

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Hladiny homocysteinu u pacientů po perkutánní koronární intervenci

Bc. Lenka Slivková

Diplomová práce

2018

University of Pardubice
Faculty of chemical-technology

Levels of homocysteine in patients after percutaneous coronary intervention
Bc. Lenka Slivková

Diploma Thesis
2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DĚLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Slivková**
Osobní číslo: **C16460**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Hladiny homocysteinu u pacientů po perkutánní koronární intervenci**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Teoretická část: Seznamte se s literárními údaji o vztahu mezi hladinami celkového plazmatického homocysteinu, perkutánní koronární intervencí a celkovou prognózou pacienta.
Experimentální část: Stanovte koncentrace celkového homocysteinu v plazmě pacientů, kteří prodělali perkutánní koronární intervenci. Pro stanovení využijte metody HPLC s elektrochemickou detekcí. Výsledky porovnejte s aktuální dostupnou literaturou.

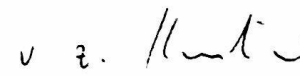
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavla Královcová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **doc. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**
Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Cegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

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

Byl jsem seznámen 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 10.5. 2018

Bc. Lenka Slivková

Poděkování:

Velice ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Pavle Královcové Ph.D. za její ochotu a pomoc při vedení práce a za cenné rady, které mi poskytla.

ANOTACE:

Homocystein je sirtá aminokyselina, která je brána jako rizikový faktor kardiovaskulárního onemocnění. V současnosti je také velice často spojována s komplikacemi vzniklými po implantaci koronárního stentu. Cílem této práce bylo stanovení hladin homocysteinu u pacientů po perkutánní koronární intervenci, kdy dochází k implantaci stentu do koronárního řečiště. Pacientům byly implantovány stenty „trvalé“ lékové a biodegradabilní.

Výsledkem práce je zjištění, že hladina homocysteinu má u biodegradabilních stentů pravděpodobně vliv na výskyt komplikací po implantaci.

KLÍČOVÁ SLOVA: homocystein, hyperhomocysteinémie, stent, biodegradabilní, perkutánní koronární intervence

TITTLE: Homocysteine levels in patients after percutaneous coronary intervention

ANNOTATION:

Homocysteine is a sulphuric amino acid that is taken as a risk factor for cardiovascular disease. It is also very often associated with complications arising after implantation of the coronary stent. The aim of the work was to determine the levels of homocysteine in patients after percutaneous coronary intervention when implanting the stent into the coronary arteries. Drug-elution “permanent” stents and biodegradable were implanted to patients.

The result of this work is the finding that the level of homocysteine in biodegradable stents probably affects the occurrence of complications after implantation.

KEYWORDS: homocysteine, hyperhomocysteinemia, stent, biodegradable, percutaneous coronary intervention

OBSAH

0 ÚVOD.....	13
1 Koronární onemocnění	14
1.1 Ateroskleróza.....	14
1.1.1 Patogeneze aterosklerózy.....	15
1.2 Ischemická choroba srdeční	16
1.2.1 Akutní formy.....	17
1.2.2 Chronické formy.....	18
2. Koronární angiografie.....	22
3. Perkutánní koronární intervence	24
3.1 Typy stentů	25
3.2. Komplikace PCI.....	27
4. Thioly.....	29
4.1 Metabolismus thiolů.....	30
4.2 Homocystein.....	31
4.2.1 Hyperhomocysteinémie	32
4.2.2 Hladina homocysteinu po intervenci	35
5. Možnosti stanovení.....	39
5.1 Preanalytická fáze	39
5.2 Analytická fáze	40
5.2.1 Enzymatické stanovení	40
5.2.2 Kombinované stanovení	40
5.2.3 Elektroforetické stanovení	41
5.2.4 Kolorimetrické metody stanovení a chemosensory.....	41
5.2.5 Chromatografické stanovení	41
5.2.5.1 HPLC s elektrochemickou detekcí.....	42
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	45
6.1 Přístroje a pomůcky	45
6. 2 Použité chemikálie	46
6.3 Příprava roztoků.....	47
6.4 Chromatografické stanovení.....	49
6.5 Vyhodnocení.....	50

6.5.1 Kalibrační křivka	51
6.5.2 Charakteristika pacientů	53
6.5.3 Výsledné koncentrace aminothioliů	58
6.6 Diskuse	65
7. Závěr	70
CITOVANÉ ZDROJE.....	71
Přílohy	78

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Progredující ateroskleróza tepny (převzato z: [5])	15
Obrázek 2 Umístění stentu (převzato z: [27]).....	25
Obrázek 3 Vzorce thiolů (upraveno dle: [34])	29
Obrázek 4 Metabolismus methioninu (upraveno dle: [34]).....	30
Obrázek 5 Průřezový pohled na coulometrický sensor (upraveno dle: [60])	43
Obrázek 6 Účinnost coulometrického čidla (upraveno dle: [60]).....	43
Obrázek 7 Chromatogram.....	50
Obrázek 8 Kalibrační závislost pro cystein	51
Obrázek 9 Kalibrační závislost pro Hcy.....	52
Obrázek 10 Kalibrační závislost pro cysteinyl – glycin.....	52
Obrázek 11 Kalibrační závislost pro methionin.....	53
Tabulka 1 Referenční hodnoty thiolů [56].....	40
Tabulka 2 Kalibrační řada	48
Tabulka 3 Detekční podmínky	50
Tabulka 4 Retenční časy thiolů	51
Tabulka 5 Koncentrace thiolů u kontrolního vzorku v $\mu\text{mol/l}$	53
Tabulka 6 Typy stentů	54
Tabulka 7 Rozdělení pacientů do skupin.....	57
Tabulka 8 Naměřené hladiny thiolů	58
Tabulka 9 Výpočty na základě naměřených hodnot	61
Tabulka 10 Studentův t-test u jednotlivých skupin.....	62
Tabulka 11 Rozdělení pacientů dle typu stentu – měření A.....	63
Tabulka 12 Rozdělení pacientů dle typu stentu - měření D	64

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACE – Angiotenzin-konvertující enzym

ATP – adenosin trifosfát

BHMT – betain-homocysteinmethyltransferasa

CBS – cystathionin- β -synthasa

CGL – cystathionin- γ -lyasa

CRP – c-reaktivní protein

DM – diabetes mellitus

DNA – kyselina deoxynukleotidová

DTT - dithiothreitol

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

EKG – elektrokardiografie

FAD – flavinadenin dinukleotid

Hcy - homocystein

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ICHS – Ischemická choroba srdeční

IM – infarkt myokardu

LDL – lipoprotein s nízkou hustotou

MAT - methioninadenosyltransferasa

MS – methionin synthasa

MTHFR – methyltetrahydrofolát reduktasa

NAD – nikotinamidenin dinukleotid

NAP – nestabilní angina pectoris

NSTEMI – infarkt myokardu bez ST elevací

PCI – perkutánní koronární intervence

PLLA – „poly-L-lactic acid“ – kyselina poly laktátová

RP-HPLC/ED – vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému obrácených fází s elektrochemickou detekcí

SAH – s-adenosylhomocystein

SAHH – s-adenosylhomocysteinhydrolasa

SAM – s-adenosylmethionin

SAP – stabilní angina pectoris

SHMT – serinhydroxymethyltransferasa

STEMI – infarkt myokardu s ST elevacemi

tHcy – celkový homocystein

0 ÚVOD

Poškození koronárních cév vlivem aterosklerózy je jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Rizikovým faktorem tohoto onemocnění může být hypertenze, hyperlipidemické stavy, diabetes mellitus, kouření nebo zvýšená hladina homocysteinu. Homocystein je sirná aminokyselina, vznikající v metabolismu methioninu. Chemickými vlastnostmi se podobá cysteinu, proto také název homocystein.

Pacienti s postižením koronárních cév jsou vyšetřeni pomocí koronární angiografie a na základě tohoto vyšetření je rozhodnuto o dalším postupu. Jedním z možností je perkutánní koronární intervence. Cílem tohoto zákroku je otevření koronární arterie a obnovení průtoku krve. Pacientům se na místo postižené arterie umístí výztuž zvaná stent, aby nedošlo k opětovnému uzávěru. Stenty, které se v současnosti rutinně používají, mohou být holé kovové nebo lékové. Tyto „trvalé“ stenty jsou však spojené s řadou komplikací. Možným východiskem by mohly být biodegradabilní stenty, které jsou však zatím většinou spíše ve fázi vývoje a testování.

Přestože je homocystein spojován s kardiovaskulárním onemocněním a existuje mnoho studií, které tuto spojitost dokládají, zatím není plně objasněna jeho spojitost se vznikem pozdních komplikací po perkutánní koronární intervenci. Studie, které se tímto tématem zabývají, mají totiž odlišné výsledky. Ty mohou být přičítány různým podmínkám a faktorům měření.

Cílem práce bylo tuto skutečnost ověřit naměřením hodnot homocysteinu v delším časovém rozmezí po perkutánní koronární intervenci. A poté porovnáním s hodnotami naměřenými před intervencí, 24 hodin a 48 hodin po intervenci.

1 Koronární onemocnění

Onemocnění koronárních arterií je hlavní příčinou úmrtí v hospodářsky vyspělých zemích a podle vzrůstu případů lze do roku 2020 předpokládat, že se stane nejčastější příčinou úmrtí i celosvětově. [1]

Koronární onemocnění se týká zúžení koronárních cév, které dodávají kyslík a krev do srdce. Nejčastějším koronárním onemocněním je ateroskleróza koronárních periferních arterií. [2]

1.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza je dominující příčinou úmrtnosti a nemocnosti v západním světě. Patofyziologické studie odhalily interakce molekulových a buněčných elementů, které se účastní aterogeneze. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, zahrnující souhru genetických a environmentálních faktorů. [3]

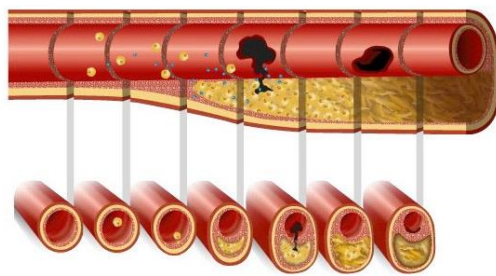
Je charakterizována akumulací cholesterolu, infiltrací makrofágů, proliferací buněk hladkého svalstva, akumulací složek pojivové tkáně a tvorbou trombů. [3] Samotná ateroskleróza je zřídka fatální. Fatální se stává až vzniklá trombóza. [4]

Rizikovými faktory pro vznik aterosklerózy jsou hyperlipidemické stavy, diabetes mellitus (DM), kouření a hypertenze. Žádný z těchto faktorů však sám není dostatečný k vytvoření aterosklerotické léze. Vedle tradičních rizikových faktorů byla s koronárními onemocněními spojena také hyperhomocysteinémie. Existuje také důkaz, který naznačuje, že fibrinogen a fibrin se podílí na tvorbě a růstu ateromu. Fibrin váže tromby, jiné koagulační faktory a lipoprotein s nízkou hustotou (LDL). Význam hyperfibrinogenémie jako rizikového faktoru pro aterosklerózu je patrný ze vztahu mezi vysokým fibrinogenem a řadou dalších rizikových faktorů. [3]

V závislosti na typu postiženého cévního lůžka jsou pozorovány odlišné klinické projevy. Ateroskleróza může v mnoha případech způsobit vážné komplikace a dokonce i smrt. Těmito komplikacemi jsou infarkt myokardu, angina pectoris, cévní mozková příhoda apod. [3]

1.1.1 Patogeneze aterosklerózy

Ateroskleróza je chronické imunopresivní, fibroproliferativní onemocnění velkých a středních arterií. Hlavní roli ve vývoji této nemoci hrají endoteliální buňky, leukocyty a buňky hladkého svalstva intimy. Na obrázku 1 je znázorněna patogeneze aterosklerózy. Vlivem ukládání tukových hmot do stěn cév dochází postupně k zužování cévy, k tvorbě tzv. ateromových plátů, a na konci může dojít k úplnému uzávěru cévy. [3,4]



Obrázek 1 Progredující ateroskleróza tepny (převzato z: [5])

Endotelové buňky

Aterosklerotické léze vznikají aktivovaným dysfunkčním endotelem v místě poškození. Dochází k inhibici oxidu dusnatého (silného vazodilatátoru) a stimulaci produkce adhezivních molekul, které přitahují zánětlivé buňky. Později mohou endoteliální buňky zmizet a objeví se de-endotelializované oblasti s trombocyty, které se drží exponované subendotelové tkáně (mohou být i bez trombocytů). [4]

V závislosti na velikosti a koncentraci se molekuly plazmy a lipoproteinové částice extrahují přes defektní endotel do subendotelového prostoru, kde jsou aterogenní lipoproteiny udržovány a modifikovány (např. oxidovány) a stávají se cytotoxickými, prozánětlivými, chemotaxickými a proaterogenními. Endotel se aktivuje aterogenními a prozánětlivými stimuly a expresí adhezivních molekul. [4]

Leukocyty

Jednou z nejčastějších buněčných odpovědí při aterogenezi je ohniskové posílení monocytů a v menší míře T-lymfocytů. Perzistence této buněčné odpovědi se zdá být podkladem progresu onemocnění. B-lymfocyty a plazmatické buňky jsou vzácné v intimálním plaku, ale mohou být hojně přítomny v adventitii. Aktivované žírné buňky se nacházejí jak

v plaku, tak v adventitii. Neutrofilů se mohou vyskytnout v trombózaných koronárních placích, pravděpodobně přijatých jako odpověď na rupturu plaku. [4]

K tomu, aby se krevní buňky dostaly k lézi je třeba chemokinů. Studie naznačují, že nejdůležitějšími aterogenními chemoatraktanty jsou oxidované LDL a monocytární chemotaktický protein-1. Monocyty se diferencují na makrofágy a internalizují aterogenní lipoproteiny. Vývoj lipidem zatížených makrofágů obsahujících masivní množství cholesterolu je charakteristickým znakem raných a pozdních aterosklerotických lézí. Smrt makrofágů apoptózou a nekrotickou přispívá k tvorbě měkkého a destabilizujícího jádra plaku, bohatého na lipidy. [4]

Buňky hladkého svalstva

Při progresi onemocnění je imunologická zánětlivá odpověď spojena s fibroproliferativní odpovědí zprostředkovanou intimálními buňkami hladkého svalstva. Tyto buňky jsou odpovědné za hojení a opravu po poranění tepen. Pokud aterogenní stimuly přetrvávají v průběhu let, reparativní reakce se může stát tak objemná a dominující, že se ztrácí lumen, sníží se průtok krve a nastane ischemie. Nicméně buňky hladkého svalstva a produkce kolagenu zajišťují stabilitu plaků a chrání je před mnohem horšími následky, jako je ruptura plaku a trombóza. [4]

1.2 Ischemická choroba srdeční

Ischemická choroba srdeční (ICHS) patří mezi nejčastěji se vyskytující onemocnění. Je mnohdy příčinou úmrtí dospělé populace. Přibližně 40 % pacientů s kardiovaskulárním onemocněním umírá na ICHS. [6]

ICHS je definována jako ischemie myokardu. Vzniká při zvýšení nároků na dodávku kyslíku (při námaze apod.), ale může být i klidová. Je způsobena převážně aterosklerózou věnčitých tepen. [6]

Klinický obraz ICHS je velice obsáhlý od zcela asymptomatického onemocnění až po náhlou srdeční smrt. Klinické formy můžeme rozdělit na akutní a chronické, které se výrazně liší léčebnými postupy i svojí prognózou. V případě akutní formy ICHS je nutnost neprodlené hospitalizace, protože je ohrožen život nemocného. U chronické formy je pacient sledován praktickým lékařem. [6]

Pacienti se známkami a příznaky ischemie by měli být vyšetřeni pomocí anamnézy, fyzikálního vyšetření, lipidového profilu, plazmatické glukózy a glykovaného hemoglobinu.

Angiografie pomocí výpočetní tomografie se často používá jako počáteční screeningový test. Dalšími diagnostickými postupy jsou: intravaskulární ultrasonografie, angiografie, elastografie, imunoscintigrafie a magnetická resonance. [7]

Pacienti by měli jíst stravu bohatou na vlákninu. Měli by mít pravidelnou fyzickou aktivitu a nekouřit. Možnou léčbou jsou antiagregační léky (aspirin, clopidogrel), léky na snížení cholesterolu (statiny) a léky na snížení krevního tlaku (inhibitory angiotenzin-konvertujících enzymů (ACE) a beta blokátory). Aspirin je indikován pro prevenci koronární aterosklerózy u vysoce rizikových pacientů. Clopidogrel se používá u pacientů, kteří trpí nesnášenlivostí aspirinu. Statiny, ACE inhibitory a blokátory angiotensinových receptorů snižují riziko aterosklerózy protizánětlivými účinky. Statiny také hrají zásadní roli v léčbě aterosklerózy stabilizací plaků. [7]

1.2.1 Akutní formy

Nestabilní angina pectoris

Nestabilní angina pectoris (NAP), dříve označována jako intermediální koronární syndrom, může vzniknout dvojnásobem. Buď se jedná o zhoršení již existující stabilní anginy nebo o nově vzniklou. Zhoršením stabilní anginy pectoris (SAP) se rozumí snížení anginózního prahu, zvýšení intenzity, frekvence nebo prodloužení záchvatů, změna charakteru bolesti nebo klidová bolest na hrudi. [6]

NAP zahrnuje spektrum symptomatických projevů, které leží mezi SAP a akutním infarktem myokardu (IM). Akutní infarkt myokardu je častým přechodem NAP a může přejít až ve smrt. [8]

Charakteristickým projevem je bolest na hrudi, která může být doprovázena dušností. Bolest je obvykle delší a intenzivnější než u stabilní anginy pectoris. NAP je nutno oddělit od variabilní anginy pectoris. Ta je způsobena spasmem věnčité tepny, proto se jí také říká vasospastická. [6]

Správným diagnostickým postupem je zhodnocení stavu, rizika nemocného, zahájení léčby a přesun k další diagnostice a léčbě. [9]

Akutní infarkt myokardu

Jedná se o akutní ložiskovou ischemickou nekrózu srdečního svalu. Dochází k náhlému uzávěru či extrémnímu zúžení srdečního svalu. Téměř z 95 % za IM může koronární

ateroskleróza s rupturou intimy a s trombózou v místě plátu. Ve zbylém množství případů je příčinou IM např. arteritida, embolie do věnčitých tepen apod. [10]

U akutního IM dochází k typickému vzestupu a následnému poklesu biochemických markerů, jako troponin T či I, isoenzym kreatinkinázy. Tyto markery se vyskytují společně s klinickými příznaky nebo s vývojem patologických Q vln na elektrokardiografu (EKG), změnami na EKG svědčícími pro ischemii nebo v souvislosti s koronární intervencí. Dle obrazu EKG můžeme IM rozdělit na IM s elevacemi ST segmentu (STEMI) nebo na IM bez elevací ST segmentu (NSTEMI) [10]

Dochází k uzávěru koronární tepny, kdy trombóza nasedá na destabilizovaný plát. V minimálních případech dochází ke koronárnímu uzávěru krvácením do plátu nebo embolií do koronární tepny. [10]

Náhlá srdeční smrt

Jedná se o úmrtí po akutní ztrátě vědomí z kardiální příčiny do jedné hodiny od vzniku symptomů. Jde o neočekávané úmrtí s nebo bez známého onemocnění srdce. Nejčastější příčinou je ICHS (téměř 80%), z menší části pak dilatující a hypertrofická kardiomyopatie a v poslední řadě zánětlivá onemocnění srdce a nemoci chlopenního aparátu. [11]

Klinické rizikové faktory jsou podobné jako u aterosklerózy. Ateroskleróza je totiž také rizikovým faktorem. Rizikem náhlé srdeční smrti může být i kouření. [12]

1.2.2 Chronické formy

Asymptomatická ICHS

Často je objevena při vyšetřovacích metodách, které jsou použity z jiných důvodů. Dochází k nálezům tzv. němé ischemie (preklinická forma aterosklerózy) při ambulantním monitorování EKG. Může být také nález kalcifikací v koronárních tepnách při vyšetření počítačovou tomografií. Mimořádně i koronarografický průkaz stenózy věnčité tepny. [6]

Asymptomatická ICHS má malou hrozbu akutních kardiovaskulárních příhod, avšak zvyšuje absolutní kardiovaskulární riziko. To je také důvodem k razantním preventivním opatřením. [6]

Příčina chybění vnímání ischemie zatím není zcela jasná, ale porucha může být pravděpodobně na různých úrovních. Jednou z možných příčin může být porucha zpracování

informace a jejího vyhodnocení v centrálním nervovém systému. Dále může dojít k poruše vedení bolesti nebo ke krátkým atakům nedokrevnosti srdečního svalu, kdy se celý proces ischemie zastaví ještě před vznikem bolesti. [13]

