

**Univerzita Karlova**  
**3. lékařská fakulta**

## Dizertační práce

Praha, 2020

**Ing. Bc. Hana Logerová**

**Univerzita Karlova**

**3. lékařská fakulta**

## Dizertační práce

Toxické látky ve výživě jako faktor chronických onemocnění

Toxic compounds in a diet as a factor of chronic diseases

Školitel: doc. MUDr. Pavel Dlouhý, PhD.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15. 4. 2020

Hana Logerová

## **Identifikační záznam:**

LOGEROVÁ, Hana. *Toxické látky ve výživě jako faktor chronických onemocnění. [Toxic compound in a diet as a factor of chronic disease]*. Praha, 2020. 82 s. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie. Školitel: doc. MUDr. Pavel DLOUHÝ, PhD.

**Klíčová slova:** DDT; diabetes mellitus 1. typu; glykémie; hmotnostní spektrometrie; chiroptická a vibrační spektroskopie; klinická diagnostika; mikroalbuminurie; PCB; plazmatické proteiny; plynová chromatografie; polybromované difenylethery; retardéry hoření; tuková tkáň.

**Keywords:** Adipose tissue; blood plasma proteins; chiroptical and vibrational spectroscopy; clinical diagnostics; DDTs; diabetes mellitus type 1; flame retardants; gas chromatography; glycaemia; microalbuminuria; polybrominated diphenylethers; mass spectrometry; PCBs.

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mojí rodině, synovi Kryštofovi a Jaromírovi, mým spolupracovníkům z oddělení biochemie Ústavu biochemie, buněčné a molekulární biologie 3. LF UK, zejména kolegyni Mirce Vojtové za spolupráci při zpracování vzorků biologického materiálu. Děkuji skupině prof. Ing. Vladimíra Setničky, PhD., z VŠCHT Praha za umožnění účasti na pilotní studii.

Musím poděkovat svému školiteli doc. MUDr. Pavlovi Dlouhému, PhD., za vedení postgraduálního studia a cenné rady.

Zvláště musím poděkovat prof. RNDr. Ing. Petrovi Tůmovi, PhD., za významnou pomoc při publikaci článků a zpracování dizertační práce.

## Obsah

1.	Úvod a přehled o stavu problematiky	11
1.1	Monitorování polybromovaných difenyletherů a dalších polutantů v tukové tkáni	11
1.2	Retardéry hoření, jejich chemická struktura a funkce	15
1.3	Využití chiroptických metod pro klinickou diagnostiku	18
1.4	Klasifikace chiroptických metod	21
1.4.1	Ramanova optická aktivita	21
1.4.2	Elektronový cirkulární dichroismus	21
1.4.3	Infračervená spektroskopie	21
2	Materiál a metodika	22
2.1	Bromované retardéry hoření	22
2.1.1	Testovaná skupina a odběr tukové tkáně	22
2.1.2	Chemikálie	23
2.1.3	Úprava klinických vzorků	24
2.1.4	Plynová chromatografie a hmotnostní spektroskopie	24
2.1.5	Statistické vyhodnocení dat	25
2.2	Chiroptické metody	25
2.2.1	Testované skupiny a odběry vzorků krve a moče	25
2.2.2	Úprava klinických vzorků	26
2.2.3	Instrumentace chiroptických metod	27
2.2.4	Statistické vyhodnocení dat	28
2.2.5	Chemikálie a příprava kalibrační řady albuminu	28
3	Výsledky	29

3.1	Bromované retardéry hoření	29
3.1.1	Polybromované difenylethery	29
3.1.2	Polychlorované bifenyly a DDT	33
3.2	Chiroptické metody v diagnostice	35
3.2.1	Ramanova spektroskopie	35
3.2.2	Infračervená spektroskopie	35
3.2.3	Ramanova optická spektroskopie	36
3.2.4	Elektronový cirkulární dichroismus	37
3.2.5	Lineární diskriminační analýza	37
3.2.6	Stanovení přítomnosti bílkovin ve vzorcích moči	39
4	Diskuze	40
4.1	Bromované retardéry hoření	40
4.2	Chiroptické metody v lékařské diagnostice	41
5	Závěr	41
5.1	Bromované retardéry hoření	41
5.2	Chiroptické metody v lékařské diagnostice	42
6	Literatura	43
	Seznam publikací	54
	Přílohy	

## Seznam použitých zkratk a symbolů

ADA	americká diabetologická asociace, American Diabetes Association
AGE	pokročilé produkty glykace, advanced glycation end.products
ATR	zeslabený úplný odraz, attenuated total refractance
BDE	bromované difenylethery
BFR	bromované zpomalovače hoření, brominated flame retardants
BMI	index tělesné hmotnosti, body mass index
CV	koeficient variace
DM	úplavice cukrová, diabetes mellitus
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
ECD	elektronový cirkulární dichroismus
FNKV	Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
FR	zpomalovače hoření, retardanty hoření, Flame retardants
GLUT	transportér pro glukózu, glucose transporter
GTT	glukózový toleranční test
HbA <sub>1c</sub>	glykovaný hemoglobin
HSA	lidský sérový albumin, human serum albumine
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě, high density lipoprotein
LDA	lineární diskriminační analýza
LDL	lipoprotein o nízké hustotě, low density lipoprotein
MA	mikroalbuminurie
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young



NIDDM	non-insulin dependent diabetes mellitus
PAU	polyaromatické uhlovodíky
PBDE	polybromované difenylethery
PCB	polychlorované bifenyly
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny, polyunsaturated fatty acids
ROA	Ramanova optická aktivita
SD	směrodatná odchylka
T <sub>3</sub>	trijodtyronin
T <sub>4</sub>	tyroxin
T1DM	diabetes mellitus 1. typu
T2DM	diabetes mellitus 2. typu
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě, very low density lipoprotein
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technologická
WHO	Světová zdravotnická organizace, World Health Organization

## Souhrn

Retardéry hoření se začaly používat v 70. letech 20. století nejprve v USA a Japonsku, a následně v 90. letech i v bývalém Československu jako součást polymerních matric plastů pro snížení jejich hořlavosti. V současnosti převažují polybromované retardéry hoření (BFR), z nich jsou nejvýznamnější polybromované difenylethery (PBDE). Lidská populace je exponována výše uvedeným kontaminantům především potravou obsahující rybí tuk, maso a mléčné výrobky a dále inhalací prachových částic. Dalším faktorem je délka expozice, dnes víme, že lidská populace může být BFR vystavena už v dětství, kdy při dlouhodobém kojení se tyto látky uvolňují z tukové tkáně do mateřského mléka.

Cílem této studie bylo zjistit aktuální koncentrace hlavních zástupců BFR v lidské tukové tkáni a porovnat je s koncentrací dlouhodobě sledovaných chlorovaných polutantů, kterými jsou PCB a DDT. V naší studii jsme sledovali koncentrace BFR, PCB a DDT v lidském podkožním tuku odebraném během plastických operací. Celkem bylo odebráno 107 vzorků tuku získaných především od obézních žen ve věkovém rozmezí 19 až 76 let. Ve vzorcích bylo odhaleno 16 kongenerů PBDE, z nichž pouze šest bylo detekováno ve více než 38 % vzorků tuku. Celková průměrná koncentrace PBDE dosáhla hodnoty 3,31 ng/g tuku, což je o 25 % nižší hodnota v porovnání s rokem 2009. Na druhou stranu, byl zjištěn vzestup koncentrace dvou kongenerů PCB, celková koncentrace PCB vzrostla na 776 ng/g tuku oproti 625,5 ng/g tuku publikovaným v roce 2009. Hladiny DDT za sledované období klesly na současnou hodnotu 467,4 ng/g tuku, což je o 24 % méně, než bylo zjištěno v roce 2009.

Druhým tématem jsou chronická onemocnění se zaměřením na diabetes mellitus a aterosklerózu. Zvýšená glykémie způsobuje glykaci plazmatických proteinů, které mají naprosto odlišné vlastnosti než fyziologické bílkoviny. Pro detekci pozměněných proteinů byly nově testovány moderní chiroptické metody: elektronový cirkulární dichroismus, Ramanova optická aktivita, infračervená spektroskopie a Ramanova spektroskopie. Výsledky chiroptických metod byly srovnány s výsledky standardního elektroforetického vyšetření a byla nalezena 100 % shoda s klinickou diagnózou na skupině 12 pacientů a 8 kontrol. Chiroptické metody byly dále použity pro citlivou detekci mikroalbuminurie u diabetiků. Chiroptické metody představují perspektivní nástroj pro časnou diagnostiku diabetu.

## Summary

Flame retardants have been used in the Czech Republic since the 1980s and 1990s as a part of the polymer matrix of plastic materials to decrease their combustibility and thus the risk of fire. Brominated flame retardants (BFR) are commonly used, polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are the most abundant flame retardants in plastic materials. The human population is exposed to these compounds particularly via diet containing fatty fish, meat and dairy products and via inhalation of dust particles. Another aspect is the duration of the exposure: it is known that human beings can be exposed to BFRs from infancy through prolonged breast feeding because breast milk can be contaminated by these compounds.

This study was performed to investigate the concentrations of the main representatives of BFRs occurring in human adipose tissue and to compare these values with the concentration of chlorinated contaminants (PCBs, DDTs). The pollutants levels were newly measured in solid adipose tissue removed during surgery. A total of 107 samples of fat were taken from 19 – 76 year-old volunteers mostly obese women. A total of 16 PBDEs congeners were determined, of which only six occur in more than 38 % of fat tissue samples. The total PBDEs level attained an average value of 3.31 ng/g, which is 25 % less than was measured in 2009. On the other hand, there was an increase in the levels of two PCBs congeners, which caused an increase in the total PCBs concentration from 625.5 ng/g, published in 2009, to the current level of 776 ng/g. The amounts of DDTs have decreased and currently correspond to 467.4 ng/g, which is about 24 % less than in 2009.

The second scope of this work includes chronic diseases, such as diabetes mellitus and atherosclerosis. Hyperglycaemia stimulates non-enzymatic glycation of plasma proteins, which are completely different compounds from original proteins. We investigated the use of chiroptical methods for detection of these changed proteins molecules: electronic circular dichroism, Raman optical activity, infrared spectroscopy and Raman spectroscopy. The results were compared with results of standard electrophoresis analysis and results of chiroptic methods were 100 % valid to clinic diagnosis for group of 12 patients and 8 controls. Chiroptical methods were used for sensitive detection of microalbuminuria of diabetics.

## 1. ÚVOD A PŘEHLED O STAVU PROBLEMATIKY

### 1.1. Monitorování polybromovaných difenyletherů a dalších polutantů v tukové tkáni

To, že výživou můžeme ovlivňovat výskyt a rozvoj chronických multifaktoriálních onemocnění, dnes již nikdo nezpochybňuje. Spíše je vědeckým úkolem látky schopné chronická onemocnění vyvolávat rozpoznat, stanovit jejich výskyt, poznat jakým mechanismem na organismus působí a získat podklady pro jejich využití, popřípadě jejich používání zakázat. Zejména mechanismus účinku je důležité rozpoznat a popsat, poněvadž i látky, které nejsou vyloženě klasifikované jako toxické, jsou pro organismus xenobiotikem [1], které může vyvolat obrannou reakci organismu s možností přechodu do chronické mírné zánětlivé reakce, která se podílí na etiopatogenezi celé řady chronických onemocnění, jako je např. ateroskleróza nebo diabetes mellitus. Ačkoliv se obecně nejedná o látky poškozující organismus přímo, po jejich dlouhodobém působení dochází k nežádoucímu zásahu do organismu, což vyústí v onemocnění.

Dobře vyvážená strava obsahující různorodé a zdravé potraviny je jedním z klíčových faktorů dobrého zdravotního stavu. Ovšem potraviny a látky v nich obsažené mohou být významným faktorem v rozvoji chronických onemocnění, jako jsou obezita, diabetes mellitus, kardiovaskulární choroby a rakovina. Tato dlouhodobá onemocnění negativně ovlivňují kvalitu života pacienta, a dále mají i celospolečenské dopady, zejména sociální a ekonomické. S rozvojem nových technologií výroby a zpracování potravin se množství kontaminantů, reziduí, konzervačních látek neustále zvyšuje, což má v řadě případů negativní vliv na zdraví člověka. Zatímco úmrtnost na podvýživu a infekční nemoci v posledních desetiletích významně klesla, začínají se projevovat problémy spojené s bezpečností potravin [2].

Na lidské zdraví může mít potenciální vliv celá řada chemických látek vyskytujících se v potravě. Jako potravinové kontaminanty jsou označovány chemické látky, které se do potravin dostaly ze znečištěného životního prostředí, ze zemědělské výroby, v průběhu technologického zpracování, skladování, při dopravě a prodeji. Endogenní kontaminanty vznikají v potravinách během fyzikálně chemických procesů v průběhu životnosti potravin. Kontaminanty exogenní pocházejí z vnějších zdrojů.

K první možné kontaminaci potravin dochází při jejich produkci v zemědělské výrobě – používání pesticidů, toxické kovy z anorganických hnojiv, dále zdrojem těchto polutantů může být také povrchová voda používaná k zalévání, kontaminanty z místního životního

prostředí, napadení mikroorganismy (plísně produkující mykotoxiny), ale i veterinární léčiva v mase apod. K další kontaminaci potravin může docházet během jejich skladování a zpracování, kdy mohou být napadeny mikroorganismy produkujícími mykotoxiny nebo bakteriální toxiny, difúzí aditiv z plastových obalů (ftaláty, bisfenol A), nebo při tepelné úpravě pokrmů, kdy dochází ke vzniku toxických kontaminant – polyaromatické uhlovodíky (PAU), N-nitrosaminy, akrylamid apod. Problémem nejsou jen toxické látky obsažené v potravinách, ale problematika toxických látek ve výživě se ještě rozšiřuje při expozici člověka původně netoxickým látkám, které se v lidském těle zapojují do procesu biotransformace xenobiotik, kdy se během chemických reakcí zvyšuje jejich biologická aktivita [2].

Riziko chronických onemocnění je také spojováno se zvýšeným energetickým příjmem, zejména sacharidů a tuků. Dnes je už známo, že nejenom nasycené mastné kyseliny živočišného původu způsobují změny metabolismu, ale i nasycené mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem rostlinného původu jsou rizikovým faktorem aterosklerózy. Je už dobře zdokumentován vztah mezi  $\omega$ -6 polynenasycenými kyselinami (PUFA) a chronickou zánětlivou reakcí, pro jejíž rozvoj se zdají být kritickými faktory právě  $\omega$ -6 a  $\omega$ -3 mastné kyseliny. Nadbytek  $\omega$ -6 PUFA a vysoký poměr  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 mastných kyselin je typický pro dnešní „západní“ dietu a je zřejmě promotorem patogeneze chronického zánětu a s ním spojených chorob. Dále je známo, že obézní lidé jsou ohroženi vyšším rizikem vzniku diabetu, aterosklerózy a některých nádorů. Dietární tuky navíc mohou obsahovat lipofilní kontaminanty, které jsou společně s tuky resorbovány ze střeva a mohou být z tuků uvolněny a následně v játrech metabolizovány podobně jako xenobiotika, což ovlivňuje etiopatogenezi chorob [3].

Retardéry hoření jsou velmi stabilní látky přidávané do polymerních materiálů (přírodních i syntetických), pro snížení rizika hoření a vzniku požárů. Jedná se o sloučeniny, které jsou odolné teple, chemickým sloučeninám, světlu a jsou velmi málo reaktivní, protože pokud dojde ke změně podmínek, rozloží se a tím zabrání dalšímu rozvoji reakce, resp. hoření. Zvýšené riziko hoření a vzniku požárů je spojeno s rozvojem technologií a techniky a objevuje se ve všech sférách lidské činnosti spojených s využíváním nových technologií (PC, televizory, nábytek, automobily, letadla, stavební a izolační materiály apod.).

Podle chemické struktury se retardéry hoření dělí do tří skupin – anorganické sloučeniny, organohalogenové a organofosforové sloučeniny [4].

## Klasifikace retardérů hoření:

- |                |                                      |                   |
|----------------|--------------------------------------|-------------------|
| A) Organické   | 1) Neobsahující fosfor               | a) halogenované   |
|                |                                      | b) nehalogenované |
|                | 2) Obsahující fosfor                 | a) halogenované   |
|                |                                      | b) nehalogenované |
| B) Anorganické | 1) Fosfátové sloučeniny              |                   |
|                | 2) Sloučeniny boru                   |                   |
|                | 3) Sloučeniny dusíku                 |                   |
|                | 4) Hydroxidy hliníku nebo hořčíku    |                   |
|                | 5) Ostatní - $\text{CaCO}_3$ a další |                   |

Největší pozornost je v poslední době věnována organohalogenovým sloučeninám, protože z důvodů jejich malé reaktivity se jedná o látky perzistentní a pokud se dostanou do životního prostředí, představují významnou exogenní kontaminantu. Vzhledem k jejich chemické struktuře (vysoký podíl halogenů a uhlíkatá skelet) se jedná o látky lipofilní, které pokud se dostanou do organismu živočichů nebo člověka, mohou být deponovány v tukové tkáni, protože jejich biotransformace a vyloučení z těla nejsou jednoduchou záležitostí. V případě, že dojde k mobilizaci tukové tkáně během kojení nebo hubnutí, jsou tyto látky uvolněny a dochází k sekundární expozici. Při kojení jsou tyto látky uvolňovány do mateřského mléka společně s tuky a je jim exponován kojeneček. Při hubnutí vyvolaném nemocí nebo redukční dietou dochází k uvolňování deponovaných FR do cirkulace a následně k vyvolání chronické zánětlivé reakce.

