

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**STANOVENÍ SPEKTRA MASTNÝCH KYSELIN U PACIENTŮ
PODSTUPUJÍCÍCH LÉČBU TAXANY**

Hradec Králové, 2018

Bc. Barbora Kuřiková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

datum

podpis

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce, paní Mgr. Monice Kuchařové, Ph.D., za její ochotu, vstřícnost, odborné vedení a čas, který mi věnovala.

Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Radomírovi Hyšplerovi, Ph.D., RNDr. Mgr. Aleně Tiché, Ph.D. a kolektivu z Výzkumné laboratoře III. interní gerontometabolické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové za poskytnutí biologického materiálu, klinických dat a pomoc při analýze vzorků.

A v neposlední řadě děkuji své rodině a manželovi za podporu, nejen během psaní diplomové práce, ale i během celého studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Autor diplomové práce: Bc. Barbora Kuříková

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Monika Kuchařová, Ph.D.

Konzultant: prof. MUDr. Zdeněk Zádák, CSc.

Název diplomové práce: Stanovení spektra mastných kyselin u pacientů podstupujících léčbu taxany

Diplomová práce se zabývá stanovením spektra mastných kyselin v erythrocytech u pacientů, kteří podstoupili léčbu taxany.

Teoretická část se věnuje obecným vlastnostem mastných kyselin, jejich syntéze a degradaci. Dále je zaměřena na téma rakoviny prsu, na problematiku léčby za pomoci taxanů a na negativní účinky spojené s použitím taxanů, především polyneuropatii. Popisuje se zde i plynová chromatografie, která se v běžné praxi ke stanovení mastných kyselin využívá.

Experimentální část je rozdělena na tři části. První část obsahuje popis pracovního postupu, chromatografické analýzy a vyhodnocení této analýzy. V druhé části porovnává spektra mastných kyselin u pacientů bez a s vyvinutou polyneuropatií. A v části poslední porovnává spektra mastných kyselin před začátkem léčby taxany, po podání a přibližně měsíc po podání taxanů. Výsledky experimentální části jsou zhodnoceny na konci práce.

Klíčová slova: taxany, polyneuropatie, esenciální mastné kyseliny, omega-3 a omega-6 mastné kyseliny, polynenasycené mastné kyseliny

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Author of Diploma Thesis: Bc. Barbora Kuříková

Supervisor of Diploma Thesis: Mgr. Monika Kuchařová, Ph.D.

Consultant: prof. MUDr. Zdeněk Zádák, CSc.

Title of Diploma Thesis: Determination of the fatty acids spectrum in patients undergoing treatment with taxanes

The diploma thesis deals with the determination of fatty acids spectrum in erythrocytes in patients treated with taxanes.

The theoretical part describes general features of fatty acids, their synthesis and degradation. Then it is focused on the topic of breast cancer, taxane treatment and negative side effects associated with taxane treatment, especially polyneuropathy. The gas chromatography, which is commonly used in practice, is also described in this part.

The experimental part is divided into three parts. The first part describes working process, chromatographic analysis and evaluation of this analysis. In the second part there is comparing of spectrum of fatty acids of patients without and with polyneuropathy. And in the last part there is a comparing of spectrum of fatty acids of patients before taxane treatment, closely after treatment and about month after the treatment. Results of the experimental part are evaluated at the end of the thesis.

Key words: taxanes, polyneuropathy, essential fatty acids, omega-3 and omega-6 fatty acids, polyunsaturated fatty acids

OBSAH

1.	ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	8
2.	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	MASTNÉ KYSELINY	9
2.1.1	KATABOLISMUS MASTNÝCH KYSELIN	11
2.1.2	SYNTÉZA MASTNÝCH KYSELIN	14
2.1.3	METABOLISMUS MASTNÝCH KYSELIN	16
2.1.4	NASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY (<i>Saturated fatty acids, SFA</i>)	17
2.1.5	NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY (<i>Unsaturated fatty acids</i>)	18
2.1.6	ESENCIÁLNÍ MASTNÉ KYSELINY (<i>Essential fatty acids, EFA</i>)	18
2.1.7	NEESENCIÁLNÍ MASTNÉ KYSELINY (<i>Non-essential fatty acids, NEFA</i>).....	22
2.2	RAKOVINA PRSU	22
2.3	TAXANY	27
2.3.1	MECHANISMUS ÚČINKU TAXANŮ.....	30
2.4	DOXORUBICIN	33
2.5	CIPN (<i>Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy</i>).....	34
2.6	PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE S PLAMENO-IONIZAČNÍ DETEKČÍ (<i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detector, GC-FID</i>).....	37
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	41
3.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ, POMŮCKY A CHEMIKÁLIE.....	41
3.2	POUŽITÝ BIOLOGICKÝ MATERIÁL	41
3.3	PRACOVNÍ POSTUP	45
3.4	CHROMATOGRFICKÁ ANALÝZA.....	45
3.5	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT	47
4.	VÝSLEDKY.....	48
4.1	ZMĚNY V HLADINÁCH MASTNÝCH KYSELIN A JEJICH SKUPIN PO LÉČBĚ DOXORUBICINEM V SOUVISLOSTI S VÝSKYTEM POLYNEUROPATIE.....	50
4.2	VARIABILITA V ZASTOUPENÍ SLEDOVANÝCH MASTNÝCH KYSELIN V PRŮBĚHU CHEMOTERAPIE TAXANY V SOUVISLOSTI S VÝSKYTEM POLYNEUROPATIE.....	52
5.	DISKUZE	61

6. ZÁVĚR	64
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	65
SEZNAM GRAFŮ	69
SEZNAM OBRÁZKŮ	71
SEZNAM TABULEK	72
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	73

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Rakovina prsu patří mezi nejčastější nádorová onemocnění u žen v České republice. Ve většině případů jsou tímto onemocněním postiženy ženy, ale může se vyskytnout i u mužů. Na vzniku se podílí genetické, environmentální a hormonální faktory. Základním znakem rakovinného bujení je abnormální rychlost dělení buněk a jejich růstu. Proto je nejdůležitější diagnostikovat toto onemocnění včas. V počátečních stádiích je šance na přežití procentuálně vyšší než při pozdních stádiích s již vzniklými metastazemi. Léčba rakoviny prsu je různorodá, od chirurgických zákroků, přes ozařování, imunoterapii, hormonální terapii až k chemoterapii.

Tato diplomová práce se zabývá taxany, které patří mezi nejvíce používaná cytostatika v léčbě karcinomu prsu, sleduje jejich mechanismus účinku a nežádoucí vlivy. Taxany jsou antimikrotubulární látky, které se používají k léčbě nádorových onemocnění. Hlavními dvěma zástupci jsou paklitaxel a docetaxel. Obě léčiva bývají často kombinována s cytotoxickým antracyklinovým antibiotikem, doxorubicinem. Jak taxany, tak i doxorubicin má velké množství nežádoucích účinků, které jsou zmíněny v textu práce. Jednomu z nich, polyneuropatii, je v práci věnována samostatná kapitola.

Cílem této diplomové práce bylo zaprvé, stanovit zastoupení polynenasycených mastných kyselin v krvi (erytrocytech) pacientů podstupujících léčbu doxorubicinem a taxany, stanovená spektra mastných kyselin porovnat a pokusit se zjistit, zda se zastoupení mastných kyselin liší u pacientů s vyvinutou polyneuropatií od pacientů bez polyneuropatie. A za druhé, porovnat získaná spektra mastných kyselin a zjistit zda v průběhu chemoterapie došlo nebo nedošlo ke změně v zastoupení jednotlivých mastných kyselin.

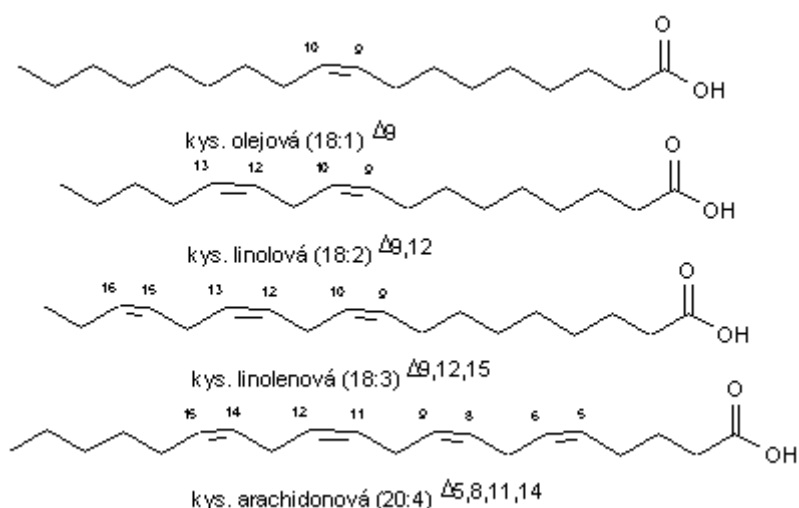
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 MASTNÉ KYSELINY

Mastné kyseliny jsou nedílnou součástí lipidů, které tvoří skupinu různorodých látek biologického původu. Jednou ze základních vlastností lipidů je jejich schopnost rozpouštět se v organických rozpouštědlech a špatná nebo žádná rozpustnost ve vodě daná nedostatkem polarizujících atomů (kyslík, dusík, síra,..). Biologický význam lipidů je zásadní, jsou zdrojem energie pro lidský organismus, jsou stavebními prvky biologických membrán a zároveň slouží jako tepelné a elektrické izolanty. Mají signální funkci, slouží jako kofaktory enzymatických reakcí, hormony či mediátory. Lipidy plní nepřeberné množství funkcí a pro lidský či jiný organismus jsou nepostradatelné. Přehled vybraných mastných kyselin je uveden v tabulce č. 1. [1,2]

Mastné kyseliny řadíme do skupiny nehydrolyzovatelných lipidů. Jsou stavebními součástmi mnohých lipidů. Mastné kyseliny po průniku do buňky mohou být buď zaktivovány v cytosolu a syntetizovat tak lipidy nebo podlehnout β -oxidaci v mitochondriích. [1,2]

Přirozeně se vyskytující mastné kyseliny v tucích a lipidech jsou karboxylové kyseliny s nerozvětveným uhlovodíkovým řetězcem o délce 3-24 uhlíků. Strukturní vzorce tří vybraných mastných kyselin jsou zobrazeny na obrázku č. 1. [1]



Obrázek č. 1: Strukturní vzorce kyseliny olejové, linolové a linolenové

Zdroj: http://orion.chemi.muni.cz/zakladni_pojmy_z_biochemie/mastky1.gif

Téměř všechny mastné kyseliny podléhají esterifikaci alkoholy. Malé množství z nich však zůstává neesterifikováno a označují se jako volné mastné kyseliny. Vyskytují se například v krvi, kde se váží na bílkoviny, kvůli jejich amfipatické povaze.
[1]

Mastné kyseliny můžeme rozdělit do několika skupin, dle různých kritérií.

Podle délky řetězce:

- a) mastné kyseliny s krátkým řetězcem ($\leq C_6$)
- b) mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (C_8-C_{12})
- c) mastné kyseliny s dlouhým řetězcem ($C_{14}-C_{18}$)
- d) mastné kyselina s velmi dlouhým řetězcem ($\geq C_{20}$)

Podle rozvětvení řetězce:

- a) jednoduché
- b) rozvětvené

Podle přítomnosti/nepřítomnosti dvojně vazby:

- a) nasycené mastné kyseliny (SFA = saturated fatty acids)
- b) nenasycené mastné kyseliny
 - mononenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (MUFA = monounsaturated fatty acids)
 - polynenasycené mastné kyseliny s dvěma a více dvojnými vazbami (PUFA = polyunsaturated fatty acids)

Podle původu:

- a) esenciální – nutno přijímat potravou
- b) neesenciální – organismus je schopný jejich syntézy [1,3]

triviální název kyseliny	systematický název kyseliny	počet atomů C	počet dvojných vazeb	pozice dvojných vazeb	série
laurová	dodekanová	12	0	-	SFA
myristová	tetradekanová	14	0	-	SFA
palmitová	hexadekanová	16	0	-	SFA
palmitolejová	cis-9-hexadecenová	16	1	9	ω -7 MUFA
stearová	oktadekanová	18	0	-	SFA
olejová	cis-9-oktadecenová	18	1	9	ω -9 MUFA
linolová	cis-9,12-oktadekadienová	18	2	9,12	ω -6 PUFA
γ -linolenová	cis-6,9,12-oktadekatrienová	18	3	6,9,12	ω -6 PUFA
α -linolenová	cis-9,12,15-oktadekatrienová	18	3	9,12,15	ω -3 PUFA
dihomo- γ -linolenová	cis-8,11,14-eikosatrienová	20	3	8,11,14	ω -6 PUFA
arachidonová	cis-5,8,11,14-eikosatetraenová	20	4	5,8,11,14	ω -6 PUFA
tímnodonová	cis-8,8,11,14,17-eikosapentaenová	20	5	5,8,11,14,17	ω -6 PUFA
cervonová	cis-4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová	22	6	4,7,10,13,16,19	ω -3 PUFA

Tabulka č. 1: Přehled vybraných mastných kyselin

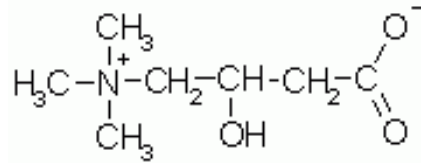
Zdroj: vlastní zpracování dle [1], [4]

2.1.1 KATABOLISMUS MASTNÝCH KYSELIN

V případě nedostatku energie v organismu dochází k trávení nebo štěpení vlastního tuku a tím k uvolnění vyšších mastných kyselin, které jsou nejvydatnějším zdrojem energie. Ve své struktuře obsahují procentuálně nejvyšší obsah spalitelného vodíku. K degradaci mastných kyselin do délky 16 uhlíků dochází v matrix mitochondrií. Tento proces se nazývá β -oxidace, podle toho, že k oxidaci dochází na β -uhlíku (CH_2 skupina na acylovém zbytku na pozici C_3) mastné kyseliny. U řetězců o 18ti a více uhlících dochází nejprve ke zkrácení dlouhých acylů v peroxisomech, a až potom jsou přesunuty do mitochondrií. Proces je aerobní, neboť je vázán na chod dýchacího řetězce. Do dýchacího řetězce totiž vstupují redukované koenzymy, které vznikají β -oxidací. [1,2]

Mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem mohou přecházet do matrix mitochondrií pomocí monokarboxylátového přenašeče a aktivovat se tam na acyl-CoA (acyl-koenzym A), zatímco mastné kyseliny s řetězcem delším než 12 uhlíků nejsou schopny přecházet přes vnitřní membránu samovolně a musí být aktivovány již na vnější mitochondriální membráně. Aktivace probíhá za účasti ATP (adenosintrifosfát) dependentního enzymu *acyl-CoA-syntetázy*. Součástí vnitřní membrány je karnitin, který zde slouží jako přenašeč acylových zbytků. Karnitin (obrázek č. 2) je

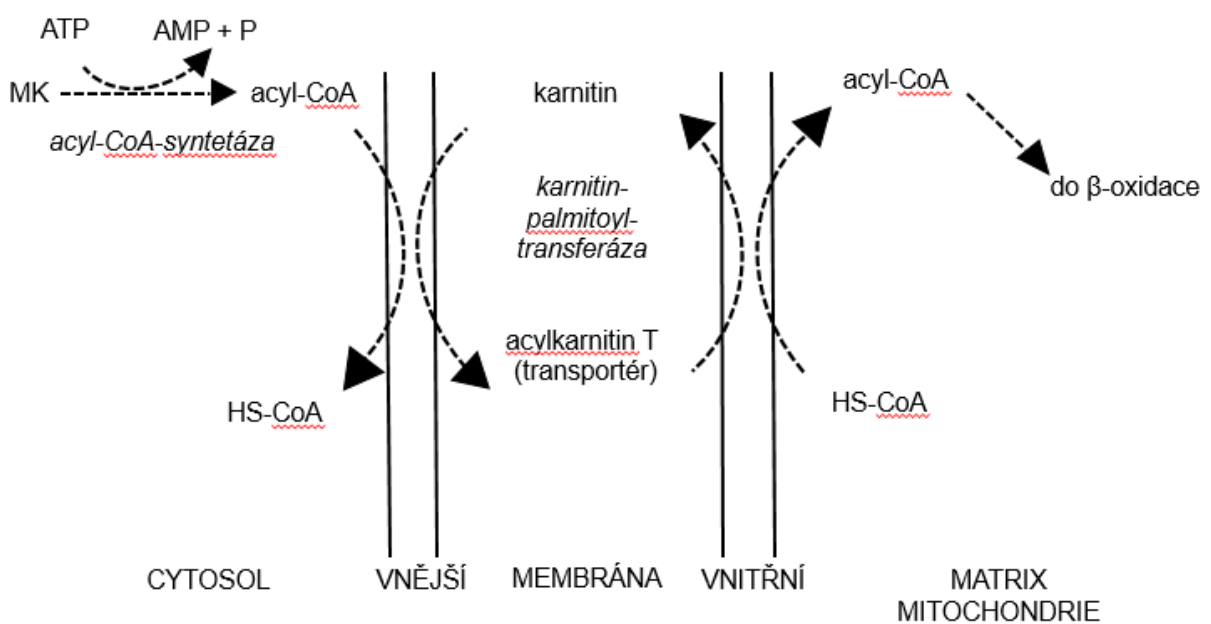
hydroxykyselina podobající se cholinu. Do organismu se dostává z potravy nebo je syntetizován z lysinu a aktivovaného methioninu. [1,2,3,5]



Obrázek č. 2: Vzorec karnitinu (β -hydroxy- γ -trimethylamoniumbutyrát)

Zdroj: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/karnitin.html

Principem přestupu přes membránu je přenos acylu z acyl-CoA na OH skupinu karnitinu pomocí specifických *karnitin-palmitoyltransferáz I a II*, za vzniku acylkarnitinu. Ten se za pomoci transportního proteinu penetruje do matrix a uvolněný karnitin jde opačným směrem. Hovoří se o acylkarnitin-karnitinovém antiportu. Acylový zbytek se naváže na řetězec koenzymu A z mitochondriální rezervy a stává se opět acyl-CoA, ale nyní mitochondriálním. Zjednodušené schéma je uvedeno níže na obrázku č. 3. [1,2,3]



Obrázek č. 3: Transport acyl-CoA přes membránu do matrix mitochondrie

Zdroj: vlastní zpracování dle literárního zdroje [3]

β -oxidace probíhá jako sled opakujících se reakcí, jimiž se uhlíkový řetězec neustále zkracuje, pokaždé o 2 uhlíky, které skončí jako acetyl-CoA. U β -oxidace rozlišujeme čtyři časové fáze. Jako první probíhá dehydrogenace nasyceného acyl-CoA za účasti *acyl-CoA-dehydrogenázy*, která využívá svůj FAD (flavinadenindinukleotid) pro přijetí vodíků. Druhou reakcí je hydratace vzniklého nenasyceného acyl-CoA za účasti *enoyl-CoA-hydratázy* za vzniku β -hydroxyacyl-CoA. Třetí reakcí je opět dehydrogenace, za účasti enzymu *β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenázy*, která však využívá NAD^+ (nikotinamidadenindinukleotid) pro přijetí vodíků. Poslední a komplikovanější reakcí je thiolýza vzniklého β -oxoacyl-CoA. *Thiolasa* lyzuje oxoacyl, do kterého vstoupí nová molekula CoA, která odštěpí dva uhlíky za vzniku acetyl-CoA a zbyde nasycený acyl kratší o dva uhlíky. U vzniklého acyl-CoA dochází opět k β -oxidaci. [1,2]

Rychlost reakce β -oxidace je závislá na dostupnosti neesterifikovaných mastných kyselin a karnitinu, na aktivitě zmíněných enzymů, rychlosti odstraňování acyl-CoA citrátovým cyklem, na přítomnosti kyslíku a hormonů. Například insulin reakci inhibuje, protože mastné kyseliny využívá pro tvorbu triacylglycerolů a naopak glukagon či adrenalin reakci iniciují. [2]