Stav po prodělaném infarktu myokardu

Jedná se o stav, kdy pacient prodělal IM a je ohrožen dalšími kardiovaskulárními příhodami. U každého pacienta je prognóza odlišná a je nutné provést kardiologem stratifikaci podle rizika. Postižení jsou poté rozděleni na skupiny: s vysokým rizikem reinfarktu, chronického srdečního selhání a náhlé smrti a na nemocné s nízkým rizikem. [6]

Pacienti musí dodržovat sekundární prevenci. Jedná se v podstatě o prevenci primární, avšak musí být brána s větší vážností a důsledností. Pacient musí upravit svůj životní styl, např. vyvarovat se kouření, což je nejúčinnějším opatřením v sekundární prevenci. [6] Prognózu také zlepšuje fyzický trénink, udržování normálního krevního tlaku, nízkocholesterolová dieta, udržení nízkých hladin glykémie a nízkých hladin tuků. [14] Do preventivního opatření je již také zahrnuta farmakologická prevence, do které patří antiagregační léčba, beta-blokátory, inhibitory ACE, blokátory kalciového kanálu. U všech pacientů, kteří mají vysoké riziko, by měla být provedena efektivní koronarografie. Podle výsledku se pak provádí perkutánní koronární intervence (PCI) nebo chirurgická revaskularizace. [6]

Riziko po infarktu bývá vyšší s narůstajícím věkem, při opakovaném infarktu, mnohočetném stenotickém postižení koronárních tepen nebo dysfunkci levé komory. Také se riziko zvyšuje u pacientů s diabetes mellitus (DM), renální insuficiencí a při výskytu komorových arytmií. [14]

Stabilní angina pectoris

SAP je charakterizována bolestí na hrudi, objevující se zpravidla při fyzické námaze, emočním stresu, nebo když je postiženému chladno. Dochází k přechodné ischemii myokardu, která je způsobena nepoměrem mezi dodávkou a spotřebou kyslíku. Průtok některé koronární tepny je omezen aterosklerotickým plátem. Vnitřní průsvit tepny je zúžen o více než 70 %. [6]

Klinickým obrazem je také typický retrosternální tlak, pocit tíhy, pálení nebo svírání. Bolest vystřeluje do krku, dolní čelisti, levé paže nebo ramene. Pacienti jsou klasifikováni podle klinické závažnosti SAP (dle Kanadské kardiologické společnosti) do 4 stupňů. Stupeň I. je způsoben mimořádně velkou námahou, II. stupeň je vyvolán větší námahou, ale běžnou pro

normální život např. chůze do kopce. III. stupeň je již malá námaha, např. chůze po rovině a u IV. stupně se bolest na hrudi objevuje při minimální zátěži nebo v klidu. [6]

Pro diagnózu SAP je důležitá pečlivá anamnéza, laboratorní testy a specifické kardiologické vyšetření – invazivní a neinvazivní. EKG obraz je často zcela normální, avšak mohou být přítomny známky prodělaného IM. Hladina hemoglobinu a klinické podezření na poruchu štítné žlázy mohou poskytnout informace týkající se možných příčin ischemie. Dále se vyšetřuje kreatinin v séru. Pokud existuje klinické podezření na nestabilitu, měly by být stanoveny biochemické markery poškození myokardu (troponin, kreatinkinázy), aby se vyloučilo poškození myokardu. Pokud jsou markery zvýšené, může se jednat o akutní koronární syndrom nikoliv o SAP. [15]

Léčba spočívá stejně jako u stavu po IM v sekundární prevenci. Pacienti užívají denně aspirin nebo clopidogrel, beta-blokátor, inhibitory ACE při systolické dysfunkci levé komory. Dále je důležité potlačení záchvatů. Pacienti s SAP užívají sprejový nitroglycerin nebo isosorbid dinitrát, které způsobí okamžité rozšíření cév. Nitroglycerin (nebo izosorbid dinitrát) musí být užit buď okamžitě při vzniku záchvatu, nebo preventivně v situaci, kdy pacient záchvat předpokládá. Dále jsou nemocní léčeni dlouhodobou antiangiozní terapií (selektivní betablokátor, blokátor kalciového kanálu, nitráty), metabolickou léčbou (Trimetazidin) a intervenční léčbou. [16]

Dysrytmické formy ICHS

Jedná se o jakoukoliv dysrytmii (např. supraventrikulární, komorová). Dysrytmie se může prolínat i s jinými formami, buď akutními (akutní koronární syndrom) nebo chronickými (SAP, stav po IM). Také však může být dysrytmie jediným projevem ICHS. [17]

Chronické srdeční selhání

ICHS se může projevit vznikem chronického srdečního selhání. V mnoha případech se jedná o selhání na podkladě systolické dysfunkce levé komory způsobené ICHS. [6] Další z častých příčin je kardiomyopatie a pokročilejší srdeční vady. [17]

Chronické srdeční selhání vede ke snížení tolerance zátěže, k zadržování tekutin a posléze k smrti. I přes četné pokroky je prognóza srdečního selhání špatná a téměř polovina pacientů umírá do 4 let od stanovení diagnózy. [17]

Diagnostická kritéria srdečního selhání jsou: symptomy srdečního selhání (slabost, únava, pocení, palpitace, stenokardie, dyspnoe, ortopnoe, kašel, astma cardiale, nykturie, oligurie, insomnie, nauzea, zvracení, obstipace), jak v klidu, tak při zátěži, prokázaná porušená srdeční funkce v klidu a odezva na léčbu. První dvě kritéria musí být vždy splněna, aby došlo ke stanovení diagnózy. [18]

Pacientovi se vyšetřuje krevní obraz, elektrolyty, kreatinin, kyselina močová, glykemie, jaterní testy a sediment. Dále se stanovují natriuretické peptidy či jejich fragmenty, zejména mozkový natriuretický peptid a N-terminální mozkový natriuretický peptid. Normální koncentrace těchto peptidů naznačují nepravděpodobnost srdečního selhání. [18]

2. Koronární angiografie

Koronární angiografie neboli koronarografie, je rentgenologické vyšetření věnčitých tepen, za pomoci katétru a kontrastní látky. Jedná se o nejběžnější operační postup celosvětově. V České Republice podstoupí toto vyšetření průměrně 50 000 pacientů ročně. [19] Vyšetření je neocenitelným testem pro detekci a kvantifikaci koronárního onemocnění, identifikaci chlopňových a dalších strukturálních abnormalit a měření hemodynamických parametrů. [20]

Průkopníkem selektivní koronární angiografie byl Sones v roce 1958. O dva roky později byla vylepšena specifickým upravením katetru podle Judkinse a Amplatza. Od té doby došlo k úplné revoluci v chápání patofyziologie onemocnění srdce. [19]

Před koronární angiografií je indikována kompletní anamnéza, důkladná fyzická prohlídka, kompletní krevní obraz, biochemické vyšetření, radiologické vyšetření a elektrokardiografie. Pacienti musí přijít nalačno. [21]

Koronarografie se provádí na katetrizačním sále, s použitím lokální anestezie a intravenózní sedace a obecně není výrazně nepříjemná. Pacient je normálně při vědomí a kooperuje s lékařem. Leží na zádech a je přikryt sterilními rouškami. Nejprve se musí místo vpichu zbavit ochlupení a poté se provede znecitlivění. Lékař vloží malý katétr (tenkou dutou trubičku o průměru 2-3 mm) přes kůži do tepny, buď v oblasti třísel (femorální tepna) nebo zápěstí (radiální tepna). [22] Dochází k posunu katétru a k otevření koronárních tepen. [23] Dále se do každé koronární arterie vstříkne malé množství kontrastního barviva (roztok obsahující jód, který je snadno vizualizován rentgenovými obrazy) a na rentgenu je pozorována protékající krev. Při vyšetření je nutné sledovat srdce z různých stran, protože věnčité tepny mají poměrně komplikované cesty kolem srdečního svalu, a tak by mohlo dojít k přehlédnutí některé z cest. [22] Jsou vytvářeny obrazy, které jsou nazývány angiogram. Celý postup trvá přibližně 20-30 minut. Po ukončení postupu je katétr odstraněn a tepna v noze nebo zápěstí je zašitá nebo ošetřena manuálním stlačením, aby se zabránilo krvácení. [23]

Stejně jako u jakékoliv invazivní metody existují specifické komplikace závislé na pacientech. Komplikace se značně liší od drobných problémů s krátkodobými následky, k život ohrožujícím situacím, které mohou způsobit nezvratné poškození, pokud není poskytnutá okamžitá péče. Naštěstí se od počátku koronarografie množství komplikací výrazně snížilo. Je to dáno hlavně zlepšením používaného zařízení a větším množstvím zkušeností. Riziko vzniku komplikací mohou zvýšit různé faktory, jedná se například o starší věk, renální nedostatečnost,

nekontrolovaný DM nebo obezitu. [20] Kontraindikací také může být těžká hypertenze, ventrikulární arytmie, těžká anémie, abnormality elektrolytů (např. hypokalemie), těžká koagulopatie nebo alergie na rentgenový kontrast. Většinu z těchto faktorů však lze před zahájením procedury odstranit. [21]

Nejčastější komplikace se vyskytují v místě vaskulárního přístupu a jsou také nejvýznamnějším přispěvatelem k úmrtnosti. Může dojít ke vzniku hematomu, retroperitoneálnímu krvácení, pseudoaneurysmatu, arteriovenózní píštěli, poškození arterie nebo žíly. Také může vzniknout trombóza a následkem i embolie. Objevuje se i IM. U některých pacientů byla zaznamenána bradykardie, hypotenze, nauzea a pocení. Velké komplikace nejsou tolik časté. Vyskytují se u méně než 2 % pacientů a mortalita je menší než 0,08 %. Proto lze tento postup úspěšně provést i u kriticky nemocného pacienta. Poměr rizik k přínosům koronarografie však musí být posuzován individuálně, aby se minimalizovaly potenciální problémy. [20]

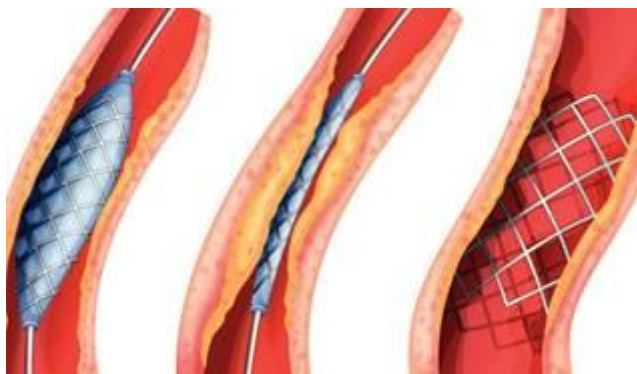
Požadovaným výsledkem angiografie je nález normálního zásobení srdce krví a nepřítomnost blokády. Angiografické snímky přesně odhalují rozsah a závažnost všech blokád koronárních artérií. Pomáhají zvolit optimální léčbu. Abnormální výsledek ve formě blokády tepny, popř. tepen, může vést k provedení angioplastiky, vložení koronárního stentu nebo bypassu koronární arterie. [23]

3. Perkutánní koronární intervence

Na základě výsledků koronarografie, klinického nálezu a dalších testů se rozhoduje o dalším postupu. Jedním z nich je PCI, jinak také koronární angioplastika. Jedná se o metodu léčby osob s ischemií myokardu nebo s IM. Cílem PCI je otevření koronární arterie a obnovení průtoku krve pomocí balónku. [24]

V roce 2017 oslavila PCI čtyřicáté výročí. První úspěšnou koronární angioplastiku provedl Andreas Grüntzig v roce 1977 ve Švýcarsku. Povedlo se mu vyvinout první úspěšnou léčbu a prokázat, že ji lze vykonat u pacienta, který bude plně vzhůru a zároveň nebude cítit žádnou bolest. Před PCI se realizovala koronární revaskularizace pouze chirurgickým by-passem, který je prováděn pod celkovou anestezií. Díky PCI je nyní možné uskutečnit revaskularizaci pod lokální anestezií a pacient se může během několika dní po zákroku vrátit k normálnímu životu. [25] Je nutno však zmínit, že PCI není vhodnou léčbou pro všechny pacienty s koronárním onemocněním a možnost léčby by měla být vždy projednána s lékařem. [24]

PCI vyžaduje použití srdeční katetrizační soupravy se speciálními zařízeními, rentgenovými schopnostmi a vyškoleným personálem. Radiální nebo femorální arterie je propíchnuta přes kůži speciální jehlou. Pod rentgenovým vedením je katetr protahován tepnou do aorty a pak jemně posunut do postižené koronární tepny. Tam se použije speciální balónek k otevření koronární arterie a obnovení průtoku krve. V tomto okamžiku bývá umístěn stent (obrázek 2), aby se udržel dobrý průtok krve poškozenou oblastí a nedošlo k opětovnému uzávěru. [24] Samotný zákrok trvá přibližně 20 minut, až jednu hodinu, málokdy déle. Během výkonu je pacient při vědomí stejně jako u koronarografie. V průběhu PCI může být pacient vyzván k nadechnutí, zakašlání atd., pro zjištění jeho stavu. Během výkonu se mohou vyskytnout drobné komplikace, jedná se však ve většině případů o přechodné a krátkodobé problémy, např. tlak a bolest na hrudi. [26]



Obrázek 2 Umístění stentu (převzato z: [27])

Pokud byla PCI provedená s místem vpichu v tříselech, je zavaděč odstraněn až po odeznění účinku antikoagulačního léku (cca po 4 hod.). Jestliže však byl vykonán radiální tepnou je možné materiál vytáhnout okamžitě po zákroku. Pro zabránění krvácení je místo vpichu stlačeno nejprve ručně a poté ještě speciálně upraveným pásem. Po zákroku ze zápěstí není nutný přísný pobyt na lůžku, ale pacient se může pohybovat po oddělení. Pobyt na oddělení trvá většinou do druhého dne. Je třeba, aby se pacient po dobu tří dnů vyhnul fyzické zátěži. [26]

3.1 Typy stentů

Stent se implantuje v naprosté většině případů. Zajistí průchodnost cévy stabilizací disekované intimy a redukuje akutní recoil (smrštění). Ideální stent by měl zajistit akutní průchodnost tepny, kontrolu pozdních komplikací (především restenózy) jak mechanicky, potlačením pozdního recoilu, tak i farmakologicky. Dále by měl zajistit zvětšení lumen tepny a měl by mít dobré mechanické vlastnosti, jako je nízký profil, snadnost zavedení, radiální sílu (radioopacitu), kompatibilitu se zaváděnými katetry a rentgenová viditelnost. [28]

V roce 1986 Puel a Sigwart vyvinuli první koronární stent, který působil jako lešení, a tak zabránil uzavření cévy během PCI a snížil výskyt restenózy (opětovný uzávěr), která se vyskytla až u 40 % pacientů. Jednalo se o kovové stenty, které byly stále spojeny se značnou mírou restenózy. Ta nastala jako výsledek neointimální hyperplazie uvnitř stentu způsobená migrací a proliferací buněk hladkého svalstva cév. [29]

V roce 2002 byly vyrobeny stenty potažené polymery, založené na vylučování léčiva, které inhibují vývoj neointimální hyperplazie uvolňováním antiproliferačních a protizánětlivých léků přímo do stěny cévy. U těchto stentů se však vyskytlo vyšší riziko vzniku pozdější trombózy. Proto bylo doporučeno, aby pacienti podstoupili léčbu aspirinem a

clopidogrelem po dobu nejméně šesti měsíců a poté následovala celoživotní léčba aspirinem. K významnému technickému pokroku a klinickým přínosům došlo vývojem platform stentu, včetně vzhledu, struktury a složení. Byly vyvinuty stenty ze slitin chromu-kobaltu a chromu-platiny. Tyto slitiny poskytují lepší pevnost a zvýšenou radioopacitu, chemickou stabilitu a odolnost proti korozi. Nové stenty mají za následek menší arteriální poranění a dále snižují riziko restenózy. [29]

Antiproliferační činidla, která se používají na platformách stentů s elucí léků jsou vysoce lipofilní molekuly, které jsou distribuovány do arteriální stěny a vykazují buď imunosupresivní účinky nebo antiproliferační účinky na buňky hladkého svalstva a tím inhibují neointimální hyperplazii. Polymerní povlaky, které jsou aplikovány na povrch stentu, slouží jako nosiče léčiva a umožňují řízení uvolňování léčiva. Pokrok v polymerní technologii byl zaměřen na snížení místních zánětlivých reakcí a na vznik trombózy. Typy složení a návrhy polymerů potažených na stentu určují kinetiku uvolňování léků po dobu týdnů až měsíců po implantaci. Reakce přecitlivělosti na nosiče polymeru však mohou vyvolat zpoždění a někdy i selhání reendotelizace a tím přispět ke vzniku trombózy. V důsledku toho byl vývoj zaměřen na výrobu biologicky rozložitelných polymerních povlaků. [29]

Poslední významnou změnu přístupu v oblasti PCI přináší biodegradabilní stenty, které poskytnou cévě pouze přechodnou oporu. Tím se mohou překonat komplikace současných stentů. Mají větší konformabilitu a flexibilitu a mohou redukovat změnu distribuce tkáňové biomechaniky a zachovat geometrii cévy. Aktuálně jsou vyvinuty stenty z polymeru nebo bioabsorbovatelné slitiny kovu. Nejčastějším používaným polymerem je poly-laktátová kyselina (PLLA), což je semikrystalický polymer, který je tvořen uspořádanými řetězci polymeru a amorfním segmentem, který řetězce spojuje a zároveň umožňuje rovnoměrnou distribuci léčiva. PLLA již několik desetiletí našla uplatnění v lékařství, zejména v ortopedii. PLLA je degradován hydrolyticky, několika kroky až na pyruvát. Po resorpci PLLA je prostor, kde byl stent umístěn postupně vyplněn proteoglykany a kolagenem. Přibližná doba absorpce jsou 2 roky. [28, 30]

Dalším materiálem pro výrobu biodegradabilní stentů mohou být slitiny hořčíku, které podléhají biokorozi a jsou absorbovány. Svými vlastnostmi se nejvíce přibližují kovovým stentům a jsou vyráběny laserovým řezáním z trubičky. Vhodným materiálem je také kyselina salicylová, respektive její molekuly, které jsou svázané molekulami mastných kyselin nebo

polykarbonový polymer, odvozený z tyrosinu, který je degradován na aminokyseliny, ethanol a vodu. [28]

Biodegradabilní stenty jsou ještě spíše ve vývoji a definitivní hodnocení těchto stentů bude možné až po získání dlouhodobých dat a po dokončení technologického vývoje. [30]

3.2. Komplikace PCI

Tradičně se PCI provádí přes femorální tepnu. S tím jsou však spojené komplikace s místem vpichu. Především je to krvácení do měkkých tkání či retroperitonea, pseudoaneuryzma a arteriovenózní fistula. Tyto komplikace se vyskytují přibližně u 3-5 % pacientů. Výjimečně mohou mít za následek trvalou invaliditu či úmrtí, občas je nutná transfúze krve a chirurgická revize. Vznikají v souvislosti s používáním agresivních antitrombotických režimů během PCI, při akutních koronárních syndromech, chlopenních náhradách, chronických fibrilací komor apod. Východiskem z těchto komplikací se zatím jeví miniaturizace instrumentace, použití alternativního cévního přístupu nebo nástroje k uzávěru místa vpichu. Proto byla provedena první PCI s místem vpichu do radiální tepny. Tuto cestu zvolil před dvaceti pěti lety Ferdinand Klemeneij a Laarman. Dochází k levostranné srdeční katetrizaci cestou radiální artérie. V Evropě volba radiálního přístupu rychle vzrůstá. Tato metoda má nízký výskyt komplikací v místě vpichu. Nejvíce na této cestě vpichu profitují nemocní s agresivní antitrombotickou léčbou, protože nedochází tak často ke krvácivým komplikacím. [31]

Obecně jsou rizika komplikací nízká, ale občas se mohou vyskytnout i u bezchybně provedeného výkonu. Mimo krvácení v místě vpichu se může objevit alergická reakce, trombóza a s ní spojená embolie nebo IM, porucha srdečního rytmu, zhoršení funkce ledvin nebo vznik infekce. [26]

