

# biochemické indikátory dietárního příjmu

**Ondřej Zvěřina**

nutriční epidemiologie

jaro 2019

## biochemické indikátory dietárního příjmu

### → Záměr

využití biochemických indikátorů (*biomarkerů*) k posouzení dietárního příjmu živin, či dokonce konkrétních potravin pro potřeby epidemiologických studií

### Zájem kliniků a nutričních specialistů

měření biomarkerů → posouzení nutričního stavu, pokrytí fyziologických potřeb

### Praktický problém

příjem živiny je pouze jeden z faktorů

koncentrace v krvi a tkáních řízena absorpcí, transportem, distribucí, metabolismem, vylučováním (i životním stylem)

### měření expozice dietárními faktory

- recall
- prospektivní jídelníček
- dietní anamnéza
- frekvenční dotazník
- vyšetření biomarkerů
  - E příjem metodou dvojitě značené vody
  - příjem bílkovin měřením dusíku v moči
  - fytoestrogeny jako ukazatele příjmu sóji
  - další a další...

## biochemické indikátory dietárního příjmu

### Může nás zajímat:

příjem n-3 mastných kyselin s dlouhým řetězcem (EPA, DHA)

- ✓ koncentrace v tukových tkáních odráží jejich dietární příjem
  
- Avšak ovlivňující faktory:
  - prekurzor  $\alpha$ -linolenová
  - [aktivita desaturáčních a elongačních enzymů](#) (tvorba z  $\alpha$ -linolenové)
  - koncentrace inzulinu
  - fyzická aktivita
  
- při interpretaci třeba zhodnotit nedietární vlivy



## biochemické indikátory dietárního příjmu

### lékařský zájem

biomarkery → předpověď výskytu chorob

→ identifikace rizikových skupin

biomarkery nemusejí nutně odpovídat dietárnímu příjmu

### příklad

krevní **cholesterol**

= ukazatel rizika srdečních chorob,  
chabá korelace s jeho příjmem  
(vlastní tvorba, metabolismus)

### naš zájem (nutriční epidemiologie)

zhodnotit a kvantifikovat příjem živin

→ hledáme vztah mezi příjmem živin a odpovídajícími biochemickými ukazateli

# využití dietárních biomarkerů

1

## náhrada FFQ

- biomarkery jako ukazatel příjmu živin
- „objektivní“
- **variabilní obsah živin** ve stejných potravinách (úprava, skladování, zpracování)
- **např.: Se** v kukuřici v USA (100x rozdíl), ve vepřovém 15x  
dotazníkový průzkum nepřesný  
(např. u celkových tuků naopak - neexistuje vhodný ind.)  
u mnohých živin a potravin možnost volby



2

## posouzení nutričního stavu

- př.1.: **sérový ferritin** - dobrý ukazatel saturace organismu, ne však jeho množství ve stravě (faktory: hemové/nehemové, spolupříjem vit.C, ztráta krve)
- př.2.: **vitamin D** - příjem v potravě vs. tvorba v kůži → slabá korelace mezi příjmem a skutečným stavem vitamínu; lepší korelace nutri.stav (*vnitřní dávka*) → zdravotní stav

3

## validace metod FFQ

- biomarkery jako **referenční ukazatel** k dotazníkovým průzkumům
- vyžaduje biomarkery silně reflektující příjem

**návratnost  
VS.  
koncentrace**

**biomarkery**

**návratné biomarkery** (*recovery biomarkers*)

silná časová souvislost mezi příjmem a biomarkerem

např.: dusík: 80 % bílkovinného dusíku je *navráceno* v moči  
→ 24hodinový příjem bílkovin lze stanovit ve 24h sběru moči  
další návratné biomarkery: draslík, sodík

nevýhody: omezené množství biomarkerů; krátký čas,  
vztahují se k celkovému příjmu, ne přijaté energii (DLW)

**koncentrační biomarkery** (*concentration biomarkers*)

souvislost mezi příjmem živin a koncentrací biomarkeru,  
umožňuje spíše rozřazovat zkoumanou populaci  
(i když korelace zřídka silná - vnitřní mechanismy)  
~ většina živin (například trans-mk v tukových tkáních)

korelace s dotazníkovými studiemi:

koncentrační biomarker polyenové kyseliny ↔ FFQ ► korelace FFQ s návratností 24h dusíku

Návratné biomarkery se jeví vhodněji, mnohá omezení vedou k tomu, že právě koncentrační b. bývají jedinou možnou volbou.

# základní principy

## objektivita biomarkerů

- analytické metody objektivní ⇒ dojem nestrannosti
- dotazníky připravují i vyplňují „pouze“ lidé
- realita: biochemické měření má také mouchy
- důležité zajistit spojitost:

**příjem ~ biomarker ~ zdravotní význam**

## možné zdroje chyb

- citlivost biomarkeru k přijímané živině
- časová integrace
- specifita biomarkeru
- nedietární vlivy a okolnosti
- sběr, skladování a analýza vzorku

pokud je vztah mezi příjmem živin a zdravotním dopadem zavádějící, bude stejně zavádějící vztah s biomarkerem

### příklad

vysoký příjem kyseliny linolenové se u někoho pojí s příjmem trans-kyselin

⇒ spojitost mezi koncentrací kys. linolenové v plazmě a srdečními chorobami ?

