



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

**Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

Lipidový profil a parametry oxidačního stresu u pacientů s terminálním renálním selháním

Lipid Profile and Oxidation Stress in Patients with Terminal Kidney Failure

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Mgr. Barbora Staňková

Tereza Suchanová

Kladno, květen 2019



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Suchanová** Jméno: **Tereza** Osobní číslo: **465765**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Lipidový profil a parametry oxidačního stresu u pacientů s terminálním renálním selháním

Název bakalářské práce anglicky:

Lipid Profile and Oxidation Stress in Patients with Terminal Kidney Failure

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude porovnání lipidového profilu a parametrů oxidačního stresu osob s neporušeným lipidovým metabolismem a hemodialyzovaných pacientů. Teoretická část bakalářské práce bude zaměřena na popis poruch lipidového metabolismu u pacientů s chronickou renální insuficiencí a možnostmi náhrady funkce ledvin. Dále se bude zabírat popisem rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění, která mají u dialyzovaných pacientů vysokou prevalenci. V praktické části bude stanovena hladina lipidových parametrů a parametrů oxidačního stresu u hemodialyzovaných pacientů a u pacientů s neporušeným lipidovým metabolismem. Získaná data budou následně statisticky zpracována. V diskuzi budou získané výsledky komentovány v kontextu se světovou literaturou.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Vostalová J., Galandaková A., Štrebl P., Zadaržil J., Oxidační stres u pacientů s náhradou funkce ledvin hemodialýzou a peritoneální dialýzou, Vnitřní lékařství, číslo 58(6): 466-472, 2012, ISSN 0042-773X
- [2] BERÁNEK, Martin a Miloš TICHÝ, Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program Zdravotnická bioanalýtika, Praha: Karolinum, 2013, Učební texty Univerzity Karlovy v Praze, ISBN 978-80-246-2186-9
- [3] MIKOLASEVIC, Ivana, Marta ŽUTELIJA, Vojko MAVRINAC a Lidija ORLIC, Dyslipidemia in patients with chronic kidney disease: etiology and management. Int J Nephrol Renovasc Dis., číslo 10: 35-45, 2017, ISSN 1178-7058

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

Mgr. Barbora Staňková

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **28.09.2018**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2020**

prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
podpis vedoucí(ho) katedry

prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.
podpis děkana(ky)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem **Lipidový profil a parametry oxidačního stresu u pacientů s terminálním renálním selháním** vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 16.05.2019

.....
podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Barboře Staňkové za odborné vedení mé bakalářské práce, cenné rady a za její čas, který mi v průběhu vypracování věnovala.

Abstrakt

Pacienti se sníženou funkcí ledvin nebo s nevratným ledvinovým selháním vykazují vysokou mortalitu na kardiovaskulární onemocnění. K nárůstu kardiometabolického rizika výrazně přispívá oxidační stres a porucha lipidového metabolismu, která vede k aterosklerotickému poškození cévního endotelu. Dyslipidémie je spojena nejen s výrazným zvýšením rizika rozvoje aterosklerotických změn, ale může se výrazně podílet i na progresi chronického renálního selhání. Riziko kardiovaskulárních příhod se zvyšuje jak u pacientů v dialyzačním programu, tak u pacientů po transplantaci ledviny.

Cílem předkládané práce bylo porovnat parametry oxidačního stresu a lipidový profil u pacientů na hemodialýze se souborem zdravých kontrol. Do studie bylo zařazeno 40 pacientů v pravidelném hemodialyzačním programu a 40 zdravých kontrol spárovaných na základě věku a pohlaví. Aktivity PON1 a koncentrace KD byly stanoveny spektrofotometricky, koncentrace SAA, ApoB48, oxLDL a hsCRP byly měřeny metodou ELISA, koncentrace Lp(a) byla stanovena imunoelektroforeticky. Hladiny ostatních biochemických parametrů byly stanoveny pomocí enzymaticko-kolorimetrických metod na biochemickém analyzátoru.

Pacienti na dialýze měli ve srovnání se skupinou zdravých osob výrazně proaterogenní lipidový profil charakterizovaný zvýšenými koncentracemi TAG, Lp(a) a apoB48. U hemodialyzovaných pacientů byl rovněž prokázán oslabený antioxidační systém a chronický zánět. Byly pozorovány snížené aktivity PON1 a zvýšené hodnoty NEFA, SAA a hsCRP.

Dialýza je pro pacienty s terminálním renálním selháním nezbytná, nicméně změny lipidových parametrů a ukazatelů oxidačního stresu ukazují, že zároveň přispívá ke zvýšení oxidačního stresu a progresi dyslipidémie.

Klíčová slova

Dyslipidémie; hemodialýza; kardiovaskulární onemocnění; lipoproteiny;
oxidační stres; renální insuficience

Abstract

Patients with renal impairment or irreversible renal failure show high mortality from cardiovascular diseases. Oxidative stress and lipid metabolism disorder, which leads to atherosclerotic damage to the vascular endothelium, contribute significantly to the increase in cardiometabolic risk. Dyslipidemia is associated not only with a significant increase in the risk of developing atherosclerotic changes, but it can also contribute significantly to the progression of chronic renal failure. The risk of cardiovascular events increases in both dialysis patients and renal transplant patients.

The aim of this thesis was to compare the parameters of oxidative stress and lipid panel in haemodialysis patients with a set of healthy check-ups. The study included 40 patients in a regular haemodialysis program and 40 healthy check-ups matched based on age and gender. PON1 activities and KD concentrations were determined spectrophotometrically, SAA, ApoB48, oxLDL and hsCRP concentrations were measured by ELISA method, Lp(a) concentration was determined by immunoelectrophoresis. Levels of other biochemical parameters were determined using enzymatic colorimetric methods with a biochemical analyser.

Dialysis patients had a markedly proatherogenic lipid profile compared to the healthy group, characterized by elevated concentrations of TAG, Lp(a) and apoB48. Haemodialysis patients also showed a weakened antioxidant system and chronic inflammation. Reduced PON1 activities and increased NEFA, SAA, and hsCRP values were observed.

Dialysis is indispensable for terminal renal failure patients, but changes in lipid parameters and oxidative stress markers indicate that it also contributes to increased oxidative stress and progression of dyslipidemia.

Keywords

Dyslipidemia; haemodialysis; cardiovascular disease; lipoproteins; oxidative stress; renal insufficiency

Obsah

1	Úvod.....	12
2	Současný stav.....	14
2.1	Ledviny.....	14
2.1.1	Stavba a funkce ledvin.....	14
2.1.2	Onemocnění ledvin.....	14
2.1.3	Renální selhání.....	15
2.2	Možnosti náhrady ledvin.....	15
2.2.1	Hemodialýza.....	15
2.2.2	Hemofiltrace.....	16
2.2.3	Peritoneální dialýza.....	16
2.2.4	Transplantace ledviny.....	16
2.3	Metabolismus a transport lipidů.....	17
2.3.1	Chylomikrony.....	17
2.3.2	Lipoproteiny o velmi nízké hustotě.....	18
2.3.3	Lipoproteiny o střední hustotě.....	18
2.3.4	Lipoproteiny o nízké hustotě.....	19
2.3.5	Lipoproteiny o vysoké hustotě.....	19
2.3.6	Lipoprotein (a).....	20
2.3.7	Apoproteiny.....	21
2.4	Poruchy lipidového metabolismu u pacientů s terminálním renálním selháním.....	22
2.4.1	Dyslipidémie u hemodialyzovaných pacientů.....	23
2.4.2	Dyslipidémie u pacientů léčených peritoneální dialýzou.....	23

2.4.3	Dyslipidémie u pacientů po transplantaci ledviny	24
2.5	Parametry oxidačního stresu a ukazatele mikrožánětu.....	24
2.5.1	Vysoce senzitivní C-reaktivní protein	24
2.5.2	Sérový amyloid A.....	25
2.5.3	Paraoxonáza 1	25
2.5.4	Oxidované částice LDL.....	25
2.6	Oxidační stres u pacientů s terminálním renálním selháním	25
2.6.1	Oxidační stres u pacientů léčených hemodialýzou.....	26
2.6.2	Oxidační stres u pacientů léčených peritoneální dialýzou	27
2.6.3	Oxidační stres u pacientů po transplantaci ledviny.....	28
2.7	Kardiovaskulární onemocnění u pacientů s terminálním renálním selháním	29
2.7.1	Riziko vzniku kardiovaskulárního onemocnění u pacientů s náhradou funkce ledvin hemodialýzou.....	29
2.7.2	Riziko vzniku kardiovaskulárního onemocnění u pacientů s náhradou funkce ledvin peritoneální dialýzou	30
2.7.3	Hypertrofie levé komory srdeční u pacientů s terminálním renálním selháním	30
2.7.4	Ischemická choroba srdeční u pacientů s terminálním renálním selháním	31
3	Cíl práce.....	32
4	Metodika	33
4.1	Použité chemikálie a přístrojové vybavení	33
4.1.1	Přístrojové vybavení	33
4.1.2	Chemikálie a diagnostické soupravy	33

4.2	Studované skupiny osob.....	35
4.3	Sběr a příprava vzorků	36
4.4	Stanovení klinických a biochemických parametrů plazmy.....	36
4.4.1	Stanovení lipidového profilu.....	36
4.4.2	Stanovení ostatních biochemických parametrů.....	37
4.5	Stanovení neesterifikovaných mastných kyselin a Lp(a).....	38
4.6	Stanovení arylesterázové aktivity paraoxonázy 1	38
4.7	Imunochemická stanovení	39
4.8	Stanovení KD.....	40
4.9	Statistické zpracování výsledků	41
5	Výsledky	42
5.1	Biochemické parametry plazmy.....	42
5.2	Lipidové parametry.....	43
5.3	Parametry oxidačního stresu a ukazatele mikrozánětu.....	44
6	Diskuze	46
7	Závěr	48
8	Seznam použitých zkratk	49
9	Bibliografie	51
10	Seznamu použitých tabulek.....	59

1 ÚVOD

Hlavními příčinami úmrtí pacientů s chronickým onemocněním ledvin jsou kardiovaskulární choroby, jako je ischemická choroba srdeční, infarkt myokardu nebo cévní mozková příhoda. Významnou úlohu v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění hraje zvýšený oxidační stres, který je výsledkem nerovnováhy mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a dusíku a/nebo nedostatečnou kapacitou antioxidačního systému. Dalším neopomenutelným rizikovým faktorem kardiovaskulárních komplikací jsou poruchy lipidového a lipoproteinového metabolismu (1).

Progresi poškození funkce ledvin potencuje dyslipidémie charakterizovaná vzestupem plazmatických triacylglycerolů (TAG), který je spojen s poklesem cholesterolu v lipoproteinu o vysoké hustotě (HDL, high density lipoproteins). Částice HDL zároveň obsahují větší podíl TAG. Plazmatické koncentrace celkového cholesterolu (TC, total cholesterol) a cholesterolu v lipoproteinu o nízké hustotě (LDL, low density lipoproteins) mívají pacienti často ve fyziologickém rozmezí nebo snížené s přesunem k malým denzním LDL (sd-LDL), které jsou velmi snadno oxidovatelné (2).

