

**Univerzita Pardubice**  
**Fakulta chemicko-technologická**

**Vztah mezi vybranými aminothioly a parametry lipidového metabolismu  
u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním**

**Bc. Hana Hrabovská**

**Diplomová práce**

**2009**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra biologických a biochemických věd  
Akademický rok: 2008/2009

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Hana HRABOVSKÁ**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Vztah mezi vybranými aminothioly a parametry lipidového metabolismu u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se s literárními údaji o vztahu některých aminothiolů k atherogenezi. Zaměřte se na vztah těchto aminothiolů a parametrů lipidového metabolismu u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním.
2. Ověřte použitelnost vypracované HPLC/ED metody pro stanovení volných plazmatických aminothiolů v lidské plazmě.
3. Ve spolupráci s lékaři a na základě předem stanovených kritérií proveďte sběr vzorků plazmy a séra od pacientů s kardiovaskulárním onemocněním.
4. Proměřte hladiny základních biochemických parametrů, parametrů lipidového spektra a aminothiolů. Dle možností stanovte i hladiny významných antioxidantů.
5. Výsledky zpracujte pomocí dostupných statistických metod.
6. Pokuste se zhodnotit získané výsledky s ohledem na dostupnou literaturu.

Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
**podle pokynu vedoucího diplomové práce**

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání diplomové práce: **1. října 2008**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2009**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.  
děkan

L.S.

  
doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 5. 2009

---

Hana Hrabovská

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především vedoucí své diplomové práce Mgr. Pavle Žákové, PhD. za metodické vedení a odbornou pomoc. Mé poděkování patří také MUDr. Vladimíru Maňáskovi, MUDr. Marii Mlčochové a Onkologickému centru J. G. Mendela v Novém Jičíně za pomoc při získávání a zpracovávání vzorků. Dále bych chtěla poděkovat všem pacientům, kteří se zúčastnili této studie a v neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za velkou podporu během celého studia.

## SOUHRN

Již dlouho se zkoumá, zda by jedním z markerů aterosklerózy mohl být homocystein a některé další aminothioly (cystein, cysteinyl-glycin). Využili jsme simultánního stanovení těchto aminothiolů a methioninu metodou HPLC-ED u souboru pacientů s aterosklerotickým kardiovaskulárním onemocněním. Zaznamenali jsme zvýšené hladiny cysteinu a homocysteinu a sníženou koncentraci methioninu, významnou negativní korelaci mezi hladinami cysteinu (homocysteinu) a methioninu a zároveň hladiny kreatininu ve fyziologických mezích. Mezi hladinami cysteinu a homocysteinu jsme našli silnou pozitivní korelaci. Z toho usuzujeme na zvýšenou tvorbu cysteinu z homocysteinu transsulfurační cestou a na utlumení remetylační dráhy, při které vzniká methionin. To může být následkem zvýšeného oxidačního stresu spojeného s aterosklerózou, ale také s vysokým věkem pacientů a s častým výskytem arteriální hypertenze. Ověřili jsme korelace některých látek s věkem. Významně pozitivně s věkem koreloval cystein a homocystein, negativně methionin.

Ve vzorcích pacientů jsme stanovili vitamin E metodou HPLC-ED. Zjistili jsme významnou negativní korelaci mezi vitaminem E a indexem aterogenity a také mezi indexem aterogenity a poměrem vitamin E/LDL. Z toho usuzujeme, že vitamin E má význam jako antioxidant, který chrání LDL částice před oxidací a tím snižuje jejich aterogenní vlastnosti.

Vyšetřili jsme lipidové spektrum u všech pacientů. Nalezli jsme významnou negativní korelaci mezi HDL-cholesterolem a homocysteinem u pacientů s hyperhomocysteinémií. Je tedy možné, že homocystein snižuje hladinu HDL cholesterolu.

Ověřili jsme použitelnost vypracované HPLC-ED metody pro stanovení volných aminothiolů v séru. Naměřili jsme nižší koncentrace volných aminothiolů, než uváděla literatura. Tato metoda vyžaduje další optimalizaci pro nižší koncentrace aminothiolů ve vzorcích a volbu pH mobilní fáze, při kterém dojde k dostatečné separaci píků.

**Klíčová slova:** aminothioly, homocystein, ateroskleróza, HDL

## SUMMARY

There is a research proceeding for a long time, aimed at question whether the homocysteine and certain other aminothiols (cystein, cysteinyl-glycin) may be markers of atherosclerosis. We have applied method of simultaneous determination of these aminothiols and methionin by HPLC-ED to pool of patients affected by atherosclerotic cardiovascular desease. We have registered increased levels of cysteine and homocysteine and lowered concentration of methionine, significant negative correlation between levels of cysteine (homocysteine) and methionine, together with creatinin levels within physiological limits. We have found strong positive correlation between cysteine and homocysteine levels too. We assume that above stated is consequence of increased transformation of homocysteine into cysteine by transsulfuration pathway and suppression of remethylation pathway, during which methionine is created. This may be caused by increased oxidation stress related to atherosclerosis, or to old age of patients or to frequent occurrence of arterial hypertension. We have checked the correlation between certain substances and age. Cysteine and homocysteine have correlated significantly positive, methionine has correlated negative.

We have determined vitamin E by HPLC-ED method. We have found significant negative correlation between vitamin E and atherogenity index and also between atherogenity index and vitamin E/LDL ratio. Because of that we assume that vitamin E function like antioxidant protecting LDL particles against oxidation and thereby suppress their atherogenic effect.

We have also determinated concentrations of lipid compounds in all samples. We found significant negative correlation between levels of homocysteine and HDL cholesterol by hyperhomocysteinemic patients. So there is possibility that homocysteine lowers the level of HDL cholesterol.

We have verified usability of created HPLC-ED method to determine free plasma aminothiols. However we have discovered lower concentrations of free aminothiols than is declared by scientific publications. This method needs additional optimalization for lower concentrations of aminothiols and pH mobile phase option to separate peaks sufficiently.

**Keywords:** aminothiols, homocysteine, atherosclerosis, HDL

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABCA 1	kazetový transportér spojený s ATP (ATP-binding cassette transporter)
AKO	aterosklerotické kardiovaskulární onemocnění
Alb	albumin
AO	aterosklerotické onemocnění
Apo	apoprotein
apoA-I	apoprotein AI
apoA-II	apoprotein AII
BMI	body mass index
CBS	cystathionin- $\beta$ -syntasa
CE	cholesterol-ester
CETP	cholesterolester transfer protein
CMP	cévní mozková příhoda
CoQ <sub>10</sub>	koenzym Q <sub>10</sub>
CRP	C-reaktivní protein
Cys	cystein
Cys-gly	cysteinyl-glycin
DM	diabetes mellitus
ED	elektrochemická detekce
fCys	volný cystein
fCys-gly	volný cysteinyl glycin
fHcy	volný homocystein
FC	volný cholesterol
fMet	volný methionin
Glc	glukóza
GSPx	glutathionselenoperoxidasa
Hcy	homocystein
HD	hemodialýza
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
HDL-C	HDL cholesterol
HL	jaterní lipasa
HLP	hypolipidemika
HTGL	hepatální triglyceridová lipasa



IA	index aterogenity
IDL	lipoproteiny se střední hustotou (intermediate density lipoprotein)
ICHS	ischemická choroba srdeční
IM	infarkt myokardu
LCAT	lecithin-cholesterolacyltransferasa
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (low density lipoprotein)
LDL-C	LDL cholesterol
LDL-R	LDL-receptor
LOOH	lipidový peroxid
LP	lipoprotein
LRP	protein příbuzný LDL receptoru (LDL-receptor related protein)
Met	methionin
MTH	methylenetetrahydrofolát
MTHFR	methylenetetrahydrofolátreduktasa
NAC	N-acetylcystein
NOS	syntasa oxidu dusnatého
oxLDL	oxidované LDL
PAF-AH	platelet-activating factor-acetyl hydrolase
PL	fosfolipidy
PLP	pyridoxal-5'-fosfát
PLTP	phospholipid transfer protein
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
RTC	reverzní transport cholesterolu
SAM	S-adenosyl methionin
SR-BI	scavenger receptor třídy B, typ I (scavenger receptor B type I)
tCys	celkový cystein
tCys-gly	celkový cysteinyl glycin
TG	triglyceridy
tHcy	celkový homocystein
TC	celkový cholesterol
tMet	celkový methionin
TRL	lipoprotein bohatý na triglyceridy (triglycerid rich lipoprotein)
vit E	vitamin E
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein)

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část .....</b>	<b>14</b>
2.1	<i>Ateroskleróza.....</i>	<i>14</i>
2.1.1	Patogeneze aterosklerózy.....	15
2.1.2	Vývojová stádia aterosklerotických lézí.....	15
2.1.3	Rizikové faktory aterogeneze .....	17
2.2	<i>Lipoproteiny .....</i>	<i>18</i>
2.2.1	Stručný přehled .....	18
2.2.1.1	Chylomikrony.....	19
2.2.1.2	Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou.....	19
2.2.1.3	Lipoproteiny s nízkou hustotou .....	20
2.2.1.4	Lipoproteiny s vysokou hustotou .....	20
2.2.2	Lipoproteiny a ateroskleróza .....	20
2.2.2.1	Struktura a metabolismus HDL částic .....	21
2.2.2.2	Reverzní transport cholesterolu.....	22
2.3	<i>Role zánětu a oxidačního stresu v patogenezi aterosklerózy .....</i>	<i>26</i>
2.3.1	Oxidační stres .....	26
2.3.2	Zánět .....	26
2.3.3	LDL, HDL a oxidační stres.....	26
2.3.4	Antioxidanty .....	28
2.3.4.1	Vitamin E.....	28
2.3.4.2	Koenzym Q <sub>10</sub> .....	29
2.4	<i>Aminothioly .....</i>	<i>30</i>
2.4.1	Význam jednotlivých aminothiolů.....	30
2.4.1.1	Methionin .....	30
2.4.1.2	Cystein.....	30
2.4.1.3	Homocystein.....	31
2.4.1.4	Cysteinyl-glycin .....	32
2.4.2	Metabolismus homocysteinu a dalších aminothiolů.....	33
2.4.2.1	Enzymy účastníci se metabolismu aminothiolů a jejich poruchy .....	34
2.4.2.2	Volné aminothioly .....	34
2.4.3	Hyperhomocysteinémie .....	34
2.4.3.1	Hyperhomocysteinémie a riziko kardiovaskulárních onemocnění.....	35
2.4.3.2	Léčba hyperhomocysteinémie .....	36
2.4.4	Možné mechanismy patologického účinku homocysteinu .....	37
2.4.5	Onemocnění spojená s hyperhomocysteinémií.....	38
2.5	<i>Souvislosti v metabolismu lipoproteinů a aminothiolů a patogenezi aterosklerózy .....</i>	<i>38</i>
2.5.1	Vztah mezi lipoproteinem(a) a thioly .....	38
2.5.2	Vztah mezi hHcy a metabolismem lipidů.....	39
2.5.3	Vztah mezi antioxidačními enzymy HDL částic a aterosklerózou.....	40

<b>3</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>42</b>
3.1	<i>Charakteristika souboru pacientů.....</i>	42
3.2	<i>Stanovení aminothioliů pomocí HPLC-ED .....</i>	43
3.2.2	Použité chemikálie .....	43
3.2.3	Přístroje a pomůcky .....	44
3.2.4	Chromatografická analýza aminothioliů.....	45
3.2.4.1	Složení a příprava mobilní fáze .....	45
3.2.4.2	Podmínky separace .....	45
3.2.4.3	Nastavení elektrochemického detektoru Coulochem II .....	46
3.2.4.4	Úprava vody pro HPLC analýzu .....	46
3.2.4.5	Identifikace píků .....	46
3.2.4.6	Kvantifikace .....	46
3.2.5	Stanovení celkových aminothioliů.....	47
3.2.5.1	Roztoky připravované do spotřebování zásob.....	47
3.2.5.2	Roztoky připravované pro každou sérii čerstvé .....	48
3.2.5.3	Příprava vzorku pro analýzu celkových aminothioliů.....	49
3.2.5.4	Kalibrace pro stanovení celkových aminothioliů .....	49
3.2.6	Stanovení volných aminothioliů .....	50
3.2.6.1	Roztoky používané pro analýzu volných aminothioliů .....	50
3.2.6.2	Příprava vzorku plazmy pro analýzu volných aminothioliů.....	51
3.2.6.3	Kalibrace pro stanovení volných aminothioliů.....	51
3.3	<i>Stanovení vitamínu E pomocí HPLC-ED .....</i>	52
3.3.1	Použité chemikálie .....	52
3.3.2	Přístroje a pomůcky .....	52
3.3.3	Příprava používaných roztoků .....	53
3.3.4	Příprava vzorků a standardů pro analýzu vitamínu E .....	53
3.3.5	Chromatografická analýza vitamínu E .....	54
3.3.5.1	Složení a příprava mobilní fáze .....	54
3.3.5.2	Podmínky separace .....	54
3.3.5.3	Nastavení elektrochemického detektoru Coulochem II .....	54
3.3.6	Identifikace píků .....	55
3.3.7	Kvantifikace .....	55
3.3.7.1	Kalibrace pro stanovení vit E .....	55
3.4	<i>Doplňující analýzy.....</i>	56
3.4.1	Stanovení celkového cholesterolu.....	56
3.4.2	Stanovení močoviny.....	56
3.4.3	Stanovení triglyceridů .....	56
3.4.4	Stanovení glukózy .....	56
3.4.5	Stanovení kreatininu .....	57
3.4.6	Stanovení kyseliny močové .....	57
3.4.7	Stanovení albuminu .....	57
3.4.8	Stanovení celkové bílkoviny.....	57
3.4.9	Stanovení Apolipoproteinu A-I imunochemicky .....	58
3.4.10	Stanovení HDL cholesterolu .....	58
3.4.11	Výpočet LDL cholesterolu.....	58
3.4.12	Výpočet indexu aterogenity .....	58
3.5	<i>Zpracování výsledků.....</i>	58

<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>59</b>
4.1	<i>Chromatografická analýza celkových aminothioliů.....</i>	59
4.1.1	Retenční časy celkových aminothioliů .....	59
4.1.2	Chromatografický záznam separace celkových aminothioliů .....	59
4.1.3	Kalibrační křivky celkových aminothioliů .....	60
4.1.4	Vyhodnocení vzorků .....	62
4.1.5	Průměrné naměřené hodnoty celkových aminothioliů .....	62
4.2	<i>Chromatografická analýza volných aminothioliů.....</i>	63
4.2.1	Retenční časy volných aminothioliů.....	63
4.2.2	Chromatografický záznam separace volných aminothioliů.....	63
4.2.3	Kalibrační křivky volných aminothioliů.....	64
4.3	<i>Chromatografická analýza vitamínu E.....</i>	67
4.3.1	Chromatografický záznam vitamínu E .....	67
4.3.2	Kalibrační křivka vitamínu E.....	68
4.3.3	Vyhodnocení vzorků .....	68
4.3.4	Průměrné naměřené hodnoty vitamínu E.....	68
4.4	<i>Korelační analýza výsledků.....</i>	69
4.4.1	Korelace mezi jednotlivými aminothioly .....	69
4.4.2	Korelace mezi celkovým homocysteinem (cysteinem) a látkami lipidového spektra .....	70
4.4.3	Korelace mezi celkovým homocysteinem (cysteinem) a látkami ledvinného spektra.....	72
4.4.4	Korelace poměru vitamín E/LDL a vit E s indexem aterogenity.....	72
4.4.5	Korelace mezi hladinami některých látek a věkem pacientů.....	74
<b>5</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>82</b>

# 1 Úvod

Ateroskleróza je hlavní příčinou kardiovaskulárních onemocnění a velkým poměrem se podílí na mortalitě ve vyspělých zemích. Multifaktoriální příčiny jejího vzniku a rozvoje vedou vědce v celém světě k hledání nových markerů, které by pomohly odhalit počínající onemocnění. Tradiční rizikové faktory jako je hypertenze, kouření, obezita či hypercholesterolemie se nemusí vyskytovat u všech pacientů a v těchto případech by využití nových markerů umožnilo včasnou diagnostiku aterosklerózy.

Již dlouho se zkoumá, zda by jedním z nových markerů aterosklerózy mohl být homocystein. Jedná se o neesenciální sirnou aminokyselinu, která je meziproduktem metabolismu methioninu. Spolu s cysteinem, cysteinyl-glycinem a dalšími látkami se řadí mezi aminothioly. Metabolismus aminothiolů je vzájemně propojen, a proto se často využívá jejich simultánní stanovení.

V některých studiích bylo zjištěno, že homocystein snižuje hladinu HDL cholesterolu. Naší snahou bylo tuto skutečnost ověřit.

Významnou roli v patogenezi aterosklerózy hrají také antioxidantní látky, jako je vitamin E či koenzym Q<sub>10</sub>. Tyto antioxidanty mají schopnost chránit lipoproteinové částice před oxidací a tím zabraňují jejich usazování v cévách a tvorbě aterosklerotického plaku.

Cílem naší práce bylo proměřit hladiny celkových aminothiolů a vitamínu E u pacientů po závažné koronární příhodě (infarkt myokardu, cévní mozková příhoda) a pacientů s pozitivním koronarografickým nálezem metodou HPLC-ED. Kromě klíčových látek jsme si dali za cíl vyšetřit základní biochemii a funkci ledvin, abychom mohli získané výsledky komplexně posoudit, porovnat hladiny jednotlivých analytů a zjistit jejich případné vzájemné korelace.

Měli jsme také ověřit použitelnost vypracované HPLC-ED metody pro stanovení volných aminothiolů v séru.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza je hlavní příčinou kardiovaskulárních onemocnění a velkým poměrem se podílí na morbiditě, invaliditě a mortalitě ve vyspělých zemích (Liao a kol., 2007, Kiechl, Willeit 1999).

Ateroskleróza, neboli kornatění tepen, je civilizační systémové onemocnění postihující velké a střední cévy tepenného řečiště. Nejčastěji vzniká v tepnách zásobujících srdce, mozek, ledviny a dolní končetiny. Jde o kombinaci patologických změn v intimě tepen, na jejímž počátku je poškození cévního endotelu (Štípek a kol., 2000; Masopust, 2003; Rucki, Strožický, 2003 ).

Poškození endotelu může být mechanické (např. arteriální hypertenzí), ale i funkční při zachování jeho morfologické integrity. Tyto poruchy nazýváme endotelovou dysfunkcí (Bureš, Horáček, 2002).

Na rozvoji a vzniku aterosklerózy se podílí celá řada faktorů způsobujících endotelovou dysfunkci. Mezi ovlivnitelné faktory patří konzumace alkoholu, obezita, fyzická inaktivita, hypertenze, kouření, zvýšení a modifikace lipoproteinů o nízké hustotě (low density lipoprotein, LDL), vysoké hladiny cholesterolu, triglyceridy (TG), lipoprotein(a) [Lp(a)], stravovací návyky, diabetes mellitus (DM). Neovlivnitelné faktory jsou dědičné predispozice, věk a mužské pohlaví. V posledních letech byly mezi rizikové faktory zařazeny také chronické infekce vyvolané virem (cytomegalovirus, herpetické viry) nebo bakteriemi (*Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*), homocystein (Hcy), fibrinogen, oxidační stres, C-reaktivní protein (CRP) (Žáková, Kand'ár 2006; Masopust, 2003; Racek a kol., 2004; Fruchart a kol., 2004; Kiechl, Willeit, 1999; Lee a kol., 2006).

Dysfunkce endotelu, způsobená těmito vlivy, vede ke kompenzační odpovědi, která mění normální homeostatické vlastnosti cévního endotelu (Masopust, 2003).

### 2.1.1 Patogeneze aterosklerózy

Poškození endotelu (obr. 1) zvýší pronikání LDL částic do intimy (kam v přiměřené míře vnikají normálně), a to zvláště tehdy, je-li vyšší hladina LDL v krevní plasmě. Lipidy v hromadících se LDL podléhají oxidaci, proteinová složka LDL též glykosylaci. Oxidaci napomáhá kouření cigaret s hromaděním volných radikálů, obezita, glykosylaci pak hyperglykémie při diabetu. Na změněný LDL reagují buňky cévní stěny, zvláště endotelie, zánětlivou reakcí.

Aktivované endotelové buňky vystavují adhezivní molekuly, které přitahují do místa poškození monocyty/makrofágy a T-lymfocyty z krevního řečiště a buňky vaskulární hladké svaloviny z medie. Makrofágy fagocytózou vstřebávají lipidy uvolněné z LDL částic a postupně se mění na pěnové buňky. Stěna cévy se v místě poškození ztlušťuje, tvoří se zde tukový proužek a následně plak s lipidovým jádrem a vazivovou „čepičkou“ z buněk cévní hladké svaloviny. Později dochází k exulceracím, krvácení do plátu a agregaci krevních destiček. Tyto děje mohou vést ke vzniku trombu, který uzavře cévu a tím zastaví přívod kyslíku a živin do oblasti na této cévě závislé. Klinickými následky potom mohou být infarkt myokardu, mrtvice či gangréna (Žáková, Kand'ár, 2006; Štípek a kol., 2000; Masopust, 2003; Rucki, Strožický, 2003).

Ateroskleróza vzniká již v dětství a v průběhu života se vyvíjí. Počáteční aterosklerotické léze (ztluštění intimy cév) se mohou objevit již během dospívání, ale frekvence konečných aterosklerotických lézí se prudce zvyšuje od 40 roku věku u mužů a u žen po menopauze (Kiechl, Willeit 1999).

### 2.1.2 Vývojová stádia aterosklerotických lézí

Podle American Heart Association se stádia aterosklerotických lézí dělí následovně:

**Typ I. Iniciální léze** – dochází ke zvýšení počtu izolovaných makrofágů v intimě, tvoří se tzv. „pěnové buňky“, v této fázi jsou pouze chemicky či mikroskopicky prokazatelná depozita lipidů

**Typ II. Lipoidní proužky** – intracelulární akumulace lipidů, v intimě se hromadí pěnové buňky vzniklé z makrofágů, hladká svalovina ještě není zmnožena, ale začínají se v ní objevovat tukové kapénky. V pokročilejší ateromatózní lézi progredují jen ty lipoidní proužky, které jsou bohaté na lipidy, makrofágy, žírné buňky a lymfocyty.

Iniciální léze a lipidní proužky nacházíme u dětí i u dospělých. Tyto dva typy lze řadit mezi časné léze aterosklerózy.

**Typ III. Preaterom** – převažují intracelulární lipidy, začínají se objevovat malé izolované extracelulární depozita lipidů. Tyto změny se mohou objevit již brzy po pubertě, jedná se o předchůdce pokročilých ateromatózních lézí, které se vyskytují u dospělých.

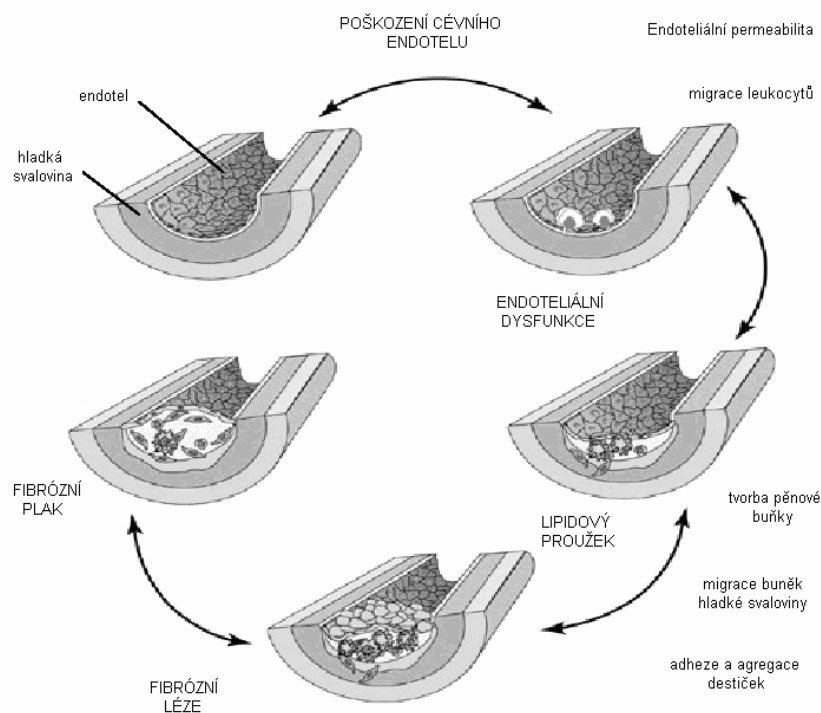
**Typ IV. Aterom** – dochází k intracelulární akumulaci lipidů spolu s extracelulárním výskytem depozit typu lipidového jádra

**Typ V. Fibroaterom** – tvoří se vyvýšené vazivové ložisko s lipidovým jádrem a fibrotickou vrstvou. Podle dalších projevů lze dělit na:

- **typ Va. – Léze s kalcifikacemi** – projevy jsou stejné jako v případě fibroateromu, ale dochází k převaze kalcifikace
- **typ Vb. – Fibrotické léze** – převažuje fibrotizace

**Typ VI. Komplikované léze** – vzniká povrchový defekt, tvoří se hematoma a může následovat hemoragie, akumulace trombocytů a vznik trombu. Nakonec může dojít až k arteriální okluzi.

Typy IV. až VI. řadíme mezi pokročilé aterosklerotické léze (Racek a kol., 2004; Rucki, Strožický, 2003).



**Obr. 1: Mechanismus poškození endotelu (Jelínková, 2008)**



### 2.1.3 Rizikové faktory aterogeneze

**LDL cholesterol** – LDL částice mohou být modifikovány oxidací, glykací (u diabetu), agregací, asociací s proteoglykany nebo inkorporací do imunitních komplexů a jsou hlavní příčinou poškození stěny artérií. Protiaterogenně působí reverzní transport cholesterolu do jater, který umožňují lipoproteinové částice o vysoké hustotě (high density lipoprotein, HDL).

**Hypertenze** - Angiotensin II (hlavní produkt renin-angiotensinového systému), který je silným vazokonstriktorem a způsobuje hypertenzi, přispívá k rozvoji aterogeneze stimulací proliferace buněk cévní hladké svaloviny. Váže se totiž na specifický receptor, což má za následek uvolnění reaktivních forem kyslíku a dusíku v různých buňkách stěn arterií (Masopust, 2003).

**Diabetes mellitus** - Hyperglykemie sdružená s DM přispívá ke vzniku oxidačního stresu, a tím k endotelové dysfunkci. Hyperglykemie podporuje adhezi leukocytů k endotelu, navozuje aktivaci vaskulární hladké svaloviny. To vede ke zvýšení tonu stěny arterií, k větší proliferaci buněk hladké svaloviny a tím ke ztluštění intimy už v časně fázi aterogeneze.

**Homocystein** - Zvýšená koncentrace Hcy v plazmě zřejmě navozuje dysfunkci endotelu (zvyšuje oxidační stres), ovlivňuje tloušťku intimy a medie arterií, pružnost stěny arterií a má protrombotický účinek (Masopust, 2003; Welch, Loscalzo, 1998).

**Infekce** - Je stále více důkazů, že chronická infekce má souvislost s rozvojem aterogeneze. Byla nalezena přítomnost herpetických virů a *Chlamydia pneumoniae* v ateromových plátech a zvýšený titr protilátek proti různým infekčním agens (*Helicobacter pylori*, cytomegalovirus, virus Epsteinova a Barrové, *Hemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*) u pacientů s akutním koronárním syndromem. Rovněž chronický zánět periodontia je považován za přispívající faktor rozvoje aterosklerózy. Infekce cévní stěny indukuje tvorbu látek, které napomáhají rozvoji dysfunkce endotelu svalových buněk cév (Masopust, 2003; Hyánek a kol., 1997).

**Kouření cigaret** - Cigaretový kouř obsahuje kromě známých karcinogenů i řadu toxických látek, jako CO, NH<sub>3</sub>, akrolein, aceton, nikotin, benzpyreny, hydrochinon, oxidy dusíku. Mnohé tyto sloučeniny modulují funkci imunokompetentních buněk (Masopust, 2003).

**Lipoprotein (a)** – Jedná se o lipoproteinovou částici s nízkou hustotou a s typickým apoproteinem(a) kovalentně vázaným k molekule apoB-100 disulfidickým můstkem. Analogie bílkovinné části Lp(a) s plazminogenem způsobuje jeho protrombotické a proaterogenní účinky. Lp(a) brání vazbě plazminogenu na fibrinogen a monomery fibrinu a inhibuje účinek tkáňového aktivátoru plazminogenu. Navíc podporuje proliferaci buněk hladké svaloviny cévní stěny (Racek a kol., 1999).

**Fibrinogen** – Jedná se o vláknitý glykoprotein, jehož koncentrace v plazmě stoupá u akutních stavů jako je zánět, trauma, operace nebo infarkt myokardu. Fibrinogen zvyšuje viskozitu krve, infiltruje arteriální stěnu, váže na sebe lipoproteiny (LP) a stimuluje buněčnou proliferaci. Dále podporuje agregaci trombocytů a tvorbu fibrinového trombu (Racek a kol., 1999).

**C-reaktivní protein** – Jedná se o bílkovinu akutní fáze, nejvýznamnější marker probíhajícího zánětu a potenciální marker kardiovaskulárního onemocnění. Hraje významnou roli v přirozené imunitní odpovědi. Je produkován také buňkami hladké svaloviny cév a je exprimován přednostně v místě porušení cévní stěny. CRP může přímo ovlivnit expresi adhezních molekul, fibrinolýzu, a tím způsobit endoteliální dysfunkci (Ridker a kol., 2004).

## **2.2 Lipoproteiny**

### **2.2.1 Stručný přehled**

Lipoproteiny jsou částice, které se skládají z nekovalentně asociovaných lipidů a proteinů, nazývaných apoproteiny (apo). Působí v plazmě jako přenašeče lipidů, které se vyskytují ve čtyřech různých formách – TG, fosfolipidy (PL), cholesterol a cholesterol-ester (CE) (Harper a kol., 1998).

Plasmové LP vytvářejí kulovité částice, které obsahují nepolární jádro z TG a CE. Toto jádro je obklopeno více polárním obalem z apo, PL a cholesterolu (Voet, Voetová, 1995; Forti, Diament, 2006).

Apoproteiny mají několik funkcí: 1) Jsou potřebné pro syntézu a sekreci specifických LP. 2) Aktivují enzymy modifikující LP. 3) Váží se na specifické receptory na povrchu buněk, a tím zajišťují odstranění LP z krevního oběhu (Racek a kol., 1999).

Lipoproteiny jsou klasifikovány podle jejich velikosti, hustoty a lipidového a proteinového složení (Forti, Diament; 2006). Na základě těchto vlastností se dělí do pěti skupin (Tab. I).

**Tab. I:** Třídy lipoproteinů a jejich vlastnosti (Voet, Voetová, 1995)

Třída lipoproteinů	Hlavní lipidy	Apoproteiny	Hustota g/mL	Průměr částice (nm)
Chylomikrony a zbytky	exogenní TG	A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III, E	< 0,95	80 - 500
VLDL	endogenní TG, CE	B-100, C-I, C-II	0,95 - 1,006	30 - 80
IDL	CE, TG, cholesterol	B-100, C-III, E	1,006 - 1,019	25 - 35
LDL	CE, cholesterol, TG	B-100	1,019 - 1,063	18 - 28
HDL	CE, cholesterol	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, A-IV	1,063 - 1,210	5 - 12

### 2.2.1.1 Chylomikrony

Chylomikrony jsou LP mající největší velikost, největší podíl lipidů a nejnižší hustotu. Vznikají ve střevě z TG a cholesterolu přijímaných v potravě a jsou uvolňovány do střevní lymfy, odkud se dostávají do krevního oběhu. Zde adherují na vazebná místa vnitřního endotelu kapilár. Po vstupu do krevního řečiště jsou během několika minut hydrolyzovány působením lipoproteinové lipasy (LPL). Uvolněné mastné kyseliny slouží jako zdroj energie pro svaly a další tkáně, jsou uloženy v tukové tkáni nebo resyntetizovány v játrech (Racek a kol., 1999; Voet, Voetová, 1995).