## základní principy

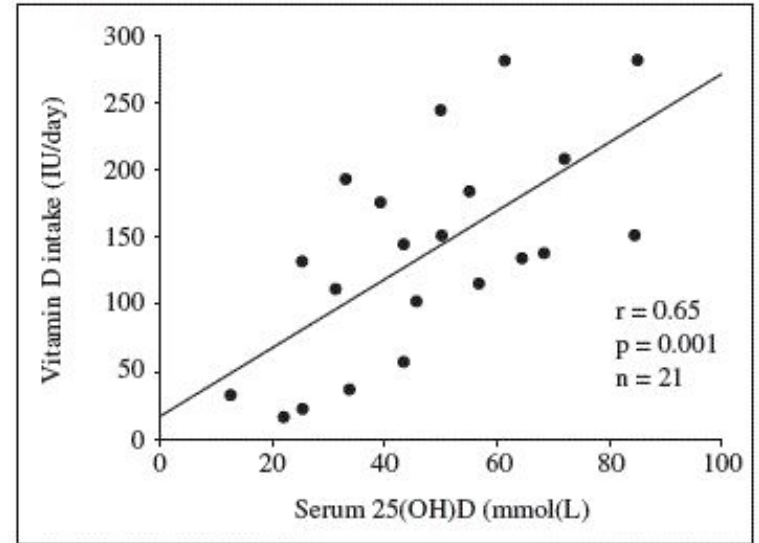
### citlivost k příjmu

*Měří naše metoda to, co měřit má?*

pokud chybí vztah mezi příjmem  
nutrientu a jeho koncentrací v (např.) krvi  
→ náhodná klasifikace vzorků

### Míru korelace řídí

- dostupnost živiny (bioavailability)
- homeostáza
- rozsah příjmu ve sledované populaci
- další nedietární faktory ovlivňující koncentraci



*Fig. 1.—Correlation between daily vitamin D intake and 25(OH)D serum level.*



## základní principy

### homeostáza

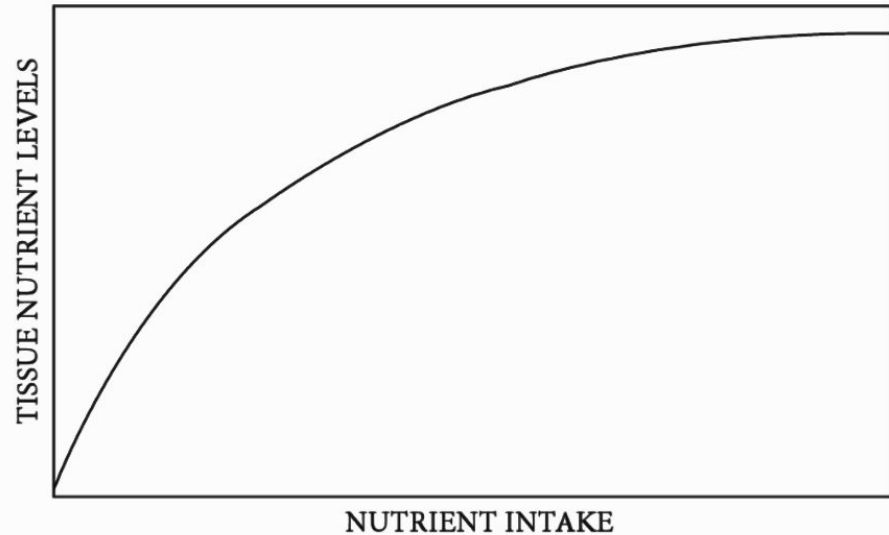
regulace živin v tělesných tkáních a tekutinách

- mechanismus může být jednoduchý
  - saturace Fe
  - vylučování přebytku vitamínu C
- nebo složitý
  - komplexní hormonální regulace Ca

### důsledek homeostázy

závislost příjem-koncentrace **jen zřídka lineární**,  
často dokonce **nemonotónní**.

Závislost pro většinu nutrientů s rostoucím příjmem slábne,  
nebo dosáhne **fáze plató**.



## základní principy

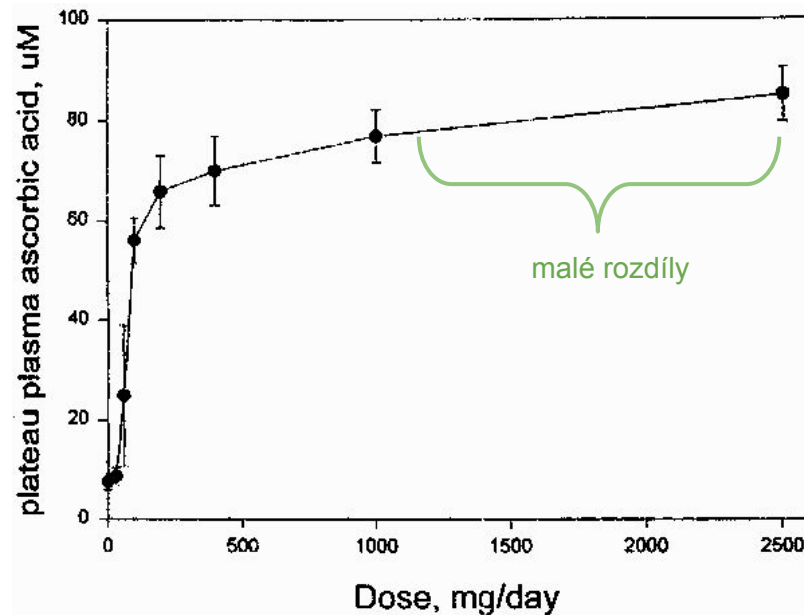
### homeostáza

#### důsledky pro měření

- pokud je plochá část široká,
- pokud cílová skupina saturována

⇒ **uniformní výsledky** (nepoužitelný indikátor)

při větším rozptylu příjmu v rámci populace lze alespoň rozlišit příjem *velmi malý* a *průměrný*



# základní principy

## homeostáza

### příklad: retinol

- lze ho měřit v séru a plazmě
- má širokou plochou část saturační křivky (plató)
- u dobře živěné populace malé rozdíly
  - >90% vitamínu A v játrech (pufrovací rezervy)
  - sérum proto nereflektuje příjem
  
- sérový retinol je ukazatel spíš u špatně saturované populace (zde koreluje s dotazníkovými příjmy i klinickými projevy deficience)



