

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

LIBEREC 2013

LUCIE JAŠKOVÁ

Prohlášení

Byl(a) jsem seznámen(a) s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím bakalářské práce a konzultantem.

Datum 30.4.2013

Podpis

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní obor: BIOMEDICÍNSKÁ TECHNIKA

Spektrofotometrická analýza antioxidantů in vivo

Spectrophotometric analysis of antioxidants in vivo

Autor: Lucie Jašková

Vedoucí práce: Prof. Ing. Aleš Richter CSc.

Konzultant: Doc. Ing. Jakub Wiener, Ph.D. Ing. Julie Volfová

Rozsah práce:

počet stran textu	počet obrázků	počet tabulek	počet grafů
52	5	5	7

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Prof. Ing Aleši Richtrovi za směrování mé bakalářské práce. Také konzultantce Ing. Julii Volfové, za její čas, který strávila při praktickém řešení vyhodnocování získaných dat. Konzultantovi Doc. Ing. Jukubu Wienerovi za rady ohledně teoretické části. Dále paní Bc. Magdaleně Mikulandové za část dat, které byly naměřené na její odborné klinice. Nemalý dík patří též Bc. Tereze Hromádkové za půjčení Biofotonického skeneru z její odborné praxe v preventivní medicíně. Dále děkuji své rodině za psychickou podporu.

Anotace

Tato práce se pokusí na základně vybrané analytické metody změřit antioxidanty u co největšího množství osob a statisticky vyhodnotit data. Cílem této práce je poukázat na souvislost, jakou mají antioxidanty s kvalitou lidského života a porovnat výsledky měření mezi Hl. m. Praha a Libereckém kraji, tedy jestli rozdíly v těchto regionech budou mít souvislost s hladinou antioxidantů jejich obyvatel.

Vybranou analytickou metodou je v našem případě spektrofotometrická metoda, Ramanova spektroskopie a měříme antioxidanty in vivo.

Klíčová slova: antioxidanty, oxidace, oxidační stres, karotenoidní antioxidanty, Ramanova spektroskopie

Annotation

This work attempts to measure antioxidants in the greatest number of people and statistically evaluate the dates. The aim of this work is to show the relationship that the antioxidants has with the quality of human life and to compare the results of measurements in the capital city Prague and Liberec region or whether the differences in these regions will be related to the antioxidant levels of their population.

The used method is based on Ramman spectroscopy and we measure antioxidants in vivo.

Key words: antioxidants, oxidation, oxidative stress, carotenoid antioxidants, Raman spectroscopy

Seznam použitých zkratk a symbolů

zkratka	význam
např.	například
apod.	a podobně
atd.	a tak dále
popř.	popřípadě
tzv.	takzvaně
tj.	to jest
ROS	reactive oxygen species
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ATP	adenosintrifosfát
SOD	superoxiddizmutáza
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
HDL	vysokodenzitní lipoprotein
OS	oxidační stres

Obsah

Úvod	9
TEORETICKÁ ČÁST	11
1 Antioxidanty a volné radikály	11
1.1 Oxidace	11
1.2 Oxidační stres	12
1.2.1 Energetická forma vytváření oxidačního stresu	13
1.2.2 Reaktivní forma vytváření oxidačního stresu	15
1.2.3 Metabolická forma vytváření oxidačního stresu	15
1.2.4 Udržení rovnováhy	16
1.2.5 Způsob hodnocení oxidačního stresu	17
1.3 Antioxidanty - klinická definice	19
1.3.1 Další rozdělení antioxidantů, takzvané funkční rozdělení ...	22
2 Karotenoidy a vitamin A (retinol)	23
3 Elektromagnetická spektroskopie	29
3.1 Ramanova spektroskopie	29
3.1.1 Teorie	29
4 Validita modelu detekce karotenoidů v kůži na základě Ramanovy spektroskopie	31
VÝZKUMNÁ ČÁST	32
Cíle bakalářské práce	32
1 Metody výpočtu závislosti	34
1.1 Korelační koeficient	34
2 Závislost hladiny karotenoidních antioxidantů a pohlaví	37
3 Závislost hladiny antioxidantů na věku	38
4 Faktory, které mohou ovlivnit hladinu antioxidantů	39
4.1 Závislost hladiny antioxidantů na regionu, ve kterém žijeme (srovnání Hlavní město Praha a Liberecký kraj)	39
4.2 Porovnání ovzduší v Libereckém kraji a v Praze	42
4.3 Rozdíly v mortalitě a morbiditě ve výše zmíněných regionech	43

4.4 Standardizovaná úmrtnost podle příčin smrti	44
4.5 Srovnání dat mezi jednotlivými regiony	48
Závěr	49
Seznam použité literatury a dalších zdrojů	50
Seznam obrázků	52
Seznam tabulek	52
Seznam grafů	52

Úvod

V současné době jsou antioxidanty novým trendem. Obecně se považují za velké pomocníky v preventivní medicíně a užívají se tedy i při plném zdraví, ve formě tablet nebo ovocných džusů. Přirozeně se vyskytují hlavně v ovoci. O antioxidantech kolují různé mýty. Některé je řadí mezi objev století a některé mezi marketingový podvrh. Faktem zůstává, že lidský organismus je denně vystaven množství škodlivých vlivů se kterými se musí vypořádat. Zejména pak ve vyspělých státech uspěchaný životní styl, nevhodné stravovací návyky a zhoršující se ovzduší přispěly výrazně ke snížení kvality života a právě antioxidanty by mohly být způsobem jak zmírnit negativní následky takového způsobu žití. Odvážné názory předpokládají, že antioxidanty zpomalují stárnutí a preventivně působí proti srdečním onemocněním a infarktu. Existují studie, které se tento názor pokusily potvrdit a ne všechny byly neúspěšné.

Většina těchto studií probíhala následovně: velkému množství subjektů se podávaly látky, které obsahovaly určitý druh antioxidantu. Tyto experimenty probíhaly dlouhodobě a studovaly se zdravotní změny na subjektech. Podle jedné studie například skupina subjektů užívající dlouhodobě beta-karoten trpěla méně kardiovaskulárními chorobami (viz. Tabulka 4).

V naší práci budeme postupovat obráceně, nejprve, u náhodně vybraných subjektů, změříme hladinu antioxidantů a poté data vyhodnotíme. Přitom nám nejde o rozdíly mezi jednotlivci, ale o rozdíly mezi kraji a to konkrétně Libereckým krajem a Prahou.

Pro měření antioxidantů jsme si vybrali spektrofotometrickou metodu, konkrétně na základě Ramanovy spektroskopie. Můžeme tak měřit antioxidanty *in vivo*. Tato metoda měření antioxidantů byla vyvinuta v Huntsman Cancer Institute University of Utah. Přístroj, který tuto metodu využívá, se nazývá Biofotonický skener a byl patentován tamtéž (validitu této metody rozebíráme v kapitole: Validita modelu detekce karotenoidů v kůži na základě Ramanovy spektroskopie).

Existují i další možnosti jak měřit antioxidanty (všechny pouze *in vitro* - v uměle vytvořených podmínkách laboratoře), tato metoda však poskytuje možnost změřit mnohem větší množství subjektů v krátkém čase, navíc se jedná o jedinou neinvazivní metodu.

Nechceme, aby byla naše data čímkoli ovlivněna, proto nejprve zjistíme závislost antioxidantů na pohlaví a také na věku měřených osob.

Dá se předpokládat, že největší závislost na antioxidantech by měl socioekonomický status a „životní styl“ měřené osoby (jestli jí pravidelně, nestresuje se v práci atd.) To však záměrně nezjišťujeme, protože chceme ukázat na rozdíl „zdravotní úrovně“ mezi Hl. m. Praha a Libereckým krajem. Mohlo by to být ale zajímavým předmětem dalších studií.

Co nás bude nejvíce zajímat je srovnání obyvatel jednotlivých krajů z hlediska zdraví. Budeme porovnávat mortalitu a morbiditu v krajích, prostor k životu i např. znečištění ovzduší, to vše jsou faktory, které obyvatele těchto krajů každý den ovlivňují a podílejí se na vytváření jejich celkového zdravotního profilu. Ten je potom vizitkou kraje jako takového (ze zdravotnického hlediska). Náš předpoklad je, že v kraji, který na tom bude s celkovým hodnocením výše uvedených faktorů lépe, bude i vyšší hladina antioxidantů u jeho obyvatel.

Pokud se tento předpoklad potvrdí, je možné, že by se měření antioxidantů mohlo stát novou objektivní metodou pro zjištění zdravotního stavu obyvatel, kdy síla důkazu je dána principy Evidence Based Medicine.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Antioxidanty a volné radikály

Termín antioxidant je hodně široký pojem. Budeme vycházet z definice, že antioxidantem je látka, schopná zabránit, zpozdit nebo odstranit oxidativní poškození cílené molekuly.[1] Antioxidanty mohou být složité enzymy jako například superoxiddismutáza (SOD) a peroxiredoxiny, nebo naopak jednoduché puriny jako kyseliny močové nebo tripeptid GSH (glutathion).

Většina organismů na zemi potřebuje ke svému přežití kyslík. Paradoxem je, že kyslík je velice reaktivní molekula. Při metabolických procesech v těle produkuje kyslík ROS (reactive oxygen species) schopné poškozovat buněčné složky jako DNA, proteiny a lipidy.[2] Antioxidanty buď zabraňují tomu, aby k takovému metabolickému procesu vůbec došlo, nebo odstraní ROS, aby nemohly poškodit buněčné složky.[2] Některé funkce ROS jsou však tělu prospěšné, proto je ideálním stavem pro tělo, pokud antioxidanty pouze udržují procesy v rovnováze. ROS zahrnují například peroxid vodíku a dále volné radikály jako ($\cdot\text{OH}$).[3]

1.1 Oxidace

Přítomnost kyslíku v atmosféře je pro živé organismy nezbytností. Jeden mol kyslíku, může vygenerovat až 3 moly ATP (adenosintrifosfát). Atomový kyslík se skládá z osmi protonů (s pozitivním nábojem) a osmi, devíti nebo deseti neutrony (bez náboje) - dohromady jsou nazývány nukleony. V přírodě existují 3 izomery kyslíku - s 16, 17 a 18 nukleony (^{16}O , ^{17}O , ^{18}O). Tyto 3 různé typy izomeru jsou v přírodě zastoupeny následovně – 99,76 % 0,04 % a 0,2 %. Přes tyto rozdíly v počtu nukleonů je počet elektronů (se záporným nábojem) kolem jádra vždy osm. Tyto elektrony rotují kolem jádra v 5 orbitalech (orbital je funkce popisující prostorové rozložení možného výskytu elektronu v elektronovém obalu) a každý element, který nemá všechny elektrony v páru,

ale naopak mu jeden elektron přebývá se nazývá volný radikál. Dalo by se tedy říci, že kyslík neustále „hledá“ další elektron ke spárování. A to je celá podstata oxidace.[4]

Na konci tohoto hledání se kyslík přemění na stabilní molekulu vody, ale do té doby projde mnoha chemickými reakcemi a každý mezikrok přemění kyslík na ještě reaktivnější molekulu. Komplexně se tyto produkty nazývají ROS (reactive oxygen species).

Je všeobecně známo, že kyslík je potenciálně toxický, což bylo zjištěno, když se používal pro stabilizaci předčasně narozených dětí, u kterých byla později opakovaně prokázána retrolentální fibroplazie[5] právě kvůli ROS. Termín oxidace se však rozšířil, zahrnující veškeré procesy, při nichž dochází ke ztrátě elektronu nebo atomu vodíku, který obsahuje právě jeden elektron, to vše samozřejmě za přítomnosti kyslíku. Takže všeobecně každá látka, která ztrácí elektron nebo atom vodíku obsahující jeden elektron, se oxiduje a každá látka, která takový elektron nebo atom vodíku přijme, se redukuje. Potenciální ničivé účinky kyslíku jsou však přímo vázány na ROS, které jsou mylně nazývány volné radikály. Definice volných radikálů jako látky, které jsou potenciálně škodlivé, by byla chybná, protože většina prvků z Mendělejevovy periodické soustavy prvků jsou volné radikály (85/103 prvků jsou volné radikály.) Možnost „se oxidovat“ je mnohem lepší vyjádření jejich vlastností než „toxicita“. Schopnost „se oxidovat“ je společná vlastnost mnoha substancí - lze je společně nazvat termínem RS (reactive species). RS jsou potom dále rozděleny na ROS, reactivechlorine species a reactivenitrogen species. Je ještě mnoho dalších RS, které značíme C·, L·, R· a povahy jsou uhlíkové (carbon), lipidové (lipid) nebo obecný radikál (genericradical). Uvnitř těla se však nejčastěji vyskytují právě ROS, které jsou považovány za nejdůležitější z řady RS.