### 2.2.1.2 Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou

Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (very low density lipoprotein, VLDL) jsou

syntetizovány v játrech. Jejich jádro je bohaté na TG, v menší míře obsahují také cholesterol. Jejich úkolem je transport TG do periferních tkání. Stejně jako chylomikrony jsou VLDL štěpeny LPL. Zbytky VLDL se objevují v krevním oběhu nejdříve jako lipoproteiny se střední hustotou (IDL). IDL jsou pak vychytány játry a metabolizovány pomocí jaterní lipasy (HL) za vzniku LDL (Racek a kol. 1999; Voet, Voetová, 1995).

### **2.2.1.3 Lipoproteiny s nízkou hustotou**

Při přeměně VLDL na LDL jsou téměř všechny proteiny kromě apoB odstraněny a většina jejich cholesterolu je esterifikována enzymem lecitin-cholesterolacyltransferasa (LCAT), který přenáší zbytek mastné kyseliny z lecitinu na cholesterol. LDL jsou hlavním typem lipoproteinů přenášejících cholesterol. Jejich jádro obsahuje téměř výlučně CE. LDL jsou vychytávány LDL-receptory (transmembránovými glykoproteiny na povrchu buněk, které specificky váží apoB a apoE) a prostupují do buněk receptorovou endocytózou. Cholesterol, který se takto dostal do buňky je buď využit ke stavbě buněčných membrán, nebo je reesterifikován a uložen do zásoby (Racek a kol. 1999; Voet, Voetová, 1995).

### **2.2.1.4 Lipoproteiny s vysokou hustotou**

HDL jsou ze všech lipoproteinů nejmenší, mají největší hustotu a vznikají v plazmě především ze složek vzniklých rozkladem jiných lipoproteinů. Jejich hlavním úkolem je přenos endogenního cholesterolu z tkání do jater. HDL mají antiaterogenní, protizánětlivé a antioxidační účinky. (Kontush, Chapman, 2006; Rader a kol., 2006; Ansell a kol. 2005; Voet, Voetová, 1995).

## **2.2.2 Lipoproteiny a ateroskleróza**

Vysoké krevní koncentrace LDL a nízké koncentrace HDL jsou primárními faktory pro rozvoj aterosklerotického onemocnění (AO) (Forti, Diament, 2006).

To, jak velké je riziko vzniku AO tedy určuje nerovnováha mezi nadbytkem cirkulujícího cholesterolu ve formě apoB obsahujícího lipoproteinu, tzv. proaterogenní apolipoprotein a nedostatkem antiaterogenních apoA-I obsahujících lipoproteinů. ApoB je převládající proteinovou složkou proaterogenních LDL, VLDL a IDL částic, zatímco apoA-I je hlavní proteinovou složkou antiaterogenních HDL částic.

Hypercholesterolemie způsobená zvýšenou koncentrací LDL-C je častou formou aterogenní dyslipidemie (skupina metabolických chorob charakterizovaných změnou hladin lipidů a lipoproteinů v plazmě). LDL je hlavní přenašeč cholesterolu nejen do periferních tkání, ale také do arteriální stěny. Interakce mezi pozitivně nabitými doménami apoB s negativně nabitými proteiny extracelulárního matrixu (proteoglykan, kolagen, fibronectin) vede k retenci lipoproteinů obsahujících apoB, což je hlavním iniciačním faktorem aterogeneze.

Dalším významným iniciačním faktorem aterogeneze je snížená hladina HDL cholesterolu (HDL-C) vyskytující se především u pacientů s metabolickým onemocněním, jakým je DM 2. typu a metabolický syndrom. Vysoké koncentrace HDL-C jsou často spojeny s dlouhověkostí (Kontush, Chapman, 2006).

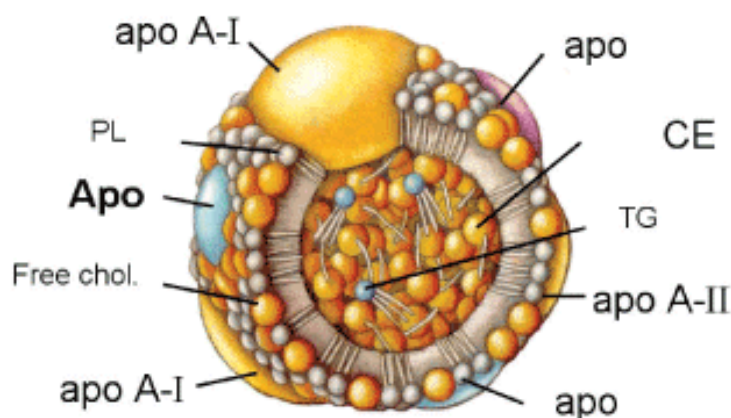
Populační studie provedené v minulosti prokázaly vysoce stabilní negativní korelaci mezi plasmatickou koncentrací HDL-C a rizikem vzniku aterosklerotického kardiovaskulárního onemocnění (AKO) u člověka. Existují také důkazy, že HDL zabraňuje rozvoji aterosklerózy u lidí i zvířat. HDL brání vzniku AKO prostřednictvím reverzního transportu cholesterolu (RTC), což je transport cholesterolu z periferních tkání do jater (Liao a kol., 2007).

### **2.2.2.1 *Struktura a metabolismus HDL částic***

HDL je částice s vysokým obsahem cholesterolu, která na rozdíl od ostatních LP neobsahuje apoB. Skládá se z 1) povrchové monovrstvy obsahující apo, PL a volný cholesterol (FC) a z 2) hydrofobního jádra, které obsahuje neutrální lipidy (CE a TG) (Obr. 2). Více než 50% hmotnosti HDL částice tvoří apo, ze kterých 90% činí apoA-I a malé množství apoA-II. Zbytek tvoří ostatní apo jejichž složení je proměnné (Rader a kol., 2006).

Zásadní roli v reverzním transportu cholesterolu má vývojový cyklus částic HDL. Tyto částice slouží jako univerzální akceptor cholesterolu z buněk, a tím udržují homeostázu cholesterolu v buňkách. Důležitou složkou HDL částic jsou enzymy a proteiny zprostředkující výměnu lipidů mezi lipoproteiny: PLTP (phospholipid transfer protein), umožňující přenos PL mezi jednotlivými lipoproteiny, LCAT, katalyzující esterifikaci FC, CETP (cholesterolestertransferprotein), umožňující vzájemnou výměnu nepolárních lipidů mezi jednotlivými lipoproteiny. Dále nesou HDL částice také enzymy s antioxidačními účinky, jako je PAF-AH (platelet-activating

factor-acetyl hydrolase), paraoxonasa 1 (PON1) a glutathionselenoperoxidasa (GSPx). Antioxidační aktivitu vykazují také LCAT a další proteiny a peptidy, jako je například sérový amyloid A - hlavní pozitivní reaktant akutní fáze nebo  $\alpha$ -1-antitrypsin – potenciální inhibitor serinové proteasy. Prostřednictvím těchto antioxidačních enzymů jsou schopny HDL chránit lipidovou i proteinovou složku LDL před oxidací a bránit akumulaci produktů oxidace v LDL (Králová Lesná a kol., 2006; Kontush, Chapman, 2006).



**Obr. 2:** Složení HDL částice (Forti, Diament, 2006).

#### 2.2.2.2 Reverzní transport cholesterolu

Reverzní transport cholesterolu (obr. 3) je fyziologický antiaterogenní proces, prostřednictvím kterého je cholesterol z periferních tkání transportován HDL částicemi do jater a steroidogenních orgánů, kde je využit pro syntézu LP, žlučových kyselin, vitamínu D a steroidních hormonů. Většina periferních buněk nemá schopnost katabolizovat cholesterol a proto jej pouze vylučují do extracelulárního prostoru, kde jej přijímají extracelulární akceptory, jakými jsou HDL částice (Rader a kol., 2006; von Eckardstein a kol., 2001).

Reverzní transport cholesterolu lze rozdělit do pěti kroků:

1. Intracelulární transport cholesterolu k buněčné membráně.
2. Transport cholesterolu přes buněčnou membránu do extracelulárního prostoru a jeho navázání na HDL částici.
3. Funkční změna HDL částice esterifikací FC účinkem LCAT a přesun těchto nepolárních esterů dovnitř částice HDL.

4. Působením CETP je část cholesterolu z HDL vyměněna za TG chylomikronů a VLDL.
5. HDL částice obsahující CE jsou vychytány v játrech a pomocí specifických receptorů je cholesterol přenesen do hepatocytů.

Narušení kteréhokoliv z těchto kroků může vést ke snížení RTC. CE je v cytoplazmě buňky uchovávan ve formě kapének. Jejich hydrolýzou pomocí cholesterylesterhydrolasy je zahájen RTC. Vzniklý FC je následně transportován k buněčné membráně (Králová Lesná a kol., 2006).

Transport FC přes buněčnou membránu se uskutečňuje třemi různými mechanismy – aktivně přes ABC receptory (A1, G1, G4) a následným navázáním na vhodný akceptor, pasivně přes jaterní receptory SR-BI (scavenger receptor B type I) a prostou difuzí (Rader a kol., 2006).

Transport FC a PL z buňky přes cytoplazmatickou membránu a jejich navázání na apoA-I umožňuje receptor ABCA1 (kasetový transportér spojený s ATP, ATP-binding cassette transporter). Tento děj vyžaduje ATP jako zdroj energie (Liao a kol., 2007; Cuchel, Rader, 2006; Králová Lesná a kol., 2006).

Mutace na obou alelách ABCA1 způsobuje absenci funkčního receptoru ABCA1 u pacientů s tangierskou nemocí. Tato mutace vede k intracelulární kumulaci lipidů. ABCA1 hraje také zásadní roli v ochraně před akumulací cholesterolu v cévní stěně (Rader a kol., 2006).

Nově vzniklé tzv. nascentní HDL částice mají diskoidní tvar a pocházejí z jater a tenkého střeva. Nascentní HDL částice přijímají FC z jiných LP a také z buněčných membrán. FC je následně esterifikován za katalýzy LCAT a jeho kofaktorem apoA-I. Takto z polární molekuly FC na povrchu částice vznikají hydrofobní estery, které se přesouvají do jádra částice HDL a vzniká tak částice HDL<sub>3</sub> (Králová Lesná a kol., 2006).

Aktivní transport cholesterolu na zralé částice HDL zahajují i další receptory z rodin receptorů ABC – tzv. ABCG1 a ABCG4. Na rozdíl od ABCA1, který reaguje s částicemi obsahujícími apoA-I a pouze malé nebo žádné množství lipidů, receptory ABCG1 a ABCG4 předávají buněčný cholesterol na zralé částice HDL<sub>2</sub> nebo HDL<sub>3</sub> (Wang a kol., 2004). ABCG1 jsou přítomny zejména na makrofázích a byl prokázán jejich vliv na patogenezi aterosklerózy. Receptory ABCG4 jsou přítomny především

---

v mozku, v malé míře také na makrofázích.

SR-BI jsou povrchové receptory HDL částic, které umožňují obousměrný tok cholesterolu uvnitř a vně buněk. Nejvíce exprimovány jsou v játrech a ve steroidogenních orgánech. Tyto receptory jsou pravděpodobně zodpovědné za přeměnu monocytů na makrofágy a následnou přeměnu makrofágů na pěnové buňky. SR-BI receptory mohou vázat i jiné ligandy než HDL, např. VLDL, LDL a oxidované LDL (oxLDL) a mají tedy proaterogenní účinky, zároveň se ale účastní RTC a umožňují eflux intracelulárního cholesterolu z pěnových buněk na HDL a mají i protiaaterogenní účinky. Inaktivace SR-BI vede ke snížení RTC a zvýšení koncentrace HDL cholesterolu v plazmě.

Část cholesterolu je schopna se uvolnit z buněk i prostou difuzí. Stejně jako v případě SR-BI se přesun cholesterolu uskutečňuje pouze ve směru koncentračního spádu (Králová Lesná a kol., 2006; Trigatti a kol., 1999).

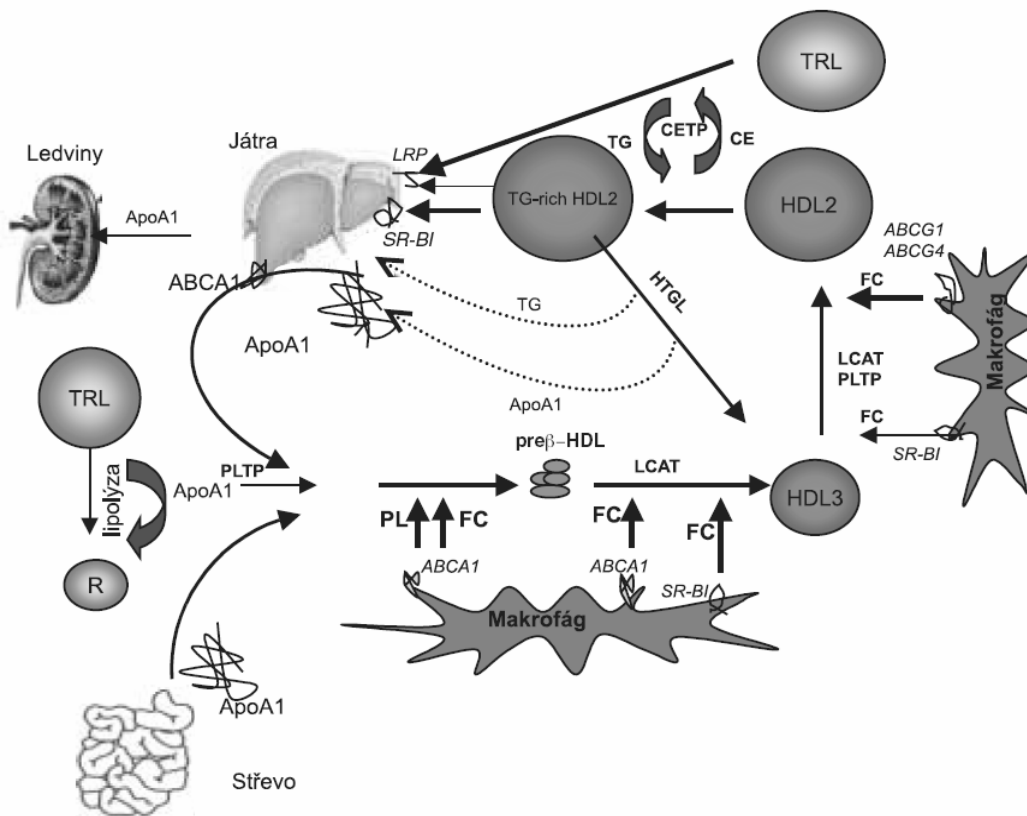
Částice HDL<sub>3</sub> je dále v intravaskulárním prostoru obohacována o cholesterol a PL uvolněné hydrolýzou TG z VLDL a chylomikronů (označovaných jako triglyceride-rich lipoproteins, TRL). Ty jsou přenášeny prostřednictvím PLTP a vzniká větší částice HDL<sub>2a</sub>. Na částice HDL<sub>2a</sub> jsou dále přenášeny za účinku CETP větší molekuly TG z TRL výměnou za menší molekuly CE, což vede k zvětšování objemu HDL za vzniku částic HDL<sub>2b</sub>. Takto modifikované HDL jsou pak vhodným substrátem pro HL, která hydrolyzuje jejich TG a PL. Z částic HDL<sub>2b</sub> jsou tak zpětně regenerovány HDL<sub>3</sub> (obr. 4). V konečné fázi cyklu částic HDL dochází k jejich delipidaci, a to několika cestami:

Selektivním vychytáváním FC i jeho esterů pomocí jaterního receptoru SR-BI. Takto navázaná částice HDL vstupuje do hepatocytu endocytózou a po odebrání cholesterolu je resekretována ve formě diskovité částice, která je schopna opět na sebe vázat lipidy.

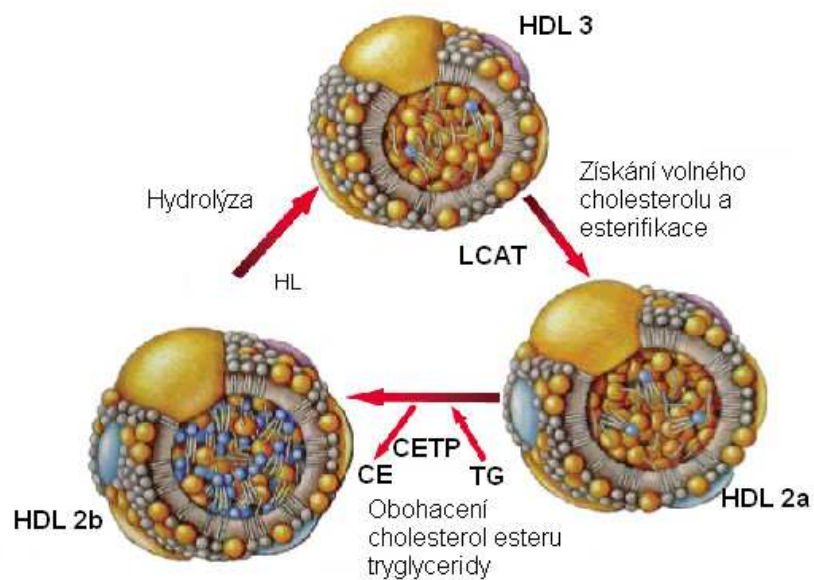
Vychytáváním celých částic zralých HDL pomocí receptoru LRP (protein příbuzný LDL receptoru, LDL-receptor related protein), na který se s vysokou afinitou váže apoprotein E a který může být přítomen na povrchu částic HDL.

Cholesterol, který byl z HDL přenesen na TRL (nesoucí apoB-100 a apoE) je z cirkulace odstraněn s těmito lipoproteiny po jejich vazbě na LRP či LDL - receptor (LDL-R) (Králová Lesná a kol., 2006).





**Obr. 3:** Schematické zobrazení reverzního transportu cholesterolu, HTGL - hepatální triglyceridová lipasa (Králová Lesná a kol., 2006)



**Obr. 4:** Vnitřní konverze mezi HDL<sub>2</sub> a HDL<sub>3</sub> frakcemi. HL = jaterní lipasa; (Forti, Diament, 2006)

## 2.3 Role zánětu a oxidačního stresu v patogenezi aterosklerózy

Nerovnováha mezi cirkulujícími hladinami cholesterolu přenášeného v HDL a v apoB obsahujících částicích je úzce spojená s indukcí endoteliální dysfunkce i oxidačního stresu v arteriální stěně, jejichž výsledkem je zánět. Dyslipidemie, oxidační stres a zánět mají velký vliv na vznik aterosklerózy (Chisolm, Steinberg, 2000).

### 2.3.1 Oxidační stres

Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi prooxidativními a antioxidantními faktory a je základem patofyziologie aterosklerózy a kardiovaskulárního onemocnění. Analýza složení plaku odhalila produkty oxidace proteinů a lipidů. Přednostní zadržování LDL částic v arteriální stěně z nich dělá hlavní substrát pro oxidaci prooxidanty produkovanými buňkami arteriální stěny. K oxidaci LDL částic přispívají různé oxidační systémy. Mezi ty nejdůležitější patří NAD(P)H-oxidasa, xanthinoxidasa, myeloperoxidasa, syntasa oxidu dusnatého (NOS), lipoxygenasy a řetězec mitochondriálního transportu elektronů (Kontush, Chapman, 2006).

### 2.3.2 Zánět

Zánět je systematická odpověď organismu zaměřená na snížení toxicity škodlivých látek a na opravu poškozených tkání. Základním znakem zánětlivé odpovědi je aktivace fagocytů, které produkují reaktivní sloučeniny kyslíku, dusíku a chloru. Lokální a systémové infekce, poranění arteriální stěny a nadměrné zadržování LDL mohou potencovat aktivaci makrofágů v arteriální stěně a produkci prooxidativních látek. Proinflamační stav odpovídá hladině CRP, je vyšší u kuřáků, starších osob a obézních). CRP lze považovat za faktor citlivosti k ateroskleróze (Kontush, Chapman, 2006).

### 2.3.3 LDL, HDL a oxidační stres

Nativní LDL obsahuje pouze jeden neporušený polypeptid apoB-100, žádné peroxidy či aldehydy a je bohatý na polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) a antioxidanty. V závislosti na lipidech v potravě a patologických podmínkách mohou nativní LDL obsahovat i malé množství lipidového peroxidu (LOOH) či další produkty

degradace. Tyto LDL jsou pak náchylnější k oxidaci. Při menší oxidaci vznikají mírně oxidované LDL, u kterých nedochází ke změnám na ApoB-100, ale pouze k oxidaci lipidů a snížení množství PUFA a antioxidantů. Při větší míře oxidace vznikají značně oxidované LDL, u kterých je apoB-100 degradován, mastné kyseliny jsou kompletně oxidovány na LOOH a je velmi snížený obsah antioxidantů. Velkou oxidací vznikají modifikované LDL, které neobsahují PUFA ani antioxidanty. V cirkulaci se tyto částice nevyskytují vůbec, nebo jsou rychle odstraněny játry (Parthasarathy, 1999).

Oxidované LDL vznikají oxidací konjugovaných dvojných vazeb v mastných kyselinách působením volných kyslíkových radikálů. Oxidace LDL pozitivně koreluje s obsahem polynenasycených mastných kyselin (PUFA) a naopak negativně s obsahem mononenasycených kyselin v lipoproteinových částicích, a dále s obsahem ubichinolu (koenzym Q<sub>10</sub>) a FC. Ubichinol inhibuje časné stadium oxidace LDL a je významný jako první antioxidant, které vylučuje volné radikály.

Volný cholesterol snižuje fluiditu povrchu částic a brzdí tak difuzi volných radikálů do nitra částice. Naopak urychlení oxidace způsobují Cu, Fe, Ni, Cd, dále nedostatek Mg a světlo. Oxidace LDL částic se pravděpodobně neděje v krevní plazmě, ale ve stěně arterií, kde může dojít snadněji k oxidačnímu stresu (Masopust, 1998). Krevní plazma obsahuje hodně antioxidantů i látky vážající kovové ionty potřebné k Fentonově reakci, při které vzniká z peroxidu vodíku v přítomnosti iontů některých kovů vysoce reaktivní hydroxylový radikál se silnými oxidačními účinky (Racek, Holeček, 1999).

Oxidované LDL vykazují prozáněťovou, imunogenní, apoptotickou a cytotoxickou aktivitu. Jsou pohlcovány makrofágy, ve kterých se hromadí. Na rozdíl od LDL jsou oxLDL přijímány makrofágy pomocí receptorů, které nejsou down-regulovány nadbytkem ligandu. Toto vede ke vzniku cholesterolem naplněných pěnových buněk. Prozáněťlivé účinky oxLDL zahrnují chemoatrakci cirkulujících monocytů, indukci exprese adhezivních molekul v endoteliálních buňkách, podněcování diferenciaci monocytů v makrofágy, indukci produkce a uvolňování prozáněťlivých cytokinů a chemokinů z makrofágů a inhibici motility (hybnosti) makrofágů (Chisolm, Steinberg, 2000).

Naproti tomu HDL částice se vyznačují širokým spektrem antiaterogenních účinků zahrnujícím 1) reverzní transport cholesterolu, 2) ochranu LDL částic před

oxidací, 3) protizánětlivé účinky v arteriální stěně, 4) antiapoptotické účinky, 5) vasodilatační účinky, 6) antitrombotické účinky a 7) antiinfekční aktivitu (Kontush, Chapman, 2006).

K ochraně LDL před oxidací slouží také řada antioxidantů. Mezi ně patří například vitamin E (vit E), či koenzym Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>).

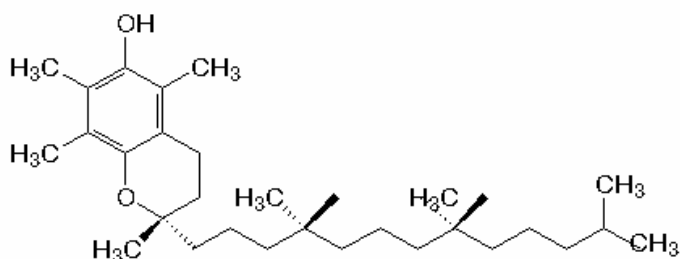
## 2.3.4 Antioxidanty

### 2.3.4.1 Vitamin E

Pod pojmem vit E rozumíme skupinu několika v přírodě se vyskytujících látek:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferolů a tokotrienolů.  $\alpha$ -Tokoferol se v přírodě vyskytuje ve formě d- $\alpha$ -tokoferolu a vyznačuje se nejvyšší biologickou aktivitou (Landvik, 2002).

$\alpha$ -Tokoferol je vzhledem k lipofilnímu charakteru své isoprenové struktury antioxidantem membrán. V plazmě je přítomen ve VLDL a LDL, které chrání proti oxidaci volnými radikály. Ve tkáních chrání především nenasycené mastné kyseliny membránových PL proti oxidačnímu poškození a lipoperoxidaci.  $\alpha$ -Tokoferol reaguje s hydroxylovými, peroxylovými a alkoxylovými radikály a se singletovým kyslíkem. Byla také prokázána schopnost vit E inhibovat proliferaci buněk hladké svaloviny vyvolanou LDL částicemi, a to přes inhibici aktivity proteinkinasy C (Kartal a kol., 2003; Kand'ár, Žáková, 2007).

Snížené hladiny vit E mohou posílit imunitní reakci. Vit E dále reguluje agregaci krevních destiček inhibicí produkce prostaglandinu (tromboxanu), funkci mitochondrií, metabolismus nukleových kyselin a proteinů a produkci hormonů. Chrání také vitamin A před destrukcí a vytváří zásobu selenu (Landvik, 2002).



Obr. 5: Vzorec vitaminu E

### 2.3.4.2 Koenzym $Q_{10}$

Koenzym  $Q_{10}$  je látka lipofilního charakteru patřící mezi ubichinony, což jsou látky složené ze substituovaného benzochinonového jádra a postranního izoprenového řetězce. Jeho chemický název je 2,3-dimetoxy-5-methyl-6-dekaprenyl-1,4-benzochinon (Vokurka, Hugo, 2004).

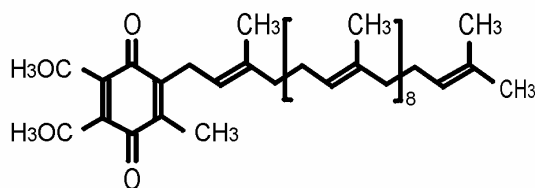
Koenzym  $Q_{10}$  se vyskytuje ve všech tkáních lidského organismu i v krvi, a to v oxidované či redukované formě. Kromě jeho koncentrace je tedy důležitý také jeho redoxní stav. Ve většině tkání kromě mozku a plic převládá redukovaná forma.

V krvi je  $CoQ_{10}$  díky jeho lipofilnímu charakteru transportován v lipoproteinech (60% v LDL, 25% v HDL a 15% v ostatních LP). Do krve se dostává jak endogenní, tak exogenní  $CoQ_{10}$  z potravy.

Hlavní funkci plní  $CoQ_{10}$  v respiračním mitochondriálním řetězci, kde se podílí na produkci ATP.  $CoQ_{10}$  zde slouží jako přenašeč elektronů získaných z primárních substrátů a zároveň se podílí na přenosu protonů z matrix mitochondrií vně vnitřní membrány.  $CoQ_{10}$  přenáší elektrony z komplexu I (NADH-ubichinonreduktasa) a komplexu II (sukcinátubichinonreduktasa) na komplex III (ubichinol-cytochrom-c-reduktasa).

Koenzym  $Q_{10}$  má také antioxidační účinky a působí především v buněčných membránách a krevních lipoproteinech. Ubichinol-10 reaguje s volnými radikály, dochází k jeho oxidaci nejprve na semiubichinon a následně až na ubichinon-10. Mezi enzymy nezbytné pro zpětnou redukci  $CoQ_{10}$  na účinný  $CoQ_{10}H_2$  patří cytozolická NADH- $CoQ$ -dependentní-reduktasa, NADH/NADPH-oxidoreduktasa (DT-diaphorasa) a NADH-cytochrom-b5-reduktasa (Crane, 2001).

Koenzym  $Q_{10}$  dokáže (na rozdíl od vit E) zasahovat nejen do propagace, ale také do iniciace lipoperoxidace.



**Obr. 6:** Vzorec koenzymu  $Q_{10}$

## 2.4 Aminothioly

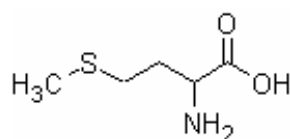
Aminothioly jsou látky, pro které je charakteristická –S–H skupina, pouze methionin je tvořen –S–CH<sub>3</sub> skupinou. Thiolová skupina je důležitým mezním intracelulárním a extracelulárním redukčním pufrem, který snadno podléhá oxidaci a tvorbě disulfidů (–S–S– vazby) (Nolin a kol. 2007).

Lze je rozdělit na vysokomolekulární bílkovinné thioly (např. protein-homocystein) a nízkomolekulární volné thioly (cystein, homocystein a jejich disulfidy) (Bald a kol., 2004). V biologických tekutinách se vyskytují v různých formách, tj. redukované, oxidované nebo vázané na krevní bílkoviny. V plazmě se váží především na albumin (Zima, 2002).

### 2.4.1 Význam jednotlivých aminothioly

#### 2.4.1.1 Methionin

Methionin (Met) se do organismu dostává v bílkovinách obsažených v potravě. Může být opět využit jako stavební jednotka bílkovin, jako iniciátor proteosyntézy, nebo se může spojit s energeticky bohatým adenosintrifosfátem a vytvořit univerzální methylační koenzym S-adenosylmethionin. U jedinců se vzácnou genetickou poruchou metabolismu Met dochází ke zvýšení hladiny Hcy a k rozvoji aterosklerózy v cévním systému (Ridker a kol., 2004).

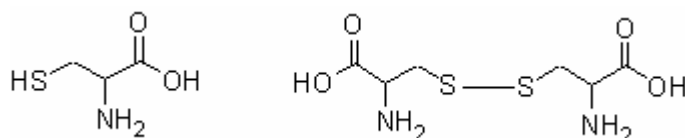


Obr 7: Vzorec methioninu

#### 2.4.1.2 Cystein

Stejně jako methionin i cystein (Cys) přichází do těla spolu s potravou a slouží také jako stavební jednotka bílkovin. Lidský organismus však vyžaduje přesně řízenou tvorbu Cys z Hcy, a tím nepřímo z Met. Pro syntézu Cys z Hcy je nutný enzym cystathionin-β-syntasa (CBS), který aktivuje sloučení Hcy se serinem za vzniku cystathioninu. Jeho rozštěpením vzniknou Cys a homoserin (Přistoupilová, Přistoupil, 2002). Bylo zjištěno, že zvýšené hladiny Cys v plazmě vytváří oxidační prostředí

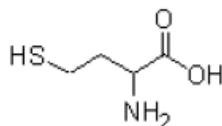
a zvyšují tedy náchylnost k cévnímu poškození (Mills a kol., 2000). Reakcí dvou Cys vzniká disulfid cystin (Obr. 8). Při poruchách metabolismu Cys může docházet k jeho hromadění, a to může být příčinou cystinurie. Koncentrace celkového Cys v séru je u zdravých lidí okolo 250  $\mu\text{mol/l}$  (Ueland a kol., 2006).