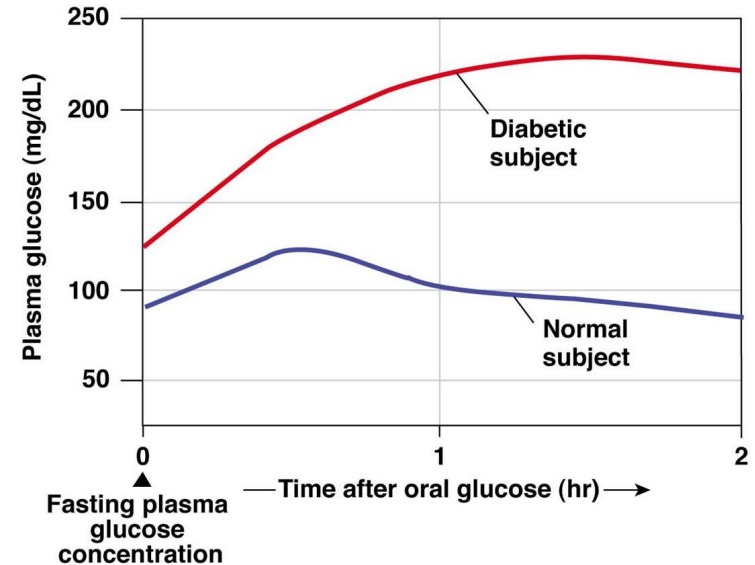
## Toleranční testy

- odběr krve nebo moči před a po podání testovací dávky (např. vitamínu, Glc, ...)
- deficientní jedinci zadržují větší množství
- logistické nároky vyšší → omezení epidemiologie

RDR = relativní odezva na dávku (*relative dose response*)

### provedení

1. počáteční odběr krve/moči
2. podání testovací dávky látky
3. po nějaké době další odběr
4. srovnání koncentrací



*oGTT: orální glukózový toleranční test*

## Toleranční testy

### Příklad: deficience retinolu

Pacientům je podána vysoká jednorázová dávka vitamínu A, sleduje se vzestup vit. A v séru za 5 hodin. Stanovení spektrofotometricky.

Retinol se v plazmě váže na retinol vázající protein (RBP). Při deficienci vitamínu se RBP hromadí v játrech. Podání vitamínu → RBP uvolněn do krve.

Běžná koncentrace ~ 2 μmol/L, za 5 hodin vzrůst na 7-25.  
Deficit při vzestupu menším než na 7 μmol/L.

The RDR value, which is expressed in per cent, is calculated as follows:

$$[(A5 - A0)/A5] * 100$$

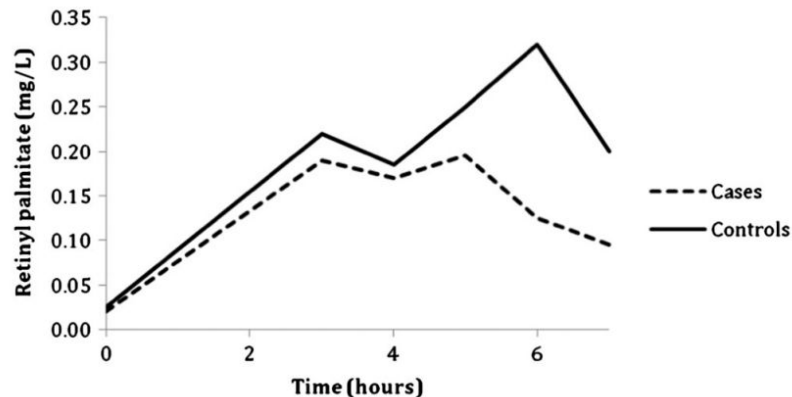
Where: A5 is the serum retinol concentration at 5 hours post-dosing

A0 is the serum retinol concentration at baseline

Při diagnostice malabsorpčního syndromu. Pozitivita testu koreluje s vylučováním tuků ve stolici

Nevýhody testu:

- **nesenzitivní** u dobře živené populace.
- logistický **náročný** (dva odběry)



A novel method to identify fat malabsorption: the Serum Retinyl Palmitate Test. Raman M. Clinica chimica acta, 2016.

### modifikovaná verze testu

Podává se 3,4-didehydroretinol.

V jediném vzorku séra se 4 h po podání měří poměr didehydroretinol/retinol (pomocí HPLC).

Při deficienci se velký podíl váže na RBP.

Výhoda: Stačí jediný vzorek.

## základní principy

### Bioavailability (biodostupnost)

*poměr přivedeného a absorbovaného nutrientu, dostupného pro využití nebo uložení*

Biodostupnost ovlivňuje citlivost biomarkeru k příjmu.

Kromě absorpce ve střevě také účinek prvního průchodu játry (**first pass effect**) ovlivňuje množství látky, které se dostane do oběhu. (Dojde-li k **biotransformaci**, měříme i produkt?)

...zkoumáme **vnitřní** dávku?

Při výrazném ovlivnění je biochemické měření vhodnější ukazatel než tabulkový výpočet.



**příklad**

různá biodostupnost železa

## základní principy

### specifická

jeden biomarker může reflektovat více složek výživy (např. je součástí více potravin)

některé biomarkery jsou navíc produkty metabolismu

### příklad

Karotenoid  **$\beta$ -kryptoxantin** v plazmě může korelovat s vitamínem C a flavonoidem hesperetinem.

Důvod: všechny tři látky jsou obsaženy v citrusovém ovoci.

### příklad 2

Fenolická sloučenina **floretin** je obsažena v jablkách.

Zároveň je však metabolitem naringeninu (flavonoid grepů). Výsledek: Phloretin v moči nereflektuje spotřebu jablek, ale taky příjem naringeninu.



## základní principy



### Integrační doba

citlivost biomarkeru k příjmu málo/moc velká

pro nutriční epidemiologii zajímavé dlouhodobé závislosti  
(např. vznikající aterosklerotické plaky - roky až dekády)

⇒ pro epidemiologii zajímavý dlouhodobý vliv a složení diety

Krátkodobý indikátor zohledňuje pouze hodiny až dny.

