 15 % pri hladinách > 5,5 mmol/l. Pre pacientov s peritoneálnou dialýzou je napríklad nevhodné použitie enzymatického systému PQQ-GDH, ktorý nie je glukóza – špecifický, ale reaguje aj s inými sacharidmi. Pri peritoneálnej dialýze sa používa roztok obsahujúci ikodextrín – polymér maltózy. Falošne vysoké hodnoty glykémie môžu maskovať hypoglykémiiu, prípadne viesť k neadekvátnemu podaniu inzulínu. Liečivá podávané v bežných terapeutických dávkach sú zanedbateľné, avšak pri otravách paracetamolom, by sa mala glukóza stanoviť štandardnou laboratórnou technikou s fotometrickou detekciou. Takmer všetky komerčne vyrábané prúžky reagujú s askorbátom. Okrem spomínaných interferencií ovplyvňujú

**TAB. 1. PREHLAD NAJČASTEJŠIE SA VYSKYTUJÚCICH PROBLÉMOV
A ODPORÚČANÍ PRE STANOVENIE GLUKÓZY**

Problém	Výsledok	Odporúčanie
Testovací prúžok nie je dostatočne vsunutý do prístroja	Falošne nízky	Uistiť sa, že je prúžok zasunutý správne
Odberové miesto je kontaminované cukrom (napríklad bruško prsta)	Falošne vysoký	Vždy očistiť a osušiť miesto odberu
Na prúžok sa nedostalo dostatočné množstvo krvi	Falošne nízky	Opakovať test s novou vzorkou
Vybité batérie	Vypisovanie chybového kódu	Vymeniť batérie a opakovať odber vzorky
Nesprávne skladovanie testovacích prúžkov/kontrolných roztokov	Falošne vysoký/nízky	Skladovať sety a súčasti podľa odporúčaní výrobcu
Dehydratácia pacienta	Falošne vysoký	Odobrať venóznou krv a zaslať do laboratória
Pacient je v šoku	Falošne nízky	Odobrať venóznou krv a zaslať do laboratória
Príliš silné stlačenie bruška prsta	Falošne nízky	Opakovať test s novou vzorkou z nového vpichu
Odberové miesto iné ako bruško prsta	Vysoký/nízky	Výsledky z alternatívnych miest nemusia zodpovedať výsledkom z bruška prsta
Poškodené testovacie prúžky/nádoby s kontrolnými roztokmi	Falošne vysoký/nízky	Neustála kontrola obalov, hľadanie puklín, úniku roztoku, atď...
Anémia/nízky hematokrit	Falošne vysoký	Odobrať venóznou krv a zaslať do laboratória
Polycytémia/zvýšený hematokrit	Falošne nízky	Odobrať venóznou krv a zaslať do laboratória

Upravené podľa:

<http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/TipsandArticlesonDeviceSafety/ucm109449.htm>

namerané hodnoty glykémie aj hypotenzia, hypertriacylglycerolémia, ťažká dehydratácia, šok, hyperosmolárny stav, alebo znížená cirkulácia krvi v organizme, nadmorská výška, vlhkosť či teplota prostredia (Montagnana a kol., 2009; Heller, 2008; Kondepati a Heise, 2007; Rao a kol., 2005; Tang a kol., 2001). Moderné glukometre sú vybavené na kompenzáciu niektorých interferencií (hematokrit, teplota, atď.).

Pri odbere sa dáva prednosť odberu z bruška prsta nedominantnej ruky (<http://www.fxol.org/aaccweb>), pretože ostatné miesta (dlaň, ušný lalok, päta) sú citlivejšie na predanalytické chyby (diéta, cvičenie, stres, choroba). Pri obsluhu glukometrov pacientmi sa vyskytujú predovšetkým nasledujúce problémy: nesprávny postup pri vpichu do prsta (15 %), nesprávna aplikácia vzorky (12 %), nedodržanie intervalu

**Na zvýšenie laboratórnej presnosti a redukciu chýb
vo výsledkoch získaných glukometrami OIR odporúča:**

Uistite sa, že:	Príčina
Postupujte podľa pokynov čo sa týka veľkosti vzorky. Pri akejkoľvek pochybnosti o dostatočnom množstve krvi opakujte test.	Pri nedostatočnom množstve krvi nemusí glukometer určiť glykémiu presne. Hoci väčšina glukometrov je dizajnovaná tak, aby upozorňovala ak je objem vzorky malý, niektoré z nich detegujú iba veľké chyby. Vyskytli sa prípady, keď glukometer zobrazoval hladinu glukózy menšiu ako polovicu skutočnej hodnoty bez akéhokoľvek chybového hlásenia.
Vložte testovací prúžok do prístroja na doraz	Pri nedostatočnom zasunutí prúžka nemôže prístroj načítať celú plochu prúžka. Mnohé zariadenia detegujú chybné uloženie prúžka a neposkytnú výsledok, ale niektoré prístroje hlásia iba veľké problémy. Zaznamenali sa prípady, keď glukometre ukázali glykémiu signifikantne vyššie alebo nižšie ako aktuálne hodnoty napriek malej chybe uloženia prúžka.
Udržujte prístroj čistý	Aj malé množstvo krvi, mastnoty alebo špiny na šošovke prístroja môže ovplyvniť výsledok
Sledujte, či sú prúžky kompatibilné s prístrojom	Prúžky nie sú vždy zameniteľné a glukometre nie sú schopné vždy detegovať nekompatibilný prúžok. Testovacie prúžky, ktoré vyzerajú identicky môžu mať na povrchu odlišné chemické zloženie. Aj malé odchýlky v rozmeroch prúžkov môžu viesť k odlišným výsledkom.
Sledujte dátum expirácie testovacích prúžkov	So starnutím sa chemický film na povrchu prúžku rozkladá. Po dátume expirácie nemusí prúžok ukázať správny výsledok.
Zadáвайте správne kalibračné kódy z nádob pri každom spustení testu	Výsledky sa môžu výrazne líšiť medzi šaržami činidiel. Kalibračné kódy pomáhajú glukometru kompenzovať tieto variácie
Kontrolujte kvalitu podľa pokynov	Kontrola kvality je typický spôsob na zistenie, že prúžky už nie sú dobré. Testovacie prúžky nie vždy vydržia do dátumu expirácie uvedenom na obale. Príčinou môže byť nadcenenie dátovania výrobcom alebo preto, že obal nebol uzatváraný okamžite po použití.
Porovnávajte výsledky z vášho glukometra s výsledkami z laboratória najčastejšie ako je to možné	Časom sa testovacie systémy môžu rozísť. Je dôležité, aby ostali synchronizované.
Pri sporných výsledkoch, ktoré nezapadajú do klinického obrazu, je potrebné vyšetriť krv v laboratóriu	Existuje veľa príčin prečo je výsledok testu nesprávny. Okrem vyššie spomínaných poznámok, niektoré stavy ako dehydratácia, hyperosmolarita, vysoký hematokrit, alebo šok môžu významne ovplyvniť výsledok testu

pre meranie (8%), zadanie nesprávne kódu (4%) a chybné vloženie prúžkov do glukometra (2%). Ďalšími chybami sú kontaminácia kože sacharidmi a znečistený glukometer. Napriek tomu, že 73 % pacientov bolo poučených ako čistiť glukometer iba 18 % z nich čistí glukometer 1 krát týždenne, kým 41 % z nich nečistí glukometer ani 1 krát za mesiac (Bergental a kol., 2000). Nedisциплиnovanosť pacientov,

ktorí si aplikujú inzulín a sú vybavení glukometrami vidieť i v tom, že len 39 % z nich si meria hladinu glukózy denne, kým 29 % prevádza toto meranie menej než raz mesačne (Kondepoti a Heise, 2007). Zaujímavú skúsenosť pri implementácii glukometra v nemocnici nedávno publikovali autorky Staňková a Pokorná (2012). Za najväčší problém považujú zlyhávanie ľudského faktora, pretože postupy

osvojené a uplatňované užívateľmi testovaného POCT nemocničného zariadenia nezodpovedali požiadavkám výrobcu a distribútora napriek tomu, že koncoví užívatelia boli na danú prácu vyškolení a teda kvalifikovaní. Za najvýznamnejšie príčiny považujú jednak sprostredkovanú edukáciu koncových užívateľov – sestier, teda nie distribútorskou firmou ale staničnými sestrami a kolegyňami z oddelenia a jednak zaškolenie počas prevádzky, pretože sa následne neumožní dostatok času na pochopenie danej problematiky (Staňková a Pokorná, 2012).

Americký Úrad pre *in vitro* diagnostiku a radiologické zdravie (Office of *In vitro* Diagnostics and Radiological Health – OIR), poskytol pre poskytovateľov zdravotnej starostlivosti na stránkach FDA (Food and Drug Administration) prehľad najčastejšie sa vyskytujúcich problémov, ich efektov na výsledky meranej glukózy a odporúčaní na riešenie zhrnutých v nasledujúcej tabuľke.

Navyše k predchádzajúcim odporúčaniam, laboratórny personál musí pamätať na umývanie rúk a výmenu rukavíc po každom pacientovi. Tak isto, vonkajší povrch glukometra má byť po každom pacientovi vyčistený a dezinfikovaný. Pri spornom výsledku je najlepšou voľbou pre pacienta odber venóznej krvi a stanovenie glykémie v laboratóriu, alebo minimálne opakovať test. Pre glukometre určené na používanie pre mnohých pacientov je možné používať jedine jednorazové lancety.

upravené podľa: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/TipsandArticlesonDeviceSafety/ucm109519.htm>

ZÁVER

Presnosť a kvalita merania glukometrami v režime POCT je závislá na správnom zavedení a používaní zariadenia v praxi. Nodostatky pri prevádzke POCT zariadení znižujú kvalitu zdravotnej starostlivosti a musia mať za následok nápravné opatrenia, inak má pracovník vykonávajúci dozor – garant povinnosť

pozastaviť používanie glukometra do vyriešenia problému. Čas ukazuje, že relatívna výhoda pre pacienta spočíva v tom, že okamžite vykonaná analýza nemusí byť realizovaná iba osobou školenou pre laboratórnu prácu, býva často zdrojom mnohých subjektívnych chýb, ktorým sa dá predísť jedine kvalitnou edukáciou a zaškolením. Odporúčania oprávnených autorít v oblasti manažmentu zavádzania a prevádzky POCT teda majú byť prístupné nielen laboratórnym pracovníkom a vedúcim pracovníkom, ale práve koncovým užívateľom.

LITERATÚRA

1. BERGENSTAL, R., PEARSON, J., CEMBROWSKI, G. S., BINA, D., DAVIDSON, J., LIST, S.: Identifying variables associated with inaccurate self-monitoring of blood glucose: Proposed guidelines to improve accuracy. *The Diabetes Educator*, 2000, 26, p. 981–989.
2. GIJZEN, K., MOOLENAAR, D. L., WEUSTEN, J. J., PLUIM, H. J., DEMIR, A. Y.: Is there a suitable point of care glucose meter for tight glycemic control? Evaluation of one home-use and four hospital-use meters in an intensive care unit. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2012, 50(11), p. 1985–1992; Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22718643>.
3. HELLER, A., FELDMAN, B.: Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management. *Chemical Reviews*, 2008, 108, p. 2482–2505.
4. TANG Z., LOUIE, R. F., LEE J. H., LEE D. M., MILLER, E. E., KOST, G. J.: Oxygen effects on glucose meter measurements with glucose dehydrogenase – and oxidase-based test strips for point-of-care testing. *Crit. Care Med.*, 2001, 29, p. 1062–1070.
5. MONTAGNANA, M., CAPUTO, M., GIAVARINA, D., LIPPI, G.: Overview on self-monitoring of blood glucose. *Clinica Chimica Acta*, 2009, 402, p. 7–13.
6. KONDEPATI, V. R., HEISE, H. M.: Recent progress in analytical instrumentation for glycemic

control in diabetic and critically ill patients. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 388, p. 545–563.

7. RAO, L. V., JAKUBIAK, F., SIDWELL, J. S., WINKELMAN, J. W., SNYDER, M. L.: Accuracy evaluation of a new glucometer with automated hematocrit measurement and correction. *Clinica Chimica Acta*, 2005, 356, p. 178–183.

8. STAŇKOVÁ, A., POKORNÁ, A.: Management implementace přístroje pro point of care testing. In *Ošetrovatelstvo 2012*, 2(2), p. 63–69, ISSN 1338-6263.

9. UMPIERREZ, G. E., HELLMAN, R., KORYTKOWSKI, M. T., KOSIBOROD, M., MAYNARD, G. A., MONTORI, V. M., SELEY, J. J., VAN DEN BERGHE, G.: Management of Hyperglycemia in Hospitalized Patients in Non-Critical Care Setting: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2012, 97, p. 16–38.

10. <https://www.aacc.org/~media/practice-guidelines/point-of-care-testing/poct-entire-imp.pdf?la=en>.

11. ČSKB: Správné zavádění a používání prostředků POCT. *Klin. Biochem. Metab.*, 19 (40), 2011, No. 4, p. 225–227, online: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-4/KBM-2011-4-dop-POCT.pdf>.

12. <http://labtestsonline.org/news/140313glucose-meters/>.

13. <http://www.fxol.org/aaccweb>.

14. <https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2012/february/glucose-testing>.

15. <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/TipsandArticlesonDeviceSafety/ucm109519.htm>.

16. <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/TipsandArticlesonDeviceSafety/ucm109449.htm>.

METABOLIZMUS A BIOLOGICKÉ ÚČINKY VITAMÍNU D

MAŠLANKOVÁ, J., STUPÁK, M.
HUBKOVÁ, B., MAREKOVÁ, M.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie
UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta
Trieda SNP 1, Košice, 040 01

SÚHRN

Vitamín D je v tukoch rozpustný vitamín, ktorý hrá dôležitú úlohu v metabolizme tvrdých tkanív. Je spájaný s mnohými skeletálnymi ochoreniami, ako osteoporóza, poruchami kalcium-fosfátového metabolizmu, avšak v nedávnom období sa poukazuje na vzťah medzi deficienciou vitamínu D a neskeletálnymi chronickými ochoreniami, medzi ktoré patria kardiovaskulárne choroby, autoimunitné ochorenia, rôzne druhy rakoviny a iné. Mnohé naznačuje, že v štúdiu metabolizmu vitamínu D je ešte stále čo objavovať.

Kľúčové slová: vitamín D, metabolizmus, účinky

SUMMARY

Vitamin D is a fat-soluble vitamin that plays an important role in the metabolism of hard tissues. This vitamin is linked to many skeletal diseases such as osteoporosis, calcium-phosphate metabolism disorder. Recently, it

has been showed to the relation between the vitamin D deficiency and non-skeletal diseases including cardiovascular and autoimmune diseases, different types of cancer and so on. Many of scientific papers indicate that in the study of vitamin D metabolism there is still many to discover.

Key words: vitamin D, metabolism, effect

ÚVOD

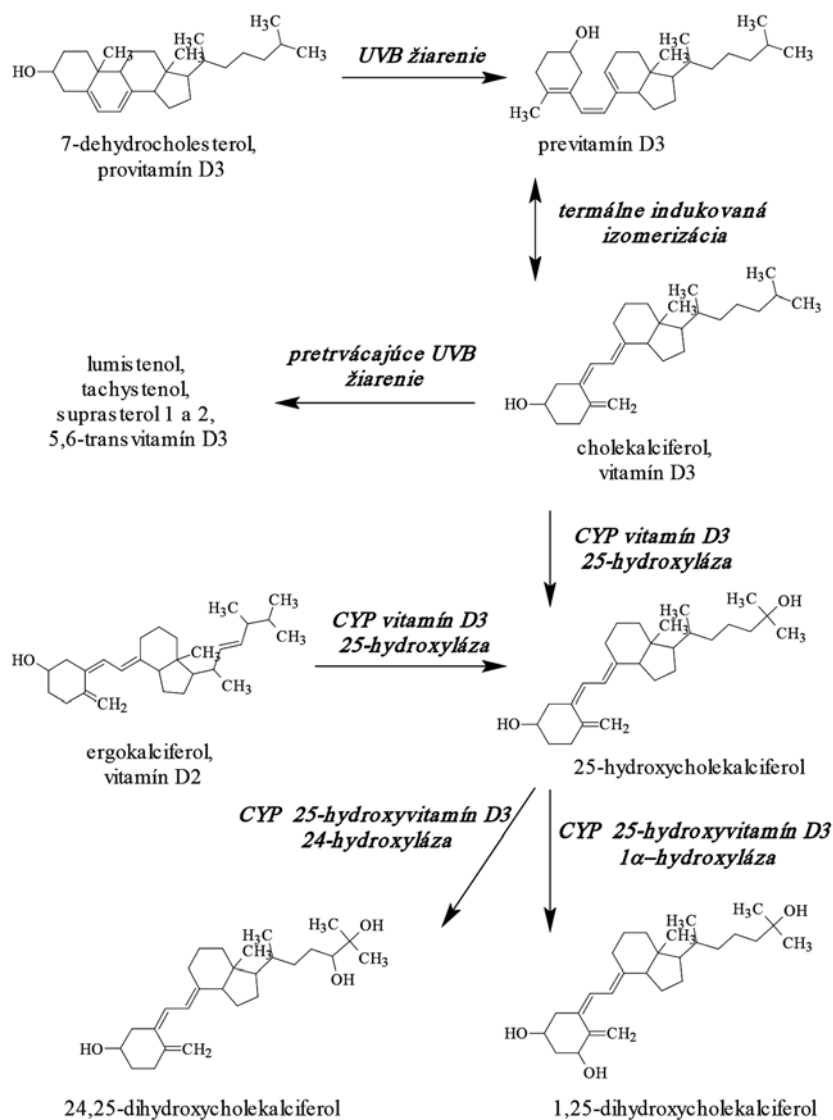
V posledných rokoch sa stále častejšie upriamuje pozornosť na potrebu zvýšiť príjem vitamínu D u malých detí a adolescentov (Maguire a kol., 2013, Sioen a kol., 2012, Absound a kol., 2011, Dong a kol., 2010,). Odhaduje sa, že deficitom vitamínu D trpí viac ako 1 miliarda obyvateľov Zeme. Na Slovensku sa výskyt hypovitaminózy udáva okolo 45–48 %. (Jackuliak a kol., 2012). Potrebu dostatočného príjmu vitamínu D zvyrazňuje jeho úloha, či už priama alebo nepriama, v procese mineralizácie/demineralizácie kostí a zubov. Od prvej známej teórie, ktorej cieľom bolo vysvetliť proces mineralizácie a tvorby kostí (Robison 1923),

nie je dodnes tento proces, ako aj postavenie vitamínu D v tomto deji, spoľahlivo vysvetlený.

Absorpcia, transport a exkrécia

Asi 60–90 % vitamínu D prijímaného potravou sa spolu s tukmi absorbuje v tenkom čreve a je ďalej transportovaný chylomikrónmi. V prípade, že organizmus prijme nadbytok vitamínu D (viac ako 50 % z množstva, ktoré sa absorbuje), uloží si ho vo forme telesného tuku. Tak je možné, že vysoká koncentrácia vitamínu D v tkanivách pretrváva aj dlhšiu dobu po prijatí.

Vitamín D, prijímaný potravou (po reabsorpcii v čreve) alebo vznikajúceho sériou chemických reakcií účinkom slnečného žiarenia zo svojho inaktívneho prekursoru 7-dehydrocholesterolu prítomného v koži, vstupuje do krvného obehu, kde je transportovaný pomocou DBP proteínu (vitamín D viažúci proteín). DBP je glykoproteín krvnej plazmy (58 kDa) syntetizovaný prevažne v pečeni. Obsahuje 3 domény s charakteristickým disulfidovým mostíkom (Nimitphong a kol., 2015). Tento proteín má väzobné miesto s vysokou afinitou pre vitamín D a jeho metabolity. DBP je členom



Obr.1 Metabolizmus vitamínu D

rovnamej proteínovej rodiny ako albumín a nie je špecifický iba pre vitamín D, ale je zároveň transportérom mastných kyselín a extracelulárneho aktínu.

Deglykozylovaná forma DBP proteínu, DBP-makrofág aktivujúci faktor (DBP-MAF) aktivuje makrofágy a osteoklasty. Dokonca aj samotný DBP môže ovplyvňovať diferenciaciu osteoklastov (Bhan a kol., 2014).

Mechanizmus exkrécie vitamínu D je stále intenzívne skúmaný. Hlavnou cestou vylúčenia je exkrécia žľou. Minoritnou cestou je exkrécia sulfátovaných metabolitov močom.

25-OH hydroxylácia v pečeni

Prvým krokom aktivácie vitamínu D po jeho uvoľnení z tukového tkaniva je 25-OH hydroxylácia v pečeni. Túto reakciu katalyzuje mitochondriálna 25-OH hydroxyláza. Patrí do skupiny monooxygenáz cytochrómu P-450 a vyžaduje si prítomnosť molekulového kyslíka a kofaktoru NADPH, feredoxínreduktázy a feredoxínu, ktorý prenáša redukčný ekvivalent priamo do cytochrómu P-450. 25-OH D₃ metabolit cirkuluje v krvi v koncentrácii 5–65 ng/ml a má biologický polčas rozpadu približne 15 dní.

1alfa OH hydroxylácia v obličke

Komplex 25 (OH)D₃-DBP je filtrovaný v glomeruloch do primárneho moču a pomocou endocytózy absorbovaný bunkami renálneho tubulu za účasti receptora megalínu. Po endocytóze je komplex 25(OH)D₃-DBP transportovaný do lyzozómu, kde sa DBP odštiepi a samotný 25(OH)D₃ podlieha sekundárnej hydroxylácii. Inaktívny metabolit 25 (OH)D₃ je hydroxylovaný v polohe 1 na 1,25 (OH)₂D₃ biologicky aktívny metabolit. Polčas života 1,25(OH)₂D₃ je 6–8 hodín. Za normálnych fyziologických podmienok je koncentrácia cirkulujúceho 1,25(OH)₂D₃ asi 500-1000 krát nižšia ako koncentrácia 25(OH)D₃.

V prípade zvýšenej hladiny vápnika sa

v obličke môže inaktívny metabolit 25(OH)D₃ hydroxylovať na 24,25(OH)₂D₃, ktorý je druhým najviac zastúpeným cirkulujúcim metabolitom vitamínu D. Funkcia 24,25(OH)₂D₃ v homeostáze minerálov a formovaní kostného matrixu je stále skúmaná, aj keď sa predpokladá, že má oveľa menší účinok na stimuláciu transportu vápnika v čreve a mineralizáciu kostí ako metabolit 1,25 (OH)₂D₃. Na druhej strane sa uvažuje aj nad možnosťou, že 24 hydroxylácia je iba iniciačnou reakciou degradácie vitamínu D (Kerley a kol., 2015).

Intracelulárne receptory

Tkanivá, ktoré sú ovplyvňované vitamínom D majú špecifické intracelulárne receptory pre 1,25 (OH)₂D₃ (VDR). VDR patrí do rodiny transkripčných faktorov, ktoré regulujú v jadre proces transkripcie génov. Tieto receptory sú lokalizované v jadre, pretože patria do skupiny lipofilných receptorov. Vitamín D po naviazaní na VDR receptor aktivuje gény cez vitamín D zodpovedajúci element (VDRE). Receptor VDR je prítomný v mnohých tkanivách a reguluje bunkovú diferenciaciu a funkciu mnohých typov buniek (makrofágy, dendritické bunky, B a T bunky a iné).

Hlavné biologické účinky vitamínu D

Úloha vitamínu D v tenkom čreve

Najvýznamnejším biologickým účinkom 1,25(OH)₂D₃ v organizme je zvýšiť absorpciu vápnika v tenkom čreve. Aktívny vitamín D sa viaže na VDR receptor (vitamín D viažúci receptor v bunkách tenkého čreva, stimuluje kalbindín, ktorý viaže vápnik a tak ovplyvňuje Na⁺/Ca²⁺ pumpu. Cytoplazmatický kalbindín (28 kDa) má štyri miesta s vysokou afinitou pre vápnik a je na rozdiel od iných vápnik viažúcich proteínov (kalmodulín) regulovaný hladinou vitamínu D. Kalbindíny sa nachádzajú aj v obličkách, mozgu, kostiach a ďalších tkanivách, kde zohrávajú dôležitú úlohu v regulácii hladiny vápnika. Okrem aktívneho transportu, sa môže

vápnik absorbovať cez črevnú stenu aj pasívnou difúziou, v závislosti od gradientu vápnika. 1,25 (OH)₂D₃ ovplyvňuje aj lipidové zloženie epitelu tenkého čreva tým, že indukuje syntézu fosfatidylcholínu.

Úloha vitamínu D v kostnom tkanive

Hlavnou funkciou vitamínu D je zvýšiť absorpciu vápnika z čreva, avšak v súčasnosti sú stále viac popisované jeho účinky na tvorbu kostného matrixu (osteoidu). Predpokladalo sa, že tvorba kostného matrixu je hlavne pasívnym procesom, ktorý si vyžaduje iba dostatok vápnika a fosforu. V poslednom období popisujú mnohé práce priamy efekt vitamínu D na bunky kostí. V práci Lam a kol., 2014 popisuje efekt overexpresie VDR receptora u myší na maturáciu osteoblastov, čím dochádza k zvýšeniu tvorby kostí. Naproti tomu Yamamoto a kol. tvrdia, že priamy efekt vitamínu D na kosti môže byť špecifický v závislosti od maturácie osteoblastov. Signalizačná kaskáda VDR receptora môže mať na nezrelé osteoblasty opačný efekt, teda stimuluje rezorpciu kostného tkaniva (Yamamoto a kol., 2013). Preto môžeme predpokladať, že priamy efekt vitamínu D na kostné tkanivo môže byť anabolický alebo katabolický v závislosti od kalcémie a diferenciácie buniek kostného tkaniva.

Úloha vitamínu D vo svaloch a ich predpokladaný účinok na kostné tkanivo

Pri nedostatku vitamínu D dochádza aj ku zníženiu fyzickej kondície (Sohl a kol., 2013). V práci Neve a kol. sa uvádza, že pri poklese absorpcie vápnika súčasne poklesne koncentrácia vitamínu D pod 20 nmol/l, zníži sa syntéza kolagénu a citrátdekarboxylázy a zároveň dochádza k aktivovaniu alkalickej fosfatázy (marker demineralizácie) a syntéze nekolagénových proteínov, osteokalcínu a osteopontínu. Aktiváciou alkalickej fosfatázy dôjde k zvýšeniu lokálnej koncentrácie fosfátov (Nev a kol., 2013).

Vitamín D stimuluje aj vaskulárne endoteliálne rastové faktory (VEGF) a IGF-1, IGF-II, ktoré

sú syntetizované vo svaloch. Tieto faktory, aj keď rôznym mechanizmom majú priaznivý efekt na mineralizáciu kostného tkaniva a diferenciáciu adipocytov (Wu a kol., 2015, Choe a kol., 2015, Joensuu a kol., 2015). Výsledky Neveho a kol. popisujú, že osteoblasty syntetizujú VEGF a podávaním vitamínu D (1,25) dochádza k stimulácii syntézy VEGF (Neve a kol., 2013).

Ďalším faktorom syntetizovaným vo svaloch, ktorý je regulovaný vitamínom D je aj interleukín IL-6. Je produkovaný počas cvičenia a kontrakcie a stimuluje rezorpciu kostného tkaniva. Účinkom vitamínu D dochádza k jeho poklesu.

Nekolagénový proteín osteokalcín je bežným markerom procesu formovania kostí. Keďže jeho gén obsahuje responzívny element pre vitamín D, bolo potvrdené, že 1,25-dihydroxyvitamín D zvyšuje expresiu osteokalcínu (Girgis a kol., 2014).

LITERATÚRA

1. **ABSOU, M., CUMMINS, C., LIM, M.J., WASSMER, E., SHAW, N. (2011):** Prevalence and predictors of vitamin D insufficiency in children: a Great Britain population based study. PLoS One 6: 6–11
2. **BHAN I.:** Vitamin d binding protein and bone health. Int. J. Endocrinol., 2014; 2014: 561214.
3. **Dong Y, Pollock N, Stallmann-Jorgensen IS, GUTIN, B., LAN, L., CHEN, T. C., KEETON, D., PETTY, K., HOLICK, M. F., ZHU, H. (2010):** Low 25-hydroxyvitamin D levels in adolescents: race, season, adiposity, physical activity, and fitness. Pediatrics, 125: 1104–1111
4. **GIRGIS, C. M., MOKBEL, N., MINN CHA, K., HOUWELING, P. J., ABOUD, M., FRASER, D. R. et al.:** The vitamin D receptor (VDR) is expressed in skeletal muscle of male mice and modulates 25-hydroxyvitamin D (25OHD) uptake in myofibers. Endocrinology, 2014; 155: 3227–37.
5. **CHOE, J., SASAKI, Y., ZHOU, L., TAKAI, H., NAKAYAMA, Y., OGATA, Y.:** Insulin-like

growth factor-II regulates bone sialoprotein gene transcription. *Odontology*, 2015 Apr 21.

6. JOENSUU, K., UUSITALO, L., ALM, J. J., ARO, H. T., HENTUNEN, T. A., HEINO, T. J.: Enhanced osteoblastic differentiation and bone formation in co-culture of human bone marrow mesenchymal stromal cells and peripheral blood mononuclear cells with exogenous VEGF. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.*, 2015 Mar 23.

7. KERLEY, C. P., ELNAZIR, B., FAUL, J., CORMICAN, L.: Vitamin D as an adjunctive therapy in asthma. Part 1: A review of potential mechanisms. *Pulm Pharmacol. Ther.* 2015 Feb 28.