**Obr. 8:** Vzorec cysteinu a cystinu

### 2.4.1.3 Homocystein

Homocystein je neesenciální sírná aminokyselina, která je meziproduktem metabolismu Met. Prekurzorem pro jeho vznik je S-adenosylmethionin (Hultberg a kol., 1995; Žáková, Kand'ár 2006).



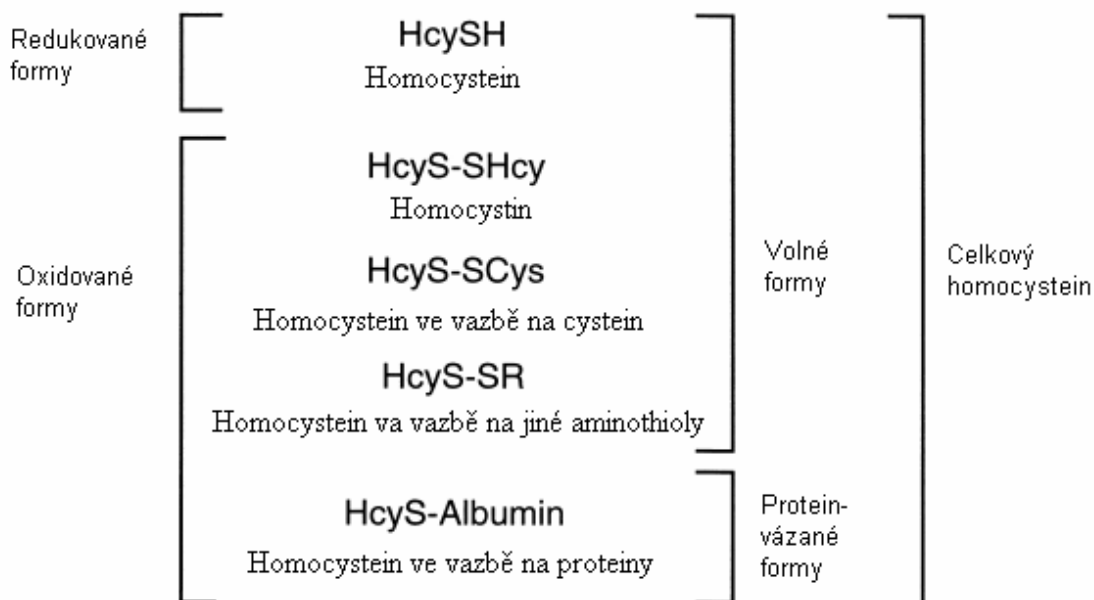
**Obr. 9:** Vzorec homocysteinu

Vysoké hladiny Hcy jsou všeobecně považovány za rizikový faktor aterogeneze a trombogeneze (Andersson a kol., 1993)

Homocystein v plazmě existuje v mnoha formách. 70% Hcy se v plazmě vyskytuje ve vazbě na albumin. Zbývajících 30% nacházíme ve formě volných disulfidů, nejčastěji je to smíšený disulfid Hcy-Cys. Obě frakce – volný Hcy i ten vázaný na proteiny zahrnujeme pod pojem celkový Hcy (tHcy). Dále rozlišujeme Hcy redukovaný (tedy Hcy jako takový) a oxidovaný vazbou na protein, další molekulu Hcy nebo jiného aminothioly za vzniku disulfidu (Nygård a kol., 1999) (Obr. 10). Analogicky dělíme i ostatní aminothioly.

Homocystein je strukturně podobný Cys: stejně jako Cys obsahuje -SH skupinu, má však delší alifatický řetězec obsahující jeden uhlíkový atom navíc. Chemické vlastnosti jsou u Hcy a Cys také podobné, obě aminokyseliny jsou schopné tvořit disulfidické můstky s jinými molekulami obsahujícími koncovou -SH skupinu. Takovouto molekulou může být např. další Hcy, Cys či diaminokyseliny jako je

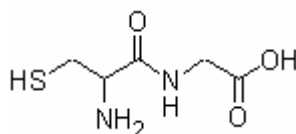
cysteinyl-glycin (Cys-gly). Vytvořením disulfidického můstku mezi dvěma Hcy vzniká molekula zvaná homocystin. V jiném případě se vzniklé molekuly obecně nazývají směsné disulfidy. Na rozdíl od Cys, se však Hcy nepodílí na stavbě proteinů a jako takový nemá strukturní funkci (Žák, 2001).



**Obr. 10:** *Různé formy homocysteinu v krvi, upraveno do češtiny podle Nygård a kol., (1999)*

#### 2.4.1.4 Cysteinyl-glycin

Cysteinyl-glycin je metabolit glutathionu a spolu s ním může mít antioxidační vlastnosti. V lidské plazmě patří k nejhojnějším aminothiolum. Plazmatická koncentrace Cys-gly se pohybuje okolo 30 $\mu$ mol/l (Ueland a kol., 1996).



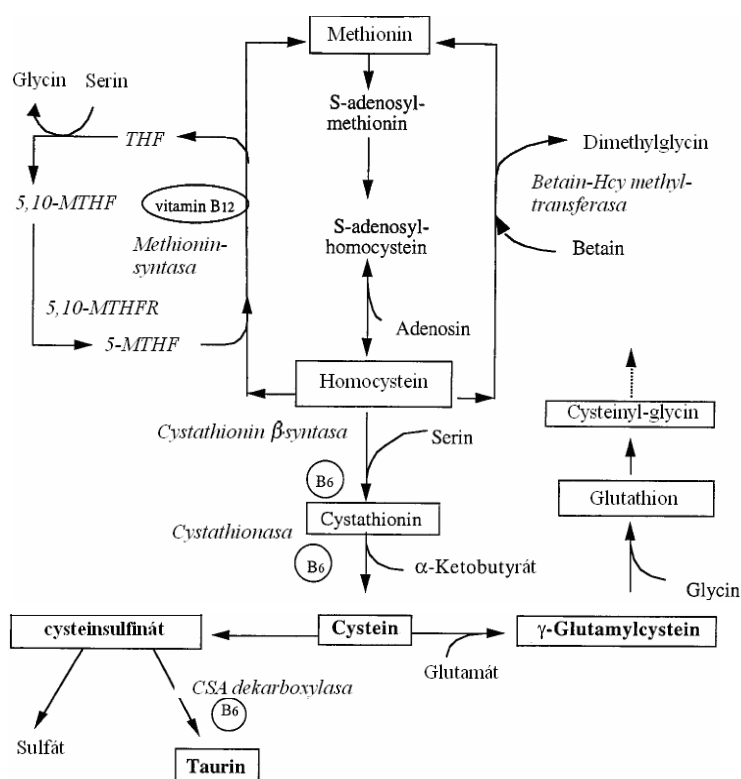
**Obr. 11:** *Vzorec cysteinyl-glycinu*



## 2.4.2 Metabolismus homocysteinu a dalších aminosí

Homocystein hraje zásadní roli v buněčném metabolismu a to konkrétně ve dvou procesech: metabolismus Met, tzv. remetylační dráha a biosyntéza Cys, tzv. transsulfurační dráha. Hcy je spojovacím bodem obou těchto drah. Vzniká jako meziproduct remetylačního cyklu, který se nachází v cytoplazmě (De Caterina a kol., 2004). V tomto cyklu je Hcy přeměněn na Met. Reakce vyžaduje kyselinu listovou (folát) a vitamin B12 (kyankobalamin), či betain v alternativní cestě, jako kofaktory (Andersson a kol., 1993). Transsulfurační dráha je závislá na přítomnosti pyridoxal-5'-fosfátu (PLP). V reakci kondenzuje Hcy se serinem na cystathionin.

Významný podíl Met je aktivován v přítomnosti ATP za vzniku S-adenosylmethioninu (SAM), v reakci katalyzované methioninkinasou. Molekula SAM slouží jako univerzální donor methylových skupin pro celou řadu akceptorů (fosfatidyletanolamin, guanidoacetát, dopamin, proteiny, DNA, RNA). Jako vedlejší produkt demetylace SAM vzniká S-adenosylhomocystein, který je hydrolyzován na adenosin a Hcy, v reakci katalyzované S-adenosylhomocysteinhydrolasou (Obr. 12) (Žák, 2001).



**Obr. 12:** Metabolismus aminosí, upraveno do češtiny podle Suliman a kol. (1999)  
 THF- tetrahydrofolát; 5,10-MTH -5,10-methyltetrahydrofolát; 5-MTH -5-methyltetrahydrofolát; 5,10-MTHFR-5,10-methyltetrahydrofolátreduktasa

#### 2.4.2.1 *Enzymy účastnící se metabolismu aminothiólů a jejich poruchy*

Cystathionin- $\beta$ -syntasa katalyzuje kondenzaci Hcy a serinu a je zodpovědná za katabolismus přibližně poloviny z celkového množství Hcy produkovaného v remetylačním cyklu. Kofaktorem CBS je PLP (De Caterina a kol. 2004). Defekt CBS blokuje kondenzaci Hcy a serinu, což způsobuje sníženou koncentraci cystathioninu a hromadění Hcy, ale také homocystinu a Met v tkáních (McCully, 1969). Vzniká onemocnění zvané homocystinurie. Onemocnění může postihnout cévní systém (dochází k časnému vzniku aterosklerotického plátu), centrální nervovou soustavu (mentální retardace, psychózy, deprese, epilepsie, defekty neurální trubice) a pojivovou tkáň (*Ectopia lentis*, osteoporóza).

Druhým typem enzymatické poruchy je kvalitativní nebo kvantitativní změna enzymu 5,10-MTHFR. Ta katalyzuje transformaci Met na Hcy a zpět, při které je methylová skupina přenášena z/na 5,10-MTH. Tento defekt způsobuje hyperhomocysteinémií (hHcy) - Hcy se hromadí v krvi a cévní endothel je vystaven jeho toxickým účinkům, dochází k urychlenému vzniku aterosklerózy (De Caterina a kol., 2004).

Mezi další významné defekty enzymů methioninového cyklu patří například defekt methioninsyntasy a methioninsyntasareduktasy. Všechny tyto poruchy souvisí s rizikem vzniku AKO.

#### 2.4.2.2 *Volné aminothioly*

Volná frakce aminothiólů zahrnuje všechny frakce vyjma aminothiólů vázaných na proteiny. Protože Hcy a další aminothioly asociované s proteiny pravděpodobně nejsou biologicky aktivní, volné formy (redukované i oxidované) hrají nejspíš hlavní roli v patogenezi aterosklerózy. Jelikož dochází k rozsáhlé interkonverzi mezi jednotlivými metabolity aminothiólů, pro zjištění jejich biologické funkce je zapotřebí jejich simultánní stanovení (Bayle a kol., 2004).

### 2.4.3 **Hyperhomocysteinémie**

Homocystein je ve vyváženém rytmu buď přeměněn na Met, nebo je degradován na Cys. Pokud se rytmus naruší, začne se Hcy hromadit, a tím se naruší průběh všech návazných pochodů (Přistoupilová, Přistoupil, 2002). Asi 50 % Hcy je remetylováno na

Met. Pokud je příjem proteinů či Met nadměrný, větší podíl Hcy je katabolizován transsulfurační cestou. Při zvýšené tvorbě Hcy v porovnání s jeho spotřebou dochází k exkreci Hcy z buněk, což detekujeme jako zvýšenou hladinu Hcy v plazmě, séru či moči (Nygård a kol., 1999).

Fyziologické koncentrace tHcy v plazmě nalačno se pohybují v rozmezí od 5,0 do 15,9  $\mu\text{mol/l}$ . V případě, že je koncentrace vyšší, mluvíme o hyperhomocysteinémii (hHcy). Rozlišujeme tři stupně: mírná hHcy s hodnotami od 16,0 do 30,0  $\mu\text{mol/l}$ . Středně těžká hHcy má horní hranici 100,0  $\mu\text{mol/l}$  a těžká hHcy se pohybuje nad touto koncentrací (De Caterina, 2004).

Hyperhomocysteinémie je významný na lipidech nezávislý rizikový faktor AKO (Liao a kol., 2007). Na manifestaci hHcy se podílejí zpravidla interakce exogenních faktorů s endogenními činiteli. Mezi exogenní příčiny patří nadměrný přívod živočišných bílkovin, snížený příjem folátů z potravy, nedostatečný přívod kobalaminu, pyridoxinu a cholinu, které jsou kofaktory remetylačních a transsulfuračních pochodů a celá řada dalších faktorů. Mezi endogenními příčinami dominují genetické odchylky, či chorobné stavy. Hyperhomocysteinémie může být důsledkem zvýšené tvorby nebo zpomaleného odbourávání Hcy v transsulfurační či remetylační cestě (Ridker a kol., 2004; Žák, 2001).

#### **2.4.3.1 *Hyperhomocysteinémie a riziko kardiovaskulárních onemocnění***

I když je toxické působení Hcy opakovaně prokazováno a přítomnost hHcy u cévních onemocnění respektována, stále není jednotný názor na to, zda je hHcy příčina nebo jen následek aterosklerotických cévních změn (Hyánek a kol., 1997).

V mnohých studiích byl prokázán vztah mezi hladinou celkového Hcy a kardiovaskulárním onemocněním koronárních i periferních tepen, mozkovou mrtvicí, žilní trombózou a cévními chorobami. Hyperhomocysteinémie je zároveň prediktorem ischemické choroby srdeční (ICHS) (Liao a kol., 2007).

Z populačního hlediska lze hHcy přisoudit 10 % rizika pro vznik ICHS. Zvýšení koncentrace Hcy o každých 5  $\mu\text{mol/l}$  představuje zvýšení rizika ICHS, které je ekvivalentní nárůstu celkového cholesterolu v plazmě o 0,52 mmol/l, což činí zhruba vzestup rizika ICHS o 20 % .

Na rozdíl od slabé asociace mezi hHcy a AKO, zjištěné u zdravých osob,

sledování nemocných s ICHS, systémovým lupus erythematoses, s renálním selháním, s DM či tromboembolickou nemocí prokázalo, že hHcy je u těchto osob velmi silným prediktorem vzniku AKO (Žák, 2001; Boushey a kol., 1995).

#### 2.4.3.2 *Léčba hyperhomocysteinémie*

Hyperhomocysteinémie jako rizikový faktor aterosklerózy je významným stimulem pro studium vlivu folátu, vitaminů B<sub>12</sub> a B<sub>6</sub> a také betainu na metabolismus Hcy (Nygård a kol., 1999; Bostom a kol., 1995). Terapie založená na roli těchto vitaminů v metabolismu Hcy je popsána v mnoha publikacích.

Bylo například zjištěno, že zvýšený příjem folátu v potravě redukuje hladinu Hcy cca o 25% a doplnění vitamínu B<sub>12</sub> snižuje hladinu o dalších 7%. Důkazy o tom, že snížení hladiny Hcy prostřednictvím folátu a vitamínu B<sub>12</sub> vede ke snížení rizika vzniku AKO však stále chybí (Ridker a kol. 2004; Bostom a kol., 1995; Woodside a kol., 1998). Podobné výsledky byly zjištěny v mnoha dalších studiích (Lobo a kol., 1999; Heijer a kol., 1998; Saw a kol., 2001; McKinley a kol., 2001)

Další studie ukázala, že folát snižuje hladinu Hcy nalačno, ale vitamin B<sub>12</sub> účinkoval pouze u subjektů s deficitem tohoto vitamínu. Vitamin B<sub>6</sub> neměl na hladiny Hcy nalačno žádný vliv, ale bylo pozorováno snížení koncentrace Hcy po zátěži methioninem. Účinky betainu nejsou zatím příliš prozkoumané (Ueland a kol., 1993; Nygård a kol., 1999).

Ridker a kol. zkoumali vliv statinů na hladinu LDL-C a Hcy a pozorovali malé snížení koncentrace Hcy při léčbě lovastatinem (Ridker a kol., 2002).

Woodside a kol. (1998) studovali vliv suplementace antioxidantů na hladiny Hcy. Mezi kyselinou askorbovou,  $\alpha$ -tokoferolem,  $\beta$ -karotenem, pyridoxal-5'-fosfátem a Hcy však nebyla zjištěna žádná korelace.

Bylo zjištěno, že N-acetylcystein (NAC) ruší disulfidické vazby v Lp(a) a mezi Hcy a plazmovými proteiny. Wiklund a kol. (1995) se zaměřili na studium možnosti snížení hladiny Lp(a) a Hcy prostřednictvím tohoto mechanismu. Výsledkem studie bylo zjištění, že hladiny Lp(a) nebyly výrazně sníženy účinkem léčby NAC, ale hladiny Hcy, Cys a Cys-gly významně poklesly.

Spencer a kol. (2004) popisují snížení homocysteinem indukované endoteliální dysfunkce v artériích prasat účinkem estrogenu.

## 2.4.4 Možné mechanismy patologického účinku homocysteinu

**Poškození cévního endotelu** – především volnými radikály, které se tvoří během autooxidace Hcy. Dochází k aktivaci krevních destiček a k jejich akumulaci v místě poškození. Poškozený endotel navíc tvoří oxidy dusíku a prostaglandiny, zvyšuje sekreci koagulačních faktorů, adhezních molekul a cytokinů (Welch, Loscalzo, 1998).

**Poškození antikoagulační funkce** – antitrombogenní rovnováhu mění v trombogenní, pravděpodobně zvýšením aktivity srážecích faktorů V a XII a snížením aktivace proteinu C. Je zde také možný vliv Hcy na Lp(a), který inhibuje fibrinolytický systém díky své analogii s plazminogenem (Nygård a kol., 1999; Ridker a kol., 2004, Welch, Loscalzo, 1998; Žák, 2001)

**Změny oxidoredukční rovnováhy** – při autooxidaci Hcy dochází k oxidaci vysoce reaktivní thiolové skupiny v molekule Hcy a k intenzivní tvorbě peroxidu vodíku, superoxidu a hydroxylových radikálů, což má za následek peroxidaci lipidů (především aterogenních LDL částic) a oxidační stres (Welch, Loscalzo, 1998; Namekata a kol., 2004).

**Podpora proliferace buněk hladké svaloviny** – nadbytek Hcy může stimulovat buněčnou proliferaci a syntézu kolagenu a podporovat tak zužování intima-media (Majors a kol.; Tsai a kol., 2004).

**Aterogenní účinky** – metabolická konverze Hcy na Hcy-thiolakton, chemicky reaktivní metabolit, který thioluje LDL a tím urychluje internalizaci LDL na membránový receptor. Zvyšuje se tak fagocytóza a akumulace cholesterolu uvnitř makrofágů. Aterogenní účinky Hcy se mohou projevit také po interakci s ionty mědi, což vede ke vzniku oxidačního stresu (Žák, 2001; Welch, Loscalzo, 1998; Carru a kol., 2004).

**Interakce homocysteinu s LDL a HDL** – může docházet ke vzniku homocystamidu-LDL (Hcy-LDL) a Hcy tak může zvyšovat aterogenicitu lipoproteinů (Ferretti a kol., 2006). Bylo zjištěno, že Hcy tlumí tvorbu a funkci HDL částic (Liao a kol., 2007).

**Nitrosylace Hcy** - Je možné, že Hcy snižuje expresi antioxidantních enzymů nitrosylací, vazbou na NO a tvorbou Hcy-NO. Toto je rozhodující, vzhledem k faktu, že NO působí nejen jako vazodilatátor, ale také zabraňuje agregaci destiček, proliferaci a migraci cévních buněk, adhezi monocytů a expresi adhezivních molekul, které mají důležité uplatnění v procesu aterotrombózy (Liao a kol., 2007).

## 2.4.5 Onemocnění spojená s hyperhomocysteinémií

Fyziologické rozmezí hladiny tHcy je ovlivnitelné mnohými faktory. Zvýšené koncentrace tHcy jsou běžně zjišťovány u pacientů s chronickým onemocněním ledvin. Epidemiologické studie odhalily inverzní korelaci mezi mírou glomerulární filtrace a koncentrací Hcy (Sjöberg a kol., 2006).

Pacienti se zhoršenou funkcí ledvin a hemodialyzovaní pacienti často inklinují ke zvýšeným hodnotám některých aminothiolů (Hultberg a kol., 1995; Wollesen a kol., 1990; Bosotm a kol., 1995; Sjöberg a kol., 2006; Williams a kol., 2001).

Zkoumá se také asociace mezi hHcy a DM, který je důležitým rizikovým faktorem pro předčasný vznik aterosklerózy (Huijberts a kol., 2005). V předešlých studiích jsme naměřili statisticky významně zvýšené hladiny nejen Hcy, ale také Cys a Cys-gly u pacientů s DM (Jelínková, 2008). Názory na hladiny aminothiolů u diabetiků se však různí. Většina studií poukazuje na hHcy u diabetiků (Huijberts a kol., 2005; Buyschaert a kol., 2000; Ndrepepa a kol., 2008). Ta by mohla přispívat k rozvoji chronických komplikací a být spojená s vyšší dispozicí k nefropatii a makroangiopatii (Buyschaert a kol., 2000; Hultberg a kol. 1991). Jiné studie však zjistily jak nezměněné (Atabek a kol., 2006), tak i snížené hladiny Hcy (Mazza a kol., 2005; Wollesen a kol. 1990; Bosotm a kol., 1995). Hladinu Hcy u diabetiků ovlivňuje mnoho faktorů jako je hyperfiltrace, renální dysfunkce a některé vitaminy (Huijberts a kol., 2005).

Mezi další choroby, u nichž se zkoumá jejich možná souvislost s hHcy patří lymfoblastická leukémie, psoriáza, hypothyroidismus, hyperinzulinémie a mikroalbuminurie (Nygård a kol., 1999).

## 2.5 Souvislosti v metabolismu lipoproteinů a aminothiolů a patogenezi aterosklerózy

### 2.5.1 Vztah mezi lipoproteinem(a) a thioly

Bylo zjištěno, že aminothioly mohou zvyšovat vazbu Lp(a) na fibrin a potencovat tak jeho protrombotický účinek. Zvýšené hladiny Lp(a) a Hcy se objevují u aterosklerotických komplikací více než v přítomnosti každého faktoru zvláště (Foody a kol. 2000).

Hcy a další thioley (Cys, glutathion, N-acetylcystein) mohou oddělit apo(a) od Lp(a) tím, že redukuje vazbu mezi ApoB-100 a apo(a). Dojde tak k vystavení dalších lysin vazebných míst na apo(a). Ty mohou následně zvýšit afinitu apo(a) k fibrinu a tím zpomalit fibrinolýzu. Je možné, že již při koncentraci Hcy okolo 8  $\mu\text{mol/l}$  dochází k významnému zvýšení afinity mezi Lp(a) a fibrinem (Racek a kol., 2004, Foody a kol., 2000; Harpel a kol., 1999)

### 2.5.2 Vztah mezi hyperhomocysteinémií a metabolismem lipidů

Klinické studie pacientů s AKO, infarktem myokardu (IM) a hyperlipidemických pacientů odhalily negativní korelaci mezi koncentrací Hcy v plazmě a HDL-C (Stampfer a kol., 1992; Qujeq a kol., 2001, Glueck a kol., 1995). Byla také zjištěna nepřímá korelace mezi hladinami HDL-C, apoA-I a Hcy.

U hHcy myši byly objeveny tři mechanismy, kterými by Hcy mohl tlumit biosyntézu HDL a jejich funkci: 1) Inhibice syntézy a sekrece apoA-I v játrech. Protože apoA-I je kofaktorem LCAT, je možné, že nižší koncentrace apoA-I vede ke snížení hladiny a substrátové reaktivity LCAT a dále k inhibici maturace HDL. 2) Zvýšením clearance HDL up-regulací jaterního receptoru SR-BI, který je hlavním receptorem pro vychytávání HDL-CE. 3) Inhibice funkce HDL a efluxu cholesterolu, což následně snižuje syntézu HDL (Liao a kol., 2007).

Liao a kol. (2007) dále při studiu hHcy myši zjistili, že při zvýšené hladině Hcy dochází k inhibici transkripce a translace apoA-I a k výrazné redukci syntézy nových apoA-I proteinů bez ovlivnění jejich degradace.

Mnoho studií potvrdilo změny koncentrací cholesterolu, TG a VLDL v plazmě u CBS-deficientních myši-homozygotů, u kterých se projevuje hHcy (Liao a kol., 2006; Namekata a kol., 2004; Woo a kol., 2005; Wang a kol., 2003). Je možné, že Hcy způsobuje dysregulaci metabolismu sterolů navozením endoplasmatického retikulárního stresu, a tím dochází k akumulaci cholesterolu a TG v játrech (Werstuck a kol., 2001).

Některé studie poukazují na význam apoA-I, který je klíčovou složkou biosyntézy HDL. Bylo zjištěno, že apoA-I chrání před vznikem předčasné aterosklerózy a má tedy antiaterogenní účinky (Sorci-Thomas a kol., 1988; Rubin a kol., 1991).

Namekata a kol. (2004) také pozorovali abnormální metabolismus lipidů u hHcy

myší. Hladiny TG, LDL a neesterifikovaných mastných kyselin byly výrazně zvýšené, aktivita thiolasy, hlavního enzymu  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a LCAT byla snížena stejně jako hladiny PL a HDL v séru. Navíc byly v séru nalezeny abnormální částice HDL s vyšší mobilitou v polyakrylamidovém elektroforetickém gelu.

Liao a kol. při studiu metabolismu lipidů u hHcy homozygotních myší s deficitem CBS a apoE pozorovali celou řadu souvislostí v metabolismu lipidů a Hcy. Hladiny TC, FC, PL a non-HDL-C byly zvýšené, koncentrace HDL-C a apoA-I byla naopak snížena. Dále byla pozorována redukce velikosti a koncentrace HDL částic a naopak zvýšená velikost VLDL částic. Byl také snížen eflux cholesterolu do plazmy, zrychlená clearance HDL-CE (ne však HDL proteinu) a zvýšená koncentrace jaterního receptoru SR-BI.

### **2.5.3 Vztah mezi antioxidačními enzymy HDL částic a aterosklerózou**

Na antioxidační a tedy i antiaterogenní aktivitu HDL částic mají vliv výše zmíněné enzymy, které jsou součástí HDL (kapitola 2.2.2.1). U zvířat byla prokázána schopnost enzymu PON1 zmírňovat rozvoj aterosklerotických lézí, která souvisí s antioxidační aktivitou tohoto enzymu. Bylo také zjištěno, že HDL částice s nedostatkem PON1 jsou přeměněny na prooxidační a prozánětlivý komplex (Deakin a kol., 2007).

HDL částice podporují sekreci PON1 v játrech. PON1 je považována za enzym schopný chránit LDL i HDL částice před oxidací. Tato fakta svědčí o existenci pozitivní asociace mezi koncentrací a aktivitou PON1 a koncentrací HDL-C a ApoA-I. Inhibice oxidace lipoproteinů spočívá v hydrolyze LOOH a cholesteryl linoleát peroxidu v oxidovaných HDL. Dále hydrolyzuje peroxid vodíku, oxidované LDL-TG s krátkým řetězcem a reaktivní sloučeniny kyslíku produkované v oxidačním stresu během aterogeneze (Aviram a kol., 1998).

PON1 nepůsobí v plazmě pouze jako peroxidasa, ale také jako laktonasa. Katalyzuje hydrolyzu různých laktonů včetně Hcy-thiolaktonu a chrání tak proteiny před homocysteinylací. Paraoxonasa 1 jako součást HDL částice navíc zvyšuje eflux cholesterolu z makrofágů zvýšením vazby HDL prostřednictvím ABCA1 (Blatter Garin a kol., 2006; Kontush, Chapman, 2006).

PAF-AH a LCAT mohou také hydrolyzovat oxidované LDL-TG s krátkým



řetězcem. GSPx je enzym schopný redukovat LOOH na odpovídající hydroxidy a tím je detoxifikovat.

Bylo zjištěno, že v případě zánětu, metabolického onemocnění spojeného se snížením hladiny HDL (DM 2. typu, metabolický syndrom) a předčasného AKO dochází ke snížení funkce a/nebo k vyčerpání PON1, PAF-AH a LCAT. Snížení aktivity PON1 v akutní fázi je pravděpodobně způsobeno jejím nahrazením za sérový amyloid A. K inaktivaci PON1 může dojít také v důsledku oxidace nebo glykace. Tuto teorii podporuje skutečnost, že snížené koncentrace PON1 v séru nacházíme u pacientů s onemocněními, pro která je typický zánět a oxidační stres (metabolický syndrom, diabetes mellitus 1. a 2. typu, familiární hypercholesterolemie). Aktivita PON1 se dále snižuje s věkem. Snížená aktivita PAF-AH byla také pozorována u pacientů s hypercholesterolémií (Kontush, Chapman, 2006).

### 3 Experimentální část

Pro stanovení aminothiolů a vit E jsme použili metodu HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED). Ostatní analyty jsme stanovovali spektrofotometricky.

#### 3.1 Charakteristika souboru pacientů

Ve vzorcích pacientů praktických lékařů města Nový Jičín jsme stanovili hladiny celkových aminothiolů (Cys, Hcy, Cys-gly) a Met, vit E, TC, HDL-C, LDL-C, TG, glukózy (glc), kyseliny močové, močoviny, kreatininu, albuminu (Alb), celkové bílkoviny (CB) a ApoA-I. Všechny naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze č. 1 – 5. U všech zúčastněných pacientů bylo prokázáno AKO a před odběrem jim byl předložen informovaný souhlas k podpisu (příloha č.13). Informace o souboru pacientů jsou uvedeny v tabulce 2. Krev byla odebrána do odběrových zkumavek a centrifugována. Po separaci bylo sérum zamraženo na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Tab. 2:** Charakteristika skupiny mužů a žen v souboru pacientů

	Muži	Ženy	P (t-test)
Věk	67,5 (49-79)	78,9 (58-90)	0,0004
BMI kg/m <sup>2</sup>	28,48 ± 2,49	28,55 ± 4,26	0,9504
BMI 22-30	12 (75 %)	13 (68,4 %)	
BMI 30-40	4 (25 %)	6 (31,6 %)	
BMI nad 40	0	0	
DM	0	8 (42,11%)	0,0020
AH	11 (68,75 %)	17 (89,47%)	0,1508
Kuřáci	1 (6,25 %)	0	0,1587
Exkuřáci	6 (37,5 %)	2 (10,53 %)	
DLP	4 (25 %)	4 (21,05 %)	0,7906
Ledvinné onemocnění	1 (6,25 %)	0	
IM	10 (62,5 %)	10 (52,63 %)	0,5694
CMP	0	2 (10,53 %)	0,1628
Poz. koronarografie	3 (18,75 %)	0	0,0825
ICHS	4 (25 %)	10 (52,63 %)	0,2117
Statiny	4 (25 %)	4 (21,05 %)	0,7906

## 3.2 Stanovení aminioliů pomocí HPLC-ED

Metodou iontově párové HPLC v systému obrácených fází s ED na principu coulometrie jsme stanovili celkové aminioliy. Tato metoda umožňuje simultánní stanovení aminioliů. Ke stanovení celkových aminioliů se využívá při přípravě vzorku redukční krok, při kterém se aminioliy uvolní z vazby na bílkoviny a deproteinační krok pro vysrážení bílkovin.

