

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**VYUŽITÍ HPLC/ED K MONITOROVÁNÍ NĚKTERÝCH KLINICKY
VÝZNAMNÝCH SÍRNÝCH SLOUČENIN**

DISERTAČNÍ PRÁCE

VEDOUCÍ PRÁCE:
prof. Ing. Karel Ventura, CSc.

AUTOR PRÁCE:
Mgr. Soňa Sechovcová

2018

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY

**USE OF HPLC/ED TO MONITORING SOME CLINICALLY IMPORTANT
SULPHUR COMPOUNDS**

THESIS

SUPERVISOR:

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.

AUTHOR:

Mgr. Soňa Sechovcová

2018

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. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 25. 6. 2018

Mgr. Soňa Sechovcová

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. Ing. Karlu Venturovi, CSc., Mgr. Pavle Královcové, Ph.D. a doc. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc během celého doktorského studia.

Děkuji dobrovolným dárcům a pacientům za poskytnuté vzorky.

V neposlední řadě děkuji rodině, manželovi, přátelům a kolegyním z práce, kteří mi vytvořili příznivé podmínky k dokončení této práce.

Souhrn

Cílem této práce bylo (a) vyvinout vhodnou metodu pro stanovení endogenních hladin kyseliny lipoové, (b) ověřit, zda je tato metoda vhodná i pro stanovení hladin kyseliny lipoové po suplementaci, (c) určit cytotoxicitu kyseliny lipoové na erytrocyty, (d) ověřit význam homocysteinu jako biomarkeru v klinické praxi, získat obecný přehled o celkovém metabolismu methioninu u pacientů s onemocněním koronárních artérií a ověřit okamžitý vliv perkutánní koronární intervence na hladiny methioninu a jeho metabolitů.

(a) Cílem bylo vyvinout vhodnou metodu pro stanovení hladin volné kyseliny lipoové. Jedná se o vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s elektrochemickou detekcí. Vzorky krve byly získány od 40 dobrovolných dárců, kteří splňovali podmínky pro zapsání do registru dárců. Tito dárci nebyli suplementováni kyselinou lipoovou. Při stanovení kyseliny lipoové v plasmě byly vzorky krve odstředěny a získaná plasma byla deproteinována acetonitrilem. Po odstředění následovala extrakce na pevné fázi a kyselina lipoová byla eluována z kolony methanolem. Eluát byl odpařen do sucha v atmosféře dusíku. Odparek byl rozpuštěn ve směsi acetonitrilu a deionizované vody, po filtraci byl vzorek dávkován na analytickou kolonu s vázanou reverzní fází. Limit detekce a kvantifikace této metody byl 1,85 a 5,18 nmol/l. Dosáhli jsme nižší hodnoty meze detekce v porovnání s předchozími studii (2,4 a 4,9 nmol/l), které se zabývaly stanovením volné kyseliny lipoové u nesuplementovaných jedinců. Nicméně i přesto jsme hladiny kyseliny lipoové v plasmě u všech 40 dobrovolných dárců nedetekovali. Výsledky naší studie ukazují, že endogenní koncentrace volné kyseliny lipoové v plasmě jsou pravděpodobně nižší než 1,85 nmol/l.

(b) Tato metoda byla využita k ověření hladin kyseliny lipoové v plasmě u suplementovaných dobrovolných dárců a je tak vhodná pro studie zabývající se stanovením hladin kyseliny lipoové u suplementovaných pacientů.

(c) Byl sledován vliv kyseliny lipoové na životaschopnost (viabilitu) erytrocytů. Vzorky krve byly získány od dobrovolných nesuplementovaných dárců. Krev byla odstředěna při 750 x g, separované erytrocyty byly celkem 3x promyty fosfátovým pufrům, následně naředěny Ringerovým roztokem a dávkovány do 12- ti jamkových kultivačních destiček. K suspenzi erytrocytů byly přidány různě naředěné roztoky kyseliny lipoové. Inkubace probíhala 24 a 48 hodin při 37 °C. K stanovení viability

buněk byla použita metoda vylučování trypanové modři. Námi testované koncentrace kyseliny lipoové (1, 5 a 10 $\mu\text{mol/l}$) nezpůsobily ani po 48 hodinové inkubaci statisticky významné změny ve viabilitě ani počtu erytrocytů oproti kontrole. Také žádná z testovaných vysokých koncentrací (50, 100, 250 $\mu\text{mol/l}$) kyseliny lipoové nezpůsobila statisticky významné změny ve viabilitě erytrocytů. Na počet erytrocytů měly vysoké koncentrace statisticky významný vliv již po 24 hodinové inkubaci.

(d) Hladiny celkového homocysteinu, cysteinu, methioninu a cysteinyl-glycinu v plasmě byly stanoveny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s coulometrickou detekcí. Důvodem byla rychlá příprava vzorku bez nutnosti derivatizace a nižší finanční nároky oproti jiným metodám. Vzorky krve byly získány od 68 pacientů s prokázaným onemocněním koronárních artérií, kteří byli rozděleni do tří skupin dle stupně závažnosti onemocnění. Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v prevalenci diabetu, pre-diabetu a onemocnění ledvin mezi sledovanými skupinami, rovněž mezi kuřáky, nekuřáky či pacienty s normálním a zvýšeným krevním tlakem. Byly zjištěny signifikantní rozdíly v hladinách albuminu, celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu a stupně indexu aterogenity u sledovaných skupin pacientů. Byly zjištěny statisticky významně zvýšené hladiny homocysteinu u pacientů s akutní formou onemocnění v porovnání s pacienty trpící chronickou formou tohoto onemocnění. Naše výsledky podporují hypotézu, že homocystein nelze využít pro včasnou diagnostiku stenózy v koronárních arteriích, ale zdá se, že by mohl být dobrým biomarkerem závažnosti již prokázaného onemocnění koronárních artérií. Zvýšené hladiny homocysteinu korelují s nestabilitou onemocnění a nutností léčby. U pacientů, u nichž došlo k dokončení revaskularizace, statisticky významně poklesly hladiny cysteinu, cysteinyl-glycinu a methioninu před druhou intervencí v porovnání s pacienty mající akutní a chronickou formou onemocnění. Tento stav je pravděpodobně spojen se zvýšeným oxidačním stresem, kdy je preferována transsulfurační dráha, která zvyšuje spotřebu cysteinu. Zdá se tedy, že cystein hraje důležitější úlohu v organismu jako antioxidant než jako rizikový faktor u pacientů s onemocněním koronárních artérií. Z této skupiny pacientů bylo vybráno 44 pacientů, u kterých následovala po angiografii perkutánní koronární intervence. Vzorky krve byly odebírány ve třech časových bodech, před zákrokem, 24 a 48 hodin po intervenci. Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v hladinách homocysteinu a cysteinu před zákrokem, 24 a 48 hodin

po zákroku. Hladiny methioninu a cysteinyl-glycinu byly signifikantně vyšší 24 a 48 hodinách po intervenci ve srovnání s hladinami před zákrokem.

Klíčová slova: cytotoxicita; elektrochemická detekce; erytrocyty; homocystein; kyselina lipoová; onemocnění koronárních artérií; perkutánní koronární intervence; plasma; vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Summary

The aims of this thesis are: (a) the development of a suitable method for the determination endogenous levels of lipoic acid, (b) the verification of a possibility to use the method for determining the lipoic acid levels after supplementation, (c) the determination of lipoic acid cytotoxicity for erythrocytes, and (d) to verify the importance of homocysteine as a biomarker in clinical practice. Moreover, the aim is to obtain a general overview about the whole methionine metabolism for patients, suffering from coronary artery disease at different degrees of severity, as well as to verify the immediate effect of a percutaneous coronary intervention on the methionine level and its metabolites.

(a) The aim was to develop a suitable method in order to determine the endogenous levels of free lipoic acid using a high-performance liquid chromatography method with a very sensitive coulometric detection. Plasma samples were collected from 40 voluntary blood donors. This group was non-supplemented with lipoic acid and met the preconditions in for being included to the blood donors' registry. A blood sample was collected into a tube containing ethylene diamintetraacetic acid as an anticoagulant and the obtained plasma was deproteinized with acetonitrile. A solid phase extraction was used for the extraction. The samples were eluted with methanol and the eluate was evaporated to dryness using a gentle nitrogen stream. The residue was re-dissolved in a mixture of acetonitrile/water. After filtration, the sample was injected into an analytical column with reversed-phase. The limit of detection and the limit of quantification values were 1.85 and 5.18 nmol/l. The limit of detection was better than in previous studies: 2.4 nmo/l and 4.9 nmol/l respectively. However, the levels of LA in the plasma of the 40 non-supplemented voluntary blood donors were not detectable in all cases. The results of our study show that endogenous concentrations of LA are less than 1.85 nmol/l.

(b) This method was used in order to determine lipoic acid levels in the plasma of supplemented voluntary blood donors. This method is suitable for further studies in order to determine lipoic acid levels in patients after supplementation.

(c) The effect of lipoic acid on the viability of erythrocytes was monitored. Plasma samples were collected from voluntary blood donors, non-supplemented with lipoic acid. The venous blood was centrifuged at 750 x g; the separated erythrocytes

were washed three times with phosphate buffer, diluted with Ringer's solution, and injected into 12-well culture plates. Lipoic acid solutions, which had previously been diluted in different ratios, were added to the erythrocyte suspension. The incubation time was 24 and 48 hours at 37°C. For the determination of the cell viability the Tryphan blue exclusion test was used. The concentrations of lipoic acid (1.5 and 10 µmol/l) did not cause a statistically significant change regarding the viability or number of erythrocytes after the 24 and 48-hour incubation time. The high concentrations of lipoic acid (50, 100, 250 µmol/l) did neither cause a statistically significant change regarding the viability or the number of erythrocytes after the 24 and 48 hour incubation time. On the other hand, the high concentrations of lipoic acid had a statistically significant effect on the number of erythrocytes already after the 24-hour incubation time.

(d) We measured the total plasma level of homocysteine, cysteine, methionine and cysteinyl-glycine using high-performance liquid chromatography with coulometric detection. Blood samples were obtained from 68 patients, suffering from coronary artery disease. The patients were divided into three groups according to the severity of their disease. We did not find any significant differences in the prevalence of diabetes, pre-diabetes and kidney diseases between the selected groups. We did not find any significant differences between the number of smokers and hypertonic patients. We found significant differences between the levels of albumin, total cholesterol, LDL-C and the index of atherogenity in the selected groups. The levels of homocysteine at those patients with acute coronary artery disease were significantly higher compared to the chronically ill patients. Our results support the hypothesis that total plasma of homocysteine is not useable in early diagnostic of stenosis in coronary arteries but seems to be a good biomarker of the severity of proved disease. Homocysteine increases with an instability of the disease and a need for treatment. Those patients who returned for the completion of the re-vascularization had significantly decreased levels of the total amount of plasma cysteine, cysteinyl-glycine and methionine before the second intervention, compared to those patients with an acute or chronic form of the disease. The condition before completion of the re-vascularization is probably associated with higher oxidative stress, when the transsulfuration pathway is preferred, because it increases cysteine consumption. The cysteine seems to act more as an antioxidant than a risk factor in patients with coronary artery disease. 44 patients underwent a coronary

angiography and subsequently a percutaneous coronary intervention. The sample collections took place before the intervention and control samples were taken 24 and 48 hours after the intervention. We have not found any statistical differences between the levels of homocysteine and cysteine before and 24 hours and 48 hours after the intervention. The levels of methionine and cysteinyl-glycine were significantly higher 24 hours and 48 hours after the percutaneous coronary intervention compared to concentrations before the intervention.

Keywords: cytotoxicity; electrochemical detection; erythrocytes; homocysteine; lipoic acid; coronary artery disease; percutaneous coronary intervention; plasma; high-performance liquid chromatography

OBSAH

1	ÚVOD	20
2	TEORETICKÁ ČÁST	21
2.1	Ateroskleróza	21
2.1.1	Jednotlivá stádia aterogeneze	21
2.1.2	Rizikové faktory aterosklerózy	24
2.1.2.1	Oxidační stres	24
2.1.2.2	Hyperlipidemie	25
2.1.2.2.1	Úloha LDL částic v procesu aterogeneze	25
2.1.2.3	Diabetes mellitus	26
2.2	Ischemická choroba srdeční	27
2.2.1	Infarkt myokardu	27
2.2.2	Angina pectoris	27
2.2.2.1	Stabilní angina pectoris	28
2.2.2.2	Nestabilní angina pectoris	28
2.3	Perkutánní koronární intervence	28
2.3.1	Koronární restenóza	29
2.3.2	Pozdní trombóza koronárního stentu	30
2.3.3	Lékové stenty	30
2.4	Kyselina lipoová	32
2.4.1	Biochemie kyseliny lipoové	32
2.4.2	Metabolismus kyseliny lipoové	33
2.4.3	Bezpečnost a toxicita	34
2.4.4	Funkce kyseliny lipoové	36
2.4.4.1	Kyselina lipoová jako významný antioxidant	36
2.4.4.2	Kyselina lipoová jako induktor endogenních antioxidantů	37
2.4.5	Terapeutické účinky kyseliny lipoové	38
2.4.5.1	Vliv kyseliny lipoové na <i>diabetes mellitus</i>	38
2.4.5.2	Ateroskleróza a kyselina lipoová	39
2.4.5.3	Vliv kyseliny lipoové na stabilitu aterosklerotického plátu	40
2.4.5.4	Ischemická choroba srdeční a kyselina lipoová	41
2.4.5.5	Potenciální využití kyseliny lipoové pro nové druhy stentů	41
2.4.5.6	Vliv kyseliny lipoové na indukci apoptózy buněk	44
2.4.5.7	Kyselina lipoová a erytrocyty	45
2.4.5.8	Kyselina lipoová a indukce apoptózy u erytrocytů	46
2.4.6	Hladina kyseliny lipoové v lidské plasmě	47
2.4.7	Možnosti stanovení kyseliny lipoové	48
2.4.7.1	Plynová chromatografie	49
2.4.7.2	Kapalinová chromatografie	50
2.4.7.3	Kapilární elektroforéza	55
2.5	Aminothioly	57
2.5.1	Homocystein	58

2.5.2	Cystein	58
2.5.3	Methionin	59
2.5.3.1	Metabolismus methioninu	59
2.5.4	Homocystein jako rizikový faktor aterogeneze	61
2.5.5	Hyperhomocysteinemie, homocystinurie	62
2.5.6	Homocystein a kardiovaskulární onemocnění	64
2.5.6.1	Homocystein jako biomarker	66
2.5.7	Možnosti stanovení homocysteinu	67
2.5.7.1	Kapilární elektroforéza	68
2.5.7.2	Imunochemické stanovení homocysteinu	69
2.5.7.3	Enzymatické stanovení homocysteinu	69
2.5.7.4	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí	69
2.5.7.5	HPLC metody	69
3	CÍLE	71
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	72
4.1	Stanovení kyseliny lipoové v plasmě	72
4.1.1	Odběr a uchování vzorků plasmy	72
4.1.2	Odběr a uchování vzorků plasmy od suplementovaných dárců	74
4.1.3	Seznam chemikálií	74
4.1.4	Přístroje a pomůcky	75
4.1.5	Příprava použitých roztoků	76
4.1.6	Postup přípravy vzorků	77
4.1.6.1	Extrakce na pevné fázi	77
4.1.6.2	Příprava mobilní fáze:	78
4.1.6.3	Chromatografická analýza	78
4.1.6.4	Identifikace píku kyseliny lipoové	79
4.1.6.5	Kvantitativní analýza	79
4.1.7	Analytické parametry metody	80
4.1.7.1	Linearita	80
4.1.7.2	Mez detekce (LOD)	80
4.1.7.3	Mez stanovitelnosti (LOQ)	80
4.1.7.4	Přesnost	81
4.1.7.6	Výtěžnost	81
4.2	Stanovení vlivu kyseliny lipoové na viabilitu a počet erytrocytů	82
4.2.1	Odběr a zpracování vzorků plasmy	82
4.2.2	Seznam chemikálií	82
4.2.3	Seznam pomůcek	82
4.2.4	Příprava použitých roztoků	83
4.2.5	Pracovní postup	83
4.2.5.1	Určení viability	84
4.3	Stanovení vybraných thiolů v plasmě	85
4.3.1	Odběr a uchování vzorku plasmy	85
4.3.2	Seznam chemikálií	87

4.3.3	Přístroje a pomůcky	87
4.3.4	Příprava použitých roztoků	89
4.3.5	Postup přípravy vzorku	90
4.3.5.1	Příprava mobilní fáze	90
4.3.5.2	Chromatografická analýza	91
4.3.6	Doplňující analýzy	91
4.3.7	Statistická analýza dat	94
5	VÝSLEDKY	95
5.1	Stanovení kyseliny lipoové v lidské plasmě bez suplementace	95
5.1.1	Analytické parametry metody	95
5.2	Stanovení kyseliny lipoové v plasmě po suplementaci	98
5.3	Účinky kyseliny lipoové na erythrocyty	99
5.3.1	Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na viabilitu erythrocytů	99
5.3.2	Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na počet erythrocytů	101
5.3.3	Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na viabilitu erythrocytů	103
5.3.4	Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na počet erythrocytů	105
5.4	Stanovení vybraných aminothiolů v lidské plasmě	107
	Chromatografické záznamy stanovení homocysteinu, cysteinu, methioninu a cysteinyl-glycinu v plasmě pacienta s onemocněním koronárních artérií (obrázek 31-33).	107
5.4.1	Hladiny aminothiolů v plasmě pacientů s onemocněním koronárních artérií	109
5.4.2	Porovnání sledovaných parametrů mezi pacienty s rozdílným stupněm závažnosti onemocnění koronárních artérií	112
5.4.3	Porovnání hladin aminothiolů v plasmě mezi pacienty s rozdílným stupněm závažnosti onemocnění koronárních artérií	113
5.4.4	Dynamika aminothiolů po perkutánní koronární intervenci	113
6	DISKUZE	114
7	ZÁVĚR	128
8	PŘÍLOHY	130
9	BIBLIOGRAFIE	142

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
AGE(s)	konečné produkty pokročilé glykace (z angl. advanced glycation end products)
AIM	akutní infarkt myokardu
AMK	aminokyselina
AP	<i>Angina pectoris</i>
ATP	adenosintrifosfát
BMI	body mass index
CAD	onemocnění koronárních artérií (z angl. coronary artery disease)
CE	kapilární elektroforéza
CNS	centrální nervový systém
CRP	C-reaktivní protein
Cys	cystein
Cys-Gly	cysteinyl-glycin
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DES	lékové stenty (z angl. drug eluting stent)
DHLA	kyselinu dihydrolipoová
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMSO	dimethylsulfoxid
EC	elektrochemický detektor
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EI-MS	hmotnostní detektor s elektronovou ionizací
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla (z angl. evaporative light scattering detector)
FD	fluorescenční detekce
FID	plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů (z angl. granulocyte colony stimulating factor)
GF	glomerulární filtrace
GSH	glutathion
HCl	kyseliny chlorovodíková
Hcy	homocystein
HDL	lipoproteinové částice o vysoké hodnotě

HHcy	hyperhomocysteinemie
HMG-CoA-reduktasa	3-hydroxy-3-metyl-glutaryl-CoA reduktasa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IA	index aterogenity
ICAM-1	intracelulární adhezivní molekula (z angl. intracellular adhesion Molecule)
ICHS	ischemická choroba srdeční
IR	infračervená spektroskopie
IS	vnitřní standard (z angl. internal standard)
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LA	kyselina lipoová
Lp(a)	lipoprotein(a)
LC	kapalinová chromatografie
LDL	lipoproteinové částice o nízké hodnotě
LLE	extrakce kapalina-kapalina (z angl. liquid-liquid extraction)
LOD	limit detekce (z angl. limit of detection)
LOQ	limit kvantifikace (z angl. limit of quantification)
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
Met	methionin
MS	hmotnostní detektor
MDA	malondialdehyd
MMP	matrixové metaloproteinasa
MTHFR	methyltetrahydrofolátreduktasa
MTHFHMt	methyltetrahydrofoláthomocysteinmethyltransferasa
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukována forma)
NAP	nestabilní <i>angina pectoris</i>
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NO•	radikál oxidu dusnatého
PA	penicilamin
PECVD	chemická deposice z plynné fáze (z angl. plasma-enhanced chemical vapor deposition)
PBS	fosfátový pufr
PCI	perkutánní koronární intervence
PI-3-K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PLA	polymer kyseliny mléčné (z ang. poly-L-lactic acid)
PP	polypropylen

RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RV	revaskularizace
SAM	S-adenosylmethionin
SAH	S-adenosylhomocystein
SAP	stabilní <i>angina pectoris</i>
SPE	extrakce na pevné fázi
TAG	triacylglyceroly
tCH	celkový cholesterol
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialový detektor
VCAM-1	vaskulární adhezivní molekula (z angl. vascular cell adhesion molecule)
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health organization)

Seznam tabulek

Tabulka 1 Seznam faktorů rozvoje aterosklerózy.	21
Tabulka 2 Souhrn analytických metod pro stanovení LA a jejích příbuzných sloučenin	56
Tabulka 3 Souhrn typů homocystinurie	64
Tabulka 4 Referenční hodnoty vitaminů B ₆ , B ₁₂ a kyseliny listové	67
Tabulka 5 Charakteristika dobrovolných dárců krve	72
Tabulka 6 Kritéria pro zařazení dobrovolníků do studie	73
Tabulka 7 Postup extrakce na pevné fázi.	78
Tabulka 8 Charakteristika pacientů s rozdílným stupněm závažnosti onemocnění koronárních artérií	86
Tabulka 9 Charakteristika pacientů s koronární angiografií a následnou PCI	86
Tabulka 10 Mez detekce a stanovitelnosti	96
Tabulka 11 Přesnost metody v sérii a mezi sériemi.	97
Tabulka 12 Výťažnost metody pro stanovení kyseliny lipoové kapalinovou chromatografií. ...	98
Tabulka 13 Hladiny kyseliny lipoové ve vzorcích plasmy suplementovaných dárců.	98
Tabulka 14 Hladiny sledovaných aminothiólů ve skupině pacientů s akutní formou CAD.	109
Tabulka 15 Hladiny sledovaných aminothiólů ve skupině pacientů s chronickou formou CAD.	110
Tabulka 16 Hladiny sledovaných aminothiólů ve skupině pacientů s dokončenou RV.	111
Tabulka 17 Charakteristika pacientů s rozdílným stupněm závažnosti onemocnění koronárních artérií.	112
Tabulka 18 Hladiny aminothiólů v plasmě u pacientů s rozdílným stupněm závažnosti onemocnění koronárních artérií.	113
Tabulka 19 Dynamika aminothiólů po PCI.	113

Seznam obrázků

Obrázek 1 Šest základních fází rozvoje aterosklerózy	22
Obrázek 2 Vývoj aterosklerózy	23
Obrázek 3 Aterogeneze	23
Obrázek 4 Aplikace koronárního stentu balónkovým katétrem	29
Obrázek 5 Trombóza stentu	30
Obrázek 6 Duální lékový stent	31
Obrázek 7 Strukturní vzorce R a S enantiomerů kyseliny lipoové	32
Obrázek 8 Předpokládané metabolické cesty kyseliny lipoové	34
Obrázek 9 Souhrnné funkce LA	36
Obrázek 10 Regenerace vitamínů a glutathionu kyselinou lipoovou	38
Obrázek 11 Histologické řezy koronární tepny obarvené methylnmetakrylátém	42
Obrázek 12 Ochranná cela (model 5020)	53
Obrázek 13 Analytická cela (model 5010)	53
Obrázek 14 Strukturní vzorce Hcy, Cys a Met	57
Obrázek 15 Strukturní vzorec homocystinu a cystinu	57
Obrázek 16 Strukturní vzorec glutathionu	57
Obrázek 17 Formy homocysteinu v organismu	58
Obrázek 18 Metabolické cesty homocysteinu	60
Obrázek 19 Metabolické cesty homocysteinu	61
Obrázek 20 Chromatografické záznamy vzorku plasmu se standardními přísadkami kyseliny lipoové	95
Obrázek 21 Kalibrační křivka pro stanovení kyseliny lipoové metodou HPLC/ED	96
Obrázek 22 Chromatografické záznamy stanovení LA v plasmě s nízkými přísadkami LA	97
Obrázek 23 Vliv nízkých koncentrací LA (1, 5 a 10 $\mu\text{mol/l}$) na viabilitu erytrocytů po 24 hodinové inkubaci	99
Obrázek 24 Vliv nízkých koncentrací LA (1, 5 a 10 $\mu\text{mol/l}$) na viabilitu erytrocytů po 48 hodinové inkubaci	100
Obrázek 25 Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na počty erytrocytů po 24 hodinové inkubaci	101
Obrázek 26 Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na počty erytrocytů po 48 hodinové inkubaci	102
Obrázek 27 Vliv vysokých koncentrací LA (50, 100 a 250 $\mu\text{mol/l}$) na viabilitu erytrocytů po 24 hodinové inkubaci	103
Obrázek 28 Vliv vysokých koncentrací LA (50, 100 a 250 $\mu\text{mol/l}$) na viabilitu erytrocytů po 48 hodinové inkubaci	104

Obrázek 29 Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na počty erytrocytů po 24 hodinové inkubaci.....	105
Obrázek 30 Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na počty erytrocytů po 48 hodinové inkubaci.....	106
Obrázek 31 Chromatografický záznam stanovení vybraných aminothioliů v plasmě pacienta s onemocněním koronárních tepen.....	107
Obrázek 32 Chromatografický záznam stanovení vybraných aminothioliů v plasmě pacienta s onemocněním koronárních tepen.....	107
Obrázek 33 Chromatografický záznam stanovení vybraných aminothioliů v plasmě pacienta s onemocněním koronárních tepen.....	108

1 Úvod

Ateroskleróza je dlouhodobě se vyvíjející onemocnění cévní stěny, které se po řadu let bezpříznakového průběhu manifestuje svými komplikacemi: ischemickou chorobou srdeční, ischemickou cévní mozkovou příhodou a ischemickou chorobou dolních končetin. Ischemická choroba srdeční je nejčastější příčinou kardiovaskulární mortality. Hlavní příčinou rozvoje těchto komplikací, které mohou skončit i smrtí, je dlouhodobě zvýšený oxidační stres. Kyselina lipoová je silný antioxidant, hraje významnou úlohu v terapii tohoto onemocnění a běžně se indikuje diabetikům jako doplněk stravy. Tento antioxidant inhibuje lipoperoxidaci, snižuje velikost aterosklerotického plátu, hladiny celkového a LDL cholesterolu, a má protizánětlivé účinky. Navíc má schopnost indukovat buněčnou apoptózu. Díky svým prospěšným vlastnostem se začíná uvažovat o jejím využití v případě lékových stentů a protinádorové terapii. S tím však úzce souvisí otázka bezpečnosti a toxicity terapeutické dávky.

V posledních letech se diskutuje o významu aminothioliů u kardiovaskulárních onemocnění. Mezi tyto aminothioly řadíme především homocystein, methionin, cystein a cysteinyl-glycin. Homocystein byl na základě mnoha studií vyhodnocen jako rizikový faktor kardiovaskulárního onemocnění, ačkoliv existují i studie, která tato tvrzení nepodporují. Rovněž zůstává otázkou, zda je vhodným indikátorem odpovědi terapeutické intervence. V současné době se řeší otázka, zda je možné homocystein vnímat nejen jako rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění, ale také jako biomarker. Výsledky některých studií jsou rozporuplné také v otázce vztahu homocysteinu a stupně stenózy v koronárních tepnách. Lékaři i vědečtí pracovníci se neustále snaží nalézt co nejvhodnější ukazatele průběhu již prokázaného onemocnění, aby co nejvíce zajistili úspěšnost léčby.

2 Teoretická část

2.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza je progresivní onemocnění, které postihuje intimu velkých i středních tepen, včetně aorty, karotid, koronárních i periferních tepen. Na počátku aterosklerózy i v její progresi hraje hlavní úlohu zánět v cévní stěně. Předstupněm v rozvoji aterosklerózy je tzv. endotelová dysfunkce, kterou může vyvolat mechanické poškození cévy např. vlivem dlouhotrvající hypertenze. Mezi další rizikové faktory řadíme zvýšenou koncentraci cholesterolu, modifikovaných lipoproteinových částic o nízké hustotě (LDL), lipoproteinu (a), homocysteinu, fibrinogenu či *diabetes mellitus* (DM). Dysfunkce endotelových buněk vede k produkci adhezivních molekul, které umožňují zánětlivým buňkám proniknout do stěny cév. Makrofágy odvozené od monocytů pak kromě hromadění lipidů secernují prozánětlivé cytokiny a růstové faktory, které působí aktivaci a proliferaci buněk hladkého svalstva i mezibuněčné hmoty vaziva a progresi sklerotických změn ⁽¹⁾ ⁽²⁾. Seznam ovlivnitelných a neovlivnitelných faktorů rozvoje aterosklerózy shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1 Seznam faktorů rozvoje aterosklerózy.

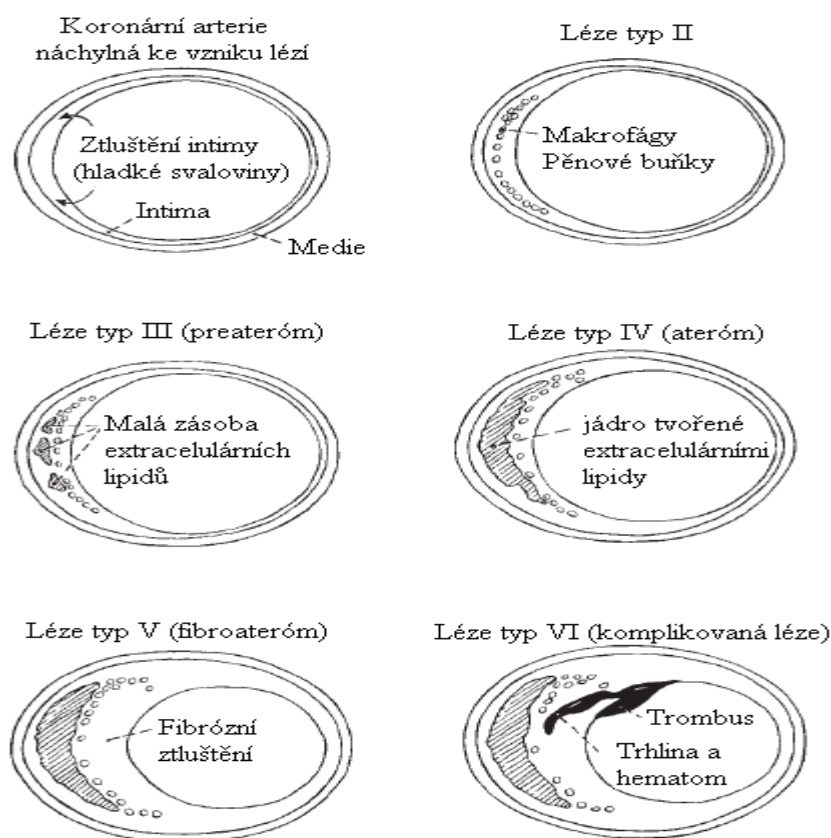
Ovlivnitelné faktory	Neovlivnitelné faktory
zvýšený celkový cholesterol	věk
zvýšený LDL cholesterol	pohlaví
snížený HDL cholesterol	genetická predispozice
zvýšené triacylglyceroly	rodinná anamnéza
kouření	existence ICHS*
hypertenze	
<i>diabetes mellitus</i>	
nízká fyzická aktivita, obezita	
hyperhomocysteinemie	
oxidační stres	
zvýšená hladina lipoproteinu (a)	
zvýšená hladina fibrinogenu	

*ICHS, ischemická choroba srdeční

2.1.1 Jednotlivá stádia aterogeneze

Ateroskleróza se histologicky manifestuje ve formě arteriálních lézí, označovaných jako tzv. pláty. Histologické a patologicko-anatomické projevy aterosklerózy lze rozdělit do

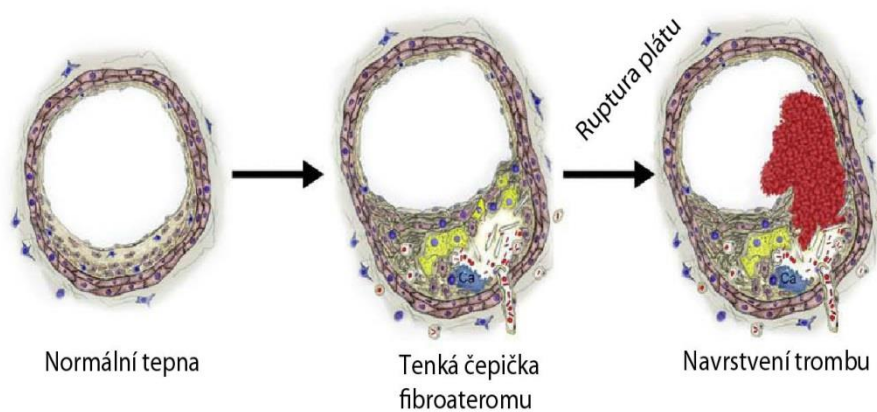
šesti základních typů, které charakterizují „přirozený“ vývoj tohoto procesu, jak je patrné z obrázků 1–3.



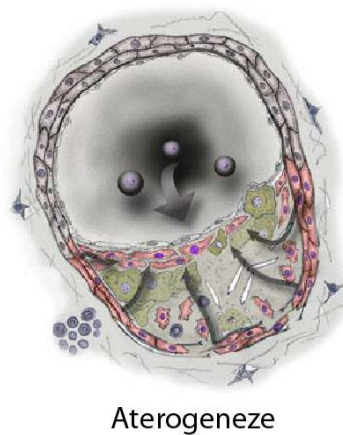
Obrázek 1 Šest základních fází rozvoje aterosklerózy⁽³⁾

I. typ se označuje jako iniciální léze a je charakterizována zvýšeným počtem izolovaných makrofágů v intimě. Makrofágy jsou vyplněné tukovými buňkami a vznikají tzv. „pěnové buňky“. Tento typ léze se projevuje ztloustnutím intimy, což je kompenzováno dilatací a lumen cévy zůstává nezměněn. Nahromaděním pěnových buněk vzniká II. typ léze, známý také jako lipidový proužek. Pokračující hromadění pěnových buněk a jejich nekróza může dát příčinu vzniku léze III. typu, tzv. preateromu, který již obsahuje malé zásoby extracelulárních lipidů. Tyto tři typy lézí patří mezi časné fáze tohoto onemocnění. Mezi rozvíjející se fáze patří IV. a V. typ lézí, charakterizované výraznými oblastmi nekrotických hmot a extracelulárních lipidů, tvořících lipidové jádro. IV. typ se označuje jako aterom a vyznačuje se tenkou přepážkou mezi lipidovým jádrem a arteriálním lumen. U V. typu léze, tzv. fibroateromu, se již vyskytuje jak lipidové jádro, tak fibrotická vrstva, která vytváří čepičku léze. V tomto stádiu již céva nedokáže kompenzovat zúžení lumen dilatací,

dochází tedy ke snížení průtoku krve. Poslední fázi představuje léze VI. typu (komplikovaná léze), která vykazuje strukturu, jež je charakterizovaná exulceracemi, krvácením do plátu, kalcifikacemi nekrotických hmot a přítomností trombózy. Fyzikálními silami toku krve dochází k ruptuře nestabilního plátu, ke krvácení do plátu a vzniku trombu, uzavěru cévy a ischemii daného orgánu. Tyto projevy se nejčastěji vyskytují v koronárních tepnách, tepnách mozku nebo tepnách dolních končetin^{(3) (4) (5) (6)}.



Obrázek 2 Vývoj aterosklerózy⁽⁷⁾



Obrázek 3 Aterogeneze⁽⁷⁾

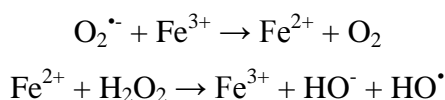
2.1.2 Rizikové faktory aterosklerózy

Rozvoj aterosklerózy úzce souvisí s poruchami metabolismu sacharidů a lipidů. Mezi hlavní rizikové faktory řadíme oxidační stres, hyperlipidemii, *diabetes mellitus* či hyperhomocysteinemii, která bude probrána v kapitole 2.5.5.

2.1.2.1 Oxidační stres

Převaha volných radikálů nad antioxidanty se nazývá oxidační stres. Volných radikálů, exogenního i endogenního původu, stále přibývá a v současné době je často porušována rovnováha mezi nimi a antioxidanty. Volné radikály jsou charakterizovány přítomností jednoho nebo více nepárových elektronů. Snaha radikálu o spárování elektronu způsobuje jejich vysokou reaktivitu⁽¹⁾⁽⁸⁾.

Energetický metabolismus buňky je založen na postupné redukci dvouatomové molekuly kyslíku za vzniku dvou molekul vody. Redukce probíhá v dýchacím řetězci mitochondrií. Za fyziologických podmínek jsou pouze 4 % kyslíku redukována jednoelektronově za vzniku reaktivních forem. Přijetím jednoho elektronu se molekula kyslíku redukuje na superoxidový aniontový radikál. Superoxid není sám o sobě příliš reaktivní. V závislosti na prostředí může mít oxidační nebo redukční účinky. Jedná se o poměrně nestabilní molekulu, která je enzymem superoxidodismutasou dismutována za vzniku peroxidu vodíku, který je málo reaktivní. Za patologických podmínek však může snadno a rychle přecházet na velmi reaktivní hydroxylový radikál. Tato reakce se nazývá Fentonova a její schéma je naznačeno v následujících rovnicích:



Mezi ROS řadíme částečně redukované metabolity molekulárního kyslíku (např. superoxidový radikál, hydroxylový radikál). Do této skupiny však patří i neradikálové sloučeniny, jako je peroxid vodíku, kyselina chlorná či singletový kyslík, které se za patologických stavů stávají zdroji vzniku vysoce toxických oxidantů.

Je-li radikál oxidu dusnatého (NO•) produkován ve vysokých koncentracích, pak představuje zdroj vysoce reaktivních sloučenin, např. nitroxylu a peroxynitritu. Vznikají reakcí NO• se superoxidovým anionem nebo molekulárním kyslíkem a souhrnně se označují jako reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS).

Na druhou stranu RONS hrají v organismu také významnou fyziologickou úlohu při imunitních reakcích. Jsou produkovány buňkami imunitního systému (makrofágy,

neutrofilů) a využívají se v boji proti cizorodým částicím a k odstranění fagocytovaných mikroorganismů. Nicméně jejich hladina v organismu musí být přísně regulována.

Organismus má schopnost regulovat množství radikálů, přítomných v organismu, třemi způsoby:

regulací aktivity enzymů, které jsou nezbytné pro tvorbu radikálů, snížením intenzity následných radikálových reakcí např. chelatací iontů přechodných kovů, zejména dvoumocného železa (ferritin, transferrin), záchytem a odstraněním již vzniklých radikálů za současného vzniku stálejších a méně reaktivních produktů enzymatickou i neenzymatickou cestou (antioxidační ochrana).

Mezi významné nízkomolekulární antioxidanty řadíme vitamíny (askorbát, tokoferol), flavonoidy, karotenoidy, koenzym Q nebo kyselinu lipoovou. Kyselina lipoová bude podrobně popsána v kapitole 2.4.

Vysoká koncentrace RONS může způsobovat oxidaci bází v nukleových kyselinách, aminokyselin, cukrů i nenasycených mastných kyselin v lipidech. Proto je nadprodukce RONS zahrnuta v patogenezi a progresi řady onemocnění, souvisejících s oxidačním stresem, jako jsou např. DM a jeho komplikace, rakovina, chronické zánětlivé onemocnění nebo neurodegenerativní choroby^{(1) (9) (10)}.

2.1.2.2 **Hyperlipidemie**

Hyperlipidemie je charakterizována poruchou metabolismu plasmatických lipidů a lipoproteinů. Lze ji dělit do tří skupin: hypercholesterolemie (zvýšená hladina celkového a LDL cholesterolu), hypertriacylglycerolemie (zvýšená hladina triacylglycerolů) a kombinovaná hyperlipidemie.

2.1.2.2.1 **Úloha LDL částic v procesu aterogeneze**

V rozvoji endotelové dysfunkce i v další progresi aterosklerotických lézí mají zásadní úlohu aterogenní lipoproteiny. Nejvýznamnější z nich jsou LDL částice, které byly chemicky modifikovány oxidací, glykosylací nebo acetylací. Oxidace LDL probíhá především po jejich průchodu do subendoteliálního prostoru. Modifikace se týká zejména apoB-100, který podléhá buď přímé oxidaci apoproteinu volnými radikály, či dochází k vazbě aldehydické skupiny na ϵ -aminoskupinu lysinového zbytku apoproteinu. Větší modifikace pozmění strukturu částice (konkrétně strukturu apoproteinu B-100) natolik, že nemůže být rozpoznána LDL receptory na povrchu buněk a jsou přijímány makrofágy po navázání na tzv. scavengerové receptory. Tento

způsob příjmu cholesterolu buňkou však nezpůsobí inhibici HMG-CoA-reduktasy, která jinak vede k potlačení syntézy cholesterolu *de novo*. Cholesterol se hromadí v buňce a dochází k tvorbě tzv. pěnových buněk, což je první stádium aterosklerózy⁽¹⁾.

2.1.2.3 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je chronické onemocnění vyvolané buď nedostatečnou produkcí insulínu slinivkou břišní, nebo rezistencí, tj. v případě, kdy tělo nemůže efektivně využívat insulin, který produkuje. Nedostatečné působení insulínu vede ke zvýšení koncentrace glukosy v krvi neboli k hyperglykémii, která může být doprovázená klinickými symptomy, jako jsou polyurie, polydipsie, úbytek hmotnosti či ketonurie. Toto závažné metabolické onemocnění je v dnešní době nejčastější příčinou chronické renální insuficience a diabetici jsou ohroženi pokročilými mikro- a makrovaskulárními komplikacemi. Hlavní příčinou rozvoje těchto komplikací, které v extrémních případech mohou skončit i smrtí, je dlouhodobě zvýšený oxidační stres. Zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS), která již není dostatečně kompenzována antioxidační aktivitou, je spojena s přetrvávající hyperglykemií. Dalšími faktory, které přispívají k rozvoji pozdních komplikací, jsou glykace proteinů a tvorba AGE(s) produktů, tzv. konečných produktů pokročilé glykace. Mezi závažné komplikace diabetu řadíme např. retinopatii, diabetickou nefropatii, neuropatii a v neposlední řadě aterosklerózu⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹⁾.

Diabetes mellitus není jednotné onemocnění a podle etiologie ho lze rozdělit na: *diabetes mellitus* 1. typu, *diabetes mellitus* 2. typu, gestační *diabetes* a ostatní specifické typy diabetu. Podstatou 1. typu je autoimunitní onemocnění, které je vyvolané zřejmě virovou infekcí nebo modifikací β -buněk Langerhansových ostrůvků. Postupná destrukce těchto buněk způsobuje defekt v tvorbě insulínu. U nemocných převládá Th1 podskupina nad Th2 podskupinou T buněk, která je zodpovědná za imunitní odpověď. Th1 buňky produkují cytokiny, které aktivují makrofágy a cytotoxické CD8+ T buňky. Na destrukci β -buněk se podílí interakce s antigenem, která vyvolává cytotoxickou aktivitu T buněk, a nepochybně i volné radikály. Pacienti s tímto typem diabetu jsou zcela závislí na intravenózním příjmu insulínu pro regulaci hladiny glukosy v krvi (8).

Do skupiny s diabetem 2. typu patří přibližně 90 % diabetiků. Tento typ je charakterizován rezistencí na insulin nebo relativním nedostatkem insulínu. Rezistence je způsobena buď snížením počtu receptorů, nebo post-receptorovou blokádou. Tento stav se projevuje redukovanou schopností insulínu stimulovat transport glukosy do

kosterních svalů, kdy tato resistance, na kterou β -buňky reagují zvýšenou sekrecí insulinu, způsobuje hlavní poruchu v udržování normálních hladin glukosy⁽⁸⁾ (4).

2.2 Ischemická choroba srdeční

Jeden z nejzávažnějších projevů či komplikací aterosklerózy je ischemická choroba srdeční (ICHS). Jedná se o akutní nebo chronické onemocnění, které vede k omezení až úplnému zastavení toku krve ve věnčitých tepnách myokardu. Ischemické postižení se obecně charakterizuje jako nepoměr mezi potřebou a dodávkou kyslíku ke tkáni. Mezi akutní formy ICHS patří akutní infarkt myokardu (AIM), nestabilní *angina pectoris* (AP) a náhlá koronární smrt. K chronickým formám ICHS řadíme stabilní AP, koronární syndrom, němou ischemii myokardu apod.⁽¹³⁾ (14).