Jednou z příčin zvýšeného kardiovaskulárního rizika hemodialyzovaných pacientů je oxidační stres a s ním spojený chronický mikrozánět. U pacientů v terminálním stádiu selhání funkce ledvin (ESRD, end-stage renal disease) nejsou ledviny schopny udržet fyziologické složení vnitřního prostředí ani za bazálních podmínek či speciálních dietních nebo farmakoterapeutických opatření (3). Pro přežití těchto pacientů je nutná náhrada funkce ledvin pomocí hemodialýzy nebo peritoneální dialýzy. Obě tyto metody jsou však doprovázeny zvýšenou oxidační zátěží pacientů ať už složením peritoneálního dialyzačního roztoku nebo druhem dialyzační membrány (4).

Jakákoliv forma dialýzy přispívá k rozvoji řady patofyziologických dějů, které vedou ke zvýšení oxidačního stresu a progresi aterosklerotických změn (5).

Cílem předkládané práce bylo porovnat lipidový profil a parametry oxidačního stresu u pacientů v pravidelném hemodialyzačním programu se souborem zdravých osob.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Ledviny

Ledviny jsou párovým orgánem fazolovitého tvaru a v organismu plní řadu životně důležitých funkcí. Uloženy jsou v retroperitoneálním prostoru po stranách bederní páteře.

2.1.1 Stavba a funkce ledvin

Na hladkém povrchu ledviny se nachází ledvinná branka, v tomto místě do ledviny vstupuje tepna, mízní cévy, nervy a vystupuje ledvinná pánvička. Uvnitř ledviny rozlišujeme kůru ledviny, která je uložena při povrchu ledviny a v hloubce ledviny se nachází dřeň, směřující k ledvinné brance. V kůře každé ledviny je uloženo okolo jednoho milionu nefronů. Nefrony jsou hlavní funkční jednotkou ledvin, jsou složeny z distálního kanálku, sběracího kanálku, Henleovy kličky, proximálního kanálku a Malpighiho tělíska. Dřeň je rozdělena do ledvinových pyramid, na vrcholcích pyramid jsou umístěny sběrací kanálky, které obemykají kalich ledviny.

Nejdůležitější funkcí ledvin je udržení stálé homeostázy organismu. Další důležitou funkcí ledvin je produkce hormonů, které regulují a zabezpečují objem a složení krve, výšku krevního tlaku, tvorbu červených krvinek v kostní dřeni a aktivaci vitamínu D (6).

2.1.2 Onemocnění ledvin

Onemocnění ledvin obecně znamená, že došlo k poškození funkce nefronu. Funkce nefronu je glomerulární a tubulární. V některých případech dochází k poškození glomerulů a tím ke snížení glomerulární filtrace a někdy k poškození tubulů. Postupem času však dojde k poškození obou částí nefronu. K zániku glomerulů dochází u chronického onemocnění ledvin a zbývající nefrony,

tzv. reziduální nefrony, jsou schopné do určité míry kompenzovat funkci zaniklých nefronů (7).

2.1.3 Renální selhání

Renální selhání se rozlišuje na dva typy: akutní a chronické. K renálnímu selhání dochází, pokud ledviny nejsou schopné vykonávat své funkce i za dodržení určitých podmínek. Akutní renální selhání se vyvíjí náhle během několika hodin nebo dní. Vyvíjí se působením nefrotoxických jedů nebo při šoku. Pokud dojde k překonání několika týdenní dialyzační léčby, může dojít k regeneraci ledvinných buněk a k částečnému vrácení renálních funkcí. Při chronickém selhání ledvin dochází k plynulému přecházení renální insuficience v renální selhání. Z počátku může být pacient zcela bez potíží, jelikož reziduální nefrony jsou schopny nahradit funkci zaniklých nefronů. Léčba u zjištěného chronického selhání spočívá v hledání nejlepší alternativy možnosti náhrady ledvin (7).

2.2 Možnosti náhrady ledvin

Jestliže je u pacienta diagnostikována snížená funkce ledvin, je z počátku snaha oddálit terminální renální selhání tzv. konzervativní léčbou. V případě, že jsou vyčerpány všechny možnosti farmakologické léčby a dojde k terminálnímu renálnímu selhání, je nutné zahájit náhradu funkce ledvin dialýzou nebo uvažovat o transplantaci ledviny (8).

2.2.1 Hemodialýza

Hemodialýza je prováděna na základě difúze látek přes polopropustnou membránu mezi krví a dialyzačním roztokem. Krev je očišťována od odpadních látek a přebytku vody, odpadní látky jsou odváděny do dialyzačního roztoku. Současně může probíhat odčerpávání ultrafiltrátu plazmy z krve, tento děj se nazývá ultrafiltrace. Metoda ultrafiltrace pracuje na základě tlakového gradientu mezi krví a dialyzačním roztokem, působením hydrauliky dialyzačního

přístroje. Pacient na hemodialýzu dochází zpravidla 3x týdně a délka dialýzy je 4-5 hodin (7; 8).

2.2.2 Hemofiltrace

Při této metodě je odčerpáváno velké množství ultrafiltrátu přes membránu hemofiltru, složení ultrafiltrátu se podobá složení primární moče. Hemofiltrace nevyužívá dialyzačního roztoku, ale ultrafiltrát je nahrazen substitučním roztokem. Existují dvě možnosti, jak provést hemofiltraci. První způsob je prediluční hemofiltrace, spočívá v tom, že substituční roztok je vpuštěn do mimotělního krevního oběhu před vstupem krve do hemofiltru. Druhý způsob pracuje na opačném principu, substituční roztok se do mimotělního krevního okruhu dává po výstupu krve z hemofiltru, je to tzv. postdiluční hemofiltrace (7).

2.2.3 Peritoneální dialýza

Peritoneální dialýza využívá k očištění krve peritoneální membránu. To je hlavní rozdíl od hemodialýzy a hemofiltrace, které používají dialyzační membrány a mimotělní krevní okruh. Peritoneální dialýza se opakuje v průměru 4x denně. Pracuje na základě pravidelných intervalů, ve kterých se do peritoneální dutiny napouští 1,5-2 litry dialyzačního roztoku přes peritoneální katetr. Po několika hodinách se dialyzační roztok z dutiny břišní vypustí, tento roztok obsahuje dusíkaté katabolity a další látky, které je nutné z těla odstranit. Takto prováděná metoda se nazývá CAPD – kontinuální ambulantní peritoneální dialýza (7).

2.2.4 Transplantace ledviny

Možnost transplantace ledviny se vždy prověřuje jako první. Je to jediná metoda z možností náhrady ledvin, která může ztracené funkce ledvin zcela nahradit. Transplantace se může provést, pokud je pacient v dobré tělesné kondici a netrpí žádným onemocněním, které by transplantaci znemožňovalo. Dárce ledviny může

být příbuzný pacienta nebo osoba blízká, pokud se nenajde vhodný dárce, zařazuje se pacient na čekací listinu (8).

Zdravá ledvina dárce je operativně vpravena do těla příjemce. Nová ledvina se ukládá do levé nebo pravé jámy kyčelní, mezi břicho a břišní dutinu poté je propojena žíla a tepna nové ledviny s cévním systémem pacienta. Transplantovaná ledvina také obsahuje močovod, který se musí napojit na močový měchýř. Po transplantaci mohou nastat komplikace, tělo pacienta nemusí ledvinu přijmout a není vyloučené, že transplantovanou ledvinu nepostihne stejné onemocnění, jako ledviny pacienta (9).

2.3 Metabolismus a transport lipidů

Lipidy jsou přijímány v potravě většinou v hydrolyzované podobě jako triacylglyceroly (TAG), fosfolipidy, sfingolipidy a estery cholesterolu. V zažívacím traktu jsou hydrolyzovány na volné mastné kyseliny, které jsou významným energetickým zdrojem. Lipidy jsou ve vodě téměř nerozpustné, aby na ně mohly působit trávicí hydrolasy, musí být nejdříve emulgovány se žlučovými kyselinami, které jsou obsaženy ve žluči. Většina lipidů je štěpena až v tenkém střevě, kde na ně působí lipasy, které vznikají v pankreatu. Triacylglyceroly jsou částečně odbourávány již v žaludku. Produktem štěpení TAG jsou mastné kyseliny a monoacylglycerol, tyto produkty jsou transportovány do buněk střevního epitelu společně s cholesterolem. V tenkém střevě dochází k novotvorbě TAG, ty jsou z tenkého střeva společně s cholesterolem transportovány ve formě lipoproteinů (10).

2.3.1 Chylomikrony

Chylomikrony vznikají v tenkém střevě a jejich hlavní funkcí je transport střevních lipidů do tkání. TAG jsou transportovány především do tukové tkáně a cholesterol do jater. Hustota chylomikronů je ze všech lipoproteinů nejmenší.

V závislosti na obsahu fosfolipidů a cholesterolu se odvíjí obsah TAG, těch mohou obsahovat až 90 %. Po příjmu tučného jídla do 3-6 hodin koncentrace chylomikronů v krvi stoupá do svého maxima, na minimum se dostane po 9 hodinách. Zvýšená hladina chylomikronů, je typická pro akutní pankreatitidu. Postupným uvolňováním TAG se z chylomikronů stávají chylomikronové zbytky, které obsahují především cholesterol. Tyto částice jsou hlavním zdrojem cholesterolu pro játra. Za normálních podmínek se zbytky chylomikronů rozpadají velmi rychle a nezasahují do procesu aterosklerózy. Pokud dojde ke zpomalení metabolismu chylomikronů, vznikají tyto zbytky s výrazně sníženým obsahem TAG a mají vysoký obsah cholesterolu, za takovýchto okolností výrazně zvyšují riziko kardiovaskulárního onemocnění (11; 12).

2.3.2 Lipoproteiny o velmi nízké hustotě

Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL, very low density lipoprotein) vznikají v játrech, skládají se především z TAG, které transportují z jater do periferních tkání, pro jejich syntézu je nutná přítomnost mastných kyselin. Zvýšená syntéza mastných kyselin vede ke zvýšené tvorbě VLDL. Cholesterol přítomný v částicích VLDL pochází z ostatních lipoproteinů. Zvýšená koncentrace VLDL může vést ke zvýšení rizika kardiovaskulárních chorob. Renální insuficience, vysoký přívod energie, obezita či diabetes mellitus jsou faktory, které vedou ke zvýšení koncentrace VLDL (12).

2.3.3 Lipoproteiny o střední hustotě

Lipoproteiny o střední hustotě (IDL, intermedial density lipoprotein) jsou degradačními produkty VLDL, ze kterých byla odebrána část TAG, obsahují přibližně stejné množství TAG i cholesterolu. IDL jsou lipoproteiny o střední hustotě. Jejich biologický poločas je za normálních okolností velmi krátký a nemají žádný význam na vznik kardiovaskulárního onemocnění. Pokud dochází ke zvýšení koncentrace IDL v krvi, stávají se velmi aterogenní (11; 12).