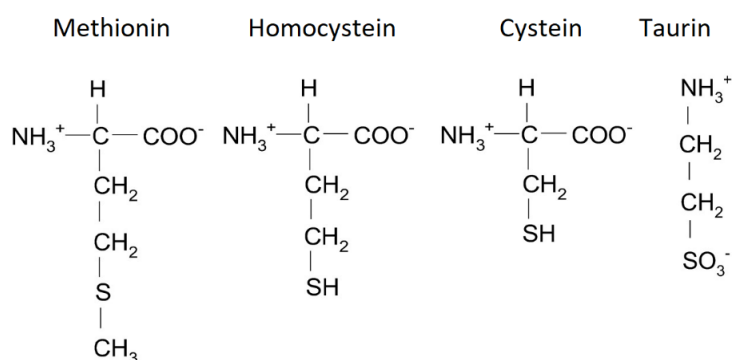
Další komplikací může být restenóza, která může vzniknout ve třech fázích. První fáze je elastická reakce stěny tepny na její roztažení, dochází k tzv. recoil. Vyskytuje se již v minutách a hodinách po intervenci. Tomu může zabránit implantace stentu. Druhou fází je tvorba nástěnného trombu. Ke vzniku dochází v místech poškozeného endotelu, kde došlo při dilataci k obnažení subendoteliálních struktur. Poté dochází k přitahování zánětlivých buněk, včetně makrofágů a lymfocytů. Třetí fáze se dělí do tří různých částí. Jedná se o shromažďování buněk hladkého svalstva a jejich postupné zvětšování, pravděpodobně v důsledku mediátorů, jejichž exprese je vyvolána vaskulárním poškozením. V první části dochází k replikaci buněk

hladkého svalstva v tunica media během prvních dvou dnů po dilataci tepny. Ve druhé části dochází k migraci buněk hladkého svalstva z medie do intimy. Tato část je v období mezi druhým a čtrnáctým dnem po intervenci a působí na tyto buňky především destičkový růstový faktor. Dochází ke změně fenotypu buněk hladkého svalstva z kontraktilního na syntetický typ. A ve třetí části dochází definitivně ke zúžení lumina tepny, vlivem akumulace extracelulární matrix ze změny fenotypu buněk a k negativní remodelaci stěny tepny. [32]

4. Thioly

V tkáních je obsaženo několik sirných aminokyselin a sloučenin síry. Zatímco některé našly svůj původ ve stravě, vytvářejí se jiné sirné aminokyseliny *in vivo* z methioninu v tkáních. Methionin se převádí na homocystein (Hcy), cystathionin, cystein, hypotaurin a taurin. [33]

Methionin, cystein, Hcy a taurin (obrázek 3) jsou čtyři běžné aminokyseliny obsahující síru, ale pouze první dvě jsou začleněny do bílkovin. Síra patří do stejné skupiny v periodické tabulce jako kyslík, ale elektronegativita síry je mnohem nižší než u kyslíku. Kyslík je druhým nejvíce elektronegativním prvkem v periodické tabulce. Nahrazení síry kyslíkem by tedy vedlo ke snížení hydrofobity aminokyselin. Tento rozdíl představuje některé z charakteristických vlastností aminokyselin obsahujících síru. [34]

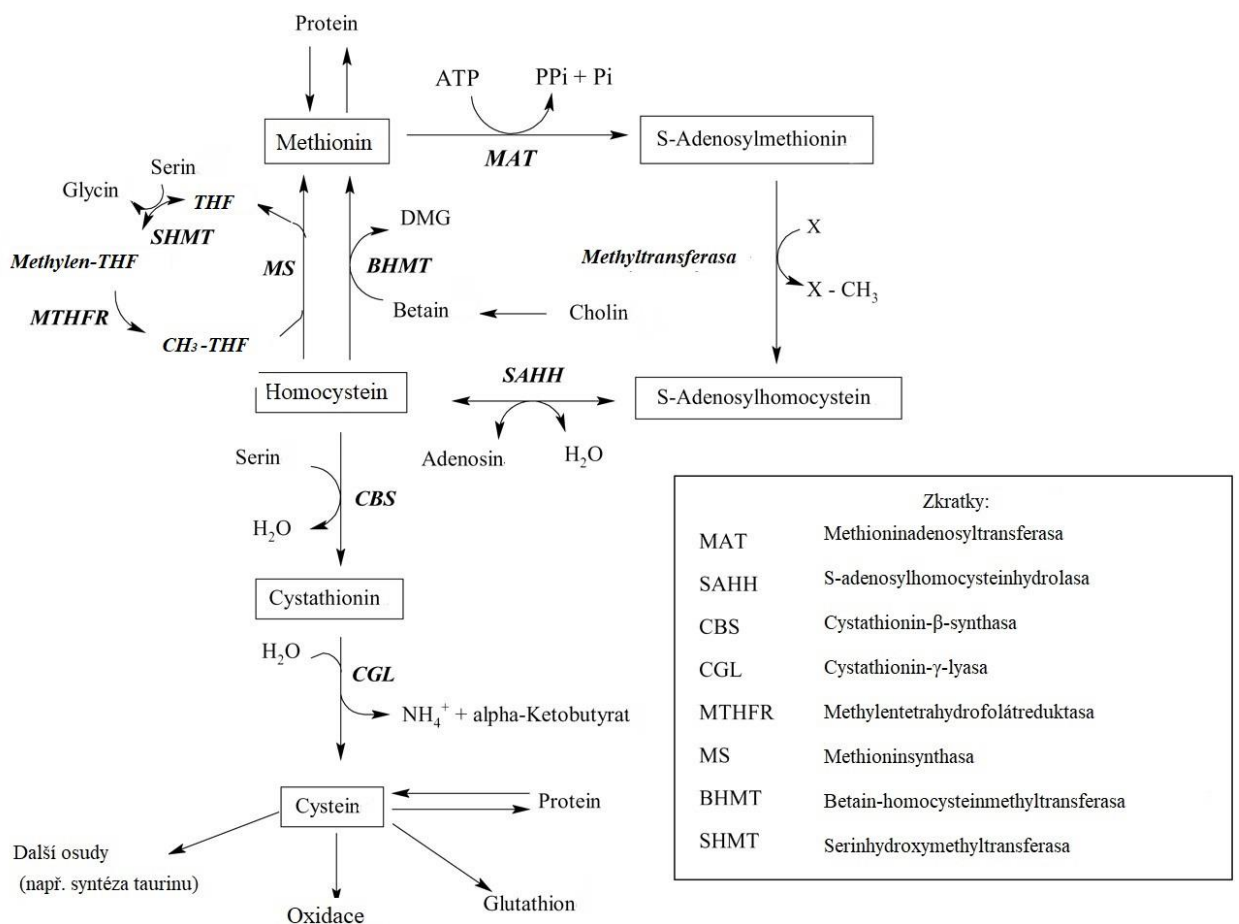


Obrázek 3 Vzorce thiolů (upraveno dle: [34])

Methionin i cystein hrají rozhodující roli v metabolismu buněk. Methionin je nezbytnou aminokyselinou v potravě, protože nemůže být syntetizován v množství dostatečném k udržení normálního růstu u savců. Patří mezi nejvíce hydrofobní aminokyseliny. To znamená, že většina methioninových zbytků v globulárních proteinech se nachází ve vnitřním hydrofobním jádru. V některých proteinech je část methioninových zbytků vystavena povrchu. Ty jsou náchylné k oxidaci na methionin sulfoxidové zbytky. Tyto zbytky mohou být redukovány na methionin pomocí enzymu methioninsulfoxidreduktasy. Cystein hraje důležitou roli v proteinové struktuře díky své schopnosti vytvářet meziprodukty a disulfidové vazby s jinými cysteinovými zbytky. Hraje také klíčovou roli ve stavu buněčného redoxu díky své thiolové skupině. [34, 35] Složením cysteinu a glycinu vzniká cysteinyl-glycin, který je hlavním meziproduktem v syntéze glutathionu, hlavního buněčného antioxidantu. [36]

4.1 Metabolismus thiolů

Metabolismus methioninu (obrázek 4) začíná jeho aktivací na S-adenosylmethionin (SAM) methioninadenosyltransferasou (MAT). SAM methyluje sloučeniny za vzniku produktů, jako je kreatin a fosfatidylcholin. Z reakce jsou odstraněny všechny tři fosfáty z ATP. SAM pak daruje svou methylovou skupinu akceptoru a vznikne S-adenosylhomocystein (SAH). Ten se pak hydrolyzuje na Hcy S-adenosylhomocysteinhydrolasou (SAHH). Tato sekvence reakcí je označována jako transmethylace a probíhá ve všech buňkách. Hcy může být methylován zpět na methionin pomocí methioninsynthasy (MS) nebo v játrech a ledvinách pomocí betainu betain-homocysteinmethyltransferasou (BHMT). MS používá jako donor methylu 5-methyl-tetrahydrofolát, zatímco BHMT využívá betain, který je produkován během oxidace cholinem, přijímaným potravou. [34]



Obrázek 4 Metabolismus methioninu (upraveno dle: [34])

Pokud je methionin přítomen v přebytku nebo je nutná syntéza cysteinu, může se Hcy dostat do transsulfurační dráhy, která má však omezenou distribuci tkáněmi. Probíhá pouze

v játrech, ledvinách, střevě, pankreatu a v nadledvinách. Začíná kondenzací Hcy se serinem za vzniku cystathioninu, při reakci katalyzované cystathionin- β -synthasou (CBS). Poté se cystathionin hydrolyzuje na α -ketobutyrát a cystein v reakci katalyzované cystathionin- γ -lyasou (CGL). Přeměna methioninu na cystein je nezvratný proces, který je závislý na výživě. Cystein může být následně katabolizován na taurin nebo je začleněn do vzniku glutathionu. Další možností je vznik proteinů. [34, 35, 37,]

Metabolismus methioninu poskytuje pozoruhodný příklad úlohy vitamínů v chemii buněk. Methioninsynthasa využívá methylkobalamin (B12) jako prostetickou skupinu. Methylová skupina použitá v methioninsynthase je poskytnuta z kyseliny listové. Methylentetrahydrofolátreduktasa (MTHFR) katalyzující přeměnu methylen-tetrahydrofolátu na methyl-tetrahydrofolát, obsahuje FAD jako prostetickou skupinu. Oba enzymy v transsulfurační cestě obsahují pyridoxal fosfát (B6). Z toho je zřejmé, že nedostatky každého z těchto vitamínů (vit. B12, kyselina listová, riboflavin a B6) jsou spojeny se zvýšenými hladinami Hcy v plazmě. Oxidační dekarboxylace α -ketobutyrátu produkovaného CGL je vyvolána pyruvátdehydrogenasou, takže niacin (NAD), thiamin a kyselina pantothenová mohou být také považovány za nezbytné pro metabolismus methioninu. [34]

Stále více vzrůstá důkaz, že sirné aminokyseliny hrají důležitou metabolickou a funkční roli v oblasti lidského zdraví a onemocnění. Studie dokazují, že transsulfurace a transmethylace jsou během normálního stravování dvakrát vyšší než během půstu. Snížená koncentrace SAM jako důsledek nízkého příjmu methioninu nebo deficitu folátu, vedou hlavně k deregulaci v methylaci DNA a jsou zapojeny do různých typů rakoviny. Klinické studie také dokazují, že zvýšené plazmatické hladiny Hcy jsou silně spojeny se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění, mrtvicí, s neurologickými poruchami, chronickým onemocněním ledvin, osteoporózou, gastrointestinálními poruchami, rakovinou, vývojem vrozených vad a Alzheimerovou chorobou. [35, 38, 39]

4.2 Homocystein

Hcy od svého objevu v roce 1932 provází mnoho spekulací. Jeho chemické vlastnosti ukázaly podobnost s cysteinem, a proto byl nazván Hcy. Hladina Hcy je ovlivňována remethylací a transsulfurací. Remethylace je primárně zodpovědná za regulaci hladin Hcy nalačno, zatímco transsulfurace reguluje převážně vyšší koncentrace Hcy, například v postprandiálním stavu. [37]

V plazmě existuje několik forem Hcy: volný Hcy, proteinově vázaný Hcy (S-vázaný a N-vázaný), oxidované formy Hcy a Hcy-thiolakton. Za normálních podmínek je většina (až 90%) plazmatického celkového Hcy (tHcy) N-vázaná a S-vázaná na γ -globuliny nebo sérový albumin. Méně než 1 % tHcy je přítomno ve volné redukované formě v plazmě a přibližně 10 % až 20 % tHcy je v různých oxidovaných formách. [39]

Hcy není stavební bílkovinou. Má potenciál degradovat disulfidové můstky cysteinu a tím změnit strukturu a funkci proteinu. Zejména u bílkovin s pomalým obratem, jako jsou vaskulární kolageny a elastin, může způsobit postupnou degradaci a tím i změnu architektury stěny cévní. [40]

Hcy se vykytuje v mnohem nižších koncentracích než např. cystein nebo glutathion. Koncentrace Hcy uvnitř buňky je kolem 1 $\mu\text{mol/l}$ a v plazmě se pohybuje od 5 do 15 $\mu\text{mol/l}$. Vyšší hodnoty jsou spojeny s řadou zdravotních komplikací, včetně kardiovaskulárních onemocnění. [41]

4.2.1 Hyperhomocysteinémie

Zvýšení plazmatické hladiny Hcy se projevuje jako hyperhomocysteinémie. Některé typy hyperhomocysteinémie jsou klasifikovány ve vztahu ke koncentraci Hcy: lehké (16-30 $\mu\text{mol/l}$), střední (31-100 $\mu\text{mol/l}$) a těžké (vyšší než 100 $\mu\text{mol/l}$). [39]

Těžké hyperhomocysteinémie se vyskytují převážně u pacientů se vzácnými genetickými poruchami. Za jednu z nejběžnějších genetických příčin těžké hyperhomocysteinémie a klasické homocystinurie je považován homozygotní nedostatek CBS, který vede k nárůstu až 40 ti-násobného tHcy nalačno. [42, 43]

Homocystinurie je autosomálně recesivní dědičná porucha, která se vyskytuje u přibližně u 1 z 200 000 až 300 000 obyvatel. Je způsobena v 90 - 95 % homozygotním deficitem CBS, přičemž většina zbývajících případů je zapříčiněna vadami remethylace. Gen CBS se nachází v subtelomerní oblasti 21q22. Nejčastější mutace CBS vedoucí k deficitu jsou 833 T \rightarrow C, 919 G \rightarrow A a 1224 A \rightarrow C. [37] Včasná diagnóza a intervence pomohou předcházet některým komplikacím homocystinurie, včetně ektopické čočky, mentální retardace a tromboembolických příhod. [44]

Hyperhomocysteinémie je oddělená, ale příbuzná entita homocystinurie. Jedná se však jen o zvýšení hladiny Hcy v krvi. Mírné zvýšení Hcy může existovat i bez homocystinurie. [44]

U široké populace převládá poměrně mírná hyperhomocysteinémie. Jedna z nejčastějších mutací nebo polymorfismů, která je spojena s mírným zvýšením plazmatického Hcy (hyperhomocysteinémie), je substituce 677 C → T (změna alaninu na valin) v enzymu MTHFR. [41, 42] Gen pro MTHFR se nachází na chromozomální oblasti 1p36. [37] Tato mutace má za následek, že může dojít ke snížené remethylaci na methionin. [41]

Hyperhomocysteinémie může vzniknout z nutričních nedostatků, způsobené nedostatečnou výživou obsahující folát nebo vitamíny B12 a B6. Rozhodující je také příjem bílkovin bohatých na methionin a cystein. Některé léky mohou zvýšit hladinu Hcy, jako např. Niacin, fibráty, methotrexát, l-dopa atd. [42]

Hlavní cestou vyloučení Hcy z organismu jsou ledviny, to znamená, že hyperhomocysteinémie může být také způsobená onemocněním ledvin. Celková hladina Hcy je u pacientů s chronickým onemocněním ledvin značně vyšší, než mírně zvýšené koncentrace, které se běžně vyskytuje u pacientů s vaskulárním onemocněním. To může být také pravděpodobná příčina přispívající k vysokému výskytu cévních komplikací u pacientů s chronickým renálním selháním. [43]

Hladina Hcy má pravděpodobně i synergický účinek s DM. Studie se v názorech na tuto problematiku rozcházejí. Hladiny Hcy u DM jsou modulovány hyperfiltrací a renální dysfunkcí, stejně jako nízkým obsahem folátu. Hyperhomocysteinémie byla spojena s mikroalbuminurií a retinopatií u DM 1. typu. U DM 2. typu je koncentrace Hcy v plazmě významným prediktorem kardiovaskulárních příhod a úmrtí. [45]

Hyperhomocysteinémie může vést ke zvýšení nežádoucích účinků rizikových faktorů, jako je hypertenze, kouření, metabolismus lipidů a lipoproteinů. Také může být podporou vývoje zánětu. Prevalence se může významně lišit mezi populacemi a pravděpodobně závisí na věku, stravě a genetických předpokladech. [43]

Před více než 50 lety bylo zjištěno, že pacienti s homocystinurií projevují výrazné zvýšení atherotrombotického kardiovaskulárního onemocnění a žilní tromboembolie. Tento objev poskytl podnět k prozkoumání role mírnějších stupňů hyperhomocysteinémie v patogenezi kardiovaskulárních chorob. Předpokládá se, že hyperhomocysteinémie vede k poškození endoteliálních buněk, ke snížení pružnosti cév a ke změně procesu hemostázy. [37]

Bylo navrženo několik možných mechanismů možné patogeneze, ale není zcela jasné, který z nich je dominantní. [37] Může jít o poškození endoteliálních buněk, proliferaci buněk hladké svaloviny, peroxidaci lipidů, zvýšenou regulaci protrombotických faktorů (XII a V), sníženou regulaci antitrombotických faktorů nebo endoteliálního oxidu dusnatého. [44]

1) Účinky na endotel:

Autooxidace Hcy stimuluje produkci reaktivních druhů kyslíku, včetně superoxidového aniontu, peroxidu vodíku a hydroxylového zbytku. Tyto radikály mohou vést k peroxidaci cirkulujících LDL a endotelových membrán. [37] Mnoho studií prokázalo *in vitro* schopnost Hcy zhoršit dostupnost endoteliálního oxidu dusnatého a zvýšit produkci volných radikálů kyslíku. Bylo prokázáno, že Hcy také inhibuje expresi široké škály antioxidantních enzymů. [41] Alternativně může tvorba Hcy-thiolaktonu vést k acylaci lysinových bočních řetězců v proteinech exprimovaných endotelem, což vede k cytotoxicitě. Stupeň poškození funkce endotelu během hyperhomocysteinémie je podobný stupni pozorovanému u jiných rizikových faktorů, jako je hypercholesterolémie, hypertenze a DM. [42]

2) Účinky na vznik apoptózy:

Ukázalo se, že Hcy souvisí s vývojem stresu endoplazmatického retikula, při kterém se hromadí nesprávně složené proteiny. Na počátku dochází ke zvýšení syntézy lipidů. Dlouhodobé nesprávné skládání však vede k aktivaci apoptózy. Hcy způsobuje stres endoplazmatického retikula tím, že naruší tvorbu disulfidové vazby a způsobí nesprávné posuny proteinů. [41]

3) Účinky na buňky hladké svaloviny:

Vystavení buněk hladkého svalstva *in vitro* Hcy vede k proliferativní odpovědi zvýšenou tvorbou a akumulací kolagenu. [37]

4) Další účinky na koagulační cesty:

Hyperhomocysteinémie může indukovat monocytární syntézu tkáňové faktoru, při čemž dochází ke vzniku trombózy. Může také vést k aktivaci krevních destiček a biosyntéze thromboxanu. Hcy v závislosti na dávce vede i ke změně molekuly faktoru V, což vede ke snížení inhibičního působení aktivovaného proteinu C. [37]

Vědci již delší dobu diskutují o tom, do jaké míry by měl být Hcy považován za rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění, ale většina studií dokládá souvislost a uznává ho jako důležité riziko.