1.2 Oxidační stres

Stav, který je označován za oxidační stres, je zapříčiněn nadměrou oxidací a nedostatkem antioxidační obrany. Oxidační stres je záležitost, která by v našem těle měla být pod kontrolou antioxidační obrany těla, kterou reprezentuje složitý systém prvků enzymatické i neenzymatické povahy. Existují tři formy vytváření oxidačního stresu: energetický, reaktivní a metabolický.

1.2.1 Energetická forma vytváření oxidačního stresu

Tato forma se váže k vytváření adenosintrifosfátu (ATP), který probíhá v mitochondriích. Průměrná kalorická hodnota pro funkce lidského těla je 2100 kcal (1 kcal = 1000 cal $\approx$ 4 185 J = 4,185 kJ). Minimálně 300 molů ATP je produkováno, aby splnily tuto základní lidskou potřebu (1 ATP = 7 kcal), k tomu je nezbytné alespoň 100 molů O₂. Z tohoto množství kyslíku vždy alespoň 1% unikne a vytvoří ROS, které poškozují okolní tkáň. Z uvedeného množství nejméně u 3 molů ROS probíhá následující reakce.

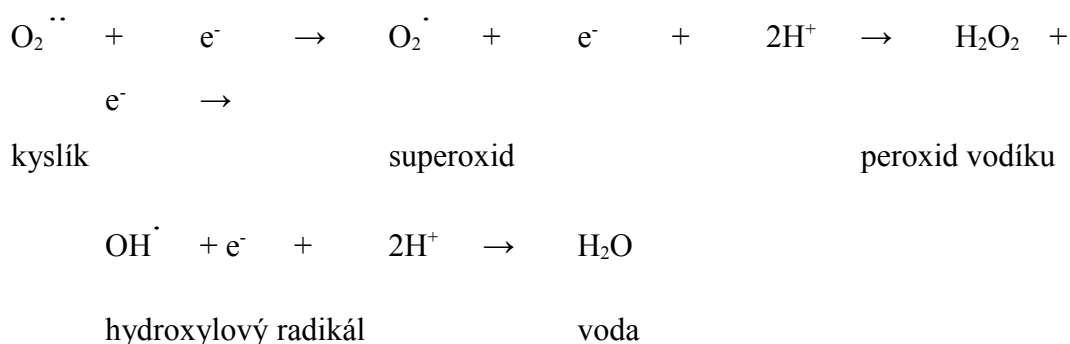


Schéma 1: Metabolismus kyslíku

K procesu ve schématu 1 jsou potřeba minimálně 4 e⁻. V každé fázi procesu se vytvoří ROS a ty můžou unikat a poškozovat okolní tkáň. Tento jev se nazývá „leakage” (únik) a je přímo úměrný množství tvorby ATP.

Tento proces probíhá pravidelně, jednotlivé kroky jsou urychlovány jak enzymatickými tak neenzymatickými prostředky, jak je uvedeno ve schématu 2.

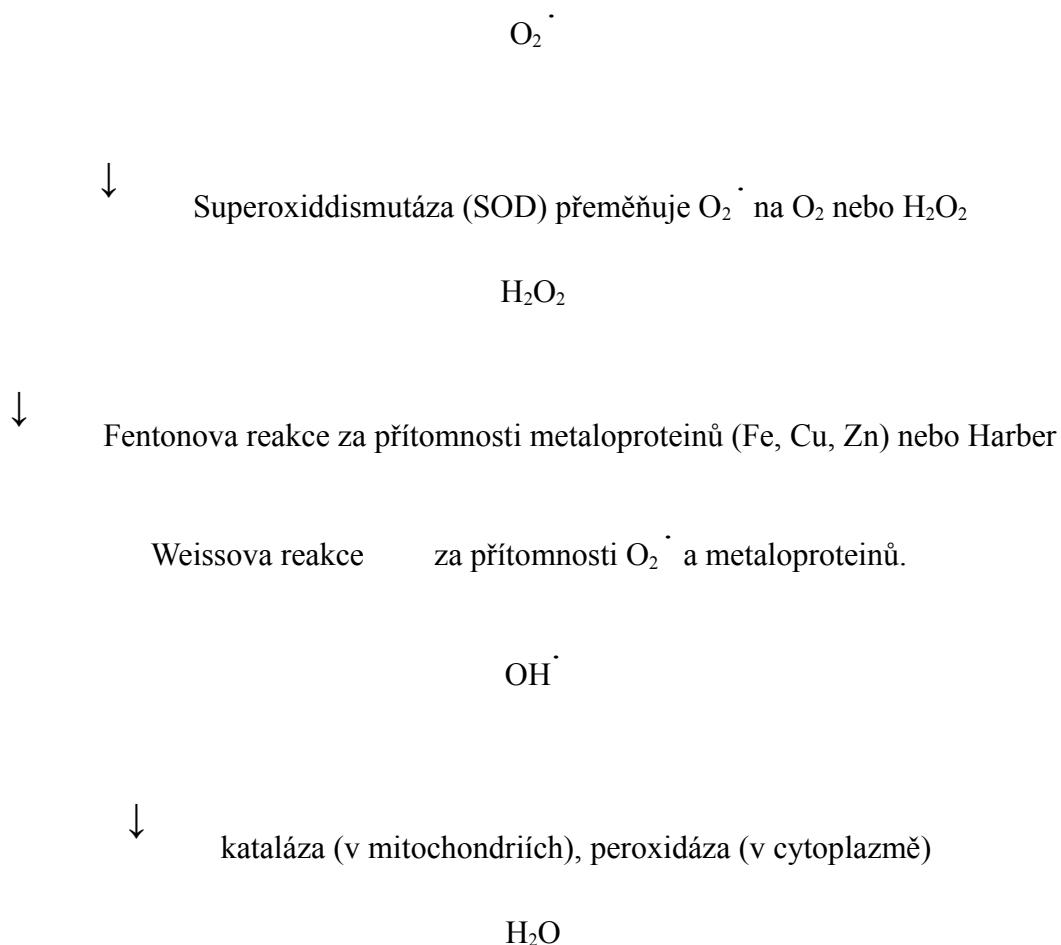


Schéma 2: Metabolismus kyslíku s přítomností urychlovačů

Nedostatek katalázy nebo peroxidázy může vést k tomu, že se hydroxylový radikál nakonec ve vodu nepřemění.

Jako příklad jsou pacienti s Downovým syndromem, kteří syntetizují velké množství superoxiddismutázy, protože kód pro její tvorbu je obsahem 21. chromozomu (podstatou Downova syndromu je trizomie 21. chromozomu), což dle schématu 1 a 2 vede i k tvorbě velkého množství H_2O_2 . Jenže zde nastává nepoměr. Tělo nevytváří stejně velké množství katalázy a peroxidázy a tím pádem není schopné přeměnit veškerý peroxid vodíku na vodu. Pacienti s Downovým syndromem jsou tak trvale pod oxidačním stresem.[6]

V každé z buněk, které produkují energii, dochází k oxidačnímu stresu v případě, že některý z enzymů nebo neenzymů, které provázejí metabolismus kyslíku, není dostatečný. První je oxidačním stresem postižena mitochondrie, dojde tak ke snížení

tvorby ATP. Bez dostatku ATP dochází k předčasnému stárnutí buňky nebo k apoptóze (programovaná buněčná smrt).

1.2.2 Reaktivní forma vytváření oxidačního stresu

Tento způsob vytváření oxidačního stresu se váže k takzvanému oxidačnímu vzplanutí. V případě napadení organismu virem nebo bakterií se stimulují obranné buňky těla (leukocyty, makrofágy) následně se aktivuje nikotinamidadenindinukleotidfosfát NADPH, který je přítomen v buněčné membráně a uvolní velké množství superoxidu. Po tom, co je superoxid (dle schématu 2) přeměněn na vodu, je za přítomnosti enzymu myeloperoxidázy a chloridového aniontu vytvořen chlornan. V kyselém prostředí se pak snadno syntetizuje hydroxilový radikál. Což je jeden z příkladů přeměny RS na ROS. Reaktivní prostředí vytváří ono oxidační vzplanutí, produkuje se velké množství RS i ROS, které společně s proteázami (skupina enzymů, které štěpí bílkoviny) působí na tkáň destruktivně.

Tento způsob vytváření oxidačního stresu je velice častý například u pacientů s hypertenzí (vysoký krevní tlak) nebo vysokým cholesterolem (tedy více než 6,18 mmol/l krve).

1.2.3 Metabolická forma vytváření oxidačního stresu

Existuje mnoho metabolických reakcí, které mohou generovat superoxid. Nejběžnější je přeměna kyseliny arachidonové (esenciální mastná kyselina) v prostaglandin, nebo syntéza noradrenalinu z dopaminu. Dále pak při kaskádě přeměn, jejichž konečným produktem je kyselina močová a to z purinu xantinu. Tato přeměna probíhá díky enzymu xantinoxidáze. Poslední zmíněná reakce je považována za příčinu reperfučního poškození.[7] Všechny tyto reakce potřebují kyslík, aby mohly probíhat. Během ischemie, kdy je prokrvenost tkáně menší, je snížen i přísun potřebného kyslíku. Dochází tak ke hromadění hypoxantinu. Když se kyslík do tkáně vrátí, nastává masivní produkce oxidačního stresu. Bohužel jsou na oxidační stres mnohem citlivější antiproteázy (antikoagulační enzymy), jako například trombin, a důsledkem je pak

tvoření trombů (krevních sraženin). Oxidační stres tedy zvyšuje krevní srážlivost a zvyšuje tak riziko ischemických chorob. Tento jev se vyskytuje ve zvýšené míře u žen užívající perorální formu antikoncepce.

1.2.4 Udržení rovnováhy

Všechny tři výše popsané děje jsou pro organismus důležité, a i když dochází k oxidačnímu stresu, bylo by nebezpečné tyto procesy měnit. Jakkoli je oxidace pro tělo důležitá, je nezbytné udržovat určitou hladinu antioxidantů, aby nedocházelo k nadměrnému poškození tkáně (v nejlepším případě, aby nedocházelo k poškození vůbec).

Většinou je OS (oxidační stres) dočasný stav, ale v případě že je konstantní, může vyvolávat řadu onemocnění. Dlouhodobé působení oxidačního stresu může vážně poškodit tkáně jako lipidy, DNA, proteiny a to při nerovnováze mezi oxidačním stresem a antioxidační ochranou. Jedná se o enzymatické i neenzymatické oxidanty, které svou efektivitu uplatňují v místě, kde intenzivně probíhá tvorba RS a ROS.

Několik příkladů pro snadnější orientaci.

Procollagen musí projít oxidací, aby se z něj stal kolagen. Během oxidace se zbytkový lysin (jedna z bazálních aminokyselin) přeměňuje na allysin, který tvoří "přemostění" mezi dvěma řetězci procollagenu. V případě oxidačního stresu se více lysinu přeměňuje na allysin a tvoří se příliš mnoho přemostění procollagenu a výsledkem je tuhý a neelastický kolagen.

V tomto případě antioxidanty "hlídají" reakci a umožňují efektivní výrobu kolagenu.