### 3.2.2 Použité chemikálie

DL-homocystein ( $C_4H_{10}NO_2S$ , 95 %, Mr 135,20) p.a. (Sigma, Německo)

L-cystein ( $C_3H_7NO_2S$ , Mr 121,16) p.a. (Sigma, Německo)

L-metionin ( $C_5H_{11}NO_2S$ , 98 %, Mr 149,20) p.a. (Sigma, Německo)

cysteinyl-glycin ( $C_5H_{10}N_2O_3S$ , 85 %, Mr 178,20) p.a. (Sigma, Německo)

L-penicilamin [ $(CH_3)_2C(SH)CH(NH_2)CO_2H$ , 99 %] p.a. (Sigma, Německo)

1,4-dithioerythritol ( $C_4H_{10}O_2S_2$ , 99 %, Mr 154,25) p.a. (Sigma, Německo)

dihydrogenfosforečnan sodný ( $NaH_2PO_4$ , 99 %, Mr 120) p.a. (Sigma, Německo)

oktan-1-sulfonan sodný monohydrát ( $C_8H_{17}NaO_3S \cdot H_2O$ , HPLC grade, Mr 234,29) p.a. (Scharlau, Španělsko)

acetonitril ( $CH_3CN$ , 99 %, gradient grade, Mr 41,05) p.a. (Merk, Německo)

kyselina sulfosalicylová ( $C_7H_6O_6 \cdot 2H_2O$ , 99 %, Mr 254,20) p.a. (Sigma, Německo)

kyselina trihydrogenfosforečná ( $H_3PO_4$ , 85 %, Mr 98,00) p.a. (Sigma, Německo)

kyselina chlorovodíková (HCl, 36,6 %, Mr 36,46) p.a. (Sigma, Německo)

kyselina boritá ( $H_3BO_3$ ,  $\geq 99,5\%$ , Mr 61,8 ) p.a. (Sigma, Německo)

hydroxid sodný (NaOH,  $\geq 98\%$ , Mr 40) p.a. (Sigma, Německo)

deionizovaná voda ( $G < 0,1 \mu S$ )

### 3.2.3 Přístroje a pomůcky

elektrochemický detektor Coulochem II 5200 (ESA, USA), pracovní elektroda – porézní uhlíková, referenční elektroda –  $\alpha$ -hydrogen paladiová

analytická cela, model 5010 (ESA, USA)

ochranná cela, model 5020 (ESA, USA)

autosampler (ESA 542, USA)

vysokotlaké analytické čerpadlo LC-10AD VP (Shimadzu, Japonsko)

chromatografická kolona HR-80 (RP-C18) 80 x 4,6 mm, 3 $\mu$ m (ESA, USA)

termostat kolony CTO-10AC (Shimadzu, Japonsko)

vyhodnocovací software CLARITY (Data Apex s. r. o., ČR)

tabulkový procesor Microsoft Excel (Windows, USA)

analytické váhy LB – 1052/2 (Laberte, Maďarsko)

předvážky p3/200 (CHIRANA, ČR)

pH metr Gryf 208, elektroda THETA, typ: HC 113

ultrazvuková vana K2 (Kraintek, Slovensko)

ultrazvuková vana K12 (Kraintek, Slovensko)

třepačka Heindolph Reax top (Heindolph, Německo)

chlazená odstředivka Jouan 23i (Jouan SA, Francie)

termoblok Isotemp 145 D (Fischer Scientific, Kanada)

hlubokomrazící box MDF-U3086S (Sanyo electric, Japonsko)

filtrační aparatura (Supelco, USA)

nylonové filtry (Nylon 66) 0,2  $\mu$ m x 47 mm (Supelco, USA)

nylonové filtry (N-4-2) 0,25  $\mu$ m x 4 mm (Supelco, USA)

mikrozkmavky s nylonovým filtrem Spin-X<sup>®</sup> Centrifuge Tube Filter, 0,22  $\mu$ m Nylon (Corning, USA)

automatické pipety (Biohit, Finsko)

špičky různých objemů pro automatické pipety

mikrozkumavky Eppendorf

odměrné laboratorní sklo kategorie A a B

vakuové zkumavky, 9 ml, K<sub>3</sub>EDTA plasma (Vacuette<sup>®</sup>, Německo)

vakuové zkumavky, 4 ml, K<sub>3</sub>EDTA plasma (Vacuette<sup>®</sup>, Německo)

vakuové zkumavky, 8 ml, z serum sep. clot activator (Vacuette<sup>®</sup>, Německo)

### 3.2.4 Chromatografická analýza aminothiолů

#### 3.2.4.1 Složení a příprava mobilní fáze

- 20 mmol/l dihydrogenfosforečnan sodný (pufr)
- 10 mmol/l oktan-1-sulfonan sodný monohydrát (protiiont)
- 5 % acetonitril
- pH = 2, 82

Navážku 7,1998 g dihydrogenfosforečnanu sodného a 7,0287 g oktan-1-sulfonanu sodného monohydrátu jsme rozpustili v 2,85 l deionizované vody. Po dokonalém rozpuštění jsme přidali 0,15 l acetonitrilu a pH upravili na hodnotu 2,82 pomocí 85% kyseliny trihydrogenfosforečné. Takto připravenou MF jsme přefiltrovali přes nylonový filtr (Nylon 66) o velikosti pórů 0,2 μm x 47 mm a odvzdušnili 60 minut na ultrazvuku.

#### 3.2.4.2 Podmínky separace

Přefiltrovaný supernatant byl dávkován na kolonu pomocí autosampleru ESA 542. Dávkovaný objem pro analýzu byl 5 μl pro celkové a 15 μl pro volné aminothioly. Na koloně byla udržována teplota 25°C a průtok mobilní fáze 1 ml/min. Pro ustavení rovnováhy na koloně jsme před vlastní analýzou nechali protékat mobilní fází přes kolonu 20 hodin. Vlastní analýza jednoho vzorku trvala cca 25 minut. Po analýze jsme systém proplachovali přefiltrovanou a odvzdušněnou deionizovanou vodou asi 15 minut. Následně jsme provedli třicetiminutový proplach směsí acetonitril : deionizovaná voda (1 : 1).

### 3.2.4.3 *Nastavení elektrochemického detektoru Coulochem II*

Ochranná cela: **napětí 850 mV**

Analytická cela (Tab. 3)

**Tab. 3:** *Nastavení detektoru pro celkové aminothioly*

	kanál 1	kanál 2
Napětí [mV]	450	750
Citlivost [ $\mu$ A]	10	<b>5</b> , v čase 0,1-5,4 min - <b>100</b>
Výstupní napětí [V]	1	1

### 3.2.4.4 *Úprava vody pro HPLC analýzu*

Veškerou vodu používanou pro HPLC-ED analýzu jsme před použitím přečistili přes kolonku plněnou C18. Důvodem byla snaha o odstranění organických látek, které vznikají jako produkty metabolické aktivity mikroorganismů přítomných ve vodě. Tyto látky se mohou postupně zachycovat na koloně a po určité době může dojít k jejich náhlému vyplavování během analýz a mohou tak rušit stanovení.

### 3.2.4.5 *Identifikace píků*

Pro identifikaci látek ve vorku jsme nejprve analyzovali směs standardů jednotlivých aminothiolů, zjistili jejich retenční časy a ty poté srovnávali s retenčními časy ve vzorku.

### 3.2.4.6 *Kvantifikace*

Pro kvantifikaci aminothiolů byla použita metoda kalibrační přímky. Kalibrační přímku jsme sestavili z deseti standardů o různých koncentracích. K jejímu sestavení jsme použili předem připravené směsné kalibrační roztoky, ze kterých jsme dalším ředěním získali standardy aminothiolů o požadované koncentraci.

### 3.2.5 Stanovení celkových aminioliů

#### 3.2.5.1 *Roztoky připravované do spotřebování zásob*

- **Zásobní roztok kyseliny sulfosalicylové (15%)**

Roztok jsme připravili rozpuštěním navážky 15g kyseliny sulfosalicylové ve 100 ml deionizované vody.

- **Zásobní roztok 10 mmol/l kyseliny chlorovodíkové**

Do odměrné baňky o objemu 25 ml jsme napipetovali 21  $\mu$ l 36,6% HCl a doplnili po rysku deionizovanou vodou.

- **Zásobní roztok vnitřního standardu penicilaminu o koncentraci 25 mmol/l**

Roztok jsme připravili rozpuštěním navážky 0,0373 g PNC v 10 ml 10 mmol/l HCl.

- **Zásobní roztok 1,4-dithioerythritolu o koncentraci 200 mmol/l**

Roztok jsme připravili rozpuštěním navážky 0,1543 g DTE v 5 ml deionizované vody.

- **Zásobní roztok homocysteinu o koncentraci 2000  $\mu$ mol/l**

Roztok jsme připravili rozpuštěním navážky 0,0136 g standardu Hcy v malém množství deionizované vody a doplnili na objem 50 ml.

- **Zásobní roztok cysteinu o koncentraci 2000  $\mu$ mol/l**

Roztok jsme připravili rozpuštěním navážky 0,0121 g standardu Cys v malém množství deionizované vody a doplnili na objem 50 ml.

- **Zásobní roztok cysteinyl-glycinu o koncentraci 2000  $\mu$ mol/l**

Roztok jsme připravili rozpuštěním navážky 0,0178 g standardu Cys-gly v malém množství deionizované vody a doplnili na objem 50 ml.

- **Zásobní roztok methioninu o koncentraci 2000  $\mu$ mol/l**

Roztok jsme připravili rozpuštěním navážky 0,0104 g standardu Met v malém množství deionizované vody a doplnili na objem 35 ml.

Všechny připravené roztoky jsme rozdělili do mikrozkuavek Eppendorf a uchovávali při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.5.2 *Roztoky připravované pro každou sérii čerstvé*

Tyto zásobní roztoky jsme uchovávali při teplotě  $4^{\circ}\text{C}$  a připravovali je zvlášť před každým měřením.

- **Pracovní roztok**

Roztok jsme připravili smícháním  $250\ \mu\text{l}$   $0,2\ \text{mol/l}$  DTE,  $20\ \mu\text{l}$  směsi (připravené smícháním  $800\ \mu\text{l}$   $10\ \text{mmol/l}$  HCl +  $200\ \mu\text{l}$   $25\ \text{mmol/l}$  penicilaminu) a  $5\ \text{ml}$  deonizované vody.

- **Směsný kalibrační roztok**

Zásobní roztoky aminothiolů jsme naředili na koncentrace uvedené v tabulce 4. Směsný kalibrační roztok jsme připravili smícháním naředěných zásobních roztoků Hcy, Cys, Cys-gly a Met v poměru 1:1:1:1.

**Tab. 4:** *Koncentrace Cys, Hcy, Cys-gly a Met v zásobním roztoku*

Hcy	$500\ \mu\text{mol/l}$
Cys	$2000\ \mu\text{mol/l}$
Cys-gly	$500\ \mu\text{mol/l}$
Met	$500\ \mu\text{mol/l}$

Z každého zásobního roztoku jsme odpipetovali  $1,25\ \text{ml}$ . Takto jsme připravili  $5\ \text{ml}$  směsného kalibračního roztoku, který jsme následně naředili na jednotlivé standardy o známých koncentracích pro sestavení kalibrační křivky (Tab. 5).

**Tab. 5:** *Koncentrace Cys, Hcy, Cys-gly a Met ve směsném kalibračním roztoku*

Hcy	$500\ \mu\text{mol/l}$
Cys	$2000\ \mu\text{mol/l}$
Cys-gly	$500\ \mu\text{mol/l}$
Met	$500\ \mu\text{mol/l}$



### 3.2.5.3 Příprava vzorku pro analýzu celkových aminioliů

Ke 400  $\mu\text{l}$  plazmy jsme přidali 100  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku pro celkové aminiolioly. Po promíchání a 15 minutové redukci při 37°C v termobloku jsme provedli deproteinaci přidáním 100  $\mu\text{l}$  vychlazené 15 % kyseliny sulfosalicylové. Vzorek jsme promíchali a inkubovali 15 minut při 4°C. Takto zredukovanou a deproteinovanou plazmu jsme odstředili (22000 G, 10 minut, 4°C). Supernatant jsme před nástřikem na kolonu přefiltrovali pomocí mikrozkuumavek s nylonovým filtrem o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$  a přepipetovali do vialek pro automatický dávkovač vzorků.

Standard jsme připravili stejně jako vzorek, jen po přidavku SS nedošlo k deproteinaci a tudíž jsme vzorek ihned přefiltrovali přes nylonový filtr do vialek.

### 3.2.5.4 Kalibrace pro stanovení celkových aminioliů

Koncentrace celkových aminioliů v jednotlivých kalibračních roztocích jsou uvedeny v tabulce 6.

**Tab. 6:** Koncentrace Cys, Hcy, Cys-gly a Met v jednotlivých kalibračních roztocích

	Objem [ $\mu\text{l}$ ]		Koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]			
	Směsný kalibrační roztok	voda	Cys	Hcy	Cys-gly	Met
1	1000	0	500	125	125	125
2	800	200	400	100	100	100
3	500	500	250	62,5	62,5	62,5
4	400	600	200	50	50	50
5	300	700	150	37,5	37,5	37,5
6	200	800	100	25	25	25
7	100	900	50	12,5	12,5	12,5
8	75	925	37,5	9,375	9,375	9,375
9	50	950	25	6,25	6,25	6,25
10	25	975	12,5	3,125	3,125	3,125

Rovnice kalibračních přímků jsme získali proložením závislosti poměru plocha píku ku koncentrace standardu metodou nejmenších čtverců. Využili jsme I.S., jehož plochou píku jsme podělili plochy všech standardů a analyzovaných látek.

### 3.2.6 Stanovení volných aminioliů

#### 3.2.6.1 *Roztoky používané pro analýzu volných aminioliů*

- **Pracovní roztok pro volné (nevázané na bílkoviny) aminioliy**

Roztok jsme připravili smícháním 400  $\mu$ l 200  $\mu$ mol/l penicilaminu a 4,6 ml 15% SS.

- **Zásobní roztok NaOH o koncentraci 3 mol/l**

Roztok jsme připravili rozpuštěním navážky 1,2 g NaOH v 10 ml deonizované vody.

- **Zásobní roztok HCl o koncentraci 5 mmol/l**

Roztok jsme připravili smícháním 925  $\mu$ l deonizované vody a 675  $\mu$ l 36,6 % HCl.

- **Kyselina boritá o koncentraci 1 mol/l**

Roztok jsme připravili rozpuštěním navážky 0,62 g kyseliny borité v 10 ml deonizované vody.

- **Směsný kalibrační roztok**

Zásobní roztoky aminioliů jsme naředili na koncentrace uvedené v tabulce 7. Směsný kalibrační roztok jsme připravili smícháním naředěných zásobních roztoků Hcy, Cys, Cys-gly a Met v poměru 1:1:1:1.

**Tab. 7:** *Koncentrace Cys, Hcy, Cys-gly a Met v zásobním roztoku*

Hcy	200 $\mu$ mol/l
Cys	500 $\mu$ mol/l
Cys-gly	200 $\mu$ mol/l
Met	500 $\mu$ mol/l

Z každého zásobního roztoku jsme odpipetovali 1,25 ml. Takto jsme připravili 5 ml směsného kalibračního roztoku, který jsme následně rozředili na jednotlivé standardy o známých koncentracích pro sestavení kalibrační křivky (Tab. 8).

**Tab. 8:** *Koncentrace Cys, Hcy, Cys-gly a Met ve směsném kalibračním roztoku*

Hcy	50 $\mu\text{mol/l}$
Cys	125 $\mu\text{mol/l}$
Cys-gly	50 $\mu\text{mol/l}$
Met	125 $\mu\text{mol/l}$

### 3.2.6.2 Příprava vzorku plazmy pro analýzu volných aminioliů

Ke 400  $\mu\text{l}$  plazmy jsme přidali 100  $\mu\text{l}$  vychlazeného pracovního roztoku pro volné aminioliy. Po promíchání jsme vzorek nechali stát 15 minut při 4  $^{\circ}\text{C}$ , přičemž došlo k deproteinaci vzorku. Deproteinovanou plazmu jsme odstředili (22000 G, 10 minut, 4  $^{\circ}\text{C}$ ). Poté jsme ke vzorku přidali 14,5  $\mu\text{l}$  3 mol/l NaOH a 42  $\mu\text{l}$  1 mol/l kyseliny borité. Získali jsme tak neutrální pH vzorku, při kterém je možné provést redukci látek ve vzorku. Vzorek jsme zredukovali přídavkem 6,5  $\mu\text{l}$  0,2 mol/l DTE. Nakonec jsme přidali 6,5  $\mu\text{l}$  5 mol/l HCl. Vzorek jsme před nástřikem na kolonu přefiltrovali pomocí mikrozkuumavek s nylonovým filtrem o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$  a přepipetovali do vialek pro automatický dávkovač vzorků.

### 3.2.6.3 Kalibrace pro stanovení volných aminioliů

Koncentrace volných aminioliů v jednotlivých kalibračních roztocích jsou uvedeny v tabulce 9.

**Tab. 9:** *Koncentrace Cys, Hcy, Cys-gly a Met v jednotlivých kalibračních roztocích*

	Objem [ $\mu\text{l}$ ]		Koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]	
	Směsný kalibrační roztok	Voda	Cys + Met	Hcy + Cys-gly
1	400	600	50	20
2	100	900	12,5	5
3	50	950	6,25	2,5
4	25	975	3,125	1,25
5	10	990	1,25	0,5

Rovnice kalibračních přímek jsme získali proložením závislosti poměru plocha píku ku koncentrace standardu metodou nejmenších čtverců. Využili jsme I.S., jehož plochou píku jsme podělili plochy všech standardů a analyzovaných látek.

### 3.3 Stanovení vitamínu E pomocí HPLC-ED

Před stanovením  $\alpha$ -tokoferolu metodou HPLC-ED jsme ho předně extrahovali do n-hexanu. Po odpaření n-hexanu v atmosféře dusíku, jsme odparek rozpustili v methanolu. Separaci jsme prováděli izokraticky za použití kolony. Jako vnitřní standard jsme použili  $\delta$ -tokoferol.

#### 3.3.1 Použité chemikálie

methanol gradient ( $\text{CH}_4\text{O}$ , Mr 32,04) (Merck, Německo)

2-propanol ( $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ , Mr 60,10) (Merck, Německo)

kyselina octová ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ , Mr 60,05) (Sigma, Německo)

octan sodný ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ , Mr 82,03) (Sigma, Německo)

ethanol gradient ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ , Mr 46,07) (Merck, Německo)

$\delta$ -tokoferol ( $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_2$ , Mr 402,65) p.a. (Sigma, Německo)

$\alpha$ -tokoferol ( $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$ , Mr 430,7) p.a. (Sigma, Německo)

hexan ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , Mr 86,18) (Merck, Německo)

deionizovaná voda ( $G < 0,1 \mu\text{S}$ )

#### 3.3.2 Přístroje a pomůcky

elektrochemický detektor Coulochem II 5200 (ESA, USA), pracovní elektroda – porézní uhlíková, referenční elektroda –  $\alpha$ -hydrogen paladiová

analytická cela, model 5010 (ESA, USA)

autosampler (ESA 542, USA)

vysokotlaké analytické čerpadlo LC-10AD VP (Shimadzu, Japonsko)

chromatografická kolona Biospher C18 150 x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$  (Labio, ČR)

termostat kolony CTO-10AC (Shimadzu, Japonsko)

vyhodnocovací software CLARITY (Data Apex s. r. o., ČR)

UV-VIS spektrofotometr (Shimadzu, Japonsko)

termostat pro spektrofotometr TCC – Controller (Shimadzu, Japonsko)

skleněné, křemenné kyvety (délka 1 cm) (Agilent, USA)

další přístroje a pomůcky jsou shodné jako pro stanovení aminothioliů

### 3.3.3 Příprava používaných roztoků

- **Zásobní roztok  $\alpha$ -tokoferolu**

Asi 400 mg standardu  $\alpha$ -tokoferolu jsme rozpustili v 50 ml ethanolu. Roztok byl ve tmě stabilní minimálně tři měsíce při  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- **Pracovní roztok  $\alpha$ -tokoferolu**

Ke 150  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku  $\alpha$ -tokoferolu jsme přidali 5 ml ethanolu. Koncentraci pracovního roztoku  $\alpha$ -tokoferolu jsme ověřili spektrofotometricky při 292 nm a vypočítali pomocí extinkčního koeficientu ( $\epsilon = 248,1 \text{ l mol cm}^{-1}$ ). Z pracovního roztoku jsme dále ethanolem naředili jednotlivé kalibrační body.

- **Zásobní roztok  $\delta$ -tokoferolu**

Asi 400 mg standardu  $\delta$ -tokoferolu jsme rozpustili v 50 ml ethanolu. Roztok byl ve tmě stabilní minimálně tři měsíce při  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- **Pracovní roztok  $\delta$ -tokoferolu**

Zásobní roztok jsme naředili 100x ethanolem. Jeho přibližnou koncentraci jsme ověřili spektrofotometricky a vypočítali pomocí extinkčního koeficientu  $\alpha$ -tokoferolu ( $\epsilon = 248,1 \text{ l mol cm}^{-1}$ ).

### 3.3.4 Příprava vzorků a standardů pro analýzu vitamínu E

Do mikrozkušavek Eppendorf jsme si připravili směs 200  $\mu\text{l}$  vzorku či standardu, 200  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku  $\delta$ -tokoferolu a 600  $\mu\text{l}$  předchlazeného hexanu. Poté jsme mikrozkušavky 15 minut intenzivně třepali na třepačce a následně jsme je odstředili v centrifuze (22000 G, 10 minut,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Po odebrání 500  $\mu\text{l}$  hexanové vrstvy jsme celý postup od přidání 600  $\mu\text{l}$  předchlazeného hexanu zopakovali ještě dvakrát. 1,5 ml hexanové vrstvy jsme odpařili v proudu dusíku a odparek rozpustili v 200  $\mu\text{l}$  methanolu, přefiltrovali přes nylonový filtr 0,22  $\mu\text{m}$  o velikosti pórů 0,25  $\mu\text{m}$  x 4 mm a přepipetovali do vialek pro automatický dávkovač vzorků.

### 3.3.5 Chromatografická analýza vitamínu E

#### 3.3.5.1 Složení a příprava mobilní fáze

- 85 % methanol
- 10 % 2-propanol
- 5 % voda
- 2,5 mmol/l kyselina octová
- 2,5 mmol/l octan sodný

Navážku 21,0797 g octanu sodného jsme rozpustili v 50 ml deionizované vody, přidali 145  $\mu$ l 99 % kyseliny octové. Po dokonalém rozpuštění octanu sodného jsme přidali 850 ml methanolu a 100 ml isopropanolu. Takto připravenou MF jsme přefiltrovali přes nylonový filtr (Nylon 66) o velikosti pórů 0,2  $\mu$ m x 47 mm a odvdušnili 60 minut na ultrazvuku. Voda pro stanovení vit E byla upravena stejným způsobem jako pro stanovení aminothioliů.

#### 3.3.5.2 Podmínky separace

Přefiltrovaný supernatant byl dávkován na kolonu pomocí autosampleru ESA 542. Dávkovaný objem pro analýzu byl 10  $\mu$ l. Na koloně byla udržována teplota 37°C a průtok mobilní fáze 0,6 ml/min. Pro ustavení rovnováhy na koloně jsme před vlastní analýzou nechali protékat mobilní fází přes kolonu 20 hodin. Vlastní analýza jednoho vzorku trvala 25 minut. Po analýze jsme systém proplachovali směsí methanol:přefiltrovaná a odvdušněná deionizovaná voda (50:50) asi 15 minut.

#### 3.3.5.3 Nastavení elektrochemického detektoru Coulochem II

Ochranná cela: **napětí: 850 mV**

Analytická cela (Tab. 10)

**Tab. 10:** Nastavení detektoru pro vit E

	kanál 1	kanál 2
Napětí [mV]	0	600
Citlivost [ $\mu$ A]	10	<b>10</b>
Výstupní napětí [V]	1	1

### 3.3.6 Identifikace píků

Pro identifikaci látek ve vorku jsme nejprve analyzovali směs standardů vit E, zjistili jejich retenční časy a ty poté srovnávali s retenčními časy ve vzorku.

### 3.3.7 Kvantifikace

Pro kvantifikaci vit E byla použita metoda kalibrační přímky. Kalibrační přímku jsme sestavili z šesti standardů o různých koncentracích. K jejímu sestavení jsme použili zásobní roztok, ze kterého jsme dalším ředěním získali standardy vit E o požadované koncentraci (Tab. 11).

#### 3.3.7.1 Kalibrace pro stanovení vit E

Koncentrace vit E v jednotlivých kalibračních roztocích jsou uvedeny v tabulce 11.

**Tab. 11:** Koncentrace vit E v jednotlivých kalibračních roztocích

	Objem pracovního roztoku vit E [ $\mu$ l] (doplněno ethanolem na celkový objem 200 $\mu$ l)	Koncentrace vit E [ $\mu$ mol/l]
1	0	0
2	5	4,7759
3	10	9,5519
4	25	23,8796
5	50	47,7593
6	105	100,294

Rovnice kalibračních přímek jsme získali proložení závislosti poměrů plocha píku ku koncentrace standardu metodou nejmenších čtverců. Využili jsme I.S., jehož plochou píku jsme podělili plochy všech standardů a analyzovaných látek.

### 3.4 Doplnující analýzy

Doplňující analýzy byly provedeny na UV-VIS spektrofotometru (Shimadzu, Japonsko) za použití skleněných nebo křemenných kyvet o délce 1 cm (Agilent, USA).

#### 3.4.1 Stanovení celkového cholesterolu

Stanovení bylo provedeno pomocí soupravy cholesterol 2500 BIO-LA-TEST<sup>®</sup> (Lachema, Česká republika). Cholesterolesterasa katalyzuje hydrolýzu esterů cholesterolu na cholesterol a mastné kyseliny. Cholesterol je působením cholesteroxidasy zoxidován na cholest-4-en-3-on a peroxid vodíku. Peroxid vodíku reaguje s 4-aminoantipyrinem a fenolem za katalýzy křenovou peroxidasou. Oxidovaný chromofor absorbuje při 500 nm a jeho absorbance je přímo úměrná koncentraci TC.

#### 3.4.2 Stanovení močoviny

Stanovení bylo provedeno pomocí soupravy <sup>L</sup>Močovina (BioVendor, Česká republika). Principem metody je specifická hydrolýza močoviny enzymem ureasa na amoniak a oxid uhličitý. Amoniak dále reaguje s 2-oxoglutarátem a NADH+H<sup>+</sup> za vzniku glutamátu a NAD<sup>+</sup>. Měří se úbytek NADH jako pokles absorbance při 340 nm.

#### 3.4.3 Stanovení triglyceridů

Stanovení bylo provedeno pomocí soupravy Triglycerides liquicolor<sup>mono</sup> (Human, Německo). Principem je sled reakcí, kterých se účastní 4 enzymy. V první reakci vznikají z TG působením LPL glycerol a mastné kyseliny. Glycerol poté reaguje s ATP a za katalýzy enzymem glycerolkinasa vzniká glycerol-3-fosfát a ADP. Třetí reakci katalyzuje glycerol-3-fosfát-oxidasa. Glycerol-3-fosfát se oxiduje na dihydroxyacetonfosfát a peroxid vodíku. Poslední reakcí vzniká z peroxidu vodíku, 4-aminoantipyrinu a 4-chlorfenolu za katalýzy enzymem peroxidasa chinonimin a změna absorbance je přímo úměrná množství TG ve vzorku. Měření probíhá při vlnové délce 500 nm.

#### 3.4.4 Stanovení glukózy

Stanovení bylo provedeno pomocí soupravy Glucose God 1500 BIO-LA-TEST<sup>®</sup> (PLIVA - Lachema, Česká republika). Principem metody je oxidace glukózy za



katalýzy enzymem glukózaoxidasa, při které vzniká peroxid vodíku a glukonát. V přítomnosti peroxidasy reaguje peroxid vodíku s 3-methylfenolem a 4-aminofenazonem za vzniku barevného produktu, který absorbuje při 498 nm.

### 3.4.5 Stanovení kreatininu

Činidla potřebná pro provedení stanovení jsme si připravili z vlastních chemikálií. Principem metody je tzv. Jaffého reakce. Metoda je založena na reakci s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí za vzniku žluto-oranžového chromoforu s absorpčním maximem při 492 nm. Nárůst absorbance při 492 nm odpovídá koncentraci kreatininu ve vzorku. Postup upraven dle soupravy kreatinin liquid 500 BIO-LA-TEST® (PLIVA - Lachema, Česká republika).

### 3.4.6 Stanovení kyseliny močové

Stanovení bylo provedeno pomocí soupravy <sup>L</sup>Kyselina močová (BioVendor, Česká republika). Principem reakce je oxidace kyseliny močové na alantoin a peroxid vodíku za katalýzy enzymem urikasa. Peroxid vodíku, 4-aminofenazon a TOOS (N-ethyl-N-(hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidin) tvoří v reakci katalyzované peroxidasou barevný komplex, který absorbuje při 550 nm a jehož intenzita zbarvení je úměrná koncentraci kyseliny močové ve vzorku.

### 3.4.7 Stanovení albuminu

Stanovení bylo provedeno pomocí soupravy Albumin liquid 500 BIO-LA-TEST® (PLIVA - Lachema, Česká republika). Principem metody je reakce s bromkresolovou zelení ve slabě kyselém prostředí za přítomnosti povrchově aktivních látek. Vzniká barevný komplex s absorpčním maximem při 578 nm. Množství komplexu albumin-bromkresolová zeleň je přímo úměrné množství albuminu ve vzorku.

### 3.4.8 Stanovení celkové bílkoviny

Činidla potřebná pro provedení stanovení jsme si připravili z vlastních chemikálií. Principem metody je tzv. Biuretova reakce, při které reagují peptidy v alkalickém prostředí s roztokem měďnaté soli za vzniku barevného komplexu

s absorpčním maximem v rozmezí 520-560 nm. Množství komplexu peptid-měďnatá sůl je přímo úměrné množství celkové bílkoviny ve vzorku. Postup upraven dle soupravy Celková bílkovina 450 liquid 500 BIO-LA-TEST® (PLIVA - Lachema, Česká republika).

### 3.4.9 Stanovení Apolipoproteinu A-I imunochemicky

Stanovení bylo provedeno pomocí soupravy Apolipoprotein A-I (APO A) (BioVendor, Česká republika). Metoda je založená na reakci mezi apoA-I jako antigenu a specifickým antisérem jako protilátkou. Tato reakce vytvoří nerozpustný komplex, produkující zákal, který je fotometricky měřen při 340 nm.

### 3.4.10 Stanovení HDL cholesterolu

Stanovení bylo provedeno pomocí soupravy HDL-C plus Roche/Hitachi 911 (Roche, USA). V prvním kroku jsou HDL částice selektivně chráněny v prostředí dextransulfátu a hořečnatých iontů, aby se neúčastnily reakcí, při kterých je z reakčního prostředí odstraněn cholesterol z LDL, VLDL a chylomikronů. Ve druhém kroku je HDL-C uvolněn z komplexu a stanoven sledem reakcí, popsaných u stanovení TC.

### 3.4.11 Výpočet LDL cholesterolu

Pomocí známého vztahu jsme vypočítali koncentraci LDL-C u jednotlivých pacientů:  $LDL-C = TC - HDL-C - 0,4545 \cdot TG$ .

### 3.4.12 Výpočet indexu aterogenity

Pomocí vztahu dle Klimova jsme vypočítali index aterogenity (IA) u jednotlivých pacientů:  $IA = (TC - HDL-C)/HDL-C$ .

## 3.5 Zpracování výsledků

Ke statistickému zpracování dat jsme použili program MS Excel a program GraphPad Prism 4. Pro porovnání hladin jsme použili Studentův t-test (na hladině významnosti 0,05). Pro zjištění vzájemných korelací jsme využili Spearmanův korelační koeficient (na hladině významnosti 0,05).

## 4 Výsledky

### 4.1 Chromatografická analýza celkových aminioliů

#### 4.1.1 Retenční časy celkových aminioliů

Retenční časy Hcy, Cys, Cys-gly a Met byly srovnatelné ve všech vzorcích i standardech a jsou uvedeny v tabulce 12.