Energetický zisk z β -oxidace je velký, například z 1 molu palmitové kyseliny vznikne 106 molů ATP, což je asi 5 470 kJ. Proto jsou tuky tak ideálním zdrojem energie. [1,2,3]

Degradace nenasycených mastných kyselin je trochu odlišná od klasické β -oxidace. V druhé reakci β -oxidace vzniká v acylu dvojná vazba v *trans* pozici, na rozdíl od pro nenasycené mastné kyseliny klasické *cis* vazby v pozici 9 nebo 12. Aby mohla reakce dále pokračovat, je nutné, aby se *cis* izomer převedl na *trans* izomer. K tomu slouží specifická *izomeráza*. Poté pokračuje běžná β -oxidace a to do té doby než opět narazí na dvojnou vazbu v pozici *cis*. [1,2,5]

Odlišná je i oxidace mastných kyselin s lichým počtem uhlíků. První tři fáze jsou stejné, ale v té poslední dochází ke vzniku propionyl-CoA, namísto acetyl-CoA. Tato aktivovaná C_3 karboxylová kyselina se přeměňuje na sukcinyl-CoA, který je součástí citrátového cyklu a poskytuje glukosu. [1,2,5]

Při degradaci může dojít ještě k jednomu problému. U polynenasycených mastných kyselin vzniká, v jednom z mezistupňů, D-izomer β -hydroxyacyl-CoA, který musí být enzymem *epimerázou* přeměněn na L-izomer, aby mohl podlehnout dehydrogenaci. [2]

2.1.2 SYNTÉZA MASTNÝCH KYSELIN

Pokud organismus přijímá nadbytek energie potravou, začnou se syntetizovat mastné kyseliny. Syntéza mastných kyselin je v podstatě opakem jejich degradace. Ale oba procesy se od sebe musí něčím lišit, aby vše fungovalo, jak má. Konečným produktem degradace je již zmíněný acetyl-CoA, který v syntéze slouží jako látka výchozí. Acetylový zbytek se v cyklické reakci několikrát prodlouží, až vznikne nasycená kyselina o 16 uhlících, kyselina palmitová, která se následně může přeměnit na další mastné kyseliny. [1,2]

A nalezneme zde i několik dalších rozdílů. První z nich je rozdíl v buněčné lokalizaci, syntéza probíhá v cytosolu většiny buněk. Nejvíce však v játrech, ledvinách, mozku, plicích, mléčné žláze a tukové tkáni. Dále enzymy a koenzymy katalyzující reakci jsou odlišné a jsou spojeny do multifunkčního enzymu. Dárcem vodíků je zde, na rozdíl od degradace, NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát). A během reakce se intermediáty neváží na CoA, ale na SH-skupinu ACP (*acyl carrier protein*). ACP neboli protein nesoucí acyly, je univerzální a vysoce konzervativní protein. [1,2,3,6]

ACP se uplatňuje hned v prvním kroku syntézy mastných kyselin, kde je na něj za pomoci *transacylázy* převeden jeden z kondenzujících se acetylů a vzniká acetyl-ACP. Z druhého acetyl-CoA, který do reakce vstupuje, se karboxylací, katalyzovanou *acetyl-CoA-karboxylázou*, stává malonyl-CoA. Karboxylace je závislá na ATP a enzym *karboxyláza* je ovlivňován insulinem, citrátem a palmitoyl-CoA. Acetyl z acetyl-CoA se odštěpí a je přesunut na periferní SH-skupinu cysteinu, který je obsažen v multifunkčním enzymu *syntáze*. A na volnou SH-skupinu ACP (centrální 4'-fosfopantetheinovou skupinu) se naváže malonylový zbytek. Vazba na SH-skupiny je zajištěna *thioesterovou vazbou*. [1,2]

Enzymový aparát *syntáza mastných kyselin* katalyzuje kompletní syntézu vyšších mastných kyselin. Nachází se v cytosolu, je vícefunkční a aktivní pouze ve formě

dimeru (dva identické peptidové řetězce ve tvaru X), což zajišťuje snazší koordinaci syntézy, plynulost, vyšší stabilitu a zabránění vedlejším reakcím. [1,2]

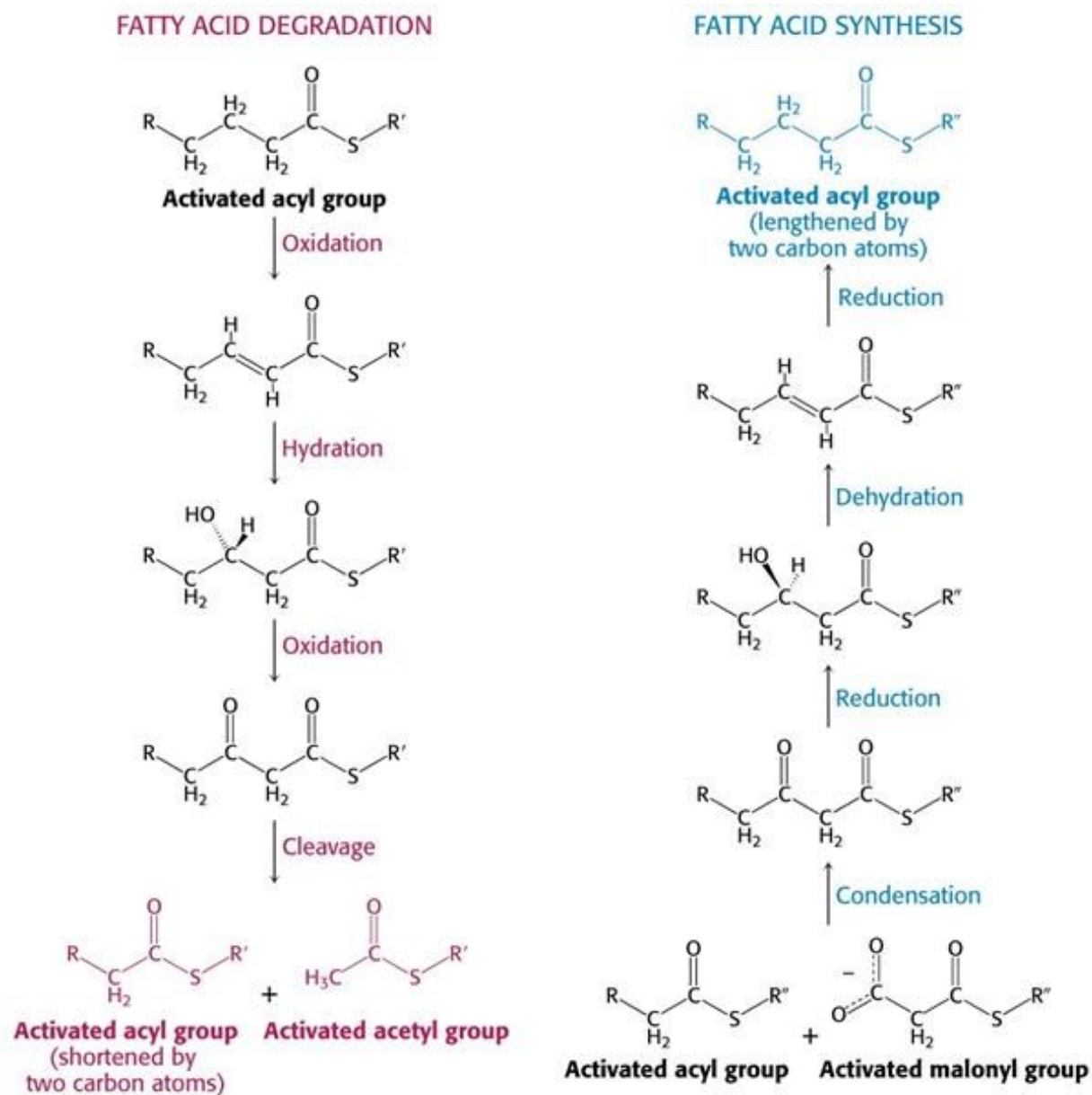
Druhým krokem je kondenzace, kde dochází ke sloučení malonyl-ACP a acetyl-ACP na acetoacetyl-ACP, za účasti *kondenzačního enzymu*. Nyní již následuje sled reakcí opačných k β -oxidaci. Acetoacetyl-ACP je hydrogenací přeměněn na 3-hydroxybutyryl-ACP, z něhož dehydratací vzniká krotonyl-ACP. Ten je opět hydrogenací přeměněn na butyryl-ACP, který kondenzuje s malonyl-ACP. Po dekarboxylaci se tak syntetizuje β -oxokyselina, která znovu vstoupí do tohoto sledu reakcí a ten probíhá tak dlouho než vznikne řetězec palmitátu o 16 uhlících. Zdrojem vodíků pro syntézu je NADPH+H⁺, jehož dodavatelem jsou reakce pentózového cyklu. [1,2]

U nenasycených mastných kyselin se syntéza také částečně liší. Odehrává se v játrech za pomoci *desaturáz*. *Desaturázy* jsou enzymy s nehemovým železem uloženým v endoplazmatickém retikulumu. [2]

Mononenasycené kyseliny vycházejí z nasycených řetězců, kde dochází k přeměně na acyl-CoA. Dvojná vazba následně vzniká hydroxylací a dehydratací. Vzniklý nenasycený acyl se od CoA odtrhne a začlení se do nějaké lipidové struktury. [2]

Syntéza mastných kyselin je regulována živinami z potravy a hormony. Pokud je výživa nedostatečná, snižuje se hladina citrátu a tím i syntéza mastných kyselin. Z hormonů má největší vliv insulin. Stejně jako citrát ovlivňuje enzym *acetyl-CoA-karboxylázu*, takže při jeho nedostatku je syntéza také snížena. Dalším hormonem je glukagon, antagonist insulínu, ten působí na *acetyl-CoA-karboxylázu* tlumivě a tlumivě působí i na samotné mastné kyseliny. Pokud je v organismu vyšší obsah mastných kyselin, tak zpětnovazebným mechanismem zpomalují, až zcela zastavují syntézu nových molekul. [2]

Pro přehledné porovnání průběhu degradace a syntézy mastných kyselin slouží obrázek č. 4.



Obrázek č. 4: Porovnání degradace a syntézy mastných kyselin

Zdroj: [http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/22-](http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/22-Metabolismus%20lipid%C5%AF/22-Metab_lipidu_soubory/image024.jpg)

[Metabolismus%20lipid%C5%AF/22-Metab_lipidu_soubory/image024.jpg](http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/22-Metabolismus%20lipid%C5%AF/22-Metab_lipidu_soubory/image024.jpg)

2.1.3 METABOLISMUS MASTNÝCH KYSELIN

Jak již bylo řečeno, mastné kyseliny lze přijímat potravou nebo je syntetizovat přímo v organismu. Jednotlivé kyseliny se mohou mezi sebou přeměňovat a to zkracováním nebo prodlužováním řetězce či tvorbou dvojných vazeb. [1]

Při prodlužování dochází k navázání koenzymu A a karboxylové kyseliny o 16 uhlících, kyseliny palmitové za dodání ATP. Vzniklý palmitoyl-CoA se může prodloužit o 2 uhlíky na stearyl-CoA (C₁₈) a ten na kyselinu arachidonovou (C₂₀) a tak dále. K prodloužení dochází za pomoci malonyl-CoA a NADPH a vše probíhá v endoplazmatickém retikulu. [1]

K zavedení dvojných vazeb je zapotřebí enzym *desaturáza*, který k sobě potřebuje ještě molekulární kyslík, NADPH a cytochrom b₅. Při tvorbě dvojných vazeb vznikají nenasycené mastné kyseliny, které mají pouze jednu dvojnou vazbu a to mezi C₉ a C₁₀ nebo na C₄, C₅ či C₆. Lidský organismus není schopný vytvořit další dvojnou vazbu za C₉. Takže kyseliny s více nenasycenými vazbami, jako je kyselina linolová, linoleová a arachidonová, nevznikají v organismu a jsou pro něj esenciální. [1]

2.1.4 NASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY (*Saturated fatty acids, SFA*)

Za základ struktury mastných kyselin můžeme považovat kyselinu octovou, od které se ostatní kyseliny odvozují přidáním -CH₂- skupiny mezi koncovou methylovou a karboxylovou skupinu. [3]

Nasyčené mastné kyseliny mají ve své struktuře pouze jednoduché vazby. V organismu jsou využívány pro tvorbu steroidních hormonů, jako energetické substráty a jsou ukládány do tukové tkáně. Organismus si je dokáže syntetizovat sám a to především v hepatocytech. Pokud je jejich příjem potravou nedostatečný, jsou uvolňovány z tukové tkáně ve formě volných mastných kyselin a ve vazbě na krevní bílkovinu albumin jsou transportovány krví do tkání. Jejich nadbytek může vést k nadváze a obezitě. Dalším negativním účinkem nasycených mastných kyselin je, že zvyšují hladinu cholesterolu v krvi a tím zvyšují i riziko vzniku srdečně-cévních onemocnění. [7,8,9]

Nasyčené mastné kyseliny nacházíme jak v tucích živočišných (máslo, sádlo, tučné maso, uzeniny, mléčné výrobky), tak rostlinných (skryté tuky v polevách, cukrovinkách, pečivu, čokoládě, atd.). [7,8]

Mezi nasycené mastné kyseliny patří například kyselina laurová, myristová, palmitová a stearová.

2.1.5 NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY (*Unsaturated fatty acids*)

Nenasycené mastné kyseliny obsahují ve své struktuře jednu nebo více izolovaných dvojných vazeb. U přirozeně se vyskytujících se lipidů je obvyklá pouze cis konformace. [1]

Můžeme je rozdělit na:

- a) mononenasyčené mastné kyseliny (*Monounsaturated fatty acids, MUFA*) – obsahují pouze 1 dvojnou vazbu
- b) polynenasycené mastné kyseliny (*Polyunsaturated fatty acids, PUFA*) – obsahují dvě a více dvojných vazeb
- c) eikosanoidy – sloučeniny odvozené od eikosapolyenových kyseliny

Dále je můžeme dělit podle toho, kde se nachází dvojná vazba, na:

- a) ω -3 nenasycené mastné kyseliny - dvojná vazba je na C₃ na nekarboxylovém konci
- b) ω -6 nenasycené mastné kyseliny - dvojná vazba je na C₆ na nekarboxylovém konci
- c) ω -9 nenasycené mastné kyseliny - dvojná vazba je na C₉ na nekarboxylovém konci

ω -3 a ω -6 polynenasycené mastné kyseliny není lidský organismus schopen syntetizovat. Označují se tedy jako esenciální mastné kyseliny (viz níže). [10,11]

2.1.6 ESENCIÁLNÍ MASTNÉ KYSELINY (*Essential fatty acids, EFA*)

Jak již bylo uvedeno, esenciální neboli nepostradatelné mastné kyseliny si organismus neumí syntetizovat, proto je nutné přijímat je v potravě nebo formou potravinových doplňků. Jedná se především o ω -6 mastné kyseliny (kyselina arachidonová AA, linolová LA, γ -linolenová GLA) a ω -3 mastné kyseliny (kyselina α -linolenová ALA, eikosapentaenová EPA, dokosahexaenová DHA). Pokud je kyselina linolová obsažena v potravě, může být přeměněna na kyselinu arachidonovou a

linolenovou, tudíž pouze kyselina linolová a α -linolenová jsou absolutně esenciální.
[1,9,11,12]

Hlavní EFA a jejich zdroje:

- LA – je v mnoha druzích listnaté zeleniny a v semenech – slunečnice, saflor (světlice barvířská), kukuřice, arašídý, olivy, řepka olejka, pupalka dvouletá
- GLA – největší množství se nachází v oleji z brutnáku lékařského, pupalky dvouleté a černého rybízu, v malém množství je i v mateřském mléce
- AA – je ve vysokém množství ve vejcích, v rybách a mase
- ALA – se nachází ve lněných semínkách a v oleji z těchto semínek, v řepkovém oleji, v malém množství v ořechách, listové zelenině, semínkách černého rybízu a pšeničných klíčcích
- EPA, DHA – jsou v tučných rybách jako je losos, makrela, tuňák, v mořských řasách, v krilu (malí oceánští korýši) a v mungo klíčcích

Jsou nezbytné pro správnou funkci a tvorbu buněk v těle, zvyšují absorpci vitamínů a minerálů, vyživují pokožku, vlasy a nehty, podporují správnou funkci nervového systému, napomáhají produkci hormonů, zajišťují normální vývoj a růst, snižují obsah lipidů v krvi a krevní tlak. [11,13,14]

Jejich nedostatek byl zjištěn u mnoha onemocnění včetně mentálních poruch, diabetu mellitu, aterosklerózy, hypertenze, ekzému a revmatoidní artritidy. Množství EFA je spojováno i s rakovinou a šancí na její vznik. [11,12,14,15]

Mnoho klinických studií se již zabývalo vlivem ω -3 a ω -6 mastných kyselin na rakovinu a dokázalo, že mají velký vliv na inhibici různých typů rakoviny. [16,17,18,19,20] Bylo navrženo několik možností, jak tento mechanismus může probíhat. Například, že ω -3 PUFA ovlivňují růst nádorových buněk modulací buněčné replikace, že interferují s komponenty buněčného cyklu nebo že zvyšují buněčnou smrt skrze nekrozu a apoptózu. Celkový mechanismus protinádorové aktivity však nebyl zatím úplně demonstrován. Vysoký příjem ω -3 PUFA má, podle těchto studií, snižovat riziko vzniku rakoviny a působit preventivně. Dávkování ω -3 PUFA během chemoterapie nebo radioterapie má také pozitivní účinky na pacienta. Důležité poznatky o zmenšování nádoru nebo o prodlužování života pacientů však nebyly prokázány. Analýzy dále poukazují na až 14% redukci rakoviny s vyšším příjmem ω -3

PUFA v potravě. Zatímco u ω -6 PUFA bylo zaznamenáno, že může působit jak protinádorově, snižovat proliferaci buněk u karcinomu prsu a plic, tak i pronádorově, podporovat proliferaci nádorových buněk u rakoviny střev a prostaty. V tomto případě záleží i na celkovém poměru ω -3 a ω -6 PUFA. Výsledky všech možných studií na toto téma, které se často liší, napomáhají k postupnému objasnění mechanismu působení jednotlivých PUFA na rakovinu, kterého se v budoucnu jistě dočkáme. [14,21,22]

V roce 1999, skupina vědců z *National Institute of Health* (NIH) ustanovila tzv. DRIs (Dietary Reference Intakes) neboli referenční příjem mastných kyselin z potravy. Byla stanovena množství jednotlivých mastných kyselin, která by měla být přijata dospělým člověkem potravou za jeden den. U LA byla určena hodnota 4,44 g, ALA 2,22 g, kombinace EPA/DHA 0,65 g. V roce 2004 bylo dávkování mírně upraveno organizací NCEP (*National Cholesterol Educational Program*). Pro ALA doporučují denní dávku 2,2-2,4 g a pro EPA 0,8-1 g. EFA mohou být konzumovány i ve větším množství (až 50 g za den) bez závažnějších nežádoucích účinků. Někdy se však mohou vyskytnout mírné bolesti břicha, nadýmání nebo průjem, ale ty brzy vymizí. Na obrázku č. 5 je zobrazen doporučený příjem lipidů podle NCEP. [9,11]

lipidy celkově	25–35%
■ satureované a trans-nenasycené (SFA, TFA)	■ do 10% běžně, do 7% při dyslipidemii
■ mononesatureované (MUFA)	■ 20%
■ polynesatureované (PUFA)	■ nad 5% běžně, nad 10% při dyslipidemii
■ linolová (omega-6)	■ 3–5%
■ linolenová (omega-3), ALA, EPA, DHA	■ 0,5–1%