Na druhou stranu je někdy oxidace obranná reakce organismu proti virům a bakteriím, a pokud antioxidanty tento proces zastaví, může nastat vážný zdravotní problém. Některé bakterie nebo metastatické buňky chrání sami sebe účinným systémem antioxidantů. Je všeobecně známo že makrofágy používají jako obranný mechanismus antioxidační vzplanutí (viz. reaktivní forma vytváření oxidačního stresu), ale tato reakce může poškozovat endotel, což přispívá k tvorbě aterosklerózy. Tento rozpor vyvolal v jednu chvíli vlnu odporu vůči umělému doplňování antioxidantů, protože mohou narušit obranný oxidační proces těla. Došlo k mnoha klinickým

výzkumům a vědeckým studiím, které se zaměřovaly na nejznámější typy antioxidantů (vit. C, E, β -caroteny, flavonoidy). Některé výsledky byly pozitivní, některé negativní. Zatím ale obecně převládá názor na prospěšnost antioxidantů lidskému tělu. Stejně tak se liší postoj veřejnosti k antioxidantům. Faktem ale zůstává, že antioxidanty by měli být doplňovány v případě zvýšeného rizika chronických onemocnění. Oxidační stres bývá příčinou mnoha nemocí a rakovina, diabetes, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění patří mezi nejčastější. Ale pravda je, že mnoha onemocněním je vlivem oxidačního stresu též zabráněno.

Kvůli znečištěnému ovzduší je mnoho vnějších vlivů, jako například přemíra CO_2 a O_3 ve vzduchu. Tyto látky jsou aktivní „partneři“ oxidačního stresu a udržují hladinu oxidačního stresu zcela mimo kontrolu. Navzdory těmto poznatkům, nebyla hladina oxidačního stresu nikdy měřena v rámci epidemiologické studie. V těchto podmínkách je těžké stanovit platný závěr o účincích antioxidantů na zdravotní stav. Nikdo by nedoporučil pacientovi s normálním krevním tlakem antihypertenziva a zároveň tyto léky každý lékař doporučí, pokud pacient bude trpět hypertenzí. Nemělo by smysl dát léky proti vysokému krevnímu tlaku všem, s tím, že někdy pomůžou (pacientům s vysokým krevním tlakem) a někdy uškodí (pacientům s normálním krevním tlakem). Tento fakt vede k závěru, že je nutné určit hladinu oxidačního stresu.

1.2.5 Způsob hodnocení oxidačního stresu

Tab. 1: Některé z nejběžnějších metod a látek pro určení oxidačního stresu

Metoda (zkratky pocházejí většinou z anglických názvů sloučenin, které se tímto způsobem získávají)	Látka nebo vlastnost, která je metodou zjištěna	kategorie
DNA	Deoxyribonukleová kyselina	1
SPC	Serum protein carbonyls	1

LHP	Peroxidované lipidy – v rámci testu stanovující reaktivní kyslíkové metabolity	1
TBARS	Reaktivní složky kyseliny thiobarbiturové	1
LNO ₂	Nitrolinoleate	1
MDA	Melanodialdehyd	1
4-HNE	4-Hydroxynonenal	1
IsoPs	F ₂ /D ₂ /E ₂ isoprostan	1
F neuroPs	F ₃ /F ₄ isoprostan	1
ONOO	Peroxinitrit	2
PTN	Alpha-phenyl-N-tert-butylnitron	2
AHS	Aromatická hydroxylace salicinu	2
TRAP	Celková antioxidační kapacita peroxidových radikálů	3
TOSCA	Celková kapacita kyslíkových radikálů	4
UA	Kyselina močová	4
UAM	Allantoin	4
TEAC	Trolox	4
FRAP	Schopnost železa se redukovat	4
ORAC	Schopnost absorbance kyslíkových radikálů	4
DMPD	N, N-dimethyl-p-fenylendiamin	4
DPPH	1,1-difenyl-2-	4

	picrylhydrazyl	
TRX	Thioredoxin and glutaredoxin	4

Pro určení hladiny oxidačního stresu existuje alespoň sto různých způsobů. Některé jsou experimentální, některé klinicky ověřené. Pro zjednodušení shrneme 4 kategorie testů oxidačního stresu:

1. Stanovení látek, které prošly oxidací RS. Stanovení může probíhat z krve, z plasmy i z moči. V Tabulce 2 jsou označeny číslem 1.
2. Stanovení pomocí metody „spinstrap“. Jsou to látky různé chemické struktury, schopné zachytit RS. Určí rezonanci elektronového spinu, což je paramagnetický signál pocházející z nepárového elektronu. Spinstrap musí být podávána opatrně kvůli možné toxicitě. Proto se využívají převážně experimentálně. V Tabulce 2 jsou označeny číslem 2.
3. Stanovení pomocí látek, které jsou v kontaktu s RS fluorescenční nebo luminiscenční. Tyto testy mohou být používány pouze ex vivo. V Tabulce 2 jsou označeny číslem 3.
4. Stanovení antioxidačních vlastností krve. V Tabulce 2 jsou označeny číslem 4.

Neexistují žádné srovnávací studie těchto metod u lidí. V důsledku toho je těžké stanovit, která metoda je pro daný případ ideální. Podobný problém nastává u měření antioxidantů. Dosud nejsou žádné testy uznávány jako standard.

1.3 Antioxidanty - klinická definice

V mnoha případech jedinci, kteří trpí oslabením organismu z důvodu nemoci nebo například menopauzy mají jako průvodní jev zvýšenou hladinu oxidačního stresu. Jakmile subjekt podstoupí terapii, oxidační stres mizí. Produkt, který oxidační stres zastavil, je tedy antioxidantem. Lze uvést definici antioxidantů, která říká, že

antioxidantem je substance, která zastavuje oxidaci in vitro a snižuje oxidační stres in vivo. Typické sloučeniny s touto charakteristikou jsou některé vitaminy, např. vitamin C a E. Určité množství antioxidantů přijímáme s potravou. Aby se prokázala účinnost jednotlivých separovaných antioxidantů na oxidační stres v lidském těle, musely by se požívat naprosto samostatně, což není možné. Důležité je uvědomit si, že antioxidanty, které jsou přijímány s potravou, jsou kombinací mnoha různých látek a činnost, kterou v těle působí, je součtem jejich účinků. Jsou tak mnohem efektivnější, než kdyby byly podávány každý zvlášť - což je stejně nemožné.

V závislosti na účincích in vitro (v uměle vytvořených podmínkách laboratoře) a hojnosti každé třídy se jako nejúčinnějšími antioxidanty prokázal náš endogenní antioxidační systém, který je v těle aktivován v případě potřeby. Klasické příklady této kategorie jsou katalázy a peroxidázy. Další na řadě v účinnosti jsou antioxidanty nazývané „shockabsorbants“, nacházejí se jak v krvi, tak ve tkáni, ale na rozdíl od první kategorie není jejich tvorba podmíněna oxidací. Patří sem albumin, transferin a např. kyselina močová. Další kategorii, v pořadí podle účinnosti třetí, tvoří základní (a veřejnosti nejznámější) antioxidanty: vitaminy, stopové prvky, aminokyseliny a látky vyráběné jako meziprodukty některých složitějších molekul, např. během syntézy cholesterolu nebo části složitějších makromolekul (koenzymu Q10 a částí cytochromů). Čtvrtá kategorie se skládá z přírodních sloučenin, jako jsou karotenoidy (kterých je asi 600) a flavonoidy/polyfenoly (kterých je asi 6000). Obecně lze říci, že první kategorie je, co se účinnosti v potlačení oxidace týče, nejúčinnější, zatímco čtvrtá kategorie je účinná nejméně. Musíme však brát v potaz fakt, že jak karotenoidy, tak flavonoidy jsou součástí mnohem složitějších sloučenin a jejich účinnost v těchto případech geometricky stoupá.

Dále se antioxidanty mohou dělit do 2 kategorií podle jejich rozpustnosti v tucích nebo ve vodě. Rozpustné v tucích se vyskytují hlavně na membránách (buď buněčných, nebo lipoproteinových). Například vitamin E (rozpustný v tucích) má afinitu převážně s lipoproteiny a na druhou stranu, vitamin C (rozpustný ve vodě) cirkuluje volně, s minimální vazbou na proteiny.

Tab. 2: Výběr z nejdůležitějších klinických/epidemiologických studií, které proběhly a zabývaly se antioxidačními kombinacemi v potravinách.

Studie	Trvání [roky]	Počet zúčastněných osob	Výsledek studie
HPFS (užívání vit. E, karotenoidy a vit. C)	3,5	39 910 mužů	Snížení výskytu ischemické choroby srdeční.
ARIC (angl. zkratka pro: Ateroskleróza a její riziko ve společnosti)	11	13 136 mužů i žen	Snížení cholesterolu, studie prokázala, že řízení hypertenze může zlepšit prognózu aterosklerózy.
ATBC (studie o prevenci rakoviny užíváním 4,α-tocopherol a Beta-karoten. Pacienti užívající vit. E nebo umělé doplňky obsahující Beta-karoten byli ze studie vyloučeni)	6,1	29 133 mužů i žen	Doplněním 4,α-tocopherol a Beta-karotenu se u kuřáků výskyt rakoviny plic nesnížil.
AHS (angl. Zkratka: Zdravotní studie)	6	30 516 mužů i žen	Konzumace ovoce působí jako prevence proti rakovině plic.
ATBC (studie o prevenci rakoviny užíváním 4,α-tocopherol a Beta-karoten. Pacienti užívající vit. E nebo umělé doplňky obsahující Beta-karoten byli ze studie vyloučeni)	6,1	4 739 mužů	Zvýšený příjem vlákniny (průměrně 34,8 g/d) snižuje riziko výskytu infarktu myokardu.

CNBSS (Kanadská studie zabývající se screeningem rakoviny prsu)	13	56 837 žen	Souvislost mezi užíváním karotenoidních antioxidantů a sníženým výskytem rakoviny nebyla prokázána.
---	----	------------	---

1.3.1 Další rozdělení antioxidantů, takzvané funkční rozdělení

Membránové antioxidanty

Zastoupeny vitaminem E, Beta-karoteny, vitaminem A. Jsou také známé jako lipofilní antioxidanty. Mají silnou afinitu k membránám buněk a lipoproteinům.

Cirkulující antioxidanty

Zastoupeny vitaminem C, aminokyselinami a polyfenoly. Známé jsou také jako hydrofilní antioxidanty. V krevním řečišti cirkulují volně.

Cytosolové antioxidanty

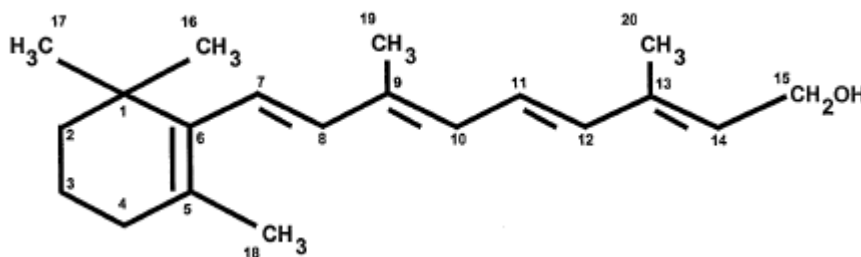
Jsou produktem buněk. Členy této skupiny jsou kyselina lipoová, skvalen, koenzym Q10. Jsou meziprodukty při tvorbě složitějších mikro a makromolekul.