2.3.4 Lipoproteiny o nízké hustotě

Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL, low density lipoprotein) jsou syntetizovány z IDL a jsou produkovány v různých velikostech, různé hustotě a obsahují okolo 50 % cholesterolu a 6 % TAG. Fyziologické hodnoty LDL v organismu jsou 1,2-3,0 mmol/l. Hlavní funkcí LDL lipoproteinů je dodávání cholesterolu periferním tkáním. Periferní tkáně dodávku cholesterolu nepotřebují, jelikož si syntetizují svůj vlastní. LDL částice mají dlouhý biologický poločas, během 24 hodin se z těla katabolizuje 30-40 % LDL částic. LDL lipoproteiny se dělí na velké LDL₁, střední LDL₂ a malé LDL₃. LDL₃ částice jsou nejvíce aterogenní a vznikají při hypertriglyceridemii, která má za následek syntézu velkých VLDL částic, ze kterých vznikají malé LDL₃ částice. U osob se zvýšeným počtem malých LDL₃ částic, je možné shledat normální koncentraci LDL v krvi. Zvýšení koncentrace LDL je možné pozorovat u osob se stravou bohatou na cholesterol a u obézních lidí (11; 12).

2.3.5 Lipoproteiny o vysoké hustotě

Lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL, high density lipoprotein) vznikají v játrech, v tenkém střevě, oddělením z chylomikronů. Hlavní funkcí HDL lipoproteinů je tzv. reverzní transport cholesterolu. Při reverzním transportu je zajišťován přenos cholesterolu z periferních tkání zpět do jater. Transport je zajišťován odebráním cholesterolu z povrchu buněk všech tkání, odebráním volného cholesterolu z ostatních lipoproteinů. Malé částice HDL slouží proti rozvoji aterosklerózy, jelikož jsou lepšími akceptory cholesterolu než velké HDL částice (11; 12).

Tabulka 1 Referenční rozmezí parametrů lipidového profilu (13)

Parametry	Dolní mez [mmol/l]	Horní mez [mmol/l]
Celkový cholesterol	2,9	5,0
HDL-C muži	1,0	2,1
HDL-C ženy	1,2	2,7
LDL-C	1,2	3,0
TAG	0,45	1,7

HDL-C: HDL-cholesterol; LDL-C: LDL-cholesterol; TAG: triacylglyceroly.

2.3.6 Lipoprotein (a)

Lipoprotein (a) (Lp(a)) je lipoproteinová částice, která obsahuje velké množství cholesterolu a je nejvíce podobná částici LDL. Je syntetizován v játrech nezávisle na TAG, oproti částicím LDL obsahuje apoprotein (a), který se kovalentně váže disulfidickou vazbou k apoprotein B-100. Struktura Lp(a) vykazuje značnou homologii s proteiny fibrinolytického systému, především s plasminogenem, a proto působí prokoagulačně. Významně se tak podílí na rozvoji trombotického procesu a aterosklerózy. Lipoprotein (a) představuje rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění, nezávislý na ostatních plazmatických lipoproteinech. Za vysoce rizikové bývají označovány plazmatické koncentrace nad 300 mg/l (14).

Hladiny Lp(a) v lidské plazmě se vyskytují v širokém koncentračním pásmu, jsou dány geneticky a velmi málo podléhají zevním vlivům (kouření, pohybové aktivitě, dietě atd.). Mezi jednotlivými etnickými skupinami existují

v plazmatických hladinách Lp(a) výrazné rozdíly (řádově až 1000 násobné), zatímco u téhož jedince jsou hodnoty relativně stálé (14).

Zvýšené koncentrace Lp (a) se vyskytují zejména u pacientů s terminálním renálním selháním, při akutní fázi infarktu myokardu a u pacientů s cévními mozkovými příhodami (14).

2.3.7 Apoproteiny

Specifické bílkoviny, izolované z lipoproteinových komplexů se označují jako apoproteiny či též jako apolipoproteiny. Apoproteiny mají dvě základní funkce. Především jsou nezbytné pro samotnou existenci lipoproteinů. Jedná se o tzv. „strukturální“ apoproteiny, které mají schopnost stabilizovat tukové micely. Strukturální apoproteiny jsou dva, apoprotein B a apoprotein A-II. Apoproteiny B je nutný pro syntézu chylomikrů a VLDL buňkami střevní sliznice a jater, a pro jejich uvolňování do krevního oběhu. Apoprotein A-II má strukturální funkci ve třídě HDL. Další funkce apoproteinů spočívají v aktivaci, či inhibici enzymů, podílejících se na metabolické přeměně lipoproteinů, v přenosu lipidů mezi lipoproteiny a konečně ve vazbě lipoproteinů a receptory periferních tkání (15).

Apoprotein A-I. – Je hlavní proteinovou složkou částic HDL, je nezbytný pro aktivitu acyltransferázy lecitin: cholesterol (LCAT) a účastní se reverzního transportu cholesterolu. Místem jeho syntézy je střevní stěna a játra (15).

Apoprotein A-II. – Plní strukturální roli v komplexech HDL. V plazmě se vyskytuje hlavně jako homodimer o dvou polypeptidových řetězcích, ale je znám i ve formě monomeru nebo heterodimeru s apolipoproteinem E nebo D. Podobně jako apo A I je syntetizován střevními a jaterními buňkami (15).

Apoproteiny B. – Vyskytují se ve dvou formách označených apoB 100 a apoB 48. Jsou hlavní proteinovou složkou chylomikronů a částic VLDL i LDL. ApoB 100 je

syntetizován v játrech a kromě strukturální funkce je odpovědný za vazbu částic LDL na specifické receptory periferních tkání (fibroblasty, leukocyty, hladké svalové buňky cév a buňky kůry nadledvin). Koncentrace apo-B 100 koreluje s hladinami plazmatického cholesterolu. Hlavní proteinovou složkou chylomikrů a jejich zbytkových lipoproteinů je apoB 48, který je syntetizován v enterocytech (15).

Apoproteiny C. – Mají ze všech apoproteinů nejmenší molekulární hmotnost. Jejich koncentrace v plazmě činí 25 mg/dl. Jedná se o tři apoproteiny. Apoprotein C-I aktivuje acyltransferasu lecitin: cholesterol, a snad i lipoproteinovou lipázu (LPL). Aktivace LPL je nejspíše zprostředkována, a je závislá na transesterifikaci plazmatického cholesterolu. Apo-C-II je nezbytně nutný pro aktivitu LPL periferních tkání (zvláště kosterního svalstva a tukové tkáně). Jeho funkce spočívá ve zprostředkování interakce LPL a triacylglycerolu lipoproteinů (chylomikrů a VLDL). Apo-C-III inhibuje LPL (15).

2.4 Poruchy lipidového metabolismu u pacientů s terminálním renálním selháním

Poruchy lipidového metabolismu neboli dyslipidémie (DLP) jsou častým nálezem u pacientů s terminálním renálním selháním (ESRD). Dochází u nich většinou ke zvýšení hladin cholesterolu v plazmatických lipoproteinech, ale celkový nález DLP nebývá závažný. Mírně se zvyšuje koncentrace TAG, VLDL a IDL naopak koncentrace HDL bývá snížena. Koncentrace cholesterolu v LDL částicích může být normální, a nebo bývá i mírně snížena. Podle různých studií se ukázalo, že DLP je rozdílná u hemodialyzovaných pacientů, pacientů s peritoneální dialýzou a u pacientů po transplantaci ledviny (16).

2.4.1 Dyslipidémie u hemodialyzovaných pacientů

Pacienti s ESRD, kteří jsou závislí na hemodialýze, mají podobnou charakteristiku DLP, jako pacienti s chronickým onemocněním ledvin, kteří nedocházejí na pravidelnou hemodialýzu. U hemodialyzovaných pacientů je typickým nálezem zvýšená hladina TAG a snížená koncentrace HDL-C. Lipoproteiny VLDL a IDL jsou zvýšeny, jelikož dochází ke snižování aktivity lipoproteinových a jaterních lipáz, tento problém je i u pacientů s chronickým selháním ledvin, kteří nejsou závislí na pravidelné hemodialýze. Kromě tohoto mechanismu mohou i další faktory související s hemodialýzou přispět ke zvýšení hladiny TAG. Hladina HDL se snižuje v důsledku použití dialyzačních membrán a dialyzátů v procesu hemodialýzy. Koncentrace LDL a celkového cholesterolu nebývá zvýšená u všech pacientů. Pokud je hladina LDL zvýšená, pacienti mají vyšší riziko rozvoje aterosklerózy a dalších kardiovaskulárních chorob. U pacientů s ESRD je 50% mortalita na následek kardiovaskulárních chorob a udává se, že úmrtnost je 30 krát vyšší u dialyzovaných pacientů než u pacientů, kteří nemusí docházet na pravidelnou hemodialýzu (16).

2.4.2 Dyslipidémie u pacientů léčených peritoneální dialýzou

Pacienti léčení peritoneální dialýzou mají větší riziko rozvoje kardiovaskulárních chorob než pacienti, kteří jsou léčení hemodialýzou. Důvodem jsou zvýšené hladiny TAG, VLDL-C, IDL-C, LDL-C a celkového cholesterolu, naopak koncentrace HDL jsou sniženy. Existují příčiny, které mohou za zvýšení či snížení hladin lipoproteinů. Významná je absorpce glukózy z dialyzačního roztoku, tím se zvýší hladina inzulinu v krvi, který zapříčiní syntézu a sekreci VLDL-C (16).

Vyšší hladina TAG a LDL může být zapříčiněna nefrotickým syndromem a s ním související ztrátou proteinů. U pacientů s peritoneální dialýzou je velká část plasmatických proteinů ztracena při peritoneální dialýze. Peritoneální dialýza

stimuluje játra k vyšší produkci albuminu a dalších proteinů, včetně lipoproteinů obohacených o cholesterol ve snaze o kompenzaci ztracených proteinů. Nejen plazmatické proteiny jsou ztraceny prostřednictvím peritoneální dutiny, ale i důležité lipoproteiny HDL, a tím je zapříčiněna jejich snížená hladina u pacientů léčených peritoneální dialýzou (16).

2.4.3 Dyslipidémie u pacientů po transplantaci ledviny

Nejčastější příčinou úmrtí pacientů po transplantaci ledviny jsou kardiovaskulární onemocnění. DLP je významný rizikový faktor rozvoje kardiovaskulárních onemocnění, vyskytuje se až u 50 % pacientů a to do jednoho roku po transplantaci ledviny. Poruchy lipidového profilu u těchto pacientů jsou ve smyslu zvýšení koncentrací celkového cholesterolu, LDL-C, VLDL-C a výrazném snížení hladiny HDL-C. Vliv na rozvoj DLP po transplantaci ledviny mají i další faktory, jako je věk, genetická predispozice, obezita, diabetes mellitus a nefrotický syndrom (16).