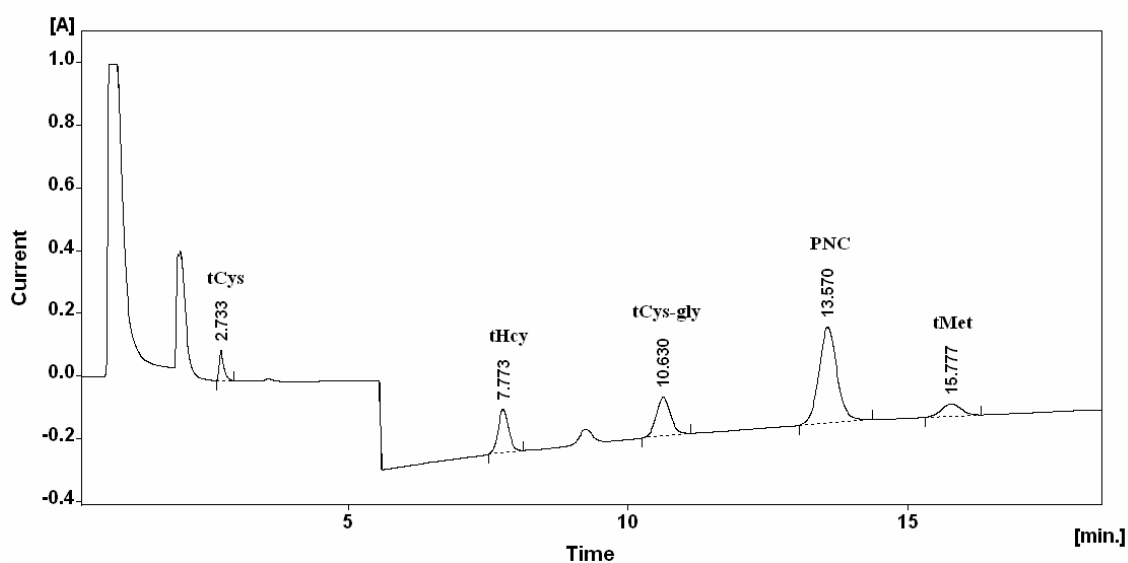
**Tab. 12:** Retenční časy celkových aminioliů (údaje jsou vyjádřeny ve tvaru střední hodnota  $\pm$  SD)

Látka	Retenční čas (min.)
Cystein	2,78 $\pm$ 0,06
Homocystein	7,98 $\pm$ 0,30
Cysteinyl-glycin	10,90 $\pm$ 0,29
Methionin	16,27 $\pm$ 0,70

#### 4.1.2 Chromatografický záznam separace celkových aminioliů

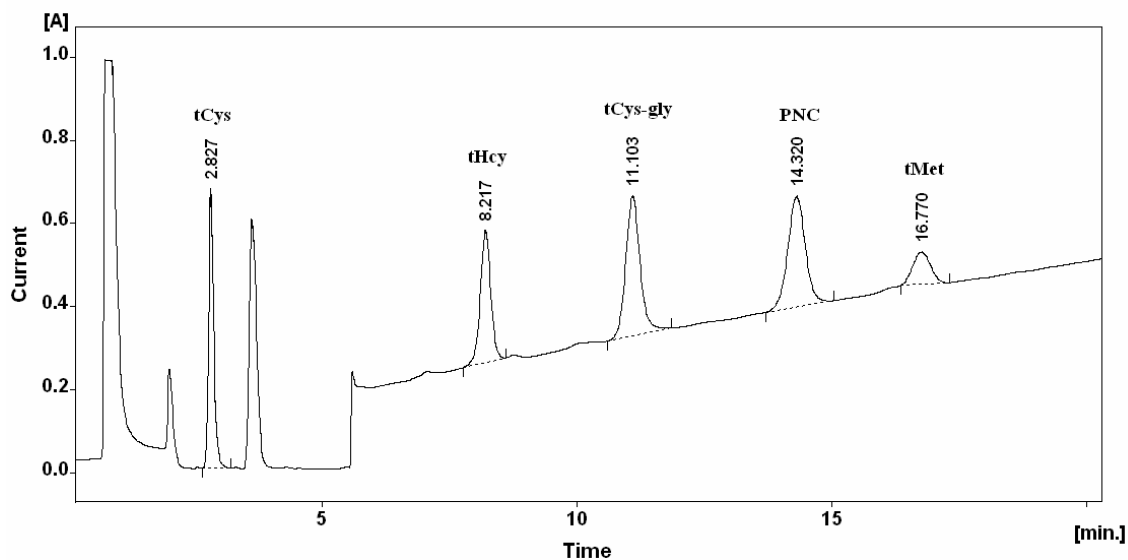
Obrázky 13 – 14 zobrazují chromatografické záznamy separace celkových aminioliů v kalibračním roztoku a ve vzorku séra.

##### A. Záznam kalibračního roztoku



**Obr. 13:** Chromatografický záznam kalibračního roztoku č. 4 (koncentrace jednotlivých aminioliů v  $\mu$ mol/l: Cys 200, Hcy 50, Cys-gly 50, Met 50)

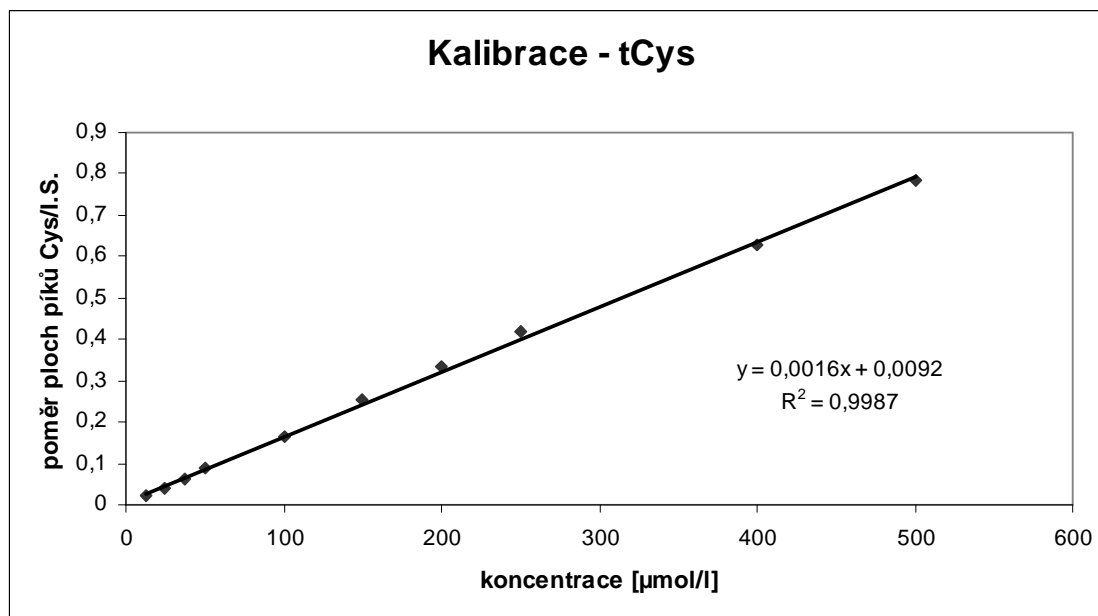
## B. Záznam vzorku



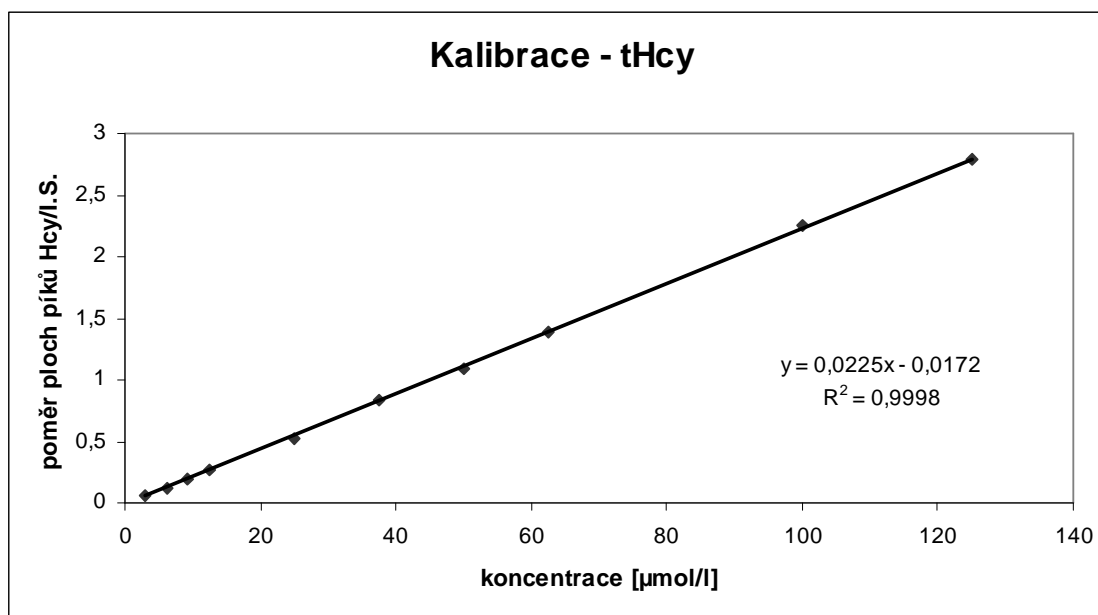
**Obr. 14:** Chromatografický záznam vzorku č. 11 (koncentrace jednotlivých aminothioliů v  $\mu\text{mol/l}$ : Cys 458,40, Hcy 32,55, Cys-gly 37,61, Met 12, 50)

### 4.1.3 Kalibrační křivky celkových aminothioliů

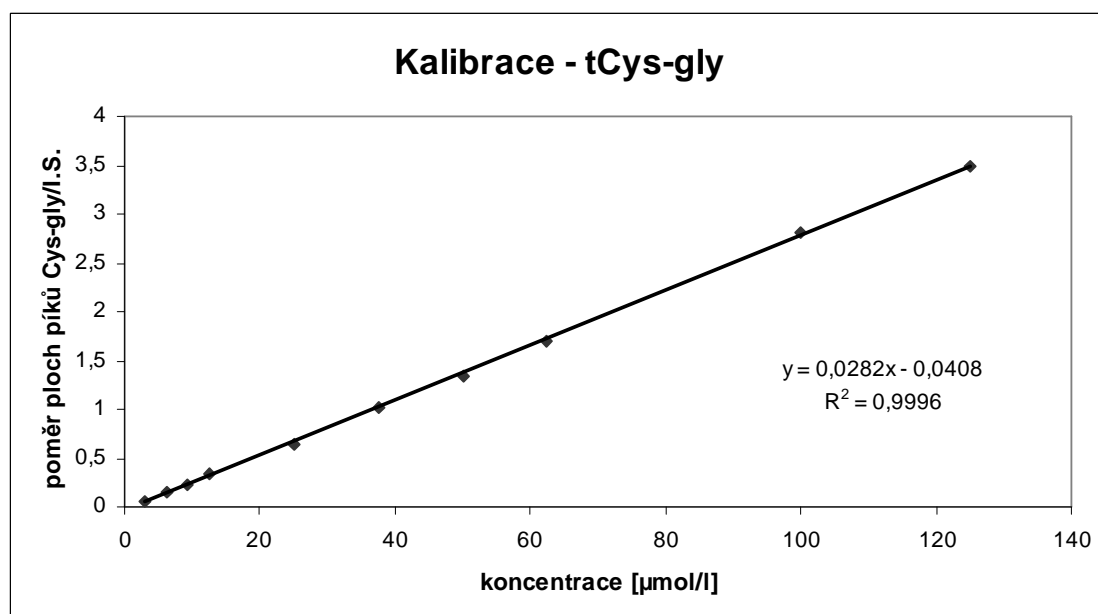
Kalibrační křivky celkového Cys, Hcy, Cys-gly a Met zobrazují obrázky 15-18.



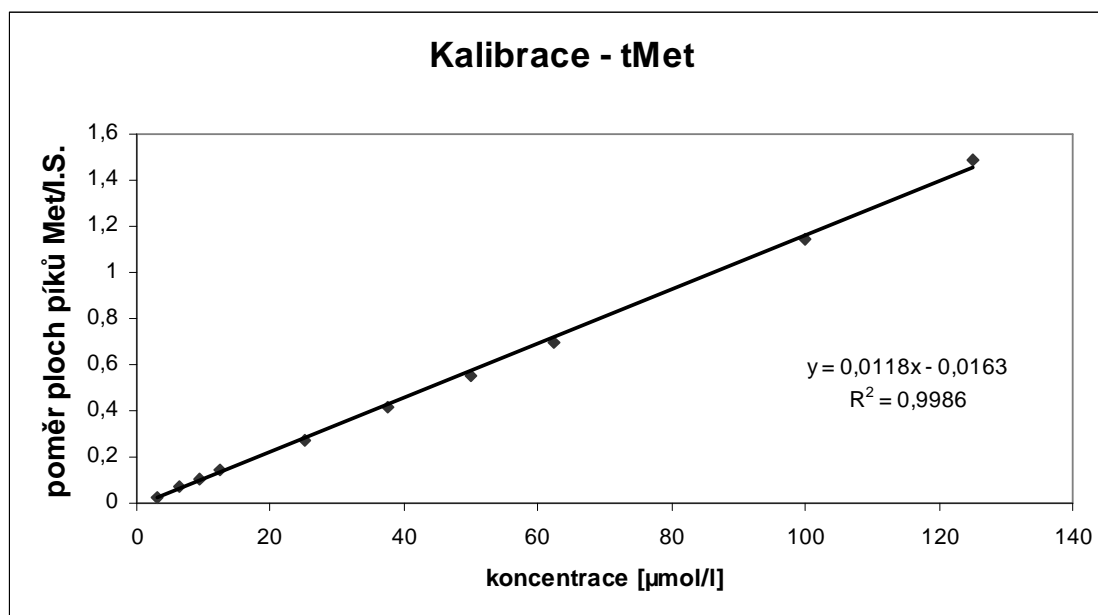
**Obr. 15:** Kalibrační závislost pro stanovení tCys



**Obr. 16:** Kalibrační závislost pro stanovení tHcy



**Obr. 17:** Kalibrační závislost pro stanovení tCys-gly



Obr. 18: Kalibrační závislost pro stanovení tMet

#### 4.1.4 Vyhodnocení vzorků

Hodnoty koncentrací celkového Cys, Hcy, Cys-gly a Met ve všech vzorcích jednotlivých pacientů jsou uvedeny v příloze č. 3.

#### 4.1.5 Průměrné naměřené hodnoty celkových aminioliů

**Tab. 13:** Naměřené hodnoty celkových aminioliů v μmol/l ve tvaru průměr ± směrodatná odchylka.

	tCys	tHcy	tCG	tMet
Celý soubor pacientů	410,41 ± 71,22	21,23 ± 8,57	41,11 ± 7,36	29,97 ± 7,46
Pacienti bez DM a HL	398,30 ± 65,33	21,70 ± 8,69	41,75 ± 7,46	30,79 ± 7,42

## 4.2 Chromatografická analýza volných aminioliů

### 4.2.1 Retenční časy volných aminioliů

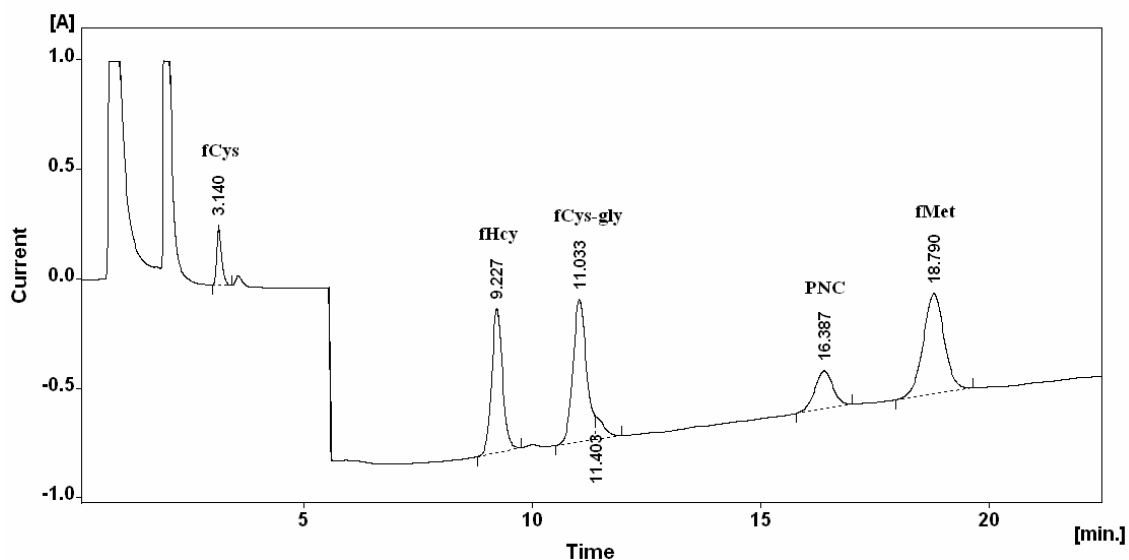
**Tab. 14:** Retenční časy volných aminioliů (údaje jsou vyjádřeny ve tvaru střední hodnota  $\pm$  SD)

Látka	Retenční čas (min.)
Cystein	$2,97 \pm 0,15$
Homocystein	$8,91 \pm 0,68$
Cysteinyl-glycin	$10,39 \pm 0,86$
Methionin	$17,55 \pm 1,55$

### 4.2.2 Chromatografický záznam separace volných aminioliů

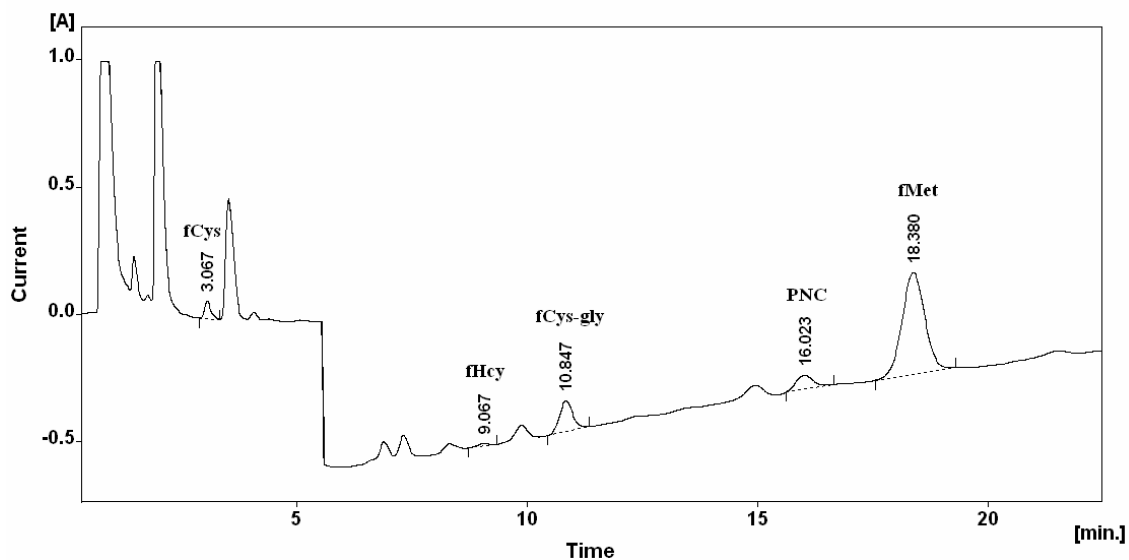
Obrázky 19 a 20 zobrazují chromatografické záznamy separace celkových aminioliů v kalibračním roztoku a ve vzorku séra.

#### A. Záznam kalibračního roztoku



**Obr. 19:** Chromatografický záznam kalibračního roztoku č. 1 (koncentrace jednotlivých aminioliů v  $\mu\text{mol/l}$ : Cys 50, Hcy 20, Cys-gly 20, Met 50)

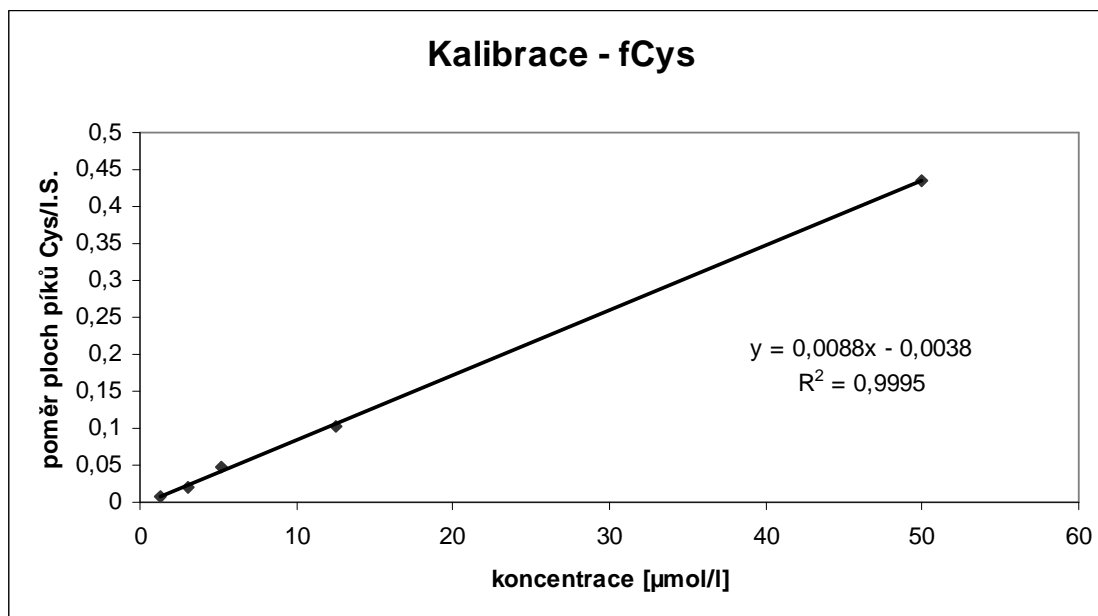
### B. Záznam vzorku



**Obr. 20:** Chromatografický záznam vzorku č. 12 (koncentrace jednotlivých aminothioliů v  $\mu\text{mol/l}$ : Cys 52,54, Hcy 0,27, Cys-gly 12,27)

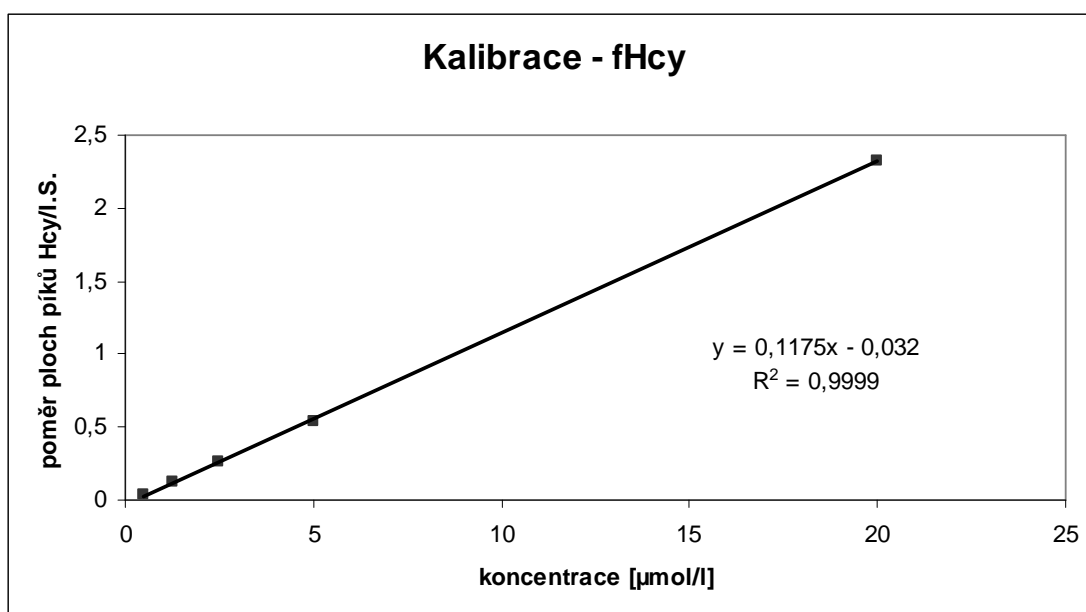
### 4.2.3 Kalibrační křivky volných aminothioliů

Kalibrační křivky volného Cys, Hcy, Cys-gly a Met znázorňují obrázky 21-24.

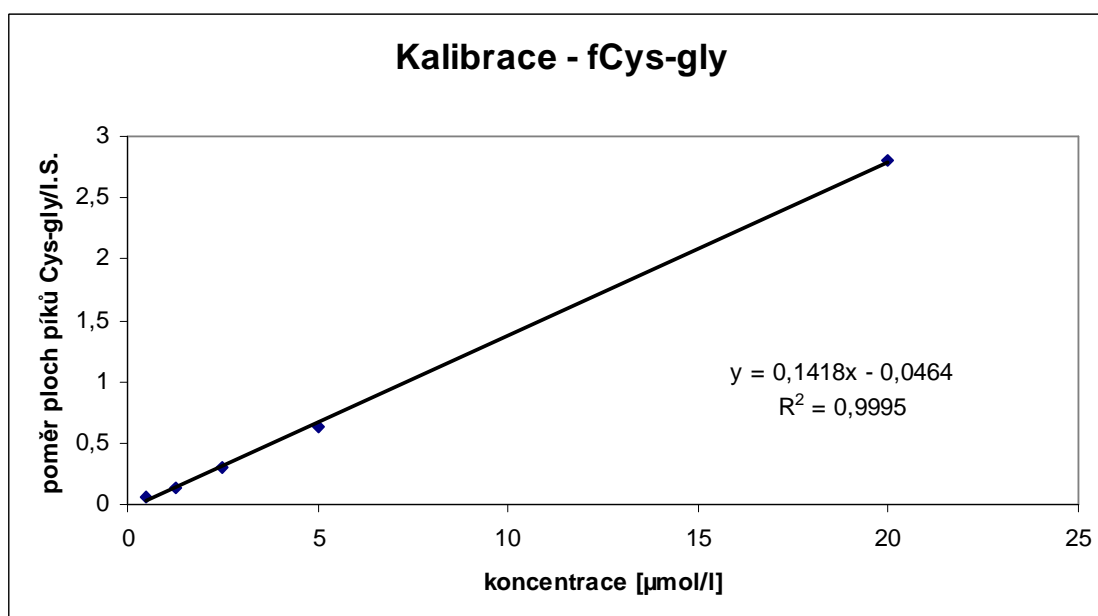


**Obr. 21:** Kalibrační závislost pro stanovení fCys

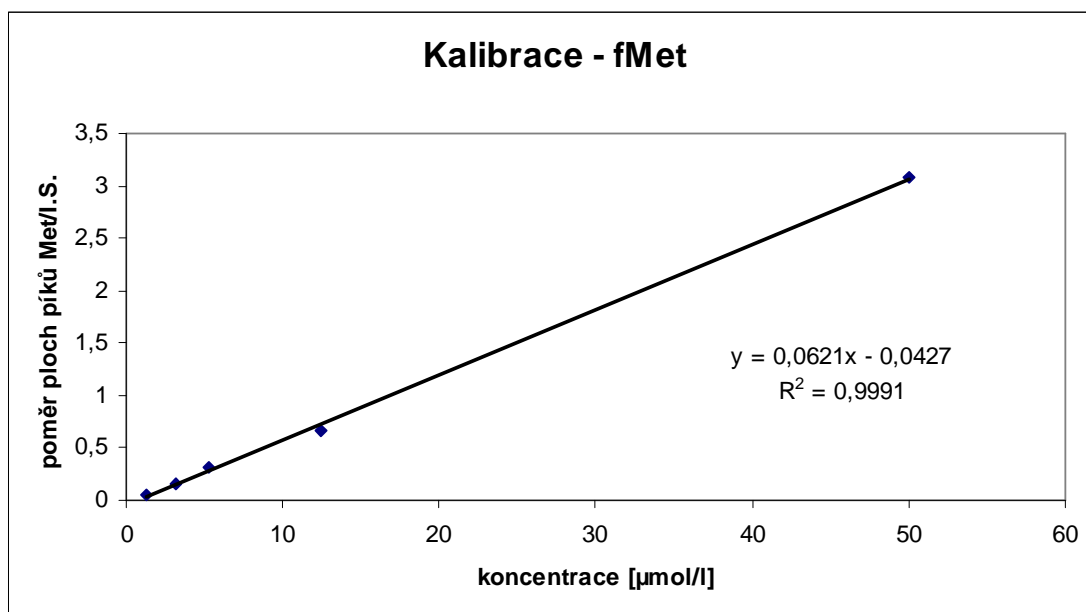




**Obr. 22:** Kalibrační závislost pro stanovení fHcy



**Obr. 23:** Kalibrační závislost pro stanovení fCys-gly



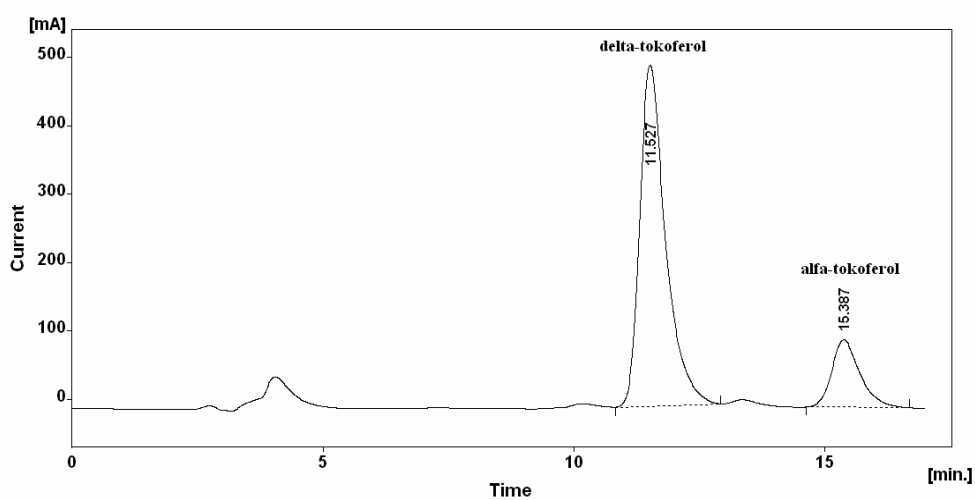
**Obr. 24** Kalibrační závislost pro stanovení fMet

## 4.3 Chromatografická analýza vitaminu E

### 4.3.1 Chromatografický záznam vitaminu E

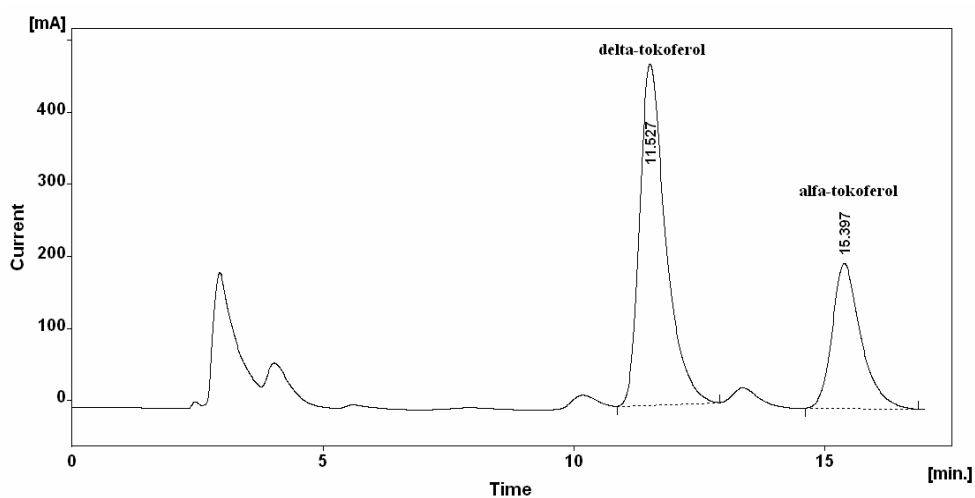
Retenční čas vitaminu E (ve tvaru střední hodnota  $\pm$  SD) =  $14,96 \pm 0,60$  min. Obrázky 25-26 zobrazují chromatografické záznamy separace vit E v kalibračním roztoku a ve vzorku séra.