Systémové antioxidanty

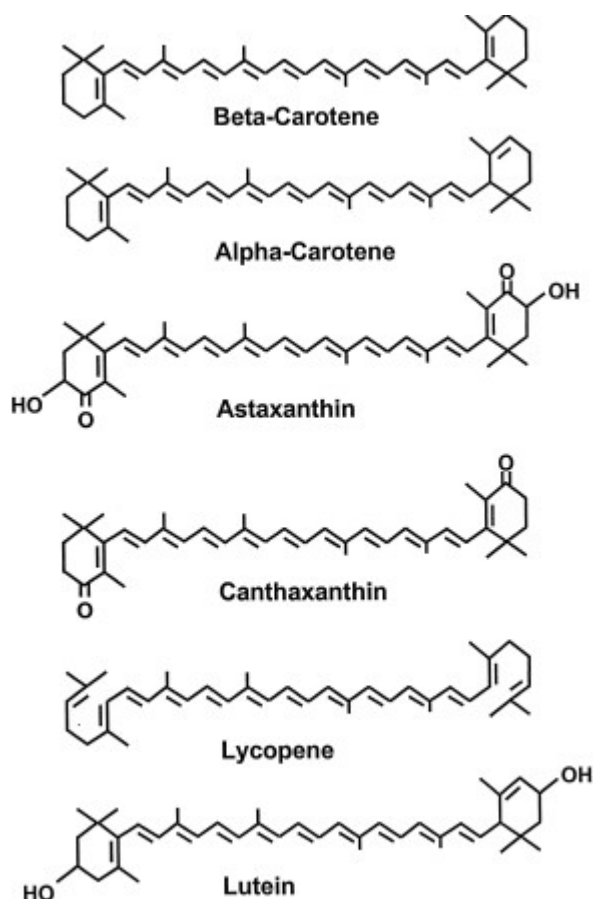
Stopové prvky (Se, Zn), aminokyseliny (l-cystein).

2 Karotenoidy a vitamin A (retinol)

Karotenoidy jsou svou strukturou podobné vitaminu A a do této skupiny patří přibližně 600 sloučenin. Asi 50 z nich je provitaminem A (tzn. že látka není vitamin, ale tělo je schopno si z ní tento vitamin syntetizovat). Karotenoidy a vitaminu A jsou známé pro svou účinnost v boji proti srdečním chorobám. Antioxidační potenciál vitaminu A a karotenoidů poprvé popsali Monaghan and Schmitt [8], kteří zjistili, že obojí chrání lipidy proti žluknutí (žluknutí je oxidace tuků). Ale až následná studie Butona a Ignolda [9] v roce 1984 ukázala mechanismus, kterým karotenoidy brání v aktivitě ROS. Následoval 15 letý intenzivní výzkum, který odhalil jejich prospěšnost v boji proti různým chorobám.



Obr. 1: Struktura vitaminu A



Obr. 2: Struktury běžných karotenoidů, nejčastěji se vyskytujících v potravinách.

Hlavními karotenoidy v lidské plazmě jsou: alfa a beta-karoten, lycopene, cryptoxantin a lutein, které jsou téměř výhradně vázány na lipoproteiny (LDL 75 % a HDL 25 %). Pokud jde o celkové zásoby karotenoidů v organismu, největšími orgány na skladování jsou játra a poté tuková tkáň. Příjem karotenoidů v potravě se mezi jednotlivci výrazně liší. Závisí na pohlaví, věku, socioekonomickém statusu, regionu, ročním období apod. Konkrétní příklady uvádíme v druhé části této práce. Skvělým zdrojem vitamínu A a karotenoidů jsou mléčné výrobky (mléko, sýry, máslo, margarín), dále zelenina (brambory, mrkev, špenát, brokolice, rajčata, dýně), ryby, vejce a vnitřnosti (játra, ledviny). Doporučená denní dávka vitamínu A je 1000 RE (retinol equivalents) pro dospělé a 375 až 700 pro děti (National Academy of Sciences, US Food and Nutrition Board). 1 RE odpovídá 1 mg retinolu a 6 mg beta-karotenu. V současné době neexistují žádná doporučení, týkající se non-provitaminů a karotenoidů.

Beta karoten zastává 50 % biologické aktivity vitamínu A. Dokonce je u lidí přepočítán koeficient pro beta-karoten na retinol - 6:1. [10] Karotenoidy, stejně jako

vitamin A, mají silnou oxidační schopnost, “zneškodňují” singletový kyslík i peroxidový radikál. Singletový kyslík je excitovaný stav molekuly kyslíku. Je nestabilní, vysoce reaktivní a může poškodit tkáň. “Úklid” singletového kyslíku může nastat dvěma způsoby. Buď fyzický přenos excitační energie singletového kyslíku na karotenoid, s následným odvodem této energie ve formě tepla bez souběžné ztráty molekuly karotenoidu. Nebo následkem chemické reakce, která proběhne mezi singletovým kyslíkem a pigmentem karotenoidu, přičemž dojde k zániku pigmentu. Některé studie ukazují, že singletový kyslík může být úzce spojen se snížením srdeční kontraktilní funkce.

Zatímco míra škodlivosti singletového kyslíku je zatím jen předmětem diskuzí, škodlivost peroxidových radikálů je všeobecně přijímána. Paradoxně není zcela jasné, jakým způsobem karotenoidy peroxidový radikál zneškodňují. Jedna z verzí mluví o tom, že karotenoidy naváží peroxidový radikál a vytvoří tak stabilnější molekulu.

Tab. 3: Výběr epidemiologických studií zabývajících se vztahy mezi Vitaminem A, karotenoidy a nemocemi srdce.

Studie	subjekty	Délka studie	Pozorovaný výsledek studie
Nurses Health Professionals Study	87.245 žen 34-59 let	8 let	Beta-karoten a vitamin A souvisí s nižším výskytem ischemické choroby srdeční.
Israeli dietary monitoring	Údaj chybí	28 let	Přijímání vyšších dávek vitaminu A souvisí s nižším výskytem ischemické choroby srdeční.

Massachusetts Based Study	1.299 starší věk	Jednorázová studie	Více beta-karotenu v plazmě významně korelovalo s nižším výskytem srdečních příhod.
European Multicentered Study	1.410 objektů Věk < 70 let	Jednorázová studie	Vyšší koncentrace beta-karotenu v tukové tkáni významně korelovalo s nižším výskytem infarktu myokardu, zejména u silných kuřáků.
Prospective Basal Study Switzerland	3.000 mužů Střední věk 50,9 let	12 let	Nízká koncentrace karotenů v plazmě výrazně zvyšuje riziko ischemické choroby srdeční a mozkové mrtvice. Podobný efekt nebyl prokázán u vitamínu A
Washington County Hospital Based Study	125 subjektů Pod neustálým dohledem 35-64 let	Jednorázová studie	Vyšší koncentrace luteinu a beta-karotenu v plazmě je spojen s nižším výskytem infarktu myokardu, ale pouze u kuřáků.

Western European and Non-European Countries	Muži < 65 let	17 let	Vyšší příjmy beta-karotenu v potravě souvisí s nižším rizikem úmrtí v důsledku kardiovaskulárních chorob.
Lipid Research Clinic Prevention Trial and Follow Up Study	1.899 subjektů 40-59 let	13 let	Snížená hladina beta-karotenu v tukové tkáni souvisí se zvýšeným výskytem ischemické choroby srdeční. Zvláště u kuřáků.
Western Electric Study Chicago	1556 mužů 40-55 let	24 let	Zvýšený příjem beta-karotenu souvisí se sníženým výskytem ischemické choroby srdeční.
Dermatology Practices Based Study	1730 subjektů Střední věk 63,2 let	8,2 let	Zvýšený příjem beta-karotenu souvisí se sníženým rizikem kardiovaskulárních onemocnění.
Spain Based Study	62 subjektů pod stálým dohledem 30-70 let	Jednorázová studie	U subjektů po infarktu myokardu byla zjištěna snížená hodnota vitamínu A v plazmě.
Edinburgh Based Study	6.000 mužů 35-64 let	Jednorázová studie	Vyšší příjem beta-karotenu snižuje riziko anginy pectoris. Neprokázáno u vitamínu A.

Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC)	11.307 subjektů 45-64 let	Jednorázová studie	Zvyšující se příjem karotenoidů je u starších lidí nepřímo úměrný zužování cév.
---	------------------------------	-----------------------	---

3 Elektromagnetická spektroskopie

Zkoumá, jak se u elektromagnetického záření mění intenzita záření s vlnovou délkou při průchodu prostředím (absorpční spektrum), odrazu na rozhraní dvou prostředí (reflexní spektrum) nebo vyzařování světla prostředím (fluorescenční spektrum). Spektroskopie neinvazivně a nedestruktivně získává informace o dané látce.

3.1 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je druh spektroskopie, využívající molekulární vibrace. Díky tomu není potřeba velké množství vzorku a je pro vzorky zcela nedestruktivní. Je schopna kvalitativní analýzy i pomáhat při kvantitativní analýze. Dokonce je hojně využívána v oblasti mimo fyzikální vědy, např. v archeologii.

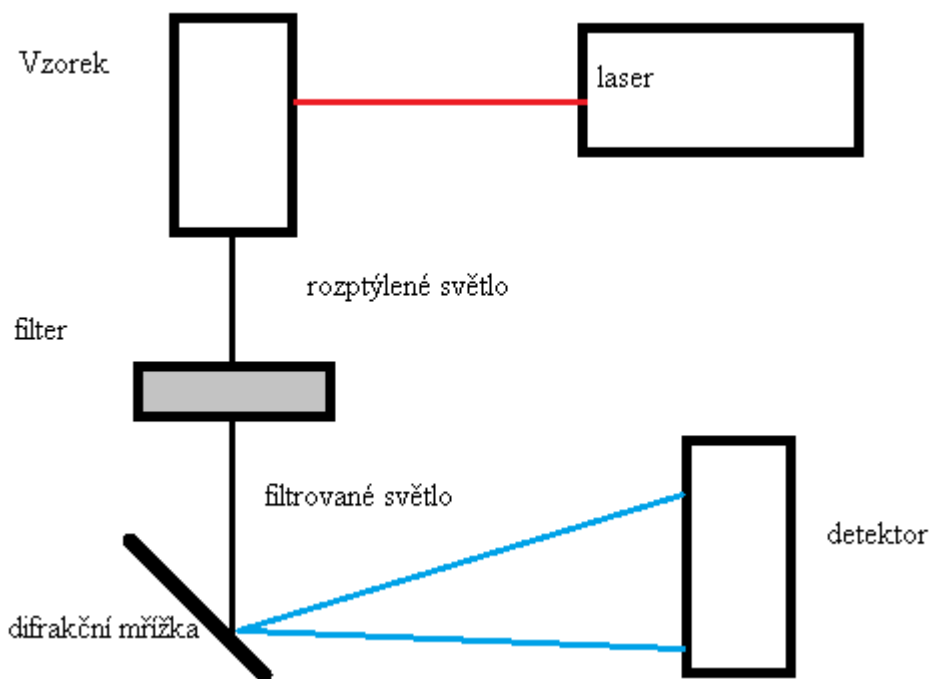
3.1.1 Teorie

Ramanova spektroskopie je založena na rozptylu záření tzv. Ramanově rozptylu, který popsal v roce 1928 sir Chandrasekhara Venkata Raman. V roce 1930 získal za tento objev Nobelovu cenu. Ramanův rozptyl je základem hned dvou Ramanových technik. Normální a rezonanční. Ramanova spektroskopie začala však být plně využívána až v 60. letech 20. století s příchodem laserových technologií. K rozvoji v této oblasti přispěla zejména rezonanční Ramanova spektroskopie. Tato technika je v porovnání s normální Ramanovou spektroskopií více selektivní. Funguje tak, že působí na vzorek zářením, které odpovídá absorpčnímu pásu. Emisní zesílení je tak až o 10^6 vyšší než u normální (nerezonanční) spektroskopie.

Molekula musí mít deformovatelný elektronový obal vlivem vnějšího elektrického pole (polarizovatelnost). Čím víc má molekula elektronů, tím se obecně zvyšuje její polarizovatelnost. Polarizovatelnost (α) je součinitelem úměrnosti mezi lokálním elektrickým polem (E) a indukovaným elektrickým dipólovým momentem (p). Matematicky lze tento vztah vyjádřit takto:

$$p = \alpha \cdot E$$

V Ramanově spektru je intenzita absorpčních pásů úměrná druhé mocnině změny polarizovatelnosti během vibračního pohybu, zatímco v infračerveném spektru je úměrná druhé mocnině změny dipólového momentu.