Obrázek č. 5: Doporučený příjem lipidů

Zdroj: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2010/08/10.pdf>

Přítomnost mastných kyselin například v membráně červených krevních buněk (erytrocytů), které byly použity v experimentální části, závisí na typu přijímaných mastných kyselin ve stravě. Při stanovení spektra mastných kyselin z plazmy tyto hodnoty odráží denní příjem mastných kyselin z potravy, zatímco složení mastných kyselin z membrány erytrocytů odráží příjem mastných kyselin za poslední 2 až měsíce. [23]

ω -3 a ω -6 PUFA mezi sebou soutěží o využití v organismu, proto je důležité je konzumovat ve správném poměru, který by se měl pohybovat v rozmezí mezi 1:2 až 1:4. V České republice je tento poměr odhadován na 1:15 až 1:30. [9,12,13]

ω -3 PUFA, které jsou obsaženy jak v rybách (sleď, makrela, losos, tuňák), tak v rostlinných zdrojích (řepkový olej, lněné semínko), je výhodnější přijímat právě ze zdrojů rostlinných. Rybí tuk sice obsahuje velké množství EFA, ale také velké množství cholesterolu a naopak neobsahuje vlákninu, která je pro trávení velice důležitá. Často bývají ryby intoxikovány toxiny z prostředí a také rtuť. Další nevýhodou ω -3 EFA v rybím tuku je jejich vysoce nestabilní molekula, která se rozkládá a uvolňuje nebezpečné volné radikály. Přes všechna tato rizika se konzumace ryb nadále doporučuje, podle Státního zdravotního ústavu totiž pozitivní účinky stále převažují nad těmi negativními. [9,12]

Z ω -3 PUFA mohou vznikat ale i prostaglandiny a leukotrieny 3. a 5. třídy. Ty působí protizánětlivě, bronchodilatačně a protisrážlivě. Prostaglandiny a leukotrieny 2. a 4. třídy vznikají z ω -6 PUFA a působí prakticky opačně než působky vzniklé z ω -3. Cesta přeměny (obrázek č. 6) zahrnuje desaturaci, vznik další dvojně vazby, poté elongaci a vznik dalších dvojných vazeb. Dvojně vazby vznikají díky enzymům *delta-6-desaturáza* a *delta-5-desaturáza*. Z kyseliny linolové tak postupně vzniká kyselina γ -linolenová, dihomog γ -linolenová a nakonec kyselina arachidonová, která je prekurzorem zmíněných prostaglandinů a leukotrienů. Podobným způsobem vzniká kyselina eikosapentaenová a dokosahexaenová z kyseliny α -linolenové. Přeměna ALA v EPA a v DHA je v organismu nízká, tudíž je zapotřebí je dodávat. [9,15]

ω -6		ω -3	
linolová – C18:2 ω 6		α -linolenová – C18:3 ω 3	
↓		↓	
γ -linolenová – C18:3 ω 6		eikosapentaenová (EPA) – C20:5 ω 3	
↓		↓	
dihomo- γ -linolenová – C20:3 ω 6		dokosapentaenová – C22:5 ω 3	
↓		↓	
arachidonová – C20:5 ω 3		dokosaheptaenová – C22:6 ω 3	
↓		↓	
lipoxygenáza	cyklooxygenáza	cyklooxygenáza	lipoxygenáza
leukotrieny 4. tř.	prostaglandiny 2. tř.	prostaglandiny 3. tř.	leukotrieny 5. tř.

Obrázek č. 6: Tvorba polynenasycených mastných kyselin a mediátorů

Zdroj: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2010/08/10.pdf>

2.1.7 NEESENCIÁLNÍ MASTNÉ KYSELINY (*Non-essential fatty acids, NEFA*)

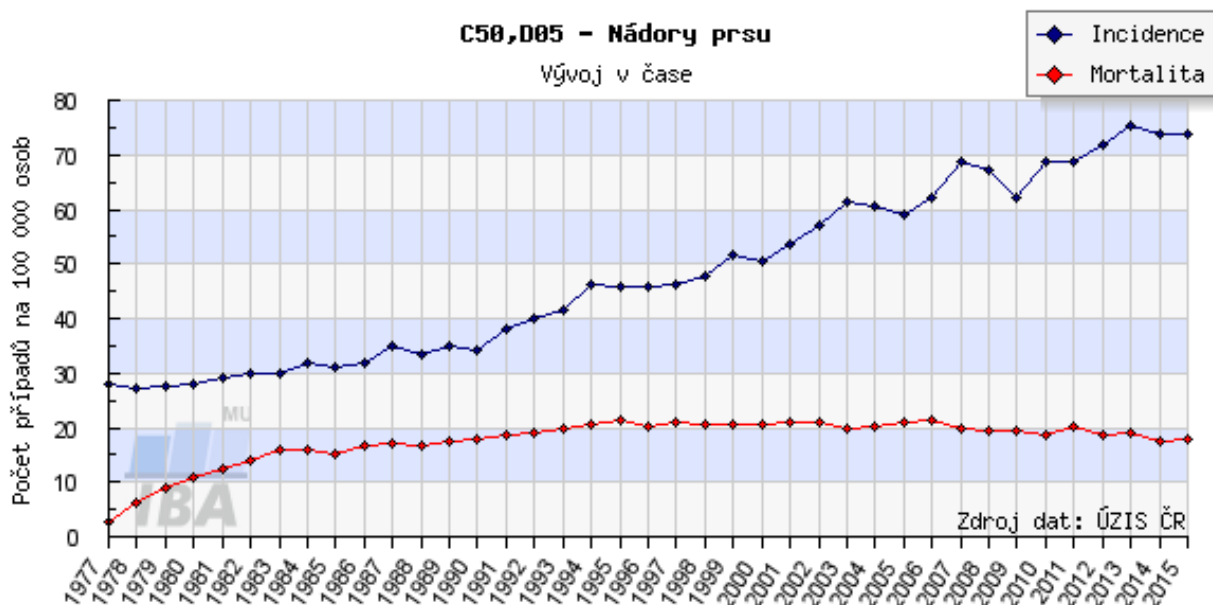
Mezi neesenciální mastné kyseliny patří ω -9 mononenasycené mastné kyseliny, protože organismus je schopný si je syntetizovat z jiných mastných kyselin. Nejběžněji vyskytující se NEFA je kyselina olejová, která je obsažena především v olivovém, makadamovém, mandlovém, řepkovém a slunečnicovém oleji, v mandlích, kešu a avokádu. Posiluje obranyschopnost a má pozitivní vliv na aterosklerózu. Dalším zástupcem je kyselina nervonová, pomáhající ke správnému fungování nervové soustavy a mozku. [11,24,25]

ω -9 NEFA mohou působit snížení hladiny cholesterolu a cukru v krvi a tím snižovat riziko rozvoje kardiovaskulárních chorob. [24,25]

2.2 RAKOVINA PRSU

Rakovina prsu patří mezi nejčastější nádorová onemocnění u žen v České republice a je druhým nejčastějším typem rakoviny u žen ve světě. Může se objevit i u mužů, ale incidence u žen převažuje. Nové případy stále přibývají, ale s moderní

diagnostikou a léčbou se mortalita neustále snižuje a přeživších přibývá (viz graf č. 1). Pravděpodobnost podlehnutí rakovině je ale stále 2,7%. [26,27]



Graf č. 1: Časový vývoj hrubé incidence a mortality rakoviny prsu. Graf zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100000 osob) nádorů prsu v celé populaci.

Zdroj: <http://www.svod.cz/report.php?diag=C50,D05>

Mezi symptomy poukazující na rakovinu prsu patří změna ve velikosti nebo tvaru prsu, bolestivost prsou nezávislá na menstruačním cyklu, bulky ve tkáni nebo její ztlustění, změny okolní pokožky, nově vytvořené bradavky, odlupování a šupinatění prsního dvorce, zarudnutí a otoky kůže, mokvání oblasti bradavky a výtok z bradavky. [26,27,28]

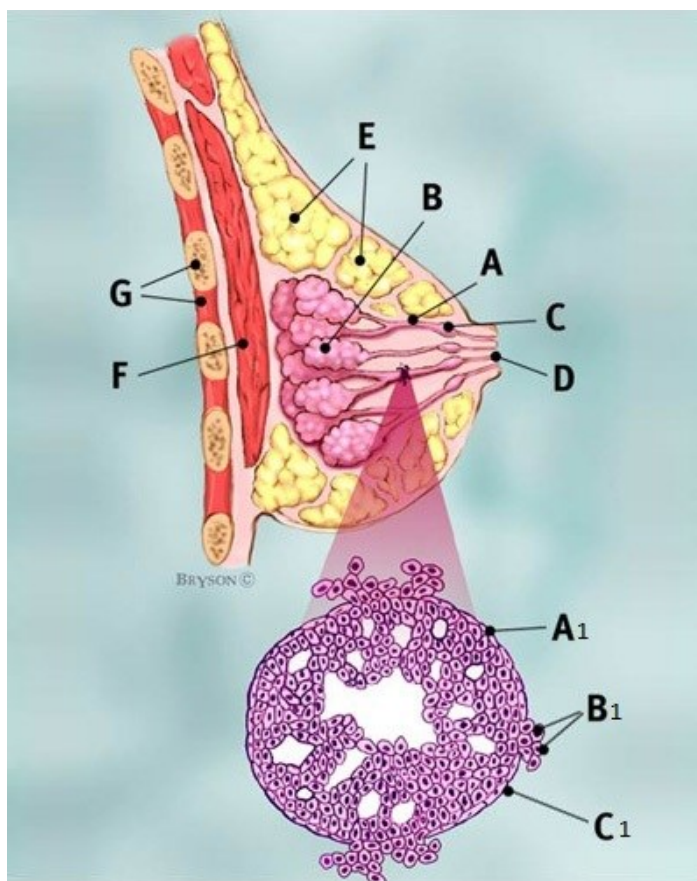
Příčinou je abnormální růst a dělení buněk v prsu. Rakovinné buňky se dělí větší rychlostí než buňky zdravé, akumulují se a formují se do bulek. Záleží i na tom, zda se jedná o nádor benigní nebo maligní. Benigní neboli nezhoubný nádor roste pouze v místě jeho vzniku. Není schopný metastazovat. Zatímco maligní, tedy zhoubný nádor tuto schopnost má. Může tvořit metastaze různé velikosti po celém těle. Rizikem pro pacienty jsou především tyto metastaze, které nemusí být okamžitě nalezeny a mohou vyřadit z činnosti životně důležité orgány. [26,28]

Faktory zvyšující riziko rozvoje rakoviny prsu jsou hormonální, environmentální a především genetické. 5-10% nádorů prsu je způsobeno genetickými mutacemi, které se předávají mezi generacemi. Nejznámějším typem mutovaného genu je BRCA1 (*breast cancer gene 1*) a BRCA2 (*breast cancer gene 2*). [26,29]

Dalšími rizikovými faktory, které zvyšují šanci na onemocnění, jsou ženské pohlaví, zvyšující se věk (mezi 50. - 60. rokem života nejčastěji), rakovina v osobní či rodinné anamnéze, genetické mutace genů p53, PTEN, STK11, CDH1, etnikum (běloši ve větším riziku), expozice radiaci, obezita, začátek menstruace v brzkém věku, začátek menopauzy v pozdním věku, pozdní či žádné těhotenství, postmenopauzální hormonální terapie a zvýšený příjem alkoholu. [26,27,28]

Rakovinu prsu můžeme rozdělit podle jejího typu na:

- Duktální karcinom *in situ* (*Ductal Carcinoma In Situ, DCIS*)
 - neprorůstá do okolní tkáně a nemetastazuje
 - vzniká v mléčných vývodech prsu (spojují bradavku a lobuli)
 - neléčený se může modifikovat na zhoubný nádor
- Invazivní duktální karcinom (*Invasive Ductal Carcinoma, IDC*, obrázek č. 7)
 - také vzniká v mléčných vývodech prsu
 - proniká do okolní tkáně a je schopen metastazovat
 - nejčastější typ rakoviny prsu (až 80%)
- Lobulární karcinom *in situ* (*Lobular Carcinoma In Situ, LCIS*)
 - vzniká v lobulech (lalůčcích) prsní žlázy
 - *in situ*, protože roste pouze v místě vzniku, nemetastazuje
 - zvyšuje riziko vzniku zhoubného nádoru
- Invazivní lobulární karcinom (*Invasive Lobular Carcinoma, ILC*)
 - málo častý typ
 - vzniká také v lobulech prsní žlázy [27,28,30]



Obrázek č. 7: Podélný řez prsní tkáně s invazivním duktálním karcinomem. A- vývod (ductus), B- lalůček (lobulus), C-rozšířená sekce vývodu k zadržování mléka, D- bradavka, E- tuk, F- sval, G- hrudní koš, A1- normální duktální buňka, B1- buňky duktálního karcinomu pronikající bazální membránou, C1- bazální membrána

Zdroj: <https://www.breastcancer.org/illustrations/i0061>

Invazivní nádory jsou takové, které prorůstají do okolní tkáně a je zde možnost rozšíření po celém těle. Neinvazivní nádory zůstávají na stejném místě, nerozrůstají se, ale je zde riziko možného rozvoje do invazivního typu. [27]

Za prevenci je považováno samovyšetření prsu, mamogram, cvičení, omezení alkoholu, zdravá a vyvážená strava. [26,27,28]

K diagnostice rakoviny prsu slouží několik metod:

- vyšetření prsou – lékař kontroluje hmatem obě dvě prsa a lymfatické uzliny v podpaží

- krevní obraz s diferencíálem – diferenciální rozpočet krevních buněk
- biochemická analýza krve – nádorové markery jsou speciální bílkoviny vylučované některými zhoubnými nádory do krve (CEA, CA 153) a slouží k diagnostice i k sledování průběhu léčby
- mamogram – rentgenový snímek prsní žlázy
- ultrazvuk prsou – za pomoci ultrazvukové vlny umožní určit, zda se jedná o pevnou bulku nebo o tekutinou naplněnou cystu
- biopsie s histologickým vyšetřením – odběr malého vzorku tkáně k definitivní diagnostice rakoviny prsu
- magnetická rezonance – snímek vnitřního prsu za pomoci magnetického pole, bez použití radiace
- scintigrafie skeletu – za pomoci radioizotopu, který po podání koluje v oběhu a dá se snímat speciální gamakamerou, ke stanovení rozsahu zhoubného nádoru
- výpočetní tomografie (*Computed Tomography, CT*) – radiologická metoda zobrazující vnitřní orgány člověka za pomoci rentgenového záření [26,28]

Rakovina prsu může probíhat v rozmezí od 0. do IV. klinického stádia. Stádium 0 (*in situ*) indikuje neinvazivní nádory, v I. stádiu může být nádor maximálně 2 cm velký a nezasahuje do lymfatických uzlin. Ve II. stádiu se začíná šířit do okolní tkáně, velikost se pohybuje od 2 do 5 cm. III. stádium je charakterizováno šířením rakoviny do lymfatických uzlin a zvětšením nádoru až na 5 cm a více. Poslední, IV. stádium, je nejzávažnější a typické jsou metastáze. Rakovina se šíří do ostatních orgánů, do kostí, jater, mozku a do plic. [26,27,28]

Léčba probíhá různými způsoby, závisí na stádiu, typu rakoviny a na celkovém zdravotním stavu pacienta. Podle vztahu k onemocnění můžeme léčbu rozdělit na neoadjuvantní, jejímž cílem je zmenšení nádoru a usnadnění operace, na adjuvantní (zajišťovací), která se podává po chirurgickém zákroku ke zničení cirkulujících nádorových buněk a na paliativní, kde se jedná o zmírnění projevů a prodloužení života pacientů s pokročilým a nevléčitelným stadiem rakoviny. [26,28]

Léčbu můžeme rozdělit i podle způsobu účinku a to na léčbu lokální, kam se řadí chirurgické výkony a léčba ozařováním. Odstranění nádoru chirurgicky s malou částí okolní tkáně se nazývá lumpektomie. Tato léčba se používá především u menších nádorů. U větších nádorů se odstraňuje větší nebo celá prsní tkáň i s mléčnou žlázou

(částečná nebo úplná mastektomie). Při metastázách do lymfatických uzlin je doporučenou léčbou i jejich odstranění. U radiční terapie jsou buňky nádoru ozařovány elektromagnetickými paprsky nebo proudy protonů s vysokým obsahem energie. Tato léčba má ale velké množství nežádoucích účinků, jako je slabost, lymfedém, lehké popáleniny v místě průchodu paprsku, poškození srdce nebo plic. [26,27,28]

Dalším typem je léčba systémová, kam se řadí hormonální terapie, chemoterapie a imunoterapie. Hormonální léčba se soustředí na nádory, které jsou citlivé na hormony (mají steroidní receptory) a blokuje je. Používá se většinou před, nebo po chirurgickém zákroku, aby se zabránilo návratu rakoviny. U chemoterapie jsou základem léky (cytostatika), které ničí rychle rostoucí nádorové buňky. Často se využívá před chirurgickým zákrokem, aby se nádor zmenšil a bylo snazší ho vyjmout. Nebo i po operaci, aby se zmenšila šance na návrat nádoru. Chemoterapeutika mají také velké množství nežádoucích účinků, které závisí na podávané látce. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří ztráta vlasů, nevolnost, zvracení, slabost, vysoké riziko nové infekce z důvodu snížení obranyschopnosti, neplodnost, poškození srdce, ledvin a poškození nervů. V případě imunoterapie je léčba namířená proti receptoru HER2/neu za pomoci monoklonálních protilátek typu trastuzumab, které omezují množení nádorových buněk. [26,27,28]

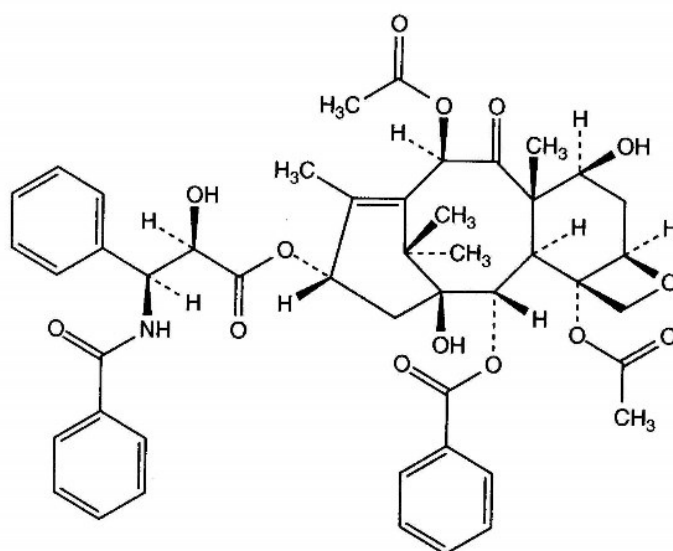
Protože všechny druhy léčby jsou agresivní a náročné, existují pro pacienty, kteří právě podstupují chemoterapii i pro ty, kteří jsou již v terminálním stádiu nemoci, specializovaní pracovníci paliativní péče. Jedná se o podpůrnou péči pro pacienta a jeho rodinu. Snaží se pacientům ulevit od bolesti a dalších symptomů nemoci. Díky paliativní péči mají pacienti přijít na jiné myšlenky, cítit se lépe, pozitivně, což by mělo pomoci i v jejich léčbě. [26]

2.3 TAXANY

Taxany jsou cytostatické antimikrotubulární látky, které se využívají v klinické praxi pro léčbu nádorů. Způsobují depolymerizaci mikrotubulů, což vede ke stabilizaci

mikrotubulárního cytoskeletu, k prodloužení buněčného dělení až na 15 hodin, a ke spuštění programované buněčné smrti, apoptózy. [31,32]