### Časová závislost

- kombinace absorpce, distribuce, vylučování
- typ vzorku (pomalá/rychlá výměna)



## základní principy

### Integrační doba podle druhu vzorku

tělesná úložiště mají rozdílnou rychlost obměny

- ▶ Jak se zjišťovala časová závislost?
  - manipulovaný příjem při některých studiích
  - průběžné testování jedinců
- ▶ Lze časová variabilita obejít?
  - opakovaným vzorkováním
  - použitím materiálu s dlouhou int. dobou

- **tuková tkáň**  
pomalá výměna  
reflektuje dlouhodobé složení výživy

- **červené krvinky**  
často méně citlivé ke krátkodobým výkyvům než plazma nebo sérum

- **moč**  
24h sběrný vzorek vypovídá víc než náhodný

- **játra**  
vynikající dlouhodobý materiál, nedostupný

- **vlasy, nehty**  
dostupné keratinové tkáně,  
reflektují týdny až měsíce  
pro některé živiny velmi vhodné

## Výběr typu vzorku

nejčastější materiál: **sérum, plazma**

další možnosti: erythrocyty, moč, vlasy, nehty, tukové tkáně

**integrační doba** slabá u séra a plazmy, delší u tukových tkání nebo nehtů

Zajímají nás materiály bez krátkodobých výkyvů složení.

**optimální materiál** se liší podle vybraného biomarkeru

- **tuková tkáň**: dlouhodobý příjem MK lepší než plazma, neplatí už pro karotenoidy a rozpustné látky.
- **moč 24h**: flavonoidy reflektuje lépe než plazma (ta je silně ovlivněna stravou posledních hodin)
- **plazma** naopak lepší pro vitamin C (moč reflektuje pouze velmi vysoké dávky).
- **nehty, vlasy** vynikající pro minerální látky

## Výběr typu vzorku

### Erythrocyty

červené krvinky

životnost cca **120 dní**  
(lepší časový záznam než sérum nebo plazma)

Nutná **inkorporace biomarkeru** během tvorby,  
nejen jeho výměna s plazmou.



Využitelné pro řadu nutrientů, m.j.: **MK, Se, kyselina listová**

#### selen

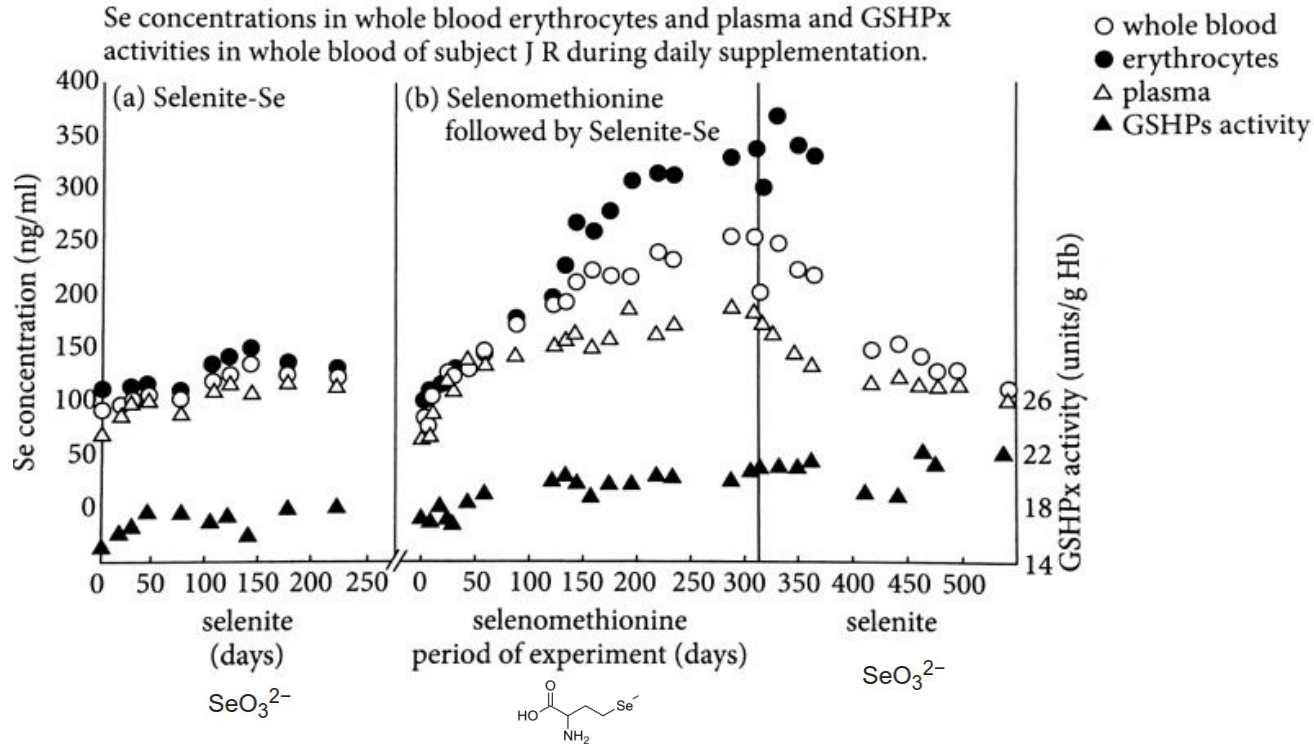
Při zvýšeném příjmu selenu pozvolna roste jeho koncentrace v erythrocytech (300+ dní). Erythrocyty tak reflektují dlouhodobější příjem selenu oproti plazmě.

#### n-6 polyenové mk

MK z rybího tuku vzrůstají během dní, tedy příliš rychle s ohledem na rychlost tvorby. ⇒ Výměna s plazmou.  
Korelace mezi dlouhodobým příjmem MK a koncentrací v erythrocytech silnější než s plazmatickou koncentrací.