Obr. 3: Schéma Ramanovy spektroskopie

Na tomto jednoduchém schématu (viz. Obr. 3) je znázorněn princip Ramanovy spektroskopie. Vzorek je ozářen monochromatickým světlem laseru. Toto světlo se po styku se vzorkem rozptýlí. Rozptýlené světlo prochází přes filtr. Filtrované světlo pak narazí na difrakční mřížku a zachytí se na detektoru. Toto zapojení je jak pro rezonanční tak normální Ramanovu spektroskopii.[12] [13][14]

4 Validita modelu detekce karotenoidů v kůži na základě Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie je rychlá objektivní a neinvazivní optická metoda pro detekci karotenoidů v lidské tkáni in vivo. Kromě toho, že karotenoidy jsou aktivní antioxidanty, jak již bylo popsáno dříve, zároveň snižují fototoxicitu UV záření. V oblasti sítnice, mohou karotenoidy zabránit nebo oddálit nástup degenerace související se stárnutím. Tu samou službu prokazují, pokud jsou ve vyšší koncentraci v kůži a pravděpodobně působí jako prevence proti kožním nádorům. Karotenoidy se vyskytují ve vysokých koncentracích v ovoci a zelenině a jsou takto přijímány ve stravě. Hladina karotenoidů v kůži může být objektivní biomarker pro jejich nedostatek ve stravě. Před tím, než byla tato optická metoda akceptována jako objektivní metoda pro měření karotenoidů, používala se metoda HPLC (high-performance liquid chromatography) což je zkratka pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Díky Ramanově rozptylu mělce proniká modro/zelené excitační světlo pod kůži, což umožňuje detekci karotenoidů. Značný útlum světla je kvůli kombinované absorpci kolagenu, hemoglobinu, melaninu a chromoforů.[11]

VÝZKUMNÁ ČÁST

Cíle bakalářské práce

Ve druhé části této práce se zaměříme na prezentaci a analýzu výsledků měření karotenoidních antioxidantů. Cílem této části bakalářské práce je

1. Zjistit závislosti mezi hladinou karotenoidních antioxidantů, pohlavím a věkem.
2. Zjistit závislost mezi hladinou antioxidantů subjektů a místem jejich bydliště. Kvůli rozsahu práce a množství naměřených dat budeme porovnávat Prahu a Liberecký kraj. Do této části zahrneme i zprávu o zdraví výše zmíněných krajů. Pokusíme se zjistit, zda hladina antioxidantů souvisí se stupněm znečištění a životním stylem, který se ve výše zmíněných krajích mírně liší.
3. Zjistit závislosti mezi hladinou antioxidantů a morbiditou a mortalitou v regionech.

Pro zjištění hladiny karotenoidních antioxidantů jsme použili Biofotonický skener, který na základě Ramanovy spektroskopie (viz teoretická část) měří hladinu karotenoidních antioxidantů in vivo. Schéma Biofotonického skeneru ani jeho přesný popis v této práci neuvádíme, protože se jedná o patent a dle zákona č. 478/1992 Sb. o užitných vzorech ve znění zákona č. 116/2000 Sb. je tedy předmětem právní ochrany. Měření karotenoidních antioxidantů pomocí Ramanovy spektroskopie in vivo je validní metoda, která je podrobněji rozebírána v teoretické části (viz. validita modelu detekce karotenoidů v kůži na základě Ramanovy spektroskopie).

Hladinu karotenoidních antioxidantů jsme u subjektů měřili z dlaně ruky. Pokožka dlaně ruky je bohatá na epidermální lipidy i pojivovou tkáň, proto je poměrně silná. Dále neobsahuje chloupky ani maz s lipidy, který váže vlhkost. Nejdůležitějším faktorem je, že pokožka na dlaních neobsahuje melanocyty, tedy buňky vytvářející pigment. Díky tomu je ideálním místem pro měření na základě Ramanovy spektroskopie.

Počet testovaných osob: **632**

U subjektů jsme zjišťovali

- Hladinu karotenoidních antioxidantů (Vyjádřeno v řádech - nejnížší naměřená hodnota 10 000, nejvyšší 87 000. Průměrnou hodnotu neuvádíme, protože přístroj vyhodnocuje hodnoty pod 10 000 za neměřitelné a nepřesné. Hodnoty jsou uváděny jako počet karotenoidních jednotek na plochu tkáně. Pro naše studie jsou to postačující hodnoty, protože přesně ukazují rozdíly mezi subjekty. Chybovost přístroje nelze uvést kvůli právní ochraně. Tento nedostatek jsme se pokusili nahradit velkým množstvím testovaných osob, aby byly výsledky co nejpřesnější.)
- Věk (nejnížší věk testované osoby - 2 roky, nejvyšší věk - 93 let)
- Pohlaví (oboje zastoupeno)
- Místo trvalého pobytu (pouze Praha nebo Liberecký kraj)

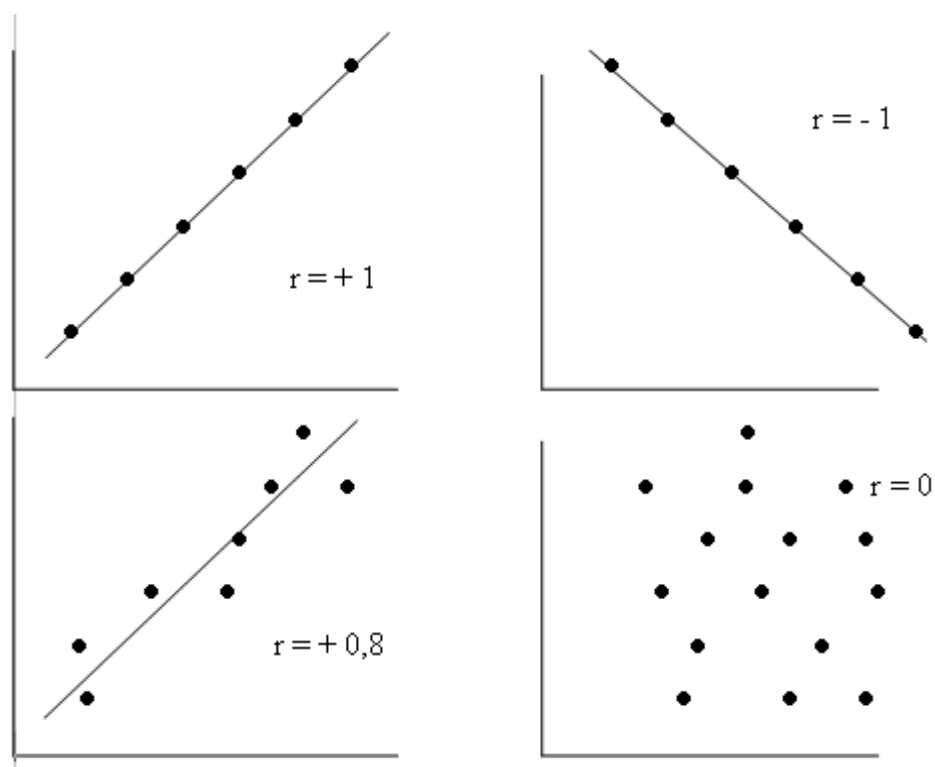
1 Metody výpočtu závislosti

Pro určení závislosti jsme použili korelaci mezi daty.

1.1 Korelační koeficient

„Nejjednodušším vztahem dvou metrických proměnných je vztah lineární, jehož míru lze zjistit korelačním koeficientem.

Lineární závislost dvou statistických lze postihnout vynesemím proměnných do grafu. V případě korelace nestanovujeme rovnici přímky závislosti (to je úlohou lineární regrese), ale můžeme si přímku představit jako vyjádření lineárního vztahu a z odchylek bodů od přímky pak odhadnout míru tohoto vztahu.”



Obr. 4: Lineární závislosti hodnot

„Korelační koeficient nabývá hodnot od -1 do $+1$, které značí perfektní lineární vztah (záporný nebo kladný).“

- V případě kladné korelace hodnoty obou proměnných zároveň stoupají.
- V případě záporné korelace hodnota jedné proměnné stoupá a druhé klesá.
- V případě neexistence lineárního vztahu $r = 0$

Výpočet korelačního koeficientu

„Výpočet se liší podle typu zkoumaných statistických proměnných. V případě, že náhodné veličiny X a Y jsou kvantitativní náhodné veličiny se společným dvourozměrným normálním rozdělením, je pro konkrétní hodnoty (x_1, y_1) , (x_2, y_2) , ... (x_n, y_n) výběrový korelační koeficient dán vztahem“

Pearsonův korelační koeficient

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

„Součty čtverců ve jmenovateli jsou $n-1$ násobkem výběrových rozptylů. Proto se často setkáváme s jednodušším vyjádřením Pearsonova korelačního koeficientu.

$$r = \frac{s_{xy}}{s_x s_y}$$

Kde s_x je směrodatná odchylka proměnné X , s_y směrodatná odchylka proměnné Y a s_{xy} takzvaná kovariance proměnných X a Y “

$$s_{xy} = \frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

„Správná interpretace Pearsonova korelačního koeficientu předpokládá, že obě proměnné jsou náhodné veličiny a mají společné dvourozměrné normální rozdělení. Potom nulový korelační koeficient znamená, že veličiny jsou nezávislé. Pokud není splněn předpoklad dvourozměrné normality, z nulové hodnoty korelačního koeficientu nelze usuzovat na nic víc, než že veličiny jsou nekorelované.”[18]

V našem případě jsme však pro výpočet korelačního koeficientu použili nástroje statistické analýzy a to funkci CORREL.

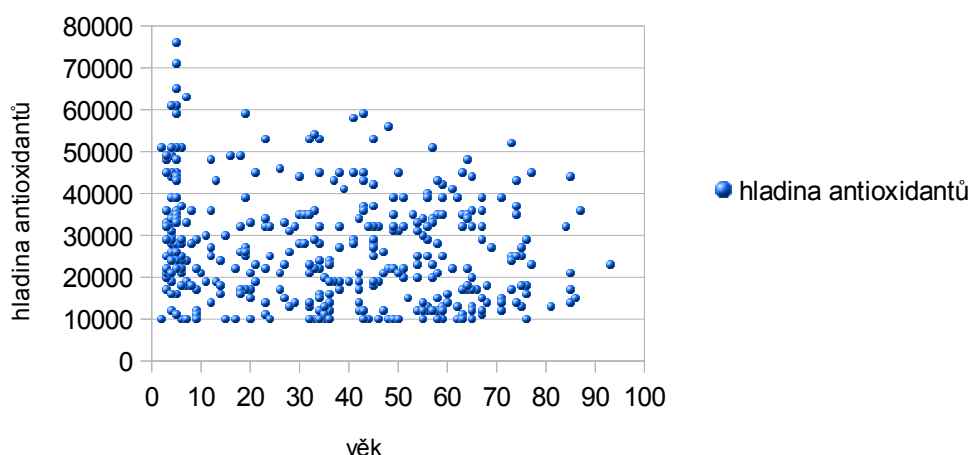
2 Závislost hladiny karotenoidních antioxidantů a pohlaví

Ačkoli obecně statistiky vypovídají o tom, že zdravý životní styl je doménou žen, naše analýza to nepotvrdila. Subjekty byly vybírány náhodně a jejich počet je, co se týče obou pohlaví, zastoupen zcela rovnoměrně. Korelační koeficient poměru dat hodnoty antioxidantů a pohlaví má v naší analýze hodnotu **-0,08**. Data jsou tedy na sobě prokazatelně nezávislá, nebo závislá zcela zanedbatelně. Hladina karotenoidních antioxidantů dle naší analýzy není ovlivněna pohlavím.