8. LAM, N. N., TRILIANA, R., SAWYER, R. K., ATKINS, G. J., MORRIS, H. A., O'LOUGHLIN, P. D. et al.: Vitamin D receptor overexpression in osteoblasts and osteocytes prevents bone loss during vitamin D-deficiency. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2014; 144(A): 128–31.

9. Maguire, J. L., Birken, C. S., Khovratovich, M., Degroot, J., Carsley, S., Thorpe, K. E., Mamdani M., Parkin, P. C., TARGETKids! Collaboration (2013): Modifiable determinants of serum 25-hydroxyvitamin D status in early childhood: opportunities for prevention. *JAMA Pediatr* 167: 230–235.

10. NEVE, A., CANTATORE, F. P., CORRADO, A., GAUDIO, A., RUGGIERI, S., RIBATTI, D.: *In vitro* and *in vivo* angiogenic activity of osteoarthritic and osteoporotic osteoblasts is modulated by VEGF and vitamin D3 treatment. *Regul Pept.* 2013 Jun 10; 184: 81–4.

11. NIMITPHONG, H., SRITARA, C., CHAILURKIT, L. O., CHANPRASERTYOTHIN,

S., RATANACHAIWONG, W., SRITARA, P., ONGPHIPHADHANAKUL, B.: Relationship of vitamin D status and bone mass according to vitamin D-binding protein genotypes. *Nutr. J.*, 2015 Mar 24; 14(1): 29.

12. ROBISON, R.: The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* 1923; 17, 286–293.

13. SIOEN, I., MOURATIDOU, T., KAUFMAN, J. M., BAMMANN, K., MICHELS, N., PIGEOT, I., VANAELST, B., VYNCKE, K., DE HENAUW, S., IDEFICS CONSORTIUM (2012): Determinants of vitamin D status in young children: results from the Belgian arm of the IDEFICS (Identification and Prevention of Dietary- and Lifestyle-Induced Health Effects in Children and Infants) study. *Public Health Nutr.*, 15: 1093–1099.

14. SOHL, E., DE JONGH, R., HEIJBOER, A., SWART, K., BROUWER-BROLSMA, E., ENNEMAN, A. et al.: Vitamin D status is associated with physical performance: the results of three independent cohorts. *Osteoporos Int.*, 2013; 24: 187–96.

15. YAMAMOTO, Y., YOSHIZAWA, T., FUKUDA, T., SHIRODE-FUKUDA, Y., YU, T., SEKINE, K. et al.: Vitamin D receptor in osteoblasts is a negative regulator of bone mass control. *Endocrinology*, 2013; 154: 1008–20.

16. WU, S., YANG, W., DE LUCA, F.: Insulin-like growth factor independent effects of growth hormone on growth plate chondrogenesis and longitudinal bone growth. *Endocrinology*, 2015 Apr 24: en20141983.

VYUŽÍVANIE GENOMIKY V PERSONALIZOVANEJ TERAPII

MATÁKOVÁ, T.¹, HALAŠOVÁ, E.²

¹UK v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin

²UK v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin

matakova@jfmed.uniba.sk

SÚHRN

Personalizovaná medicína je multidisciplinárny vedný odbor, ktorý sa (na rôznych úrovniach) zaoberá optimalizáciou liečebných a diagnostických postupov u konkrétneho pacienta s využitím moderných metód. Personalizovaná medicína býva často uvádzaná ako „správna diagnostika, správna liečba pre správneho pacienta v správnom čase„. Intenzívny výskum v klinickej oblasti priniesol za ostatné desaťročia nielen nové liečivá ale aj prediktori liečebnej odpovede predovšetkým v onkológii. Tieto poznatky umožňujú personalizovať terapiu na základe genetických/expresných zmien. Markery ako HER2, EGFR, KRAS, BRAF a ALK, sú v súčasnej dobe neoddeliteľnou súčasťou rutínnej diagnostiky a ich testovanie má zásadný vplyv na voľbu adekvátneho terapeutického postupu a skvalitnenia života konkrétneho pacienta.

Kľúčové slová: perssonalizovaná medicína, molekulová cielená terapia, polymorfizmus, onkomarkery toxicity

SUMMARY

Personalized Medicine is defined as a medical model using characterization of individuals'

phenotypes and genotypes (e.g. molecular profiling, medical imaging) for tailoring the right strategy for the right person at the right time, and/or to determine the predisposition o disease and/or to deliver timely and targeted prevention. Personalized medicine is an emerging practice of medicine that uses an individual's genetic profile to guide decisions made in regard to the prevention, diagnosis, and treatment of disease. Knowledge of a patient's genetic profile can help doctors select the proper medication or therapy and administer it using the proper dose or regimen. Contemporary trend of therapy is leading to the appropriate patient selection with regard to analysis of several prognostic and predictive biomarkers (HER2, EGFR, KRAS, BRAF a ALK); it is proposed that future therapy will be more and more personalized.

Key words: personalized medicine, molecular targeted therapy, polymorphisms, biomarkers of toxicity

ÚVOD

Už v roku 2004 časopis Nature zverejnil článok, v ktorom charakterizoval liečebný prístup onkológie 21. storočia – princíp 4P- prediktívna – personalizovaná – preventívna –

participačná onkológia [1]. Tento princíp je však možné uplatniť vo všetkých oblastiach medicíny.

Personalizovaná medicína je založená na poznatku, že rozdielni pacienti s tou istou klinickou diagnózou môžu reagovať na rovnakú liečbu rozličným spôsobom. Kým určité liečivo môže mať u jedného pacienta vysokú účinnosť, to isté liečivo u iného pacienta nemusí dosiahnuť požadované výsledky a to aj napriek rovnakej diagnóze. Individuálne charakteristiky pacienta majú vplyv na spôsob, akým liečivo funguje, bez ohľadu na to, či ide o liečivá súvisiace s chorobou alebo o liečivá nezávislé od daného ochorenia. Liečba všetkých pacientov diagnostikovaných určitou chorobou použitím „hromadného“ prístupu odporuje týmto individuálnym rozdielom. Inými slovami, konvenčne praktizovaná medicína nie je až tak efektívna ako by mohla byť. Príliš veľa pacientov prijíma liečbu, ktorá nie je prospešná pre ich konkrétne ochorenie. Naopak, v niektorých prípadoch môže takáto liečba dokonca spôsobiť nežiaduce reakcie. Cieľom personalizovanej medicíny je sledovanie genomických polymorfizmov génov spojených s liečivami, ktoré spôsobujú výrazné rozdiely v reakcii na liečivo [2]. Dôvodom týchto rozdielov by mohlo byť to, že liečivá sú nové látky ktoré sa objavili v ľudskom evolučnom vývoji. Z toho vyplýva, že genetické mutácie alebo polymorfizmy génov spojené s metabolizmom liečiv spôsobujú fatálne reakcie na liečivá, nakoľko ešte neuplynul dostatočne dlhý čas na ich elimináciu ľudskou evolúciou. Naopak v prípade genetických mutácií a polymorfizmov génov súvisiacich s ochorením, ktoré mali fatálne účinky, boli z väčšej časti eliminované dlhým vývojom ľudskej evolúcie [3].

Personalizovaná terapia

Na rozdiel od pomalého pokroku v personalizovanej starostlivosti založenej na štúdiu génov ochorení, personalizované používanie liečiv je rýchlo sa rozvíjajúca oblasť geno-

mickej medicíny. Individuálne upravené liečivá sa už zavádzajú do klinickej praxe. Niektoré genetické polymorfizmy sa môžu zúčastňovať funkcií vzťahujúcich sa k účinku liečiva, čím spôsobujú individuálne rozdiely v reakcii na liečivo a dávajú tak podnet ku klasifikácii „respondér“ a „ne-respondér“ (citlivý/necitlivý na liečivo). Koncept farmakogenetiky je používaný už viac ako 40 rokov na označenie štúdií jednotlivých génov a ich vplyvu na inter-individuálne rozdiely v enzýmoch podieľajúcich sa na metabolizme liečiv. Na rozdiel od toho je farmakogenomika relatívne nový pojem, ktorý vznikol po projekte ľudského genómu a ktorý označuje štúdie nie len jednotlivých génov, ale aj funkcie a interakcie všetkých génov v genóme v celkovej variabilite reakcií na liečivo [4]. Ide o najúspešnejšie sa rozvíjajúce sa oblasti genomickej medicíny.

„Journal of the American Medical Association (JAMA-časopis Americkej lekárskej spoločnosti) v roku 1998 napísal, že asi dva milióny pacientov ročne utrpí následky spojené s užívaním liečiv a asi 100 000 z nich zomrie, čo predstavuje štvrtú až piatu príčinu úmrtia v USA [5]. Úrad pre výživu a liečivá (Food and Drug Administration FDA) v USA podporuje používanie pred-diagnostických testov DNA na testovanie reakcií na liečivá. Tieto testy sú u niektorých liečiv povinné, z dôvodu aby sa zamedzilo ich nežiaducim vedľajším účinkom [6].

Individuálne rozdiely v reakcii na liečivá sa prisudzujú predovšetkým dvom triedam genetických polymorfizmov. Prvá trieda sa označuje ako farmakodynamický (PD) polymorfizmus a je spôsobený polymorfizmom génov kódujúcich proteíny, ktoré sa vzťahujú k účinku liečiv. PD polymorfizmus je spojený s receptormi alebo proteín kinázou. Druhý sa označuje ako farmakokinetický (PK) polymorfizmus a vyskytuje sa vďaka génom ktoré kódujú proteíny zodpovedné za absorpciu, distribúciu, metabolizmus a vylučovanie liečiva (napríklad enzýmy metabolizujúce alebo transportujúce liečivá).

PD polymorfizmus reakcie liečiv je často nachádzaný v molekulovo cielených liečivách rôznych moderných protinádorových preparátov. Za zmienku stojí Gefitinib (Iressa), liečivo používajúce sa v terapii karcinómu pľúc (epidermálny rastový faktor receptoru – tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI), ktoré má dobrú účinnosť v liečbe pokročilého nemalobunkového karcinómu pľúc (NSCLC) [7]. Veľmi dobrý efekt má hlavne u „super-respondéra“, ktorého stav sa výrazne zlepšil po aplikácii gefitinibu, dokonca aj v prípadoch kedy sa pľúcny karcinóm rozšíril po celých pľúcach [8]. Avšak môže spôsobiť vážne vedľajšie účinky ktoré sa prejavujú intersticiálnou pľúcnou chorobou, následkom ktorej jedna tretina pacientov zomiera. Aby sa zabránilo nebezpečnému účinku u tzv. ne-respondérov, genetické testovanie je nevyhnutné. Rozdiel v reakcii na liečivo sa pripisuje špecifickej mutácii receptoru EGF a uvádza sa, že účinok liečiva sa u pacientov s touto mutáciou zvyšuje desaťkrát [9]. Ďalším dobre známym príkladom je trastuzumab (Herceptin), liečivo používané pri terapii nádorov prsníka, založený na monoklonálnej protilátke. Liečivo je účinné u pacientok ktoré majú zvýraznený receptor HER2 (ľudský epidermálny rastový faktor typu 2) [10], [11]. Úrad pre potraviny a liečivá v USA, rozhodol, že pred-diagnostické testovanie DNA pomocou imunohistochemie (IHC) a fluorescenčnej in situ hybridizácie (FISH) je pred aplikáciou tohto liečiva povinné.

Polymorfizmus PK riadi pacientovu individuálnu reakciu na určité liečivá od „extenzívneho metabolizéra“, ktorého tráviace enzýmy eliminujú liečivo príliš rýchlo, čím znižujú jeho účinok, až po „slabého metabolizéra“, ktorý metabolizuje liečivo zle, takže liečivo zostáva v jeho organizme príliš dlho a spôsobuje excesívny účinok. Najznámejší polymorfizmus metabolického enzýmu, ktorý je obecné spájaný s účinnosťou liečiv, je skupina cytochrómov P450 (CYP). Je známych viac ako 50 izoenzýmov CYP. Klasifikácia tohto enzýmu je založená na stupni homológie genetických sekvencií.

Účinky mnohých často používaných liečiv, ako sú napríklad protinádorové liečivá 5-fluorouracil (5-FU), irinotekan alebo prostriedky používané v terapii tuberkulózy ako izoniazid a ďalšie, závisia na polymorfizme CYP. Je k dispozícii mnoho vynikajúcich štúdií o polymorfizmoch CYP a ich účinkoch na metabolizmus liečiv. Veľmi vhodným príkladom je personalizovaná medikácia warfarinom.

Warfarin je najrozšírenejšie antikoagulačné liečivo, používané na potlačenie syntézy zrážacích faktorov, čím sa predchádza infarktu, mŕtvice a poruchám zrážaniu krvi. Koncentrácie warfarinu v organizme je ovplyvňovaná mnohými faktormi – diétou, liekovými interakciami a tiež genetikou a jeho antikoagulačným účinkom závisí od pečenej bunky. Je tiež známy svojim úzkym terapeutickým rozsahom; nadmerná dávka spôsobuje krvácanie, kým nedostatočná dávka spôsobuje trombózu. Ďalší problém je v tom, že sa úzky terapeutický rozsah medzi jednotlivcami podstatne líši a variabilita dosahuje až desaťnásobku, takže udržiavacia dávka liečiva musí byť starostlivo monitorovaná častými krvnými testami, aby bola zabezpečená adekvátna, ale súčasne bezpečná, dávka. Hlavne európska populácia, ktorá je nositeľom funkčne defektných *2 a *3 alel izoenzýmu 2C9 cytochrómu P450 (CYP2C9) je známa tým, že vyžaduje signifikantne nižšiu udržiavaciu dávku liečiva, častejšou nestabilitou antikoagulačnej liečby, ďalším pretrvávaním antikoagulačného účinku liečiva po jeho vysadení alebo znížení dávky a v konečnom dôsledku sú nositelia týchto alel viac ohrození hemoragickými komplikáciami. Štúdie ukazujú, že pacientova prvá reakcia je určená hlavne genotypom VKORC1. Gén VKORC1, kóduje podjednotku cieľového proteínu pre Warfarin – vitamín K epoxid reduktázový komplex. Tento komplex recykluje redukovaný vitamín K, ktorý je nevyhnutný na aktiváciu koagulačných faktorov (FII, FVII, FIX a FX). Genetické varianty VKORC1 majú významný vplyv na dávkovanie warfarinu a odpoveď na liečbu [12].

Onkomarkery toxicity liečby

Personalizovaná cieľená terapia bola jednou z prvých uplatnená pri onkologických indikáciách a postupne sa stáva súčasťou bežnej onkologickej praxe. Väčšina endemicky sa vyskytujúcich nádorov v pokročilom stave zostáva napriek kombinovanej liečebnej modalite inkurabilnými ochoreniami. Z rýchlo narastajúcimi poznatkami v oblasti molekuly biológie a genetiky sa celý rad kedysi homogénnych nádorových jednotiek rozpadá na nové nádorové entity s odlišnými charakteristikami ktoré ponúkajú nové cieľové štruktúry pre nové molekuly cieľenej personalizovanej medicíny.

Aj keď v praxi zatiaľ vôbec nie je bežné, aby sa pred zahájením konkrétnej terapie testovali genetické varianty, medicína v tomto smere predsa len pokročila. Kedysi bola napríklad prognóza akéhokoľvek karcinómu jasne daná orientačným patologickým vyšetrením alebo histológiou a spravidla nasledoval okamžitý chirurgický zákrok ako jediné možné riešenie. Dnes je už pri týchto diagnózach testovaná niektorá z variant molekuly translokácie, mikrosatelitnej nestability, mutácie EGFR (epidermal growth factor receptor) atď. a až potom je na mieste, navyše v súčinnosti s farmakogenomikou, rozhodnúť o optimálnej liečbe – či je výhodnejšie chirurgické, rádioterapeutické alebo chemoterapeutické riešenie.

Nádejou pre zlepšenie účinnosti protinádorovej terapie sa ukazuje identifikácia biomarkerov, ako indikátorov patologických dejov alebo farmakoterapeutických zásahov. Biomarkery umožňujú selektovať typy nádorov nielen z pohľadu protinádorovej odpovede ale aj predikcie toxicity liečby. S týmto prístupom ide ruka v ruke nutnosť novej stratégie klinického vývoja a skúšania nových molekúl.

Trastuzumab, monoklonálna protilátka proti HER-2 receptoru je príkladom najdlhšie používaného princípu personalizovanej medicíny pre špecifickú podskupinu pacientov. Na stanovenie amplifikácie génu HER2/neu vzhľadom

k centromerickému markeru sa dnes používa fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH).

Najnovšími príkladmi cieľenej terapie je používanie crizotinibu, ALK- inhibítora pre podskupinu nemalobunkových karcinómov pľúc nesúcich ALK mutáciu. Vemurafenib, inhibítor B-raf, je používaný v terapii metastatického melanómu nesúceho špecifickú mutáciu B-raf V6004. Nádor nežije v izolovanom prostredí, ale je zásadne ovplyvňovaný práve nádorovým mikroprostredím, ktoré sa stáva tiež jedným z možných cieľov personalizovanej medicíny. Inhibícia novotvorby ciev je štandardnou súčasťou liečby niekoľkých solidných nádorov.

Molekulové biomarkery je možné použiť aj v personalizácii bežne používanej chemoterapie.

Metabolická dráha 5-FU zahŕňa gény, ktorých mutácie vedú k systémovej toxicite spôsobenej akumuláciou toxických metabolitov. Mutácie a znížená expresia génu DPYD pre dihydropyrimidín dehydrogenázu (DPD), resp. znížená aktivita DPD zodpovedná za odbúravanie 5-FU, vedie k hromadeniu aktívneho metabolitu v tele pacienta, a tým extrémnej senzitivite na bežné dávky 5-FU. Bolo nájdených viac ako 50 mutácií tohto génu, ktoré sú u približne 3–5 % populácie asociované s toxicitou liečby 5-FU [13], [14]. Stanovenie aktivity enzýmu DPD, ktoré je možné stanoviť na úrovni mRNA z periférnej krvi, však v súčasnosti stále nie je súčasťou rutinného skrínového vyšetrenia pred začiatkom liečby 5-FU, napriek tomu, že ide o závažný farmakogenetický problém s fatálnymi následkami [15]. Zvýšená expresia tymidylát syntázy (TS) spôsobená mutáciou génu TYMS je spojená rovnako so zvýšenou citlivosťou na liečbu 5-FU, ktorá vedie až k toxicite [16], [17]. Podobne mutácie v géne pre enzým tiopurín-S-metyltransferázu (TPMT) predikuje citlivosť k terapii tiopurínmi a môže viesť až ku zníženej tolerancie bežne používaných dávok [18].

Homozygotní varianta alely UGT1A1 (UGT1A1*28) je prítomná približne u 10 % populácie a spôsobuje výrazné zníženie aktivity enzýmu UDP-glukuronyltransferázy, ktorý katalyzuje biotransformáciu významného

protinádorového liečiva – irinotekanu. Významné zníženie enzymatickej aktivity vedie ku závažným toxickým postihnutiam. Vyšetrenie mutácie génu je odporúčované FDA už od roku 2005 [19]. Prejavy toxicity môžu byť aj dobrým prediktorom pre účinnosť terapie, ako je tomu u EGFR-cielených terapií [20]. Kožná toxicita, zapríčinená väzbou liečiva na EGFR a inhibíciu jeho signálnej dráhy v keratinocytoch, koreluje s dobrou účinnosťou liečby u kolorektálneho a pľúcnych karcinómov [21], [22]. Intenzívny výskum v oblasti klinickej onkológie priniesol za ostatné desaťročie celý rad nových liečiv a prediktorov liečebnej odpovedi, čo umožnilo personalizovať terapiu na základe genetických/expresných zmien nádoru. Markery ako HER2, EGFR, KRAS, BRAF a ALK, ktorých prediktívny význam bol dokázaný celým radom klinických štúdií, sú v súčasnej dobe neoddeliteľnou súčasťou rutinej diagnostiky, ich testovanie má zásadný vplyv na voľbu adekvátneho terapeutického postupu a skvalitnenia života konkrétneho pacienta.

C-MET proto-onkogén kódujúci hepatocytárny rastový receptor (HGFR) s tyrozín kinázovou aktivitou je amplifikovaná u celej rady nádorových ochorení. U NSCLC sa získanou rezistenciou na gefitinib/erlotinib býva amplifikácia C-MET nájdená približne u 20 % prípadov (23). V súčasnosti je u NSCLC gén C-MET jedným z najnádejnejších prediktívnych markerov, súčasná blokácia EGFR a C-MET sa zdá ako sľubná stratégia pre liečbu pacientov so získanou rezistenciou na gefitinib/erlotinib. Nízkomolekulový inhibítor ARQ197 (tivantinib) potvrdilo výrazné zlepšenie PFS i OS u pacientov s lokálne pokročilým alebo metastatickým neskvamóznym pľúcny karcinómom liečených kombináciou tivantinibu a erlotinibu oproti samotnému erlotinibu [24]. Ďalším testovaným inhibítorom je crizotinib, indikovaný NSCLC pacientom s ALK prestavbou, ktorý vykazuje sľubné účinky u pacientov s NSCLC a *de novo* amplifikáciou C-MET (25).

Molekuly zúčastňujúce sa signálnej dráhy PI3K/AKT/mTOR patrí medzi najviac študo-

vané v súvislosti so vznikom rôznych druhov nádorových ochorení (26-32). PIK3CA mutácie a strata expresie PTEN je spojená s rezistenciou na trastuzumab, respektíve s horšou prognózou ochorenia pri liečbe karcinómu prsníka [33], [34] a s rezistenciou na liečbu cetuximabem u kolorektálneho karcinómu [35]. Dve hlavné aktivačné mutácie PIK3CA (E545K a H1047R) a mutácie PTEN, vedúce ku strate funkcie, sú spojené s rezistenciou na lapatinib u pokročilého HER2 pozitívneho karcinómu prsníka [36]. Cestou ku zvráteniu rezistencie sú mnohé nízkomolekulové inhibítory PI3K ako BKM120 – panPI3K inhibítor (NCT01501604) alebo BYL719 – selektívny inhibítor PI3K (NCT01219699).

U pacientok s karcinómom prsníka a mutáciou AKT bola dokázaná rezistencia na tamoxifen. AKT mutantné karcinómy sú cieľom nových inhibítorov ako napr. panAKT inhibítor MK-2206 [37]. Inhibítory mTOR sú používané na liečbu rôznych typov malignít [38], [39], [40].

Používanie na mieru ušitých liečiv sa zvyšuje spolu s pokrokom vo farmakogenomike a farmakogenetike.

ZÁVER

Medicína sa stáva vedou o informáciách, vyžadujúcich systémový holistický prístup, kde sa už nezaobídeme bez metodiky analytických technológií – matematických počítačových a fyzikálnych. Výstupy nových vedeckých poznatkov z oblasti genomiky, proteomiky, interaktomiky, metabolomiky a všetkých ďalších „-omics“ je nevyhnutné správne prepojiť a urobiť z nich súvislý systém údajov, ktorý by s využitím informačných technológií mohli priniesť nové pohľady na celú situáciu v personalizovanej medicíne. Genetika poskytuje cenné údaje avšak s prihliadnutím a vedomím, že veľmi veľa je možné ovplyvniť environmentálnymi faktormi vonkajším prostredím alebo fenotypovou expresiou.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla za podpory grantov: MZ SR 2012/25-UKMA-2 (50 %) a APVV-0412-11 (50 %).

LITERATÚRA

1. **GOH, K. I., CUSICK, M. E., VALLE, D. et al.:** The human disease network. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007; 104: 8685–8690.
2. **International human genome sequencing consortium.** Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 2004; 431: 931–945.
3. **GUTTMACHER, A. E., COLLINS, F. S.:** Genomic medicine – a primer. *N. Engl. J. Med.*, 2002; 347: 1512–1520.
4. **EVANS, W. E., RELLING, M. V.:** Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature*, 2004; 429: 464–468.
5. **Lazarou, J., Pomeranz, B. H., Corey, P. N.:** Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*, 1998; 279: 1200–1205.
6. **FDA:** Guidance for Industry Pharmacogenomic Data Submissions, 2003. <http://www.fda.gov/cder/guidance/5900dft.pdf>
7. **BLACKLEDGE, G., AVERBUCH, S.:** Gefitinib ('Iressa', ZD1839) and new epidermal growth factor receptor inhibitors. *Br. J. Cancer* 2004; 90: 566–572.
8. **LYNCH, T. J., BELL, D. W., SORDELLA, R. et al.:** Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 350: 2129–2139.
9. **ASAHINA, H., YAMAZAKI, K., KINOSHITA, I. et al.:** A phase II trial of gefitinib as firstline therapy for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations. *Br. J. Cancer*, 2006; 95: 998–1004.
10. **BASELGA, J.:** Clinical trials of Herceptin (trastuzumab). *Eur. J. Cancer*, 2001; 37 (Suppl 1): S18–24.
11. **SLAMON, D. J., LEYLAND-JONES, B., SHAK S. et al.:** Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.*, 2001; 344: 783–792.
12. **SCHWARZ, U. I., RITCHIE M. D., BRADFORD, Y. et al.:** Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med* 2008; 58: 999–1008.
13. **WEI, X., MCLEOD, H. L., MCMURROUGH, J. et al.:** Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J. Clin. Invest.*, 1996; 98: 610–615.
14. **LU, Z., ZHANG, R., CARPENTER, J. T., DIASIO, R. B.:** Decreased dihydropyrimidine dehydrogenase activity in a population of patients with breast cancer: implication for 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 1998; 4: 325–329.
15. **CICCOLINI, J., GROSS, E., DAHAN, L., et al.** Routine dihydropyrimidine dehydrogenase testing for anticipating 5-fluorouracil-related severe toxicities: hype or hope? *Clin. Colorectal Cancer*, 2010; 9: 224–228.
16. **EDLER, D., GLIMELIUS, B., HALLSTROM M. et al.:** Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy. *J. Clin. Oncol.*, 2002; 20: 1721–178.
17. **AFZAL, S., GUSELLA, M., VAINER, B., et al.:** Combinations of polymorphisms in genes involved in the 5-Fluorouracil metabolism pathway are associated with gastrointestinal toxicity in chemotherapy-treated colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 2011; 17: 3822–3829.
18. **EVANS, W. E., HON, Y. Y., BOMGAARS, L. et al.:** Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J. Clin. Oncol.*, 2001; 19: 2293–2301.
19. **INNOCENTI, F., UNDEVIA, S. D., IYER, L. et al.:** Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J. Clin. Oncol.*, 2004; 22: 1382–1388.
20. **PARMAR, S., SCHUMANN, C. G., RUDIGER, S. et al.:** Pharmacogenetic predictors for

EGFR-inhibitor-associated skin toxicity. *Pharmacogenomics J.*, 2011.

20. FUSEK, M., VÍTEK, L., BLAHOŠM J. et al.: *Biologická léčiva: Teoretické základy a klinická praxe.* 1 ed. Praha: Grada Publishing; 2012

21. PETRELLIM, F., BORGONOVO, K., CABIDDU, M. et al.: Relationship between skin rash and outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with anti-EGFR tyrosine kinase inhibitors: a literature-based meta-analysis of 24 trials. *Lung Cancer*, 2012; 78: 8–15.

22. BEAN, J., BRENNAN, C., SHIH, J. Y. et al.: MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007; 104: 20932–20937.

23. SEQUIST, L. V., VON PAWEL, J., GARMEY, E. G. et al.: Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2011; 29: 3307–3315.

24. OU, S. H., KWAK, E. L., SIWAK-TAPP, C. et al.: Activity of crizotinib (PF02341066), a dual mesenchymal-epithelial transition (MET) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor, in a non-small cell lung cancer patient with de novo MET amplification. *J. Thorac Oncol.*, 2011; 6: 942–946.

25. COURTNEY, K. D., CORCORAN, R. B., ENGELMAN, J. A.: The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28: 1075–1083.

26. LI, J., YEN, C., LIAW, D. et al.: PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 1997; 275: 1943–1947.

27. LEE, J. W., SOUNG, Y. H., KIM, S. Y. et al.: PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 2005; 24: 1477–1480.

28. JANKU, F., WHELER, J. J., WESTIN, S. N., et al.: PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA mutations. *J. Clin. Oncol.*, 2012; 30: 777–782.

29. NOSHO, K., KAWASAKI, T., OHNISHI, M. et al.: PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia*, 2008; 10: 534–541.

30. WHANG, Y. E., WU, X., SUZUKI, H. et al.: Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998; 95: 5246–5250.

31. RASHEED, B. K., STENZEL, T. T., MCLENDON, R. E. et al.: PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res.*, 1997; 57: 4187–4190.

32. BERNS, K., HORLINGS, H. M., HENNESSY, B. T. et al.: A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, 2007; 12: 395–402.

33. NAGATA, Y., LAN, K. H., ZHOU, X. et al.: PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*, 2004; 6: 117–127.

34. JHAWER, M., GOEL, S., WILSON, A. J. et al.: PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res.*, 2008; 68: 1953–1961.

35. EICHHORN, P. J., GILI, M., SCALTRITI, M. et al.: Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res.*, 2008; 68: 9221–9230.

36. YAP, T. A., YAN, L., PATNAIK, A. et al.: First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.*, 2011; 29: 4688–4695.

37. HUDES, G., CARDUCCI, M., TOMCZAK, P. et al.: Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 2007; 356: 2271–2281.

38. GALANIS, E., BUCKNER, J. C., MAURER, M. J. et al.: Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 5294–5304.

39. YU, K., TORAL-BARZA, L., DISCAFANI, C. et al.: mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 2001; 8: 249–258.

ZMENY V METABOLIZME TROMBOCYTOV – POTENCIONÁLNE BIOMARKERY SUICIDALITY?