Studie De Ruijtera a kol. z roku 2009 ukázala, že souvislost hladiny Hcy s kardiovaskulárními onemocněními je silná a překonává skóre Framinghamova rizika (pravděpodobnost rizika akutních koronárních příhod do 10 let) a další klasické rizikové faktory ve schopnosti předpovědět riziko kardiovaskulární úmrtnosti u starších osob bez kardiovaskulární anamnézy. Navíc prognostické schopnosti klasických rizikových faktorů, jako je hypercholesterolemie a hypertenze se s věkem oslabují. [46]

Nygaard a kol. již v roce 1997 hlásil silný a odstupňovaný vztah mezi hladinami Hcy v plazmě a celkovou mortalitou s angiograficky potvrzeným kardiovaskulárním onemocněním po mediánovém sledování 4,6 roku. Ve své studii měli pacienti s hladinou Hcy > 15 $\mu\text{mol/l}$ s celkovou mortalitou 24,7 % ve srovnání s 3,8 % u pacientů s hladinou Hcy < 9 $\mu\text{mol/l}$. Později také Stubbs a kol. uvedl podobnou souvislost plazmatických hladin Hcy s dlouhodobou prognózou u pacientů s akutním koronárním syndromem. Zjistil, že pacienti s hladinou Hcy > 12,2 $\mu\text{mol/l}$ mají 2,6 násobně vyšší riziko srdeční smrti a re-infarktu myokardu. [47]

Nedávná metaanalýza u pacientů s chronickým onemocněním ledvin zjistila významné přínosy snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění léčbou foláty, zejména u pacientů s vyšší hladinou Hcy. Další výzkumy zaměřené na patogenezi Hcy jsou důležité k tomu, aby přispěly k potenciálně novým terapeutickým postupům ke snížení hladin Hcy a zlepšení výsledků. [47]

4.2.2 Hladina homocysteinu po intervenci

Bylo navrženo mnoho patologických mechanismů, které by mohly zvýšit riziko restenózy po PCI. Výsledky klinických studií zkoumajících Hcy a restenózu po koronárních zákrocích jsou zatím v rozporu. V budoucnu je třeba zjistit, zda a za jakých podmínek se Hcy účastní restenózy a zda by měla být pro tyto pacienty doporučena léčba vitamíny. [48]

Jak již bylo uvedeno, bylo popsáno mnoho možných mechanismů patogeneze Hcy ve spojení s aterosklerózou, nemusí se Hcy nezbytně podílet stejným způsobem i na restenóze. [48]

Multifaktorová etiologie restenózy zahrnuje mechanické a hemostatické faktory, stejně jako změněnou buněčnou proliferaci. Hcy může přispět vzniku restenózy po perkutánních

koronárních zákrocích zejména díky interakci se systémem koagulace a jeho účinkem podporujícím růst buněk hladkého svalstva cév. [48]

Byly navrženy tři mechanismy patogeneze Hcy na restenózu:

- 1) přijímání leukocytů zvýšením exprese a sekrece monocytárního chemoatraktantu proteinu-1 a interleukinu-8. [49]
- 2) zvýšená proliferace buněk hladkého svalstva a zvýšená produkce kolagenu. [49]
- 3) výrazná akumulace krevních destiček v důsledku přímých proagregačních účinků Hcy nebo poškození endotelem zprostředkované inhibice krevních destiček. [49]

Existuje mnoho studií, které zpochybňují souvislost hodnoty Hcy s restenózou a studie, které naopak tuto souvislost potvrzují. Kosokabe a kol. v roce 2001 zkoumal vztah mezi genotypy MTHFR, hladinami Hcy a restenózou. Studie ukázala, že genotypy MTHFR mají vliv na neointimální hyperplazii, zatímco hladina Hcy nemá žádný vliv. [46]

Studie provedená Zairisem a kol. z roku 2002 zahrnující pacienty se SAP a akutním koronárním syndromem po úspěšném koronárním stentingu, také nenalezla významnou souvislost mezi hladinami Hcy v plazmě a zvýšenou úmrtností na koronární onemocnění. Byli vyřazeni pacienti s bloádou levého svazku, infekcí nebo zánětlivými onemocněními, maligním onemocněním, jaterní dysfunkcí, plazmatickým kreatininem vyšším než 1,5 mg/dl, anamnézou IM, koronární revaskularizací v posledních šesti měsících nebo ejekční frakcí levé komory méně než 35 %. Ve studii bylo 465 pacientů, kteří podstoupili implantaci stentu. Vzorky byly odebrány před PCI a $22,1 \pm 8,3$ měsíců po PCI. Ve studii byla také měřena hladina zánětlivého markeru C-reaktivního proteinu (CRP) a rizikového faktoru lipoproteinu (a). Průměrná výchozí hladina tHcy byla o 8 $\mu\text{mol/l}$ vyšší u pacientů s anamnézou koronárního bypassu. O 5 $\mu\text{mol/l}$ vyšší u pacientů s anamnézou cerebrovaskulárního onemocnění nebo periferním arteriálním onemocněním. O 4 $\mu\text{mol/l}$ u pacientů s věkem ≥ 75 let. Také byly zvýšené hladiny průměrně o 2 $\mu\text{mol/l}$ u pacientů s poškozením více koronárních tepen a o 1 $\mu\text{mol/l}$ u DM. Do jednoho roku se u 121 pacientů vyvinula klinická recidiva příznaků včetně 10 lidí, kteří zemřeli. Studie zjistila, že nezávislými prediktory klinické recidivy byl DM, zbytková stenóza po PCI a plazmatická hodnota $\text{CRP} \geq 0,68$ mg/dl. Bylo zjištěno, že tHcy ani další stanovované markery nesouvisely s restenózou. Výsledky však mohou být přičítány kratšímu trvání sledování (22 měsíců) a různým zahrnutým skupinám pacientů. [50]

Se stejným závěrem přišel i Breuckmann a kol. v roce 2005. Ve studii bylo 143 pacientů se SAP a trvala 6 měsíců. Byly jim implantovány holé kovové stenty. Ze studie byli vyřazeni pacienti s NAP, akutním IM, chronickou renální nedostatečností a také pacienti, kteří užívali vitamín B. Hladina Hcy v době zákroku ani šest měsíců po zákroku nevykazovala žádný vliv na restenózu. Za celé období sledování se nevyskytly žádné závažné srdeční příhody včetně IM a úmrtí. [51]

Schnyder a kol. se ve studii z roku 2002 také zabývali problematikou vlivu hladiny Hcy na vznik restenózy po PCI. Ve studii bylo 205 pacientů s alespoň jednou koronární stenózou. Z celkového počtu podstoupilo 183 pacientů šesti měsíční angiografické sledování. Ze studie byli vyloučeni pacienti s nedávným IM, renální dysfunkcí, megaloblastickou anémií, užívající vitamíny a pacienti po bypassu. Průměrný věk pacientů byl 61 let, ¼ byly ženy a jednalo se o středoevropskou populaci. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin. V I. skupině byli pacienti s hladinami Hcy < 9 μmol/l a v II. skupině byli pacienti s hladinami Hcy ≥ 9 μmol/l. Během sledování, několik pacientů zemřelo. Ti, kteří zemřeli, měli významně vyšší hladiny Hcy než ti, kteří přežili. Výskyt závažných nežádoucích srdečních příhod byl signifikantně nižší u pacientů s hladinami Hcy < 9 μmol/l. Tato studie poskytla první důkaz, že hladina Hcy předpovídá restenózu po PCI. [52]

Yeh a kol. provedli studii, která trvala od roku 2003 do roku 2014. Do studie bylo zapojeno 1307 pacientů (průměrný věk 62 ± 12 let, interval 24–93 let, 81,5 % muži) s implantovanými holými kovovými stenty a byli sledováni po dobu 58 ± 41 měsíců. Na 1307 pacientů bylo implantováno celkem 1800 stentů, což znamená, že někteří pacienti měli více stentů. Ze studie byli vyřazeni pacienti se závažným mnohočetným onemocněním vyžadujícím bypass, s netolerancí duální antiagregační léčby a nedodržující studijní protokol, dále byli také vyřazeni pacienti s renální insuficiencí, aktivní infekcí, zánětlivým onemocněním nebo rakovinou. Všichni pacienti dostávali standardní ischemickou léčbu, včetně dvojité antiagregační léčby aspirinem a clopidogrelem nebo tikagrelorem, beta blokátory, statiny, inhibitory ACE nebo blokátory angiotenzinového receptoru. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin. Kdy pacienti v I. skupině měli hodnoty Hcy < 12 μmol/l a ve II. skupině byli pacienti s hladinou Hcy ≥ 12 μmol/l. Mezní hodnotou pro hyperhomocysteinémií byla tedy hladina 12 μmol/l. Pacienti ve II. skupině byli významně starší a mnoho jich trpělo DM, hypertenzí, systolickou dysfunkcí levé komory a měli již v minulosti mrtvici. Celková úmrtnost související se srdečním onemocněním byla vyšší ve skupině II. Nakonec bylo sledováno 1289 pacientů, kteří přežili. Nejenže ve II.

skupině byla vyšší úmrtnost, ale pacienti měli také vyšší procento nových lézí koronární artérie vyžadujících stent. Analýza ukázala, že míra dlouhodobých kardiovaskulárních příhod byla signifikantně spojena s DM, ejekční frakcí levé komory, postižením více koronárních tepen, typem lézí, minimálním průměrem lumina, hladinou kreatininu v séru a hladinou Hcy v plazmě $> 12 \mu\text{mol/l}$. Výsledkem studie je zjištění, že pacienti s hyperhomocysteinémií mají riziko dlouhodobých kardiovaskulárních příhod po implantaci holých kovových stentů a nutnost nového stentování. V této studii však bylo i několik omezení: byla použita mezní hladina Hcy $12 \mu\text{mol/l}$, nebyly přesně definovány časy sběru krve, hladiny Hcy mohou ovlivnit četné faktory prostředí (např. strava), nebyla zohledněna hladina kyseliny listové, vitamínu B6 nebo B12 ani genetický polymorfismus MTHFR a v poslední řadě výsledky nemusí být stejné pro jiné rasy a etnické skupiny. [47]

Han a kol. se ve studii z roku 2016 zabývali vlivem Hcy na progresi neischemických koronárních lézí u starších pacientů s akutním koronárním syndromem po PCI. Ve studii, která probíhala 12 měsíců, bylo zahrnuto 223 pacientů starších 65 let s akutním koronárním syndromem, kteří podstoupili úspěšnou PCI a byl jim implantován stent. Hladiny Hcy byly detekovány u všech pacientů před PCI a přibližně 12 měsíců po PCI. Z této studie byli vyřazeni pacienti s vážným onemocněním ledvin, jater nebo s maligními onemocněními a pacienti, kteří již v minulosti podstoupili PCI nebo bypass. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin: I. skupina s hladinou Hcy $\geq 15 \mu\text{mol/l}$ a II. skupina s hladinou Hcy $< 15 \mu\text{mol/l}$. Jako první volba při výběru stentů byly lékové stenty. Medián věku pacientů byl 71,1 let, 75,8 % byli muži a 40,8 % pacientů trpělo DM. Během sledování bylo 55 pacientů s progresí koronárního poškození. Ve skupině I. byl vyšší poměr mužů a kuřáků než ve skupině II. Po 12 měsíčním sledování byla progresie neischemických lézí u 41 pacientů z I. skupiny a u 14 pacientů z II. skupiny. Bylo zjištěno, že Hcy a DM je u starších lidí nezávislým rizikovým faktorem v progresi těchto lézí, zatímco nebyly žádné významné rozdíly v pohlaví, u kuřáků a v hladině celkového cholesterolu. [46]

Je však ještě příliš brzy na závěry. Jsou nutné další klinické studie s různými postupy a metodami, delší sledovací období a specifická populace pacientů, aby bylo možné pozorovat dopady Hcy na progresi koronární aterosklerózy. [47]

5. Možnosti stanovení

5.1 Preanalytická fáze

Důležité je zmínit, že koncentraci Hcy ovlivňuje dieta, věk, pohlaví a rasa. S rostoucím věkem dochází k vzestupu koncentrace Hcy v plazmě, v souvislosti se snížením hladiny vitamínu B a s poklesem glomerulární filtrace. Dále hladinu Hcy ovlivňuje poloha při odběru (bylo prokázáno, že při odběru vleže dochází k poklesu Hcy) nebo doba zatažení paže. Proto je nutné brát zřetel na správný odběr vzorku. [53]

Vzorek krve od pacienta je odebrán do vakuové zkumavky. Odběr probíhá nalačno, kdy je doporučeno nejíst 12 hodin před odběrem. Ke vzorku je přidáno antikoagulační činidlo ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) nebo heparin a posléze se stočí na centrifuze. Použitím citrátového antikoagulačního činidla by došlo ke snížení hodnoty Hcy o 5-15 %. Pokud okamžité odstředování stabilizované krve není možné, lze nárůst Hcy snížit udržením krve v chladu a oddělením plazmy od buněk do 1 hodiny. Dlouhodobým kontaktem plazmy s erytrocyty se zvyšuje hladina Hcy v plazmě. To je důvodem, proč by neměl být Hcy nikdy měřen v séru, protože koncentrace Hcy se zvýší o 5 ± 10 % během doby potřebné k dokončení koagulace před centrifugací. [54, 55]

Vliv hemolýzy na koncentraci tHcy v plazmě není zas až tak zřetelný. Pokud však bude masivní, může dojít k malým procentuálním změnám v koncentraci tHcy. [54]

Jak bylo zmíněno stabilita Hcy ve vzorcích je velmi omezená a ve vzorku plné krve za laboratorní teploty může za 1 hodinu vzrůst koncentrace Hcy o 10 %, za 4 hodiny o 20-35 %, za 24 hodin až o 60-75 %. [53] Po centrifugaci a oddělení krevních elementů je Hcy stabilní 4 dny. Pro delší skladování může být plazma zamrazena. Stabilita v lednici (4 °C) je několik týdnů, v mrazáku při -20 °C i několik let. Zmrazení přináší problém s nehomogeností vzorku, a proto je po rozmrazení nutné vzorek důkladně promíchat. [54]

V tabulce 1 jsou uvedeny referenční hodnoty thiolů. V praxi se však většinou stanovuje pouze Hcy. Také je možnost stanovení koncentrace vitamínů B₆, B₁₂ a kyseliny listové. [53]

Tabulka 1 Referenční hodnoty thiolů [56]

	Referenční mez
Cystein	250 ± 20 µmol/l
Homocystein	5-15 µmol/l
Methionin	6-40 µmol/l
Cysteinyl-glycin	30 ± 20 µmol/l

U většiny analytických metod je nutné provést nejprve redukci vzorku, k uvolnění thiolů z vazby na proteiny. Redukčním činidlem může být např. dithiothreitol (DTT), tris-(2-karboxyethyl)-fosfin, tetrahydroboritan sodný. [57]

5.2 Analytická fáze

Metody použité k určení hladiny Hcy v různých biologických vzorcích můžeme rozdělit na: chromatografické, enzymatické a kombinované testy (enzymatická reakce s následnou imunoanalýzou). Koncentrace celkového Hcy může být také hodnocena pomocí kapilární elektroforézy s vhodným detekčním systémem. Také byly vyvinuty testy na základě přidání komplexů přechodných kovů. Z těchto metod je nutné vyzdvihnout chromatografické stanoviště, které se využívá nejčastěji. [39]

5.2.1 Enzymatické stanovení

U enzymatického stanovení se využívá sled 2 nebo 3 reakcí, při kterých dochází k redukci a následné konverzi Hcy, kdy vzniknou druhotné produkty (H₂O₂, H₂S, pyruvát). [52] Enzymem může být například CBS, methionin-γ-lyasa z *E. coli* nebo kombinace CBS a laktátdehydrogenasy. Také lze využít homocystein-α,γ-lyasu, která uvolňuje H₂S a ten se poté převede na fluorescenční chromofor reakcí s N,N-dibutylfenylendiaminem. Enzymatické metody jsou levné a mají vyšší linearitu v porovnání s imunostanovením. [58]

5.2.2 Kombinované stanovení

Kombinované testy se provádí konverzí Hcy na SAH a následnou vazbou SAH na monoklonální anti-SAH protilátku s fluorimetrickou detekcí nebo kolorimetrickou detekcí využívající sekundární protilátku spojenou s peroxidázou. [58] Díky komerčně dostupným soupravám se imunostanovení rozšířilo. Je to především rychlá, automatizovaná metoda, která je vhodná pro rutinní použití. [53]

5.2.3 Elektroforetické stanovení

Kapilární elektroforéza se provádí s pomocí laserové indukované fluorimetrické detekce. Jedná se o vysoce selektivní, přesnou, rychlou metodu s jednoduchou instrumentací. Hcy se uvolní z vazby na proteiny a poté reaguje s 5-bromomethylfluoresceinem. [57, 58]

5.2.4 Kolorimetrické metody stanovení a chemosensory

Je nutné ještě zmínit kolorimetrické metody stanovení, které využívají enzymové reakce. Po redukci vzorku DTT následuje katalýza specifickými enzymy. Podstatou stanovení Hcy a cysteinu je reakce aldehydických skupin azobarviv s cysteinem a Hcy při neutrálním pH. Můžeme pozorovat pouhým okem změny barvy z růžové na žlutou. [57]

Také lze stanovení provést pomocí chemosensory, kde se využívá komplex Iridia (III). Luminiscence změní barvu z tmavě červené na zelenou. Nebo se může použít komplex Platiny (II), kde luminiscence změní barvu ze zelené na oranžovou. [58]

5.2.5 Chromatografické stanovení

Chromatografické stanovení lze rozdělit na kapalinovou chromatografii a plynovou chromatografii. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je nejvíce využívanou metodou pro stanovení Hcy v krvi. Lze využít fluorescenční detekci, ultrafialovou spektrofotometrickou detekci, kolorimetrickou detekci a elektrochemickou detekci, také lze aplikovat kombinaci s hmotnostní spektrometrií. [58]

Plynová chromatografie se používá v kombinaci s hmotnostní spektrometrií s elektronovou ionizací a s plamenově fotometrickou detekcí. [57] Jedná se o méně používanou metodu. Nejprve je vzorek redukován DTT, deproteinován ethanolem a derivatizován methylchloromravenčnanem a toluenem. [57]

U HPLC s fluorescenční detekcí je nutná předkolonová derivatizace thiolů. Používají se fluorogenní látky jako např. amonium-7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonát. Poté následuje HPLC a fluorescenční detekce. [57]

HPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií je vysoce selektivní, specifická a časově nenáročná technika. Lze jí stanovit hladinu tHcy v plazmě i v moči. Je vhodná pro rutinní

stanovení a není potřeba derivatizace vzorku. Derivatizace není nutná ani u HPLC s elektrochemickou detekcí, kde je stanovení založeno na oxidační-redukčních reakcích. [57]

HPLC s fotometrickou detekcí vyžaduje derivatizaci. Využívá se specifická postkolonální detekční metoda, která je založená na shlukování zlatých nanočástic s aktivním povrchem. Hcy nebo cystein agreguje zlaté nanočástice a dochází ke snížení nebo naopak zvýšení absorbance roztoku při daných vlnových délkách. [57]

5.2.5.1 HPLC s elektrochemickou detekcí

Přítomnost thiolové skupiny je vhodná pro elektrochemickou detekci na základě oxidačně-redukčních reakcí. Zpracování vzorků je jednoduché, protože není potřeba časově náročná derivatizace před analýzou. Stabilita a přesnost testu závisí na pečlivé údržbě, aby se zabránilo kontaminaci nebo poškození elektrody. [55]

Martin a kol. v roce 1999 zlepšil přesnost použitím penicilaminu jako interního standardu a nainstaloval ochranný článek mezi čerpadlo a dávkovací zařízení, aby elektrochemicky vyčistil mobilní fázi před přidáním vzorku a snížil tak proud na pozadí detektoru. [55]

Elektrooxidační reakce Hcy na tradičních elektrodách nastane při velkých potenciálech. Byly používány různé druhy elektrod, ale elektrochemická oxidace thiolů na těchto elektrodách byla komplikována adsorpcí a účinkem oxidů na povrchu elektrod. V roce 1999 Melnyk a kol. popsal metodu s použitím dvou analytických cel se dvěma porézními uhlíkovými elektrodami. Byly schopné měřit jak celkové, tak volné aminothioly, včetně Hcy, methioninu a cysteinu a dosáhly přijatelné celkové nepřesnosti. Výhodami těchto elektrod je široké rozmezí potenciálu. [55, 59]

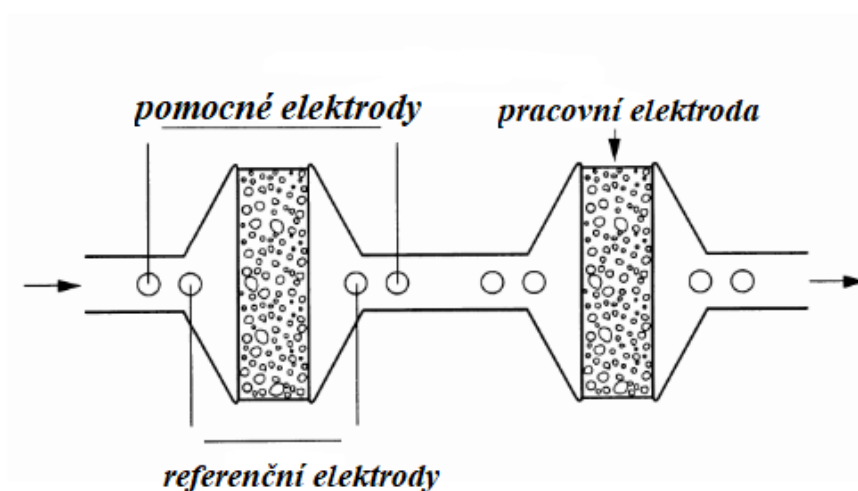
V elektrochemické detekci se dává přednost coulometrickému detektoru, kde proudí eluát přes porézní grafitovou elektrodu. Detektor může poskytnout lepší citlivost stanovení.