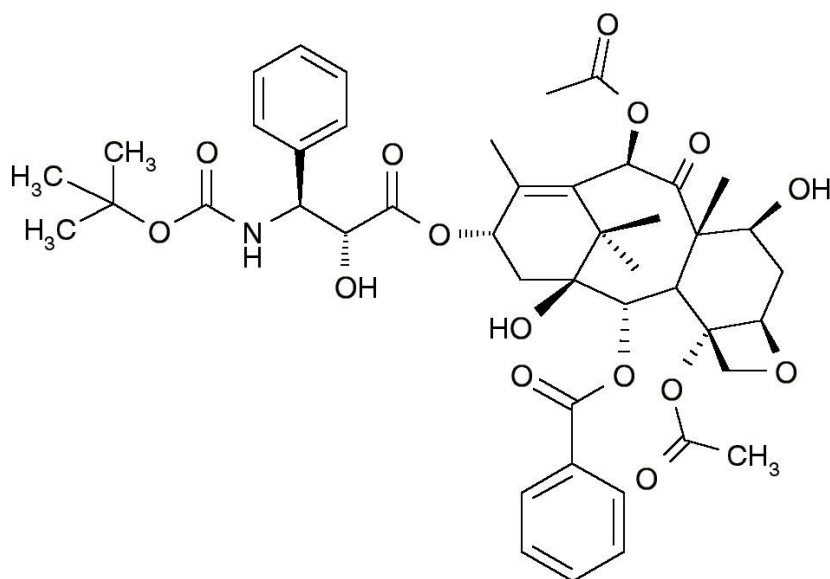
Mezi nejvíce využívané taxany v léčbě karcinomu prsu patří paklitaxel a docetaxel. Paklitaxel byl poprvé izolován v roce 1971 z kůry pacifického tisu *Taxus brevifolia* a z endofytické houby *Taxomyces andreanae*. Řadíme ho do první generace taxanů. Později se podařilo ho zcela syntetizovat. Jeho struktura je zobrazena na obrázku č. 8. [31,32,33,34]



Obrázek č. 8: Strukturní vzorec paklitaxelu

Zdroj: <http://ks26686.kimsufi.com/stabilis/Monographie.php?IdMolecule=86&IdOnglet=Incomp&codeLangue=CZ-cz>

Docetaxel, který se řadí do druhé generace taxanů se připravuje polysynteticky esterifikací postranního řetězce neaktivního prekurzoru 10-deacetylbaecatinu III, který je obsažen v tisu červeném *Taxus baccata*. Struktura docetaxelu je vyobrazena na obrázku č. 9. [31,32,35]



Obrázek č. 9: Strukturní vzorec docetaxelu

Zdroj: <http://ks26686.kimsufi.com/stabilis/Monographie.php?IdMolecule=299>

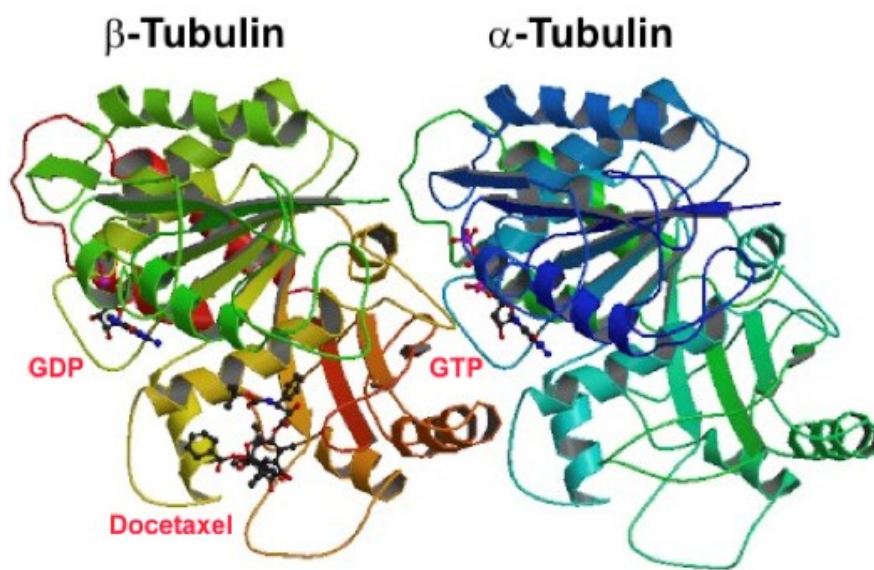
Při porovnání monoterapie paklitaxelem a docetaxelem je z klinických studií zřejmé, že docetaxel prokazuje vyšší afinitu k vazbě k mikrotubulům, delší čas intracelulární retence, vyšší koncentraci v buňkách, vyšší indukci apoptózy a vyšší procento thymidin fosforylace. [31] Thymidin je v organismu fosforylován ATP za účasti enzymu *thymidin kinázy*, který můžeme nalézt ve většině živých buněk a má klíčovou funkci při syntéze DNA a dělení buňky. *Thymidin kináza* se v klinických studiích využívá jako marker proliferace v diagnostice a kontrole léčby maligních onemocnění. [36]

První i druhá generace taxanů jsou vysoce hydrofobní látky a pro překonání jejich slabé rozpustnosti potřebují rozpouštědla na bázi lipidů. Mezi tato rozpouštědla patří polyethyl ricinový olej (Cremophor®EL) s etanolem a polysorbate80 (Tween®80) s etanolovým ředidlem. Obě ředidla jsou biologicky a farmakologicky aktivní látky a jsou schopny vyvolat řadu vedlejších nežádoucích účinků. [32]

Docetaxel má lineární farmakokinetiku a není zapotřebí takových dávek jako u paklitaxelu. Přičemž paklitaxel má i více nežádoucích účinků, jako je hypersenzitivita a neurotoxicita. U docetaxelu je časté zadržování tekutin a únava. Kromě vedlejších nežádoucích účinků, dochází často i ke vzniku rezistence k těmto lékům. [31,32]

2.3.1 MECHANISMUS ÚČINKU TAXANŮ

Jak již bylo zmíněno, taxany stabilizují mikrotubuly. Stabilizace probíhá v oblasti vazby guanosindifosfátu (GDP) na β -tubulinové podjednotky (viz obrázek č. 10). Tím dochází k nahromadění buněk v G2-M fázi, vzniku hvězdicovitých útvarů místo dělicího vřeténka a tím pádem k nedokončení mitotického dělení a k indukci apoptózy. [37,38,39]



Obrázek č. 10: Struktura α - a β -tubulinové podjednotky mikrotubulů

Zdroj: <http://www.mastcell-basophil.net/wiki/wiki-start/microtubules-and-mast-cell-signaling/>

Apoptóza neboli geneticky programovaná buněčná smrt je obecně chápána jako schopnost organismu eliminovat poškozené, nefunkční nebo nepotřebné buňky. Na rozdíl od nekrózy, se kterou je apoptóza často zaměňována, zde nedochází ke vzniku zánětu, morfologie vzniku se tedy liší. Apoptóza může být fyziologická neboli spontánní, kdy dochází k redukci buněčných populací, např. při embryogenezi, u hyperplazie, při obměně krevních elementů apod. Nebo indukovaná patologicky, kdy je podnětem např. virové onemocnění, imunitní reakce, působení škodlivých látek, ale i již zmíněná chemoterapie. Jednoduchý princip je vyobrazen na obrázku č. 11. [1,32,40]



Obrázek č. 11: Apoptóza. V první části dochází ke srážení buněčného chromatinu, chromozomů a buněčných bílkovin. Následuje ztráta strukturální integrity buňky, vznik výčnělků na povrchu obklopujícím buňku a odškrnutí váčků zvaných apoptotická tělíska. V poslední části dochází ke zmenšení, scvrknutí buňky. Buněčná DNA se stává zlomkovitou a jednotlivé části buňky jsou následně recyklovány makrofágy a dalšími fagocytujícími buňkami bez vzniku zánětu.

Zdroj: <http://kreacionismus.cz/kreace/puvod%20apoptozy%20sobecke%20geny%20ci%20inteligentni%20plan.htm>

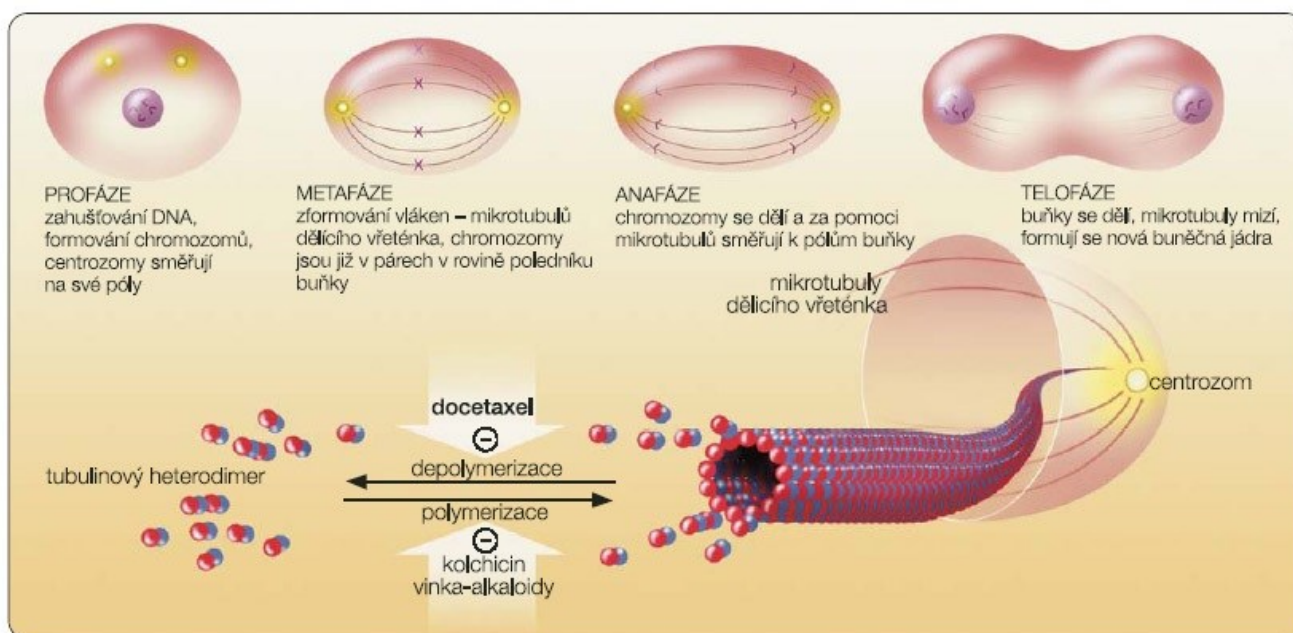
Mikrotubuly, které se účastní řady buněčných funkcí včetně buněčné motility, udržování tvaru buňky a mitózy, kde vytváří dělicí vřeténko, jsou tvořeny dimery proteinů α - a β -tubulinu a jsou schopny vázat guanosintrifosfát (GTP) nekovalentní vazbou. S navázaným GTP tvoří protofilamenta a následně polymery, které se formují do dutých, cylindrických trubic, tubulů. GTP se váže na α - i β -tubulin. Na α -tubulinu je vázán stabilně a nedochází k jeho hydrolýze. Zatímco na β -tubulinu se GTP štěpí na fosfát a GDP, což způsobuje změny v prostorové struktuře molekul. Ve volných dimerech je však GDP znova nahrazen GTP a znova dochází k polymerizaci tubulů. [32,41,42]

Za normálních okolností je k polymerizaci tubulinu GTP nezbytný. Taxany jsou však schopny polymerovat tubulin i bez dodání GTP. Vznikají stabilní mikrotubuly, ale s porušenou dynamickou rovnováhou. Během mitózy dochází působením taxanů k omezení pohybu dělicího vřeténka a chromozomy nejsou schopny se správně

navázat na kinetochory. Signály kontrolního bodu zastaví buněčný cyklus, většinou na přelomu G2-M fáze, což je jedním ze signálů pro zahájení apoptózy. [32,41]

Cílem taxanů jsou tedy β -tubulinové podjednotky, kde se váží v T-konformaci v M-smyčce a jsou v kontaktu s valin²³, arginin²⁸² a histidin²²⁷ / asparagin²²⁴ kapsou a podněcují stabilizaci a další polymerizaci tubulů. [43,44]

Mechanismus účinku docetaxelu je přehledně vyobrazen a popsán na obrázku č. 12.



V mechanismu účinku docetaxelu hrají centrální úlohu mikrotubuly – vlákna, která působí jako transportní dráhy pro různé molekuly a intracelulární struktury během buněčného dělení a současně se spolu s centrozomem spolupodílejí na pohybu chromozomů během tohoto dělení. Rozhodující jsou dva procesy, polymerizace a depolymerizace. Při depolymerizaci mikrotubulů dochází k odtažení rozdělených chromozomů na opačné konce – póly buňky, a právě do tohoto děje zasahuje docetaxel, který se na mikrotubuly specificky váže, a brání tak jejich depolymerizaci a kontrakci. Buněčné dělení je zablokováno a dochází k buněčné smrti.

Obrázek č. 12: Mechanismus účinku docetaxelu

Zdroj: <http://www.remedia.cz/Images/Articles/Main/vtextu20060515024915.jpg>

α - i β -tubuliny mají několik izotypických forem, které jsou typické pro určité části těla nebo pro určitou fázi životního cyklu. Mohou také podléhat různým posttranslačním modifikacím. Kromě těchto modifikací jsou ovlivňovány například proteiny, které mění jejich dynamiku a které jsou označovány jako MAPs (*Microtubule associated proteins*). [32,41,42]

Účinek taxanů může být ovlivněn vznikem rezistence na tento typ cytostatik. Rezistence může v tomto případě být jak primární, tak sekundární. Primární neboli přirozená rezistence vychází z biologických vlastností nádoru a z jeho histologie, zatímco sekundární (získaná) rezistence je navozena prvotní léčbou. Rezistence na taxany může být způsobena širokým spektrem faktorů. Jedním z nich je mutace v α -nebo β -tubulinech. Většina mutací se nachází na 4. exonu v genu *HM40* β 1-tubulinového izotypu. Dále rozdílná stavba 7 tříd izotypů β -tubulinu, přičemž podle vědeckých studií jsou třídy β 3 a β 4 méně citlivé k účinku paklitaxelu, protože jsou přímým cílem mikroRNA (miR-200c), která ovlivňuje karcinogenezi svým vlivem na klíčové buněčné procesy. [32,45]

I změna v expresi MAPs či změna v P-glykoproteinu může stát za vznikem rezistence. Mezi MAPs patří protein Tau, který se nachází v neuronech, gliových a epitelálních buňkách a jeho funkcí je shlukování tubulinu a stabilizace mikrotubulů. Problémem je, že jeho vazebné místo na mikrotubulu odpovídá vazebnému místu pro paklitaxel. Dalším MAP je například protein MAP4, který se nachází ve všech buňkách a také stabilizuje mikrotubuly. K uvolnění z vazby je nutná jeho inaktivace, a pokud je tato inaktivace nedostatečná, může opět dojít ke vzniku rezistence. Při změně exprese enzymů, které kontrolují všechny MAPs, *proteinových kináz*, může také dojít ke snížení citlivosti k účinku taxanů. [32,46]

2.4 DOXORUBICIN

Doxorubicin patří mezi cytotoxická antracyklinová antibiotika. Je izolovaný z kultur bakterie *Streptomyces peuceutius*. Mechanismem účinku tohoto protinádorového antibiotika je jeho vazba na obě dvě vlákna DNA (kyselina deoxyribonukleová) neboli interkalace. Interkalace znemožňuje replikaci DNA, transkripci do RNA a tím zabraňuje vzniku bílkovin. Dalším účinkem doxorubicinu je inhibice enzymu *topoizomerázy II*, díky čemuž dochází k rozpadu DNA. Doxorubicin se váže i na tuky v buněčné membráně a tím ji poškozuje. Protože docházelo ke kumulaci léku v srdci (a následně ke kardiomyopatii) a v trávicím traktu, byla jeho forma upravena na tzv. lipozomální doxorubicin a pegylovaný lipozomální doxorubicin. Uzavření léku do lipozomu, uměle připravené kulovité částice, vede ke snížení nežádoucích účinků. Při pegylaci, jejíž

podstatou je vazba polyethylenglykolu na lipozom, dochází ke snížení rychlosti eliminace v organismu. [47,48]

Doxorubicin je indikován u karcinomu hlavy a krku, žaludku, jater, plic, prsu, endometria, prostaty, močového měchýře, štítné žlázy, u leukémie, lymfomů a dalších nádorových onemocnění. Často se podává souběžně s jinými antineoplastiky, například s antracykliny, cisplatinou, cyklosporinem a taxany. Současné podání taxanů s doxorubicinem mění jeho povahu a způsobuje pokles jeho clearance v organismu. Na podkladě farmakokinetické interakce dochází ke vzniku většího množství kardiotoxického metabolitu doxorubicinolu a tím ke zvýšení kardiotoxicity. Kombinovaná léčba s taxany způsobuje i častější výskyt neutropenie a stomatitid. Přes všechny nežádoucí účinky, kombinace taxanů s doxorubicinem má lepší léčebné účinky než samotná monoterapie a prodlužuje čas do progresu onemocnění. [31,47,49]

Kontraindikací může být vážná porucha jater, ledvin, arytmie, jiné kardiovaskulární onemocnění, zvýšená krvácivost, hematurie a další. [47,49]

Mezi nežádoucí účinky léku patří neuropatie, tachykardie, bradykardie, městnavé selhání srdce, dyspnoe, plicní edém, kardiomegalie, hepatomegalie, oligurie, ascites, perikarditida a myokarditida, vycházející z kardiotoxicity doxorubicinu. [47,48,49]

2.5 CIPN (*Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy*)

CIPN neboli chemoterapií indukovaná periferní neuropatie je souborem symptomů způsobených poškozením periferních nervů (obrázek č. 13), pravděpodobně na základě interference s axonálním transportem založeným na mikrotubulech. Je jedním z běžných nežádoucích účinků u chemoterapie, který může být až z 30% permanentní. Záleží na věku pacienta, zda trpí diabetem nebo HIV infekcí, jaké užívá léky, na rodinné anamnéze, na dávce a typu chemoterapeutika. Udává se, že 30-100 % pacientů může zažít tento vedlejší účinek, poškozující jejich nervový systém, v závislosti na dávce a typu chemoterapeutika. [50,51,52,53,54,55,56]

Během nedávné analýzy 31 studií na téma CIPN, které byly založeny na výsledcích od 4179 pacientů, bylo zjištěno, že prevalence CIPN je 48%. Po jednom

měsíci od léčby taxany prevalence vzrostla na 68,1% a po šesti a více měsících od ukončení léčby klesla na 30%. Vývoj CIPN je nepředvídatelný a jak již bylo zmíněno, některé symptomy mohou vymizet, jiné mohou zůstat permanentně. [57,58]