Průmyslová produkce retardérů hoření začala na konci sedmdesátých let 20. století v USA a Japonsku. Retardéry hoření jsou inkorporovány do polymerních matric plastů, aby zabránily hoření a snížily riziko vzniku požárů [5]. V České republice došlo k jejich rozšíření a masovější produkci v devadesátých letech 20. století. Retardéry hoření se podle chemické struktury dělí na anorganické, které nepředstavují významnější riziko pro životní prostředí a lidské zdraví [4], a organické s obsahem halogenů [6] nebo fosforu [7]. Podíl fosforových retardérů tvořil v roce 2006 20 % z celkového objemu evropské produkce retardérů hoření a tento typ látek představuje významnou zátěž pro životní prostředí a je

potenciálním rizikem pro lidské zdraví [6]. Organické retardéry hoření lze v současnosti detekovat ve všech složkách životního prostředí po celé Zemi, kam jsou uvolňovány přímo z průmyslové produkce nebo postupně při degradaci výrobků během skládkování a likvidace.

Z halogenovaných retardérů hoření jsou v současnosti nejrozšířenější bromované retardéry hoření [8]. Jedná se především o polybromované difenyl ethery (PBDE), které jsou do polymerů inkorporovány pouze slabými fyzikálními vazbami, takže se relativně snadno z těchto matric uvolňují zvýšením teploty nebo vlivem intenzivního slunečního záření [9]. PBDE představují skupinu celkem 209 kongenerů s obecným chemickým vzorcem  $C_{12}H_{(10-x)}Br_xO$ , kde  $x$  je 1, 2 až 10 (Obr. 1) a počty jednotlivých izomerů mono, di, tri až deka-PBDE jsou postupně 3, 12, 24, 42, 46, 24, 12, 3 a 1. Průmyslově vyráběné PBDE představují vždy směs různých kongenerů a jsou prodávány pod různými názvy jako DE-60F, DE-71, DE 83R a řadou dalších. Největší riziko představují PBDE s menším počtem atomů bromu (1 až 4), které se snadno akumulují v životním prostředí a po vstupu do organismu ovlivňují syntézu hormonů štítné žlázy, vývoj plodu, reprodukční systém, funkci jater a nervového systému, jak bylo prokázáno v několika studiích [10-14].

Lidská populace je PBDE exponována konzumací ryb [15, 16], mastných výrobků, vajec [17, 18], mléčných výrobků a olejů [19]. Dalším zdrojem kontaminace je prach a prachové částice inhalované zejména v uzavřených prostorech domácího i pracovního prostředí, která je nejvýznamnější cestou pro kontaminaci kongenerem BDE-209 [20, 21]. Inhalace prahu ve vnějším prostředí má minoritní význam [22, 23]. Významný expoziční zdroj představuje také dlouhodobé kojení [24], kdy dochází k mobilizaci mateřské tukové tkáně a společně s tukem jsou tyto kontaminanty uvolňovány do krve a mateřského mléka, podobně jako PCB [25, 26]. Do současnosti byly PBDE prokazatelně detekované v lidském mateřském mléce [13, 27, 28], krvi [13, 29], tukové tkáni [30-32] a fetálních játrech [33]. Epidemiologické studie popsaly vztah mezi expozicí PBDE a sníženou funkcí štítné žlázy [34], poruchami spermatogeneze [35] a endokrinní disrupcí [36, 37].

Všechny výše zmíněné způsoby kontaminace souvisí s nepolárním charakterem PBDE a jejich relativně silným bioakumulačním potenciálem. PBDE se akumulují zejména k bílé tukové tkáni, odkud jsou uvolňovány např. při dlouhodobém hladovění nebo dlouhodobém kojení. PBDE lze rovněž detekovat v krevní plazmě, kde jsou transportovány vazbou na plasmatické proteiny podobně jako hormony štítné žlázy [38]. Ze všech těchto důvodů je používání vybraných PBDE, jako je penta-BDE, okta-BDE, společně s hexabrombenzen (HBB) a Lindane regulováno Stockholmskou úmluvou [39] a dále bylo používání

vybraných technických směsí zakázané direktivou EU z 15. 8. 2004 [40]. S monitorováním PBDE se v České republice začalo až počátkem 21. století a první data byla publikována v roce 2004 [25, 41, 42]. Jedná se o údaje z vodních ekosystémů a později bylo sledováno mateřské mléko.

Naše studie se zaměřila na monitorování PBDE a dalších bromovaných retardérů hoření, polychlorovaných bifenyly (PCB) (Obr. 1) a chlorovaných difenylethanů souhrnně označovaných jako DDT (Obr. 1) [43]. PCB jsou organické látky se sumárním vzorcem  $C_{12}H_{10-x}Cl_x$ , které jsou klasifikovány jako perzistentní organické polutanty. PCB fungují jako endokrinní disruptory a jsou pravděpodobně i karcinogenní. Dichlordifenyltrichlorethan běžně známý jako DDT je organochlorová sloučenina původně vyvinutá jako insekticid, která má významný vliv na životní prostředí. Komerčně vyráběné DDT je směsí izomerů, které jsou v životním prostředí metabolizovány na dichlordifenylidichlorethylen (DDE) a dichlordifenylidichlorethan (DDD) [44].

Tyto skupiny rizikových látek jsou nově sledovány v tukové tkáni většinou obézních pacientek středního věku, které podstoupily zákrok na plastické chirurgii. Odebrané vzorky podkožního tuku byly analyzovány pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Takto získaná data byla porovnána s údaji předchozí studie provedené na tukové tkáni v ČR před více jak deseti lety [45].

## **1.2. Retardéry hoření, jejich chemická struktura a funkce**

Retardéry hoření jsou látky, které zpomalují nebo zabraňují hoření, čímž zvyšují teplotní odolnost materiálů. Jejich použití je spojeno s masovou produkcí plastů, které oproti klasickým materiálům mají lepší fyzikálně chemické vlastnosti, ovšem při hoření jsou produkovány toxické plyny. K jejich uvolnění do životního prostředí dochází v průběhu výroby, při používání plastů a výrobků plasty obsahující, ale také při likvidaci výrobků, resp. při jejich skládkování.

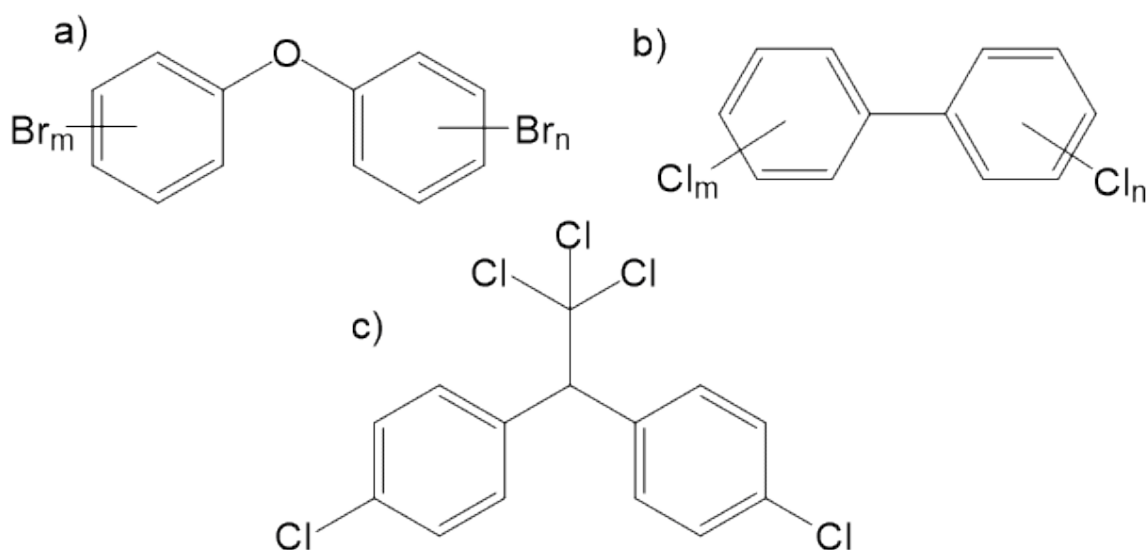
Retardéry hoření snižují hořlavost materiálů fyzikální nebo chemickou cestou, nejčastěji se jedná o kombinaci obou. Retardéry hoření jsou schopny ovlivnit proces pyrolýzy tak, že při hoření je uvolňována kyselina fosforečná, která vytváří sklovitou vrstvu bránící přístupu kyslíku, vedle toho vzniká více popela, který rovněž zabraňuje přístupu kyslíku. Během hoření vznikají také reaktivní radikály, které proces hoření dále podporují. Pokud je retardér hoření schopen volné radikály vychytávat, dochází touto cestou k inhibici hoření. Některé retardéry hoření při zahřátí uvolňují vodní páru, čímž dochází



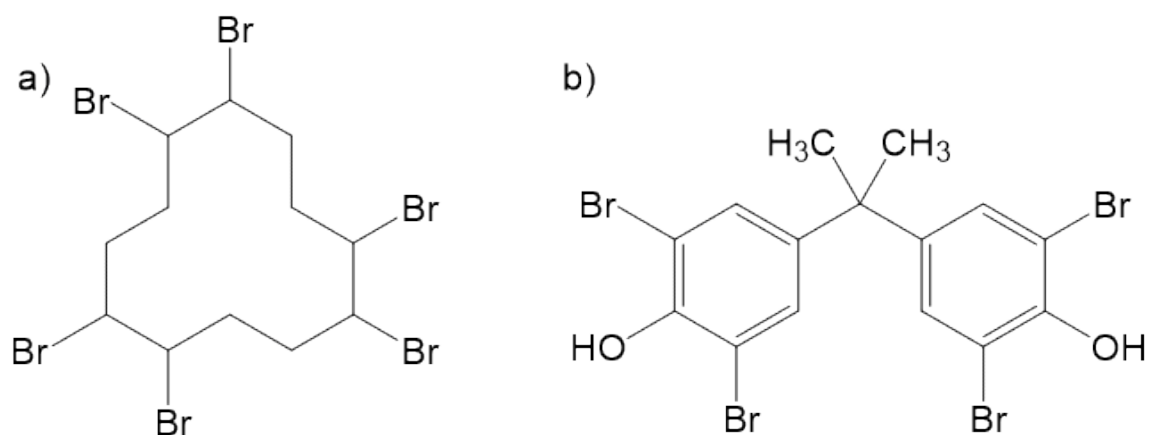
k ochlazení materiálu nebo způsobují tvorbu uhlíkového popela, který zabraňuje přístupu vzduchu.

Podle chemického složení se retardéry hoření dělí do čtyř skupin: anorganické, halogenované, na bázi fosforu a na bázi dusíku. Další dělení je založeno na typu vazby retardéru na polymer, podle něhož se dále dělí na aditivní, které nejsou chemicky vázány na polymer a reaktivní, které jsou inkorporovány do polymerní matrice chemickou vazbou. Celosvětová spotřeba retardérů hoření je asi 2 miliony tun ročně. Asi 85 % je použito v plastech, zbytek je součástí textilií a pryžových výrobků. Největší podíl na trhu má hydroxid hlinitý - cca 40 %, bromované retardéry hoření - cca 20 %, chlorované - asi 11 %, a dále oxid antimonitý - cca 8,5 %. Typickými představiteli retardérů hoření jsou halogenované retardéry, které rychlost hoření materiálu ovlivňují vychytáváním volných radikálů tak, že při hoření dochází ke spékání materiálu, čímž vzniká krusta bránící přístupu vzduchu a dochází ke snížení vzniku těkavých hořlavých produktů. Výsledkem je pomalejší hoření.

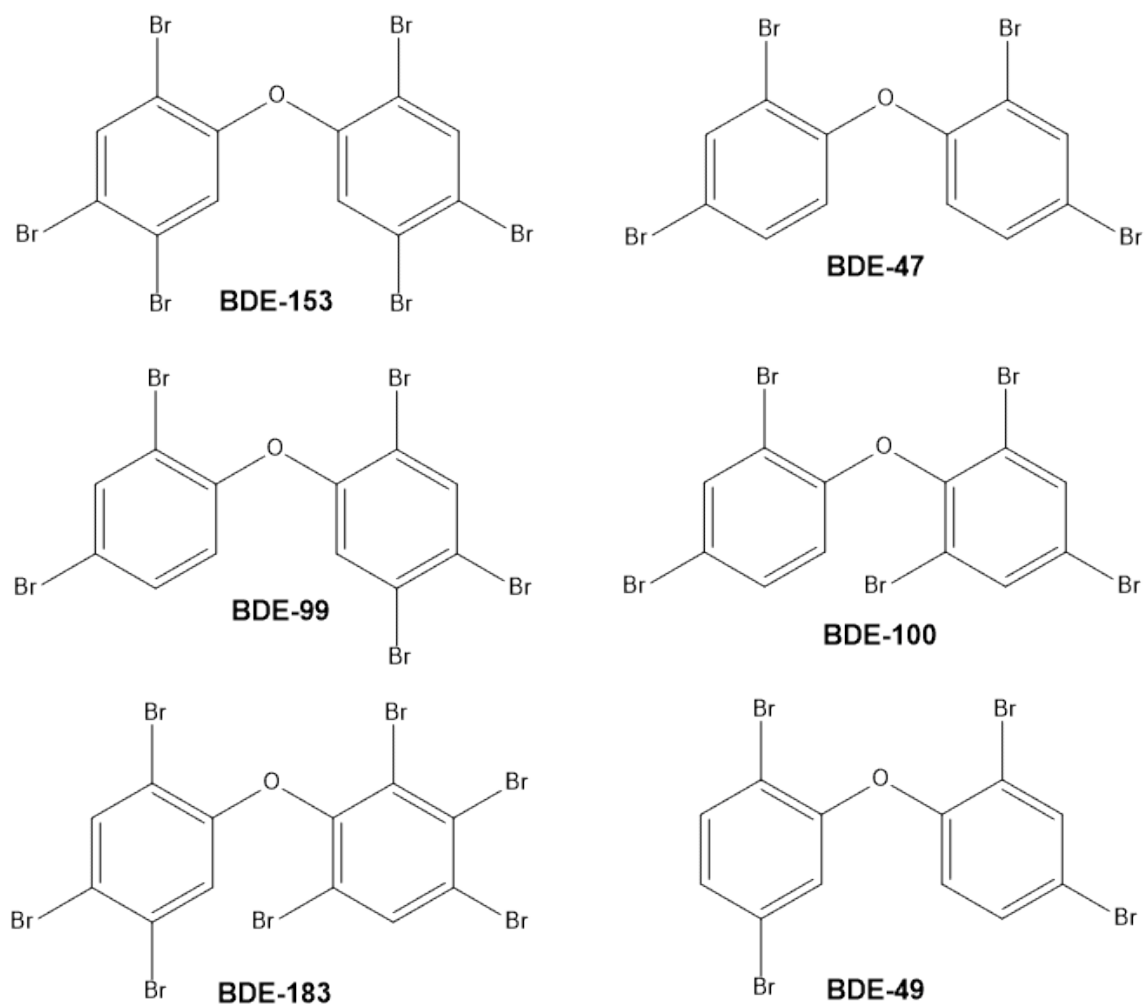
Dnes je známo asi 75 různých komerčních bromovaných zpomalovačů hoření (BFR), které mohou být rozděleny do tří skupin v závislosti na zabudování retardérů do polymerní matrice: monomery, reaktivní a aditivní přísady. Bromované polymery jsou vyráběny tak, že bromovaný monomer je přidáván do polymerní směsi před polymerací, příkladem je tetrabrombisfenol A (Obr. 2) chemicky vázaný na plast. V druhém případě jsou bromované retardéry smíchány s již vytvořenými polymery, příkladem jsou penta-BDE v polyuretanových pěnách, deca-BDE v PVC, v textiliích a v elektronice je to tetrabrombisfenol A.



**Obr. 1** Obecná struktura: a) polybromovaných difenyletherů (PBDE), b) polychlorovaných bifenyľů (PCB), c) struktura dichlorodifenyľtrichlorethanu (DDT).