Colouchem III

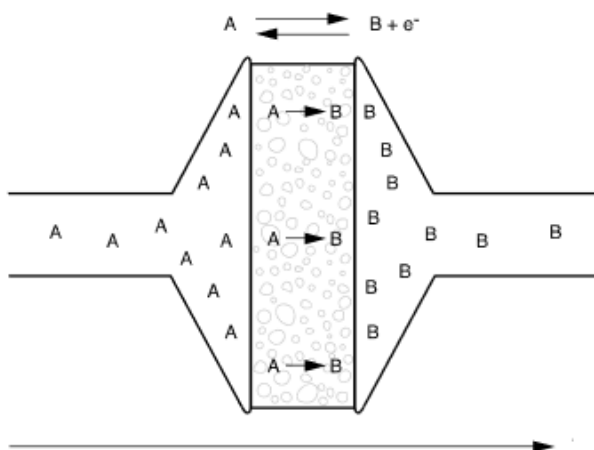
Pro stanovení thiolů je vhodný tento typ detektoru. Detektor pracuje na coulometrickém principu. Je vybaven analytickou a ochrannou celou. Elektrochemické cely jsou součástí, kde dochází k oxidaci (redukci) a generuje se na nich proud z oxidace (redukce) požadované sloučeniny. Tento proud je přeměněn na výstupní napětí a je zpracováván a přenášen do

záznamového zařízení. Analytická cela je složena ze dvou pracovních grafitových elektrod. Na tyto elektrody je vkládáno odlišné napětí. [60]

Coulometrický snímač zahrnuje průtok eluentu přes porézní grafitovou elektrodu, jak je znázorněno na obrázku 5. Povrch elektrody je velmi velký, takže v podstatě všechny elektroaktivní složky budou oxidovány nebo redukovány (obrázek 6). Vzhledem k tomu, že oxidováno (redukováno) bude mnohem větší množství elektroaktivní látky bez zvýšení šumu, může tento detektor poskytnout významně větší citlivost než amperometrický snímač. [60]



Obrázek 5 Průřezový pohled na coulometrický sensor (upraveno dle: [60])



Obrázek 6 Účinnost coulometrického čidla (upraveno dle: [60])

Ve většině aplikací zahrnujících coulometrické senzory je potenciál konstantní (DC režim) a proud se měří jako funkce času ve formě píků. Když elektroaktivní složky projdou celou, proud se bude zvyšovat nebo snižovat vzhledem k baselině. [60]

Ve vzorku se stanovuje více elektroaktivních složek, a proto je chromatograficky oddělena a v detektoru je v daném okamžiku přítomna pouze jedna sloučenina (např. pouze cystein). [60]

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Stanovení Hcy bylo provedeno v návaznosti na předchozí diplomovou práci metodou iontové párové vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému obrácených fází. [56] V této metodě dochází k tvorbě iontových párů mezi dělenými látkami iontové povahy. Mimo Hcy byly stanoveny i další thioly, jako je cystein, cysteinyl-glycin a methionin.

6.1 Přístroje a pomůcky

- elektrochemický detektor Coulochem III (ESA, USA)
- analytická cela 5010A (ESA, USA)
- ochranná cela 5020 (ESA, USA)
- vysokotlaké analytické čerpadlo – LC-10AD VP (Shimadzu, Japonsko)
- chromatografická kolona 124-4, RP-C18 (LiChroCart, Německo)
- analytické váhy LB-1050/2 (Laberte, Maďarsko)
- předvážky Kern 440-35A (Kern, Německo)
- pH metr (Hanna Instruments, USA)
- ultrazvuková vana K2 (Kraintek, Slovensko)
- ultrazvuková vada K1L (Kraintek, Slovensko)
- termoblok Isotemp 145 D (Fisher Scientific, Kanada)
- chlazená odstředivka 5417 R (Eppendorf, Německo)
- třepačka Heidolph Reax top (Heidolph, Německo)
- filtrační aparatura (Supelco, USA)
- nylonové filtry (Nylon 66) 0,2 μm x 47 mm (Supelco, USA)
- nylonové filtry (N-4-2) 0,25 μm x 4 mm (Supelco, USA)

- mikrozkušavky s nylonovým filtrem Spin-X centrifuge (Corning, USA)
- automatické pipety – 100 µl, 1000 µl, 10 ml (Biohit, USA)
- Hamiltonova mikrostříkačka – 50 µl (Hamilton, Švýcarsko)
- špičky pro automatické pipety – 100 µl, 1000 µl, 10 ml
- mikrozkušavky Eppendorf
- odměrné laboratorní sklo (SIMAX, ČR)
- vyhodnocovací software CLARITY (Data Apex s.r.o., ČR)
- tabulkový procesor Microsoft Excel (Windows, USA)
- statistický software SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc, USA)

6. 2 Použité chemikálie

- L - homocystein ($C_4H_9NO_2S$, $M_r = 135,18$ g/mol) p.a. (Sigma, Německo)
- L – cystein ($C_3H_7NO_2S$, $M_r = 121,16$ g/mol) p.a. (Sigma, Německo)
- L – methionin ($C_5H_{11}NO_2S$, $M_r = 149,21$ g/mol) p.a. (Sigma, Německo)
- Cysteinyl-glycin ($C_5H_{10}N_2O_3S$, $M_r = 178,2$ g/mol) p.a. (Sigma, Německo)
- Kyselina sulfosalicylová ($C_7H_6O_6S \cdot 2H_2O$, 99 %, $M_r = 254,22$ g/mol) p.a. (Sigma, Německo)
- Kyselina chlorovodíková (HCl, 36,6%, $M_r = 36,46$ g/mol) p.a. (Sigma, Německo)
- L- penicilamin [$(CH_3)_2C(SH)CH(NH_2)CO_2H$, $M_r = 149,212$ g/mol] p.a. (Sigma, Německo)
- 1,4-dithioerythrol ($C_4H_{10}O_2S_2$, $M_r = 154,253$ g/mol) p.a. (Sigma, Německo)
- Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4 , $M_r = 120$ g/mol) p.a. (Sigma, Německo)

- Oktan-1-sulfonan sodný monohydrát ($C_8H_{17}NaO_3 \cdot H_2O$, $M_r = 234,29$) p.a. (VWR chemicals, Belgie)
- Kyselina trihydrogenfosforečná (H_3PO_4 , 85 %, $M_r = 98$ g/mol) p.a. (Sigma, Německo)
- Acetonitril gradient grade pro HPLC (CH_3CN , $M_r = 98$ g/mol), (LiChrosolv, Německo)
- Hydroxid sodný (NaOH, $M_r = 40$ g/mol) p.a. (Sigma, Německo)
- Kontrolní roztok Hcy – Homocysteine Control kit (AXIS-SHIELD, UK)
- Deionizovaná voda, $G < 0,05$ μS , Smart-2Pure (TKA, Německo)

6.3 Příprava roztoků

Zásobní roztoky

Byly připraveny zásobní roztoky:

- Hcy o konc. 2000 $\mu mol/l$: rozpuštěním 13,5 mg Hcy v 50 ml deionizované vody; roztok byl poté zředěn redestilovanou vodou na koncentraci 500 $\mu mol/l$
- Cystein o konc. 2000 $\mu mol/l$: rozpuštěním 12,1 mg cysteinu v 50 ml deionizované vody; roztok byl poté zředěn redestilovanou vodou na koncentraci 1600 $\mu mol/l$
- Methionin o konc. 500 $\mu mol/l$: rozpuštěním 3,7 mg v 50 ml deionizované vody
- Cysteinyl-Glycin o konc. 500 $\mu mol/l$: rozpuštěním 4,5 mg v 50 ml deionizované vody
- 10 mmol/l kyselina chlorovodíková (36,6%): smícháním 84 μl kyseliny a doplněno do 100 ml deionizovanou vodou
- Vnitřní standard penicilaminu o konc. 25 mmol/l: rozpuštěním 37,3 mg v 10 ml deionizované vody; roztok byl poté zředěn na koncentraci 20 mmol/l
- Kyselina sulfosalicylová (asi 15%): rozpuštěním 7,5 g kyseliny v 50 ml deionizované vody
- Redukční činidlo 1,4-dithioerythriolu o konc. 0,2 mol/l: rozpuštěním 154,3 mg v 5 ml deionizované vody

Takto připravené zásobní roztoky byly zamrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a v případě každého měření byly rozmrazeny a použity.

Pracovní roztok

Byl připraven pracovní roztok smícháním 250 μl 0,2 mol/l 1,4-dithioerythriolu, 20 μl 20 mmol/l roztoku penicilaminu a 5 ml deionizované vody.

Směsný kalibrační roztok standardů

Zásobní roztoky standardů byly smíchány v poměru 1:1:1:1, na koncentrace 1600 $\mu\text{mol/l}$ pro cystein a 500 $\mu\text{mol/l}$ pro Hey, cysteinyl-glycin a methionin. Nato byla vytvořena kalibrační řada standardů (tabulka 2). Řada se skládala z 5 kalibračních bodů od nejvyšší po nejnižší koncentrace. Se vzorky standardů se poté postupovalo stejně jako se vzorkem (viz níže).

Tabulka 2 Kalibrační řada

	Objem směsného kalibračního roztoku + objem deionizované vody [μl]	Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]			
		Cystein	Homocystein	Cysteinyl-glycin	Methionin
1.	125 + 875	200	62,5	62,5	62,5
2.	75 + 925	120	37,5	37,5	37,5
3.	50 + 950	80	25	25	25
4.	25 + 975	40	12,5	12,5	12,5
5.	10 + 990	16	5	5	5

Vzorek plazmy

Bylo napipetováno 200 μl vzorku plazmy a přidáno 50 μl pracovního roztoku. Následovalo promíchání a inkubace 15 minut při 37°C . Dále bylo přidáno 50 μl 15 % kyseliny sulfosalicylové a tím provedena deproteinace vzorku. Po dokonalém promíchání následovala

15 minut inkubace při 4°C. Vzorek byl odstředěn (22000 x g, 10 minut, 4 °C) a oddělený supernatant byl přefiltrován přes nylonový filtr (N-4-2) o velikosti pórů 0,25 µm.

Proplachovací roztoky

Byl připraven 1 litr roztoku acetonitril:deionizovaná voda (50:50). Roztok byl přefiltrován přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,2 µm. A poté byl odvzdušněn na ultrazvukové lázni minimálně 30 minut.

Dalším proplachovacím roztokem byla deionizovaná voda, která byla přefiltrována přes nylonový filtr a odvzdušněna na ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze

Mobilní fáze byla složená z 2,85 l deionizované vody, ve které bylo rozpuštěno 7,2 g 20 mmol/l dihydrogenfosforečnanu sodného a 6,4884 g 10 mmol/l oktan-1-sulfonanu sodného. Po důkladném rozpuštění bylo přidáno 0,15 l acetonitrilu. Poté bylo upraveno pH pomocí 85 % kyseliny trihydrogenfosforečné na hodnotu 2,82. Následovalo přefiltrování před nylonový filtr o velikosti pórů 0,2 µm a důkladné odvzdušnění na ultrazvukové lázni.

6.4 Chromatografické stanovení

Na chromatografické stanovení byly připraveny všechny potřebné roztoky: mobilní fáze, acetonitril:voda, deionizovaná voda a vzorky.

Mobilní fáze byla pumpována minimálně 20 hodin před začátkem analýzy na kolonu pod průtokem 1,0 ml/min, aby došlo k ustanovení rovnováhy na koloně při tvorbě iontových asociátů. Vždy před novým 20 hodinovým proplachem mobilní fází se musel systém vždy propláchnout 15-20 minut odvzdušněnou deionizovanou vodou. Po ukončení analýzy se celý systém 15-20 minut proplachoval přefiltrovanou a odvzdušněnou deionizovanou vodou a následně se proplachoval 30 minut přefiltrovanou a odvzdušněnou směsí acetonitril-deionizovaná voda (50:50).

Detekční podmínky

Před začátkem analýzy bylo nutné nastavit detektor Coulochem III. Nastavilo se napětí + 850 mV na ochranné cele detektoru. Dle tabulky 3 se na každém kanálu nastavily dané parametry. Na druhém kanálu bylo nastaveno napětí +750 mV, které je optimální pro oxidaci

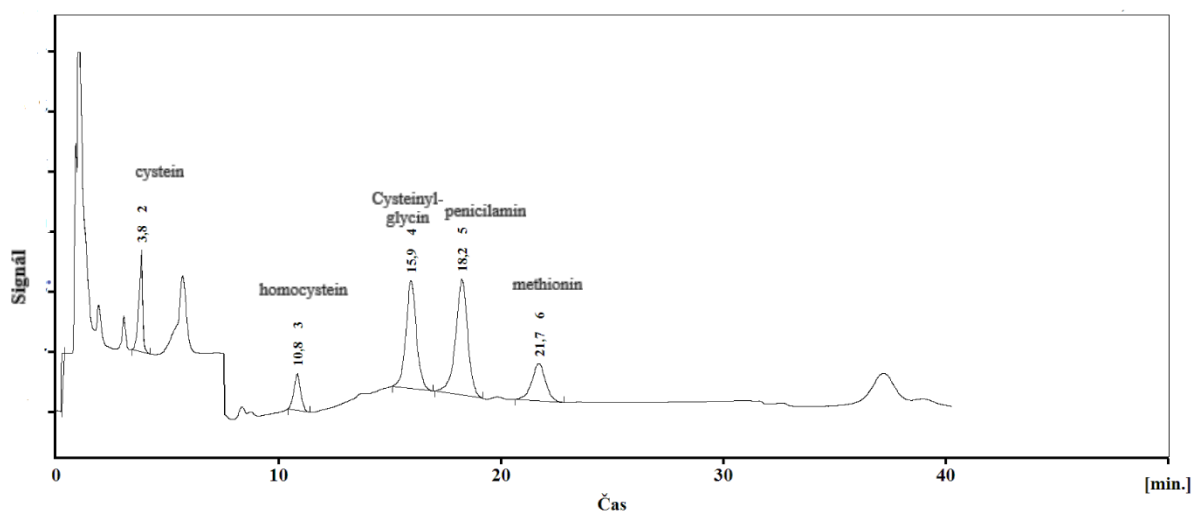
redukovaných thiosloučenin. Protože stanovení cysteinu vyžaduje nižší citlivost, byla měřena s časem. Protože stanovení cysteinu vyžaduje nižší citlivost, byla změněna v čase 0,1-7 minut citlivost na 200 μA a 7-40 minut byla změněna na 5 μA .

Tabulka 3 Detekční podmínky

	Napětí	Výstupní napětí	Filtr	Citlivost
Kanál 1.	+450 mV	1 V	2 s	10 μA
Kanál 2.	+750 mV	1 V	2 s	5 μA , 200 μA

6.5 Vyhodnocení

Za pomoci programu Clarity byly poskytnuty chromatogramy (obrázek 7) a k nim potřebné informace k daným píkům. Pomocí kalibrační křivky, a tedy i kalibrační rovnice vytvořené z naměřených dat směsného kalibračního roztoku, byla provedena kvantifikace koncentrací thiolů. Identifikace thiolů proběhla na základě poloh píků, porovnáním retenčních časů vzorku s retenčními časy standardů. V tabulce 4 jsou uvedeny retenční časy daných thiolů.



Obrázek 7 Chromatogram

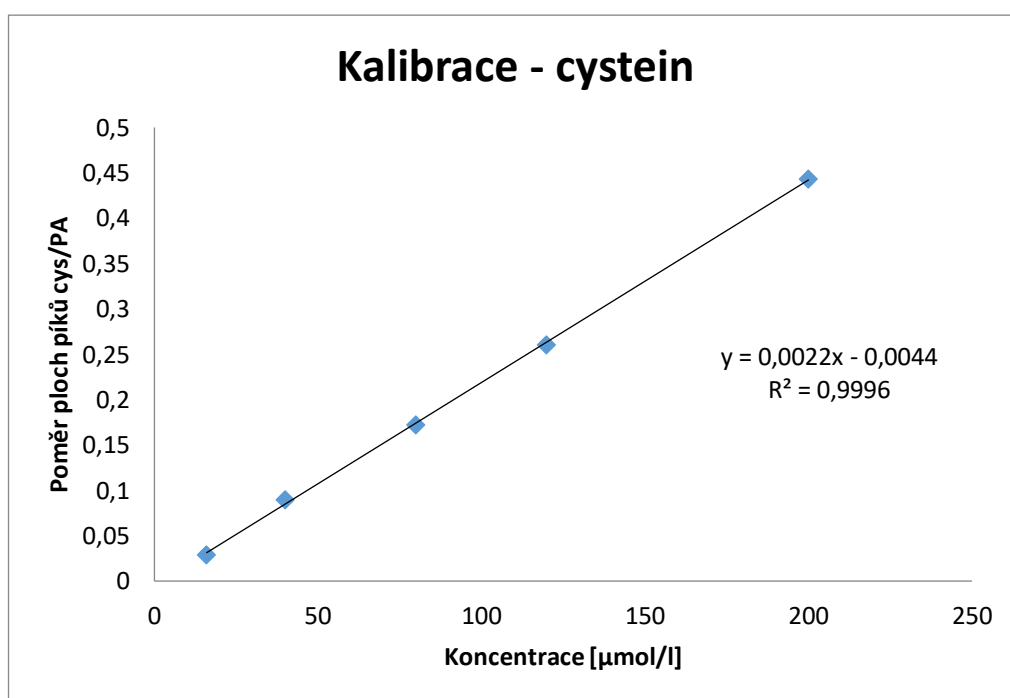
Tabulka 4 Retenční časy thiolů

Thiol	Retenční čas [min]
Cystein	
Homocystein	10,823 ± 0,545
Cysteinyl-glycin	16,047 ± 0,752
Penicilamin	18,447 ± 1,177
Methionin	21,845 ± 1,295

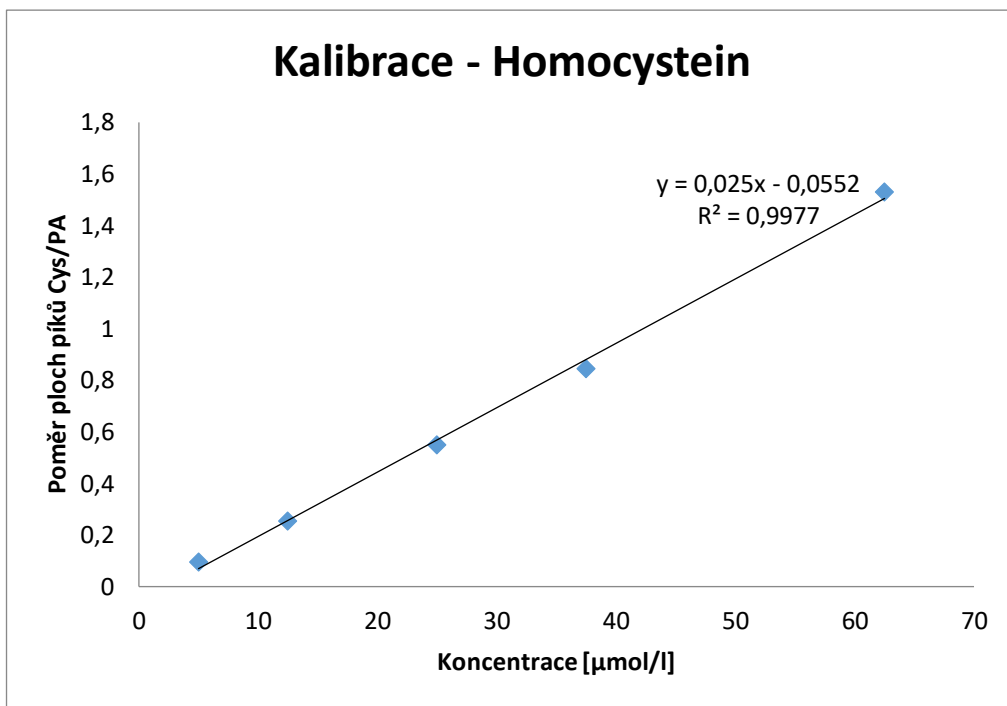
Analýza každého vzorku probíhala přibližně 40 minut. Pro statistickou analýzu byl použit program Microsoft Excel a SigmaStat 3.5.

6.5.1 Kalibrační křivka

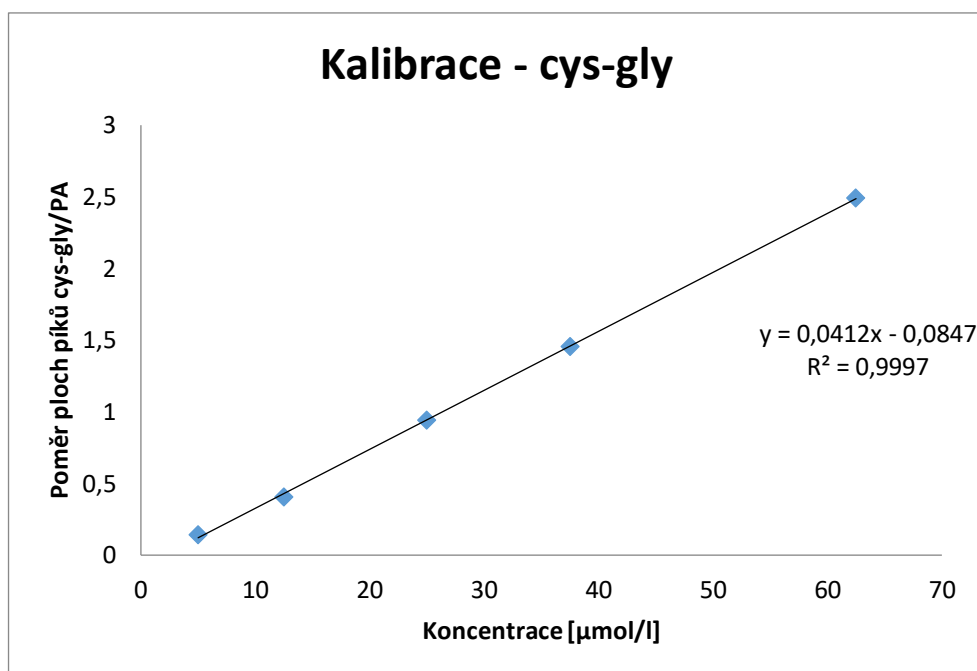
Pro výpočet kalibrační rovnice se na ose y nachází hodnoty vycházející z poměrů ploch píků daného thiolu a ploch píků vnitřního standardu penicilaminu. Na ose x jsou koncentrace daných standardů. Příklady kalibračních grafů, pro každý thiol s rovnicemi, jsou na obrázcích 8-11.