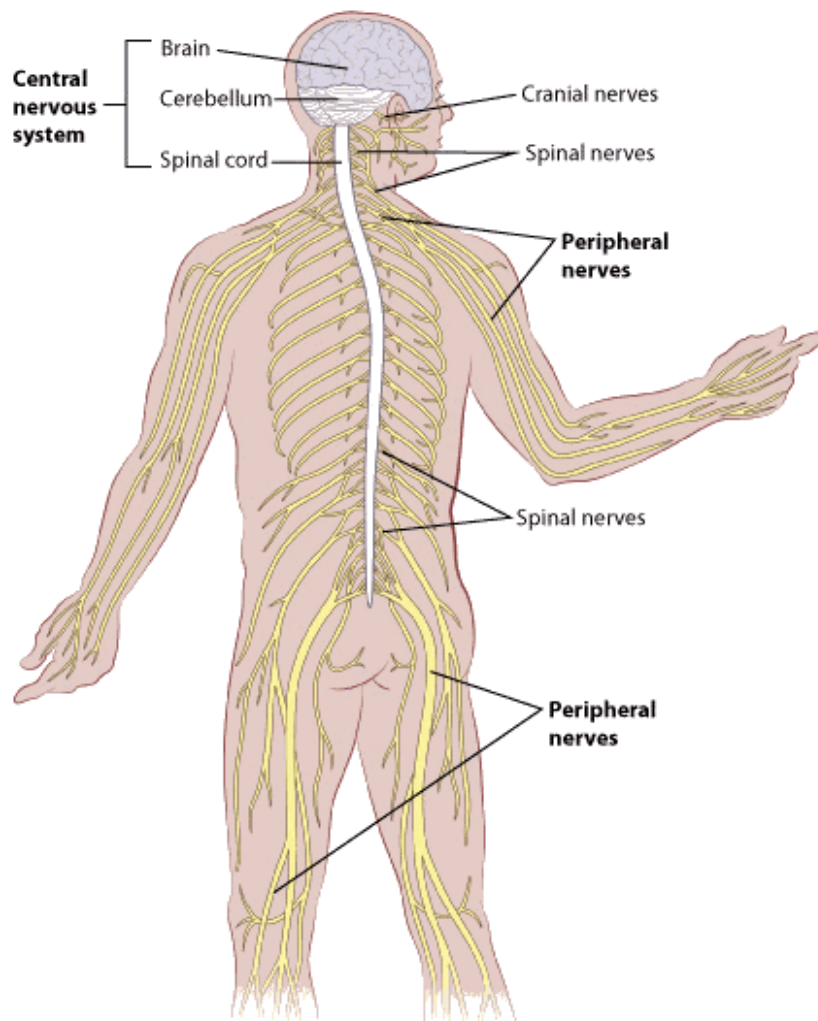
CIPN má negativní efekt na funkci a kvalitu života pacientů. Dochází ke znecitlivění konečků prstů na ruce i nohy, které postupuje i na celé končetiny. Jsou tedy porušeny jak motorické dovednosti, tak schopnost chůze či rovnováhy. Problémy se psaním, uchopováním věcí, s řízením automobilu, se cvičením, s tím vším musí pacienti podstupující léčbu počítat. Negativní vliv se může promítnout i v osobním a intimním životě. Bolesti různé intenzity jsou dalším typickým znakem CIPN. Často bývají doprovázeny pálením, štípáním, pícháním, přecitlivělostí v daných místech na těle. Také se vyskytují křeče svalstva, ochablost svalstva, zácpa, únik moči, potíže s polykáním a v nejhorším případě i anafylaktický šok v důsledku hypersenzitivní reakce na dávku. [50,52,59]

Pokud již nelze CIPN tolerovat, je nutné snížit a optimalizovat dávky chemoterapie nebo chemoterapii zcela ukončit. To však může ovlivnit šanci na přežití pacienta. A z toho důvodu velká většina pacientů zatajuje před svým lékařem bolesti, kterými trpí kvůli CIPN. Bojí se, že by to mohlo vést k přerušení chemoterapie a tím pádem k podlehnutí jejich nemoci. [50,60]

Mezi léky způsobující CIPN patří např.: cisplatina, karboplatina, paklitaxel, docetaxel, rostlinné alkaloidy, thalidomid, lenalidomid, bortezomib, eribulin. V této době nejsou vyvinuty žádné efektivní kombinované metody, které by mohly CIPN celkově zamezit. Lékaři jsou schopni snížit bolest pomocí léků na bolest, steroidů, opioidů a dalších narkotik. Dávají pacientům antidepresiva, léky proti záchvatům a křečím a doporučují jim alternativní terapie jako je akupunktura, masáže, elektrostimulace nervů, reflexní cvičení k uvolnění těla, jóga a podobně. [50,52,55,60,61]

Jak již bylo uvedeno výše, lék na CIPN zatím neexistuje. V některých klinických studiích však byly zaznamenány příznivé účinky preventivní léčby vitamínem E, vápníkem, hořčíkem, glutathionem, thiaminem a zmíněnými léky proti záchvatům (karbamazepin) a antidepresivy (venlafaxin). V jiných studiích jsou tato tvrzení vyvrácena. [51,61,62,63]

Lékaři také radí pacientům, aby se vyhýbali situacím, které zhoršují jejich CIPN. Doporučuje se vyhýbat hodně nízkým a vysokým teplotám, nespíchat a nebát se požádat o pomoc, nepít alkohol, kontrolovat si hladinu cukru v krvi, vyhýbat se aktivitám s ostrými předměty, chránit ruce rukavicemi při práci venku nebo při uklízení, nepřetěžovat se, odpočívat, zamezit vzniku puchýřů a jiných poranění, pít hodně vody, aby se zabránilo zácpě a užívat léky jak je předepsáno. [60]



Obrázek č. 13: Znázornění nervové soustavy u člověka.

Zdroj: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects/peripheral-neuropathy/what-is-cipn.html>

2.6 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE S PLAMENO-IONIZAČNÍ DETEKČÍ (*Gas Chromatography with Flame Ionization Detector, GC-FID*)

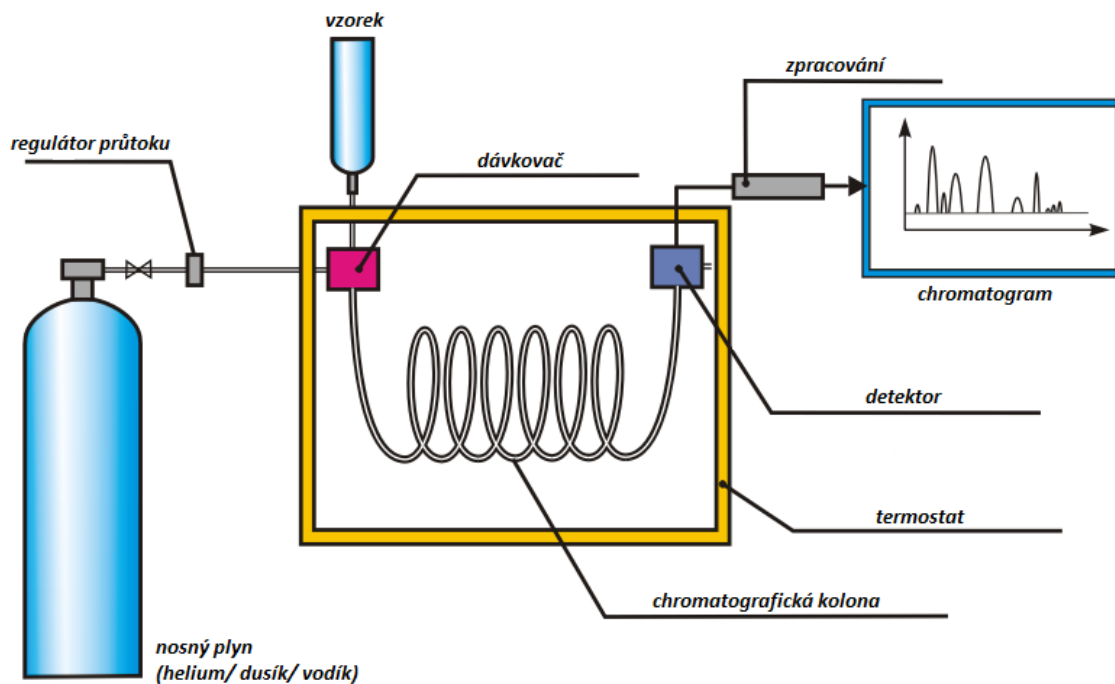
Chromatografické metody jsou separační, fyzikálně-chemické metody, jejichž principem je opakované ustalování rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi, stacionární a mobilní. V případě plynové chromatografie je mobilní fáze tvořena inertním nosným plynem. Jako nosný plyn se používá dusík, vodík, helium, neon nebo argon o čistotě 99,99%. Podmínkou pro použití GC je těkavost a tepelná stabilita analytu (do 400°C). Takže lze separovat látky plynné nebo takové, které lze derivatizací převést na těkavé deriváty. Mechanismus separace dělených látek je založen buď na adsorpčním (*Gas-Solid Chromatography, GSC*) nebo rozdělovacím (*Gas-Liquid Chromatography, GLC*) principu. [64,65,66,67]

Plynová chromatografie se využívá především v potravinářství, při kontrole kvality životního prostředí a ve farmaceutické analýze k identifikaci, zkouškám na čistotu nebo stanovení obsahu účinných látek, resp. i jejich rozkladných produktů nebo metabolitů. Je využívána i pro separaci a kvantifikaci mastných kyselin z plazmy, séra nebo celé krve. [23,68]

Hlavními součástmi GC jsou (obrázek č. 14):

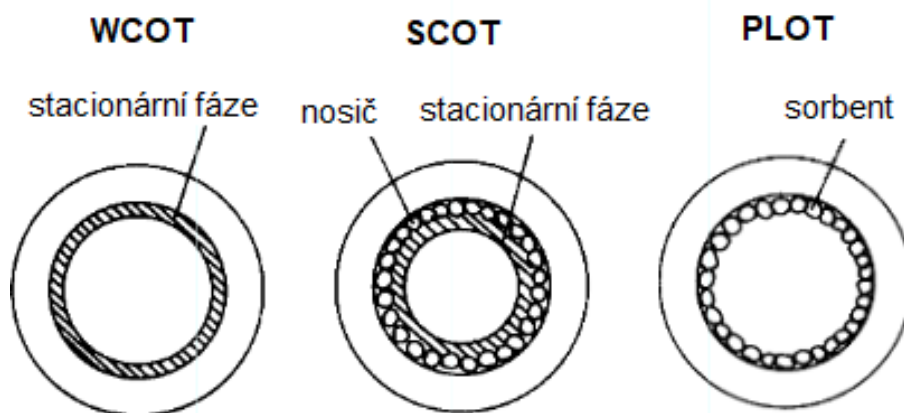
- tlakové láhve s nosným plynem s redukčními ventily (udržení konstantního tlaku) a vysoušedlem (zbavení vlhkosti)
- nástřikové zařízení
 - dávkovač vzorku (Hamiltonova mikrostříkačka nebo autosampler)
 - pryžové septum
 - nástřiková komůrka (zplynění vzorku)
 - dělič toku
- termostatovaná chromatografická kolona
 - náplňová – nerezová nebo skleněná kolona, Ø 3-8 mm, délka 1-5 m
 - naplněná tuhou stacionární fází – grafitizovaný uhlík, molekulová síta na bázi aktivního uhlí, silikagel, alumina, polymery (*GSC*)
 - naplněná tuhým nosičem - křemelina, silanizované skleněné kuličky, teflonové kuličky, pokrytá vrstvou kapalné stacionární fáze (*GLC*)

- kapilární - křemenná nebo skleněná kolona, \varnothing 0,05-0,15 mm, délka 20-100m, s tenkým filmem kapalné stacionární fáze na vnitřním povrchu kapiláry (GLC) (obrázek č. 15)
 - WCOT (*Wall Coated Open Tubular*) – kapalná polymerní stacionární fáze zakotvená na vnitřní straně kapiláry
 - SCOT (*Support Coated Open Tubular*) – částice nosiče pokryté kapalnou fází zachyceny na vnitřní stěně kapiláry
 - PLOT (*Porous Layer Open Tubular*) – adsorbent zachycen na vnitřní straně kapiláry
- termostatovaný detektor – s rychlou odezvou, vysokou citlivostí, selektivitou, stabilitou a linearitou odezvy
 - tepelně vodivostní detektor (*Thermal Conductivity Detector, TCD*)
 - plamenový ionizační detektor (*Flame Ionization Detector, FID*)
 - termo-ionizační detektor (*Thermionic Detector, TID*)
 - detektor elektronového záchytu (*Electron Capture Detector, ECD*)
 - plamenový fotometrický detektor (*Flame Photometric Detector, FPD*)
 - atomový emisní detektor (*Atomic Emission Detector, AED*)
 - hmotnostně spektrofotometrický detektor (*Mass Spectrometric Detector, MSD*)
 - infračervený detektor
 - chemiluminiscenční detektor [65,66,67,68]



Obrázek č. 14: Schéma plynového chromatografu

Zdroj: <https://docplayer.cz/docs-images/26/7300261/images/37-0.png>



Obrázek č. 15: Typy kapilárních kolon

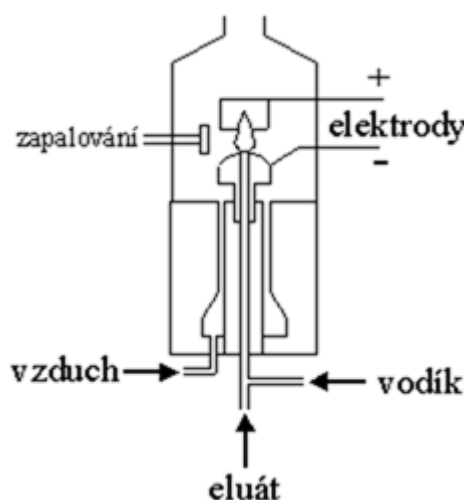
Zdroj: [61]

Plamenový ionizační detektor (FID) je destruktivní, vysoce citlivý typ detektoru. Není univerzální, ale je selektivní pro organické látky. Principem je měření vodivosti kyslíko-vodíkového plamene. V přítomnosti stop uhlovodíků počet iontů a elektronů silně roste a tím roste i vodivost plamene. FID poskytuje nízké detekční limity,

dlouhodobou stabilitu, jednoduchost provedení, nízké mrtvé objemy a rychlou odezvu [66,67,68,69]

Ionty vznikají termální emisí z mikroskopických uhlíkových částic, které vznikají během procesu spalování. FID je pravděpodobně nejjednodušší, nejsnazší a nejspolehlivější detektor. Průtok vodíku se obvykle nastavuje na 20-30 ml/min a průtok vzduchu přibližně šestkrát větší, 120-200 ml/min. Spalováním organických látek ve vodíkovém plamenu dochází k jejich ionizaci. Organické molekuly jsou v plamenu štěpeny na iontové nebo radikálové fragmenty, které jsou na první elektrodě nabity na určitý potenciál a jsou přitahovány druhou elektrodou, které svůj náboj odevzdají. Vzniklý proud iontů mezi elektrodami je přímo úměrný počtu iontů a měří se jeho změna, tudíž odezva tohoto typu detektoru je závislá na počtu uhlíků v separované molekule a na charakteru uhlíkových vazeb. [70]

Ionizace probíhá v miniaturním plamenu, kam z kolony vychází nosný plyn a vodík. Spálením vznikají ionty, radikály a elektrony, které umožňují přechod elektrického proudu mezi elektrodami. V redukční zóně plamene dochází ke krakování a hydrogenaci uhlíkatých sloučenin za vzniku uhlíkatých radikálů, kyslíkatých fragmentů a vodíkových iontů. V oxidační zóně plamene pak dochází k exotermické reakci mezi uhlíkatými radikály a kyslíkatými fragmenty za vzniku dalších radikálů. Uvolněná energie způsobuje jejich ionizaci za vzniku kationtu a elektronu. Na obrázku č. 16 je znázorněno schéma FID. [70,68]



Obrázek č. 16: Schéma FID

Zdroj: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52965

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ, POMŮCKY A CHEMIKÁLIE

- ultrazvuková lázeň Ultrasonic Cleaner DU-06 (Argolab, Itálie)
- třepačka Rotator SB3 (Stuart, Velká Británie)
- centrifuga Eppendorf 5810R (Eppendorf, Německo)
- termoblok Tectra QBT2 (Grant, Velká Británie)
- termostat Stericell 55 (Brněnská medicínská technika, Česká republika)
- crimper kleště Perkin Elmer
- chromatograf GC 8000 series (Fisons Instruments, USA)
- kapilární kolona SP 2330 (30 m x 0,25 mm x 0,2 µm film thickness) (Supelco, USA)
- pipety, špičky
- laboratorní sklo a plast
- hexan CHROMASOL HPLC
- isopropanol CHROMASOL V
- dusík technický
- destilovaná voda
- C17 IS (0,5 Mm)
- methanol CHROMASOL V HPLC
- toluen
- acetylchlorid
- uhličitan draselný 12%

3.2 POUŽITÝ BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Ke stanovení spektra mastných kyselin bylo použito celkem 113 vzorků venózní krve od 56 pacientů s rakovinou prsu. Vzorky byly poskytnuty v rámci kontrol laboratorních výsledků pacientů během roku 2015. První odběr byl proveden u všech pacientů po léčbě doxorubicinem, druhý během léčbě taxany a třetí po léčbě taxany. Do zpracování byly vzorky zamrazeny při teplotě -70°C.

Pacienti byli rozděleni podle množství odebraných vzorků na 2 skupiny. V první skupině jsou pacienti, u nichž byla krev odebrána jednou, a to po léčbě doxorubicinem. Hodnoty těchto pacientů byly spolu s prvními odběry z dalších dvou skupin použity jako kontrolní hodnoty pro vstupní porovnání. Bylo sledováno, zda snížené nebo zvýšené hodnoty jednotlivých mastných kyselin korelují s výskytem polyneuropatie či nikoliv.

Do druhé skupiny byli zařazeni pacienti, kterým byla krev odebrána dvakrát nebo třikrát, po léčbě doxorubicinem, během chemoterapie taxany a po léčbě taxany. Tato skupina byla využita ke sledování variability podílu sledovaných mastných kyselin během celého procesu chemoterapie.

Informace o pacientech (pohlaví, věk, výskyt CIPN a data odběrů) jsou uvedeny v tabulkách č. 2, 3 a 4.

	POHLAVÍ	VĚK	CIPN	DATUM ODBĚRU
1.	žena	67	ano	06.02.2015
2.	žena	67	ano	09.06.2015
3.	muž	73	ano	03.08.2015
4.	žena	62	ano	14.07.2015
5.	žena	72	ano	25.03.2015
6.	žena	34	ano	12.03.2015
7.	žena	75	ano	01.04.2015
8.	žena	49	ano	29.01.2015
9.	muž	65	ne	21.05.2015
10.	žena	73	ne	02.06.2015
11.	žena	70	ne	18.02.2015
12.	žena	75	ne	25.03.2015
13.	žena	71	ne	14.07.2015
14.	žena	75	ne	09.02.2015
15.	žena	46	ne	24.07.2015
16.	žena	55	ne	07.05.2015
17.	žena	34	ne	11.08.2015
18.	žena	73	ne	01.06.2015

Tabulka č. 2: Informace o pacientech, kterým byla krev odebrána pouze jednou po léčbě doxorubicinem

Zdroj: vlastní zpracování

	POHLAVÍ	VĚK	CIPN	DATUM 1. ODBĚRU	DATUM 2. ODBĚRU
1.	žena	50	ano	31.07.2015	21.08.2015
2.	žena	49	ano	10.07.2015	31.07.2015
3.	žena	68	ano	10.08.2015	31.08.2015
4.	žena	69	ano	29.01.2015	26.03.2015
5.	žena	66	ano	18.05.2015	09.06.2015
6.	žena	65	ano	23.06.2015	14.07.2015
7.	žena	66	ano	20.02.2015	20.03.2015
8.	muž	51	ano	27.08.2015	22.10.2015
9.	žena	62	ano	20.04.2015	11.05.2015
10.	muž	64	ano	25.06.2015	05.08.2015
11.	žena	59	ano	16.05.2015	03.06.2015
12.	žena	71	ano	04.09.2015	25.09.2015
13.	žena	78	ano	24.04.2015	07.05.2015
14.	žena	59	ano	14.07.2015	04.08.2015
15.	žena	41	ne	16.10.2015	13.11.2015
16.	muž	55	ne	25.09.2015	19.10.2015
17.	žena	37	ne	18.09.2015	09.10.2015
18.	žena	49	ne	04.09.2015	20.11.2015
19.	žena	68	ne	06.02.2015	10.04.2015

Tabulka č. 3: Informace o pacientech, kterým byla krev odebrána dvakrát, po léčbě doxorubicinem a během léčby taxany

Zdroj: vlastní zpracování

	POHLAVÍ	VĚK	CIPN	DATUM 1. ODBĚRU	DATUM 2. ODBĚRU	DATUM 3. ODBĚRU
1.	žena	64	ano	13.03.2015	03.04.2015	29.05.2015
2.	žena	37	ano	20.05.2015	10.06.2015	05.08.2015
3.	žena	51	ano	16.03.2015	13.04.2015	01.06.2015
4.	žena	56	ano	01.06.2015	22.06.2015	03.08.2015
5.	žena	56	ano	16.03.2015	08.04.2015	01.06.2015
6.	žena	65	ano	08.04.2015	29.04.2015	01.07.2015
7.	žena	72	ano	21.08.2015	11.09.2015	06.11.2015
8.	žena	46	ano	04.09.2015	25.09.2015	20.11.2015
9.	žena	45	ano	28.08.2015	18.09.2015	13.11.2015
10.	žena	72	ano	09.07.2015	30.07.2015	24.09.2015
11.	žena	50	ano	08.04.2015	29.04.2015	24.06.2015
12.	žena	68	ne	12.03.2015	09.04.2015	05.06.2015
13.	žena	36	ne	09.07.2015	30.07.2015	24.09.2015
14.	žena	53	ne	07.05.2015	29.05.2015	23.07.2015
15.	žena	41	ne	24.04.2015	18.05.2015	13.07.2015
16.	žena	75	ne	29.04.2015	27.05.2015	15.07.2015
17.	žena	55	ne	12.06.2015	03.07.2015	28.08.2015
18.	žena	53	ne	30.01.2015	20.02.2015	17.04.2015
19.	žena	52	ne	13.03.2015	03.04.2015	29.05.2015

Tabulka č. 4: Informace o pacientech, kterým byla krev odebrána třikrát, po léčbě doxorubicinem, během léčby taxany a po léčbě taxany

Zdroj: vlastní zpracování

Do experimentální části diplomové práce byly použity hodnoty od 56 pacientů, přičemž z celkového počtu bylo 51 žen a 5 mužů. Průměrný věk všech pacientů ze všech skupin je $59,1 \pm 12,2$ let (medián 62,0).