2.2.1 Infarkt myokardu

Jedná se o ischemické ložiskové odumření části myokardu, které vzniká v důsledku uzávěru či výrazného zúžení levé nebo pravé věnčité tepny. Typickým příznakem AIM je dlouhotrvající svíravá bolest na hrudi, která přetrvává i v klidovém stavu pacienta. Bolest často vystřeluje do levého ramene, krku, zad nebo břicha. Dalšími průvodními jevy jsou dušnost, slabost, nevolnost, nadměrné pocení, a to v různé míře v závislosti na lokalizaci uzávěru či zúžení povodí věnčité tepny. Akutní infarkt myokardu dělíme dle EKG nálezu na AIM s elevací ST úseku (tzv. STEMI) a bez elevace ST úseku (tzv. non STEMI), tj. s a) depresí ST úseku; b) inverzí T vln; c) fyziologickým EKG obrazem⁽¹⁵⁾.

2.2.2 Angina pectoris

Angina pectoris je nejčastějším projevem ICHS a je obecně definována jako bolesti na hrudi či prsou srdečního původu, které vycházejí z momentální nerovnováhy mezi nabídkou a spotřebou kyslíku v myokardu, projevující se často při vyšší námaze. Mezi dalšími příznaky patří např. slabost, pocení, dušnost, nauzea a pocity na omdlení. Svými projevy se velmi podobá AIM, s tím rozdílem, že při AP nedochází k nekróze srdeční tkáně a příznaky obvykle mizí do několika minut po skončení zátěže. Vlastní příčinou anginy pectoris je tvorba aterosklerotických plátů ve stěně cév, které zásobují srdce krví. Při zvýšené fyzické námaze nejsou schopny aterosklerotické tepny vést dostatečné množství okysličené krve a zabezpečit tak potřebný přísun této krve do myokardu⁽¹³⁾ (16).

2.2.2.1 Stabilní angina pectoris

Stabilní *angina pectoris* (SAP) je nejčastější z klinických manifestací ICHS. Je charakterizována záchvatovou bolestí za hrudní kostí, v dolní čelisti, rameni a paži, která se projevuje při fyzické zátěži či při silném citovém stresu, obecně při stavech, které vedou ke zvýšené spotřebě kyslíku myokardem. Tyto bolesti se nazývají odborně stenokardie a obvykle odeznívají během odpočinku či po podání nitroglycerinu. Stenokardie informují o aktuální přechodné ischemii myokardu. Pro tento typ anginy je typická chronicita a dlouhý stabilní průběh, který je v drtivé většině způsobený vznikem stabilního aterosklerotického plátu. Stupeň zátěže, která vyvolá bolest a další obtíže, se nazývá anginózní práh. Tento práh je zpravidla nepřímě úměrný závažnosti stenózy věnčité tepny. Čím je tedy stenóza rozsáhlejší, tím je anginózní práh nižší^{(13) (16) (17) (18)}.

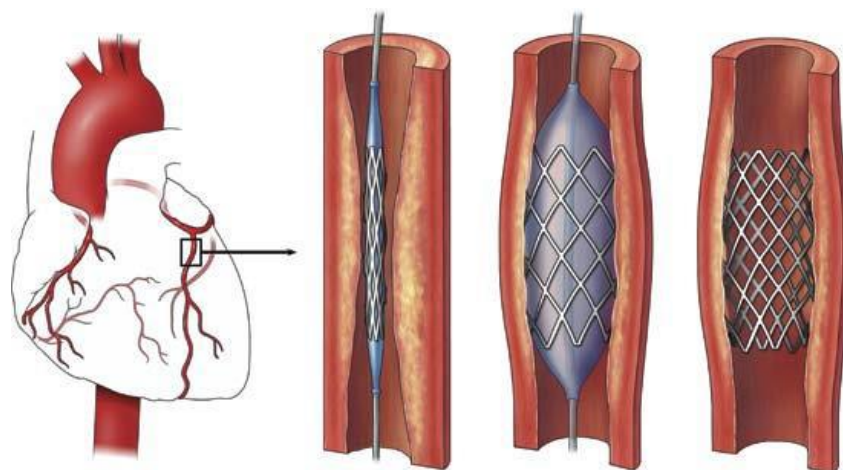
2.2.2.2 Nestabilní angina pectoris

Klinicky se nestabilní *angina pectoris* (NAP) manifestuje podobně jako SAP, s tím rozdílem, že k vyvolání bolesti je třeba mnohem menší zátěže, bolest trvá znatelně déle, objevuje se i v klidu a neustupuje ani po podání nitroglycerinu. Nejčastěji je způsobena změnou stability aterosklerotického plátu ze stabilního na nestabilní, což je způsobeno jeho rupturou a vznikem trombu.

Při léčbě akutního koronárního syndromu jde o závod s časem. Čím rychleji se podaří znovu zpřístupnit uzavřenou tepnu, ať už přímou perkutánní koronární intervencí (PCI) nebo trombolýzou, tím větší je pacientova šance na přežití^{(14) (19)}.

2.3 Perkutánní koronární intervence

Přívod kyslíku a živin do myokardu je zabezpečen věnčitými neboli tzv. koronárními tepnami. Pravá a levá věnčitá tepna, které se dále větví, zabezpečují nezbytnou výživu myokardu. Pro léčbu ICHS, během které dochází k částečnému, či k úplnému uzavěru tepny (tzv. stenóza), se kromě farmakologické léčby, využívá metoda perkutánní koronární intervence. Tato metoda PCI (dříve nazývaná angioplastika) spočívá v roztažení a zprůchodnění postiženého místa věnčité tepny, čehož se dosáhne zavedením stentu. Hlavním místem k zavedení stentu se využívá nejčastěji pravá stehenní tepna nebo radiální tepna v oblasti zápěstí a pažní tepna. Do místa zúžení či uzavření tepny se stent transportuje tenkým vodičem a balónkovým katétrem. V místě poškození se céva rozšíří nafouknutím balónku a následuje aplikace stentu. Aplikace koronárního stentu balónkovým katétrem je znázorněno na obrázku 4.



Obrázek 4 Aplikace koronárního stentu balónkovým katétrem⁽²⁰⁾.

Hyperplazie intimy zabezpečí, že se stenty stanou součástí cévní stěny a zůstávají tak uvnitř tepny natrvalo. Při běžné reakci intimy se celý stent pokryje endotelem asi za jeden měsíc od implantace⁽²⁰⁾.

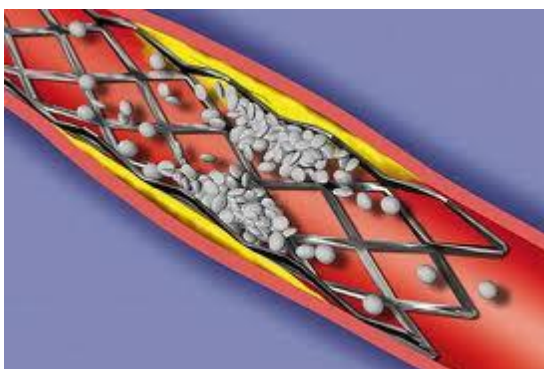
2.3.1 Koronární restenóza

Stent svou přítomností v koronární tepně vyvolává zánětlivou, resp. hojivou odpověď cévní stěny za účasti krevních destiček a buněk imunitního systému. Výsledkem je hyperproliferace a migrace buněk hladké svaloviny, které se mění na buňky, které syntetizují extracelulární matrix. V případě přílišné proliferace intimy dochází ke koronární restenóze, která vede k postupnému zúžení, nebo až k uzavření tepny. U diabetiků je vznik restenózy po aplikaci stentu vyšší o 60 %. Přispívá k tomu nadměrná neointimální proliferace v místě cévního poranění a negativní remodelace arterií. Příčiny těchto jevů jsou hyperglykémie, endoteliální dysfunkce a protrombogenní aktivita krve^{(13) (14)}. Restenóza po angioplastice zůstává hlavním problémem těchto zákroků. S cílem potlačit zánětlivou reakci a proliferaci neointimy byla při léčbě restenózy testována celá řada antiproliferativních, imunosupresivních a ostatních látek. Byly provedeny studie s cytostatiky (tranilast), antikoagulačními látkami (heparin, enoxaparin), antiagregačními (aspirin, tiklopidin, abciximab) a protizánětlivými (kortikosteroidy). Byla testována léčba angiopeptinem, rybím tukem, estrogeny a hypolipidemiky, včetně statinů. Bohužel snahy zabránit restenóze nejrůznějšími farmaky, se ukázaly vesměs jako neúčinné^{(21) (22)}. Z tohoto důvodu se začaly vyrábět tzv. lékové stenty, které uvolňují antiproliferativní látky, které brání hyperplazii vnitřní vrstvy cévy.

Existuje celá řada různých druhů stentů. Můžeme je dělit do tří skupin: nepotahované stenty, biodegradabilní stenty a potahované stenty, kam řadíme již zmiňované lékové stenty. Nejčastějšími materiály pro jejich výrobu je lékařská ocel.

2.3.2 Pozdní trombóza koronárního stentu

Problém restenózy bývá spojován především s holými kovovými stenty, zatímco pozdní trombóza je problémem zejména lékových stentů. Stenty vyvolávají biologickou odpověď organismu, neboť působí na organismus jako cizorodý materiál. Z tohoto důvodu dochází k aktivaci hemostatického systému a zánětlivé odpovědi organismu. Nadměrná aktivace hemostatického systému vede za určitých podmínek k trombóze koronárních stentů⁽²³⁾⁽²⁴⁾. Pozdní koronární trombóza stentu je naznačena na obrázku 5.



Obrázek 5 Trombóza stentu⁽²³⁾.

2.3.3 Lékové stenty

Jedním z hlavních problémů PCI je koronární restenóza, proto další vývoj směřoval k tvorbě tzv. lékových stentů (DES, z angl. Drug Eluting Stents) obsahujících dostatečné množství aktivní látky, která by restenózu potlačila bez toxických účinků spjatých se systémovým podáním. Jedná se prakticky o kovový stent, který slouží jako nosič lokálně působících léčiv. Je potažen většinou polymerovou matricí, ve které je navázána postupně se uvolňující účinná látka.

Kromě svých obvyklých vlastností stentů, jako je ohebnost, minimální tloušťka a dostatečná radiální síla, musí DES poskytovat dostatečně velkou plochu pro navázání farmaka. Struktura stentu musí zajistit optimální rozvrstvení stentu, aby jeho působení na okolní stěnu cévy bylo rovnoměrné. Polymer musí být biologicky inertní, elektroneutrální, odolný vůči mechanickému poškození, odolný vůči sterilizaci, dlouhodobě stabilní, inertní vůči agregaci krevních destiček a nesmí vyvolávat zánětlivou reakci.

Aktivní lék v optimálním případě inhibuje neointimální hyperplazii potlačením zánětlivé reakce, potlačením aktivace krevních destiček a potlačením proliferace buněk hladké svaloviny. Pronikání farmak do stěny cévy závisí na jejich lipofilních a lipofóbních vlastnostech a molekulové hmotnosti. Většina léků se používá rutinně v chemoterapii a imunosupresivní léčbě. Mezi léčiva potlačující restenózu patří vybraná cytostatika (angiopeptin, paclitaxel, aktinomycin D, angiopeptin), inhibitory C-proteinasy a metaloproteinasy (batimastat), antitrombiny (heparin, abciximab, hirudin), imunosupresiva (sirolimus, tranilast, dexametazon, cyklosporin, methylprednisolon) atd. Moderní polymerové technologie jsou schopny programovat přesné uvolňování aktivních látek nejen v prostoru, ale i čase, aby účinek byl maximální. Z nepřeberné skupiny léčiv, které teoreticky ovlivňují jednotlivé fáze restenózy, jich byla s DES použita jen malá část. Nejčastěji používanými farmaky jsou sirolimus a paclitaxel. Sirolimus, nazývaný také rapamycin, je antibiotikum, produkované aktinomycetou *Streptomyces hygroscopicus*. Využívá se v medicíně jako imunosupresivum po transplantacích. Zabezpečuje blokaci buněčného cyklu v G1 fázi, a proto je vhodný pro potlačení proliferace buněk hladké svaloviny. Paclitaxel je cytostatikum pocházející z tisu *Taxus brevifolia*. Používá se při léčbě nádorových onemocnění. Má vliv na organizaci mikrotubulů v buňkách s následnou zástavou dělení, migraci a sekreci buněk hladké svaloviny. Výhodou je jeho selektivní účinek na buňky hladké svaloviny bez ovlivnění endoteliálních buněk⁽²¹⁾.

Hlavním problémem lékových stentů však zůstává vyšší riziko vzniku pozdních trombóz po přerušení antiagregační léčby^{(25) (26)}. Další vývoj v této oblasti směřuje k vyhledávání nových účinnějších léčiv, vytvoření stentů vychytávajících progenitorové endoteliální buňky, stentům vylučující geny a bioabsorbovatelným stentům z přírodních materiálů⁽¹⁴⁾. Příklad lékového stentu je znázorněn na obrázku 6.



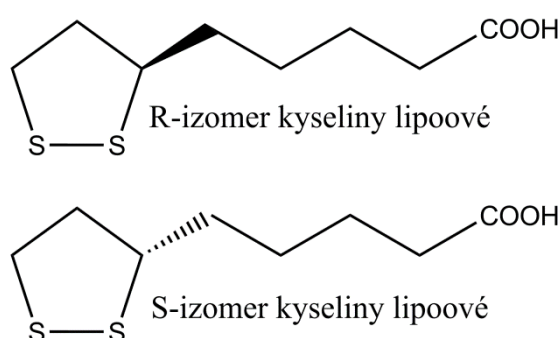
Obrázek 6 Duální lékový stent⁽²⁷⁾.

2.4 Kyselina lipoová

2.4.1 Biochemie kyseliny lipoové

Kyselina lipoová (LA), známá také pod pojmy thiooktanová, či 1,2-dithio-3-pentanová kyselina, je thiolová (disulfidická) sloučenina, která se přirozeně vyskytuje v eukaryotických i prokaryotických organismech a je syntetizována z kyseliny oktanové⁽²⁸⁾. Tato sloučenina byla poprvé izolována z hovězích jater a popsána Reedem a kol. v roce 1951⁽²⁹⁾. Nicméně její existence je známá již od roku 1930, kdy byla označována jako tzv. růstový faktor brambor, neboť bylo zjištěno, že je nezbytná pro růst některých bakterií. Dříve byla řazena do skupiny vitamínů B, později bylo zjištěno, že je syntetizována v rostlinném, zvířecím i lidském organismu^{(30) (31)}.

Kyselina lipoová obsahuje jedno chirální centrum na pozici 3 v 1,2-dithiolové části, tudíž může vytvářet dva stereoizomery, R a S-izomer, jak je patrné na obrázku 7. Avšak pouze R-izomer je syntetizován v těle a hraje klíčovou úlohu v energetickém metabolismu.



Obrázek 7 Strukturální vzorce R a S enantiomerů kyseliny lipoové⁽⁴⁾.

Kyselina lipoová je esenciálním kofaktorem řady komplexů, které katalyzují oxidativní dekarboxylaci. V tkáních je karboxylová skupina kyseliny lipoové vázaná kovalentně k ϵ -aminoskupině lysinového zbytku. Přednostně působí v dehydrogenasovém systému 2-oxokyselin (pyruvátdehydrogenasový komplex, 2-oxoglutarátdehydrogenasový komplex a dehydrogenasový komplex 2-oxokyselin s rozvětveným řetězcem). Slouží zde jako přenašeč acylové skupiny z jednoho místa

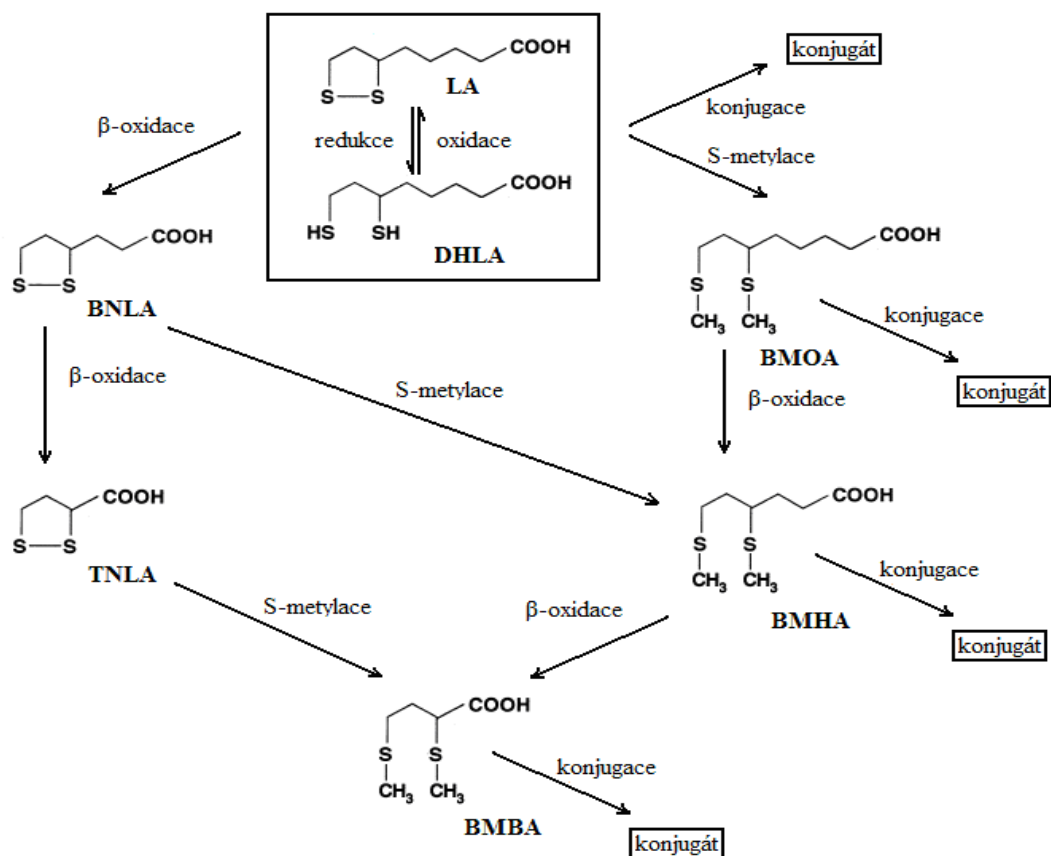
enzymového komplexu na jiné. Dále je také důležitým koenzymem v glycin-štěpicím enzymovém systému, kde funguje jako přenašeč aminomethylové skupiny^{(30) (32) (33)}.

2.4.2 Metabolismus kyseliny lipoové

Kompletní cesta biosyntézy LA *de novo* nebyla dosud zcela objasněna, nicméně, experimentální izotopové studie ukazují, že kyselina oktanová slouží jako prekurzor osmiuhlíkatého řetězce a zdrojem síry může být aminokyselina cystein⁽³⁴⁾.

Kyselina lipoová je v malém množství syntetizována v játrech a zdá se, že tato *de novo* syntéza poskytuje nezbytné množství LA pro potřebu její úlohy v intermediárním metabolismu. Dále je také přijímána v potravě rostlinných či živočišných zdrojů. Po příjmu je primárně, ale pouze jen přechodně, akumulována především v játrech, srdci a kosterní svalovině, v menší míře ji lze nalézt i v ostatních tkáních. K její degradaci dochází v játrech, a to především β -oxidací postranního řetězce a S-methylací dithiolového kruhu^{(34) (35)}.

Pro stanovení metabolitů LA byla vyvinuta metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s elektrochemickou detekcí a díky ní bylo u člověka identifikováno 5 metabolitů. Studie, zkoumající metabolismus LA u hlodavců a psů, odhalila více než 12 jejich metabolitů v moči a krevní plasmě. Nehledě na zvířecí druh, společnými metabolity LA jsou bisnorlipoát, tetranorlipoát, β -hydroxy-bisnorlipoát nebo bis-methylované merkaptoderiváty těchto sloučenin⁽³⁴⁾. Předpokládané metabolické cesty LA jsou znázorněny na obrázku 8.



Obrázek 8 Předpokládané metabolické cesty kyseliny lipoové

LA, kyselina lipoová; BNLA, bis-norlipoová kyselina; TNLA, tetranorlipoová kyselina; BMOA, 6,8-bis(methylthio)oktanová kyselina; BMHA, 4,6-bis-(methylthio)hexanová kyselina; BMBA, 2,4-bis-(methylthio)butanová kyselina⁽⁶⁾.

LA získaná z potravy nebo doplňků stravy se lehce vstřebává, metabolizuje a vylučuje, zejména močí, a proto se pouze zanedbatelné množství volné LA uchovává ve tkáních⁽³⁶⁾. Ledviny, srdce a kosterní svalovina obsahuje nejvyšší množství proteinově vázané LA, tudíž koncentrace volné LA je *in vivo* velmi nízká⁽³⁷⁾. Nicméně, po aplikaci doplňků stravy dochází k přechodnému zvýšení koncentrace nevázané LA uvnitř všech buněk, zejména srdce, mozku a jater⁽³⁸⁾. Orálně podávaná LA je po transportu do tkání enzymaticky redukována na kyselinu dihydrolipoovou (DHLA). Redukci LA na DHLA katalyzuje mitochondriální dihydrolipoamiddehydrogenasa, která je složkou pyruvátdehydrogenasového komplexu^{(39) (40) (41) (42) (43)}. Díky vysoké hydrofobitě, může LA pronikat biologickou membránou a vstupovat do mitochondriální matrix⁽³⁴⁾.

2.4.3 Bezpečnost a toxicita

V následující kapitole je uveden přehled v současné době námi dostupných informací o bezpečnosti a toxicitě LA. Ve studiích je značná rozporuplnost v otázkách výše dávky,

způsobu aplikace i délky působení LA. Komerčně dostupné potravinové doplňky obsahují obvykle dávku 50 - 600 mg racemické směsi R a S-LA, což je přibližně 1000x vyšší množství, které je možné získat z potravy. U zdravých jedinců, kteří užívají preventivně LA a chtějí pouze podpořit svoji antioxidační aktivitu, postačí denní dávka 20 - 50 mg LA. Avšak u pacientů s diabetem by terapeutická dávka LA měla být vyšší, uvádí se běžně 300 - 600 mg denně⁽⁴⁴⁾.

Horní limit pro dávkování LA nebyl prozatím stanoven, avšak se vzrůstající oblibou využívání LA jako doplněk stravy, byly stanoveny bezpečnostní limity pro akutní perorální příjem LA na zvířecích modelech a výrazně se mezidruhově liší⁽⁴³⁾. Např. u psů byla střední smrtelná dávka LD50 (tzn. letální dávka, po níž uhynie právě 50 % testovaných živočichů) stanovena na 400 - 500 mg LA/kg tělesné váhy, zatímco potkani byli mnohem odolnější vůči vyšším dávkám LA a LD50 dosahovalo hodnot více než 2000 mg LA/kg tělesné váhy⁽⁴⁵⁾.

Výsledky klinických studií ALADIN (I, II a III), SYDNEY (I a II) a OPRIL, které zkoumaly nepříznivé účinky podávání LA zdravým dobrovolníkům, dokazují, že suplementací LA až do 2400 mg/den nevyvolala žádné vedlejší účinky ve srovnání s placebo skupinou. LA byla také aplikována intravenózně v dávkách 600 mg/den po dobu tří týdnů s žádnými důkazy o závažných vedlejších účincích⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾.

Shay a kol. aplikovali denně potkanům intraperitoneálně 100 mg/kg tělesné váhy racemické směsi LA. Studie trvala 2 týdny a takto vysoké dávky vyvolaly zvýšenou peroxidaci plasmatických lipidů a oxidační poškození plasmatických i tkáňových bílkovin. U člověka by tato dávka odpovídala hodnotě 5 - 10 g/den⁽⁴⁸⁾.

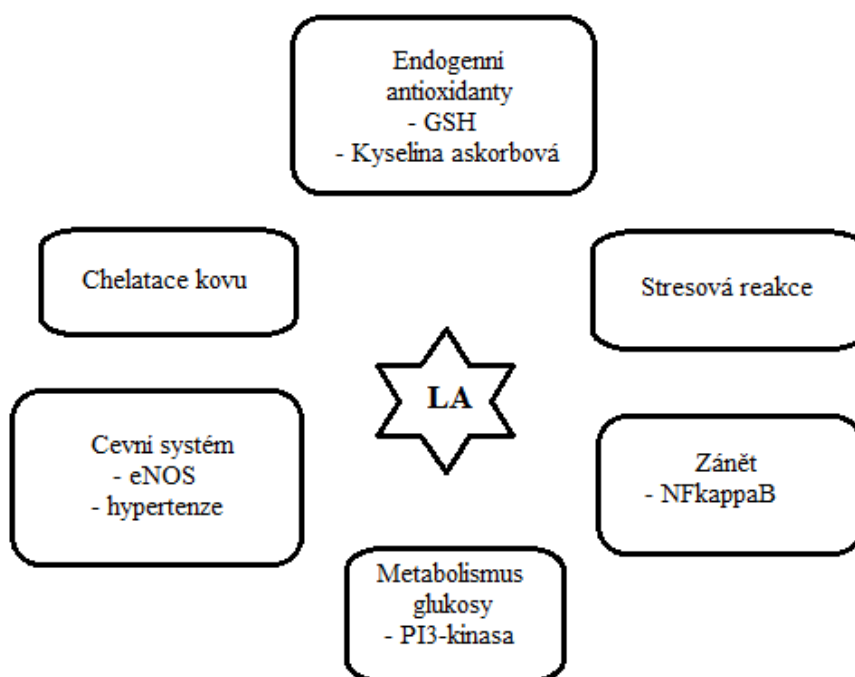
Vigil a kol.⁽⁴⁹⁾ testovali účinky vysokých dávek LA ve skupině 6 opic rodu *Makak rhesus*. Po intravenózním podání 90-100 mg/kg tělesné váhy došlo k úmrtí 50 % jedinců ve sledované skupině. Pitva prokázala rozsáhlé nekrózy svalů a orgánů, především jater.

In vitro studie imortalizovaných lidských buněk proximálního tubulu ledvin (HK-2 buněčná linie slouží jako model ke zkoumání fyziologických a patofyziologických mechanismů ledvin) prokázala, že při koncentraci 250 $\mu\text{mol/l}$ LA (inkubace po dobu 48 hodin) došlo ke snížení buněčné proliferace. Dvojnásobná koncentrace postačila k usmrcení HK-2 buněk již po 24hodinové inkubaci. Z těchto výsledků vyplývá, že by vysoké koncentrace LA mohly působit nefrotoxicky⁽⁵⁰⁾.

Vzhledem k tomu, že LA má i prooxidační vlastnosti a je schopna vyvolávat apoptózu buněk, včetně erytrocytů, je nutné zvážit výši dávky LA individuálně vzhledem k ostatním faktorům daného onemocnění⁽⁴⁹⁾.

2.4.4 Funkce kyseliny lipoové

Řadou studií bylo prokázáno, že LA má mnoho funkcí. Mezi významné funkce LA patří především její silné antioxidační účinky, chelatační vlastnosti, či např. schopnost zprostředkovat buněčnou signalizaci⁽⁴⁸⁾. Funkce LA jsou souhrnně znázorněny na obrázku 9.



Obrázek 9 Souhrnné funkce LA⁽⁴⁸⁾.

eNOS, endotelová syntasa oxidu dusnatého; NFkappaB, nukleární faktor kappa B; PI3-kinasa, fosfatidylinositol-3-kinasa;

2.4.4.1 Kyselina lipoová jako významný antioxidant

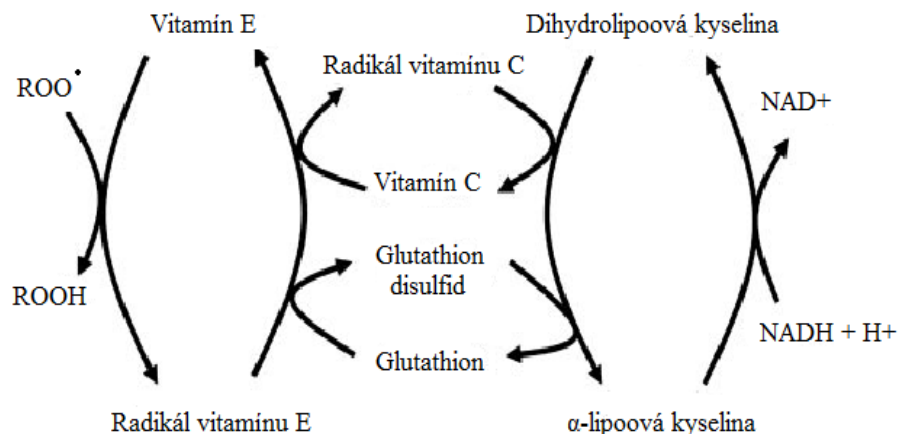
Chemická reaktivita LA je dána především přítomností dithiolového kruhu. Oxidovaná a redukovaná forma LA vytváří silný redoxní pár, jehož standardní redoxní potenciál je -0,32 V. Díky této vlastnosti je LA jednou z nejsilnějších přirozeně se vyskytujících antioxidantů. Na rozdíl od ostatních antioxidantů je výjimečná tím, že vykazuje hydrofobní i hydrofilní vlastnosti a zachovává si své antioxidační vlastnosti v obou svých stavech, jak v oxidovaném, tak redukovaném. Bylo prokázáno, že obě formy mají

schopnost „zhaset“ různé volné radikály, jako např. hydroxylový či peroxylový radikál. LA navíc zhasí singletový kyslík, zatímco DHLA má schopnost účinně zhaset např. radikál oxidu dusnatého. Ani jedna z forem však není aktivní v boji proti peroxylovým radikálům^{(51) (52) (53) (54)}. Navíc, DHLA dokáže regenerovat i ostatní endogenní antioxidanty (např. vitamín C a E)^{(36) (55)}.

2.4.4.2 Kyselina lipoová jako induktor endogenních antioxidantů

Několik studií poukazuje na schopnost LA nepřímo působit na udržení stálého antioxidačního stavu uvnitř buněk. Toho se docílí buď zvýšením příjmu, či syntézy nízkomolekulárních endogenních antioxidantů nebo zvýšením enzymů, nezbytných pro jejich syntézu. Některé studie ukazují, že LA zvyšuje hladiny intracelulárního askorbátu. U suplementovaných potkanů došlo ke zvýšení hladiny askorbátu v játrech, která by jinak klesala s věkem. S věkem dochází totiž k úbytku transportérů pro vitamín C. LA může zvýšit příjem askorbátu z krve. Tyto studie byly doplněny o zjištění, že redukce dehydroaskorbátu na askorbát v mitochondriích jater potkanů byl posílen v přítomnosti LA^{(56) (57) (58) (59)}.

LA výrazně zvyšuje hladiny intracelulárního glutathionu (GSH) v T-lymfocytech, erythrocytech a gliálních buňkách lidí. Autoři této studie došli k závěru, že DHLA redukuje cystin na cystein, který je limitujícím substrátem pro syntézu GSH. Navíc může LA také zvyšovat hladinu cysteinu v buňkách, a to zvýšením příjmu cystinu z krevní plasmy a následně jej redukovat. LA může tedy zabránit poklesu hladin GSH v myokardu, který je spjat s rostoucím věkem a zvýšením dostupnosti cysteinu^{(60) (61)}. Navíc má LA schopnost regenerovat endogenní antioxidanty. Tato regenerace je nutná, neboť při antioxidačním procesu dochází k oxidaci samotného antioxidantu, který už poté není schopen odstraňovat další volné radikály. Je tedy nutná jeho redukce, což zabezpečuje právě DHLA^{(8) (62)}. Regeneraci vitamínů a GSH shrnuje obrázek 10.



Obrázek 10 Regenerace vitamínů a glutathionu kyselinou lipoovou ⁽⁹⁾.

2.4.5 Terapeutické účinky kyseliny lipoové

Kyselinu lipoovou lze přijímat jednak z potravy, kde se nachází pouze v nízkých koncentracích, a jednak z komerčně dodávaných preparátů obsahujících racemickou směs R a S enantiomeru, v množství 50-600 mg. Typickými potravinovými zdroji jsou maso, vnitřnosti, špenát, brokolice atd. ^{(63) (64) (65)}.

Řada klinických studií dokazuje blahodárný vliv suplementace LA na lidský organismus. LA může podporovat terapii řady onemocnění, jako je např. diabetes, ateroskleróza, katarakta, onemocnění jater, neurodegenerativní nemoci, mitochondriální choroby, či AIDS ⁽⁶⁶⁾. Dále je účinným chelátorem řady iontů kovů, a proto se hojně využívá v léčbě otravy těžkými kovy ^{(67) (68) (69)}. Navíc nedávné studie poukázaly na schopnost LA indukovat apoptózu u řady rakovinných buněčných linií ⁽⁷⁰⁾.

2.4.5.1 Vliv kyseliny lipoové na *diabetes mellitus*

Diabetes mellitus je chronické onemocnění, které je doprovázeno velkým množstvím komplikací. Díky širokému spektru antioxidačních účinků, může mít LA preventivní i terapeutický účinek u řady komplikací diabetu nebo může přímo působit na hladinu glukosy v krvi. LA je schopna aktivovat dvě molekuly signální dráhy, která je nezbytná k přenosu signálu pro vstup glukosy do buněk. Jedná se o insulin-receptor substrátovou molekulu (IRS-1, z angl. insulin receptor substrate) a fosfatidylinositol-3-kinasu (PI-3-K). PI-3-K dále aktivuje proteinkinasu B. Výsledkem je zvýšení počtu glukosových transportérů GLUT-4. Těmito mechanismy LA přispívá k vstupu glukosy do buněk a reguluje tím tak její hladinu v krvi ^{(65) (71)}.

Yi a kol. ⁽⁷²⁾ ve své studii zjistili, že LA u myší výrazně snižuje hladinu cholesterolu, zeslabuje albuminurii a glomerulární mesangiální expanzi. Tyto údaje naznačují, že suplementace LA účinně tlumí rozvoj a progresi diabetické nefropatie díky jejím antioxidačním vlastnostem.

Výsledky studií rovněž potvrdily, že LA působí na zlepšení klinických příznaků diabetické neuropatie, navíc zlepšuje rychlost vedení vzruchu v motorických nervech a chrání periferní nervstvo před ischemicko-reperfúzním onemocněním ^{(46) (47) (65) (73)}.

Byl proveden výzkum, při němž bylo rozděleno 40 potkanů do čtyř skupin. Dvě skupiny sloužily jako kontrola. V dalších dvou skupinách byli potkani, u nichž byl vyvolán diabetes intraperitoneální injekcí alloxanu (100 mg/kg). Čtvrté skupině byla navíc denně podávána LA (60 mg/kg), a to po dobu čtyř měsíců. Během dvou až čtyř měsíců se měřila glykémie, hladina GSH a vitamínu C. Následně byla zvířata usmrcena a podrobena mikroskopickému vyšetření sítnice. U neléčených diabetických potkanů došlo k výraznému zhoršení biochemických parametrů, navíc se u nich vyskytly i zřetelné histopatologické změny. U skupiny diabetických potkanů, jimž byla podávána LA, byly hodnoty biochemických parametrů výrazně lepší a dále nebyly prokázány žádné výrazné odchylky na sítnici ve srovnání s kontrolní skupinou ⁽⁷⁴⁾.

2.4.5.2 Ateroskleróza a kyselina lipoová

Ying a kol. ⁽⁷⁵⁾ zkoumali mechanismus ochranného působení LA na zvířecích modelech s aterosklerózou. Klíčovým zjištěním této studie bylo, že u zvířat, kterým byla podávána LA, došlo k redukci tělesné hmotnosti o 15 ± 5 % beze změny v lipidových parametrech. Magnetická rezonance ukázala, že u zvířat suplementovaných LA se snížil výskyt aterosklerotických plátů v břišní aortě a morfologická analýza odhalila snížení obsahu lipidů a zánětlivých buněk. Současně s jejím účinkem na aterosklerózu, LA pozitivně zlepšuje cévní reaktivitu (např. zvýšená relaxace na acetylcholin a insulin), inhibuje aktivaci NF- κ B, snižuje oxidační stres a expresi klíčových adhezivních molekul v cévním systému.

Zulhairi a kol. ⁽⁷⁶⁾ zkoumali ochranný vliv LA u zvířat s indukovanou hypercholesterolémií. Výsledky ukázaly, že ve skupině, suplementované LA, došlo k významnému snížení indexu lipoperoxidace, což se projevilo nízkou hladinou malondialdehydu (MDA), dále snížení hladiny celkového a LDL cholesterolu ve srovnání se skupinou bez suplementace LA. Navíc histomorfologická analýza léze v aortě poukázala na snížení tvorby aterosklerotického plátu ve skupině zvířat

suplementovaných LA. To poukazuje na to, že kromě antioxidačních vlastností, má LA také hypolipidemické účinky.

Pro zjištění účinků LA na aterosklerotický plát byla použita metoda zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MSI, z angl. mass spectrometry imaging) ^{(76) (77)}. Po šesti týdnech krmení králíků stravou s vysokým obsahem lipidů byla zaznamenána výrazně vyšší velikost aterosklerotického plátu v tepenné stěně. Po dvanácti týdnech suplementace LA došlo k signifikantnímu snížení velikosti aterosklerotického plátu v porovnání s kontrolní skupinou. V kontrolní skupině aterosklerotický plát nadále rostl. Tento fakt vedl k závěru, že LA je vhodným léčivem v boji proti ateroskleróze i v její prevenci. Imunohistochemická analýza prokázala snížení buněk CD 68⁺ a snížení množství lipidů v místě aterosklerotického plátu. LA také snižuje vasokonstriční reakce na angiotensin II. Dále byly prokázány protizánětlivé účinky LA. V aterosklerotickém plátu břišní aorty u suplementované skupiny králíků došlo ke snížení exprese vaskulárních a intracelulárních adhezivních molekul VCAM-1 (z angl. vascular cell adhesion molecule), ICAM-1 (z angl. intracellular adhesion molecule) a L-selektinu (CD 62L). Také bylo zjištěno, že LA snižuje infiltraci T-lymfocytů (CD 3⁺) v aterosklerotickém plátu, které se přímo účastní zánětlivého procesu v cévní stěně.

2.4.5.3 Vliv kyseliny lipoové na stabilitu aterosklerotického plátu

Podle Světové zdravotnické organizace je kardiovaskulární onemocnění nejčastější příčinou úmrtí v tzv. západní civilizaci. Z tohoto důvodu je neustále nutné hledat nové biomarkery, které by spolehlivě odrážely průběh nemoci nebo dokonce umožňovaly její včasný záchyt. V případě AP se takovými biomarkery zdají být matrixové metaloproteinasy (MMP). Jedná se o proteolytické enzymy, patřící do rodiny zinek-dependentních endopeptidas, které regulují integritu a složení extracelulární matrix (ECM).

V souvislosti s kardiovaskulárním onemocněním se nejčastěji hovoří o MMP-2 a MMP-9, také nazývané jako gelatinasy. Tyto gelatinasy jsou hojně zastoupeny v různých zhoubných nádorech, hrají také aktivní úlohu při angiogenezi a mohou také ovlivnit proces formace a destabilizace aterosklerotických lézí. Aterosklerotický plát je charakterizován intenzivní infiltrací zánětlivých buněk, tvořených převážně monocyty a makrofágy. Makrofágy jsou schopny degradovat ECM fagocytózou nebo vylučovat MMP, které oslabují vláknitou čepičku aterosklerotického plátu a přispívají tak k jeho prasknutí. Dřívější studie ukázaly, že MMP-9 se nachází v ateromu v břišním

aneuryzmatu aorty a zvýšené hladiny jsou spojeny s cévní mozkovou příhodou nebo kardiovaskulární smrtí. Aktivované makrofágy, a to zejména v aterosklerotických lézích, jsou hlavním zdrojem ROS. Bylo prokázáno, že antioxidační síť má schopnost blokovat ROS-indukovanou MMP aktivaci a inhibuje jejich proteolytickou činnost.

Bogani a kol. ⁽⁷⁸⁾ se ve své studii zabývali otázkou, zda antioxidanty, jako je GSH, N-acetylcystein a LA, ovlivňují tvorbu a vylučování gelatinasy. Výsledky ukazují, že thiolové sloučeniny ovlivňují expresi a aktivitu MMP různými způsoby. Aktivita MMP-2 je přímo inhibována N-acetylcysteinem a GSH, zatímco LA je v této činnosti neúčinná. Naopak exprese MMP-9 je LA inhibována na pre-transkripční úrovni a její aktivita je stimulována GSH prostřednictvím přímé interakce s gelatinasou. Výsledkem této studie bylo tedy zjištění, že léčba antioxidanty snižuje aktivitu MMP indukovanou právě ROS a že by mohla mít vliv na tvorbu a vylučování gelatinasy.

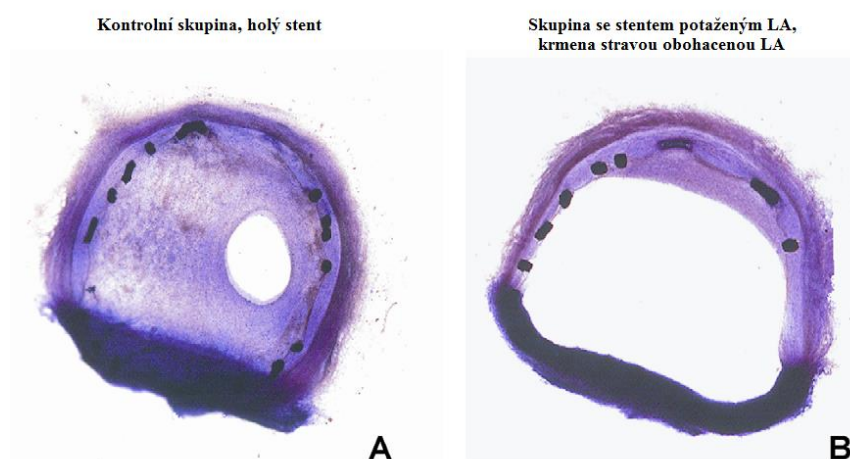
2.4.5.4 Ischemická choroba srdeční a kyselina lipoová

Wang a kol. ⁽⁷⁹⁾ provedli studii, ve které se zabývali otázkou, zdali podávání LA u pacientů s ischemií myokardu vede k lepší regeneraci postižené tkáně. U zvířecích modelů (krysy) byla navozena ischemie myokardu podvázáním levé koronární tepny. Po dvou hodinách ischemie byl průtok do tepny obnoven. Reperfúze trvala 0, 1, 2, 4 a 8 hodin. Třicet minut před reperfúzí byl polovině potkanům nitrožilně podán fyziologický roztok (kontrolní skupina). Druhé skupině bylo podáno kromě fyziologického roztoku také 0,1 g LA/kg hmotnosti. Podávání fyziologického roztoku a LA pokračovalo u druhé skupiny paralelně s časem 0, 1, 2, 4 a 8 hodin. Po zvoleném časovém intervalu byla krysí srdce vyoperována a srdeční tkáň byla podrobena analýze. Studie se zaměřila na ukazatele postižení tkáně a oxidačního stresu, které vznikají při ischemii myokardu. Kontrolní skupina měla výrazně zvýšenou aktivitu kreatinkinasy, která korelovala s časem. U krys, kterým byla aplikována LA, byla zaznamenána snížená aktivita kreatinkinasy jak v séru, tak také srdečním svaly. Byl pozorován i pokles hladiny MDA (ukazatel peroxidace lipidů) u krys, kterým byla podávána LA. Aktivity superoxididmutasy i katalasy v závislosti na čase také klesaly, naopak hladina GSH stoupala, což poukazuje na prospěšné antioxidační působení LA.

2.4.5.5 Potenciální využití kyseliny lipoové pro nové druhy stentů

Díky řadě prospěšných vlastností LA se uvažuje o jejím využití v případě lékových stentů. Stent potažený LA, která by se postupně uvolňovala, by měl mít příznivé

antioxidační a protizánětlivé účinky na okolní tkáň, což by mohlo omezit restenózu či vznik pozdní trombózy. Lim a kol. ⁽⁸⁰⁾ se zabývali ve své studii tím, zda stenty potažené LA mohou omezit vznik restenózy a pozdní trombózy. Jako vhodný pokusný model bylo zvoleno prasce. K potažení stentu LA bylo využito kovalentní vazby mezi karboxylovou skupinou LA a aminovou skupinou v polymeru (diaminocyklohexan) stentu. Kontrolní skupině prasat byly do dvou koronárních tepen implantovány dva holé kovové stenty, zatímco druhé skupině byly do stejných tepen implantovány lékové stenty potažené LA. Navíc byla tato skupina po celou dobu experimentu krmena stravou obohacenou LA (100 mg/kg). Po 28 dnech byla provedena imunohistopatologická analýza stentované tkáně. Studie se zaměřila na aktivaci nukleárního transkripčního faktoru NF- κ B, faktoru stimulující kolonie granulocytů (G-CSF, z angl. granulocyte-colony stimulating factor) a dále byly provedeny histologické řezy, které byly obarveny a pozorovány pod mikroskopem. Výsledky studie lze shrnout takto. Proliferace buněk hladké svaloviny cév byla inhibována a exprese NF- κ B byla v přítomnosti LA snížena. Histopatologickou analýzou bylo zjištěno, že u prasat léčených LA byla redukována stenóza, jak je patrné na obrázku 11. Závěrem této práce je fakt, že strava obsahující LA, či LA-potažené stenty inhibují u prasat hyperplazii neointimy s modelem restenózy v místě stentu prostřednictvím inhibice NF- κ B a proliferace buněk hladké svaloviny cév.