#### A. Záznam kalibračního roztoku



Obr. 25: Chromatografický záznam kalibračního roztoku č. 4 (koncentrace vit E  $23,88 \mu\text{mol/l}$ )

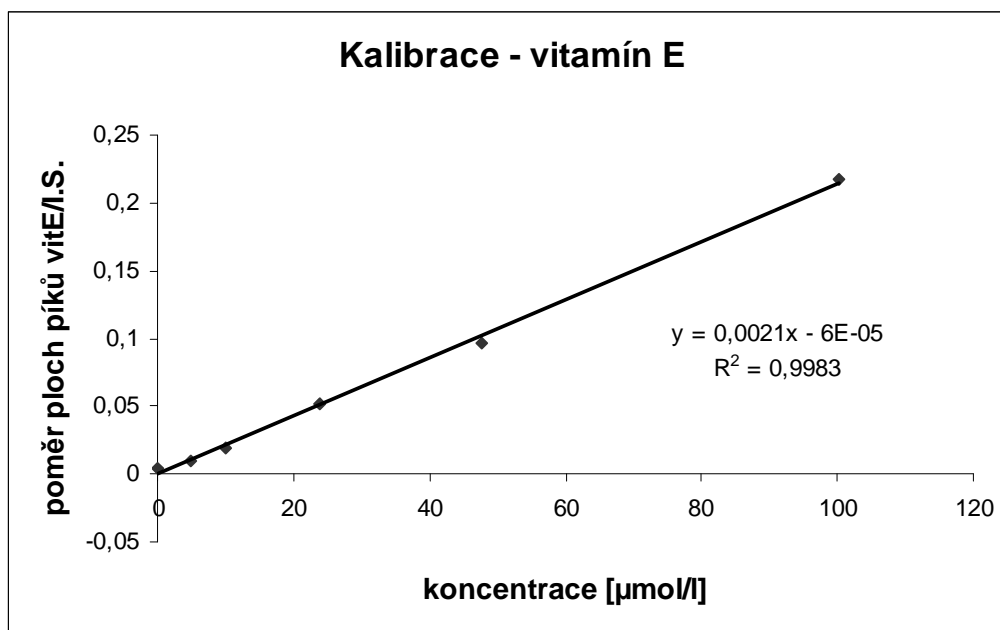
#### B. Záznam vzorku



Obr. 26: Chromatografický záznam vzorku č. 8 (koncentrace vit E  $44,77 \mu\text{mol/l}$ )

### 4.3.2 Kalibrační křivka vitamínu E

Kalibrační křivka vit E je zobrazena na obrázku 27.



Obr. 27: Kalibrační závislost pro stanovení vitamínu E

### 4.3.3 Vyhodnocení vzorků

Hodnoty koncentrací vit E a poměru vit E/LDL ve všech vzorcích jednotlivých pacientů jsou uvedeny v příloze č. 4.

### 4.3.4 Průměrné naměřené hodnoty vitamínu E

Tab. 15: Naměřené hodnoty vitamínu E v μmol/l ve tvaru průměr ± směrodatná odchylka.

	Vit E
Celý soubor pacientů	22,88 ± 5,39
Pacienti bez DM, HL	23,40 ± 6,00

## 4.4 Korelační analýza výsledků

Pro korelační analýzu jsme v naší práci použili Spearmanův korelační koeficient a statistický program GraphPad Prism 4. Pátrali jsme po existenci vzájemných vztahů mezi jednotlivými stanovenými analyty a také mezi některými látkami a věkem či BMI pacientů. Pro přehled jsou všechny korelace uvedeny v přílohách č. 6 – 9. Významné hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu jsou zvýrazněny.

### 4.4.1 Korelace mezi jednotlivými aminosíroly

Hodnotili jsme korelace mezi jednotlivými thiolovými látkami v celém souboru pacientů (počet jedinců  $N = 35$ ) a poté s vyloučením pacientů s DM a pacientů léčených HLP ( $N = 20$ ). Statisticky významná pozitivní korelace v obou skupinách byla mezi tCys a tHcy. V celém souboru pacientů jsme navíc našli pozitivní korelaci mezi tMet a tCys-gly a negativní korelaci mezi tMet a tHcy (Tab. 16).

**Tab. 16:** Hodnoty korelačního koeficientu pro korelace mezi jednotlivými aminosíroly

	Celý soubor pacientů	Pacienti bez DM, HLP
Cys-Hcy	<b>0,599</b>	<b>0,768</b>
Cys-Cys-gly	0,054	0,209
Cys-Met	-0,048	-0,081
Hcy-Cys-gly	-0,209	0,06
Hcy-Met	<b>-0,398</b>	-0,427
Cys-gly-Met	<b>0,524</b>	0,397

Vzájemné porovnání tCys a tHcy jsme provedli také zvlášť u pacientů, u nichž byla hladina Hcy do 20  $\mu\text{mol/l}$  a u těch, kteří měli hladinu Hcy vyšší než 20  $\mu\text{mol/l}$ . Soubor pacientů jsme posuzovali nejprve jako celek a následně s vyřazením jedinců léčených HLP a pacientů s DM. Na žádné statisticky významné korelace jsme však nenarazili (Tab. 17).

**Tab. 17:** Korelace mezi celkovým Hcy a Cys,  $r = \text{Spearmanův korelační koeficient}$ ,  $N = \text{počet jedinců ve skupině}$

	tHcy (do 20 $\mu\text{mol/l}$ ) - tCys	tHcy (nad 20 $\mu\text{mol/l}$ ) - tCys
Celý soubor pacientů	$N = 19; r = 0,390$	$N = 16; r = 0,385$
Pacienti bez HLP a DM	$N = 10; r = 0,491$	$N = 10; r = 0,539$

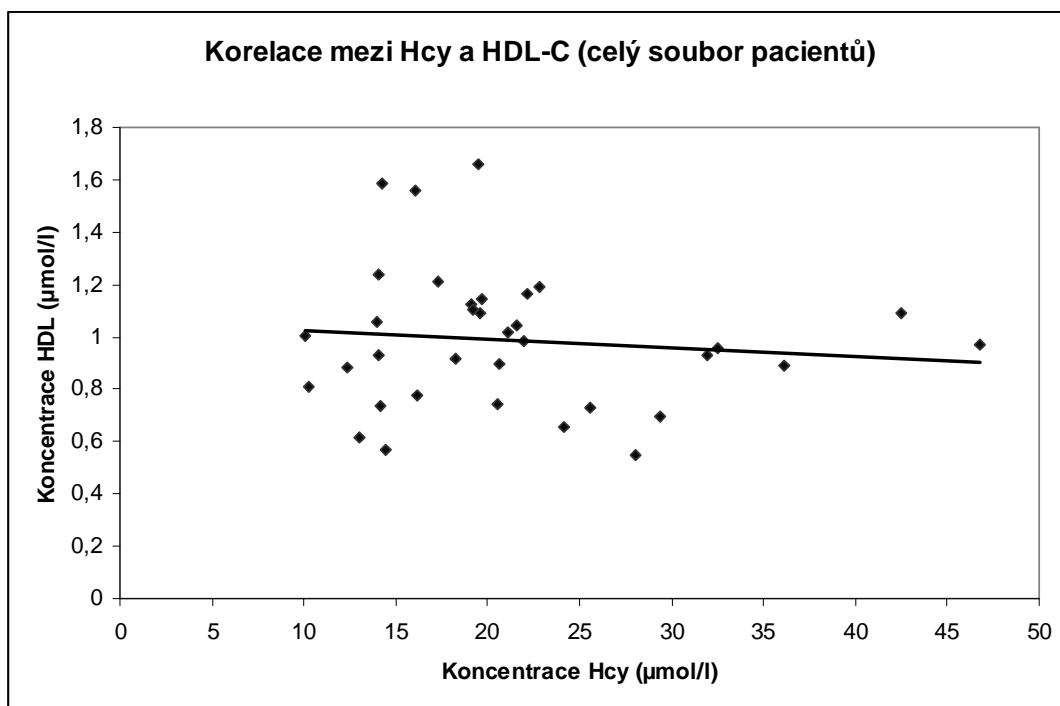
#### 4.4.2 Korelace mezi celkovým homocysteinem (cysteinem) a látkami lipidového spektra

U všech pacientů jsme posoudili korelaci mezi aminothioly Hcy a Cys a jednotlivými látkami lipidového spektra (Tab. 18). Statisticky významnou pozitivní korelaci jsme zaznamenali mezi tHcy a LDL-C a negativní mezi tMet a LDL-C. Obě významné korelace náleží do celého souboru pacientů. Po vyloučení pacientů s DM a HLP jsme žádné významné korelace nenalezli.

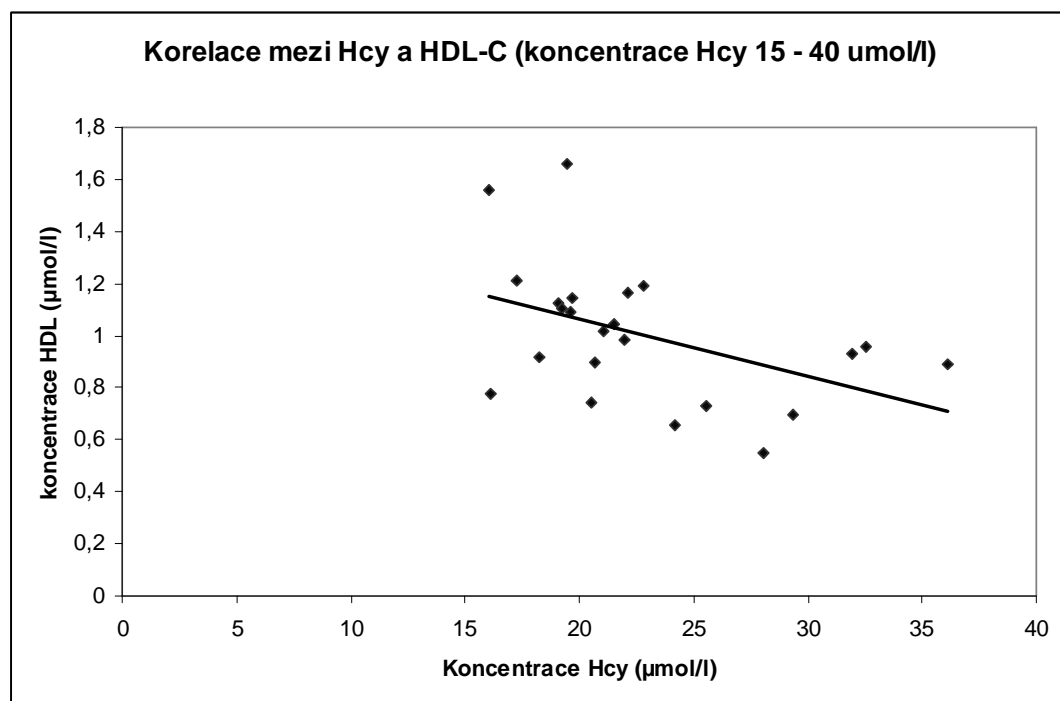
Posouzení korelace mezi Hcy a HDL-C jsme provedli zvlášť u skupiny pacientů s koncentrací Hcy v rozmezí 15-40  $\mu\text{mol/l}$  a našli jsme zde významnou negativní korelaci. Hodnota korelačního koeficientu byla **-0,502** (N = 23). Obrázky 28 a 29 znázorňují korelaci mezi Hcy a HDL-C v obou skupinách pacientů.

**Tab. 18:** Korelace mezi celkovým Hcy (Cys) a látkami lipidového spektra.

	Celý soubor pacientů	Pacienti bez HLP a DM
tCys – HDL-C	-0,204	-0,302
tHcy – HDL-C	-0,086	0,006
tCys-gly – HDL-C	-0,226	-0,275
tMet - HDL-C	-0,276	-0,386
tCys – LDL-C	-0,024	-0,027
tHcy – LDL-C	<b>0,379</b>	0,326
tCys-gly – LDL-C	-0,168	-0,428
tMet – LDL-C	<b>-0,337</b>	-0,398
tCys – TG	-0,215	-0,177
tHcy – TG	-0,220	-0,349
tCys-gly - TG	0,073	0,132
tMet - TG	-0,034	0,197
tCys – IA	0,088	0,199
tHcy – IA	0,243	0,141
tCys-gly - IA	-0,083	-0,249
tMet - IA	-0,026	0,033
tCys – TC	-0,220	-0,155
tHcy – TC	0,154	0,181
tCys-gly – TC	-0,337	<b>-0,528</b>
tMet – TC	<b>-0,428</b>	<b>-0,472</b>



**Obr. 28:** Korelace mezi HDL-C a Hcy v celém souboru pacientů



**Obr. 29:** Korelace mezi HDL-C a Hcy v souboru pacientů s koncentrací Hcy v rozmezí 15 - 40 µmol/l

#### 4.4.3 Korelace mezi celkovým homocysteinem (cysteinem) a látkami ledvinného spektra

Mezi koncentracemi tHcy (tCys) a kreatininu nebyly nalezeny žádné korelace. Významnou pozitivní korelaci jsme však našli mezi tHcy i tCys a močovinou a to u obou skupin pacientů (Tab. 19).

**Tab. 19:** Korelace mezi celkovým Hcy (Cys) a látkami ledvinného spektra

	Celý soubor pacientů	Pacienti bez HLP a DM
tCys – Kreatinin	0,038	-0,094
tHcy – Kreatinin	0,107	-0,035
tCys-gly - Kreatinin	-0,140	0,113
tMet - Kreatinin	-0,179	-0,018
tCys – Močovina	<b>0,497</b>	<b>0,565</b>
tHcy – Močovina	<b>0,479</b>	<b>0,530</b>
tCys-gly - Močovina	-0,140	0,063
tMet - Močovina	<b>-0,352</b>	-0,115

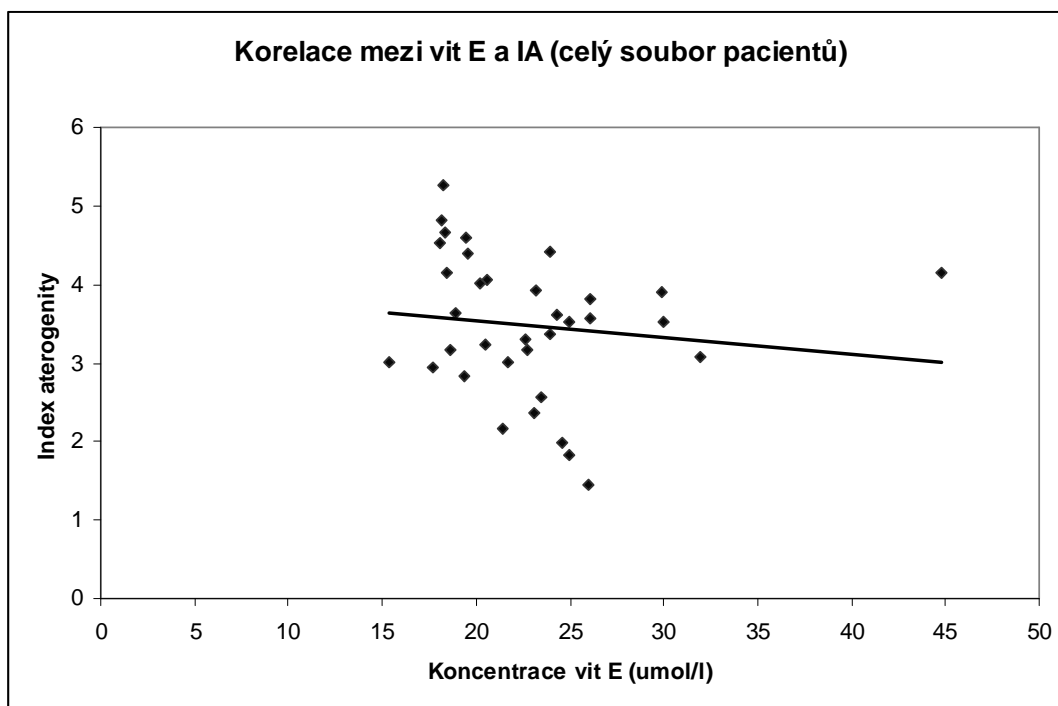
#### 4.4.4 Korelace poměru vitamin E/LDL a vit E s indexem aterogenity

Statisticky významnou negativní korelaci jsme našli mezi IA a poměrem vit E/LDL. Po vyloučení jednoho pacienta s extrémně vysokou hladinou Vit E jsme našli také významnou negativní korelaci mezi vit E a IA v celém souboru pacientů (Tab 20). Obrázky 30 a 31 znázorňují korelace mezi vit E a IA před a po vyloučení jednoho bodu.

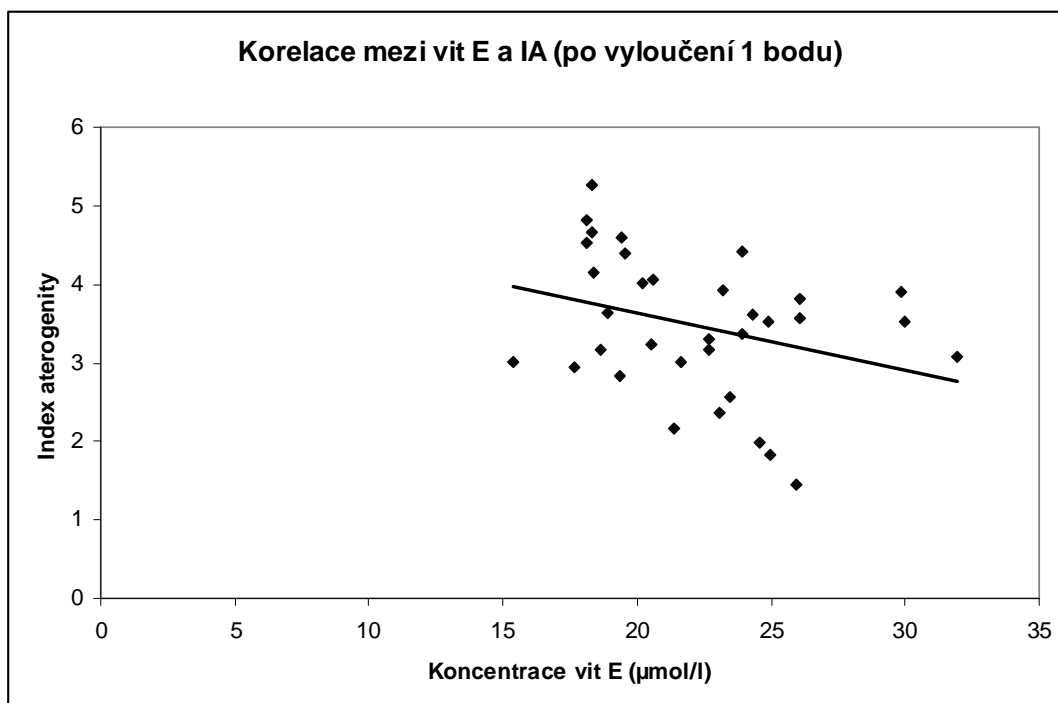
**Tab. 20:** Korelace mezi indexem aterogenity a poměrem vit E/LDL a vit E

	Celý soubor pacientů	Pacienti bez HLP a DM
Vit E/LDL – IA	<b>-0,553</b>	-0,311
Vit E – IA (N = 35)	-0,266	0,102
Vit E – IA (N = 34)	<b>-0,326</b>	-0,004





**Obr. 30:** Korelace mezi Vit E a IA v celém souboru pacientů



**Obr. 31:** Korelace mezi Vit E a IA po vyloučení jednoho bodu

#### 4.4.5 Korelace mezi hladinami některých látek a věkem pacientů

Ověření korelací jsme prováděli na celém souboru pacientů. Statisticky významná pozitivní korelace s věkem byla nalezena u tCys, tHcy a močoviny. Silnou negativní korelaci jsme zaznamenali u tMet (Tab. 21).

**Tab. 21:** *Korelace mezi koncentrací některých látek a věkem pacientů (N = 35)*

Látka	Celý soubor pacientů	Pacienti bez HLP a DM
tCys	<b>0,427</b>	<b>0,614</b>
tHcy	<b>0,398</b>	<b>0,775</b>
tCys-gly	-0,035	0,151
tMet	<b>-0,450</b>	<b>-0,480</b>
Močovina	<b>0,616</b>	<b>0,632</b>
Kreatinin	0,217	-0,019

## 5 Diskuse

Stále není jednotný názor na to, jak významnou roli hraje Hcy a ostatní aminothioly v rozvoji aterosklerotického a následně kardiovaskulárního onemocnění. V literatuře sice převládá názor, že zvýšené hladiny Hcy souvisejí s AO (Andersson a kol., 1993; Liao a kol., 2007), řada autorů však tuto souvislost nenalezla (Zhou a kol., 2008; Donner a kol. 1998; Hansari a kol., 2006; Linnebank a kol., 2006).

V mnoha studiích byly prokázány patologické účinky Hcy zahrnující poškození cévního endotelu vlivem oxidačního stresu, podporu proliferace buněk hladké svaloviny a syntézy kolagenu, zvýšení agregace krevních destiček, lipoperoxidaci a trombogenní a aterogenní aktivitu. Z těchto důvodů je Hcy považován za možný rizikový faktor aterosklerózy (Andersson a kol., 1993; Welch, Loscalzo, 1998; Nygård a kol., 1999; Bald a kol., 2004, Liao a kol., 2007). V některých studiích byl také nalezen vztah mezi Cys a kardiovaskulárním onemocněním (Ueland a kol., 1996). Mills a kol. (2000) se domnívají, že zvýšená hladina Cys u pacientů s KVO vede ke vzniku oxidačního prostředí, což může přispívat k poškození cévního endotelu. Cys-gly má význam jako produkt degradace glutathionu, který by mohl být zodpovědný za produkci reaktivních kyslíkových radikálů a lipoperoxidaci (Scanu a kol., 1990). Methionin jako takový nemá vliv na rozvoj aterosklerózy, poruchy v jeho metabolismu však mohou vést ke změnám hladin Hcy a dalších aminothiолů (Bald a kol., 2004).

Naše práce navazuje na dlouhodobý výzkum zabývající se vlivem aminothiолů na rozvoj aterosklerózy. V předchozích studiích bylo po proměření hladin aminothiолů metodou HPLC-ED u pacientů s pozitivním a negativním koronarografickým nálezem zjištěno, že hladiny celkových aminothiолů byly u obou skupin srovnatelné, pouze u pacientů s pozitivním koronarografickým nálezem byla mírně zvýšená hladina cysteinu. Statistické porovnání získaných hodnot ukázalo, že rozdíly ve všech skupinách jsou nevýznamné. Po modifikaci metody a určení jejich parametrů byly dále proměřeny hladiny volných aminothiолů u hemodialyzovaných pacientů a kontrolní zdravé skupiny. Zjištěné rozdíly hladiny cystathioninu, cysteinyl-glycinu a methioninu u obou souborů se ukázaly jako nevýznamné (Stoklasová, 2007).

Další naše studie odhalila významně zvýšené hladiny celkového Cys, Hcy a Cys-gly u pacientů s DM, které nesouvisí s ledvinným onemocněním. U hemodialyzovaných pacientů byly zjištěny zvýšené hodnoty Cys a Hcy a významně

---

snížené hodnoty Met. U obézních pacientů byly statisticky významně zvýšené pouze hladiny Cys, hladiny ostatních aminothioliů se příliš nelišily od kontrolní skupiny (Jelínková, 2008).

Pro naši studii jsme učinili pečlivý výběr pacientů, kde hlavním kritériem bylo kardiovaskulární onemocnění. Všichni pacienti, kteří se naší studie zúčastnili, nejprve podepsali informovaný souhlas (Příloha č. 13). Jako pacienty s potvrzeným kardiovaskulárním onemocněním považujeme jedince po prodělané akutní koronární příhodě, jako je IM či CMP a dále pacienty s pozitivním koronarografickým nálezem. Původním požadavkem bylo, aby tito pacienti byli nekuřáci, neužívali hormonální antikoncepci, statiny, fibráty, netrpěli DM a nebyli hemodialyzovaní. DM a kouření jsou považovány za rizikové faktory ICHS. Užívání statinů, fibrátů a také hormonální antikoncepce má vliv na lipidový metabolismus i koncentraci aminothioliů. Statiny a fibráty navíc mění hladiny CoQ<sub>10</sub>, který bude u těchto pacientů stanovován v navazující studii. U hemodialyzovaných pacientů jsme již v předchozích studiích zaznamenali výrazně změněné hladiny aminothioliů (Jelínková, 2008). Všechny tyto faktory tedy mohou ovlivňovat hladiny námi stanovovaných látek. Aby však byla splněna hlavní podmínka, byli jsme nuceni zaměřit se na skupinu pacientů s velmi vysokým věkem. U těchto pacientů je nutné očekávat především častější výskyt DM a také větší množství užívaných léků, mezi nimi také statinů. V průběhu získávání vzorků jsme tak přistoupili ke kompromisu. Z 35 pacientů, kteří se naší studie zúčastnili, je 8 diabetiků a 8 jich užívá statiny. Při vyhodnocování výsledků jsme proto vždy nejdříve analyzovali celý soubor pacientů a poté se zaměřili na skupinu jedinců s vyčleněním výše zmíněných diabetiků a pacientů léčených statiny, abychom vyloučili vliv těchto faktorů na naměřené hodnoty analytů.

Pro naši analýzu jsme použili vzorky séra. Plná krev byla odebírána vždy na lačno a do půl hodiny centrifugována. Následně byla odebrána plazma do mikrozkušavek Eppendorf a vzorky byly uloženy do hlubokomrazícího boxu při -80°C. Po nasbírání všech vzorků následoval transport do naší laboratoře, při kterém byly vzorky uloženy na ledu nebo v tekutém dusíku, aby se tak předešlo jejich rozmrazení a opětovnému zamrazení. V naší laboratoři byly vzorky až do spotřeby skladovány při -80°C.

U našeho souboru pacientů s KVO jsme stanovili celkové aminothioly metodou HPLC-ED. V naší předchozí práci, kde byly měřeny hladiny thiolových látek

u hemodialyzovaných pacientů proti kontrolní skupině, byly zjištěny významně zvýšené hladiny Hcy a Cys, koncentrace Met byla významně snížena. My jsme zaznamenali podobné výsledky. Vzhledem k tomu, že hladiny kreatininu jsou u našich pacientů většinou ve fyziologických mezích, nelze zde přisuzovat změněné hladiny aminosulfidů zhoršené funkci ledvin, jak tomu bylo u hemodialyzovaných pacientů. Usuzovalo se, že vlivem onemocnění ledvin dochází ke vzniku oxidačního stresu a je snaha ho kompenzovat zvýšeným katabolismem Hcy transsulfurační cestou, při které vzniká Cys a méně probíhá jinak častější remetylační cesta, kterou vzniká Met (Suliman a kol., 1997). Vzhledem k tomu, že analýza složení aterosklerotického plaku odhalila produkty oxidace proteinů a lipidů (Kontush, Chapman, 2006), je možné usuzovat že AO je spojeno se vznikem oxidačního stresu. Ten by mohl vyvolat stejný mechanismus, jako byl popsán u hemodialyzovaných pacientů. Vznik oxidačního stresu by mohl také souviset s vysokým průměrným věkem a s 98 %ním výskytem arteriální hypertenze v našem souboru pacientů. Například Atif a kol. (2008) ve svém článku poukazují na zvýšené hladiny tHcy naměřené u pacientů s arteriální hypertenzí.

Při porovnávání hladin tHcy a tMet (tCys a tMet) jsme narazili na silnou negativní korelaci mezi těmito thioley a to v celém souboru pacientů i po vyloučení pacientů s DM a HLP. To podporuje naši teorii o utlumení remetylační cesty, během které vzniká z Hcy Met. Nadbytečný Hcy je pak všechn přeměňován na Cys, který se hromadí.

Někteří autoři v literatuře uvádějí, že našli zvláštní korelaci mezi tCys a tHcy. Při koncentraci tHcy do 20  $\mu\text{mol/l}$  to byla výrazná pozitivní korelace, při vyšší koncentraci tHcy než 20  $\mu\text{mol/l}$  to byla naopak silná negativní korelace (Demuth a kol., 2002, van den Brandhof a kol., 2001, Donner a kol., 1998). My jsme tuto závislost ověřili na našem souboru, našli jsme však pozitivní korelaci v celém rozsahu koncentrací tHcy, což také podporuje naši teorii.

Klinické studie pacientů s aterosklerotickým kardiovaskulárním onemocněním, infarktem myokardu a hyperlipidemických pacientů odhalily negativní korelaci mezi koncentrací Hcy v plazmě a HDL-C (Stampfer a kol., 1992; Glueck a kol., 1995, Qujeq a kol., 2001). Je tedy možné, že Hcy snižuje hladinu HDL-C. Liao a kol. popsali několik mechanismů, kterými by Hcy mohl tlumit biosyntézu HDL a jejich funkci. Mnoho studií také potvrdilo změny koncentrací cholesterolu, TG a VLDL v plazmě u CBS-deficientních myší-homozygotů, u kterých se projevuje hHcy (Liao a kol., 2006;

---

Namekata a kol., 2004; Woo a kol., 2005; Wang a kol., 2003).

Další souvislost nacházíme mezi Hcy a LDL částicemi. Při interakci Hcy s LDL může docházet ke vzniku Hcy-LDL, které jsou ve větší míře pohlcovány makrofágy a Hcy tak může zvyšovat aterogenicitu lipoproteinů (Ferretti a kol., 2006; Zinellu a kol., 2006).

U našeho souboru pacientů jsme vyšetřili lipidové spektrum a ověřili korelace mezi aminothioly a HDL-C a LDL-C popisované v literatuře. Námi provedená korelační analýza odhalila statisticky významnou negativní korelaci mezi HDL-C a Hcy u pacientů s koncentrací Hcy v rozmezí 15 – 40  $\mu\text{mol/l}$ . Z toho usuzujeme, že Hcy by opravdu mohl snižovat hladinu HDL-C u pacientů s hyperhomocysteinémií a nemůžeme jej tedy vyloučit jako rizikový faktor aterosklerózy. Dále jsme zaznamenali významnou pozitivní korelaci mezi Hcy a LDL-C. Stejných výsledků jako my dosáhl také Qujeq a kol. (2001) u pacientů po IM a shodují se také s výsledky zaznamenanými při studii na hHcy myších.

Významnou roli v patogenezi aterosklerózy hrají také antioxidační látky, jako je vit E či CoQ<sub>10</sub>. Tyto antioxidanty mají schopnost chránit lipoproteinové částice před oxidací a tím zabraňují jejich usazování v cévách a tvorbě plaku (Crane, 2001; Kand'ár, Žáková, 2007). Vit E je v plazmě přítomen ve VLDL a LDL částicích, které chrání před oxidací volnými radikály. Ve tkáních chrání především nenasycené mastné kyseliny membránových PL proti oxidačnímu poškození a lipoperoxidaci. Některé studie se zabývají možností kompenzace oxidačního stresu způsobeného hyperhomocysteinémií podáváním některých antioxidantů, především vit E (Joseph a kol., 2008; Coppola a kol., 2004; Kartal a kol., 2003).