**Obr. 2** Struktury dalších sledovaných polybromovaných retardérů: a) hexabromcyklododekan b) tetrabrombisfenol A.



**Obr. 3** Zástupci PBDE s nejvyšším zastoupením v životním prostředí.

Běžné použití bromovaných retardérů hoření vyráběných pod různými obchodními značkami je podle EFSA následující:

- a) Polybromované difenylethery (PBDE) - plasty, textilie, elektronika (Obr. 1)
- b) Hexabromcyklododekan (HBCDD) - tepelná izolace ve stavebnictví (Obr. 2)
- c) Tetrabrombisfenol A (TBBPA) - tištěné spoje, termoplasty v TV (Obr. 2)
- d) Polybromované bifenyly (PBB) - pěny, textilie
- e) Ostatní bromované FR

Polybromované difenylethery jsou většinou lipofilní sloučeniny odolné účinkům chemických látek, světla, tepla, které představují vzhledem ke své bioakumulační schopnosti rizikové sloučeniny pro životní prostředí. Nejzávažnější PBDE dělíme do tří skupin podle počtu vázaných atomů bromu: penta-, okta- a deka-PBDE bromované bifenyly. PBDE byly jako první prokázány v životním prostředí už na konci 70. let 20. století [46] v Arkansasu a New Jersey v USA, kde bylo měření iniciováno přítomností chemických průmyslových závodů produkujících tyto látky.

### **1.3. Využití chiroptických metod pro klinickou diagnostiku**

Zánětlivá reakce je obrannou reakcí organismu na poškození (faktory fyzikální, chemické a biologické infekce). Na zánětlivé reakci se podílejí buňky imunitního systému a proteiny krevní plazmy. Typické zánětlivé projevy jsou vyvolány působením látek, které se během zánětu uvolňují a fungují jako signální molekuly, tzv. mediátory zánětu. Za určitých okolností může zánětlivá reakce nabýt rázu autoagresivního a poškodit orgán nebo celý organismus. Expozice organismu nízkým dávkám cizorodých látek, resp. ukládání těchto látek v organismu vede k stimulaci mírné chronické zánětlivé reakci, která je v konečném důsledku schopna vyvolat chronické onemocnění jako je např. ateroskleróza a přispět k rozvoji tzv. civilizačních onemocnění (kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus, nádorová onemocnění).

U těchto onemocnění je zcela zásadní prevence a časná diagnostika. Jako součást dizertační práce jsem se zabývala s týmem prof. Vladimíra Setničky z Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha využitím chiroptických metod při včasné diagnostice některých civilizačních chorob, zejména u diabetu mellitu.

Diabetes mellitus je závažné metabolické onemocnění s prevalencí do 10 % v populaci, přičemž víme, že asi třetina nemocných není diagnostikována a v době záchytu trpí již pokročilými mikro- nebo makrovaskulárními komplikacemi. Diabetici jsou ohroženi předčasným rozvojem aterosklerózy se všemi orgánovými projevy, z jejich řad se také rekrutují pacienti trpící chronickou renální insuficiencí. Včasná diagnostika a adekvátní léčba jsou nezpochybnitelné.

Diabetes mellitus je označení onemocnění, které se dělí podle etiologie na diabetes mellitus 1. typu (T1DM), diabetes mellitus 2. typu (T2DM) a další specifické typy diabetu. Diabetes mellitus 1. typu je také označován jako inzulin dependentní diabetes mellitus (IDDM), který se obvykle manifestuje v nižším věku (dřívější označení juvenilní) a je vyvolán nedostatkem inzulinu v důsledku zničení  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu. Příčinnou je autoimunitní reakce organismu spuštěná pravděpodobně virovým onemocněním nebo chemickou modifikací buněk u jedinců s genetickou predispozicí, přičemž na destrukci inzulin produkujících buněk se podílejí i reaktivní formy kyslíku. Genetické predispozice jsou mnohem významnější u diabetu 2. typu. Diabetes mellitus 2. typu je označován jako non inzulin dependentní diabetes (NIDDM), i když nezávislost na exogenní dodávce inzulinu není pravidlem. Tímto typem diabetu trpí 90 % diabetiků a je důsledkem inzulinové rezistence transportérů pro glukózu typu 4 (GLUT 4) nebo relativního nedostatku inzulinu vzhledem k nadměrnému množství bílé tukové tkáně. Jedná se většinou o starší pacienty často obézní a redukce hmotnosti je u nich důvodem progresivního zlepšení metabolismu glukózy. Genetické vlivy o tohoto typu onemocnění jsou známy a jedná se o polygenní typ dědičnosti. Tato porucha bývá doprovázena dalšími metabolickými změnami, hovoříme o metabolickém syndromu. K T2DM se řadí i autozomálně dědičné formy diabetu manifestující se v mládí vyvolané mutací genů označené jako Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY). Vyskytují se v několika podtypech s odlišným průběhem. Benigní formu představuje diabetes MODY 2 způsobený heterozygotní formou defektu enzymu glukokinázy v  $\beta$ -buňkách pankreatu. MODY diabetu dalších typů jsou vyvolané poruchou genů pro různé transkripční faktory a vedou k postupnému selhávání  $\beta$ -buněk v produkci inzulinu. Dalším typem diabetu je gestační diabetes manifestovaný v průběhu těhotenství [47].

Fyziologická funkce inzulinu je aktivace membránových přenašečů pro glukózu GLUT 4, které zajišťují přenos glukózy do buněk svalové a tukové tkáně [48]. Pokud není glukóza využívána ve tkáních, zvyšuje se její hladina v krvi a vzniká hyperglykémie, tím postupně dochází k překročení renálního prahu pro glukózu v buňkách proximálního tubulu

zajišťujících zpětnou resorpci glukózy a vzniká glykosurie. Osmoticky aktivní glukóza v definitivní moči na sebe váže velké množství vody, což se projevuje polyurií a se zvýšeným vylučováním vody je spojená i polydipsie. Následkem tělní buňky závislé na GLUT 4 nemají dostatek glukózy pro získávání energie a začnou utilizovat mastné kyseliny, což vede ke zvýšené produkci ketolátek, které jsou následně detekovány v moči (ketonurie), ketogenéze je charakteristická zejména pro T2DM [49]. Typické klinické příznaky diabetu využíváme v diagnostice DM, ke kontrole průběhu léčby a ke včasnému odhalení hrozících komplikací diabetu. Při diagnostice diabetu je obvyklým biologickým materiálem pro stanovení glykémie krevní plazma získaná z venózní krve. Podle doporučení České společnosti klinické biochemie a České diabetologické společnosti, které vychází z doporučení Světové zdravotnické organizace (WHO) a Americké diabetologické asociace (ADA), se postupuje následovně: diagnóza DM se stanoví z hodnoty glykémie a pokud je glykémie v rozmezí 6,1 - 6,9 mmol/l, provede se glukózový toleranční test (GTT) [47].

V naší práci jsme se zaměřili na včasnou diagnostiku T1DM a včasnou diagnostiku komplikací u DM [50]. Pro T1DM je charakteristická selektivní destrukce  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu prostřednictvím vlastního imunitního systému. V současné době je jednou z obecně přijímaných teorií vysvětlujících tuto autoimunní destrukci tzv. teorie virová, buňka infikovaná virem prezentuje na svém povrchu jiné antigeny než zdravá buňka a imunitní systém infikované buňky ničí. Následně jsou v průběhu apoptózy infikovaných buněk do krve uvolňovány změněné signální molekuly a pro jejich včasné odhalení budou nově testovány chiroptické metody.

Do pilotní studie byli vybráni pacienti léčení v diabetologické ambulanci Kliniky dětí a dorostu FNKV, kteří byli rozděleni do dvou skupin: dlouhodobě léčení a nově diagnostikovaní. Pacientům byl proveden standardní odběr venózní krve do zkumavek Vacuette s protisrážlivým činidlem draselnou solí kyseliny ethylendiamminotetraoctové ( $K_3EDTA$ ). Na Ústavu biochemie, buněčné a molekulární biologie 3. LF UK byly získané vzorky krve zpracovány pro následné analýzy tímto způsobem: centrifugace při  $1500 \times g$  po dobu 10 minut a zamražení plazmy na teplotu  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ , (30  $\mu\text{l}$  plazmy bylo před zamražením použito pro elektroforézu proteinů krevní plazmy). Před vlastní analýzou vzorků krevní plazmy v Laboratoři medicínální diagnostiky VŠCHT Praha byly tyto rozmrazeny na pokojovou teplotu  $22 - 24 \text{ }^\circ\text{C}$ , zfiltrvány a centrifugovány a použity pro analýzu s využitím metod chiroptické spektroskopie.

## 1.4. Klasifikace chiroptických metod

Obecně je chiroptická spektroskopie založená na interakci chirálních molekul s kruhově polarizovaným zářením. Chirální molekuly jsou molekuly obsahující atom uhlíku, na který jsou vázány čtyři různé ligandy a tyto chirální molekuly stáčí rovinnou polarizovaného světla. Dnes rozlišujeme několik typů chiroptických metod.

### 1.4.1. Ramanova optická aktivita

Na přelomu 60. a 70. let 20. století bylo na základě obecné teorie polarizačních vlastností pružného Rayleighova a nepružného Ramanova rozptylu světla chirálními molekulami ukázáno, že rozptýlené světlo obsahuje velmi slabou složku s kruhovou polarizací, a že intenzita rozptylu dopadajícího pravo- a levotočivě kruhově polarizovaného záření se vzájemně liší [49]. Na základě tohoto objevu vznikla a rozvinula se úplně nová chiroptická metoda známá jako Ramanova optická aktivita (ROA), dnes se jedná o spektroskopickou metodu využitelnou pro celou řadu chirálních látek, počínaje od malých jednoduchých molekul až po částice virů [51]. ROA je významná v tom, že měří vibrační optickou aktivitu a poskytuje ve srovnání se standardní technikou viditelného a ultrafialového cirkulárního dichroismu, který měří elektronovou optickou aktivitu s mnohem bohatší stereochemickou informací.

### 1.4.2. Elektronový cirkulární dichroismus

Elektronový cirkulární dichroismus (ECD) je chirální varianta konvenční absorpční spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti [52, 53]. Na rozdíl od klasické absorpční spektroskopie se v ECD používá kruhově polarizované záření. Chirální molekuly absorbují pravo- a levotočivě kruhově polarizované záření rozdílně. ECD je tedy z podstaty možné použít pouze pro zkoumání struktury chirálních molekul a odhalení jejich enantiomerní čistoty včetně strukturní studie biomolekul [52, 53].

### 1.4.3. Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie (IČ) patří do skupiny nedestruktivních analytických metod, kdy vzorek není analýzou poškozen a přitom poskytuje informace o svém složení. Získané hodnoty vibrační energií souvisí s pevností chemických vazeb v molekule, s molekulovou geometrií a hmotnostmi jader atomů, čehož využíváme k popisu jejich molekulové struktury. Infračervená spektroskopie je založena na měření IČ záření absorbovaného nebo odraženého vzorkem. Absorpce IČ záření souvisí se změnou vibračního nebo rotačního

stavu molekul. Z informací ze spektra jsme schopni zjistit informace o výskytu funkčních skupin, konstituci molekul a vzájemné interakci molekul. Pomocí infračervené spektroskopie lze stanovit látky, jejíž molekuly obsahují alespoň slabě polární vazby, ať již se jedná o látky organické nebo anorganické povahy. U infračervené spektroskopie často používáme techniku zeslabeného úplného odrazu (ATR). Technika ATR spočívá v nanášení vzorku v kompaktní vrstvě na povrch měrného hranolu s vysokým indexem lomu vhodném pro vzorky a používá se v případě, kdy není možné připravit transparentní tenké vrstvy.

## **2. MATERIÁL A METODY**

### **2.1. Bromované retardéry hoření**

#### *2.1.1. Testovaná skupina a odběr tukové tkáně*

Vzorky bílé tukové tkáně byly odebrány v průběhu běžných chirurgických zákroků prováděných na Klinice plastické chirurgie FNKV a celá klinická studie byla schválena etickou komisí 3. LF UK [43]. Vzorky tukové tkáně byly odebrány z podkožního tuku z prsou (51 vzorků), z břicha (55 vzorků) a ze zad (1 vzorek). Celkem bylo odebráno 107 vzorků lidského podkožního tuku (96 ženy, 11 muži); průměrný věk skupiny je 43,6 roku s rozmezím 19 až 76 let. 46 jedinců trpělo nadváhou s body mass indexem (BMI) 25,0 – 29,9 kg/m<sup>2</sup>, 22 jedinců obezitou s BMI vyšší než 30,0 kg/m<sup>2</sup>. Podrobné antropometrické údaje o věku, váze, výšce a BMI jedinců zahrnutých do studie jsou shrnuty v Tabulce 1. Pro získání relevantních údajů ohledně možných cest expozice a možností kontaminace pacienti vyplňovali dotazník obsahující jejich osobní data (věk, hmotnost, výška), změny hmotnosti během posledních měsíců a údaje o zaměstnání, z důvodu možnosti pracovní expozice. Pacientům byla zároveň odebírána krev pro stanovení glykémie a hladin plasmatických lipidů (cholesterol, HDL, LDL a triacylglyceridy). Vzorky tukové tkáně byly po odběru zmrazeny na teplotu -70 °C a uchovány pro následnou GC-MS analýzu.

**Tabulka 1** Antropometrické parametry skupiny 107 dobrovolných dárců tukové tkáně

	<b>Průměr</b>	<b>SD</b>	<b>P50</b>	<b>Iqr</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
<b>Věk (roky)</b>	43,2	12,4	41,0	16,5	19,0	76,0
<b>Hmotnost (kg)</b>	75,2	15,2	74,0	18,0	49,0	150,0
<b>Výška (cm)</b>	167,4	7,3	166,0	6,0	150,0	190,0
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26,8	4,9	26,0	6,0	18,7	47,3

SD - směrodatná odchylka, P50 - medián, Iqr - mezikvartilové rozpětí, Min. - nejmenší, Max. - největší hodnota.

### 2.1.2. Chemikálie

Čistota všech standardů použitých chemikálií byla vyšší než 98 %. Směs indikátorů PCBs obsahující kongenery 28, 52, 101, 138, 153 a 180; individuální standardy PCBs 118 a PCB 112, 2,2',4,4',5,5'-hexabrombiphenyl (PBB 153) byly zakoupené od Dr. Ehrenstorfer GmbH (Německo). Individualní standardy organochlorovaných pesticidů: hexachlorobenzen (HCB);  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - isomery hexachlorcyclohexanu (HCH); dichlorodichlorophenylethylene (DDE): o, p'-DDE, p, p'-DDE; dichlorodiphenyldichlorethan (DDD): o, p'-DDD, p, p'-DDD; o, p'-DDT a p, p'-DDT byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (USA). Individualní standardy PBDE kongenerů (2,4,4'-triBDE (BDE 28); 3',4,4'-tribromdiphenyl ether (BDE 37); 2,2',4,4'-tetra BDE (BDE 47); 2,2',4,5'-tetra BDE (BDE 49); 2,3',4,4'-tetraBDE (BDE 66); 3,3',4,4'-tetrabromdiphenyl ether (BDE 77); 2,2',3,4,4'-pentaBDE (BDE 85); 2,2',4,4',5-pentaBDE (BDE 99); 2,2',4,4',6- penta BDE (BDE 100); 2,2',4,4',5,5'-hexaBDE (BDE 153); 2,2',4',4,5,6'-hexaBDE (BDE 154); 2,2',4,4',5',6-hexaBDE (BDE 183); 2,2',3,3',4,4',5,6'-octa-bromdiphenyl ether (BDE 196); 2,2',3,3',4,4',6,6'-octa-bromdiphenyl ether (BDE 197); 2,2',3,4,4',5,5',6-octa-bromdiphenyl ether (BDE 203); 2,2',3,3',4,4',5,5',6-nona-bromdiphenyl ether (BDE 206); 2,2',3,3',4,4',5,6,6'-nona-bromdiphenyl ether (BDE 207); deca-bromdiphenyl ether (BDE209); hexabrombenzen (HBB); pentabromtoluen (PBT); pentabromethylbenzen (PBEB); 1,2-Bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethan (BTBPE);



octabromtrimethylphenylindan (OBIND) a decabromdiphenylethan (DBDPE) byly zakoupeny od Wellington Laboratories (Kanada). Decabrom [ $^{13}\text{C}_{12}$ ]diphenyl ether ( $^{13}\text{C}$  BDE 209) byl dodán firmou Cambridge Isotope Laboratories (USA). Pracovní roztoky standardů byly připraveny v isooktanu a skladovány při teplotě 5 °C.