PÁLOVÁ E., SABO J.

Ústav lekárskej a klinickej biofyziky UPJŠ LF, Trieda SNP 1, 040 01 Košice

e-mail: jan.sabo@upjs.sk

SÚHRN

Od roku 1976, kedy prof. Mary Åsbergová (Åsbergová a kol., 1976) ako prvá objavila alterácie neurotransmitterového systému v mozgo-miechovom moku (CSF) u jedincov so suicidálnym správaním, začali sa objavovať ďalšie práce zamerané na danú problematiku. Väčšina štúdií poukazuje na význam troch hlavných neurotransmitterových systémov v centrálnom nervovom systéme (CNS) pri rozvoji suicidálneho správania: noradrenergný, sérotonínerný a dopamínerný (Nordström a kol., 1994).

U jedincov so suicidálnym správaním pravdepodobne dochádza k zmenám (v zmysle deficitu funkcie) v prefrontálnom kortexe (PFC), kde prebieha exekutívny proces myslenia. Dôvodom tohto deficitu by mohli byť spomínané zmeny v metabolizme niektorých neurotransmitterových systémov. Zdravý mozog je schopný nájsť alternatívne riešenie v ťažkej životnej situácii, avšak „suicidálny“ mozog s deficitom v PFC túto alternatívu schopný nájsť nie je – preto jedinec spácha samovraždu (Underwood, 2011).

Podľa údajov WHO zomrie ročne vo svete

na samovraždu zhruba 800 000 ľudí (WHO, 2014). Ak by bola možná identifikácia niektorých biomarkerov suicidality (napr. prostredníctvom proteomickej analýzy mozgo-miechového moku a krvných doštičiek), bolo by snáď možné stanoviť riziko suicidality už pri preventívnom rutínnom vyšetrení ako je odber krvi. To by umožnilo včasnejší záchyt takýchto pacientov s možnosťou zahájenia okamžitej terapie.

Kľúčové slová: suicidalita, samovražda, suicidálne správanie, biomarker, proteomika, proteomická analýza, mozgo-miechový mok, CSF, trombocyty, PLT

SUMMARY

Since prof. Mary Åsberg (Åsberg et al., 1976) in 1976 discovered alterations in neurotransmitter systems in cerebrospinal fluid (CSF) in patients with suicidal behavior many studies focusing on the problem of suicidality were done. The main focus of interest of this research are the three major neurotransmitter systems that may play a role in suicidal behavior:

noradrenergic, serotonergic and dopaminergic system (Nordström et al., 1994).

It is supposed that in people with suicidal behavior the main changes take place in the prefrontal cortex (PFC), which is the centre of executive processes of thinking. The deficit of *this* function in PFC might be associated with alterations of the certain neurotransmitter systems in the central nervous system (CNS). Healthy brain is able to find an alternative way how to solve the difficult life events or situations, but „the suicidal“ brain with the deficit of the function in PFC is not able to find a reason why not to commit suicide (Underwood, 2011).

According to WHO data around 800 000 people worldwide commit suicide every year (WHO, 2014). Therefore the possibility to identify potential biomarkers of suicidal behavior is a very challenging issue that might help in future identification of patients with suicidal behavior via simple blood test.

Key words: suicidality, suicide, suicidal behavior, biomarker, proteomics, proteomic analysis, cerebrospinal fluid, CSF, platelets, PLT

ÚVOD

Suicídium (samovražda, z latinského *sui caedere*, t.j. „zabiť sám seba“) je v súčasnosti definovaná ako ukončenie vlastného života úmyselne a dobrovoľne. Pojem suicidality zahŕňa klinické symptómy od vzniku samovražedných myšlienok (suicidálne ideácie), cez suicidálne správanie, samovražedný pokus (tentamen suicidii) až po samotné suicídium (Meyer a kol, 2010). Každá samovražda predstavuje osobnú tragédiu jednotlivca, ktorá významne zasahuje najmä do života jeho rodiny, blízkych priateľov, ale aj okolia. Každý rok spácha vo svete samovraždu vyše 800 000 ľudí – každých 40 sekúnd zomrie jeden človek na samovraždu (WHO, 2014).

Podľa najnovších štatistík bolo v roku 2013 na Slovensku spáchaných 628 samovrážd (NCZI, 2014), bližšie charakteristiky opisuje tabuľka č. 1.

Z hľadiska neurochémie suicidality sa v súčasnosti venuje najväčšia pozornosť sérotonínernému systému. Narušenie fungovania tohto systému môže spôsobovať symptómy ako sú zvýšená impulzivita, agresivita (orientovaná

TAB. 1. CHARAKTERISTIKY 628 SAMOVRÁŽD NA SLOVENSKU V ROKU 2013. ZDROJ: NCZI, 2014

Charakteristiky samovrážd za rok 2013:
pomer mužov k ženám 6:1
riziko u žien stúpa: vdova < rozvedená < vydatá < slobodná
riziko u mužov stúpa: vdovec < rozvedený < slobodný < ženatý
hlavným motívom činu: „iné vnútorné osobné konflikty a problémy“ a „súvislosť so somatickým ochorením alebo telesnou chybou“
najčastejšie miesto vykonania činu: domov
najčastejší spôsob vykonania činu: sebapoškodenie obesením, zaškrtením, zadusením; sebapoškodenie skokom z výšky a sebapoškodenie z ručnej zbrane
najčastejším mesiacom vykonania činu: marec, jún a október
najčastejším dňom v týždni: pondelok a utorok s časom od 22:00 do 07:00

najmä voči sebe samému) a poruchy spánku (Rao a kol., 1998). Pilotnú štúdiu o zníženej hladine kyseliny 5-hydroxy-indolactovej (5-HIAA, hlavný degradačný produkt sérotonínerného systému) v mozgovo-miechovom moku (CSF) uverejnila v roku 1976 profesorka Mary Åsbergová (Åsbergová a kol., 1976). Viaceré štúdie však poukazujú aj na úlohu dopamínerného, noradrenerného či GABA-erného systému ako možných kofaktorov pri vzniku suicidálneho správania. Okrem neurotransmitterových systémov sa za ďalšie kofaktory rozvoja suicidality pokladajú: zmena vo funkcii hypotalamo-hypofýzo-adrenokortikálnej osi (HPA), zmeny vo funkcii imunitného systému alebo aj zmeny lipidového metabolizmu (Sequeira a kol., 2009; Wildenauer, 2009).

Suicidalita však stále zostáva pomerne komplexným fenoménom, kde okrem genetickej predispozície hrajú úlohu ako biologické, tak aj psychologické, sociologické či ekonomické faktory (Slater a kol., 2009; Wasserman a kol., 2007). Molekulárna podstata suicidality je v súčasnosti stále nejasná. Aj z tohto dôvodu predstavuje proteomika vhodnú alternatívu pre štúdium molekulárnej úrovne suicidálneho správania.

PROTEOMIKA SUICIDALITY

Úvod do proteomiky

Proteomické metódy, resp. proteomika predstavujú v súčasnosti široké spektrum vysoko sofistikovaných technológií, ktoré umožňujú identifikovať jednotlivé proteíny v biologickej vzorke. Proteomika sa zaoberá najmä štúdiom štruktúry a funkcie daných proteínov. Jej cieľom je stanovenie, tzv. *proteómu*, kompletnej sady proteínov genómu daného organizmu.

Za hlavný hnací motor vývoja proteomických metód sa môže považovať dešifrovanie kompletného genómu človeka v roku 2002 (Fleischmann a kol., 1995; Medzinárodné Konzorcium Sekvenovania Ľudského Genómu, 2004).

Najaktuálnejšia *mapa proteómu človeka* (HPM) bola zhotovená použitím tandémového hmotnostného spektrometra s pripojenou separačnou metódou kvapalinovej chromatografie (LC-MS/MS). Táto mapa obsahuje dôkazy proteínov vzniknutých transláciou z vyše 17 000 génov človeka zo 17 rôznych tkanív dospelých zdravých jedincov, 6 hematopoetických buniek a 7 fetálnych tkanív (Kim a kol., 2014).

Základná biochemická dogma zahŕňa transkripciu genetickej informácie z deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) do mediátorovej ribonukleovej kyseliny (mRNA), z ktorej je za účasti ribozómu a ďalších faktorov prevedená translácia tejto informácie do formy bielkoviny. Genóm sa teda mení na proteóm nasledovne: gén → jeho genóm → genomika (vedný odbor), následne vzniká z genómu tzv. „transkript“ (mRNA) → transkriptóm (súbor všetkých typov mRNA) → transkriptomika (vedný odbor) a následne vzniká proteín → proteóm (súbor všetkých proteínov) → proteomika.

Genóm je nutné chápať ako *lineárnu informáciu statického charakteru* (tvorenú kombináciou štyroch základných dusíkatých báz: adenín, guanín, cytozín a tymín), kdežto proteóm predstavuje *reťazec dynamického charakteru* (tvorený kombináciou 20 aminokyselín). Jedným zo súčasných cieľom modernej biochémie je aj zmapovanie celého proteómu človeka. Odhaduje sa, že bude identifikovaných vyše 100 000 základných proteínov (genóm obsahuje cca 20 000). Jungblut podáva zaujímavú vlastnú definíciu proteómu a proteínovej expresie: „*Genóm organizmu je stabilný počas celého jeho života (s výnimkou vzácných mutácií). Vajíčko motýľa má taký istý genóm ako motýľ sám – špecifická sada proteínov jeho organizmu sa však počas jeho vývoja mení. Jeho proteóm je súborom všetkých druhov proteínov, ktoré sa počas jeho života vyskytnú. Práve preto je každý proteóm individuálny – každý jedinec žije v inom prostredí - má svoj vlastný individuálny proteóm*“ (Jungblut a kol., 2008). Proteóm je teda súbor všetkých proteínov v daný čas a pod vplyvom daného prostredia.

Proteomické metódy

Proteomické technológie prechádzajú v poslednom období rapídny rozvojom, o čom svedčí aj pomerne široká paleta identifikačných a separačných metód. V súčasnosti jednoznačne dominuje hmotnostná spektrometria (MS), ktorá umožňuje identifikáciu proteómu. Pohľad do súboru proteínov môže poskytnúť veľmi cennú informáciu o súčasnom stave pacienta. Identifikácia nových molekúl s diagnostickým potenciálom by pomohla nielen diagnostiku uľahčiť, ale aj urýchliť a spresniť (Vajrychová a kol., 2012).

Chromatografické separačné metódy

Jedná sa o fyzikálno-chemickú metódu, ktorá delí látky na základe ich rozličnej afinity k dvom nemiešateľným fázam. Fáza mobilná je pohyblivá presúva sa cez alebo po fáze stacionárnej. Fáza stacionárna je nepohyblivá a má väčší povrch. Podľa použitej mobilnej fázy rozlišujeme chromatografiu *kvapalinovú* a *plynovú*. Podľa použitej stacionárnej fázy rozlišujeme chromatografiu *stĺpcovú*, *papierovú* alebo *na tenkej vrstve*. Na základe mechanizmu separácie rozlišujeme chromatografiu *ionexovú*, *adsorbčnú*, *afinitnú* a *gélóvú permeačnú* (Graves a Haystead, 2002; Pavia a kol., 2006). Vďaka chromatografickým separačným metódam dokážeme separovať aminokyseliny a im príbuzné látky.

1. Plynová chromatografia (GC):

Metóda GC využíva ako pohyblivú fázu plyn a separujú sa ňou hlavne plynné a kvapalné zmesi ľahko odpariteľné s teplotou varu maximálne 200–250 °C. Vzorka sa privádza do tzv. injektora, kde prebehne zohriatie alebo odparenie vzorky. Tá je následne unášaná prúdom plynu do kolóny, čo predstavuje samotné miesto separácie plynnej zmesi. Rozlišujeme kolónu *náplňovú*, ktorá je naplnená stacionárnou fázou a kolónu *kapilárnu*, ktorá má stacionárnu fázu lokalizovanú iba na svojom povrchu. Prin-

cípom GC metódy je teda separácia zložiek zmesi podľa ich afinity k náplni, resp. povrchu kolóny. Zložka s najnižšou afinitou ku stacionárnej fáze kolóny z nej vychádza prvá. Výstup už separovaných zložiek z kolóny je monitorovaný detektorom s vyhodnocovacím zariadením (Graves a Haystead, 2002; Pavia a kol., 2006). Výsledkom je chromatograf s jednotlivými *píkmi*, t.j. špičkami grafu (z anglického „peak“).

2. Kvapalinová chromatografia (LC):

Ide o fyzikálnu separačnú metódu, pri ktorej dochádza k separácii v pohyblivej fáze. Vzorka sa pri LC separuje medzi pohyblivou a nepohyblivou fázou (kolóna naplnená sorbentom) na základe jej vlastností, ako sú: náboj, veľkosť, polarita a pod. Afinita molekúl vzorky voči nepohyblivej fáze spôsobuje spomalenie jej pohybu vnútri kolóny. V spojení s najmodernejšími technológiami hmotnostnej spektrometrie sa v súčasnosti využíva najmä vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC), ktorej súčasťou prístrojového vybavenia je vysokotlakové čerpadlo zabezpečujúce prietok mobilnej fázy pod vysokým tlakom cez kolónu menších rozmerov (Dong, 2006). V porovnaní s klasickou stĺpcovou LC vie HPLC omnoho rýchlejšie a efektívnejšie zabezpečiť separáciu jednotlivých zložiek skúmanej vzorky. Separácia vzorky na jej jednotlivé zložky umožňuje ich detekciu. Jednotlivé „časy opustenia“ kolóny predstavujú jednotlivé zložky vzorky (Braithwaite a Smith, 1999; Kardoš a Berek, 1979). Medzi nevýhody HPLC patrí hlavne vysoká cena prístroja a jeho príslušenstva (napr. kolóny, roztoky, mobilné fázy a pod.) a relatívne nízka životnosť kolón (McMaster, 2007).

Hmotnostná spektrometria (MS)

MS predstavuje v súčasnosti už nielen nástroj využívaný čisto iba v oblasti fyzikálneho výskumu. Jedná sa o metodiku presahujúcu do oblastí moderného biologického, biochemického ale najmä klinického výskumu.

Za otca hmotnostnej spektrometrie sa právom považuje fyzik J. J. Thomson (1856–1940) pôsobiaci v Cambridgei, ktorý prispel k vývoju tejto metódy svojim výskumom o vychyľovaní katódového žiarenia v elektrickom poli a objavom a popisom samotného elektrónu (Thomson, 1897).

Hmotnostný spektrometer dokáže z molekulej a iónovej zmesi separovať nabité častice podľa ich hmotnosti a tým poskytnúť informácie o relatívnom zastúpení iónov rovnakej hmotnosti v danej zmesi. MS metódy sú pomerne citlivé a dokážu vykonať aj analýzu látky o hmotnosti cca 10^{-9} gramu. Na základe tohto princípu je možné pomocou MS metódy získať údaje o štruktúre proteínu (vďaka sekvencii aminokyselín, alebo množstvu peptidov) s jeho následnou identifikáciou prostredníctvom proteínovej databázy (Graves a Haystead, 2002). Proces identifikácie proteínov MS metódou je možné rozdeliť do troch krokov: Preparácia vzorky, ionizácia vzorky a analýza vzorky.

1. Preparácia vzorky:

Preparácia vzorky je v proteomike jedným z najkritickejších krokov. Analýza proteínov MS metódou prebieha najčastejšie na peptidoch, čo si vyžaduje rozrušenie terciárnej a kvartérnej bielkovinovej štruktúry. To sa dosiahne štiepením disulfidických väzieb (procesom redukcie) a zabránením ich reoxidácie (procesom alkylácie), čím sa získa kvalitný súbor peptidov (Jin a Manabe, 2005). Medzi najčastejšie používané enzýmy v tomto kroku patrí serínová endopeptidáza duodena *trypsín*. Tento tráviaci enzým štiepi peptidové väzby na karboxylovej strane arginínu a lyzínu.

2. Ionizácia vzorky:

Medzi najčastejšie používané metódy patrí metóda ionizácie elektrosprejom (ESI) a laserová desorpcia/ionizácia za prítomnosti matrice (MALDI). Pri oboch metódach sú peptidy konvertované na ióny pri súčasnom nadobudnutí, resp. strate jedného alebo viacerých protónov. V oboch prípadoch ide o tzv. „mäkké“ ionizačné

metódy, ktoré nenarušujú integritu vzorky, čo je nevyhnutné pre získanie čo najpresnejšej informácie o hmotnosti daného peptidu, resp. proteínu (Graves a Haystead, 2002).

3. Analýza vzorky:

Analýza ionizovanej vzorky prebieha v hmotnostných analyzátoroch na základe pomeru hmotnosti k náboju (m/z) vo vákuu. Medzi najčastejšie hmotnostné analyzátory patria: Kvadrupólové analyzátory, analyzátory doby dopadu (time-of-flight, TOF) a analyzátory s „iónovou pascou“ (IT, z anglického „ion trap“).

Kvadrupóly

Kvadrupól je MS analyzátor pozostávajúci zo štyroch paralelných tyčí kruhového prierezu. Na dve protilahlé tyče je aplikované kladné jednosmerné napätie, na zvyšné dve záporné jednosmerné napätie (medzi tyčami s opačným nábojom vzniká elektrostatické pole). Ióny vstupujú medzi tyče pozdĺžne a začnú oscilovať. Ak nespĺňajú podmienky pre určitý m/z , tak sú pritiažené elektrickým poľom niektorej z tyčí. Ak spĺňajú podmienky pre daný m/z , dôjdu až k detektoru (Yates, 1998; Kaufmann a Walker, 2013).

TOF

Ide o pomerne jednoduché typy MS, kde sa molekulové hmotnosti iónov zisťujú na základe doby preletu k danému detektoru. TOF analyzátory sa radia medzi analyzátory s vysokou rozlišovacou schopnosťou.

IT

Analyzátory IT fungujú na princípe vytvorenia trojdimenzionálnej „iónovej pasce“, kde sa zachytávajú jednotlivé ióny vzorky. Ich výhoda spočíva v akomsi „zbieraní“ daných iónov a ich následné selektívne vypúšťanie „z pasce“, čím sa zvyšuje ich senzitivita (Yates, 1998). Základná stavba IT analyzátoru pozostáva z prstencovej elektródy a dvoch koncových elektród, na ktoré je aplikované napätie. Krátkym pulzom na-

pätia sú ióny vyslané „do pasce“ vstupným otvorom koncovej elektródy. Po vyslaní istého množstva iónov sú tie zadržané „vnútri pasce“ a postupnou zmenou napätia vypudzované na detektor výstupným otvorom na základe ich m/z (Cooks a kol., 1991).

Stratégia analýzy nameraných dát

Medzi dva základné prístupy vrámci proteomickej analýzy patrí *bottom-up* analýza (ide o analýzu peptidov a peptidových fragmentov, ktoré následne vedú k identifikácii materského proteínu) a *top-down* analýza (ide o analýzu

celých neštiepených bielkovín, ktorá však často vyžaduje relatívne chemicky čistú bielkovinu). Väčšina klinických štúdií aplikuje *bottom-up* analýzu.

Určenie sekvencie peptidov (získaných MS analýzou) sa uskutočňuje na základe ich porovnania s proteínovou databázou. Medzi najčastejšie vyhľadávacie programy v databázach (tzv. „*proteomický softvér*“) patria napr. SEQUEST, OMSSA, Byonic, Mascot, MassWiz, InsPecT, alebo X!Tandem. Ide o algoritmy, ktorých hlavným cieľom je oddeliť *nesprávne identifikované* peptidy od *správne identifikovaných* peptidov.

TAB. 2. PREHLAD PRÁC, KTORÉ SA ZAMERIAVALI NA IDENTIFIKÁCIU PROTEÍNOV V MOZGOVO-MIECHOVOM MOKU S UVEDENÝMI POČTAMI DANÝCH PROTEÍNOV

Autor	Počet identifikovaných proteínov	Veľkosť vzorky	Charakteristika populácie	Metodika	Rok vydania práce
Sickmann a kol.	70	25 (pool)	Zdravá	2D-PAGE, MS	2000
Wenner a kol.	249	10***	Kognitívne zdraví (post-mortem)	2D-LC-MS/MS	2004
Zhang a kol.	315	58 (pool)	Zdravá	2D-LC-MS/MS	2005
Zougman a kol.	798	6 (pool)	„Neurologickí surogáti,****“	LC-MS/MS	2008
Pan a kol.	2594	N/A	N/A****	kombinácia metodík	2007
Schutzer a kol.	2630*	11 (pool)**	Zdravá	2D-LC-MS/MS	2010

Zdroj: Pan a kol., 2007; Sickmann a kol., 2000; Schutzer a kol., 2010; Wenner a kol., 2004; Zhang a kol., 2005; Zougman a kol., 2008.

* celkový počet proteínov identifikovaných v CSF, z toho 1472 (56%) proteínov je špecifických pre mozgo-miechový mok na základe porovnania s proteínovou databázou plazmy, t.j. 3654 identifikovaných proteínov (Liu a kol., 2006).

** Tzv. *pool* predstavuje súbor vzoriek od všetkých pacientov spojený do jednej vzorky. V prípade vzoriek mozgo-miechového moku sa jedná o pomerne vzácny materiál v pomerne vzácnom množstve - z tohto dôvodu viaceré výskumy pracujú s poolom.

*** Vzorky mozgo-miechového moku boli odobraté z mozgových komôr.

**** V tejto práci sú zahrnuté výsledky viacerých klinických štúdií CSF so zameraním na neurodegeneratívne ochorenia, napr. Alzheimerova choroba.

***** Pacienti, ktorí podstúpili lumbálnu punkciu za iným účelom, avšak výsledky ich lumbálnej punkcie boli v norme.

Na základe typu dát, ktoré chceme vyhľadávať, sa proteínové databázy človeka delia na databázy sekvencií, databázy proteínovej štruktúry, databázy interakcií proteín-proteín a komplexov, databázy proteínových rodín, všeobecné proteomické databázy, databázy proteínových izoforiem a iné (Zhang a kol., 2011; Zhou a kol., 2010). Celý proces začínajúci analýzou nameraných dát až po identifikáciu jednotlivých proteínov sa označuje aj ako „*data mining*“ (voľný preklad „dolovanie dát“).

PROTEOMIKA MOZGOVO-MIECHOVÉHO MOKU

Mozgovo-miechový mok (CSF) predstavuje biologický materiál, ktorý je v priamom styku so štruktúrami mozgu. Biopsia mozgu človeka *in vivo* však predstavuje výkon nesúci viac rizík, resp. nežiaducich účinkov než lumbálna punkcia. Mozgové tkanivo samovrahov analyzuje väčšina štúdií iba *post-mortem*.

Mozgovo-miechový mok však podľa niektorých autorov poskytuje relevantnejšie dôkazy začínajúcej alebo už pokračujúcej patológie, než samotných mozgový parenchým (Ransohoff, 2009). Zmapovanie „zdravého proteómu“ CSF je nevyhnutné pre následné určenie jednotlivých patologických proteínov, resp. ich patologických hladín, či iných charakteristík. V súčasnosti je dostupných viacero výskumných prác zaoberajúcich sa identifikáciou „zdravého proteómu“ CSF. Niektoré z nich sú uvedené v tabuľke č. 2.

„Neurologickí surogáti“ (resp. „neurologickí zástupcovia zdravých“, z anglického „neurologic surrogate-normals“) predstavujú súbor pacientov, ktorí podstúpili lumbálnu punkciu za účelom diferenciálnej diagnostiky možného ochorenia CNS (napr. prítomnosť infekcie CNS), resp. v rámci predprípravy na ortopedickú operáciu. Všetci títo pacienti však mali klinické výsledky lumbálnej punkcie v norme. Autor Schutzer a kol. uvádza, že v prípade porovnania jeho 2630 identifikovaných proteínov

s 798 proteínmi identifikovanými Zougmannom a kol. ide o 92 % prekrytie, t.j. 735 identicky identifikovaných proteínov (Schutzer a kol., 2010; Zougman a kol., 2008). Proteínový set s 2630 identifikovanými proteínmi by mohol slúžiť ako „základná mapa zdravého proteómu“ CSF, s ktorou by sa napr. mohli porovnávať výsledky proteomickej analýzy CSF u jedincov so suicidálnym správaním.

Proteomickej analýze CSF u 14 pacientov s tzv. veľkou depresívnou poruchou sa venoval Brunner a kol. V prvej skupine boli doteraz neliečení depresívni pacienti bez suicidálneho pokusu (7 pacientov) a v druhej skupine doteraz neliečení depresívni pacienti po suicidálnom pokuse (7 pacientov). Po analýze CSF dvojdimenzionálnou elektroforézou sa v skupine depresívnych pacientov po suicidálnom pokuse našiel jeden odlišný proteín, ktorý bol zadefinovaný iba molekulárnou hmotnosťou 33 kDa a izoelektrickým bodom o hodnote 5,2 (Brunner a kol., 2005).

V súčasnosti je však stále málo dostupných prác o proteomickej analýze CSF u pacientov so suicidálnym správaním.

PROTEOMIKA TROMBOCYTOV

Trombocyty (PLT, krvné doštičky) nemajú vlastné jadro. To sťažuje analýzu genómu a transkriptómu vďaka nízkym hladinám mRNA. Analýza súboru všetkých proteínov tu však môže práve naopak poskytnúť oveľa väčšie množstvo informácií (García a kol., 2004; Gnatenko a kol., 2003).

Veitinger a kol. predpokladá, že za vysokú variabilitu proteómu PLT môže inkorporácia exogénnych proteínov a genetické polymorfizmy endogénnych bielkovín (Veitinger a kol., 2012). Autor skúmal skupinu 52 zdravých jedincov (16 mužov a 36 žien vo veku 82 ± 11 rokov), kde identifikoval v rámci proteómu trombocytov niektoré proteíny charakteristické skôr pre krvnú plazmu. Veitinger a kol. zamietajú možnosť kontaminácie svojej vzorky gélovou

filtráciou. Na druhej strane pripúšťa, že jeho súbor obsahoval vekovo starších jedincov, čo mohlo pridať na zvýšenej variabilite proteómu. Predpokladá však, že niektoré typicky plazmatické proteíny pravdepodobne tvoria základnú súčasť proteómu trombocytov. Spomedzi 695 identifikovaných proteínov uvádza ako „plazmatických kandidátov trombocytárneho proteómu“: *apolipoproteín A-I* (súčasť vysokodenzitných lipoproteínov, tzv. HDL), *C4b-viažúci proteín* (súčasť komplementu), rôzne *izoformy albumínov* (podieľajú sa na udržiavaní onkotického tlaku plazmy), *haptoglobulínov* (glykoproteín tvorený v pečeni), *aktín* a jeho cytoplazmatická *izoforma typu 1* (súčasť kontraktilného aparátu) a *koagulačný faktor XIIIa* (tzv. fibrín stabilizujúci faktor). Prítomnosť apolipoproteínu A-I, C4b-viažúceho proteínu a rôznych typov albumínov potvrdzujú viacerí autori (García a kol., 2004; Martens a kol., 2006; Zhang a kol., 2006).

Analýzu kompletného proteómu PLT publikoval O'Neill a kol., pričom spolu bolo identifikovaných 536 proteínov (v rozmedzí izoelektrického bodu 4–5). Následne bola táto proteínová mapa doplnená o 224 proteínov (v rozmedzí izoelektrického bodu 5–11), čo predstavuje spolu 760 identifikovaných proteínov (García a kol., 2004; O'Neill a kol., 2002).

Proteomické analýzy krvných doštičiek sa uskutočňujú najmä s cieľom identifikácie potenciálnych biomarkerov srdcovo-cievnych ochorení. Publikácie o proteomickej analýze krvných doštičiek v rámci psychiatrie sú však stále málo dostupné.

ZÁVER

V súčasnosti stále nie je dostupná skríninová metóda na včasnú detekciu suicidality. Z biomarkerov, ktoré by mohli priamo súvisieť s neurobiológiou samovraždy, sa v súčasnosti ako najslubnejšie javia najmä sérotonín-ergné metabolity, ako je koncentrácia kyseliny 5-hydroxyindolctovej (5-HIAA) v mozgovo-

-miechovom moku, koncentrácia sérotonínu v trombocytoch ale aj denzita sérotonínových receptorov (podtypu 5-HT_{2A}) na membráne trombocytov.

Posledné výskumy poukazujú na možnú koreláciu zmien v metabolizme trombocytov so zmenami v mozgovo-miechovom moku (ktoré priamo súvisia aj so zmenami v samotnom CNS). Ak by sa teda dokázala korelácia medzi koncentráciou 5-HIAA v CSF a 5-HT_{2A} receptormi na PLT, mohlo by to viesť k vývoju novej skríninovej metódy suicidality.

LITERATÚRA

1. ÅSBERG, M. et al.: 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? In *Archives of General Psychiatry*. 1976, Vol. 33, No. 10, p. 1193–1197.
2. BRAITHWAITE, A. SMITH, F. J.: *Chromatographic Methods*, 5th ed., Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999, 559 p., ISBN 0751401587.
3. BRUNNER, J. et al.: Proteomic analysis of the CSF in unmedicated patients with major depressive disorder reveals alterations in suicide attempters, In *European Archives of Psychiatry + Clinical Neuroscience*. 2005, Vol. 255, is. 6, p. 438–440.
4. COOKS, R. G. et al.: Ion trap mass spectrometry, In *Chemical Engineering News*. 1991, Vol. 69, is. 12, p. 26–41.
5. COURTER, P. et al.: The monoamine oxidase — A gene may influence the means used in suicide attempts, In *Psychiatric Genetics*. 2005, Vol. 15, No. 3, p. 189–193.
6. DONG, M. W.: *Modern HPLC for Practicing Scientists*. New Jersey: A John Wiley & Sons, Inc., 2006, 286 p., ISBN 047172789X.
7. FLEISCHMANN, R. D. et al.: Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd., In *Science*. 1995, Vol. 269, No. 5223, p. 496–521.
8. GARCÍA, A. et al.: Extensive analysis of the human platelet proteome by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, In *Proteomics*. 2004, Vol. 4, Is. 3, p. 656–668.