3 Závislost hladiny antioxidantů na věku

Zde jsme předpokládali jakýsi „faktor mládí“, což byl pracovní název pro náš předpoklad, že mladší lidé a děti, tedy populace méně ovlivněná nezdravým životním stylem, stresem apod., bude mít hladinu antioxidantů vyšší, než lidé starší. Paradoxně nejvyšší naměřená hodnota antioxidantů, tedy 87 000, byla však zjištěna u 93 leté ženy. Překvapily i výsledky naměřené u nejmladších dětí, které měly hodnoty spíše nízké. Podle naší analýzy vyšel korelační koeficient **-0,21**, což ukazuje na velice malou závislost, co se týče hladiny antioxidantů a věku. Na grafu 1 tuto skutečnost můžeme sledovat názorně. Vidíme, že hladina antioxidantů je rovnoměrně zastoupena v každé věkové kategorii. Tedy v rámci naměřených hodnot. Nejčastěji naměřenou hodnotou bylo bohužel **10 000**, což je zároveň nejnížší možná naměřená hodnota. Průměrná naměřená hodnota je naštěstí vyšší, je to **26 864**. Jak již ale bylo zmíněno, nejedná se o průměr hladiny antioxidantů vybrané skupiny subjektů, ale pouze o průměrně naměřené hodnoty, protože přístroj nevyhodnocuje hodnoty pod 10 000, protože je považuje za nedostatečné a nepřesné. U grafu 1 si můžeme všimnout, že koresponduje se čtvrtým grafem na obr. 5, kde není žádná lineární závislost.

závislost hladiny antioxidantů a věku



Graf 1: Závislost hladiny karotenoidních antioxidantů a věku

4 Faktory, které mohou ovlivnit hladinu antioxidantů

Zjistili jsme tedy, že hladina antioxidantů není závislá na věku ani na pohlaví. Další předpoklad je, že hladina antioxidantů je závislá na místě, ve kterém žijeme. Tedy, že jsme ovlivněni prostředím, ve kterém dlouhodobě pobýváme. Z grafu 1 je dobře patrné, že hladina antioxidantů výrazně kolísá mezi jednotlivci, ale dosud nevíme, odkud jednotlivci pocházejí. K datům, která jsme naměřili, máme k dispozici zároveň místo trvalého bydliště jednotlivých subjektů. V další části této práce se pokusíme dokázat, nebo vyvrátit, že prostředí regionu ve kterém žijeme, nás ovlivňuje natolik, že se to projeví na hladině antioxidantů. Jako srovnávací regiony jsme si zvolili Liberecký kraj a Hlavní město Praha. A to převážně z důvodu snazší dostupnosti k datům. Nejprve se pokusíme objektivně srovnat oba regiony. Budeme srovnávat zalidněnost, ovzduší a morbiditu a mortalitu v regionech. Jinak řečeno, pokusíme se co nejpřesněji srovnat obě prostředí, ve kterých se subjekty pohybují a pak následně vyjádřit korelaci mezi hladinou antioxidantů a místem jejich trvalého bydliště. Pokud se prokáže, že hladina antioxidantů se v závislosti na regionech výrazně liší, bude to poukazovat na lepší životní podmínky v tom kraji, kde bude hladina antioxidantů u obyvatel vyšší. S trochou nadskázky se dá říci, že se jedná o objektivní metodu jak porovnat kvalitu života obyvatel v regionech v závislosti na jejich celkovém zdraví.

4.1 Závislost hladiny antioxidantů na regionu, ve kterém žijeme (srovnání Hlavní město Praha a Liberecký kraj)

Hlavní město Praha a Liberecký kraj jsou lokality ne zcela daleko od sebe, ale co se týče životního stylu obyvatel, jsou poměrně rozdílné. Uvádíme několik faktů pro srovnání:

Praha měla k 1.1.2012 1 241 664 obyvatel, přitom hustota zalidnění je 2 601,2 obyvatel/km². Naproti tomu Liberecký kraj má 438 600 obyvatel a hustotu zalidnění pouze 139 obyvatel/km². [15]

„Liberecký kraj patří spíše ke krajům s mladším obyvatelstvem (hodnoty indexu stáří jsou dlouhodobě nižší než celorepublikový průměr), i zde však pokračuje proces demografického stárnutí. Výrazně ubývá procentuálního zastoupení dětské složky (osoby ve věku 0–14 let), ta v současné době v kraji tvoří více než 15 %, v ČR dokonce o něco méně. Přitom ještě na začátku 90. let se tato složka na celkové populaci podílela z jedné pětiny. Podíl obyvatelstva staršího 65 let roste pozvolna, ale v následujících letech lze očekávat jeho výrazné zvyšování, neboť tohoto věku dosáhnou silné poválečné ročníky. Stárnutí obyvatelstva dokládá i zvyšování průměrného věku populace - průměrný věk v roce 2011 byl v ČR 41,1 a v kraji 40,6.“[16]

Věková struktura obyvatel v Libereckém kraji

Tab. 4: Věková struktura obyvatel v Libereckém kraji.

Age group	31.12.					
	total		males		females	
	number	%	number	%	number	%
0	4 672	1,1	2 352	1,1	2 320	1,0
1–4	21 029	4,8	10 760	5,0	10 269	4,6
5–9	21 364	4,9	10 943	5,1	10 421	4,7
10–14	20 074	4,6	10 289	4,8	9 785	4,4
15–19	23 375	5,3	12 093	5,6	11 282	5,0
20–24	28 517	6,5	14 457	6,7	14 060	6,3
25–29	29 526	6,7	15 155	7,0	14 371	6,4
30–34	34 609	7,9	17 753	8,3	16 856	7,5
35–39	38 803	8,8	19 837	9,2	18 966	8,5
40–44	29 898	6,8	15 236	7,1	14 662	6,6
45–49	28 633	6,5	14 477	6,7	14 156	6,3
50–54	25 709	5,9	12 817	6,0	12 892	5,8
55–59	31 050	7,1	15 070	7,0	15 980	7,1
60–64	33 754	7,7	16 164	7,5	17 590	7,9
65–69	24 669	5,6	11 431	5,3	13 238	5,9
70–74	15 643	3,6	6 691	3,1	8 952	4,0
75–79	11 617	2,6	4 531	2,1	7 086	3,2
80–84	9 011	2,1	3 069	1,4	5 942	2,7
85–89	5 187	1,2	1 498	0,7	3 689	1,6
90–94	1 251	0,3	325	0,2	926	0,4
95+	209	0,0	35	0,0	174	0,1
Total	438 600	100,0	214 983	100,0	223 617	100,0
0–4	25 701	5,9	13 112	6,1	12 589	5,6
0–14	67 139	15,3	34 344	16,0	32 795	14,7
15–49	x	x	x	x	104 353	46,7
15–64	303 874	69,3	153 059	71,2	150 815	67,4
65+	67 587	15,4	27 580	12,8	40 007	17,9
Total 2000	429 121		208 992		220 199	
Total 2005	429 031		209 128		219 903	

„Na konci roku 2011 žilo na území Hlavního města Prahy 1 241 664 obyvatel (z toho 48,6 % mužů). Oproti předcházejícímu roku se počet obyvatel Prahy zvýšil o 7 627 osob a tento přírůstek byl převážně dán migrací (přírůstek stěhováním činil 5 751 osob). V roce 2011 počet živě narozených dětí opět převýšil počet zemřelých obyvatel (přirozený přírůstek činil 1 876 osob). Věková struktura obyvatel Hlavního města Prahy se mění pouze nepatrně. V roce 2011 byl podíl dětí ve věku 0–14 let 13,3 %, podíl obyvatel starších 65 let 17,2 % a index stáří tj. počet osob starších 65 let na 100 dětí do 14 let, dosahoval hodnoty 129,7. V porovnání s ČR je v Praze vyšší podíl staršího obyvatelstva a naopak nižší zastoupení dětí (index stáří v ČR 110,4).”[17]

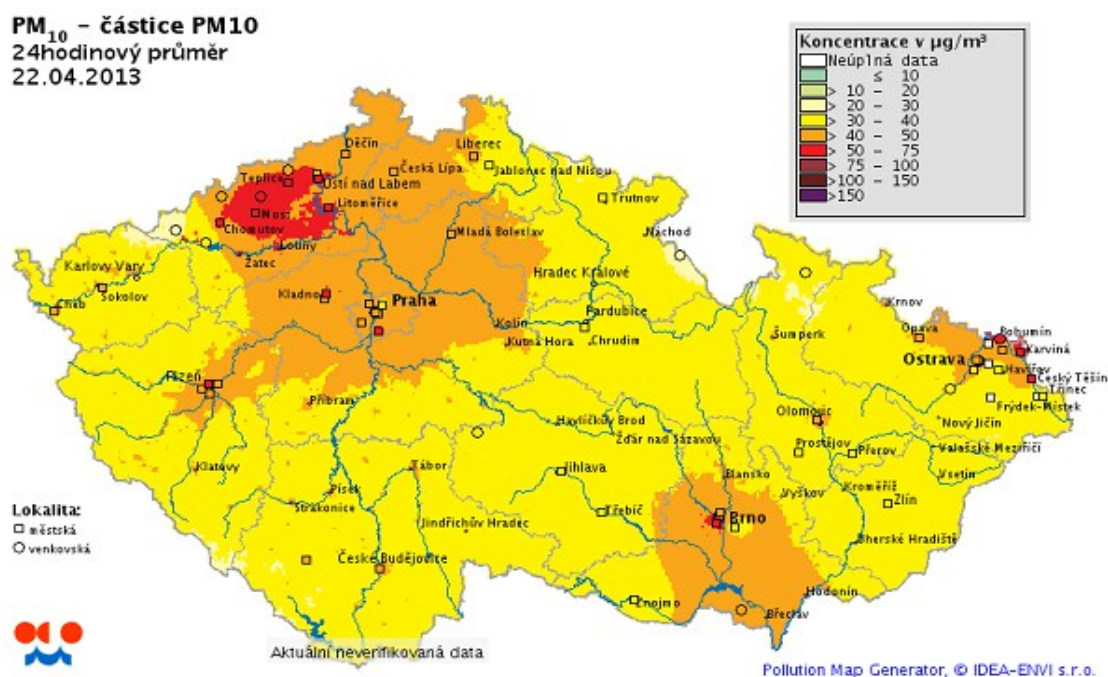
Věková struktura obyvatel v Hlavním městě Praha

Tab. 5: Věková struktura obyvatel v Hlavním městě Praha

Age group	31.12.					
	total		males		females	
	number	%	number	%	number	%
0	13 979	1,1	7 146	1,2	6 833	1,1
1–4	57 184	4,6	29 396	4,9	27 788	4,4
5–9	51 568	4,2	26 380	4,4	25 188	3,9
10–14	41 928	3,4	21 633	3,6	20 295	3,2
15–19	50 331	4,1	25 476	4,2	24 855	3,9
20–24	73 835	5,9	37 473	6,2	36 362	5,7
25–29	93 090	7,5	47 452	7,9	45 638	7,1
30–34	117 913	9,5	60 342	10,0	57 571	9,0
35–39	115 958	9,3	59 838	9,9	56 120	8,8
40–44	85 880	6,9	44 093	7,3	41 787	6,5
45–49	83 506	6,7	41 872	6,9	41 634	6,5
50–54	72 006	5,8	35 376	5,9	36 630	5,7
55–59	85 276	6,9	40 258	6,7	45 018	7,0
60–64	85 702	6,9	39 618	6,6	46 084	7,2
65–69	76 854	6,2	34 311	5,7	42 543	6,7
70–74	44 880	3,6	19 474	3,2	25 406	4,0
75–79	36 361	2,9	14 362	2,4	21 999	3,4
80–84	31 257	2,5	11 293	1,9	19 964	3,1
85–89	18 347	1,5	5 752	1,0	12 595	2,0
90–94	4 840	0,4	1 234	0,2	3 606	0,6
95+	969	0,1	208	0,0	761	0,1
Total	1 241 664	100,0	602 987	100,0	638 677	100,0
0–4	71 163	5,7	36 542	6,1	34 621	5,4
0–14	164 659	13,3	84 555	14,0	80 104	12,5
15–49	x	x	x	x	303 967	47,6
15–64	863 497	69,5	431 798	71,6	431 699	67,6
65+	213 508	17,2	86 634	14,4	126 874	19,9
Total 2000	1 181 126		559 544		621 582	
Total 2005	1 181 610		566 542		615 068	
Total 2010	1 257 158		612 072		645 086	

4.2 Porovnání ovzduší v Libereckém kraji a v Praze

Co se týče znečištění ovzduší, je na tom Praha a Liberecký kraj velmi podobně. S menšími rozdíly během roku. Podle českého hydrometeorologického ústavu na mapě znečištění ovzduší můžeme pozorovat, že množství částic ve vzduchu je například v hlavním krajském městě Liberci a Hlavním městě Praze stejný. Mapa je zde pouze pro názornost, jedná se o průměrné hodnoty za 24 hodin. Mapa se každých 24 hodin mění, ale i po dlouhodobém pozorování jsme došli k závěru, že znečištěním ovzduší jsou si tyto dvě lokality velmi podobné.