Ethylacetát byl dodán firmou Sigma-Aldrich (USA). Hexan, isooktan, cyklohexan a dichlormethan byly dodány firmou Merck (Německo). Všechna rozpouštědla byla na úrovni stopové organické analýzy. Kyselina sírová (98 %) byla zakoupena od firmy Merck (Německo). Stacionární fáze pro gelovou permeační chromatografii (GPC) Bio-Beads S-X3 (styren-divinylbenzen gel, 200-400 mesh) zakoupena od firmy Bio Rad (USA). Bezvodý síran sodný zakoupen u firmy Penta (Chrudim, ČR) [43].

### *2.1.3. Úprava klinických vzorků*

5,0 g lidské tukové tkáně bylo smícháno s 20,0 g bezvodého síranu sodného a extrahováno v Soxhletu po dobu 8 hodin 170 ml směsi hexan/dichloromethan (1:1, v/v). Extrakt byl odpařen do sucha při teplotě 40 °C a sušina (izolovaný tuk) zvážena pro určení obsahu tuku v tkáni. Izolovaný tuk (cca 750 mg) byl rozpuštěn v 10 ml směsi cyclohexan/ethylacetát (1:1, v/v) s přidavkem vnitřního standardu PCB 112 a purifikován na GPC s mobilní fází cyclohexan/ethylacetát (1:1, v/v). Frakce o objemu 18 - 36 ml byla zachycena, vysušena do sucha a následně rozpuštěna ve 200  $\mu\text{l}$  isooktanu s přidavkem vnitřních standardů BDE 37 (5 ng/ml), BDE 77 (5 ng/ml) a  $^{13}\text{C}$ -BDE 209 (50 ng/ml).

### *2.1.4 Plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie*

Veškeré GC-MS analýzy byly provedeny na plynovém chromatografu Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, USA) spojeném s trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem 7000B (Agilent Technologies, USA), který pracuje v elektron ionizujícím (EI) módu pro stanovení PCB a negativní chemická ionizace (NCI) byla použita pro stanovení BFR. MassHunter software (verze B05.02, Agilent Technologies, USA) byl použit pro zpracování dat [41, 43, 45].

Stanovení PCB bylo provedeno na GC koloně RXI-17Sil (délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, vrstva stacionární fáze 25  $\mu\text{m}$ , Restek, USA); objem nástřiku 8  $\mu\text{l}$ ; mód nástřiku: ventování par rozpouštědla PTV; teplotní program nástřiku: 50 °C (0,17 min), 600 °C/min do 325 °C (5 min), 100 °C/min do 208 °C; čas odvětrávání, tok a tlak: 1 min, 50 ml/min,

průtok mobilní fáze (He): 1,3 ml/min; teplotní program pece: 50 °C (2,67 min), 30 °C/min do 240 °C, 2 °C/min do 270 °C, 40 °C/min do 340 °C (12 min); teplota transferline: 280 °C. Trojitý kvadrupól pracoval v módu multiple reaction monitoring.

Stanovení PBDE bylo provedeno na GC koloně DB-XLB (délka 15 m, vnitřní průměr 0,18 mm, vrstva stacionární fáze 0,07 µm, Agilent Technologies, USA); objem nástřiku: 2 µl; mód nástřiku: pulsní nástřik bez splitu; doba nástřiku bez splitu: 1,5 min; teplotní program nástřiku: 80 °C (0,2 min), 600 °C/min do 320 °C (3,5 min); teplota pulsního nástřiku: 50 psi (1,5 min); průtok mobilní fáze (He): 1,3 ml/min, teplotní program pece: 80 °C (1,5 min), 30 °C/min do 320 °C (7 min); teplota transferline: 300 °C. Trojitý kvadrupól pracoval v módu selected ion monitoring.

#### *2.1.5. Statistické vyhodnocení dat*

Statistické zpracování získaných dat bylo provedeno pomocí programu Statistika. Celkem byla zpracována data pro 107 vzorků tukové tkáně; v případě, že se naměřená koncentrace polutantů nacházela pod limitem kvantifikace metody (LOQ), byla do statistických výpočtů zahrnuta polovina LOQ.

## **2.2. Chiroptické metody**

### *2.2.1. Testované skupiny a odběry vzorků krve a moče*

Do této studie bylo zařazeno 12 pacientů s diabetem 1. typu, kteří byli vybráni na Klinice dětí a dorostu FNKV v Praze [50]. Skupinu kontrolních jedinců tvořilo 8 studentů 1. ročníku 3. LF UK. Průměrný věk pacientů a kontrol byl 15,1 a 19,7 roků. U všech testovaných subjektů byly určeny základní fyziologické a biochemické parametry související s T1DM a zároveň byla provedena elektroforéza plazmatických proteinů, uvedeno v Tabulce 2. Vzhledem k tomu, že kontrolní skupina nevykazovala zvýšenou hladinu krevní glukózy, nebyly u ní systematicky určeny hodnoty glykovaného hemoglobinu (HbA<sub>1c</sub>) 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<sub>3</sub>EDTA. Tato studie byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací a byla schválena Etickou komisí 3. LF UK. Od všech účastníků

studie byl zajištěn písemný informovaný souhlas, u nezletilých byl informovaný souhlas stvrzen i jejich rodiči.

## Tabulka 2

Průměrné hodnoty vybraných fyziologických a biochemických parametrů pro pacienty s T1DM a kontrolní jedince

Parametr	N (počet)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Glykémie (mmol/l)	HbA <sub>1c</sub> (mmol/mol)	HSA (%)	α-globuliny (%)
<b>T1DM</b>	12	19,6	10,9 - 11,9	75,9	52,6	23,5
<b>Kontroly</b>	8	22,7	4,0 - 4,5	Neurčeno	55,4	18,8

Ve studii mikroalbuminurie bylo použito 10 vzorků moči od pacientů s diagnostikovaným DM [54]. Chlapců ve věku 11 – 15 let (všichni bez dříve klinicky diagnostikované mikroalbuminurie) a 5 dívek ve věku 13 – 18 let (jedna s klinicky diagnostikovanou MA, čtyři bez předchozí detekce MA). Všechny vzorky byly získány od pacientů Diabetologické ambulance FNKV v Praze.

### 2.2.2. Úprava klinických vzorků

Odebrané vzorky plné krve byly při pokojové teplotě centrifugovány při  $1500 \times g$  po dobu 10 minut na Ústavu biochemie, buněčné a molekulární biologie 3. LF UK. Získané frakce plazmy byly okamžitě zmrazeny a uchovány při teplotě  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před každým měřením byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě a zfiltrovány pomocí membránových filtrů s porozitou  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ . (Grace, USA) při  $13\,000 \times g$ , po dobu 10 minut, teplota  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Po odběru byly vzorky moče zpracovány na Ústavu biochemie, buněčné a molekulární biologie 3. LF UK: centrifugace při  $1500 \times g$  po dobu 10 min, supernatant odebrán a zamražen na teplotu  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následně byly vzorky transportovány v tepelně izolované nádobě na suchém ledu ( $-78,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) do Laboratoře medicínální diagnostiky na Ústav analytické chemie VŠCHT Praha, kde byly skladovány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před měřením byly vzorky rozmrazeny na pokojovou teplotu, zfiltrovány centrifugací při  $13000 \times g$  po

dobu 10 min přes centrifugační filtry s polyvinylidendifluoridovou membránou o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$ .

### 2.2.3. Instrumentace chiroptických metod

Ramanova spektra a spektra Ramanovy optické aktivity byla naměřena simultánně na spektrometru ChiralRAMAN-2X<sup>TM</sup> (BioTools Inc., USA), který je vybaven systémem OPUS 2W/mpc6000 (Laser Quantum, Velká Británie) s excitační vlnovou délkou 532 nm. Zfiltrované vzorky plazmy (100  $\mu\text{l}$ ) byly analyzovány v oblasti 2500-90  $\text{cm}^{-1}$  v kyvetě o rozměrech 4  $\times$  4  $\times$  10 mm s antireflexní povrchovou úpravou, která byla umístěna v držáku s Peltierovým chlazením pro kontrolu teploty vzorků (15  $^{\circ}\text{C}$ ). Pro záznam spekter ve střední infračervené oblasti (4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ ) byl použit IČ spektrometr s Fourierovou transformací Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) vybavený ZnSe krystalem pro techniku zeslabeného úplného odrazu (ATR). Zfiltrované vzorky (30  $\mu\text{l}$ ) byly měřeny přímo bez další úpravy [50, 55-57].

Měření ECD krve byla prováděna na spektrometru J-815 (Jasco, Japonsko) při teplotě 23  $^{\circ}\text{C}$  (kontrolováno Peltierovým článkem). Pro analýzu při nižších vlnových délkách byly všechny zfiltrované vzorky naředěny sterilním fosfátovým pufrům (pH = 7,4) v poměru 1/3 v/v. Zředěné vzorky (25  $\mu\text{l}$ ) byly dávkovány do křemenné kyvety s optickou dráhou 0,01 mm (Hellma, Německo) a změřena jejich spektra v oblasti 185 - 280 nm. Před a po spektrálních měřeních byly všechny kyvety a ATR krystal vyčištěny roztokem Starna CellClean (Starna Scientific Ltd., Velká Británie), opakovaně propláchnuty demineralizovanou vodou a methanolem a vysušeny.

Měření ECD moče byly prováděna na spektrometru J-815 (Jasco, Japonsko) při teplotě 23  $^{\circ}\text{C}$  (kontrolováno Peltierovým článkem) [54]. Měření probíhalo ve spektrální oblasti 185 – 280 nm pro ředěné vzorky moči a modelové kalibrační roztoky, pro vzorky neředěné moči při vlnových délkách 195 – 280 nm. Optika přístroje a kyvetový prostor byly proplachovány tlakovým dusíkem (SIAD, ČR, čistota 99,99 %. 60  $\mu\text{l}$  vzorku bylo pipetováno do skládané křemenné kyvety o tloušťce měřené 0,1 mm (Hellma, Německo), pro analýzu kalibračních roztoků bylo pipetováno 300  $\mu\text{l}$  roztoku do pevné kyvety o tloušťce měřené vrstvy 1 mm (Hellma, Německo). Kyvety byly před každým měřením propláchnuty destilovanou vodou, methanolem (Penta, ČR, čistota p.a.) a vysušeny. Pro každý vzorek zjištěno 6 hodnot (rychlost snímání 50 nm/min, šířka štěrbin 2 nm, standardní citlivost 100 mdeg a rozlišení 0,1 nm).

#### 2.2.4. Statistické vyhodnocení dat

Získaná spektrální data byla vyhodnocena metodou lineární diskriminační analýzy (LDA) [58-60] 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 specifická a senzitivita a pro ověření kvality modelu byla provedena křížová validace. Spektra ECD byla zpracována v programu Spectra Manager verze 2.6.0.1 (Jasco, Japonsko). Vizualizace spekter pomocí programu MagicPlot Student verze 2.7.2. (MagicplotSystem, Rusko). U výsledných spekter nebyla provedena žádná korekce.

#### 2.2.5. Chemikálie a příprava kalibrační řady albuminu

Odměrný roztok lidského sérového-albuminu (HSA) 300 mg/l: 3,0 mg HSA (Sigma-Aldrich, USA, čistota  $\geq 99$  %, bez přítomnosti mastných kyselin a globulinu) bylo naváženo na analytických váhách AE200 (Mettler Toledo, USA), převedeno do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněno destilovanou vodou po rysku. Roztok ředěn destilovanou vodou tak, aby kalibrační roztoky obsahovaly koncentraci HSA 150, 100, 50, 15 a 10 mg/l. Analogickým způsobem připraveny roztoky HSA v moči, vzorky moče byly zředěny v poměru 1:1 v/v destilovanou vodou a následně spikovány odměrným roztokem HSA na koncentraci 150 mg/l a 10 mg/l.

### 3. VÝSLEDKY

#### 3.1. Bromované retardéry hoření

##### 3.1.1. Polybromované difenylethery

PBDE byly ve světě prokazatelně detekovány v mateřském mléce [13, 27], krvi [27, 29], tukové tkáni [30, 32] a fetálních játrech [33]. Epidemiologické studie popsaly souvislost mezi expozicí PBDE a sníženou funkcí štítné žlázy [34], poruchami spermiogeneze [35] a endokrinní disrupcí [36, 37]. Monitorování výskytu BFR v ČR bylo zahájeno na začátku 21. století, první data byla publikována v roce 2004 [25, 41, 42]. První údaje byly získány z vodních ekosystémů, později se začalo používat mateřské mléko jako biomarker pro monitoring lidské expozice. Analýza výskytu BFR v lidské tukové tkáni nejprve používala tukovou tkáň získanou při liposukcích, nyní jsme poprvé v ČR použili pevnou tukovou tkáň získanou při plastických operacích od zdravých pacientů, kteří podstupovali plastickou operaci z estetických důvodů [43]. Ve srovnatelné studii provedené v ČR v roce 2007 autoři analyzovali 98 vzorků získaných při liposukcích (Tabulka 3) [45].

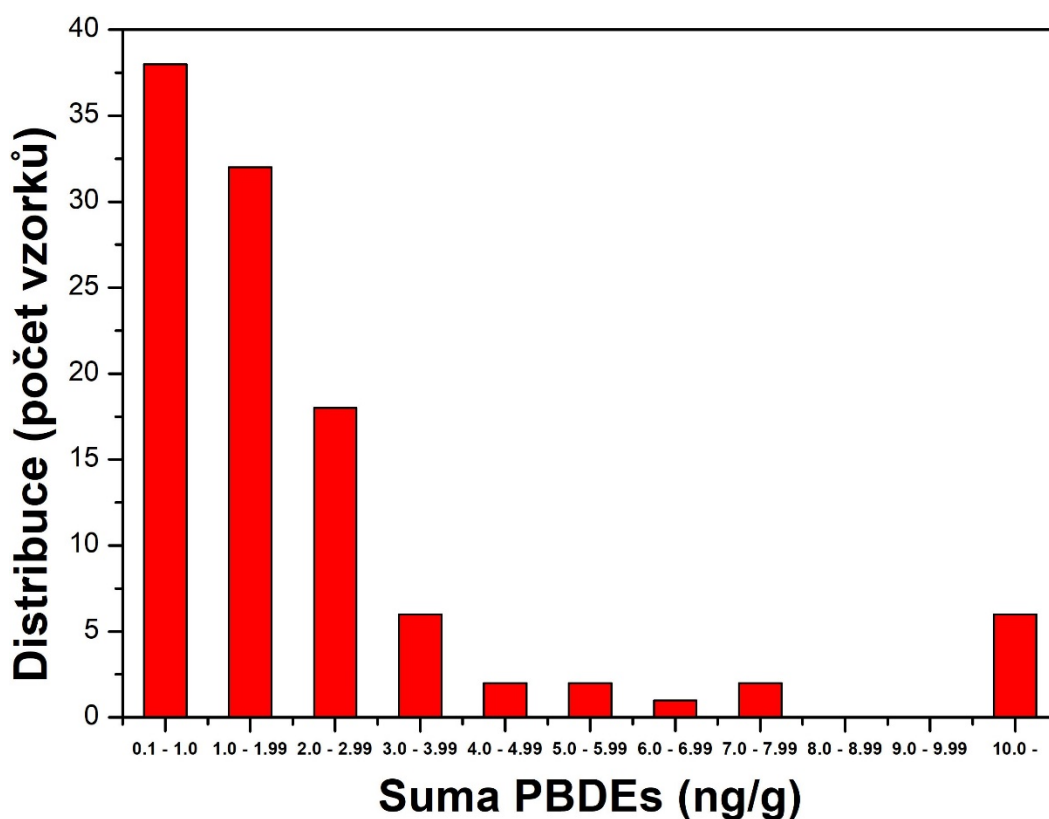
**Tabulka 3** Celková hladina PBDE, PCB a DDT v lidské tukové tkáni v ng/g tuku a porovnání současného stavu se stavem v roce 2009 pro ČR.

Analyt	Současná studie (N = 107)					Studie z roku 2009 (N = 98)					p
	$\bar{x}$	CV	$\tilde{x}$	P5	P95	$\bar{x}$	$\tilde{x}$	Me	P5	P95	
PBDE	3,31	1,26	1,87	0,45	12,2	4,4	1,39	3,1	0,9	9,1	0,05 - 0,1
PCB	776	0,80	563	162	2136	626	0,6	595	215	1285	< 0,025
DDT	467	0,94	302	109	1502	616	0,71	510	138	1668	< 0,01

$\bar{x}$  - aritmetický průměr,  $\tilde{x}$  – medián, CV - koeficient variace, P5 - percentil 5%, P95 - percentil 95%, p - pravděpodobnostní hodnota.