2.5 Parametry oxidačního stresu a ukazatele mikrozánětu

2.5.1 Vysoce senzitivní C-reaktivní protein

Vysoce senzitivní C-reaktivní protein (hsCRP, high sensitivity C-reactive protein) je syntetizován v játrech. Tento protein je ukazatel zánětlivého procesu v těle. Různé studie ukázali, že zvýšená hladina hsCRP společně se zvýšenou hladinou LDL-C, může značit infarkt myokardu. Uvádí se, že hladina LDL-C je zvýšena pouze u 50 % postižených, zatímco hladina hsCRP je u pacientů s infarktem myokardu zvýšená vždy. U zdravých jedinců je hsCRP spolehlivým ukazatelem rizika vzniku kardiovaskulárního onemocnění (17).

2.5.2 Sérový amyloid A

Sérový amyloid A (SAA) je pozitivní reaktant akutní fáze. Podílí se na snížení reverzního transportu HDL-C. Hladina SAA bývá zvýšena při virových infekcích a zvyšuje se i u méně závažných infekcích. Pokud je hladina SAA dlouhodobě zvýšená, může to představovat určité riziko rozvoje aterosklerózy. Dlouhodobé hromadění SAA může vést k rozvoji sekundární amyloidózy, to je vzácná komplikace chronických zánětů či chronických infekcí (18).

2.5.3 Paraoxonáza 1

Paraoxonáza 1 (PON 1) patří mezi glykoproteiny, je syntetizována v játrech a následně je vylučována do krve, kde se seskupuje s částicemi HDL. Oxidační stres u pacientů s renálním selháním je zodpovědný za redukci PON 1, zejména u pacientů léčených hemodialýzou je tento stav zodpovědný za rozvoj aterosklerózy. Po transplantaci ledviny se úroveň aktivity PON 1 vrací do normálních hodnot, které jsou typické pro zdravou populaci (19).

2.5.4 Oxidované částice LDL

Částice LDL pronikají cévní stěnou a mohou se v ní ukládat, dochází v ní k jejich oxidaci a tím vznikají oxidované částice LDL (ox-LDL). Tyto částice hrají významnou roli při rozvoji aterosklerózy, jelikož podporují zánětlivý proces v cévní stěně. Zvýšená koncentrace ox-LDL byla naměřena i u zdravých jedinců s přítomnými rizikovými faktory kardiovaskulárních onemocnění (obezita, vyšší věk, mužské pohlaví, nízká pohybová aktivita nebo špatné stravovací návyky), (20).

2.6 Oxidační stres u pacientů s terminálním renálním selháním

Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi tvorbou volných radikálů a kapacitou antioxidantních mechanismů. Pokud v organismu převažují volné

radikály nad antioxidačními mechanismy dochází k oxidačnímu stresu. U pacientů s chronickým onemocněním ledvin je často deficit kyseliny askorbové, jelikož omezují ovoce a zeleninu kvůli dietě a také ztrácejí kyselinu askorbovou při dialýze. U těchto pacientů dochází ke snížení vitamínu E a selenu. Starší pacienti a lidé mající diabetes mellitus, produkují zvýšené množství oxidantů. Poruchy oxidačního stresu nastávají již v raných stádiích chronického renálního selhání a nejčastěji bývá diagnostikován u pacientů léčených dialýzou (21).

2.6.1 Oxidační stres u pacientů léčených hemodialýzou

K rozvoji oxidačního stresu u hemodialyzovaných pacientů přispívá několik faktorů. Mezi tyto faktory patří zejména kontakt krevních elementů s dialyzační membránou, kontaminace dialyzačního roztoku, deficit nízkomolekulárních látek, narušený metabolismus železa a další. U hemodialyzovaných pacientů přispívá trvalý výskyt volných radikálů k rozvoji chronického zánětu. Volné radikály také modifikují LDL částice a tím přispívají k rozvoji aterosklerózy u těchto pacientů (4; 22).

Volné radikály vznikají především v leukocytech, při styku s nedostatečně biokompatibilní dialyzační membránou vyrobené z regenerované celulózy. Takto vyrobené membrány produkují vyšší počet reaktivních forem kyslíku než membrány vyrobené z modifikované celulózy. Prokázání příznivého vlivu podávání vitamínu E dialyzovaným pacientům vedlo k výrobě dialyzačních membrán s povrchem potaženým vitaminem E. Tyto membrány přispívají ke snížení oxidačního stresu a zabraňují rozvoji anémie (4; 22).

Dalším faktorem je kvalita použité ultračisté vody, která může mít za následek aktivaci leukocytů a vede tak k produkci reaktivních forem kyslíku a dusíku. NADPH-oxidáza je multienzymový komplex a podílí se na produkci reaktivních forem kyslíku pomocí neutrofilů. Tento komplex je v neaktivní formě uložený v neutrofilních leukocytech a monocytech. K jeho aktivaci dochází stimulací

Fc-receptoru, bakteriemi, jejich složkami a produkty, cytokiny, či při kontaktu s dialyzační membránou. Po aktivaci NADPH-oxidázy dochází k produkci dalších radikálů a reaktivních forem kyslíku. U hemodialyzovaných pacientů se pozoruje zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku následkem aktivace NADPH-oxidázy, a to vede k rozvoji kardiovaskulárních komplikací a k ateroskleróze (4).

Při hemodialýze dochází k úbytku látek, které jsou nepostradatelné pro organismus včetně antioxidantů. Byl pozorován pokles vitamínu C o 30-50 % v porovnání s výsledky před hemodialýzou. Pokles vitamínu C může způsobit problémy s odstraňováním reaktivních forem kyslíku a dusíku a také může snížit schopnost regenerace antioxidačních mechanismů a přispět tak k riziku rozvoje kardiovaskulárního onemocnění. Avšak podávání vitamínu C se nedoporučuje, jelikož je u pacientů často léčena anémie podáváním železa a vede to k prooxidační zátěži organismu (4).

Běžný projev u chronického selhání ledvin je anémie, vznik anémie je podmíněn několika faktory. Mezi tyto faktory patří deficit železa v důsledku ztrát krve při hemodialýze, snížená stimulace kostní dřeně a zkrácené přežívání erytrocytů. Pacientům je často podáváno železo perorální nebo intravenózní cestou. Perorální cesta je méně účinná v léčbě anémie, ale nevyvolává oxidační stres, naopak intravenózní podání železa je účinnější a zvyšuje oxidační stres. Intravenózní podávání železa zvyšuje riziko kardiovaskulárního onemocnění a přispívá k rozvoji aterosklerózy (4).

2.6.2 Oxidační stres u pacientů léčených peritoneální dialýzou

Hlavními faktory, podílející se na produkci volných radikálů u pacientů léčených peritoneální dialýzou, jsou složení peritoneálního dialyzačního roztoku, sterilizace peritoneálního dialyzačního roztoku, glykace a oxidace proteinů, aktivace leukocytů, ztráta antioxidantů, mikrožánět (4).

Prvním faktorem je složení peritoneálního dialyzačního roztoku, vyráběné roztoky jsou kyselé a obsahují glukózu. Nízké pH a vysoká koncentrace glukózy zapříčiňují nízkou snášenlivost roztoku s biologickým prostředím. Sterilizací peritoneálních dialyzačních roztoků dochází k oxidaci, štěpení a dehydrataci glukózy, to vede ke vzniku reaktivních látek obsahující karbonylovou skupinu. Vzniklé látky se mohou podílet na glykaci a oxidaci proteinů, tím vznikají tzv. pokročilé produkty glykace proteinů, které se podílejí na vzniku oxidačního stresu (4).

Dále dochází ke ztrátám antioxidantů a vitamínu C, těmito ztrátami dochází k prohloubení oxidačního stresu. U těchto pacientů jsou pozorovány změny antioxidačních enzymů, snížení aktivity katalázy a nárůst hladiny karbonylů (4).

Na základě mnoha studií je doloženo, že léčba peritoneální dialýzou je také spojena s oxidačním stresem, ale zároveň dochází ke zlepšení metabolismu thiolových látek v erytrocytech. Dále nejsou pozorovány výrazné změny v arteriálním obsahu NADPH-oxidázy. Pacienti léčení peritoneální dialýzou mají i menší oxidační zátěž na funkci arterií. Ke snížení oxidačního stresu může přispět dieta bohatá na karotenoidy a snížením příjmu vitamínu C. Porovnání v tomto směru se léčba peritoneální dialýzou jeví jako šetrnější než léčba hemodialýzou (4).

2.6.3 Oxidační stres u pacientů po transplantaci ledviny

Oxidační stres je hlavní rizikový faktor kardiovaskulární mortality u pacientů po transplantaci ledviny. Zvýšený oxidační stres u těchto pacientů vede k poškození buněčných proteinů, lipidů a nukleových kyselin a k projevům orgánové dysfunkce. Lze předpokládat, že po transplantaci ledviny dojde i k vyrovnaní rovnováhy mezi volnými radikály a antioxidačními mechanismy a tím se sníží oxidační zátěž pacientů. Podle výsledků různých studií se ukazuje, že ke snížení oxidačního stresu nedochází a pacienti jsou jím dále ohrožováni (23).

Po úspěšné transplantaci ledviny dochází postupně ke snižování parametrů oxidačního stresu. Avšak v porovnání se zdravými jedinci jsou tyto hodnoty stále vyšší. Bylo prokázáno, že oxidační stres lze snížit i vhodnou úpravou jídelníčku. Po zařazení potravin bohatých na omega-3 mastné kyseliny, došlo u pacientů ke snížení oxidační zátěže (23).

Další faktor související s oxidačním stresem je imunosupresivní terapie u pacientů po transplantaci ledviny. Sama imunosupresivní terapie zahrnuje spoustu nežádoucích účinků, jako je zvýšení rizika infekce, nádorových onemocnění a mimo jiné i oxidační stres. Některé léky podávané v rámci imunosupresivní terapie mají nepříznivý vliv na oxidační zátěž, jelikož postupnou přeměnou těchto léků pomocí jaterních mikrozomálních enzymů vznikají volné radikály (23).

2.7 Kardiovaskulární onemocnění u pacientů s terminálním renálním selháním

Pacienti s chronickým postižením ledvin mají 10–20x vyšší pravděpodobnost úmrtí na kardiovaskulární onemocnění než lidé bez postižení ledvin. Udává se, že většina pacientů zemře na kardiovaskulární onemocnění ještě před zahájením samotné dialýzy. Pacienti s renálním selháním mají zvýšené riziko úmrtí po infarktu myokardu, vyskytuje se u nich ve vyšší míře dystrofie levé srdeční komory a také chronické srdeční selhání. Již v dřívější době bylo známo, že u dialyzovaných pacientů dochází k rychlejšímu rozvoji aterosklerózy. V dnešní době je zřejmé, že cévní léze u pacientů s chronickým selháním ledvin se liší od aterosklerózy, kterou nacházíme u pacientů z běžné populace (24).