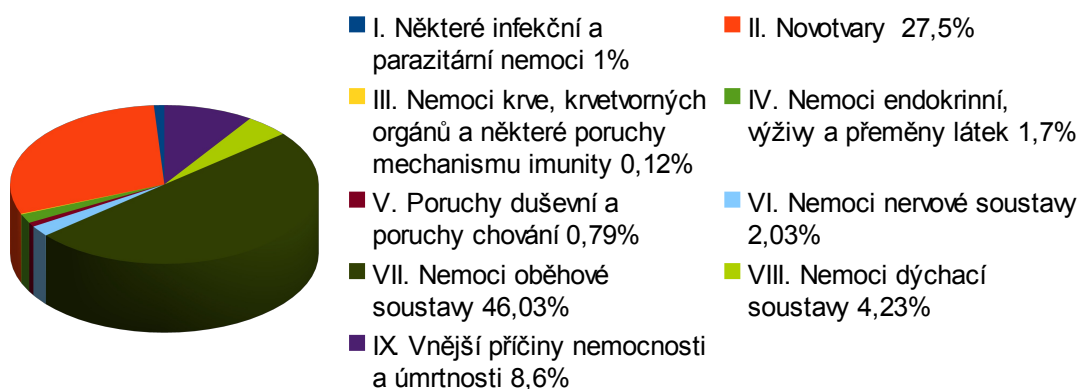
Obr. 5: Prachové částice, mapa srovnávající ovzduší v krajích.

4.3 Rozdíly v mortalitě a morbiditě ve výše zmíněných regionech

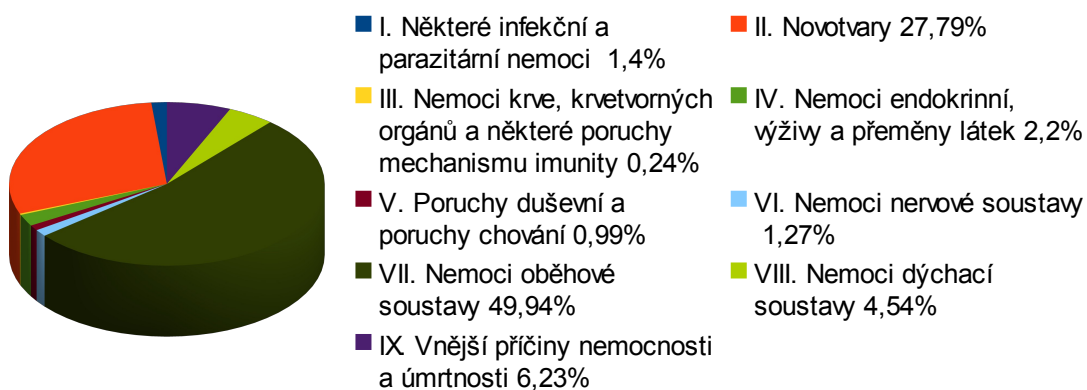
„Za posledních deset let umírá v Libereckém kraji každoročně stále méně osob nebo se jejich počet alespoň nezvyšuje, což naznačuje postupné zlepšování úmrtnostních poměrů v kraji. Ačkoli patřil Liberecký kraj mezi kraje s vyšší úmrtností, díky trvalému zlepšování se v posledních pěti letech dostala hrubá úmrtnost pod průměr v ČR. Naděje dožití při narození dosáhla v období let 2010–2011 (pro kraje počítána vždy za dvouleté období) u žen 80,8 let. U mužů 74,8 let. V České republice jsou tyto hodnoty neznatelně nižší, v roce 2011 byla naděje dožití při narození u žen 80,7 let a u mužů 74,7 let.“[16]

„Počet zemřelých obyvatel Prahy se oproti roku 2010 snížil o 174. Posouvání úmrtí do stále vyššího věku je však zřejmé z trvalého růstu hodnot střední délky života při narození. Střední délka života za kraje je počítána za dvouleté období 2010 a 2011. V Hlavním městě Praze dosáhla u mužů 76,5 let a u žen dokonce přesáhla hodnotu 81 let (81,7). Nejčastější skupinou příčin úmrtí jsou nemoci oběhové soustavy, ostatní ischemické nemoci srdeční a cévní nemoci mozku a dále novotvary. Kojenecká úmrtnost dosahuje v celé ČR velmi nízkých hodnot a její hodnocení na úrovni krajů je výrazně ovlivněno malým počtem úmrtí do 1 roku (v roce 2011 v Praze zemřelo 27 kojenců, kojenecká úmrtnost činila 1,9 promile).“[17]

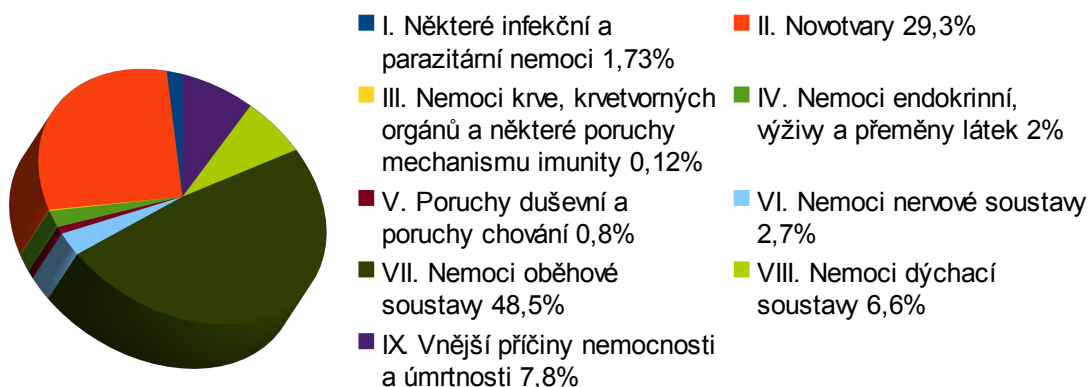
4.4 Standardizovaná úmrtnost podle příčin smrti



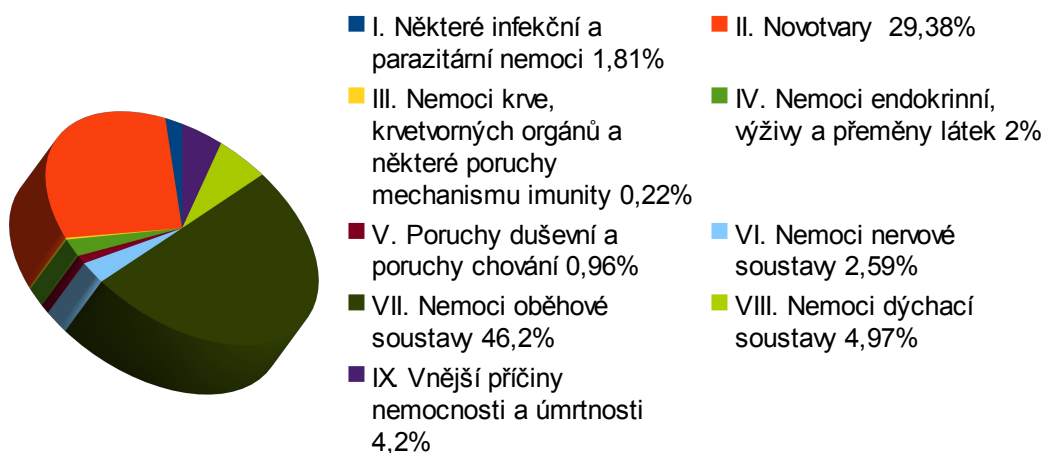
Graf. 2: Standardizovaná úmrtnost - muži (Liberecký kraj)[16]



Graf 3: Standardizovaná úmrtnost - ženy (Liberecký kraj)[16]



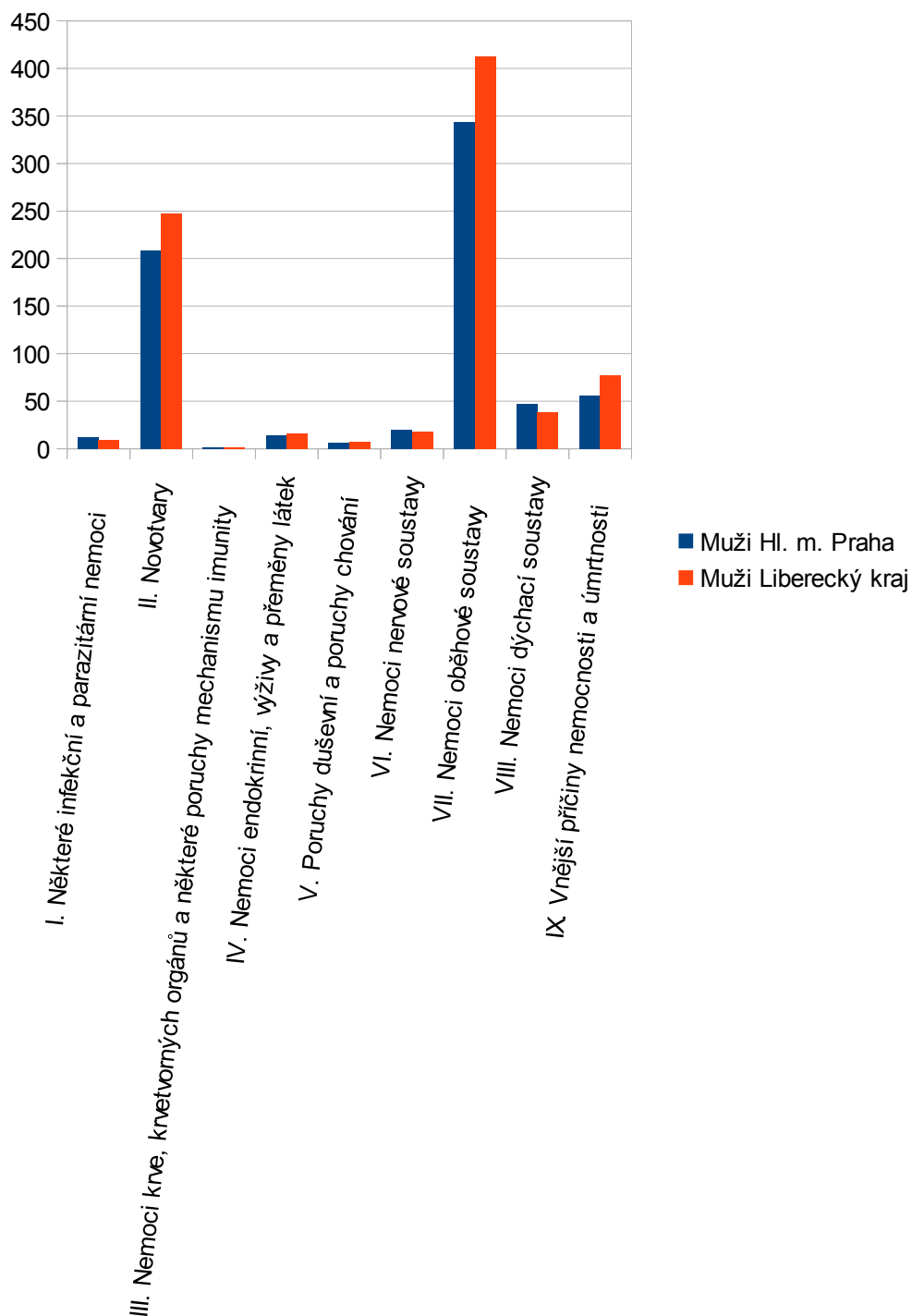
Graf 4: Standardizovaná úmrtnost - muži (Hlavní město Praha) [17]



Graf 5: Standardizovaná úmrtnost - ženy (Hlavní město Praha) [17]