- 9. GNATENKO, D. V. et al.:** Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression, In *Blood*. 2003, Vol. 101, Is. 6, p. 2285–2293.
- 10. GRAVES, P. R., HAYSTEAD, T. A. J.:** Molecular Biologist's Guide to Proteomics, In *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002, Vol. 66, No. 1, p. 39–63.
- 11. INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM:** Finishing the euchromatic sequence of the human genome, In *Nature*. 2004, Vol. 431, Is. 7011, p. 931–945.
- 12. JIN, Y., MANABE, T.:** High-efficiency protein extraction from polyacrylamide gels for molecular mass measurement by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry, In *Electrophoresis*. 2005, Vol. 26, Is. 6, p. 1019–1028.
- 13. JUNGBLUT, P. R. et al.:** The speciation of the proteome, In *Chemistry Central Journal*. 2008, Vol. 2, no. 16. Dostupné na: <http://journal.chemistrycentral.com/content/pdf/1752-153X-2-16.pdf>
- 14. KARDOŠ, E. BEREK, D.:** *Základy kvapalinovej chromatografie*, 1. vyd., Bratislava: Alfa, 1979, 296 s., ISBN 30205113.
- 15. KAUFMANN, A. WALKER, S.:** Evaluation of the interrelationship between mass resolving power and mass error tolerances for targeted bioanalysis using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, In *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2013, Vol. 27, Is. 2, p. 347–356.
- 16. KIM, M. S. et al.:** A draft map of the human proteome, In *Nature*. 2014, Vol. 509, Is. 7502, p. 575–581.
- 17. KUŽELOVÁ, H. a kol.:** Polymorfismus genu pro serotoninový transportér 5-HTT v etiológii psychiatrických onemocnení, In *Česká a Slovenská Psychiatrie*. 2010, roč. 106, č. 2, s. 98–104.
- 18. LIU, T. et al.:** High dynamic range characterization of the trauma patient plasma proteome, In *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, Vol. 5, p. 1899–1913.
- 19. MARSH, A. A.:** Serotonin Transporter Genotype (5-HTTLPR) Predicts Utilitarian Moral Judgments, In *PLoS ONE*. 2011, Vol. 6, Is. 10, p. e25148.
- 20. MARTENS, L. et al.:** A comparison of the HUPO Brain Proteome Project pilot with other proteomics studies, In *Proteomics*. 2006, Vol. 6, Is. 18, p. 5076–5086.
- 21. MCMASTER, M. C.:** *HPLC: A practical User's Guide*, 2nd ed., New Jersey: A John Wiley & Sons, Inc., 2007, 238 p., ISBN 0471754013.
- 22. MEYER, R. E. et al.:** Suicidality and risk of suicide — definition safety concerns, and a necessary target for drug development: a consensus statement. In *The Journal of Clinical Psychiatry*, 2010, Vol. 71, No. 8, p. e1–e21.
- 23. NORDSTRÖM, P. et al.:** CSF 5-HIAA predicts suicide risk after attempted suicide, In *Suicide and Life-Threatening Behavior*. 1994, Vol. 24, Is. 1, p. 1–9.
- 24. NCZI:** *Samovraždy a samovražedné pokusy v SR 2013*. Ročník 2014. ZŠ – 5/2014. [online] Bratislava: Edícia zdravotnícka štatistika, Národné centrum zdravotníckych informácií, 2013. s. 2–33. [cit: 2015-01-01] Dostupné na: <http://www.nczisk.sk/Documents/publikacie/2012/zs1305.pdf>
- 25. O'NEILL, E. E. et al.:** Towards complete analysis of the platelet proteome, In *Proteomics*. 2002, Vol. 2, Is. 3, p. 288–305.
- 26. PAN, S. et al.:** A combined dataset of human cerebrospinal fluid proteins identified by multi-dimensional chromatography and tandem mass spectrometry, In *Proteomics*. 2007, Vol. 7, Is. 3, p. 469–473.
- 27. PAVIA, D. L. et al.:** *Introduction to Organic Laboratory Techniques*. 4th ed., Pacific Grove: Thomson Brooks/Cole, 2006, p. 797–817, ISBN 9780495280699.
- 28. RANSOHOFF, R. M.:** Immunology: Barrier electrical storms, In *Nature*. 2009, Vol. 457, Is. 7226, p. 155–156.
- 29. RAO, M. L. et al.:** Upregulation of the platelet serotonin_{2A} receptor and low blood serotonin in suicidal psychiatric patients, In *Neuropsychobiology*. 1998, Vol. 38, No. 2, p. 84–89.
- 30. SCHUTZER, S. E. et al.:** Establishing the Proteome of Normal Human Cerebrospinal Fluid, In *PLoS ONE*. 2010, Vol. 5, Is. 6, p. e10980.
- 31. SEQUEIRA, A. et al.:** Global gene brain expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression, In *PLoS One*. 2009, Vol. 4, Is. 8, p. e6585.

- 32. SICKMANN, A. et al.:** Identification of proteins from human cerebrospinal fluid, separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, In *Electrophoresis*. 2000, Vol. 21, Is. 13, p. 2721–2728.
- 33. SLATER, S. et al.:** Key neurochemical markers for the prevention of suicide, In *Trends in analytical chemistry*. 2009, Vol. 28, Is. 9, p. 1037–1047.
- 34. THOMSON, J. J.:** Cathode Rays, In *Philosophical Magazine Series 5*. 1897, Vol. 44, No. 269, p. 293–316.
- 35. UNDERWOOD, M. D. ARANGO, V.:** Evidence for neurodegeneration and neuroplasticity as Part of the Neurobiology of Suicide. In *Biological Psychiatry*, 2011, Vol. 70, Is. 4, p. 306–307.
- 36. VAJRYCHOVÁ, M. a kol.:** Možnosti proteomických metod v klinické diagnostice. In *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 2012, roč. 20, č. 3, p. 158–164.
- 37. VEITINGER, M. et al.:** A combined proteomic and genetic analysis of the highly variable platelet proteome: From plasmatic proteins and SNPs, In *Journal of Proteomics*. 2012, Vol. 75, Is. 18, p. 5848–5860.
- 38. WASSERMAN, D. et al.:** Nature and nurture in suicidal behavior, the role of genetics: some novel findings concerning personality traits and neural conduction. In *Physiology & Behavior*. 2007, Vol. 92, Is. 1–2, p. 245–249.
- 39. WENNER, R. B. et al.:** Proteomic analysis of human ventricular cerebrospinal fluid from neurologically normal, elderly subjects using two-dimensional LC-MS/MS, In *Journal of Proteome Research*, 2004, Vol. 3, Is. 1, p. 97–103.
- 40. WILDENAUER, D. B.:** *Molecular Biology of Neuropsychiatric Disorders, Series: Nucleic Acids and Molecular Biology*. Vol. 23. Berlin: Springer Science & Business Media, 2009, p. 206–221, ISBN: 9783540853824.
- 41. WHO:** *Preventing Suicide: A global imperative*. Geneva: WHO Press (WHO Library Cataloguing-in-Publication Data), 2014. p. 7–27. ISBN 9789241564779.
- 42. YATES, J. R.:** III., Mass spectrometry and the age of the proteome, In *Journal of Mass Spectrometry*. 1998, Vol. 33, Is. 1, p. 1–19.
- 43. ZHANG, J. et al.:** Quantitative proteomic analysis of age-related changes in human cerebrospinal fluid, In *Neurobiology of Aging*. 2005, Vol. 26, Is. 2, p. 207–227.
- 44. ZHANG, Y. Q. et al.:** An overview of human protein databases and their application to functional proteomics in health and disease, In *Science China — Life Sciences*, 2011, Vol. 54, No. 11, p. 988–998.
- 45. ZHANG, X. et al.:** Proteomic analysis of individual variation in normal livers of human beings using difference gel electrophoresis. In *Proteomics*, 2006, Vol. 6, Is. 19, p. 5260–5268.
- 46. ZHOU, A. et al.:** PEPPI: a peptidomic database of human protein isoforms for proteomic experiments. In *BMC Bioinformatics*, 2010, Vol. 11, issue supplement 6, p. S7.
- 47. ZOUGMAN, A. et al.:** Integrated analysis of the cerebrospinal fluid peptidome and proteome, In *Journal of Proteome Research*. 2008, Vol. 7, Is. 1, p. 386–399.

ANALÝZA NATÍVNEJ FLUORESCENCIE PRI DIAGNOSTIKE NÁDOROVÝCH OCHORENÍ

ŠTEFFEKOVÁ, Z.^A, BIRKOVÁ, A.^B
MAREKOVÁ, M.^B

^AKatedra chémie, biochémie a biofyziky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

^BÚstav lekárskej a klinickej biochémie
UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta

steffekova.zuzana@mail.com

SÚHRN

Vzhľadom na to, že rakovina patrí k obávaným chorobám, na jej diagnostiku je využívaný celý rad techník. Limitujúca je ich nízka senzitivita, mnohé lézie je problém včas identifikovať konvenčnými metódami aj pre skúsených odborníkov. Mnohé metódy sú navyše obmedzene využiteľné, invazívne a často drahé, preto by bolo žiadúce najsť nový, jednoduchý a neinvazívny protokol detekcie maligných ochorení. Včasná detekcia malignít umožňuje skorší terapeutický zásah a teda aj vyššiu šancu na vyliečenie. V dnešnej dobe je preto veľká snaha vyvinúť nové diagnostické prístupy. Veľa metabolitov, vrátane prirodzene fluoreskujúcich látok, je kvôli alterovanému metabolizmu v nádorovom tkanive produkovaných v odlišných množstvách v porovnaní so zdravým. Využitie fluorescenčnej spektroskopie je jednou z potenciálnych alternatív. Tento článok sa zaoberá aplikáciou analýzy autofluorescencie do onkologickej diagnostiky.

Kľúčové slová: rakovina, diagnostika, fluorescenčná spektroskopia

SUMMARY

Because cancer is a dreaded disease, a number of techniques are currently employed for its diagnosis. Unfortunately, the poor sensitivity associated with standard methods is a significant limitation and many lesions are difficult to identify by means of conventional methods, even for experienced physicians. Many of these are specific to a particular site, invasive, and often expensive. Early detection of malignancies allows more effective therapy and also higher chance of cure. Hence, there is a definite need for a simple and noninvasive protocol for detection of malignant disease. That is why major efforts continue in the development of new, alternative diagnostic approaches. Many metabolic compounds including native fluorophores are produced in excess amounts in cancerous tissues due to altered metabolism of tumour. The use of fluorescence spectroscopy is one of the potential alternatives. In this article, application of autofluorescence analysis into oncological diagnostic is reviewed.

Key words: cancer, diagnostic, fluorescence spectroscopy

ÚVOD

Bunkové delenie je fyziologický proces, ktorý sa vyskytuje takmer vo všetkých tkanivách a je zároveň v rovnováhe s odumieraním buniek. Karcinogenéza je proces transformácie normálnych buniek na rakovinové, ktorý je charakterizovaný nekontrolovaným delením buniek a zmenou ich metabolizmu. Malígný nádor (malígný tumor, rakovina) je masa patologicky zmenených buniek, ktoré sa vymkli regulačným mechanizmom organizmu, progresívne sa delia, invadujú okolité tkanivo a vytvárajú vzdialené metastázy.

Dnešné metódy diagnostiky onkologických ochorení nie sú dostačujúce, tumor je väčšinou diagnostikovaný až v neskoršom štádiu konvenčnými metódami, čo často znemožňuje možnosť účinného terapeutického zásahu. Jednou s potenciálnych možností na poli diagnostiky malignít je stanovovanie onkomarkerov v tkanivách alebo biologických tekutinách. Onkomarkery sú špecifické látky, ktoré je možné vo vzorkách tkaniva alebo telových tekutín pacienta detegovať vo vyššej koncentrácii ako za fyziologických podmienok. FDA (Food and Drug Administration) definuje marker ako „charakteristiku, ktorú je možné cielene merať a stanoviť ako indikátor normálnych biologických procesov, patologických procesov alebo farmakologickej odpovede na terapeutický zásah“. Onkomarkery môžu byť produkované nádorovými bunkami, alebo zdravými bunkami ktoré reagujú na prítomnosť nádoru a charakterizujú molekulové zmeny u pacienta s rakovinou. Môžu predstavovať molekulu DNA, modifikácie DNA, RNA, proteíny a ich modifikácie, alebo iné biologické molekuly (Dong et al., 2005). Podľa výskytu rozlišujeme celulózne alebo tkanivové nádorové markery, ktoré sa nachádzajú v tkanive zhubného nádoru a humorálne nádorové markery nachádzajúce sa v telesných tekutinách, napr. sére alebo moči. V mnohých prípadoch je limitujúcim faktorom využívania nádorových markerov pri diagnostike ich nízka špecificita

a senzitivita. V súčasnosti sa využívajú hlavne na sledovanie priebehu ochorenia alebo reakcie na terapiu, progresie ochorenia, alebo prognózy pacienta.

Keďže nádorové bunky majú odlišný metabolizmus ako zdravé, mení sa aj zastúpenie rôznych metabolitov, a tým aj svetelný rozptyl a absorpčné vlastnosti tkaniva a telesných tekutín. Atypické jadrá v abnormálnych bunkách vedú k výraznejšiemu rozptylu. Optické metódy poskytujú nové spôsoby na charakterizáciu fyzikálnych a chemických zmien objavujúcich sa v tkanivách a bunkách, z čoho vyplývajú zaujímavé možnosti na nové diagnostické a terapeutické postupy (Birková et al., 2007).

Medzi optické metódy, pri ktorých je riešená otázka ich využitia pri diagnostike medicínsky významných ochorení patrí fluorescenčná spektroskopia (FS). Javí sa byť potenciálnou diagnostickou technikou vo viacerých oblastiach medicíny, najväčšia pozornosť sa však venuje využitiu FS ako diagnostického prostriedku v onkológii (Shazad et al., 2010).

Fluorescencia je emisia svetla molekulou, ktorá absorbovala svetlo, prípadne iné elektromagnetické žiarenie, ktoré je možné zmerať. Je to jav týkajúci sa elektrónov. Látky, ktoré vykazujú fluorescenciu sa nazývajú fluorofóry, ich spoločným menovateľom je systém konjugovaných dvojitých väzieb. Existujú exogénne fluorofóry a endogénne - natívne, prirodzené, tzv. autofluorofóry. Exogénne fluorofóry sami o sebe nefluoreskujú, vykazujú fluorescenciu napríklad po reakcii s vhodnou látkou, pričom fluoreskuje produkt reakcie. Endogénne fluorofóry emitujú fluorescenciu prirodzene, bez potreby chemickej reakcie.

Mnoho významných metabolitov sú natívne fluorofóry, patria medzi ne napríklad aromatické aminokyseliny (tryptofán, tyrozín, fenylalanín) a rôzne ich deriváty, štrukturálne proteíny (kolagén, elastín), koenzýmy NADH a FAD, lipidy, porfyríny a vitamíny. Autofluorescencia kolagénu a elastínu je spojená so štrukturálnym usporiadaním buniek a tkanív. Ostatné fluorofóry (tryptofán, tyrozín, fenylalanín, deriváty

pyridoxínu, NAD(P)H, FAD a porfyríny) sú spojené s bunkovým metabolizmom a funkciou (Kalaivani et al., 2008). Nádorové tkanivo má kvôli alterovanému metabolizmu iné zloženie fluoreskujúcich metabolitov ako zdravé, čím sa menia fluorescenčné charakteristiky samotného nádorového tkaniva, ako aj biologických tekutín (Shazad et al., 2010). Medzi fluorofóry, ktoré úzko súvisia s transformáciou neoplastického procesu sa často spomínajú aminokyseliny tryptofán a tyrozín (Ganesan et al., 1998), štruktúrne proteíny kolagén a elastín (Wang et al., 1999), koenzýmy NADH a FAD (Masilamani et al., 2010) a porfyríny (Kalaivani et al., 2008).

Autofluorescencia tkanív

Na problematiku komplexnosti vzťahov medzi bunkami *in vivo* poukazujú mnohé práce študujúce autofluorescenciu tkanív. Tkanivové štúdie poskytujú platformu, ktorá je omnoho bližšia skutočným *in vivo* analýzám v zmysle štruktúrálnej architektúry na mikroskopickej aj makroskopickej úrovni. Meranie celkovej fluorescencie zmesi fluorofórov je veľmi jednoduché, výsledky meraní však môžu byť na prvý pohľad nezrozumiteľné.

Pomocou autofluorescencie bolo analyzované široké spektrum tkanív od myšacích alebo potkaních tumorov až po ľudské zuby (Vo-Dinh et al., 2003). Množstvo vedeckých tímov dokázalo, že je signifikantný rozdiel vo fluorescencii zdravého a nádorového tkaniva. Fluorescenčné techniky môžu byť teda alternatívnym diagnostickým prostriedkom kožných malignít, ktoré sú rutinne diagnostikované histologickým vyšetrením kožných bioptátov (Thompson et al., 2011). Gerichovi et al. (2011) sa podarilo FS detegovať rakovinové bunky v tkanive prostaty so špecificitou 94 % a senzitivitou 90 %. Lane et al. (2012) aj McGee et al. (2009) vidia FS ako nápomocnú techniku pri detekcii orálnych neoplázií. Vývoj optických vlákien umožnil rozšíriť spektrum vyšetřovaných tkanív na všetky lokality dostupné endoskopickému vyšetřeniu. Klinická aplikácia

autofluorescenčného zobrazovania je možná pri detekcii nádorových ochorení krčka maternice (Chang et al., 2002), pažeráka (Yoshida et al., 2009, Suzuki et al., 2009), žalúdka (Kato et al., 2009), kolorekta (Aihara et al., 2012), alebo pľúc (Lam et al., 2006).

Autofluorescencia biologických tekutín

Fluorescenčné techniky ponúkajú perspektívny a doteraz plne nevyužitý potenciál aj pre štúdium biologických tekutín, ktorých zloženie je výsledkom metabolických procesov organizmu. Zloženie fluorofórov alebo intenzita fluorescencie závisí napr. od spôsobu stravovania, stavu hydratácie, proteínúrie, príjmu niektorých vitamínov atď. Výrazné zmeny v koncentrácii fluorofórov, ich pomere alebo prítomnosť atypických fluorofórov môžu súvisieť rôznymi pochodmi organizmu. Biologické tekutiny majú pre vyššiu variabilitu oproti tkanivám interpretačnú nevýhodu. V zmesiach panujú rôzne vzájomné vzťahy medzi fluorofórmí aj ich prostredím a mnohé z nich nie sú ešte popísané.

Pilotné práce o fluorescencii krvi pochádzajú z konca minulého storočia. V súvislosti s rakovinou prsníka študovali Bell et al. (1971) zmeny v koncentrácii degradačných produktov tryptofánu v krvi a ich vzťah ku steroidným hormónom. Xu et al. (1988) študovali fluorescenciu porfyrínovv sére onkologicky chorých. Wenchong (1989) popísal štúdiu o využití porfyrínov ako nádorových markerov v krvi aj v tkanivách. Leiner et al. (1986) a Hubmann et al. (1990) detailnejšie študovali celkové fluorescenčné vlastnosti krvného séra. Masilamani et al. (2003) najprv demonštrovali vzťah medzi porfyrínmi a proliferáciou buniek na zvieracom modeli a o rok neskôr (Masilamani et al., 2004) rozšírili tú istú štúdiu na ľudskú krv a zamerali sa na možnosti diagnostiky rôznych typov rakoviny meraním autofluorescencie porfyrínov v sére, pričom sa im jasne potvrdila pozitivita u pacientov s malignitou. Jednotlivé malignity však od seba odlíšiť ne-

vedeli. Poukázali na závislosť medzi vysokou koncentráciou porfyrínov v krvi a závažnosťou rakoviny.

Štúdie o autofluorescencii biologických tekutín iných ako krv sú raritné. Napriek interpretačným komplikáciám sa analýza autofluorescencie moču javí ako veľmi prínosná, aj vzhľadom na jeho dostupnosť. Nedávno (2010) porovnávali Masilamani et al. fluorescenciu štyroch rôznych biologických materiálov (tkanivo, plazmu, moč a pleurálny výpotok) od jedného pacienta s rakovinou pľúc. Vypozorovali, že napriek rôznorodosti materiálov, sa vo všetkých nachádzal opakujúci sa nález identických píkov typických pre nádorové ochorenie. V moči bol tento nález dokonca výraznejší ako v plazme a pleurálnom výpotku, čo významne zvyšuje diagnostickú hodnotu moču a jeho preferenciu ako biologického materiálu prvej voľby pre neinvazivitu. Podobnú štúdiu publikoval aj Al Sahli et al. (2011), analyzoval fluorescenčné spektrá krvi aj a moču a zaznamenal rozdielnosť spektier pri rôznych druhoch rakoviny.

Moč je mnohozložková zmes, roztok anorganických solí, v ktorom sú prítomné mnohé organické látky. Už v roku 1869 Jaffe popísal modro – zelenú fluorescenciu normálneho moču po vystavení UV žiareniu. Neskôr sa vykonali experimenty, ktoré mali objasniť vzťah fluoreskujúcich molekúl a ostatných bežných zložiek moču s výsledkom, že denný výdaj fluoreskujúcich molekúl je nezávislý od vylúčeného objemu moču a tiež sa nenašiel významný vzťah k ostatným zložkám moču (Squires et al., 1928). Medzi prvé onkologické aplikácie patrí práca Rabinowitza z roku 1949, ktorý testoval modro a červeno fluoreskujúce zložky prítomné v moči a ich vzájomné vzťahy. Zistil, že malígný rast sprevádza nárast červeno fluoreskujúcich látok a pokles látok s modrou fluorescenciou.

Vedecký tím profesora Masilamaniho študoval fluorescenciu moču tiež v súvislosti s diagnostikou nádorového ochorenia. S vysokou špecificitou (92 %) a citlivosťou (76 %) odlišili na základe fluorescencie flavínov, porfyrínov

a NADH zdravých ľudí a pacientov s rakovinou rôznej lokalizácie. Zároveň konštatovali, že pokročilé štádiá rôznych typov rakoviny majú podobné spektrum. Porfyríny a flavíny (možno aj bilirubín) sú zvýšené a NADH znížené (Masilamani et al., 2010). Podobnú štúdiu publikoval aj Rajasekaran et al., zistil signifikantný rozdiel medzi fluorescenčnými charakteristikami moču rôznych onkologických pacientov v porovnaní s kontrolnou skupinou, ktorý pripisuje odlišnej koncentrácii flavínov. Pri diagnostike rakoviny všeobecne je veľmi dôležité jej včasné odhalenie, ktoré značne zvyšuje šancu na uzdravenie pacienta. Diagnostika začiatkových štádií je obtiažna, čo súvisí aj s problematickou dostupnosťou vzoriek. Možnosťou využitia analýzy autofluorescencie pri detekcii prekanceróz sa zaoberala práca Šteffekovej et al. (2014), v ktorej potvrdila rozdiel medzi zdravou skupinou potkanov a potkanov s chemicky indukovanými včasnými fázami kolorektálneho karcinómu. Rakovina vaječníkov je z diagnostického hľadiska jednou najproblematickejších nádorových ochorení s veľmi vysokou mortalitou, pri ktorej je hľadanie nových markerov a skriningových metód vysoko aktuálnou úlohou (Urban et al., 2011). Jednou z potenciálnych možností je aj analýza autofluorescencie moču (Birková et al., 2014).

ZÁVER

Fluorescenčná spektroskopia sa pri detekcii rakoviny javí ako vhodný diagnostický doplnok. V poslednej dobe sa aplikáciou tejto metódy zaoberá viacero vedeckých tímov, ktoré dosahujú zaujímavé výsledky. Odlišná fluorescencia patologicky pozmenených tkanív poskytla možnosť vylepšenia endoskopických vyšetrení. Výhodou tejto metódy sú pomerne nízke náklady na vyšetrenie. Analýza natívnej fluorescencie biologických tekutín ako sú krv alebo moč vďaka minimálnej alebo žiadnej invazivite odberu vzorky, jej dostupnosti a dostatočnému množstvu analyzovaného

materiálu predstavuje potenciálny skrínigový prostriedok malignít.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla pri riešení projektu DIAGONKO, ITMS: 26220220153, aktivita 2.4 (100 %)

LITERATÚRA

1. **DONG, C.K. et al., 2005:** Telomerase: regulation, function and transformation. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Vol. 54, pp. 85.

2. **BIRKOVÁ, A. et al., 2007:** Metabolické profilovanie – nový pohľad na hodnotenie biologického materiálu. In *Klinická Biochemie a Metabolismus*, Vol. 15, pp. 145–154.

3. **SHAHZAD, A. et al., 2010:** Fluorescence spectroscopy: An emerging excellent diagnostic tool in medical sciences. In *Applied Spectroscopy Reviews*, Vol. 45, pp. 1–11.

4. **KALAIVANI, R. et al., 2008:** Fluorescence Spectra of Blood Components for Breast Cancer Diagnosis. In *Photomedicine and Laser Surgery*, Vol. 26, pp. 251–256.

5. **GANESAN, S. et al., 1998:** Native fluorescence spectroscopy of normal and malignant epithelial cells. In *Cancer Biochem Biophys*, Vol. 16, pp. 365–373.

6. **WANG, H. et al., 1999:** Quantitative laser scanning confocal autofluorescence microscopy of normal, premalignant and malignant colonic tissues. In *IEEE Trans Biomed Eng*, Vol. 46, pp. 1246–1252.

7. **MASILAMANI, V. et al., 2012:** Cancer detection by native fluorescence of urine. In *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 15, pp. 057003-1-057003-9.

8. **VO-DINH, T., CULLUM, B.M., 2003:** Fluorescence spectroscopy for biomedical diagnostics. in *Biomedical Photonics Handbook*, T. Vo-Dinh, Editor, CRC Press, Boca Raton, FL, Chapter 28, pp. 28.1–28.40.

9. **THOMPSON, A. et al., 2011:** Hyperspectral fluorescence lifetime fibre probe spectroscopy for use in the study and diagnosis of osteoarthritis and

skin cancer. In *Progress in Biomedical Optics and Imaging — Proceedings of SPIE*, Vol. 7895, Article number 78950G.

10. **GERICH, C.E. et al., 2011:** Detection of cancer cells in prostate tissue with time-resolved fluorescence spectroscopy. In *Progress in Biomedical Optics and Imaging — Proceedings of SPIE*, Vol. 7897, Article number 78970.

11. **LANE, P. et al., 2012:** Has fluorescence spectroscopy come of age? a case series of oral precancers and cancers using white light, fluorescent light at 405 nm, and reflected light at 545 nm using the Trimira identafi 3000. In *Gender Medicine*, Vol. 9, pp. 25–35.

12. **McGEE, S. et al., 2009:** Anatomy-based algorithms for detecting oral cancer using reflectance and fluorescence spectroscopy. In *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, Vol. 118, pp. 817–826.

13. **CHANG, S.K. et al., 2002:** Fluorescence spectroscopy for cervical precancer detection: Is there variance across the menstrual cycle? In *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 7, pp. 595–602.

14. **YOSHIDA, Y. et al., 2009:** Assessment of novel endoscopic techniques for visualizing superficial esophageal squamous cell carcinoma: autofluorescence and narrow-band imaging. In *Dis Esophagus*, Vol. 22, pp. 439–46.

15. **SUZUKI, H. et al., 2009:** Evaluation of visualization of squamous cell carcinoma of esophagus and pharynx using an autofluorescence imaging videoendoscope system. In *J Gastroenterol Hepatol*, Vol. 24, pp. 1834–9.

16. **KATO, M. et al., 2009:** Analysis of the color patterns of early gastric cancer using an autofluorescence imaging video endoscopy system. In *Gastric Cancer*, Vol. 12, pp. 219–24.

17. **AIHARA, H. et al., 2012:** Application of Autofluorescence Endoscopy for Colorectal Cancer Screening: Rationale and an Update. In *Gastroenterol Res Pract*, 971383.

18. **LAM, B. et al.,** The clinical value of autofluorescence bronchoscopy for the diagnosis of lung cancer. In *Eur Respir J*, Vol. 28, pp. 915–919.

19. **BELL, E.M. et al., 1971:** Relationships between excretion of steroid hormones and tryp-

tophan metabolites in patients with breast cancer. In *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 24, pp. 694–698.

20. XU, X. et al., 1998: The characteristic fluorescence of the serum of cancer patients. In *J Lumin*, pp. 40–41, 219–220.

21. WENCHONG, L., 1989: Some fluorescence observation on the canceration tissue and the blood of cancer patients. In *Proc. SPIE*, Vol. 1054, pp. 196–199.

22. LEINER, M. J. P. et al., 1986: Fluorescence topography in biology. III. Characteristic deviations of tryptophan fluorescence in sera of patients with gynecological tumors. In *Clin. Chem*, Vol. 32, pp. 1974–1978.

23. HUBMAN, M. R. et al., 1990: Ultraviolet Fluorescence of Human Sera: I. Source of characteristic Differences in the Ultraviolet Fluorescence Spectra of sera from Normal and Cancer-Bearing Humans. In *Clin Chem*, Vol. 36, pp. 1880–1883.

24. MASILAMANI, V. et al., 2003: Diagnosis of cancer from blood by native fluorescence. In *Asian J Phy*, Vol. 12, pp. 125–132.