2.7.1 Riziko vzniku kardiovaskulárního onemocnění u pacientů s náhradou funkce ledvin hemodialýzou

Téměř u poloviny pacientů dochází při hemodialýze k opakované ischemii, která je způsobena dočasným snížením výkonnosti srdce i při absenci

aterosklerotického postižení koronárních tepen. Opakováním tohoto jevu může dojít k srdečnímu selhání, arytmiím, náhlé srdeční smrti, nebo k ireverzibilní fibróze myokardu. Tomuto lze předejít, pokud se zvýší doba hemodialýzy a provádí se chlazení dialyzátu naopak prediktorem této problematiky je velikost nastaveného ultrafiltračního objemu a intradialytická hypotenze. Mnohé studie prokázaly, že riziko vzniku kardiovaskulárního onemocnění je u pacientů léčených hemodialýzou vyšší než u pacientů léčených peritoneální dialýzou (25).

2.7.2 Riziko vzniku kardiovaskulárního onemocnění u pacientů s náhradou funkce ledvin peritoneální dialýzou

U pacientů léčených peritoneální dialýzou nedochází k opakovaným ischemiím tak, jako u pacientů léčených hemodialýzou. Při peritoneální dialýze dochází k delšímu udržení reziduální renální funkce, to přispívá k lepšímu odstraňování fosfátu a vysvětluje to nižší prevalenci kalcifikace chlopní ve srovnání s hemodialýzou. Autoři studií uvádějí, že díky modernizaci peritoneální dialýzy, kdy je kontrolován stav hydratace, nedochází k přetížení cirkulujícím objemem a potažmo k srdečnímu selhání (25).

2.7.3 Hypertrofie levé komory srdeční u pacientů s terminálním renálním selháním

K zmohtnutí levé srdeční komory dochází již v predialyzačním období, faktory přispívajícími k hypertrofii jsou arteriální hypertenze a anémie. U hemodialyzovaných pacientů přispívají k rozvoji hypertrofie i další faktory, zejména chronické zvýšení krevního objemu. Tento nález je u pacientů v terminálním stadiu renálního selhání velmi častý a závažně ovlivňuje jejich kardiovaskulární prognózu. Důležité je dbát na prevenci, kontroluje se zejména krevní tlak a hydratace. Pokud není možné předejít hypertrofii levé srdeční komory, pak se dbá na zahájení časně léčby (24).

2.7.4 Ischemická choroba srdeční u pacientů s terminálním renálním selháním

U dialyzovaných pacientů dochází ke kumulaci řady rizikových faktorů přispívajících k ateroskleróze. Typická je hypertriglyceridemie, kdy dochází k vzestupu koncentrace VLDL-C, IDL-C a malých denzních, vysoce aterogenních, LDL. Další důležité faktory jsou oxidační stres, chronický zánět a poruchy kalciumfosfátového metabolismu. Řada rizikových faktorů je shodná pro dialyzované pacienty a pro pacienty z běžné populace. Tyto rizikové faktory se dělí na dvě skupiny – ovlivnitelné a neovlivnitelné rizikové faktory. Mezi neovlivnitelné patří věk, pohlaví či genetická predispozice a ovlivnitelnými faktory jsou obezita, diabetes mellitus, kouření cigaret, hypertenze a nízká pohybová aktivita (24; 26).

Pacienti s chronickým selháním ledvin mají podobně kalcifikované léze, jako pacienti mající diabetes mellitus. Hlavní rozdíl mezi dialyzovanými pacienty a pacienty s normální renální funkcí není ve velikosti aterosklerotických plátů, ale je v jejich složení. Pacienti mající renální selhání mají větší tloušťku medie, výraznější kalcifikace a užší lumen (24).

Diagnostika ischemické choroby srdeční je u dialyzovaných pacientů mnohem náročnější než u zdravých jedinců. Jedním z hlavních příznaků ischemické choroby srdeční je bolestivost na hrudi, tento příznak však není u dialyzovaných pacientů zcela specifický. Další nespolehlivý příznak je namáhavá dušnost, která může být způsobena anémií či zavodněním pacienta. Běžně užívané laboratorní metody jsou také relativně nespolehlivé. Klidová elektrokardiografie je u dialyzovaných pacientů abnormální i v klidovém režimu, hlavním důvodem jsou iontové změny. Jediná spolehlivá diagnostika k průkazu přítomnosti a závažnosti koronární aterosklerózy je koronarografie (24).

3 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce „Lipidový profil a parametry oxidačního stresu u pacientů s terminálním renálním selháním“ bylo v teoretické části popsat:

- problematiku kardiovaskulárního rizika u pacientů s chronickým poškozením ledvin;
- možnosti náhrady funkce ledvin.

Cílem praktické části předkládané práce bylo:

- stanovit parametry oxidačního stresu a koncentrace lipidů u pacientů s terminálním renálním selháním;
- stanovit parametry oxidačního stresu a koncentrace lipidů u zdravých osob;
- porovnat lipidový profil a parametry oxidačního stresu u pacientů s terminálním renálním selháním se skupinou zdravých osob.

4 METODIKA

4.1 Použité chemikálie a přístrojové vybavení

4.1.1 Přístrojové vybavení

- Laboratorní úprava vody Direct Q 3 UV (Millipore, Česká republika)
- Centrifuga: HERAEUS MEGAFUGE 16R (Thermo Scientific, USA)
- Termostatovaný inkubátor vzorků: TERMOVAP TV 10+ (ECOM, ČR)
- Míchačka: Lab Dancer vario (IKA, Německo)
- Biochemický automatický analyzátor MODULAR (ROCHE, Švýcarsko)
- Biochemický automatický analyzátor IMAGE ANALYZER (Beckman-Coulter, ČR)
- Automatický analyzátor COBAS MIRA PLUS (ROCHE, Švýcarsko)
- Analytické váhy Discovery 2150D, Ohaus Corporation, Švýcarsko
- pH metr PHM 62 (Radiometr Copenhagen, Dánsko)
- Spektrofotometr Helios γ (Thermo Scientific, USA)
- Multikanálový spektrofotometr MULTISKAN SPECTRUM (Thermo Scientific, USA)
- Vodní lázeň s termostatem M5 (MWL, Německo)
- Centrifuga Minispin Plus (Eppendorf AG, Německo)
- Jednorázové UV semimikrokyvety 1,5 – 3,5 ml (Brand, Německo)

4.1.2 Chemikálie a diagnostické soupravy

- Diagnostická souprava CHOD-PAP pro stanovení TC (LABMARK, ČR)
- Diagnostická souprava GPO-PAP pro stanovení TAG (LABMARK, ČR)
- Diagnostická souprava pro přímé stanovení HDL-C (LABMARK, ČR)
- Diagnostická souprava pro stanovení ApoA-I (BECKMAN-COULTER, ČR)
- Oxochrom kyselina močová (Lachema a.s. Brno, ČR)
- GOD-PAP Oxochrom Glukosa (Lachema a.s. Brno, ČR)

- UREA/BUN (ROCHE, Švýcarsko)
- KREA Plus (ROCHE, Švýcarsko)
- SAA ELISA Kit (KHA0011, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Human Apo B-48 ELISA kit (Shibayagi Co., Ltd., Shibukawa, Gunma, Japonsko)
- Human hsCRP ELISA kit (BioVendor, ČR)
- oxLDL ELISA kit (Merckodia, Švédsko)
- Insulin IRMA (Imunotech Praha, ČR)
- NEFA (Randox Labs, Velká Británie)
- Hydragel Lp(a) (Sebia, Francie)
- Chloroform, Chromapur G (CHROMSERVIS, ČR)
- Cyklohexan, Chromapur G (CHROMSERVIS, ČR)
- Metanol, Chromapur G (CHROMSERVIS, ČR)
- Fenylacetát (Sigma, USA)
- Fyziologický roztok (Lachema, ČR)
- Tris(hydroxymethyl) aminomethan, p.a. (TRIS, PENTA, ČR)
- Kyselina chlorovodíková, p.a. (PENTA, ČR)
- Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové dihydrát, p.a. (Na₂EDTA, LACHEMA, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný heptahydrát, p.a. (LACHEMA, ČR)
- Chlorid vápenatý, p.a. (LACHEMA, ČR)
- Heparin Léčiva inj. (50.000UI/l, ZENTIVA, ČR)
- Citronan sodný dihydrát, p. a. (PENTA, ČR)

Stanovení PON1

TRIS – HCl pufr (20mM) pH 8,0 s přídavkem CaCl₂ (1mM)

Mr (TRIS) = 121,14

Mr (CaCl₂) = 147,02

Příprava 250 ml pufru:

Navážíme 0,6058 g TRIS a 0,03675 g CaCl₂ a rozpustíme ve vodě, pomocí 2M HCl upravíme pH na hodnotu 8,0 a doplníme do 250 ml destilovanou vodou. Pufr uchováváme v lednici.

Fenylacetát (100mM) v pufru (startovací roztok)

Mr (fenylacetát) = 136,20

Příprava 2 ml roztoku:

Ve skleněné zkumavce rozpustíme 0,0272 g fenylacetátu v 0,8 ml metanolu a během stálého míchání na třepačce po kapkách přidáme 1,2 ml TRIS pufru. Z důvodu spontánní hydrolyzy substrátu připravujeme roztok pro 4 až 5 analýz. Po nárůstu absorbance blanku (slepého roztoku) o 0,100 připravíme čerstvý startovací roztok. Roztok fenylacetátu je nejstabilnější za laboratorní teploty.

Stanovení KD

Precipitační pufr heparin – citrát (0,064M) pH 5,05

Mr (citronan sodný dihydrát) = 294,05

Příprava 100ml pufru:

Navážíme 1,882 g dihydrátu citronanu sodného a rozpustíme v destilované vodě, přidáme 1 ml heparinu a pomocí 2M HCl upravíme pH na hodnotu 5,05. Doplníme destilovanou vodou do 100 ml pufr uchováváme v lednici.

4.2 Studované skupiny osob

Do studie byli zařazeni pacienti v pravidelném hemodialyzačním programu (HD) spolu se skupinou zdravých, kontrolních jedinců (KON) párovaných na věk a pohlaví. Všechny zúčastněné osoby podepsaly informovaný souhlas s účastí ve studii. Protokol studie byl schválen etickou komisí 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a/nebo etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

4.3 Sběr a příprava vzorků

Sledovaným pacientům byla odebírána krev po minimálně 12 hodinovém lačnění, u dialyzovaných pacientů před dialýzou. Krev byla odebírána z periferní žíly do odběrových zkumavek BD Vacutainer® s přídavkem gelu pro separaci séra (BD SST™ II Advances) a zkumavek BD Vacutainer® EDTA pro separaci plazmy. Zkumavky pro rutinní biochemické analýzy byly ihned odeslány do Centrálních laboratoří Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze. Zkumavky pro další analýzy byly odeslány do Laboratoře pro výzkum aterosklerózy, kde bylo každému vzorku přiděleno anonymní identifikační číslo.

Vzorky krve byly vytemperovány na laboratorní teplotu, sérum i plazma byly od krevních elementů odděleny centrifugací při 3500 RPM a 4 °C po dobu 10 minut. Alikvoty séra a plazmy pro jednotlivé speciální analýzy byly skladovány při -80 °C. Ke vzorkům séra pro stanovení koncentrace konjugovaných dienu (KD) byla v poměru 10:1 přidána Na₂EDTA.