Obrázek 11 Histologické řezy koronární tepny obarvené methylmetakrylátem, pozorovány mikroskopem při zvětšení 200x. Obr. A – kontrolní skupina, obr. B – skupina se stentem potaženým LA, upraveno podle ⁽⁸⁰⁾ (81).

Lim a kol. ⁽⁸²⁾ ve své studii zkoumali antiproliferativní a antioxidační vliv stentů, potaženými sirolimem a LA. K potažení stentu účinnou látkou byl použit biologicky odbouratelný polymer kyseliny mléčné (PLA, z angl. poly-L-lactic acid), který je snadno degradován jednoduchou hydrolýzou a může být odstraněn z těla přirozenou metabolickou cestou. Jako vhodný zvířecí model byla opět zvolena prasata, která byla rozdělena do 4 skupin. Kontrolní skupině prasat byly do dvou koronárních tepen implantovány dva holé kovové stenty, druhé a třetí skupině byly do stejných tepen implantovány lékové stenty potažené LA nebo sirolimem, zatímco čtvrté skupině byly implantovány lékové stenty potažené kombinací obou účinných látek. Sirolimus a LA se postupně uvolňovaly 30 dní. Po 28 dnech byla provedena histopatologická analýza stentované tkáně. Bylo zjištěno, že u prasat léčených stentem potaženým kombinací LA a sirolimem, došlo k nejvýraznější redukci stenózy. Výsledky této studie poukazují na možnost využití kombinace sirolimu a LA ve spojení s biologicky vstřebatelnými koronárními stenty, které by mohly účinněji inhibovat hyperplazii neointimy a zároveň snížit dlouhodobé vedlejší účinky spojené s trvalými stenty.

V další studii stejný kolektiv autorů zkoumal optimální způsob potažení dvouvrstvého polymerního koronárního stentu účinnými látkami sirolimem a LA. Testovaná prasata byla náhodně rozdělena do tří skupin, v každé skupině bylo stentováno vždy 10 koronárních tepen. Ve skupině IAOS byla vnitřní vrstva stentu potažena LA a vnější sirolimem, ve skupině ISOA naopak a poslední skupina, označená BES, byla stentována komerčně dostupným stentem s sirolimem. Histopatologická analýza byla provedena po 28 dnech a nebyly zjištěny významné rozdíly v protizánětlivých účincích mezi jednotlivými skupinami. Mikrotomografií se prokázaly významné rozdíly v procentuální míře stenózy, konkrétně 23.8±3.51% skupina IAOS; 28.9±4.65% skupina ISOA a 36.4±8.07% skupina BES, p<0.05). Navíc potažené stenty ve skupině IAOS byly účinnější v prevenci hyperplazie neointimy ve srovnání se stenty v ISOA skupině ⁽⁸³⁾.

Hlavním úskalím lékových stentů je nadále pozdní trombóza, která může souviset s využíváním různých typů polymerů k navázání účinné látky k holému kovovému stentu. Lim a kol. ⁽⁸⁴⁾ se zabývali ve své studii novou technologií lékových stentů bez použití polymerové matrice. K navázání účinných látek použili vrstvu TiO₂, která byla nanášena na holý stent pomocí chemické deposice z plynné fáze (PECVD, z angl. plasma-enhanced chemical vapor deposition). Navázaná vrstva TiO₂ byla chemicky modifikována a vzniklé hydroxylové skupiny tvořily esterové vazby

s karboxylovou skupinou léků. V této studii sledovali efekt TiO₂-stentu potažený abciximabem nebo LA. Prasata byla rozdělena do 4 skupin. Kontrolní skupině byly do dvou koronárních tepen zavedeny dva holé TiO₂ stenty, zatímco druhé a třetí skupině byly zavedeny dva TiO₂-abciximab stenty a TiO₂-LA stenty. Čtvrté skupině byly implantovány dva komerčně dostupné stenty s biologicky odbouratelným polymerem potaženým biolimem. *In vitro* testem bylo zjištěno, že abciximab se postupně uvolňoval 4 týdny, ale LA se uvolnila již během šesti dnů. Histopatologickou a imunohistochemickou analýzou, spolu s mikrotomografií se prokázalo, že použití TiO₂-stentu v kombinaci s abciximabem nebo LA výrazně snížilo hyperplasiu neointimy ve srovnání s holým TiO₂-stentem. Navíc použití TiO₂-abciximab a TiO₂-LA stentů mělo výrazně vyšší protizánětlivé účinky na okolní tkáň oproti komerčně dostupným stentům s biolimem.

2.4.5.6 Vliv kyseliny lipoové na indukci apoptózy buněk

Apoptóza je cílená programovaná buněčná smrt, která vychází z genetického programu buňky nebo je vyvolána vnějším podnětem. Organismus se tak zbavuje buněk opotřebovaných či z nějakých důvodů nefunkčních (buňky infikované virem, nádorové buňky atd.). Jedná se o proces, který zahrnuje sled biochemických reakcí, vedoucí k morfologickým změnám buňky. Centrální úlohu hraje aktivace kaspas v cytosolu a výsledkem je degradace cytoskeletu, fragmentace jádra, změna tvaru cytoplasmatické membrány a smrštění buňky. Takto pozměněná buňka je vychytána a degradována buňkami imunitního systému. Během tohoto procesu nedochází k aktivaci zánětlivé reakci organismu a tím se liší od nekrózy⁽⁸⁵⁾.

Kyselina lipoová má schopnost indukovat buněčnou apoptózu u mnoha typů buněk, a proto se několik studií zabývalo testováním jejich účinků na rakovinné buněčné linie. Přesné mechanismy účinků LA na apoptózu sice nejsou prozatím zcela objasněné, ale bylo prokázáno, že dlouhodobá expozice vysoké koncentrace LA (do 10 mmol/l) je schopná indukovat apoptózu u buněčných linií jater a hltnu⁽⁷⁰⁾. Nižší koncentrace (100 – 250 μmol/l) a mnohem kratší čas expozice LA stačila k indukci apoptózy v případě rakovinných buněk tlustého střeva, plicních epitelálních buněk a buněk rakoviny prsu, kde navíc přispívala k potlačení tvorby a invaze metastáz. Bylo prokázáno, že LA také zvyšuje citlivost buněk i na jiné mechanismy způsobující apoptózu buněk. Předpokládá se, že by LA byla v kombinaci s jinými léčivy vhodná při

léčbě některých druhů rakoviny, a to především v těch oblastech, kde je účinná již v nízkých koncentracích ⁽⁸⁶⁾ ⁽⁸⁷⁾.

2.4.5.7 Kyselina lipoová a erytrocyty

Po perorálním užití se LA vstřebává z gastrointestinálního traktu do krevního řečiště, následně se přechodně akumuluje ve tkáních, nejvíce v srdci, ledvinách a játrech. Odbourávání probíhá v játrech a metabolity jsou glomerulární filtrací vyloučeny močí z organismu. V krevním řečišti může působit na jednotlivé složky krve, erytrocyty, lymfocyty a trombocyty. Erytrocytární membrány mají transportní systémy pro LA i DHLA. Erytrocyty přijímají a redukují exogenní LA glukosovým metabolismem, za nezbytné přítomnosti molekul glukosy a NADPH. Jelikož jsou erytrocyty bezjaderné buňky, neobsahují tedy mitochondrie, a tudíž se zde nachází jen velmi malé množství dihydrolipoamiddehydrogenasy, je redukce LA katalyzovaná především glutathionreduktasou. Tato závislost byla prokázána studií lidských erytrocytů s geneticky podmíněným deficitem glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, který způsobuje nedostatečnou tvorbu NADPH. V tomto modelu erytrocytů nedošlo k redukci LA. Volný hemoglobin má schopnost poměrně v krátké době DHLA reoxidovat, navíc DHLA podléhá samovolné reoxidaci a příčinu spontánní zpětné oxidace je obtížné blíže objasnit ⁽³⁹⁾.

Kyselina lipoová, a především její redukováná forma, brání oxidačnímu stresu vedoucímu k poškození buněčných membrán erytrocytů a chrání je před hemolýzou, která může být indukována peroxylovými radikály ⁽³⁹⁾ ⁽⁸⁸⁾. Z těchto důvodů byly použity lidské erytrocyty jako testovací model terapeutického účinku LA v oblasti mikrovaskulární komplikace diabetu, diabetické neuropatie. Při této komplikaci dochází k postižení periferní nervové tkáně, která postupně vede k poruchám citlivosti a významné bolestivosti dolních končetin. Tento stav se nazývá „diabetická noha“ a velmi často, při nedostatečné kompenzaci komplikací, dochází k amputaci ⁽⁸⁹⁾.

Důležitým faktorem pro rozvoj diabetické neuropatie je snížená aktivita sodíko-draslíkové pumpy (Na^+/K^+ ATPasa), která je nezbytná pro normální fyziologii svalů a nervů. Selvaraj a kol. ve své studii použili model lidských erytrocytů, u kterých simulovali stav odpovídající diabetu. Výsledek studie ukázal, že působení LA výrazně zvýšilo aktivitu Na^+/K^+ ATPasy a Ca^+ ATPasy. Navíc došlo ke snížení indexu lipoperoxidace, glykosylace lipidů a neenzymatické glykace hemoglobinu, kde významným rizikovým faktorem je právě lipoperoxidace ⁽⁸⁹⁾ ⁽⁹⁰⁾.

Ameta a kol. stanovili hladiny LA po perorálním podání (600 mg) u zdravých dobrovolníků. Čas, kdy LA dosáhla maximální koncentrace v plasmě, činil v průměru 1 až 1,5 h a hladina LA se pohybovala v rozmezí 6,2 – 11,2 $\mu\text{mol/l}$. Oproti tomu koncentrace LA v erythrocytech byla výrazně nižší, resp. 0,2 – 0,3 $\mu\text{mol/l}$ ⁽⁹¹⁾.

2.4.5.8 Kyselina lipoová a indukce eryptózy

Erythrocyty, stejně jako ostatní buňky v organismu, podléhají programované buněčné smrti, tzv. eryptóze. Eryptóza je organizovaná buněčná smrt, která je geneticky naprogramovaná nebo může být vyvolána např. úbytkem energie, osmotickým šokem, hypertermií či oxidačním stresem, který způsobuje poškození její buněčné membrány. Podobně jako u apoptózy jaderných buněk, dochází během eryptózy k smršťování erythrocytů a postupné změně tvaru buněčné membrány, vysunutí fosfolipidů na buněčný povrch. Takto pozměněné erythrocyty jsou rozpoznány, vychytány a odstraněny buňkami imunitního systému z krve. Celý proces je enzymaticky regulován kinasami a na rozdíl od apoptózy nepotřebuje eryptóza k svému průběhu aktivaci cytosolových kaspas.

Hlavním spouštěčem eryptózy je zvýšená aktivita Ca^{2+} iontů v cytosolu, které vstupují z extracelulárního prostoru do buňky přes propustné kationtové kanály. Zde aktivují enzymatickou degradaci proteinů v cytoskeletu, způsobují nadměrné vylučování intracelulárních K^+ a Cl^- iontů, což vede celkově ke ztrátě vody, změně tvaru membrány a smršťování buňky. Celý proces je zesílen membránovým lipidem ceramidem, který zvyšuje citlivost buněčné membrány erythrocytů na působení vápenatých iontů. Eryptóza může být naopak inhibována radikálem oxidu dusnatého, katecholaminy, či do určité míry i erythropoetinem⁽⁹²⁾.

Kyselina lipoová má schopnost indukovat buněčnou smrt u řady typů buněk, včetně erythrocytů. Její oxidovaná forma může zvyšovat tvorbu ceramidu, a tím dochází ke stimulaci zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v cytosolu, má schopnost snižovat hladinu ATP v buňce. Koncentrace LA, při které byly pozorovány již zmíněné účinky, byla 20 $\mu\text{mol/l}$ a více. Za fyziologických podmínek je však stimulační účinek LA na eryptózu zanedbatelný a u zdravých jedinců se může projevit pouze dlouhodobým podáváním vysokých dávek LA. Pokud v organismu probíhá zvýšená aktivita eryptózy, je tento jev často kompenzován erythropoézou. Avšak u pacientů s hematologickým onemocněním, při kterém dochází k výraznému snížení hladiny erythrocytů, by se podávání LA mělo zvážit⁽⁹³⁾.

2.4.6 Hladina kyseliny lipoové v lidské plasmě

Názory na to, jaké jsou endogenní hladiny LA, se různí. Teichert a kol. ⁽⁹⁴⁾ v roce 1992 ve své studii uvedli, že referenční interval LA a DHLA se pohybuje u zdravých nesuplementovaných jedinců v rozmezí 4,8–121 nmol/l, resp. 158–691 nmol/l. Výsledky studie z roku 2002 stejného autorského kolektivu ukazují, že endogenní koncentrace LA se pohybují okolo 4,85 nmol/l a zároveň připouštějí, že hladiny mohou být i nižší, řádově v pmol/l ⁽⁹⁵⁾. Na druhé straně Khan a kol. ⁽⁹⁶⁾ ve své práci publikují průměrné koncentrace 169,7 nmol/l pro LA a 830,5 nmol/l pro DHLA. Montera a kol. vyvinuli metodu HPLC/MS/MS pro simultánní stanovení LA a α -, γ - a δ -tokoferolu. Ve své studii tvrdí, že endogenní hladiny LA u nesuplementovaných pacientů jsou prakticky nedetekovatelné ⁽⁹⁷⁾. Jiné zmínky o endogenních koncentracích LA nebyly publikovány, stanovení endogenní koncentrace LA je totiž obtížné.

U pacientů, kterým je LA podávána, jsou hladiny LA asi 1000x vyšší ⁽⁴⁴⁾. Rochette a kol. uvádějí optimální terapeutickou dávku LA 200 - 1800 mg denně, přičemž koncentrace v plasmě po suplementaci je dle jejich studie v rozmezí 15-20 $\mu\text{mol/l}$ ⁽⁹⁸⁾.

Teichert a kol. podávali skupině 9 zdravých dobrovolníků 600 mg LA po dobu 1 měsíce. Koncentraci LA v plasmě po suplementaci měřili metodou HPLC/ED a zjistili, že první den po perorálním podání dosáhla LA své maximální koncentrace za 30 min, čtvrtý den podávání již za pouhých 20 minut. Průměrné hladiny LA v plasmě byly $36,19 \pm 10,35 \mu\text{mol/l}$, resp. $31,45 \pm 8,20 \mu\text{mol/l}$ ⁽⁹⁹⁾.

Carlson a kol. podávali perorálně 600 mg R-LA 12 zdravým dobrovolníkům. Maximální koncentrace LA v plasmě byla dosažena za 14 minut po podání. Koncentrace měřili metodou HPLC/ED a průměrná hladina činila $77,56 \pm 30,63 \mu\text{mol/l}$. Na základě svých poznatků došli k závěru, že vzhledem k terapeutickým účelům je vhodnější podávat racemickou směs R- a S-LA. Dále tvrdí, že k významnějším terapeutickým výsledkům dochází při koncentraci LA v plasmě 50-100 $\mu\text{mol/l}$. Horní hranice LA v plasmě byla autory stanovena na 250 $\mu\text{mol/l}$ ⁽¹⁰⁰⁾.

Chen a kol. podali 10 zdravým dobrovolníkům jednorázově 600 mg LA. Koncentrace LA dosáhla svého maxima za 65 minut a byla v průměru $16 \pm 4,2 \mu\text{mol/l}$ ⁽¹⁰¹⁾. Moini a kol. shrnuli výsledky několika studií. Po jednorázovém podání 200 mg a 600 mg LA byla naměřena hodnota $3,1 \pm 1,5 \mu\text{mol/l}$ a $13,7 \pm 8,2 \mu\text{mol/l}$. Maximum své koncentrace dosahovala v průměru za půl hodiny. Po intravenózní aplikaci 200 mg LA

byla naměřená hodnota výrazně vyšší, konkrétně $40,3 \pm 11,3 \mu\text{mol/l}$. Diabetickým pacientům se aplikovalo 600 mg LA intravenózně a hladiny se pohybovaly v průměru mezi 100 – 200 $\mu\text{mol/l}$ ⁽⁹⁾.

Chvatko a kol. měřili hladiny LA v plasmě po perorálním podání 600 a 1200 mg LA zdravým dobrovolníkům metodou HPLC/UV, koncentrace se pohybovala v rozmezí $0,67 \pm 0,40 \mu\text{mol/l}$ a $1,57 \pm 0,34 \mu\text{mol/l}$ ⁽¹⁰²⁾.

2.4.7 Možnosti stanovení kyseliny lipoové

Stanovení LA v biologickém materiálu, potravinách a doplňcích stravy je důležité pro studie zkoumající biochemické reakce LA, nutriční a farmakodynamické studie nebo také pro diagnózu či sledování úspěšnosti terapie řady onemocnění. Speciálně pro klinickou praxi je nutné posoudit také farmakokinetiku LA. Z těchto důvodů bylo vyvinuto několik adekvátních metod vhodných pro stanovení LA. V minulosti se používaly metody jako např. polarografie, enzymová imunoanalýza, mikrobiologické metody atd. ^{(103) (104) (105) (106) (107)}. Tyto metody však nebyly dostatečně vyhovující díky své nespecifitě či nedostatečné citlivosti. Chromatografické metody jsou pro stanovení LA mnohem vhodnější. K stanovení LA je možné použít např. tenkovrstvou chromatografii (TLC), plynovou chromatografii (GC), a především pak HPLC s různými typy detektorů.

Biologické vzorky obsahují velké množství interferujících látek, které by mohly rušit stanovení. Proto je nutné vzorek před vlastní analýzou upravit. Vhodný způsob úpravy jsou deproteinace a extrakce. Pro přípravu vzorku lze použít extrakci kapalina-kapalina nebo extrakci na tuhé fázi (SPE). Pro SPE se využívají kolonky o objemech mezi 1-6 ml. Na SPE kolonce se složky vzorku dělí nejčastěji na principu chromatografie s obrácenými fázemi a uplatňují se zde různé retenční mechanismy, jako např. van der Waalsovy síly, dipól-dipólové interakce nebo vodíkové vazby či iontová výměna. Kolonky jsou plněny částicemi sorbentu o velikosti 50–100 μm . Využívá se zde retence sledovaného analytu, který je po promytí vzorku z kolonky desorbován. Jako sorbent se používá modifikovaný silikagel. V SPE se řídíme následujícím postupem. Po zvolení vhodné SPE kolonky je nutná její aktivace (kondicionace) a následné promytí kolonky stejným rozpouštědlem, v kterém se nachází sledovaný analyt. Dalším krokem je nadávkování vzorku, kdy je analyt zachycen sorbentem. Kolonka je promývaná vhodným rozpouštědlem, kterým jsou odstraněny nežádoucí nečistoty. Následuje vymytí analytu vhodným elučním činidlem ⁽¹⁰⁸⁾.

Jelikož je v biologickém materiálu majoritní část LA ve vazbě na proteiny, je nutné ji před vlastní analýzou z této vazby uvolnit. K tomu se využívá kyselá, bazická a především šetrná enzymatická hydrolýza.

Kataoka a kol. ⁽¹⁰⁹⁾ zkoušeli bazickou hydrolýzu. Tento postup byl šetrnější ve srovnání s kyselou hydrolýzou, navíc se LA méně oxidovala. Vzorek hydrolyzovali 2mol/l hydroxidem draselným obsahující 4% hovězí sérový albumin při teplotě 110 °C po dobu 3 hodin. Uvolněnou LA extrahovali do dichlormethanu a výtěžnost byla 50–60 %.

Shih a Steinsberger ⁽¹¹⁰⁾ hydrolyzovali vzorek 6 mol/l kyselinou sírovou při teplotě 125 °C po dobu 6 hodin a LA extrahovali do benzenu. Výtěžnost této metody byla 34 %.

White a kol. ⁽¹¹¹⁾ a Liaud a kol. ⁽¹¹²⁾ hydrolyzovali vzorek 6 mol/l kyselinou chlorovodíkovou při teplotě 120 °C po dobu 2–6 hodin a uvolněnou LA extrahovali do dichlormethanu. Výtěžnost byla pouze 30 %, navíc během hydrolýzy docházelo k nežádoucí oxidaci LA.

Teichert a Preiss ⁽⁹⁴⁾ publikovali studii, kde zkoumali účinky několik proteas pro uvolnění LA z vazby na bílkovinu. Výtěžnost metody při použití termofilní proteasy, alkalasy a subtilisinu byla 70, 80 a 82 %.

2.4.7.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie má široké uplatnění v analýze těkavých látek. Je relativně jednoduchá s vysokou rozlišovací schopností či citlivostí. LA a její metabolity nelze stanovovat přímo, je nutná derivatizace. Nejčastějšími deriváty LA jsou methylestery, S,S-dibenzylmethylestery či S,S-diethoxykarbonylmethylestery.

GC s plamenově ionizačním detektorem

Shih a Steinsberger ⁽¹¹⁰⁾ separovali a stanovili LA a její metabolity z kuřecích jater GC s plamenově ionizačním detektorem (FID). Jako derivatizační činidlo použili diazomethan.

Natraj a kol. ⁽¹¹³⁾ používali jako methylační činidlo směs methanolu a kyseliny chlorovodíkové, Liaud a kol. ⁽¹¹²⁾ roztok fluoridu boritého v methanolu. V biologickém materiálu je stanovení LA touto metodou obtížné, neboť část LA tvoří směs disulfidů, které musí být redukovány na thioly a pak derivatizovány vhodnými činidly. Jako redukční činidlo se používá např. tetrahydridoboritan sodný.

GC s hmotnostním detektorem

Pratt a kol. ⁽¹¹⁴⁾ a Jackman a kol. ⁽¹¹⁵⁾ detegovali methylester LA hmotnostním detektorem s elektronovou ionizací (EI-MS) sledováním fragmentu iontu s m/z 123 a molekulárního iontu s m/z 220.

White ⁽¹¹¹⁾ stanovoval LA jako S,S-dibenzylmethylester metodou GC/EI-MS, monitoroval ionty s m/z 311 a 137, které vznikají při štěpení vazby mezi uhlíky C7 a C8. Dále testoval některá činidla, jako např. dinitrofluorbenzen a 2,2-dimethoxypropan pro derivatizaci DHLA, nicméně, vzniklé deriváty nebyly vhodné pro stanovení metodou GC-MC díky své nízké těkavosti, nestabilitě a složité přípravě.

2.4.7.2 Kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je v dnešní době nejvíce používanou metodou pro analýzu LA a příbuzných sloučenin. Je používána v kombinaci s řadou typů detektorů, jako je např. ultrafialový (UV), fluorescenční, chemiluminiscenční, MS a především elektrochemický (EC).

Ultrafialový detektor

UV detekce nenašla při stanovení LA velké uplatnění. Hlavní příčinou je skutečnost, že LA neobsahuje silný chromofor, tudíž je nezbytná derivatizace. LA může být detekována při vlnové délce 330 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu dithiolového kruhu. Citlivost této detekce je velmi nízká.

Howard a McCormick ⁽¹¹⁶⁾ ⁽¹¹⁷⁾ separovali LA a příbuzné sloučeniny metodou HPLC/UV v systému obrácených fází s gradientovou elucí.

Campos a kol. ⁽¹¹⁸⁾ vyvinuli metodu pro stanovení LA ve vzorku kůže metodou HPLC/UV, HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC/EC) a HPLC s odpařovacím detektorem rozptylu světla (HPLC/ELSD, z angl. evaporative light scattering detector). Srovnáním parametrů metod, využívajících rozdílné typy detektorů, došli k názoru, že metoda HPLC/UV poskytuje sice poměrně dobrou přesnost v celém koncentračním rozmezí, ale nízkou citlivost z důvodu absence chromoforu. Tato metoda může být použita ke sledování stability LA ve vzorku kůže a pouze při vyšších koncentracích. Detekční limit této metody byl 1 $\mu\text{g/ml}$.

Chwatko a kol. stanovili hladiny LA v lidské plasmě suplementovaných dobrovolníků. Nejprve provedli redukci disulfidového kruhu a následovala derivatizace thiolové skupiny 1-benzyl-2-chlorpyridiniumbromidem. Vzniklý S-pyridinový derivát

analyzovali metodou HPLC/UV. Detekční limit pro celkovou hladinu LA („total LA“) byl 0,05 $\mu\text{mol/l}$ a 0,2 $\mu\text{mol/l}$ pro proteinově vázanou LA ⁽¹⁰²⁾.

Fluorescenční detektor

Kyselina lipoová neobsahuje ve své molekule ani fluorofor, tudíž je před HPLC analýzou s fluorescenční detekcí opět nutná derivatizace. Příkladem derivatizačního činidla je 2-bromoacetyl-6-methoxynaftalen, monobromobiman či 2-(4-aminofenyl)-6-methylbenzothiazol. Výhodou fluorescenční detekce (FD) je vysoká citlivost a linearita ve velkém rozsahu koncentrací. Nevýhodou je složitá a zdlouhavá příprava vzorku.

Satoha a kol. ⁽¹¹⁹⁾ provedli simultánní stanovení LA a DHLA. DHLA byla derivatizována 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazolem. LA byla redukována tris(2-karboxyethyl)fosfinem na DHLA, která byla derivatizována 7-fluorobenzofurazan-4-sulfátem. Vzniklé deriváty byly separovány v systému obrácených fází a detekovány při vlnové délce 510 nm (excitace při 380 nm). Limit detekce byl 0,3 pmol.

Haj-Yehia a kol. ⁽¹²⁰⁾ vyvinuli metodu HPLC/FD pro simultánní stanovení LA a DHLA v plasmě a moči. Derivatizačním činidlem byl 2-(4-aminofenyl)-6-methylbenzothiazol. Před derivatizací bylo nutné blokovat thiolové skupiny DHLA ethylchlorformiátem, aby nedošlo k jejich oxidaci. Vzniklé deriváty byly isokraticky separovány v systému obrácených fází a detegovány fluorescenčním detektorem ($\lambda_{\text{excitace}} = 343 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emise}} = 423 \text{ nm}$). Metoda byla lineární v širokém koncentračním rozmezí, detekční limit byl 0,1 ng/ml pro LA a 0,5 ng/ml pro DHLA.

Niebch a kol. ⁽¹²¹⁾ vyvinuli stereoselektivní metodu pro analýzu R a S enantiomerů. Jako derivatizační činidlo použili o-ftalaldehyd v přítomnosti D-fenylalaninu. Detekční limit byl 3 ng/ml.

Witt a kol. ⁽¹²²⁾ popsali ve své práci metodu pro stanovení LA v plasmě a tkáních. Metoda je založená na selektivní předkolonové derivatizaci thiolů s monobromobimananem. Po extrakci diethyletherem byl dithiolový kruh otevřen po redukcí tetrahydridoboritanem sodným. Vzniklé deriváty byly detegovány při vlnové délce 470 nm (excitace při 385 nm). Detekční limit byl 4 ng/ml.

Hmotnostní detektor

Chen a kol. ⁽¹⁰¹⁾ vyvinuli metodu HPLC-ESI-MS pro stanovení LA v lidské plasmě po suplementaci. Tuto metodu úspěšně použili pro farmakokinetické studie LA u 10 zdravých dobrovolníků. Vnitřní standard naproxen a LA byly z plasmy extrahovány acetonitrem. Separace byla provedena na koloně Zorbax SB-C18, mobilní fází byla směs acetonitrilu a 0,1% kyseliny octové v poměru 65:35 (v/v). Detekční limit byl 2 ng/ml.

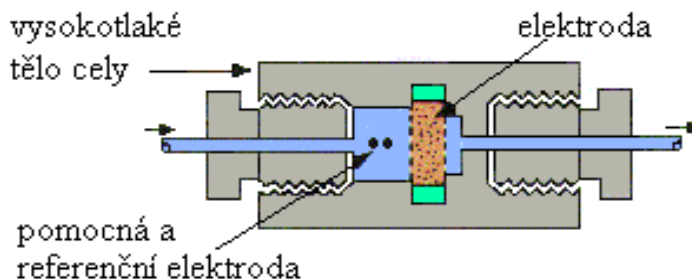
Chang a kol. ⁽¹²³⁾ vyvinuli metodu HPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS/MS) pro stanovení hladiny perorálně podávané LA ve vzorcích krve a mozku krys. Mobilní fází byla směs acetonitrilu a 0,1% kyseliny octové o pH 4,0. Kyselina valproová (vnitřní standard) a LA byly extrahovány acetonitrem. Výťažnost metody byla v rozmezí 92–115 %, detekční limit byl 0,1 ng/ml.

Elektrochemický detektor

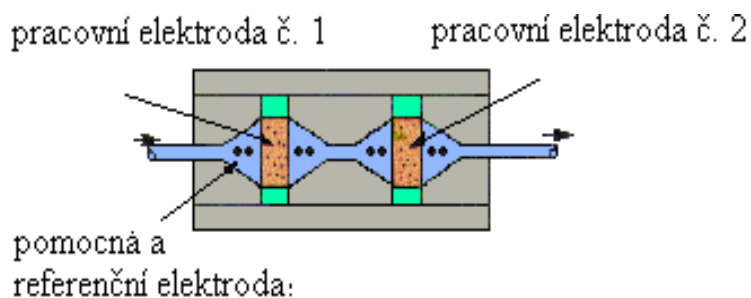
Nejčastěji používanou metodou pro stanovení LA je HPLC/EC. Tento typ detekce vykazuje vysokou citlivost a selektivitu. Navíc nevyžaduje vysoké nároky na přípravu vzorku ve srovnání s ostatními metodami, kde je nutná derivatizace. Nevýhodou této detekce je užší lineární dynamický rozsah a jistá obtížnost spojení tohoto detektoru s gradientovou elucí. Je nutné používat vodivé mobilní fáze, pracuje se v systému s obrácenými fázemi. LA a DHLA je možno oxidovat vložení vhodného elektrického potenciálu, a proto je tento typ detektoru vhodný pro stanovení obou forem. Citlivost a selektivita této metody je určena volbou typu přístroje, elektrod a složením mobilní fáze.

Pro simultánní stanovení oxidované a redukované formy LA je možno použít EC detektor, pracující na principu coulometrie. Množství analytu je určeno z velikosti náboje, vznikajícího na elektrodách s vloženým konstantním potenciálem při 100 % průběhu reakce. Pro stanovení LA je detektor Coulochem vybaven analytickou a ochrannou celou. Ochranná cela (model 5020, obr. 12) se skládá z pórovité grafitové elektrody, na kterou se vkládá takové napětí, které odstraňuje nežádoucí elektroaktivní látky z mobilní fáze. Lze jí také využít k oxidaci či redukci stanovovaných látek. Analytická cela (model 5010, obr. 13) se skládá z dvou pracovních grafitových elektrod, na které se vkládají vzájemně odlišná napětí, lze tedy stanovovat různé látky. Výsledný proud je zaznamenáván jako funkce času ve formě píků. Při stanovení LA je na obě elektrody vloženo kladné napětí. Jejich hodnota se volí

podle hydrodynamického voltamogramu separovaných látek. Volí se takové napětí, které zajišťuje dostatečnou odezvu detektoru, přičemž nedochází ke snížení životnosti analytické cely. Referenční elektrody jsou hydrogenpaladiové. Tento typ materiálu je zvolen díky své odolnosti vůči vysokým tlakům, které jsou kladeny na ochrannou celu, která je umístěna za HPLC čerpadlem⁽⁴⁾.



Obrázek 12 Ochranná cela (model 5020)⁽⁴⁾.



Obrázek 13 Analytická cela (model 5010)⁽⁴⁾.

Teichert a kol.^{(94) (124)} vyvinuli metodu pro stanovení LA v lidské plasmě po suplementaci. Tato metoda zahrnuje hydrolýzu vzorku k uvolnění LA z proteinů, SPE a kvantifikaci HPLC/ED. Detekční limit této metody byl 1 ng/ml. V popsané práci nebyli schopni současně stanovit LA a DHLA, neboť nedokázali zabránit rychlé oxidaci DHLA. Provedli hydrolýzu vzorků plasmy koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a uvolněnou LA (DHLA) extrahovali směsí hexanu a chloroformu. Výtěžnost této metody byla pouze 30 %. Testovali také hydrolýzu enzymem alkalasou, následovanou SPE. V tomto případě byla výtěžnost 80 %.

Stejný kolektiv autorů v roce 2002 stanovil LA a jejich 5 metabolitů v lidské plasmě a moči, rovněž u suplementovaných pacientů⁸⁰. Tato práce také zahrnuje

hydrolyzu vzorku k uvolnění LA z proteinů a SPE. Výtěžnost metody byla pro plasmu 90 % a moč 82,5 %. Limit kvantifikace uvádějí 4,6 ng/ml v případě plasmu a 103 ng/ml v případě moče. Tvrdí, že tyto metody jsou vhodné pro stanovení exogenních hladin LA a posouzení její farmakokinetiky, avšak nejsou použitelné pro měření endogenních hladin LA.

Kamata a Akiyama ⁽³⁷⁾ ve své studii uvádějí, že LA a její lipoamid mohou být simultánně analyzovány metodou HPLC/ED při použití argentochloridových elektrod. Detekční limit byl 0,05 ng (LA) a 0,1 ng (lipoamid).

Handelman a kol. ⁽¹²⁵⁾ a Han a kol. ⁽¹²⁶⁾ použili ve svých pracích pro stanovení LA a DHLA alternativní elektrochemický systém, duální Hg-Au elektrodu. V tomto systému jedna z elektrod působí jako generátor a druhá jako detektor určitých částic, přičemž LA je redukována na DHLA při vysokém záporném potenciálu na generátorové elektrodě a detegována jako DHLA na následné elektrodě. Detekční limit byl 10 ng (LA) a 2 ng (DHLA).

V roce 2010 Khan a kol. ⁽⁹⁶⁾ ve své práci prezentovali HPLC/ED metodu pro stanovení LA v lidské plasmě. Jako vnitřní standard použili naproxen, LA a vnitřní standard extrahovali jedнокrokovou extrakcí kapalina-kapalina a SPE. Extrakčním činidlem byl v obou případech dichlormethan. Výtěžnost LA při extrakci kapalina-kapalina byla 95–99 % a 97–102 % v případě SPE. Detekční limit této metody byl 0,2 ng/ml. O rok později stejný tým autorů prezentuje HPLC/ED metodu pro simultánní stanovení LA a DHLA ⁽¹²⁷⁾. Jako vnitřní standard použili opět naproxen a LA, spolu s DHLA, extrahovali dichlormethanem v systému kapalina-kapalina. Výtěžnost metody byla 93–97 %. Detekční limit pro LA byl 0,5 ng/ml a 3 ng/ml pro DHLA.

V roce 2014 Marin a kol. ⁽¹²⁸⁾ popsali ve své práci voltametrické stanovení LA v lidském séru platinovou elektrodou v acetátovém pufru. Všechna elektrochemická měření byla provedena přístrojem Autolab PGSTAT 302N. Vliv chloridových iontů na elektrochemickou oxidaci LA byl zjišťován cyklickou a diferenčně pulsní voltametrií na platinové a uhlíkové skelné elektrodě. Platinová elektroda vykazovala lepší elektrokatalytickou aktivitu pro oxidaci LA. Elektrochemická oxidace LA na platinové elektrodě je ireverzibilní proces, závislý na pH a zahrnující přenos jednoho elektronu a protonu. Jelikož tato elektroda jevila nejlepší elektrokatalytickou aktivitu při pH 4,5, musely být vzorky lidského séra zředěny acetátovým pufrům. Vlivem ředění vzorků a nízké koncentraci LA v séru byla citlivost detekce nízká a bylo nutné ke vzorkům séra přidávat standardní přídavek LA o koncentraci 0,05–0,5 ng/ml. Tato metoda je tedy

vhodná pouze pro stanovení LA v lidském séru po suplementaci. Detekční limit byl 0,02 ng/ml.

2.4.7.3 Kapilární elektroforéza

Ve srovnání s HPLC je CE schopna dosáhnout lepší účinnosti separace, minimalizuje se spotřeba organických činidel a zároveň se snižuje množství vzorku potřebného k analýze. Migrační vlastnosti ionizovaných látek závisí na několika faktorech, jako je např. pH a koncentrace pufru, teplota kapiláry či síla elektrického pole.

Panak a kol. ⁽¹²⁹⁾ použili micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC) k separaci LA, lipoamidu a GSH v prostředí 50mmol/l Tris-HCl pufru a 30mmol/l dodecylsiranu sodného o pH 7. Detekce byla UV (214 nm), s detekčním limitem ve femtomolech.

Sitton a kol. ⁽¹³⁰⁾ popisují ve své práci stanovení LA v doplňcích stravy kapilární zónovou elektroforézou (CZE), v prostředí fosfátového pufru (pH 7) a s přidavkem methanolu, který brání nežádoucí adsorpci LA na vnitřní stěnu kapiláry. Detekční limit je 0,8 µg/ml.

V roce 2014 Li a kol. ⁽¹³¹⁾ použili alternativní CE k měření obsahu LA v buněčné kultuře. Separace probíhala v prostředí borátového pufru (pH 9,1) a detekční limit byl 0,1 µg/ml.

Kodoma a kol. ⁽¹³²⁾ separovali R a S enantiomery z doplňků stravy metodou CE/UV, za použití trimethyl-β-cyklodextrinu jako chirálního selektoru, s detekčním limitem 34 µg/ml.

Souhrn analytických metod pro stanovení LA je znázorněn v tabulce 2.

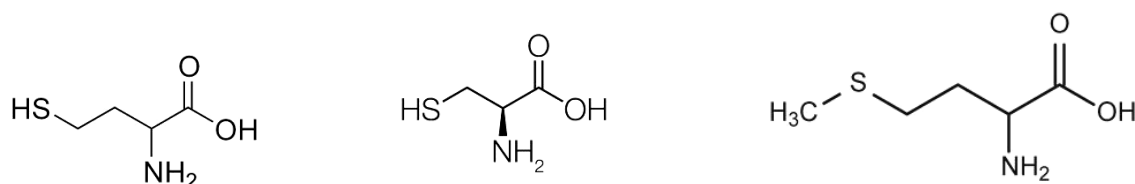
Tabulka 2 Souhrn analytických metod pro stanovení LA a jejích příbuzných sloučenin.

Metoda	Vzorek	Analyt ^a	Derivatizace ^b	Limit detekce	Ref.
GC/FID	kuřecí játra	LA	CH ₂ N ₂	-	(110)
GC/FID	kryší játra, ledviny	LA	HCl-MeOH	-	(113)
GC/FID	pšeničná zrna	LA	BF ₃ -MeOH	20 ng	(112)
GC/MS	<i>E.coli</i>	LA	CH ₂ N ₂	-	(114)
GC/MS	játra, ledviny	LA	CH ₂ N ₂	-	(115)
HPLC/UV	standardní roztok	LA,LAM	-	15 mg	(116)
HPLC/UV	plasma	LA,LAM	BCPB	LA:0,05μmol/l,LAM:0,20μmol/l	(102)
HPLC/UV	lidská kůže	LA	-	1 μg/ml	(117)
HPLC/UV	doplněk stravy	LA	-	4,4 μg/ml	(128)
HPLC/FD	plasma	LA,DHLA	ABD-F,SBD-F	0,3 pmol	(118)
HPLC/FD	plasma, moč	LA,DHLA	ABT-M	0,1 ng/ml,0,5 ng/ml	(119)
HPLC/FD	plasma	R,S LA	OPA-D-Phe	3 ng/ml	(120)
HPLC/FD	plasma	LA	mBBr	4 ng/ml	(121)
HPLC/FD	plasma	R,S LA	ABD-F	17 μg/ml	(133)
HPLC/FD	plasma	LA	-	9,69 nmol/l	(134)
LC/MS	plasma	LA	-	2 ng/ml	(122)
LC/MS/MS	kryší krev	LA	-	0,1 ng/ml	(101)
HPLC/MS	plasma	LA	-	LOQ: 921,5 nmol/l	(135)
HPLC/ED	plasma	LA	-	1 ng/ml	(123)
HPLC/ED	plasma, moč	LA	-	p:4,6 ng/ml, m:103ng/ml	(95)
HPLC/ED	doplněk stravy	LA,LAM	-	LA:0,05ng, LAM:0,1ng	(37)
HPLC/ED	tkáňová kultura	LA,DHLA	-	LA:10ng,DHLA:2ng	(124)
HPLC/ED	plasma	LA	-	0,2 ng/ml	(127)
HPLC/ED	plasma	LA	-	LOQ: 119 nmol/l	(97)
HPLC/ED	plasma	LA	-	-	(9)
HPLC/ED	plasma	LA,DHLA	-	LA:0,5ng/ml,DHLA:3ng/ml	(126)
DPV/ED	sérum	LA	-	0,02 ng/ml	(96)
CE/UV	plná krev	LA,LAM	-	-	(129)
CE/UV	doplněk stravy	LA	-	0,8 μg/ml	(130)
CE/UV	buněčná kultura	LA	-	0,1 μg/ml	(131)
CE/UV	doplněk stravy	R,S LA	-	34 μg/ml	(132)

^aLAM, lipamid; R,S LA, R,S enantiomer; ^bCH₂N₂, diazomethan; HCl-MeOH, směs methanolu a kyseliny chlorovodíkové; BF₃-MeOH, roztok fluoridu boritého v methanolu; BCPB benzyl-2-chlorpyridinbromid; ABD-F, 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3,-benzoxadiazol; SBD-F, 7-fluorobenzofurazan-4-sulfát; ABT-M, 2-(4-aminofenyl)-6-methylbenzothiazol; OPA, *o*-ftalaldehyd; D-Phe, D-fenylalanin; mBBr, monobromobiman.

2.5 Aminothioly

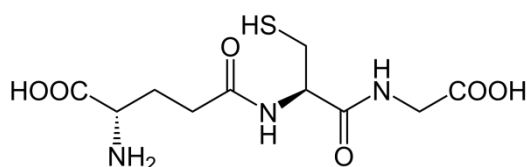
Do skupiny aminothiolů řadíme nízkomolekulární látky, které obsahují thiolovou a aminoskupinu. Jedná se o aminokyseliny homocystein (Hcy), cystein (Cys), glutathion a jejich disulfidy. Výjimkou v této skupině je methionin (Met), který obsahuje ve své struktuře namísto $-SH$ skupiny $S-CH_3$ skupinu. Tyto látky se vyznačují vysokou biologickou aktivitou. Jsou součástí antioxidačního ochranného systému, účastní se udržování intra- a extracelulární homeostázy organismu, podílí se na odstraňování škodlivin z organismu a v neposlední řadě tvoří prekurzory a meziprodukty řady metabolických cest. Aminothioly a jejich metabolické produkty jsou zapojeny do mnoha biologických dějů včetně regulace buněčného cyklu, degradaci proteinů a jsou nezbytné pro buněčné dýchání a získávání energie. Zájem o sledování této skupiny látek se v posledních letech neustále zvyšuje, neboť byla pozorována souvislost mezi jejich hladinami a řadou onemocnění, jako je např. Alzheimerova choroba či různá kardiovaskulární onemocnění ^{(136) (137) (138)}. Strukturální vzorce vybraných aminothiolů jsou znázorněny v následujících obrázcích.



Obrázek 14 Strukturální vzorce Hcy, Cys a Met ⁽¹³⁹⁾.



Obrázek 15 Strukturální vzorec homocystinu a cystinu ⁽¹³⁹⁾.

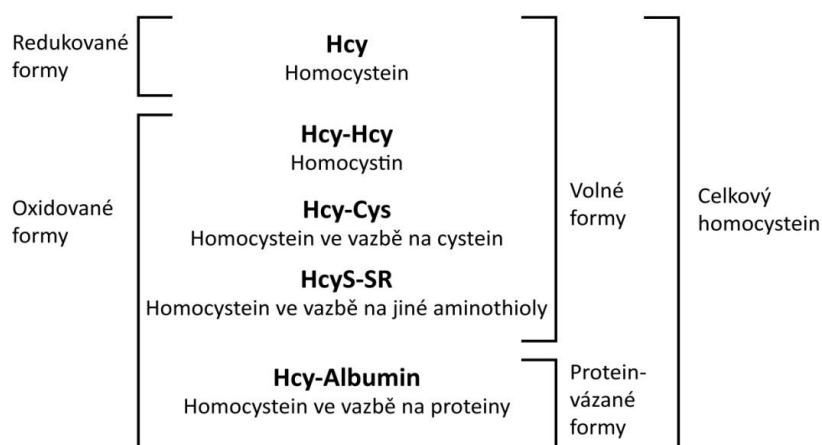


Obrázek 16 Strukturální vzorec glutathionu.