Dominantní zastoupení v lidské tukové tkáni vykazují kongenery PBDE 47, 99, 100 a 153 (Obr. 3); kongener 183 byl detekován jen v 41 vzorcích (38,3% zastoupení); hladiny ostatních PBDE 197, 196 + 203, 207, 206 a 209 byly pod limity kvantifikace (Tabulka 4). Distribuce celkové hladiny PBDE má asymetrické rozložení odpovídající logaritmicke-

normálnímu rozložení, a proto je pro jeho popis lepší použít medián nebo geometrický průměr (Obr. 4 a Tabulka 5). Celková koncentrace PBDE určená jako suma PBDE 28, 49, 47, 66, 85, 99, 100, 153 a 154 byla v intervalu od 0,05 (dolní limit kvantifikace) do 24,3 ng/g tuku. Při porovnání nově získaných dat s údaji z roku 2009 byly odhaleny prokazatelně nižší hladiny jednotlivých PBDE. Což je v souladu s údaji publikovanými v The Voluntary Emissions Control Action Programme (VECAP) v roce 2015, kde bylo zaznamenáno snížení prodeje čtyř hlavních PBDE a s tím by měl dle předpokladů souviset i klesající trend jejich potencionálního uvolnění do ovzduší, vody, půdy a zamoření lidské populace.



**Obr. 4** Distribuční rozložení celkové hladiny PBDE v tukové tkáni sledované skupiny.

**Tabulka 4** Koncentrace bromovaných retardérů hoření a organochlorovaných polutantů v lidské tukové tkáni (ng/g tuku).

<b>Analyt</b>	<b>Průměr</b>	<b>CV</b>	<b>P50</b>	<b>IQR</b>	<b>P5</b>	<b>P95</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>
<b>PCB 28</b>	1,88	2,32	0,99	1,52	0,03	4,03	0,03	35,5
<b>PCB 52</b>	0,16	1,22	0,07	0,19	0,03	0,47	0,03	1,06
<b>PCB 101</b>	0,61	1,31	0,33	0,66	0,03	1,93	0,03	4,34
<b>PCB 118</b>	12,7	0,85	9,5	10,9	2,6	31,9	1,60	68,8
<b>PCB 138</b>	194	1,05	143	156	33,2	530	11,4	1474
<b>PCB 153</b>	238	0,89	178	254	35,7	578	19,0	1114
<b>PCB 180</b>	329	0,84	241	245	53,2	827	20,9	1652
<b>suma PCB</b>	<b>776</b>	<b>0,80</b>	<b>563</b>	<b>619</b>	<b>150</b>	<b>2189</b>	<b>67,5</b>	<b>3466</b>
<b>HCB</b>	152	1,32	65,6	128	11,4	533	8,7	1152
<b><math>\alpha</math>- HCH</b>	0,53	1,06	0,49	0,68	0,03	1,21	0,03	3,9
<b><math>\beta</math>- HCH</b>	29,5	1,26	14,6	30,8	2,7	127	1,40	190
<b>Lindane</b>	0,39	0,74	0,44	0,66	0,03	0,71	0,03	0,89
<b><i>o,p'</i>- DDE</b>	0,37	1,02	0,24	0,70	0,03	0,74	0,03	2,48
<b><i>p,p'</i>- DDE</b>	410	0,99	252	364	71	1267	46	2217
<b><i>o,p'</i>- DDD</b>	0,47	1,07	0,23	0,85	0,05	0,94	0,05	3,39
<b><i>p,p'</i>- DDD</b>	10,0	2,35	2,73	7,41	0,25	32,6	0,03	166
<b><i>o,p'</i>- DDT</b>	1,41	1,61	0,87	1,25	0,20	4,25	0,11	18,6
<b><i>p,p'</i>- DDT</b>	45,5	1,80	25,6	36,7	4,15	134	0,50	617
<b>PBDE 47</b>	0,59	1,64	0,30	0,56	0,05	2,47	0,05	7,03
<b>PBDE 99</b>	0,49	2,46	0,14	0,24	0,05	2,18	0,05	8,23
<b>PBDE 100</b>	0,19	1,37	0,11	0,17	0,05	0,76	0,05	1,66
<b>PBDE 153</b>	1,02	1,78	0,67	0,64	0,10	2,05	0,10	16,6

CV – koeficient variace, IQR – mezikvartilové rozpětí, P50 - percentil 50 %, P5 - percentil 5 %, P95 - percentil 95 %.



**Tabulka 5** Koncentrace bromovaných retardérů hoření a organochlorovaných polutantů v lidské tukové tkáni v ng/g tuku - geometrický průměr a 95% interval spolehlivosti.

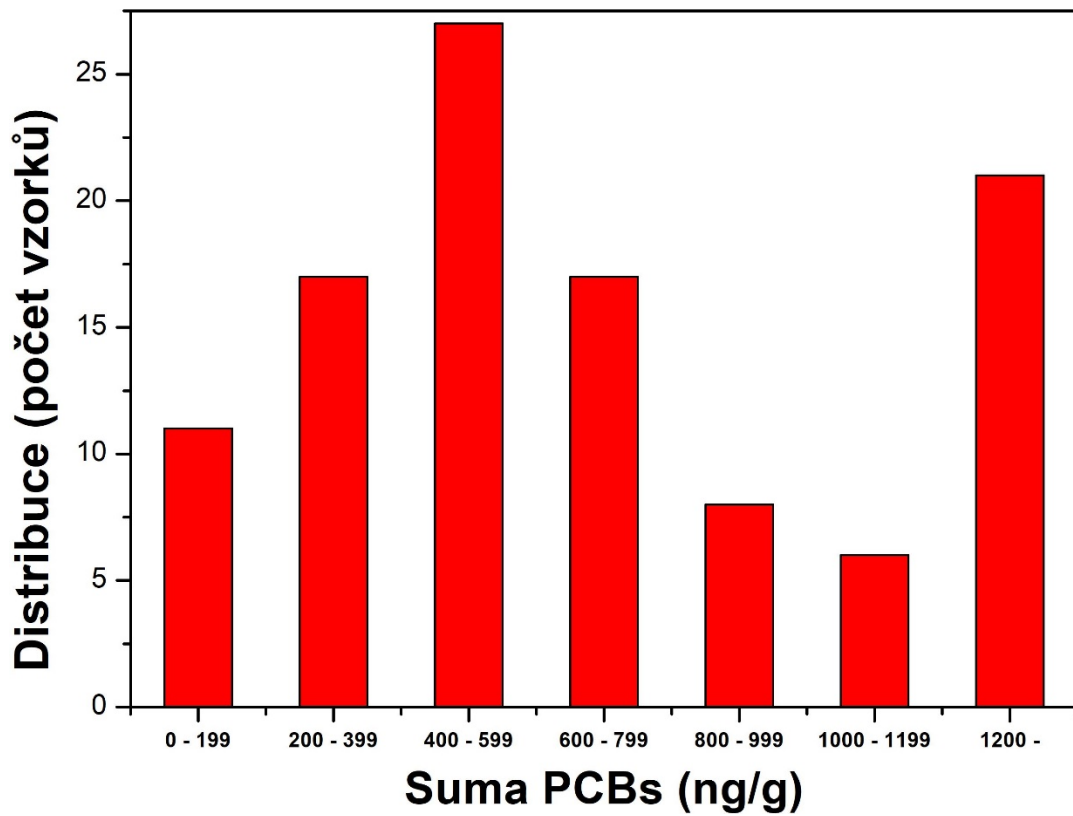
<b>Analyte</b>	<b>GM</b>	<b>LCI</b>	<b>UCI</b>
<b>PCB 28</b>	0,72	0,54	0,58
<b>PCB 52</b>	0,08	0,06	0,10
<b>PCB 101</b>	0,24	0,18	0,32
<b>PCB 118</b>	9,33	8,01	10,9
<b>PCB 138</b>	134	114	158
<b>PCB 153</b>	163	136	194
<b>PCB 180</b>	247	213	287
<b>PCB suma</b>	<b>594</b>	<b>514</b>	<b>685</b>
<b>HCB</b>	73,7	58,4	92,9
<b><math>\alpha</math>- HCH</b>	0,26	0,19	0,34
<b><math>\beta</math>- HCH</b>	15,6	12,5	19,4
<b>Lindane</b>	0,20	0,15	0,27
<b><i>o,p'</i>-DDE</b>	0,17	0,13	0,22
<b><i>p,p'</i>-DDE</b>	282	239	332
<b><i>o,p'</i>-DDD</b>	0,21	0,16	0,28
<b><i>p,p'</i>-DDD</b>	3,06	2,24	4,19
<b><i>o,p'</i>-DDT</b>	0,78	0,64	0,95
<b><i>p,p'</i>-DDT</b>	24,4	19,5	30,4
<b>PBDE 47</b>	0,27	0,22	0,35
<b>PBDE 99</b>	0,15	0,12	0,20
<b>PBDE 100</b>	0,11	0,10	0,14
<b>PBDE 153</b>	0,65	0,55	0,77

GM – geometrický průměr, LCI – dolní mez intervalu spolehlivosti, UCI – horní mez intervalu spolehlivosti.

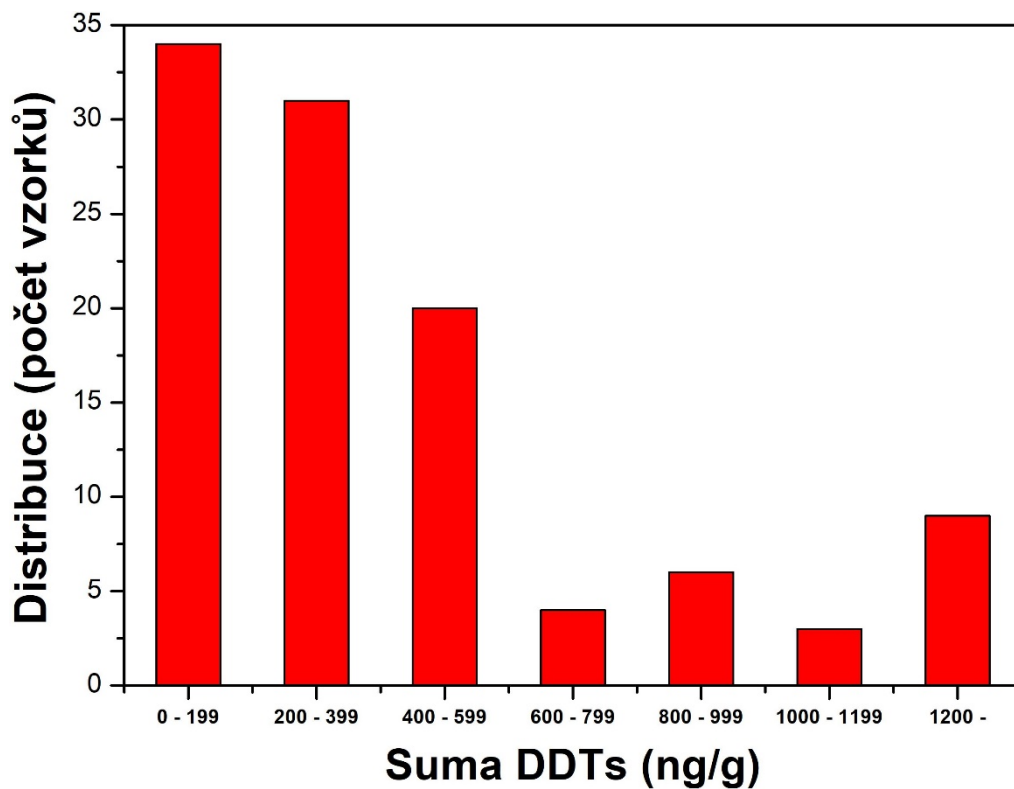
### 3.1.2. Polychlorované bifenyly a DDT

Polychlorované bifenyly byly v Československu produkovány od roku 1959 do roku 1984, měřitelné koncentrace byly poprvé detekovány v mléce a mase krav v Liblicích u Mělníka v roce 1987 a od té doby se začalo s monitorováním jejich výskytu v potravě (duben 1987 vyšetření mléka OHS Mělník, od listopadu 1987 příkaz Ministerstva zemědělství a výživy, č.j. 2957/87-110). Po zákazu výroby PCB v roce 1984 byly limity jejich výskytu v potravinách sníženy a v roce 1996 byla aktualizována hygienická pravidla. V současnosti má výskyt PCB v tukové tkáni vzrůstající tendenci, PCB jsou stále uvolňovány z dřívě aplikovaných nátěrů, při hoření odpadů, při skládkování barev a transformátorových olejů apod. Z těchto důvodů zajišťují České úřady pravidelné monitorování koncentrací PCB v atmosféře a potravinách. Celková koncentrace PCB v lidské tukové tkáni v rámci této studie se pohybovala v rozmezí 67,4 až 3466,1 ng/g tuku, s průměrnou hodnotou 776,0 ng/g tuku a mediánem 506,1 ng/g tuku. Při porovnání s daty publikovanými v roce 2009 je opět patrný pokles u většiny kongenerů PCB s výjimkou PCB 138 (121,6 ng/g tuku v roce 2009, nyní 193,6 ng/g tuku) a PCB 180 (245 ng/g tuku v roce 2009 a nyní 329,1 ng/g tuku), Obr. 5. Domníváme se, že u těchto kongenerů souvisí jejich zvýšení s jejich perzistentní strukturou. Z důvodu vyšších hladin těchto dvou kongenerů je i celková suma PCB v současnosti vyšší než byla v roce 2009. Současný výskyt PCB je navíc několika násobně vyšší v porovnání s hladinami PBDE.

Celková koncentrace DDT v tukové tkáni se pohybuje v rozmezí od 52,6 do 2489,21 ng/g tuku, s průměrnou hodnotou 467,27 ng/g tuku a mediánem 346,37 ng/g tuku, Obr. 6. Tyto hodnoty jsou prokazatelně nižší než v roce 2009.



Obr. 5 Distribuční rozložení celkové hladiny PCB v tukové tkáni sledované skupiny.



Obr. 6 Distribuční rozložení celkové hladiny DDT v tukové tkáni sledované skupiny.

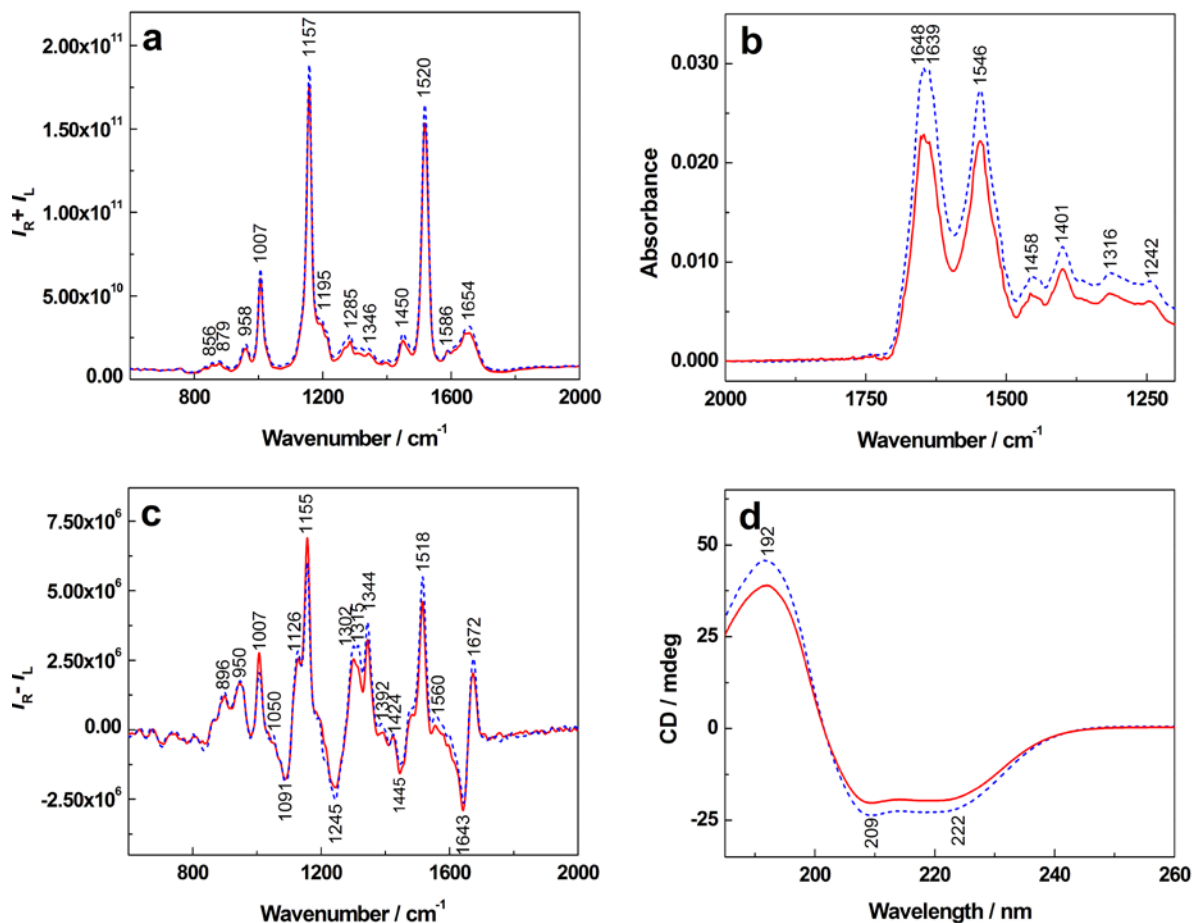
## 3.2. Chiroptické metody v diagnostice

### 3.2.1. Ramanova spektroskopie

V průměrných Ramanových spektrech pacientů s T1DM a kontrolních jedinců (Obr. 7a) [50] jsou patrné tři intenzivní pásy pocházející primárně z vibrací karotenoidů ( $1007$ ,  $1157$  a  $1520\text{ cm}^{-1}$ ), které jsou přítomny v plazmě v nízkých koncentracích. Jejich vysoká intenzita v Ramanově spektru je zapříčiněna rezonančním zesílením po excitaci ve viditelné oblasti ( $532\text{ nm}$ ) [55, 56, 60]. Spektra vykazují změny v intenzitách pásů typických pro proteiny s vysokým obsahem  $\alpha$ -helikální struktury, zejména pásy  $1654\text{ cm}^{-1}$  v oblasti amidu I,  $1285$  a  $1346\text{ cm}^{-1}$  v oblasti rozšířeného amidu III, odpovídají vibracím peptidové vazby, a pásy  $879$  a  $958\text{ cm}^{-1}$  lokalizované v oblasti vibrací proteinového/peptidového skeletu [57, 61]. Méně prokreslený pás  $1654\text{ cm}^{-1}$  a výrazně zvýšená intenzita raménka okolo  $1642\text{ cm}^{-1}$  v oblasti amidu I ve spektrech pacientů indikuje nižší obsah  $\alpha$ -helixu, což je konzistentní s degradací sérového albuminu při progresi T1DM [62, 63]. Sacharidy a lipidy přítomné v krvi jsou zastoupeny pásy  $958$  a  $1450\text{ cm}^{-1}$  [61, 64]. Jejich mírně snížené intenzity pravděpodobně odpovídají narušení metabolismu u diabetiků [65].