Průměrný věk všech mužů je $61,6 \pm 7,8$ let (medián 64,0), v 1. skupině $69,0 \pm 4$ let (medián 69,0), v 2. skupině $56,7 \pm 5,4$ let (medián 55,0) a ve 3. skupině muži nebyli.

U žen byl celkový průměrný věk $58,9 \pm 12,5$ let (medián 62,0), v 1. skupině $62,4 \pm 13,9$ let (medián 68,5), v 2. skupině $59,8 \pm 11,1$ let (medián 63,5) a ve 3. skupině $55,1 \pm 11,4$ let (medián 53,0).

3.3 PRACOVNÍ POSTUP

Prvním krokem bylo rozmražení vzorků a jejich vytemperování na laboratorní teplotu. Následně byly eppendorfovy mikrozkušavky s krví vloženy do ultrazvukové lázně, aby došlo k rozrušení membrán erytrocytů. Od každého vzorku bylo do skleněných zkumavek odpipetováno 200 μ l krve a k tomu přidáno 5 ml směsi hexan:isopropanol v poměru 3:2. Vzorky byly důkladně protřepány na třepačce a poté 5 minut stáčeny v centrifuze při 3000 ot./min. při 4°C. Vzniklý supernatant, tedy organická fáze, byl odpipetován do acylačních zkumavek. Extrakce byla provedena ještě jednou, nyní se 2 ml směsi hexan:isopropanol. Supernatanty z obou extrakcí byly spojeny a následně odpařeny pod dusíkem v termobloku vyhříváném na teplotu 50°C. K odparku bylo přidáno 200 μ l destilované vody a nadále bylo s rozpuštěným odparkem pracováno jako s plazmou.

Do acylačních zkumavek s plazmou bylo napipetováno 50 μ l C17 0,5 mM interního standardu, 3 ml methanolu a 1 ml směsi toluen:acetylchlorid v poměru 4:1. Zkušavky se uzavřely víčky s gumovým těsněním, aby nedocházelo k úniku organické fáze. Uzavřené zkumavky byly opět nechány důkladně protřepat na třepačce po dobu 15 minut a následně nechány 1 hodinu inkubovat v horkovzdušném termostatu vyhřátém na 100°C. Po vychladnutí zkumavek bylo ke každému vzorku přidáno 6 ml 12 % K₂CO₃ (uhličitan draselný). Vzorky se nechaly 15 minut promísit na rotátoru a poté byly zcentrifugovány 5 minut při 3000 ot./min. při 4°C. Vrchní čirá vrstva byla odpipetována do připravených vialek a uzavřena hliníkovými víčky pomocí crimper kleští. Takto připravené vzorky k analýze byly postupně ukládány do mrazícího boxu, do té doby, než byly připraveny všechny a mohly být analyzovány na plynovém chromatografu.

3.4 CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA

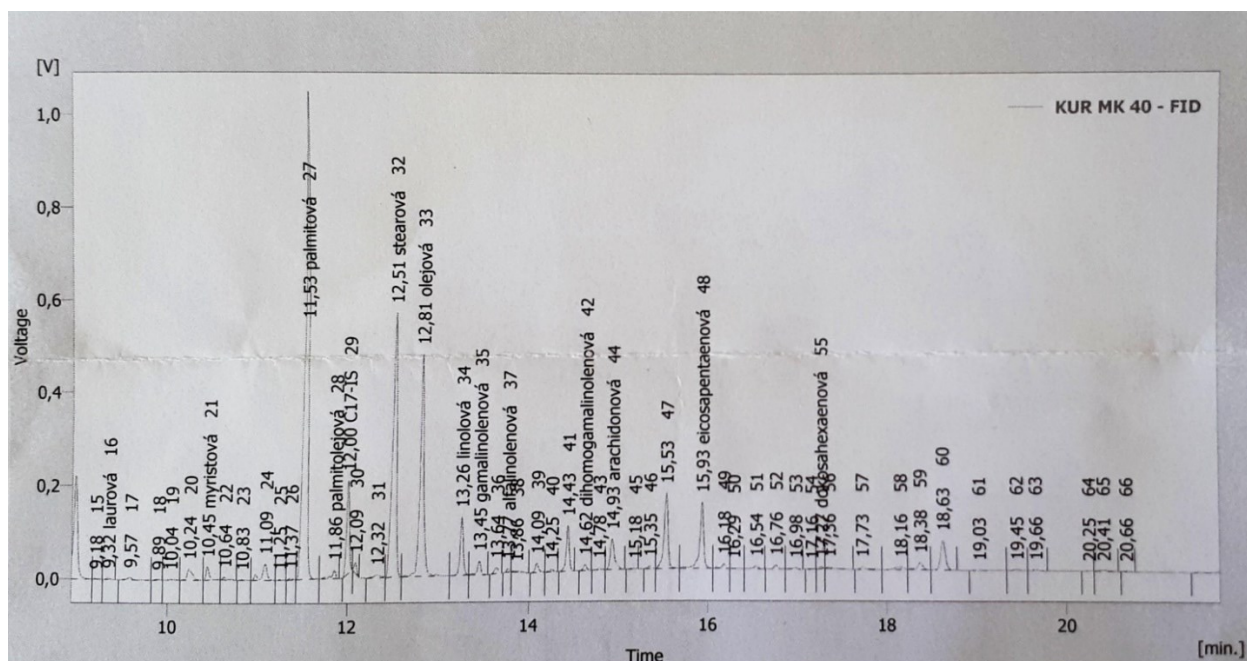
Analýzu plynovým chromatografem GC 8000 series s následnou FID detekcí zajistil MUDr. Radomír Hyšpler, Ph.D z výzkumné laboratoře III. Interní gerontometabolické kliniky. Pro analýzu byla použita kapilární kolona SPTM 2330²⁵ a byly použity tyto chromatografické podmínky:

- tlak nosného plynu- helia 300 kPa
- objem nástřiku 2 μ l
- teplota injektoru 280 °C
- teplota termostatu kolony 110 °C po dobu prvních 2 minut
- teplotní gradient 14 °C za 1 minutu, max. 250 °C
- teplota detektoru 330 °C

Na chromatogramu bylo identifikováno 13 mastných kyselin a vnitřní standard, podle kterého bylo možné se orientovat. Na obrázku č. 17 je zobrazen chromatogram mastných kyselin, se kterým bylo pracováno jako se standardem. S tímto standardním záznamem byly porovnány záznamy, které vznikly změřením připravených vzorků. Píkům tak bylo možné přiřadit jejich retenční časy. Plocha pod každým píkem byla automaticky vypočítána v programu Clarity od firmy DataApex, který byl použit i pro přiřazování retenčních časů k píkům.

Interní standard a mastné kyseliny, které byly na chromatogramu identifikovány, byly v tomto pořadí:

- kyselina laurová
- kyselina myristová
- kyselina palmitová
- kyselina palmitolejová
- C17 IS
- kyselina stearová
- kyselina olejová
- kyselina linolová
- kyselina γ -linolenová
- kyselina α -linolenová
- kyselina dihomo- γ -linolenová
- kyselina arachidonová
- kyselina eikosapentaenová
- kyselina dokosahexaenová



Obrázek č. 17: Chromatogram standardního vzorku

Zdroj: vlastní fotografie

3.5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

Díky vypočítaným plochám pod píky bylo možné stanovit procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích, které sloužilo k srovnání mezi jednotlivými analyzovanými vzorky a jako podklad pro deskriptivní statistiku. Kromě toho, byly v programu vypočítány ještě tyto hodnoty:

- tSFA = suma nasycených mastných kyselin v %
- tMUFA = suma mononenasycených mastných kyselin v %
- ω -3 PUFA = suma ω -3 polynenasycených mastných kyselin v %
- ω -6 PUFA = suma ω -6 polynenasycených mastných kyselin v %
- Δ -9 = poměr kyseliny olejové a stearové
- Δ -5 = poměr kyseliny arachidonové a dihomo- γ -linolenové
- AA/EPA = poměr kyseliny arachidonové a eikosapentaenové

Pro statistické zpracování dat byl použit tabulkový software *Microsoft Excel* a pro posouzení normality dat D'Agostino-Pearson *omnibus* K2 testem program *GraphPad Prism*. Pro porovnání středních hodnot (mediánů) mastných kyselin a jejich skupin u pacientů s CIPN a bez CIPN byl použit nepárový, neparametrický Mann-Whitney t-test.

A pro porovnání variability v zastoupení jednotlivých mastných kyselin a jejich skupin během léčby byl použit nepárový, neparametrický test Kruskal-Wallis (ANOVA). Oba dva testy byly provedeny programem *GraphPad*. Pro testování statistických hypotéz byla zvolena hladina významnosti $p = 0,05$.

4. VÝSLEDKY

Deskriptivní statistika jednotlivých mastných kyselin a jejich skupin uvádí počet hodnot, hodnotu minimální a maximální, aritmetický průměr, směrodatnou odchylku, medián, 25% a 75% percentil a normalitu rozdělení dat. Pro přehlednost byla vytvořena tabulka č. 5, která všechna tato data obsahuje.

Hodnoty procentuálního zastoupení pro sledované mastné kyseliny byly zpracovány formou sloupcových grafů. Pro každou mastnou kyselinu či skupinu mastných kyselin je vedle grafického znázornění vytvořena ještě tabulka č. 6, obsahující statisticky významné rozdíly mezi hodnotami pacientů z druhé a třetí skupiny s CIPN a bez CIPN.

	kyselina laurová		kyselina myristová		kyselina palmitová		kyselina palmitolejová	
	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE
počet hodnot	33	23	33	23	33	23	33	23
minimální hodnota	0,054	0,164	0,358	0,227	31,026	37,933	0,145	0,401
maximální hodnota	24,037	0,845	5,816	7,113	54,363	55,014	6,646	1,245
aritmetický průměr	1,083	0,406	1,710	1,828	43,176	44,194	1,136	0,886
směrodatá odchylka	4,060	0,162	0,961	1,595	4,712	4,703	1,284	0,238
medián	0,348	0,380	1,450	1,282	42,769	42,688	0,765	0,767
25% percentil	0,268	0,306	1,198	1,064	41,414	41,110	0,640	0,655
75% percentil	0,507	0,451	1,916	1,974	44,323	45,317	1,086	0,953
normalita rozdělení	ne	ne	ne	ne	ano	ne	ne	ano
	kyselina stearová		kyselina olejová		kyselina linolová		kyselina γ -linolenová	
	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE
počet hodnot	33	23	33	23	33	23	33	23
minimální hodnota	0,475	0,624	0,076	0,076	0,956	0,183	0,115	0,156
maximální hodnota	38,005	33,519	29,556	32,351	14,646	22,539	2,613	2,833
aritmetický průměr	25,061	24,577	15,851	16,022	3,414	3,536	0,847	1,088
směrodatá odchylka	7,533	7,968	7,283	7,332	2,434	4,170	0,549	0,543
medián	24,544	25,183	18,149	17,955	2,980	2,816	0,675	0,940
25% percentil	23,220	23,868	14,839	13,165	2,350	2,348	0,499	0,625
75% percentil	27,179	29,310	19,695	19,611	3,631	3,341	1,110	1,326
normalita rozdělení	ne	ne	ne	ano	ne	ne	ne	ano
	kyselina α -linolenová		kyselina dihomo- γ -linolenová		kyselina arachidonová		kyselina eikosapentaenová	
	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE
počet hodnot	33	23	33	23	33	23	33	23
minimální hodnota	0,097	0,104	0,166	0,188	0,264	0,383	0,040	0,880
maximální hodnota	1,799	0,809	14,128	3,666	3,212	3,296	7,582	6,582
aritmetický průměr	0,509	0,392	0,791	0,528	1,732	1,929	3,790	4,171
směrodatá odchylka	0,368	0,211	2,395	0,711	0,703	0,710	2,568	2,401
medián	0,480	0,378	0,293	0,312	1,882	1,938	5,196	5,131
25% percentil	0,201	0,204	0,246	0,263	1,477	1,559	0,372	1,967
75% percentil	0,653	0,533	0,352	0,418	2,093	2,261	5,880	5,970
normalita rozdělení	ne	ano	ne	ne	ano	ano	ne	ano
	kyselina dokosahehexaenová		tSFA		tmFA		ω 6	
	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE
počet hodnot	33	23	33	23	33	23	33	23
minimální hodnota	0,021	0,097	50,300	49,167	0,221	1,140	3,217	3,203
maximální hodnota	7,084	3,948	91,822	91,987	36,202	33,564	23,832	25,641
aritmetický průměr	0,901	0,605	71,029	71,004	16,987	16,828	6,784	7,001
směrodatá odchylka	1,574	0,907	8,494	9,061	7,407	7,303	3,765	4,282
medián	0,197	0,199	69,066	68,737	19,024	18,768	5,950	6,136
25% percentil	0,150	0,163	66,592	66,941	15,567	13,894	5,362	5,044
75% percentil	0,795	0,656	74,105	76,402	20,362	20,252	6,687	7,256
normalita rozdělení	ne	ne	ano	ano	ano	ano	ne	ne
	ω 3		Δ 9		AA/EPA		Δ 5	
	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE	CIPN ANO	CIPN NE
počet hodnot	33	23	33	23	33	23	33	23
minimální hodnota	0,369	1,833	0,002	0,003	0,069	0,127	0,052	0,246
maximální hodnota	8,502	7,248	44,959	36,241	27,617	36,762	11,940	12,009
aritmetický průměr	5,200	5,167	2,759	3,325	3,508	3,512	5,884	5,897
směrodatá odchylka	1,904	1,809	8,720	8,961	6,373	8,190	2,790	2,632
medián	5,986	5,820	0,740	0,705	0,377	0,367	6,499	6,089
25% percentil	4,126	4,096	0,531	0,448	0,307	0,289	5,322	5,363
75% percentil	6,444	6,631	0,826	0,817	4,938	0,737	7,039	7,026
normalita rozdělení	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ano	ano

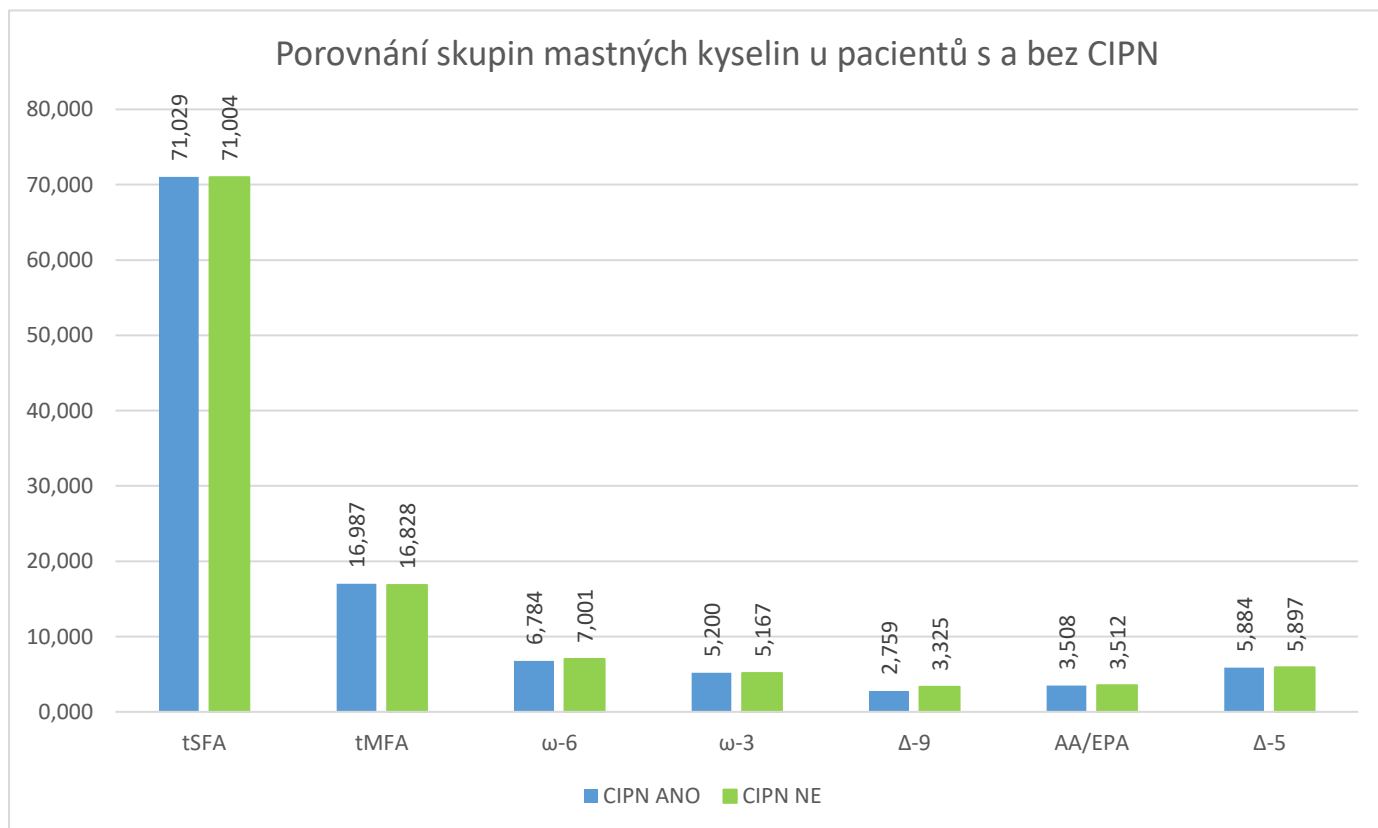
Tabulka č. 5: Deskriptivní statistika pro jednotlivé mastné kyseliny a jejich skupiny