2.5.1 Homocystein

Homocystein (2-amino-4-merkaptomáselná kyselina) je nekódovaná aminokyselina obsahující síru, která je zapojena do metabolismu aminokyselin cysteinu a methioninu. Vzniká demethylací methioninu a je nezbytnou součástí a důležitým regulačním bodem metabolismu síry v organismu. Jednou metabolickou cestou může být homocystein remethylován na methionin, druhou cestou transsulfurován na cystein^{(140) (136) (138)}. Homocystein se vyskytuje v buňkách všech vyšších organismů a byl nalezen také v rostlinných a živočišných buňkách. Tato neesenciální aminokyselina hraje důležitou úlohu v základních životních procesech, jako jsou syntéza a recyklace některých klíčových metabolitů, řízení tvorby energie nebo buněčné dýchání⁽¹⁴¹⁾.

Hladina celkového homocysteinu v plasmě je definována jako suma jeho jednotlivých forem. Přibližně 70 % celkového homocysteinu tvoří vázaný homocystein, který je disulfidickým můstkem vázán na bílkovinu albumin. Dalších 25–30 % tvoří volný oxidovaný homocystein, který je disulfidickým můstkem vázán k jiné molekule (nejčastěji smíšený disulfid homocysteinu a cysteinu, Hcy-Cys) a vysoce reaktivní homocysteinthiolakton. Nepatrné množství, přibližně 2 % z celkového homocysteinu pak tvoří jeho volná redukovaná forma. V těle se vyskytuje v nižších koncentracích, intracelulárně <1 μmol/l a extracelulárně 5 - 15 μmol/l^{(142) (143)}. Jednotlivé formy homocysteinu v organismu jsou znázorněny na obrázku 17.



Obrázek 17 Formy homocysteinu v organismu⁽¹³⁰⁾.

2.5.2 Cystein

Tato aminokyselina se strukturně liší od homocysteinu pouze tím, že má o jeden uhlík méně. Naše tělo ji přijímá v potravě, nebo si ji může syntetizovat transsulfurací

methioninu⁽¹⁴⁴⁾. Thiolová skupina cysteinu je snadno oxidovatelná. Cystein je schopen poskytovat dva vodíkové protony pro redukční děje, kdy se současně dvě jeho molekuly spojí do jedné, vzniká cystin. V plasmě se cystein vyskytuje v redukované formě, oxidované formě (cystin) a rovněž ve formě vázané na proteiny. Referenční hodnoty cysteinu v plasmě se pohybují v rozmezí 225–270 $\mu\text{mol/l}$ ⁽¹⁴⁴⁾⁽¹⁴⁵⁾.

Cystein je schopen díky své thiolové skupině autooxidace za současné tvorby ROS. Reaguje s radikálem oxidu dusnatého za vzniku nitrosocysteinu a tím vyčerpává jeho zásobu. Tento fakt poukazuje na možnost jeho proaterogenního účinku. Na druhou stranu je dobře známá skutečnost, že cystein je významným antioxidantem a silným vasodilatátorem⁽¹⁴⁶⁾. Cystein spolu s glutamátem a glycinem tvoří nejznámější tripeptid GSH.

2.5.3 Methionin

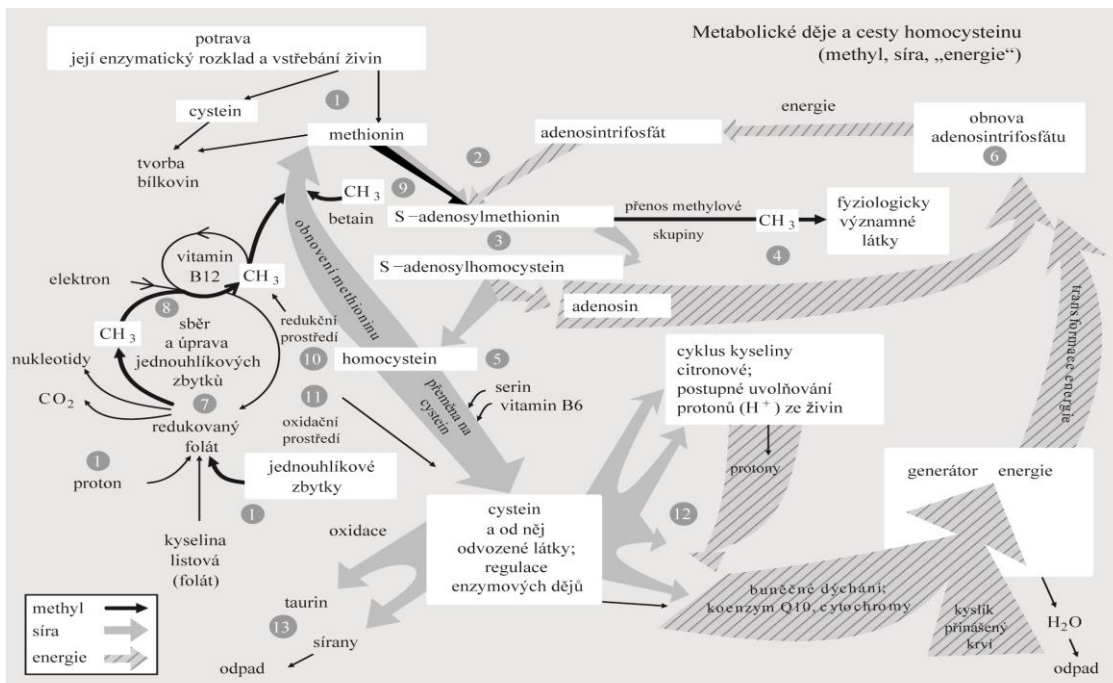
Methionin patří mezi esenciální aminokyseliny obsahující síru. Ovlivňuje redoxní homeostázu metabolismu síry. Slouží také jako donor methylových skupin a je výchozí látkou několika metabolických procesů. Je prekurzorem řady antioxidantů, jako jsou GSH, taurin či cystein. Fyziologická hladina methioninu v plasmě se pohybuje v rozmezí 40–46 $\mu\text{mol/l}$ ⁽¹⁴⁶⁾⁽¹⁴⁷⁾.

2.5.3.1 Metabolismus methioninu

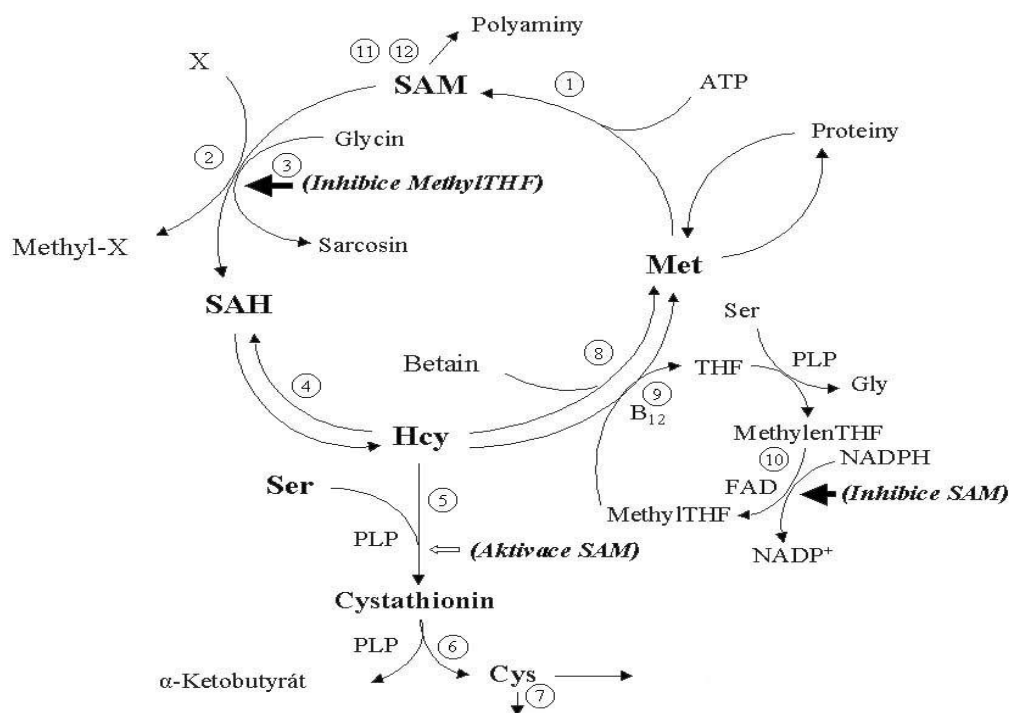
Methionin reaguje s ATP za katalýzy enzymem methioninadenosyltransferasou, vzniká S-adenosylmethionin (SAM). Tento meziprodukt je významným donorem methylové skupiny. Po odevzdání methylové skupiny, za katalýzy odpovídajících methyltransferas, vhodnému akceptoru, se SAM mění na S-adenosylhomocystein (SAH). Místo původní inertní methylové skupiny vzniká reaktivní thiolová skupina. Hydrolýzou SAH se uvolní adenosyl a vzniká homocystein. Tato reakce je katalyzována enzymem S-adenosylhomocysteinhydrolasou. Vzniklý homocystein může být metabolizován dvěma metabolickými cestami. Může být remethylován zpět na methionin. Smyslem této reakce je zajistit buňkám dostatek SAM, který je nezbytný pro syntézu kreatinu. Remethylace probíhá v játrech a ledvinách za přítomnosti tetrahydrofolátu a vitamínu B₁₂. Methylová skupina, potřebná pro remethylaci, se získává redukcí jednováhlíkových zbytků (např. formaldehydu či mravenčanu). K redukci těchto jednováhlíkatých zbytků je zapotřebí NADPH+H⁺, který vzniká především v pentosovém cyklu. Kyselina listová (tetrahydrofolát) zachycuje tyto jednováhlíkaté zbytky, které jsou za katalýzy enzymem

methylenetetrahydrofolátreduktasou (MTHFR) redukovány na methylové zbytky. Methyltetrahydrofolát může přenášet methylové skupiny ve spolupráci s vitamínem B₁₂. Toto platí pro játra, ledviny a mozek. V játrech se vyskytuje navíc betain, který je schopen přenášet methylovou skupinu z methyltetrahydrofolátu na homocystein bez účasti vitamínu B₁₂.

Druhou metabolickou cestou odbourávání homocysteinu je transsulfurace. Homocystein nejprve reaguje s aminokyselinou serinem, vzniká cystathionin. Tato reakce je katalyzována enzymem cystathion-β-synthasou, jejíž kofaktorem je derivát vitamínu B₆. Cystathionin je poté konvertován na cystein a 2-oxobutyrát. Cystein je o jeden uhlík kratší než homocystein, zatímco serin se prodlouží o tento uhlík za vzniku homoserinu. Homoserin se poté sledem reakcí může přeměnit až na sukcinyl-S-CoA⁽¹³⁷⁾ (136) (148) (149). Souhrn metabolických cest je znázorněn na obrázcích 18 a 19.



Obrázek 18 Metabolické cesty homocysteinu⁽¹³⁶⁾.



Obrázek 19 Metabolické cesty homocysteinu ⁽¹⁵⁰⁾.

1: enzym methioninadenosyltransferasa; 2: SAM dependentní transmethylace; 3: enzym glycin-N-methyltransferasa; 4: enzym S-adenosylhomocysteinhydrolasa; 5: enzym cystathion-β-synthasa; 6: enzym γ-cystathioninasa; 7: enzym sulfitoxidas; 8: enzym betain-homocysteinmethyltransferasa; 9: enzym methioninsynthasa; 10: enzym methylenetetrahydrofolátreduktasa; 11: enzym S-adenosylmethionindekarboxylasa; 12: enzym spermidinsynthasa; X: receptor methylenové skupiny; methyl – X: methylovaný akceptor ⁽¹⁵⁰⁾.

2.5.4 Homocystein jako rizikový faktor aterogeneze

Celkový homocystein byl na základě mnoha studií vyhodnocen jako rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění a také aterosklerózy. Zvýšená hladina homocysteinu je spojována s rozvojem těchto onemocnění. Vlastní mechanismus proaterogenního působení homocysteinu stále není znám. Existuje několik možných mechanismů, kterými homocystein může působit na cévy:

1. přímé působení na cévní stěnu prostřednictvím -SH skupiny, působení na endoteliální buňky tak, že produkují více superoxidového aniontu ⁽¹³¹⁾;
2. zkrácení životnosti trombocytů, zvýšení syntézy tromboxanu A₂ a aktivace Hagemannova faktoru (koagulační faktor XII) ⁽¹⁾;
3. snížení fibrinolýzy usnadněním vazby lipoproteinu(a) [Lp(a)] na fibrin, Lp(a) inhibuje fibrinolytický systém díky své analogii s plasminogenem ⁽¹⁾;

4. autooxidace, ta vede k vzniku ROS. Při autooxidaci je oxidována -SH skupina, dochází k zvýšené tvorbě peroxidu vodíku, superoxidu a hydroxylových radikálů, což vede k lipoperoxidaci (hlavně aterogenních LDL částic) a rozvíjí se oxidační stres⁽¹⁵¹⁾;
5. snížení aktivity glutathionperoxidasy a superoxididismutasy, což jsou enzymy chránící endoteliální buňky před oxidačním stresem⁽¹⁵²⁾;
6. inaktivuje dimethylarginindimethylaminohydrolasu, tím snižuje hladinu asymetrického dimethylargininu, který inhibuje produkci radikálu oxidu dusnatého⁽¹⁾;
7. metabolickou přeměnou na homocysteinthiolakton, který je chemicky nestabilní a poměrně rychle reaguje s LDL částicemi. Thiolací dochází k urychlení internalizace LDL na membránový receptor, je zvýšena fagocytóza a akumulace cholesterolu uvnitř makrofágů⁽¹⁵¹⁾;
8. podporuje proliferaci buněk hladké svaloviny a syntézu kolagenu, dochází tak k zužování cév⁽¹⁴⁸⁾.

2.5.5 Hyperhomocysteinemie, homocystinurie

Ke správnému metabolismu homocysteinu v organismu je zapotřebí přítomnost enzymů MTHFR, methyltetrahydrofoláthomocysteinmethyltransferasy (MTHFHMT) a cystathioninsyntasy. Dále je nezbytná přítomnost kofaktorů methyltetrahydrofolátu, odvozeného od kyseliny listové, methylcyanokobalaminu, odvozeného od vitamínu B12 a pyridoxalfosfátu, odvozeného od vitamínu B6. V případě defektu kteréhokoliv z enzymů či nedostatku kofaktorů, dochází ke zvýšení koncentrace homocysteinu, která se nazývá hyperhomocysteinemie (HHcy). Nemetabolizovaný homocystein proniká do krve, kde se hromadí a začíná jeho patologické působení⁽¹⁾.

Hyperhomocysteinemii lze rozdělit na mírnou (15 – 30 $\mu\text{mol/l}$), střední (31 – 100 $\mu\text{mol/l}$) a těžkou (více než 100 $\mu\text{mol/l}$)¹. Za mírnou HHcy se v současné době považuje hladina vyšší než 15 $\mu\text{mol/l}$, ale je snahou tuto hraniční hladinu stále snižovat, neboť bylo zjištěno, že negativní působení Hcy na cévy se projevuje už při mírné HHcy^{(1) (153)}.

Existují dva typy HHcy:

1. častější formy, způsobují středně zvýšené hladiny homocysteinu, souvisí s patogenezí řady onemocnění a hrají zde úlohu jako environmentální faktor

2. vzácné, ale závažné formy, které jsou způsobeny hlavními genetickými mutacemi enzymů, podílející se na metabolismu homocysteinu ⁽¹⁵³⁾.

1. typ

HHcy je nejčastěji způsobena vlivem nutričního deficitu, kdy dochází k nedostatečnému příjmu folátu, vitamínu B6 a vitamínu B12 z potravy. Problém dnešní civilizace spočívá v tom, že lidstvo postupně změnilo složení své stravy do té míry, že přestalo zabezpečovat zásobování buněk důležitými mikronutrienty. Hlavně chybějí ty, které jsou nezbytné pro bezporuchový metabolismus homocysteinu. Nejvíce je patrný nedostatek kyselina listové a pyridoxinu u vegetariánů, u osob s poruchou funkce žaludku je obvyklý nedostatek vitamínu B12. Řada onemocnění, jako je dysfunkce ledvin, dysfunkce štítné žlázy, rakovina, diabetes, kardiovaskulární onemocnění, stejně jako alkohol, tabák, káva, starší věk a menopauza jsou spojeny se středně zvýšenými hladinami homocysteinu ⁽¹⁴¹⁾⁽¹⁵⁴⁾.

Hladiny homocysteinu v plasmě mohou být zvýšeny různými léky a onemocněními, které interferují s metabolismem folátu, vitamínu B6 a B12, a proto by mohlo být stanovení hladin homocysteinu využito při diagnostice těchto stavů ⁽¹⁵⁴⁾.

2. typ

Při těžké formě HHcy, kdy koncentrace homocysteinu přesahuje hladinu více než 100 $\mu\text{mol/l}$, dochází k vylučování až 300 mg oxidované formy, tj. homocystinu močí. Homocystinurie je autosomálně recesivně dědičná porucha a je způsobena vrozeným defektem některého z enzymů účastnících se metabolismu Met. Prevalence onemocnění je 1 : 160 000. Nemoc se manifestuje již v dětství, a to nejčastěji abnormalitami dlouhých kostí, mentální retardací a dislokací očních čoček. Pacienti s tímto onemocněním mají sklon k rozvoji aterosklerózy s následnou trombózou. Díky tomuto zjištění se vytvořila hypotéza, že HHcy může vést k poškození stěn cév předčasnou aterosklerózou a rozvoji kardiovaskulárních a dalších onemocnění ⁽¹⁵⁵⁾.

Pokud se homocystinurie neléčí, objeví se vaskulární příhoda (cévní mozková příhoda, infarkt myokardu, jiná tromboembolická komplikace) přibližně u poloviny těchto pacientů před dosažením věku 30 let. Studie však ukázala nedostatek statisticky významné souvislosti mezi mutacemi MTHFR a ischemickou chorobou srdeční, s výjimkou pacientů v oblasti Středního východu a Japonska, kde vykázala statistickou významnost ⁽¹⁵⁶⁾. Souhrn jednotlivých typů homocystinurie je znázorněno v Tabulce 3.

Tabulka 3 Souhrn typů homocystinurie.

Název	Defekt
Homocystinurie I	defekt cystathioninsynthasy
Homocystinurie II	defekt MTHFR*
Homocystinurie III	snížená aktivita MTHFHMT** s následnou neschopností syntézy methylkobalaminu
Homocystinurie IV	snížená aktivita MTHFHMT s následným defektem střevní resorpce kobalaminu

* MTHFR enzym methylenetetrahydrofolátreduktasa;

**MTHFHMT enzym methyltetrahydrofoláthomocysteinmethyltransferasa

Při léčbě HHcy se pacientům podává nejčastěji kombinace vitamínu B6 a kyseliny listové, zvláště pokud je samotné podávání kyseliny listové neúčinné. Terapeutická dávka je 2,5 – 5 mg kyseliny listové v denní dávce. Navíc se doporučuje dieta s nízkým obsahem bílkovin, které jsou zdrojem Met⁽¹⁵³⁾.

2.5.6 Homocystein a kardiovaskulární onemocnění

Dosavadní literatura v drtivé většině tvrdí, že je homocystein nezávislým rizikovým faktorem KVO. Existují však i kontroverzní studie, které tvrdí opak^{(157) (158) (159)}. Nicméně informace o homocysteinu jako o biomarkeru, který by mohl pomoci ve sledování stupně závažnosti onemocnění, jsou stále dost rozporuplné^{(154) (160)}.

Homocystein může podpořit rozvoj KVO několika různými mechanismy, například vlivem nežádoucích účinků na vaskulární endotel a buňky hladké svaloviny s následnými změnami v arteriální struktuře a její funkci. Dochází k zvýšené proliferaci buněk hladkého svalstva cév, endoteliální dysfunkci, oxidačnímu poškození, zvýšení syntézy kolagenu a zhoršení elasticity arteriální stěny⁽¹⁶¹⁾. Bylo také prokázáno, že HHcy je spojena s vyšším rizikem vzniku venózní trombózy. Zvýšená hladina homocysteinu souvisela se zvýšením adheze krevních destiček na endotelové buňky a byla také spojena s vyššími hladinami protrombotických faktorů, jako je například β -tromboglobulin, aktivátor tkáňového plazminogenu a faktoru VIIc. To vedlo ke zvýšení tvorby trombů⁽¹⁶¹⁾.

Homocystein je známý jako nezávislý rizikový faktor pro aterosklerózu. Ateroskleróza je definována jako kontinuální zánětlivé poškození arteriální intimy se zvýšenou permeabilitou, ukládáním lipidů do aterosklerotických lézí, fibrózou a

kalcifikací lézí. Ateroskleróza je patologický proces, který vede ke vzniku KVO, jako je infarkt myokardu, srdeční selhání, mrtvice apod. Vztah mezi HHcy a aterosklerotickým onemocněním byl poprvé zkoumán před více než 40 lety. Několik průlomových a kontrolních studií poukázalo na jasnou významnou korelaci mezi celkovou hladinou homocysteinu a incidencí koronárních, karotických a periferních vaskulárních onemocnění⁽¹⁶²⁾.

Bylo provedeno 12 kontrolních studií, které zahrnovaly 47 429 pacientů, aby se zjistila účinnost intervencí vedoucí ke snížení hladiny homocysteinu. Bohužel výsledek studií prokázal, že intervence neměly žádný významný vliv na průběh KVO ve srovnání s kontrolní skupinou. V řadě studií se již dlouhou dobu diskutuje o tom, do jaké míry by měl být homocystein považován za rizikový faktor KVO, protože dle některých je možné vysvětlit klasickými rizikovými faktory pouze 50 % KVO a tvrdí, že "nové" rizikové faktory by významně zvýšily predikci KVO. Tyto úvahy však byly široce kritizovány⁽¹⁶²⁾.

Pang a kol. sledovali vliv homocysteinu na expresi CRP na zvířecím modelu a ukázalo se, že homocystein významně indukoval expresi CRP u buněk hladké svaloviny cév. Studie prokázala, že homocystein je schopen iniciovat zánětlivou odezvu v buňkách hladké svaloviny cév stimulováním produkce CRP, což poskytlo nový důkaz o důležité úloze homocysteinu v patogenezi aterosklerózy⁽¹⁶³⁾.

Shenov a kol. tvrdí, že homocystein může být považován za včasný aterosklerotický promotor. Hladiny homocysteinu v séru nalačno byly u pacientů s onemocněním koronárních artérií významně vyšší než u kontrolní skupiny ($p < 0,001$). Navíc hladiny homocysteinu významně korelovaly se zvyšující se závažností onemocnění koronární arterie ($p < 0,001$). Autoři navíc prokázali existenci mírné korelace mezi hladinou homocysteinu a ICHS⁽¹⁶⁴⁾.

Ndrepepa a kol. sledovali hladiny homocysteinu a hodnotili je ve vztahu s existencí polymorfismu genu C677T MTHFR, renální funkcí a přítomností onemocnění koronární arterie. Této studii se účastnilo 2121 pacientů, u kterých bylo angiograficky prokázáno onemocnění koronární arterie (507 pacientů s diabetem typu 2 a 1614 pacientů bez diabetu). Skupina pacientů s diabetem měla vyšší věk, poměr hypertenze, BMI index, závažnější koronární aterosklerózu a byla zatížena dříve prodělaným IM. Hladiny kreatininu, C-reaktivní proteinu, glukosy, hemoglobinu A1c a triacylglycerolů byly rovněž vyšší ve skupině s diabetickými pacienty. Rychlost glomerulární filtrace byla nižší u diabetiků. Hladiny homocysteinu byly výrazně vyšší u pacientů s diabetem.

U diabetických pacientů se hladiny homocysteinu jen velmi málo lišily v závislosti na typu terapie (léčba dietou, insulinem, hypoglykemickými léky). Genový polymorfismus MTHFR ovlivnil plasmatické hladiny homocysteinu u pacientů s diabetem, kdy došlo k progresivnímu nárůstu jeho koncentrace ve srovnání se skupinou bez diabetu. Hladiny homocysteinu rovněž korelovaly s glomerulární filtrací (GF) u obou skupin. Pokud byla GF <90 ml/min, pacienti s diabetem měli signifikantně vyšší hladiny homocysteinu ve srovnání s druhou skupinou. V opačném případě, tedy GF >90 ml/min, nebyly zaznamenány výrazné rozdíly u obou skupin. Významná korelace byla pozorována i ve vztahu homocysteinu s hemoglobinem A1c. V závěru studie autoři tvrdí, že zvýšené hladiny homocysteinu mohou být spojovány se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem u pacientů s diabetem 2. typu ⁽¹⁶⁵⁾.

K rozvoji KVO přispívá mimo jiné i vysoký krevní tlak neboli hypertenze. Existuje mnoho faktorů mající vliv na hypertenzi a homocystein zřejmě patří k nim. Lim a kol. ⁽¹⁶⁶⁾ popsali ve svých experimentálních studiích a studiích na zvířatech souvislost mezi homocysteinem a krevním tlakem. Bylo pozorováno zvýšení krevního tlaku jako důsledek indukované HHcy. Podávání homocysteinu způsobilo přímé poškození endoteliálních buněk *in vitro* u zvířat. Homocystein indukoval oxidační stres na endotel a snížil dostupnost radikálu oxidu dusnatého (silný vazodilatátor) ve studiích buněčné kultury. Studie u lidí prokázala poškození vazodilatace při dočasné nebo chronické HHcy a homocystein měl vliv na diastolický a systolický krevní tlak. V případě zvýšení koncentrace o 5 μmol/l se zvýšil diastolický a systolický krevní tlak u mužů o 0,5 a 0,7 mmHg. V případě žen bylo zvýšení krevního tlaku výraznější, o 0,7 a 1,2 mmHg.

2.5.6.1 Homocystein jako biomarker

Mnoho studií považuje HHcy jako rizikový faktor KVO, i přesto že existuje několik pochybností. Rovněž zůstává otázkou jeho vliv jako indikátoru odpovědi terapeutické intervence. V současné době se řeší otázka, zda je možné homocystein vnímat nejen jako rizikovým faktorem KVO, ale také především jako biomarker. Výsledky jiných studií jsou rozporuplné také v otázce vztahu homocysteinu a stupněm stenózy v koronárních tepnách.

Sarwer a kol. ⁽¹⁶⁷⁾ ve své práci systematicky prozkoumali publikované studie zaměřené na vztah mezi celkovým homocysteinem v séru a subklinickými ukazateli aterosklerózy u asymptomatických jedinců. Řada studií tvrdí, že hladina homocysteinu souvisí s klinicky manifestující se aterosklerózou, avšak vztah homocysteinu

k subklinické ateroskleróze nebyl zcela vyjasněn. Autoři ke své analýze vybrali pouze studie zaměřené na asymptomatickou populaci a vyloučili jakoukoli studii zahrnující symptomatické pacienty nebo osoby s anamnézou koronárních, periferních nebo cerebrovaskulárních onemocnění. Systematická analýza 19 článků odhalila významnou souvislost mezi zvýšenými hladinami homocysteinu a subklinickými ukazateli aterosklerózy u asymptomatických jedinců ve většině studií. Celkem 12 studií ukázalo významnou souvislost mezi hladinou homocysteinu a dalšími rizikovými faktory aterosklerózy (věk, pohlaví a ostatní konvenční faktory). Naopak 7 studií nevykazovalo žádný významný vztah. Další studie tvrdí, že cílené snižování hladiny homocysteinu nevedlo ke zlepšení skóre subklinických ukazatelů. Na základě prozkoumání publikací dospěli k závěru, že homocystein je potenciálně vhodným kandidátem stát se biomarkerem aterosklerotického onemocnění.

Tuto hypotézu vyvracejí Lin a kol. ⁽¹⁶⁸⁾ a Gurel a kol. ⁽¹⁶⁹⁾, kteří naopak tvrdí, že homocystein není vhodným kandidátem pro predikci u subklinické aterosklerózy.

Situace není jasnější ani v případě symptomatické aterosklerózy. Většina literatury popisuje statisticky významné rozdíly v hladinách celkového homocysteinu v plasmě mezi pacienty s koronárně angiograficky pozitivními a negativními nálezy ⁽¹⁵⁷⁾ ⁽¹⁵⁸⁾ ⁽¹⁵⁹⁾. Faria-Neto a kol. ⁽¹⁵⁸⁾ však tyto rozdíly hodnotí jako minimální. Donnera a kol. ⁽¹⁷⁰⁾ tvrdí, že rozdíly mezi angiograficky odlišnými skupinami není významný.

2.5.7 Možnosti stanovení homocysteinu

V praxi se běžně stanovuje tzv. celkový homocystein. Stanovení ostatních aminothioliů se v současné době rutinně neprovádí. Hladina homocysteinu v plasmě se stanovuje na lačno nebo po zátěžovém methioninovém testu. Dále se mohou stanovovat hladiny vitaminů B₆, B₁₂ a kyseliny listové. Referenční hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 Referenční hodnoty vitaminů B₆, B₁₂ a kyseliny listové.

Parametr	Vzorek	Jednotky	Referenční mez
Vit. B ₆	plasma	nmol/l	20,2 – 121,8
Vit. B ₁₂	sérum	ng/l	200 – 1490
Kys. listová	sérum	μg/l	4 – 16
Kys. listová	erytrocyty	-	176 – 589 ¹

¹ v přepočtu na hematokrit ⁽¹⁷¹⁾

Stanovení vitamínu B₆ v plasmě (séru)

V praxi se využívají imunoenzymatické a imunoradiometrické analýzy (ELISA, IRMA) a HPLC/FD. Alternativním stanovením je zjištění koeficientu aktivity erytrocytární transaminasy.

Stanovení vitamínu B₁₂ v plasmě (séru)

Pro stanovení hladin kobalaminu v plasmě či séru se využívají metody HPLC/FD.

Stanovení koncentrace kyseliny listové v plasmě (séru)

Pro stanovení hladin kyseliny listové v plasmě či séru se využívají metody HPLC/FD a HPLC/UV. Za přesnější ukazatel se bere hodnota koncentrace v erytrocytech⁽¹⁷¹⁾.

Stanovení homocysteinu v plasmě

Téměř všechny v současnosti používané metody stanovení celkového homocysteinu dávají přednost stanovení v plasmě. Důvodem je možnost rychlé centrifugace. Nejčastěji používaným antikoagulačním činidlem je EDTA, používá se také citrát sodný a další aditiva, která stabilizují koncentraci homocysteinu v plasmě při laboratorní teplotě. Pokud jsou vzorky odebrány do EDTA odběrových zkumavek a uchovány na ledu, je homocystein stabilní 4 hodiny⁽¹⁷²⁾.

2.5.7.1 Kapilární elektroforéza

Jedná se o jednoduchou, rychlou a vysoce účinnou metodu, kterou je možné stanovit celkový homocystein. Výhodou je nízká spotřeba organických rozpouštědel a zároveň se snižuje množství vzorku potřebného k analýze. Je často používána v kombinaci s elektrochemickým, ultrafialovým či fluorescenčním detektorem.

Elektrochemická detekce

Compton a kol. měřili hladiny celkového homocysteinu v plasmě metodou kapilární elektroforézy s elektrochemickou detekcí, kdy využili Au/Hg amalgámovou elektrodou, na které probíhala oxidace thiolů⁽¹⁷³⁾.

Fluorescenční detekce

Výhodou FD je vysoká citlivost a linearita ve velkém rozsahu koncentrací. Nevýhodou je nutnost derivatizace, složitější a delší příprava vzorku. Jako derivatizační činidla lze použít isothiokyanát, brommethylfluorescein, či 6-jodoacidamidfluorescein⁽¹⁷⁴⁾.

UV/Vis detekce

Tento typ detekce poměrně zaostává ve srovnání s ostatními typy detektorů. Je zde opět nutná derivatizace, jinak by docházelo ke snížení senzitivity této metody. Tseng a kol. používali k izolaci analyzované látky zlaté nanočástice a následovala CE s UV detekcí⁽¹⁷⁵⁾.

2.5.7.2 Imunochemické stanovení homocysteinu

Výhodou imunochemických metod je rychlost, citlivost a možnost automatizace. Prvně je třeba uvolnit homocystein z vazby na proteinech. Volný homocystein je převeden na SAH za katalýzy enzymem S-adenosylhomocysteinhydrolasou. Hladina vzniklého SAH, která odpovídá hladině celkového homocysteinu je stanovena imunochemickou metodou. Nevýhodou je, ve srovnání s chromatografickými metodami, vysoká cena reagensů^{(171) (174)}.

2.5.7.3 Enzymatické stanovení homocysteinu

Enzymatické reakce využívají 2 typy enzymů. První z nich je homocystein- α,γ -lyasa, která katalyzuje reakci, při níž se homocystein přemění na α -oxobutyryát, amoniak a sulfan. Sulfan poté reaguje s derivatizačním činidlem za vzniku vysoce fluorescenčního derivátu, který lze detekovat fluorimetrem. Druhým enzymem, který se využívá při stanovení homocysteinu je homocysteinmethyltransferasa⁽¹⁷⁴⁾.

2.5.7.4 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Homocystein má ve své struktuře hlavně polární skupiny, a proto se špatně extrahuje do organických rozpouštědel. Metoda GC-MS není příliš využívána pro stanovení homocysteinu, protože je poměrně časově náročná. Prvním krokem této metody je redukce, např. dithiothreitem, následovaná derivatizací N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamidem. Výhodou této metody je možnost stanovení více látek v rámci jedné analýzy^{(173) (174)}.

2.5.7.5 HPLC metody

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je v dnešní době nejvíce používanou metodou pro stanovení hladin homocysteinu. Je používána v kombinaci s řadou typů detektorů, jako je např. ultrafialový, fluorescenční, hmotnostní a především elektrochemický.

UV/Vis detekce

Tato metoda nemá široké uplatnění při stanovení homocysteinu. Hlavní příčinou je skutečnost, že homocystein neobsahuje silný chromofor, tudíž je nezbytná derivatizace. Derivatizačním činidlem můžeme být např. 2-chloro-1-methylpyridiumjodid nebo 2-chloro-1-methylchinoliniumtetrafluoroborát⁽¹⁷³⁾.

Fluorescenční detekce

Metoda HPLC s fluorescenční detekcí patří k nejrozšířenějším technikám používaným pro stanovení hladin homocysteinu. Před analýzou je nutná redukce oxidovaných forem homocysteinu (homocystin, směsné disulfidy, proteinově vázaný homocystein) tri-N-butylfosfinem, dithiothreitem, borohydridem draselným nebo tris-2-karboxylethylfosfinem. Množství derivatizačních činidel, které se mohou použít k derivatizaci homocysteinu, je velmi široké. Mezi nejpoužívanější fluorescenční činidlo patří *ortho*-ftalaldehyd, který lze použít i v kombinaci s 2-merkaptethanolem. *ortho*-Ftalaldehyd reaguje s aminoskupinou homocysteinu. Dalším používaným derivatizačním činidlem, které lze použít při stanovení thiolů metodou HPLC-FD je monobromidamin. Ovšem nejčastěji používaným derivatizačním činidlem, používaným při stanovení homocysteinu, je 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonát⁽¹⁷¹⁾⁽¹⁷⁶⁾.

Elektrochemická detekce

Metoda HPLC-EC je velmi oblíbená pro stanovení thiolů. Její hlavní výhodou oproti výše uvedeným metodám je, že k detekci thiolů není potřeba žádná předchozí derivatizace. Při detekci se využívá oxidace homocysteinu na homocystin, která probíhá na měřicí elektrodě. Lze použít elektrody z různých materiálů, jako např. uhlíkovou elektrodu, skleněnou elektrodu, grafitovou, platinovou, zlatou či stříbrnou. Mimo těchto materiálů lze použít i tradičnější materiál jako je rtuťová amalgámová elektroda⁽¹⁷⁴⁾
(176).

3 Cíle

- vyvinout vhodnou metodu pro stanovení endogenních hladin kyseliny lipoové
- ověřit, zda je tato metoda vhodná i pro stanovení hladin kyseliny lipoové po suplementaci
- určit cytotoxicitu kyseliny lipoové na erytrocyty
- ověřit význam homocysteinu jako biomarkeru v klinické praxi
- získat obecný přehled o celkovém metabolismu methioninu u pacientů s onemocněním koronárních artérií
- zjistit okamžitý vliv perkutánní koronární intervence na hladiny methioninu a jeho metabolitů

4 Experimentální část

4.1 Stanovení kyseliny lipoové v plasmě

Hladiny kyseliny lipoové v plasmě byly stanoveny metodou HPLC/ED v systému obrácených fází s isokratickou elucí.

4.1.1 Odběr a uchování vzorků plasmy

Tato studie byla provedena ve spolupráci s Transfúzním oddělením (Nemocnice Pardubického kraje). Vzorky venózní krve byly získány od dobrovolných dárců krve ($n = 40$, 17 žen ve věku 26-58 roků a 23 mužů ve věku 27-63 roků; tabulka 5). Krev byla odebrána z *vena mediana (vena basilica)* do sterilních odběrových zkumavek s EDTA (Vacuette[®], Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Rakousko). Plasma byla oddělena od krevních buněk centrifugací ($1700 \times g$, 15 min, 8 °C). Jeden mililitr plasmy byl přenesen do 1,5ml polypropylenových (PP) zkumavek typu Eppendorf a do doby analýzy uchováván v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C. Skupina dobrovolných dárců krve nebyla suplementována kyselinou lipoovou. Písemný informovaný souhlas byl získán od všech zúčastněných dárců krve a jeho vzor je uveden v Příloze 1. Kritéria pro zařazení dobrovolných dárců do studie jsou uvedena v tabulce 6.

Tabulka 5 Charakteristika dobrovolných dárců krve.

Parametr	celkem (n=40)	ženy (n=17)	muži (n=23)
věk	43 ± 9,8	38 ± 9,5	46 ± 8,5
výška (cm)	174,0 ± 8,0	167,6 ± 5,0	178,7 ± 6,4
váha (kg)	77,7 ± 16,2	64,4 ± 11,0	87,5 ± 12,0
BMI (kg/m ²)	25,5 ± 4,1	22,8 ± 3,1	27,6 ± 3,7
kuřáci	13 (32 %)	5 (30 %)	8 (35 %)
nekuřáci	27 (68 %)	12 (70 %)	15 (65 %)

Tabulka 6 Kritéria pro zařazení dobrovolníků do studie.

Trvalé vyloučení	Provizorní vyloučení (6 měsíců)	Provizorní vyloučení (1 měsíc)	Provizorní vyloučení (1-2 týdny)	Provizorní vyloučení (různá doba)
Hepatitis B nebo C	Chirurgický zákrok, zranění	Chřipka	Extrakce zubu	Drobný chirurgický zákrok se šitím (do zahojení)
Syfilis nebo tuberkulóza	Gynekologická intervence	Angina	Menší chirurgické zákroky v ústech	Infekce hepatitidou A (1-2 roky)
Některé druhy tropických nemocí	Invazivní vyšetření	Léčba antibiotiky	Nachlazení	Mononukleóza (1-2 roky)
Těžké formy alergií	Tetování	Vakcinace (chřipka, hepatitis B)	Opar	Borelióza (1-2 roky)
Hemofilie	Piercing, nástřel náušnic	Atak klíštěte		Neinfekční onemocnění srdce, plic, ledvin a jater (čas je různý dle závažnosti onemocnění)
Epilepsie	Akupunktura	Pobyt mimo Evropu		
HIV	Pobyt v tropech	Kojení		
Rakovina	Gravidita (porod, potrat)			
Závažné psychiatrické poruchy				
Závažná chronická onemocnění				

4.1.2 Odběr a uchování vzorků plasmy od suplementovaných dárců

Vzorky venózní krve byly získány od suplementovaných dobrovolných dárců krve LA (n = 3; 2 ženy ve věku 23-39 roků a 1 muž ve věku 43 let) a byly zpracovány a uchovávány stejným způsobem jako u nesuplementových dárců krve. Dárcům krve bylo perorálně podáno 500 mg racemické směsi LA v tabletách, odběr krve probíhal vždy jednu hodinu po konzumaci tablet.

4.1.3 Seznam chemikálií

- kyselina lipoová ($C_8H_{14}O_2S_2$, $M_r = 206,33$) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- deionizovaná voda (H_2O , $M_r = 18,02$; $G = 0,055 \mu S$)
- dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4 , $M_r = 119,98$) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- kyselina trihydrogenfosforečná (H_3PO_4 , 85%, $M_r = 98,00$) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- hydroxid sodný ($NaOH$, 98%, $M_r = 40,00$) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- kyselina chlorovodíková (HCl , $M_r = 35,46$) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- dichlormethan (CH_2Cl_2 , $M_r = 84,93$) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- chlorid sodný ($NaCl$, $M_r = 58,44$) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- chlorid draselný (KCl , $M_r = 74,55$) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- alkalasa (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- methanol (CH_4O , $M_r = 32,04$) (Merck, Darmstadt, Německo)
- 2-propanol (C_3H_8O , $M_r = 60,10$) (Merck, Darmstadt, Německo)
- acetonitril (C_2H_3N , $M_r = 41,05$) (Merck, Darmstadt, Německo)
- kyselina sulfosalicylová ($C_7H_6O_6S \cdot 2H_2O$, $M_r = 254,22$) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- dusík (N_2 , čistota 4,6; Linde Gas a.s., Praha, ČR)

4.1.4 Přístroje a pomůcky

- elektrochemický detektor Coulochem III (ESA Laboratories, Chelmsford, MA, USA), pracovní elektroda – porézní uhlíková, referenční elektroda – α -hydrogenpaladiová
- analytická cela, model 5010 (ESA Laboratories, Chelmsford, MA, USA)
- ochranná cela, model 5020 (ESA Laboratories, Chelmsford, MA, USA)
- dávkovací ventil Rheodyne 9725i (Rheodyne, L.P., Rohnert Park, CA, USA)
- vysokotlaké analytické čerpadlo LC-10AD_{VP} (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- chromatografická kolona LiChroCart 250 x 4 mm i. d., Purospher Star RP-18e, 5 μ m (Merck, Darmstadt, Německo)
- ochranná kolona LiChroCart 4 x 4 mm i. d., Purospher Star RP-18e, 5 μ m (Merck, Darmstadt, Německo)
- mikrostříkačka Hamilton 710, 100 μ l (Hamilton-Bonaduz AG, Bonaduz, Švýcarsko)
- software pro řízení HPLC a vyhodnocování chromatogramů Clarity (Data Apex, Praha, ČR)
- analytické váhy LB – 1052/2 (Laberte, Budapešť, Maďarsko)
- předvážky p3/200 (Chirana, Praha, ČR)
- pH metr Portable Analog HI 8314 (Hanna Instruments, Kluž, Rumunsko)
- ultrazvuková vana K2 (Kraintek, Podhájska, Slovensko)
- ultrazvuková lázeň Sonorex (Bandelin electronic, Berlín, Německo)
- chlazená odstředivka Eppendorf 5417R (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- třepačka Heidolph Reax top (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo)
- termoblok Isotemp 145 D (Fischer Scientific, Pardubice, ČR)
- hlubokomrazicí box MDF-U3086S (Sanyo electric, Ósaka, Japonsko)
- filtrační aparatura pro filtrování mobilních fází (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- nylonové filtry (Nylon 66) o porozitě 0,20 μ m a průměru 47 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- nylonové filtry (N-4-2) o porozitě 0,25 μ m a průměru 4 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- polypropylenové zkumavky (1,5 ml) s nylonovým filtrem Spin-X[®] 0,22 μ m (Corning, New York, NY, USA)

- vakuový systém Visiprep pro extrakci na pevné fázi (SPE), 12 pozic (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- SPE kolonky (DSC-Ph, DSC-C8, DSC-C18, DSC-C18Lt, DSC-CN, 1 ml) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- koncentrátor vzorků Termovap TV 10+ (Ecom, Praha, ČR)
- zařízení pro úpravu vody Smart 2 Pure (TKA, Niederelbert, Německo)
- automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko)
- polypropylenové zkumavky (1,5 ml) typ Eppendorf (Fischer Scientific, Pardubice, ČR)
- odběrové zkumavky Vacuette[®] (Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Rakousko)
- odměrné laboratorní sklo kategorie A a B

4.1.5 Příprava použitých roztoků

Deionizovaná voda pro přípravu roztoků

Pro přípravu veškerých roztoků byla použita deionizovaná voda o vodivosti 0,055 μS .

Roztok hydroxidu sodného (50 mmol/l)

Roztok byl připraven rozpuštěním 0,2 g hydroxidu sodného v 100 ml přefiltrované deionizované vody.

Zásobní roztok kyseliny lipoové (50 mmol/l)

Navážka 1 g kyseliny lipoové byla rozpuštěna v 100 ml roztoku hydroxidu sodného (50 mmol/l). Takto připravený zásobní roztok byl uchováván v 1,5ml PP zkumavkách při teplotě -80°C .

Pracovní roztok kyseliny lipoové (50 $\mu\text{mol/l}$)

Do 100ml odměrné baňky bylo pipetováno 100 μl zásobního roztoku kyseliny lipoové a objem byl doplněn po rysku přefiltrovanou deionizovanou vodou.