Proměřili jsme hladinu vit E u jednotlivých pacientů metodou HPLC-ED. Mezi tHcy a poměrem vit E/LDL jsme našli významnou negativní korelaci. Po vyloučení jednoho pacienta s vysokou koncentrací vit E v séru ze souboru jsme také našli významnou negativní korelaci mezi vit E a IA. Toto zjištění bylo pro nás velice zajímavé, protože jsme v dřívější studii zaměřené na skupinu pacientů s nižším průměrným věkem podobných výsledků nedosáhli (Žáková a kol., 2007). Z toho vyvozujeme, že ochrana LDL částice před oxidací klesá úměrně koncentraci vit E a věku.

Vzhledem k vysokému věku v našem souboru pacientů jsme zkoumali

přítomnost korelací mezi hladinami některých látek a věkem. Statisticky významnou pozitivní korelaci jsme našli u Cys, Hcy a močoviny. Naopak negativně s věkem koreloval methionin. Edgar a kol. (2008) našli také pozitivní korelaci Cys s věkem. Rossi a kol. (2008) zjistili zvyšující se míru cysteinylace a homocysteinylace proteinů s věkem. Z toho vyvozují, že s věkem se snižuje účinnost thiolů jako antioxidačního systému, což by mohlo mít za následek ireverzibilní oxidační změny –SH skupin plazmových proteinů.

Většina studií zabývajících se metabolismem thiolových látek se zaměřuje pouze na stanovení celkových aminothiolů. Protože však Hcy a další aminothioly asociované s proteiny podle Bayleho a kol. (2004) nejsou biologicky aktivní, volné formy (redukované i oxidované) hrají nejspíš hlavní roli v patogenezi aterosklerózy. Van Oijen a kol. (2008) se domnívají, že fHcy je pro cévní endotel nebezpečnější než tHcy. Ve své studii zaznamenali, že koncentrace fHcy vyšší než 4,11  $\mu\text{mol/l}$  jsou významným a nezávislým rizikovým faktorem KVO.

Pro stanovení volných aminothiolů jsme použili metodu HPLC-ED, stejně jako pro stanovení celkových aminothiolů. Jelikož jsou obecně koncentrace volných aminothiolů několikanásobně nižší, než koncentrace celkových aminothiolů, bylo zapotřebí při jejich stanovení zvýšit dávkování vzorku na kolonu z původních 10  $\mu\text{l}$  na 15  $\mu\text{l}$ . Pro počáteční stanovení jsme použili stejné pH mobilní fáze jako u analýzy celkových aminothiolů, tedy pH 2,82. Při tomto pH jsme však nedosáhli potřebného odseparování píků jednotlivých aminothiolů (příloha č. 10). Z dřívějších zkušeností jsme nepřistoupili k prodloužení retenčních časů přidáním protiontu, věděli jsme, že při koncentraci protiontu 12  $\text{mmol/l}$  dochází k „nasyčení“ kolony (Jelínková, 2008). Jelikož nastavení optimálního pH mobilní fáze při naší používané iontově-párové HPLC podporuje disociaci chromatografovaných látek a tím i tvorbu iontových párů, využili jsme úpravu pH mobilní fáze ke změně retenčních časů analytů. Rozhodli jsme se pro pH mobilní fáze 2,7. Odseparování píků ani po tomto zásahu však nebylo ideální (příloha č. 11). Pík methioninu byl příliš velký a bylo patrné, že spolu s ním se eluuje nám neznámá látka, což vedlo ke zkreslení hodnot. Tato domněnka se nám později potvrdila, kdy při použití nové mobilní fáze o pH 2,69 se v oblasti methioninu objevil dvojpík (příloha č. 12). Úplného oddělení methioninu od této látky jsme zatím nedosáhli. Dále v oblasti Hcy, který je pro nás klíčový, se ve vzorcích pacientů objevovala skupina píků o přibližně stejné velikosti a nebylo vždy možné s jistotou

určit, který z nich náleží Hcy. Při analýze vzorků jsme také řešili problém s robustností metody. Záznamy jednotlivých vzorků byly velmi různorodé a v důsledku nízké koncentrace aminothioliů se zde objevovalo velké množství interferenčních píků.

Při stanovení koncentrací volných thiolů jsme vycházeli z literatury a očekávali jsme koncentrace v rozmezích, jaká zde uvádějí. Koncentrace volných aminothioliů nalezené u kontrolních skupin se v literatuře pohybují přibližně v těchto rozmezích: fCys 100-180  $\mu\text{mol/l}$ , fHcy 1,37-5  $\mu\text{mol/l}$ , fCys-gly 9,1-21  $\mu\text{mol/l}$  (Sjöberg a kol., 2006; Hultberg a kol., 1995; Andersson a kol., 1993; Mansoor a kol., 1995). My jsme však zaznamenali koncentrace mnohem nižší, a to u všech thiolů. V Návaznosti na naši práci by bylo potřeba metodu lépe optimalizovat pro nižší koncentrace volných thiolů např. dalším zvýšením dávkování, zvýšením citlivosti. Také je potřeba zjistit pH, při kterém dochází k lepší separaci píků, především Met a Hcy.

V některých studiích byla nalezena pozitivní korelace mezi hladinami Hcy (Cys) a kreatininu (Melenovsky a kol., 2003; Piovesan a kol., 2007). Elshorbagy a kol. (2007) objevili vztah mezi kreatininem a Hcy u starších jedinců. Někteří autoři předpokládají vzestup obou aminokyselin vzhledem ke zhoršující se funkci ledvin s věkem (Bona a kol., 2006). Pozitivní korelace kreatininu a thiolů může ale také vyplývat z faktu, že kreatin vzniká ze SAM ve svalech, kde není příznivé prostředí pro remetylaci a přebytečný Cys a Hcy jsou vyplavovány do krve. (Přistoupilová, Přistoupil, 2000; Přistoupilová, Přistoupil, 2002; Melenovsky a kol., 2003). Taes a kol. (2004) však suplementací kreatinu u pacientů s chronickým ledvinným onemocněním nedosáhli snížení hladiny tHcy. Závislost tHcy a kreatininu jsme ověřili na našem souboru pacientů, nenalezli jsme však žádnou korelaci.

Při zjišťování vztahu mezi aminothioly a močovinou jsme narazili na významnou pozitivní korelaci mezi tHcy (tCys) a močovinou a významnou negativní korelaci mezi tMet a močovinou. Protože močovina vzniká při odbourávání amoniaku pocházejícího z aminokyselin v ornitinovém cyklu, jsou korelace mezi ní a aminothioly pochopitelné.

Tato studie poskytuje prozatím dílčí výsledky, které budou doplněny především o stanovení CoQ10 u našeho souboru pacientů.



## 6 Závěr

V této práci jsme se zaměřili na soubor pacientů s kardiovaskulárním onemocněním, u kterého jsme změřili hladiny celkových aminothiolů. Zjistili jsme zvýšenou hladinu cysteinu a homocysteinu a sníženou hladinu methioninu. Negativní korelace mezi cysteinem (homocysteinem) a methioninem nasvědčuje tomu, že u těchto pacientů dochází k utlumení remetylační cesty a k upřednostnění transsulfurační dráhy za vzniku nadbytku cysteinu. Zvýšená hladina cysteinu vede pravděpodobně ke vzniku oxidačního prostředí, což může přispívat k poškození cévního endotelu.

Vzhledem k tomu, že většina pacientů měla koncentraci kreatininu ve fyziologických mezích, usuzujeme, že změněné hladiny aminothiolů nesouvisí se zhoršenou funkcí ledvin, jak bylo navrženo u hemodialyzovaných pacientů. Přikláníme se k teorii, že ke zvýšené produkci cysteinu a homocysteinu dochází v důsledku oxidačního stresu, který může souviset jak s aterosklerózou, tak s vysokým věkem pacientů a častým výskytem arteriální hypertenze v souboru. Ověřili jsme také korelace některých látek s věkem. Významně pozitivně s věkem koreloval cystein a homocystein, negativně methionin. Můžeme se tedy pouze dohadovat, zda změněné hladiny celkových aminothiolů jsou příčinou nebo následkem aterosklerotického kardiovaskulárního onemocnění.

Ve vzorcích pacientů jsme stanovili vitamin E. Zjistili jsme významnou negativní korelaci mezi vitaminem E a indexem aterogenity a také mezi indexem aterogenity a poměrem vitamin E ku LDL cholesterolu. Z toho usuzujeme, že vitamin E se jeví jako významný antioxidant, který chrání LDL částice před oxidací a tím snižuje jejich aterogenní vlastnosti.

Vyšetřili jsme lipidové spektrum u všech pacientů. Nalezli jsme významnou negativní korelaci mezi HDL-cholesterolem a homocysteinem u pacientů s hyperhomocysteinémií. Z tohoto důvodu nemůžeme vyloučit Hcy jako rizikový faktor aterosklerózy.

Ověřili jsme použitelnost vypracované HPLC-ED metody pro stanovení volných plazmatických aminothiolů. Zjistili jsme však nižší koncentrace volných aminothiolů, především Hcy, než uváděla literatura. Tato metoda vyžaduje další optimalizaci pro nižší koncentrace aminothiolů ve vzorcích a volbu pH mobilní fáze, při kterém dojde k dostatečné separaci píků.

## 7 Použitá literatura

ANDERSSON, A., ISAKSSON, A., BRATTSTRÖM L., HULTBERG, B.: *Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization*. Clinical chemistry, 1993, 39(8), 1590-1597.

ANSELL, B. J., WATSON, K.E., FOGELMAN, A. M., NAVAB, M., FONAROW, G. C.: *High-Density Lipoprotein Function*. J Am Coll Cardiol, 2005, 46(10), 1792-1798.

ATABEK, M. E., PIRGON, O., KARAGOZOGLU, E.: *Plasma homocysteine levels in children and adolescents with type I diabetes*. Indian Pediatrics, 2006, 43, 401-407.

ATIF, A., ATIF RIZVI, M., TAUHEED, S., AAMIR, I., MAJEED, F., SIDDIQUI, K., KHAN, S.: *Serum homocysteine concentrations in patients with hypertension*. Pak J Physiol, 2008, 4(1), 21-22.

AVIRAM, M., ROSENBLAT, M., BISGAIER, C. L., NEWTON, R. S., PRIMO-PARMO, S. L., LA DU, B. N.: *Paraoxonase Inhibits High-density Lipoprotein Oxidation and Preserves its Functions: A Possible Peroxidative Role for Paraoxonase*. J. Clin. Invest, 1998, 101(8), 1581-1590.

BALD, E., CHWATKO, G., GŁOWACKI, R., KUŚMIEREK, K.: *Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. J. Chromatogr. A, 2004, 1032, 109-115.

BAYLE, C., CAUSSÉ, E., COUDERC, F.: *Determination of aminothiols in body fluids, cells, and tissues by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2004, 25, 1457-1472.

BLATTER GARIN, M.-C., MOREN, X., JAMES, R. W.: *Paraoxonase-1 and serum concentrations of HDL-cholesterol and apoA-I*. Journal of lipid research, 2006, 47(3), 515-20.

BONAA, K. H., NJOLSTAD, I., UELAND, P. M. a kol.: *Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction*. N Engl J Med., 2006, 354, 1578-1588.

BOSTOM, A. G., SHEMIN, D., LAPANE, K. L., MILLER, J. W., SUTHERLAND, P., NADEAU, M., SEYOUM, E., HARTMAN, W., PRIOR, R., WILSON, P. W., a kol.: *Hyperhomocysteinemia and traditional cardiovascular disease risk factors in end-stage renal disease patients on dialysis: A case-control study*. Atherosclerosis, 1995, 114(1), 93-103.

BOUSHEY, C. J., BERESFORD, S. A., OMENN, G. S., MOTULSKY, A. G.: *A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes.*, 1995, 274(13), 1049-57.

- BUREŠ, J., HORÁČEK, J.: *Základy vnitřního lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, 2003, s. 629-63, ISBN: 80-7262-208-0.
- BUYSSCHAERT, M., DRAMAIS, A. S., WALLEMACQ, P. E., HERMANS, M. P.: *Hyperhomocysteinemia in Type 2 diabetes*. *Diabetologia*, 2003, 46, 766-772.
- CARRU, C., DEIANA, L., SOTGIA, S., PES, G. M., ZINELLU, A.: *Plasma thiols redox status by laser-induced fluorescence capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2004, 25, 882-889.
- COPPOLA, A., ASTARITA, C., LIGUORI, E., FONTANA, D., OLIVIERO, M., ESPOSITO, K., COPPOLA, L., GIUGLIANO, D.: *Impairment of coronary circulation by acute hyperhomocysteinaemia and reversal by antioxidant vitamins*. *J Intern Med*, 2004, 256(5), 398-405.
- CRANE, F. L.: *Biochemical functions of coenzyme Q<sub>10</sub>*. *J Am Coll Nutr*, 2001, 20(6), 591-598, ISSN 0731-574.
- CUCHEL, M., RADER, D. J.: *Macrophage Reverse Cholesterol Transport: Key to the Regression of Atherosclerosis?* *Circulation*, 2006, 113, 2548-2555.
- DEAKIN, S., MOREN, X., JAMES, R. W.: *HDL Oxidation Compromises its Influence on Paraoxonase-1 Secretion and its Capacity to Modulate Enzyme Activity*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27, 1146-1152.
- DEMUTH, K., DRUNAT, S., GIRERD, X. A KOL.: *homocysteine is only plasma thiol associated with carotid artery remodeling*. *Atherosclerosis*, 2002, 165, 167-174.
- DEN HEIJER, M., BROUWER, I. A., BOS, G. M. J., BLOM, H. J., VAN DER PUT, N. M. J., SPAANS, A. P., ROSENDAAL, F. R., THOMAS, C. M. G., HAAK, H. L., WIJERMANS, P. W., GERRITS, W. B. J.: *Vitamin supplementation reduces blood homocysteine levels*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18, 356-361.
- DONNER, M. G., KLEIN G. K., MATHES P. B., SCHWANDT P., RICHTER W. O.: *Plasma total homocysteine levels in patients with early-onset coronary heart disease and a low cardiovascular risk profile*. *Metabolism*, 1998, 47(3), 273-9.
- ELSHORBAGY, A. K., OULHAJ, A., KONSTANTINOVA, S., NURK, E., UELAND, P. M., TELL, G. S., NYGÅRD, O., VOLLSET, S. E., REFSUM, H.: *Creatinine as a determinant of plasma total homocysteine concentrations in the Hordaland Homocysteine Study: use of statistical modeling to determine reference limits*. *Clin Biochem*, 2007, 40(16-17), 1209-18.
- FERRETTI, G., BACCHETTI, T., RABINI, R., VIGINI, A., NANETTI, L., MORONI, C., MAZZATI, L.: *Homocysteinylation of low-density lipoproteins (LDL) from subjects with Type 1 diabetes: effect on oxidative damage of human endothelial cells*. *Diabetic Medicine*, 2006, 23, 808-813.

FOODY, A. M., MILBERG, J. A., ROBINSON, K., PEARCE, G. L., JACOBSEN, D. W., SPRECHER, D. L.: *Homocysteine and lipoprotein(a) interact to increase CAD risk in young men and women*. *Atheroscler. Tromb. Vasc. Biol.*, 2000, 20, 493-499.

FORTI, N., DIAMANT, J.: *High-Density Lipoproteins: Metabolic, Clinical, Epidemiological and Therapeutic Intervention Aspects. An Update for Clinicians*. *Arq. Bras. Cardiol.*, 2006, 87, 614-622.

FRUCHART, J. C., NIERMAN, M. C., STROES, E. S., KASTELEIN, J. P., DURIEZ, P.: *New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment*. *Circulation*, 2004, 109, 15-19.

GLUECK, C. J., SHAW, P., LANG, J. E., TRACY, T., SIEVE-SMITH, L., WANG, Y.: *Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients*. *Am J Cardiol*, 1995, 75, 132-136.

HANSRANI, M., OATES, C., STANSBY, G.: *A prospective patient observational study of the role of hyperhomocysteinemia in restenosis in patients undergoing infrainguinal angioplasty or bypass procedures*. *Int Angiol.*, 2006, 25(4), 378-84.

HARPEL, P. C., CHANG, V. T., BORTH, W.: *Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin: A potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism*. *Medical Sciences*, 1992, 89, 10193-10197.

HUIJBERTS, M. S. P., BECKER, A., STEHOUWER, C. D. A.: *Homocysteine and vascular disease in diabetes: a double hit?* *Clin Chem Lab Med*, 2005, 43(10), 993-1000, Review.

HULTBERG, B., AGARDH, E., ANDERSSON, A., BRATTSTROM, L., ISAKSSON, A., ISRAELSSON, B., AGRADH, C. D.: *Increased levels of plasma homocysteine are associated with nephropathy, but not severe retinopathy in type I diabetes mellitus*. *Scand J Clin Invest*, 1991, 51, 277-282.

HULTBERG, B., ANDERSSON, A., ARNADOTTIR, M.: *Reduced, free and total fractions of homocysteine and other thiol compounds in plasma from patients with renal failure*. *Nephron*, 1995, 70, 62-67.

HYÁNEK, J. a kol.: *Diagnostický význam mírné hyperhomocysteinémie*. *Laboratorna diagnostika*, 3, 1997, 187-194.

CHISOLM, G. M., STEINBERG, D.: *The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: An overview*. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28:1815-1826.

JELÍNKOVÁ, I.: *Monitorování vybraných aminothioliů u pacientů s vysokým rizikem aterosklerózy* (Diplomová práce) Pardubice: Univerzita Pardubice, 2008.

STOKLASOVÁ, M.: *HPLC/ED stanovení celkových a volných aminothiů u pacientů s koronograficky odlišnými nálezy* (Diplomová práce) Pardubice: Univerzita Pardubice, 2007.

JOSEPH, J., JOSEPH, L., DEVI, S., KENNEDY, R. H.: *Effect of anti-oxidant treatment on hyperhomocysteinemia-induced myocardial fibrosis and diastolic dysfunction*. J Heart Lung Transplant, 2008, 27(11), 1237-41.

KANĎÁR, R., ŽÁKOVÁ, P.: *Monitorování oxidačního stresu pomocí kapalinové chromatografie*. Chemagazín, 2007, 17(5), 8-11.

KARTAL OZER, N., NEGIS, Y., AYTAN, N.: *Molecular mechanisms of cholesterol or homocysteine effect in the development of atherosclerosis: Role of vitamin E*. Biofactors, 2003, 19(1-2), 63-67.

KIECHL, P., WILLEIT, J.: *The natural course of atherosclerosis. Part II: Vascular Remodeling*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19, 1484-1490.

KIECHL, P., WILLEIT, J.: *The natural course of atherosclerosis. Part I: Incidence and Progression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19, 1484-1490.

KRÁLOVÁ LESNÁ, I., KOVÁŘ, R., POLEDNE, R.: *Reverzní transport cholesterolu*. Cor Vasa, 2006, 48(3), 114-120.

LANDVIK, S. V., DIPLOCK, A. T., PACKER, L.: *Efficacy of vitamin E in human : Health and disease*. In CADEMÁS, E., PACKER, L. *Handbook of antioxidants*. 2nd rev. edition. USA : Routledge, 2002. s. 75-91. ISBN 978-0-8247-05.

LEE, K. W. J., HILL, J. S., WALLEY, K. R., FROHLICH, J. J.: *Relative value of multiple plasma biomarkers as risk factors for coronary artery disease and death in an angiography cohort*. CMAJ, 2006, 174(4), 461-466.

LIAO, D., TAN, H., HUI, R., LI, Z., JIANG, X., GAUBATZ, J., A KOL.: *Hyperhomocysteinemia decreases circulating high-density lipoprotein by inhibiting apolipoprotein A-I proteinsynthesis and enhancin HDL cholesterol clearance*. Circ Res, 2006, 99, 598-606.

LIAO, D., YANG, X., WANG, Y.: *Hyperhomocysteinemia and high-density lipoprotein metabolism i cardiovascular disease*. Clin. Chem. Lab. Med., 2007, 45 (12), 1652-1659, Review.

LINNEBANK, M., MOSKAU, S., FARMAND, S. A KOL.: *Homocysteine and carotid intima-media thickness in a german population: lack of clinical relevance*. Stroke, 2006, 37(11), 2840-2.

LOBO, A. L., NASO, A., ARHEART, K., KRUGER, W. D., ABOU-GHAZALA, T., ALSOUS, F., NAHLAWI, M., GUPTA, A., MOUSTAPHA, A., VAN LENTE, F., JACOBSEN, D.W., ROBINSON, K.: *Reduction of homocysteine levels in coronary artery disease by low-dose folic acid combined with vitamins B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub>*. Am J Cardiol, 1999, 83, 821-825.

- MAJORS, A., EHRHART, L. A., PEZACKA, E.: *Homocysteine as a risk factor for vascular disease, enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 1997, 17(10), 2074-81.
- MANSOOR, M. A., BERGMARK, C., SVARDAL, A. M., LØNNING, P. E., UELAND, P. M.: *Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 1995, 15(2), 232-40.
- MASOPUST, J.: *Klinická biochemie*. Karolinum, UK, Praha 1998.
- MASOPUST, J.: *Ptobiochemie buňky*. Karolinum, UK, Praha, 2003, 85-105.
- MAZZA, A., BOSSONE, E., MAZZA, F., DISTANTE, A.: *Reduced serum homocysteine levels in type 2 diabetes*. *Nutrition, Metabolism&Cardiovascular Diseases* 2005, 15, 118-124.
- MC KINLEY, M. C., MC NULTY, H., MC PARTLIN, J., STRAIN, J. J., PANTIEVA, K., WARD, M., WEIR, D. G., SCOTT, J. M.: *Low-dose vitamin B-6 efficiency lowers fasting plasma homocysteine in healthy elderly persons who are folate and riboflavin replete*. *Am J Clin Nutr*, 2001, 73, 759-764.
- MCCULLY, K. S.: *Vascular Pathology of Homocysteinemia: Implications for the Pathogenesis of Arteriosclerosis*. *Homocysteinemia*, 1969, 56(1), 111-128.
- MELENOVSKY, V., STULC, T., KOZICH, V. a kol: *Effect of folic acid on fenofibrate-induced elevation of homocysteine and cysteine*. *Am Heart J*, 146, 2003.
- MILLS, B. J., WEISS, M. M., LANG, C.A., LIU, M.C., ZIEGLER, C.: *Blood glutathione and cysteine changes in cardiovascular disease*. *Lab Clin Med.*, 2000, 5(135), 396-401.
- MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W.: *Harperova biochemie*. 2. čes vyd. Praha: H&H, 1998, s. 262-278. ISBN 80-85787-38-5.
- NAMEKATA, K., ENOKIDO, Y., ISHII, I., NAGAI, Y., HARADA, T., KIMURA, H.: *Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia*. *J Biol Chem*, 2004, 279, 52961-9.
- NDREPPA, G., KASTRATI, A., BRAUN, S., KOCH, W., KÖLLING, K., MEHILLI, J., SCHÖMIG, A.: *Circulating homocysteine levels in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Nutrition, Metabolism&Cardiovascular Diseases*, 2008, 18, 66-73.
- NILSSON, S. E., EVRIN, P. E., TRYDING, N., BERG, S., MCCLEARN, G., JOHANSSON, B.: *Biochemical values in persons older than 82 years of age: report from a population-based study of twins*. *Scand J Clin Lab Invest.*, 2003, 63(1), 1-13.

NOLIN, T. D., MCMENAMIN, M. E., HIMMELFARB, J.: *Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: Application to studies of oxidative stress.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci., 2007, 852(1-2), 554-61.

NYGÅRD, O., VOLLSET, S.E., REFSUM, H., BRATTSTRÖM, L., UELAND, P. M.: *Total homocysteine and cardiovascular disease.* Journal of internal medicine, 1999, 246, 425-454.

PARTHASARATHY, S.: *Oxidants and antioxidants in atherogenesis: appraisal.* J Lipid Res, 1999, 40, 2143-2157, ISSN 1539-7262.

PIOVESAN, F., VERONESE, F. J., SANTOS, A. F., POZZA, R., SARTURI, P. S., TOGNON, A., GARCIA, V. D., KEITEL, E., SAITOVITCH, D.: *Serum homocysteine levels in renal transplant recipients with and without hypercholesterolemia.* Arq Bras Cardiol., 2007, 89(3), 154-9, 170-5.

PŘISTOUPILOVÁ, K., PŘISTOUPIL T. I.: *Homocystein, jeho úloha v buněčné energetice.* Sborník symposia Atherosklerosa, Hyperhomocysteinemie 2002, 2002, 65-68.

PŘISTOUPILOVÁ, K., PŘISTOUPIL T. I.: *The key role of S-adenosylmethionone and its dissociates in general metabolism and in considerations on hyperhomocysteinemia.* Klin Biochem Metab, 2000, 8, 252-257.

QUJEQ, D., OMRAN, T. S., HOSINI, L.: *Correlation between total homocysteine, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in the serum of patients with myocardial infarction.* Clin Biochem, 2001, 34, 97-101.

RACEK, J. a kol.: *Klinická biochemie.* 1. vyd. Praha: Galén, 1999, ISBN: 80-7262-023-1.

RACEK, J., HOLEČEK, V.: *Enzymy a volné radikály.* Chem. Listy, 1999, 93, 774 – 780.

RADER, D. J., ALEXANDER, E. T., WEIBEL, G. L., BILLHEIMER, J., ROTHBLAT, G. H.: *Role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis.* Journal of lipid research, 2008, doi:10.1194/jlr.R800088-JLR200, (article in press).

RIDKER, P. M., BROWN, N. J., VAUGHAN, D. E., HARRISON, D. G., MEHTA, J. L.: *Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events.* Circulation, 2004, 25(109), 6-19.

RIDKER, P. M., SHIH, J., COOK, T. J., CLEARFIELD, M., DOWNS, J. R., PRADHAN, A. D., WEIS, S. E., GOTTO, A. M.: *Plasma Homocysteine Concentration, Statin Therapy, and the Risk of First Acute Coronary Events.* Circulation, 2002, 105, 1776-1779.

RUCKI, Š., STROŽICKÝ, F.: *Prevence nemocí oběhové soustavy v pediatrii.* Triton 2003, ISBN: 80-7254-388-1.

SAW, S. – M., YUAN, J. – M., ONG, C. – N., ARAKAWA, K., LEE, H. – P., COETZEE, G. A., YU, M. C.: *Genetic dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-aged and older Chinese men and women in Singapore.* Am J Clin Nutr, 2001, 73, 232-239.

SCANU, A. M., FLESS, G. M.: *Lipoprotein (a), Heterogeneity and Biological Relevance;* J. Clin. Invest. 1990, 85, 1709-1715.

SJÖBERG, B., ANDERSTAM, B., SULIMAN, M., ALVESTRAND, A.: *Plasma reduced homocysteine and other aminothiols concentrations in patients with CKD.* American journal of kidney diseases, 2006, 47 (1), 60-71.

SPENCER, T. A., CHAI, H., FU, W., RAMASWAMI, G., COX, M. W., CONKLIN, B., LIN, P. H., LUMSDEN, A. B., YAO, Q., CHEN, C.: *Estrogen blocks homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronar arteries.* Journal of Surgical Research, 2004, 118(1), 83-90.

STAMPFER, M. J., MALINOW, M. R., WILLET, W. C., NEWCOMER, L. M., UPSON, B., ULLMANN, D., A KOL.: *A prosspective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians.* J Am Med Assoc, 1992, 268, 877-881.

SULIMAN, M. E., DIVIN FILHO, J. C., BÀRÀNY, P., ANDERSTAM, B., LINDHOLM, B., BERGSTRÖM, J.: *Effects of High-Dose Folic Acid and Pyridoxine on Plasma and Erythrocyte Sulfur Amino Acids in Hemodialysis Patients,* J Am Soc Nephrol., 1999, 10, 1287-1296.

ŠTÍPEK, S. A KOL.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci.* Grada Publishing, spol. s. r. o., 2000, 120–122.

TAES, Y. E., DELANGHE, J. R., DE BACQUER, D., LANGLOIS, M., STEVENS, L., GEEROLF, I., LAMEIRE, N. H., DE VRIESE, A. S.: *Creatine supplementation does not decrease total plasma homocysteine in chronic hemodialysis patients.* Kidney Int., 2004, 66(6), 2422-8.

TRIGATTI, B., RAYBURN, H., VINALS, M., BRAUN, A., MIETTIEN, H., PENMAN, M., HERTZ, M., SCHRENZEL M., AMIGO L, RIGOTTI A, KRIEGER M: *Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 9322-9327.

TSAI, J., PERRELLA, M., YOSHIKUMI, M., HSIEH, C., HABER, E., SCHLEGEL, R., LEE, M.: *Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: A link to atherosclerosis.* Medical Sciences 1994, 91, 6369-6373.

UELAND, P. M., MANSOOR, A. M., GOTTFORMSEN, A. B., MULLER, F., AUKRUST, P., REFSUM, H., SVARDAL, A.: *Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status: A possible element of the extracellular antioxidant defence system.* American Institute of Nutrition, 1996, 126(4), 1281-1285.



- UELAND, P. M., REFSUM, H., STABLER, S. P., MALINOW, M. R., ANDERSSON, A., ALLEN, R. H.: *Total homocyst(e)ine in plasma or serum: methods and clinical applications*. Clin chem, 1993, 39, 1764-1779.
- VAN DEN BRANDHOF, W. E., HAKS, K., SCHOUTEN, E. G., VERHOEF, P.: *The relation between plasma cysteine, plasma homocysteine and coronary atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2001, 157, 403-409.
- VAN OIJEN, M. G., CLAESSEN, B. E., CLAPPERS, N., VAN SCHAİK, A., LAHEIJ, R. J., JANSEN, J. B., PETERS, W. H., VERHEUGT, F. W.: *Prognostic value of free plasma homocysteine levels in patients hospitalized with acute coronary syndrome*. Am J Cardiol., 2008, 102(2), 135-9.
- VOET, D., VOETOVÁ, J.: *Biochemie*. 1. čes. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995, S. 332, 333. ISBN 80-85605-44-9.
- VOKURKA, M., HUGO, J., a kol.: *Velký lékařský slovník*. 4 vyd. Praha: Maxdorf, 2004, ISBN 80-7345-037-2.
- VON ECKARDSTEIN, A., NOFER, J. R., ASSMANN, G.: *High density lipoproteins and arteriosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2001 21:13–27.
- WANG, H., JIANG, X., GAUBETZ, J. W., MA, L., MAGERA, M. J., a kol.: *Hyperhomocysteinemia accelerates atherosclerosis in cystathionine beta synthase and apolipoprotein E double knock-out mice with and without dietary perturbation*. Blood, 2003, 101, 3901-3907.
- WANG, N., LAN, D., CHEN, W., MATSUURA, F., TALL, A. R.: *ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins*. PNAS, 2004, 101 (26) 9774–9779.
- WELCH, G. N., LOSCALZO, J.: *Homocysteine and atherothrombosis*. The New England Journal of Medicine, 1998, 238(15), 1042-1050, Review.
- WERSTUCK, G. H., LENTZ, S. R., DAYAL, S., HOSSIAN, G. S., SOOD, S. K., SHI, Y. Y., a kol.: *Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways*. J Clin Invest, 2001, 107, 1263-1273.
- WIKLUND, O., FAGER, O., ANDERSSON, A., LUNDSTAM, U., MASSON, P., HULTBERG, B.: *N-acetylcysteine lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a)*. Atherosclerosis , 1995, 119(1996), 99-106.
- WILLIAMS, R. H., MAGGIORE, J. A., REYNOLDS, R. D., HELGASON, C. M.: *Novel approach for the determination of the redox status of homocysteine and other amino thiols in plasma from healthy subjects and patients with ischemic stroke*. Clin chem, 2001, 47(6), 1031-1039.