#### kys. listová

Saturace křivky během suplementace daleko dříve u plazmy než erythrocytů.



Studie: Různé biologické vzorky a jejich reakce na suplementaci Se. (Robinson and Thomson 1981)  
 Izotopicky značený selenomethionin: erythrocyty reagují pozvolna na suplementaci (300+ dní) i její přerušení.  
 Odezva v plazmě byla rychlejší (nárůst během 5 dní suplementace, pokles při ukončení rychlejší)

## Měření minerálních látek v krvi

hlavní zdroje chyb: odběr, skladování, příprava vzorku

### odběr do komerčních nádob

jejich materiál nutné volit s ohledem na analyt:

Al - nevhodné sklo (běžné nadhodnocení, je v prachu)

Cd - nevhodné některé měkčené plasty

Cr, Ni, Mn - vhodná kanyla nebo posilikonovaná jehla

### Louhování kovů z povrchu nádoby: nelze simulovat

vodou/kyselinou; biologické analyty obsahují ligandy, které mohou vázat kovy. ⇒ luhování referenčním vz.

Dekontaminace nádobek HNO<sub>3</sub> 10%. Pozor na čistotu přidávaného EDTA, citrátu...

**uchování:** do 3-5 dnů v ledničce, déle v mrazničce

Certifikované referenční materiály ([CRM Sigma](#) / [katalog klinických materiálů](#)) nutné k ověření správnosti

Vliv odběrového materiálu na analýzu stopových prvků v plné krvi<sup>9</sup> (koncentrace μg.l<sup>-1</sup>)

Prvek	Počet vzorků	Koncentrace	
		jehla z nere-zové oceli	teflonová kanyla
Ag	18	0,29±0,09	0,29±0,06
Al	18	a	a
Bi	18	0,45±0,12	0,47±0,13
Cd	18	0,55±0,24	0,57±0,26
Co	16	0,38±0,19	0,39±0,16
Cr	18	5,65±2,13	0,19±0,08
Cu	18	1260±150	1275±166
Hg	15	5,20±1,9	4,90±1,75
Mn	17	8,8±2,1	8,4±2,9
Ni	17	7,3±0,6	2,3±0,7
Pb	18	161±32	159±37
Se	18	108±19	110±18
Zn	18	6345±585	6290±569

<sup>9</sup> Pod mezí stanovitelnosti

## Výběr typu vzorku

### Tukové tkáně

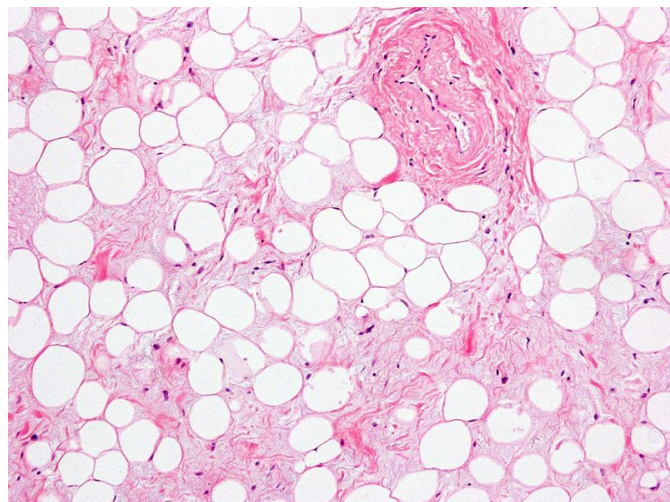
Doba obměny tukové tkáně je velmi dlouhá.  
Podkožní tuk = vynikající ukazatel mastných kyselin.

Dayton et al. 1966: 5letá studie kontrolovaného příjmu linolové kyseliny. Průběžná měření  $\Rightarrow$  doba obměny tkáně  $\sim$  680 dní.

Katan et al. 1997: Rovnovážný stav EPA a DHA kyselin nebyl dosažen během 18 měsíců suplementace.

$\Rightarrow$  časová **integrace cca 2+ roky**  $\times$  několikátýdenní obměna cholesterolových esterů

**FFQ studie PUFA a trans-MK korelují s koncentrací v tukové tkáni** (více než s plazmou nebo erythrocyty).



#### další využití

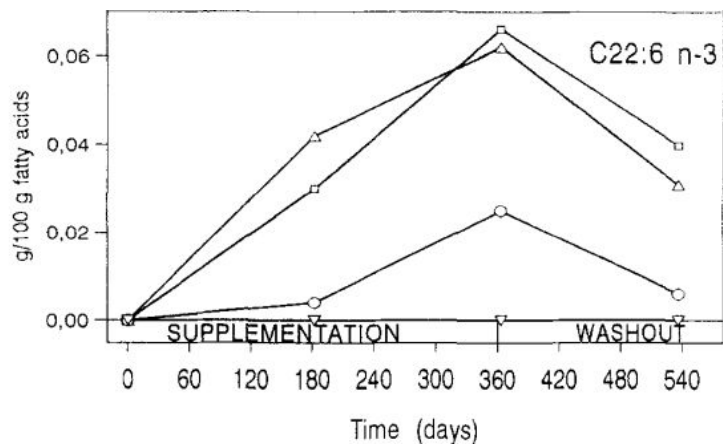
- alkyiresorcinol z celozrnné mouky - dobrá korelace se spotřebou (Jansson, 2010)
- pentadekanová kyselina (15:0) jako marker mléčného tuku - v podkožním tuku koreluje s FFQ



## Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study

Martijn B. Katan,<sup>1,2</sup> Jean Paul Deslypere,<sup>1,3</sup> Angelique P. J. M. van Birgelen, Margriet Penders,<sup>4</sup> and Marianne Zegwaard

Department of Human Nutrition, Wageningen Agricultural University, Bomenweg 2, 6703 HD Wageningen, The Netherlands



**Fig. 3.** Changes in the levels of very-long-chain in n-3 polyunsaturated fatty acids in gluteal (buttock) fat tissue aspirates in volunteers supplemented for 12 months with 0 g/d (▽), 3 g/d (○), 6 g/d (△), or 9 g/d (□) of fish oil rich in EPA. Values represent changes from baseline corrected for changes in the placebo (0 g/d) group. Top: Eicosapentaenoic acid (EPA), C20:5n-3; middle: docosapentaenoic acid (DPA), C22:5n-3; bottom, docosahexaenoic acid (DHA), C22:6n-3.