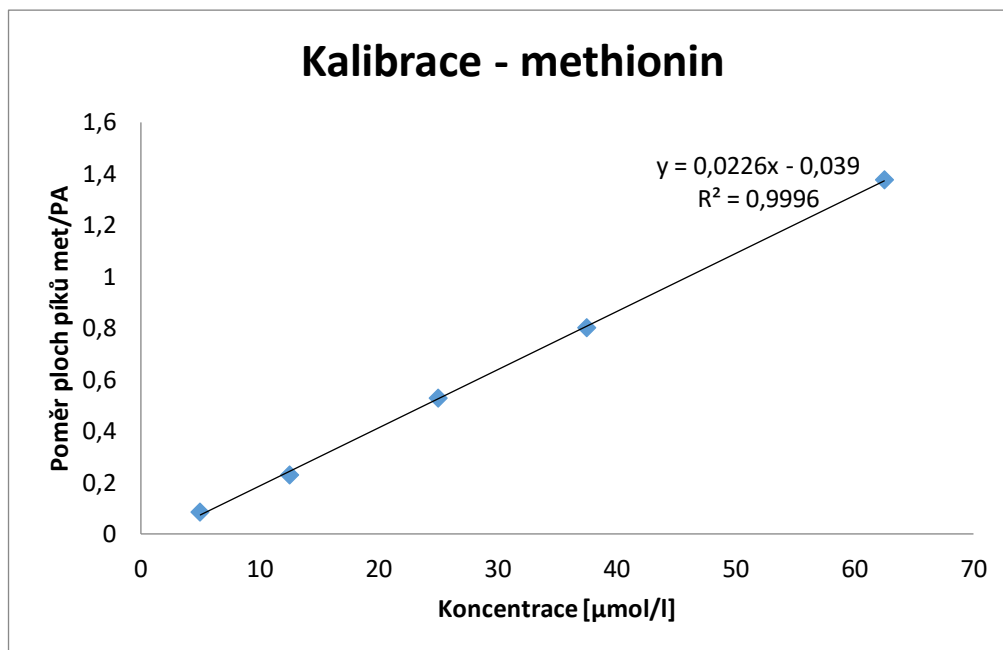
Obrázek 8 Kalibrační závislost pro cystein



Obrázek 9 Kalibrační závislost pro Hcy



Obrázek 10 Kalibrační závislost pro cysteinyl – glycin



Obrázek 11 Kalibrační závislost pro methionin

Před analýzou vzorků plazmy bylo nutné pro zjištění správnosti metody zanalyzovat kontrolu. Pro ověření správnosti byla použita kontrola se střední hladinou Hcy (C = 8,7 – 15,7 μmol/l). V tabulce 5 jsou uvedeny hladiny kontrolního vzorku z měření.

Tabulka 5 Koncentrace thiolů u kontrolního vzorku v μmol/l

kontrola	Cystein	Hcy	cys-gly	Methionin
1.	47,240	12,259	4,189	3,794
2.	41,369	11,680	5,378	3,491
3.	41,002	11,583	4,639	3,843
4.	45,310	11,625	4,195	3,276
průměr	43,73 ± 2,64	11,79 ± 0,27	4,6 ± 0,48	3,6 ± 0,23

6.5.2 Charakteristika pacientů

Pro tuto práci bylo analyzováno celkem 31 pacientů, kteří podstoupili plánovaný zákrok PCI a byl jim umístěn minimálně jeden stent do koronárního řečiště (tabulka 6). Sběr vzorků probíhal na Kardiologickém oddělení Interní kliniky Pardubické nemocnice za schválení etické komise (přílohy B, C a D). Pacienti podepsali informovaný souhlas (příloha E, F) a vyplnili dotazník (příloha G). Vzorky byly odebrány ve čtyřech časových intervalech - před zákrokem (A), 24 hodin (B) a 48 (C) hodin po zákroku a poslední odběr probíhal po několika měsících od

PCI (D) - ve většině případů po 3 měsících, ale některé byly odebrány i po 12 měsících i po roce a půl.

Vzorky krve byly sbírány do vakuových zkumavek s K₂EDTA. Vzorky byly stočeny na centrifuze, aby došlo k oddělení plazmy. Plazma byla oddělena a uložena do mrazáku na -20 °C. Po převozu na Univerzitu Pardubice – Katedru biologických a biochemických věd, byly vzorky zamraženy na -80 °C.

V tabulce 6 jsou uvedeny informace o stentech, které byly pacientům implantovány. Některým pacientům bylo implantováno více stentů. Jednalo se o absorbovatelné a lékové stenty. Absorbovatelné stenty (Absorb) byly implantovány více než polovině námi stanovovaných pacientů. Podrobnější informace o pacientech jsou přiloženy v příloze A.

Tabulka 6 Typy stentů

pacient	nově implantovaný stent			stent v minulosti		další problematická tepna
	počet	materiál	lokalizace			
1	1	absorbovatelný - Absorb 3,5x18	ACD 3	ANO	1x lékový	NE
2	1	lékový – Promus 4,0x20	ACD	NE	-	ANO
3	1	lékový – Promus 4,0x20	RIA	ANO	1x kovový	NE
4	1	Lékový Promus 3,0 x 16	ACD	ANO	1x absorb. 1x lékový	NE
5	1	absorbovatelný Absorb 3,0 x 18	RIA 2	ANO	1x absorb.	NE
6	1	absorbovatelný - Absorb 3,0x18	RIA 2	ANO	1x kovový	NE
7	1	absorbovatelný - Absorb 2,5 x 23	RD	ANO	1x kovový	ANO
8	1	lékový – Promus 4,0x12	ACD	ANO	2x lékový 1x kovový	NE

9	1	absorbovatelný - Absorb 3,5x23	RIA	NE	-	NE
10	1	lékový – Promus 3,5x16	ACD	ANO	1x lékový	NE
11	1	absorbovatelný – Absorb (bez udání rozměrů)	RC	ANO	1x lékový	NE
12	1	absorbovatelný - Absorb 3,5x23	ACD	NE	-	ANO
13	1	absorbovatelný - Absorb 3,5x18	RIA	NE	-	NE
14	1	lékový – Promus 3,5x16	ACD	NE	-	ANO
15	1	absorbovatelný - Absorb 3,0x18	RMS	ANO	1x absorb.	NE
16	1	absorbovatelný - Absorb 2,5x18	RIA	ANO	2x lékový	ANO
17	1	absorbovatelný - Absorb 3,5 x 23	ACD	ANO	1x absorb.	NE
18	1	absorbovatelný - Absorb 3,0 x 28	RIA	NE	-	ANO
19	1	lékový – Promus 3,0 x 28	ACD	ANO	1x kovový 1x lékový	NE
20	2	absorbovatelný - Absorb 3,5 x 28 Absorb 3,5 x 18	ACD	ANO	1x lékový 1x kovový	NE
21	1	lékový – Synergy 3,0 x 12	RIA	ANO	2x lékový	NE
22	1	absorbovatelný - Absorb 2,5 x 18	RIA	ANO	1x absorb.	NE
23	1	lékový – dále nespecifikován	RIA/RD	NE	-	ANO

		lékový –				
24	2	Synergy 2,75 x 20 Synergy 3,0 x 8	ACD	ANO	2x lékový	NE
25	1	absorbovatelný – dále nespecifikován	ACD	NE	-	ANO
26	1	absorbovatelný – Absorb (bez udání velikosti)	RIA	ANO	2x lékový	NE
27	3	lékový – Synergy 3,5 x 20 Synergy 4,0 x 38 Synergy 4,0 x 20	ACD	ANO	1x kovový 2x lékový	ANO
28	1	lékový – Synergy 3,5 x 16	RIA	NE	-	ANO
29	1	absorbovatelný - Absorb 3,5 x 12	ACD3	NE	-	NE
30	2	lékový – Synergy 3,5 x 8 Synergy 4 x 12	RIA	ANO	4x lékový	ANO
31	1	lékový – Synergy 2,5 x 16	RC	ANO	1x lékový	?

Lokalice cév: RIA – ramus interventricularis anterior, ACD – arteria coronaria dextra, RC – ramus circumflexus, RMS - ramus marginalis sinister, RD - ramus diagonalis

Pacienti byli rozděleni do tří skupin. Rozdělení proběhlo na základě jejich anamnézy. Ve skupině I. byli pacienti, kteří byli hospitalizováni pro dokončení revaskularizace pro chronickou ICHS. Ve II. skupině byli pacienti, kteří byli hospitalizováni pro dokončení revaskularizace pro akutní ICHS a ve III. skupině pak pacienti s chronickou ICHS. V tabulce 7 jsou uvedeny základní informace o skupinách. Také jsou v tabulce vyhodnoceny t-testem rozdíly hodnot skupin mezi sebou, na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 7 Rozdělení pacientů do skupin

	Skupiny			P (t-test)		
	I	II	III	I-II	I-III	II-III
	n = 6	n = 15	n = 10			
Muži	67%	80%	80%	0,589	0,606	1
Věk	67,6±4,89	61,66±8,95	67,1±6,92	0,083	0,861	0,116
BMI	32,51±5,14	28,63±5,33	29,01±3,58	0,188	0,215	0,845
Hypertenze	100%	80%	70%	0,082	0,081	0,599
Kouření Nyní	0%	27%	0%	0,041	-	0,041
Dříve	67%	27%	60%	0,135	0,807	0,116
DM	0%	27%	30%	0,041	0,081	0,865
Prediabetes	17%	0%	10%	0,363	0,740	0,343
Statiny před PCI	100%	93%	50%	0,334	0,015	0,033
Pozit. rodinná Anamnéza	50%	40%	30%	0,709	0,478	0,625
Onemocnění						
<i>hypercholesterolémie</i>	100%	87%	100%	0,164	-	0,164
<i>nádorové onem.</i>						
<i>benigní</i>	0%	7%	10%	0,334	0,343	0,785
<i>maligní</i>	0%	7%	20%	0,334	0,168	0,387
<i>ledvinné onemocnění</i>	0%	13%	10%	0,164	0,343	0,808
<i>stav po infekčním on.</i>	33%	13%	20%	0,413	0,606	0,685
<i>jiná onemocnění</i>	33%	47%	20%	0,606	0,606	0,171
Typ stentu						
absorbovatelný	50%	53%	60%	0,901	0,725	0,755
lékový	50%	47%	40%	0,901	0,725	0,755
Po PCI 3 měsíce	100%	80%	90%	0,082	0,343	0,502
> 3 měsíce	0%	20%	10%	0,082	0,343	0,502

Vývoj						
bez komplikací	33%	40%	50%	0,794	0,548	0,642
mírné komplikace	50%	40%	30%	0,709	0,478	0,625
střední komplikace	0%	20%	10%	0,082	0,343	0,502
vážné komplikace	17%	0%	10%	0,363	0,740	0,343

Důležitými informacemi o pacientech jsou rizikové faktory, které mají určitou roli v rozvoji kardiovaskulárního onemocnění, mezi které patří, mimo zvýšené hladiny Hcy, hypertenze, DM, kouření, obezita, hypercholesterolemie.

Vývoj stavu pacientů po PCI byl rozdělen do čtyř kategorií. Bez komplikací se považovali ti pacienti, u kterých se nevyskytl žádný kardiologický problém. Psychické vypětí nebylo bráno jako komplikace. Do kategorie mírných komplikací byli zařazeni ti pacienti, kteří se zadýchávali při vyšší námaze. Do středních komplikací spadají pacienti, u kterých dochází k zadýchání již při chůzi a byla u nich indikována rekonarografie. A do vážných komplikací byli zahrnuti pacienti, u kterých došlo k vážné komplikaci. V těchto případech konkrétně ke vzniku trombózy.

6.5.3 Výsledné koncentrace aminosíroly

Naměřené hodnoty hladin cysteinu, tHcy, cysteinyl-glycinu a methioninu pacientů, jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8 Naměřené hladiny thiolů

Pac.	Cys	Hcy	cys-gly	Met	Pac.	Cys	Hcy	cys-gly	Met
1 A	84,520	15,908	25,879	25,480	17 A	145,133	23,801	28,691	8,291
B	250,386	14,310	37,814	37,334	B		31,418	28,023	10,816
C		12,479	29,638	25,576	C	97,3	25,74	27,141	12,629
D	245,691	13,173	30,770	27,766	D				
2 A	316,743	27,278	26,393	12,165	18 A	101,74	13,758	15,059	13,420
B	354,130	33,509	39,945	12,420	B		14,676	18,718	18,203
C	343,652	33,030	38,269	21,509	C		14,580	17,331	18,203
D	291,764	28,400	34,660	18,943	D		16,350	13,039	15,153
3 A	250,67	15,036	26,97	19,637	19 A	124,108	7,742	19,373	19,030
B	300,452	19,377	29,321	18,856	B	102,683	9,295	26,069	20,308

	C	290,579	19,053	26,348	18,302		C	110,727	9,042	26,105	20,770
	D	275,857	14,527	32,800	23,545		D	119,429	9,434	29,403	17,587
4	A	242,543	13,107	22,316	19,072	20	A	138,487	8,998	17,148	12,882
	B	237,3	13,764	26,881	28,056		B	100,12	9,645	19,791	22,744
	C	252,371	14,513	28,146	19,713		C	100,97	9,985	18,730	17,308
	D						D	96,2	9,067	19,161	15,021
5	A	182,39	11,073	20,584	21,332	21	A	140,8	13,875	17,790	14,324
	B	159,293	9,025	22,534	19,179		B	155,0	15,866	22,057	22,361
	C	189,24	10,908	22,955	22,697		C	149,6	15,028	24,505	22,861
	D	232,790	11,120	28,311	22,153		D	143,6	13,948	20,914	19,260
6	A	216,786	14,586	26,114	20,281	22	A		41,355	18,555	11,115
	B	182,029	12,186	28,438	20,183		B				
	C	196,181	16,389	29,31	25,456		C				
	D	246,237	16,394	33,700	34,523		D		15,578	24,332	13,822
7	A	331,425	15,626	30,155	26,03	23	A		12,911	22,398	11,531
	B	233,922	12,181	22,703	19,667		B		11,509	17,084	16,780
	C	257,982	14,854	18,644	15,939		C	31,5	13,460	16,752	15,519
	D	282,423	15,435	15,56	11,577		D		10,836	20,229	12,158
8	A	121,543	10,090	21,401	10,885	24	A	171,009	9,787	12,590	12,854
	B	136,963	9,790	22,200	12,183		B	152,281	9,904	16,730	15,289
	C	131,545	10,936	23,216	10,626		C	170,594	8,945	15,326	17,615
	D		10,529	21,766	13,866		D	189,376	9,754	20,850	11,439
9	A	78,646	10,999	20,232	18,093	25	A	100,148	10,141	11,547	10,340
	B	145,032	10,537	21,639	15,420		B	128,427	12,067	16,59	13,471
	C	137,408	10,637	21,071	21,603		C	122,736	11,057	16,087	12,768
	D		10,367	22,57	14,887		D	155,17	12,185	19,733	14,993
10	A	125,757	13,812	14,818	9,788	26	A	156,157	14,373	15,671	9,541
	B	136,695	16,131	19,799	13,021		B	165,518	16,338	20,519	20,007
	C	128,433	15,100	18,547	16,852		C	163,878	13,753	20,172	19,487
	D		16,165	21,84	14,883		D	143,4	16,002	22,066	23,577
11	A	127,748	11,558	13,926	7,796	27	A	144,3	12,349	21,707	13,240
	B	137,359	13,460	19,475	9,619		B	130,03	12,671	23,979	13,521
	C	116,665	12,744	18,154	13,504		C	140,5	11,707	24,062	23,883

	D	118,809	12,444	19,479	11,687		D	142,85	12,482	27,413	12,625
12	A	145,151	10,560	12,316	14,907	28	A	43,89	10,069	16,091	21,408
	B	142,597	9,640	14,116	17,519		B	6,32	5,908	13,323	23,560
	C	139,714	9,581	14,765	16,002		C	140,39	8,225	22,247	11,477
	D	104,714	8,756	14,056	15,520		D	151,4	11,458	24,915	12,750
13	A	180,588	16,518	26,083	13,225	29	A	109,8	15,952	19,297	15,740
	B	156,441	12,284	15,553	14,875		B	36,76	18,990	24,675	19,408
	C	156,916	13,852	16,190	13,121		C	42,98	19,064	25,376	19,997
	D	116,069	10,200	13,965	11,137		D	107,28	12,912	20,075	15,024
14	A	158,953	11,611	14,903	12,592	30	A		13,623	16,903	12,643
	B	169,757	11,071	16,189	17,445		B		14,449	15,439	15,237
	C	136,893	11,184	15,197	12,854		C		19,979	16,792	13,814
	D		10,238	17,013	13,591		D		19,108	18,446	15,340
15	A	151,626	12,366	15,197	19,143	31	A	45,68	7,838	15,546	11,343
	B	151,916	12,049	17,864	21,292		B		9,388	18,718	14,387
	C	115,066	11,953	16,602	16,701		C		10,418	18,638	14,814
	D	115,245	11,096	17,667	19,187		D		11,621	20,608	11,300
16	A	105,996	9,090	19,845	12,457						
	B	103,320	8,959	18,613	25,458						
	C		11,370	19,142	18,358						
	D	13,881	8,652	19,327	11,975						

Cys – cystein, Cys-gly – cysteinyl-glycin, Met - methionin

Na základě naměřených hodnot a rozdělení do skupin byly provedeny výpočty mediánů a průměry se směrodatnou odchylkou, které jsou uvedeny v tabulce 9. Dále byl v tabulce 10 vypracován studentův t-test k porovnání jednotlivých skupin mezi sebou, na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 9 Výpočty na základě naměřených hodnot

A	I. skupina		II. skupina		III. skupina	
	průměr	medián	průměr	medián	průměr	medián
cys	136,65 ± 84,97	144,19	162 ± 59,42	144,3	137,3 ± 74,67	109,8
Hcy	16,01 ± 11,52	12,09	13,33 ± 3,7	13,8	13,98 ± 4,95	12,26
c-g	18,96 ± 2,26	19,2	20,5 ± 5,62	19,37	17,15 ± 5,49	15,58
met	14,66 ± 4,01	12,55	15,27 ± 5,73	13,24	14,34 ± 3,16	13,32
B						
cys	166,65 ± 54,94	11,621	167,72 ± 57,23	151,92	142,43 ± 97,25	143,82
hcy	11,12 ± 2,46	20,608	14,31 ± 5,37	12,671	14,02 ± 7,24	11,79
c-g	20,43 ± 3,93	13,822	23,65 ± 5,32	22,2	19,78 ± 7,46	16,84
met	20,46 ± 5,45	19,179	18,46 ± 6,6	19,67	16,91 ± 3,02	17,11
C						
cys	220,81 ± 31,57	220,81	154,79 ± 55,72	135,57	139,13 ± 83,83	137,41
hcy	13,44 ± 3,57	11,37	13,79 ± 4,2	12,74	14,47 ± 6,83	12,32
c-g	21,14 ± 4,04	19,14	22,43 ± 4,54	23,22	20,33 ± 6,83	17,04
met	17,88 ± 3,25	18,36	18,5 ± 4,39	17,62	16,3 ± 3,62	15,76
D						
cys	123,34 ± 109,5	123,34	176,58 ± 65,21	143,5	154,49 ± 64,6	133,74
hcy	13,22 ± 3,69	11,62	12,89 ± 2,51	12,83	13,17 ± 5,44	11,15
c-g	18,56 ± 3,65	20,61	23,81 ± 5,64	21,8	22,59 ± 10,48	19,9
met	22,21 ± 3,89	20,61	18,32 ± 6,66	16,3	14,42 ± 2,06	14,94

cys – cystein, c-g – cysteinyl-glycin, met - methionin

Tabulka 10 Studentův t-test u jednotlivých skupin

		P (t-test)		
		I.-II. skupina	I.-III. skupina	II.-III. skupina
	věk	0,083	0,861	0,116
A	Cys	0,726	0,99	0,283
	Hcy	0,508	0,704	0,934
	C-G	0,846	0,485	0,172
	Met	0,907	0,786	0,656
B	Cys	0,85	0,721	0,562
	Hcy	0,239	0,358	0,524
	C-G	0,254	0,426	0,025
	Met	0,571	0,358	0,504
C	Cys	0,177	0,126	0,777
	Hcy	0,875	0,951	0,76
	C-G	0,596	0,298	0,114
	Met	0,785	0,458	0,221
D	Cys	0,552	0,688	0,606
	Hcy	0,824	0,759	0,873
	C-G	0,727	0,507	0,148
	Met	0,368	0,951	0,306

Na základě typu stentů jsme si pacienty rozdělili na dvě skupiny. V jedné skupině byli pacienti, kterým byl implantován lékový stent a ve druhé skupině byli pacienti, kterým byl implantován biodegradabilní stent. Vytvořili jsme tabulky pouze pro měření A (tabulka 11) a D (tabulka 12), vzhledem k významnosti výsledků. U měření B a C nebyly nalezeny žádné významné výsledky.