4.4 Stanovení klinických a biochemických parametrů plazmy

Hodnoty krevního tlaku byly u všech probandů měřeny digitálním pažním tonometrem, tělesná hmotnost pro výpočet BMI byla měřena na tělesné váze pro medicínské účely (TANITA DC-430 S MA).

Hladiny vybraných biochemických parametrů byly stanoveny v laboratořích Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze.

4.4.1 Stanovení lipidového profilu

Koncentrace celkového cholesterolu (TC), TAG a HDL-C byly stanoveny na automatickém biochemickém analyzátoru Modular. Hladina TC byla měřena enzymatickou metodou CHOD-PAP, hladina TAG byla stanovena spektrofotometricky enzymatickým kolorimetrickým testem GPO-PAP

a koncentrace HDL-C byla určena přímou homogenní enzymatickou kolorimetrickou reakcí bez precipitace. Koncentrace apolipoproteinů A1 a B100 byly stanoveny nefelometricky pomocí diagnostického setu na proteinovém analyzátoru Image.

Součástí vyšetření byl výpočet odvozených parametrů lipidového profilu. Pro výpočet hladiny LDL-cholesterolu byl použit Friedewaldův vzorec:

$$LDL-C = TC - HDL-C + \frac{TAG}{2,2}$$

kde *LDL-C* je LDL cholesterol [mmol/l]; *TC* celkový cholesterol [mmol/l]; *HDL-C* HDL cholesterol [mmol/l], TAG triacylglyceroly [mmol/l] (27).

Koncentrace cholesterolu non-HDL byla vypočtena ze vztahu:

$$non-HDL = TC - HDL-C$$

kde *non-HDL* je non-HDL cholesterol [mmol/l]; *TC* celkový cholesterol [mmol/l]; *HDL-C* HDL cholesterol [mmol/l].

Index aterogenity (AI) byl vypočten podle vzorce:

$$AI = \frac{TC - HDL-C}{HDL-C}$$

kde *AI* je index aterogenity; *TC* celkový cholesterol [mmol/l]; *HDL-C* HDL cholesterol [mmol/l] (27).

4.4.2 Stanovení ostatních biochemických parametrů

Koncentrace glukózy, močoviny, kreatininu a kyseliny močové byly stanoveny na automatickém biochemickém analyzátoru Modular. Koncentrace kyseliny močové a glukózy byly stanoveny enzymaticko-kolorimetrickými metodami (Oxochrom

kyselina močová, GOD-PAP OxoChrom Glukosa). Fotometrickou metodou Jaffe bez deproteinace byla kineticky stanovena koncentrace kreatininu a hladina močoviny byla stanovena UV metodou s ureázou. Imunoreaktivní inzulin (IRI) byl stanoven RIA metodou s použitím dvojích (monoklonálních) protilátek.

4.5 Stanovení neesterifikovaných mastných kyselin a Lp(a)

Neesterifikované mastné kyseliny (NEFA, non-esterified fatty acids) byly stanoveny enzymaticko-kolorimetrickou metodou na analyzátoru COBAS MIRA Plus. Koncentrace Lp(a) byly stanoveny imunoelektroforeticky na Hydragelu Lp(a).

4.6 Stanovení arylesterázové aktivity paraoxonázy 1

Stanovení arylesterázové aktivity paraoxonázy 1 (PON1) bylo provedeno podle metodiky popsané v publikaci od kolektivu českých autorů (28). Tato metoda využívá jako substrátu ke stanovení PON1 fenylacetát, který rozkládá na fenol a kyselinu octovou a vychází z metody publikované Eckersonem (29).

Do semimikrokyvet bylo napipetováno 900 μl 20mM Tris-HCl pufru s přídavkem 1mM CaCl_2 o pH = 8,0 a dále bylo přidáno 50 μl předem 80x zředěného vzorku séra. Po 5 minutové inkubaci při 25°C byla reakce nastartována přídavkem 50 μl 100mM fenylacetátu. Každý vzorek byl měřen v tripletu proti vlastní slepé. Rychlost tvorby fenolu byla po dobu 2 minut měřena spektrofotometricky při 270nm.

Výsledná aktivita PON1 byla vypočítána pomocí molárního extinkčního koeficientu fenolu ($\epsilon = 1310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a vyjádřena v jednotkách U/ml séra ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$).

4.7 Imunochemická stanovení

Koncentrace sérového amyloidu A, oxidovaných částic LDL, senzitivního C-reaktivního proteinu a apolipoproteinu B48 (apoB48) byly stanoveny sendvičovou heterogenní enzymovou imunoanalýzou ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) s použitím příslušných diagnostických setů Human ELISA Kit.

Nekompetitivní imunoenzymatické metody využívají dvou odlišných protilátek navázaných na různé antigenní determinanty stanovovaného antigenu. První protilátka je v nadbytku (vzhledem k vyšetřovanému antigenu) navázána na pevný nosič (jamku mikrotitrační destičky). Po vytvoření konjugátu navázáním stanovovaného antigenu na imobilizovanou protilátku se do reakce rovněž v nadbytku přidá druhá protilátka, která je značená enzymem. Navázáním druhé protilátky na antigen vzniká sendvičový komplex: navázaná protilátka na pevné fázi – antigen-protilátka značená enzymem.

Postup stanovení koncentrací výše zmíněných analytů metou ELISA je velmi podobný. Probíhá v několika postupných krocích a provádí se na mikrotitračních 96 jamkových destičkách s imobilizovanou protilátkou proti příslušným lidským antigenům. Před vlastní analýzou se většinou vzorky séra nebo plazmy musí několikanásobně naředit a rovněž se musí připravit kalibrační standardy. V prvním kroku se pak na destičku do příslušných jamek v duplikátech pipetují jednotlivé vzorky či standardy. Následně se k nim přidá konjugát, destička se překryje ochrannou fólií a nechá se po předepsanou dobu inkubovat. Po první inkubaci se obsah jamek vyprázdní a destička se několikrát promyje promývacím roztokem. Poté se do jamek destičky obvykle v předepsaném množství pipetuje straptavidin, na který je kovalentní vazbou navázána avidin-peroxidáza. Po další inkubaci se opět vyprázdní obsah jamek a destička se několikrát promyje promývacím roztokem. Poslední fází analýzy je reakce, kdy se do každé jamky

přidá dané množství chromogenu, destička se překryje a nechá se stát na temném místě při pokojové teplotě. Po 30 minutách se reakce ukončí přidáním stop činidla (1M H₂SO₄) a změří se absorbance na multikanálovém spektrofotometru při vlnové délce 450nm.

4.8 Stanovení KD

Jako další marker oxidačního stresu byla u všech pacientů stanovena koncentrace konjugovaných dienu (KD) v precipitovaných částicích LDL. Částice LDL byly ze séra izolovány precipitační metodou dle Ahotupa et al. (30), stanovení koncentrace KD bylo provedeno modifikovanou metodou podle Wielanda (31).

Do skleněných uzavíratelných centrifugačních zkumavek se pipetuje 110 µl séra s přídavkem EDTA (10:1) a dále se přidá 1ml precipitačního pufru heparin – citrát (pH = 5,05). Po uzavření zkumavek šroubovacím víčkem se suspenze protřepe a inkubuje 10 minut v temnu při laboratorní teplotě. Precipitované částice LDL se separují centrifugací (2800 rpm, 10 minut). Supernatant se odstraní odsátím pomocí skleněné stříkačky (např. Hamilton) a ihned se přidá 100 µl fyziologického roztoku, ve kterém se skleněnou tyčinkou rozmíchá sedimentovaná peleta. Pro extrakci lipidů se přidá směs chloroform-metanol (2:1 v/v) a po 10 minutách pravidelného míchání se přidá 250 µl destilované vody. Celá směs se znovu důkladně promíchá a organická fáze se následně oddělí centrifugací (3000 rpm, 5 minut). Po separaci se skleněnou stříkačkou přenesou 800 µl infranatantu do čisté skleněné zkumavky a vysuší pod proudem dusíku při 40°C. Takto připravený vzorek se rozpustí v 300µl cyklohexanu a změří se absorbance vzorků proti cyklohexanu při 234nm. Výsledná koncentrace KD se počítá s využitím molárního extinkčního koeficientu ($\epsilon = 2,95 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a vyjadřuje v jednotkách mmol/l séra.

4.9 Statistické zpracování výsledků

Výsledky parametrických veličin jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Výsledky neparametrických veličin jsou znázorněny jako medián (0,25-0,75 percentil). Normalita je testována prostřednictvím Shapiro-Wilkova W testu. K vyhodnocení, zda se mezi sebou liší hodnoty hemodialyzovaných pacientů od kontrolní skupiny, byl použit dvouvýběrový t-test. Za statisticky významné byly považovány výsledky s hodnotou $p < 0,05$. Pro statistické analýzy byl používán program STATISTICA 12.0 (Stat Soft, ČR).

5 VÝSLEDKY

Do studie bylo celkem zařazeno 40 zdravých, kontrolních osob (KON) a 40 pacientů v pravidelném hemodialyzačním programu (HD). Charakteristiku obou skupin shrnuje Tabulka 3. Mezi oběma skupinami nebyly pozorovány rozdíly ve věku ani tělesném hmotnostním indexu.

Tabulka 2 Základní informace o sledovaných skupinách

	HD	KON
N (M/Ž)	40 (20/20)	40 (20/20)
Věk (roky)	67,84 ± 8,99	64,43 ± 6,15
BMI (kg/m²)	26,56 ± 6,25	24,59 ± 5,28

HD: hemodialyzovaní pacienti; KON: kontrolní skupina; M: muži; Ž: ženy; N: počet osob; BMI: body mass index. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka.

5.1 Biochemické parametry plazmy

Vybrané laboratorní charakteristiky obou sledovaných skupin jsou uvedeny v Tabulce 3. V souladu s diagnózou měli pacienti na hemodialýze oproti kontrolní skupině zdravých osob významně zvýšené hodnoty glukózy, inzulinu, močoviny i kreatininu.

Tabulka 3 Základní biochemické parametry

Parametr	HD	KON
Glukóza (mmol/l)	7,50 ± 2,50***	5,32 ± 0,80
Inzulin (mU/l)	19,20 (10,00-32,00)**	9,17 (6,26-16,42)
Urea (mmol/l)	15,95 ± 5,2***	5,43 ± 1,09
Kreatinin (μmol/l)	592,98 ± 176,48***	77,73 ± 16,31
Kyselina močová (μmol/l)	326,78 ± 56,05	308,35 ± 77,92

*HD: hemodialyzovaní pacienti; KON: kontrolní skupina. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka pro parametrické veličiny nebo jako medián (0,25-0,75 percentil) pro neparametrické veličiny. ** P < 0,01; *** P < 0,001*

5.2 Lipidové parametry

Z lipidových parametrů byly měřeny koncentrace TC, TAG, HDL-C, LDL-C, apo-A1, apo-B100, apo-B48, Lp(a) a NEFA. Pozorované výsledky lipidových parametrů obou skupin shrnuje Tabulka 4.