**Abstract.** Tissue levels of n-3 fatty acids reflect dietary intake, but quantitative data about rate of incorporation and levels as a function of intake are scarce. We fed 58 men 0, 3, 6, or 9 g/d of fish oil for 12 months and monitored fatty acids in serum cholesteryl esters, erythrocytes, and subcutaneous fat during and after supplementation. Eicosapentaenoic acid (EPA) in cholesteryl esters plateaued after 4-8 weeks; the incorporation half-life was 4.8 days. Steady-state levels increased by  $3.9 \pm 0.3$  mass % points ( $\pm$  SE) for each extra gram of EPA eaten per day. Incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) was erratic; plateau values were  $1.1 \pm 0.1$  mass % higher for every g/d ingested. Incorporation of EPA into erythrocyte membranes showed a half-life of 28 days; a steady state was reached after 180 days. Each g/d increased levels by  $2.1 \pm 0.1$  mass %. C22:5n-3 levels increased markedly. Changes in DHA were erratic and smaller. EPA levels in adipose tissue rose also; the change after 6 months was 67% of that after 12 months in gluteal and 75% in abdominal fat. After 12 months each gram per day caused an  $0.11 \pm 0.01$  mass % rise in gluteal fat for EPA,  $0.53 \pm 0.07$  for C22:5n-3, and  $0.14 \pm 0.03$  for DHA. Thus, different (n-3) fatty acids were incorporated with different efficiencies, possibly because of interconversions or different affinities of the enzymatic pathways involved. EPA levels in cholesteryl esters reflect intake over the past week or two, erythrocytes over the past month or two, and adipose tissue over a period of years. These findings may help in assessing the intake of (n-3) fatty acids in epidemiological studies.—Katan, M. B., J. P. Deslypere, A. P. J. M. van Birgelen, M. Penders, and M. Zegwaard.

## Výběr typu vzorku

### odběr tukové tkáně

Odběr podkožního tuku jehlou a stříkačkou (téměř) bezbolestná metoda (místní znecitlivění sprejem).

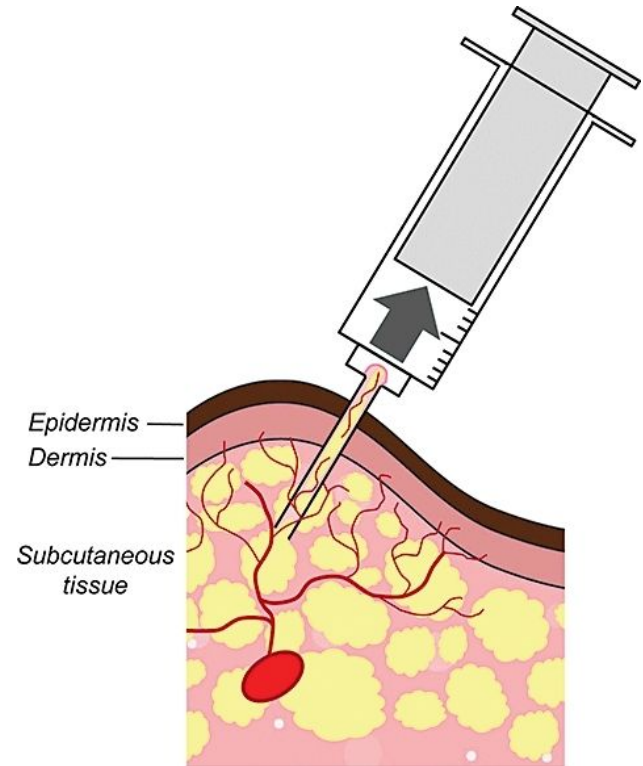
Používání tenčích jehel → eliminace anestetik

⇒ použití v epidemiologických studiích

#### příklad

[Campos, Baylin, Willett, 2008](#): sběr 3600 tkání na Costa Rice, výzkum příjmu  $\alpha$ -linolenové na výskyt infarktu. Rozsah  $\alpha$ -linolenové v tukové tkáni 0,3 - 1 %. Vyšší příjem (indikovaný laboratorně i dotazníky) byl spojen s nižším rizikem výskytu infarktu.

**Conclusions**— Consumption of vegetable oils rich in  $\alpha$ -linolenic acid could confer important cardiovascular protection. The apparent protective effect of  $\alpha$ -linolenic acid is most evident among subjects with low intakes.





## Výběr typu vzorku

### Vlasy a nehty

Vhodné pro měření minerálních látek: Se, Cd, Hg, Pb, ...

časová integrace: podle délky **až roky**

**Snadný odběr** i skladování, zřetel na vnější kontaminaci.  
Vzdálenější části často obsahují víc kovů než u hlavy.

Péče o vlasy může zkreslovat výsledky. Ideální stav vlasů u hlavy (ztráta dlouhodobé informace).

Pro porovnatelné výsledky - třeba standardizovat přípravné procedury.