### 3.2.2. Infračervená spektroskopie

Na Obrázku 7b jsou zobrazena průměrná infračervená spektra se dvěma významnými pásy, jejich maxima leží okolo  $1648$  a  $1546\text{ cm}^{-1}$  v oblastech amidu I, resp. amidu II, které odpovídají vibracím peptidové vazby [66, 67]. 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 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 rozvoje T1DM v důsledku degračních procesů. Pokles v intenzitách byl rovněž pozorován pro pásy  $1458$  a  $1401\text{ cm}^{-1}$ , které odpovídají vibracím funkčních skupin alifatických postranních řetězců.



**Obr. 7** Průměrná Ramanova (a), infračervená (b), ROA (c) a ECD spektra (d) krevní plazmy znázorňující rozdíly mezi pacienty s T1DM (plná čára) a kontrolními jedinci (čárkovaná čára).

### 3.2.3. Ramanova optická aktivita

V průměrných spektrech Ramanovy optické aktivity (Obr. 7c) můžeme zaznamenat skupinu pásů v oblastech amidu I a amidu III, které jsou typické pro proteiny s vysokým obsahem  $\alpha$ -helikálních struktur [61, 68]. Ve spektrech pacientů byla pozorována vyšší intenzita negativního pásu  $1245\text{ cm}^{-1}$  značící vyšší obsah  $\beta$ -struktur [69], což může být vysvětleno rozvinutím struktury albuminu a jeho štěpením v průběhu onemocnění T1DM. Pozitivní pásy  $1302$ ,  $1344\text{ cm}^{-1}$  a raménko  $1315\text{ cm}^{-1}$  proteiny s převažující  $\alpha$ -helikální konformací [69]. Změny v intenzitách zmíněných pásů mohou být vysvětleny jako důsledek degradace albuminu na různé intermediáty, které jsou využity pro syntézu dalších plazmatických proteinů nezbytných pro udržení homeostázy organismu během T1DM [62, 63]. Výrazné pozitivní pásy  $1007$ ,  $1155$  a  $1518\text{ cm}^{-1}$  mohou být opět přiřazeny karotenoidům, přičemž některé z nich se překrývají s pásy aromatických aminokyselinových zbytků [56].

### 3.2.4. Elektronový cirkulární dichroismus

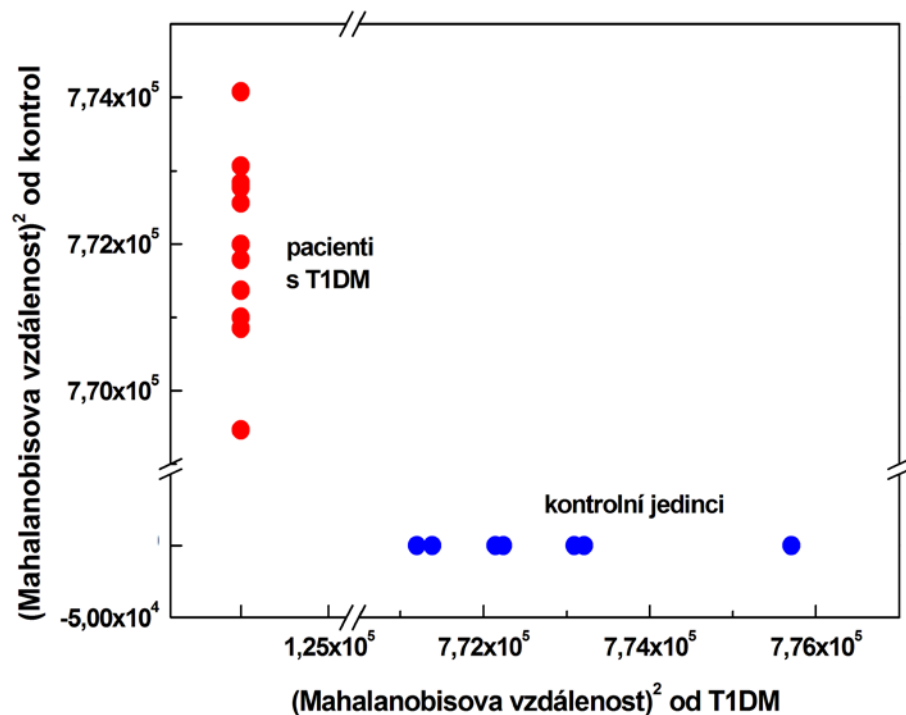
ECD spektra (Obr. 7d) se vyznačují třemi dominantními pásy charakteristickými pro sekundární strukturu proteinů [56, 70]. Spektrální průběh odpovídá proteinům s vysokým obsahem  $\alpha$ -helixu [70, 71], které jsou v krvi zastoupeny převážně lidským sérovým albuminem. Pozitivní pás 192 nm a dva částečně se překrývající negativní pásy 209 a 222 nm jsou výsledkem elektronových přechodů amidových skupin. Intenzita a tvar těchto pásů se mění v závislosti na geometrii peptidového řetězce [61, 72]. 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, zatímco proteiny si zachovávají svou nativní chirální strukturu. Nebo zadruhé, albumin jako negativně nabitý protein akutní fáze rozvinuje svou strukturu a je štěpen na achirální struktury. To vede ke zvýšené produkci pozitivních protizánětlivých proteinů ( $\alpha_1$ - a  $\alpha_2$ -globulinů) s cílem udržet normální hodnoty ostatních plazmatických proteinů, což je v souladu s patofyziologií T1DM [62, 63].

### 3.2.5. 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 chemometricky. Cílem bylo odlišit pacienty od kontrol na základě spektrálních vzorů (spectral pattern recognition), dále určit senzitivitu a specificitu použitých spektroskopických metod a prokázat spolehlivost matematického modelu [71, 73].

Výsledkem statistického vyhodnocení bylo zjištění, že jednotlivé metody využitě samostatně neposkytují uspokojivé hodnoty senzitivity ani specificity. Na základě tohoto poznatku a skutečnosti, že vybrané spektroskopické metody poskytují navzájem komplementární informace, byl vytvořen souhrnný matematický model kombinující všechny čtyři použité spektroskopie (Obr. 8).

Po aplikaci matematického modelu 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 % (Tabulka 6).



**Obr. 8** 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.

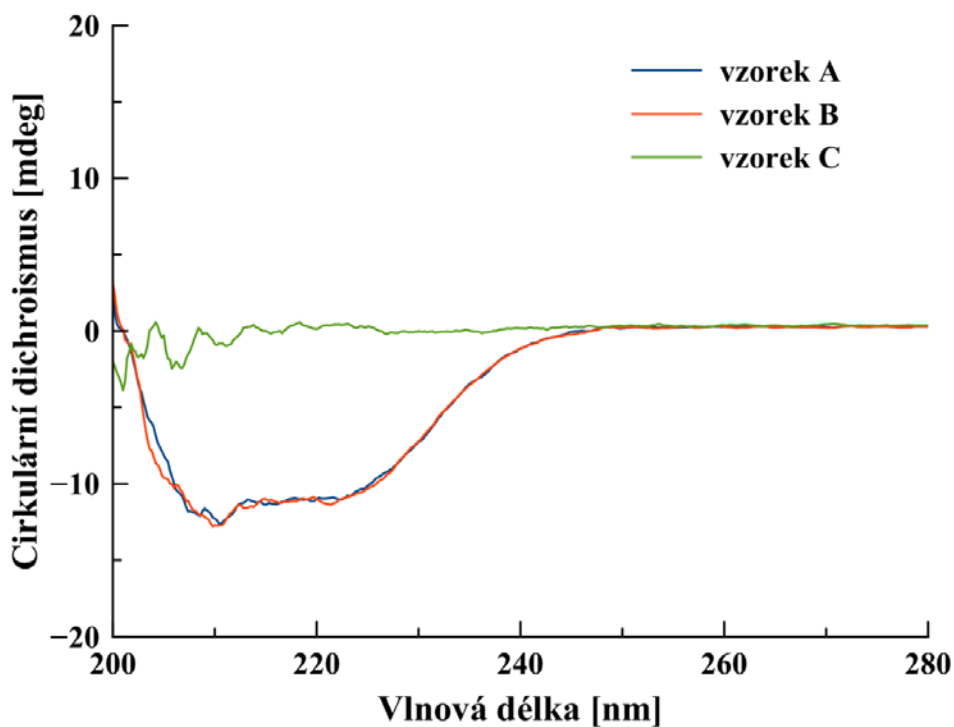
**Tabulka 6** Hodnoty senzitivity, specificity a celkové správnosti modelu LDA a jeho křížové validace pro diskriminaci vzorků krevní plazmy pacientů s T1DM a kontrolních jedinců.

Metoda	Model			Křížová validace modelu		
	Senzitivita (%)	Specifická (%)	Správnost (%)	Senzitivita (%)	Specifická (%)	Správnost (%)
Raman	62	83	75	25	58	45
IČ	88	92	90	88	92	90
ROA	75	92	85	63	75	70
ECD	75	92	85	38	75	60
Kombinace	100	100	100	100	92	95

### 3.2.6. Určení přítomnosti bílkovin ve vzorcích moči

Pro hodnocení přítomnosti bílkovin, tedy pro sledování mikroalbuminurie (MA), byly analyzovány vzorky moči ředěné destilovanou vodou v poměru 1:1 v/v. Spektra ECD dvou vzorků moči jedinců s T1DM (Obr. 7) vykazovala přítomnost bílkovin [54]. Ve spektrech dominují dva vzájemně se překrývající negativní pásy s maximy kolem 209 a 222 nm. Tyto pásy jsou charakteristické pro převažující  $\alpha$ -helikální sekundární strukturu proteinů a jsou výsledkem elektronových přechodů amidové skupiny peptidové vazby [52]. Průběh spekter poukazuje na vysoký obsah  $\alpha$ -helikálních struktur [74], což je v souladu s vysokým obsahem těchto struktur v albuminu [75].

Vzorek A (Obr. 9 9) pochází od osoby, u které byla MA diagnostikována v množství 76,0 mg/24 h na základě standardní diagnostiky. Elektronový cirkulární dichroismus v tomto případě potvrdil přítomnost albuminu v moči. Vzorek B byl odebrán pacientovi, kterému MA ani jiná forma proteinurie dosud diagnostikována nebyla. ECD spektrum ovšem výrazně ukazuje na přítomnost proteinů, proto se i v tomto případě dá MA předpokládat. Nutné je ověření zavedenou analytickou metodou (nejpravděpodobněji imunoturbidimetrie). Pro porovnání je v obrázku zahrnuto i spektrum vzorku C, které nevykazuje známky přítomnosti bílkovin.



**Obr. 9** Spektra ECD vzorků moči T1DM. Vzorky A, B vykazují přítomnost proteinů a vzorek C nikoli.



## 4. DISKUZE

### 4.1. Bromované retárdéry hoření

Tato studie podává detailní zprávu o výskytu jednotlivých kongenerů PBDE, PCB a DDT v lidské tukové tkáni získané od dobrovolníků z ČR v roce 2018. Celkem bylo analyzováno 107 vzorků pevné tukové tkáně odebrané během plastických operací podstoupených z estetických důvodů. Získaná data jsou porovnávána s údaji získanými v podobné studii v roce 2009, kdy byla analyzována kapalná tuková tkáň odebraná při liposukcích, ale analytická část obou studií je stejná. V tukové tkáni byly nalezeny tyto kongenery, jejichž zastoupení klesá v pořadí PBDE 153, PBDE 99, PBDE 47, PBDE 100, s tím, že koncentrace nejvíce zastoupeného PBDE 153 je 16,61 ng/g tuku. Koncentrace ostatních je v naprosté většině pod limitem kvantifikace použité metody, který se pohybuje v rozmezí 0,2 – 1,0 ng/g tuku. Při porovnání těchto dat s výsledky obdobné studie provedené ve Švédsku [31], lze konstatovat, že koncentrační zastoupení jednotlivých kongenerů není stejné, a navíc naměřené koncentrace jsou u většiny z nich nižší. Je otázkou diskuze, zda tyto odlišnosti souvisí s dodržováním Stockholmské úmluvy a omezením výroby PBDE nebo jsou zapříčiněny pozdějším používáním BFR v ČR, které se datuje až po roce 1989.

Bohužel pro rozsáhlejší porovnávání dat v rámci Evropy nebo i Světa je vysoce limitováno nedostupností dat, neboť stanovení těchto polutantů v tukové tkáni není běžné. Jako nejbližší dostupné údaje použitelné alespoň pro aproximaci jsou koncentrace BFR stanovené v krvi nebo mateřském mléce, u kterých lze vysledovat určité trendy. Pokud se striktně zaměříme pouze na výskyt PBDE v tukové tkáni je třeba konstatovat [30, 32, 76-78], že v různých studiích se setkáváme s odlišnými výsledky a závěry, z nichž jednotně vyplývá, že hlavními kongenery lidské tukové tkáně jsou PBDE 47 a PBDE 153. Ve všech těchto studiích byl ovšem analyzován tuk získaný posmrtně při pitvách. Pokud porovnáme námi získaná data se studii analyzujícími výskyt PBDE v mateřském mléce [79], koncentrace jednotlivých kongenerů jsou podobné, ale liší se pořadí jejich zastoupení, což může souviset s metabolickými změnami během kojení, které ovlivní i metabolismus PBDE. Podobné změny v pořadí výskytu metabolitů bylo zjištěno i v dalších klinických a environmentálních studiích [28, 80, 81].

Co se týká koncentrací PCB v tukové tkáni, došlo oproti roku 2009 ke zvýšení pouze u dvou kongenerů PCB 138 a PCB 180, koncentrace všech ostatních jsou nižší (Tabulka 7). V sumárních hodnotách jsou však stále koncentrace PCB výrazně vyšší v porovnání s PBDE. Je otázkou diskuze, zda je tento fakt zapříčiněn vyšším výskytem PCB v životním prostředí a jejich historicky delším používáním, na druhou stranu PCB byly

zakázány před více jak třiceti lety. Velmi obdobná je situace u DDT, současné koncentrace jsou nižší jak v roce 2009, ale stále podstatně vyšší než koncentrace BFR.

**Tabulka 7** Srovnání obsahu jednotlivých skupin analytů v tukové tkáni v ng/g tuku.

<b>Analyt</b>	<b>Průměr</b>	<b>Medián</b>	<b>Max</b>	<b>Min</b>
<b>Suma PCB</b>	776	563	3466	67,5
<b>Suma DDT</b>	464	301	2489	11,9
<b>Suma PBDE</b>	3,42	1,99	34,3	0,05

#### **4.2. Chiroptické metody v lékařské diagnostice**

Při využití chiroptických metod není důležitá jen kvalitativní analýza, ale také kvantitativní, na jejímž základě je možné lépe rozhodnout o léčbě a prevenci mikroalbuminurie. Během dlouhodobé hyperglykémie dochází ke spontánní neenzymatické glykaci proteinů [82-84] a tím i ke změně jejich helikální struktury, která je limitujícím faktorem pro použití chiroptických metod, protože můžeme dostávat falešně negativní výsledky (přítomnost sacharidových struktur převažuje nad výskytem proteinových). Naštěstí albumin je relativně stabilní protein krevní plazmy, u kterého nedochází k tak významným strukturálním změnám, které by poškodily  $\alpha$ -helikální struktury v jeho molekule [82, 85].