Zdroj: vlastní zpracování

4.1 ZMĚNY V HLADINÁCH MASTNÝCH KYSELIN A JEJICH SKUPIN PO LÉČBĚ DOXORUBICINEM V SOUVISLOSTI S VÝSKYTEM POLYNEUROPATIE

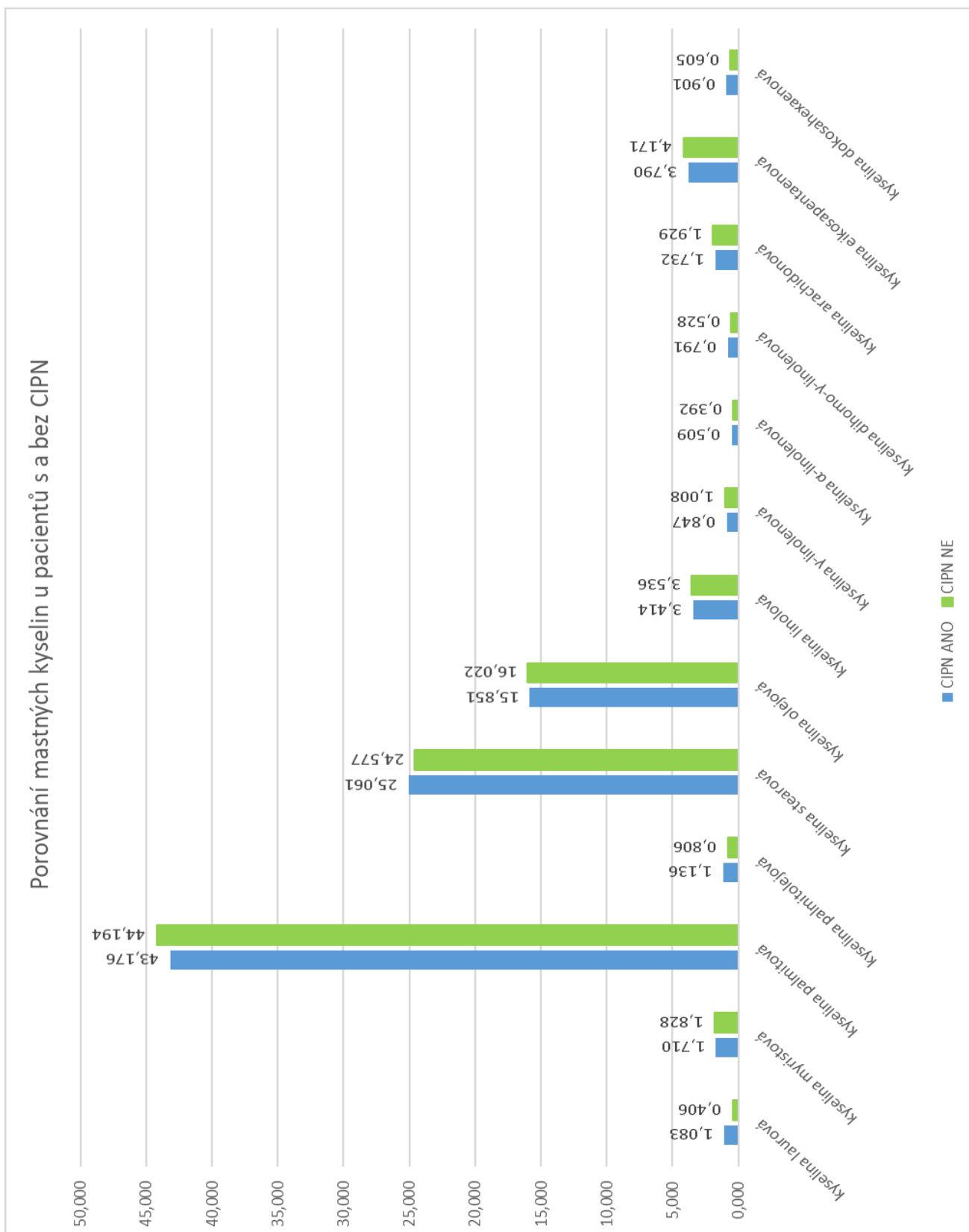
Hodnoty naměřené u první skupiny pacientů, kterým byla krev odebrána pouze jednou a hodnoty z prvních odběrů skupiny druhé a třetí, byly použity pro vzájemné porovnání a bylo sledováno, zda snížené či zvýšené hodnoty jednotlivých mastných kyselin a jejich skupin korelují s výskytem CIPN či nikoliv.

Pro velké množství dat, byly hodnoty pro každou mastnou kyselinu a skupinu mastných kyselin zprůměrovány a z těchto aritmetických průměrů byly pro přehlednost vytvořeny grafy č. 2 a č. 3. Na grafu č. 2 je vyobrazeno porovnání skupin mastných kyselin u pacientů, u kterých se CIPN projevil a u kterých se neprojevil. Každý sloupec je navíc doplněn o průměrnou hodnotu procentuálního zastoupení jednotlivých skupin. To samé platí pro graf č. 3, kde je však uvedeno porovnání jednotlivých mastných kyselin.



Graf č. 2: Porovnání skupin mastných kyselin u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



Graf č. 3: Porovnání jednotlivých mastných kyselin u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování

Po statistické analýze Mann-Whitney testem bylo zjištěno, že mezi hodnotami mastných kyselin a jejich skupin u pacientů s vyvinutým CIPN a bez CIPN nejsou signifikantní rozdíly, což lze vidět i na grafech č. 2 a č. 3.

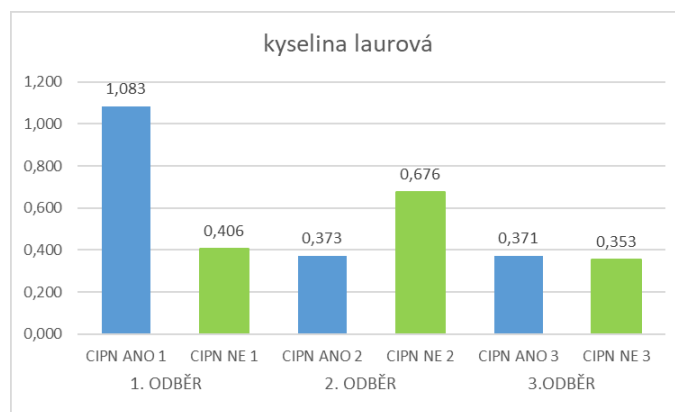
4.2 VARIABILITA V ZASTOUPENÍ SLEDOVANÝCH MASTNÝCH KYSELIN V PRŮBĚHU CHEMOTERAPIE TAXANY V SOUVISLOSTI S VÝSKYTEM POLYNEUROPATIE

Pro zjištění variability mastných kyselin byly použity hodnoty naměřené u druhé a třetí skupiny pacientů, kterým byla krev odebrána dvakrát, resp. třikrát v průběhu chemoterapie. Pro jednotlivé mastné kyseliny byly vytvořeny grafy, které zobrazují jejich průměrné procentuální zastoupení v průběhu chemoterapie. U každého odběru jsou pacienti rozděleni na ty s vyvinutým CIPN a bez CIPN.

Pro vytvoření grafického znázornění byly opět použity hodnoty aritmetického průměru z každého souboru dat, které jsou zobrazeny nad jednotlivými sloupci v grafu.

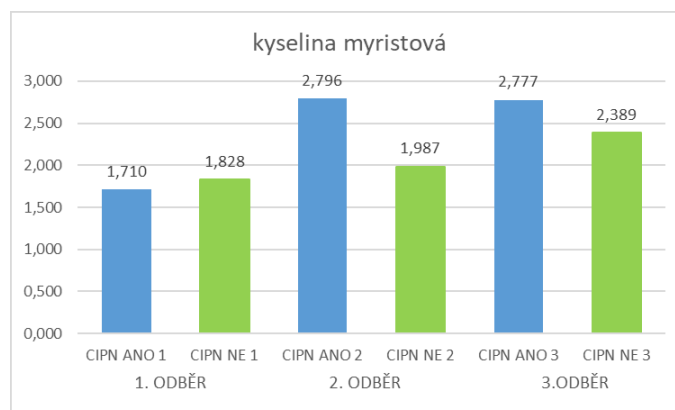
Pro lepší přehlednost byly do této části diplomové práce vloženy jednotlivé grafy (č. 4 až č. 23) pro každou mastnou kyselinu a pro sledované skupiny. Celkový graf byl z důvodu velkého množství dat nepřehledný.

Za posledním grafem v této části je vložena tabulka č. 6, která obsahuje informace ze statistické analýzy provedené Kruskal-Wallis testem. Porovnána byla získaná data jednotlivých mastných kyselin a jejich skupin v průběhu celé léčby. Byly tedy porovnány vždy dvě nebo tři hodnoty podle toho, kolikrát byla krev odebrána. Tabulka je navíc rozdělena na výsledky od pacientů s CIPN a bez CIPN. Diferencí je míněna variabilita (signifikantní rozdíl) mastných kyselin mezi odběry.



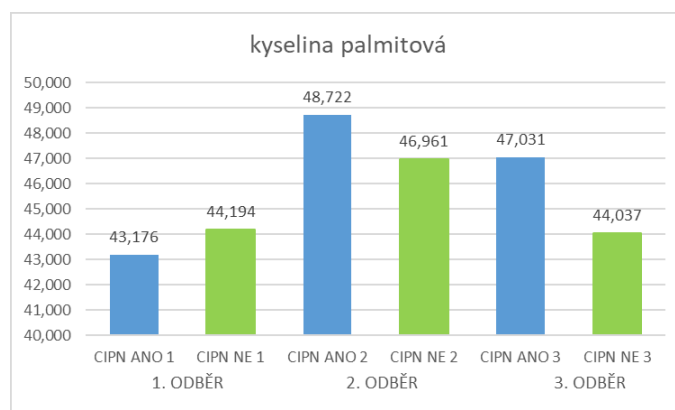
Graf č. 4: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny laurové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



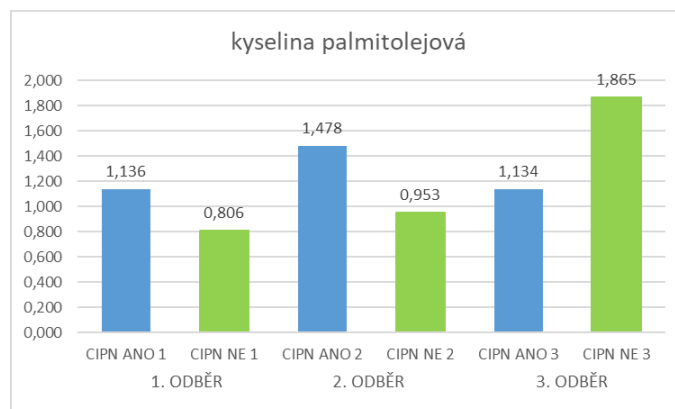
Graf č. 5: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny myristové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



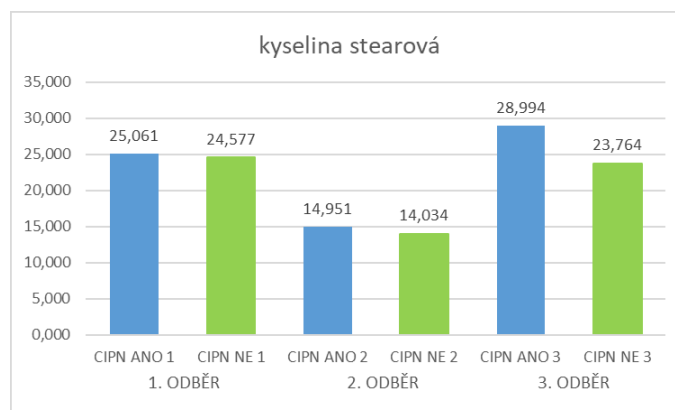
Graf č. 6: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny palmitové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



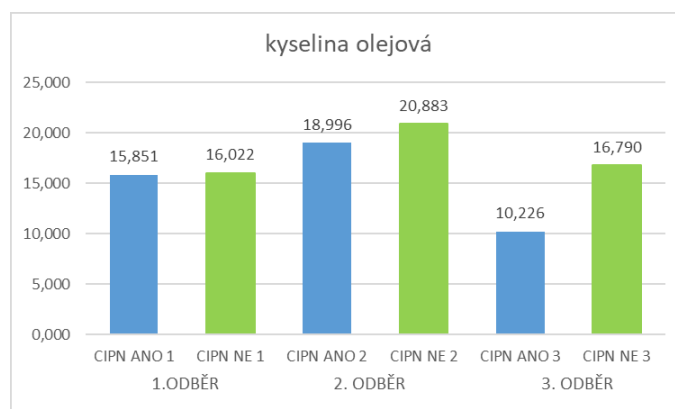
Graf č. 7: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny palmitolejové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



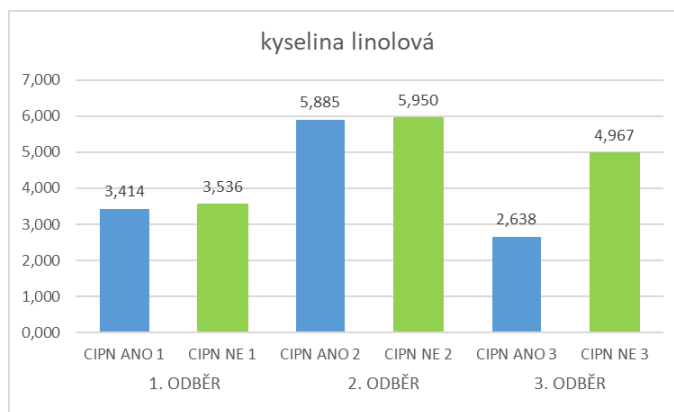
Graf č. 8: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny stearové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



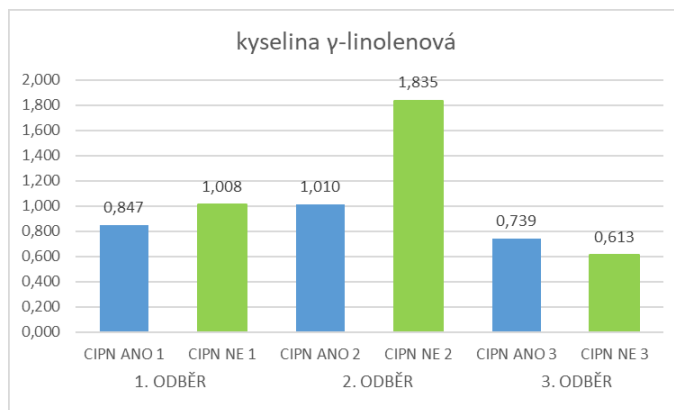
Graf č. 9: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny olejové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



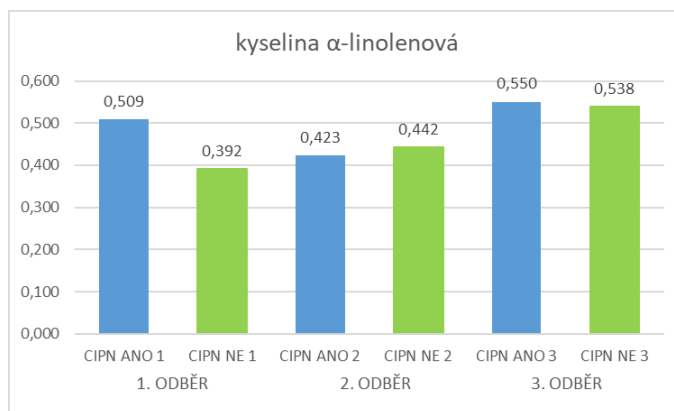
Graf č. 10: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny linolové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



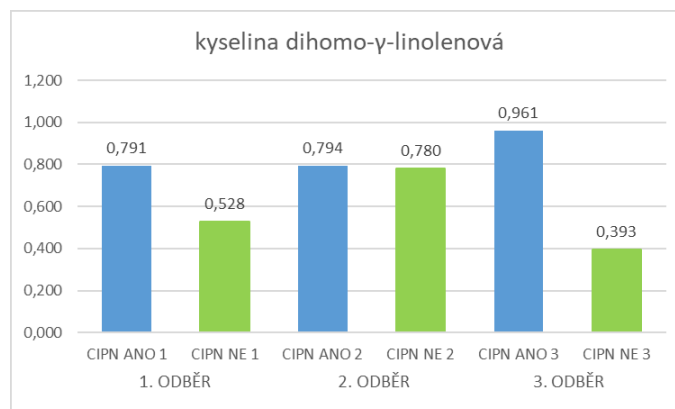
Graf č. 11: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny γ-linolenové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



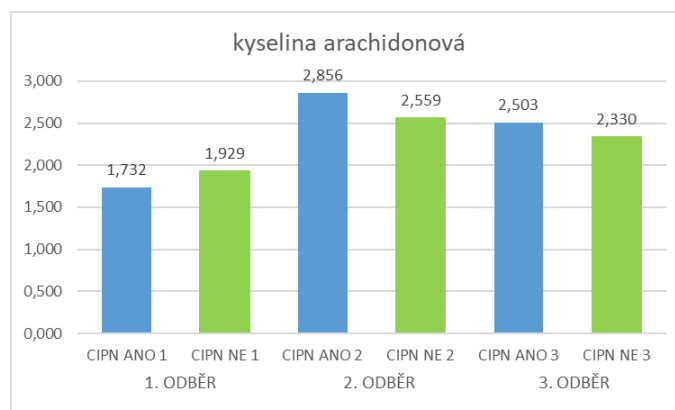
Graf č. 12: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny α-linolenové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



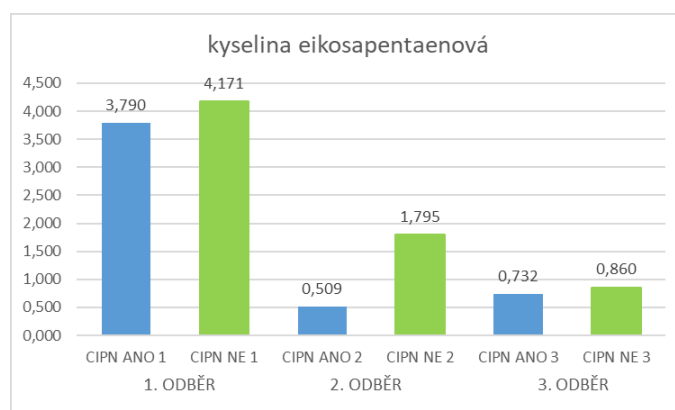
Graf č. 13: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny dihomu-γ-linolenové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



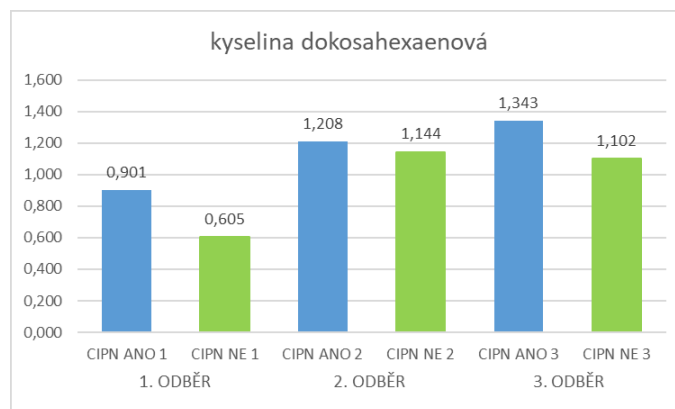
Graf č. 14: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny arachidonové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



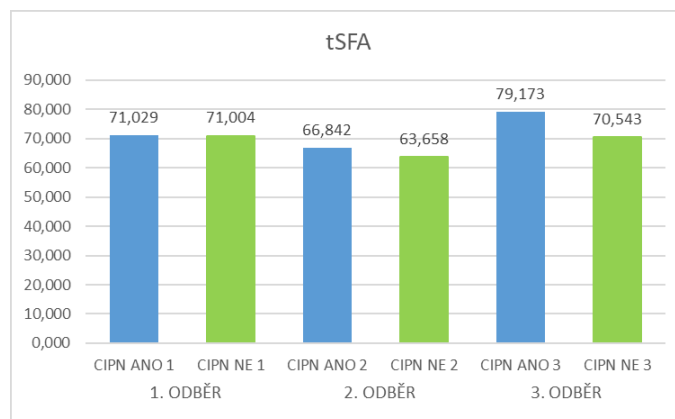
Graf č. 15: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny eikosapentaenové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



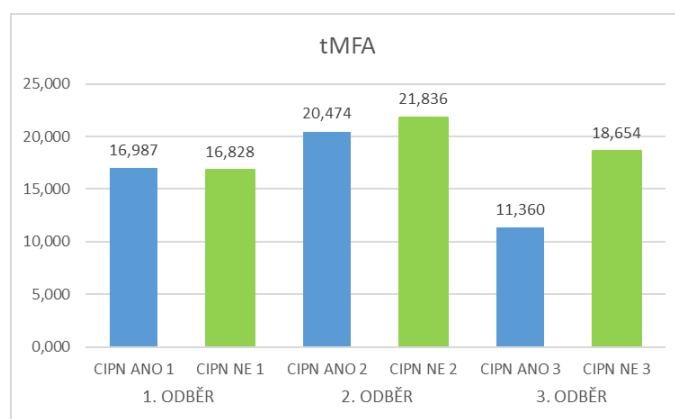
Graf č. 16: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny dokosahexaenové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