25. MASILAMANI, V. et al., 2004: Cancer diagnosis by autofluorescence of blood components. In *J of Luminiscence*, Vol. 109, pp. 143–154.

26. AL SALHI, M. et al., 2011: Detection of cancer by optical analysis of body fluids - A single

blind study. In *Technology in Cancer Research and Treatment*, Vol. 10, pp. 145–152.

27. JAFFE, M., 1869: Zur Lehre von den Eigenschaften und der Abstammung der Harnpigmente. In *Virchows Arch f path Anat*, Vol. 47, pp. 405–427.

28. SQUIRES, B. T., JEFFREE J. H., 1928: A simple Ultra-violet Fluorophotometer. In *J Sci Instruments*, Vol. 5, pp. 273–277.

29. RABINOWITZ, H. M., 1949: A Correlation of Fluorescence of Human Urine with Benign and Malignant Growth. In *Cancer Res*, Vol. 9, pp. 672–676

30. RAJASEKARAN, R. et al., 2013: Characterization and diagnosis of cancer by native fluorescence spectroscopy of human urine. In *Photochem Photobiol*, Vol. 89, pp. 483–91.

31. ŠTEFFEKOVÁ, Z. et al., 2014: Early diagnosis of colorectal cancer in rats with dmh induced carcinogenesis by means of urine autofluorescence analysis. In *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 90, pp. 682–685.

32. URBAN, P. et al., 2011: Overview of potential oncomarkers for detection of early stages of ovarian cancer. In *Klinická onkologie*, Vol. 24, pp. 106–111.

33. BIRKOVÁ, A. et al., 2014: Changes in urine autofluorescence in ovarian cancer patients. In *Neoplasma*, Vol. 61, pp. 724–731.

DIAGNOSTIKA DIABETU 1. TYPU S VYUŽITÍM POKROČILÝCH SPEKTROSKOPICKÝCH METOD

ŠŤOVÍČKOVÁ, L.^A, LOGEROVÁ, H.^B, TATARKOVIČ, M.^A
KOCOURKOVÁ, L.^A, VAVŘINEC, J.^C, SETNIČKA, V.^A

^AÚstav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika; Lucie1.Stovickova@vscht.cz

^BÚstav biochemie, buněčné a molekulární biologie, 3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Ruská 87, 100 00 Praha 10, Česká republika

^CKlinika dětí a dorostu, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
Šrobárova 50, 100 34 Praha 10, Česká republika

SOUHRN

Současné diagnostické postupy pro diabetes mellitus 1. typu jsou zaměřeny především na určení koncentrace krevní glukózy a glykovaného hemoglobinu. Z pohledu včasné diagnostiky tohoto závažného autoimunitního onemocnění mají však tyto postupy svá omezení. Diabetes 1. typu se klinicky manifestuje zvýšenou hladinou glukózy a změnami hladin dalších biomarkerů. Již v preklinické fázi onemocnění však dochází ke změnám v prostorovém uspořádání plazmatických proteinů a dalších biomolekul spojených s patogenezí diabetu, které však nejsou klasickými klinickými postupy zaznamatelné. Naproti tomu, pokročilé spektroskopické metody jsou citlivé na prostorové uspořádání chirálních molekul, a jsou tudíž potenciálně schopny tyto strukturní změny identifikovat. Krevní plazma diabetiků a kontrolních jedinců byla analyzována pomocí pokročilých spektroskopických metod (elektronový cirkulární dichroismus a Ramanova optická aktivita) doplněných o konvenční metody molekulové spektroskopie (infračervená a Ramanova spektroskopie). Získaná spekt-

rální data byla chemometricky vyhodnocena vícerozměrnými statistickými metodami se zaměřením na spektrální oblasti odpovídající struktuře a konformaci proteinů a dalších biomolekul krevní plazmy. Dosažené výsledky naznačují, že chiroptická spektroskopie v kombinaci s infračervenou a Ramanovou spektroskopii je schopna zaznamenat patologické změny ve struktuře molekul plazmatických proteinů provázejících diabetes a může tedy být slibným podpůrným nástrojem ke konvenčním diagnostickým postupům.

Klíčová slova: diabetes mellitus 1. typu, chiroptická spektroskopie, krevní plazma, spektrální biomarker, diagnostika

SUMMARY

The current procedures to diagnose type 1 diabetes mellitus are focused mainly on determining levels of blood glucose and glycated hemoglobin. However, these diagnostic tools are limited for the early diagnosis of this severe autoimmune disease. Type 1 diabetes is accompanied not only by the elevated

blood glucose level and changes in other biomarker levels, but also by changes in the spatial arrangement of plasma proteins and other biomolecules that are associated with the pathogenesis of diabetes. These structural changes occur before the disease onset, but unfortunately; the conventional clinical procedures are not able to detect them. In contrast, advanced spectroscopic methods are inherently sensitive to the spatial arrangement of chiral molecules, and thus; potentially able to identify any possible structural changes. Blood plasma from diabetic patients and healthy controls was analyzed by advanced spectroscopic methods (electronic circular dichroism and Raman optical activity). The measurements were supplemented by conventional methods of molecular spectroscopy, i.e. infrared and Raman spectroscopy. The obtained spectral data sets were evaluated by multivariate statistical methods focusing on the spectral ranges that correspond to the structure and conformation of proteins and other plasma biomolecules. The achieved results suggest that chiroptical spectroscopy in combination with infrared and Raman spectroscopies is able to detect the pathological changes in molecular structure that are caused by diabetes, and therefore; may be a promising complement to conventional diagnostic methods.

Key words: type 1 diabetes mellitus, chiroptical spectroscopy, blood plasma, spectral biomarker, diagnostics

ÚVOD

V současnosti je jednou z přijímaných hypotéz patogeneze diabetu mellitu 1. typu (T1DM) teorie, která předpokládá, že b-buňky pankreatu jsou napadeny virem, což vede k produkci odlišných signálních molekul (antigenů) na jejich povrchu. Tyto odlišné antigeny jsou imunitním systémem rozpoznávány jako „cizí“ a dochází k autoimunitní destrukci postiže-

ných b-buněk, což má za následek nedostačnou produkci inzulínu a zvyšování hladiny glukózy v krevním oběhu (hyperglykémie) [1], [2]. Zvýšená glykémie spolu s narušením acidobazické rovnováhy, která je způsobena zvýšenou ketogenezí, je hlavním indikátorem diabetického stavu. V důsledku změněné antigenicity β -buněk dochází u diabetu, stejně jako u dalších onemocnění, ke změnám ve struktuře plazmatických biomolekul. Tyto změny se objevují ještě před propuknutím onemocnění, tedy před tím, než je možné zaznamenat zvýšenou hladinu glukózy v krvi [1], [3]. Detekce těchto časných změn by tedy mohla sloužit jako podpůrný nástroj pro včasnou diagnostiku a léčebný zásah u jedinců s rozvíjejícím se diabetem 1. typu.

Změny ve stereochemii biomolekul však nemohou být jednoduše zaznamenány konvenčními diagnostickými postupy, případně klasickými metodami molekulové spektroskopie. A jelikož jsou mnohé biomolekuly v lidském organismu chirální, přicházejí v tomto případě v úvahu pokročilé spektroskopické metody, jakými je chiroptická spektroskopie.⁴ Jejich principem je interakce kruhově polarizovaného záření s chirálními molekulami, z čehož vyplývá jejich citlivost k trojrozměrné struktuře chirálních molekul.⁴ I přes svou schopnost identifikovat jakékoliv spektrální změny nebyly prozatím chiroptické metody systematicky využity k analýze tělních tekutin (s výjimkou našich předchozích studií) [5], [6], [7], [8], [9], [10].

V této pilotní studii se zabýváme možnostmi využití elektronového cirkulárního dichroismu (ECD) a Ramanovy optické aktivity (ROA) spolu s infračervenou (IČ) a Ramanovou spektroskopií vzorků lidské krevní plazmy pro diagnostiku T1DM. Věříme, že zaměření se na pre-diabetické strukturní změny proteinů, sacharidů a dalších esenciálních biomolekul v krevní plazmě povede k diagnostice dost včasné na to, aby bylo možné u dětí a adolescentů předcházet život ohrožujícím náhlým kolapsům a těžkým komplikacím, které jsou obvykle spjaty s propuknutím T1DM.

MATERIÁL A METODY

Krevní plazma

Do této studie bylo zařazeno 12 pacientů s diabetem 1. typu, kteří byli vybráni na Klinice dětí a dorostu, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV) v Praze. Skupinu kontrolních jedinců tvořilo 8 studentů 1. ročníku 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy (3. LF UK) v Praze. Průměrný věk pacientů a kontrol byl 15,1; resp. 19,7 let. U všech testovaných subjektů byly určeny základní fyziologické a biochemické parametry související s T1DM a zároveň byla provedena elektroforéza plazmatických proteinů (Tab. 1). Vzhledem k tomu, že kontrolní skupina nevykazovala zvýšenou hladinu krevní glukózy, nebyly u ní systematicky určeny hodnoty glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}) ani sérového albuminu (HSA), případně dalších parametrů souvisejících s diabetem.

Na Klinice dětí a dorostu FNKV v Praze bylo každému pacientovi/kontrolnímu jedinci odebráno 9 ml krve do sterilních zkumavek Vacuette® (Greiner Bio-One GmbH, Rakousko) obsahujících antikoagulant K_3EDTA (draselná sůl kyseliny ethylendiammintetraoctové). Vzorky byly poté odstředěny při 1500g a 25 °C po dobu 10 minut na Ústavu biochemie, buněčné a molekulární biologie 3. LF UK v Praze. Získané frakce plazmy byly okamžitě zmrazeny a uchovány při teplotě -75 °C. Před každým měřením byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě a zfiltrány pomocí membránových filtrů s porozitou 0,45 mm (Grace, USA) při 13 000 g a 15 °C po dobu 10 minut.

Tato studie byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací a byla schválena Etickou komisí 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Od všech účastníků studie byl zajištěn písemný informovaný souhlas, u nezletilých potvrzený i souhlasem zákonného zástupce.

Spektroskopické metody

Ramanova spektra a spektra Ramanovy optické aktivity byla naměřena simultánně na spektrometru ChiralRAMAN-2X™ (BioTools Inc., USA), který je vybaven systémem OPUS 2 W/mpc6000 (Laser Quantum, Velká Británie) s excitační vlnovou délkou 532 nm. Zfiltrované vzorky plazmy (100 ml) byly v oblasti 2500–90 cm^{-1} analyzovány v kyvetě o rozměrech 4 × 4 × 10 mm s antireflexní povrchovou úpravou, která byla umístěna do držáku s Peltierovým chlazením pro kontrolu teploty vzorků (15 °C).

Pro záznam spekter ve střední infračervené oblasti (4000–400 cm^{-1}) byl použit IČ spektrometr s Fourierovou transformací Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) vybavený ZnSe krystalem pro techniku zeslabeného úplného odrazu (ATR, Attenuated Total Reflectance). Zfiltrované vzorky plazmy (20 ml) byly měřeny přímo bez další úpravy.

Měření ECD byla prováděna na spektrometru J-815 (Jasco, Japonsko) při teplotě 23 °C (kontrolováno Peltierovým článkem). Pro analýzu v oblasti 185–280 nm byly všechny zfiltrované vzorky naředěny sterilním fosfátovým pufrem (pH = 7,4) v poměru 1 : 3 v/v. Takto zředěné vzorky (25 ml) byly měřeny v křemenné kyvetě s optickou dráhou 0,01 mm (Hellma, Německo).

TAB. 1 PRŮMĚRNÉ HODNOTY VYBRANÝCH FYZIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH PARAMETRŮ PRO PACIENTY S T1DM A KONTROLNÍ JEDINCE

parametr	BMI	glykémie [mmol·l ⁻¹]	HbA _{1c} [mmol·mol ⁻¹]	HSA [%]	α-globuliny [%]
pacienti s T1DM	19,6	10,9–11,9	75,9	52,6	23,5
kontrolní jedinci	22,7	4,0–4,5	neurčeno	55,4	18,8

Před a po spektrálních měřeních byly všechny kvety a ATR krystal vyčištěny roztokem Starna CellClean (Starna Scientific Ltd., Velká Británie), opakovaně propláchnuty demineralizovanou vodou a methanolem a vysušeny.

Statistické vyhodnocení dat

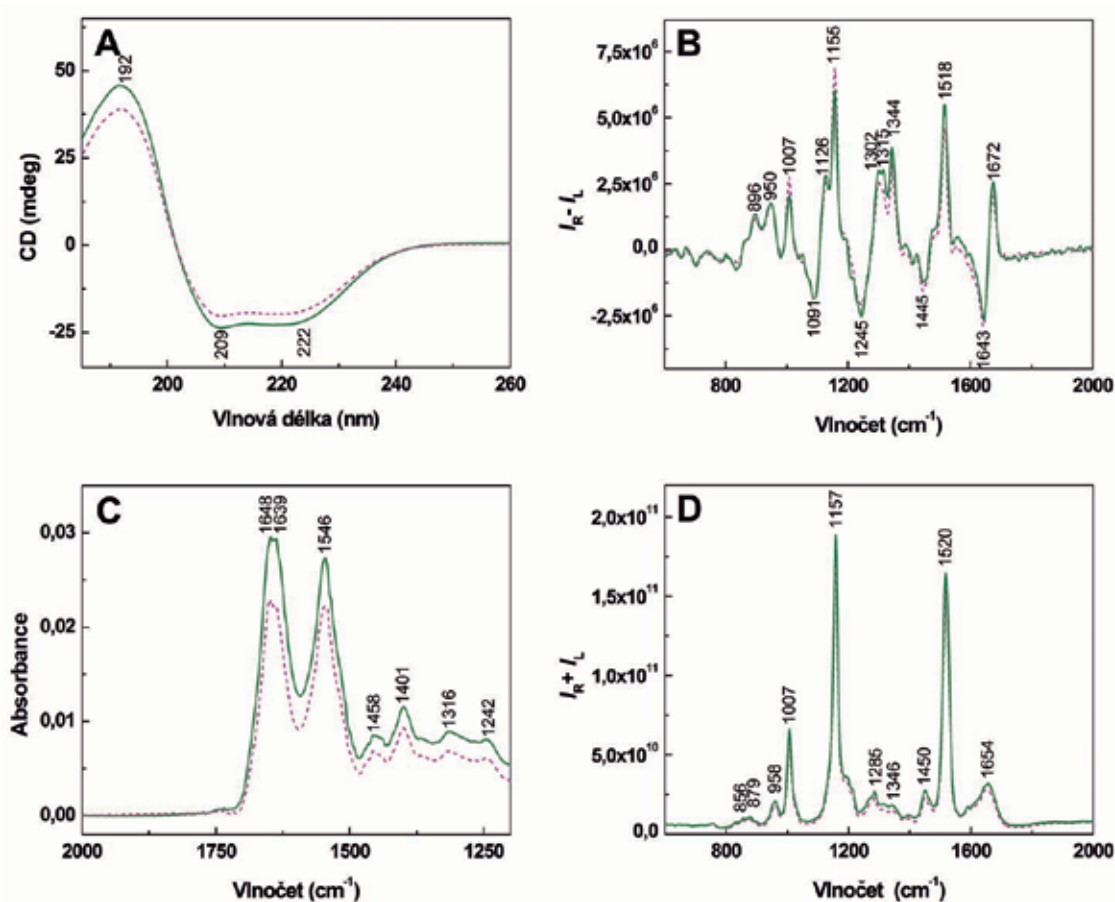
Získaná spektrální data byla vyhodnocena metodou lineární diskriminační analýzy (LDA) [11] v programu XLSTAT (Addinsoft, Francie). Pro vybrané pásy, které mohou nést klíčové informace o molekulární struktuře proteinů a dalších plazmatických biomolekul i jejich možných změnách, byl vytvořen statistický model. Výběr spektrálních pásů byl proveden s využitím korelačních a kovariančních matic. Pro statistický model byla rovněž určena jeho

specifita a senzitivita a pro ověření jeho kvality byla provedena křížová validace [12].

VÝSLEDKY

Elektronový cirkulární dichroismus

Spektra ECD (Obr. 1A) se vyznačují třemi dominantními pásy charakteristickými pro sekundární strukturu proteinů [4], [13]. Spektrální průběh odpovídá proteinům s vysokým obsahem α -helixu [4], [1],4 které jsou v krvi zastoupeny převážně lidským sérovým albuminem. Pozitivní pás 192 nm a dva částečně se překrývající negativní pásy 209 a 222 nm jsou výsledkem elektronových přechodů amidové skupiny peptidové vazby. Intenzita a tvar



Obr. 1. Průměrná spektra ECD (A), ROA (B), IČ (C) a Ramanovy (D) spektroskopie krevní plazmy z názorňující rozdíly mezi pacienty s T1DM (čárkovaná čára) a kontrolními jedinci (plná čára)

těchto pásů se mění v závislosti na geometrii peptidového řetězce [6], [15]. Je patrné, že v případě pacientů s T1DM dochází ke snížení intenzity všech tří výše zmíněných spektrálních pásů, což může mít dvě možné příčiny. Zaprvé, hodnoty celkového proteinu v plazmě se snižují s progresí onemocnění, zatímco proteiny si zachovávají svou nativní chirální strukturu. Nebo zadruhé, albumin jako negativní protein akutní fáze rozvinuje svou strukturu a je štěpen na achirální struktury či méně uspořádané struktury. To vede ke zvýšené produkci pozitivních protizánětlivých proteinů (α_1 - a α_2 -globulinů) s cílem udržet normální hodnoty ostatních plazmatických proteinů, což je v souladu s patofyziologií T1DM [1], [2].

Ramanova optická aktivita

V průměrných spektrech Ramanovy optické aktivity (Obr. 1B) můžeme zaznamenat skupinu pásů proteinů v oblastech amidu I a amidu III, které jsou typické pro proteiny s vysokým obsahem α -helikálních struktur [6], [16]. Ve spektrech vzorků pacientů byla pozorována změna intenzity negativního pásu 1245 cm^{-1} značící vyšší obsah β -struktur [17], což může být vysvětleno větší mírou rozvinutí struktury albuminu a/nebo jeho štěpením v průběhu onemocnění T1DM. Pozitivní pásy 1302 , 1344 cm^{-1} a raménko 1315 cm^{-1} představují proteiny s převažující α -helikální konformací [17]. Změny v intenzitách zmíněných pásů mohou být vysvětleny jako důsledek degradace albuminu na blíže nespecifikované intermediáty, které jsou využity pro syntézu dalších plazmatických proteinů nezbytných pro udržení homeostázy organismu během T1DM [1], [2]. Výrazné pozitivní pásy 1007 , 1155 a 1518 cm^{-1} mohou být přiřazeny karotenoidům, přičemž některé z nich se překrývají s pásy aromatických aminokyselinových zbytků [6].

Infračervená spektroskopie

Na Obr. 1C jsou zobrazena průměrná infračervená spektra se dvěma významnými pásy,

jejich maxima leží okolo 1648 a 1546 cm^{-1} , t. j. v oblastech amidu I, resp. amidu II, které odpovídají vibračním peptidové vazby.¹⁸ V tomto případě mohou oba tyto pásy a jejich relativní intenzity odrážet změny v sekundární struktuře plazmatických proteinů. Ve výsledných IČ spektrech pacientů byl pozorován významný pokles intenzit pásů a zároveň změna poměru intenzit pásů amid I/amid II v porovnání s kontrolními jedinci. Navíc změny ve tvaru pásu amidu I mohou indikovat změny v sekundární struktuře plazmatických proteinů, ke kterým dochází v průběhu T1DM v důsledku degračních procesů. Pokles v intenzitách byl rovněž pozorován pro pásy 1458 a 1401 cm^{-1} , které odpovídají vibračním funkčním skupinám alifatických postranních řetězců.

Ramanova spektroskopie

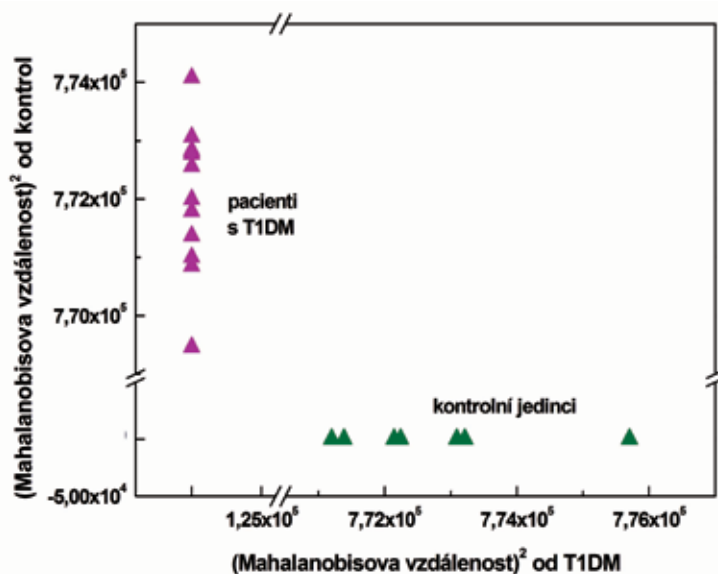
V průměrných Ramanových spektrech pacientů s T1DM a kontrolních jedinců (Obr. 1D) jsou patrné tři intenzivní pásy pocházející především od vibrací karotenoidů (1007 , 1157 a 1520 cm^{-1}), které jsou přítomny v plazmě v nízkých koncentracích. Jejich vysoká intenzita v Ramanově spektru je zapříčiněna rezonančním zesílením po excitaci ve viditelné oblasti (532 nm) [13], [19]. Spektra vykazují změny v intenzitách pásů typických pro proteiny s vysokým obsahem α -helikální struktury, zejména pásy 1654 cm^{-1} v oblasti amidu I a 1285 a 1346 cm^{-1} v oblasti rozšířeného amidu III, odpovídající vibračním peptidové vazby [6], [20]. Méně strukturovaný pás 1654 cm^{-1} a výrazně zvýšená intenzita pásu okolo 1642 cm^{-1} v oblasti amidu I ve spektrech pacientů indikuje změnu obsahu α -helixu, což je konzistentní s degračním sérového albuminu při vývoji T1DM [1], [2]. Sacharidy a lipidy přítomné v krvi jsou zastoupeny pásy 958 , resp. 1450 cm^{-1} [6]. Jejich mírně snížené intenzity pravděpodobně odpovídají narušení metabolismu těchto látek u diabetiků.

Lineární diskriminační analýza

Vzhledem k tomu, že některé spektrální změny mezi pacienty s T1DM a kontrolními jedinci jsou pouhým okem obtížně postřehnutelné, byla získaná spektrální data vyhodnocena vícerozměrnými statistickými metodami. Cílem bylo odlišit pacienty od kontrol na základě spektrálních vzorů (spectral pattern recognition), dále určit senzitivitu a specifitu po-

užitých spektroskopických metod a prokázat spolehlivost matematického modelu.

Výsledkem vyhodnocení bylo zjištění, že jednotlivé spektroskopické metody využitě samostatně nedosahují uspokojivých hodnot senzitivity ani specifity (Tab. 2). Na základě tohoto poznatku a skutečnosti, že vybrané metody poskytují navzájem komplementární informace, byl vytvořen souhrnný matematický model kombinující data ze všech čtyř použitých



Obr. 2 Grafické znázornění výsledku LDA pro kombinaci chiroptických (ECD, ROA) a konvenčních (Raman, IČ) spektroskopických metod v analýze krevní plazmy pacientů s T1DM a kontrolních jedinců

TAB. 2. HODNOTY SENZITIVITY, SPECIFICITY A CELKOVÉ SPRÁVNOSTI MODELU LDA A JEHO KŘÍŽOVÉ VALIDACE PRO DISKRIMINACI VZORKŮ KREVŇÍ PLAZMY PACIENTŮ S T1DM A KONTROLNÍCH JEDINCŮ

metoda	model			křížová validace modelu		
	specifita [%]	senzitivita [%]	správnost [%]	specifita [%]	senzitivita [%]	správnost [%]
ECD	75	92	85	38	75	60
ROA	75	92	85	63	75	70
IČ	88	92	90	88	92	90
Raman	62	83	75	25	58	45
kombinace	100	100	100	100	92	95

metod (Obr. 2). Nyní již byla pozorována úplná separace skupin pacientů s T1DM a kontrolních jedinců, přičemž celková správnost přiřazení jednotlivých vzorků do příslušných skupin činila 100 %. Specificita a senzitivita vytvořeného modelu dosahovaly vysokých hodnot i po provedení křížové validace, a to 100 %, resp. 92 % (Tab. 2).

ZÁVĚR

Na základě analýzy krevní plazmy pomocí ECD a ROA v kombinaci s IČ a Ramanovou spektroskopií byly určeny spektrální oblasti nejvíce ovlivněné T1DM. Podle dosažených výsledků je možné konstatovat, že nejvýznamnější změny mezi pacienty s T1DM a kontrolními jedinci jsou partneré především v oblastech vibrací a elektronových přechodů peptidových vazeb, které odrážejí změny sekundární struktury proteinů v průběhu onemocnění. Následná multivariační analýza spektrálních dat prokázala, že chiroptické metody jsou schopny spolehlivě detekovat komplexní signály plazmatických biomolekul. Navíc, kombinací ROA a ECD s Ramanovou a IČ spektroskopií bylo dosaženo 100% specificity a 92% senzitivity v rozlišení vzorků po křížové validaci. Získané výsledky naznačují, že chiroptická spektroskopie může poskytnout odpovídající doplňující informace k již zavedeným klinickým postupům a může se tak stát užitečným podpůrným nástrojem v klinické diagnostice a screeningu T1DM.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla financována z účelové podpory MŠMT 20/2015 (A1_FCHI_2015_003 a A2_FCHI_2015_001) a Grantovou agenturou České republiky (projekt č. P208/11/0105). Autoři rovněž děkují „Operačnímu programu Praha – konkurenceschopnost“ (CZ.2.16/3.1.00/22197) a „Národnímu programu udržitelnosti“ (NPU I (LO) MŠMT – 34870/2013). Metodologie měření

krevních vzorků a statistického zpracování dat byla vyvinuta za podpory grantu č. NT13259-3 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

LITERATURA

1. LEVY, D., 2011: Type 1 diabetes. Oxford University Press, Oxford, ISBN 978-0-199-55321-1.
2. LEROITH, D. et al., 2004: Diabetes mellitus: A fundamental and clinical text. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, ISBN 978-0-781-74097-5.
3. SCHIPPER, H. M. et al., 2008: Spectroscopy of human plasma for diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. In *Biomarkers Med.*, Vol. 2, No. 3, pp. 229–238.
4. BEROVA, N. et al., 2012: Comprehensive chiroptical spectroscopy. John Wiley & Sons Inc., New Jersey, ISBN 978-1-118-01292-5.
5. TATARKOVIČ, M. et al., 2015: The minimizing of fluorescence background in Raman optical activity and Raman spectra of human blood plasma. In *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 407, No. 5, pp. 1335–1342.
6. SYNYTSYA, A. et al., 2013: Analysis of human blood plasma and hen egg-white by chiroptical spectroscopic methods (ecd, vcd, roa). In *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 405, No. 16, pp. 5441–5453.
7. TATARKOVIČ, M. et al., 2012: Can chiroptical spectroscopy be used for the analysis of blood plasma? In *Chirality*, Vol. 24, No. 11, pp. 951–955.
8. PIECKOVÁ, L. et al., 2014: Metody chiroptické spektroskopie – nástroj v diagnostice degenerativních onemocnění? In *Chem. Listy*, Vol. 108, No. S4, pp. s255–s258.
9. ŠŤOVÍČKOVÁ, L. et al., 2015: Identification of spectral biomarkers for type 1 diabetes mellitus using the combination of chiroptical and vibrational spectroscopy. In *Analyst*, Vol. 140, No. 7, pp. 2266–2272.
10. TATARKOVIČ, M. et al., 2015: The potential of chiroptical and vibrational spectroscopy of blood plasma for the discrimination between colon cancer patients and the control group. In *Analyst*, Vol. 140, No. 7, pp. 2287–2293.

- 11. DUNNE, R. A., 2006:** Linear discriminant analysis. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, ISBN 978-0-470-14815-0.
- 12. SAMMUT, C., Webb, G. I., 2010:** Encyclopedia of machine learning. Springer, New York, ISBN 978-0-387-30768-8.
- 13. PARKER, S. F. et al., 1999:** Raman spectrum of beta-carotene using laser lines from green (514.5 nm) to near-infrared (1064 nm): Implications for the characterization of conjugated polyenes. In *Appl. Spectrosc.*, Vol. 53, No. 1, pp. 86–91.
- 14. HIRST, J. D. et al., 2003:** Electronic circular dichroism of proteins from first-principles calculations. In *J. Phys. Chem. B*, Vol. 107, No. pp. 11813–11819.
- 15. WHITMORE, L., WALLACE B. A., 2008:** Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. In *Biopolymers*, Vol. 89, No. 5, pp. 392–400.
- 16. ZHU, F. et al., 2005:** Raman optical activity: A tool for protein structure analysis. In *Structure*, Vol. 13, No. 10, pp. 1409–1419.
- 17. BARRON, L. D. et al., 2007:** Raman optical activity: An incisive probe of molecular chirality and biomolecular structure. In *J. Mol. Struct.*, Vol. 834-836, No. pp. 7–16.
- 18. DAIDONE, I. et al., 2010:** On the origin of ir spectral changes upon protein folding. In *Chem. Phys. Lett.*, Vol. 488, No. 4–6, pp. 213–218.
- 19. WITHNALL, R. et al., 2003:** Raman spectra of carotenoids in natural products. In *Spectrochim. Acta, Part A*, Vol. 59, No. 10, pp. 2207–2212.
- 20. KINALWA, M. N. et al., 2010:** Accurate determination of protein secondary structure content from Raman and Raman optical activity spectra. In *Anal. Chem.*, Vol. 82, No. 15, pp. 6347–6349.