## Výběr typu vzorku

### Vlasy a nehty

#### oběr vlasů

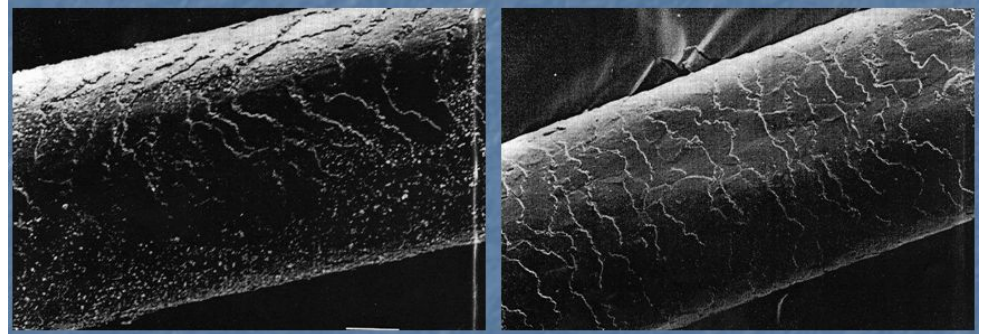
odběr z týlní oblasti, <5 cm od hlavy,  
cca 0,5-1 g vzorku

#### Mycí procedura (dle WHO):

- aceton,
  - 3x deionizovaná voda,
  - aceton
- (vždy 10 minut)

#### Rozklad vzorku

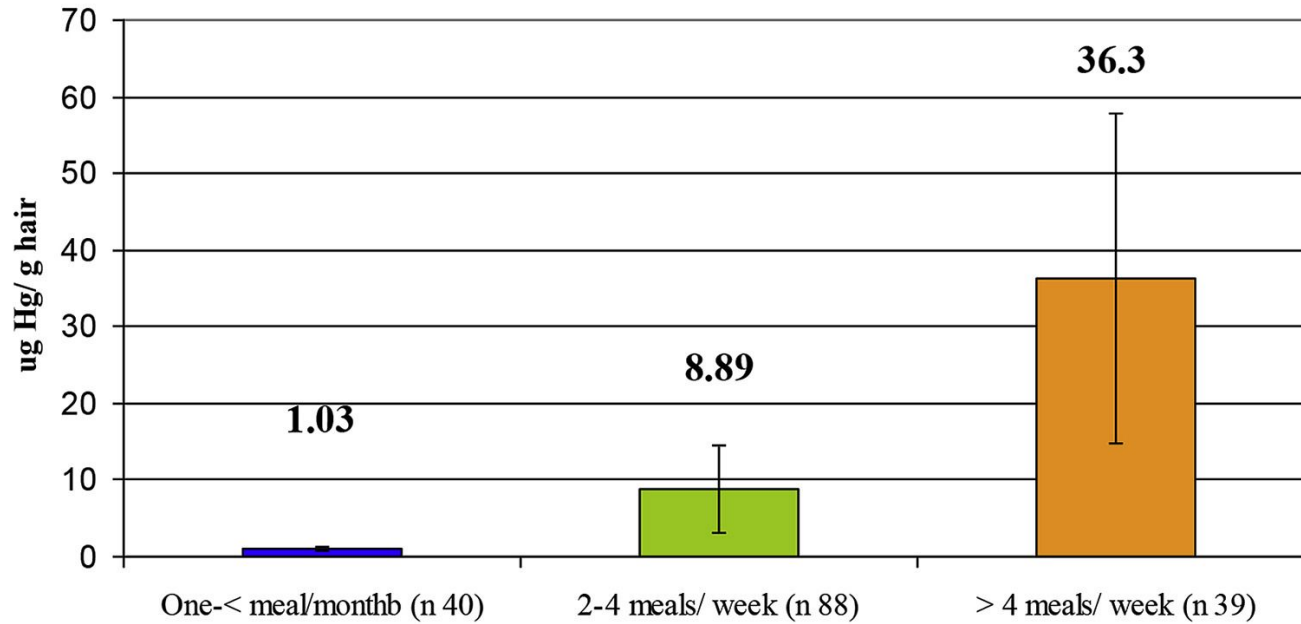
#### Stanovení kovů



před mytím

po mytí

Ověření: ([Certifikované referenční materiály](#), [obr.](#))



Correlation between the number of sea food meals and the concentration levels of mercury in human hair (Adapted from [Renzoni et al., 1998](#)).

In the Iraq poisoning, of an estimated 50,000 people exposed to the contaminated bread, 459 died, and 6,530 were hospitalized.



Photographs from *Neurotoxicology*, 1995, Vol. 16, No. 4

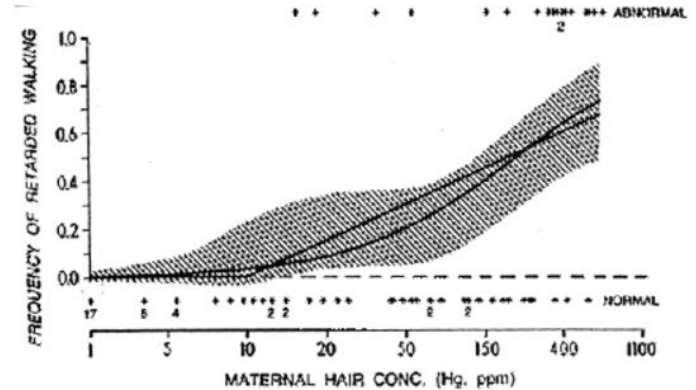


Fig. 2

Dose-response curve from article: Cox C., D. Marsh, G. Myers, and T. Clarkson, (1995). Analysis of data on delayed development from the 1971-1972 outbreak of methylmercury poisoning in Iraq: assessment of influential points. *NeuroToxicology*, 16 (4), 727-730.

## Výběr typu vzorku

### Vlasy a nehty

#### příklad 1

Zvýšený obsah Cd ve vlasech dětí. Zdrojem se ukázalo zahradní hnojivo. Rodina si nechala navézt na zahradu několik nákladních aut čistírenských kalů. Ty běžně obsahují vysoké množství kovů včetně Cd.

#### příklad 2

10letá holčička s podezřením na otravu Pb. Analýza vlasů prokázala otravu celé rodiny. Analýza dlouhých vlasů matky naznačila roční periodu otravy. Hypotéza periodického využití atypického nádobí?