Standardizovaná úmrtnost

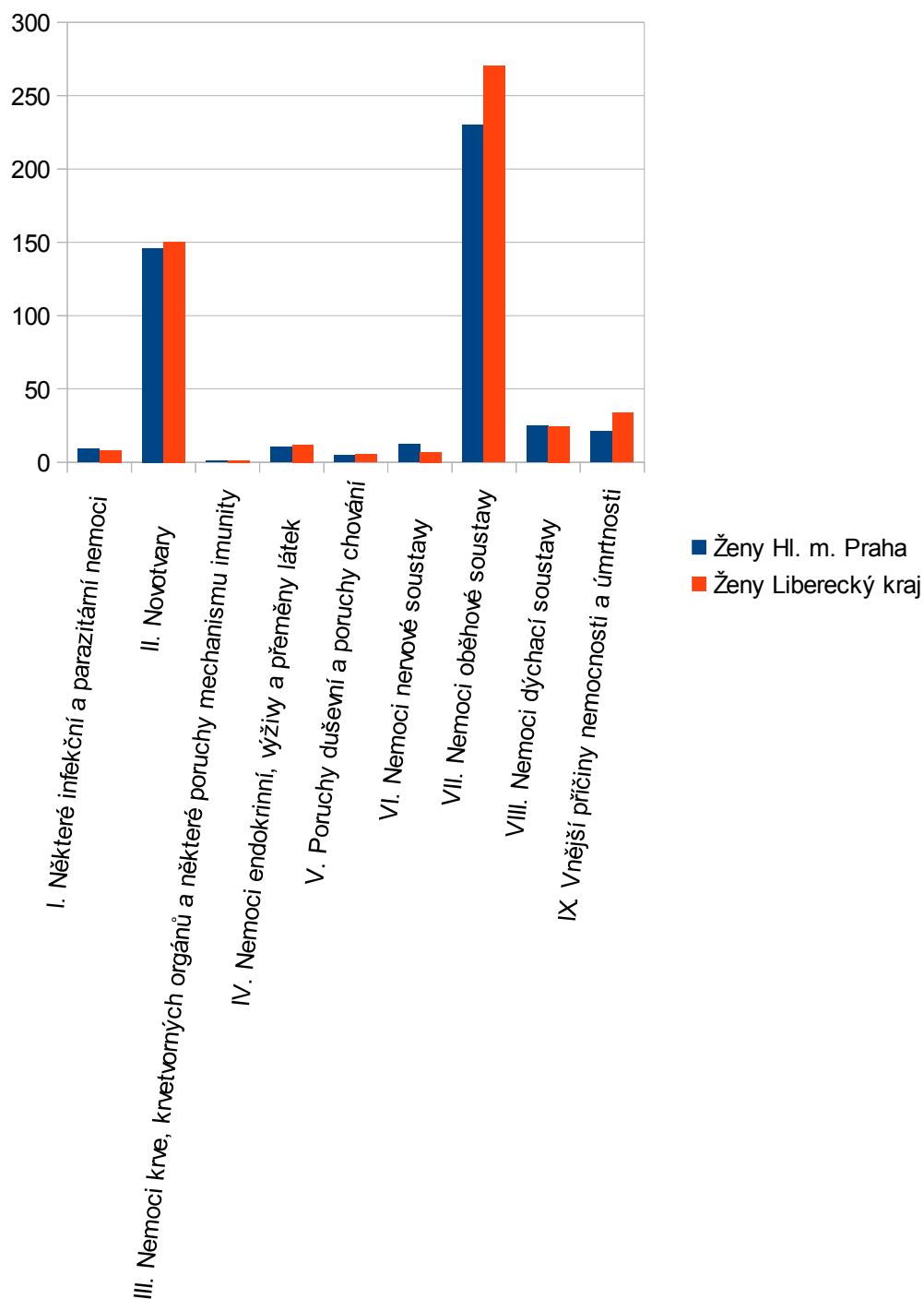
srovnání Hl. m. Praha a Liberecký kraj



Graf 6: Srovnání standardizované úmrtnosti mezi Prahou a Lib. krajem (muži)

Standardizovaná úmrtnost

srovnání Hl. m. Praha a Liberecký kraj



Graf 7: Srovnání standardizované úmrtnosti mezi Prahou a Lib. krajem (ženy)

4.5 Srovnání dat mezi jednotlivými regiony

Z postupného srovnávání obou regionů vyšla kupodivu lépe Praha. Hlavně při porovnávání dat standardizované úmrtnosti. Ačkoliv se dalo očekávat, že vzhledem k většímu životnímu prostoru na tom bude Liberecký kraj lépe.

U naměřených antioxidantů jsme porovnávali **632** hodnot, z toho **399** dat pro Hl. m. Praha a **233** pro Liberecký kraj. U každé hodnoty bylo zaznamenáno antioxidační skóre, věk, pohlaví a místo bydliště. Jak jsme se přesvědčili už dříve, věk ani pohlaví s antioxidačním skóre vůbec nesouvisí, ačkoli rozdíly mezi jednotlivci jsou markantní. Přestože jsme uvedli podstatné rozdíly mezi regiony, po porovnání naměřených dat vyšel korelační koeficient **-0,067**, což svědčí o nulové závislosti na regionech. Je však nutné připustit, že zde byly porovnávány 2 docela blízké kraje. K tomu jestli tato studie platí i pro další regiony, by bylo potřeba mnohem většího množství dat i z jiných oblastí. Mohlo by to být předmětem dalšího výzkumu.

Závěr

Cílem této práce bylo především užití biomedicínské techniky, jako nástroje pro výzkumné aktivity v oblasti preventivní medicíny. S úspěchem jsme se seznámili se zajímavou spektrofotometrickou metodou, užitou při měření hladiny karotenoidních antioxidantů. Měřili jsme touto metodou antioxidanty v Hl. městě Praha a v Libereckém kraji. Dohromady se našeho pokusu zúčastnilo 632 osob, u kterých jsme postupně zjistili hladinu antioxidantů a to řádově, dále jsme zapsali pohlaví, věk a místo trvalého bydliště.

U prvních dvou veličin, tedy pohlaví a věku, jsme nepředpokládali vysokou závislost na naměřené hladině antioxidantů, což se později přesně potvrdilo. Rozdíly v naměřených hodnotách byly sice vysoké, co se týče jednotlivců, ale průměrné hodnoty mladých i starších lidí se nelišily. Stejný výsledek přineslo i srovnání pohlaví. Mohly jsme předpokládat, že ženy se většinou starají o svou životosprávu lépe. Výsledky to ale nepotvrdily.

Největším překvapením bylo srovnání výsledků mezi Hl. městem Prahou a Libereckým krajem. Pokusili jsme se dokázat, že zdravotní rozdíly mezi obyvateli jednotlivých krajů jsou zřetelné, stejně tak jako jejich životní prostor je rozdílný. Avšak hladina antioxidantů u obyvatel jednotlivých krajů je na sobě nezávislá (dokonce ještě méně, než je tomu u závislosti na pohlaví). Hl. město Praha a Liberecký kraj tedy podle závěru této práce mají stejnou zdravotnickou osvětu, co se týče preventivní medicíny.

Co však z této práce dobře vyplývá, je celková nízká úroveň hladiny antioxidantů u obyvatelstva. Nejčastější naměřená hodnota byla 10 000 což je nejmenší možná hodnota, kterou je přístroj schopen vyhodnotit, a proto na základě této práce lze doporučit zlepšení osvěty, co se týče životního stylu. Prospěšnost antioxidantů byla v teoretické části vyzdvížena na základě mnohých zveřejněných studií.

Seznam použité literatury a dalších zdrojů

- [1] GUTTERIDGE a HALLIWELL. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *ScienceDirect*. 2010, 393 (2010) 561–564. DOI: Biochemical and Biophysical Research Communication.
- [2] SIES, Helmut. PHYSIOLOGICAL SOCIETY SYMPOSIUM: IMPAIRED ENDOTHELIAL AND SMOOTH MUSCLE CELL FUNCTION IN OXIDATIVE STRESS: OXIDATIVE STRESS: OXIDANTS AND ANTIOXIDANTS. *Experimental Physiology* [online]. 1996, s. 291-295 [cit. 2013-03-17].
- [3] Valko, M; Leibfritz, D; Moncol, J; Cronin, M; Mazur, M; Telser, J (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39** (1): 44–84
- [4] CORNELLI. Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*. (2009), č. 27, s.20.
- [5] COMROE JH, DRIPPS RD, DUMKE PR, DEMING M. *Oxygen toxicity*. JAMA 1945;128:707-10.
- [6] ZITNANOVA I, KORYTAR P, ARUOMA OI, et al. Uric acid and allantoin levels in Down syndrome: *antioxidant and oxidative mechanism?* Clin Chim Acta 2004;341:139-46.
- [7] KATZ MA. *The expanding role of oxygen free radicals in clinical medicine*. West J Med 1986;144:441-6.
- [8] MONOGHAN, B. R.; SCHMITT, F. O. The effects of carotene and of vitamin A on the oxidation of linoleic acid. *J. Biol. Chem.* **96**:387–395; 1932
- [9] BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. b-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* **224**:569–573; 1984.
- [10] WANG, X. D. Review: absorption and metabolism of b-carotene. *J. Am. Coll. Nutr.* **13**:314–325; 1994

- [11] IGOR V. a Werner GELLERMANN. Validation model for Raman based skin carotenoid detection: Department of Physics and Astronomy, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112, United States. *ScienceDirect: Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- [12] SMITH, W.; DENT, G. Introduction, Basic Theory, and Principles and Resonance Raman Scattering. *Modern Raman Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Ltd, England, 2005; 1-7 & 93-97
- [13] BALL, D.W. "Theory of Raman Spectroscopy" *Spectroscopy*, 16 (11), 2001, 32
- [14] EFREMOV, E.; ARIESE, F.; GOOIJER, C. "Achievements in resonance Raman spectroscopy: A Review of a technique with a distinct analytical chemistry potential" *Analytica Chimica Acta*, 606, 2008, 119-134.
- [15] Počet obyvatel v oblastech, krajích a okresech České republiky k 1.1.2012, Český statistický úřad
- [16] *Zdravotnická ročenka Libereckého kraje 2011*. 2011. vyd. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 172 s. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/cr-kraje/kraje/liberecky-kraj>
- [17] *Zdravotnická ročenka Hlavního města Prahy 2011*. 2011, vyd. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 168 s. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/cr-kraje>
- [18] KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE. KATEDRA PRAVDĚPODOBNOSTI A MATEMATICKÉ STATISTIKY. *Matematická korelace*. 5 s. Dostupné z: www.pedf.cuni.cz/kpsp/skalouda/korelace.doc

Seznam obrázků

Obr. 1: Struktura vitamínu A

Obr. 2: Struktury běžných karotenoidů, nejčastěji se vyskytujících v potravinách

Obr. 3: Schéma Ramanovy spektroskopie

Obr. 4: Lineární závislosti hodnot

Obr. 5: Prachové částice, mapa srovnávající ovzduší v krajích

Seznam tabulek

Tab. 1: Některé z nejběžnějších metod a látek pro určení oxidačního stresu

Tab. 2: Výběr z nejdůležitějších klinických/epidemiologických studií, které proběhly a zabývaly se antioxidačními kombinacemi v potravinách.

Tab. 3: Výběr epidemiologických studií zabývajících se vztahy mezi Vitaminem A, karotenoidy a nemocemi srdce.

Tab. 4: Věková struktura obyvatel v Libereckém kraji

Tab. 5: Věková struktura obyvatel v Hlavním městě Praha

Seznam grafů

Graf 1: Závislost hladiny karotenoidních antioxidantů a věku

Graf 2: Standardizovaná úmrtnost muži (Liberecký kraj)

Graf 3: Standardizovaná úmrtnost ženy (Liberecký kraj)

Graf 4: Standardizovaná úmrtnost muži (Hlavní město Praha)

Graf 5: Standardizovaná úmrtnost ženy (Hlavní město Praha)

Graf 6: Srovnání standardizované úmrtnosti mezi Prahou a Lib. Krajem (muži)

Graf 7: Srovnání standardizované úmrtnosti mezi Prahou a Lib. Krajem (ženy)