Tabulka 11 Rozdělení pacientů dle typu stentu – měření A

Měření A – před PCI			
Typ stentu	Lékový	Absorbovatelný	P (t-test)
	n=14	n=17	
Věk	66,86 ± 5,2	62,71 ± 9,6	0,228
BMI	29,58 ± 4,02	29,5 ± 5,65	0,822
Hypertenze	93%	71%	0,110
Kouření: Nyní	14%	12%	0,843
Dříve	36%	47%	0,445
DM	29%	18%	0,494
prediab.	7%	6%	0,893
Hypercholesterolémie	93%	82%	0,211
Statiny	86%	71%	0,321
Hyperhomocysteinémie	14%	29%	0,321
Komplikace			
mírné	29%	29%	0,960
střední/vážné	0%	29%	0,020
Hyperhomocysteinémie + komplikace	0%	24%	0,041
Thiol	průměr	průměr	P (t-test)
Cys	154,67	150,31	0,903
Hcy	12,79	15,10	0,242
Cysteinyl-glycin	18,31	19,78	0,460
Met	14,32	15,30	0,706

Tabulka 12 Rozdělení pacientů dle typu stentu - měření D

Měření D			
Typ stentu	Lékový n=13	Absorbovatelný n=16	P (t-test)
Věk	66,54 ± 5,24	62,88 ± 9,87	0,228
BMI	29,6 ± 4,18	30,03 ± 5,4	0,822
Hypertenze	92%	69%	0,11
Kouření:	Nyní	15%	13%
	Dříve	38%	50%
DM	31%	19%	0,479
Prediabetes	8%	6%	0,885
Hypercholesterolémie	92%	94%	0,885
Statiny	85%	94%	0,461
Hyperhomocysteinémie	23%	31%	0,636
Komplikace			
Mírné	31%	31%	0,979
Střední/vážné	0%	31%	0,02
Hyperhomocysteinémie + komplikace	0%	25%	0,041
Thioly			
	průměr	průměr	P (t-test)
Cys	187,7537	153,84	0,154
Hcy	13,73	12,48	0,416
Cysteinyl-glycin	23,91	20,86	0,12
Met	15,18	17,38	0,417

Do mírných komplikací náleželi pacienti, kteří se při vyšší fyzické námaze zadýchávali. Do středních a vážných komplikací byli zařazeni pacienti, u kterých se objevily stejné příznaky, jako před předchozí příhodou a byli objednáni k rekonarografii nebo u kterých došlo ke vzniku trombózy.

6.6 Diskuse

Stále není přesně jasné, jakou roli hraje hladina tHcy v krvi u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním po perkutánní koronární intervenci. Bylo zjištěno, že zvýšená hladina se podílí už na rozvoji kardiovaskulárního onemocnění. I když se některé studie v názoru na tuto problematiku rozcházejí, je hladina tHcy brána jako důležitý rizikový faktor. Nejednotnost v názorech může být dána různými metodami měření, různými pacienty a dalšími podmínkami. Studie De Ruijtera a kol. z roku 2009 doložila souvislost hladiny Hcy s kardiovaskulárním onemocněním. [46] Stejně tak meta analýza Penga a kol. z roku 2015 tuto souvislost dokládá. Do analýzy bylo zařazeno dvanáct studií s přibližně 23 000 osobami. Došli k závěru, že zvýšená hladina tHcy je nezávislým prediktorem následné kardiovaskulární mortality. [61]

Byl navržen i mechanismus patogeneze tHcy na progresi kardiovaskulárního onemocnění. Může dojít k účinku na endotel vlivem vzniku kyslíkových radikálů, k zajištění nesprávné skládání proteinů a tím aktivaci apoptózy, podpoře proliferace buněk hladké svaloviny a syntéze kolagenu nebo může působit na koagulační cesty například indukci monocytární syntézy tkáňového faktoru. [37,41]

Předmětem této práce je stanovení hladiny tHcy u pacientů po perkutánní koronární intervenci. Zda je vyšší hladina tHcy důležitým faktorem pro vznik pozdních komplikací po tomto zákroku je nyní námětem mnoha studií. Jak již bylo zmíněno v teoretické části práce, jsou studie, které tuto souvislost popírají, ale také studie, které jí dokládají. Například ve studii Zairise a kol. z roku 2002 nebo ve studii Breuckmanna a kol. z roku 2005 kde tuto problematiku zkoumali, došli k závěru, že hladina tHcy se nepodílí na vzniku restenózy. [50,51] Naopak studie Schnydera a kol. z roku 2002 tuto nezávislost vyvrátila a poskytla důkaz vlivu hladiny tHcy na restenózu. [52] To potvrdila i studie Yeha a kol. z roku 2014. V této studii bylo velké množství pacientů a měla dlouhé trvání. Došlo k potvrzení, že hladina tHcy hraje zásadní roli ve vzniku restenózy po implantaci holých kovových stentů s nutností opětovného stentování. [47] Také ve studii Han a kol. z roku 2016, která se zabývala převážně lékovými stenty, došli k závěru, že hladina Hcy je nezávislým rizikovým faktorem. [46]

Thioly jsme stanovovali v návaznosti na předchozí diplomovou práci metodou iontově párové vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému obrácených fází

s elektrochemickou detekcí. Je to metoda vhodná pro stanovení více frakcí thiolů v lidské plazmě při jedné analýze, kde není nutná derivatizace vzorku a thioley se snadno oxidují. [56]

Metoda je velice citlivá. Rozhodující pro náležitý průběh je správné pH mobilní fáze a navážení protiiontu. Stačilo, aby došlo k malému posunu pH nebo byl protiiont špatně navážen a analýza neposkytla správné výsledky. Proto bylo velmi nutné používat správný postup přípravy mobilní fáze a také, aby byla vždy připravena stejně.

Na začátku analýzy se vytvořila kalibrační křivka ze zásobních roztoků standardů. Pro zjištění správnosti připravené mobilní fáze se vždy testoval také kontrolní vzorek. Aby byl výsledek vzorku vždy správně vyhodnocen, jednotlivé výsledky se vztahovaly k vnitřnímu standardu penicilaminu. Hladina tHcy v kontrolním vzorku vyšla $11,79 \pm 0,27$, což je hodnota, která splňuje kritéria pro správnost analýzy. Ačkoliv nebyl tento kontrolní materiál připraven pro měření hladiny cysteinu, cysteinyl-glycinu a methioninu a neobsahuje tak pro ně deklarované koncentrační rozmezí, použili jsme jej pro porovnání hladin těchto thiolů mezi jednotlivými měřeními. Hladiny jsou uvedeny v tabulce 5. Kontrolní roztoky jsou vyráběny převážně pro stanovení pouze tHcy, popřípadě pro tHcy a cystein.

Naše práce vznikla ve spolupráci s Kardiologickým oddělením Interní kliniky Pardubické nemocnice a umožnila ji etická komise (příloha B, C a D). Jednalo se o studii s názvem „Zánětlivá reakce po implantaci koronárních stentů“. Do studie byli zařazeni pacienti po perkutánní koronární intervenci s kardiovaskulárním onemocněním. Pacienti byli řádně informováni a museli podepsat informovaný souhlas o vstupu do studie (příloha E a F) a vyplnili dotazník (příloha G). Byl jim implantován lékový nebo absorbovatelný stent. Absorbovatelný stent byl složen z kyseliny polymléčné (PLLA), jejíž rozklad trvá přibližně dva roky. Odběr vzorků probíhal ve čtyřech intervalech – před zavedením stentu, 24 hodin a 48 hodin po zákroku a poslední byl odebrán po několika měsících. Primárním cílem sledování pacientů bylo zjistit, jaký vliv na vznik pozdních komplikací má absorbovatelný stent a také souvislost hladiny CRP se vznikem pozdních komplikací, sekundárním cílem (tato Diplomová práce) bylo sledování hladiny tHcy. Do studie byli zařazeni pacienti se SAP, NAP a IM. Také v ní byli i dva pacienti se srdečním selháním.

Celkem bylo analyzováno 31 pacientů ve věku od 44 do 82 let, kde 77 % byli muži. Téměř všichni pacienti trpěli nadváhou nebo obezitou, pouze 4 měli ideální váhu. Dva měli těžkou obezitu, s BMI > 40. Většina pacientů, s výjimkou šesti, trpěla hypertenzí. Ve výzkumu

byli celkem 4 kuřáci a 13 bývalých kuřáků, zbytek byli nekuřáci. DM byl prokázán u 7 pacientů a u dvou byl diagnostikován prediabetes. Dvanáct pacientů mělo z hlediska kardiovaskulárního onemocnění pozitivní rodinnou anamnézu a téměř většina trpěla hypercholesterolémií. U žádného pacienta nedošlo k úmrtí.

Pacienty je možné rozdělit do tří skupin. I. skupina byli pacienti, kteří byli hospitalizováni pro dokončení revaskularizace pro chronickou ICCHS. Ve II. skupině pacienti, kteří byli hospitalizováni pro dokončení revaskularizace pro akutní ICCHS a ve III. skupině pak pacienti s chronickou ICCHS. Výsledky tohoto rozdělení neukazují signifikantní rozdíly v hladině thiolů mezi těmito skupinami. Jak bylo výše uvedeno homocystein je brán jako rizikový faktor vzniku kardiovaskulárního onemocnění. Do popředí se však ještě dostává tvrzení, že by homocystein by mohl být biomarkerem závažnosti kardiovaskulárního onemocnění. Výsledky studií jsou v rozporu, avšak nedávné studie možnost tohoto využití spíše potvrzují. Liu a kol. ve studii z roku 2015, souhlasí s tím, že hyperhomocysteinémie je nezávisle spojena se závažností kardiovaskulárního onemocnění a významně koreluje s nízkým množstvím kyseliny listové a vitamínem B12. [62] Ve Studii Oudi a kol. z roku 2010 zkoumali tHcy a zánětlivé markery u pacientů s akutním koronárním syndromem a došli také k závěru, že hladina tHcy a stanovované markery jsou spojeny s větším počtem poškozených tepen a následnou závažností onemocnění koronárních artérií. [63] S naší prací nemůžeme přispět k potvrzení této teorie, protože naše skupiny nebyly srovnatelné co do výskytu faktorů, které hladinu tHcy ovlivňují (DM, užívání statinů apod.).

Dále jsme si pacienty rozdělili na základě typu stentů do dvou skupin. V jedné skupině byli pacienti s lékovými stenty a v druhé skupině pacienti s absorbovatelnými stenty. Porovnávali jsme rizikové faktory, komplikace po zákroku, hyperhomocysteinémií a hladiny thiolů mezi jednotlivými skupinami. Porovnání proběhlo pro všechna měření (A,B,C i D), ale pouze v měření A a D jsme našli statisticky významné odlišnosti.

Důležitým výsledkem pro nás byl výskyt středních/vážných (odběr A – $p = 0,02$; odběr D – $p = 0,02$) komplikací u absorbovatelných stentů. Ve skupině lékových stentů jsme žádné tyto komplikace nezaznamenali. Spojení hyperhomocysteinémie s výskytem komplikací mírných i středních/vážných (A – $p=0,040$; D – $p=0,041$) u absorbovatelných stentů bylo signifikantně vyšší než u lékových stentů. A to jak u měření A, tak u měření D. Studentův t-test nám také ukázal, že hladiny cysteinu a cysteinyl-glycinu se v měření D blíží významnosti. Tento jev je možné přisuzovat pravděpodobnému vzniku oxidačního stresu a využití cysteinu

jako antioxidantu. Dle našeho předpokladu dochází působením stentu k dějům, které mají vliv na oxidační stres.

Absorbovatelné stenty jsou momentálně hodně v popředí mnoha studií. Těmito stenty se zabýval například Stefanini a kol. v roce 2012, kde porovnávali lékové stenty s biodegradabilním polymerem a odolné polymerní sirolimus-eluční stenty. Studie probíhala 4 roky a účastnilo se jí 4062 pacientů. Pacienti byli náhodně rozděleni na dvě skupiny a byly jim implantovány stenty. Cílem bylo zjištění, který stent se podílí v menší míře na vzniku pozdní trombózy. Zjistili, že po 4 letech bylo riziko vzniku trombózy a IM nižší u pacientů léčených biodegradabilním polymerem. Závěrem této studie je, že biologicky rozložitelný polymer je bezpečnější a účinnější ve srovnání s odolným polymerem. [64] V roce 2015 se Sabáte a kol., zabývali lékovými vstřebatelnými stenty (Absorb) v porovnání s obyčejnými lékovými stenty (everolimus-ulovňující stent) u pacientů se STEMI. Pacienti byli náhodně rozděleni 1:1 a byly jim implantovány Absorb stenty a EES. Studie trvala 6 měsíců a bylo zjištěno, že u pacientů se stentem Absorb došlo k téměř úplnému uzdravení než u pacientů s obyčejnými lékovými stenty. [65]

Capodanno a kol. v roce 2015, zkoumali střednědobé výsledky biodegradabilního stentu (BVS) z registru GHOST-EU. V období od roku 2011-2014 podstoupilo 1189 pacientů PCI s implantací jednoho nebo více biodegradabilních stentu. Primárním cílem byl výskyt selhání cílových lézí, definovaných jako kombinace srdeční smrti, IM nebo nutnosti revaskularizace. Celkem bylo implantováno 1731 stentů Absorb BVS. Výskyt selhání cílových lézí byl u 67 případů s mediánem 109 dnů po implantaci. Incidence byla 2,2 % za 30 dní a 4,4 % za šest měsíců. Kumulativní výskyt definitivní/pravděpodobné trombózy byl 1,5 % za 30 dní a 2,1 % za šest měsíců (16 případů z 23 se vyskytlo do 30 dnů). Výsledek této studie je znepokojující především s výskytem trombózy do 30 dnů od zákroku. [66]

Těmito stenty se zabývala také studie Serruyse a kol z roku 2015. Jednalo se o studii ABSORB II. Byly porovnávány everolimus-uvolňující biodegradabilní stenty s everolimus-uvolňujícími kovovými stenty. Do studie bylo zařazeno 501 pacientů ve věku od 18-85 let s prokázanou ischemií a jednou nebo dvěma *de novo* lézemi. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin 2:1 a byly jim implantovány stenty. U 3 pacientů s absorbovatelným stentem se vyskytly komplikace ve formě trombózy, zatímco u pacientů s lékovým kovovým stentem se trombóza nevykytla ani u jednoho. Dále se u absorbovatelného stentu objevilo 17 (5%) pacientů se srdeční příhodou oproti pěti (3%) pacientům s kovovým stentem. [67]

Studie Novotného a spol. z roku 2017, jejíž součástí je i naše práce, se zabývala pacienty léčenými stenty Absorb. Ve studii bylo 178 pacientů s tímto stentem. Sledování probíhalo 722 dnů. A téměř polovina pacientů byla s akutním koronárním syndromem, ve zbylých případech se jednalo o stabilní formy ICHS. K úmrtí z kardiovaskulárních příčin došlo v prvním roce u 3,9 % pacientů. U 6 případů bylo jisté, že došlo k trombóze a u 2 případů pravděpodobné. Do 39 dnů po implantaci došlo ke vzniku jisté/pravděpodobné trombózy u 2,8 % pacientů. Tato studie potvrdila obavu z vyššího výskytu této komplikace, která se podle již dostupných dat jeví jako hlavním a nejzávažnějším problémem léčby ICHS za použití biodegradabilního stentu tohoto typu. [68]

Naše výsledky souhlasí s některými předchozími studiemi, kdy bylo zjištěno, že absorbovatelné stenty Absorb mají vliv na vznik pozdních komplikací, především na vznik trombózy. Naše práce navíc naznačuje souvislost zvýšené hladiny tHcy s komplikacemi spojenými s těmito stenty. Domníváme se, že by se pacientům se zvýšenou hladinou tHcy stent Absorb neměl implantovat. Dle našeho názoru je důležité soustředit se na snižování hladiny tHcy po PCI, protože i v měření D jsme našli významnost. Vzhledem k tomu, že v naší práci však bylo pouze 31 pacientů, není výsledek tolik průkazný a bylo by vhodné se na tuto problematiku zaměřit v dalších studiích s vyšším počtem pacientů. V nám poskytnuté literatuře jsme nenašli žádnou studii, která by se tímto spojením zabývala. Je nutno také poukázat na to, že se jedná pouze o jeden typ stentu a u jiných biodegradabilních stentů může být výsledek jiný.

7. Závěr

V naší práci byla metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí stanovena hladina celkového plazmatického homocysteinu u pacientů po perkutánní koronární intervenci. Mimo homocystein jsme stanovovali také hladinu dalších sirných sloučenin cysteinu, cysteinyl-glycinu a methioninu. Studie vznikla ve spolupráci s Kardiologickým oddělením Interní kliniky Pardubické nemocnice. Pacientům byly implantovány dva rozdílné typy stentů – lékový nebo biodegradabilní. Vzorky krve byly odebrány ve čtyřech intervalech - před intervencí, 24 a 48 hodin po intervenci a poslední vzorek byl odebrán v delším časovém období, převážně tři měsíce po zákroku.

Soubor pacientů v naší studii je poměrně malý a tvoří pouhou část rozsáhlejší studie probíhající na spolupracujícím oddělení. Hlavním důvodem je patrně fakt, že pacienti museli podstoupit sérii odběrů krve v přesně určených časových intervalech a také další vyšetření s časovým odstupem. I tak však výsledky naznačují některé zajímavé závěry, které by však musely být ověřeny větší skupinou pacientů.

V souladu s výsledky studie spolupracujícího pracoviště je i v našem menším souboru pacientů zjištěno, že implantace biodegradabilního stentu Absorb je v porovnání s lékovými stenty spojena s vyšším výskytem následujících závažných komplikací. Týká se to zejména vzniku trombózy stentu a to již poměrně brzy po zákroku.

Zjistili jsme také, že hladina homocysteinu před vlastním zákrokem pravděpodobně souvisí se vznikem komplikací po zavedení biodegradabilního stentu Absorb. Proto se domníváme, že zavedení tohoto typu stentu může být rizikové zejména u pacientů s výchozí vysokou hladinou homocysteinu.