## Výběr typu vzorku

### Vlasy a nehty

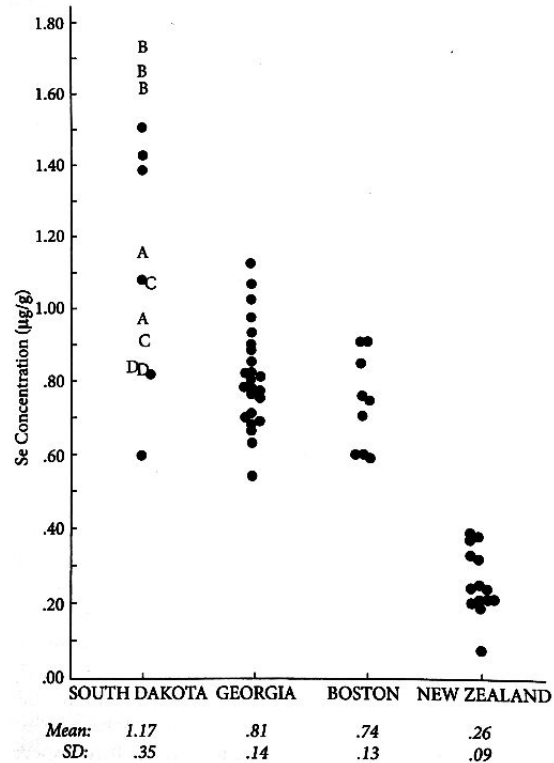
#### nehty na nohou

- méně exponované vnějšímu prostředí
- jednoduchá logistika
- vhodné pro minerální látky - integrace za  $\frac{1}{2}$  - 1 rok
- nehet palce u nohy roste  $\sim 0,056$  mm/den
  
- možnost samostatného odběru
  - $\frac{2}{3}$  kohorty, cca. 68 000 žen poslalo nehty poštou v rámci dlouhodobé studie Nurses' health study

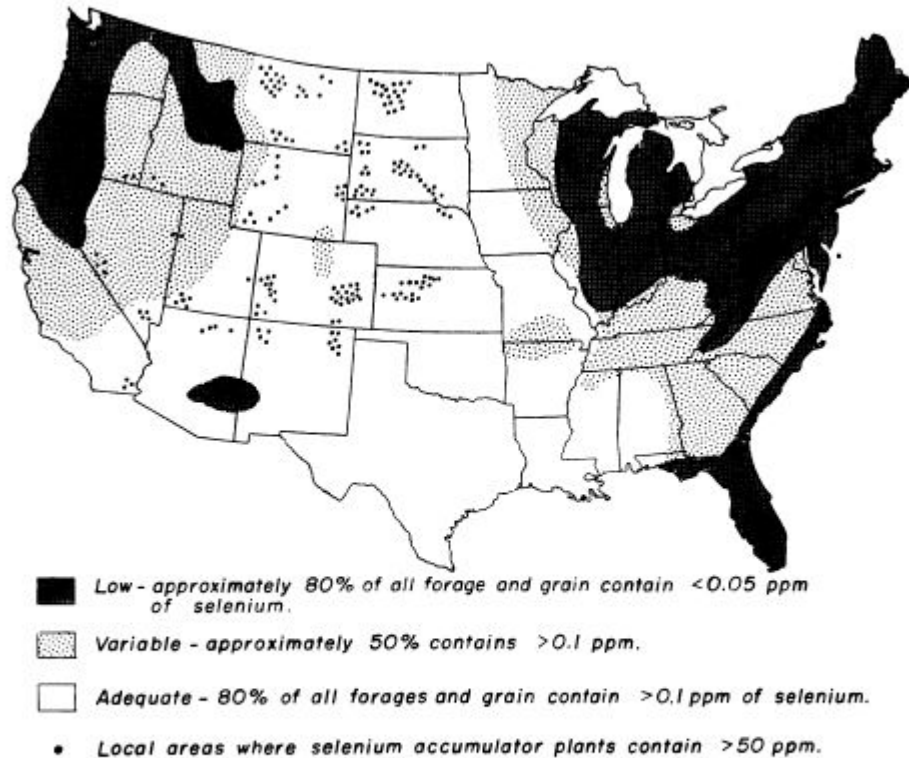


delší nehty = delší časová integrace





obsah selenu v nehtech v různých regionech



**Figure 8.** Geographical distribution of low-, variable-, and adequate-Se areas in the United States (ppm = 1 µg/g). From Kubota and Allaway, 1972, by permission Soil Science Society of America.

## Výběr typu vzorku

### Moč

způsoby odběru:

**24hodinová** (reprezentativní, sběrné PE nádoby)

**celonoční sběr**

**první ranní vzorek**

**jednorázový vzorek** (nejjednodušší, malá integrace)

+časté doplnění o vzorek krve - komplementární

návratné biomarkery: N, K, Na

koncentrační biomarkery: I, fenolické látky

Mnohé epi-studie prokázaly, že 24h vzorek není tak obtížné získat: [INTERSALT](#) - 10 tisíc lidí ze 32 zemí.

Curhan, Taylor ([2008](#)): 3350 vzorků poštou.





## Výběr typu vzorku

### Moč

**zředění** - ovlivňuje koncentraci biomarkerů

náhodné vzorky korelují se 24h sběrnými měrou 0,4–0,6 (Ilich, 2009)

možnost normalizace na **kreatinin**

- produkt degradace svalů
- vylučování kreatininu ~ konstantní
- dá se dopočítat z pohlaví, věku a váhy
- ověření 24h sběru, normalizace jednorázového vzorku

nebo: kontrola návratnosti PABA (4-aminobenzoové kys.)

#### příklad

Sója zvyšuje hladinu isoflavonů v moči. Porce sóji k večeri → zvýšení isoflavonů v ranní moči. Ne však, pokud je součástí snídane. ([Fraser, 2010](#))