### **5. ZÁVĚR**

#### *5.1. Bromované retardéry hoření*

Tato studie získala aktuální informace o zátěži obézních žen v ČR polutanty PBDE, PCB a DDT na základě jejich detekce v tukové tkáni. Bylo analyzováno 107 vzorků pevné tukové tkáně od dobrovolníků, kteří podstoupili chirurgický zákrok z estetických důvodů. Data byla srovnána s údaji získanými ze studie publikované v roce 2009, kdy byl tuk odebírán během liposukcí, ale použitá analytická metoda byla identická. V tukové tkáni byly zjištěny následující kongenery PBDE seřazené podle klesající koncentrace: 153, 47, 99, 100, 183, 49, 154, 28, 85 a 66, kdy průměrná koncentrace nejvíce zastoupeného kongeneru BDE 153 byla 1,02 ng/g tuku. Ve většině případů koncentrace ostatních byla  $\leq$

0,1 ng/g tuku. Celková koncentrace PBDE měřená jako suma 10 nejvíce zastoupených kongenerů dosahuje průměrné hodnoty 3,31 ng/g tuku a kolísala v rozmezí od 0,05 do 34,3 ng/g tuku, což je o 25 % méně, než bylo zjištěno před 10 lety. Lze říci, že u vzorku obézních žen středního věku, které tvořily významnou část našeho vzorku, je kontaminace PBDE nižší, než je zátěž PCB a DDT.

Pro srovnání s Evropou a ostatními zeměmi není zatím dostatečné množství dat, vzhledem k tomu, že v různých studiích byla získána různá data [86-89], a navíc většina studií stanovuje koncentraci PBDE v krvi nebo mateřském mléku. Nicméně striktním srovnáním koncentrací všech stanovovaných kongenerů PBDE bylo zjištěno, že nejčtenější zastoupení v lidském organismu mají BDE 153 a 47, což je ve shodě se zahraničními studiemi, které pro stanovení použily tuk získaný posmrtně během pitvy. Pokud srovnáváme zastoupení kongenerů PBDE v mateřském mléku, nalézáme odlišné pořadí, což si vysvětlujeme metabolickými změnami během kojení.

Koncentrace PCB v tuku v porovnání s rokem 2009 vzrostla u kongenerů PCB 138 a 180, zatímco koncentrace ostatních jsou nižší. Avšak celková koncentrace PCB se oproti roku zvýšila z průměrné hodnoty 625,5 ng/g tuku na současnou průměrnou hodnotu 776 ng/g tuku, což představuje nárůst o 24 %. Navíc koncentrace PCB v tuku jsou více jak stokrát vyšší než koncentrace PBDE. Je otázkou do diskuze, co je příčinou tak velkého rozdílu, zda je způsoben mnohem delší dobou expozice a delším používáním PCB, přestože používání PCB je více jak třicet let zakázáno.

Průměrná koncentrace DDT v tukové tkáni klesla z 615,6 ng/g tuku před deseti lety na současnou průměrnou hodnotu 467,4 ng/g tuku. Domníváme se, že míra zatížení životního prostředí a tím i míra expozice populace klesá, vzhledem k zákazu použití těchto látek.

## **5.2. Chiroptické metody v lékařské diagnostice**

Na základě analýzy krevní plazmy pomocí metod elektronového cirkulárního dichroismu a Ramanovy optické aktivity byly určeny spektrální oblasti, které jsou nejvíce ovlivněné T1DM. Podle dosažených výsledků je možné konstatovat, že nejvýznamnější změny mezi pacienty s T1DM a kontrolními jedinci jsou patrné především v oblastech vibrací 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 92% shody

specificity a 100% shody senzitivity při rozlišení vzorků po křížové validaci. Získané výsledky naznačují, že chiroptická spektroskopie může poskytnout odpovídající doplňující informace k již zavedeným klinickým postupům a představuje užitečný podpůrný nástroj pro klinickou diagnostiku a screening T1DM.

Elektronový cirkulární dichroismus umožňuje analyzovat vzorky moči dětských diabetiků, u dvou jedinců byla zjištěna MA, přičemž u jednoho byla již dříve klinicky diagnostikována. Ve druhém případě se jednalo o včasný záchyt bez předchozí klinické diagnózy. V budoucnu bude nezbytné provést analýzu většího počtu vzorků a připravujeme analýzy vzorků moče dospělých diabetiků, u kterých předpokládáme vyšší variabilitu složení matrice.

## 6. LITERATURA

1. VOKURKA, M.; HUGO, J. *Velký lékařský slovník*. 10. vyd. Praha: Maxdorf Jessenius, 2015.
2. VELÍŠEK, J. *The Chemistry of Food*: Chichester: Wiley-Blackwell, 2014. ISBN 978-1-118-38383-4.
3. ANDĚL, M.; POLÁK, J.; KRAML, P.; DLOUHÝ, P.; ŠTICH, V. Chronický mírný zánět spojuje obezitu, metabolický syndrom, aterosklerózu a diabetes. *Vnitřní lékařství*. 2009, **55**(7-8), 659-665. ISSN 0042-773X.
4. BROWN, S. C.; VAN DEN ENDE, N.; VAN DER VEEN, I. Flame retardants: inorganic oxide and hydroxide systems. In: PRITCHARD, GEOFFREY, ed. *Plastics Additives: An A-Z reference*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1998, s. 287-296. ISBN 978-0-412-72720-7.
5. VAN ESCH, G. *Environmental Health Criteria 192 - Flame Retardants: A General Introduction*. Geneva: World Health Organization, 1997.
6. BERGMAN, A.; RYDEN, A.; LAW, R. J.; DE BOER, J.; COVACI, A.; ALAEE, M.; BIRNBAUM, L.; PETREAS, M.; ROSE, M.; SAKAI, S.; VAN DEN EEDE, N.; VAN DER VEEN, I. A novel abbreviation standard for organobromine, organochlorine and organophosphorus flame retardants and some characteristics of the chemicals.

*Environment International*. 2012, **49**(November), 57-82. ISSN 0160-4120. DOI: 10.1016/j.envint.2012.08.003.

7. VAN DER VEEN, I.; DE BOER, J. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. *Chemosphere*. 2012, **88**(10), 1119-1153. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.03.067.

8. LOGEROVÁ, H.; DLOUHÝ, P. Zátěž populace bromovanými retardéry hoření. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie a výživa*. 2016, **19**(1), 1-4. ISSN 1211-9326.

9. WESCHLER, C. J.; NAZAROFF, W. W. SVOC partitioning between the gas phase and settled dust indoors. *Atmospheric Environment*. 2010, **44**(30), 3609-3620. ISSN 1352-2310. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2010.06.029.

10. ESKENAZI, B.; CHEVRIER, J.; RAUCH, S. A.; KOGUT, K.; HARLEY, K. G.; JOHNSON, C.; TRUJILLO, C.; SJODIN, A.; BRADMAN, A. In Utero and Childhood Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Exposures and Neurodevelopment in the CHAMACOS Study. *Environmental Health Perspectives*. 2013, **121**(2), 257-262. ISSN 0091-6765. DOI: 10.1289/ehp.1205597.

11. GOMARA, B.; HERRERO, L.; PACEPAVICIUS, G.; OHTA, S.; ALAEE, M.; GONZALEZ, M. J. Occurrence of co-planar polybrominated/chlorinated biphenyls (PXBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk of women from Spain. *Chemosphere*. 2011, **83**(6), 799-805. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.02.080.

12. KANG, C. S.; LEE, J. H.; KIM, S. K.; LEE, K. T.; LEE, J. S.; PARK, P. S.; YUN, S. H.; KANNAN, K.; YOO, Y. W.; HA, J. Y.; LEE, S. W. Polybrominated diphenyl ethers and synthetic musks in umbilical cord Serum, maternal serum, and breast milk from Seoul, South Korea. *Chemosphere*. 2010, **80**(2), 116-122. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.04.009.

13. SCHECTER, A.; COLACINO, J.; SJODIN, A.; NEEDHAM, L.; BIRNBAUM, L. Partitioning of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in serum and milk from the same mothers. *Chemosphere*. 2010, **78**(10), 1279-1284. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.12.016.

14. WANG, H. S.; JIANG, G. M.; CHEN, Z. J.; DU, J.; MAN, Y. B.; GIESY, J. P.; WONG, C. K. C.; WONG, M. H. Concentrations and congener profiles of polybrominated

diphenyl ethers (PBDEs) in blood plasma from Hong Kong: Implications for sources and exposure route. *Journal of Hazardous Materials*. 2013, **261**, 253-259. ISSN 0304-3894. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.07.033.

15. ROOSENS, L.; CORNELIS, C.; D'HOLLANDER, W.; BERVOETS, L.; REYNDERS, H.; VAN CAMPENHOUT, K.; VAN DEN HEUVEL, R.; NEELS, H.; COVACI, A. Exposure of the Flemish population to brominated flame retardants: Model and risk assessment. *Environment International*. 2010, **36**(4), 368-376. ISSN 0160-4120. DOI: 10.1016/j.envint.2010.02.005.

16. BRAGIGAND, V.; AMIARD-TRIQUET, C.; PARLIER, E.; BOURY, P.; MARCHAND, P.; EL HOURCH, M. Influence of biological and ecological factors on the bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers in aquatic food webs from French estuaries. *Science of the Total Environment*. 2006, **368**(2-3), 615-626. ISSN 0048-9697. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2006.04.001.

17. BOCIO, A.; LLOBET, J. M.; DOMINGO, J. L.; CORBELLA, J.; TEIXIDO, A.; CASAS, C. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs: Human exposure through the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, **51**(10), 3191-3195. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf0340916.

18. COVACI, A.; ROOSENS, L.; DIRTU, A. C.; WAEGENEERS, N.; VAN OVERMEIRE, I.; NEELS, H.; GOEYENS, L. Brominated flame retardants in Belgian home-produced eggs: Levels and contamination sources. *Science of the Total Environment*. 2009, **407**(15), 4387-4396. ISSN 0048-9697. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.09.057.

19. FREDERIKSEN, M.; VORKAMP, K.; THOMSEN, M.; KNUDSEN, L. E. Human internal and external exposure to PBDEs - A review of levels and sources. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2009, **212**(2), 109-134. ISSN 1438-4639. DOI: 10.1016/j.ijheh.2008.04.005.

20. HARRAD, S.; HAZRATI, S.; IBARRA, C. Concentrations of polychlorinated biphenyls in indoor air and polybrominated diphenyl ethers in indoor air and dust in Birmingham, United Kingdom: Implications for human exposure. *Environmental Science & Technology*. 2006, **40**(15), 4633-4638. ISSN 0013-936X. DOI: 10.1021/es0609147.

21. HARRAD, S.; IBARRA, C.; ABDALLAH, M. A. E.; BOON, R.; NEELS, H.; COVACI, A. Concentrations of brominated flame retardants in dust from United Kingdom

cars, homes, and offices: Causes of variability and implications for human exposure. *Environment International*. 2008, **34**(8), 1170-1175. ISSN 0160-4120. DOI: 10.1016/j.envint.2008.05.001.

22. STAPLETON, H. M.; DODDER, N. G.; OFFENBERG, J. H.; SCHANTZ, M. M.; WISE, S. A. Polybrominated diphenyl ethers in house dust and clothes dryer lint. *Environmental Science & Technology*. 2005, **39**(4), 925-931. ISSN 0013-936X. DOI: 10.1021/es0486824.

23. JONES-OTAZO, H. A.; CLARKE, J. P.; DIAMOND, M. L.; ARCHBOLD, J. A.; FERGUSON, G.; HARNER, T.; RICHARDSON, G. M.; RYAN, J. J.; WILFORD, B. Is house dust the missing exposure pathway for PBDEs? An analysis of the urban fate and human exposure to PBDEs. *Environmental Science & Technology*. 2005, **39**(14), 5121-5130. ISSN 0013-936X. DOI: 10.1021/es048267b.

24. MEIRONYTE, D.; NOREN, K.; BERGMAN, A. Analysis of polybrominated diphenyl ethers in Swedish human milk. A time-related trend study, 1972-1997. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*. 1999, **58**(6), 329-341. ISSN 1528-7394. DOI: 10.1080/009841099157197.

25. KAZDA, R.; HAJŠLOVÁ, J.; POUSTKA, J.; ČAJKA, T. Determination of polybrominated diphenyl ethers in human milk samples in the Czech Republic - Comparative study of negative chemical ionisation mass spectrometry and time-of-flight high-resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2004, **520**(1-2), 237-243. ISSN 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2004.04.069.

26. SCHECTER, A.; HARRIS, T. R.; SHAH, N.; MUSURNBAL, A.; PAPKE, O. Brominated flame retardants in US food. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2008, **52**(2), 266-272. ISSN 1613-4125. DOI: 10.1002/mnfr.200700166.

27. SCHECTER, A.; PAPKE, O.; TUNG, K. C.; JOSEPH, J.; HARRIS, T. R.; DAHLGREN, J. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the US population: Current levels, temporal trends, and comparison with dioxins, dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 2005, **47**(3), 199-211. ISSN 1076-2752. DOI: 10.1097/01.jom.0000158704.27536.d2.

28. HOOPMANN, M.; ALBRECHT, U. V.; GIERDEN, E.; HUPPMANN, R.; SUCHENWIRTH, R. Time trends and individual characteristics associated with

polybrominated diphenyl ethers in breast milk samples 2006-2009 in Lower Saxony, Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2012, **215**(3), 352-359. ISSN 1438-4639. DOI: 10.1016/j.ijheh.2011.08.019.

29. MAZDAI, A.; DODDER, N. G.; ABERNATHY, M. P.; HITES, R. A.; BIGSBY, R. M. Polybrominated diphenyl ethers in maternal and fetal blood samples. *Environmental Health Perspectives*. 2003, **111**(9), 1249-1252. ISSN 0091-6765. DOI: 10.1289/ehp.6146.

30. FERNANDEZ, M. F.; ARAQUE, P.; KIVIRANTA, H.; MOLINA-MOLINA, J. M.; RANTAKOKKO, P.; LAINE, O.; VARTIAINEN, T.; OLEA, N. PBDEs and PBBs in the adipose tissue of women from Spain. *Chemosphere*. 2007, **66**(2), 377-383. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.04.065.

31. GUVENIUS, D. M.; BERGMAN, A.; NOREN, K. Polybrominated diphenyl ethers in Swedish human liver and adipose tissue. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2001, **40**(4), 564-570. ISSN 0090-4341. DOI: 10.1007/s002440010211.

32. JOHNSON-RESTREPO, B.; KANNAN, K.; RAPAPORT, D. P.; RODAN, B. D. Polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue from New York. *Environmental Science & Technology*. 2005, **39**(14), 5177-5182. ISSN 0013-936X. DOI: 10.1021/es050399x.

33. SCHECTER, A.; JOHNSON-WELCH, S.; TUNG, K. C.; HARRIS, T. R.; PAPKE, O.; ROSEN, R. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels in livers of US human fetuses and newborns. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*. 2007, **70**(1), 1-6. ISSN 1528-7394. DOI: 10.1080/15287390600748369.

34. HERBSTMAN, J. B.; SJODIN, A.; APELBERG, B. J.; WITTER, F. R.; HALDEN, R. U.; PATTERSON, D. G.; PANNY, S. R.; NEEDHAM, L. L.; GOLDMAN, L. R. Birth delivery mode modifies the associations between prenatal polychlorinated biphenyl (PCB) and polybrominated diphenyl ether (PBDE) and neonatal thyroid hormone levels. *Environmental Health Perspectives*. 2008, **116**(10), 1376-1382. ISSN 0091-6765. DOI: 10.1289/ehp.11379.

35. AKUTSU, K.; TAKATORI, S.; NOZAWA, S.; YOSHIKE, M.; NAKAZAWA, H.; HAYAKAWA, K.; MAKINO, T.; IWAMOTO, T. Polybrominated diphenyl ethers in human serum and sperm quality. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2008, **80**(4), 345-350. ISSN 0007-4861. DOI: 10.1007/s00128-008-9370-4.