STANOVENIE OXIDAČNÉHO POŠKODENIA DNA POMOCOU KOMÉTOVEJ METÓDY ZO ZMRAZENEJ KRVI U DETÍ A ADOLESCENTOV TRPIACICH DEPRESÍVNOU PORUCHOU

VAVÁKOVÁ, M.¹, KATRENČÍKOVÁ, B.^{1, 2}, TREBATICKÁ, J.³
ĎURAČKOVÁ, Z.¹, PADUCHOVÁ, Z.^{1*}

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie
Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava

²Katedra biochémie Prírodovedeckej fakulty UK, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava

³Klinika detskej psychiatrie LF UK a DFN, Limbova 1, 833 40 Bratislava

zuzana.paduchova@fmed.uniba.sk

SÚHRN

Vo vzorkách celej krvi uskladnenej pri -80°C po dobu jedného mesiaca pochádzajúcich od detí a adolescentov trpiacich depresívnou poruchou ($n = 17$) a zdravých dobrovoľníkov podobného veku ($n = 20$) sme stanovili oxidačné poškodenie DNA na základe enzymaticky modifikovanej kométovej metódy. Porovnali sme dva spôsoby spracovania krvnej vzorky po rozmrazení (celá krv a izolácia leukocytov) a dva spôsoby vyhodnocovania výsledkov (vizuálne a počítačový softvér). Paradoxne sme detegovali signifikantné zníženie oxidačného poškodenia DNA u pacientov v porovnaní s kontrolnou skupinou pri oboch metódach spracovania vzoriek. Nepreukázali sme však rozdielnú citlivosť leukocytov na exogénne oxidačné poškodenie peroxidom vodíka ani v skupine pacientov s depresívnou poruchou a ani u kontrolnej skupiny.

Kľúčové slová: depresívna porucha, oxidačné poškodenie DNA, kométovej metódy, skladovanie krvi

SUMMARY

Samples of whole blood stored at -80°C for one month from children and adolescent with major depression ($n = 17$) and healthy volunteers with similar age ($n = 20$) was analyzed by enzymatically modified comet assay to determine oxidative DNA damage. We compared two methods of sample processing after thawing (whole blood and isolation of leukocytes) and two methods of scoring samples (visual and computer software scoring). We found paradoxically significantly decreased oxidatively damaged DNA in patient in comparison to control group according to both methods of sample preparation. We didn't find any difference in sensitivity of leukocytes to H_2O_2 -induced DNA damage neither in patients suffering from depression nor in control group.

Key words: major depression, oxidatively damaged DNA, comet assay, blood storage

ÚVOD

Depresívna porucha je štvrté najčastejšie sa vyskytujúce ochorenie spomedzi celosvetovo najviac zastúpených ochorení [1]. Ide o multifaktoriálne ochorenie, do ktorého sú zapojené nielen faktory prostredia, ale aj genetické, psychologické a biologické faktory [2], [3], [4]. Patofyziológia depresívnej poruchy sa spája so zápalovými procesmi v organizme, zvýšeným oxidačným stresom, zvýšenou aktivitou prooxidačných enzýmov, zníženou koncentráciou antioxidantov, neurodegeneráciou, poruchami mitochondrií, hypotalamo-hypofýzo-adrenálnej osi a poruchami v metabolizme neurotransmiterov, ako napr. serotonínu a dopamínu [5], [6], [7], [8].

Oxidačný stres a zápalové procesy v organizme majú za následok zvýšené poškodenie DNA [9]. 8-oxo-7,8-dihydroguanín (8-oxoG) vzniká v dôsledku poškodenia guanínu hydroxilovým radikálom. Mutácia je následne v organizme rozpoznávaná 8-oxoguanín DNA glykozilázou 1 (OGG1), ktorá je súčasťou enzýmov bázovej excíznej opravy (BER) [10].

Poškodenie DNA je možné stanoviť pomocou kométovej metódy (gélová elektroforéza jednej bunky), ktorá deteguje vláknové zlomy DNA v eukaryotických bunkách [11], [12]. Enzymovo modifikovaná kométovej metóda slúži na zvýšenie senzitivity a špecificity pre konkrétne typy mutácií v závislosti od použitého enzýmu, na základe čoho je možné detegovať oxidačné poškodenie pyrimidínových báz a dimérov, purínových báz alebo alkylačného poškodenia DNA [12], [13]. Najčastejšie používanými enzýmami sú bakteriálna formamidopyrimidín DNA glykozyláza (FPG), endokukleáza III (ENDOIII) a ľudská OGG1. FPG a ENDOIII však nie sú špecifické výhradne na 8-oxoG mutáciu, ale aj na alkylačné poškodenie, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidín či 4,6-diamino-5-formamidopyrimidín [14], [15].

Kométovej metódu je možné využiť pre potreby biomonitingu, nutričných štúdií, pre stanovenie genotoxicity alebo reparačnej

schopnosti DNA [12], [13]. Ako biologický materiál je možné využiť krvné bunky (lymfocyty, bunky periférnej krvi s jedným jadrom), alebo tkanivá, ktoré je možné homogenizovať na jednotlivé bunky [12].

Okamžité spracovanie vzoriek však často nie je výhodné z časových, kapacitných či finančných dôvodov, obzvlášť v prípade dlhodobých klinických štúdií či biomonitingu v terénnych podmienkach. Vzorky celej krvi je však možné skladovať pri -20°C alebo -80°C s pridaním kryoprotektívnej látky alebo bez nej. Po pridaní kryoprotektívnej látky je možné skladovať aj vyizolované lymfocyty a časti tkanív pri -80°C alebo v tekutom dusíku [12], [13].

Najrýchlejším spôsobom uskladnenia vzoriek pre potreby kométovej metódy je skladovanie zmrazenej celej krvi v malých alikvótach. Pri štandardnom postupe izolácie lymfocytov z čerstvej krvi je potrebné odobrať väčšie množstvo krvi (9–10 ml), pričom pri klinických štúdiách je zabezpečenie takého objemu krvi nemožné. Naopak, zmrazenie celej krvi v malých objemoch je výhodné, avšak suspenzia predstavuje heterogénnu zmes leukocytov (lymfocyty, neutrofilny a monocyty) [12], [13], [16].

Malé alikvóty celej krvi (250 μl) je možné skladovať aj bez pridaní kryoprotektívnej látky bez nárastu poškodenia DNA oproti čerstvo spracovanej krvi minimálne po dobu jedného mesiaca. Pri väčších alikvótach (5 ml) a vyššej teplote skladovania (4°C) však už poškodenie DNA narastá. Malé alikvóty zrejme dovoľujú rýchle zmrazenie vzorky bez formovania kryštálov, ktoré môžu exogénne poškodzovať DNA [13]. Ošetrovanie buniek peroxidom vodíka pre stanovenie citlivosti buniek voči oxidačnému exogénnemu poškodeniu je však u zmrazených vzoriek celej krvi neúčinný, pravdepodobne kvôli prítomnosti katalázy v erytrocytoch, ktorá H_2O_2 rýchlo degraduje [13], [17], [18].

Vyizolovanie leukocytov zo zmrazenej celej krvi je možné po jej rozmrazení pomocou premývania vo fosfátovom tlmivom roztoku (PBS) pri nízkych otáčkach (7 min, 700 g, 4°C). Takto opracované krvné bunky sú napriek vyššiemu

bazálnemu poškodeniu DNA citlivé na peroxid vodíka, pravdepodobne v dôsledku odstránenia erytrocytov a teda aj katalázy [13], [19].

Malé alikvóty celej krvi skladovanej pri -80°C s pridaním kryoprotektívnych látok po dobu 4 mesiacov preukazujú $>85\%$ životaschopnosť, pričom u nich nie je zaznamenaný výrazný nárast poškodenia DNA [20]. Znovuzmrazovanie vzoriek sa však kvôli zvýšenému mechanickému poškodeniu DNA neodporúča [21]. Na druhej strane, lymfocyty skladované pri -80°C po dobu viac ako troch týždňov strácajú schopnosť opravy vláknových zlomov DNA. Obnovenie reparačnej aktivity je možné pomocou pridanej ATP do vzorky po jej rozmrazení, čím sa umožní nukleotidová bázová oprava DNA [22].

Porovnanie poškodenia DNA na základe kométovej metódy však sťažuje nielen výber materiálu a jeho spracovania, ale aj rozdiely v podmienkach metódy v rámci rôznych laboratórií, ako napríklad rôzna hustota agarózového gélu, hodnota elektrického napätia na centimeter elektroforetického tanku, či odlišné spôsoby značenia DNA a vyhodnocovania vzoriek [12], [23].

Cieľom našej práce bolo zistiť, či majú deti a adolescenti trpiaci depresívnou poruchou vyššie oxidačné poškodenie DNA ako zdravé kontroly v podobnom veku. Ďalej sme študovali schopnosť buniek (leucyotov, lymfocytov) odolávať voči poškodeniu vyvolanému peroxidom vodíka, teda ich citlivosť voči exogénnemu oxidačnému poškodeniu. Hľadali sme aj koreláciu medzi rôznymi spôsobmi spracovania a vyhodnocovania vzoriek.

MATERIÁL A METÓDY

Celú krv sme odoberali do odberových skúmaviek typu vacutainer s obsahom EDTA od 17 pacientov trpiacich depresívnou poruchou a/alebo úzkostnými poruchami (F32.0, F32.1, F41.0, F41.2) vo veku $15 \pm 1,74$ (M/Ž = 2/14), ktorí užívali SSRI antidepressíva (antidepressíva

na báze inhibície spätného vychytávania serotonínu). Kontrolnú skupinu tvorilo 20 zdravých dobrovoľníkov z pediatrického centra Juvenalia s. r. o, Dunajská Streda, s priemerným vekom $14,3 \pm 2,57$ (M/Ž = 8/12).

Celú krv sme uskladnili v objeme 200 μl pri -80°C po dobu jedného mesiaca (3–5 týždňov) bez pridanej kryoprotektívnych látok. Po uplynutí stanovenej doby skladovania sme zmrazené vzorky spracovali pomocou enzýmovo modifikovanej kométovej metódy v alkalickvej verzii ($\text{pH} > 13$) podľa postupu Al-Salmani et al. [17], kde sme 15 μl celej krvi zmiešali so 600 μl 0,75 % LMP agarózy a podľa postupu Akor-Dewu et al. [19], kde sme 100 μl celej krvi zmiešanej s 1 ml PBS dvakrát centrifugovali pri nízkych otáčkach (500 g, 4°C). Pelet sme rozsuspendovali v 0,5 ml PBS a následne sme 120 μl suspenzie zmiešali s 560 μl 0,75 % LMP. Zmes agarózy a krvných buniek sme u oboch postupov naniesli na tri podložné sklíčka potiahnuté 1 % NMP agarózou. Každú vzorku sme inkubovali pri troch rôznych podmienkach:

I. s FPG enzýmom na stanovenie oxidačného poškodenia DNA (E) (30 min, 37°C),

II. s FPG pufrom na stanovenie bazálneho poškodenia (K) (30 min, 37°C),

III. s peroxidom vodíka na stanovenie citlivosti DNA voči jeho poškodeniu (P) (100 μM H_2O_2 , 5 min, 4°C). Poškodenie DNA bolo stanovené na základe migrácie DNA v alkalickom elektroforetickom roztoku po predchádzajúcej lýze bunkových membrán. Po lytickej fáze (> 1 hod, 4°C) nasledovala neutralizácia vzoriek E a K v FPG pufri (15 min, 4°C) a inkubácia pri 37°C (30 min). Ďalším krokom bolo odvíjanie DNA v elektroforetickom roztoku u všetkých vzoriek (20 min, 4°C) a elektroforéza (20 min, 4°C , 0,75 V/cm). Všetky vzorky boli nakoniec dvakrát premyté v 0,4 M TrisHCl (5 min, 4°C) a raz v destilovanej vode (6 min, 4°C). DNA sme vizualizovali pomocou interkalačného farbiva 4,6-diamidino-2-fenylindolu (DAPI) a analyzovali mikroskopom OLYMPUS BX41.

Každú vzorku sme vyhodnotili 2 spôsobmi. Najprv vizuálne (VH), na základe zaradenia po-

škodených buniek ($n = 100$) do piatich kategórií (0–4) a následne výpočtom podľa modifikovanej kalibračnej krivky podľa ESCODD [24]. Výsledky pre oxidačné poškodenie DNA udávame ako 8-oxoG/10⁶G a poškodenie vyvolané H₂O₂ udávame ako arbitrárne jednotky (AU = 0–400). Druhý spôsob vyhodnotenia predstavovalo hodnotenie pomocou softvéru LUCIA comet assay (verzia 7.0) (SH) a výsledky udávame ako medián % DNA v chvoste pre oxidačné poškodenie DNA aj pre H₂O₂-vyvolané zlomy v DNA ($n = 50$).

V prípade normálne rozdelených dát udávame výsledky ako priemerné hodnoty \pm SD. U nenormálne rozdelených dát udávame výsledky ako medián (prvý a tretí kvartil). Pri normálne rozdelených údajoch sme použili nepárový t-test, v prípade dát nenormálne rozdelených Mann-Whitneyho test. Ako štatisticky významné udávame hodnoty $p < 0,05$. Pri porovnaní metód vyhodnocovania vzoriek (VH a SH) udávame hodnoty Spearmanovho korelačného koeficientu (ρ) a jeho významnosť (p). Na vyhodnotenie výsledkov sme použili štatistický program StatsDirect 2.3.7. (StatsDirect Sales, Sale, Cheshire M33 3UY, UK).

VÝSLEDKY

V tabuľke 1 sú uvedené parametre oxidačného poškodenia DNA a maximálneho poškodenia vplyvom peroxidu vodíka stanovené na základe metódy Al-Salmani et al. [17]. Pri spracovaní celej zmrazenej krvi sme zistili štatisticky významne zvýšené oxidačné poškodenie DNA u kontrolnej skupiny v porovnaní s pacientmi trpiacimi depresívnou poruchou pri oboch spôsoboch vyhodnocovania (vizuálne aj softvérové). V prípade ošetrenia vzoriek peroxidom vodíka sme nezistili signifikantný rozdiel v reparačnej, resp. ochrannej funkcii krvi u pacientov v porovnaní s kontrolou. Tento negatívny výsledok bol spôsobený nízkym účinkom H₂O₂ na poškodenie DNA leukocytov,

vďaka možnému pôsobeniu katalázy, čo predpokladal aj Al-Salmani et al. [17].

Oxidačné poškodenie leukocytov stanovené na základe metódy Akor-Dewu et al. [19] je uvedené v tabuľke 2. Štatisticky významné zvýšenie oxidačného poškodenia DNA (8-oxoG/10⁶G) sme zistili u kontrolnej skupine pri vizuálnom hodnotení, pričom opačný trend sme zaznamenali pri vyhodnocovaní pomocou počítačového softvéru, avšak tento rozdiel nebol štatisticky významný. V prípade poškodenia vyvolaného H₂O₂ sme obdobne ako v prípade metódy Al-Salmani et al. [17] nezaznamenali štatisticky významný rozdiel medzi skupinami.

Pri porovnaní vizuálneho a softvérového vyhodnotenia oxidačného poškodenia DNA leukocytov podľa metódy Al-Salmani et al. [17] sme dokázali pozitívnu koreláciu v skupine depresívnych pacientov ($p = 0,0411$; $\rho = 0,449$) ako aj u zdravých detí ($p = 0,004$; $\rho = 0,582$) (8-oxoG/10⁶G vs. % DNA v chvoste). Pozitívnu koreláciu sme našli aj po pôsobení H₂O₂ u kontrol ($p = 0,0122$; $\rho = 0,517$), pričom v skupine pacientov s depresívnou poruchou sme ju nezistili ($p = 0,210$; $\rho = 0,207$). Obdobne sme zistili pozitívnu koreláciu v prípade bazálneho poškodenia DNA (K) v skupine detí s depresívnou poruchou ($p < 0,0001$; $\rho = 0,862$), avšak koreláciu sme nenašli pri maximálnom poškodení DNA H₂O₂ (P) ($p = 0,415$; $\rho = 0,056$). V prípade kontrolnej skupiny sme zistili pozitívnu koreláciu medzi hodnotami bazálneho poškodenia (K) ($p < 0,0001$; $\rho = 0,821$), aj pri maximálnom poškodení DNA H₂O₂ (P) ($p = 0,017$; $\rho = 0,479$).

Spearmanova korelácia poukázala na signifikantnú koreláciu v prípade oxidačného poškodenia DNA leukocytov podľa metódy Akor-Dewu et al. [19] pri rôznych spôsoboch vyhodnocovania vzoriek u kontrol ($p = 0,045$; $\rho = 0,4$), avšak nie u pacientov ($p = 0,446$; $\rho = 0,037$). Opačný efekt sme však zaznamenali v prípade opracovania vzoriek H₂O₂, pri ktorom sme detegovali pozitívnu koreláciu v skupine depresívnych detí ($p = 0,032$; $\rho = 0,507$), ale nie u kontrol ($p = 0,199$; $\rho = 0,204$). Na druhej

TAB.1. OXIDAČNÉ POŠKODENIE DNA A CELKOVÉ POŠKODENIE DNA

vyvolané peroxidom vodíka spracované podľa Al-Salmani et al. [17] a vyhodnotené na základe modifikovanej kalibračnej krivky resp. vyjadrené ako arbitrárne jednotky (AU) (VH – vizuálne hodnotenie) [24] a na základe počítačového softvéru (SH – softvérové hodnotenie)

Al-Salmani et al. [17]	Pacienti		Kontroly	
	medián (Q1; Q3)	n	medián (Q1; Q3)	n
Endogénne oxid. poškodenie DNA (8-oxoG/10 ⁶ G) ^{VH}	0,128 (0,035; 0,175)	17	0,344 (0,201; 0,482) *	20
Oxidačné poškodenie DNA (%DNA v chvoste) ^{SH}	0,195 (0,03; 0,5)	16	0,540 (0,328; 1,305) *	20
H ₂ O ₂ vyvolané zlomy DNA (AU) ^{VH}	51 (16; 58)	17	28 (18,5; 41,5)	20
H ₂ O ₂ vyvolané zlomy DNA (% DNA v chvoste) ^{SH}	0,220 (0,170; 0,46)	17	0,605 (0,258; 1,023)	20

Hodnoty sú udávané ako medián (1. kvartil; 3. kvartil), n – počet vyhodnotených vzoriek

* – štatisticky významný rozdiel medzi pacientmi a kontrolami p < 0,05

TAB. 2. OXIDAČNÉ POŠKODENIE DNA A CELKOVÉ POŠKODENIE DNA VYVOLANÉ PEROXIDOM VODÍKA

spracované podľa metódy Akor-Dewu et al. [19] a vyhodnotené na základe modifikovanej kalibračnej krivky resp. ako arbitrárne jednotky (AU) (VH – vizuálne hodnotenie) [24] a na základe počítačového softvéru (SH – softvérové hodnotenie)

Akor-Dewu et al. [19]	Pacienti		Kontroly	
	Priemer ± SD Medián (Q1; Q3)	n	Priemer ± SD Medián (Q1; Q3)	n
Endogénne oxid. poškodenie DNA (8-oxoG/10 ⁶ G) ^{VH}	0,267 ± 0,283	14	0,545 ± 0,336*	20
Oxidačné poškodenie DNA (% DNA v chvoste) ^{SH}	4,230 (2,410; 9,290)	14	3,940 (1,425; 5,590)	19
H ₂ O ₂ vyvolané zlomy DNA (AU) ^{VH}	133,5 ± 55,31	14	155,45 ± 21,14	20
H ₂ O ₂ vyvolané zlomy DNA (% DNA v chvoste) ^{SH}	32,763 ± 23,503	14	25,001 ± 21,135	19

Hodnoty sú udávané v prípade normálne rozdelených dát ako priemer ± SD, v prípade nenormálne rozdelených dát ako medián (1. kvartil; 3. kvartil), n – počet vyhodnotených vzoriek,

* – štatisticky významný rozdiel medzi pacientmi a kontrolami p < 0,05

strane, porovnaním VH a SH u pacientov s depresívnou poruchou sme preukázali pozitívnu koreláciu pri bazálnom poškodení DNA (K) ($p=0,002$; $\rho=0,719$), ale žiadnu koreláciu pre poškodenie DNA peroxidom (P) ($p=0,1136$; $\rho=0,343$) obdobne ako pri metóde Al-Salmani et al. [17]. U kontrolnej skupiny sme zaznamenali pozitívne korelácie v prípade bazálneho poškodenia (K) ($p<0,0001$; $\rho=0,908$) ako aj pri peroxide vodíka (P) ($p<0,0001$; $\rho=0,820$).

ZÁVER

Czarny et al. [25] detegoval v skupine pacientov trpiacich depresívnou poruchou zvýšené oxidačné poškodenie DNA stanovené pomocou kométovej metódy na základe pôsobenia ľudského OGG1 v porovnaní so zdravými dobrovoľníkmi v čerstvo spracovanej krvi. My sme však detegovali opačný trend v zmrazenej krvi pochádzajúcej od zdravých dobrovoľníkov a depresívnych pacientov pri oboch spôsoboch spracovania zmrazenej krvi. Jedným z možným vysvetlení je buď veľkosť súboru pacientov, alebo s rôznou formou a závažnosťou depresívnej poruchy. Taktiež je tu aj možnosť, ktorú u zmrazených vzoriek predpokladal Risom a Knudsen [26], že bunky s najslabšou reparačnou schopnosťou nie sú ďalej životaschopné po zmrazení a/alebo rozmrazení. Z toho dôvodu sa teda v zmrazených vzorkách selektujú bunky s najsilnejším reparačným systémom a teda aj relatívne menším poškodením DNA. V prípade pacientov s depresívnou poruchou môže v dôsledku zvýšeného oxidačného stresu dochádzať k zvýšeniu adaptačných mechanizmov na oxidačné poškodenie [27]. Taktiež užívanie antidepressív, obzvlášť pri dlhšej administrácii, má antioxidantný efekt [28].

Naše výsledky potvrdili neúčinnosť H_2O_2 na tvorbu exogénneho oxidačného poškodenia zmrazenej celej krvi, obdobne ako zaznamenali predchádzajúce výskumy [17], [18]. Pri vyzolovaní leukocytov pomocou premývania

v PBS sme pozorovali vyššie poškodenie vyvolané H_2O_2 , obdobne ako to zaznamenal Akor-Dewu et al. [19]. Citlivosť buniek na H_2O_2 sa nelíšila v rámci skupín ani v prípade použitia metódy spracovania zmrazenej krvi podľa Al-Salmani et al. [17] ani metódy podľa Akor-Dewu et al. [19]. Rovnaký výsledok však zaznamenal aj Czarny et al. [25] v čerstvej krvi pochádzajúcej od pacientov a zdravých dobrovoľníkov.

Vyhodnocovanie vzoriek za pomoci vizuálneho hodnotenia a počítačového softvéru v prípade spracovania vzoriek podľa Al-Salmani et al. [17] vo väčšine prípadov navzájom pozitívne koreluje. Avšak v prípade spracovania vzoriek podľa metódy Akor-Dewu et al. [19] sme zaznamenali pozitívnu koreláciu len pre 50 % údajov. Naše výsledky vizuálneho vyhodnotenia vzoriek predprepočtom na 8-oxoG/10⁶G sú v zhode s Collins et al. [29], ktorý pozoroval dobrú, aj keď nie úplne lineárnu koreláciu medzi vizuálnym a počítačom sprostredkovaným vyhodnocovaním, pričom najväčšie odchýlky boli pozorované v prípade najvyšších a najnižších hodnôt. Nami pozorovaný rozdiel by mohlo znížiť vytvorenie vlastnej kalibračnej krivky vytvorenej na základe poškodenia buniek v závislosti od dávky ionizačného žiarenia [11].

Naše výsledky paradoxne poukazujú na znížené oxidačné poškodenie DNA u detí a adolescentov trpiacich depresívnou poruchou a na nezmenenú citlivosť buniek na exogénne vplyvy (peroxid vodíka) v porovnaní so zdravými dobrovoľníkmi. Môže to byť spôsobené malým súborom dát alebo spôsobom spracovania a skladovania vzoriek pre kométovej metódu (zmrazovanie celej krvi).

Pre potreby detekcie oxidačného poškodenia DNA odporúčame využitie metódy spracovania skladovaných vzoriek podľa Al-Salmani et al. [17] z dôvodu nižšieho bazálneho poškodenia (K). V prípade stanovovania citlivosti buniek na exogénne vplyvy je vzhľadom na naše výsledky vhodnejšie využitie metódy izolácie leukocytov podľa Akor-Dewu et al. [19]. Vizuálny spôsob vyhodnocovania výsledkov a softvérové

hodnotenie sú rovnocenné, obzvlášť v prípade nízkych poškodení DNA. Tejto problematike sa budeme naďalej venovať.

POĎAKOVANIE

Podakovanie patrí lekárom a sestričkám z Kliniky detskej psychiatrie LF UK a DFN, Bratislava, tak isto ako lekárom a sestričkám Pediatrického centra Juvenalia s.r.o., Dunajská Streda a v neposlednom rade laborantkám Ústavu lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK, Bratislava.

Práca bola finančne podporovaná grantom VEGA 1/0703/13 Depomega.

% podiel: Vaváková, M. (50%), Katrenčíková, B. (5%), Trebatická, J. (10%), Ďuračková, Z. (5%), Paduchová, Z. (30%)*

LITERATÚRA

1. MATHERS, C.D. a LONCAR, D., 2006: Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. In *PLoS Med.*, Vol. 3, No. 11, pp. e442.

2. TALATI, A., WEISSMAN, M.M. a HAMILTON, S.P., 2013: Using the high-risk family design to identify biomarkers for major depression. In *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, Vol. 368, No. 1615, pp. 1–10.

3. ZISOOK, S. et al., 2004: Factors that differentiate early vs. later onset of major depression disorder. In *Psychiatry Res.*, Vol. 129, No. 2, pp. 127–40.

4. BIEDERMAN, J. et al., 1995: Psychiatric comorbidity among referred juveniles with major depression: fact or artifact? In *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, Vol. 34, No. 5, pp. 579–90.

5. LOPRESTI, A.L., HOOD, S.D., DRUMMOND, P.D., 2013: A review of lifestyle factors that contribute to important pathways associated with major depression: diet, sleep and exercise. In *J. Affect Disord.*, Vol. 148, No. 1, pp. 12–27.

6. LEONARD, B., MAES, M., 2012: Mechanistic explanations how cell-mediated immune

activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. In *Neurosci Biobehav Rev.*, Vol. 36, No. 2, pp. 764–785.

7. SCAPAGNINI, G. et al., 2012: Antioxidants as antidepressants: fact or fiction? In *CNS Drugs.*, Vol. 26, No. 6, pp. 477–490.

8. HERKEN, H. et al., 2007: Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. In *Arch. Med. Res.*, Vol. 38, No. 2, pp. 247–252.

9. RYBKA, J. et al., 2013: Interplay between the pro-oxidant and antioxidant systems and pro-inflammatory cytokine levels, in relation to iron metabolism and the erythron in depression. In *Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 63, pp. 187–194.

10. BA, X. et al., 2014: The role of 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 in inflammation. In *Int. J. Mol. Sci.*, Vol. 15, No. 9, pp. 16975–97.

11. FORCHHAMMER, L. et al., 2010: Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial. In *Mutagenesis.*, Vol. 25, No. 2, pp. 113–123.

12. COLLINS, A.R., 2004: The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. In *Mol. Biotechnol.*, Vol. 26, No. 3, pp. 249–261.

13. COLLINS, A. et al., 2013: The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. In *Mutat Res. Rev. Mutat Res.*, Vol. 759, pp. 27–39.

14. SMITH, C.C. et al., 2006: hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. In *Mutagenesis.*, Vol. 21, No. 3, pp. 185–190.

15. KARAKAYA, A. et al., 1997: Kinetics of excision of purine lesions from DNA by *Escherichia coli* Fpg protein. In *Nucleic Acids Res.*, Vol. 25, No. 3, pp. 474–479.

16. MÖLLER, P., 2006: Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. In *Mutat Res.*, Vol. 612, No. 2, pp. 84–104.