Roztok kyseliny chlorovodíkové (2 mmol/l)

Do odměrné baňky bylo pipetováno 16 μl 37 % HCl a objem doplněn do 100 ml deionizovanou vodou.

Roztoky pro proplach HPLC sestavy

Roztok A byl připraven smícháním 2-propanolu a methanolu v poměru 1:4 (v/v).

Roztok B byl připraven smícháním acetonitrilu a deionizované vody v poměru 1:1 (v/v).

Oba roztoky byly před použitím filtrovány skrz nylonový filtr o porozitě 0,20 μm a odvzdušněny 2 x 15 minut v ultrazvukové lázni.

Roztok pro proplach smyčky dávkovacího zařízení

Roztok pro proplach smyčky dávkovacího zařízení byl připraven smícháním acetonitrilu a deionizované vody v poměru 1:1 (v/v).

Roztok na rozpuštění odparku vzorku

Roztok pro rozpuštění odparku byl připraven smícháním acetonitrilu a deionizované vody v poměru 1:1 (v/v) a filtrován skrz nylonový filtr o porozitě 0,20 μm .

4.1.6 Postup přípravy vzorků

Pracovní roztok LA (50 $\mu\text{mol/l}$) byl naředěn na požadované koncentrace deionizovanou vodou. Vzorek plasmy byl rozmrazen při pokojové teplotě. K 450 μl plasmy bylo přidáno 50 μl standardního roztoku LA tak, aby jednotlivé koncentrace standardních přídavek LA se pohybovaly v rozmezí asi 1–80 nmol/l . Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu po dobu 1 minuty. Poté bylo přidáno 250 μl vychlazeného acetonitrilu, obsah zkumavek byl promíchán na vortexu (2 min), inkubován 20 minut při 4 $^{\circ}\text{C}$ a odstředěn (25 000 x g, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$). Supernatant (450 μl) byl převeden do 1,5ml PP zkumavek a okyselen 20 μl 2 mol/l kyseliny chlorovodíkové. Takto upravený vzorek byl aplikován na SPE kolonku.

Příprava vzorků plasmy byla stejná jako v případě přípravy standardů s tím rozdílem, že k 450 μl plasmy bylo přidáno 50 μl deionizované vody.

4.1.6.1 Extrakce na pevné fázi

K odstranění interferujících látek byla použita technika SPE na kolonkách Discovery DSC-Ph (objem 1 ml, 100 mg silikagelu s navázanou fenylovou stacionární fází, velikost částic 50 μm s průměrem pórů 50 \AA a plochou povrchu 480 m^2/g ; Supelco, Bellefonte, PA, USA). SPE kolonka byla propláchnuta methanolem (3 x 1 ml), poté

deionizovanou vodou (3 x 1 ml). Na takto připravenou kolonku byl aplikován supernatant. Následující kroky SPE postupu jsou uvedeny v tabulce 6. Získaný eluát byl přefiltrován skrz nylonový filtr o porozitě 0,25 µm a převeden do PP zkumavky. Methanol byl opatrně odpařen v atmosféře dusíku (čistota 4,6; Linde Gas, Praha, ČR) při 40 °C. Odparek byl rozpuštěn v 100 µl směsi acetonitrilu a deionizované vody (1:1, v/v).

Tabulka 7 Postup extrakce na pevné fázi.

kondicionace kolonky methanolem (3 x 1 ml)	–
kolonka promyta deionizovanou vodou (3 x 1 ml)	–
supernatant (450 µl) aplikován na kolonku	eluát odstraněn
kolonka promyta deionizovanou vodou (5 x 1 ml)	eluát odstraněn sušení při nízkém tlaku po dobu 5 min
kyselina lipová eluována methanolem (1 ml)	–

4.1.6.2 Příprava mobilní fáze:

(směs acetonitrilu a 20 mmol/l dihydrogenfosforečnanu sodného, 38:62 v/v, pH 2,80)

V 1240 ml deionizované vody byla rozpuštěna navážka 4,80 g dihydrogenfosforečnanu sodného. Po rozpuštění dihydrogenfosforečnanu sodného bylo k roztoku přidáno 760 ml acetonitrilu, směs byla řádně promíchána a pH bylo upraveno koncentrovanou kyselinou trihydrogenfosforečnou na hodnotu 2,80. Po úpravě pH byla mobilní fáze přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,20 µm a odvzdušněna ultrazvukem.

4.1.6.3 Chromatografická analýza

Přístrojové vybavení

čerpadlo LC-10AD_{VP} (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)

dávkovací ventil Rheodyne 9725i (Rheodyne, L.P., Rohnert Park, CA, USA)

elektrochemický detektor Coulochem III (ESA Laboratories, Chelmsford, MA, USA)

software a hardware pro řízení, záznam a vyhodnocení dat z chromatografických systémů Clarity (DataApex, Praha, ČR)

analytická kolona:	LichroCart 250 x 4 mm i. d., Purospher Star RP-18e, 5 μm
ochranná kolonka:	LichroCart 4 x 4 mm i. d., Purospher Star RP-18e, 5 μm
mobilní fáze:	směs 38 % acetonitrilu v 20 mmol/l dihydrogenfosforečnanu sodném, pH 2,80
průtok mobilní fáze:	1 ml/min
teplota termostatu kolony:	37 °C
detekce:	EG = +750 mV E1 = +450 mV, citlivost 10 μA E2 = +590 mV, citlivost 20 nA; citlivost 2 μA
dávkový objem vzorku:	10 μl

Před vlastní analýzou byl HPLC systém propláchnut roztokem A (30 minut, rychlost průtoku 1 ml/min), poté roztokem B (30 – 60 minut, rychlost průtoku 1 ml/min).

Před nadávkováním prvního vzorku na kolonu bylo na elektrodách postupně zvyšováno napětí až na požadované napětí a HPLC systém byl ustavován přibližně 3 hodiny při průtoku mobilní fáze 1 ml/min (při citlivosti 20 nA). Po asi 50ti nástřicích bylo napětí na pracovních elektrodách nastaveno na hodnotu -1000 mV po dobu asi 15 minut při průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Tento postup je nutný k odstranění nečistot z elektrod a dosažení tak vyšší citlivosti a stability základní linie.

4.1.6.4 Identifikace píku kyseliny lipoové

Ke vzorku bylo přidáno známé množství standardního přídatku kyseliny lipoové. Rovněž byly porovnány retenční časy píků kyseliny lipoové ve standardech a vzorcích.

4.1.6.5 Kvantitativní analýza

Pro kvantifikaci LA ve vzorcích byla použita metoda kalibrační křivky. Rovnice kalibrační křivky byla získána proložení závislosti plochy píku na koncentraci metodou nejmenších čtverců.

4.1.7 Analytické parametry metody

4.1.7.1 Linearita

Linearita je schopnost metody poskytovat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci sledovaného analytu v daném rozmezí. Je chápána jako přímková závislost mezi dvěma proměnnými, analytickým signálem a koncentrací analytu. K hodnocení linearity se využívá korelační koeficient, který vyjadřuje těsnost vzájemné závislosti dvou proměnných. Testuje se minimálně pět různých koncentrací standardní látky.

4.1.7.2 Mez detekce (LOD)

Mez detekce je nejnížší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni detekovat. Odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez detekce lze vypočítat různými způsoby. V této práci byla vypočtena dvojím způsobem, používaným pro HPLC:

1) Výpočet z rovnice kalibrační křivky.

$$LOD = \frac{3,3 \cdot Sa}{b}$$

kde Sa je SD interceptu, b je úsek kalibrační křivky.

2) Výpočet metodou „signál-šum“.

$$LOD = \frac{3 \cdot h}{m}$$

kde h je výška šumu, m je směrnice kalibrační křivky.

4.1.7.3 Mez stanovitelnosti (LOQ)

Mez stanovitelnosti je nejnížší možná koncentrace analytu, která může být stanovena za přijatelné správnosti a přesnosti. LOQ odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že umožňuje kvantitativní vyhodnocení. V této práci byla vypočtena dvojím způsobem, používaným pro HPLC:

1) Výpočet z rovnice kalibrační křivky

$$LOD = \frac{10 \cdot Sa}{b}$$

kde Sa je SD interceptu, b je úsek kalibrační křivky.

2) Výpočet metodou „signál-šum“.

$$LOD = \frac{10 \cdot h}{m}$$

kde h je výška šumu, m je směrnice kalibrační křivky.

4.1.7.4 Přesnost

Přesnost analytické metody je vyjádřena mírou shody mezi jednotlivými hodnotami, které jsou měřeny opakovaně při stejných podmínkách s homogenním vzorkem. Přesnost v sérii byla určena opakovanou analýzou jednoho vzorku. Přesnost mezi sériemi byla stanovena opakovanou analýzou vzorku po dobu 5 dnů. Jako míra přesnosti byl použit variační koeficient.

4.1.7.5 Výtěžnost

Výtěžnost (recovery) představuje míru účinnosti dané metody. Recovery je zjišťována metodou přidavků známého množství analytu ke vzorkům s různou endogenní koncentrací. Hodnoty recovery jsou vypočteny jako stonásobek poměru mezi nalezeným a přidaným množstvím analytu dle rovnice:

$$Recovery (\%) = \frac{X1 - X0}{Y}$$

kde $X1$ je koncentrace analytu ve vzorku s přidavkem; $X0$ je endogenní koncentrace analytu a Y je koncentrace přidaného množství analytu.

4.2 Stanovení vlivu kyseliny lipové na viabilitu a počet erytrocytů

Ke stanovení viability buněk, tj. životaschopnosti, byla použita metoda vylučování trypanové modři. Tato metoda je založena na tom, že živé buňky mají nepoškozené buněčné membrány, a tudíž do nich barvivo nemůže prostoupit nebo ho dokáže aktivním transportem opět z buňky vyloučit. Mrtvé buňky mají naopak membrány nefunkční a poškozené, tudíž do sebe absorbují barvivo z okolí. Tyto buňky se potom dají od živých buněk dobře odlišit, protože mají výrazně modrou barvu.

4.2.1 Odběr a zpracování vzorků plasmy

Krev byla odebrána od dobrovolných dárců krve z *vena mediana* (*vena basilica*) do sterilních odběrových zkumavek s EDTA (Vacuette[®], Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Rakousko). Krev byla ve zkumavce promíchána a následovala centrifugace (750 \times g, 7 min, 21 °C). Supernatant byl odstraněn a erytrocyty byly promyty 4 ml PBS a obsah zkumavky opět odstředěn. Erytrocyty byly promyty celkem 3x, po posledním promytí byl supernatant odstraněn a stanoven počet erytrocytů.

4.2.2 Seznam chemikálií

- dimethylsulfoxid (DMSO) (C₂H₆OS, 99,8 %, Mr = 78,13) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Německo)
- kyselina lipová (C₈H₁₄O₂S₂, Mr = 206,33) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- fosfátový pufr (PBS) 10X (pH = 7,4) (Fischer Scientific, Pardubice, ČR)
- Ringerův roztok – tablety (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- trypanová modř (0,4%) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

4.2.3 Seznam pomůcek

- odběrové zkumavky Vacuette[®] (Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Rakousko)
- chlazená odstředivka Eppendorf 5417R (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- kultivační destičky Cell Culture Plate 3512 (CoStar Group, Washington, DC, USA)
- mikroskop Eclipse 80i (Nikon, Tokio, Japonsko)
- multidávkovač Multipette Plus + plastové nástavce Combitips Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)

- plastové špičky pro automatické pipety (Neptune Scientific, San Diego, CA, USA)
- termostat Memmert (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Německo)
- polypropylenové zkumavky (1,5 ml), typ Eppendorf (Fischer Scientific, Pardubice, ČR)
- automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko)
- hlubokomrazicí box MDF-U3086S (Sanyo electric, Ósaka, Japonsko)
- zařízení pro úpravu vody Smart 2 Pure (TKA, Niederelbert, Německo)
- parafilm (Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA)

4.2.4 Příprava použitých roztoků

Zásobní roztoky kyseliny lipoové v DMSO

Jednotlivé navážky LA, které odpovídaly výsledným koncentracím (1-250 $\mu\text{mol/l}$) byly rozpuštěny v roztoku DMSO (0,1 %). Takto připravené zásobní roztoky byly uchovávány v 1,5ml PP zkumavkách při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Fosfátový pufr

Zásobní roztok fosfátového pufru (Fischer Scientific, Pardubice, ČR) byl naředěn 10x. K 10 ml zásobního roztoku pufru bylo přidáno 90 ml deionizované vody.

Ringerův roztok

Jedna tableta k přípravě Ringerova roztoku byla rozpuštěna v 500 ml deionizované vody.

4.2.5 Pracovní postup

Erytrocyty byly naředěny Ringerovým roztokem a dávkovány do 12- ti jamkových kultivačních destiček. Počet erytrocytů v jednotlivých jamkách odpovídal si 50 000 000 buněk/ml. Do každé jamky bylo odpipetováno celkem 2,5 ml suspenze erytrocytů a přidáno 2,5 μl naředěného zásobního roztoku LA tak, aby v každé jamce byla maximální koncentrace DMSO 0,1 %. Ke kontrole bylo přidáno 2,5 μl DMSO. Aby nedocházelo k zbytečné manipulaci, která by mohla stanovení zatížit chybou, byly připraveny 2 kultivační destičky se stejnými koncentracemi přísad LA – jedna byla inkubována po dobu 24 hodin, druhá 48 hodin.

Všechny vzorky byly připraveny v triplicátu. Vzorky byly inkubovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.5.1 Určení viability

Pro určení životaschopnosti buněk bylo na parafilmu smícháno 10 µl buněčné suspenze s 10 µl trypanové modři, suspenze byla inkubována 1-2 minuty při laboratorní teplotě. Deset mikrolitrů suspenze bylo nadávkováno do Bürkerovy komůrky a pod mikroskopem (fázový kontrast, zvětšení 400x) byl v 25 polích Bürkerovy komůrky hodnocen počet živých/mrtvých buněk. Viabilita buněk byla stanovena podle rovnice:

$$viabilita (\%) = \frac{\text{počet živých buněk}}{\text{celkový počet buněk}} \cdot 100$$

Výsledky byly zpracovány v programu MS Excel 2010. Byly vyhotoveny sloupcové grafy průměrných hodnot počtu a viability s chybovými úsečkami, které znázorňovaly směrodatnou odchylku.

4.3 Stanovení vybraných thiolů v plasmě

Hladiny vybraných thiolů, tedy cysteinu, homocysteinu, cysteinylglycinu a methioninu v plasmě byly stanoveny metodou iontově párové HPLC/ED v systému obrácených fází s isokratickou elucí.

4.3.1 Odběr a uchování vzorku plasmy

Tato studie byla provedena ve spolupráci s Oddělením klinické biochemie a diagnostiky a s Kardiologickým oddělením (Nemocnice Pardubického kraje). Vzorky venózní krve byly získány od pacientů (n = 68, 27 žen ve věku 52-90 roků a 41 mužů ve věku 39-84 roků). Krev byla odebrána z *vena mediana (vena basilica)* do sterilních odběrových zkumavek s EDTA (Vacuette[®], Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Rakousko). Plasma byla oddělena od krevních buněk centrifugací (1600 x g, 10 min, 4 °C). Jeden mililitr plasmy byl přenesen do 1,5ml PP zkumavek typu Eppendorf a do doby analýzy uchováván v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C. Doba mezi odběrem vzorku a jeho zmrazením nepřesáhla 60 minut, aby nedošlo k nežádoucímu uvolňování homocysteinu z erytrocytů do extracelulárního prostoru. Písemný informovaný souhlas byl získán od všech pacientů a je uveden v Příloze 2. Vzor dotazníku pacienta je uveden v Příloze 3.

Pacienti byli rozděleni do dvou skupin:

Skupina A (n = 68, 27 žen ve věku 52-90 roků a 41 mužů ve věku 39-84 roků) zahrnovala pacienty s akutní formou onemocnění koronárních artérií (akutní IM s a bez ST elevace, NAP), chronickou formou CAD (SAP) s progresivním průběhem nebo byli hospitalizováni pro dokončení revaskularizace po nedávném prodělání akutní formy CAD (tabulka 8).

Do skupiny B (n = 44, 9 žen ve věku 52-84 roků a 35 mužů ve věku 39-84 roků) byli zařazeni pacienti ze skupiny A, kteří po koronární angiografii podstoupili PCI. Vzorky byly sbírány ve třech časových intervalech, před PCI, 24 a 48 hodin po PCI (tabulka 9).

Pacienti v obou skupinách užívali aspirin, antagonisty vápníku, beta-blokátory, inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu, nitráty a perorální antidiabetika.

Tabulka 8 Charakteristika pacientů s rozdílným stupněm závažnosti onemocnění koronárních artérií.

	akutní CAD (n = 29)	chronické CAD (n = 22)	kompletní RV (n = 17)
muži (n)	15 (51,7 %)	12 (54,5 %)	14 (82,4 %)
	67,0 let (39-83)	68,7 let (49-84)	66,3 let (43-83)
ženy (n)	14 (48,3 %)	10 (45,5 %)	3 (17,7 %)
	75,4 let (52-90)	77,9 let (57-90)	72 let (60-84)
kuřáci	4 (13,8 %)	0 (0 %)	4 (23,5 %)
ex-kuřáci	6 (20,7 %)	8 (36,4 %)	6 (35,3 %)
hypertenze	20 (68,9 %)	20 (90,9 %)	14 (82,4 %)
diabetes	6 (20,7 %)	10 (45,5 %)	3 (17,7 %)
pre-diabetes	2 (6,9 %)	1 (4,6 %)	1 (5,9 %)
onemocnění ledvin	1 (3,5 %)	0 (0 %)	1 (5,9 %)
BMI	27,9 ± 4,3	28,3 ± 3,4	29,8 ± 4,5
statiny	9 (31,1 %)	9 (40,9 %)	10 (58,8 %)
fibráty	0 (0 %)	2 (9,1 %)	0 (0 %)

CAD, onemocnění koronárních artérií (z angl. coronary artery disease); RV, revaskularizace; BMI, body mass index; tCH, celkový cholesterol; TAG, triacylglyceroly; IA, index aterogenity

Tabulka 9 Charakteristika pacientů s koronární angiografií a následnou PCI.

(n = 44); 67,1 let (39-84)			
muži (n)	35 (79,5 %); 66,9 let (39-84)	ženy (n)	9 (20,5 %); 67,7 let (52-84)
kuřáci	8 (18,2%)	ex-kuřáci	16 (36,4%)
hypertenze	35 (79,5%)	BMI	28,4 ± 4,5
diabetes	12 (27,2%)	prediabetes	2 (4,6%)
onemocnění ledvin	1 (2,3%)	statiny/fibráty	21 (47,7%) / 3 (6,9%)

4.3.2 Seznam chemikálií

- DL-homocystein ($C_4H_9NO_2S$, Mr = 135,20) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- L-cystein ($C_3H_7NO_2S$, Mr = 121,16) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- DL-methionin ($C_5H_{11}NO_2S$, min 98 %, Mr = 149,20) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- L-cysteinyglycin ($C_5H_{10}N_2O_3S$, 85 %, Mr = 178,20) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- L-penicilamin ($C_5H_{11}O_2NS$, Mr = 149,21) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- 1,4-dithioerythritol ($C_4H_{10}O_2S_2$, Mr = 154,25) (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- oktan-1-sulfonan sodný ($C_8H_{17}NaO_3S$, Mr = 216,27) (VWA, Radnor, PA, USA)
- kyselina sulfosalicylová ($C_7H_6O_6S \cdot 2H_2O$, Mr = 254,22) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- kyselina chlorovodíková (HCl, 36,6 %, Mr = 36,46) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4 , 99,5 %, Mr = 120,00) (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- kyselina trihydrogenfosforečná (H_3PO_4 , 86,1 %, Mr = 98,00) (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- acetonitil (C_2H_3N , Mr = 41,05) (Merck, Darmstadt, Německo)
- deionizovaná voda (H_2O , Mr = 18,02; G = 0,055 μS)
- kontrolní materiál firmy Bio-Rad, série 18360 (Bio-Rad, Berkeley, CA, USA)
- kontrolní materiál firmy Axis-Shield (Axis-Shield Diagnostics Ltd., Dundee, UK)
LOT 902910712

4.3.3 Přístroje a pomůcky

- chromatografická kolona LiChroCart 125 x 4 mm i. d., Purospher Star RP-18e, 5 μm (Merck, Darmstadt, Německo)
- ochranná kolonka LichroCart 4 x 4 mm i. d., Purospher Star RP-18e, 5 μm (Merck, Darmstadt, Německo)

- elektrochemický detektor Coulochem II (ESA Laboratories, Inc., Chelmsford, MA, USA), pracovní elektroda – porézní uhlíková, referenční elektroda – α -hydrogenpaladiová
- analytická cela, model 5010 (ESA Laboratories, Chelmsford, MA, USA)
- ochranná cela, model 5020 (ESA Laboratories, Chelmsford, MA, USA)
- vysokotlaké analytické čerpadlo LC-10AD_{VP} (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- dávkovací ventil Rheodyne 9725i (Rheodyne, L.P., Rohnert Park, CA, USA)
- termostat kolon CTO-10AS_{VP} (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- software pro řízení HPLC a vyhodnocování chromatogramů Clarity (Data Apex, Praha, ČR)
- analytické váhy LB – 1052/2 (Laberte, Budapešť, Maďarsko)
- předvážky p3/200 (Chirana, Praha, ČR)
- pH metr Portable Analog HI 8314 (Hanna Instruments, Kluž, Rumunsko)
- ultrazvuková vana K2 (Kraintek, Podhájiska, Slovensko)
- ultrazvuková vana K12 (Kraintek, Podhájiska, Slovensko)
- třepačka Heidolph Reax top (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo)
- chlazená odstředivka Jouan 23i (Jouan SA, Saint-Herblain, Francie)
- termoblok Isotemp 145 D (Fischer Scientific, Pardubice, ČR)
- hlubokomrazicí box MDF-U3086S (Sanyo electric, Ósaka, Japonsko)
- filtrační aparatura pro filtrování mobilních fází (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- nylonové filtry (Nylon 66) o porozitě 0,20 μm a průměru 47 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- nylonové filtry (N-4-2) o porozitě 0,25 μm a průměru 4 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- polypropylenové zkumavky (1,5 ml) s nylonovým filtrem Spin-X[®] 0,22 μm (Corning, New York, NY, USA)
- automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko)
- polypropylenové zkumavky (1,5 ml), typ Eppendorf (Fischer Scientific, Pardubice, ČR)
- odměrné laboratorní sklo kategorie A a B
- zařízení pro úpravu vody Smart 2 Pure (TKA, Niederelbert, Německo)

4.3.4 Příprava použitých roztoků

- **Roztoky připravované do spotřebování zásob**

Všechny zásobní roztoky byly uchovávány v 1,5ml PP zkumavkách při teplotě – 80°C.

Zásobní roztok homocysteinu o koncentraci 5000 $\mu\text{mol/l}$

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0338 g homocysteinu v 50 ml deionizované vody.

Zásobní roztok cysteinu o koncentraci 6400 $\mu\text{mol/l}$

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0388 g cysteinu v 50 ml deionizované vody.

Zásobní roztok methioninu o koncentraci 5000 $\mu\text{mol/l}$

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0373 g methioninu v 50 ml deionizované vody.

Zásobní roztok cysteinylglycinu o koncentraci 5000 $\mu\text{mol/l}$

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0446 g cysteinylglycinu v 50 ml deionizované vody.

Zásobní roztok kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 10 mmol/l

Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo pipetováno 84 μl 36,6 % kyseliny chlorovodíkové a objem byl doplněn po rysku deionizovanou vodou.

Zásobní roztok penicilaminu (vnitřní standard) o koncentraci 60 mmol/l

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0895 g penicilaminu v 10 ml kyseliny chlorovodíkové (10mmol/l). Pro přípravu pracovního roztoku byl tento roztok ještě naředěn 10mmol/l HCl na koncentraci 20 mmol/l.

Zásobní roztok kyseliny sulfosalicylové (asi 15%)

K 15 g kyseliny sulfosalicylové bylo přidáno 85 ml deionizované vody.

Zásobní roztok 1,4-dithioerythritolu o koncentraci asi 0,2 mol/l

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,1543 g 1,4-dithioerythritolu (DTE) v 5 ml deionizované vody.

- **Roztoky připravované denně čerstvé**

Tyto roztoky byly uchovávány při teplotě 4 °C.

Pracovní roztok směsi 1,4-dithioerythritolu a penicilaminu

Roztok byl připraven smícháním 250 µl 0,2 mol/l DTE, 20 µl 20mmol/l roztoku penicilaminu a 5 ml deionizované vody.

Směsný roztok standardů cysteinu, homocysteinu, cysteinylglycinu a methioninu

Roztok byl připraven smícháním zásobních roztoků jednotlivých standardů a deionizované vody takto: 250 µl zásobního roztoku cysteinu, 100 µl zásobního roztoku homocysteinu, 100 µl zásobního roztoku cysteinylglycinu, 100 µl zásobního roztoku methioninu a 450 µl deionizované vody. Koncentrace jednotlivých thiolů v 1 ml byly následující: cystein 1600 µmol/l; homocystein, cysteinylglycin a methionin 500 µmol/l. Následným ředěním byl získán směsný standard (nejvyšší bod kalibrace), kde koncentrace jednotlivých thiolů byly: cystein 400 µmol/l; homocystein, cysteinylglycin a methionin 125 µmol/l.

4.3.5 Postup přípravy vzorku

K 200 µl vzorku plasmy bylo přidáno 50 µl pracovního roztoku směsi DTE a penicilaminu. Směs byla promíchána a inkubována 15 minut při 37 °C. K směsi bylo přidáno 50 µl vychlazené 15 % kyseliny sulfosalicylové. Obsah zkumavky byl řádně promíchán, inkubován 15 minut při 4 °C a odstředěn (22 000 x g, 10 minut, 4 °C). Supernatant byl před nástřikem na chromatografickou kolonu filtrován skrz nylonový filtr o velikosti pórů 0,25 µm. Stejným způsobem byl zpracován i kontrolní materiál a standardní roztoky.

4.3.5.1 Příprava mobilní fáze [směs 5% acetonitrilu v roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného (20mmol/l) a oktan-1-sulfonanu sodného (10mmol/l), pH 2,82]

V 1900 ml deionizované vody byla rozpuštěna navážka 4,80 g dihydrogenfosforečnanu sodného a 4,325 g oktan-1-sulfonanu sodného. Po rozpuštění dihydrogenfosforečnanu

sodného a oktan-1-sulfonanu sodného bylo k roztoku přidáno 100 ml acetonitrilu, směs byla řádně promíchána a pH bylo upraveno koncentrovanou kyselinou trihydrogenfosforečnou na hodnotu 2,82. Po úpravě pH byla mobilní fáze přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,20 μm a odvzdušněna ultrazvukem.

4.3.5.2 Chromatografická analýza

Přístrojové vybavení

čerpadlo LC-10AD_{VP} (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)

dávkovací ventil Rheodyne 9725i (Rheodyne, L.P., Rohnert Park, CA, USA)

elektrochemický detektor Coulochem II (ESA Laboratories, Chelmsford, MA, USA)

software a hardware pro řízení, záznam a vyhodnocení dat z chromatografických systémů Clarity (DataApex, Praha, ČR)

analytická kolona: LiChroCart 125 x 4 mm i. d., Purospher Star RP-18e, 5 μm
(Merck, Darmstadt, Německo)

ochranná kolonka: LichroCart 4 x 4 mm i. d., Purospher Star RP-18e, 5 μm
(Merck, Darmstadt, Německo)

mobilní fáze: směs 5 % acetonitrilu v roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného (20mmol/l) a oktan-1-sulfonanu sodného (10mmol/l), pH 2,82

průtok mobilní fáze: 1 ml/min

teplota termostatu kolony: 25 °C

detekce: EG = +850 mV
E1 = +450 mV, citlivost 10 μA
E2 = +750 mV, citlivost 100 μA ; 0,1-7 min, 5 μA ; 7,1–40 min

dávkovaný objem vzorku: 10 μl

4.3.6 Doplnující analýzy

Celkový cholesterol, triacylglyceroly, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, albumin a glukosa byly analyzovány rutinními metodami v laboratoři Oddělení klinické biochemie

a diagnostiky (Nemocnice Pardubického kraje). Veškeré dále uvedené principy jsou součástí příbalových letáků poskytnutých jednotlivými výrobci daných souprav.

Stanovení celkového cholesterolu

Stanovení bylo provedeno na biochemickém analyzátoru Dimension RxL MAX (Dade Behring, USA) soupravou Cholesterol Flex[®] reagent cartridge (Dade Behring, USA). Cholesterol estera katalyzuje hydrolýzu esterů cholesterolu na cholesterol a mastné kyseliny. Cholesterol je působením cholesterol oxidasy oxidován na cholest-4-en-3-on a peroxid vodíku. Peroxid vodíku reaguje s N,N–diethylanilin-HCl/4-aminoantipyrinem za katalýzy křenuvou peroxidasou. Oxidovaný chromofor absorbuje při 540 nm a jeho absorbance je přímo úměrná koncentraci celkového cholesterolu.

Stanovení triacylglycerolů

Stanovení bylo provedeno na biochemickém analyzátoru Dimension RxL MAX (Dade Behring, USA) se soupravou Triglyceride Flex[®] reagent cartridge (Dade Behring, USA). Principem je sled reakcí, kterých se účastní 4 enzymy. V první reakci vznikají z triacylglycerolů působením lipoproteinové lipasy glycerol a mastné kyseliny. Glycerol poté reaguje s ATP za katalýzy enzymem glycerolkinasou, vzniká glycerol-3-fosfát a ADP. Třetí reakci katalyzuje glycerol-3-fosfát oxidasa. Glycerol-3-fosfát se oxiduje na dihydroxyacetonfosfát a peroxid vodíku. Poslední reakci vzniká z peroxidu vodíku, aminoantipyrinu a 4-chlorofenolu za katalýzy enzymem peroxidasou chinonimin a změna absorbance je přímo úměrná množství triacylglycerolů ve vzorku. Měření probíhá při vlnových délkách 510 a 700 nm.

Stanovení HDL cholesterolu

Stanovení HDL cholesterolu (HDL-C) bylo provedeno na biochemickém analyzátoru Dimension RxL MAX (Dade Behring, USA) se soupravou Automated HDL Cholesterol Flex[®] reagent cartridge (Dade Behring, USA). V prvním kroku jsou HDL částice selektivně chráněny, 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, které byly již popsány u stanovení celkového cholesterolu.

Stanovení LDL cholesterolu

Stanovení LDL cholesterolu (LDL-C) bylo provedeno na biochemickém analyzátoru Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics, Švýcarsko) se soupravou LDL cholesterol přímý (Dialab, ČR). V prvním kroku jsou LDL částice selektivně chráněny, aby se neúčastnily reakcí, při kterých je z reakčního prostředí odstraněn cholesterol z HDL, VLDL a chylomikronů. Nejprve cholesterolerasy katalyzuje hydrolyzu esterů cholesterolu na cholesterol a mastné kyseliny. Cholesterol je působením cholesteroloxidasy oxidován na cholest-4-en-3-on a peroxid vodíku. Peroxid vodíku je rozložen katalasou. Ve druhém kroku je LDL-C uvolněn z komplexu a stanoven sledem reakcí, které byly již popsány u stanovení celkového cholesterolu. V reakční směsi je přítomná katalasa inhibována azidem sodným.

Stanovení albuminu

Stanovení albuminu v séru bylo provedeno na biochemickém analyzátoru Dimension RxL MAX (Dade Behring, USA) se soupravou Albumin Flex[®] reagent cartridge (Dade Behring, USA). V principu se jedná o adaptaci metody s bromkresolovým purpurem, kdy v prostředí pH 4,9 vzniká barevný komplex, který absorbuje při vlnové délce 600 nm. Množství komplexu albumin-bromkresolový purpur je přímo úměrné množství albuminu ve vzorku.

Stanovení glukosy

Stanovení glukosy v séru bylo provedeno na biochemickém analyzátoru Dimension RxL MAX (Dade Behring, USA) se soupravou Glucose Flex[®] reagent cartridge (Dade Behring, USA). Glukosa reaguje s ATP za katalýzy enzymem hexokinasou a vzniká glukosa-6-fosfát a ADP. Glukosa-6-fosfát je následně oxidována za katalýzy enzymem glukosa-6-fosfátdehydrogenasou v přítomnosti NADP⁺ na 6-fosfoglukonát a NADPH+H⁺. Přírůstek NADPH+H⁺ je měřen při vlnové délce 340 nm a je přímo úměrný koncentraci glukosy ve vzorku.

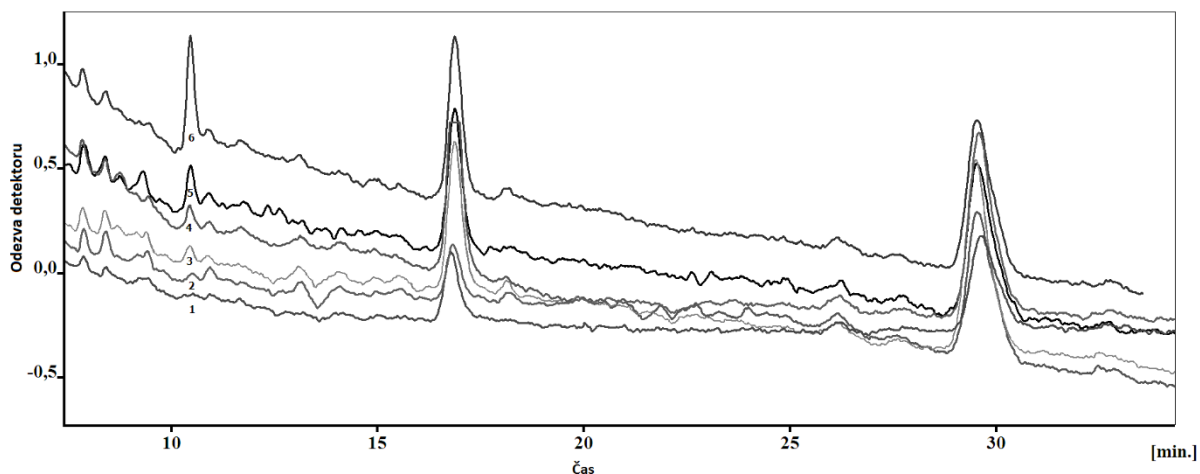
4.3.7 Statistická analýza dat

Pro zpracování výsledků byl použit program MS Excel a statistické programy Sigmastat (verze 3.5; Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA) a Software QuickCalcs (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Data jsou vyjádřena jako průměr a směrodatná odchylka. Rozdíly mezi pacienty a vliv kyseliny lipoové na viabilitu a počet erytrocytů byly stanoveny Studentovým t-testem. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

5 Výsledky

5.1 Stanovení kyseliny lipoové v lidské plasmě bez suplementace

Chromatografické záznamy stanovení kyseliny lipoové v plasmě jsou znázorněny na obrázku 20.



Obrázek 20 Chromatografické záznamy vzorku plasmu se standardními přídávky kyseliny lipoové.

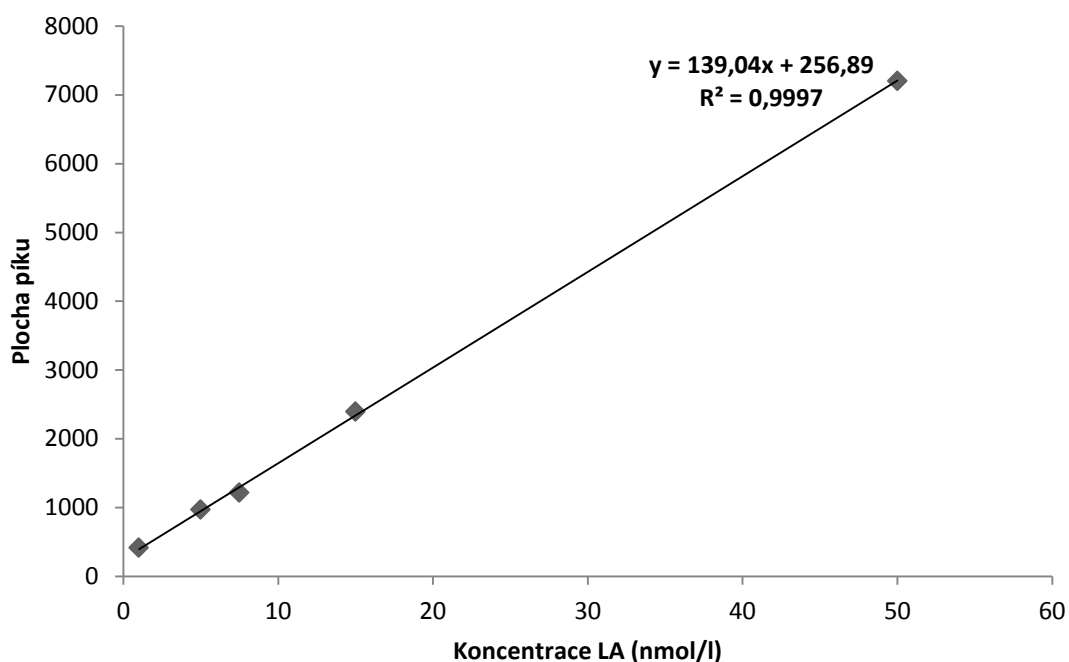
(1) plasma bez přídávku LA; (2) plasma s přídávkem 1 nmol/l; (3) plasma s přídávkem 5 nmol/l; (4) plasma s přídávkem 7,5 nmol/l; (5) plasma s přídávkem 15 nmol/l; (6) plasma s přídávkem 50 nmol/l. Podmínky HPLC analýzy: isokratická eluce (mobilní fáze: 38 % ACN v 20mmol/l NaH₂PO₄, pH 2,8), průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, separace probíhala při 37 °C, citlivost 20 nA.

5.1.1 Analytické parametry metody

Linearita

Linearita byla zjišťována jako součást kalibrace metody, a to analýzou standardů s koncentracemi rovnoměrně pokrývající předpokládaný rozsah metody. Linearita byla testována analýzou 10 standardů o různých koncentracích (1-80 nmol/l). S použitím programu MS Excel byla sestrojena kalibrační křivka a provedeno vyhodnocení kalibračního vztahu. Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu 7,5-50 nmol/l. Rovnice regresní přímky byla $y = 139,04x + 256,89$, kde y je plocha píku a x je koncentrace LA (nmol/l). Průměrná směrnice a korelační koeficient byly 139,04 (SD = 9,18) a 0,9997.

Typická kalibrační křivka konstruována z 5 bodů je znázorněna na obrázku 21.



Obrázek 21 Kalibrační křivka pro stanovení kyseliny lipoové metodou HPLC/ED.

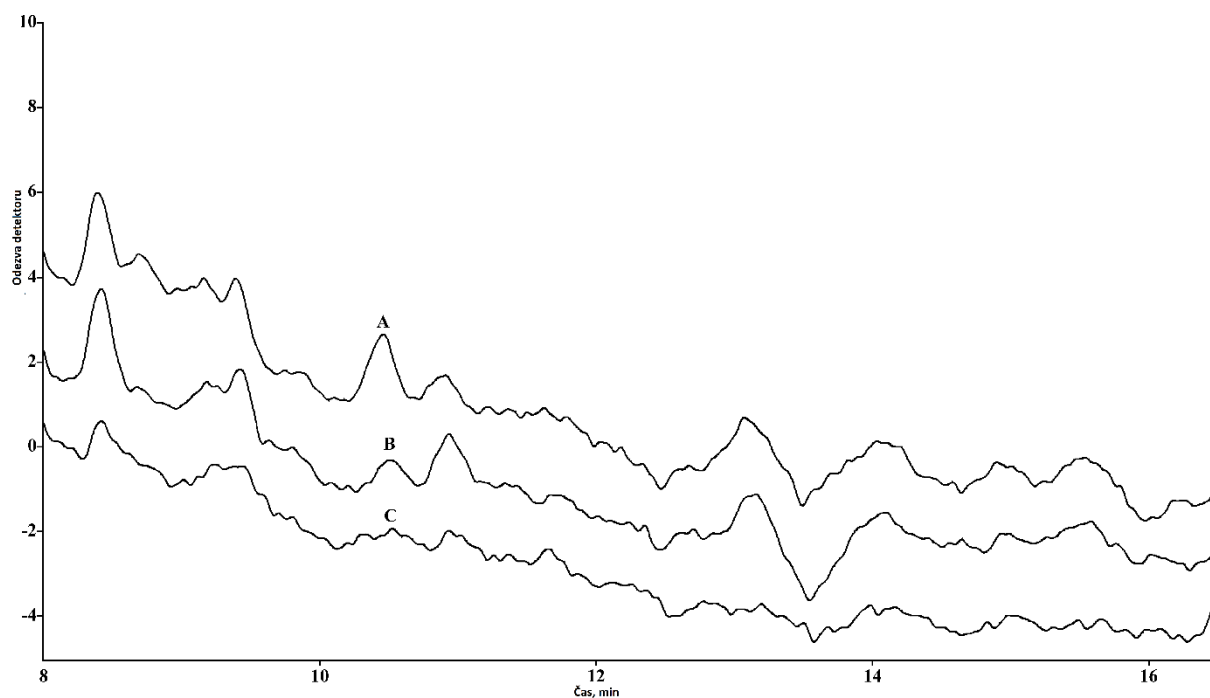
Mez detekce, mez stanovitelnosti

Nejnižší koncentrace LA, která může být kvantifikována s přijatelnou správností a přesností byla 2,4 nmol/l, resp. 5,18 nmol/l. Hodnota 2,4 nmol/l byla vypočtena z rovnice kalibrační křivky, hodnota 5,18 nmol/l metodou signál - šum (způsob výpočtu je uveden v kapitole 4.1.7.2 a 4.1.7.3). Detekční limit byl 0,81 nmol/l, resp. 1,85 nmol/l. LOD a LOQ jsou shrnuty přehledně v tabulce 10.

Tabulka 10 Mez detekce a stanovitelnosti.

Parametr	Výpočet z rovnice kalibrační křivky	Metoda signál – šum
LOD nmol/l	0,81	1,85
LOQ nmol/l	2,4	5,18

Příklady chromatografických záznamů stanovení LA v plasmě s nízkými přídávky LA jsou znázorněny na obrázku 22.



Obrázek 22 Chromatografické záznamy stanovení LA v plasmě s nízkými přídávky LA.

(A) přídavek 5 nmol/l LA; (B) přídavek 1 nmol/l LA; (C) plasma bez přídávku LA. Podmínky HPLC analýzy: isokratická eluce (mobilní fáze: 38 % ACN v 20mmol/l NaH₂PO₄, pH 2,8), průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, separace probíhala při 37 °C, citlivost 20 nA.

Přesnost

Přesnost v sérii byla určena opakovanou analýzou vzorku plasmy o koncentraci LA asi 5 nmol/l). Vzorek byl analyzován za podmínek opakovatelnosti, tj. stejná metoda, stejný materiál, stejný pracovník, stejná laboratoř, krátký časový úsek. V případě přesnosti mezi sériemi jsme analyzovali stejný vzorek v různé dny. K výpočtu jsme použili rovnice kalibračních přímek, získaných v tentýž den. Hodnoty jsou shrnuty v tabulce 11.

Tabulka 11 Přesnost metody v sérii a mezi sériemi.

	kyselina lipoová průměr ± SD nmol/l	CV %
přesnost v sérii n=10	4,68 ± 0,11	2,28
přesnost mezi sériemi n=10	5,46 ± 0,54	9,87

SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient

5.2 Stanovení kyseliny lipoové v plasmě po suplementaci

Linearita

Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu 0,5-20 $\mu\text{mol/l}$. Rovnice regresní přímky byla $y = 1081,734x - 49,181$, kde y je plocha píku a x je koncentrace LA ($\mu\text{mol/l}$). Korelační koeficient byl 0,999.

Mez detekce, mez stanovitelnosti

Nejnižší koncentrace LA, která může být kvantifikována s přijatelnou správností a přesností byla 0,35 $\mu\text{mol/l}$. Hodnota byla vypočtena metodou signál - šum (způsob výpočtu je uveden v kapitole 4.1.7.2.) Detekční limit byl 0,17 $\mu\text{mol/l}$.

Výtěžnost

Tabulka 12 Výtěžnost metody pro stanovení kyseliny lipoové kapalinovou chromatografií.

Přídavek ($\mu\text{mol/l}$)	Výtěžnost (%)
1	107,9
2	119,7
4	97,4
5	98,8
AVG (%)	105,9
SD	8,9
CV (%)	8,4

Tabulka 13 Hladiny kyseliny lipoové ve vzorcích plasmy suplementovaných dárců.