36. DARNERUD, P. O. Brominated flame retardants as possible endocrine disrupters. *International Journal of Andrology*. 2008, **31**(2), 152-160. ISSN 0105-6263. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2008.00869.x.
37. MEEKER, J. D.; JOHNSON, P. I.; CAMANN, D.; HAUSER, R. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) concentrations in house dust are related to hormone levels in men. *Science of the Total Environment*. 2009, **407**(10), 3425-3429. ISSN 0048-9697. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.01.030.
38. DINGEMANS, M. M. L.; DE GROOT, A.; VAN KLEEF, R.; BERGMAN, A.; VAN DEN BERG, M.; VIJVERBERG, H. P. M.; WESTERINK, R. H. S. Hydroxylation increases the neurotoxic potential of BDE-47 to affect exocytosis and calcium homeostasis in PC12 cells. *Environmental Health Perspectives*. 2008, **116**(5), 637-643. ISSN 0091-6765. DOI: 10.1289/ehp.11059.
39. LALLAS, P. L. The Stockholm Convention on persistent organic pollutants. *American Journal of International Law*. 2001, **95**(3), 692-708. ISSN 0002-9300. DOI: 10.2307/2668517.
40. Směrnice evropského parlamentu a rady 2003/11/ES, omezení uvádění na trh a používání některých nebezpečných látek a přípravků (pentabromdifenylether, oktambromdifenylether).
41. HAJŠLOVÁ, J.; PULKRABOVÁ, J.; POUSTKA, J.; ČAJKA, T.; RANDÁK, T. Brominated flame retardants and related chlorinated persistent organic pollutants in fish from river Elbe and its main tributary Vltava. *Chemosphere*. 2007, **69**(8), 1195-1203. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.06.030.
42. PULKRABOVÁ, J.; HAJŠLOVÁ, J.; POUSTKA, J.; KAZDA, R. Fish as Biomonitoring of Polybrominated Diphenyl Ethers and Hexabromocyclododecane in Czech Aquatic Ecosystems: Pollution of the Elbe River Basin. *Environmental Health Perspectives*. 2007, **115**(Suppl. 1), 28-34. ISSN 0091-6765. DOI: 10.1289/ehp.9354.
43. LOGEROVÁ, H.; TŮMA, P.; STUPÁK, M.; PULKRÁBOVÁ, J.; DLOUHÝ, P. Evaluation of the Burdening on the Czech Population by Brominated Flame Retardants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019, **16**(21), 4105. ISSN 1661-7827. DOI: 10.3390/ijerph16214105.

44. LONGNECKER, M. P.; ROGAN, W. J.; LUCIER, G. The human health effects of DDT (dichlorodiphenyl-trichloroethane) and PCBS (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. *Annual Review of Public Health*. 1997, **18**(May), 211-244. ISSN 0163-7525. DOI: 10.1146/annurev.publhealth.18.1.211.
45. PULKRABOVÁ, J.; HRÁDKOVÁ, P.; HAJŠLOVÁ, J.; POUSTKA, J.; NAPRAVNÍKOVÁ, M.; POLÁČEK, V. Brominated flame retardants and other organochlorine pollutants in human adipose tissue samples from the Czech Republic. *Environment International*. 2009, **35**(1), 63-68. ISSN 0160-4120. DOI: 10.1016/j.envint.2008.08.001.
46. HESSE, J. L.; POWERS, R. A. Polybromated biphenyl (PBB) contamination of pine river, gratiot, and midland counties, Michigan. *Environmental Health Perspectives*. 1978, **23**(April), 19-25. ISSN 0091-6765. DOI: 10.2307/3428737.
47. RACEK, J. *Klinická biochemie. 2.,* přepřac. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.
48. HOLEČEK, M. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin.* Praha: Grada Publishing, 2006. ISBN 80-247-1562-7.
49. ATKINS, P. W.; BARRON, L. D. Rayleigh scattering of polarized photons by molecules. *Molecular Physics*. 1969, **16**(5), 453-466. ISSN 0026-8976. DOI: 10.1080/00268976900100501.
50. ŠTOVÍČKOVÁ, L.; TATARKOVIČ, M.; LOGEROVÁ, H.; VAVŘINEC, J.; SETNIČKA, V. Identification of spectral biomarkers for type 1 diabetes mellitus using the combination of chiroptical and vibrational spectroscopy. *Analyst*. 2015, **140**(7), 2266-2272. ISSN 0003-2654. DOI: 10.1039/c4an01874e.
51. BARRON, L. D.; HECHT, L.; MCCOLL, I. H.; BLANCH, E. W. Raman optical activity comes of age. *Molecular Physics*. 2004, **102**(8), 731-744. ISSN 0026-8976. DOI: 10.1080/00268970410001704399.
52. SETNIČKA, V.; URBANOVÁ, M. Spektroskopie cirkulárního dichroismu. In: DOHNAL, J., ed. *Moderní přístupy k farmaceutické analýze.* Praha: Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, 2010. ISBN 978-80-7305-085-6.

53. BEROVA, N.; POLAVARAPU, P. L.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy: Applications in Stereochemical Analysis of Synthetic Compounds, Natural Products, and Biomolecules*: Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2012. ISBN 978-1-118-01292-5.
54. HABARTOVÁ, L.; LOGEROVÁ, H.; TOMANÍK, L.; MAREŠOVÁ, A.; SETNIČKA, V. Electronic circular dichroism for the detection of microalbuminuria. *Chirality*. 2018, **30**(5), 576-580. ISSN 0899-0042. DOI: 10.1002/chir.22832.
55. TATARKOVIČ, M.; SYNYTSYA, A.; ŠTOVÍČKOVÁ, L.; BUNGANIC, B.; MIŠKOVIČOVÁ, M.; PETRUŽELKA, L.; SETNIČKA, V. The minimizing of fluorescence background in Raman optical activity and Raman spectra of human blood plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, **407**(5), 1335-1342. ISSN 1618-2642. DOI: 10.1007/s00216-014-8358-7.
56. SYNYTSYA, A.; JUDEXOVÁ, M.; HRUBÝ, T.; TATARKOVIČ, M.; MIŠKOVIČOVÁ, M.; PETRUŽELKA, L.; SETNIČKA, V. Analysis of human blood plasma and hen egg white by chiroptical spectroscopic methods (ECD, VCD, ROA). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, **405**(16), 5441-5453. ISSN 1618-2642. DOI: 10.1007/s00216-013-6946-6.
57. TATARKOVIČ, M.; FIŠAR, Z.; RABOCH, J.; JIRÁK, R.; SETNIČKA, V. Can Chiroptical Spectroscopy be Used for the Analysis of Blood Plasma? *Chirality*. 2012, **24**(11), 951-955. ISSN 0899-0042. DOI: 10.1002/chir.22063.
58. SCHIPPER, H. M.; KWOK, C. S.; ROSENDAHL, S. M.; BANDILLA, D.; MAES, O.; MELMED, C.; RABINOVITCH, D.; BURNS, D. H. Spectroscopy of human plasma for diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. *Biomarkers in Medicine*. 2008, **2**(3), 229-238. ISSN 1752-0363. DOI: 10.2217/17520363.2.3.229.
59. BURNS, D. H.; ROSENDAHL, S.; BANDILLA, D.; MAES, O. C.; CHERTKOW, H. M.; SCHIPPER, H. M. Near-Infrared Spectroscopy of Blood Plasma for Diagnosis of Sporadic Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimers Disease*. 2009, **17**(2), 391-397. ISSN 1387-2877. DOI: 10.3233/jad-2009-1053.
60. NAFIE, L. Calculation of Vibrational Optical Activity. *Vibrational Optical Activity: Principles and Applications*: Hoboken: Wiley, 2011, s. 261-292. ISBN 978-0-470-03248-0.

61. LU, G. L.; FEI, B. W. Medical hyperspectral imaging: a review. *Journal of Biomedical Optics*. 2014, **19**(1), 23. ISSN 1083-3668. DOI: 10.1117/1.Jbo.19.1.010901.
62. LASCH, P.; KNEIPP, J. *Biomedical Vibrational Spectroscopy*: Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2007. ISBN 978-0-470-22945-3.
63. MITCHELL, A. L.; GAJJAR, K. B.; THEOPHILOU, G.; MARTIN, F. L.; MARTIN-HIRSCH, P. L. Vibrational spectroscopy of biofluids for disease screening or diagnosis: translation from the laboratory to a clinical setting. *Journal of Biophotonics*. 2014, **7**(3-4), 153-165. ISSN 1864-063X. DOI: 10.1002/jbio.201400018.
64. LEVY, D.; DOUIO, N. *Type 1 Diabetes*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2016. ISBN 978-0-19-876645-2.
65. LEROITH, D.; TAYLOR, S. I.; OLEFSKY, J. M. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. ISBN 978-0-7817-4097-5.
66. BAI, C.; GRAHAM, T. L.; ARNOLD, M. A. Assessing and Advancing Technology for the Noninvasive Measurement of Clinical Glucose. *Analytical Letters*. 2008, **41**(15), 2773-2793. ISSN 0003-2719. DOI: 10.1080/00032710802418885.
67. VASHIST, S. K. Non-invasive glucose monitoring technology in diabetes management: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2012, **750**(October), 16-27. ISSN 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2012.03.043.
68. OLIVER, N. S.; TOUMAZOU, C.; CASS, A. E. G.; JOHNSTON, D. G. Glucose sensors: a review of current and emerging technology. *Diabetic Medicine*. 2009, **26**(3), 197-210. ISSN 0742-3071. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2008.02642.x.
69. ČLUPEK, M.; MATĚJKA, P.; VOLKA, K. Noise reduction in Raman spectra: Finite impulse response filtration versus Savitzky-Golay smoothing. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2007, **38**(9), 1174-1179. ISSN 0377-0486. DOI: 10.1002/jrs.1747.
70. BARMAN, I.; DINGARI, N. C.; KANG, J. W.; HOROWITZ, G. L.; DASARI, R. R.; FELD, M. S. Raman Spectroscopy-Based Sensitive and Specific Detection of Glycated Hemoglobin. *Analytical Chemistry*. 2012, **84**(5), 2474-2482. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac203266a.

71. ZHANG, D.; ZUO, W. Computational Intelligence-Based Biometric Technologies. *IEEE Computational Intelligence Magazine*. 2007, **2** (2), 26-36. ISSN 1556-603X. DOI: 10.1109/MCI.2007.353418.
72. SAMMUT, C.; WEBB, G. *Encyclopedia of Machine Learning*: Boston: Springer, 2010. ISBN 978-0-387-30768-8.
73. DUNNE, R. *A Statistical Approach to Neural Networks for Pattern Recognition*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006. ISBN 978-0-471-74108-4.
74. NEELOFAR, K.; ARIF, Z.; ALAM, K.; AHMAD, J. Hyperglycemia induced structural and functional changes in human serum albumin of diabetic patients: a physico-chemical study. *Molecular Biosystems*. 2016, **12**(8), 2481-2489. ISSN 1742-206X. DOI: 10.1039/c6mb00324a.
75. SCHALLER, J.; GERBER, S.; KÄMPFER, U.; LEJON CROTTET, S.; TRACHSEL, C. *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008. ISBN 978-0-470-01674-9.
76. CARRIZO, D.; GRIMALT, J. O. Influence of breastfeeding in the accumulation of polybromodiphenyl ethers during the first years of child growth. *Environmental Science & Technology*. 2007, **41**(14), 4907-4912. ISSN 0013-936X. DOI: 10.1021/es070217u.
77. NAERT, C.; PIETTE, M.; BRUNEEL, N.; VAN PETEGHEM, C. Occurrence of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in Belgian human adipose tissue samples. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2006, **50**(2), 290-296. ISSN 0090-4341. DOI: 10.1007/s00244-004-0234-6.
78. COVACI, A.; VOORSPOELS, S.; ROOSENS, L.; JACOBS, W.; BLUST, R.; NEELS, H. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human liver and adipose tissue samples from Belgium. *Chemosphere*. 2008, **73**(2), 170-175. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.02.059.
79. THOMSEN, C.; STIGUM, H.; FROSHAUG, M.; BROADWELL, S. L.; BECHER, G.; EGGESBO, M. Determinants of brominated flame retardants in breast milk from a large scale Norwegian study. *Environment International*. 2010, **36**(1), 68-74. ISSN 0160-4120. DOI: 10.1016/j.envint.2009.10.002.

80. LINDERHOLM, L.; BIAGUE, A.; MANSSON, F.; NORRGREN, H.; BERGMAN, A.; JAKOBSSON, K. Human exposure to persistent organic pollutants in West Africa - A temporal trend study from Guinea-Bissau. *Environment International*. 2010, **36**(7), 675-682. ISSN 0160-4120. DOI: 10.1016/j.envint.2010.04.020.
81. TURYK, M. E.; ANDERSON, H. A.; STEENPORT, D.; BUELOW, C.; IMM, P.; KNOBELOCH, L. Longitudinal biomonitoring for polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in residents of the Great Lakes basin. *Chemosphere*. 2010, **81**(4), 517-522. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.07.037.
82. GUERIN-DUBOURG, A.; CATAN, A.; BOURDON, E.; RONDEAU, P. Structural modifications of human albumin in diabetes. *Diabetes & Metabolism*. 2012, **38**(2), 171-178. ISSN 1262-3636. DOI: 10.1016/j.diabet.2011.11.002.
83. CAO, H.; CHEN, T. T.; SHI, Y. J. Glycation of Human Serum Albumin in Diabetes: Impacts on the Structure and Function. *Current Medicinal Chemistry*. 2015, **22**(1), 4-13. ISSN 0929-8673. DOI: 10.2174/0929867321666140912155738.
84. YAMASAKI, K.; ANRAKU, M. Stability of Albumin and Stabilization of Albumin Preparations. In: OTAGIRI, M.; CHUANG, V., ed. *Albumin in Medicine: Pathological and Clinical Applications*. Singapore: Springer, 2016, s. 25-49. ISBN 978-981-10-2115-2.
85. SJODIN, A.; PATTERSON, D. G.; BERGMAN, A. A review on human exposure to brominated flame retardants - particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environment International*. 2003, **29**(6), 829-839. ISSN 0160-4120. DOI: 10.1016/s0160-4120(03)00108-9.
86. SHE, J. W.; PETREAS, M.; WINKLER, J.; VISITA, P.; MCKINNEY, M.; KOPEC, D. PBDEs in the San Francisco Bay Area: measurements in harbor seal blubber and human breast adipose tissue. *Chemosphere*. 2002, **46**(5), 697-707. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/s0045-6535(01)00234-x.
87. KUNISUE, T.; TAKAYANAGI, N.; ISOBE, T.; TAKAHASHI, S.; NOSE, M.; YAMADA, T.; KOMORI, H.; ARITA, N.; UEDA, N.; TANABE, S. Polybrominated diphenyl ethers and persistent organochlorines in Japanese human adipose tissues. *Environment International*. 2007, **33**(8), 1048-1056. ISSN 0160-4120. DOI: 10.1016/j.envint.2007.06.006.

88. PETREAS, M.; NELSON, D.; BROWN, F. R.; GOLDBERG, D.; HURLEY, S.; REYNOLDS, P. High concentrations of polybrominated diphenylethers (PBDEs) in breast adipose tissue of California women. *Environment International*. 2011, **37**(1), 190-197. ISSN 0160-4120. DOI: 10.1016/j.envint.2010.09.001.
89. HE, Y. F.; PENG, L.; ZHANG, W. C.; LIU, C. X.; YANG, Q. T.; ZHENG, S. K.; BAO, M.; HUANG, Y. N.; WU, K. S. Adipose tissue levels of polybrominated diphenyl ethers and breast cancer risk in Chinese women: A case-control study. *Environmental Research*. 2018, **167**(November), 160-168. ISSN 0013-9351. DOI: 10.1016/j.envres.2018.07.009.

### **Seznam publikací Ing. Bc. Hana Logerová**

#### a) s IF

1. LOGEROVÁ, H.; TŮMA, P.; STUPÁK, M.; PULKRÁBOVÁ, J.; DLOUHÝ, P. Evaluation of the Burdening on the Czech Population by Brominated Flame Retardants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019, **16**(21), 4105. ISSN 1661-7827. DOI: 10.3390/ijerph16214105.
2. ŠTOVÍČKOVÁ, L.; TATARKOVIČ, M.; LOGEROVÁ, H.; VAVŘINEC, J.; SETNIČKA, V. Identification of spectral biomarkers for type 1 diabetes mellitus using the combination of chiroptical and vibrational spectroscopy. *Analyst*. 2015, **140**(7), 2266-2272. ISSN 0003-2654. DOI: 10.1039/c4an01874e.
3. HABARTOVÁ, L.; LOGEROVÁ, H.; TOMANÍK, L.; MAREŠOVÁ, A.; SETNIČKA, V. Electronic circular dichroism for the detection of microalbuminuria. *Chirality*. 2018, **30**(5), 576-580. ISSN 0899-0042. DOI: 10.1002/chir.22832.

#### b) bez IF

1. LOGEROVÁ, H.; DLOUHÝ, P. Zátěž populace bromovanými retardéry hoření. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie a výživa*. 2016, **19**(1), 1-4. ISSN 1211-9326.

### **Přílohy**