- 17. AL-SALMANI, K. et al., 2011:** Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. In *Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 51, No. 3, pp. 719–725.
- 18. CHUANG, C. H., HU, M. L., 2004:** Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay *in vivo* and white blood cells for *in vitro* assay. In *Mutat Res.*, Vol. 564, No. 1, pp. 75–82.
- 19. AKOR-DEWU, MB. et al., 2014:** Leucocytes isolated from simply frozen whole blood can be used in human biomonitoring for DNA damage measurement with the comet assay. In *Cell Biochem. Funct.*, Vol. 32, No. 3, pp. 299–302.
- 20. HININGER, I. et al., 2004:** Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. In *Mutat Res.*, Vol. 558, No. 1–2, pp. 75–80.
- 21. AZQUETA, A. et al., 2013:** Measurement of DNA base and nucleotide excision repair activities in mammalian cells and tissues using the comet assay--a methodological overview. In *DNA Repair (Amst.)*, Vol. 12, No. 11, pp. 1007–1010.
- 22. LANGIE, S. A. et al., 2006:** Development and validation of a modified comet assay to phenotypically assess nucleotide excision repair. In *Mutagenesis*, Vol. 21, No. 2, pp. 153–158.
- 23. FORCHHAMMER, L. et al., 2012:** Inter-laboratory variation in DNA damage using a standard comet assay protocol. In *Mutagenesis*, vol. 27, no. 6, pp. 665–672.
- 24. GEDIK, C. M., COLLINS A., ESCOD, D., 2005:** Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. In *FASEB J.*, Vol. 19, No. 1, pp. 82–4.
- 25. CZARNY, P. et al., 2015:** Elevated level of DNA damage and impaired repair of oxidative DNA damage in patients with recurrent depressive disorder. In *Med. Sci. Monit.*, Vol. 21, pp. 412–418.
- 26. RISOM, L. a KNUDSEN, L. E., 1999:** Use of cryopreserved peripheral mononuclear blood cells in biomonitoring. In *Mutat. Res.*, Vol. 440, No. 2, pp. 131–138.
- 27. BLOOMER, R. J. a GOLDFARD, A. H., 2004:** Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. In *Can. J. Appl. Physiol.*, Vol. 29, No. 3, pp. 245–263.
- 28. BEHR, G. A., MOREIRA, J. C. a FREY, B. N., 2012:** Preclinical and clinical evidence of antioxidant effects of antidepressant agents: implications for the pathophysiology of major depressive disorder. In *Oxid Med. Cell Longev.*, doi: 10.1155/2012/609421.
- 29. COLLINS, A. et al., 1997:** Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. In *Environ. Mol. Mutagen.*, Vol. 30, No. 2, pp. 139–146.

ÚČINOK HUMÍNOVÝCH KYSELÍN NA ANTIOXIDAČNÝ STATUS V MITOCHONDRIÁCH SRDCA A V PLAZME POTKANOV POČAS CHRONICKEJ INTOXIKÁCIE OLOVOM

ŽATKO, D.¹, VAŠKOVÁ, J.¹, KREMPASKÁ, K.¹
MAJOR, P.², VAŠKO, L.¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta
Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach
Trieda SNP 1, 040 11, Košice; daniel.zatko@student.upjs.sk
²Klinika vtákov, exotických a voľne žijúcich zvierat
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Komenského 73, 040 81 Košice

SÚHRN

V našej práci sme sledovali vplyv prídavku humínových kyselín do krmiva na aktivitu antioxidačne pôsobiacich enzýmov a na hladinu redukovaného glutatiónu v plazme a v mitochondriách srdca potkanov súčasne chronicky intoxikovaných olovom. Z našich výsledkov vyplýva, že humínové kyseliny a olovo majú rozdielny vplyv na aktivity jednotlivých antioxidačných enzýmov resp. glutatiónu v srdcových bunkách a v plazme, avšak schopnosť humínových kyselín v aplikovanej dávke ovplyvniť či zvrátiť pôsobenie olova na tieto antioxidanty je len mierny, pričom v dlhšom časovom horizonte sa v podstate stráca.

Kľúčové slová: humínové kyseliny, olovo, antioxidačné enzýmy, glutatión, potkan

SUMMARY

We have concerned in our work to follow up the effect of humic acid (HA) supplementation and lead(II) acetate intoxication alone

and together on the changes of the activities of antioxidant enzymes and the level of reduced glutathione in mitochondria isolated from heart and in the plasma of Sprague — Dawley rat males. Our results point to the different effects of HA and Pb on the monitored parameters in the plasma and in the mitochondria, and to relatively low ability of HA in dose applied to affect or reverse the influence of lead on these antioxidants, even decaying after time.

Key words: humic acids, lead, antioxidant enzymes, glutathione, rat

ÚVOD

Toxicita olova a jeho zlúčenín je všeobecne známa. Spôsobuje anémiu tým, že inhibuje syntézu porfyrínov, má neurotoxické účinky, najmä na mladý organizmus, narúša štruktúru bunkových membrán a DNA [1], [2]. Okrem toho sa podieľa na vzniku oxidačného stresu v bunkách, avšak skôr nepriamo, tým, že ovplyvňuje aktivity antioxidačných enzýmov a hladinu glutatiónu (GSH), ktorý sa podieľa na jeho eliminácii [3]. Prídavok octanu olovna-

tého ku plazme spôsobuje jednoznačný rapidný pokles hladiny GSH *in vitro* [4], *in vivo* bol rovnako pozorovaný pokles hladiny GSH ako dôsledok chronickej intoxikácie [3], [4], [5]. V literatúre bol rovnako popísaný aj značný pokles aktivity selenoenzýmu glutatiónperoxidáza (GPx), najmä po chronickom pôsobení olova [6]. Olovnatý kation má schopnosť substituovať vápenaté a zinočnaté kationy z aktívnych miest enzýmov, a tak ovplyvňovať ich aktivity, napr. aj niektoré z izoforiem enzýmu superoxidizmutázy (Cu/Zn-SOD) [4].

Výskumy potvrdzujú, že podávanie exogénnych antioxidantov môže pomôcť organizmu znížiť či eliminovať nepriaznivé dôsledky intoxikácie olovom v rôznych orgánoch potkanov. [4], [7]. Humínové kyseliny sú látky prírodného pôvodu, ktoré vykazujú zaujímavé detoxikačné a antioxidačné vlastnosti, popísané *in vitro* aj *in vivo*, ktoré spočívajú jednak v ich schopnosti interagovať s reaktívnymi formami kyslíka a dusíka a jednak v schopnosti chelatovať kationy kovov, ktoré sa podieľajú na vzniku týchto škodlivých častíc [8]. Je preto predpoklad, že prídavok humínových kyselín do diéty potkanov môže pozitívne ovplyvniť zmeny v antioxidačnom statuse plazmy a mitochondrií srdca, vyvolané chronickou intoxikáciou octanom olovnatým.

MATERIÁL A METÓDY

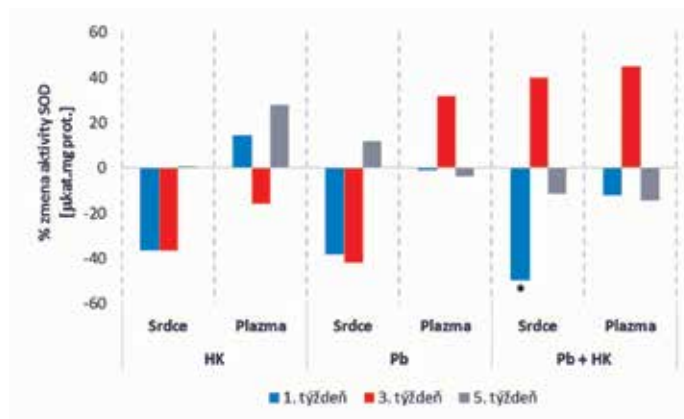
V experimente schválenom Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (Ro-2575/14-221) sme použili 72 samcov laboratórnych potkanov kmeňa Sprague – Dawley, ktorých sme rozdelili na štyri skupiny po 18 kusov zvierat. V prvej, kontrolnej skupine (K) boli zvieratá kŕmené štandardnou kŕmnou zmesou a bola im podávaná čistá pitná voda, v druhej skupine (HK) bol do kŕmnej zmesi pridávaný 1 % prídavok prípravku s obsahom humínových kyselín (Humac Natur®, Humac, s. r. o., Košice). V tretej skupine (Pb), bez prídavku humínových kyselín, sme potkanom pridávali do pitnej

vody kontrolovanú dávku octanu olovnatého v dennej dávke 79.2 mg/deň/kg ž. h. V štvrtej skupine sme skombinovali prídavok olovnatej soli a humínových kyselín s dávkovaním obdobným ako je opísané vyššie. Potkany mali prístup ku krmivu a k pitnej vode *ad libitum*. Odbery biologického materiálu sme opakovali trikrát, po jednom, po troch a po piatich týždňoch od začatia experimentu. Po usmrtení zvierat podaním ketamínu sme im odobrali krv, z ktorej sme centrifugáciou izolovali plazmu a srdcia, z ktorých sme izolovali mitochondrie podľa Fernández-Vizarra a kol. [9]

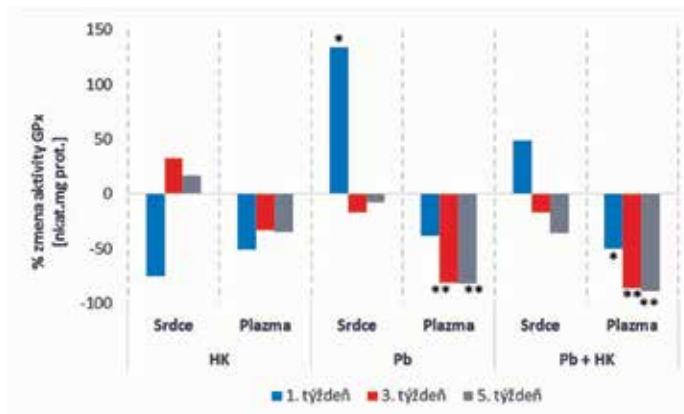
V plazme a mitochondriálnom izoláte sme zmerali obsah celkových proteínov s použitím kyseliny bicinchoninovej. Následne sme stanovili aktivity superoxidizmutázy (SOD, E.C. 1.15.1.1) pomocou SOD-Assay Kit-WST (Fluka, Japonsko), glutatiónperoxidázy (GPx, E.C. 1.19.1.9) a glutatiónredutázy (GR, E.C. 1.8.1.7) pomocou kitov (Sigma-Aldrich, Nemecko), a taktiež aj hladinu redukovaného glutatiónu (GSH) podľa Floreani a kol. [10]. Enzymové aktivity sme prepočítali na mg proteínov vo vzorkách.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

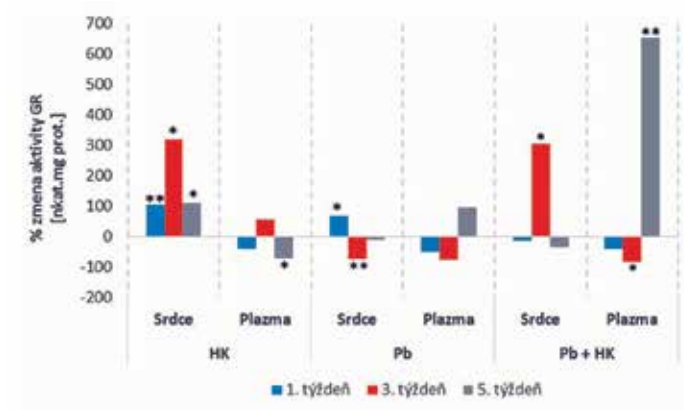
Aktivita superoxidizmutázy v mitochondriách srdca bola v dôsledku podávania humínových kyselín a rovnako aj octanu olovnatého po jednom a po troch týždňoch podstatne znížená, avšak v piatom týždni už voči kontrole nevykazovala zmeny (HK), resp. bola mierne vyššia (Pb), avšak pri kombinovanom podávaní Pb + HK po počiatocnom signifikantnom poklese nastal v treťom týždni nárast aktivity tohto enzýmu a v piatom týždni vykazovala len mierny pokles. V plazme vykazovala aktivita SOD kolísavú tendenciu, pri podávaní HK najprv stúpala, v strede pozorovaného obdobia poklesla a nakoniec znova stúpala, pri podávaní olovnatej soli sme zaznamenali opačný trend, v 1. týždni bola aktivita nepatrne znížená, v 3. týždni bola maximálna a v 5. týždni znova



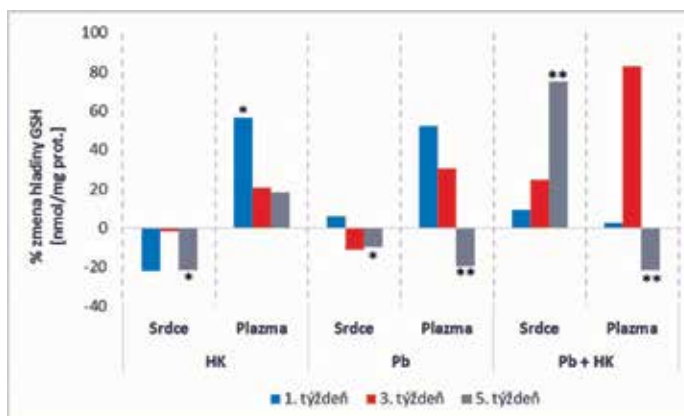
a)



b)



c)



d)

Obr. 1. Percentuálna zmena aktivity SOD (a), GPx (b), GR (c) a hladiny GSH (d) voči kontrole po jednom, troch a piatich týždňoch (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$)

mierne znížená. Prídavok HK k Pb^{2+} zintenzívnil túto tendenciu (obr. 1a).

Na aktivitu glutatiónperoxidázy v srdcových mitochondriách malo olovo dramatický vplyv najmä v prvom týždni (viac než 100 % nárast), neskôr došlo skôr k miernemu zníženiu. Samotné humínové kyseliny spôsobili zo začiatku práve pokles, neskôr skôr mierny nárast aktivity GPx, ak boli pridávané k Pb, zmena aktivity tohto enzýmu mala podobný priebeh ako v prípade prídavku samotného olova, avšak s miernejším počiatočným nárastom a s neskorším poklesom. Zdá sa, že mitochondrie srdca potkanov sú schopné adaptácie aktivity GPx pri dlhodobejšej konštantnej prítomnosti afektora. Humínové kyseliny teda tlmia efekt olova na aktivitu tohto enzýmu. V plazme bola aktivita GPx po celú dobu experimentu olovom redukovaná, v neskoršej fáze signifikantne, obdobne, avšak v menšej miere aj humínovými kyselinami. Tu sme však nepozorovali ich vplyv na účinok olova (obr. 1b).

HK signifikantne podporovali aktivitu glutatiónreduktázy v mitochondriách srdca s maximom v strede sledovaného obdobia, Pb^{2+} spočiatku signifikantne zvyšovalo, neskôr obdobne znižovalo a ku koncu vykazovalo len zanedbateľný vplyv na GR. V kombinácii HK opäť pôsobili antagonisticky, avšak intenzívnejšie ako ťažký kov. V plazme sme pozorovali miernejšie a skôr negatívne ovplyvnenie aktivity GR humínovými kyselinami, najmä v záverečnej fáze, v ktorej ju olovo naopak ovplyvňovalo pozitívne. V kombinácii HK a Pb je badať tendenciu podobnú prípadu prídavku samotného olova, no zaujímavé je extrémne zvýšenie aktivity po uplynutí piatich týždňov koadministrácie Pb a HK (obr. 1c). Tieto zmeny principiálne opačne korelujú so zmenami hladiny redukovaného glutatiónu v plazme pri podávaní olova resp. olova s HK (nárast po prvom resp. treťom týždni, no signifikantný pokles po piatich týždňoch), samotné HK hladinu GSH najmä v počiatočnom štádiu experimentu zvyšujú. V mitochondriách srdca HK aj olovo osve skôr znižujú hladinu GSH,

pri spoločnom podávaní sme však pozorovali signifikantne zvýšený obsah tohto tripeptidu (obr. 1d).

Z nameraných hodnôt môžeme usudzovať, že účinok humínových kyselín na aktivitu SOD a GR v plazme je v podstate opačný ako účinok samotného olova, avšak nie je badateľná jasná schopnosť molekúl HK eliminovať vplyv Pb na spomínané enzýmy. Pravdepodobne suplementácia humínovými kyselinami nedokáže dlhodobu zabrániť substitúcii zinočnatého katiónu olovnatým v aktívnom mieste SOD a jej inaktivácii. Po piatich týždňoch chronickej otravy olovom sa podľa našich výsledkov stráca schopnosť indukcie syntézy glutatiónu v dôsledku jeho počiatočnej zvýšenej spotreby za účelom chelatácie a eliminácie Pb^{2+} z organizmu, resp. sa jeho koncentrácia sústreďí do orgánov, kde sa olovo z dlhodobého hľadiska kumuluje, teda najmä do obličiek a pečene. Relevanciu chelatácie olovnatých katiónov molekulami HK pri simultánnom podávaní Pb a HK môže naznačovať nezmenená koncentrácia GSH v plazme v prvých dňoch experimentu, keďže tak chýba podnet na aktiváciu jeho syntézy.

Afinita katiónov ťažkých kovov, teda mäkkých Lewisových kyselín ku mäkkým zásadám, ako tiolové a selenolové funkčné skupiny, stojí za dôležitosťou úlohy redukovaného glutatiónu v procese odstraňovania týchto iónov z organizmu, avšak má pravdepodobne na svedomí aj dramatické zníženie aktivity glutatiónperoxidázových enzýmov v plazme, najmä v dlhodobom časovom horizonte, hoci mitochondrie srdcového svalu naznačujú určitú adaptabilitu voči chronickej intoxikácii olovom.

ZÁVER

Na základe našich výsledkov možno konštatovať, že chronická otrava olovom má za následok celkové zníženie odolnosti voči oxidačnému stresu, primárne kvôli komplexácii a dezaktivácii natívnych cysteínových a selenocysteínových antioxidantných komponentov

v mitochondriách srdca a v plazme potkanov. Protektívny účinok humínových kyselín v použitej koncentrácii voči toxicite olovnatých solí na tento antioxidantný mechanizmus sa v našom experimente prejavil len na krátkodobej úrovni, najmä v srdcovom tkanive, zatiaľčo v plazme a z dlhodobého hľadiska je skôr zanedbateľný.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla s podporou grantov 17/GSD/2012, 20 %; VEGA 1/1236/12 60 % a VEGA 1/0782/15, 20 %.

LITERATÚRA

1. VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J., 2009: *Chemie potravín 1*, 3. vydanie, OSSIS, Havlíčkův Brod, ISBN 978-80-86659-15-2, str. 495–498.
2. PATRA, R. C. a kol., 2011: Oxidative Stress in Lead and Cadmium Toxicity and Its Amelioration. In *Vet. Med. Int.*, vol. 2011, article ID 457327, 9 strán, doi:10.4061/2011/457327.
3. ULLAH, N. a kol., 2011: Metabolic modulation of glutathione in whole blood components against lead-induced toxicity. In *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 10 (77), str. 17853–17858, available online

at <http://www.academicjournals.org/AJB>, DOI: 10.5897/AJB11.1615.

4. BOKARA, K. K. a kol., 2009: Influence of lead acetate on glutathione and its related enzymes in different regions of rat brain. In *J. Appl. Toxicol.*, Vol. 29 (5), str. 452–458, doi: 10.1002/jat.1423.
5. DIPTI, P. a kol., 2003: Lead Induced Oxidative Stress: Beneficial Effects of Kombucha Tea. In *Biomed. Environ. Sci.*, Vol. 16, str. 276–282.
6. SOBEKOVÁ, A. a kol., 2009: The alteration of glutathione peroxidase activity in rat organs after lead exposure. In *Acta Physiol. Hung.*, vol. 96 (1), str. 37–44, doi: 10.1556/APhysiol.96.2009.1.4.
7. MUSA, S. A. a kol., 2012: Preventive Activity of Ascorbic Acid on Lead Acetate Induced Cerebellar Damaged in Adult Wistar Rats. In *Med. Health Sci. J.*, Vol. 13, str. 99–104, ISSN: 1805-5014 (online).
8. VAŠKOVÁ, J. a kol., 2011: Effects of Humic Acid *In Vitro*. In *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, Vol. 47, str. 376–382.
9. FERNÁNDEZ-VIZARRA, E. a kol., 2002: Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. In *Methods*, Vol. 26, str. 292–297.
10. FLOREANI, M. et al. 1997: A comparison between different methods for the determination of reduced and oxidized glutathione in mammalian tissues. In *Free Radical Research*, Vol. 26, No. 5, pp. 449–455.

VYUŽITIE UV/VIS SPEKTROSKOPIE PRI STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÝCH VLASTNOSTÍ P-HYDROXYBENZOOVEJ KYSELINY A JEJ ESTEROV PRI REAKCII S HYDROXYLOVÝM RADIKÁLOM

VELIKÁ, B.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie

ÚVOD

Hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$) sa považuje za najreaktívnejší spomedzi všetkých voľných radikálov. Je vysoko toxický pre bunky organizmu, jeho formovaním dochádza k vzniku oxidačného stresu, ktorý prispieva k rozvoju aj neurodegeneratívnych ochorení, napr. Parkinsonova choroba (Mašlanková a kol. 2013). Zdrojom $\text{OH}\cdot$ je Fentonova reakcia, ktorá zároveň vysvetľuje vysokú reaktivitu H_2O_2 v podmienkach *in vivo*, v ktorej H_2O_2 reaguje s čiastočne redukovaným iónom kovu (Fe^{2+}) za vzniku veľmi reaktívneho hydroxylového radikálu (Tadolini a Cabrini, 1990). Fenolové látky, medzi ktoré zaraďujeme aj hydroxybenzoové kyseliny, patria k efektívnym antioxidantom voči rôznym typom voľných radikálov, v neposlednom rade aj hydroxylového radikálu (Scalbert a kol, 2005). Patria k terminátorom voľnoradikálových reakcií. Pre ich antioxidantné vlastnosti sú dôležité medzimolekulové vodíkové väzby v ich štruktúre. Svojím antioxidantným účinkom môžu predchádzať poškodeniu organizmu na rôznych úrovniach, ktoré je vyvolané účinkom voľných radikálov. Ich schopnosť viazať voľné radikály sa využíva aj v prevencii vzniku

nádorových ochorení a pri zvyšovaní účinnosti imunitného systému (Tomečková a kol., 2011; Tomečková a kol., 2013). Existuje množstvo štúdií, ktoré dokazujú, že konzumácia ovocia a zeleniny, ktoré sú bohaté na prítomnosť fenolových antioxidantov, dokázala signifikantne redukovať riziko vzniku nádorových, srdcovo-cievnych ochorení (Scalbert a kol, 2005, Bilecová-Rabajdová a kol. 2013).

V tejto práci sme sa venovali skúmaniu antioxidantných vlastností kyseliny p-hydroxybenzoovej a jej metyl- a propyl- esteru pri vychytávaní hydroxylového radikálu. Kyselina p-hydroxybenzoová má schopnosť chelatačne viazať ióny prechodných kovov za vzniku stabilného komplexu, čím predchádza vzniku voľných radikálov generovaných vďaka prítomnosti týchto prechodných kovov (Pignatello, 1992; Rivas a kol., 2001). Veľmi významné sú jej estery, nazývané tiež parabény, ktoré sa používajú hlavne v kozmetickom a potravinárskom priemysle (Soni a kol., 2005). Medzi najvýznamnejšie estery patrí etylester kyseliny p-hydroxybenzoovej (E 214), metylester kyseliny p-hydroxybenzoovej (E 218) a propylester kyseliny p-hydroxybenzoovej (E 216). Tieto estery sa používajú ako konzervačné látky, pôsobia proti

kvasinkám, plesniam a niektorým baktériám. Používajú sa na konzerváciu nealkoholických nápojov, ovocných džúsov, nakladanej zeleniny, pekárenských výrobkov a vína. Pridávajú sa aj do cukroviek (okrem čokolády), orechov, zemiakov a do tekutých stolových sladidel. U nás je ich využitie obmedzené zákonom. V USA a v Austrálii nie je ich používanie dovolené. Patria k nevhodným aditívam pre hyperaktívne deti, alergikov, a astmatikov. Pri použití v kozmetických prípravkoch sa môžu vyskytnúť nežiaduce účinky ako napr. dermatitída. Ich koncentrácia v kozmetických prípravkoch je zvyčajne 0,3-1%, čo predstavuje dvakrát vyššiu koncentráciu oproti povolenej koncentrácii v potravinách (Soni a kol., 2005).

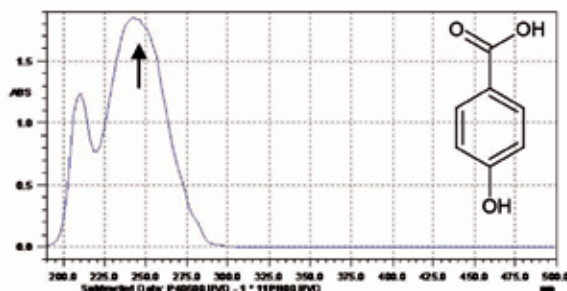
MATERIÁL A METÓDY

Zásobné roztoky: 250 ml fosforečnanového tlmivého roztoku (PB) s koncentráciou 0,05 mmol/l a s pH 6; 30 %-ný peroxid vodíka. Roztok Mohrovej soli s koncentráciou 1 mmol/l bol pripravený v objeme 50 ml PB. Zásobné roztoky derivátov hydroxybenzoovej kyseliny s koncentráciou 30 mmol/l boli pripravené v objeme 50 ml. Roztok Mohrovej soli bol na experiment nariadený na koncentráciu 0,01 mmol/l; peroxid vodíka na koncentráciu 0,1 mmol/l; a testovaná látka na koncentráciu 0,06 mmol/l.

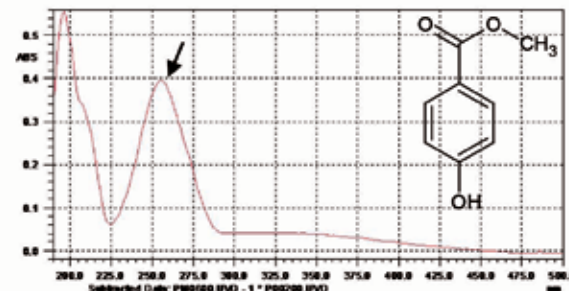
Pri detekcii hydroxylového radikálu sa v experimentoch na rozpustenie síranu železnato-

UV/VIS spektrá testovaných látok (c = 0,06 mmol/l, pH = 7,4)

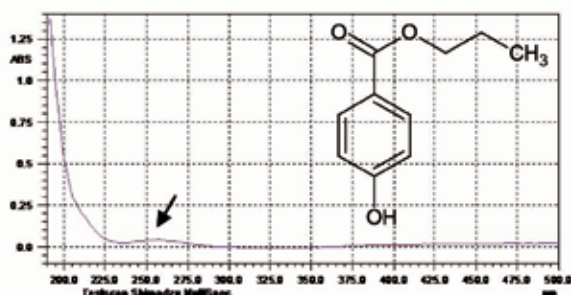
1, kyselina p-hydroxybenzoová (4-HBA)



2, metylester kyseliny p-hydroxybenzoovej (metylparabén, 4-HBAM)

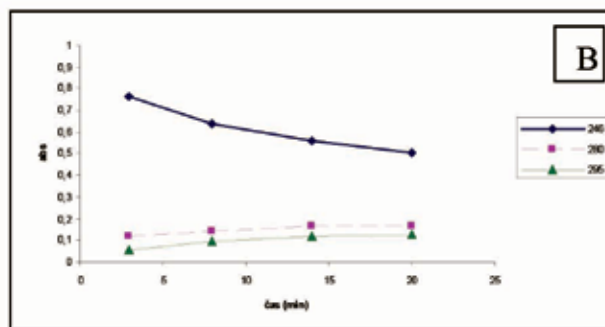
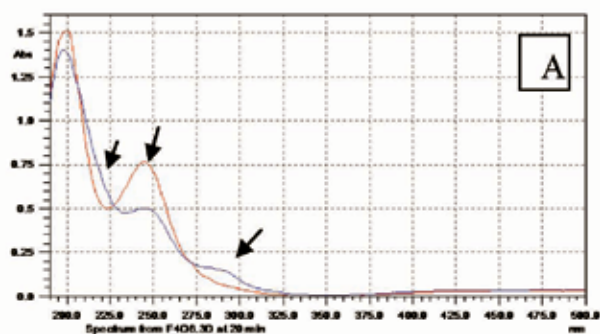


3, propylester kyseliny p-hydroxybenzoovej (propylparabén, 4-HBAP)

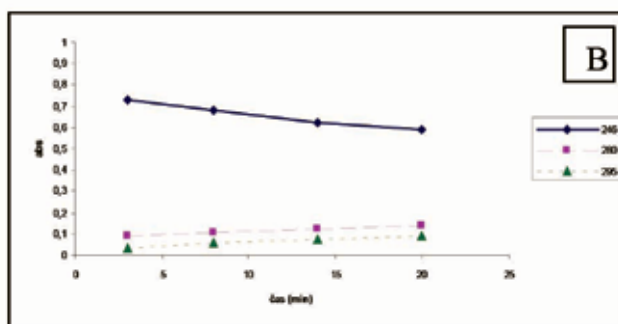
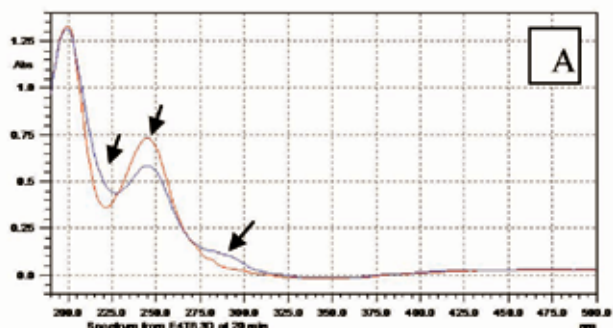


TAB. 1. UV MAXIMÁ TESTOVANÝCH LÁTOK (namerané pri pH 7,4)

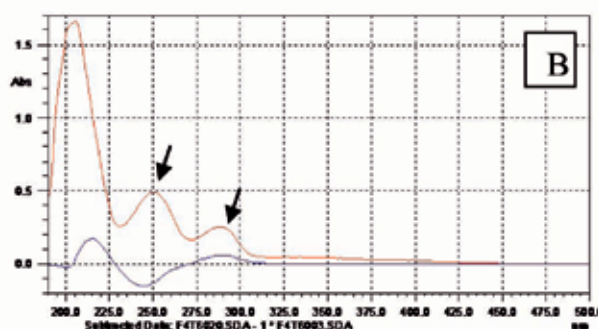
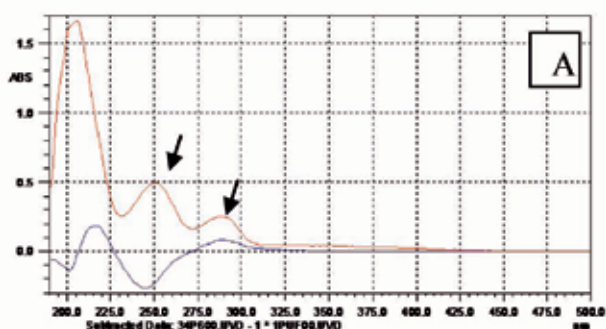
Zlúčenina	1. pík
4-HBA	246 nm
4-HBAM	255 nm
4-HBAP	255 nm