WOLLESEN, F., BRATTSTRÖM, L., REFSUM, H., UELAND, P. M., BERGLUND, L., BERNE, C.: *Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus*. *Kidney International* 1990, 55, 1028-1035.

WOO, C. W., SIOW, Y. L., PIERCE, G. N., CHOY, P. C., MINUK, G. Y., MYMIN, D., a kol.: *Hyperhomocysteinemia induces hepatic cholesterol biosynthesis and lipid accumulation via activation of transcription factors*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288, E1002-1010.

WOODSIDE, J. V., YARNELL, J. W. G., MCMASTER, D., YOUNG, I. S., HARMON, D. L., MCCRUM, E. E., PATTERSON, C. C., GEY, K. G., WHITEHEAD, A. S., EVANS, A.: *Effect of B-group vitamins and antioxidant vitamins on hyperhomocysteinemia: a double-blind, randomized factorial-design, controlled trial*. *Am J Clin Nutr*, 1998, 67, 858-866.

ZIMA, T.: *Laboratorní diagnostika*. 1. vyd. Praha: Galén, 2002, s. 155-159. ISBN: 80-7262-201-3.

ZINELLU, A., ZINELLU, E., SOTGIA, S., FORMATO, M., CHERCHI, G. M., DEIANA, L., CARRU, C.: *Factors Affecting S-Homocysteinylation of LDL Apoprotein B*. *Clinical Chemistry*, 2006, 52(11), 2054–2059.

ŽÁKOVÁ, P., KANĎÁR, R.: *Využití HPLC v monitorování méně známých rizikových faktorů aterosklerózy*. *Chemagazín*, 2006, roč. 16, č. 2, s. 8-9.

ŽÁKOVÁ, P., KANĎÁR, R., ŠKARYDOVÁ, L., SKALICKÝ, J., MYJAVEC, A., VOJTÍŠEK, P.: *Ubiquinol-10/lipids ratios in consecutive patients with different angiographic findings*. *Clinica chemica acta*, 2007, 380, 133-138.

## **PŘÍLOHA**

## Charakteristika lipidového spektra u všech pacientů

Pacient	Cholesterol	TG	HDL	LDL	Index aterogenity
1	3,567	0,992	0,887	2,229	3,020
2	4,208	1,911	0,932	2,409	3,516
3	3,734	1,944	0,894	1,958	3,176
4	3,037	0,828	0,616	2,046	3,933
5	3,288	1,058	0,776	2,032	3,236
6	4,054	0,943	1,659	1,968	1,444
7	3,887	1,361	1,092	2,177	2,559
8	5,364	2,649	1,042	3,120	4,148
9	3,037	0,976	0,550	2,044	4,523
10	4,486	2,026	1,588	1,979	1,825
11	4,430	0,672	0,958	3,168	3,625
12	4,626	1,968	1,208	2,525	2,828
13	3,595	1,798	0,699	2,080	4,144
14	4,013	1,845	1,017	2,159	2,946
15	5,489	1,854	1,193	3,455	3,602
16	5,183	1,777	1,144	3,232	3,529
17	4,458	2,670	1,090	2,157	3,089
18	5,239	3,078	1,562	2,280	2,354
19	4,361	3,059	1,000	1,973	3,359
20	3,553	2,138	0,737	1,846	3,824
21	5,336	1,034	0,984	3,883	4,423
22	5,322	1,757	1,166	3,359	3,566
23	5,517	1,274	1,123	3,816	3,912
24	3,804	2,422	0,886	1,818	3,291
25	4,584	2,133	1,102	2,514	3,160
26	3,344	1,349	1,060	1,671	2,154
27	3,678	0,933	1,235	2,020	1,978
28	2,982	1,268	0,743	1,663	3,011
29	3,650	1,194	0,653	2,455	4,587
30	4,904	0,778	0,969	3,583	4,064
31	3,218	1,275	0,568	2,072	4,663
32	4,946	1,046	0,915	3,556	4,403
33	4,235	1,270	0,727	2,932	4,827
34	5,071	1,043	0,811	3,787	5,254
35	4,667	1,470	0,932	3,069	4,009

**Příloha 1** Hodnoty jsou uvedeny v mmol/l

Charakteristika renální funkce u všech pacientů

Pacient	Močovina (mmol/l)	Kyselina močová (μmol/l)	Kreatinin (μmol/l)
1	7,676	440,521	61,857
2	14,220	301,489	110,286
3	6,846	166,023	72,571
4	7,123	148,198	92,143
5	6,795	216,950	20,714
6	6,015	484,827	93,571
7	7,701	461,299	133,714
8	9,086	221,710	121,571
9	14,421	325,412	119,714
10	4,304	302,765	170,429
11	17,769	272,965	113,429
12	5,612	238,993	92,714
13	20,512	375,265	111,714
14	6,795	332,923	83,857
15	8,708	166,047	91,429
16	9,614	266,505	82,714
17	11,653	217,521	117,857
18	4,430	528,858	147,143
19	7,878	310,884	152,714
20	6,493	508,864	135,000
21	1,820	377,673	94,286
22	5,922	651,982	133,143
23	3,714	496,143	101,286
24	4,223	531,922	49,286
25	2,549	387,150	97,857
26	4,685	204,196	60,571
27	5,534	284,367	84,714
28	7,670	261,069	110,286
29	6,044	472,117	90,429
30	7,573	555,029	97,857
31	5,170	361,771	82,714
32	6,966	417,428	84,286
33	7,597	541,463	60,143
34	4,053	408,682	68,143
35	6,942	647,212	108,429

**Příloha 2** Jednotky jsou uvedeny v závorce

Naměřené hodnoty celkových aminioliů u všech pacientů

Pacient	tCys	tHcy	tCG	tMet
1	509,256	36,112	52,868	18,298
2	454,038	14,082	44,307	23,508
3	420,931	20,671	25,973	30,502
4	374,241	13,001	42,951	38,423
5	387,399	16,122	42,528	33,943
6	454,020	19,478	27,927	22,208
7	378,278	19,612	36,726	25,900
8	463,551	21,557	39,768	33,343
9	567,620	28,051	32,995	26,318
10	320,190	14,227	37,796	22,739
11	458,396	32,547	37,610	30,882
12	339,025	17,300	50,382	33,711
13	505,087	29,357	53,223	29,019
14	349,996	21,059	53,018	35,207
15	414,717	22,787	36,386	22,142
16	400,434	19,697	35,296	25,229
17	597,608	42,443	31,535	17,773
18	299,139	16,026		29,279
19	305,341	10,121		22,963
20	375,871	14,122	43,881	45,285
21	403,635	21,955	36,658	26,844
22	409,010	22,102	37,496	28,856
23	317,540	19,121	37,678	22,682
24	362,219	12,363	46,972	36,496
25	494,034	19,231	51,307	48,488
26	419,774	13,960	40,820	42,396
27	387,644	14,052	44,951	36,548
28	459,017	20,564	46,525	37,256
29	466,349	24,182	50,412	36,235
30	421,908	46,807	42,234	29,676
31	379,298	14,401	48,215	35,381
32	424,283	18,284	45,603	25,851
33	361,989	25,555	33,561	21,302
34	301,540	10,292	36,280	31,341
35	380,994	31,936	32,808	22,963

**Příloha 3** Hodnoty jsou uvedeny v  $\mu\text{mol/l}$

Naměřené hodnoty vitamínu E a zjištěný poměr vit E ku LDL u všech pacientů

Pacient	Koncentrace vit E ( $\mu\text{mol/l}$ )	Vit E/LDL-C
1	21,657	9,716
2	29,979	12,446
3	18,650	9,525
4	23,193	11,337
5	20,502	10,091
6	25,934	13,180
7	23,449	10,770
8	44,766	14,348
9	18,089	8,848
10	24,990	12,628
11	18,878	5,959
12	19,387	7,679
13	18,396	8,844
14	17,690	8,195
15	24,312	7,036
16	24,918	7,709
17	31,906	14,793
18	23,085	10,125
19	28,388	12,135
20	24,267	14,126
21	23,937	6,165
22	26,082	7,765
23	29,882	7,831
24	22,669	12,469
25	22,700	9,029
26	21,375	12,789
27	24,586	12,174
28	15,367	9,241
29	19,423	7,911
30	20,610	5,753
31	18,313	8,840
32	19,561	5,501
33	18,150	6,190
34	18,285	4,828
35	20,222	6,590

**Příloha 4** Jednotky jsou uvedeny v závorce

Naměřené hladiny glukózy, albuminu, celkové bílkoviny a apoproteinu A-I

Pacient	Glc (mmol/l)	Alb (g/l)	CB (g/l)	ApoA-I (g/l)
1	5,724	38,041	64,286	1,196
2	10,484	42,671	76,446	1,363
3	5,077	46,026	63,032	1,292
4	6,443	41,928	64,669	1,037
5	6,467	40,715	63,925	1,184
6	10,081	46,645	77,828	1,670
7	5,899	43,141	79,805	1,291
8	6,533	48,348	77,828	1,443
9	7,347	38,851	67,177	0,971
10	5,595	36,561	70,812	1,357
11	6,484	44,299	70,536	1,270
12	12,390	45,772	67,815	1,138
13	7,413	36,091	70,557	1,134
14	7,889	67,080	77,275	1,295
15	11,054	43,488	71,131	1,387
16	4,979	28,557	61,926	1,319
17	7,831	43,804	69,027	1,164
18	6,735	58,995	77,105	1,493
19	14,546	36,809	58,440	1,256
20	5,904	47,561	80,060	0,966
21	6,330	42,733	79,720	1,159
22	5,420	40,733	68,453	1,335
23	5,685	42,058	67,602	1,398
24	5,750	46,596	66,050	1,153
25	5,760	51,319	73,725	1,292
26	9,240	43,476	44,579	1,310
27	5,602	45,017	74,575	1,293
28	5,662	41,043	72,237	1,019
29	5,546	48,713	75,723	1,029
30	5,236	42,962	64,414	1,179
31	4,743	36,363	66,539	0,935
32	6,565	33,491	71,748	1,128
33	5,700	42,355	69,920	1,194
34	5,347	42,566	63,478	1,154
35	4,955	38,951	68,708	1,316

**Příloha 5** Jednotky jsou uvedeny v závorce



Korelační analýza v celém souboru pacientů (1. část)

	Věk	BMI	TC	TG	HDL	Vit E	Močovina	Kyselina močová	LDL	Kreatinin
Věk		-0,088	-0,163	-0,240	-0,019	-0,029	<b>0,616</b>	-0,108	-0,101	0,217
BMI	-0,088		-0,103	0,129	0,000	0,067	0,003	-0,042	-0,159	0,210
TC	-0,163	-0,103		0,248	<b>0,609</b>	<b>0,421</b>	-0,169	0,235	<b>0,783</b>	0,222
TG	-0,240	0,129	0,248		0,290	0,330	-0,039	-0,062	-0,197	<b>0,341</b>
HDL	-0,019	0,000	<b>0,609</b>	0,290		<b>0,568</b>	-0,253	-0,024	0,178	0,278
Vit E	-0,029	0,067	<b>0,421</b>	0,330	<b>0,568</b>		-0,045	-0,007	0,095	<b>0,405</b>
Močovina	<b>0,616</b>	0,003	-0,169	-0,039	-0,253	-0,045		-0,300	-0,011	0,234
Kyselina močová	-0,108	-0,042	0,235	-0,062	-0,024	-0,007	-0,300		0,278	0,133
LDL	-0,101	-0,159	<b>0,783</b>	-0,197	0,178	0,095	-0,011	0,278		0,003
Kreatinin	0,217	0,210	0,222	0,341	0,278	<b>0,405</b>	0,234	0,133	0,003	
Glc	0,217	0,248	-0,008	0,245	0,207	0,156	0,290	<b>-0,341</b>	-0,158	0,210
Alb	-0,310	-0,012	0,095	0,256	0,280	0,123	-0,277	0,024	-0,091	0,023
CB	0,135	0,051	0,140	0,120	0,220	0,251	-0,034	0,227	0,075	<b>0,433</b>
tCys	<b>0,427</b>	0,019	-0,221	-0,215	-0,204	-0,010	<b>0,497</b>	-0,192	-0,024	0,038
tHcy	<b>0,398</b>	-0,155	0,154	-0,220	-0,086	-0,174	<b>0,479</b>	0,164	<b>0,379</b>	0,107
tCG	-0,035	-0,049	-0,337	0,073	-0,226	-0,215	-0,139	0,034	-0,168	-0,140
tMet	<b>-0,450</b>	-0,040	<b>-0,428</b>	-0,034	-0,276	-0,282	<b>-0,352</b>	-0,175	<b>-0,337</b>	-0,179
ApoA-1	0,131	-0,058	<b>0,558</b>	0,256	<b>0,765</b>	<b>0,535</b>	-0,064	0,009	0,196	0,170
IA	-0,061	-0,134	0,132	-0,265	<b>-0,649</b>	-0,266	0,152	0,231	<b>0,512</b>	-0,115
Vit E/LDL	0,058	0,173	<b>-0,393</b>	<b>0,424</b>	0,153	<b>0,508</b>	0,032	-0,267	<b>-0,735</b>	0,258

**Příloha 6** Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu

Korelační analýza v celém souboru pacientů (2. část)

	Glc	Alb	CB	tCys	tHcy	tCG	tMet	ApoA-1	IA	Vit E/LDL
<b>Věk</b>	0,217	-0,310	0,135	<b>0,427</b>	<b>0,398</b>	-0,035	<b>-0,450</b>	0,131	-0,061	0,058
<b>BMI</b>	0,248	-0,012	0,051	0,019	-0,155	-0,049	-0,040	-0,058	-0,134	0,173
<b>TC</b>	-0,008	0,095	0,140	-0,221	0,154	-0,337	<b>-0,428</b>	<b>0,558</b>	0,132	<b>-0,393</b>
<b>TG</b>	0,245	0,256	0,120	-0,215	-0,220	0,073	-0,034	0,256	-0,265	<b>0,424</b>
<b>HDL</b>	0,207	0,280	0,220	-0,204	-0,086	-0,226	-0,276	0,765	<b>-0,649</b>	0,153
<b>Vit E</b>	0,156	0,123	0,251	-0,010	-0,174	-0,215	-0,282	<b>0,535</b>	-0,266	<b>0,508</b>
<b>Močovina</b>	0,290	-0,277	-0,034	<b>0,497</b>	<b>0,479</b>	-0,139	<b>-0,352</b>	-0,064	0,152	0,032
<b>Kyselina močová</b>	<b>-0,341</b>	0,024	0,227	-0,192	0,164	0,034	-0,175	0,009	0,231	-0,267
<b>LDL</b>	-0,158	-0,091	0,075	-0,024	<b>0,379</b>	-0,168	<b>-0,337</b>	0,196	<b>0,512</b>	<b>-0,735</b>
<b>Kreatinin</b>	0,210	0,023	<b>0,433</b>	0,038	0,107	-0,140	-0,179	0,170	-0,115	0,258
<b>Glc</b>		0,231	0,225	0,100	-0,115	0,120	-0,132	0,125	-0,281	0,308
<b>Alb</b>	0,231		<b>0,477</b>	-0,008	-0,027	0,078	<b>0,388</b>	0,222	-0,298	0,266
<b>CB</b>	0,225	<b>0,477</b>		0,122	0,121	0,148	0,044	0,144	-0,111	0,168
<b>tCys</b>	0,100	-0,008	0,122		<b>0,599</b>	0,053	-0,048	-0,136	0,088	0,091
<b>tHcy</b>	-0,115	-0,027	0,121	<b>0,599</b>		-0,209	<b>-0,398</b>	0,002	0,243	<b>-0,368</b>
<b>tCG</b>	0,120	0,078	0,148	0,053	-0,209		<b>0,524</b>	<b>-0,360</b>	-0,083	0,066
<b>tMet</b>	-0,132	<b>0,388</b>	0,044	-0,048	<b>-0,398</b>	<b>0,524</b>		<b>-0,393</b>	-0,026	0,129
<b>ApoA-1</b>	0,125	0,222	0,144	-0,136	0,002	<b>-0,360</b>	<b>-0,393</b>		<b>-0,447</b>	0,181
<b>IA</b>	-0,281	-0,298	-0,111	0,088	0,243	-0,083	-0,026	<b>-0,447</b>		<b>-0,553</b>
<b>Vit E/LDL</b>	0,308	0,266	0,168	0,091	<b>-0,368</b>	0,066	0,129	0,181	<b>-0,553</b>	

**Příloha 7** Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu

Korelační analýza v souboru s vyloučením DM a HLP (1. část)

	Věk	BMI	TC	TG	HDL	Vit E	Močovina	Kyselina močová	LDL	Kreatinin
Věk		<b>-0,520</b>	-0,032	-0,198	-0,052	-0,097	<b>0,632</b>	-0,143	-0,035	-0,018
BMI	<b>-0,520</b>		-0,054	0,233	0,110	0,045	<b>-0,493</b>	0,187	-0,171	-0,005
TC	-0,032	-0,054		0,168	<b>0,678</b>	<b>0,466</b>	-0,252	0,244	<b>0,805</b>	0,259
TG	-0,198	0,233	0,168		<b>0,463</b>	0,282	-0,202	-0,033	-0,381	0,419
HDL	-0,052	0,110	<b>0,678</b>	<b>0,463</b>		0,383	-0,306	0,125	0,313	0,370
Vit E	-0,097	0,045	<b>0,466</b>	0,282	0,383		-0,147	0,156	0,170	<b>0,502</b>
Močovina	<b>0,632</b>	<b>-0,493</b>	-0,252	-0,202	-0,306	-0,147		-0,375	-0,180	-0,136
Kyselina močová	-0,143	0,187	0,244	-0,033	0,125	0,156	-0,375		0,311	0,414
LDL	-0,035	-0,171	<b>0,805</b>	-0,381	0,313	0,170	-0,180	0,311		-0,041
Kreatinin	-0,018	-0,005	0,259	0,419	0,370	<b>0,502</b>	-0,136	0,414	-0,041	
Glc	0,209	-0,033	-0,039	0,265	0,074	-0,177	0,162	-0,290	-0,126	0,123
Alb	-0,250	0,235	0,134	<b>0,477</b>	0,164	-0,123	-0,220	0,042	-0,054	0,195
CB	0,011	-0,092	0,200	<b>0,496</b>	0,214	0,308	-0,217	0,199	-0,048	<b>0,630</b>
tCys	<b>0,614</b>	<b>-0,555</b>	-0,155	-0,177	-0,302	-0,072	<b>0,565</b>	-0,084	-0,027	-0,094
tHcy	<b>0,775</b>	<b>-0,501</b>	0,181	-0,349	0,006	-0,113	<b>0,530</b>	0,132	0,326	-0,035
tCG	0,151	0,105	<b>-0,528</b>	0,132	-0,275	-0,216	0,063	0,172	-0,428	0,113
tMet	<b>-0,480</b>	0,405	<b>-0,472</b>	0,197	-0,387	-0,287	-0,115	-0,177	-0,399	-0,018
ApoA-1	0,190	0,033	<b>0,632</b>	0,385	<b>0,723</b>	0,421	-0,038	0,039	0,221	0,260
IA	0,016	-0,278	0,214	-0,418	<b>-0,523</b>	0,102	0,149	0,057	<b>0,474</b>	-0,020
Vit E/LDL	-0,037	0,209	-0,397	<b>0,550</b>	-0,098	0,374	0,026	-0,171	<b>-0,756</b>	0,289

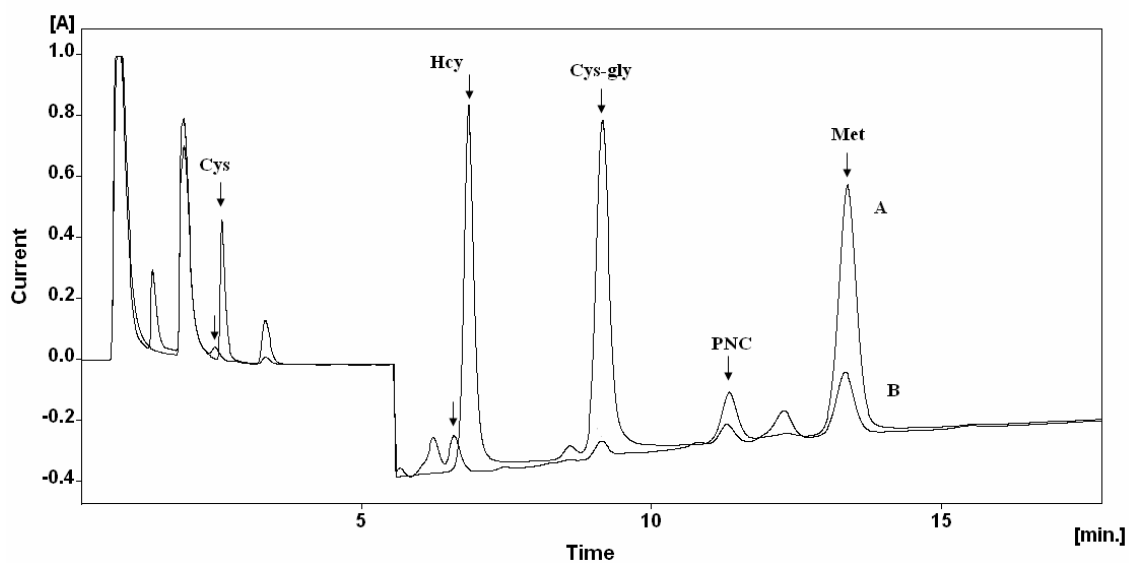
**Příloha 8** Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu

Korelační analýza v souboru s vyloučením DM a HLP (2. část)

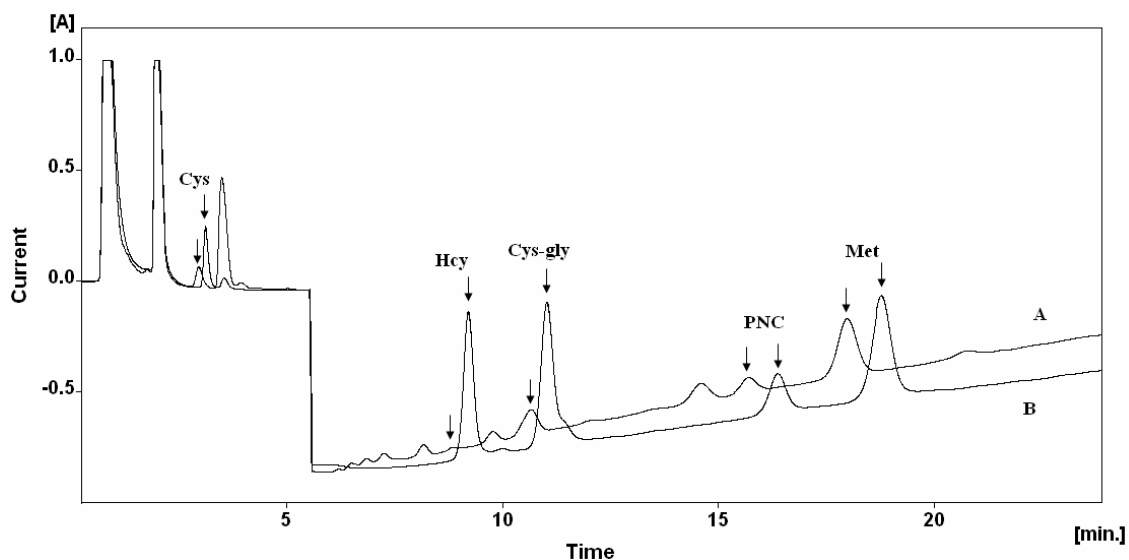
	Glc	Alb	CB	tCys	tHcy	tCG	tMet	ApoA-1	IA	Vit E/LDL
<b>Věk</b>	0,209	-0,250	0,011	<b>0,614</b>	<b>0,775</b>	0,151	<b>-0,480</b>	0,190	0,016	-0,037
<b>BMI</b>	-0,033	0,235	-0,092	<b>-0,555</b>	<b>-0,501</b>	0,105	0,405	0,033	-0,278	0,209
<b>TC</b>	-0,039	0,134	0,200	-0,155	0,181	<b>-0,528</b>	<b>-0,472</b>	<b>0,632</b>	0,214	-0,397
<b>TG</b>	0,265	<b>0,477</b>	<b>0,496</b>	-0,177	-0,349	0,132	0,197	0,385	-0,418	<b>0,550</b>
<b>HDL</b>	0,074	0,164	0,214	-0,302	0,006	-0,275	-0,387	<b>0,723</b>	<b>-0,523</b>	-0,098
<b>Vit E</b>	-0,177	-0,123	0,308	-0,072	-0,113	-0,216	-0,287	0,421	0,102	0,374
<b>Močovina</b>	0,162	-0,220	-0,217	<b>0,565</b>	<b>0,530</b>	0,063	-0,115	-0,038	0,149	0,026
<b>Kyselina močová</b>	-0,290	0,042	0,199	-0,084	0,132	0,172	-0,177	0,039	0,057	-0,171
<b>LDL</b>	-0,126	-0,054	-0,048	-0,027	0,326	-0,428	-0,399	0,221	<b>0,474</b>	<b>-0,756</b>
<b>Kreatinin</b>	0,123	0,195	<b>0,630</b>	-0,094	-0,035	0,113	-0,018	0,260	-0,020	0,289
<b>Glc</b>		0,384	<b>0,556</b>	-0,018	0,062	<b>0,511</b>	0,232	-0,032	-0,125	0,123
<b>Alb</b>	0,384		<b>0,544</b>	-0,087	-0,077	0,126	<b>0,540</b>	0,174	-0,152	0,092
<b>CB</b>	<b>0,556</b>	<b>0,544</b>		0,006	0,026	0,340	0,199	0,128	0,020	0,284
<b>tCys</b>	-0,018	-0,087	0,006		<b>0,768</b>	0,209	-0,081	-0,101	0,199	-0,018
<b>tHcy</b>	0,062	-0,077	0,026	<b>0,768</b>		0,060	-0,427	0,132	0,141	-0,381
<b>tCG</b>	<b>0,511</b>	0,126	0,340	0,209	0,060		0,397	-0,379	-0,249	0,395
<b>tMet</b>	0,232	<b>0,540</b>	0,199	-0,081	-0,427	0,397		-0,439	0,033	0,247
<b>ApoA-1</b>	-0,032	0,174	0,128	-0,101	0,132	-0,379	-0,439		-0,344	0,143
<b>IA</b>	-0,125	-0,152	0,020	0,199	0,141	-0,249	0,033	-0,344		-0,311
<b>Vit E/LDL</b>	0,123	0,092	0,284	-0,018	-0,381	0,395	0,247	0,143	-0,311	

**Příloha 9** Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu

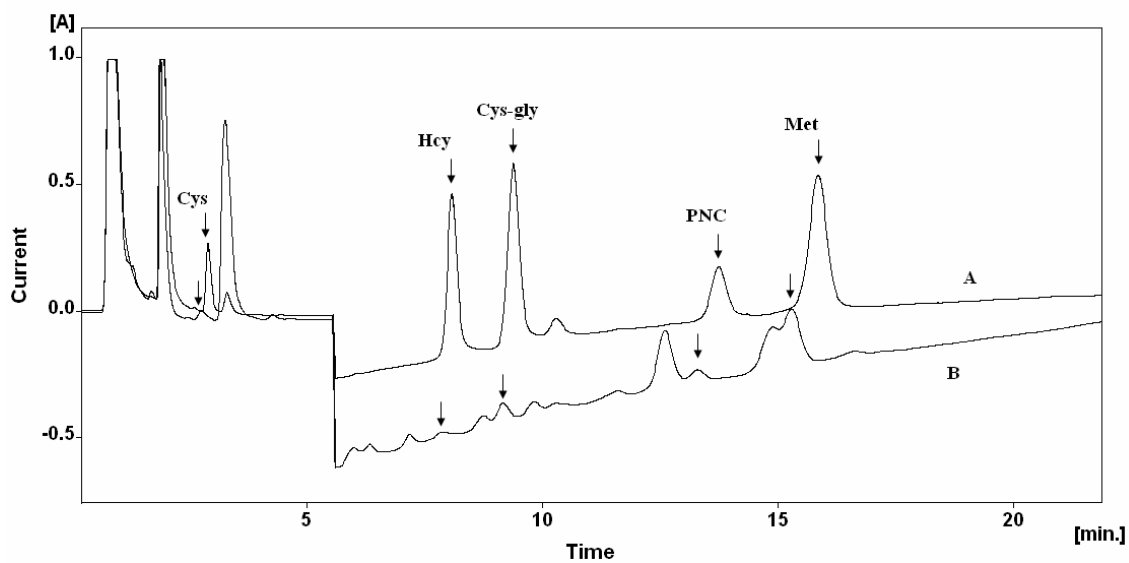
## Záznamy vzorků a kalibračních roztoků volných aminioliů



**Příloha 10** Chromatografický záznam vzorku volných aminioliů č. 2 (B) a kalibračního roztoku o koncentraci Cys 125  $\mu\text{mol/l}$ , Hcy 50  $\mu\text{mol/l}$ , Cys-gly 50  $\mu\text{mol/l}$ , Met 125  $\mu\text{mol/l}$  (A), pH mobilní fáze 2,82, dávkování 10  $\mu\text{l}$



**Příloha 11** Chromatografický záznam vzorku volných aminioliů č.15 (A) a kalibračního roztoku č. 1 o koncentraci Cys 50  $\mu\text{mol/l}$ , Hcy 20  $\mu\text{mol/l}$ , Cys-gly 20  $\mu\text{mol/l}$ , Met 50  $\mu\text{mol/l}$  (B), pH mobilní fáze 2,7, dávkování 15  $\mu\text{l}$



**Příloha 12** Chromatografický záznam vzorku volných aminosíroloch č. 25 (B) a kalibračního roztoku č. 1 o koncentraci Cys 50  $\mu\text{mol/l}$ , Hcy 20  $\mu\text{mol/l}$ , Cys-gly 20  $\mu\text{mol/l}$ , Met 50  $\mu\text{mol/l}$  (A), pH mobilní fáze 2,69, dávkování 15  $\mu\text{l}$

## Informovaný souhlas

### INFORMACE PRO ÚČASTNÍKY STUDIE

Vážená paní, vážený pane.

V současné době probíhá ve spolupráci s Katedrou biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice studie nazvaná „Ateroskleróza“. Tato výzkumná práce je zaměřena na sledování hladin látek, které se podílejí na vzniku a rozvoji aterosklerózy.

Veškeré potřebné informace a podrobnosti Vám budou sděleny.

Zátěž vyplývající ze zařazení do studie spočívá v odběru vzorku krve.

### PÍSEMNÉ PROHLAŠENÍ O SOUHLASU S ÚČASTÍ VE STUDII

Byl(a) jsem seznámen(a) s cílem a obsahem studie „Ateroskleróza“ a souhlasím se zařazením do tohoto projektu.

Údaje o mé osobě budou předávány třetím osobám pouze v anonymní formě, bez uvedení mého jména a data narození.

Přeji/Nepřeji si být po skončení studie informován(a) o jejích závěrech.

V Novém Jičíně dne:

Podpis účastníka studie:

Se získanými údaji bude nakládáno jako s ochraňovanými skutečnostmi a tyto údaje budou využity pouze pro potřeby studie.

Jména a podpisy řešitelů studie:

MUDr. Vladimír Maňásek

V Novém Jičíně dne:

Bc. Hana Hrabovská

V Pardubicích dne:

Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.

V Pardubicích dne:

**Příloha 13** *Informovaný souhlas předkládaný všem pacientům účastnícím se studie k podpisu*