CITOVANÉ ZDROJE

- [1] VOJÁČEK, J.: Koronární nemoc, *Intervenční a Akutní Kardiologie*, 2004, 3:59-60
- [2] NORDQVIST, CH.: Coronary heart disease: What you need to know. *Medical News Today*. MediLexicon International [online]. 2018 [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/184130.php>
- [3] SINGH, R. B.; MENGI, S. A; XU, Y. J. et al.: Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Experimental & Clinical Cardiology*, 2002, 7(1): 40
- [4] FALK, E.: Pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006, 47(8) Supplement: C7-C12
- [5] MLČOCH, Z.: Jak vzniká ateroskleróza (zvápnění tepen) – příběh o cévách, cholesterolu a prevenci [online]. 2016 [cit. 2018-01-16]. Dostupné z: http://www.zbynekmlcoch.cz/informace/texty/zdravi/jak-vznika-ateroskleroz-a-zvapenateni-tepen-pribeh-o-cevach-cholesterolu-a-prevenci?fb_comment_id=1028792470524444_1029260000477691#f1bb8a849649e6e
- [6] HRADEC, J.; BÝMA, S.: Ischemická choroba srdeční: doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře: novelizace 2009. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, Praha, 2009, s. 1-20, ISBN: 978-80-86998-36-7
- [7] AZIZ, M.; YADAV, K. S.: Pathogenesis of Atherosclerosis A Review. *Medical & Clinical Reviews*, 2016, 2(3), DOI: 10.21767/2471-299X.1000031
- [8] CAIRNS, J. A.; FANTUS, I. G.; KLASSEN, G. A.: Unstable angina pectoris. *American Heart Journal*, 1976, 92(3): 373-386
- [9] ASCHERMANN, M.: Doporučení k diagnostice a léčbě nestabilní anginy pectoris - revize 2002, [online]. 2002 [cit. 2017-09-22]. Dostupné z: https://is.muni.cz/www/72002/4253036/4365127/Doporuceni_k_diagnostice_a_lecbe_nestablni_anginy_pectoris.pdf?lang=cs
- [10] WIDIMSKÝ, P.; JANOUŠEK, S.; VOJÁČEK, J.: Doporučení pro diagnostiku a léčbu akutního infarktu myokardu (Q-typ//s elevacemi ST//s raménkovým blokem). *Cor et Vasa*, 2002, 44(9): K165-182

- [11] KOZÁK, M.: Náhlá srdeční smrt, *Interní Medicína*, 2009, 11(5): 211-214
- [12] SEDLÁČEK, K.; HUBÁČEK, J.; KAUTZNER, J.: Genetická predispozice a riziko náhlé srdeční smrti v důsledku maligních arytmií. *Intervenční a Akutní Kardiologie*, 2009, 8(5): 242-246
- [13] ČECH, V.; DUFKA, A.; NÁPLAVA, R.: Závažná němá ischemie myokardu u mladého pacienta s paroxyzmální formou fibrilace síní. *Interní Medicína*, 2006, 7 a 8: 360-362
- [14] ŠIMEK, S.: Ischemická choroba srdeční – péče o pacienta po infarktu myokardu. *Medicína Pro Praxi*, 2007, 4(10): 395-399
- [15] FOX, K.; GARCIA, M. A. A.; ARDISSINO, D. et al.: Guidelines on the management of stable angina pectoris: executive summary: The Task Force on the Management of Stable Angina Pectoris of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*, 2006, 27(11): 1341-81
- [16] ŠTEJFA, M.: Stabilní angina pectoris. *Kardiologická revue*, 2003, 4: 195-189
- [17] HEINC, P.: Chronické srdeční selhání. *Medicína.Pro Praxi*, 2007, 5: 211- 216
- [18] ŠPINAR, J.; VÍTOVEC, J.; HRADEC, J. et al.: Czech Society of Cardiology guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure 2011. *Cor et Vasa* 2012, 54, e113–e134
- [19] KOČKA, V.: The coronary angiography – An old-timer in great shape. *Cor et vasa*, 2015, 57(6): e419-e424
- [20] TAVAKOL, M.; ASHRAF, S.; BRENER, S. J.: Risks and Complications of Coronary Angiography: A Comprehensive Review. *Global Journal of Health Science*, 2012, 4(1): 65
- [21] OLADE, R.B.; SAFI, A.; BADERO, O.J. Cardiac Catheterization of Left Heart. *Medscape* [online]. 2016 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/1819224-overview>
- [22] Informace pro pacienty před koronarografickým vyšetřením, AGEL Kardiologické centrum [online]. 2006 [cit. 2018-03-23] Dostupné z: <https://nemocnicepodlesi.agel.cz/verejnost/brozury-pro-pacienty/info-pro-pacienty-pred-operaci-srdce.pdf>
- [23] KULICK, D. L.: Coronary Angiogram. [online]. 2015 [cit. 2018-01-03]. Dostupné z: https://www.medicinenet.com/coronary_angiogram/article.htm

- [24] TORPY, M. J.; LYNN, C.; GLASS, R.M.: Percutaneous Coronary Intervention. *The Journal of the American Medical Association*, 2004, 291(6): 778-778
- [25] XU, E.X.: Prof. Yean Leng Lim: evolution of percutaneous coronary intervention over 40 years. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 2015, 5(4): 335-337
- [26] NOVOBÍLSKÝ, K.; KRYZA, R.: Koronarografie, perkutánní koronární intervence. *Kardiologie*, Městská nemocnice Ostrava, příspěvková organizace [online]. 2017 [cit. 2018-03-15]. Dostupné z: <http://www.mnof.cz/wp-content/uploads/2015/08/86-Koronarografie-a-perkut%C3%A1nn%C3%AD-koron%C3%A1rn%C3%AD-intervence.pdf>
- [27] GAMBINO, B.: Coronary Artery Stenosis: Bioresorbable Vascular Scaffold vs Metallic Everolimus-Eluting Stent. *Cardiology Advisor* [online]. 2016 [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: <https://www.thecardiologyadvisor.com/chd/scaffolds-vs-stents-in-coronary-artery-stenosis/article/500546/>
- [28] MATES, M.: Biodegradabilní koronární stenty. *Intervenční a akutní kardiologie*, 2010, 9(4): 195-197
- [29] BENNETT, J.; DUBOIS, Ch.: Percutaneous coronary intervention, a historical perspective looking to the future. *Journal of thoracic disease*, 2013, 5(3): 367
- [30] NOVOTNÝ, V.; VARVAŘOVSKÝ, I.; MATĚJKA, J. a kol.: Biodegradabilní stenty – kouzlo pomíjivého? *Intervenční a Akutní Kardiologie*, 2016, 15(3): 127-134
- [31] BRANNY, M.; INDRÁK, J.; ČERNÝ, J. a kol.: Radiální přístup pro koronární angiografii a perkutánní koronární intervenci. *Intervenční a Akutní Kardiologie*, 2008, 7(2): 60-64
- [32] ASCHERMAN, M.; HORÁK, J.; ŘEZNÍČEK, V. a kol.: Stenty s lokálním uvolňováním léků k prevenci restenózy po koronárních intervencích. *Interní medicína pro praxi*, 2003, 8: 392-395
- [33] GAITONDE, M. K.: Sulfur amino acids. *Metabolic Reactions in the Nervous System*, Boston, 1970, p. 225-287, ISBN: 978-1-4615-7162-9
- [34] BROSANAN, J. T.; BROSANAN, M. E.: The sulfur-containing amino acids: an overview. *The Journal of nutrition*, 2006, 136(6): 1636-1640
- [35] SHOVELLER, A. K.; STOLL, B.; BALL, R.O.: Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. *The Journal of nutrition*, 2005, 135(7): 1609-1612

- [36] EBISCH, I. M. W.; PETERS, W. H. M.; THOMAS, C. M. G. et al.: Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub) fertile couple. *Human reproduction*, 2006, 21(7): 1725-1733
- [37] KEY, N. S.; MCGLENNEN, R. C.: Hyperhomocyst(e)inemia and thrombophilia. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 2002, 126(11): 1367-1375
- [38] BAUCHART-THEVRET, C.; STOLL, B.; BURRIN, D. G.: Intestinal metabolism of sulfur amino acids. *Nutrition Research Reviews*, 2009, 22: 175-187
- [39] ŠKOVIEROVÁ, H.; VIDOMANOVÁ, E.; MAHMOOD, S. et al.: The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *International journal of molecular sciences*, 2016, 17(10): 1733
- [40] DELLES, CH.: Homocysteine and the very elderly: is there a message for cardiovascular risk? *Journal of hypertension*, 2013, 31 (5): 874-876
- [41] MATO, J. M.; LU, S. C.: Homocysteine, the bad thiol. *Hepatology*, 2005, 41(5): 976-979
- [42] LENTZ, S. R.: Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2005, 3(8): 1646-1654
- [43] GANGULY, P.; ALAM, S. F.: Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition journal*, 2015, 14(1): 6
- [44] MANDAVA, P.; KENT, T.A.: Homocystinuria/Homocystinemia. MedScape, [online]. 2017 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/1952251-overview>
- [45] HUIJBERTS, M. S. P.; BECKER, A.; STEHOUWER, C. D.: Homocysteine and vascular disease in diabetes: a double hit? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2005, 43(10): 993-1000
- [46] HAN, T. W.; ZHOU, S.S.; LI, J.T. et al.: Homocysteine is associated with the progression of non-culprit coronary lesions in elderly acute coronary syndrome patients after percutaneous coronary intervention. *Journal of geriatric cardiology*, 2016, 13(4): 299
- [47] YEH, J. K.; CHEN, C. C.; HSIEH, M. J. et al.: Impact of homocysteine level on long-term cardiovascular outcomes in patients after coronary artery stenting. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 2017, 24(7): 696-705

- [48] GENSER, D.: Homocysteine, vitamins, and restenosis after percutaneous coronary interventions. *Cardiovascular reviews & reports*, 2003, 24(5): 253-258
- [49] DE LUCA, G.; SURYAPRANATA, H.; GREGORIE, G., et al.: Homocysteine and its effects on in-stent restenosis. *Circulation*, 2005, 112(19): e307-e311
- [50] ZAIRIS, M. N.; AMBROSE, J. A.; MANOUSAKIS, S. J. et al.: The impact of plasma levels of C-reactive protein, lipoprotein (a) and homocysteine on the long-term prognosis after successful coronary stenting: The Global Evaluation of New Events and Restenosis After Stent Implantation Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 2002, 40(8): 1375-1382
- [51] BREUCKMANN, F.; NABER, C; BECKERT, J. et al.: Postinterventional homocysteine levels: failure as a predictive biomarker of in-stent restenosis. *International journal of cardiology*, 2006, 108(1): 20-25.
- [52] SCHNYDER, G.; ROFFI, M.; FLAMMER, Y. et al.: Association of plasma homocysteine with restenosis after percutaneous coronary angioplasty. *European heart journal*, 2002, 23(9): 726-733
- [53] DUBSKÁ, L.; HYÁNEK, J.: Stanovení homocysteinu v biologickém materiálu. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 2009, 17(38): 93-5
- [54] REFSUM, H.; SMITH, A. D.; UELAND, P. M. et al.: Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clinical chemistry*, 2004, 50(1): 3-32
- [55] RASMUSSEN, K.; MØLLER, J.: Total homocysteine measurement in clinical practice. *Annals of clinical biochemistry*, 2000, 37(5): 627-648
- [56] DOMAŠINSKÁ, P.: Diplomová práce. *Dynamika hladin homocysteinu a dalších aminothiolů u pacientů po zavedení stentu do koronárního řečiště*. Univerzita Pardubice: Fakulta chemicko-technologická, 2012
- [57] VODOVÁ, M.: Bakalářská práce. *Vliv metabolismu homocysteinu na lidskou reprodukci*. Masarykova univerzita: Přírodovědecká fakulta, 2008
- [58] MANOLESCU, B. N.; OPREA, E.; FARCASANU, I. C. et al.: Homocysteine and vitamin therapy in stroke prevention and treatment: a review. *Acta Biochimica Polonica*, 2010, 57(4): 467-477

- [59] ZHAO, J.; DU, P.; SUN, X. et al.: Development of Electrochemical Sensor for Homocysteine Determination as a Cerebrovascular Disease Biomarker. *International Journal Of Electrochemical Science*, 2017, 12(9): 8642-8650
- [60] Manuál k elektrocheemickému detektoru Coulochem III (ESA, 2004)
- [61] PENG, H. Y.; MAN, C.F.; XU, J. et al.: Elevated homocysteine levels and risk of cardiovascular and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective studies. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2015, 16(1): 78-86.
- [62] LIU, Ch.; YANG, Y.; PENG, D. et al.: Hyperhomocysteinemia as a metabolic disorder parameter is independently associated with the severity of coronary heart disease. *Saudi medical journal*, 2015, 36(7): 839
- [63] OUDI, M. E. L; AOUNI, Z.; MAZIGH, C. et al.: Homocysteine and markers of inflammation in acute coronary syndrome. *Experimental & Clinical Cardiology*, 2010, 15(2): 25
- [64] STEFANINI, G.G.; KALESAN, B.; SERRUYS, P. et al.: Long-term clinical outcomes of biodegradable polymer biolimus-eluting stents versus durable polymer sirolimus-eluting stents in patients with coronary artery disease (LEADERS): 4 year follow-up of a randomised non-inferiority trial. *The Lancet*, 2011, 378(9807): 1940-1948
- [65] SABATÉ, M.; WINDECKER, S.; IÑIGUEZ, A. et al.: Everolimus-eluting bioresorbable stent vs. durable polymer everolimus-eluting metallic stent in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: results of the randomized ABSORB ST-segment elevation myocardial infarction—TROFI II trial. *European heart journal*, 2015, 37(3): 229-240.
- [66] CAPODANNO, D.; GORI, T.; NEF, H. et al.: Percutaneous coronary intervention with everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffolds in routine clinical practice: Early and midterm outcomes from the European multicentre GHOST-EU registry. *European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions*, 2015, 10(10): 1144-1153
- [67] SERRUYS, P. W.; CHEVALIER, B.; DUDEK, D. et al.: A bioresorbable everolimus-eluting scaffold versus a metallic everolimus-eluting stent for ischaemic heart disease caused by de-novo native coronary artery lesions (ABSORB II): an interim 1-year analysis of clinical and procedural secondary outcomes from a randomised controlled trial. *The Lancet*, 2015, 385(9962): 43-54

[68] NOVOTNÝ, V.; PLÍVA, M.; VARVAŘOVSKÝ, I. a kol.: Klinické výsledky pacientů léčených Absorb BVS – zkušenosti jednoho centra. *Invervenční Akutní Kardiologie*, 2017, 16(3): 98-102

Přílohy

Příloha A Anamnézy pacientů

Příloha B Stanovisko Etické komise

Příloha C Složení etické komise

Příloha D Prohlášení Etické komise

Příloha E Informace pro účastníky studie

Příloha F Informovaný souhlas

Příloha G Dotazník

Příloha A Anamnézy pacientů

Pacient	pohlaví	věk	BMI	hypertenze	kouření	DM	poz. rod. anamnéza	diagnóza	statiny	jiná onemocnění	po PCI	vývoj
1	muž	48	32,7	ANO	Exkuřák	NE	ANO	NAP /NSTEMI	ANO - atoris	hypercholesterolemie, stav po benigním nádoru slinných žláz	3 měs.	nyní tlaky na hrudi, únava - podobné jako před NSTEMI, objednána k rekonarografii
2	muž	67	27,1	ANO	Exkuřák	NE	ANO	SAP	ANO - sortis	kolapsový stav, hypercholesterolemie	3 měs.	bez kompl.
3	muž	73	chybí	ANO	ANO	NE	NE	srdeční selhání	NE	osteoporóza, žaludeční vředy	3 měs.	bez kompl.
4	muž	71	29,4	ANO	NE	NE	ANO	SAP	ANO - sortis	hypercholesterolemie	?	bez hospitalizace či revaskularizace, úmrtí nehlášeno
5	muž	69	31,1	ANO	NE	NE	NE	SAP -DR	ANO - rosuvastatin	hypercholesterolemie	3 měs.	bez kompl. - aktivně sportuje
6	muž	44	32,6	NE	ANO	NE	ANO	IM - STEMI	ANO - sortis	hypercholesterolemie, hyperglykemie	3 měs.	při námaze se zadýchává (podobně jako před STEMI), kouří, řidič z povolání
7	žena	68	34,25	ANO	NE	ANO	ANO	ASS	ANO - Torvacard	hypercholesterolemie, ca prsu, mastektomie, moč. kameny, nefrektomie, respirační infekce	3 měs.	zadýchává se při chůzi do kopce, bez bolesti na hrudi
8	muž	64	41,21	ANO	exkuřák	ANO	NE	IM - STEMI	ANO - Tova cart	hypercholesterolemie, hyperurikémie	1,5 roku	bez kompl., mimo onemocnění DK ve vztahu s DM
9	muž	68	29,8	ANO	NE	NE	NE	SAP/NAP	NE	hypercholesterolemie	12 měs.	bez kompl.
10	žena	73	27,2	ANO	NE	ANO	NE	IM - STEMI	ANO - Sortis	hypercholesterolemie	12 měs.	bez kompl., ale psychická zátěž
11	muž	71	27,5	ANO	NE	NE	ANO	IM - STEMI	ANO - Sortis	hypercholesterolemie	12 měs.	bez kompl., jen se zadýchává při námaze
12	muž	64	36,3	ANO	exkuřák	ANO	NE	SAP	před NE	hypercholesterolemie	3 měs.	horší dýchání při zátěži, stejně jako před PCI, indikace k rekonarografii
13	žena	65	23,8	NE	exkuřák	NE	NE	SAP/NAP	ANO - Sortis	hypercholesterolemie	3 měs.	bez kompl., špatný psychický stav
14	muž	72	24,7	ANO	NE	NE	ANO	SAP	ANO - sortis	hypercholesterolemie, astma bronchale, hematurie, prostatektomie, stav po hepatitidě A, mukotomie, antrostomie, po odstranění basaliomu	3 měs.	bez kompl., měsíc po intervenci zvláštní pocity na hrudi, ale vymizelo to
15	muž	58	26,12	ANO	NE	NE	NE	IM - NSTEMI	ANO - sortis	sclerosis prostatae, sclerosis coli vesicae urin, hepatopatie	3 měs.	bez bolesti ani pálení, ale bolest levé paže (není jasné, zda to má koronární původ)
16	muž	65	30,86	ANO	exkuřák	NE	NE	SAP	ANO - rosuvastatin	hypercholesterolemie, stav po lymfické borelióze	3 měs.	obtíže odezněly, ale má zažívací potíže - pálení žáhy, suchý kašel
17	žena	60	21	ANO	NE	NE	NE	IM - NSTEMI	ANO - Sortis	hypercholesterolemie, chronická ledvinná insuficience, normocytární monochromní anemie	3 měs.	bez kompl.

Pacient	pohlaví	věk	BMI	hypertenze	kouření	DM	poz. rod. anamnéza	diagnóza	statiny	jiná onemocnění	po PCI	vývoj
18	muž	58	25,62	NE	exkuřák	NE	NE	SAP	před NE	hypercholesterolémie, hemangiom jater	3 měs.	po 4 dnech výměna stentu kvůli trombóze za kovový, setrvalé bolesti na hrudi - poslán na plicní
19	muž	62	28,4	ANO	NE	NE	NE	AIM - STEMI	ANO - Sortis	hypercholesterolémie	3 měs.	bez kompl.
20	muž	61	18,7	NE	exkuřák (měsíc)	NE	ANO	IM - NSTEMI	ANO - sortis	hypercholesterolémie, CHOPN, odstraněný plicní lalok - Mycobacterium	3 měs.	plicní diagnóza
21	muž	72	28,7	ANO	ANO	NE	NE	IM - STEMI	ANO - Atoris	hypercholesterolémie, vertebroalgiický syndrom páteře	3 měs.	někdy pálení, dlouhodobě se zadýchává při chůzi do schodů
22	žena	76	43,3	ANO	NE	prediab.	ANO	SAP	ANO - sortis	hypercholesterolémie, astma, chronická hepatitis, porušení glu. tolerance	3 měs.	trombóza stentu den po DR - proto chybí odběr B a C, nyní námahový tlak na hrudi
23	žena	74	32	ANO	NE	ANO	ANO	SAP	ANO - Sortis	hypercholesterolémie, artróza, stav po borelióze, glaukom	3 měs. po zákroku, nikoliv po DR	zadýchává se při chůzi, jinak bez obtíží
24	muž	60	26	ANO	NE	NE	NE	IM - STEMI	ANO - sortis	hypercholesterolémie, artróza kyčlí	3 měs.	krátká epizoda tlaku na hrudi
25	muž	61	30,6	ANO	Exkuřák	NE	NE	SAP	ANO - Tulip	hypercholesterolémie	3 měs.	bez kompl., rozkolísaný TK - v souvislosti se stresem
26	muž	48	27,1	NE	ANO	NE	NE	IM - STEMI	ANO - Sortis, bez fibrátů	hypercholesterolémie	3 měs.	úzkosti a záchvaty paniky - bez kardiologického původu
27	muž	63	29,4	ANO	exkuřák	ANO	ANO	IM - STEMI	ANO - Sortis, bez fibrátů	hypercholesterolémie	3 měs.	zadýchává se při větší námaze
28	muž	60	30,1	NE	NE	prediab.	NE	SAP	NE	hypercholesterolémie, chronická hepatopatie, jaterní hemangiom, flebotrombóza, artróza	3 měs.	bez kompl.
29	muž	82	30,08	ANO	Exkuřák	ANO	NE	SAP	před NE	hypercholesterolémie, ca hrtanu	3 měs.	cítil se dobře, ale nedávno nastydl (zhoršení dýchání, tlukot srdce) - podezření na recidivu karcinomu
30	muž	62	33,1	ANO	Exkuřák	NE	NE	SAP	ANO - Sortis	hypercholesterolémie	3 měs.	stav dobrý, ale bolest v lýtku
31	žena	63	27,3	ANO	Exkuřák 2 měsíce	NE	ANO	SAP	ANO - Sortis	hypercholesterolémie, thyreopatie	3 měs.	stav lepší, ale zadýchává se při námaze

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 zaměřena 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 Štásek, 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. Kandár, 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.
Kýjevská 4a
532 03 Pardubice



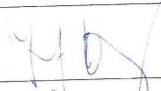


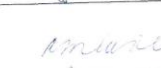

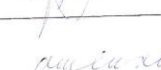
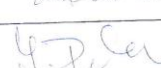




.....
MUDr. Josef Hájek, CSc.
předseda Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.

Příloha C Složení Etické komise

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.
Kyjevská 44
532 03 Pardubice

Prohlášení / Declaration

Tímto potvrzují, že Etická komise při Pardubické krajské nemocnici, a.s. postupuje v souladu s principy Správné klinické praxe (ICP 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.
Kyjovská 44
532 03 Pardubice

.....
podpis předsedy/pověřené osoby

Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a.s.

EC Chairman's /Designee's Signature

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 potažená 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 potažené výše uvedeným léčivem zabraňujícím 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.

Příloha F Informovaný souhlas

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 G Dotazník

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)

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)

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: