

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Dominik Novák

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Klinický význam gama-glutamyltransferasy u pacientů s onemocněním
koronárních tepen

Dominik Novák

Bakalářská práce

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Dominik Novák**
Osobní číslo: **C19188**
Studijní program: **B0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Klinický význam gama-glutamyltransferasy u pacientů s onemocněním koronárních tepen**
Téma práce anglicky: **The Clinical Importance Of Gamma-glutamyltransferase In Patients With Coronary Artery Disease**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Z dostupné literatury uspořádejte informace o klinickém využití gama-glutamyltransferasy u pacientů s onemocněním koronárních arterií.
2. Zaměřte se také na vztah tohoto enzymu k dalším laboratorním parametrům monitorovaným u této skupiny pacientů.
3. Změřte hladiny gama-glutamyltransferasy u vybraných pacientů s onemocněním koronárních arterií.
4. Aktuální poznatky a získané výsledky zpracujte a přehledně uspořádejte.

Rozsah pracovní zprávy: 25 s.
Rozsah grafických prací: dle potřeby
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

LS.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 01. 07. 2022

Dominik Novák

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval Mgr. Pavle Žákové, Ph.D. za velkou pomoc, cenné rady, neskutečnou vstřícnost, velkou trpělivost a hlavě za skvělé vedení při vypracovávání této práce. Mé díky patří také Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za pomoc s praktickým provedením této práce. Dále bych chtěl poděkovat Tereze Brátové za podporu, trpělivost, a hlavně za pomoc při psaní této práce. Samozřejmě chci poděkovat své rodině za podporu během celé doby mého studia. Také děkuji všem ostatním, kteří se na realizaci této práce nějakým způsobem podíleli. Velké poděkování patří i Nemocnici Pardubice a.s. za poskytnutí vzorků a také i jejich dárcům.

ANOTACE

Tato práce se zabývá využitím gama-glutamyltransferasy (GGT), což je enzym, který je účinným biomarkerem onemocnění jater a ledvin, zároveň se jedná o enzym, jehož aktivita roste při zánětech. A jelikož ateroskleróza je zánětlivé onemocnění koronárních tepen, předpokládáme, že GGT lze využít i jako biomarker tohoto kardiovaskulárního onemocnění. Z toho důvodu byly provedeny analýzy vzorků od kardiologických pacientů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Gama-glutamyltransferasa, ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění, koronární tepny, biomarker, perkutánní koronární intervence

TITLE

The Clinical Importance of Gamma-glutamyltransferase in Patients with Coronary Artery Disease.

ANNOTATION

This thesis deals with the use of Gamma-glutamyltransferase (GGT), which is an enzyme that is an effective biomarker of liver and kidney disease. It is also an enzyme whose activity increases during inflammation. Considering atherosclerosis as an inflammatory disease of the coronary arteries, we assume that GGT can be also used as a biomarker of this cardiovascular disease. For this reason, there were analyzed samples from cardiac patients.

KEYWORDS

Gamma-glutamyltransferase, atherosclerosis, cardiovascular disease, coronary arteries, biomarker, percutaneous coronary intervention

OBSAH

Úvod.....	12
Teoretická část	13
1. Gama-glutamyltransferasa	13
1.1 Gama-glutamyllový cyklus	15
1.2 Stanovení GGT.....	16
1.2.1 Spektrofotometrie	16
1.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	17
1.3 GGT a alkohol.....	17
1.4 GGT a vliv léků.....	17
1.5 Preanalytické vlivy	18
1.6 Referenční hodnoty	19
1.7 Biomarker kardiovaskulárních onemocnění	19
1.7.1 Oxidační stres	20
1.7.2 Zánět	20
2. Ateroskleróza	22
2.1 Koronární cévy.....	23
2.2 Rizikové faktory	23
2.2.1 Věk.....	24
2.2.2 Chronický zánět	24
2.2.3 Genetika	24
2.2.4 Pohlaví	25
2.2.5 Metabolismus lipoproteinů	25
2.2.6 Vysoký krevní tlak.....	25
2.2.7 Diabetes	25
2.2.8 Obezita a pohyb	26
2.2.9 Kouření	26

2.2.10	Střevní mikroflóra.....	26
2.3	Vznik onemocnění	27
2.4	Kalcifikace	28
2.5	Komplikace	28
2.6	Angina pectoris	29
2.6.1	Dělení anginy pectoris	30
2.6.2	Léčba anginy pectoris	30
2.7	Léčba aterosklerózy	31
	Praktická část	33
3.	Materiály, pacienti a metoda stanovení	33
3.1	Pomůcky.....	33
3.2	Chemikálie	33
3.3	Pacienti.....	33
3.4	Vzorky.....	36
3.4.1	Příprava séra	36
3.4.2	Příprava plazmy	36
3.5	Princip metody	36
3.6	Postup.....	37
3.6.1	Výpočet aktivity GMT.....	38
4.	Výsledky	39
	Diskuse.....	48
	Závěr	52
	Použitá literatura	53

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1	Struktura GGT, [3]	13
Obrázek 2	Reakce katalyzována gama-glutamyltransferázou (GGT), vlastní tvorba dle [1]...14	
Obrázek 3	Gama-glutamyllový cyklus, [11].....	15
Obrázek 4	Popis zánětu, [27]	21
Obrázek 5	Rozdíl ve struktuře tepny a žíly, [28]	22
Obrázek 6	Rozvoj aterosklerózy, upraveno z originálu [1]	27
Obrázek 7	Hypertrofie myokardu, [42]	29
Obrázek 8	Aortální stenóza, upraveno dle [41]	29
Obrázek 9	Schéma rozmístění na titrační destičce, vlastní tvorba	38
Obrázek 10	Graf průměrů a mediánů výsledků pacientů absolvujících dokončení revaskularizace po akutním koronárním syndromu	42
Obrázek 11	Graf průměrů a mediánů výsledků pacientů se SAP	42
Obrázek 12	Graf průměrů a mediánů výsledků pacientů absolvujících dokončení revaskularizace po stabilní angině pectoris	43
Obrázek 13	Graf průměrů a mediánů výsledků pacientů po akutním infarktu myokardu	43
Obrázek 14	Graf průměrů a mediánů výsledků nezávisle na pacientově anamnéze	44
Obrázek 15	Graf průměru a mediánů výsledků plazem a sér, k porovnání bylo k dispozici 33 vzorků plazem a sér	44
Obrázek 16	Graf korelace mezi hsCRP a GGT	46
Obrázek 17	Graf korelace GGT s Il-6	47
Tabulka 1	Frakce GGT	14
Tabulka 2	Složení reagensů.....	33
Tabulka 3	Charakteristika pacientů	35
Tabulka 4	Složení směsi vzorek a pracovní roztok	37
Tabulka 5	Výsledky pacientů po AIM.....	39
Tabulka 6	Výsledky pacientů absolvujících DR po SAP	40
Tabulka 7	Výsledky pacientů se SAP	40
Tabulka 8	Výsledků pacientů absolvujících DR po AKS	41
Tabulka 9	Vztah albuminu s GGT	45

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

GGT	Gama-glutamyltransferasa
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z anglického: High-Performance Liquid Chromatography
EC	Číslo klasifikace enzymu, z anglického: Enzyme Commission Number
LDL	Nízko hustotní lipoprotein, z anglického: Light Density Lipoprotein
DNA	Deoxyribonukleová kyselina, z anglického: Deoxyribonucleic Acid
VLDL	Velmi nízko hustotní lipoproteiny, z anglického: Very Light Density Lipoprotein
HDL	Vysoce hustotní lipoprotein, z anglického: High Density Lipoprotein
HMG-CoA	β -hydroxy- β -methylglutaryl-koenzym A
PCI	Perkutánní koronární intervence, z anglického: Percutaneous coronary intervention
AKS	Akutní koronární syndrom
AP	Angina pectoris
AIM	Akutní infarkt myokardu
SAP	Stabilní angina pectoris
NAP	Nestabilní angina pectoris
AMK	Aminokyselina
CMP	Cévní mozková příhoda
ICHDK	Ischemická choroba dolních končetin
DR	Dokončení revaskularizace
hsCRP	Vysoce senzitivní C-reaktivní protein, z anglického: High-sensitivity C-reactive protein
Il-6	Interleukin 6
Cys	Cystein
Gly	Glycin
Glu	Glutamin

ÚVOD

Gama-glutamyltransferasa (dále jen „GGT“) je velmi citlivým jaterním markerem, pomocí kterého se dají rozpoznat onemocnění jater a žlučových cest. Nárůst tohoto enzymu je ale patrný i u alkoholiků nebo v případě, že pacient bere léky na ředění krve (například heparin). Po vysazení léků se však hodnota rychle normalizuje. Jeho specifita je ale nízká, a proto ho lze využít i k indikaci diabetu, akutní pankreatitidy (zánět slinivky břišní), nebo po akutním infarktu myokardu.

V současnosti se uvažuje o spojitosti mezi GGT a aterosklerózou, což je zánětlivé onemocnění koronárních tepen. Z toho důvodu je snaha zachytit pacienty v co nejranějším stádiu, neboť k rozvoji dochází již v mladém věku, a to hlavně díky konzumaci nadměrně tučného jídla.

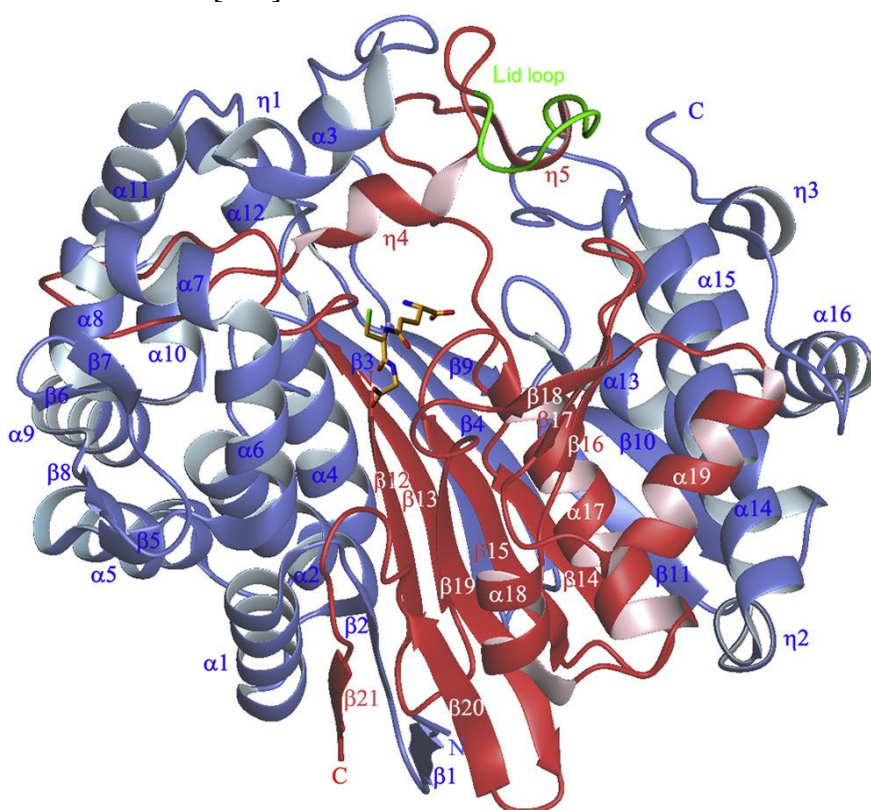
Koronární cévy zajišťují vyživování a okysličování srdce. Jedná se o dvě věčité tepny a žíly. V případě, že jsou ucpany, dochází k ischemii srdce a rozvoji infarktu myokardu. Ačkoliv v poslední době dochází k poklesu úmrtí na toto onemocnění díky brzké zdravotní péči, tak se stále jedná o velmi častou příčinu úmrtí. Proto je snaha zabránit vzniku obstrukce a zachytit pacienty ještě ve fázi aterosklerózy neboli kornatění tepen.

Je snaha odhalit toto onemocnění už v raném stádiu. Jedním z možných indikátorů může být gama-glutamyltransferasa. Tato bakalářská práce se zaměřuje na možnost využití GGT jako markeru pro včasnou indikaci aterosklerózy a jejím cílem bylo ověřit hypotézu, zda tento enzym může být využit jako biomarker kardiovaskulárních onemocnění.

TEORETICKÁ ČÁST

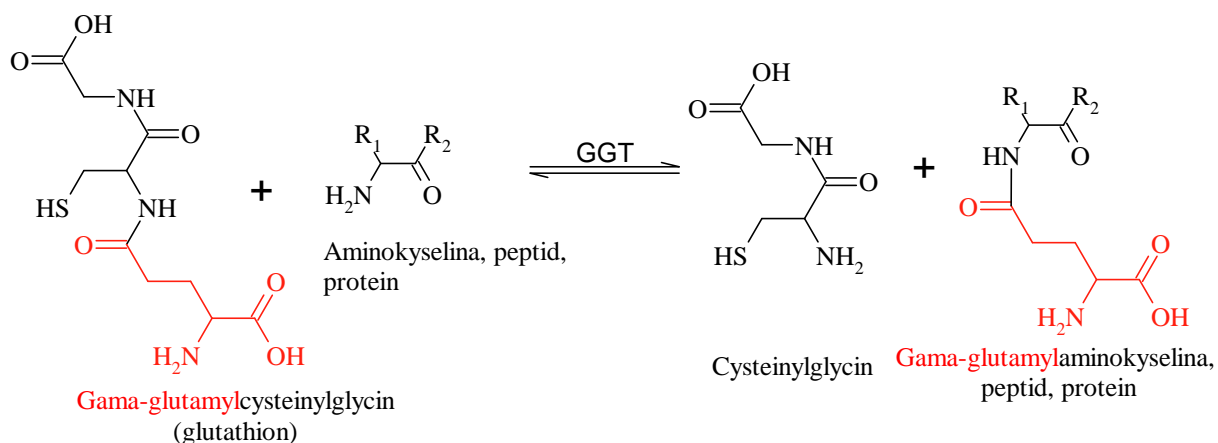
1. Gama-glutamyltransferasa

GGT je glykoproteinový enzym vázaný v cytoplazmatické membráně buněk pankreatu, jater, žlučových cest a ledvin. Jeho mezinárodní označení je [EC] 2.3.2.2. a jeho strukturu lze vidět na Obrázek 1. Jedná se o N-terminální nukleofilní hydrolasu, která katalyzuje přenos některých aminokyselin a peptidů z extracelulárního prostředí do buňky prostřednictvím gama-glutamylvého cyklu. Štěpí všechny gama-glutamylvé vazby bez ohledu na substrát. Podílí se i na cysteinové homeostáze, kde má velmi významnou roli. Schéma reakce je uvedeno na obrázku 2. [1–9]



Obrázek 1 Struktura GGT, modře je zbarvena velká podjednotka, červeně malá, zeleně je znázorněna smyčka, která zavírá aktivní centrum enzymu, v aktivním centru se nachází glutathion, jehož struktura je zbarvena oranžově [3]

Lidská GGT je vytvořena jako 569 aminokyselin dlouhý polypeptid, který je neaktivní. Jeho aktivace je zprostředkována posttranslační modifikací, kdy dojde ke změně struktury za katalýzy threoninem. Tím vznikne zralý GGT, který se skládá z dvou podjednotek, velké a malé, a má molekulovou hmotnost 68 kDa. Velká podjednotka zprostředkovává přichycení GGT k cytoplazmatické membráně prostřednictvím N-terminální domény, jež má vysoce hydrofobní vlastnosti. Je tvořena 380 aminokyselinami, její molekulová hmotnost je 46 kDa. Malá podjednotka váží 22 kDa a zajišťuje katalytickou činnost enzymu, tvoří ji 189 AMK.



Obrázek 2 Reakce katalyzována gama-glutamyltransferázou (GGT), vlastní tvorba dle [1]

Na zralý enzym je prostřednictvím N-glykosylačních vazeb navázáno 7 glukosových zbytků. Množství navázaných glukosových zbytků se může lehce lišit, to má za následek mírné odchylky v celkové hmotnosti glykoproteinu. Tyto drobné detaily mohou být určeny tkáňovým umístěním či určitou specifičností. V současné době jsou známy 4 frakce GGT, viz tabulka 1. Předpokládá se, že velká GGT je prekurzorem pro zbývající frakce. Sama je tvořena membránovými mikrovezikuly. Volná GGT není vázaná na žádnou membránu a je plně rozpustná v plazmě. Bylo prokázáno, že k tomu nepotřebuje žádný nosič, ať už lipoprotein či albumin. [1–9]

Tabulka 1 Frakce GGT

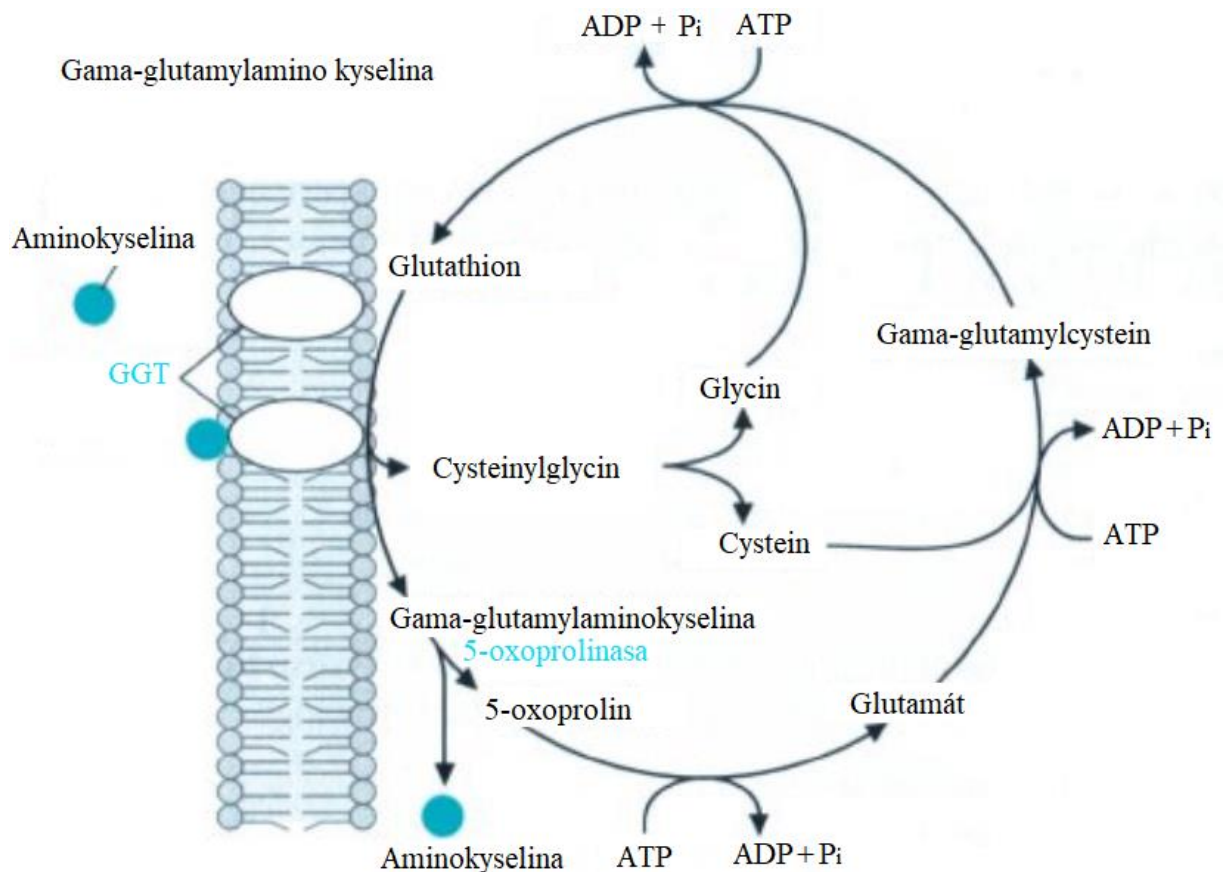
Frakce GGT	Molekulová hmotnost (kDa)
Big (velká) GGT	2000
Medium (střední) GGT	1000
Small (malá) GGT	200
Free (volná) GGT	70

U lidí je GGT kódována 7 různými geny umístěnými na chromozomu 22q11. Nejlépe definovaným genem je GGT 1, ostatní geny či pseudogeny se liší jen v řádu jednotek procent. Přesto jsou však schopny tvořit aktivní enzym pouze dva geny, a to GGT 1 a GGT 5. Gen GGT 2 je téměř totožný s genem GGT 1, jeho produkty se ale na rozdíl od prvního genu neumí aktivovat samy. Jsou umístěny na plazmatické membráně, kde podléhají rychlé degradaci cytoplazmatickými proteázami. Výše zmíněný gen GGT 5 má s prvním genem shodu jen ze 40 procent. [1][8][9]

Syntéza GGT je indukována hlavně oxidačním stresem. Jedním z významných spouštěčů je alkohol, který zvyšuje oxidační stres. Velmi vzácně se může objevit jedinec s deficitem GGT, který však nebyl způsoben mutací některého z genů, ale nadměrným vylučováním glutathionu do moči. U takto zasažených pacientů byly popsány i násobně nižší koncentrace cysteinu v plazmě. [1][3][9][10]

Díky svému umístění je využíván jako indikátor poškození jater vlivem akutního či chronického zánětu, obstrukcí žlučových cest a zánětu pankreatu. Jelikož jeho hladina v séru roste i vlivem nadměrné konzumace alkoholu, je hojně využíván pro diagnostiku míry konzumace alkoholu. Hladina GGT může být ovlivněna i konzumací některých léků například heparinu, antidepresiv a dalších. [1][10][11]

1.1 Gama-glutamylový cyklus



Obrázek 3 Gama-glutamylový cyklus, ADP je adenosindifosfát, ATP je adenosintrifosfát, P_i je anorganický fosfát, GGT je gama-glutamyltransferasa, [11]

Hlavní funkcí GGT je extracelulární katabolismus glutathionu, ten je tvořen třemi aminokyselinami: cysteinem, glycinem a zbytkem kyseliny glutamové. Glutathion je velmi důležitý antioxidant, převážně v erytrocytech, v nichž pomáhá udržovat oxidoredukční

prostředí. Jeho další důležitou funkcí je účast při odstranění některých xenobiotik, kdy po jejich navázání vzroste rozpustnost ve vodě a tím se snáze vyloučí ledvinami. [1][2][8][9][10]

GGT katalyzuje přenos aminokyseliny či peptidu skrz cytoplazmatickou membránu. Na aminokyselinu v extracelulární tekutině naváže gama-glutamylový zbytek, který poskytne glutathion uvnitř buňky. Zbylý dipeptid cysteinylglycin je hydrolyzován dipeptidasou na volný cystein a glycin. Po průchodu glutamylového zbytku s aminokyselinou dojde k rozštěpení této sloučeniny a gama-glutamylový zbytek se opět váže na cystein a glycin za vzniku glutathionu. Tato reakce probíhá v aktivním centru GGT, jenž je znázorněno na oranžově na obrázku 1. [1–3][5][7–10]

Další důležitou funkcí je schopnost zvyšování dostupnosti aminokyselin, zvláště cysteinu. Díky zvýšené aktivitě GGT na povrchu buněk okolo proximálního tubulu umožňuje zpětné vychytávání aminokyselin, a to hlavně cysteinu, tím, že štěpí glutathion přítomný v glomerulárním filtrátu. [1][2][8–10]

1.2 Stanovení GGT

Při stanovení GGT se lze zaměřit na celkovou aktivitu enzymu nebo na aktivitu jednotlivých frakcí. Jako základní metody se používají spektrofotometrie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. [12]

1.2.1 Spektrofotometrie

Jednou ze základních a jednoduchých analytických metod, které lze použít ke kvantitativnímu průkazu látek je spektrofotometrie. Umožňuje stanovit množství látky přímo či nepřímo v závislosti na stanovované látce. V případě GGT bude stanovení nepřímé, jelikož bude měřen barevný produkt vznikající ze substrátu za katalýzy GGT. Tím bude stanovena celková GGT. [12]

Principem stanovení je reakce, která vychází z té probíhající v organismu. Je sledován přenos gama-glutamylového zbytku ze substrátu na glycyglycin. Jako substrát je používán L-gama-glutamyl-3,4-nitroanilid. V důsledku přenosu glutamylového zbytku je uvolněn p-nitroanilid, který je barevný a je proto vhodný indikátor. Jeho přírůstek je signalizován vznikem žlutého zbarvení. Toto zbarvení je následně měřeno spektrofotometricky a je měřena změna absorbance při 410 nm v závislosti na čase. [12]

1.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Dalším způsobem stanovení je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), ta je vůči spektrofotometrickému stanovení výrazně dražší, ale je mnohem citlivější, přesnější a umožňuje nám stanovit jednotlivé frakce GGT. [12][13]

Pomocí HPLC lze sledovat jednotlivé enzymatické reakce nezávisle na typu enzymu, substrátu či produktu. Dalšími výhodami jsou vysoká specifita a reprodukovatelnost. [12]

1.3 GGT a alkohol

Dříve byl tento enzym využíván především jako citlivý marker užívání alkoholu. Bylo potvrzeno, že alkoholici mají vyšší hladiny GGT oproti abstinentům. Příčinou tohoto jevu je nadměrná zátěž jater vlivem konzumace alkoholu a v případě, že byl jedinec i obézní, byla tato zátěž ještě vyšší. Byly provedeny četné studie zaměřené na vliv alkoholu na GGT, ale i na kardiovaskulární onemocnění. [2][11][14][15]

Bylo zjištěno, že mírné pití alkoholu má lehký ochranný účinek, jenž spočívá ve snížení všech rizikových faktorů způsobených životosprávou. Zároveň nebyl prokázán negativní vliv alkoholu na vznik a rozvoj těchto onemocnění. [2][11]

1.4 GGT a vliv léků

Jako všechny procesy v těle i aktivita GGT je ovlivněna řadou léčiv. Nejrozsáhlejší skupinou jsou antikonvulziva. To jsou léky využívající se při prevenci a léčbě epileptických záchvatů a křečí. Jejich efekt spočívá v účinku na sodíkové, vápníkové, draslíkové, gama-aminomáselné (inhibiční) a glutamátové (excitační) receptory. Díky tomu dochází k potlačení popudlivosti (excitability) neuronů. Mechanismus účinku u většiny antiepileptik však není obeznámen. [2]

Některé studie prokázaly, že hladiny sérové GGT vzrostly při snížení jaterního glutathionu. To nasvědčuje o tom, že se GGT podílí na udržování jaterní homeostázy glutathionu. Řada léků má tento efekt, kdy dojde ke zvýšení GGT a snížení glutathionu. Výjimku tvoří fenobarbital, to je silný induktor enzymů, ale po jeho podání vzroste glutathion i GGT. Bylo prokázáno, že k indukci GGT dochází pouze tehdy, když léky snižují hladiny glutathionu v játrech. [2]

Tento poznatek musí být zohledněn při využití GGT jako biomarkeru, neboť by mohlo docházet ke zkreslení výsledků. To samé platí i při indikaci užívání alkoholu, neboť pacient, který není notorickým alkoholikem a nemá poškozená játra, může mít také zvýšené hladiny GGT, a to právě vlivem těchto léků. [2]

1.5 Preanalytické vlivy

Kvalita odebrání vzorku a jeho převoz do laboratoře jsou nezbytnou součástí zpracování vzorku, jelikož mohou velmi významně ovlivnit kvalitu a přesnost výsledků. Krev musí být odebrána nejlépe bez škrtidla anebo s ním ale maximálně po dobu jedné minuty, aby nedošlo k změně koncentrací některých analytů. Zároveň je kladen velký důraz na pacientovu spolupráci, bez které není možné mít kvalitní vzorek. Pacient musí před odběrem vypít dostatek tekutin (voda, černý čaj) a dodržet bez tučnou dietu alespoň 12 hodin před odběrem. Na odběr by se měl pacient dostavit nalačno. Tím se minimalizuje riziko náběru chylózního vzorku. [11][40]

Chylozita vzorku se projeví mléčným zakalením, které může rušit spektrofotometrická stanovení. Samozřejmě záleží na jeho intenzitě. Laboratoře jsou dnes schopny změřit chylozitu a posoudit, zda to bude rušit významně či nikoliv, dle toho se rozhodnou, jestli vzorek vrátí nebo zpracují. Chylozitu mohou způsobit i metabolické poruchy, například hyperlipidémie. [11][16][40]

Hemolýza je dalším významným faktorem, který může ovlivnit přesnost stanovení. Může být způsobena špatným náběrem krve, kdy je vyvinut příliš velký podtlak, nebo nedostatečným naplněním zkumavky s reagensy či špatnými podmínkami při přepravě. Během přepravy musí být vzorek udržován v chladu a nesmí být vystaven nadměrnému třepání. Hemolýza je nejčastější příčinou odmítnutí vzorku na příjmu v laboratořích. [11][16][17][40]

V souvislosti s GGT je hemolýza nejzásadnější, protože intenzivní červené zbarvení jednak významně ruší spektrofotometrickou detekci, ale zároveň rozpadem erytrocytů dochází k uvolnění GGT vázané v jejich membráně, to může zvýšit plazmatickou aktivitu GGT. Současně se ale z erytrocytů uvolní hem, který obsahuje iont železa (Fe^{3+}) a může způsobit odklon GGT redukce probíhající v gama-glutamylovém cyklu k oxidaci a tím ke tvorbě volných kyslíkových radikálů, což může mít za následek snížení její aktivity. [11][16][17][40]

Vzhledem k tomu, že stanovení GGT pro výzkumné účely neprobíhá okamžitě, je nutné vzorky skladovat. Kvůli tomu jsou vzorky zamrazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při dlouhodobějším skladování na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Výhodou je, že studie dokázaly, že GGT stejně jako další jaterní enzymy nejsou zmrazením ovlivněny. Stejně tak následné rozmrazení nemá na aktivitu GGT zásadní vliv. [18]

1.6 Referenční hodnoty

GGT je vždy přítomná v séru „zdravých“ jedinců. Její hodnoty se liší v závislosti na věku a pohlaví. Novorozenci mají hodnoty klidně i 7krát vyšší, než jsou horní hranice referenčního rozmezí. Přibližně v šestém měsíci tyto hodnoty klesají a odpovídají hodnotám dospělých jedinců. U mužů je referenční mez: 0,18–1,02 $\mu\text{kat/L}$ (10,8–61,2 U/L) a u žen: 0,15–0,65 $\mu\text{kat/L}$ (9–39 U/L). [1]

V průběhu patologických změn je prokázán nárůst koncentrace GGT. Hladiny jsou výrazně zvýšené u pacientů s jaterním onemocněním, kdy je cirkulující GGT vázána na plazmatické lipoproteiny. [1][19]

1.7 Biomarker kardiovaskulárních onemocnění

GGT je již dlouho považována za biomarker zánětlivých onemocnění jater, žlučníku a ledvin, ale až v současnosti se uvažuje i o jejím významu při kardiovaskulárních onemocněních. V souvislosti s játry vykazuje vysokou citlivost na jejich poškození, kdy dochází k jejímu několikanásobnému zvýšení, současně i s dalšími jaterními enzymy jako jsou aspartát a alaninaminotransferasa. K nárůstu hladiny GGT dochází bez ohledu na příčinu poškození. Nejvyšších zvýšení však dochází při poškození žlučníku, a hlavně při cholestázách, která je způsobena poruchou transportu žluči v játrech anebo obstrukcí žlučových cest, kdy nedochází k volnému odtoku žlučových kyselin do střev. Jelikož se jedná o enzym, jehož hladina se zvedá při zánětu, lze tedy předpokládat, že i v případě chronického zánětu koronárních tepen (aterosklerózy) bude hrát důležitou roli v jejich včasné identifikaci. [1][15][21][22][23][24]

Hladina GGT, potažmo její zvýšení, je úzce spojeno se všemi rizikovými faktory pro rozvoj aterosklerózy až po infarkt. To znamená, že GGT je velmi dobrým biomarkerem pro kardiovaskulární onemocnění, a tudíž i aterosklerózu, protože už její zvýšení signalizuje větší zátěž organismu ze strany oxidačního stresu a zánětů. Díky tomu mohou kardiologové lépe sledovat pacienty, ale hlavně jim doporučit vhodnou úpravu životního stylu. [1][7][15][22][25]

Bylo prokázáno, že mírné zvýšení hladiny plazmatické GGT signalizuje zvýšené riziko pro vznik kardiovaskulárních onemocnění. Nejčastěji se GGT podílí na oxidaci LDL, což je klíčový krok pro rozvoj aterosklerózy. Bylo zjištěno, že se v aterosklerotickém plátu GGT nejen akumuluje v pěnových buňkách, ale je zde i syntetizována z genu GGT 1. [7][15][22]

1.7.1 Oxidační stres

V organismu nepřetržitě probíhají metabolické děje, při kterých neustále vznikají nestabilní radikály, které jsou následně zpracovány na užitečné produkty, energii a metabolity. Je udržována křehká rovnováha mezi vznikem a zánikem těchto radikálů. Díky tomu nedochází k poškození organismu, ale jeho profitování z daných dějů. Tato rovnováha je udržována pomocí takzvaných antioxidantů. Ty reagují s volnými kyslíkovými radikály, jakožto superoxidy, peroxidy vodíku a další, a převádí je na neškodné látky. Mezi významné antioxidanty patří kyselina močová, superoxiddismutasa či třeba glutathion. [1][7][11][25]

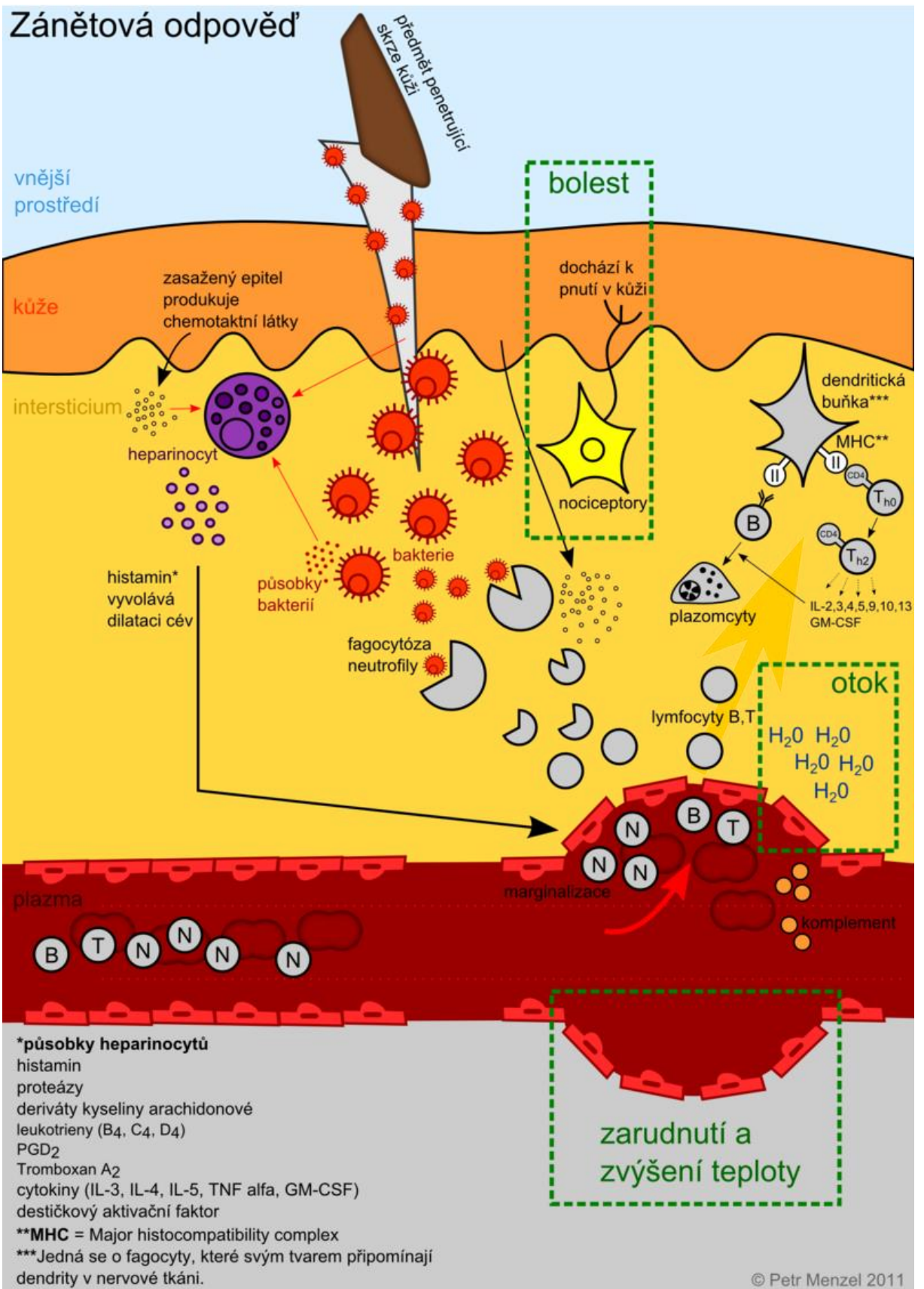
Porušení této rovnováhy nastává zejména při poškození buňky, kdy nedochází k syntéze důležitých antioxidantních enzymů. Dále také při přetěžování organismu a nadměrném stresu. Kromě negativních účinků mají kyslíkové radikály i důležitou funkci v imunitním systému, a to likvidaci fagocytovaných patogenů. To vypovídá o jejich potenciálním účinku na buňky organismu, kde by mohly při porušení rovnováhy napáchat velké škody, například na genetické výbavě. [1][7][11][25]

1.7.2 Zánět

Je přirozenou odpovědí organismu na poškození tkáně, jeho hlavním úkolem je obrana. Problém však může nastat při rozvoji chronického zánětu, kdy dochází k poškození vlastní zdravé tkáně. Zánět může být vyvolán fyzickým poškozením tkáně, chemickými vlivy, ischemií anebo působením mikroorganismů. Celý postup je ukázán na Obrázek 4. [1][22]

Prvním stupněm reakce na některý z výše uvedených podnětů je lokální zánět. Při něm je aktivován koagulační systém při fyzickém porušení tkáně. Dále je aktivován imunitní systém, který postupuje z nejbližší kapiláry díky zvýšení její permeability. Zvýšení propustnosti je umožněno díky produkci histaminu, serotoninu interleukinu 8 a dalších chemických látek. Ty jsou produkovány poškozenými buňkami. Poškozením tkáně dochází i k aktivaci Hagemanova faktoru, který aktivuje kalikrein z prekalikreinu. Ten přímo štěpí C5 složku komplementu, jejíž štěpné produkty aktivují žírné buňky produkující histamin. Ten je vazodilatační látkou, ale i aktivátorem bolesti. [1][7][22]

Dalším stupněm je systémová odpověď, kdy dochází ke zvýšené produkci leukocytů, horečce, zvýšenému tepu, zvýšené tepové frekvenci a vyplavení glukokortikoidů. Také jsou produkovány proteiny akutní fáze na úkor ostatních bílkovin. Jejich úkolem je snížit rozsah poškození okolní tkáně. Mezi ně patří fibrinogen, C reaktivní protein a další. [1][22]

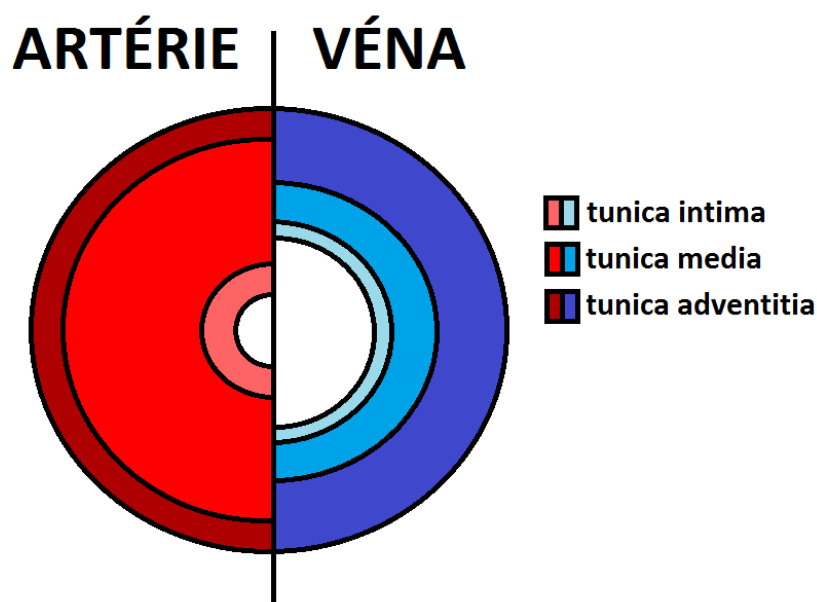


Obrázek 4 Popis zánětu, [27]

2. Ateroskleróza

Je to chronické zánětlivé onemocnění, při kterém dochází k ukládání tukových kapének ve vnitřní straně cév, označuje se také jako kornatění tepen. Toto ukládání tuků způsobuje, že se doposud flexibilní cévní stěna pomalu mění a ztrácí svoji pružnost. Zároveň tvořená tuková překážka, jinak označovaná jako aterosklerotický plát, může způsobit úplné zneprůchodnění cévy. V důsledku ucpání nastává ischemie daného orgánu. Nejčastěji se toto onemocnění spojuje se srdcem. [2]

Krevní cévy dělíme na 3 základní typy: tepny (artérie), žíly (vény) a vlasečnice (kapiláry). Tepny zprostředkovávají rozvod krve od srdce k orgánům. Žíly vedou krev z orgánů do srdce. Vlasečnice jsou nezbytnou součástí oběhové soustavy, neboť právě díky nim dochází k výměně mezi krví a tkání. Jsou tvořeny tenkou vrstvou endotelových buněk a hladké svaloviny. Tepny a žíly jsou oproti tomu tvořeny několika vrstvami. Jejich stěny jsou proto silnější, což znemožňuje výměnu látek s okolím. Vnitřní vrstva je tvořena endotelovými buňkami, ty nasedají na subendotelovou vrstvu, která je tvořena převážně kolagenními vlákny, společně tvoří *tunicu intimu*. Na ní nasedá *tunica media*, která je tvořena buňkami hladké svaloviny, jež do svého okolí produkují glykosaminoglykany, mezi ně spadá kyselina hyaluronová anebo třeba heparin. Další složkou této vrstvy jsou elastická vlákna. Na vnější straně se nachází *tunica adventitia*, která je tvořena převážně kolagenními vlákny, fibroblasty (kolagenní a elastinová vlákna) a buňkami hladké svaloviny. Na Obrázek 5 je vidět rozdíl ve stavbě tepny a žíly. [2]



Obrázek 5 Rozdíl ve struktuře tepny a žíly, [28]

2.1 Koronární cévy

Tyto tepny a žíly zprostředkovávají okysličování a vyživování srdce. Okysličená krev proudí k srdci prostřednictvím dvou koronárních tepen, levé a pravé. U většiny lidí zajišťuje největší podíl pravá koronární tepna, která zásobuje pravou komoru a předsíň, spodní část levé komory a mezikomorový prostor. Levá koronární tepna zaopatřuje zbytek levé komory a celou levou předsíň. [28][30–32]

Věnicité cévy mezi sebou bohužel netvoří propojení (anastozomy), a proto když dojde k ucpání některé z nich, nemá šanci krev obstrukci obejít. Z toho důvodu tkáň v okolí ucpání a dál od něj není nijak vyživována a dochází k ischemii. To způsobí infarkt myokardu. [28][30][32]

Průtok krve koronárními cévami je v klidovém stavu okolo 250 ml/min, když je organismus vystaven zvýšené zátěži, může se objem průchozí krve zvýšit až na 1250 ml/min, což je pětinasobek klidového objemu. Průtok krve věnicími tepnami je limitovaný hlavně diastolickým tlakem, kdy při vysoké tepové frekvenci dochází ke zkrácení diastoly (klidový stav mezi stahy srdce) a tím i zmenšení zásobování srdce krví. Srdce však potřebuje asi 30 ml kyslíku za minutu, to se však může zvýšit až na 120 ml/min vlivem masivní zátěže. [28][30]

Průtok krve věnicími tepnami je regulován hlavně metabolicky, kdy zvýšená koncentrace odpadních látek, jako je laktát, způsobí rozšíření cév. Tento vasodilatační efekt má i adenosin, který vzniká z adenosinmonofosfátu při nedostatečném zásobení kyslíkem. Nepřímo ji způsobují i adrenalin a noradrenalin, což jsou hormony zvyšující tepovou frekvenci, jelikož díky nim dojde ke zvýšení produkce metabolitu. [28][30][32]

To vše vyžaduje, aby byla céva dostatečně pružná a bez jakýchkoliv překážek. K ucpání koronární tepny dochází postupně, kdy podle životosprávy jedince může jít i o řadu let. [28][30]

2.2 Rizikové faktory

Jako každé onemocnění i toto má faktory, které zapříčiňují jeho rozvoj a rychlý vývoj. V případě aterosklerózy těmi faktory jsou: zvýšená hladina celkového cholesterolu, zvýšená hladina triacylglycerolů, index tělesné hmotnosti, kouření, vysoký krevní tlak, fyzická neaktivita, obezita, diabetes mellitus, oxidační stres. Řada z těchto faktorů patří do životosprávy, kterou můžeme ovlivnit. Zjednodušeně lze říci, že za toto onemocnění si pacient může sám špatným životním stylem. Konzumace nadměrně tučných a slaných jídel je

jedním z hlavních důvodů vzniku aterosklerózy. Velké množství tuku narušuje jeho transport krví a sůl zvedá krevní tlak, čímž dochází k narušení vnitřní výstelky cévy. Pak sem samozřejmě patří i faktory, které životem ovlivnit nemůžeme, jimi jsou: vyšší věk, pohlaví (muži jsou ohroženi více, u žen menopauza) a samozřejmě genetické predispozice. Se všemi výše zmíněnými faktory však úzce souvisí nárůst GGT v krvi. [1][25][33][34]

2.2.1 Věk

Jak již bylo zmíněno, ateroskleróza je onemocnění týkající se hlavně seniorů, ačkoliv existují i případy, kdy k jejímu propuknutí došlo i dříve. To bylo způsobeno většinou nějakou dědičnou chorobou, nejčastěji familiární hypercholesterolémií. [2][35]

V současnosti byla prokázána spojitost aterosklerózy s mutacemi krvetvorby, kdy dochází ke vzniku krevních buněk v oběhu. Tato klonální hematopoéza se rozvíjí s vyšším věkem a má za následek vyšší proliferaci. [2]

Dalším rizikem je biologické stárnutí (senescence), vlivem oxidačního stresu je poškozena DNA a nastává úplné vyčerpání telomer. To vše vede k apoptóze a následné tvorbě nových buněk. V ideálním případě se tkáň zregeneruje, ale v případě pokročilého věku již nefunguje, jak by měla a dochází ke zvýšené propustnosti tkání a přivolání více leukocytů pro likvidaci zánětu. Takhle se pozvolně rozvíjí chronický zánět. Dalším problémem je, že senescentní buňky narušují kolagenní vrstvu, která stabilizuje aterosklerom. [2][35]

2.2.2 Chronický zánět

K jeho rozvoji dochází často v pokročilém věku vlivem řady faktorů. Dojde ke zvýšení tvorby monocytů a makrofágů. Ty jsou pak hlavním zdrojem zánětlivých cytokinů. Uvolňování cytokinů lze ale farmakologicky omezit. [2][22]

2.2.3 Genetika

Je jednou z podstatných příčin vzniku aterosklerózy. Její vliv tvoří asi 40 procent. Genetické variace ovlivňují náchylnost pro rozvoj tohoto onemocnění. Jednou z nejvýznamnějších variací je ANRIL, gen, regulující expresi dlouhé nekódující RNA. V současnosti bylo zjištěno, že právě tyto dlouhé nekódující úseky mají na vznik aterosklerózy zásadní vliv. Vzhledem k obtížnosti detekce malých úseků RNA a DNA je stále velká řada interakcí genů s aterosklerózou skryta. [2]

2.2.4 Pohlaví

Bylo zjištěno, že muži trpí chorobou více než ženy, podle nedávných studií za to mohou pohlavní hormony. Jelikož jsou mladé ženy chráněny svými hormony, tak se onemocnění projevuje až po sedmdesátém roku života, kdy pak procento výskytu aterosklerózy převyšuje muže. Podle všeho je i část genů podmiňující vznik aterosklerózy uchována na pohlavních chromozomech. Avšak studie těchto tvrzení zatím nebyly potvrzeny. [2]

2.2.5 Metabolismus lipoproteinů

Hladina plazmatických lipoproteinů je jedním z hlavních rizikových faktorů pro vznik aterosklerózy. Lipidy, vzhledem ke svému nepolárnímu charakteru, potřebují být navázány na nosič, aby se mohly přemísťovat v polární plazmě. K tomu využívají vazbu na proteiny, kdy tímto spojením vznikají lipoproteiny. Triacylglyceroly jsou transportovány ze střev do jater ve formě chylomikronů, největších lipoproteinů, a lipoproteinu s velmi nízkou hustotou (VLDL). V játrech jsou zpracovány lipázami za vzniku LDL částic, které dodávají triacylglyceroly a cholesterol do tkání jako zdroj energie. Dalším důležitým lipoproteinem je HDL, ten zajišťuje transport cholesterolu z periferní tkáně do jater. Tam je zpracován na žlučové kyseliny a vyloučen přes žlučník do střev. Nejvýznamnějšími lipoproteiny pro rozvoj aterosklerózy jsou LDL a HDL. Kdy vysoké hladiny LDL znamenají zásadní riziko pro rozvoj aterosklerózy. [2][7][15][25][35–37]

2.2.6 Vysoký krevní tlak

Je dalším hlavním rizikovým faktorem pro vznik kardiovaskulárních onemocnění. I přesto není mechanismus podpory rozvoje aterosklerózy přesně znám. Zvýšení tlaku je dáno jak genetickými predispozicemi, tak především životosprávou, kdy konzumace velmi slaných a tučných jídel způsobuje jeho zvýšení. Jednou z teorií, jak ovlivňuje rozvoj aterosklerózy je, že způsobuje nadměrné používání hladkého svalstva, čímž usnadňuje prostup LDL do prostoru intimy. [2][7][15][25][33][34]

2.2.7 Diabetes

Nejčastěji se hovoří o diabetu 2 typu čili o tom, který je způsobený špatnou životosprávou, obezitou. Tito diabetici často vykazují metabolický syndrom, což znamená shluk problémů, mezi něž patří inzulínová rezistence, obezita, hypertenze a samozřejmě zvýšené hladiny LDL. Špatná regulace cukrů v krvi pacienta může velmi zhoršit aterosklerózu, a to skrze řadu dějů. Mezi tyto děje patří například modifikace LDL, oxidační stres, anebo tvorba konečného produktu glykace. [2][15][25][33][38]

2.2.8 Obezita a pohyb

Jak bylo již výše zmíněno, obezita je jedním ze zásadních faktorů pro rozvoj aterosklerózy. Důležitým faktorem je i strava, protože nezdravá výživa nejen že přispívá k obezitě, ale i k ateroskleróze. Jelikož konzumace příliš tučných jídel má za následek zvýšení hladin tuků v krvi. Obezita zároveň negativně působí na imunitu i na kardiovaskulární systém, protože srdce musí dostat krev do většího množství tkání, neboť i tukové tkáně potřebují výživu. [2][25]

K rozvoji obezity také přispívá sedavá práce, a hlavně osobní doprava, protože jednou z neúčinnějších zbraní proti obezitě je právě fyzická aktivita. Je prokázáno, že přispívá ke zlepšení glukosové tolerance, snížení plazmatických lipidů, ale posiluje i protizánětlivé dráhy. Tělo, které je zvyklé například na běh, má tendenci lépe reagovat na sepsi, právě díky lepším protizánětlivým účinkům. [2][34]

2.2.9 Kouření

Stejně jako má negativní vliv na vznik rakoviny a onemocnění dýchacích cest, má stejně špatný vliv i na rozvoj kardiovaskulárních onemocnění. V případě posledního jmenovaného nezáleží na intenzitě kouření, protože i slabí kuřáci mají násobně větší riziko kardiovaskulárních onemocnění. Mnoho studií již potvrdilo, že kouření zvyšuje krevní tlak a koncentraci LDL v plazmě. [2][25][33]

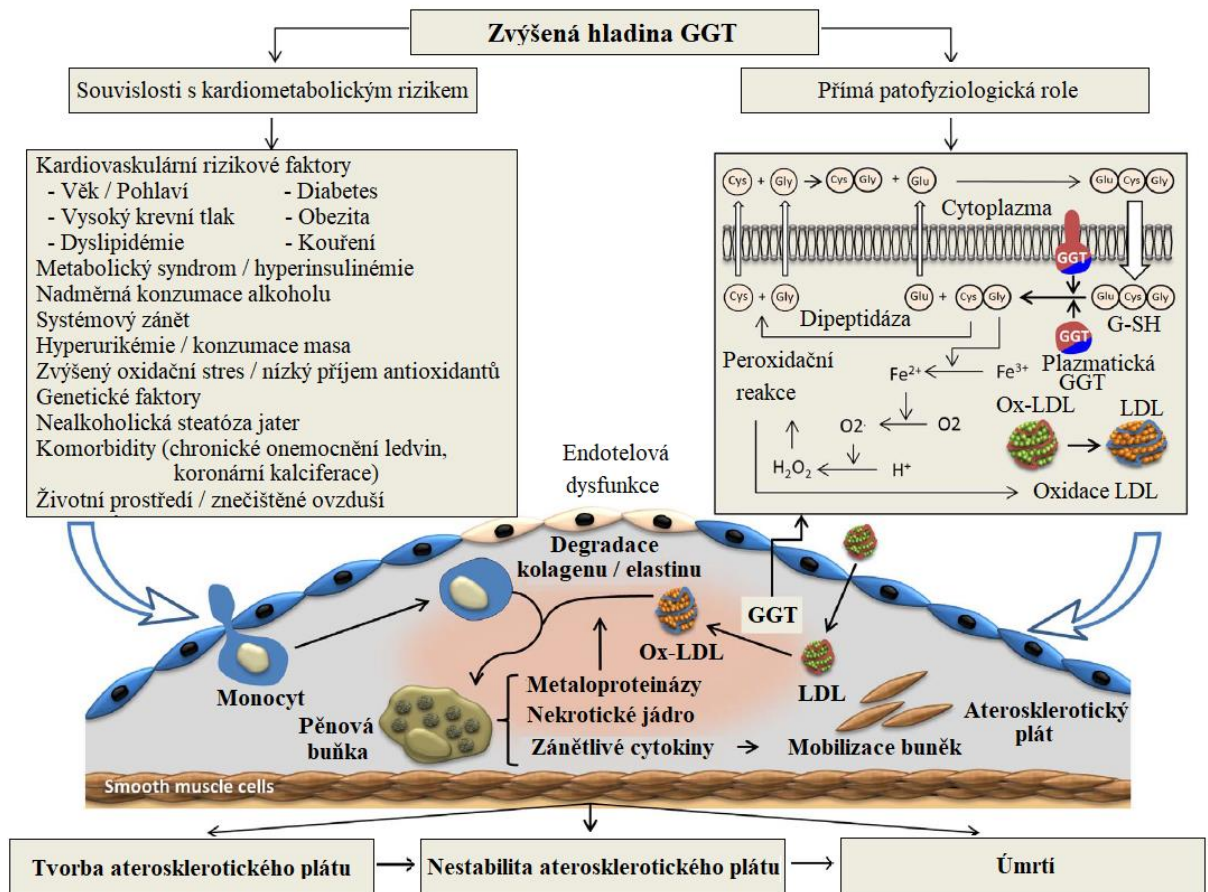
V dnešní době se staly velmi populární takzvané e-cigarety pro svůj menší, ale stále dost zásadní škodlivý účinek. Z toho důvodu na to byly zaměřeny četné studie, které prokázaly, že jejich užívání má velký vliv na peroxidaci LDL a narušení antioxidační rovnováhy v náš neprospěch, to znamená že podporuje zánětlivé reakce v organismu stejně jako tabákový kouř. [2][25][33]

2.2.10 Střevní mikroflóra

Naše střeva jsou osídlena stovkami miliard symbiotických bakterií, které usnadňují trávení potravy, vyrábí nezbytné látky (vit B12 a K, ...) a samozřejmě pomáhají s obranou střev před cizími patogeny. Tyto bakterie získáváme hned po narození od matky a své nejbližší rodiny. V poslední době se ukazuje, že jejich význam je ale velmi zásadní i u řady se střevy přímo nesouvisejícími nemocemi. [2]

V případě aterosklerózy byl identifikován mediátor trimethylamin-N-oxid, ten vzniká v játrech jako produkt odbourávání cholinu a karnitinu, které vyprodukovaly střevní bakterie. Bylo zjištěno, že tento metabolit zvyšuje reaktivitu krevních destiček, a hlavně podporuje vznik zánětu cév. [2]

2.3 Vznik onemocnění



Obrázek 6 Rozvoj aterosklerózy, GGT: gama-glutamyltransferasa, LDL: nízko hustotní lipoprotein (Light Density Lipoprotein), Ox: oxidovaná forma, Cys: cystein, Gly: glycin, Glu: glutamin, dyslipidémie znamená zvýšení koncentrace lipidů v krvi, upraveno z originálu [1]

K rozvoji aterosklerózy dochází nejčastěji v tepnách s turbulentním prouděním, které má za následek zvýšení propustnosti endotelu. Schéma rozvoje je uvedeno na obrázku 6. Při zvýšené koncentraci LDL lipoproteinů dochází k jejich prostupu do *tunica intima*, kde jsou oxidovány na oxidované LDL, pro krevní monocyty se to jeví jako zánětlivý signál. Na oxidaci se podílí GGT, která je stimulována železitými ionty. Ty jsou dodávány například z transferinu. To má za následek jejich vstup do *tunica intima*, kde se diferencují na makrofágy a okamžitě začínají pohlcovat oxidované LDL, po překročení určité hranice se z nich vlivem přehlcení stanou pěnové buňky produkující další zánětlivé faktory (cytokiny) přivolávající další monocyty. Pěnové buňky jsou podobné kostním buňkám a ukládají do sebe fosforečnan

vápenatý (kalcifikace). Zároveň jsou stále hromaděny tuky, na které se naváží další monocyty ve snaze zabránit akumulaci, ty pak vysílají další zánětlivé faktory, které přivolají další monocyty. Takto vzniká začarovaný kruh, jenž je obtížné zastavit. Postupně dochází ke zvětšování uložených lipidů, mezi kterými se nachází odumřelé bílé krvinky. Vlivem toho všeho nastává degradace kolagenních a elastinových vláken, čímž dochází ke značné ztrátě flexibility a pevnosti cévy. Takto extracelulárně akumulovaným lipidům se říká ateromy. Důležité je zdůraznit, že pěnové buňky podléhají v ateromu apoptóze a nekróze vlivem přesycení oxidovanými LDL. To má za následek růst takzvaného nekrotického jádra tvořeného převážně cholesterolem a jeho estery, zbytky buněk, což zvyšuje jeho nestabilitu. [1][2][22]

Další fází je zpevnění akumulovaných lipidů kolagenními vlákny. K tomu dochází jako odpověď cévní stěny na ztrátu flexibility, důležitým faktorem je však stabilizace příbytku dalších lipidů, kdy masivní přírůstek toto zpevnění znesnadňuje. Důsledkem toho je zpevnění a další rozrůstání ucpávky. Nakonec je aterom plně začleněn do cévní stěny. Tímto způsobem vytvořený aterosklerotický plát omezuje průtok krve a zvyšuje lokální tlak na cévu. [1][2][22]

2.4 Kalcifikace

Dochází k ní v pokročilém stádiu aterosklerózy, kdy je již vytvořené nekrotické jádro, a pěnové buňky tak začnou hromadit fosforečnan vápenatý. Nejprve vznikají malé vezikuly. Ke vzniku dochází v oblasti *intimi* či *medie*. Tyto počáteční vezikuly se postupně spojí dohromady právě v blízkosti nekrotického jádra. Nakonec jsou vytvořeny kalcifikované vrstvy. Toto zvápnění má za následek zpevnění té části, kde se nachází. Tím je způsobena ještě větší ztráta flexibility cévy. Také to může být problém při léčbě, protože se jedná o tvrdší útvary než samotný plát. Útvary budou bránit roztažení cévy při PCI. [2][28][37]

2.5 Komplikace

Vzniklý plát je tvořen tukovým jádrem a fibrózním obalem, který se skládá z kolagenních vláken a hladké svaloviny. Je pevně spojen s cévní stěnou. Mohou však nastat situace, kdy poměr mezi tukovou a fibrinovou částí není ve prospěch fibrinové, ale tukové. To má za následek vznik tenké nestabilní fibrinové vrstvy, tomuto jevu se říká nestabilní aterosklerotický plát, dochází k němu hlavně při rozvoji chronického zánětu. [1][2][22]

V případě, že je plát nestabilní, je velice náchylný k utrnutí, což může způsobit ucpaní cévy. Nestabilitu ještě více zesilují makrofágy produkující enzymy (metaloproteinasy) štěpící kolagenní a fibrinová vlákna. Makrofágy dále produkují zánětlivé signály, které říkají

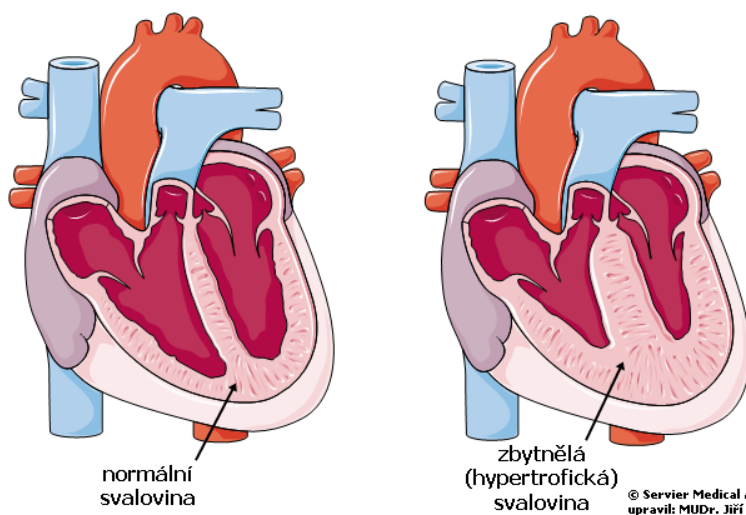
ostatním bílým krvinkám, že v místě ateromu je zánět. To přivolá hlavně T lymfocyty, které začnou vytvářet inhibitory syntézy kolagenu a fibrinu. Způsobuje to uvolňování plátu od stěny cévy. Do vzniklé mezery mezi plátem a cévní stěnou se začne dostávat krev, jež tam vytvoří krevní sraženiny, tím se aterom zvětší, a ještě více se zmenší průchod krve. [1][2][22]

2.6 Angina pectoris

V důsledku vzniku aterosklerotického plátu dochází k omezení průtoku krve. Nejčastěji jsou postižené koronární cévy, kdy hovoříme o tom, že pacient trpí anginou pectoris. To je klinický syndrom, při kterém pacient trpí nadměrným zadýcháváním při lehce zvýšené zátěži a prudkou bolestí na hrudi. Bolest se však může projevovat i v oblasti krku, ramen anebo čelisti. Platí přímá úměrnost mezi množstvím zátěže a klinickými projevy. To je způsobeno nedostatečným zásobováním srdce živinami, kdy dochází k rozvoji jeho ischemie. Tyto projevy většinou ustoupí se zmírněním fyzické aktivity až do úplného klidu nebo podáním léků, nejčastěji glycerinnitrátu. Výskyt těchto parametrů popisuje typickou anginu pectoris. V případě, že jsou potvrzeny pouze dvě tyto charakteristiky, jedná se o atypickou anginu pectoris, ale mohou nastat i situace, kdy není splněn ani jeden z bodů, v tu chvíli hovoříme o neanginózní bolesti na hrudi. V momentě, kdy tyto projevy přetrvávají déle jak 2 měsíce, tak se jedná o chronickou anginu pectoris. [27][40]



Obrázek 8 Aortální stenóza, upraveno dle [41]



Obrázek 7 Hypertrofie myokardu, [42]

Jak již bylo řečeno, angina pectoris je způsobena ischemií myokardu. K jejímu rozvoji dochází hlavně vlivem onemocnění koronárních tepen, nejčastěji vlivem aterosklerózy. Dalšími důvody mohou být například aortální stenóza, kdy dochází k degenerativnímu poškození chlopně, která se nedovírá. Srovnání zdravé a poškozené chlopně lze vidět na obrázku 7.

Koronární spasmus je dalším možným iniciátorem rozvoje anginy pectoris, jedná se o křečovitě sevření koronární tepny jejím hladkým svalstvem. A poslední zásadní příčinou rozvoje je hypertrofická kardiomyopatie, kdy dojde k ztluštění myokardu, viz Obrázek 7. Toto se týká hlavně vrcholových sportovců, kde tvoří velmi často příčinu náhlé smrti. [27][40]

Na vzniku anginy pectoris se podílejí i faktory, které mají za následek její eskalaci. Mezi ně patří špatně korigovaný vysoký krevní tlak, anémie anebo tachykardie, což je zvýšení tepu nad 90 tepů za minutu. [27][40]

2.6.1 Dělení anginy pectoris

Dle závažnosti symptomů se hovoří o dvou základních typech tohoto klinického syndromu. Ke správnému zařazení pacienta je ovšem nezbytné dobře znát jeho anamnézu, protože to může mít klíčový význam. [27][40]

- Stabilní neboli chronická AP: obtíže se projevují jen při zvýšené fyzické námaze, pacient je léčen pouze medikací. V případě, že se začnou těžkosti objevovat i v klidovém stavu, přechází pacient do druhé skupiny. Příznaky většinou odezní do 15 minut nebo dříve po podání léků. [27][40]
- Nestabilní či akutní AP: Pacientovy obtíže neustupují, ani po podání léků je zcela neutlumí, v tomto případě již pacient potřebuje urychleně pomoc, protože obtíže se zvětšují a mohou vést až k ucpaní cévy a tím k rozvoji akutního infarktu myokardu. [27][40]

2.6.2 Léčba anginy pectoris

U pacientů, u kterých došlo k rozvoji anginy pectoris existují dva způsoby léčby. Jednou variantou je farmakologická cesta a druhou je revaskularizace. V případě první jmenované varianty je nasazena medikace s cílem zabránit zvětšování obstrukce a zmírnění současných problémů. Je tedy podáván Aspirin v nízkých dávkách, jenž má antitrombotický účinek. Dále jsou podávány statiny pro omezení syntézy cholesterolu. Dalším užívaným léčivem jsou regulátory vysokého krevního tlaku, do této skupiny patří například Ramiplin. Pro zmírnění příznaků anginy pectoris se používají nitráty, jež mají vasodilatační účinek a způsobí relaxaci hladké svaloviny. Jejich účinek je však krátkodobý, pomáhají hlavně při zklidnění záchvatů. [27][36][40]

Druhou variantou léčby je revaskularizace, jedná se o chirurgický zákrok, při kterém se přemostí ucpaná céva. Provádí se u pacientů, kteří trpí akutní nestabilní formou anginy

pectoris, kde hrozí rozvoj infarktu myokardu. Jedná se o invazivní postup, kterému předchází použití farmakologické cesty. Výjimkou jsou kolabující pacienti. Jednou z možností revaskularizace je bypass. Ten slouží k přemostění v našem případě zúžené ale i úplně uzavřené cévy. Jedná se o velmi závažnou operaci, kdy musí být dobře zváženy všechny okolnosti. Další možností je perkutánní koronární intervence (PCI), dříve označovaná jako angioplastika koronárních cév. Jedná se o bezpečný zákrok, který rychle zprůchodní cévu s minimem rizik v porovnání s bypassesem. [27][30][36][40]

Principem PCI je zavedení katetru skrze třísla do krevního řečiště. Pacient je pouze pod lokální anestézií a během celého procesu je neustále měřena srdeční aktivita a srdce je rentgenováno kvůli viditelnosti katetru. Po zavedení katetru do místa zúžení je nafouknut balóněk, jenž roztáhne zúžení a současně je aplikován stent, který má za úkol zpevnit aterosklerotický plak a zabránit dalšímu zúžení. Dříve se používaly hlavně stenty nerezové neboli kovové, ale v dnešní době se využívají stenty lékové, které po aplikaci uvolňují antikoagulační látky bránící vzniku sraženiny. Jednou z nejmodernějších variant je aplikace absorbovatelného stentu, který se v těle pacienta zcela začlení do cévy a rozloží se. [1][30][40]

Díky tomu dochází k okamžité úlevě od veškerých klinických projevů anginy pectoris. Pacient po tomto zákroku je nejčastěji po 24 hodinách propuštěn domů a je mu nasazena medikace zabraňující vzniku trombózy. Je však důležité, aby pacient dodržoval zdravou životosprávu a nekouřil. [1][40]

2.7 Léčba aterosklerózy

V rané fázi je možná neinvazivní léčba, při které je snaha upravit pacientův životní styl tak, aby bylo úplně zakázáno kouření, omezen příjem nadměrného množství tuků a snížen krevní tlak. Zároveň je kladen vysoký důraz na zvýšení fyzické aktivity. Tato léčba je komplexní, účinná, ale hlavně dlouhodobá, jejím cílem je útlum zánětu a vznik stabilního ateromu, který se již nebude zvětšovat. Je podstatná včasná indikace, aby se zabránilo rozvoji doprovodných nemocí. Ta se zaměřuje hlavně na výše zmíněné rizikové faktory, spoléhá i na zobrazovací techniky a informace od pacienta, hlavně co se týče životního stylu. U pacientů, jejichž příbuzní měli již s aterosklerózou problém, je prováděna i genetická analýza a jsou sledovány i hladiny IgE protilátek. [1][2]

V případě, že již došlo k rozvoji aterosklerózy je kladen důraz na stabilizaci plátu a zabránění vzniku nových. K tomu se využívají jak již výše zmíněná úprava životního stylu, tak i medikace, která je zaměřena hlavně na metabolismus lipoproteinů. Předepisují se statiny, což

jsou inhibitory HMG-CoA reductasy. Tento inhibovaný enzym katalyzuje hlavní reakci v syntéze cholesterolu, a to přeměnu HMG-CoA na kyselinu mevalonovou. Díky tomu dojde k omezení rychlosti syntézy nového cholesterolu. Jsou tak zvýšeny hladiny LDL receptorů v játrech, čímž je LDL více vychytáváno játry a dojde ke snížení jeho hladiny v krvi. Bohužel stejně jako ostatní léky i tento má řadu vedlejších účinků, jedním z nich je svalová slabost, ale i podpora vzniku diabetu druhého typu. Další možností je zaměření se na zánětlivé účinky, ale účinnost takových metod je velmi nízká v porovnání se statiny. [1][2]

V současné době naděje nejvíce směřují k výzkumu trvalých genetických změn, kde by bylo možné změnit funkci buněk tak, aby bránily vzniku aterosklerózy a odstranit všechny predispozice. Metoda se již používá k léčbě srpkové anémie a specifických očních poruch. Nejtěžší je však získat vhodné buňky pro modulaci. V případě aterosklerózy by byla zaměřena na metabolismus cholesterolu, čímž by došlo k omezení jeho syntézy. Tato metoda je, ale ovšem stále na začátku a bude potřeba ještě dlouhý výzkum pro bezpečné masové použití. [1][2][22]

PRAKTICKÁ ČÁST

3. Materiály, pacienti a metoda stanovení

3.1 Pomůcky

- Multifunkční modulární reader (Tecan Infinity 200 Pro, Švýcarsko)
- Chladnička (Liebherr LH KTS 1414, Německo)
- Hlubokomrazicí box MDF – U3386S (Panasonic, Japonsko)
- Blokový termostat ISOTEMP 145 D (Fisher Scientific, ČR)
- Mikrokumavky Eppendorf: 1 500 μ l
- Automatické pipety: 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l (BioHit, Finsko)
- Multikanálová pipeta (Eppendorf, Německo)
- Mikrotitrační destičky (Thermo Fisher Scientific, Spojené státy americké)
- Plastová stříčka (Fisher Scientific, ČR)

3.2 Chemikálie

Pro stanovení byla použita sada od firmy Erba Lachema, s.r.o. Tato sada je složena z dvou činidel, viz Tabulka 2. Jejich smícháním vznikla reakční směs, jejíž složení je uvedeno v Tabulka 2.

Tabulka 2 Složení reagensů

	Koncentrace [mmol/L]		
	Činidlo 1	Činidlo 2	Reakční směs
Tris pufr (pH 8,25)	125	–	90,9
Glycylglycin	125	–	90,9
L- γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid	–	20	3,64

3.3 Pacienti

Pro tuto bakalářskou práci byly využity séra a plazmy, jež nám poskytla Pardubická nemocnice, a.s., interní klinika – kardiologické oddělení. Tito pacienti byli seznámeni s účelem zpracování jejich vzorku a podepsali informovaný souhlas (příloha 1). Oficiální název uvedený v souhlasu je „Zánětlivá reakce po implantaci koronárních stentů“. Cílem této studie je sledování biomarkerů zánětu a oxidačního stresu u pacientů po PCI. Etická komise při Pardubické nemocnici vydala souhlas s touto studií ke dni 13. 12. 2013, viz příloha 2.

Pacienti v této práci byli rozděleni nejprve dle závažnosti jejich onemocnění:

- Pacienti, kteří přišli na dokončení revaskularizace (DR) po akutním koronárním syndromu (AKS), to se týká pacientů s nestabilní anginou pectoris (NAP) a těch po akutním infarktu myokardu (AIM)
- Pacienti, jenž přišli na dokončení revaskularizace, ale trpí stabilní anginou pectoris (SAP)
- Pacienti s akutním infarktem myokardu
- Pacienti se stabilní anginou pectoris

Další dělení pacientů souvisí s typem aplikovaného stentu, zda se jedná o stent lékový či absorbovatelný. Stručná charakteristika pacientů je uvedena v tabulce 3.

Tabulka 3 Charakteristika pacientů, DR po AKS je dokončení revaskularizace po akutním koronárním selhání, DR SAP je dokončení revaskularizace při stabilní angině pectoris, AIM je akutní infarkt myokardu, SAP je stabilní angina pectoris

		DR po AKS	DR SAP	AIM	SAP
Celkem		14	3	9	9
Muži [%]		78,57	33,33	55,56	77,78
Ženy [%]		28,57	66,67	44,44	22,22
Typ stentu	Lékový [%]	57,14	33,33	66,67	55,56
	Absorbovatelný [%]	42,86	33,33	11,11	33,33
	Kovový [%]	21,43	33,33	33,33	11,11
Věk nad 60 let [%]		85,71	66,67	66,67	55,56
Nadváha [%]		50,00	66,67	11,11	44,44
Kouření	Současnost [%]	21,43	0,00	22,22	11,11
	Minulost [%]	28,57	66,67	33,33	66,67
Diabetes mellitus [%]		42,86	66,67	55,56	55,56
Statiny [%]		92,86	100,00	44,44	77,78
Hypertenze [%]		92,86	100,00	88,89	88,89
AIM V minulosti [%]		57,14	0,00	22,22	44,44
CMP v minulosti [%]		7,14	0,00	0,00	0,00
ICHDK v minulosti [%]		21,43	0,00	11,11	22,22
Současně probíhající onemocnění [%]		107,14	100,00	100,00	100,00
Rodinná anamnéza	Ženy [%]	14,29	33,33	22,22	44,44
	Muži [%]	21,43	0,00	22,22	22,22

3.4 Vzorky

GGT byla stanovována ze vzorků séra a plazmy. Od pacientů byly získány čtyři odběry, bohužel pro tuto práci mohly být využity většinou jen tři, jelikož se čtvrté odběry nedochovaly. Vzorky byly označeny písmeny A, B, C, D, kdy A byl odběr před zákrokem, B odběr 24 hodin po zákroku, C byl odběr 48 hodin po zákroku a D byl odběr po delší době, převážně 3–12 měsíců.

3.4.1 Příprava séra

Krev pro získání séra byla po odběru transportována na ledu, aby se předešlo hemolýze a nežádoucím enzymatickým reakcím. V laboratoři byl vzorek nechán přibližně 30 minut srážen při laboratorní teplotě. Poté následovala centrifugace při 3500 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Získané sérum bylo odpipetováno do Eppendorf zkumavek a bylo zamraženo nejprve při -20 °C a poté byly vzorky uchovány při -80 °C.

3.4.2 Příprava plazmy

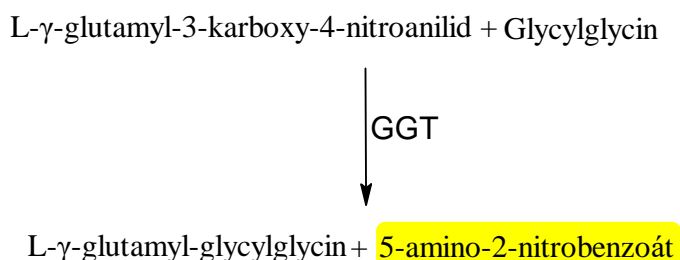
Krev určená pro získání plazmy byla odebrána do zkumavky s protisrážlivým činidlem, v našem případě se jednalo o ethylendiamintetraoctovou kyselinu. Poté byla na ledu transportována do laboratoře, kde byla stočena při 3500 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Oddělená plazma byla následně odebrána pipetou a umístěna do Eppendorf zkumavek. Poté byl postup stejný jako v případě séra.

Před stanovením GGT byly séra a plazmy vyndány z mrazáku a byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu přibližně 1 hodiny.

3.5 Princip metody

Základem tohoto stanovení je kinetická kolorimetrická metoda dle Persij & van der Slik, která je standardizována na metodu doporučenou Mezinárodní federací klinické chemie a laboratorní medicíny. Reakce probíhá dle rovnice 1.

Rovnice 1 Stanovení GGT



GGT katalyzuje přenos gama-glutamylové skupiny z L- γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilidu na glycyglycin. Současně se uvolní ekvivalentní množství 5-amino-2-nitrobenzoátu, který je přímo úměrný aktivitě GGT a je žlutě zbarvený. Výsledná intenzita tohoto zbarvení se měří v minutových intervalech při 405 nm.

3.6 Postup

Stanovení byla provedena za použití jednoreagenční metody, kdy byl připraven pracovní roztok z výchozích činidel v poměru 4 díly činidla 1 a 1 díl činidla 2.

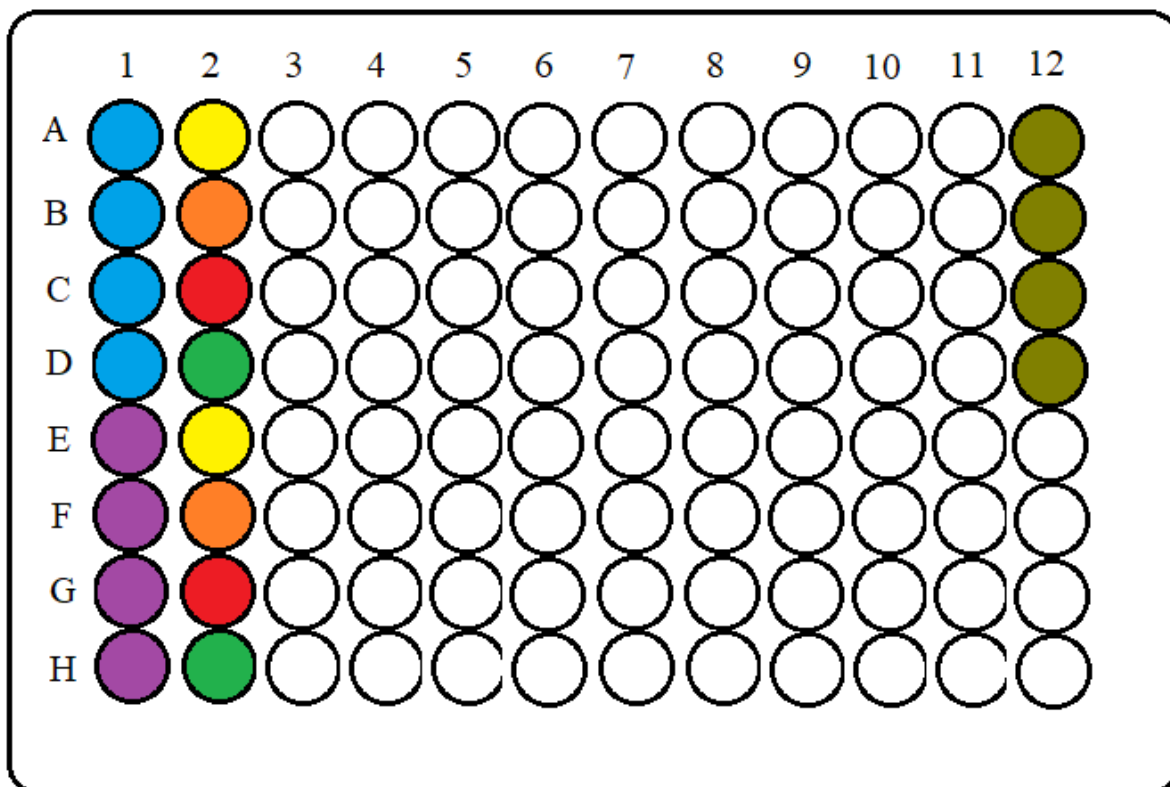
Lyofilizovaný kontrolní vzorek a standard byly rozpuštěny v destilované vodě, promíchány a inkubovány, kdy kontrolní vzorek byl nechán 30 minut a standard 15 minut.

Byl spuštěn reader a pc s programem Absorbance MTT Assay M200.mdfx, jenž obsluhuje výše uvedený reader.

Tabulka 4 Složení směsi vzorek a pracovní roztok

	Blank	Standard	Vzorek / kontrolní vzorek
Pracovní roztok	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Vzorek / kontrolní vzorek	–	–	10 μ l
Kalibrátor	–	10 μ l	–
Destilovaná voda	10 μ l	–	–

Vzorky i pracovní roztok byly temperovány na teplotu 37 °C. Následně byly na temperovanou mikrotitrační destičku aplikovány vzorky, standard, blank a kontrolní vzorek dle údajů v Tabulka 4 a schématu na Obrázek 9. Vzorky byly umístěny ve sloupcích 2–11 a byly aplikovány po jednotlivých sériích vždy v dubletu pod sebe. Na takto připravenou destičku byl aplikován multikanálovou pipetou pracovní roztok. S první řadou byla spuštěna inkubace trvající 1 minutu. Během té byla destička umístěna do multifunkčního modulárního readeru (Tecan Infinity 200 Pro) a byl spuštěn nastavený program. Ten ve zbývajícím čase inkubace promíchal vzorky na destičce a pak následně provedl pět měření po jedné minutě. Současně vzorky před měřením vždy krátce promíchal. Ze získaných absorbancí byly získány rozdíly mezi jednotlivými měřeními a ty byly zprůměrovány nejdříve pro každou jamku a následně pro dublet.



Obrázek 9 Schéma rozmístění na titrační destičce, modře je označen: blank, fialově: standard, olivově zeleně: kontrolní vzorek, žlutě: vzorek A, oranžově: vzorek B, červeně: vzorek C a zeleně: vzorek D, pacienti byli rozmístěni ve sloupcích 2-11 a byli vždy v dubletu, vlastní tvorba

3.6.1 Výpočet aktivity GMT

K výpočtu koncentrace byl využit vzorec uvedený níže, do kterého byly dosazeny získané průměrné hodnoty pro vzorek a pacienta nebo kontrolní vzorek a byly porovnány s průměrnou hodnotou standardu s tabelovanou koncentrací.

$$\text{GGT } (\mu\text{kat/L}) = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \times C_{\text{standardu}}$$

Správnost měření byla na každé destičce ověřena kontrolním vzorkem, který prokázal, že získané výsledky jsou v pořádku. Nejprve byla změřena jedna destička, kdy byla potvrzena funkčnost metody a následně byli proměřeni všichni pacienti.

4. Výsledky

Naměřené hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Excel a byla použita 5% hladina významnosti. V tabulkách 5–8 jsou uvedeny výsledky aktivity GGT v $\mu\text{kat/L}$. Výsledky jsou řazeny do skupin dle pacientů. Tučně jsou zvýrazněny hodnoty překračující referenční rozmezí. Na obrázcích 10–15 jsou zobrazeny grafy s průměry a mediány jednotlivých skupin pacientů, pak nezávisle na anamnéze a porovnání plazmy a séra. V tabulce 9 jsou zobrazeny výsledky poměru GGT před zákrokem s albuminem změřeným nemocnicí. Na obrázcích 16 a 17 jsou zobrazeny grafy prezentující korelaci GGT odebrané před zákrokem s vysoce senzitivním C-reaktivním proteinem (hsCRP) a Interleukinem 6, ty byly také změřeny nemocnicí. Ke korelační analýze byl využit Spearmanův koeficient.

Tabulka 5 Výsledky pacientů po AIM

Pacienti	Pohlaví	GGT [$\mu\text{kat/L}$]			
		Před zákrokem	24 hodin po zákroku	48 hodin po zákroku	3–12 měsíců po zákroku
11	M	1,2643	1,2487	1,2773	–
14	M	0,3463	0,4480	0,5304	–
15	Ž	0,3153	0,3946	0,3972	–
16	M	0,8848	0,4895	0,5686	–
18	Ž	0,4706	0,5622	0,3056	–
23	Ž	0,8194	0,7264	0,3736	–
31	M	0,1130	0,6065	0,1314	–
64	Ž	0,4388	0,5089	0,3902	0,1223
76	M	0,5743	0,7478	0,7128	0,9442
Průměr		0,5807	0,6370	0,5208	0,5333
Medián		0,4706	0,5622	0,3972	0,5333

Tabulka 6 Výsledky pacientů absolvující DR po SAP

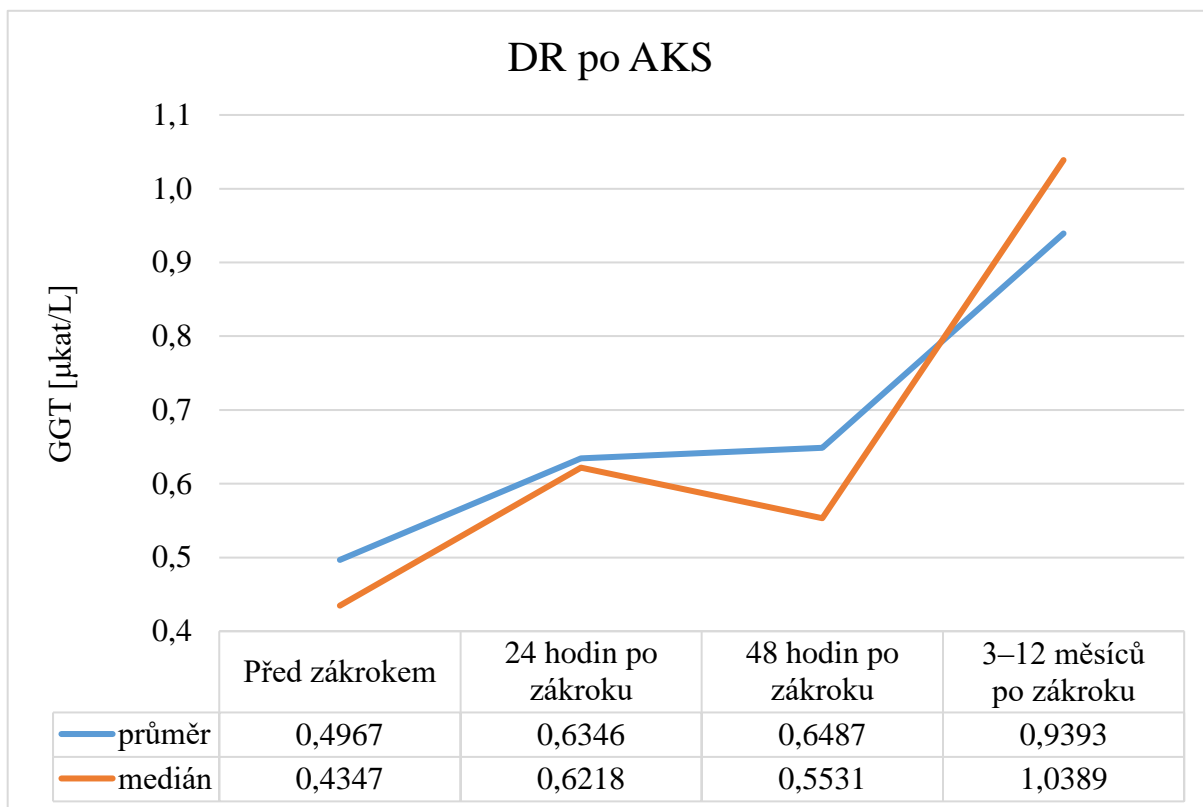
Pacienti	Pohlaví	GGT [μ kat/L]			
		Před zákrokem	24 hodin po zákroku	48 hodin po zákroku	3–12 měsíců po zákroku
9	Ž	0,1672	0,6168	0,4586	–
45	M	0,5747	0,9030	0,9922	0,7226
77	Ž	0,7408	0,7777	0,7321	0,7093
Průměr		0,4942	0,7658	0,7276	0,7160
Medián		0,5747	0,7777	0,7321	0,7160

Tabulka 7 Výsledky pacientů se SAP

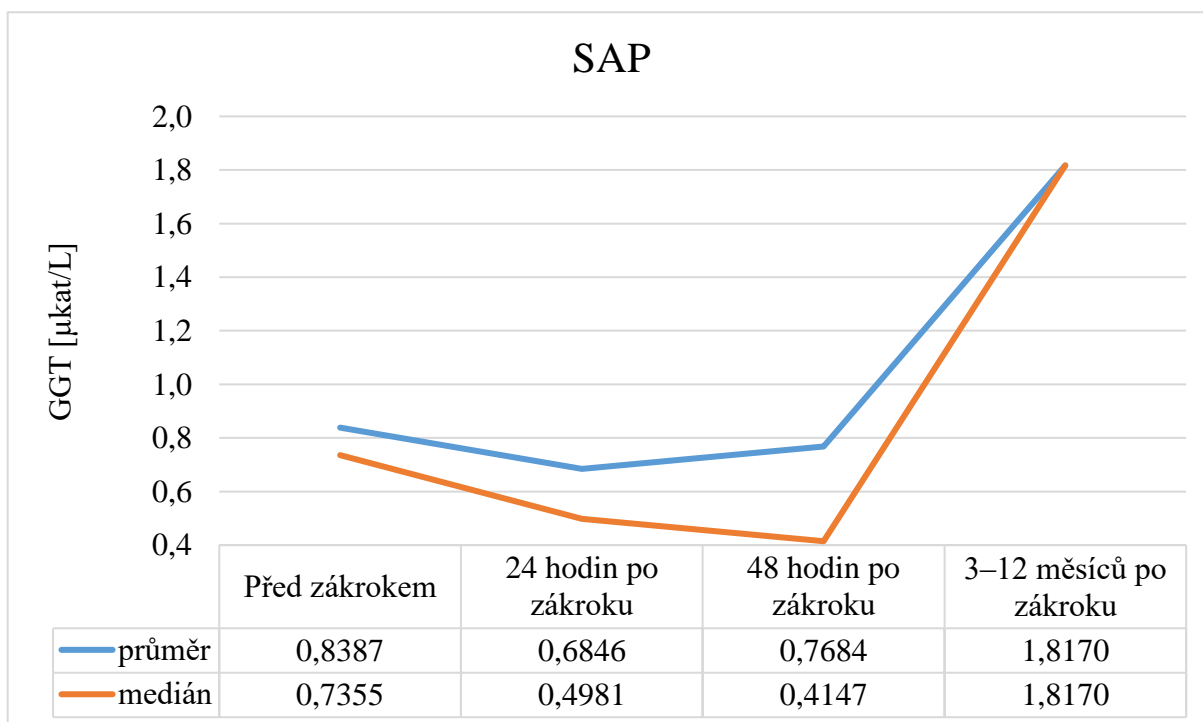
Pacienti	Pohlaví	GGT [μ kat/L]			
		Před zákrokem	24 hodin po zákroku	48 hodin po zákroku	3–12 měsíců po zákroku
2	M	0,8308	0,4981	0,2751	–
3	Ž	0,2884	0,3358	0,3586	–
4	M	0,6023	0,4270	0,4147	–
5	M	0,2629	0,5696	0,7126	–
6	M	0,5929	0,1632	0,0983	–
32	Ž	0,7355	0,1169	0,0360	–
50	M	1,0735	1,5400	1,4096	2,1857
70	M	1,3834	0,8159	1,6875	1,4483
73	M	1,7780	1,6950	1,9233	–
Průměr		0,8387	0,6846	0,7684	1,8170
Medián		0,7355	0,4981	0,4147	1,8170

Tabulka 8 Výsledků pacientů absolvující DR po AKS

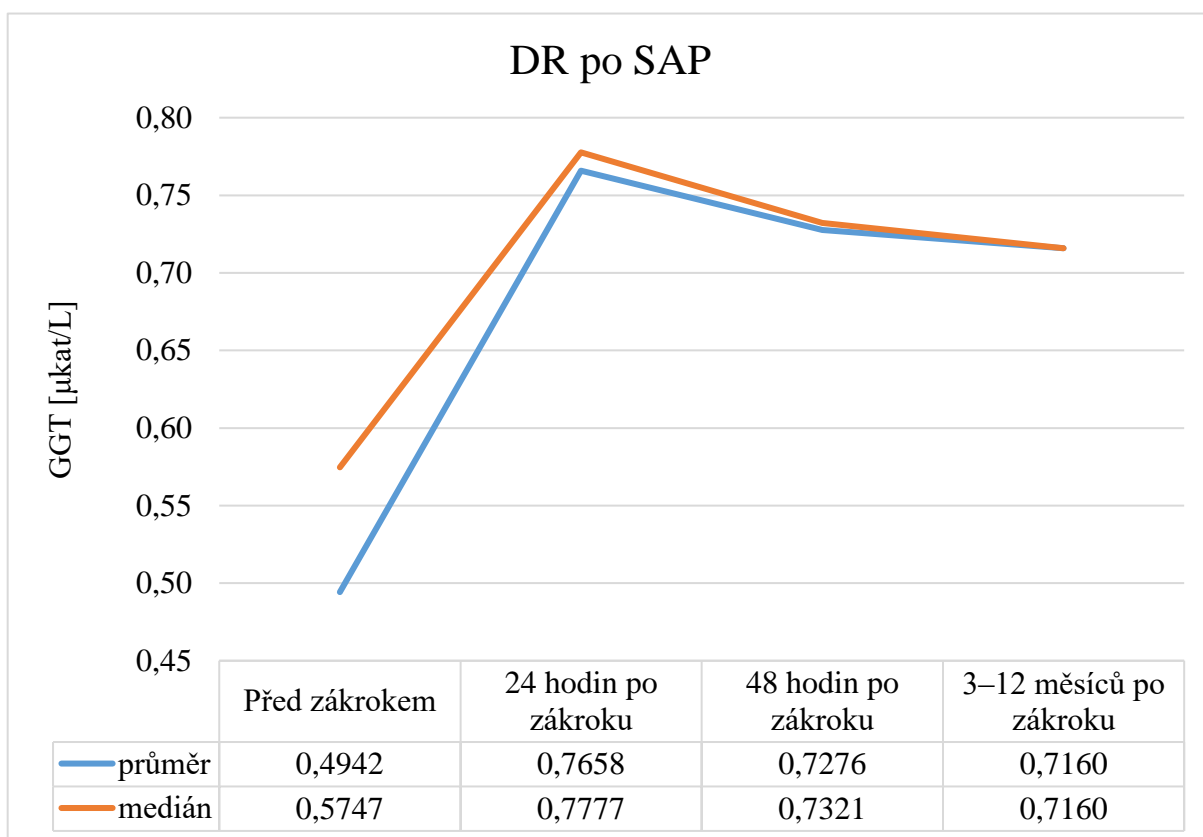
Pacienti	Pohlaví	GGT [μ kat/L]			
		Před zákrokem	24 hodin po zákroku	48 hodin po zákroku	3–12 měsíců po zákroku
12	M	0,4245	0,6468	0,5402	–
17	M	0,6182	0,6949	0,7508	–
26	Ž	0,5480	0,4349	0,5558	–
28	M	0,5256	0,7781	0,8657	–
30	Ž	0,0761	0,3736	0,3321	–
34	Ž	0,3990	0,4266	0,4543	–
37	M	0,7287	0,8094	1,0654	–
38	M	0,3280	0,3789	0,4319	–
39	M	0,1845	0,5212	0,8302	–
41	M	0,0132	0,4409	0,7348	0,8463
46	M	1,3591	0,9983	0,4916	1,3591
51	Ž	0,9091	1,1179	0,9943	1,0389
52	M	0,3952	0,5969	0,4848	0,3952
69	M	0,4449	0,6659	0,5503	1,0571
Průměr		0,4967	0,6346	0,6487	0,9393
Medián		0,4347	0,6218	0,5531	1,0389



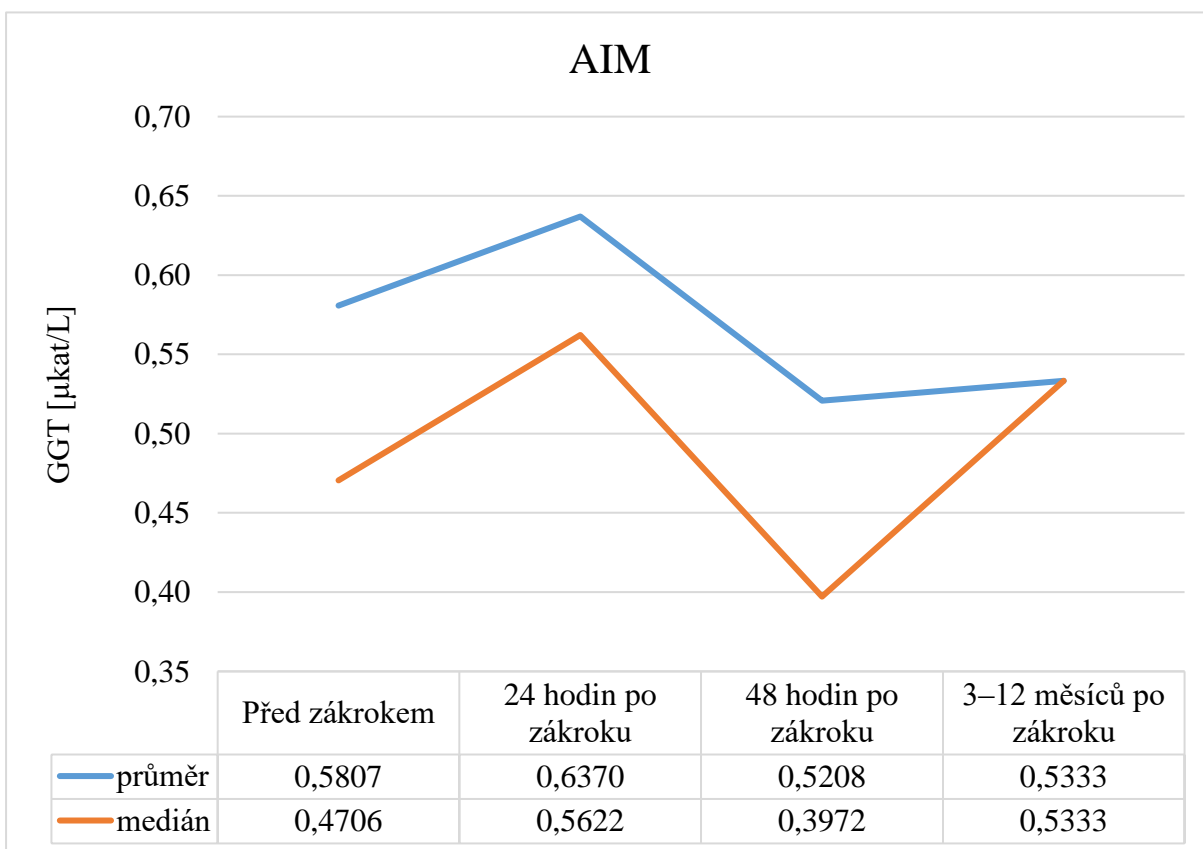
Obrázek 10 Graf průměrů a mediánů výsledků pacientů absolvujících dokončení revaskularizace po akutním koronárním syndromu



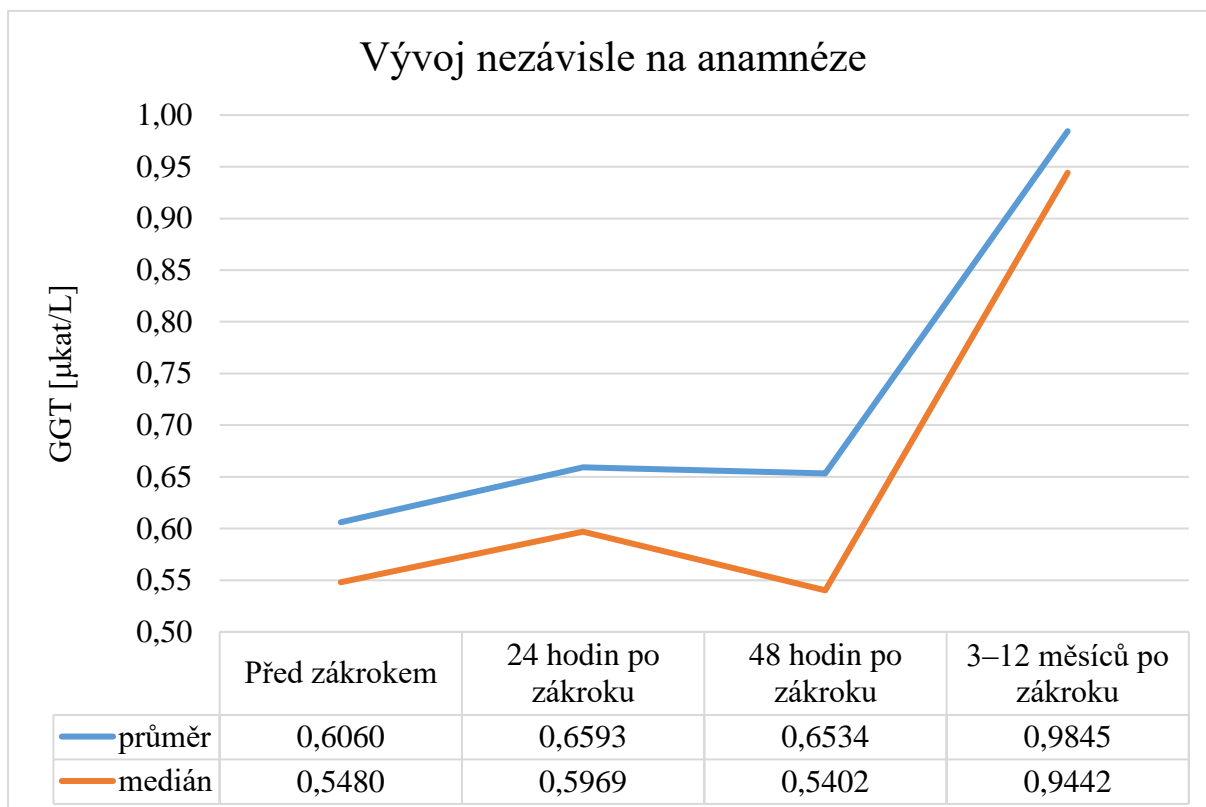
Obrázek 11 Graf průměrů a mediánů výsledků pacientů se SAP



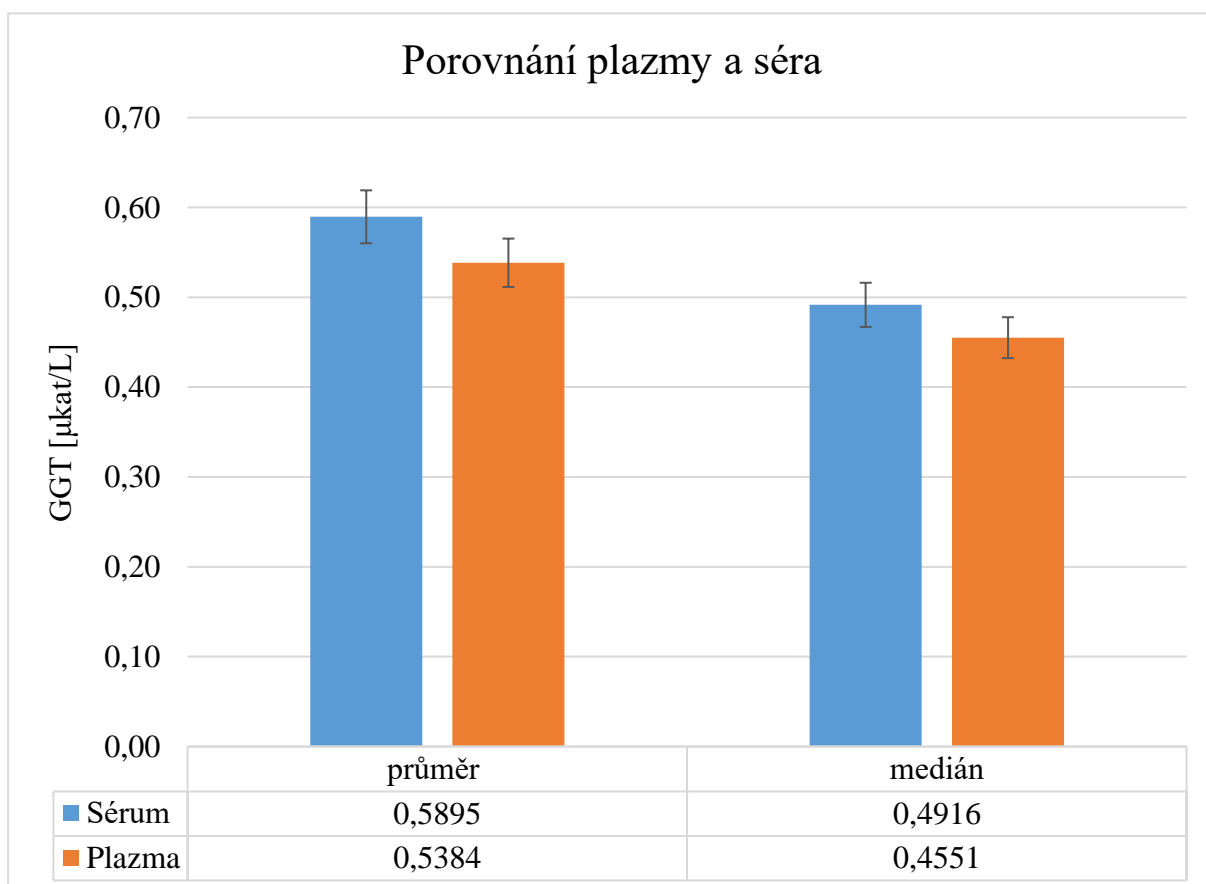
Obrázek 12 Graf průměrů a mediánů výsledků pacientů absolvujících dokončení revaskularizace po stabilní angině pectoris



Obrázek 13 Graf průměrů a mediánů výsledků pacientů po akutním infarktu myokardu



Obrázek 14 Graf průměrů a mediánů výsledků nezávisle na pacientově anamnéze

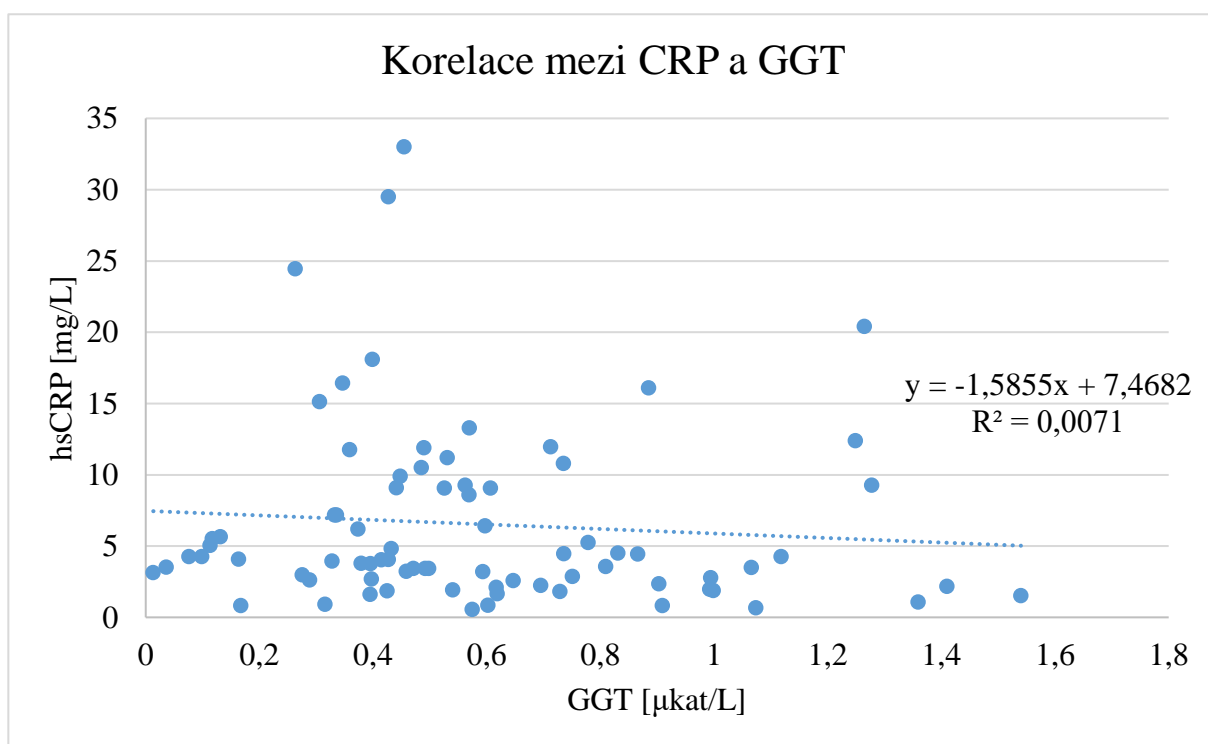


Obrázek 15 Graf průměru a mediánů výsledků plazem a sér, k porovnání bylo k dispozici 33 vzorků plazem a sér

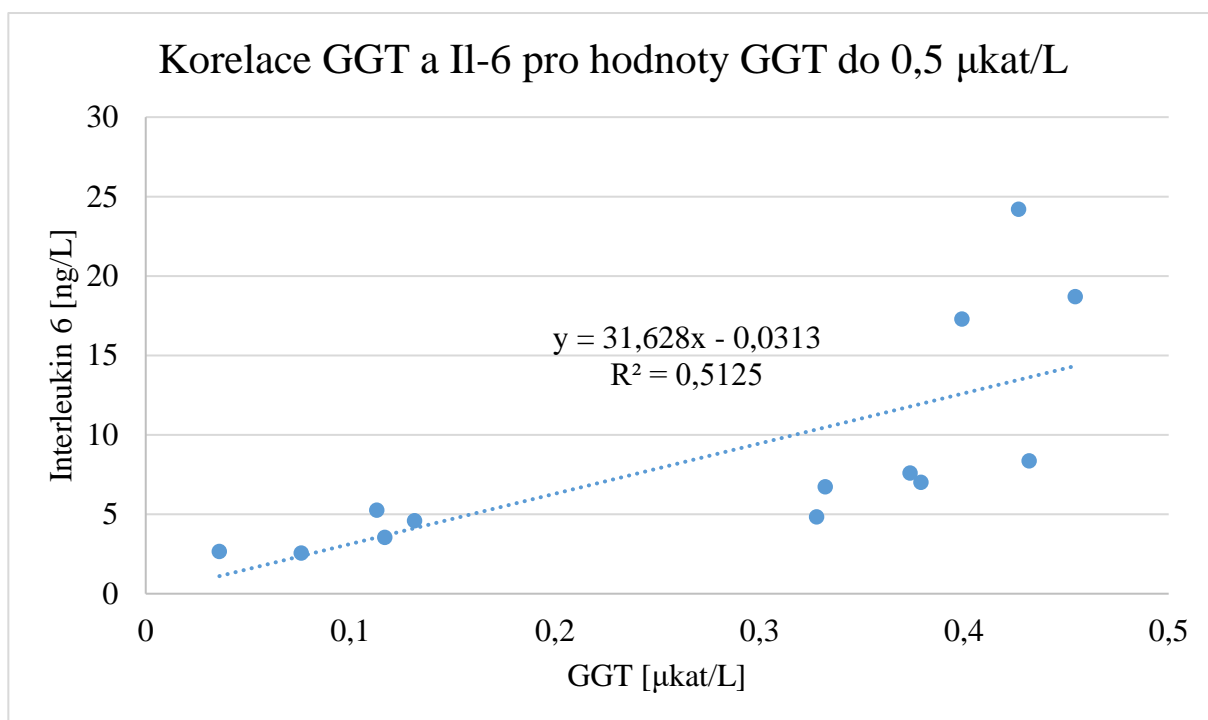
Tabulka 9 Vztah albuminu s GGT, GGT: gama-glutamyltransferasa, tučně jsou zvýrazněny hodnoty poměru GGT s albuminem pod 0,26

Pacient	GGT		Albumin	GGT/Albumin
	μkat/L	U/L	g/L	
2	0,8308	49,8480	35	1,4242
3	0,2884	17,3040	31	0,5582
4	0,6023	36,1380	39	0,9266
5	0,2629	15,7740	28	0,5634
6	0,5929	35,5740	33	1,0780
9	0,1672	10,0320	40	0,2508
11	1,2643	75,8580	35	2,1674
12	0,4245	25,4682	35	0,7277
14	0,3463	20,7780	32	0,6493
15	0,3153	18,9180	36	0,5255
16	0,8848	53,0880	31	1,7125
17	0,6188	37,1291	36	1,0314
18	0,4706	28,2360	34	0,8305
26	0,5480	32,8788	35	0,9394
28	0,5256	31,5336	39	0,8086
30	0,0761	4,5660	34	0,1343
31	0,1130	6,7800	34	0,1994
32	0,7355	44,1300	34	1,2979
34	0,3990	23,9370	29	0,8254
37	0,7287	43,7232	41	1,0664

Pacient	GGT		Albumin g/L	GGT/Albumin
	μkat/L	U/L		
38	0,3280	19,6776	35	0,5622
41	0,0132	0,7908	38	0,0208
45	0,5747	34,4820	35	0,9852
46	1,3591	81,5472	35	2,3299
50	1,0735	64,4100	37	1,7408
51	0,9091	54,5472	32	1,7046
52	0,3952	23,7114	33	0,7185



Obrázek 16 Graf korelace mezi hsCRP a GGT, hsCRP je vysoce senzitivní C-reaktivní protein, GGT je gama-glutamyltransferasa



Obrázek 17 Graf korelace GGT s Il-6, GGT je gama-glutamyltransferasa, Il-6 je Interleukin 6, pro korelační analýzu byly vynechány hodnoty vyšší jak 0,5 $\mu\text{kat/L}$, protože při použití všech dat korelace není signifikantní

DISKUSE

Tato práce se zabývala měřením aktivity GGT. K tomu byla využita spektrofotometrická kolorimetrická metoda, z toho důvodu byl použit L- γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid, jakožto substrát, jehož rozkladem vzniká žlutě zbarvený produkt. GGT ze substrátu přenáší glutamylovou skupinu na glycyglycin, tím dojde k uvolnění 5-amino-2-nitrobenzoátu který je zodpovědný za již zmíněné zbarvení. [12]

Původně se tato metoda prováděla na spektrofotometru za použití jedné kyvety, což dělalo tuto metodu velmi zdlouhavou, obzvláště proto, že je měřena absorbance třikrát po jedné minutě kvůli zachycení kinetiky reakce. Z tohoto důvodu byl pro tuto práci využit reader, který měří absorbanci na mikrotitrační destičce. Díky tomuto kroku bylo možné zrychlit celý proces měření, protože na jedné destičce mohlo být umístěno více vzorků, a to v dubletu. Pro zajištění správnosti měření byl na každé destičce umístěn blank, standard a kontrolní vzorek o známé koncentraci. Díky tomu byla zajištěna kvalita výsledků. Práce s readerem se velmi osvědčila.

Velmi zásadním krokem této metody bylo míchání. Z počátku bylo nezbytné využívat vortex, aby byla zaručena dostatečná homogenizace směsi, ale díky využití readeru byl tento problém eliminován, neboť reader vždy každou destičku řádně promíchal před každým měřením. Dalším potenciálním problémem byl samotný substrátový roztok, protože bylo zjištěno, že jeho stabilita na světle je velmi nízká. Z tohoto důvodu byl vždy skladován v temnu a zakryt alobalem. Nejzásadnějším problémem měření, který se u jedné destičky projevil, byla teplota. Ačkoliv bylo vše temperováno na 37 °C, což je optimální teplota pro práci GGT, pokles teploty velmi zásadně ovlivnil její aktivitu. Jelikož bylo z bezpečnostních důvodů pracováno v laminárním boxu, tak právě ono proudění vzduchu způsobilo ochlazení, díky čemuž došlo ke zkreslení výsledků, a snížení aktivity GGT.

Jelikož se jedná o měření absorbance, jakékoliv zbarvení má zásadní vliv na kvalitu výsledků. Z toho důvodu byla neméně zásadním problémem hemolýza vzorku. Ta mohla být způsobena preanalytickou fází zpracování vzorku. Dle dostupné literatury bylo zjištěno, že aktivita GGT klesá při mírné hemolýze. Toto snížení je způsobeno uvolněním hemu, jenž obsahuje železitý iont, který podporuje odklon GGT od substrátu. V případě že se jedná o těžkou hemolýzu tak obsah GGT strmě roste. To je způsobeno několikanásobně vyšší koncentrací GGT v erythrocytech, jenž se uvolní do extracelulární tekutiny (plazmy či séra dle zpracování). Dalším faktorem podporujícím strmý růst je samotné červené zbarvení, které zvyšuje

absorbanci. V této práci bylo pracováno s několika vzorky, jež byly mírně hemolytické, jejich hodnoty mohou být mírně nižší, ale jelikož se pohybovaly v referenčních rozmezích, byly tyto výsledky akceptovány. Problém nastal u několika vzorků, jež měly hemolýzu silnější, ty byly vyřazeny. [11][16][17][40]

Chylozita je dalším problémem preanalytické fáze, primárně na straně pacienta. Bohužel většina vzorků byla alespoň slabě chylózních. To bylo způsobeno především tím, že většina pacientů trpí poruchou metabolismu lipidů. Toto slabé zakalení mohlo mírně snížit hodnoty GGT, ale žádný vzorek nebyl zakalen natolik, aby ho nebylo možné změřit. [11][16][40]

Mezi vzorky byl nalezen i jeden ikterický vzorek, který byl také změřen, a to za dodržení všech bezpečnostních opatření. Výsledné hodnoty GGT však vyšly velmi zkraslené tmavým oranžovým zbarvením s náznakem chylozity, a proto byl tento výsledek vyloučen.

Tato práce byla zaměřena na vzorky kardiologických pacientů, které poskytla Nemocnice Pardubice v rámci studie „Zánětlivá reakce po implantaci koronárních stentů“. Tito pacienti byli rozděleni do čtyř skupin dle jejich anamnézy. Jelikož se jednalo o pacienty již s reálným problémem, nebyl od těchto pacientů dostupný odběr z doby, kdy byli „zdraví“. K dispozici byly čtyři odběry, avšak většinou jen tři, neboť u některých pacientů chyběly čtvrté odběry vzhledem k délce uchovávání vzorků a měření různých parametrů.

Na naměřené výsledky bylo nahlíženo několika způsoby. Téměř vždy se ale jednalo o vzorky séra. Jedním z nich bylo dělení do skupin dle anamnézy, kdy jsou výsledky uvedeny v tabulkách 5–8. Výsledky byly následně zprůměrovány a byl vypočten medián. Jednotlivé průměry a mediány lze vidět na obrázcích 10–15. Z těchto výsledků je patrné, že průměrné hodnoty byly většinou nadsazené oproti mediánu. Zároveň došlo vždy k nárůstu mezi odběrem před a 24 hodin po zákroku, dle našeho názoru to bylo způsobeno primárně zásahem do již tak namáhané cévy, ale také tím že v aterosklerotickém plátu je GGT velmi koncentrovaná a aplikací stentu může dojít k jejímu uvolnění, což se projeví jako nárůst, který však rychle klesá. Pokles je vidět již při odběru po 48 hodinách po zákroku. Výjimku oproti ostatním tvoří skupina se stabilní anginou pectoris, u které dochází k poklesu již po 24 hodinách po zákroku. Dle našeho názoru to je způsobeno hlavně tím, že se v tomto případě jedná o preventivní zákrok. To znamená, že cévy nejsou podrážděny již předchozím zásahem, plát je pevný a stabilní, tudíž nemusí zákrokem dojít k uvolnění GGT dislokované v plátu.

Ve skupině pacientů na dokončení revaskularizace po akutním koronárním selhání byly k dispozici i vzorky se čtvrtým odběrem, kde je po delší době vidět velmi prudký nárůst

hodnot GGT, viz obrázek 10. Oproti tomu ve skupině po dokončení revaskularizace po stabilní angině pectoris byl i u čtvrtého odběru patrný pokles, viz obrázek 13. To může být způsobeno tím, že pacienti v této skupině již před zákrokem upravili životní styl a po zákroku ho dodržovali, čímž nedošlo ke zhoršení situace jako v případě pacientů na DR po AKS, u kterých nárůst signalizuje pokračující zhoršování a tvorbu dalších plátů.

Další úhel pohledu byl zaměřen na celkové výsledky nehledě na anamnézu. I v tomto případě byl vypočten medián a průměr, z nichž byl vytvořen graf, viz obrázek 14. Také je zde patrný nárůst GGT po zákroku jak u mediánu, tak u průměru, jejich pokles po 48 hodinách a prudký vzestup při dlouhodobém odběru. Což odpovídá vývoji u jednotlivých skupin bez SAP.

Studie se také zaměřila na porovnání séra a plazmy. Výsledné průměry a mediány jsou uvedeny v grafu na obrázku 15. Dle našich výsledků nebyl zaznamenán zásadní rozdíl v hladinách GGT v sérech a plazmách. To znamená, že zpracování vzorku, srážení krve nemá vliv na GGT, samozřejmě za předpokladu dodržení správných postupů.

Výsledky aktivity GGT z odběru před zákrokem byly převedeny na U/L, viz tabulka 9. Díky tomu mohly být dány do poměru s albuminem, který byl změřen laboratoří v nemocnici. Tento poměr musí být větší jak 0,26, pokud je nižší, znamená horší dlouhodobou prognózu, ale i vyšší riziko úmrtí způsobené krvácivým onemocněním. Bohužel hodnoty albuminu nebyly získány u všech pacientů, ale z dostupných dat jsme zjistili, že nižší poměr mají pouze čtyři pacienti, z dostupných informací ale víme, že u jednoho pacienta, který měl hodnotu poměru nejnižší, se riziko potvrdilo, protože při následné kontrole měl výrazné zhoršení zdravotního stavu a byl objednan na rekonarografi. [23]

Dále byla provedena korelace mezi zánětlivými faktory, v našem případě hsCRP a Il-6. V případě hsCRP nebyla zjištěna žádná korelace, a to ani v případě vyřazení pacientů s hemolýzou kvůli možnému rušení analýzy. U Il-6 nám však vyšla významná korelace při vynechání třech pacientů, kteří měli hodnoty vyšší jak 0,5 $\mu\text{kat/L}$. V tu chvíli můžeme říci, že existuje určitý vztah mezi GGT a Il-6. Vzhledem k tomu, že se bohužel nepodařilo získat hodnoty hsCRP a Il-6 všech pacientů, hlavně vlivem toho, že byly v referenčním rozmezí, a tak nebyla uvedena konkrétní hodnota. Naše soubory dat nebyly tak velké, aby naše závěry mohly být jednoznačné.

Posledním bodem, na který se studie soustředila bylo porovnání mezi skupinami. Zde jsme viděli jisté souvislosti mezi hladinami GGT a skupinou, do které byl pacient zařazen. Protože se jedná o velmi malé skupinky pacientů, neprováděli jsme statistické vyhodnocení.

Poněvadž se jedná o celkem novou problematiku, nepodařilo se nám nalézt dostatečné literární zdroje, jež by potvrdily význam GGT jako biomarkeru kardiovaskulárních onemocnění, ačkoliv řada studií zabývajících se tímto tématem dochází k podobným závěrům jako my.

ZÁVĚR

Dle našeho názoru je použití readeru užitečným zrychlením této kolorimetrické metody pro stanovení celkové GGT. Kdy je nezbytné dávat pozor na kvalitu vzorku, zejména hemolýzu, dostatečné míchání a uchovávání pracovního roztoku kvůli jeho nestabilitě. V této studii byla stanovována pouze celková GGT, ale dle našeho názoru by bylo vhodné provést i stanovení jednotlivých frakcí pomocí kapalinové chromatografie pro určení dominantní frakce ve vztahu k ateroskleróze.

Vzhledem k našim výsledkům nelze s určitostí říci, zda lze GGT využít jako biomarker kardiovaskulárních onemocnění potažmo aterosklerózy, ačkoliv je patrná souvislost mezi její hladinou a aterosklerózou, bylo by nezbytné provést měření i u dárců, jenž jsou bráni jako zdraví, aby bylo možné porovnat zvýšení hladiny GGT oproti běžné hladině. Poněvadž dle našich výsledků, její zvýšení většinou nedojde nad referenční rozmezí.

Dle námi získaných výsledků jsme také nezaznamenali významný rozdíl mezi EDTA plazmou a sérem, což znamená, že v případě, že se jedná o akutní situace, jako například infarkt myokardu, není problém nečekání na srážení krve a získání séra. Použití plazmy výrazně urychlí získání potřebných informací pro záchranu života.

Ačkoliv naše výsledky přesvědčivě neříkají, že lze GGT využít jako biomarker aterosklerózy, jsou zde určité souvislosti, které si rozhodně zaslouží pozornost a další výzkum. Z toho důvodu bychom doporučili porovnat hladiny kardio pacientů se zdravými dárci. Dále bychom se zaměřili na širší věkovou populaci, protože v této studii byli zkoumáni převážně pacienti v pokročilém věku. Za další výzkum rozhodně stojí vztah GGT a hemolýzy.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] NDREPEPA, Gjin, Roisin COLLERAN a Adnan KASTRATI. Gamma-glutamyl transferase and the risk of atherosclerosis and coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2018, 476, 130-138 [cit. 2022-05-17]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2017.11.026
- [2] BRENNAN, Paul N., John F. DILLON a Elliot B. TAPPER. Gamma-Glutamyl Transferase (γ -GT) – an old dog with new tricks?. *Liver International* [online]. 2022, 42(1), 9-15 [cit. 2022-06-02]. ISSN 1478-3223. Dostupné z: doi:10.1111/Liv.15099
- [3] TERZYAN, Simon S., Luong T. NGUYEN, Anthony W.G. BURGETT, et al. Crystal structures of glutathione- and inhibitor-bound human GGT1: critical interactions within the cysteinylglycine binding site. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2021, 296(1) [cit. 2022-06-24]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.RA120.016265
- [4] MASON, Jennifer E., Rodman D. STARKE a John E. VAN KIRK. Gamma-Glutamyl Transferase: A Novel Cardiovascular Risk BioMarker. *Preventive Cardiology* [online]. 2010, 13(1), 36-41 [cit. 2022-06-02]. ISSN 1520037X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-7141.2009.00054.x
- [5] NDREPEPA, Gjin a Adnan KASTRATI. Gamma-glutamyl transferase and cardiovascular disease. *Annals of Translational Medicine* [online]. 2016, 4(24), 481-481 [cit. 2022-06-27]. ISSN 23055839. Dostupné z: doi:10.21037/atm.2016.12.27
- [6] ABDUL-RASHEED, Omar F. Serum γ -glutamyltransferase as Oxidative Stress Marker in Pre-and Postmenopausal Iraqi Women. *Oman Medical Journal* [online]. 2010, 25(4), 286–288 [cit. 2022-06-24]. ISSN 1999768X. Dostupné z: doi:10.5001/omj.2010.83
- [7] NEUMAN, Manuela G, Stephen MALNICK a Lucy CHERTIN. Gamma glutamyl transferase – an underestimated marker for cardiovascular disease and the metabolic syndrome. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* [online]. 2020, 23(1), 65-74 [cit. 2022-06-27]. ISSN 1482-1826. Dostupné z: doi:10.18433/jpps30923
- [8] TAKEMURA, Kosuke, Philip G. BOARD a Fumitaka KOGA. A Systematic Review of Serum γ -Glutamyltransferase as a Prognostic Biomarker in Patients with Genitourinary Cancer. *Antioxidants* [online]. 2021, 10(4) [cit. 2022-06-27]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox10040549

- [9] HANIGAN, Marie H. Gamma-Glutamyl Transpeptidase. Redox and Cancer Part A [online]. Elsevier, 2014, 2014, 103-141 [cit. 2022-06-27]. Advances in Cancer Research. ISBN 9780124201170. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-420117-0.00003-7
- [10] BRADLEY, Ryan D., Annette L. FITZPATRICK, David R. JACOBS, et al. Associations between γ -glutamyltransferase (GGT) and biomarkers of atherosclerosis: The multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). Atherosclerosis [online]. 2014, 233(2), 387-393 [cit. 2022-06-02]. ISSN 00219150. Dostupné z: doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.01.010
- [11] ABERKANE, Hayet, Jean-François STOLTZ, Marie-Madeleine GALTEAU, et al. Erythrocytes as targets for gamma-glutamyltranspeptidase initiated pro-oxidant reaction. European Journal of Haematology [online]. 2002, 68(5), 262-271 [cit. 2022-06-24]. ISSN 09024441. Dostupné z: doi:10.1034/j.1600-0609.2002.01636.x
- [12] ZHANG, Rui a Qingtao WANG. Comparability of four clinical laboratory measurement methods for GGT and commutability of candidate reference materials. Journal of Clinical Laboratory Analysis [online]. 2020, 34(12) [cit. 2022-06-24]. ISSN 0887-8013. Dostupné z: doi:10.1002/jcla.23557
- [13] LAMBETH, David O. a Wallace W. MUHONEN. High-performance liquid chromatography-based assays of enzyme activities. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications [online]. 1994, 656(1), 143-157 [cit. 2022-06-29]. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/0378-4347(94)00072-7
- [14] BJÖRKEGREN, Johan L.M. a Aldons J. LUSIS. Atherosclerosis: Recent developments. Cell [online]. 2022, 185(10), 1630-1645 [cit. 2022-06-14]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2022.04.004
- [15] KUNUTSOR, Setor K. Gamma-glutamyltransferase-friend or foe within?. Liver International [online]. 2016, 36(12), 1723-1734 [cit. 2022-06-27]. ISSN 14783223. Dostupné z: doi:10.1111/Liv.13221
- [16] AGARWAL, Shweta, German VARGAS, Cristina NORDSTROM, et al. Effect of interference from hemolysis, icterus and lipemia on routine pediatric clinical chemistry assays. Clinica Chimica Acta [online]. 2015, 438, 241-245 [cit. 2022-06-27]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2014.08.008
- [17] KOSEOGLU, Mehmet, Aysel HUR, Aysenur ATAY et al. Effects of hemolysis interference on routine biochemistry parameters. Biochimica Medica

- [online]. 2011, 21(1), 79-85 [cit. 2022-06-24]. ISSN 18467482. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2011.015
- [18] CUHADAR, Serap, Mehmet KOSEOGLU, Aysenur ATAY et al. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. *Biochemia Medica* [online]. 2013, 70-77 [cit. 2022-06-27]. ISSN 18467482. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2013.009
- [19] RUBAN, Angela, Natalie DAYA, Andrea L.C. SCHNEIDER, et al. Liver Enzymes and Risk of Stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Journal of Stroke* [online]. 2020, 22(3), 357-368 [cit. 2022-06-02]. ISSN 2287-6391. Dostupné z: doi:10.5853/jos.2020.00290
- [20] CORTI, Alessandro, Eugenia BELCASTRO, Silvia DOMINICI, et al. The dark side of gamma-glutamyltransferase (GGT): Pathogenic effects of an 'antioxidant' enzyme. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2020, 160, 807-819 [cit. 2022-06-02]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.005
- [21] MARTÍNEZ-QUINTANA, Efrén, Javier PARDO-MAIZA, Beatriz DÉNIZ-ALVARADO, et al. Gamma-glutamyl transferase and cardiovascular events in patients with congenital heart disease. *European Journal of Clinical Investigation* [online]. 2022, 52(4) [cit. 2022-05-17]. ISSN 0014-2972. Dostupné z: doi:10.1111/eci.13720
- [22] KIM, Yong-Giun, Gyung-Min PARK, Seung Bum LEE, et al. Association of gamma-glutamyl transferase with subclinical coronary atherosclerosis and cardiac outcomes in non-alcoholics. *Scientific Reports* [online]. 2020, 10(1) [cit. 2022-06-02]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-75078-6
- [23] ZHENG, Ying-Ying, Ting-Ting WU, You CHEN, et al. Gamma-glutamyl transferase to albumin ratio as a novel predictor of bleeding events and mortality in patients after percutaneous coronary intervention: A retrospective cohort study. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* [online]. 2020, 95(S1), 572-578 [cit. 2022-06-27]. ISSN 1522-1946. Dostupné z: doi:10.1002/ccd.28696
- [24] ERTEM, Şeyma, A. Goktug ERTEM, Mehmet A. ERDOL, Koray DEMIRTAS, et al. Γ -Glutamyltransferase Subtype and Major Adverse Cardiac Events. *Angiology* [online]. 2020, 71(3), 292-292 [cit. 2022-06-27]. ISSN 0003-3197. Dostupné z: doi:10.1177/0003319719862961
- [25] ATAR, Asli I., Omer C. YILMAZ, Kayihan AKIN, et al. Association between gamma-glutamyltransferase and coronary artery calcification. *International Journal of*

- Cardiology [online]. 2013, 167(4), 1264-1267 [cit. 2022-06-27]. ISSN 01675273.
Dostupné z: doi:10.1016/j.ijcard.2012.03.157
- [26] LIBBY, Peter, Paul M. RIDKER a Göran K. HANSSON. Inflammation in Atherosclerosis. Journal of the American College of Cardiology [online]. 2009, 54(23), 2129-2138 [cit. 2022-05-17]. ISSN 07351097. Dostupné z: doi:10.1016/j.jacc.2009.09.009
- [27] MENZEL, Petr. Záněťová odpověď. In: WikiSkripta.eu [online]. online: WikiSkripta.eu, 2022, 2011 [cit. 2022-06-13]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Z%C3%A1n%C4%9Bt>
- [28] GOMBALA, Tomas. Srovnání struktury arterie a vény při stejné tloušťce. In: WikiSkripta.eu [online]. online: WikiSkripta.eu, 2010 [cit. 2022-06-14]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:Arterie_vena.png
- [29] GÉNÉREUX, Philippe, Mahesh V. MADHAVAN, Gary S. MINTZ, et al. Ischemic Outcomes After Coronary Intervention of Calcified Vessels in Acute Coronary Syndromes. Journal of the American College of Cardiology [online]. 2014, 63(18), 1845–1854 [cit. 2022-06-29]. ISSN 07351097. Dostupné z: doi:10.1016/j.jacc.2014.01.034
- [30] SILVERIO, Angelo, Sergio BUCCHERI, Dimitrios VENETSANOS, et al. Percutaneous Treatment and Outcomes of Small Coronary Vessels. JACC: Cardiovascular Interventions [online]. 2020, 13(7), 793-804 [cit. 2022-06-29]. ISSN 19368798. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcin.2019.10.062
- [31] PENG, Liyuan, Xincheng GUO, Ya GAO, et al. Impact of right coronary dominance on triple-vessel coronary artery disease. Medicine [online]. 2018, 97(32) [cit. 2022-06-29]. ISSN 0025-7974. Dostupné z: doi:10.1097/MD.0000000000011685
- [32] HEUSCH, Gerd, Peter LIBBY, Bernard GERSH, et al. Lancet Seminar: Cardiovascular Remodelling in Coronary Artery Disease and Heart Failure. The Lancet [online]. 2014, 383(9932), 1933-1943 [cit. 2022-06-29]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(14)60107-0
- [33] DOGAN, Abdullah, Akif ARSLAN, Habil YUCEL, et al. Gamma glutamyltransferase, inflammation and cardiovascular risk factors in isolated coronary artery ectasia. Revista Portuguesa de Cardiologia [online]. 2016, 35(1), 33-39 [cit. 2022-06-02]. ISSN 08702551. Dostupné z: doi:10.1016/j.repc.2015.05.009
- [34] JEON, Joeeun, Dae H. KIM, Woojin KIM, et al. Dose-response relationship between gamma-glutamyltransferase and the risk of atherosclerotic cardiovascular

- diseases in Korean adults. *Atherosclerosis* [online]. 2020, 292, 152-159 [cit. 2022-06-27]. ISSN 00219150. Dostupné z: doi:10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.004
- [35] SPOTO, Belinda, Graziella D'ARRIGO, Giovanni TRIPEPI, et al. Serum gamma-glutamyltransferase, oxidized LDL and mortality in the elderly. *Aging Clinical and Experimental Research* [online]. 2021, 33(5), 1393-1397 [cit. 2022-06-27]. ISSN 1720-8319. Dostupné z: doi:10.1007/s40520-019-01391-4
- [36] FAN, Maoxia, Dong GUO, Yiming WANG, et al. Efficacy and safety of Xinkeshu in the treatment of angina pectoris of coronary heart disease. *Medicine* [online]. 2021, 100(40), 1-4 [cit. 2022-06-20]. ISSN 0025-7974. Dostupné z: doi:10.1097/MD.00000000000027407
- [37] CHO, H.S., S.W. LEE, E.S. KIM, et al. HAN. Clinical significance of serum bilirubin and gamma-glutamyltransferase levels on coronary atherosclerosis assessed by multidetector computed tomography. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* [online]. 2015, 25(7), 677-685 [cit. 2022-06-27]. ISSN 09394753. Dostupné z: doi:10.1016/j.numecd.2015.03.014
- [38] EMIROGLU, Mehmet Y., Özlem Batukan ESEN, Mustafa BULUT, et al. GGT levels in type II diabetic patients with acute coronary syndrome (does diabetes have any effect on GGT levels in acute coronary syndrome?). *Acta Diabetologica* [online]. 2013, 50(1), 21-25 [cit. 2022-06-27]. ISSN 0940-5429. Dostupné z: doi:10.1007/s00592-010-0208-2
- [39] GABARA, Lavinia, Sally OLSEN, Bashir ALAOUR et al. Ischaemic heart disease: stable angina. *Medicine* [online]. 2022 [cit. 2022-06-20]. ISSN 13573039. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpmed.2022.04.004
- [40] GALLONE, Guglielmo, Luca BALDETTI, Georgios TZANIS, et al. Refractory Angina. *JACC: Cardiovascular Interventions* [online]. 2020, 13(1), 1-19 [cit. 2022-06-20]. ISSN 19368798. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcin.2019.08.055
- [41] Aortic stenosis. In: *Remedy LAND* [online]. online: Remedy LAND, 2019 [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: <http://www.remedylan.com/wp-content/uploads/Aortic-stenosis.png>
- [42] ŠTEFÁNEK, Jiří. Hypertrofie myokardu. In: *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. Praha: 1. LF UK, 2011 [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: https://www.stefajir.cz/files/Hypertrofie_Myokardu.png

Příloha 1 Informovaný souhlas

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.

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 1 Souhlas etické komise

Ethics Committee (EC)
Regional Hospital Pardubice
Chairman: MUDr. Josef Hájek, CSc.
Kyjevská 44
532 03 Pardubice
Czech Republic

Members:

MUDr. Petr Vojtíšek, CSc., head of the Cardiology Dept. submitted in cooperation with University of Pardubice the application for EC approval of the study focused on inflammation, oxidative stress and other biochemical parameters in patients with ischemic heart disease. Involvement of the patient into this study will not influence the patient therapy. The patients will be submitted only to 3 blood sample collections (à 19 ml) within 2 days and filling the questionnaire. Patients will be informed about the purpose of this study by attending physician. Only in the case of their agreement to participate in this study, blood sampling will be done.

EC approve protocol of the study „The dynamic of inflammatory markers after PCI in patients with ischemic heart disease“.

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

26. 3. 2010