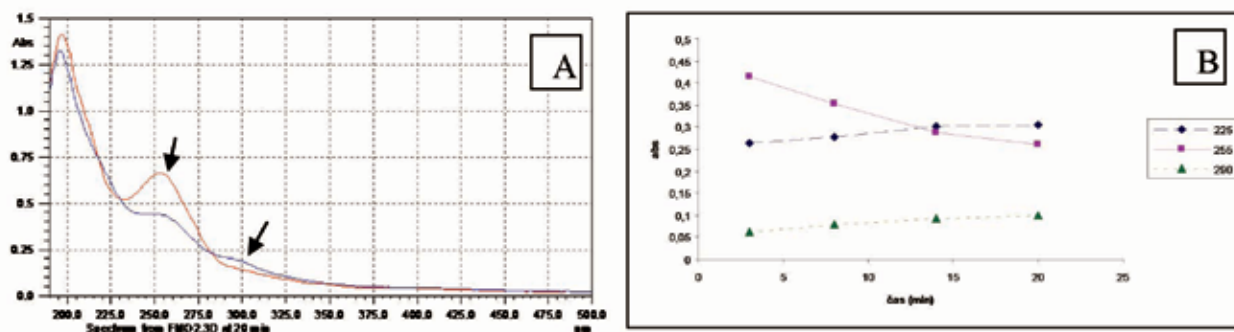
Graf 1. Spektrum antioxidačných vlastností 4-HBA počas reakcie s hydroxylovým radikálom, $c(4\text{-HBA}) = 0,06 \text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 6$, $t = 22^\circ\text{C}$ (r.t.); červená – začiatok reakcie, modrá – koniec reakcie; A: kinetické 20 minútové spektrum, reakčná zmes obsahovala Fe(II) + po 1 minúte 4-HBA+ po 2 minúte H_2O_2 ; B: zmeny absorbancie testovanej látky pri vlnových dĺžkach 246 nm, 280 nm, 295 nm



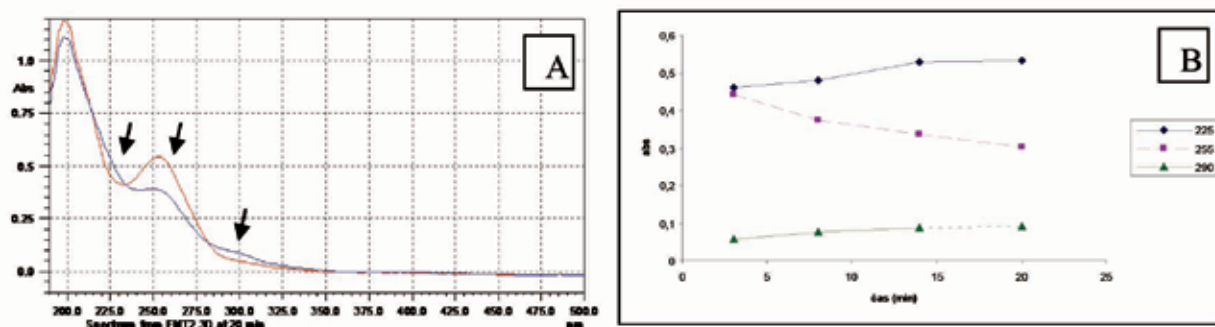
Graf 2. Spektrum antioxidačných vlastností 4-HBA počas reakcie s hydroxylovým radikálom, $c(4\text{-HBA}) = 0,06 \text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 6$, $t = 37^\circ\text{C}$; červená – začiatok reakcie, modrá – koniec reakcie; A: kinetické 20 minútové spektrum, reakčná zmes obsahovala Fe(II) + po 1 minúte 4-HBA+ po 2 minúte H_2O_2 ; B: zmeny absorbancie testovanej látky pri vlnových dĺžkach 246 nm, 280 nm, 295 nm



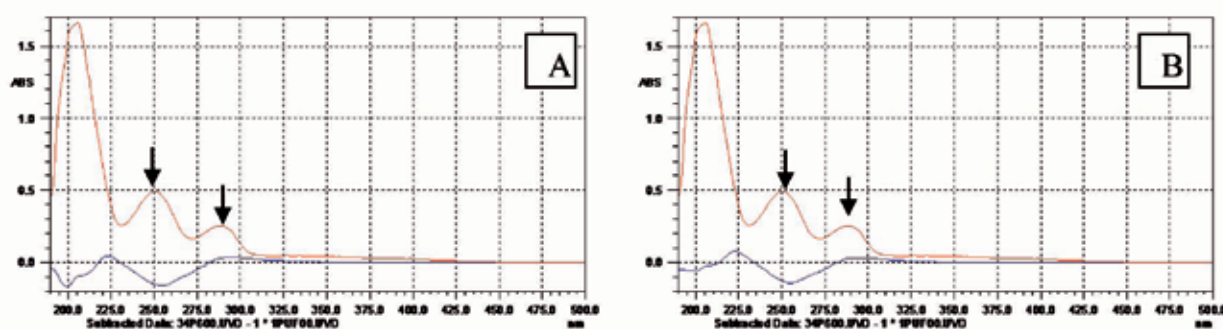
Graf 3. Spektrum antioxidačných vlastností 4-HBA počas reakcie s hydroxylovým radikálom, $c(4\text{-HBA}) = 0,06 \text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 6$, A: $t = 22^\circ\text{C}$ (r.t.); UV/VIS spektrá predpokladaných produktov; modré – diff: medzi začiatkom a koncom reakcie, oranžové – 3,4-DHB (0,06 mmol/l); B: $t = 37^\circ\text{C}$ UV/VIS spektrá predpokladaných produktov; modré – diff: medzi začiatkom a koncom reakcie, oranžové – 3,4-DHB (0,06 mmol/l)



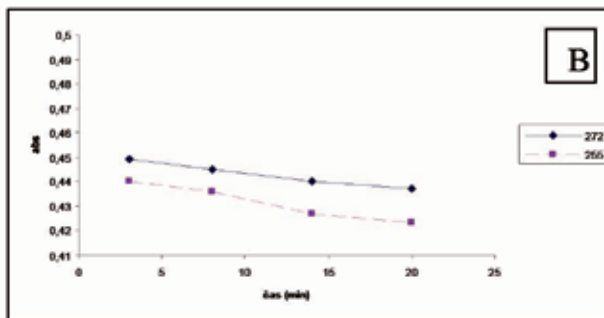
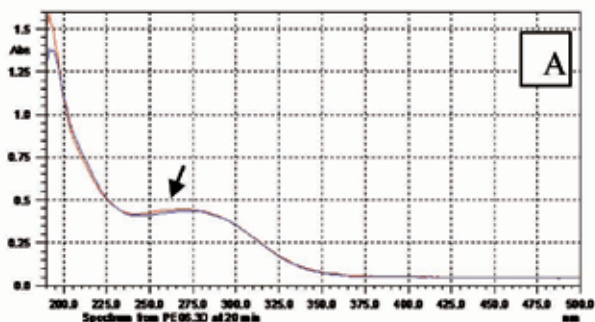
Graf 4. Spektrum antioxidačných vlastností 4-HBAM počas reakcie s hydroxylovým radikálom, $c(4\text{-HBAM}) = 0,06 \text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 6$, $t = 22^\circ\text{C}$ (r.t.); červená – začiatok reakcie, modrá – koniec reakcie; A: kinetické 20 minútové spektrum, reakčná zmes obsahovala Fe(II) + po 1 minúte 4-HBAM + po 2 minúte H_2O_2 ; B: zmeny absorpcie testovanej látky pri vlnových dĺžkach 225 nm, 255 nm, 290 nm



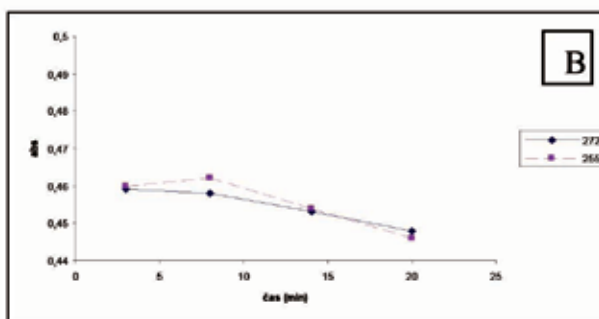
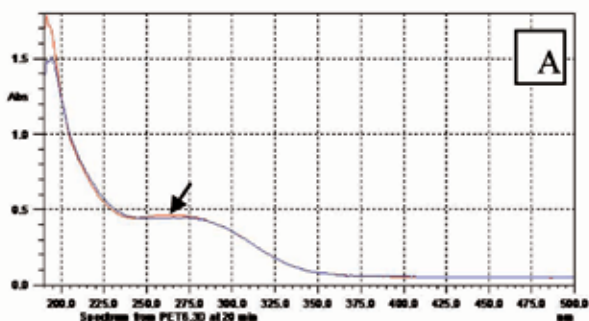
Graf 5. Spektrum antioxidačných vlastností 4-HBAM počas reakcie s hydroxylovým radikálom, $c(4\text{-HBAM}) = 0,06 \text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 6$, $t = 37^\circ\text{C}$; červená – začiatok reakcie, modrá – koniec reakcie; A: kinetické 20 minútové spektrum, reakčná zmes obsahovala Fe(II) + po 1 minúte 4-HBAM + po 2 minúte H_2O_2 ; B: zmeny absorpcie testovanej látky pri vlnových dĺžkach 225 nm, 255 nm, 290 nm



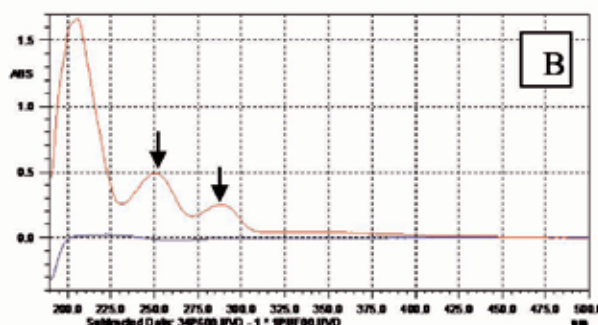
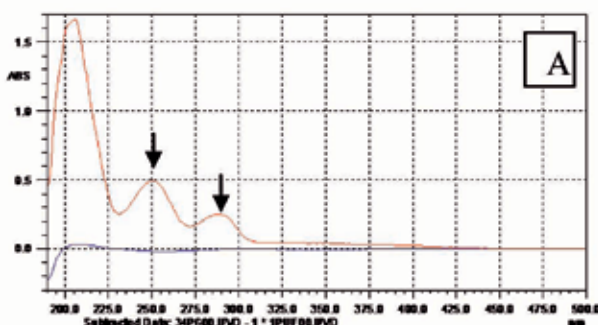
Graf 6. Spektrum antioxidačných vlastností 4-HBAM počas reakcie s hydroxylovým radikálom, $c(4\text{-HBAM}) = 0,06 \text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 6$, A: $t = 22^\circ\text{C}$ (r.t.); UV/VIS spektrá predpokladaných produktov; modré – diff: medzi začiatkom a koncom reakcie, oranžové – 3,4-DHB (0,06 mmol/l); B: $t = 37^\circ\text{C}$ UV/VIS spektrá predpokladaných produktov; modré – diff: medzi začiatkom a koncom reakcie, oranžové – 3,4-DHB (0,06 mmol/l)



Graf7. Spektrum antioxidačných vlastností 4-HBAP počas reakcie s hydroxylovým radikálom, $c(4\text{-HBAP})=0,06\text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 6$, $t = 22^\circ\text{C}$ (r. t.); červená – začiatok reakcie, modrá – koniec reakcie; A: kinetické 20 minútové spektrum, reakčná zmes obsahovala Fe(II) + po 1 minúte 4-HBAP + po 2 minúte H_2O_2 ; B: zmeny absorbancie testovanej látky pri vlnových dĺžkach 272 nm, 255 nm



Graf8. Spektrum antioxidačných vlastností 4-HBAP počas reakcie s hydroxylovým radikálom, $c(4\text{-HBAP})=0,06\text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 6$, $t = 37^\circ\text{C}$; červená – začiatok reakcie, modrá – koniec reakcie; A: kinetické 20 minútové spektrum, reakčná zmes obsahovala Fe(II) + po 1 minúte 4-HBAP + po 2 minúte H_2O_2 ; B: zmeny absorbancie testovanej látky pri vlnových dĺžkach 272 nm, 255 nm



Graf9. Spektrum antioxidačných vlastností 4-HBAP počas reakcie s hydroxylovým radikálom, $c(4\text{-HBAP})=0,06\text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 6$, A: $t = 22^\circ\text{C}$ (r. t.); UV/VIS spektrá predpokladaných produktov; modré – diff: medzi začiatkom a koncom reakcie, oranžové – 3,4-DHB (0,06 mmol/l); B: $t=37^\circ\text{C}$ UV/VIS spektrá predpokladaných produktov; modré – diff: medzi začiatkom a koncom reakcie, oranžové – 3,4-DHB (0,06 mmol/l)

**TAB. 2. RÝCHLOSŤ REAKCIE 4-HBA S HYDROXYLOVÝM RADIKÁLOM
A RÝCHLOSŤ VZNIKU PREDPOKLADANÝCH PRODUKTOV**

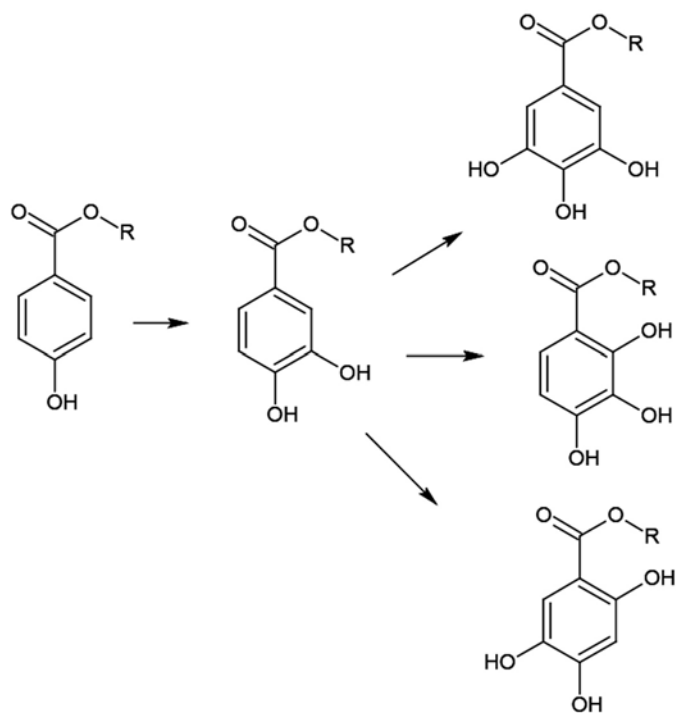
Fe(II) + 4-HBA + H₂O₂, r. t.	λ	Abs (diff)	v [mol/min]	Fe(II) + H₂O₂ + 4-HBA, r.t.	λ	Abs (diff)	v [mol/min]
4-HBA	246 nm	-0,258	-12,1.10 ⁻⁷	4-HBA	246 nm	-0,312	-14,6.10 ⁻⁷
3,4-DHB	250 nm	-0,224	-16,03.10 ⁻⁷	3,4-DHB	250 nm	-0,274	-19,6.10 ⁻⁷
	288 nm	0,083	11,9.10 ⁻⁷		288 nm	0,086	12,4.10 ⁻⁷
Fe(II) + 4-HBA + H₂O₂, t = 37 °C	λ	Abs (diff)	v [mol/min]	Fe(II) + H₂O₂ + 4-HBA, t=37°C	λ	Abs (diff)	v [mol/min]
4-HBA	246 nm	-0,149	-6,97.10 ⁻⁷	4-HBA	246 nm	-0,247	-11,6.10 ⁻⁷
3,4-DHB	250 nm	-0,128	-9,16.10 ⁻⁷	3,4-DHB	250 nm	-0,216	-15,5.10 ⁻⁷
	288 nm	0,064	9,24.10 ⁻⁷		288 nm	0,068	9,82.10 ⁻⁷

**TAB. 3. RÝCHLOSŤ REAKCIE 4-HBAM S HYDROXYLOVÝM RADIKÁLOM
A RÝCHLOSŤ VZNIKU PREDPOKLADANÝCH PRODUKTOV**

Fe(II) + 4-HBAM + H₂O₂, r. t.	λ	Abs (diff)	v (mol/min)	Fe(II) + H₂O₂ + 4-HBAM, r.t.	λ	Abs (diff)	v (mol/min)
4-HBAM	255 nm	-0,157	-6,82.10 ⁻⁷	4-HBM	255 nm	-0,148	-6,43.10 ⁻⁷
3,4-DHB	250 nm	-0,149	-10,7. 10 ⁻⁷	3,4-HBA	250 nm	-0,169	-12,1.10 ⁻⁷
	288 nm	0,031	4,49.10 ⁻⁷		288 nm	0,034	4,91.10 ⁻⁷
Fe(II) + 4-HBAM + H₂O₂, t = 37 °C	λ	Abs (diff)	v [mol/min]	Fe(II) + H₂O₂+ 4-HBAM,t=37°C	λ	Abs (diff)	v [mol/min]
4-HBAM	255 nm	-0,138	-5,99.10 ⁻⁷	4-HBAM	255 nm	-0,165	-7,17.10 ⁻⁷
3,4-HBA	250 nm	-0,127	-9,09.10 ⁻⁷	3,4-HBA	250 nm	-0,156	-1,12.10 ⁻⁷
	288 nm	0,028	3,97.10 ⁻⁷		288 nm	0,027	3,89.10 ⁻⁷

**Tab. 4. RÝCHLOSŤ REAKCIE 4-HBAP S HYDROXYLOVÝM RADIKÁLOM
A RÝCHLOSŤ VZNIKU PREDPOKLADANÝCH PRODUKTOV**

Fe(II) + 4-HBAP + H₂O₂, r. t.	λ	Abs (diff)	v [mol/min]	Fe(II) + H₂O₂ + 4-HBAP, r.t.	λ	Abs (diff)	v [mol/min]
4-HBAP	256 nm	-0,017	-1,71.10 ⁻⁷	4-HBAP	256 nm	-0,015	-1,49.10 ⁻⁷
3,4-HBA	250 nm	-0,015	-1,10.10 ⁻⁷	3,4-HBA	250 nm	-0,014	-9,80.10 ⁻⁷
	288 nm	-0,003	-0,45.10 ⁻⁷		288 nm	-0,001	-0,19.10 ⁻⁷
Fe(II) + 4-HBAP + H₂O₂, t = 37 °C	λ	Abs (diff)	v [mol/min]	Fe(II) + H₂O₂+ 4-HBAP, t=37°C	λ	Abs (diff)	v [mol/min]
4-HBAP	256 nm	-0,015	-1,49.10 ⁻⁷	4-HBAP	256 nm	-0,021	-2,13.10 ⁻⁷
3,4-HBA	250 nm	-0,009	-0,65.10 ⁻⁷	3,4-HBA	250 nm	-0,019	-1,35.10 ⁻⁷
	288 nm	-0,002	-0,27.10 ⁻⁷		288 nm	-0,002	-0,25.10 ⁻⁷



Obr. 1. Predpokladaný vznik produktov 4-HBA a jej derivátov
(R = -H, -CH₃, -CH₂-CH₂-CH₃), po hydroxylácii

-amónneho použil fosforečnanový tlmivý roztok s pH 6, aby sa predišlo vyzrážaniu hydroxidu železnatého pri pH 7,4. K roztoku Mohrovej soli bol pridaný príslušný antioxidant (testované látky) a peroxid vodíka priamo v kyvete.

Priebeh reakcií bol zaznamenaný pomocou spektrofotometra Shimadzu MultiSpec-1501, pri vlnovej dĺžke 190–800 nm s použitím kremenej kyvety (d = 1 cm).

K 1,8 ml pracovného roztoku Mohrovej soli (0,01 mmol/l) v kyvete (QS, d = 1 cm), bolo pridané 0,2 ml antioxidantu (testovaná látka) a 1 minútu sa sledovala tvorba komplexu, po minúte reakcie boli pridané 2 µl peroxidu vodíka (0,1 mmol/l) a sledovala sa tvorba hydroxylových radikálov. Priebeh reakcie bol zaznamenaný po dobu 20 minút pri izbovej teplote (r. t.). Reakcia bola uskutočnená aj pri teplote 37 °C.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V prípade 4-HBA ako *para* derivátu kyseliny benzoovej, sú viditeľné veľmi dobré antioxidantné účinky voči hydroxylovému radikálu. Prejavuje sa to výrazným poklesom absorpcie pri vlnovej dĺžke 246 nm (graf č. 1, graf č. 2), čo je charakteristická vlnová dĺžka pre túto látku (tabuľka č. 1). Pokles je výraznejší pri izbovej teplote (graf č. 1) v porovnaní s experimentom uskutočneným pri teplote 37 °C (graf č. 2). V grafe č. 1 a č. 2 je vidieť nárast absorpcie pri vlnových dĺžkach 250 nm a 288 nm. Tieto vlnové dĺžky sú charakteristické pre 3,4-DHB, ako jediného možného produktu hydroxylácie 4-HBA (obrázok č. 1). Pozorujeme aj nárast absorpcie pri vlnovej dĺžke v oblasti 220 nm. Pri tejto vlnovej dĺžke sa dá predpokladať vznik komplexu medzi Fe (II) a 4-HBA. Pri použití parabénov ako antioxidantov je zrejmé, že na antioxidantný účinok voči hydroxylovému

radikálu má značný vplyv aj dĺžka reťazca. Metylester (graf č. 4 a graf č. 5) má lepšie antioxidačné účinky v porovnaní s propylesterom (graf č. 7 a graf č. 8). V prípade metylesteru je vidieť výraznejší pokles absorbancie pri vlnových dĺžkach 250 nm a 288 nm (graf č. 6), na základe čoho môžeme predpokladať vznik derivátu 3,4-DHB ako produktu hydroxylačnej reakcie (obrázok č. 1). V prípade propylesteru môžeme taktiež predpokladať vznik 3,4-DHB ako produktu hydroxylačnej reakcie, hlavne na základe teoretického rozboru mezomérnych efektov funkčných skupín umiestnených na benzénovom jadre (obrázok č. 1).

Z literatúry je známe, že prítomnosť prechodných kovov alebo peroxidu vodíka znižuje antioxidačnú kapacitu fenolov (Labieniec a Gabryelak 2007). Zvyšovanie prooxidačných vlastností fenolov v prítomnosti Fe (III) alebo Cu (II) bolo primárne spájané s ich schopnosťou redukovať kovové ióny, ktoré potom môžu byť znova oxidované vo Fentonovej reakcii, čo vedie k produkcii hydroxylového radikálu a iných reaktívnych kyslíkových metabolitov. Antioxidačné a prooxidačné vlastnosti fenolov závisia od mnohých faktorov, ako napríklad od koncentrácie a charakteru prechodných kovových iónov, koncentrácie fenolových látok a pH (Rodtjer a kol., 2006; Kumamoto a kol., 2001).

ZÁVER

Na základe výsledkov našich meraní môžeme konštatovať, že vzájomná poloha –OH a –COOH skupiny na benzénovom jadre je dôležitá. Dôležitá je prítomnosť voľnej hydroxylovej a karboxylovej skupiny. Blokovanie karboxylovej, alebo hydroxylovej skupiny v skupine testovaných esterov má inhibičný vplyv na ich antioxidačné vlastnosti, aj dĺžka bočného reťazca esteru je rozhodujúca pre antioxidačný efekt.

Parabény sú potencionálne prooxidanty v pokožke, a preto sa odporúča venovať zvýšenú pozornosť pri používaní kozmetických prí-

pravkov, ktoré ich obsahujú, hlavne u pacientov s diagnostikovanou protoporfýriou (Nishizawa a kol., 2006). Metylparabén patrí k najčastejšie používaným antimikrobiálnym, konzervačným prostriedkom v kozmetickom priemysle (Soni a kol., 2002). Toxikologická charakteristika produktov reakcie medzi esterami p-hydroxybenzoovej kyseliny a singletovým kyslíkom je veľmi dôležitá kvôli ich častému používaniu v kozmetickom priemysle a možnému vzniku 1O_2 v pokožke (Nishizawa a kol., 2006).

Výzvou do budúcnosti pre nás je schopnosť porozumieť týmto vzťahom so zvláštnym dôrazom na možnosť manipulácie a využitia látok fenolového typu v prevencii a liečbe rôznych ochorení.

*Táto publikácia bola vytvorená pri realizácii projektu **Medicínsky univerzitný park v Košiciach (MediPark, Košice)** ITMS:26220220185 (100 %) na základe podpory Operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (OP VaV-2012/2.2/08-RO) č. zmluvy: OPVaV/12/2013.*

LITERATÚRA

- 1. BILECOVÁ-RABAJDOVÁ, M., BIRKOVÁ, A., URBAN, P., GREGOVÁ, K., ĎUROVCOVÁ, E., MAREKOVÁ, M., 2013:** Naturally occurring substances and their role in chemo-protective effects. In *Central European Journal of Public Health*, 2013, 21, 213–219.
- 2. KUMAMOTO, M. a kol., 2001:** Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins. In *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001, 65, 126–132.
- 3. LABIENIEC, M., GABRYELAK, T., 2007:** Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of H_2O_2 or Cu^{2+} ions. In *Toxicol. In Vitro.*, 2007, 21, 146–156.
- 4. MAŠLANKOVÁ, J., HUBKOVÁ, B., BÓDY, G., STUPÁK, M., VELIKÁ, B., MIHÁLIK, J.,**

MAREKOVÁ, M., 2013: Vplyv selegilínu (depre-nylu) na vznik oxidačného stresu. In *Slovenský veterinárny časopis*, 3–4/2013.

5. NISHIZAWA, C. a kol., 2006: Reaction of para-hydroxybenzoic acid esters with singlet oxygen in the presence of glutathione produces glutathione conjugates of hydroquinone, potent inducers of oxidative stress. In *Free Radic. Res.*, 2006, 40, 233–240.

6. PIGNATELLO, J. J., 1992: Dark and photo-assisted Fe³⁺ catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. In *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, 944–951.

7. RIVAS, F. J. a kol., 2001: Oxidation of p-hydroxybenzoic acid by fenton's reagent. In *Wat. Res.*, 2001, 35, 387–396.

8. RODTJER, A., SKIBSTED, L.H., ANDERSEN, M. L., 2009: Antioxidative and prooxidative effects of extracts made from cherry liqueur pomace. In *Food Chem.*, 2006, 99, 6–14.

9. SCALBERT, A., MANACH, C., MORAND, CH., RÉMÉSY, CH., JIMÉNEZ, L., 2005: Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. In *Food Science and Nutrition*, 2005, 45, 287–306.

10. SONI, M. G. a kol., 2002: Evaluation of the health aspects of methyl paraben: A review Publisher literature. In *Food chem. Toxicol.*, 2002, 40:1335–133.

11. SONI, M. G., CARABIN, I., BURDOCK, G. A., 2005: Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). In *Food Chem. Toxicol.*, 2005, 43, 985–1015.

12. TADOLINI, B., CABRINI, L., 1990: The influence of pH on OH[•] scavenger inhibition of damage to deoxyribose by Fenton reaction. In *Mol. Cell Biochem.*, 1990, 94, 97–104.

13. TOMEČKOVÁ, V., STUPÁK, M., MOJŽIŠOVÁ, G., ŠUTOROVÁ, M., 2011: Porovnanie cytotoxického vplyvu pagaštanu a escínu na mitochondrie leukemických buniek *in vitro*. In: *INFOVET : veterinársky odborný a informačný časopis*, 2011, roč. 18, č. 4, s. 37–39.

14. TOMEČKOVÁ, V., ŠUTOROVÁ, M., REVICKÁ, M., MOJŽIŠOVÁ, G., STUPÁK, M., MAŠLANKOVÁ, J., 2013: Cytotoxický vplyv extraktu zo semena pagaštanu konského na pečňové mitochondrie *in vivo*. In *Farmaceutický obzor*, 2013, roč. 82, č. 4–5, s. 79–83.

Pre pacientov
SME NEVIDITEĽNÍ,
pre lekárov
NENAHRADITEĽNÍ

 **MEDIREX GROUP**
všetko pre vaše zdravie

- sme tu pre vás viac ako 10 rokov
- pôsobíme na celom Slovensku

- poskytujeme špičkovú laboratórnu diagnostiku
- zabezpečujeme komplexné služby
- opierame sa o medzinárodné skúsenosti

- zavádzame inovácie, sledujeme trendy
- podporujeme vzdelávanie, vedu a výskum

www.laboratornadiagnostika.sk



ITES Vranov, s.r.o.

...kvalita overená rokmi

www.ites.sk

**UŽ viac ako 20 rokov
prínášame riešenia
pre Vaše laboratória a interiéry:**

- laboratórny nábytok a digestory
- iný nábytok pre interiéry
- laboratórny spotrebný materiál
- prístrojová technika



Sme Vaším partnerom