Oproti kontrolní skupině měli hemodialyzovaní pacienti podle očekávání významně zvýšené hodnoty TAG, apo-B48, Lp(a) a NEFA. Koncentrace TC, HDL-C, LDL-C, non HDL-C, Apo-A1 a apo-B100 byly u skupiny HD naopak významně sníženy.

Tabulka 4 Parametry lipidového profilu

Parametr	HD	KON
TC (mmol/l)	4,46 ± 0,83***	5,65 ± 1,45
TAG (mmol/l)	2,08 (1,48-4,56)***	1,31 (0,85-2,01)
HDL-C (mmol/l)	1,22 ± 0,40**	1,51 ± 0,42
LDL- C (mmol/l)	2,42 ± 0,66***	3,50 ± 1,12
nonHDL-C (mmol/l)	3,24 ± 0,75***	4,14 ± 1,33
AI	2,92 ± 1,19	2,90 ± 1,06
apolipoprotein A-I (g/l)	1,31 ± 0,33**	1,52 ± 0,32
apolipoprotein B-100(g/l)	0,86 ± 0,20***	1,18 ± 0,30
apolipoprotein B-48 (mg/l)	42,55 ± 18,66***	12,95 ± 13,16
Lp (a) (g/l)	35,05 (10,80-67,30)***	0,15 (0,08-0,42)
NEFA (mmol/l)	0,59 (0,49-0,75)**	0,47 (0,30-0,68)

*HD: hemodialyzovaní pacienti; KON: kontrolní skupina; TC: celkový cholesterol; TAG: triacylglyceroly; HDL-C: HDL-cholesterol; LDL-C: LDL-cholesterol; non HDL-C = TC – HDL-C; AI: index aterogenity = (TC-HDL-C)/HDL-C; Lp (a): lipoprotein a; NEFA: neesterifikované mastné kyseliny. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka pro parametrické veličiny nebo jako medián (0,25-0,75 percentil) pro neparametrické veličiny. ** P < 0,01; *** P < 0,001*

5.3 Parametry oxidačního stresu a ukazatele mikrozánětu

Jako markery oxidačního stresu byly sledovány koncentrace oxidativně modifikovaných částic LDL a konjugovaných dienu v precipitovaných LDL.

Sledovanou komponentou antioxidačního systému byla aktivita PON1 a jako marker zánětu byl stanovován hsCRP a SAA. Naměřené hodnoty ukazatelů oxidačního stresu jsou shrnuty v Tabulce 5.

Oproti kontrolní skupině měli pacienti na hemodialýze signifikantně sníženou aktivitu PON1 a významně zvýšené hladiny SAA, hsCRP, oxLDL a KD/LDL. Koncentrace konjugovaných dienu v precipitovaných LDL byla vztažena na množství LDL, a je tedy vyjádřena jako poměr KD/LDL.

Tabulka 5 Parametry oxidačního stresu a ukazatele chronického mikrozánětu

Parametr	HD	KON
KD/LDL (poměr)	25,13 ± 9,06***	18,86 ± 6,34
PON1 (kU/l)	102,78 ± 37,26***	162,08 ± 23,76
oxLDL (U/l)	54,5 (29,3 – 70,8)***	31,7 (17,8 – 55,0)
SAA (µg/ml)	38,05 (14,84-104,69) **	18,74 (11,63-32,67)
hsCRP (mg/l)	7,20 (2,59-12,51)***	2,16 (0,80-4,48)

*HD: hemodialyzovaní pacienti; KON: kontrolní skupina; KD: konjugované dieny; PON1: paraoxonáza-1; oxLDL: oxidované částice LDL; SAA: sérový amyloid A; hsCRP: senzitivní C-reaktivní protein. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka pro parametrické veličiny nebo jako medián (0,25-0,75 percentil) pro neparametrické veličiny. ** P < 0,01; *** P < 0,001*

6 DISKUZE

V současnosti je věnována velká pozornost antioxidačnímu ochrannému systému, jehož nedostatečná činnost může ovlivňovat vznik a intenzitu rozvoje mnohých onemocnění. Do popředí zájmu se tak dostávají nové biochemické parametry, které částečně napomáhají sledovat tento složitý systém. Předkládaná bakalářská práce byla zaměřena na sledování markerů oxidačního stresu spolu s vybranými lipidovými parametry u nefrotických pacientů v pravidelném hemodialyzačním programu.

V souladu s dalšími klinickými studiemi (32; 33) byl u pacientů dlouhodobě léčených pomocí hemodialýzy pozorován nárůst rizikových faktorů kardiovaskulárních chorob ve smyslu zvýšení koncentrace TAG a snížení koncentrací HDL-C, LDL-C, TC. Hypertriacylglycerolémie může souviset se sníženou tolerancí glukózy a s inzulinovou rezistencí, která je u pacientů s renální insuficiencí velice častá (34). Inzulínová rezistence a hypertriacylglycerolémie byla dále asociována se zvýšením sérových koncentrací NEFA. Oproti kontrolní skupině zdravých osob byly u hemodialyzovaných pacientů pozorovány významně zvýšené koncentrace také dalších rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění a to apo-B48 a Lp(a).

Sledovaným antioxidačním enzymem byla PON1, konkrétně její aryylesterázová aktivita. Tento enzym vykazuje ještě další 2 druhy aktivit, ale dřívější studie prokázaly (35; 36), že všechny 3 aktivity spolu navzájem korelují a je tedy dostačující měřit pouze jednu z nich. Pozorovaná snížená aktivita PON1 u hemodialyzovaných pacientů se projevila zvýšením hladin markerů oxidačního stresu, konkrétně ox-LDL a KD v částicích LDL. Současně byly u pacientů na hemodialýze zaznamenány zvýšené koncentrace hsCRP a SAA což ukazuje na chronický mikrozánět.

Ke zvýšenému riziku rozvoje kardiovaskulárních komplikací u pacientů s terminálním renálním selháním přispívají jednak lipidové abnormality, tak i snížené hladiny antioxidantního systému (37). Velmi často sledovaným parametrem hlavně u onemocnění spojených s aterosklerózou je aktivita PON1, která je spojena s HDL a bylo prokázáno, že inhibuje oxidaci LDL (38). Oxidační modifikace LDL hraje klíčovou roli v procesu aterogeneze stejně jako zvýšené koncentrace KD/LDL. Zatímco KD/LDL jsou ukazatelem minimálně oxidativně modifikovaných LDL, jejichž částice mají modifikovanou pouze lipidovou složku, tak ox-LDL představují částice, ve kterých je oxidačně modifikovaná jak lipidová, tak bílkovinná složka (30; 39). Možných mechanismů vedoucích ke snížení aktivity PON1 je několik. Mimo zvýšené oxidační zátěže může být dalším důvodem akutní zánětlivá odpověď organismu a s ní spojená modifikace HDL. Dřívější výzkumy ukázaly, že v průběhu akutní zánětlivé odpovědi organismu dochází k modifikaci struktury HDL, které ztrácí esterifikovaný cholesterol, apoA-1 a též většinu enzymů asociovaných s HDL, včetně PON1, která je nahrazena prostřednictvím SAA. Tyto změny vedou ke ztrátě antioxidantních vlastností HDL (40).

Význam Lp(a) jako samostatného rizikového faktoru kardiovaskulárních onemocnění potvrzují studie z poslední doby (41). Lipoprotein (a) představuje specifickou podtřídu lipoproteinů, ve vysoké koncentraci působí protromboticky a má tak přímý aterogenní účinek. Plazmatická koncentrace Lp(a) je do značné míry geneticky podmíněna a vyznačuje se velkou interindividuální variabilitou. Vysoký aterogenní potenciál mají remnantní chylomikrony, které jsou bohaté na cholesterol a další lipidy. Zvýšené koncentrace apo B-48 jsou asociovány se zvýšenými koncentracemi ox-LDL (42).

7 ZÁVĚR

Výsledky této práce ukazují, že k vaskulárním komplikacím, které běžně postihují nefrologické pacienty, přispívá dyslipidémie a zvýšená oxidační zátěž. Poruchy lipidového metabolismu byly charakterizovány sníženými koncentracemi HDL-C, LDL-C, TC a hypertriglyceridemií. Zvýšená koncentrace TAG vede k tvorbě reaktivních oxidačních produktů lipoperoxidů, které se přímo podílejí na procesu aterogeneze. Ateroskleróza je považována za chronické zánětlivé onemocnění. Jako kritický mechanismus aterosklerózy se ukazuje oxidační stres. Z měřených surogátních markerů oxidačního stresu měli hemodialyzovaní pacienti vyšší koncentrace konjugovaných dienu v LDL (KD/LDL) i vyšší koncentrace ox-LDL. Oxidační stres u těchto pacientů je akcelerován několika faktory, například kontaktem krevních elementů s hemodialyzační membránou, malou antioxidační ochranou či zánětlivými faktory.

Oxidační stres se dále významně uplatňuje v patogenezi poškození funkce ledvin. Může vést ke snížení aktivity PON1 a dále ke zvýšené tvorbě produktů peroxidace. Tyto produkty peroxidace pak mohou sloužit jako markery oxidačního stresu. V této práci získané výsledky potvrdily očekávání, že u hemodialyzovaných pacientů bude aktivita PON1 snížena oproti zdravým osobám. Na takto výrazném snížení aktivity PON1 se však kromě oxidačního stresu do značné míry mohl podílet i chronický mikrozánět.

Uremičtí pacienti na hemodialýze měli výrazně aterogenní lipidový profil, který zvyšuje riziko kardiovaskulárních komplikací a může tak nepříznivě ovlivnit jejich celkovou prognózu. Problematika oxidačního stresu a poruch metabolismu lipidů u pacientů s terminálním selháním ledvin je velmi složitá, heterogenní a vyžaduje komplexní přístup v péči o tyto pacienty.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AI	index aterogenity
BMI	body mass index
DLP	dyslipidémie
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ESRD	terminální renální selhání, end-stage renal disease
HD	skupina pacientů na hemodialýze
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě, high density lipoprotein
HDL-C	HDL cholesterol
hsCRP	senzitivní C-reaktivní protein, high sensitivity C-reactive protein
IDL	lipoproteiny o střední hustotě, intermedial density lipoprotein
IRI	imunoreaktivní inzulin
KD	konjugované dieny
KON	kontrolní skupina pacientů
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě, low density lipoprotein
LDL-C	LDL cholesterol
Lp (a)	lipoprotein (a)
NEFA	neesterifikované mastné kyseliny, nonesterified fatty acids
ox-LDL	oxidované částice LDL
PON1	paraoxonáza 1
SAA	sérový amyloid A, serum amyloid A

TAG	triacylglyceroly
TC	celkový cholesterol, total cholesterol
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě, very low density lipoprotein
VLDL-C	VLDL cholesterol

9 BIBLIOGRAFIE

- (1) DE LOMOS, JA a LD HILLIS. Diagnosis and management of coronary artery disease in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* [online]. 1996, 7(10), 2044-2054 [cit. 2019-05-09]. ISSN 1533-3450. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/612/>
- (2) KASISKE, Bertram L. Hyperlipidemia in patients with chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* [online]. 1998, 32(5), 142-156 [cit. 2019-05-09]. ISSN 1523-6838. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/02726386>
- (3) ŠTĚPÁNKOVÁ, S., S. ŠUREL a J. ŘEHOŘOVÁ. Chronická renální insuficience společným pohledem praktického lékaře a nefrologa. *Med. praxi. b.r.*, 5(3), 98-100. ISSN 1803-5310.
- (4) VOSTÁLOVÁ, J., A. GALANDÁKOVÁ, P. ŠTREBL a J. ZADRAŽIL. Oxidační stres u pacientů s náhradou funkce ledvin hemodialýzou a peritoneální dialýzou. *ISSN 0042-773X: Vnitřní lékařství*. 2012, 58(6), 466-472. ISSN 0042-773X.
- (5) MALYSZKO, Jolanta, Jacek S MALYSZKO a Hanna BACHORZEWSKA-GAJEWSKA. Cardiovascular risk in chronic renal disease and transplantation prevention and management. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* [online]. 2005, 6(6), 929-943 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1517/14656566.6.6.929. ISSN 1465-6566. Dostup z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14656566.6.6.929>
- (6) DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-

247-3240-4.

- (7) RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie. 2., přeprac. vyd.* Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.
- (8) Porozumět dialýze. *Dialyza.cz* [online]. Praha: FlashHealth, 2015 [cit. 2019-01-08]. Dostupné z: <https://www.dialyza.cz/cs/porozumet/>
- (9) Transplantace ledviny. *Ledviny.cz* [online]. Praha: MUDr. Roman Kantor, b.r. [cit. 2019-01-12]. Dostupné z: <http://www.ledviny.cz/transplantace-ledviny>
- (10) KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Vydání první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.
- (11) Biochemie. *Institut Galenus* [online]. 2008-2019 [cit. 2019-01-12]. Dostupné z: <https://www.galenus.cz/clanky/biochemie>
- (12) SOŠKA, Vladimír. *Poruchy metabolismu lipidů: diagnostika a léčba*. 1. vyd. Praha: Grada, 2001. Malá monografie (Grada). ISBN 80-247-0234-7.
- (13) FRANEKOVÁ, J., B. FRIEDECKÝ, A. JABOR, V. PALIČKA, F. STOŽICKÝ a V. SOŠKA. Referenční meze, optimální a cílové hodnoty v kontextu klinického hodnocení lipidového profilu. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2006, **14**(4), 207-210. ISSN 2570-9402.
- (14) Lipoprotein (a) v séru. https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_02389-L0000006.htm [online]. Praha: ARSY, 2015-2019 [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_02389-L0000006.htm

- (15) ŽÁK, Aleš a Jaroslav MACÁŠEK. *Ateroskleróza: nové pohledy*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3052-3.
- (16) MIKOLASEVIC, Ivana, Marta ŽUTELIJA, Vojko MAVRINAC a Lidija ORLIC. Dyslipidemia in patients with chronic kidney disease: etiology and management. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease* [online]. 2017, **10**, 35-45 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.2147/IJNRD.S101808. ISSN 1178-7058. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/dyslipidemia-in-patients-with-chronic-kidney-disease-etiology-and-man-peer-reviewed-article-IJNRD>
- (17) KAMATH, DeepakY, Denis XAVIER, Alben SIGAMANI a Prem PAIS. High sensitivity C-reactive protein (hsCRP) & cardiovascular disease: An Indian perspective. *Indian Journal of Medical Research* [online]. 2015, **142**(3) [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.4103/0971-5916.166582. ISSN 0971-5916. Dostupné z: <http://www.ijmr.org.in/text.asp?2015/142/3/261/166582>
- (18) Sérový amyloid A. *Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy* [online]. Praha, 2006-2019 [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/seznam-lab-vysetreni?vysetreni=2323>
- (19) FLEKAČ, M., J. ŠKRHA a Z. NOVOTNÝ. Faktory ovlivňující aktivitu a koncentraci antioxidantního enzymu paraoxonáza 1. *Klin. Biochem. Metab.* [online]. 2006, **14**(35), 33-39 [cit. 2019-05-10]. ISSN 2570-9402. Dostupné z: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0601-33.pdf>
- (20) RACEK, Jaroslav. Oxidované LDL a ateroskleróza. *Labor aktuell* [online]. 2010, **9**(3), 12-15 [cit. 2019-05-10]. ISSN 1214-7672.

- (21) HODKOVÁ, Magdaléna. *Oxidační stres, mikrozáněť a kardiovaskulární riziko u pacientů s chronickým onemocněním ledvin*. Praha, 2006. Disertační práce. 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí práce Doc. MUDr. Marta Kalousová, PhD.
- (22) RACEK, Jaroslav. *Oxidační stres a jeho ovlivnění*. 1. vyd. Praha: Galén, 2003. Repetitorium. ISBN 80-7262-231-5.
- (23) VOSTÁLOVÁ, J., A. GALANDÁKOVÁ, P. ŠTREBL a J. ZADRAŽIL. Oxidační stres u pacientů po transplantaci ledviny. *Vnitřní lékařství*. 2013, **59**(4), 296-300. ISSN 0042-773X.
- (24) TESAŘ, V. Kardiovaskulární rizikové faktory u chronického selhání ledvin. *Kardiol Rev Int Med*. 2009, **11**(3), 111-116. ISSN 2336-2898.
- (25) OPATRNÁ, Sylvie. Porovnání rizika nově vzniklého srdečně-cévního onemocnění u pacientů v terminálním stadiu renálního selhání léčených hemodialýzou a peritoneální dialýzou. *Postgraduální nefrologie*. 2016, **14**(3), 12-14. ISSN 1214-178X.
- (26) ČEŠKA, Richard. *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*. Vyd. 4., V Tritonu 2. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-599-2.
- (27) BERÁNEK, Martin a Miloš TICHÝ. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program Zdravotnická bioanalytika*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2186-9.
- (28) KODYDKOVÁ, Jana, Lucie VÁVROVÁ, Miroslav ZEMAN, Roman JIRÁK, Jaroslav MACÁŠEK, Barbora STAŇKOVÁ, Eva TVRZICKÁ a Aleš ŽÁK. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women.

- Clinical Biochemistry* [online]. 2009, **42**(13-14), 1368-1374 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2009.06.006. ISSN 00099120. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912009002574>
- (29) ECKERSON, H.W. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet.* [online]. 1983, **35**(6), 1126-1138 [cit. 2019-05-09]. ISSN 1537-6605. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00029297>
- (30) AHOTUPA, M. Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. *Clin Biochem.* [online]. 1996, **29**(2), 139-144 [cit. 2019-05-09]. ISSN 1873-2933. Dostupné z: <http://sciencedirect.com/science/journal/00099120>
- (31) WIELAND, H. a D. SEIDEL. A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins. *J Lipid Res* [online]. 1983, **24**(7), 904-909 [cit. 2019-05-09]. ISSN 1539-7262. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/568/>
- (32) HOKANSON, J.E. a M.A. AUSTIN. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high density lipoprotein cholesterol levels: a meta-analysis of population based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* [online]. 1996, **3**(2), 213-219 [cit. 2019-05-09]. ISSN 1350-6277. Dostupné z: <http://cpr.sagepub.com/>
- (33) ATTMAN, Per-Ola a Petar ALAUPOVIC. Lipid and Apolipoprotein Profiles of Uremic Dyslipoproteinemia -Relation to Renal Function and Dialysis. *Nephron* [online]. 2004, **57**(4), 401-410 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1159/000186303. ISSN 1660-8151. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/186303>

- (34) OZSOY, Riza C, Sander I VAN LEUVEN, John JP KASTELEIN, Lambertus ARISZ a Marion G KOOPMAN. The dyslipidemia of chronic renal disease: effects of statin therapy. *Current Opinion in Lipidology* [online]. 2006, **17**(6), 659-666 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1097/MOL.0b013e328010a87d. ISSN 0957-9672. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00041433-200612000-00009>
- (35) KODYDKOVA, Jana, Lucie VAVROVA, Barbora STANKOVA, Jaroslav MACASEK, Tomas KRECHLER a Ales ZAK. Antioxidant Status and Oxidative Stress Markers in Pancreatic Cancer and Chronic Pancreatitis. *Pancreas* [online]. 2013, **42**(4), 614-621 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1097/MPA.0b013e318288360a. ISSN 0885-3177. Dostupné z: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00006676-201305000-00009>
- (36) NOVAK, Frantisek, Lucie VAVROVA, Jana KODYDKOVA, Frantisek NOVAK, Magdalena HYNKOVA, Ales ZAK a Olga NOVAKOVA. Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis. *Clinical and Experimental Medicine* [online]. 2010, **10**(1), 21-25 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1007/s10238-009-0059-8. ISSN 1591-8890. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10238-009-0059-8>
- (37) MARTÍN-GALLÁN, P., A. CARRASCOSA, M. GUSSINYÉ a C. DOMÍNGUEZ. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med.* [online]. 2003, **34**(12), 1563-1574 [cit. 2019-05-09]. ISSN 1873-4596. Dostupné z: <http://sciencedirect.com/science/journal/08915849>
- (38) AVIRAM, M, M ROSENBLAT, C L BISGAIER, R S NEWTON, S L PRIMO-PARMO a B N LA DU. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein

- oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1998, **101**(8), 1581-1590 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1172/JCI1649. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/1649>
- (39) ESTERBAUER, H., J. GEBICKI, H. PUHL a G. JÜRGENS. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* [online]. b.r. [cit. 2019-05-06]. ISSN 1873-4596. Dostupné z: <http://sciencedirect.com/science/journal/08915849>
- (40) VAN LEEUWEN, Henk J., Eric C. J. M. HEEZIUS, Geesje M. DALLINGA, Jos A. G. VAN STRIJP, Jan VERHOEF a Kok P. M. VAN KESSEL. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine* [online]. 2003, **31**(5), 1359-1366 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1097/01.CCM.0000059724.08290.51. ISSN 0090-3493. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003246-200305000-00010>
- (41) NORDESTGAARD, Børge G., M. John CHAPMAN, Kausik RAY et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *European Heart Journal* [online]. 2010, **31**(23), 2844-2853 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq386. ISSN 0195-668X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehq386>
- (42) MORI, Kenta, Tatsuro ISHIDA, Tomoyuki YASUDA et al. Fasting serum concentration of apolipoprotein B48 represents residual risks in patients with new-onset and chronic coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2013, **421**, 51-56 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1016/j.cca.2013.02.005. ISSN 00098981. Dostupné z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898113000491>

10 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Referenční rozmezí parametrů lipidového profilu	21
Tabulka 2 Základní informace o sledovaných skupinách	39
Tabulka 3 Základní biochemické parametry.....	39-40
Tabulka 4 Parametry lipidového profilu	40-41
Tabulka 5 Parametry oxidačního stresu a ukazatele chronického mikrozánětu	42