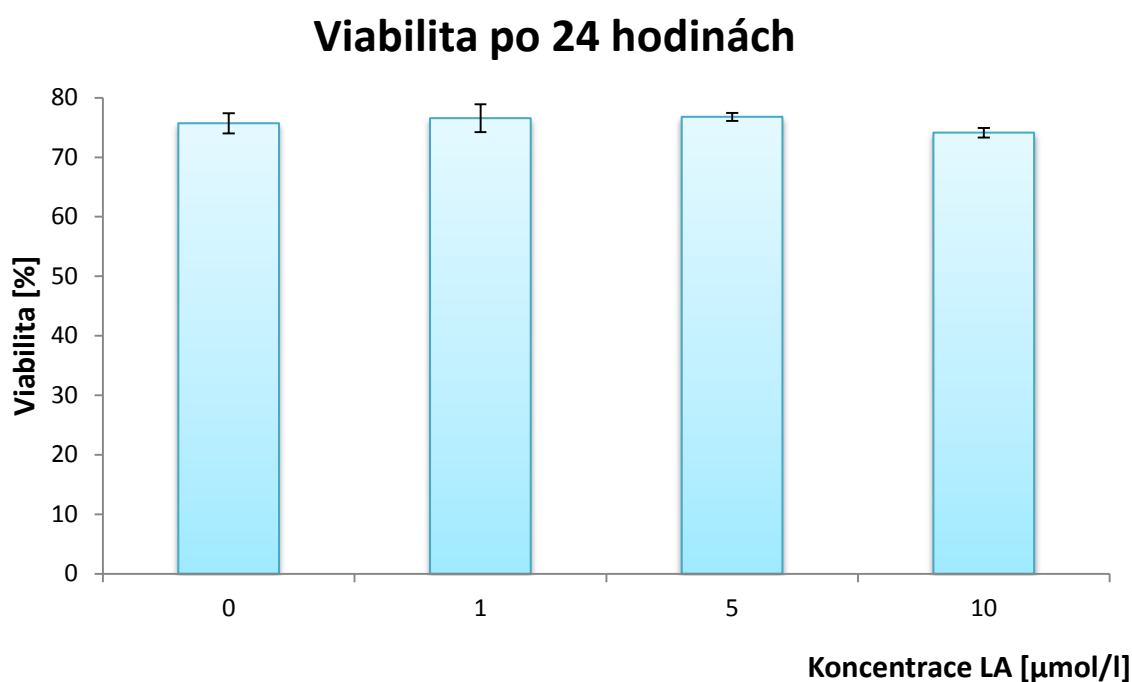
Dobrovolný dárc	Koncentrace kyseliny lipoové $\mu\text{mol/l}$
1	1,42
2	1,92
3	4,73

Podmínky HPLC analýzy: isokratická eluce (mobilní fáze: 38 % ACN v 20mmol/l NaH_2PO_4 , pH 2,8), průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, separace probíhala při 37 °C, citlivost 2 μA . Koncentrace LA ve vzorcích plasmy suplementovaných dárců byla vypočítána z rovnice regrese kalibrační křivky.

5.3 Účinky kyseliny lipoové na erythrocyty

5.3.1 Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na viabilitu erythrocytů

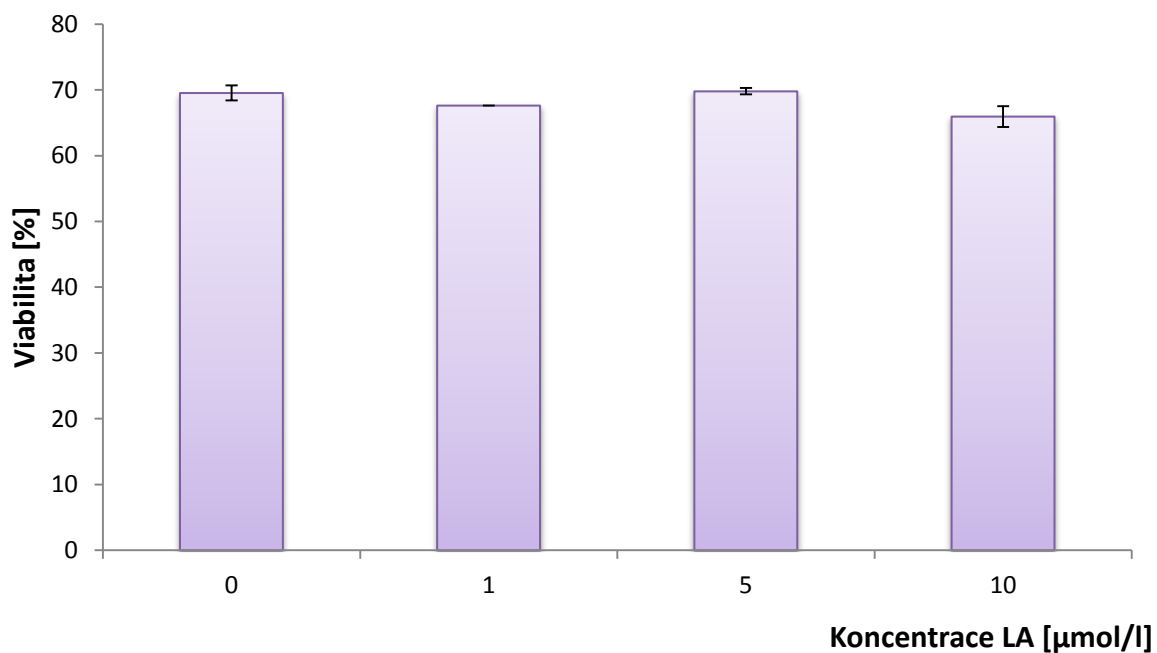
Byl testován vliv nízkých koncentrací LA na viabilitu erythrocytů po 24 a 48 hodinové inkubaci. Koncentrace LA byla 1, 5 a 10 $\mu\text{mol/l}$. Hodnoty viability erythrocytů po 24 a 48 hodinové inkubaci jsou znázorněny na obrázcích 23 a 24.



Obrázek 23 Vliv nízkých koncentrací LA (1, 5 a 10 $\mu\text{mol/l}$) na viabilitu erythrocytů po 24 hodinové inkubaci.

Na obrázku je znázorněn aritmetický průměr měření se směrodatnou odchylkou. Kyselina lipoová nezpůsobila po 24 hodinové inkubaci v žádné z testovaných koncentrací statisticky významný rozdíl ve viabilitě erythrocytů ve srovnání s kontrolou.

Viabilita po 48 hodinách

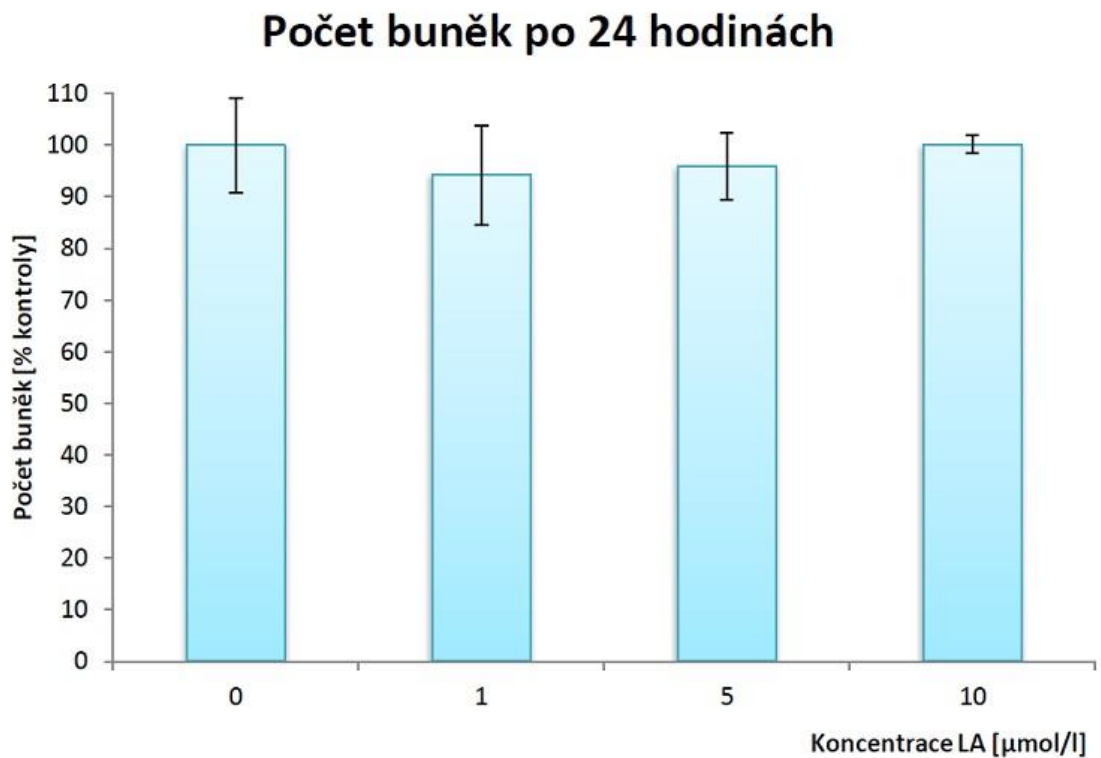


Obrázek 24 Vliv nízkých koncentrací LA (1, 5 a 10 µmol/l) na viabilitu erytrocytů po 48 hodinové inkubaci.

Na obrázku je znázorněn aritmetický průměr měření se směrodatnou odchylkou. Kyselina lipová nezpůsobila ani po 48 hodinové inkubaci v žádné z testovaných koncentrací statisticky významný rozdíl ve viabilitě erytrocytů ve srovnání s kontrolou.

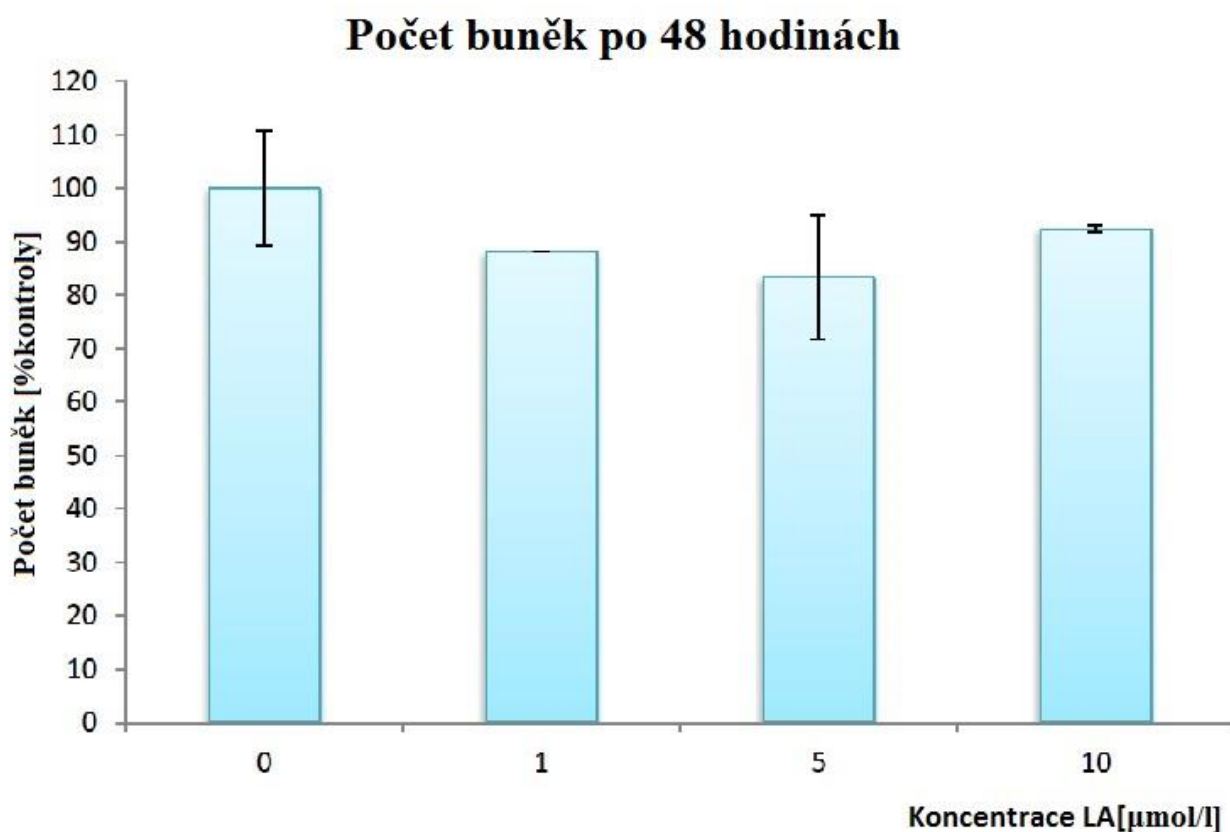
5.3.2 Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na počet erytrocytů

Společně s viabilitou byly statisticky vyhodnoceny i změny v počtech buněk po 24 a 48 hodinové inkubaci s 1, 5 a 10 $\mu\text{mol/l}$ LA. Počty jednotlivých buněk byly vyhodnoceny jako procento kontroly a jsou zobrazeny na obrázcích 25 a 26.



Obrázek 25 Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na počty erytrocytů po 24 hodinové inkubaci.

Na obrázku je znázorněn aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou. Kyselina lipoová neměla po 24 hodinové inkubaci v žádné z testovaných koncentrací statisticky významný vliv na počet erytrocytů ve srovnání s kontrolou.

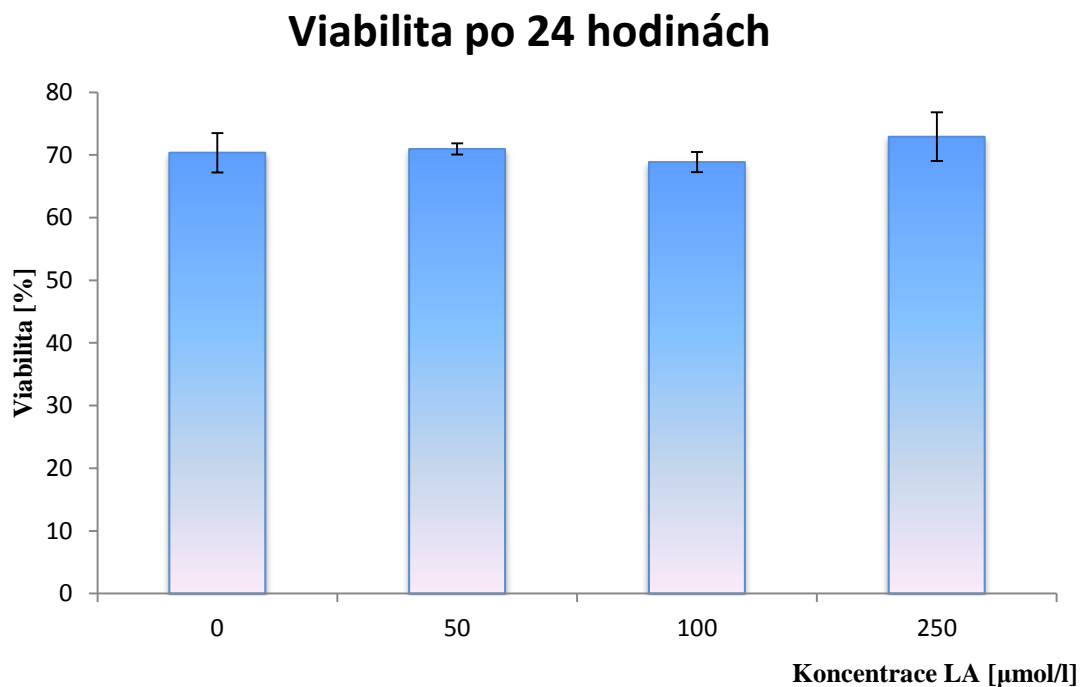


Obrázek 26 Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na počty erytrocytů po 48 hodinové inkubaci.

Na obrázku je znázorněn aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou. Kyselina lipoová neměla ani po 48 hodinové inkubaci v žádné z testovaných koncentrací statisticky významný vliv na počet erytrocytů ve srovnání s kontrolou.

5.3.3 Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na viabilitu erytrocytů

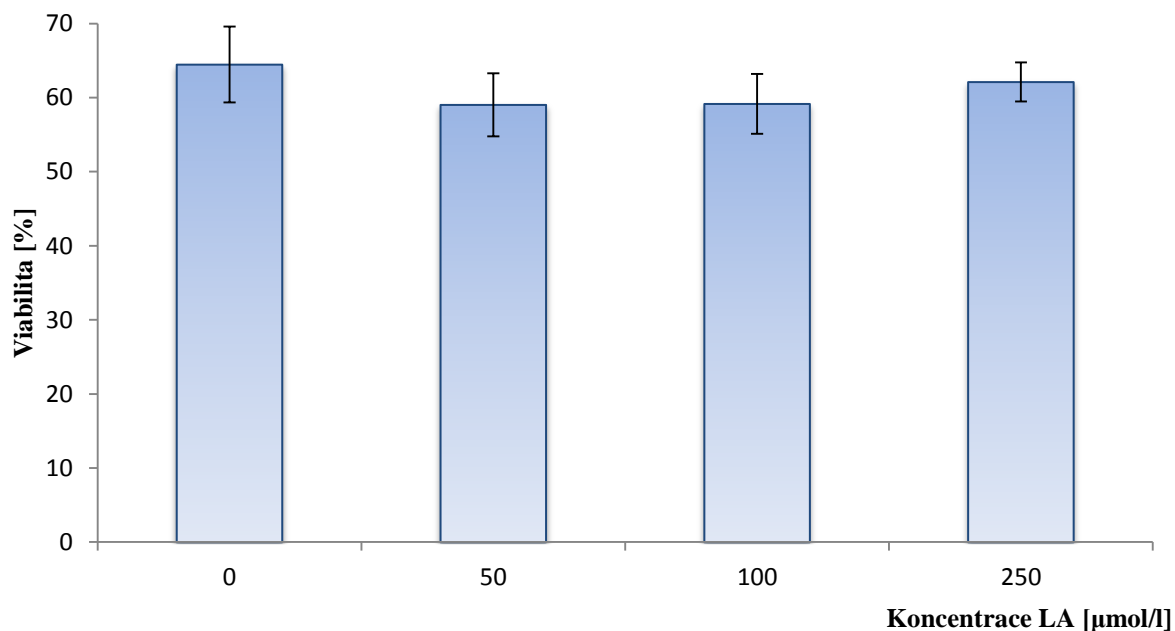
Byl testován vliv vysokých koncentrací LA na viabilitu erytrocytů. Byly zvoleny koncentrace 50, 100 a 250 $\mu\text{mol/l}$. Inkubace erytrocytů s LA probíhala 24 a 48 hodin. Hodnoty viability erytrocytů po 24 a 48 hodinové inkubaci jsou znázorněny na obrázcích 27 a 28.



Obrázek 27 Vliv vysokých koncentrací LA (50, 100 a 250 $\mu\text{mol/l}$) na viabilitu erytrocytů po 24 hodinové inkubaci.

Na obrázku je znázorněn aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou. Kyselina lipoová nezpůsobila po 24 hodinové inkubaci v žádné z testovaných koncentrací statisticky významný rozdíl ve viabilitě erytrocytů ve srovnání s kontrolou.

Viabilita po 48 hodinách

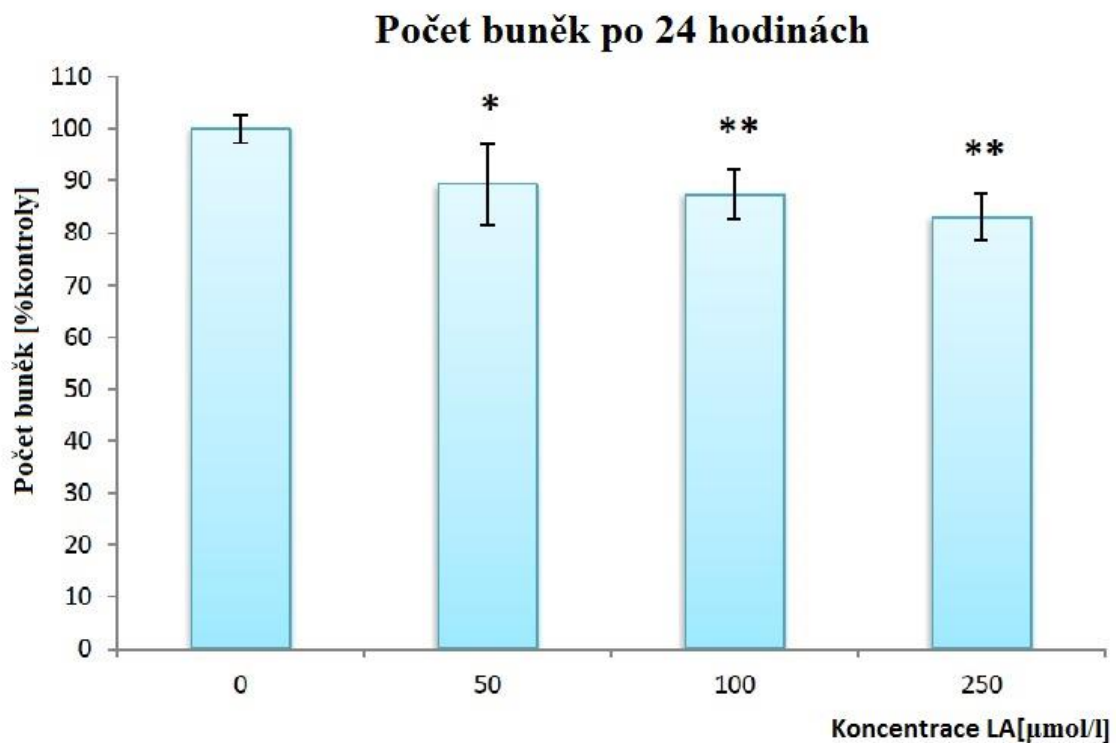


Obrázek 28 Vliv vysokých koncentrací LA (50, 100 a 250 µmol/l) na viabilitu erytrocytů po 48 hodinové inkubaci.

Na obrázku je znázorněn aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou. Kyselina lipoová nezpůsobila ani po 48 hodinové inkubaci v žádné z testovaných koncentrací statisticky významný rozdíl ve viabilitě erytrocytů ve srovnání s kontrolou.

5.3.4 Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na počet erytrocytů

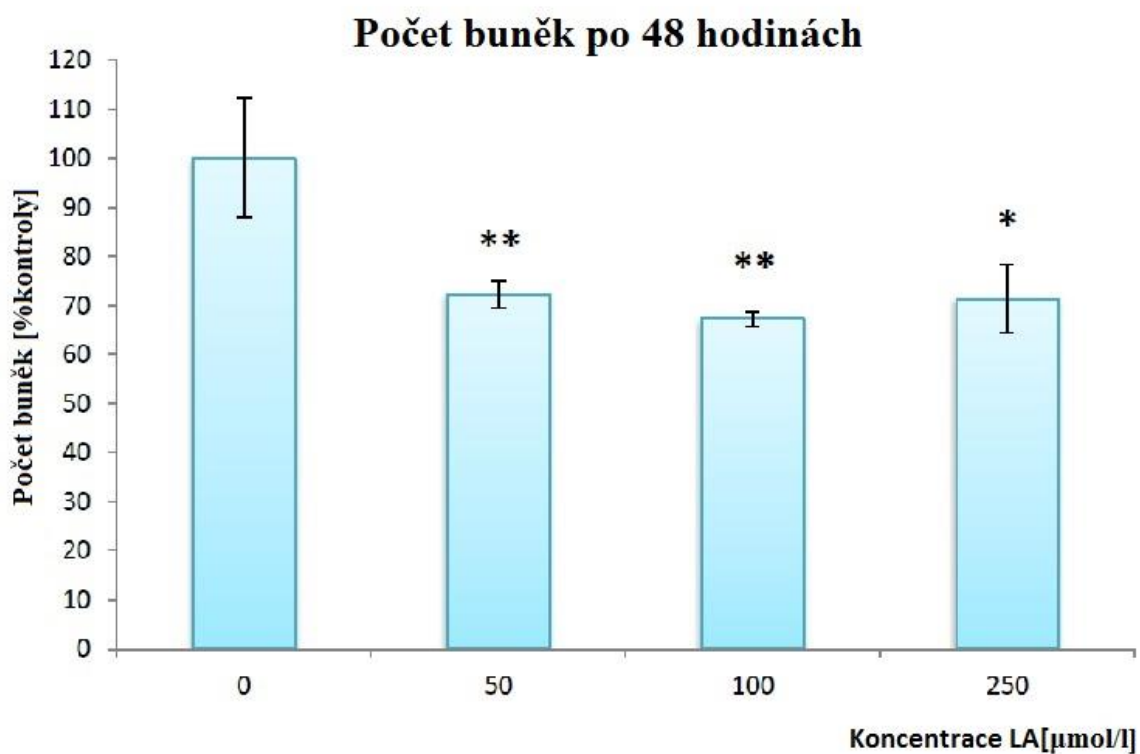
Byly statisticky vyhodnoceny změny v počtu buněk po 24 a 48 hodinové inkubaci s 50, 100 a 250 $\mu\text{mol/l}$ LA. Počty jednotlivých buněk byly vyhodnoceny jako procento kontroly a jsou zobrazeny na obrázcích 29 a 30.



Obrázek 29 Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na počty erytrocytů po 24 hodinové inkubaci.

Na obrázku je znázorněn aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou. Symbol * označuje výsledky na hranici statistické významnosti; symbol ** označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$



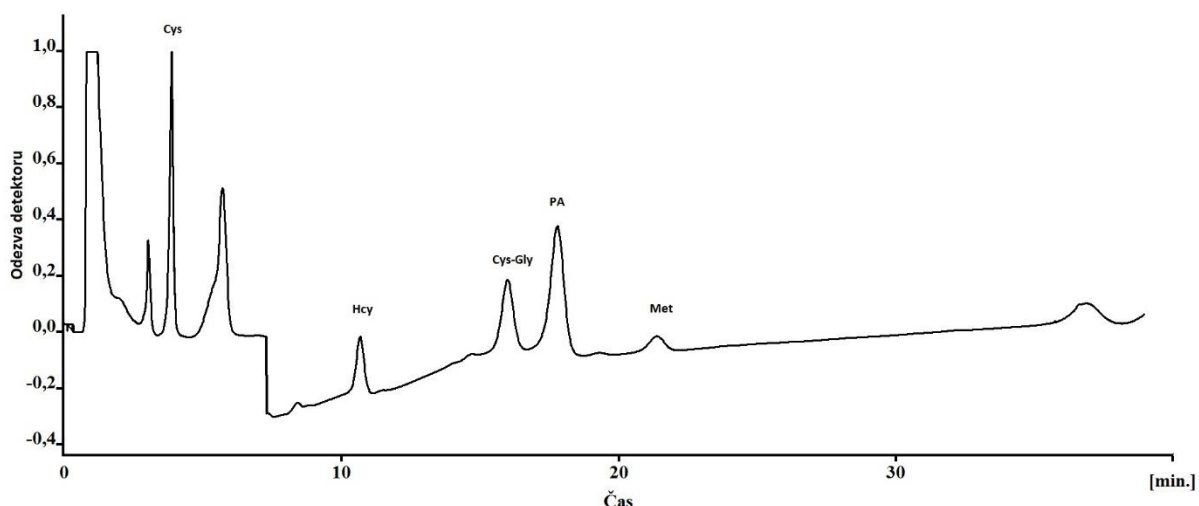
Obrázek 30 Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na počty erytrocytů po 48 hodinové inkubaci.

Na obrázku je znázorněn aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou. Symbol * označuje výsledky na hranici statistické významnosti; symbol ** označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

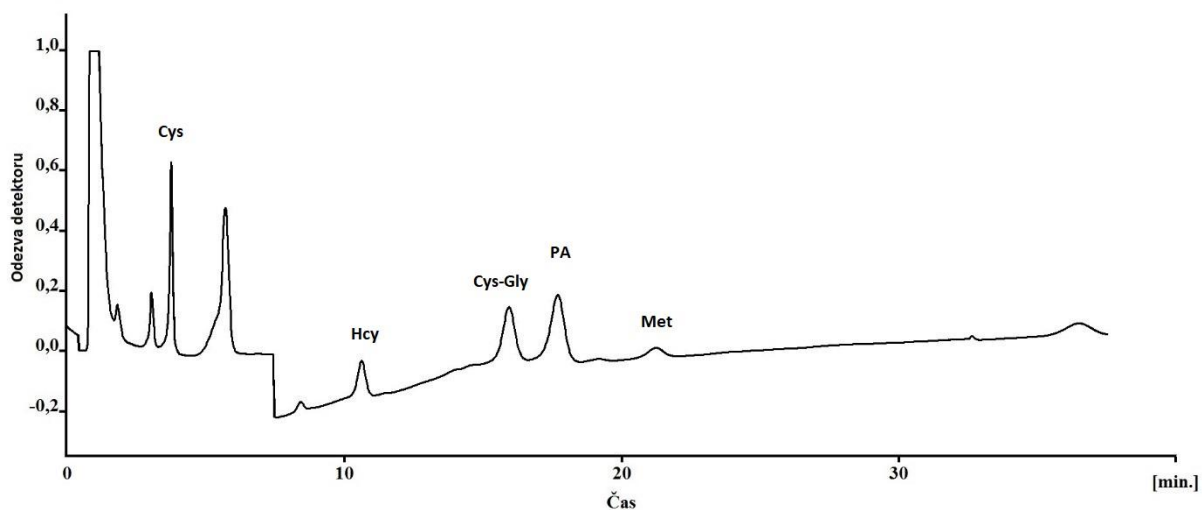
5.4 Stanovení vybraných aminosíroly v lidské plasmě

Chromatografické záznamy stanovení homocysteinu, cysteinu, methioninu a cysteinylglycinu v plasmě pacienta s onemocněním koronárních artérií (obrázek 31-33).



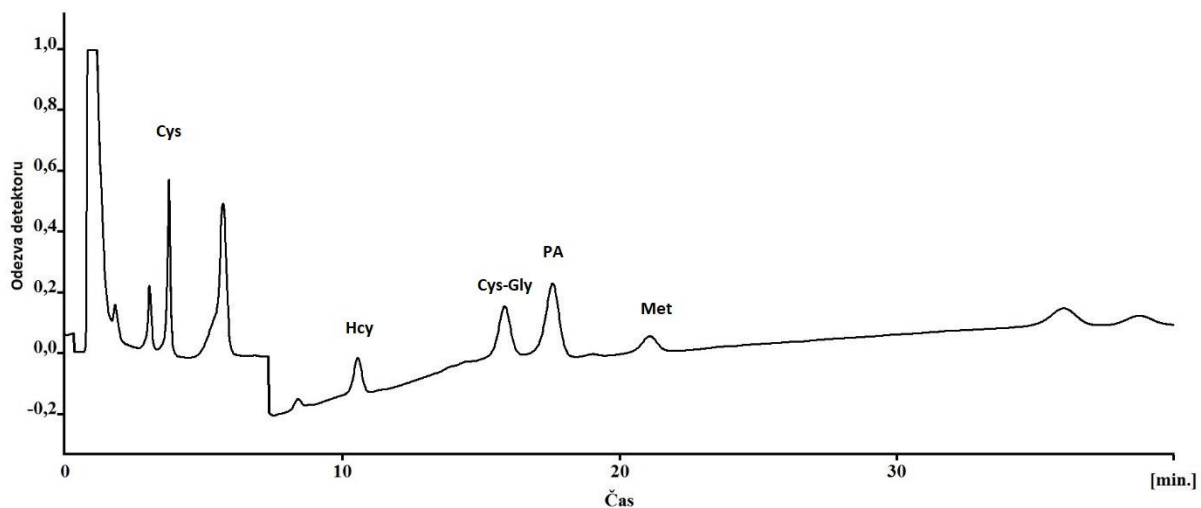
Obrázek 31 Chromatografický záznam stanovení vybraných aminosíroly v plasmě pacienta s onemocněním koronárních artérií.

Vzorek plasmy byl odebrán před provedením PCI. Podmínky HPLC analýzy: isokratická eluce (mobilní fáze: 5 % ACN v roztoku 20mmol/l NaH_2PO_4 a 10mmol/l 1-sulfonanu sodného, pH 2,82), průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, separace probíhala při 25 °C, citlivost 100 μA , 0,1-7 min; 5 μA , 7,1-40 min.



Obrázek 32 Chromatografický záznam stanovení vybraných aminosíroly v plasmě pacienta s onemocněním koronárních artérií.

Vzorek plasmy byl odebrán 24 hodin po PCI. Podmínky HPLC analýzy: viz obrázek 31.



Obrázek 33 Chromatografický záznam stanovení vybraných aminothioliů v plasmě pacienta s onemocněním koronárních artérií.

Vzorek plasmy byl odebrán 48 hodin po PCI. Podmínky HPLC analýzy: viz obrázek 31.

5.4.1 Hladiny aminothioliů v plasmě pacientů s onemocněním koronárních arterií

Tabulka 14 Hladiny sledovaných aminothioliů ve skupině pacientů s akutní formou CAD.

Pořadové číslo	Pacient	Homocystein μmol/l	Cystein μmol/l	Cysteinyl-glycin μmol/l	Methionin μmol/l
1	11	22,6	70,3	17,3	19,5
2	14	17,9	409,9	20,9	36,4
3	15	27,3	124,8	22,2	26,7
4	16	24,0	291,0	35,2	27,7
5	19	24,7	336,2	27,9	21,0
6	20	20,0	336,2	22,2	21,3
7	21	23,7	276,0	20,1	38,1
8	22	57,6	365,6	30,5	17,0
9	23	25,0	503,2	19,7	22,0
10	31	30,8	338,3	24,4	17,1
11	49	37,1	513,6	53,0	18,8
12	52	13,1	376,8	43,9	38,4
13	53	17,4	388,3	42,5	34,0
14	55	20,8	379,2	36,7	25,9
15	59	34,9	459,3	37,6	30,9
16	60	19,2	340,0	50,4	33,7
17	61	30,9	506,0	53,2	29,0
18	62	21,6	351,0	53,0	35,2
19	64	22,2	400,4	35,3	25,3
20	65	42,7	598,0	31,5	17,8
21	68	15,0	376,8	43,9	45,3
22	70	22,4	409,9	37,5	28,9
23	73	20,0	503,2	51,3	48,5
24	76	21,3	459,9	46,5	37,3
25	77	25,2	467,3	50,4	36,2
26	78	47,2	422,8	42,2	29,7
27	79	14,6	381,9	48,2	35,4
28	81	27,8	362,9	33,6	21,3
29	83	32,9	381,9	32,8	23,0

Tabulka 15 Hladiny sledovaných aminothioliů ve skupině pacientů s chronickou formou CAD.

Pořadové číslo	Pacient	Homocystein μmol/l	Cystein μmol/l	Cysteinyl-glycin μmol/l	Methionin μmol/l
1	1	13,3	327,3	12,2	24,8
2	2	20,8	271,3	16,7	21,5
3	3	7,6	192,7	11,8	19,7
4	4	9,4	252,9	7,3	22,7
5	5	14,6	78,5	26,6	21,6
6	6	20,6	359,8	29,5	35,2
7	7	20,4	307,0	31,0	26,8
8	10	18,0	491,9	22,4	30,1
9	13	10,5	177,7	23,8	18,8
10	42	27,3	316,7	26,4	12,2
11	47	27,7	396,2	29,5	21,6
12	50	15,1	454,0	44,3	23,5
13	51	22,0	420,9	26,0	30,5
14	54	20,4	454,0	27,9	22,2
15	56	21,5	463,5	37,6	33,3
16	57	29,8	568,6	33,0	26,4
17	58	15,3	321,1	37,8	22,8
18	63	24,1	415,7	36,4	22,1
19	67	10,5	305,3	-	23,0
20	94	14,5	420,7	40,8	42,4
21	75	14,3	388,6	45,0	36,6
22	80	18,6	424,3	45,6	25,9

Tabulka 16 Hladiny sledovaných aminothiůlů ve skupině pacientů s dokončenou RV.

Pořadové číslo	Pacient	Homocystein $\mu\text{mol/l}$	Cystein $\mu\text{mol/l}$	Cysteinyl-glycin $\mu\text{mol/l}$	Methionin $\mu\text{mol/l}$
1	12	15,3	197,6	25,5	29,8
2	17	23,0	207,3	31,7	39,2
3	18	21,0	228,9	31,3	27,0
4	25	31,7	380,6	22,5	20,8
5	27	24,0	-	70,2	20,5
6	28	17,9	422,9	23,0	18,2
7	29	14,4	371,3	24,0	17,6
8	30	18,0	221,6	20,4	15,1
9	33	28,5	402,5	29,0	18,5
10	34	29,0	343,1	20,6	14,5
11	36	16,8	246,6	19,5	11,8
12	37	18,0	284,4	20,1	15,0
13	38	23,5	153,6	26,5	15,5
14	39	26,4	146,5	24,7	15,3
15	41	15,0	84,52	25,9	25,5
16	43	22,0	343,1	34,7	25,0
17	46	22,6	316,7	35,7	27,2

5.4.2 Porovnání sledovaných parametrů mezi pacienty s rozdílným stupněm závažnosti onemocnění koronárních artérií

Tabulka 17 Charakteristika pacientů s rozdílným stupněm závažnosti onemocnění koronárních artérií.

	akutní CAD (n = 29) 71,3 let (39–90)	chronické CAD (n = 22) 72,9 let (49-90)	kompletní RV (n = 17) 67,3 let (43-84)	hodnota <i>p</i>
muži (n)	15 (51,7 %)	12 (54,5 %)	14 (82,4 %)	-
	67,0 let (39-83)	68,7 let (49-84)	66,3 let (43-83)	
ženy (n)	14 (48,3 %)	10 (45,5 %)	3 (17,7 %)	-
	75,4 let (52-90)	77,9 let (57-90)	72 let (60-84)	
kuřáci	4 (13,8 %)	0 (0 %)	4 (23,5 %)	<0,05* ^o
ex-kuřáci	6 (20,7 %)	8 (36,4 %)	6 (35,3 %)	NS
hypertenze	20 (68,9 %)	20 (90,9 %)	14 (82,4 %)	<0,05*
diabetes	6 (20,7 %)	10 (45,5 %)	3 (17,7 %)	NS
pre-diabetes	2 (6,9 %)	1 (4,6 %)	1 (5,9 %)	NS
onemocnění ledvin	1 (3,5 %)	0 (0 %)	1 (5,9 %)	NS
BMI	27,9 ± 4,3	28,3 ± 3,4	29,8 ± 4,5	NS
glukosa (mmol/l)	6,6 ± 2,7	7,4 ± 2,5	6,2 ± 2,1	NS
albumin (g/l)	40,6 ± 8,8	38,4 ± 5,4	35,5 ± 2,6	<0,05 [§]
tCh (mmol/l)	4,3 ± 1,1	4,1 ± 0,8	3,5 ± 0,9	<0,05 [§]
LDL-C (mmol/l)	2,5 ± 0,7	2,5 ± 0,7	2,0 ± 0,8	<0,05 [§]
HDL-C (mmol/l)	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,2	NS
TAG (mmol/l)	1,4 ± 0,6	1,5 ± 0,6	1,2 ± 0,7	NS
IA	3,4 ± 1,0	3,1 ± 1,4	2,3 ± 0,9	<0,01 [§] ; <0,05 ^o
statiny	9 (31,1 %)	9 (40,9 %)	10 (58,8 %)	NS
fibráty	0 (0 %)	2 (9,1 %)	0 (0 %)	NS

* porovnání pacientů s akutním a chronickým CAD; § porovnání pacientů s akutním CAD a dokončenou RV; ^o porovnání pacientů s chronickým CAD a dokončenou RV
CAD onemocnění koronárních artérií (z angl. coronary artery disease); RV revaskularizace; BMI body mass index; tCH celkový cholesterol; TAG triacylglyceroly; IA index aterogenity

5.4.3 Porovnání hladin aminothiolů v plasmě mezi pacienty s rozdílným stupněm závažnosti onemocnění koronárních artérií

Tabulka 18 Hladiny aminothiolů v plasmě u pacientů s rozdílným stupněm závažnosti onemocnění koronárních artérií.

	Akutní CAD	Chronické CAD	Kompletní RV	hodnota <i>p</i>
Homocystein (μmol/l)	26.7 ± 9.6	17.9 ± 6.1	21.6 ± 5.2	<0.001*
Cystein (μmol/l)	391.8 ± 115.7	355.2 ± 114.7	271.9 ± 101.1	<0.01 [§] ; <0.05 [°]
Cysteinyl-glycin (μmol/l)	36.1 ± 11.6	29.7 ± 11.3	28.5 ± 11.9	<0.05 [§]
Methionin (μmol/l)	28.9 ± 8.12	26.1 ± 6.7	19.2 ± 5.9	<0.001 [§] ; <0.01 [°]

* porovnání pacientů s akutním a chronickým CAD; § porovnání pacientů s akutním CAD a dokončenou RV; ° porovnání pacientů s chronickým CAD a dokončenou RV

5.4.4 Dynamika aminothiolů po perkutánní koronární intervenci

Tabulka 19 Dynamika aminothiolů po PCI.

Dynamika (μmol/l)	0 hodin (před PCI)	24 hodin (po PCI)	48 hodin (po PCI)	hodnota <i>p</i>
Homocystein	22.0 ± 7.9	22.4 ± 7.3	22.9 ± 7.1	NS
Cystein	285.5 ± 108.0	282.2 ± 109.9	286.5 ± 110.7	NS
Cysteinyl-glycin	24.8 ± 6.6	28.7 ± 8.1	28.3 ± 8.2	< 0.05 ^{*§}
Methionin	23.7 ± 7.5	27.5 ± 8.5	27.5 ± 8.6	< 0.05 ^{*§}

* srovnání hladin před PCI a 24 hodin po PCI; § srovnání hladin před PCI a 48 hodin po PCI; NS žádný významný rozdíl (z angl. no significant)
PCI perkutánní koronární intervence (angl. Percutaneous Coronary Intervention)

6 Diskuze

V teoretické části této disertační práce je popsáno chronické progresivní onemocnění ateroskleróza, které se po řadu let bezpříznakového průběhu manifestuje svými komplikacemi: ischemickou chorobou srdeční, ischemickou cévní mozkovou příhodou a ischemickou chorobou dolních končetin^{(11) (12) (5)}. Hlavními rizikovými faktory rozvoje tohoto onemocnění jsou oxidační stres, hyperlipidemie, *diabetes mellitus* či hyperhomocysteinemie. Dle Světové zdravotnické organizace (WHO, z angl. World Health Organization) je ischemická choroba srdeční nejčastější příčinou kardiovaskulární mortality a předpokládá se, že v roce 2030 bude *diabetes mellitus* sedmou hlavní příčinou úmrtí⁽¹⁷⁷⁾. Z těchto důvodů je značná pozornost věnována jejich prevenci. Veškerá snaha je směřována především co možná k nejefektivnější eliminaci působení již známých rizikových faktorů, hledání nových biomarkerů a v neposlední řadě hledání nových účinných látek, které by napomáhaly v terapii kardiovaskulárního onemocnění.

V posledních letech je často diskutována kyselina lipoová, která má v organismu mnoho významných funkcí (obrázek 9) a je především silným antioxidantem^{(54) (51) (106) (53)}. Četné klinické studie dokazují, že hraje významnou úlohu při léčbě mnoha onemocnění, jejichž vývoj a progresse je úzce spjata se zvýšeným oxidačním stresem. V dnešní době se LA rutinně indikuje jako doplněk stravy u pacientů s diabetem. Terapeutická dávka je nejčastěji 600 mg/den a je prokázáno, že dlouhodobé užívání této terapeutické dávky nemá nežádoucí účinky na organismus^{(46) (73)}.

V současnosti je výzkum zaměřen na možné využití LA v oblasti lékových stentů a v protinádorové terapii.^{(84) (82) (83)}

V době mého studia probíhala ve spolupráci s Kardiologickým oddělením a Oddělením klinické biochemie a diagnostiky (Pardubická krajská nemocnice) studie zaměřená na sledování dynamiky některých diagnostických ukazatelů po provedení PCI ve vztahu k další prognóze pacienta. Především šlo o sledování hladin vysoce senzitivního C-reaktivního proteinu. Bylo by však vhodné stanovit i další potenciálně využitelné ukazatele, jako je např. LA a tím lépe pochopit, co se v organismu odehrává po zavedení stentu. Pacienti z této studie nebyli suplementováni LA, a proto jsme se zaměřili na stanovení endogenních hladin LA.

Kyselina lipoová se ve tkáních vyskytuje ve třech formách: volná, proteinově vázaná vodíkovými vazbami, a především pak vázaná kovalentně k ϵ -aminoskupině

lysinového zbytku ⁽⁶⁶⁾. Hydrolýza z amidových vazeb je možná kyselou či zásaditou hydrolýzou, nicméně poskytuje velmi malou výtěžnost (30-50%) ^{(109) (111) (112)}. Hydrolýza enzymem (subtilisin, alkalasa) zřejmě nedokáže LA uvolnit z vazby na lysinový zbytek ⁽⁹⁴⁾. Předpokládá se, že antioxidační účinky vykazuje jen volná LA a její redukovaná forma, a proto bylo cílem mé předchozí diplomové práce pokusit se vyvinout metodu pro simultánní stanovení obou forem. V námi dostupné literatuře se nepodařilo nalézt žádné studie, ze kterých by bylo možné čerpat ucelené informace, kde by bylo spojení stanovení v plasmě, elektrochemického detektoru a simultánního stanovení LA a DHLA. Z dřívějších měření bylo jasné, že komerčně dostupné standardy DHLA nelze použít, protože standardní roztok DHLA se vždy částečně oxidoval. Navíc před elucí DHLA docházelo k nevysvětlitelnému pádu základní linie. Z tohoto důvodu byly standardní roztoky DHLA připravovány přímo v naší laboratoři. Byl optimalizován postup redukce a určena vhodná doba inkubace, optimální koncentrace a poměr redukčního činidla tetrahydridoboritanu sodného a LA. Stabilita DHLA byla zjišťována za laboratorní teploty, při -20 a -80° C. Při laboratorní teplotě byla DHLA relativně stabilní i po půl hodině, poté její hladina výrazně klesala. DHLA je zřejmě oxidována složkami silně oxidačního charakteru, které jsou přítomny v plasmě, a proto jsme se dále soustředili jen na stanovení volné frakce oxidované LA ⁽⁴⁾.

Existuje mnoho studií, které se zabývaly stanovením exogenních hladin LA po suplementaci, ale informace o endogenních hladinách jsou stále rozporuplné. Našli jsme pouze tři kolektivy autorů, kteří se zabývali stanovením endogenních hladin v lidské plasmě bez suplementace. Teichert a kol. ⁽⁹⁴⁾ v roce 1992 ve své studii uvedli, že referenční interval LA se pohybuje u zdravých nesuplementovaných jedinců v rozmezí 4,8–121 nmol/l. Výsledky studie z roku 2002 stejného autorského kolektivu ukazují, že endogenní koncentrace LA se pohybují pouze okolo 4,85 nmol/l a zároveň připouštějí, že hladiny mohou být i nižší, řádově v pmol/l ⁽⁹⁵⁾. Na druhé straně Khan a kol. ⁽⁹⁶⁾ ve své práci publikují průměrné koncentrace 169,7 nmol/l. Montera a kol. ⁽⁹⁷⁾ ve své studii tvrdí, že endogenní hladiny LA u nesuplementovaných pacientů jsou prakticky nedetekovatelné. Jiné zmínky o endogenních koncentracích LA jsme v dostupné literatuře nenašli.

Domnívali jsme se, že se LA v plasmě bude vyskytovat ve stejné formě jako ve tkáních, a tedy hladina její volné formy bude nízká. Proto jsme optimalizovali chromatografické podmínky a experimentální parametry. Zajistili jsme maximální citlivost detektoru, minimalizovali ředění vzorku a modifikovali extrakční proces.

Optimalizace chromatografických podmínek

Kyselina lipoová byla separována na koloně s vázanou reverzní fází (C18). Eluce byla isokratická, mobilní fází byla směs acetonitrilu a dihydrogenfosforečnanu sodného. Byly testovány různé mobilní fáze (různé poměry pufru a acetonitrilu, přídavek methanolu). Nejlepší separace LA od interferujících látek v relativně krátkém čase bylo dosaženo s mobilní fází acetonitril – 20 mmol/l NaH₂PO₄ (38:62 v/v). Retenční vlastnosti LA byly studovány v závislosti na pH mobilní fáze v rozmezí 2 - 5. K úpravě pH byla použita 85% kyselina trihydrogenfosforečná. Optimální pH bylo 2,8. Bylo zjištěno, že při pH nižším než 2,7 nedošlo k dostatečné separaci LA od interferujících látek. Použitá kritéria byla rozlišení, citlivost, stabilita základní linie a rychlost analýzy.

Rychlost průtoku mobilní fáze byla testována v rozmezí 1-2 ml/min. K dobrému rozlišení došlo při konstantním průtoku 1 ml/min. Při vyšších rychlostech docházelo ke zkrácení retenčních časů, které vedlo ke špatné separaci od interferujících látek a ke snížení odezvy.

Kyselina lipoová byla po HPLC separaci detekována elektrochemickým detektorem Coulochem III, vybaveným duální analytickou celou (Model 5010) a ochrannou celou (Model 520). Pro nastavení optimálních detekčních podmínek elektrochemického systému byl sestrojen hydrodynamický voltamogram LA (závislost generovaného proudu na vkládaném napětí v rozmezí 500 – 950 mV). Analýza byla provedena nástřikem 10 µl standardního roztoku LA (1 µmol/l) a měřením proudu, který je generován při oxidaci LA na elektrodě. Nejvyšší odezva byla zaznamenána při vloženém napětí o velikosti 590 mV. Citlivost 20 nA byla maximální možná hodnota, při které bylo ještě možné za těchto podmínek ustálit základní linii.

Příprava vzorku

Při přípravě vzorku je zapotřebí použít vhodné precipitační činidlo k odstranění proteinů. K tomuto účelu se nejčastěji využívají roztoky kyselin nebo organická rozpouštědla. Khan a kol. použili k deproteinaci ACN a Teichert a kol. 0,2mol/l kyselinu trichloroctovou ⁽¹²⁷⁾ ⁽¹²⁴⁾. Bylo testováno několik deproteinačních činidel: kyselina chlorovodíková (2 mol/l), kyselina 5-sulfosalicylová (10%), acetonitril, methanol, acetonitril s kyselinou chlorovodíkovou a methanol s kyselinou chlorovodíkovou (v různém poměru). Všechny použité kyseliny nebyly pro precipitaci proteinů vhodné, protože výrazně zhoršovaly stabilitu základní linie. Pouze acetonitril

neinterferoval s HPLC analýzou a byl používán jako precipitační činidlo ve všech následujících analýzách.

Jelikož jsou hladiny LA v plasmě velmi nízké, byla dalším krokem při úpravě vzorku extrakce. Extrakcí došlo k odstranění nežádoucích interferujících látek a zakonzentrování LA. Khan a kol. ⁽¹²⁷⁾ použili jako extrakční činidlo dichlormethan a metodu extrakce kapalina-kapalina (LLE). Teichert a kol. ⁽¹²⁴⁾ ⁽⁹⁴⁾ použili metodu SPE a LA z kolonky eluovali methanolem. Vycházeli jsme z dostupné literatury, kombinovali a modifikovali jsme postupy extrakce obou autorů. Nejprve byla testována účinnost LLE extrakce. LLE extrakce za použití dichlormethanu nebyla vhodná, protože dichlormethan obsahoval stabilizátor amylen (2-methyl-2-buten), který výrazně interferoval s HPLC analýzou. Tento stabilizátor měl podobné chromatografické vlastnosti jako LA. Nejprve byl testován dichlormethan určený pro HPLC analýzu s čistotou $\geq 99,9\%$. Kromě toho byl testován i dichlormethan pro IR spektroskopii s podobnou čistotou $> 99,5\%$. Byl vybrán ve spolupráci se zástupcem firmy Sigma-Aldrich, protože měl nejnižší koncentraci amylenů ve skupině těchto rozpouštědel s vysokou čistotou. I přes četnou úpravu chromatografických podmínek nebylo možné interferující stabilizátor oddělit od LA. Gradientovou eluci nebylo možné u tohoto typu detektoru použít. Chromatografický záznam standardu LA (500 nmol/l) a interferujícího amylenů je uveden v Příloze 4. Vlivem tohoto zjištění byla následně testována metoda SPE. Nejprve byla zvolena vhodná SPE kolonka, která by poskytovala nejvyšší výtěžnost LA. Bylo testováno celkem 5 typů SPE kolonek s vázanou stacionární fází (Phe, C8, C18, C18t a CN). Jako nejlepší byla zvolena stacionární fáze s vázaným fenylem. Byly optimalizovány různé objemy, průtok, doba sušení a složení roztoků s cílem maximálně odstranit interferující látky a zároveň minimalizovat ztráty LA. Optimální objem byl 1 ml, rychlost průtoku 3 ml/min, doba sušení 5 minut a methanol poskytl nejlepší eluci LA.

Hlavním úskalím metody byla absence vhodného interního standardu (IS). Vnitřním standardem by měla být látka, která je chemicky podobná stanovované látce, není endogenně přítomna ve vzorku, vykazuje obdobné elektrochemické vlastnosti a je komerčně dostupná. Pro LA je velmi obtížné IS nalézt. Khan a kol. používali naproxen, látku, která je strukturně a chemicky naprosto odlišná od LA, nicméně vykazuje podobné elektrochemické vlastnosti. Naproxen je nesteroidní antiflogistikum používané pro omezení mírné až středně silné bolesti, horečky a zánětů způsobených celou řadou nemocí. V České republice obsahují komerčně dostupné potahované tablety Nalgesin S

(*naproxenum natricum*) léčivou látku naproxen ve formě sodné soli a jsou často lékaři indikováni, existuje tedy riziko, že by plasma pacientů mohla tuto látku obsahovat. U ostatních polárnějších endogenních thiosloučenin (cystein, homocystein, methionin) se s výhodou používá osvědčený vnitřní standard penicilamin. Ten je ovšem velmi polární, a proto nemůže být použit při stanovení LA, neboť za daných chromatografických podmínek se na stacionární fázi prakticky nezadržuje⁽¹⁷⁸⁾. Chemicky podobnou látkou je kaptopril, antihypertenzivum, který je účinnou látkou ve dvou preparátech, Capoten a Tensiomin. Tato skupina léčiv, známé jako ACE inhibitory, se dříve využívala k léčbě hypertenze a srdečního selhání⁽¹⁷⁹⁾. V současné době se již téměř nepoužívají nebo jen ve zvláštních případech. Existuje tedy jen malá pravděpodobnost, že by vzorek plasmy pacientů, trpících kardiovaskulárním onemocněním, obsahovaly tuto látku, a proto by mohl být použit jako IS pro stanovení LA. Navíc při tvorbě hydrodynamického voltamogramu vykazoval podobné elektrochemické vlastnosti⁽⁶⁾. Jedná se o polárnější látku než LA a bohužel nevyhovoval naší metodě, neboť eluoval v krátkém retenčním čase ($3,6 \pm 0,4$ min) v oblasti velkého množství interferujících látek. Nepodařilo se nám z literatury zjistit jiný vhodný IS pro stanovení LA, a proto jsme stejně jako Teichert a kol.⁽⁹⁴⁾ nepoužívali IS.

Jedním z cílů této studie bylo ověřit hladiny volné LA v plasmě u nesuplementovaných zdravých dobrovolníků (n = 40, 17 žen, 23 mužů). Tato studie probíhala ve spolupráci s Transfúzním oddělením (Nemocnice Pardubického kraje). Dobrovolníky byli dárci krve, kteří darovali krev a splňovali podmínky pro zapsání do registru dárců. Každý dobrovolný dárcce krve vyplnil dotazník, ve kterém mimo jiné odpověděli na otázku ohledně suplementace LA. Písemný informovaný souhlas byl získán od všech zúčastněných dárců krve. Kritéria pro zařazení dobrovolníků do studie byla následující: věk (18-65 let), tělesná hmotnost (50 kilogramů a více) a dobrý zdravotní stav. Kritéria pro vyloučení ze studie byla: infekce hepatitidou B nebo C, syfilis, některé tropické nemoci a tuberkulóza v minulosti, těžká alergie, hemofilie, epilepsie, HIV pozitivita, rakovina, těžké psychiatrické, těžké chronické nemoci. Dárci, kteří prodělali chřipku nebo angínu, byli po očkování, chirurgické intervenci nebo po úrazu, museli dodržovat předepsanou dobu regenerace, než mohli darovat krev. Lidé s drogovou závislostí a alkoholicí nemohou být zapsáni do registru dárců. Jednotlivá kritéria jsou podrobně rozepsána v tabulce 6.

Mez detekce a kvantifikace této metody byl 1,85 a 5,18 nmol/l. LOD byl v naší studii nižší než v předchozích dvou studiích (2,4 a 4,9 nmol/l), které se zabývaly

stanovením volné LA u nesuplementovaných jedinců^{(127) (94)}. Nicméně i přesto nebyly hladiny LA u všech 40 dobrovolných dárců detekovatelné. Výsledky naší studie ukazují, že endogenní koncentrace volné LA jsou nižší než 1,85 nmol/l. Tyto výsledky jsou v souladu se závěry předchozích studií, které tvrdí, že hladiny LA jsou menší než 4,9 nmol/l nebo prakticky nedetekovatelné^{(95) (97)}. Naše výsledky jsou v rozporu s jiným autorským kolektivem, který ve své studii tvrdí, že průměrné koncentrace LA jsou 169,7 nmol/l⁽¹²⁷⁾.

Stanovení kyseliny lipoové v plasmě suplementovaných dárců

Výše uvedená metoda je vhodná pro stanovení exogenních hladin LA po suplementaci, které se pohybují řádově v $\mu\text{mol/l}$. Rochette a kol.⁽⁹⁸⁾ uvádějí optimální terapeutickou dávku LA 200 - 1800 mg/den, přičemž koncentrace v plasmě po suplementaci je v rozmezí 15-20 $\mu\text{mol/l}$. Teichert a kol.⁽⁹⁹⁾ podávali skupině 9 zdravých dobrovolníků 600 mg LA po dobu 1 měsíce, LA dosáhla své maximální koncentrace za 30 min a průměrné hladiny LA v plasmě byly $36,19 \pm 10,35 \mu\text{mol/l}$. Chen a kol.⁽¹⁰¹⁾ podali 10 zdravým dobrovolníkům jednorázově 600 mg LA a koncentrace LA dosáhla svého maxima za 65 minut a byla v průměru $16 \pm 4,2 \mu\text{mol/l}$. Moini a kol.⁽⁹⁾ naměřili po jednorázovém podání 200 mg a 600 mg LA hodnoty $3,1 \pm 1,5 \mu\text{mol/l}$ a $13,7 \pm 8,2 \mu\text{mol/l}$. Maximum své koncentrace dosahovala v průměru za půl hodiny.

Tato metoda byla využita k ověření hladin LA v plasmě u suplementovaných dobrovolných dárců krve (n=3, 2 ženy, 1 muž). Dárcům bylo perorálně podáno 500 mg LA v tabletách, odběr krve probíhal vždy jednu hodinu po konzumaci tablet. Naměřené hladiny byly 1,42; 1,92 a 4,73 $\mu\text{mol/l}$. Tyto hodnoty odpovídaly hodnotám v literatuře. Vzorky byly měřeny při nastavení citlivosti detektoru 2 μA . Tato metoda je jednoduchá, rychlá, dostatečně citlivá, poměrně nenáročná na přípravu vzorku a je připravená pro další studie zabývající se podáváním LA pacientům.

Cytotoxicita LA

Řada studií se zabývala antiaterogenními vlastnostmi LA^{(76) (79) (180)}. Bylo prokázáno, že suplementace LA podporuje inhibici lipoperoxidace, snižuje hladinu celkového a LDL cholesterolu, velikost aterosklerotického plátu a množství lipidů v místě aterosklerotického plátu. Dále byly prokázány protizánětlivé účinky LA⁽⁷⁶⁾. Díky těmto prospěšným vlastnostem LA se začalo uvažovat o jejím využití v případě lékových stentů (DES). Hlavním problémem DES je v současnosti vyšší riziko vzniku pozdních trombóz po přerušení antiagregační léčby^{(25) (26)}. Z tohoto důvodu další vývoj v této

oblasti směřuje k vyhledávání nových účinnějších léčiv. Stent potažený LA, která by se postupně uvolňovala, by měl mít příznivé antioxidační a protizánětlivé účinky na okolní tkáň, což by mohlo omezit restenózu či vznik pozdní trombózy. Již v roce 2009 byla provedena první studie na prasatech, kterým byla podávána LA a aplikován DES potažený LA. LA-potažené stenty inhibovaly hyperplasii neointimy v místě stentu prostřednictvím inhibice NF- κ B a proliferace buněk hladké svaloviny cév. Stejný kolektiv autorů pokračoval na výzkumu a v roce 2014 a 2016 publikovali výsledky studií zabývajících se antiproliferativními a antioxidačními vlivy stentů, potaženými sirolimem nebo LA^{(82) (83) (84)}. Výsledky těchto studií poukazují na možné využití LA jako účinné látky DES. V případě jejího využití u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním, by byla LA v přímém kontaktu se složkami krve. V současné době jsme nenašli literaturu, která by nám poskytla informace, v jakém množství a jak dlouho by se LA mohla z DES uvolňovat, aby nedošlo k poškození složek krve, především erytrocytů. S tímto úzce souvisí otázka bezpečnosti a možné cytotoxicity LA.

Jelikož má LA schopnost indukovat buněčnou apoptózu u mnoha typů buněk, včetně erytrocytů, několik studií se zabývalo také testováním jejich účinků na rakovinné buněčné linie. Účinné koncentrace LA u protinádorové terapie, či množství při postupném uvolňování ze stentů, nejsou v současné době zcela nastaveny. Bylo prokázáno, že dlouhodobá expozice vysoké koncentraci LA (do 10 mmol/l) je schopná indukovat apoptózu u buněčných linií jater a hltnu⁽⁷⁰⁾. Nižší koncentrace (100 – 250 μ mol/l) a mnohem kratší čas expozice LA stačily k indukci apoptózy v případě rakovinných buněk tlustého střeva, plicních epitelálních buněk a buněk rakoviny prsu, kde navíc přispívaly v potlačení tvorby a invaze metastáz^{(86) (87)}. V roce 2015 byl v rámci diplomové práce⁽⁵⁰⁾ testován vliv LA na zástavu proliferace a indukci apoptózy u buněčných linií adenokarcinomu prsu (MCF-7 a SK-BR-3) a adenokarcinomu plic (A549). Dále se zkoumal vliv na immortalizované buňky proximálního tubulu ledvin HK-2, které byly zvoleny jako model lidských ledvin. U buněk MFC-7 bylo zaznamenáno snížení proliferace buněk po 48 hodinové kultivaci se 100, 250 a 500 μ mol/l LA. Proliferace buněk SK-BR-3 byla snížena až po 40 hodinové kultivaci s 500 μ mol/l LA. U buněk A549 nebyl zaznamenán vliv LA na snížení proliferace v žádné z testovaných koncentrací ani po 72 hodinové kultivaci. Koncentrace 250 μ mol/l LA však způsobila po 48 hodinovém působení snížení proliferaci HK-2 buněk. Při kultivaci s koncentrací LA 500 μ mol/l došlo po 24 hodinách k usmrcení těchto buněk. Z těchto výsledků vyplývá, že vysoké koncentrace LA by mohly působit nefrotoxicky⁽⁵⁰⁾. Je patrné, že

v případě protinádorové terapie by se musely podávat vysoké dávky LA, pravděpodobně intravenózně, aby se zvýšila její biologická dostupnost. S tak vysokými koncentracemi terapeutických dávek však úzce souvisí již zmíněná otázka bezpečnosti a toxicity LA.

Z výše uvedených důvodů jsme se pokusili určit cytotoxicitu LA a zjistit, jaké koncentrace LA působí negativně či letálně na erytrocyty. Byl sledován vliv různých koncentrací LA na počet a viabilitu erytrocytů. Ke stanovení viability buněk byla použita metoda vylučování trypanové modři. Tato metoda je často využívána v praxi ve spojitosti s počítáním erytrocytů. Tato metoda je poměrně jednoduchá, a především nenáročná na přístrojové vybavení. Nejprve byl testován vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na viabilitu a počet erytrocytů po 24 a 48 hodinové inkubaci. Použité koncentrace LA byly 1, 5 a 10 $\mu\text{mol/l}$. Ani po 48 hodinové inkubaci nezpůsobila LA v žádné z testovaných koncentrací statisticky významný rozdíl v počtu a ve viabilitě erytrocytů v porovnání s kontrolou. Byl také testován vliv vysokých koncentrací LA - 50, 100 a 250 $\mu\text{mol/l}$ na viabilitu a počet erytrocytů po 24 a 48 hodinové inkubaci. Ani po 48 hodinové inkubaci nezpůsobila LA v žádné z testovaných koncentrací statisticky významný rozdíl ve viabilitě erytrocytů v porovnání s kontrolou. Statisticky významný vliv vysokých koncentrací LA na změnu počtu erytrocytů byl zaznamenán již po 24 hodinové inkubaci. Koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$ způsobila úbytek buněk, který byl na hranici statistické významnosti. Koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$ a 250 $\mu\text{mol/l}$ způsobily statisticky významný pokles počtu buněk oproti kontrole. Po 48 hodinové inkubaci byl zaznamenán statisticky významný úbytek v počtu erytrocytů již při koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$. Námi testované nízké koncentrace LA přibližně odpovídají literárně podloženým hodnotám LA, které byly stanoveny v krevní plasmě po perorální suplementaci 200 – 600 mg racemické směsi LA, která se běžně užívá při léčbě diabetických pacientů^{(98) (101) (9)}. Nejvyšší testovaná koncentrace LA byla 250 $\mu\text{mol/l}$. Vyšší koncentrace zásobních roztoků nebylo možné připravit kvůli špatné rozpustnosti LA, která se sice v použitém rozpouštědle DMSO rozpustila, ale poté v Ringerově roztoku zpětně vykrytalizovala. Rozpustnost LA by se dala zvýšit jejím rozpuštěním v ethanolu, ale bohužel ethanol má na erytrocyty toxický vliv a snižoval by jejich viabilitu⁽¹⁸¹⁾.

Výsledky našeho experimentu korespondují se studií Bhavsara a kol.⁽⁹³⁾ V této studii se zaměřili na sledování jiných parametrů. Sledovali zvyšování hladin Ca^{2+} iontů v cytosolu, zvyšování ceramidu, pokles ATP a změnu velikosti erytrocytů vlivem

působení LA o různých koncentracích. Většinu těchto parametrů stanovovali na základě průtokové cytometrie. Statisticky významné zmenšení erytrocytů nastalo po 48 hodinové inkubaci již při koncentraci LA 20 $\mu\text{mol/l}$, hladiny ceramidu vzrostly po působení 50 $\mu\text{mol/l}$ LA a k poklesu buněčného ATP došlo po inkubaci se 75 $\mu\text{mol/l}$ LA.

Z našich výsledků vyplývá, že příliš vysoké koncentrace LA uvolňující se z DES, by mohly mít negativní vliv na erytrocyty a způsobit anémii. V budoucnu bude zřejmě nutné zjistit optimální koncentraci LA a dobu, po kterou se bude uvolňovat ze stentu. Bude nutné rovněž zvážit aplikaci DES s LA u pacientů s hematologickým onemocněním, při kterém dochází k výraznému snížení hladiny erytrocytů. Na základě hladin LA v krevní plasmě po suplementaci a stanovené cytotoxické koncentraci LA usuzujeme, že dávky LA, které se terapeuticky podávají diabetikům, by neměly negativně působit na viabilitu ani počet erytrocytů.

V další části této práce jsme se zaměřili na aminothioly, tedy homocystein, cystein, methionin a cysteinyl-glycin. Zájem o sledování této skupiny látek se v posledních letech neustále zvyšuje, neboť byla pozorována souvislost mezi jejich hladinami a řadou onemocnění, jako je např. Alzheimerova choroba či různá kardiovaskulární onemocnění^{(137) (136) (138)}. Některé aminothioly jsou součástí antioxidantního ochranného systému, účastní se udržování intra- a extracelulární homeostázy organismu, podílí se na odstraňování škodlivin z organismu a v neposlední řadě tvoří prekurzory a meziprodukty řady metabolických cest.

Celkový homocystein byl na základě mnoha studií vyhodnocen jako rizikový faktor řady onemocnění. Vlastní mechanismus proaterogenního působení homocysteinu stále není znám. Existuje několik možných mechanismů, kterými homocystein může působit na cévy a tím podpořit rozvoj KVO, např. vlivem nežádoucích účinků na endotel cév a buňky hladké svaloviny s následnými změnami v arteriální struktuře a její funkci. Dochází k zvýšené proliferaci buněk hladké svaloviny cév, endoteliální dysfunkci, oxidačnímu poškození, zvýšení syntézy kolagenu a zhoršení elasticity arteriální stěny. Bylo také prokázáno, že hyperhomocysteinemie je spojena s vyšším rizikem vzniku venózní trombózy^{(1) (131) (152) (161)}. Mnoho studií tedy považuje zvýšenou hladinu celkového homocysteinu za rizikový faktor KVO, ale některé studie toto nepotvrzují. Rovněž zůstává otázkou jeho vliv jako indikátoru odpovědi terapeutické intervence. V současné době se řeší otázka, zda je možné homocystein vnímat nejen jako rizikový faktor KVO, ale také především jako biomarker. Výsledky některých

studií jsou rozporuplné také v otázce vztahu homocysteinu a stupně stenózy v koronárních tepnách ^{(167) (182) (158)}.

Cystein je schopen díky své thiolové skupině autooxidace za současné tvorby ROS. Reaguje s radikálem oxidu dusnatého za vzniku nitrosocysteinu a tím vyčerpává jeho zásobu. Tento fakt poukazuje na možnost jeho proaterogenního účinku. Cystein, strukturně podobný homocysteinu, je dle řady autorů rizikovým faktorem onemocnění koronárních artérií, ale některé studie tvrdí opak ^{(183) (184) (185)}. Na druhou stranu je cystein významným antioxidantem a silným vasodilatátorem, spolu s glutamátem a glycinem tvoří nejznámější tripeptid GSH. GSH je hlavním antioxidantem, který je degradován na cysteinyl-glycin, velmi reaktivní thiol, který generuje ROS ^{(154) (160)}.

Tato studie probíhala ve spolupráci s Kardiologickým oddělením a Oddělením klinické biochemie a diagnostiky (Pardubická krajská nemocnice). Do výzkumu bylo zahrnuto celkem 143 pacientů. Pacienti byli rozděleni do tří skupin. Do skupiny A se zařadili pacienti s podezřením na CAD a byli rozděleni dle rozdílů koronarografického nálezu. Ve skupině B byli pacienti s prokázaným onemocněním CAD a byli rozděleni dle stupně závažnosti onemocnění. Do skupiny C se zařadili pacienti ze skupiny B, u kterých bylo nutné provést PCI a byl sledován okamžitý vliv PCI na hladiny sledovaných aminothioliů. Vzor karty pacientů je uveden v Příloze 5.

Žáková ⁽¹⁴⁶⁾ se ve své disertační práci zabývala stanovením aminothioliů u pacientů s CAD (studie A). Tito pacienti měli podezření na CAD, byla zjištěna přítomnost rizikových faktorů CAD a trpěli typickými či atypickými symptomy CAD. Pacienti s jinými závažnými onemocněními, pacienti s již dříve prodělanou PCI či prodělaným koronárním bypassem, byli z této skupiny vyloučeni. Ke zjištění stupně koronární restenózy byla využita metoda koronární angiografie a na základě nálezu byli pacienti rozděleni do dvou skupin, s negativními a pozitivními nálezy. Negativní nález byl definován nepřítomností stenózy v koronárních artériích. Pozitivní nález byl charakterizován jako více než 70% stenóza koronární artérie nebo více jak 50% stenóza *arteria coronaria sinistra*. Třicet osm pacientů mělo angiografický negativní nález, 37 pacientů mělo pozitivní angiografický nález, ale tyto pacienti neměli akutní formu CAD a byli léčeni konzervativně. Nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly v prevalenci diabetu, pre-diabetu, hypertenzi a onemocnění ledvin mezi sledovanými skupinami. Hypertenze byla diagnostikována u nediabetiků jako systolický tlak větší než 140 mm Hg nebo diastolický tlak větší než 90 mm Hg, u diabetiků větší než 130/80 mm Hg. Počet pacientů, kteří užívali hypolipidemické léky a počet bývalých kuřáků byl rovněž

srovnatelný, avšak rozdíl v počtu kuřáků byl statisticky významný. Pacienti s pozitivními nálezy měli signifikantně nižší hladiny HDL-C ($p = 0,031$) a albuminu ($p = 0,026$) ve srovnání s pacienty s negativními nálezy. Navíc měli signifikantně vyšší hladiny TAG ($p = 0,013$) a vyšší IA ($p = 0,023$). Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v hladinách aminothiolů mezi pacienty s pozitivním a negativním nálezem ⁽¹⁴⁶⁾. Ze studie tedy vyplývá, že zvýšená hladina homocysteinu není pravděpodobně citlivým ukazatelem stenózy v koronárních artériích. Charakteristika pacientů a výsledky studie A jsou uvedeny v Příloze 6.

Hlavním cílem bylo ověřit význam homocysteinu jako biomarkeru v klinické praxi a dalším cílem bylo získat obecný přehled o celkovém metabolismu methioninu u pacientů s CAD a ověřit okamžitý vliv PCI na hladiny methioninu a jeho metabolitů.

Šedesát osm pacientů, u kterých bylo angiograficky prokázáno CAD, byli zařazeni do studie B ($n = 68$, 41 mužů a 27 žen). Tento soubor pacientů byl rozdělen do tří skupin. Pacienti s akutní formou CAD (infarkt myokardu s nebo bez ST elevace, nestabilní *angina pectoris*), s chronickou formou CAD (stabilní *angina pectoris*) a pacienti s progresivním průběhem CAD nebo pacienti, kteří byli hospitalizováni k dokončení revaskularizace po akutním CAD. Dvacet devět pacientů mělo akutní formu CAD, 22 chronickou formu a 17 přišlo k dokončení RV. Nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl v prevalenci diabetu, pre-diabetu a onemocnění ledvin mezi sledovanými skupinami (tabulka 15). Rovněž nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v počtu kuřáků a hypertoniků. Byly zjištěny signifikantní rozdíly v hladinách albuminu, celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu a stupně indexu aterogenity ve sledovaných skupinách. Ve studii B byly zjištěny statisticky významně zvýšené hladiny homocysteinu u pacientů s akutní formou CAD ve srovnání s pacienty s chronickou formou CAD. Dle našeho názoru, různý počet kuřáků ve skupině nebyl důvodem signifikantního zvýšení hladiny homocysteinu, neboť rozdíl v počtu kuřáků byl téměř na hranici významnosti ($p = 0,0433$) ve srovnání s výrazným rozdílem v hladinách homocysteinu ($p = 0,0003$). Navíc pacienti s akutním CAD měli vyšší hladiny homocysteinu než pacienti, kteří přišli k dokončení RV po nedávném prodělání akutního CAD. Tito pacienti, kteří byli nedávno akutně léčeni, mají vyšší hladiny homocysteinu ve srovnání s pacienty s chronickým CAD, i když tyto rozdíly jsou na hranici významnosti. Dřívější intervence není důvodem zvýšení hladiny homocysteinu, protože pacienti se vraceli za 1-7 týdnů po první PCI a homocystein má v plasmě krátký biologický poločas (3-4 hodiny). U pacientů, kteří se vrátili k dokončení RV, došlo

k statisticky významnému poklesu hladin cysteinu, cysteinyl-glycinu a methioninu před druhou intervencí ve srovnání s pacienty s akutní a chronickou formou CAD. Tento stav je pravděpodobně spojen se zvýšeným oxidačním stresem, kdy je preferována transsulfurační dráha, která zvyšuje spotřebu cysteinu. Zdá se tedy, že cystein hraje důležitější úlohu v organismu jako antioxidant než jako rizikový faktor u pacientů s CAD. Naše zjištění jsou v souladu s některými studiemi, které tvrdí, že hladina homocysteinu v plasmě je spíše spojena se zvýšeným rizikem CAD než hladiny cysteinu. Charakteristika pacientů a vyhodnocení výsledků je shrnuto v tabulkách 9,17 a 18.

Do studie C byli vybráni pacienti ze skupiny B (n=44, 35 mužů a 9 žen), u kterých následovala po angiografii PCI. Vzorky krve se odebírali před zákrokem, 24 a 48 hodin po PCI. Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v hladinách homocysteinu a cysteinu před, 24 a 48 hodin po zákroku. Hladiny methioninu a cysteinyl-glycinu byly signifikantně vyšší po 24 a 48 hodinách po PCI ve srovnání s hladinami před zákrokem (tabulka 19). V současné době se dokončuje sběr kontrolních vzorků pacientů půl roku po prodělaném zákroku PCI.

Pacienti všech skupin užívali aspirin, antagonisty vápníku, betablokátory, inhibitory ACE, ACE I (inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu), nitráty a perorální antidiabetika. Informovaný souhlas byl získán od všech pacientů. Studie byla schválena etickou komisí Krajské nemocnice Pardubice z 13. prosince 2013 (Příloha 7).

Hladiny celkového homocysteinu, cysteinu, methioninu a cysteinyl-glycinu byly stanoveny metodou HPLC s coulometrickou detekcí. Aminothioly byly separovány na koloně s vázanou reverzní fází (C18). Eluce byla isokratická, mobilní fáze byla směs 5% acetonitrilu v roztoku 20mmol/l dihydrogenfosforečnanu sodného a 10mmol/l oktan-1-sulfonanu. K úpravě pH (2,82) byla použita 85% kyselina trihydrogenfosforečná. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 ml/min a kolona byla temperována při 25 °C. Po HPLC separaci byly aminothioly detekovány elektrochemickým detektorem Coulochem II, vybavený duální analytickou celou (Model 5010) a ochrannou celou (Model 5020). Nastavení detektoru bylo následující: $E_G = +850$ mV, $E_1 = +450$ mV, citlivost 10 μ A, $E_2 = +750$ mV, citlivost 100 μ A; 0,1-7 min, 5 μ A; 7,1-40 min, upraveno dle ⁽¹⁴⁶⁾.

Srovnání s literaturou

Sarwar a kol. ⁽¹⁶⁷⁾ tvrdí, že signifikantní vztah mezi hladinami homocysteinu a subklinickou fází aterosklerózy ukazuje na potenciální využití homocysteinu jako ukazatele v brzké asymptomatické fázi rozvoje tohoto onemocnění. Tato studie je

v rozporu s autory Lin a kol. ⁽¹⁶⁸⁾, kteří tvrdí, že homocystein není významným ukazatelem aterosklerotické zátěže a koronární stenózy. Gurel a kol. ⁽¹⁶⁹⁾ dokonce ve své studii uvádějí, že homocystein není užitečným parametrem pro časnou predikci subklinické aterosklerózy. Situace není vyjasněná ani u pacientů se symptomatickou aterosklerózou. Většina literatury prokazuje na statisticky významné rozdíly v hladinách celkového homocysteinu v plasmě pacientů s pozitivními a negativními koronarografickými nálezy ^{(182) (158) (159)}, avšak některé studie tvrdí, že tento rozdíl byl nevýznamný ⁽¹⁵⁸⁾. Výsledky studie A ⁽¹⁴⁶⁾ se shodují s výsledky autorů Donnor a kol. ⁽¹⁷⁰⁾, kteří tvrdí, že rozdíl v hladinách homocysteinu mezi angiograficky odlišnými skupinami je nevýznamný. Tyto kontroverzní závěry mohou být částečně vysvětleny tím, že se autoři zabývali porovnáváním pacientů s různými rizikovými faktory. Většina autorů uvádí statisticky významné rozdíly ve věku, počtu kuřáků, diabetu, hypertonických pacientů nebo hladinách lipidů ^{(158) (159)}.

Zvýšená hladina homocysteinu může být spojena se zvýšenou nestabilitou CAD, tedy s různým stupněm závažnosti tohoto onemocnění. V minulosti bylo publikováno mnoho informací týkajících se homocysteinu, ale tímto vztahem se zabývalo jen několik studií v posledních deseti letech. Jejich závěry jsou poněkud nejasné. Stupeň závažnosti onemocnění bylo zkoumáno různými metodami. Navíc jsme v dostupné literatuře nenašli informace týkající se pacientů, kteří byli hospitalizováni po dokončení RV. Naše zjištění jsou v souladu s kolektivem autorů Basati a kol. ⁽¹⁸⁶⁾, kteří ve své studii zjistili statisticky významně vyšší hladiny homocysteinu u pacientů s nestabilní *angina pectoris* ve srovnání se stabilní formou a kontrolní skupinou. Podobně Liu a kol. ⁽¹⁸⁷⁾ porovnávali pacienty s akutním infarktem myokardu, pacienty se stabilní a nestabilní *angina pectoris* a pacienty s nekoronární srdeční chorobou. Poukázali na rostoucí prevalenci hyperhomocysteinemie s rostoucí závažností onemocnění. Na druhou stranu Vizzarda a kol. ⁽¹⁸⁸⁾ dospěli k závěru, že hladina homocysteinu nekoreluje se závažností CAD ve skupině pacientů s nestabilní angínou.

Další možností je určení stupně závažnosti onemocnění podle počtu postižených koronárních artérií. Výsledky, které publikovali Chai a kol. ⁽¹⁸⁹⁾ podporují hypotézu, že homocystein je nezávislým prediktorem u pacientů s vícečetným postižením koronárních artérií. Podobně Oudi a kol. ⁽¹⁹⁰⁾ a Shenoy a kol. ⁽¹⁹¹⁾ dospěli k závěru, že zvýšené hladiny celkového homocysteinu korelují s počtem postižených artérií. Naopak, někteří autoři tvrdí, že neexistuje žádná korelace mezi hladinou homocysteinu a rozsahem CAD na základě počtu stenotických koronárních artérií ⁽¹⁸²⁾.

Jiní autoři našli korelaci mezi hladinou homocysteinu v plasmě a indexem perfúze myokardu u pacientů se scintigraficky prokázaným CAD, nebo zjistili souvislost mezi zvýšenými hladinami homocysteinu a koronárními angiografickými nálezy, délkou sledování, srdeční smrtí a nefatálním infarktem myokardu ⁽¹⁹²⁾⁽¹⁹³⁾.

Yurtas a kol. ⁽¹⁹⁴⁾ ve své studii poukazují na významnou patofyziologickou souvislost mezi zvýšenými hladinami homocysteinu, stupněm ischemických nálezů a závažností pomalého průtoku u pacientů s pomalým koronárním tokem.

Wu a kol. ⁽¹⁹⁵⁾ tvrdí, že vysoké hladiny homocysteinu mohou způsobit snížení aktivitu thioredoxinu, což úzce souvisí s rozsahem a závažností CAD.

Koubaa a kol. ⁽¹⁹⁶⁾ předpokládají, že vztah mezi vysokou hladinou homocysteinu a stupněm závažností CAD může být částečně vysvětlen sníženými hodnotami thiolaktonasové aktivity u těchto pacientů.

Naše výsledky podporují hypotézu, že homocystein nelze využít pro včasnou diagnostiku stenózy v koronárních arteriích, ale zdá se, že by mohl být dobrým biomarkerem závažnosti již prokázaného CAD.

7 Závěr

První část práce byla zaměřena na ověření endogenních hladin kyseliny lipové v plasmě nesuplementovaných dobrovolných dárců krve. Byly optimalizovány chromatografické podmínky a příprava vzorku. Byla nastavena maximální citlivost detektoru, minimalizováno ředění vzorku a modifikován proces extrakce na pevné fázi. Mez detekce a kvantifikace této metody byl 1,85 a 5,18 nmol/l, tedy nižší než v předchozích dvou studiích (2,4 a 4,9 nmol/l), které se zabývaly taktéž stanovením kyseliny lipové u nesuplementovaných jedinců. Nicméně i přesto nebyly hladiny kyseliny lipové u všech 40 dobrovolných dárců detekovatelné. Výsledky naší studie naznačují, že endogenní koncentrace kyseliny lipové jsou nižší než 1,85 nmol/l. Tato metoda byla využita k ověření hladin kyseliny lipové v plasmě u suplementovaných dobrovolných dárců krve a je připravená pro další studie zabývající se podáváním LA pacientům.

V druhé části práce byla zkoumána cytotoxicita kyseliny lipové na erytrocyty. Byl zkoumán vliv nízkých (1, 5, 10 $\mu\text{mol/l}$) a vysokých (50, 100, 250 $\mu\text{mol/l}$) koncentrací kyseliny lipové na viabilitu a počet erytrocytů po 24 a 48 hodinové inkubaci. Celý rozsah námi testovaných koncentrací nezpůsobil statisticky významné změny ve viabilitě erytrocytů ani po 48 hodinové inkubaci. Rovněž nízké koncentrace nezpůsobily statisticky významné změny v počtu erytrocytů ani po 48 hodinové inkubaci. Avšak na počet erytrocytů měly vysoké koncentrace statisticky významný vliv již po 24 hodinové inkubaci.

V třetí části práce byly stanoveny hladiny homocysteinu, cysteinu, methioninu a cysteinyl-glycinu v plasmě pacientů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí. Studie se účastnilo 68 pacientů s prokázaným onemocněním koronárních artérií, kteří byli rozděleni do tří skupin podle závažnosti onemocnění. Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v prevalenci diabetu, pre-diabetu a onemocnění ledvin mezi sledovanými skupinami. Rovněž nebyl nalezen statistický významný rozdíl v počtu kuřáků a hypertoniků. Byly zjištěny signifikantní rozdíly v hladinách albuminu, celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu a stupně indexu aterogenity ve sledovaných skupinách pacientů. Byly zjištěny statisticky významně zvýšené hladiny homocysteinu u pacientů s akutní formou ve srovnání s pacienty s chronickou formou tohoto onemocnění. Naše výsledky podporují hypotézu, že homocystein nelze využít pro včasnou diagnostiku stenózy v koronárních arteriích,

ale zdá se, že by mohl být dobrým biomarkerem závažnosti již prokázaného onemocnění koronárních artérií. Zvýšené hladiny homocysteinu korelují s nestabilitou onemocnění a potřebou léčby. U pacientů, kteří se vrátili k dokončení revaskularizace, došlo k statisticky významnému poklesu hladin cysteinu, cysteinyl-glycinu a methioninu před druhou intervencí ve srovnání s pacienty s akutní a chronickou formou onemocnění. Tento stav je pravděpodobně spojen se zvýšeným oxidačním stresem, kdy je preferována transsulfurační dráha, která zvyšuje spotřebu cysteinu. Zdá se tedy, že cystein hraje důležitější úlohu v organismu jako antioxidant než jako rizikový faktor u pacientů s onemocněním koronárních artérií. Z této skupiny pacientů bylo vybráno 44 pacientů, u kterých následovala po angiografii perkutánní koronární intervence. Vzorky krve se odebíraly ve třech časových bodech, před zákrokem, 24 a 48 hodin po intervenci. Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v hladinách homocysteinu a cysteinu před, 24 a 48 hodin po zákroku. Hladiny methioninu a cysteinyl-glycinu byly signifikantně vyšší po 24 a 48 hodinách po intervenci ve srovnání s hladinami před zákrokem.

8 Přílohy

Příloha 1 Dotazník a písemný informovaný souhlas dobrovolných dárců krve.

Příloha 2 Písemný informovaný souhlas pacientů.

Příloha 3 Dotazník pacienta, výpis z chorobopisu.

Příloha 4 Chromatografický záznam standardu LA (500 nmol/l) a interferujícího amylenu.

Příloha 5 Vzor karty pacientů.

Příloha 6 Charakteristika pacientů a výsledky studie A.

Příloha 7 Souhlas etické komise.

Příloha 1 Dotazník a písemný souhlas dobrovolných dárců krve.

INFORMACE PRO ÚČASTNÍKY STUDIE

Vážená paní, vážený pane,

V současné době probíhá ve spolupráci s Univerzitou Pardubice studie „Dynamika zánětu po implantaci koronárního stentu“. Tato výzkumná práce je zaměřena na sledování ukazatelů zánětu a oxidačního stresu v krvi pacientů se zúžením koronárních tepen po implantaci stentu. Pro vyhodnocení je třeba jednotlivé parametry porovnat s hodnotami u skupiny zdravých osob.

Zátěž vyplývající ze zařazení do studie spočívá v jednom odběru 25 ml krve a v odpovědi na několik níže uvedených otázek. Další podrobnosti a informace Vám budou na požádání sděleny.

Vaše účast na této studii je zcela dobrovolná.

Žena - muž: Odběrové číslo:

Věk:

Kouříte nyní cigarety (kolik)?.....

Výška:..... Váha:

Neléčíte se pro onemocnění štítné žlázy?.....

Trpíte nějakým onemocněním?

PÍSEMNÉ PROHLÁŠENÍ O SOUHLASU S ÚČASTÍ VE STUDII

Byl(a) jsem seznámen(a) s povahou studie a souhlasím se zařazením do tohoto výzkumného projektu.

Dále souhlasím s tím, že údaje o mé osobě, které byly získány během studie, budou předávány třetím osobám pouze v anonymní formě, tzn. bez uvedení mého jména.

V Pardubicích dne Podpis (účastníka studie):

Se získanými osobními údaji bude nakládáno jako s ochraňovanými skutečnostmi a tyto údaje budou využity pouze pro potřeby studie. Řešitel odpovídá za to, že s krví bude nakládáno dle pravidel platných pro biologický materiál.

V Pardubicích dne Podpis (řešitele studie):

Příloha 2 Písemný informovaný souhlas pacienta.

INFORMACE PRO ÚČASTNÍKY STUDIE

Vážená paní, vážený pane,

v současné době probíhá na našem pracovišti ve spolupráci s Univerzitou Pardubice výzkumná práce (studie) s názvem „Zánětlivá reakce po implantaci koronárních stentů“.

Tato výzkumná práce je zaměřena na sledování ukazatelů zánětu a oxidačního stresu v krvi pacientů po perkutánní koronární intervenci (PCI) a vyhodnocení jejich významu v závislosti na typu použitého stentu.

V současné době je standardní léčbou ischemické choroby srdeční tzv. perkutánní koronární intervence (PCI), která spočívá v roztažení zúženého místa věnčité tepny speciálním balónkem a jeho následné vyztužení stentem. Stentů je několik typů, nejčastěji jsou používány stenty kovové, jejichž struktura je potažena léčivou látkou, která se postupně uvolňuje a brání následnému opětovnému zužování věnčité tepny v reakci na cizí materiál stentu. Tyto stenty označujeme jako tzv. „lékové stenty“. Nověji jsou dostupné stenty, které jako kostru místo kovu využívají organickou látku (kyselinu polymléčnou), která se v organismu postupně rozkládá, až přibližně po dvou letech z organismu zcela zmizí. Výhodou tohoto typu stentu je možnost navrácení věnčité tepny do stavu blízkého stavu původnímu, tedy se zachovanou schopností reagovat na přirozené podněty k rozšíření či zúžení tepny. Nevýhodou je pak nemožnost zavést tyto stenty do všech typů zúžení, tj. nelze je využít ve všech situacích. Tyto stenty nazýváme „absorbovatelné stenty“ a jsou rovněž potaženy výše uvedeným léčivem zabráňujícím opětovnému zúžení tepny.

V předkládané práci budeme srovnávat laboratorní parametry zánětlivé odpovědi na zavedení těchto dvou typů stentů. Předchozí práce prokázaly, že čím vyšší je zánětlivá reakce po výkonu na věnčité tepně, tím vyšší je riziko pozdějších komplikací ve smyslu opětovného zužování věnčité tepny či srdečního infarktu.

K účasti v této výzkumné práci jste byl/a osloven/a vzhledem k tomu, že Váš zdravotní stav vyžaduje ošetření zúžení věnčité tepny stentem a zároveň jde o zúžení tepny, které je vhodné k zavedení obou typů stentů.

V případě, že se rozhodnete pro účast v této výzkumné práci, bude na základě náhodného výběru (tzv. randomizace) zvolen k ošetření zúžení věnčité tepny jeden z výše uvedených typů stentů. Rizika spojená s účastí ve studii se neliší od běžných rizik v souvislosti s PCI a zavedením stentu. Tato rizika jsou podrobně popsána v Informovaném souhlase s provedením koronarografie/PCI, který jste před výkonem podepsal/a.

Zátěž vyplývající ze zařazení do studie spočívá ve třech odběrech 19 ml krve během stávající hospitalizace a ve vyplnění dotazníku, dále v klinické kontrole a odběru krve po jednom roce. Další podrobnosti a informace Vám budou na požádání sděleny.

Vaše účast na této studii je zcela dobrovolná.

Jméno:

Pořadové číslo:

PÍSEMNÉ PROHLÁŠENÍ O SOUHLASU S ÚČASTÍ VE STUDII

Byl(a) jsem seznámen(a) s povahou studie a souhlasím se zařazením do tohoto výzkumného projektu.

Dále souhlasím s tím, že údaje o mé osobě, které byly získány během studie, budou předávány třetím osobám pouze v anonymní formě, tzn. bez uvedení mého jména a identifikačních údajů.

V Pardubicích dne

Podpis (účastníka studie):

Se získanými osobními údaji bude nakládáno jako s ochraňovanými skutečnostmi a tyto údaje budou využity pouze pro potřeby studie a nebudou sdělovány třetím osobám.

V Pardubicích dne

Jméno a podpis (řešitele- studie):

Příloha 3 Dotazník pacienta.

STUDIE „Dynamika hsCRP po PCI pro stabilní anginu pectoris ”

Pořadové číslo:

č. chorobopisu:

1/ **Jméno a příjmení:**

2/ **Pohlaví:** a/ muž b/ žena

rodné číslo:

3/ **Adresa bydliště:**

telefon:

4/ **Datum narození:**

Věk:

5/ **Výška:**

Váha:

BMI:

Obvod pasu:

6/ **Krevní tlak při přijetí:**

7/ **Jaké je vaše nejvyšší dokončené vzdělání?**

a/ základní škola

b/ vyučení bez maturity

c/ vyučení s maturitou

d/ střední škola s maturitou

e/ vysoká škola

8/ **Měl váš otec, bratr či syn projevy anginy pectoris nebo infarkt myokardu ve věku mladším 55 let?**

a/ ano

b/ ne

9/ **Měla vaše matka, sestra či dcera projevy anginy pectoris nebo infarkt myokardu ve věku mladším 65 let?**

a/ ano

b/ ne

10/ **Řekl Vám někdy lékař, že u Vás byla zjištěna cukrovka (diabetes mellitus)?**

a/ ne

b/ ano Pokud ano, jak se léčíte?

a/ jen tabletami

b/ jen insulinem

c/ insulinem i tabletami

d/ jen dietou

11/ **Řekl Vám někdy lékař, že máte zvýšený nebo vysoký krevní tlak?**

a/ ne

b/ ano - kdy to bylo:

12/ **Kouříte nyní cigarety?**

a/ ne

b/ ano

Pokud ano: kouříte pravidelně alespoň 1 cigaretu denně? a/ ano b/ ne

kolik cigaret v průměru vykouříte za den? (uved'te)

v kolika letech jste začal kouřit? (uved'te)

Příloha 3 Dotazník pacienta (2. část).

13/ Pohybujete se často v zakouřeném prostředí? a/ ano b/ ne

14/ Kolik piva, vína a destilátů jste vypil v posledním týdnu před hospitalizací (průměrně pijete týdně)?

Pivo (v litrech, s přesností na 0,5 l):litru

Víno (v litrech, s přesností na 0,2 l):litru

Destiláty (počet malých panáků, tj. 0,02 l)

15/ Byla u vás zjištěna tato onemocnění? Pokud ano, uveďte i ve kterém roce.

a/ angina pectoris od r.

b/ ischemická choroba dolních končetin - stupeň, od r.

c/ cévní mozková příhoda - v r.

d/ infarkt myokardu kdy:

e/ ostatní závažná prodělaná onemocnění

16/ Užíval jste statiny před přijetím?

a/ ne

b/ ano

Pokud ano, uveďte název:

dávku:

jak dlouho je užíváte

16/ Užíval jste během posledního týdne před hospitalizací nějaké léky nebo vitamíny nebo dostal jste nějaké injekce?

a/ ne

b/ ano

Pokud ano, jaké léky to byly?

Název léku a dávka (firemní název, síla)	Dávkování	Způsob podání	Užívání (pravidelně nebo dle potřeby)

Příloha 3 Dotazník pacienta - Výpis z chorobopisu (3. část – vyplňuje lékař).

Vypsat z chorobopisu:

Diagnóza při přijetí:

Medikace při přijetí (v den příjmu)

Název léku a dávka (firemní název, síla)	Dávkování	Způsob podání	

Komplikace průběhu:

Projevy **levostranné srdeční insuficience** dle Killip - Kimballa během prvních 48 hod.:

I II III IV

Arytmie v průběhu hospitalizace :

a/ ne

b/ ano - do 48 hod. od přijetí, jaká a kdy:

po 48 hod. od přijetí, jaká a kdy:

Recidiva ischemie

Úmrtí – příčina, kdy:

Diagnóza při propuštění z nemocnice, průběh hospitalizace:

Echokardiografie:

Ejekční frakce:

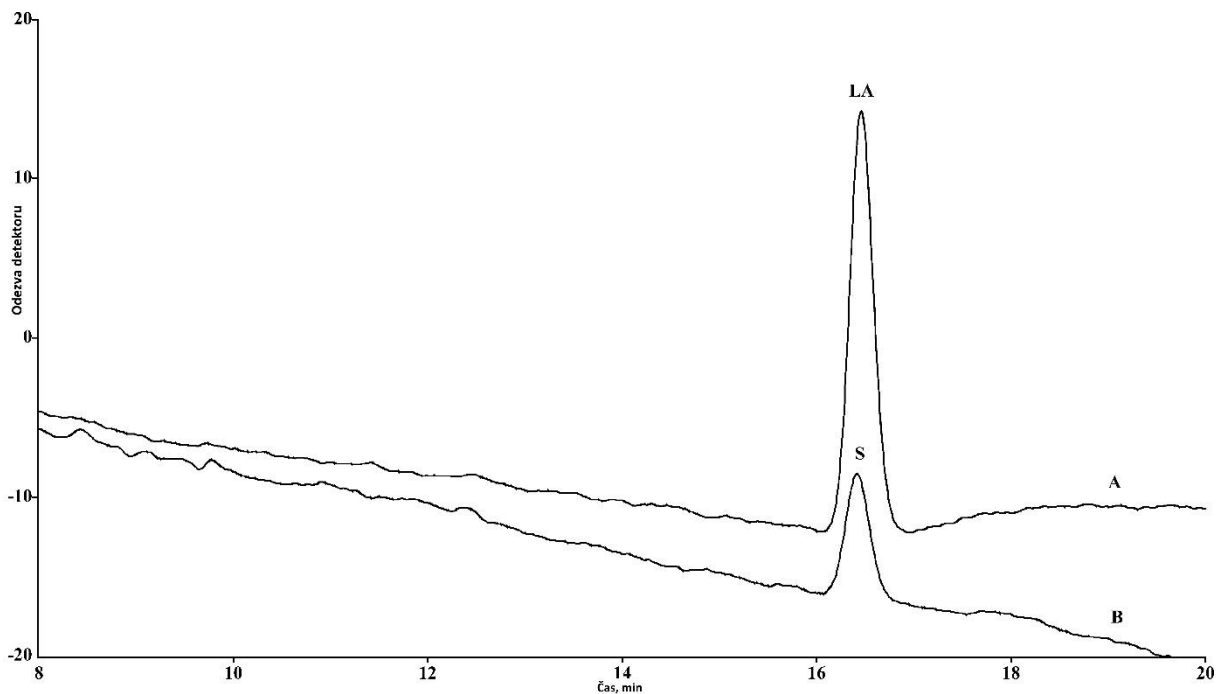
Každý den EKG

Datum propuštění z nemocnice, ev. datum úmrtí:

KO - Počet neutrofilů:

Hemoglobin:

Příloha 4 Chromatografický záznam standardu LA (500 nmol/l) a interferujícího amylenu.



Chromatografický záznam interferujícího stabilizátoru. (A) vodný standard kyseliny lipoové pro demonstraci retenčního času, (B) interferující stabilizátor obsažený v dichlormethanu. Podmínky HPLC analýzy: isokratická eluce (mobilní fáze: 35% ACN v 20mmol/l NaH_2PO_4 , pH 2,8), průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, separace probíhala při 37 °C.

Příloha 5 Vzor karty pacienta.

Pacient číslo:	Pohlaví:	Věk:	BMI:
Základní DG		Další DG	
STENT NOVĚ IMPLANTOVANÝ		STENT v MINULOSTI	
Počet:		Ano x Ne	
Materiál:		Další problematická tepna: Ano x Ne	
Lokalizace: (% restenózy)			
KOMPLIKACE ZÁKROKU		Levostranná insuficience	
Periprocedurální IM:		(během prvních 48 hodin):	
DM – Ano x Ne		Léčba:	
Kouření – Ano x Ne		Bližší údaj:	
Tlak při přijetí-		Léčba pro hypertenzi: Ano x Ne	
PULZ:			
AIM v minulosti: Ano x Ne			
CMP v minulosti: Ano x Ne			
ICHDK v minulosti: Ano x Ne			
Rodinná anamnéza			
Otec, bratr, syn AP nebo AIM pod 55 let:		Matka, sestra, dcera AP nebo AIM pod 65 let:	
Statiny:			
Jiné závažné onemocnění:			
Dlouhodobý vývoj:			

IM infarkt myokardu; DM *diabetes mellitus*; AIM akutní infarkt myokardu; CMP cévní mozková příhoda; ICHDK ischemická choroba dolních končetin; AP *angina pectoris*

Příloha 6 Charakteristika pacientů a výsledky studie A.

	Negativní nález (n = 38) 61,0 let (40–79)	Pozitivní nález (n = 37) 64,4 let (47-83)	Hodnota <i>p</i>
muži (n)	19 (50,0 %)	24 (65,0 %)	-
	55,3 let (40-72)	62,9 let (47-83)	-
ženy (n)	19 (50,0 %)	13 (35,0 %)	-
	66,6 let (48-79)	67,2 let (53-80)	-
kuřáci	0 (0 %)	5 (13,5 %)	0,023
ex-kuřáci	2 (5,3 %)	7 (18,9 %)	NS
hypertenze	28 (74,2 %)	28 (75,6 %)	NS
diabetes	7 (18,5 %)	14 (37,8 %)	NS
pre-diabetes	0 (0 %)	1 (2,7 %)	NS
onemocnění ledvin	6 (15,9 %)	6 (16,2 %)	NS
BMI	27,9 ± 3,9	28,1 ± 4,6	NS
glukosa (mmol/l)	6,8 ± 1,4	7,5 ± 1,7	NS
albumin (g/l)	41,2 ± 3,3	39,6 ± 5,4	0,026
tCh (mmol/l)	5,3 ± 0,9	5,4 ± 1,2	NS
LDL-C (mmol/l)	3,1 ± 0,7	3,3 ± 0,9	NS
HDL-C (mmol/l)	1,3 ± 0,3	1,1 ± 0,3	0,031
TAG (mmol/l)	1,5 ± 0,5	2,1 ± 0,6	0,013
IA	3,4 ± 1,1	4,1 ± 1,7	0,023
statiny	13 (34,5 %)	21 (56,7 %)	NS
fibráty	5 (13,3 %)	3 (8,1 %)	NS

BMI body mass index; tCH celkový cholesterol; TAG triacylglyceroly; IA index aterogenity; NS žádný významný rozdíl (z angl. no significant)

Stanovisko Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.
ze dne 13. 12. 2013 (15.00 h)

Přítomni: MUDr. Josef Hájek, CSc., MUDr. David Stuchlík, MUDr. Jan Mejzlík, Ph.D.,
Mgr. Jaroslav Procházka, JUDr. Josef Rokos, Mgr. Jana Škvrňáková, Ph.D.,
MUDr. Marek Sychra, MUDr. Petr Formánek, doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc.,
Omluveni: MUDr. Zuzana Kala Grofová, Anna Němcová.

Schůzi zahájil a řídil MUDr. Josef Hájek, CSc.
Sekretářka EK seznámila členy s korespondencí se SÚKL a multicentrickými etickými komisemi za období
25.11.2013 – 13.12.2013.

434/13.12.2013

▪ MUDr. Vojtěch Novotný, lékař kardiologického odd. PKN, a.s., požádal členy EK o souhlas s prováděním studie s názvem „**Zánětlivá odpověď po implantaci absorbovatelných koronárních stentů**“. Studie je zaměřená na sledování zánětlivé reakce, nových markerů oxidačního stresu a dalších biochemických parametrů u pacientů s ischemickou chorobou srdeční a uskuteční se v rámci spolupráce Pardubické krajské nemocnice, a.s., Kardiologického centra Agel, a.s. a Univerzity Pardubice na Kardiologickém oddělení s vědomím a pod dohledem prim. MUDr. Petra Vojtíška, CSc. a MUDr. Iva Varvařovského, Ph.D. Studie nemá komerční charakter a rozšiřuje již probíhající studii, schválenou Etickou komisí při PKN, a.s. dne 11.5.2012. Získaná data využije MUDr. Vojtěch Novotný k sepsání disertační práce v rámci doktorského studijního programu (Ph.D.) na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, školitelem je doc. MUDr. Josef Šťásek, Ph.D.

Na studii se budou podílet:

Kardiologické oddělení: prim. MUDr. P. Vojtíšek, CSc., MUDr. V. Novotný

Kardiologické centrum Agel, a.s.: MUDr. I. Varvařovský, Ph.D., MUDr. J. Matějka, Ph.D., MUDr. V. Rozsíval, CSc., MUDr. V. Novotný.

Oddělení klinické biochemie a diagnostiky: prim. PharmDr. J. Skalický, Ph.D., Mgr. J. Kovařík

Univerzita Pardubice: MUDr. V. Mužáková, Ph.D., Mgr. P. Žáková, Ph.D., Doc. Mgr. R. Kand'ár, Ph.D.

Byly předloženy dokumenty: protokol studie, informovaný souhlas, patientský dotazník, informovaný souhlas s provedením koronarografie /PCI, informace výrobců o stentech.

Členové EK studii po prostudování předložených dokumentů – v souladu s ICH GCP – schválili.

V Pardubicích 13. 12. 2013

Zapsala: Ivana Faiklová

Předběžný termín příští schůze etické komise: **24. 1. 2014**

Etická komise
při Pardubické krajské nemocnici, a.s.
Kyjevská 44
532 03 Pardubice

.....
MUDr. Josef Hájek, CSc.

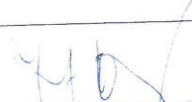
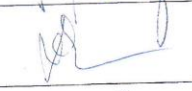

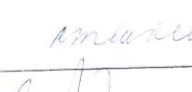

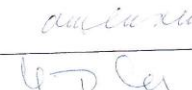
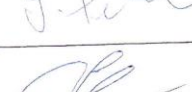

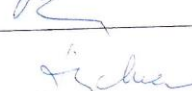
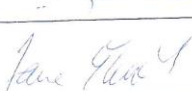

předseda Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s

Etická komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.

- její složení na schůzi konané

dne 19. 12. 2013

podpis

MUDr. Josef Hájek, CSc. – předseda EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc. – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. Petr Formánek – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. Zuzana Kala Grofová – členka EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. Jan Mejzlík, Ph.D. – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
Anna Němcová zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
Mgr. Jaroslav Procházka – člen EK není zaměstnán v Pardubické krajské nemocnici, a.s.	
JUDr. Josef Rokos – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. David Stuchlík – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. Marek Sychra – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
Mgr. Jana Škvrňáková, Ph.D. není zaměstnána v Pardubické krajské nemocnici, a.s.	

Etická komise
při Pardubické krajské nemocnici, a.s.
Kýjevska 44
532 03 Pardubice

Prohlášení / Declaration

Tímto potvrzuji, že Etická komise při Pardubické krajské nemocnici, a.s. postupuje v souladu s principy Správné klinické praxe (ICH GCP), novelizovaným zákonem o léčivech 378/2007 Sb. a novelizovanou vyhláškou o Správné klinické praxi č. 226/2008 Sb., a že vyjádření bylo poskytnuto dostatečným počtem členů EK.

I hereby certify that the ethics committee operates according to ICH GCP guidelines, the Amended Act on Pharmaceuticals No. 378/2007 Coll. and the Amended Decree of Good Clinical Practice No. 226/2008 Coll., and that the notification was provided by a sufficient number of members.

V Pardubicích dne 15. 11. 2013

Etická komise
při Pardubické krajské nemocnici, a.s.
Kryjevska 44
532 03 Pardubice

.....
podpis předsedy/pověřené osoby

Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a.s.

EC Chairman's /Designee's Signature

9 Bibliografie

1. **Racek, J. a kol.** *Klinická biochemie, 2.přepřacované vydání.* Praha : Galen, 2006.
2. **Rosen P., Tritschler H.J., Packer L.** *Handbook of antioxidant.* New York : Dekker, 2002. s.201.
3. **Tocker R., Heaney J.F.** *Physiol Rev* 84. 2004, s. 1384.
4. **Bencová, S.** *Stanovení kyseliny lipoové v lidské plazmě, diplomová práce.* Pardubice : Fakulta Chemicko-technologická Univerzity Pardubice, 2010.
5. **Masopust, J.** Patobiochemie buňky, kapitola 6.4.1 Patogeneze aterosklerózy. [Online]13.duben 2017,16:40. [www.https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1427.html](http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1427.html).
6. **Pyskatý, L.** *HPLC stanovení kyseliny lipoové v lidské plazmě, diplomová práce.* Pardubice : Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice, 2009.
7. **Bentzon J.F., Falk E.** *Vasc Pharmacol* 52. 2010, s. 11.
8. **Moreau R., Zhang W.J., Hagen T.M.** *Handbook of antioxidant.* New York : Dekker, 2002.
9. **Moini H., Packer L., Saris N.E.L.** *Toxikol Appl Pharmacol* 182. 2002, s. 84.
10. **Štípek, S.** *Antioxidantya volné radikály ve zdraví a v nemoci. 1. vydání.* Praha : Grada Publishing 2000
11. **Rybka, J.** *Diabetes mellitus-komplikace a přidružená onemocnění, 1.vydání.* Praha : Grada Publishing, 2007.
12. **Goldibi S., Ebadi S.A., Laher I.** *Curr Diabetes Rev* 7. 2011, s. 106.
13. **Štejfa, M.** *Kardiologie, 3.přepřacované vydání.* Praha : Grada, 2007. 772.
14. **Danzig V., Šimek S., Šimková R. a kol.** *Ischemická choroba srdeční u diabetiků.* Praha : Maxdorf, 2006. s. 283.
15. **Groch, L.** *Interv Akut Kardiol* 2. 2003, s. 158-160.
16. **O'Rourke R., Walsh R., Fuster V. a kol.** *Kardiologie - Hurstův manuál pro praxi, překlad, 12.vydání.* Praha : Grada Publishing, 2010.
17. **Albrecht, S.** *US Pharm* 38. 2013, s. 43.
18. **Hradec J., Bultas J., Telízko M.** *Cor Vasa* 52. 2010, s. 543.
19. **Aschermann, M.** *Cor Vasa* 44. 2002, s .123.
20. **Lékové formy,** Implantáty jako lékové transportní systémy. [Online] 3.květen 2013, 18:00. <http://remedia.cz/Clanky/Lekove-formy/Implantaty-jako-lekove-transportni-systemy-klinicke-uplatneni-obsahujicich-lecivo/6-H-jK.magarticle.aspx>.
21. **Šimek S., Horák J., Kuchynka P., Škvařilová M., Humhal J., Mrázek V., Danzig V. Aschermann M.** Praha : Klinika kardiologie a angiologie I. LF a VFN, 2005.

22. **Bennet, M.R.** *Pharmacol Therap* 91. 2001, s. 149.
23. **Vojáček, J.** *Cor Vasa* 49. 2007, s. 209.
24. **Varvařovský I., Matějka J., Herman A.** *Vnitřní lékařství* 53. 2007, s. 1085.
25. **Kováč, J.** *Interv Akut Kardiol* 2. 2003, s. 73.
26. **Aschermann O., Formánel P., Kmoníček P. a kol.** *Postgraduální medicína - Mimořádná příloha* 31. 2007.
27. [Online] prosinec 2014, 16:24. <http://braunoviny.bb Braun.cz/clanky/coroflexz-isar>.
28. **Tirosh O., Roy S., Packer L.** *Handbook of antioxidants*. New York : Dekker, 2002.
29. **Reed, J.L.** *Science* 114. 1951, s. 93.
30. **Reed, J.L.** *Comprehensive Biochem* 14. 1996, s. 99.
31. **Carreau, J.P.** *Methods Enzymol* 62. 1979, s. 152.
32. **Fujiwara K., Okamura K., Motokawa Y.** *J Biol Chem* 271. 1996, s. 12932.
33. **Reed, J.L.** *Protein Sci* 7. 1998, s. 220.
34. **Harrison E.H., McCormick D.B.** *Arch Biochem Biophys* 160. 1974, s. 514.
35. **Schupke H., Hempel R., Peter G., Hermann R., Wessel K., Engel J., Kronbach T.** *Drug Metab Dispos* 29. 2001, s. 855.
36. **Biewenga G.P., Haenen G.R., Bast A.** *Gen Pharmacol* 29. 1997, s. 315.
37. **Kamata K., Akiyama K.** *J Pharm Biomed Anal* 8. 1990.
38. **Peinado J., Sies H., Akerboom T.P.M.** *Arch Biochem Biophys* 273. 1989, s. 389.
39. **Constantinescu A., Pick U., Handelman G.J., Haramaki N., Han D., Podda M., Tritschler H.J., Packer L.** *Biochem Pharmacol* 50. 1995, s. 253.
40. **Biewega G.P., Dorstijn M.A., Verhagen J.V., Haenen G.R., Bast A.** *Biochem Pharmacol* 51. 1996, s. 233.
41. **Haramaki N., Han D., Handelman G.T., Packer L.** *Free Radical Biol Med* -. 1997, s. 535.
42. **Jones W., Li X., Qu Z.C., Perriott L., Whitesell R.R., May J.M.** *Free Radical Biol Med* 33. 2002, s. 83.
43. **Packer L., Witt E.H., Tritschler H.J.** *Free Radical Biol Med* 19. 1995, s. 227.
44. **Singh U., Jialal I.** *Nutr Rev* 66. 2008, s. 646.
45. **Cremer D.R., Rabeler R., Roberts A., Lynch B.** *Regul Toxicol Pharm* 46. 2006, s. 29.
46. **Ziegler D., Hanefeld M., Ruhnau K.J., Meissner H.P., Lobish M., Schutte K., Gries F.A.** *Diabetologia* 38. 1995, s. 1425.

47. Ziegler D., Hanefeld M., Ruhnau K.J., Hasche H., Lobish M., Schutte K., Kerum G., Malessa R. *Diabet Care* 22. 1999, s. 1296.
48. Shay K.P., Moreau R.F., Smith A.R., Hagen T.M. *Biochim Biophys Acta* 1790. 2009, s. 1149.
49. Vigil M., Berkson B.M., Garcia P. *Glob Adv in Health Med.* 2014, s. 25-27.
50. Pařízková, K. *Stanovení kyseliny lipoové v erythrocytech a její vliv na proliferaci in vitro, diplomová práce.* Pardubice : Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice, 2015.
51. Devasagayam T.P., Subramanian M., Pradhan D.S., Sies H. *Chem Biol Interact* 86. 1993, s. 79.
52. Suzuki Y.J., Tsuchiya M., Packer L. *Free Radic Res Commun* 15. 1991, s. 255.
53. Kaiser S., Mascio P., Sies H. *Thioctseure.* Frankfurt : Verlag GmbH, 1989.
54. Devasagayam T.P., Mascio P., Kaiser S., Sies H. *Biochem Biophys Acta* 1088, s. 409.
55. Bast A., Haenen G.R. *Biofactors* 17. 2003, s. 207.
56. Lykkesfeld J., Hagen T.M., Vinarski V., Ames B.N. *Faseb J* 12. 1998, s. 1183.
57. Michels A.J., Joisher N., Hagen T. *Arch Biochem Biophys* 410. 2003, s. 112.
58. Suh J.H., Shigeno E.T., Morrow J.D., Cox B., Rocha A.E., Frei B., Hagen T.M. *Faseb J.* 15. 2001, s. 700.
59. Xu D.P., Wells W.W. *J Bioenerg Biomembr* 28. 1996, s. 77.
60. Han D., Handelsmann G., Marcocci L., Sen C.K., Roy S., Kobouchi H., Tritshler H.J., Flohe L., Packer L. *Biofactors* 6. 1997, s. 321.
61. Suh J.H., Wang H., Liu R.M., Liu J., Hagen T.M. *Arch Biochem Biophys* 423. 2004, s. 126.
62. Rozsival, V. *Restenóza v koronárním stentu, 1. vydání.* Hradec Králové : Nucleus HK, 2010.
63. Michels A.J., Joisher N., Hagen T.M. *Arch Biochem Biophys* 410. 2003, s. 112.
64. Akiba S., Matsugo S., Packer L., Konishi T. *Anal Biochem* 258. 1998, s. 299.
65. Packer L., Kraemer K., Rimbach G. *Nutrition* 17. 2001, s. 888.
66. Navari Izzo F., Quartacci M.F., Sgherri C. *Plant Physiol Biochem* 40. 2002, s. 463.
67. Lodge J.K., Traber M.G., Packer L. *Free Radic Biol Med* 25. 1998, s. 287.
68. Muler L., Menzel H. *Biochim Biophys Acta* 1052. 1990, s. 386.
69. Anuradha P., Varalakshmi P. *Pharmacol Res* 39. 1999, s. 67.
70. Zhang S.J., Ge Q.F., Guo D.W., Hu W.X., Liu H.Z. *Bioorg Med Chem Lett* 20. 2010, s. 3078.
71. Kamenova, P. *Hormones* 5. 2006, s. 251.
72. YI X., Nickeleit W., James L.R., Maeda N. *J Diabet Compl.* 2010.

73. **Ziegler D., Nowak H., Kempler P., Vargha P., Low P.A.** *Diabet Med* 21. 2004, s. 114.
74. **El-Hossary G.G., El-Hamid K.A.** *Aust J Basic and Appl Sci* 4. 2010, s. 127.
75. **Ying Z., Kherada N., Farrar B.** *Life Sci* 86. 2010, s. 95.
76. **Zulkhairi A., Zaiton Z., Jamaluddin M.** *Biomed Pharmacother* 62. 2008, s. 716.
77. **Amon Z., Zakarina Z., Mohamed J.** *J Clin Biochem* 43. 2008, s. 88.
78. **Bogani P., canavesi M., Hagen T.M., Visioli F., Bellosta S.** *Bioch Bioph Res Co* 363. 2007, s. 651.
79. **Wang X., Yu Y., Ji L.** *Food Chem Toxicol* 49. 2011, s. 2750.
80. **Lim S.Y., Bae E.H., Jeong M.H.** *J Cardiol* 54. 2009, s. 2009.
81. **Hebelka, P.** *Stanovení kyseliny lipoové u nesuplementovaných pacientů, diplomová práce.* Pardubice : Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice, 2013.
82. **Lim K.S., Park J.K., Jeong M.H., Bae I.H., Nah J.W., Park D.S., Kim J.M., Kim J.H. a kol.** *J Mater Sci: Mater Med* 66. 2016.
83. **Lim K.S., Park J.K., Jeong M.H., Bae I.H., Nah J.W., Park D.S., Kim J.M., Kim J.H. a kol.** *Macromol Res* 24. 2016.
84. **Lim K.S., Jeong M.H., Bae I.H., Park J.K., Park D.S., Kim J.M., Kim J.H. a kol.** *J Cardiol* 64. 2014, s. 409.
85. **Genetika a biologie - Váš zdroj informací.** [Online] 20.květen 2016, 12:35. <http://www.genetika-biologie.cz/buněčná smrt>.
86. **Dorsam B., Fahrner J.** *Cancer Lett* 37. 2016, s. 12-19.
87. **Yoo T.H., Lee J.H., Chun H.S., Chi S.G.** *Anti-cancer Drugs* 24. 2013, s. 555-565.
88. **May J. M., Qu Z.-CH., Nelson D. J.** *Clin Biochem* 40. 2007, s.1135-1142.
89. **Jain S.K., Lim G.** *Free Radic Biol Med* 29. 2000, s. 1122-1128.
90. **Selvaraj N., Bobby Z., Sathlyapriya V.** *Clin Chim Acta* 366. 2006, s. 190-195.
91. **Amenta F., Traini E., Tomassoni D., Mignini F.** *Clin Exp Hypertens* 30. 2009, s. 767-775.
92. **Lang F., Qadri S.M.** *Blood Purif* 33. 2012, s. 125-130.
93. **Bhavsar S.K., Bobbala D., Xuan N.T., Foller M., Lang F.** *Cell Physiol Biochem* 26. 2010, s. 859-868.
94. **Teichert J., Preiss R.** *J Chromatogr B* 672. 1995, s. 277.
95. **Teichert J., Preiss R.** *J Chromatogr B* 769. 2002, s. 269.
96. **Khan M.I., Iqbal Z., Watson D.G., Khan A., Khan I.** *J Chromatogr B* 879. 2011, s. 1725.

97. **Montero O., ramírez M., Sánchez G.A., Gonzáles C.** *Biomed Chromatogr* 26. 2012, s. 1228-1233.
98. **Rochette L., Ghibu S., Muresan A., Vergely C.** *Can J Physiol and Pharmacol* 93. 2015, s. 1021-1027.
99. **Teichert J., Hermann R., Ruus P., Preiss R.** *J Clin Pharmacol* 43. 2003, s. 1257-1267.
100. **Carlson D.A., Smith A.R., Fischer S.J., Young K.L., Packer L.** *Alt Med Rew* 12. 2007, s. 343-351.
101. **Chen J., Jiang W., Cai J., Tao W., Gao X., Jiang X.:** *J Chromatogr B* 824. 2005, s. 249.
102. **Chwatko G., Krawczyk M., Iciek M., Kaminska A., Bilska-Wilkosz A., Marcykiewicz B., Glowacki R.** *Arabian Jour of Chemistry*. 2016.
103. **Stokstad E.L.R., Seaman G.R., Davis R.J., Hunter S.H.** *Methods Biochem Anal* 3. 1956, s. 23.
104. **Herbert A.A., Guest J.R.** *Methods Enzymol* 18A. 1970, s. 1970.
105. **Nishida, M.** *Vitamins* 19. 1960, s. 364.
106. **Suzuki Y., Tsuchiya M., Parcker L.** *Methods Enzymol* 234. 1994, s. 454.
107. **MacLean A.I., Bachas L.G.** *Anal Biochem* 195. 1991, s. 303.
108. **Willey, J.** *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. New Jersey : 2003. s. 458.
109. **Kataoka, H.** *J Chromatogr B* 717. 1981, s. 65.
110. **Shih J.C.H., Steinsberger S.C.** *Anal Biochem* 116. 1981, s. 65.
111. **White, R.H.** *Anal Biochem* 110. 1981, s. 89.
112. **V-Liaud N., Kobrehel K., Scuvaire Y., Wong J.H., Buchanan B.B.** *J Agric Food Chem* 42. 1994, s. 1110.
113. **Natraj C.V., Gandhi V.M., Menon K.K.G.** *Biosci* 6. 1984, s. 37.
114. **Pratt K.J., Carles C., Carne T.J., Hanson M.J., Stebvenson K.** *Biochem J* 258. 1989, s. 749.
115. **Jackman S.A., Hough D.W., Danson M.J., Stevenson K.J., Opperdoes F.R.** *Eur J Biochem* 193. 1990, s.91.
116. **Howard S.C., McCormick D.B.** *J Chromatogr B* 208. 1981, s. 129.
117. **Furr H.C., Shih J.C.H., Harrison E.H., Chang H.H., Spence J.T., Wright L.D., McCormick D.B.** *Methods enzymol* 62. 1979, s. 129.
118. **Campos P.M., Praca F.S., Bentley M.V.** *J Chromatogr B xxx*. 2015.
119. **Satoh S., Toyo oka T., Fukushima T., Inagaki S.** *J Chromatogr B* 854. 2007, s. 109.
120. **Haj-Yehia A., Assaf P., Nassar T., Katzhendler J.** *J Chromatogr A* 870. 2000, s.381.

121. Niebch G., Buechele B., Biome J., Grieb S., Brandt G., Kampa P., Rafel H.H., Borbe H.O., Nubert I., Fleischhauer I. *Chirality* 9. 1997, s. 32.
122. Witt W., Rustow B. *J Chromatogr B* 705. 1998, s.127.
123. Chng H.T., New L.S., Neo A.H. Goh C.W., Browne E.R., Chan E.C.Y. *Pharm Biomed Anal* 51. 2010, s.754.
124. Teichert J., Preiss R. *Methods Enzymol* 279. 1997, s. 159.
125. Handelsmann G.J., Han D., Tritschler H., Packer L. *Biochem Pharmacol* 47. 1994, s. 1725.
126. Han D., Handelsmann G.J., Packer L. *Methods Enzymol* 251. 1995, s. 315.
127. Khan M.I., Iqbal Z., Ahmad L., Shah Y., Watson D.G. *J Chromatogr B* 878. 2010, s. 2782.
128. Marin M., Lete C., Manolescu B.N., Lupu S. *J Electroanal Chem* 729. 2014, s. 128.
129. Panak K.C., Ruiz O.A., Giorgier S.A., Dioz L.E. *Electrophoresis* 17. 1996, s. 1613.
130. Sitton A., Schmid M.G., Gubitz G., Aboul-Enein H.Y. *J Biochem Bioph Methods* 61. 2004, s. 119.
131. Li H., Kong Y., Feng Z., Chang N., Liu J., Long J. *J Chromatographia* 77. 2014, s. 145.
132. Kodoma S., taga A., Aizawa S.I., Kemmei T., Honda Y., Suzuki K., Yamamoto A. *Electrophoresis* 33. 2012, s. 2441.
133. Keith D.J., Butler J.A., Bemer B., Dixon B.,Johnson S., Garrard M. a kol. *Pharmacol Res* 66. 2012, s. 199.
134. Hemrann R., Mungo J., Cnota P.J., Ziegler D. *Clin Pharmacology* 6. 2014, s. 195-204.
135. Mignini F., Napolioni V., Reggiardo G., Fasani R., Ferrari P. *Minerva Medica* 102. 2011, s. 475-482.
136. Přistoupilová K., Přistoupil T. *Vesmír* 9. 2002, s. 81.
137. Přistoupilová K., Přistoupil T. *Chem listy* 93. 1999, s. 365.
138. Ueland, P.M. *J Nutr* 126. 1996, s. 1281.
139. Přistoupilová K., Přistoupil T. Homocystein a civilizační choroby. *Vesmír* 81. 2002.
140. Přistoupilová K., Přistoupil T.I. Heyrovský M. *Homocystein - molekula tešící se rostoucí pozornosti*. Praha : Chemické Listy, 1999.
141. Erben, K. *Homocystein - klíč je zdraví*. Praha : Formát, 2005.
142. Hu M.L., Chang Ch.Y., Yang T.H. *Clin Biochem* 37. 2004, s. 494.
143. Rodriguez J., Robinson K. *ACC Cur J Rev* 10. 2001, s. 31.
144. Wlodek, P.J. *Clin Chim Acta* 304. 2001, s. 9.

145. **Hogg, N.** *Free Radic Biol Med* 27. 1999, s. 28.
146. **Žáková, P.** *Využití HPLC/ED k monitorování látek ovlivňujících aterogenezi koronárních artérií, disertační práce.* Pardubice : Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice, 2007.
147. **Gladyshev V.N., Lee B.CH.** *Free Radic Biol Med* 50. 2011, s.221.
148. **Splaver A., Lamas G., Hennekens H.CH.** *Am Heart J* 148. 2004, s. 34.
149. **Erben, K.** *Homocystein - klíč ke zdraví.* Praha : Formát, 2005.
150. **Žák, A.** *Klinický význam hyperhomocysteinemie. Atherosklerosa.* 2001.
151. **Domašínská, P.** *Dynamika hladin homocysteinu a dalších aminothioliů u pacientů se zavedením stentu do krevního řečiště.* Pardubice : Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice, 2012.
152. **Weiss, N.** *Curr Drug Metabol* 6. 2005, s. 27.
153. **Hankey G.J., Eikelboom J.W.** *Lancet* 354. 1999, s. 407-413.
154. **Ganguly P., Alam S.F.** *Nut J* 6. 2015, s. 14.
155. **Splaver A., Lamas A.** *Am Heart J* 1. 2004.
156. **Faeh D., Chiolero A., Paccaud F.** *Swiss Med Wkly* 136. 2006, s. 745-756.
157. **Naghstabrizi B., Shakerian F., Hajilooi M., Emami F.** *J Cardiovasc Dis Res.* 2012, s. 276-279.
158. **Faria-Neto J.R., Chagas A.C.P., Bydlowski S.P., Lemos Neto P.A., Chamone D.A., Ramirez J.A.F., da Luz P.L.** *Braz J Med Biol Res* 39. 2006, s. 455-463.
159. **Schroeksnadel K., Grammer T.B., Boehm B.O., März W., Fuchs D.** *Thromb Haemost* 103. 2010, s. 5.
160. **Schalinske K.L., Smazal A.L.** *Adv Nutr* 3. 2012, s. 755-762.
161. **Zhang S., Yong-Yi B., Luo L.M., Xiao W.K., Wu H.M., Ye P.** *J Geriatr Cardiol* 11. 2014, s. 32-38.
162. **Okura T., Miyoshi K., Irita J., Enomoto D., Nagao T., Kukida M.** *Nature Com Sci Rep* 4. 2014, s. 5663.
163. **Pang X., Liu J., Zhao J., Mao J., Zhang X., Feng L.** *Atherosclerosis* 236. 2014, s. 73-81.
164. **Shenov V., Mehendale V., Prabhu K., Shetty R., Rao P.** *Ind J Clin Biochem* 29. 2014, s. 339-344.
165. **Ndrepepa G., Kastrati A., Braun S., Koch W., Kolling K., Mehilli J., Schomig A.** *Nutrition Metabolism Cardi Diseases* 18. 2018, s. 66-73.
166. **Lim U., Cassano P.A.** *Am J Epidemiol* 156. 2002, s. 1105-1111.
167. **Sarwar A.B., Sarwar A., Rosen B.D., Nasir K.** *Clin Chem* 12. 2007, s. 1667-1677.

168. Lin T., Liu J.CH., Chang L.Y., Shen CH.V. *Atherosclerosis* 212. 2010, s. 501-506.
169. Gürel E., Tigen K., Karaahmet T., Gecmen C., Mutlu B., Basaran Y. *Herz* 40. 2015, s. 495-501.
170. Donner M.G., Gernot K.K., Mathes P.B., Schwandt P., Richter W.O. *Metabolism* 47. 1998, s. 273-279.
171. Zima, T. *Laboratorní diagnostika, 2. přepracované vydání*. Praha : Galen, 2017.
172. Dubská L., Hyánek L. *Klin Biochem Metab* 17. 2009, s. 93-95.
173. Compton R.G., Nekrassova O., Lawrence N. *Talanta* 29. 2003, s. 1085-1095.
174. Ducros, V. a kol. *J Chromatogr B* 781. 2002, s. 207-226.
175. Tseng W.L., Chang Ch.W. *Analytical Chemistry* 81. 2010, s. 2696-2702.
176. Carducci C., a kol. *J Chromatogr A* 846. 1999, s. 93-100.
177. [Online] 21.listopad 2017, 13:00. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
178. Hanson N. Q., Eckfeldt J. H., Schwichtenberg K., Aras O., Tsai M. Y. *Clin Chem* 48. 2002, s. 1539-1545.
179. [Online] 20.březen 2018, 7:00. <http://www.sukl.cz/modules/medication/search>.
180. Zing Z., Kherada N., Farrar B. *Life Sci* 86. 2010, s. 95.
181. T., Mullerová. *Vliv kyseliny lipoové na erytrocyty, diplomová práce*. Pardubice : Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice, 2017.
182. Naghshtabrizi B., Shakerian F., Hajilooi M., Emami F. *J Cardiovasc Dis Res* 3. 2012, s. 276-279.
183. El Khairy L., Ueland P.M., Refsum H., Graham I.M., Vollset S.E. *Project Circulation* 103. 2001, s. 2544-2549.
184. El Khairy L., Vollset S.E., Refsum H., Ueland P.M. *Clin Chem* 49. 2003, s. 895-900.
185. Xiao Y., Zhang Y., Lv X., Su D., Li D., Xia M., Qui J., Ling W., Ma J. *Lipids Health Dis* 10. 2011, s. 10-37.
186. Basati G., Ravazi A.E., Abdi A., Sarrafzedegan B. *Miomark Med* 8. 2014, s. 405-412.
187. Liu Ch., Yang Y., Peng D., Chen L., Luo J. *Saudi Med J* 36. 2015, s. 839-846.
188. Vizzard E., Nodari S., Fiorina C., Metra M., Dei Cas L. *Cardiol* 107. 2007, s. 354-359.
189. Chai H.T., Chen Y.L., Chung S.Y., Tsai T.H., Yang Ch.H., Chen H. Ch., Sung P.H., Sun Ch.K., Chang L.T., Fan Ch.Q., Yip H.K. *Int Heart J* 52. 2011, s. 280-285.
190. Oudi M.E., Aouni Z., Mazigh C., Khochkar R., Gazoueni E., Haouela H., Machghoul S. *Exp Clin Cardiol* 15. 2015, s. 25-28.

191. **Shenoy V., Mehendale V., Prabhu K., Shetty R., Rao P.** *Ind J Clin Biochem* 29. 2014, s. 339-344.
192. **Kwon S.W., Kim J.Y., Suh Y.J., Lee D.H., Yoon Y.W., Lee B.K., Yung Y.H., Choi E.Y., Hong B.K., Rim S.J., Kwon H.M.** *Korean Circ J* 46. 2016, s. 154-160.
193. **Ankrah A., Buscombe J., Sathekge M.M.** *Cardiovasc J Afr* 23. 2012, s. 313-317.
194. **Yurtdas M., Ozcan I.T., Seyis A.S., Camsari A., Cicek D.** *J Cardiol* 61. 2013, s. 138-143.
195. **Wu Y., Yang L., Zhong L.** *Atherosclerosis* 212. 2010, s. 351-355.
196. **Koubaa N., Nakbi A., Hammami S., Attia N., Mehri S., Ben Hamda K., Ben Farhat M., Miled A., Hammami M.** *Clin Biochem* 42. 2009, s. 771-776.