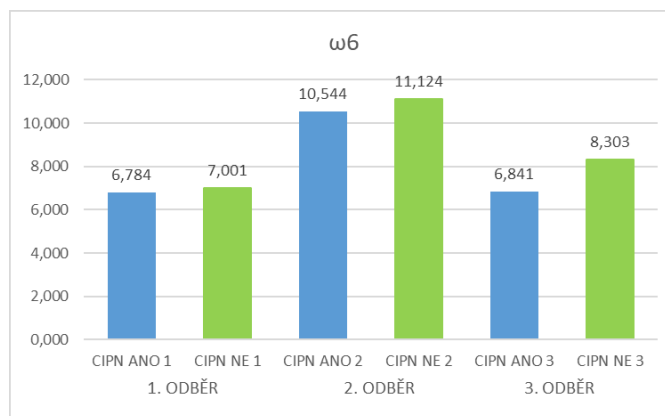
Graf č. 17: Průměrné procentuální zastoupení nasycených mastných kyselin během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



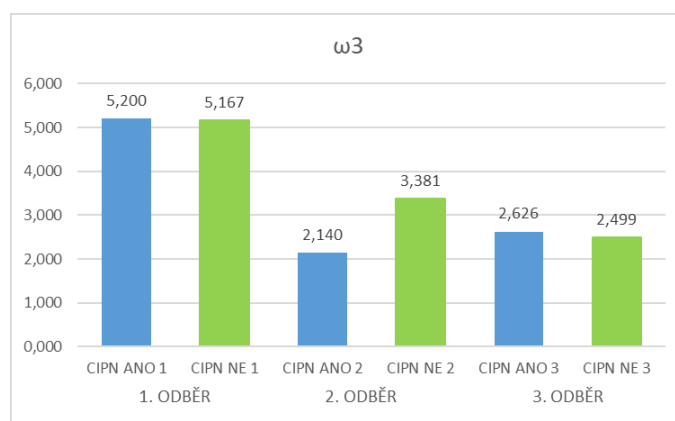
Graf č. 18: Průměrné procentuální zastoupení mononenasycených mastných kyselin během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



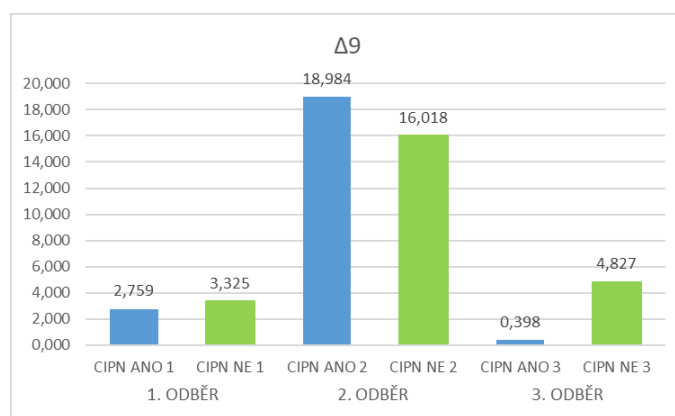
Graf č. 19: Průměrné procentuální zastoupení ω -6 mastných kyselin během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



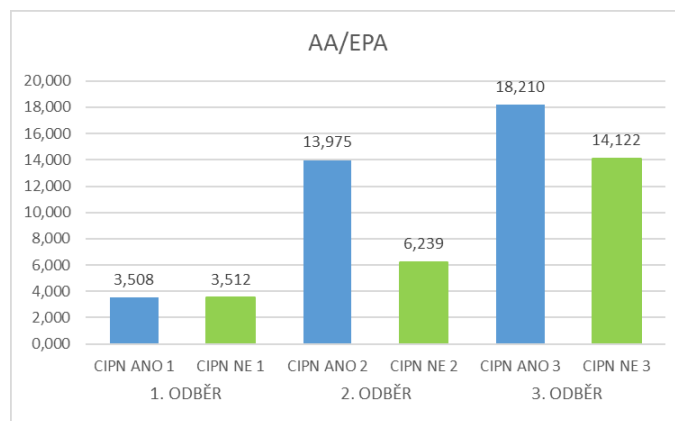
Graf č. 20: Průměrné procentuální zastoupení ω -3 mastných kyselin během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



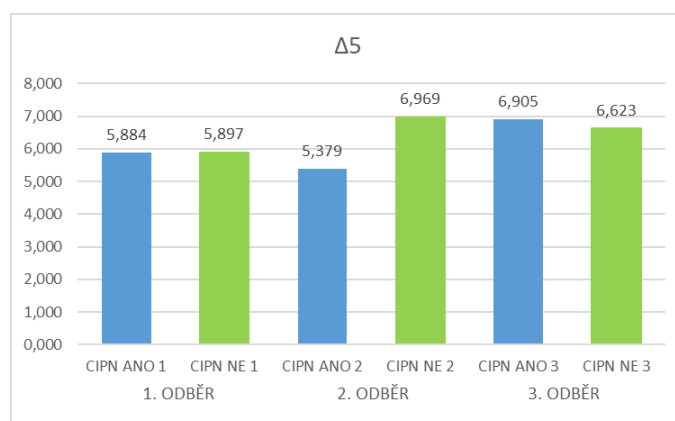
Graf č. 21: Průměrné procentuální zastoupení Δ -9 mastných kyselin během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



Graf č. 22: Průměrné procentuální zastoupení poměru AA/EPA během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování



Graf č. 23: Průměrné procentuální zastoupení Δ-5 mastných kyselin během celé léčby u pacientů s a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování

	CIPN ANO		CIPNE NE	
	p hodnota	diference	p hodnota	diference
kyselina laurová	0,7038	NE	0,6598	NE
kyselina myristová	0,0094	ANO	0,222	NE
kyselina palmitová	0,0047	ANO	0,0081	ANO
kyselina palmitolejová	0,0576	NE	0,0079	ANO
kyselina stearová	0,0082	ANO	0,1034	NE
kyselina olejová	0,007	ANO	0,2607	NE
kyselina linolová	0,3329	NE	0,6217	NE
kyselina γ -linolenová	0,3236	NE	0,0681	NE
kyselina α -linolenová	0,5687	NE	0,5639	NE
kyselina dihomogamma-linolenová	0,0053	ANO	0,3026	NE
kyselina arachidonová	0,0001	ANO	0,4224	NE
kyselina eikosapentaenová	0,0001	ANO	0,0004	ANO
kyselina dokosaheptaenová	0,0001	ANO	0,0016	ANO
tSFA	0,0225	ANO	0,3767	NE
tMFA	0,017	ANO	0,1923	NE
ω 6	0,2705	NE	0,8428	NE
ω 3	0,0001	ANO	0,0009	ANO
Δ 9	0,0073	ANO	0,1831	NE
AA/EPA	0,0001	ANO	0,0003	ANO
Δ 5	0,3077	NE	0,3653	NE

Tabulka č. 6: Analýza dat pro nalezení signifikance rozdílu hodnot mezi jednotlivými odběry u pacientů s CIPN a bez CIPN

Zdroj: vlastní zpracování

U pacientů s vyvinutým CIPN byl signifikantní rozdíl mezi odběry pozorován u kyseliny myristové, palmitové, stearové, olejové, dihomogamma-linolenové, arachidonové, eikosapentaenové a dokosaheptaenové, což odpovídá i skupinám tSFA, tMFA, ω 3, Δ 9 a poměru AA/EPA.

U pacientů bez CIPN byl nalezen rozdíl mezi odběry u kyseliny palmitové, palmitolejové, eikosapentaenové a dokosaheptaenové. U skupin byl rozdíl mezi odběry u ω 3 a poměru AA/EPA.

Variabilita mastných kyselin mezi odběry je častější u pacientů s CIPN.

5. DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo zaprvé, stanovit zastoupení jednotlivých mastných kyselin a jejich skupin v krvi u pacientů léčených doxorubicinem. Stanovená spektra mastných kyselin porovnat a pokusit se zjistit, zda se zastoupení mastných kyselin liší u pacientů s vyvinutou chemoterapií indukovanou polyneuropatií od pacientů bez této polyneuropatie. A za druhé, porovnat získaná spektra mastných kyselin a zjistit, zda v průběhu chemoterapeutické léčby došlo nebo nedošlo ke změně v zastoupení jednotlivých mastných kyselin a jejich skupin.

Biologický materiál pocházel od pacientů s diagnostikovanou rakovinou prsu a byl získán v rámci kontrol laboratorních výsledků pacientů. Experimentu se účastnilo celkem 56 pacientů, 51 žen a 5 mužů, jejichž průměrný věk je $59,1 \pm 12,2$ let (medián 62 let).

Pacienti byli rozděleni do třech skupin. První skupinu tvořili ti, kterým byla krev odebrána pouze jednou po léčbě doxorubicinem. Jednalo se o 18 osob, 16 žen a 2 muže, z čehož 8 pacientů trpělo symptomy CIPN. V druhé skupině pacienti podstoupili odběry dva, po léčbě doxorubicinem a po léčbě taxany. Skupinu tvořilo 19 osob, 16 žen a 3 muži, z čehož 14 pacientů trpělo symptomy CIPN. A do třetí skupiny byli zařazeni pacienti se třemi odběry, po léčbě doxorubicinem, po léčbě taxany a na konci léčby. Jednalo se o 19 osob, pouze ženského pohlaví, z čehož 11 pacientek trpělo symptomy CIPN.

Příprava vzorků a jejich chromatografická analýza byla uskutečněna ve Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Přičemž z původního množství 116 vzorků, bylo do práce použito vzorků pouze 113, z důvodu nedetekovatelnosti hodnot u těchto tří vzorků.

V první části experimentu, kde mělo být zjištěno, zda snížené či zvýšené množství mastných kyselin koreluje s výskytem CIPN, bylo dospěno k těmto zjištěním:

- u pacientů s CIPN byly zvýšeny hodnoty kyseliny laurové, palmitolejové, stearové, dihomog- γ -linolenové, dokosaheptaenové a skupin SFA, MFA a ω 3

- u pacientů bez CIPN byly zvýšeny hodnoty kyseliny myristové, palmitové, olejové, linolové, γ -linolenové, α -linolenové, arachidonové, eikosapentaenové a skupin ω -6, Δ -9, AA/EPA a Δ -5

Zvýšení či snížení hodnot bylo však téměř zanedbatelné, tudíž signifikantní rozdíly mezi hodnotami zjištěny nebyly.

V druhé části experimentu, kde měla být zaznamenána variabilita mastných kyselin mezi jednotlivými odběry v průběhu léčby, bylo dospěno k těmto zjištěním:

- u pacientů s CIPN byl signifikantní rozdíl mezi jednotlivými odběry pozorován u kyseliny myristové, palmitové, stearové, olejové, dihomogamma-linolenové, arachidonové, eikosapentaenové a dokosaheptaenové, což odpovídá i skupinám tSFA, tMFA, ω -3, Δ -9 a poměru AA/EPA
- u pacientů bez CIPN byl signifikantní rozdíl mezi jednotlivými odběry pozorován u kyseliny palmitové, palmitoolejové, eikosapentaenové, dokosaheptaenové a u skupiny ω -3 a poměru AA/EPA
- variabilita mastných kyselin je častější u pacientů s CIPN
- u pacientů s CIPN byl rozdíl mezi odběry 1. < 2. > 3. zaznamenán u kyseliny myristové, palmitové, palmitoolejové, olejové, linolové, γ -linolenové, arachidonové, skupiny tMFA, ω -6 a Δ -9
- u pacientů bez CIPN byl rozdíl mezi odběry 1. < 2. > 3. zaznamenán u kyseliny laurové, palmitové, olejové, linolové, γ -linolenové, dihomogamma-linolenové, arachidonové, dokosaheptaenové a u skupin tMFA, ω -6, Δ -9 a Δ -5
- u pacientů s CIPN byl rozdíl mezi odběry 1. > 2. < 3. zaznamenán u kyseliny stearové, eikosapentaenové, skupiny tSFA, ω -3 a Δ -5
- u pacientů bez CIPN byl rozdíl mezi odběry 1. > 2. < 3. zaznamenán u kyseliny stearové, α -linolenové a skupiny tSFA
- u pacientů s CIPN byl rozdíl mezi odběry 1. > 2. > 3. zaznamenán u kyseliny laurové
- u pacientů bez CIPN byl rozdíl mezi odběry 1. > 2. > 3. zaznamenán u kyseliny eikosapentaenové a skupiny ω -3
- u pacientů s CIPN byl rozdíl mezi odběry 1. < 2. < 3. zaznamenán u kyseliny α -linolenové, dihomogamma-linolenové, dokosaheptaenové a poměru AA/EPA

- u pacientů s CIPN byl rozdíl mezi odběry 1. < 2. < 3. zaznamenán u kyseliny myristové, palmitolejové a poměru AA/EPA

Přestože záměrem práce nebylo vyvodit jednoznačné závěry, ale pouze popsat výsledky práce a pokusit se je statisticky vyhodnotit, lze konstatovat, že hladina mastných kyselin během procesu chemoterapie není konstantní, ale variabilní.

Výzkum postavení mastných kyselin v lidském organismu v souvislosti s patologickými stavy a lékovou terapií je stále v začátcích, proto je dostupnost zdrojů pro porovnání zjištěných výsledků omezená.

Studie o vybraných rizikových nutričních aspektech CIPN od pracovníků z Výzkumné laboratoře III. interní gerontometabolické kliniky a oddělení Onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice v Hradci Králové poukazuje na významně vyšší hladinu skupiny tSFA u pacientů s CIPN, ale také na to, že sumu tSFA nelze použít pro predikci vzniku CIPN. [71] S tímto tvrzením naše zjištění částečně souhlasí. Rozdíl je pouze v tom, že o významném rozdílu mezi hodnotami tSFA hovořit nelze. V našem experimentu byly hladiny tSFA u pacientů s CIPN a bez CIPN téměř identické.

Klinické studie, které se zabývaly vlivem ω -3 a ω -6 mastných kyselin na rakovinu dokázaly, že mají velký vliv na inhibici různých typů rakoviny. Mechanismus vlivu těchto esenciálních mastných kyselin však nebyl zcela odhalen. Kromě inhibičních vlastností v rámci rakovinného bujení, mohou mít EFA pozitivní účinky na pacienta během radioterapie nebo chemoterapie. Důležité poznatky, například o zmenšení nádoru, ale nebyly prokázány. Problém je také v tom, že u ω -6 mastných kyselin byly mimo jiné zaznamenány pronádorové účinky u rakoviny střev nebo prostaty. [16,17,18,19,20]

Dalším problémem je také neznalost složení stravy pacientů, kteří se našeho experimentu účastnili. Není známo, zda během procesu chemoterapie konzumovali či nekonzumovali potravu bohatou na mastné kyseliny, především esenciální mastné kyseliny, takže je možné, že výsledné údaje nemusí být zcela směrodatné.

Dále bylo zjištěno, že ω -3 mastné kyseliny mohou působit neuroprotektivně v souvislosti s profylaxí CIPN. [72] Cesta ke zmírnění projevů CIPN, které pacientům znepříjemňují život, je však stále dlouhá a je zapotřebí se tímto tématem nadále zabývat.

6. ZÁVĚR

Záměrem diplomové práce bylo stanovit zastoupení mastných kyselin v krvi (erytrocytech) pacientů podstupujících léčbu taxany, metodou plynové chromatografie s plameno-ionizační detekcí.

Ze statistického testování získaných hodnot bylo zjištěno, že mezi pacienty trpící chemoterapií indukovanou polyneuropatií a pacienty, kteří CIPN nemají, není statisticky významný rozdíl v zastoupení jednotlivých mastných kyselin.

Dále bylo konstatováno, že zastoupení mastných kyselin v průběhu procesu chemoterapie, tedy po léčbě doxorubicinem a taxany, je proměnné a u pacientů s CIPN výrazněji než u pacientů bez CIPN.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	kyselina arachidonová
ACP	Acyl Carrier Protein, protein nesoucí acyl
ADP	adenosindifosfát
ALA	kyselina α -linolenová
ATP	adenosintrifosfát
C	uhlík
CA	carbohydrate antigen
CDH1	Cadherine 1
CEA	karcinoembryonální antigen
CIPN	Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy, chemoterapií indukovaná periferní neuropatie
cm	centimetr
CoA	koenzym A
CT	Computed Tomography, výpočetní tomografie
DCIS	Ductal Carcinoma In Situ, duktální in situ karcinom
DHA	kyseliny dokosahexaenová
DNA	kyseliny deoxyribonukleová
DRIs	Dietary Reference Intakes, referenční příjem z potravy
EFA	Essential Fatty Acid, esenciální mastná kyselina
EPA	kyselina eikosapentaenová
FAD	flavinadenindinukleotid

FID	Flame Ionization Detector, plamenový ionizační detektor
g	gram
GC	Gas Chromatography, plynová chromatografie
GDP	guanosindifosfát
GLA	kyselina γ -linolenová
GTP	guanosintrifosfát
HIV	Human Immunodeficiency Virus, Virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IDC	Invasive Ductal Carcinoma, invazivní duktální karcinom
ILC	Invasive Lobular Carcinoma, invazivní lobulární karcinom
IS	Interní standard
K ₂ CO ₃	uhličitan draselný
kJ	kilo joul
kPa	kilo pascal
LA	kyselina linolová
LCIS	Lobular Carcinoma In Situ, lobulární in situ karcinom
MAPs	Microtubule Associated Proteins, proteiny asociované s mikrotubuly
miR	mikroRNA
ml	mililitr
ml/min	mililitr za minutu
mM	milimol

NAD	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
NCEP	National Cholesterol Educational Program, národní vzdělávací program o cholesterolu
NIH	National Institute of Health, národní institut zdraví
ot./min.	otáčky za minutu
p53	protein 53
PLOT	Porous Layer Open Tubular, kolona s vnitřní stěnou pokrytou chemicky navázaným sorbentem
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid, polynenasycená mastná kyselina
SCOT	Support Coated Open Tubular, kolona s vnitřní stěnou pokrytou nosičem stacionární fáze
STK11	Serine/Threonin Kinase 11
Tzv.	tak zvaný
WCOT	Wall Coated Open Tubular, kolona s vnitřní stěnou pokrytou vrstvou stacionární fáze
α	alfa
β	beta
γ	gama
Δ -5	poměr kyseliny arachidonové a dihomogama-linolenové
Δ -9	poměr kyseliny olejové a stearová
ω	omega

G2-M	přechod premitotické fáze na mitotickou
(t)MUFA	(total) Monounsaturated Fatty Acid, (total) mononenasyčená mastná kyselina
(t)SFA	(total) Saturated Fatty Acid, (total) nasycená mastná kyselina
°C	stupeň Celsia
μl	mikrolitr

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Časový vývoj hrubé incidence a mortality rakoviny prsu	23
Graf č. 2: Porovnání mastných kyselin u pacientů s a bez CIPN	51
Graf č. 3: Porovnání skupin mastných kyselin u pacientů s a bez CIPN	50
Graf č. 4: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny laurové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	53
Graf č. 5: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny myristové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	53
Graf č. 6: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny palmitové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	53
Graf č. 7: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny palmitolejové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	54
Graf č. 8: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny stearové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	54
Graf č. 9: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny olejové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	54
Graf č. 10: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny linolové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	55
Graf č. 11: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny γ -linolenové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	55
Graf č. 12: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny α -linolenové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	55
Graf č. 13: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny dihomo- γ -linolenové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	56
Graf č. 14: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny arachidonové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	56
Graf č. 15: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny eikosapentaenové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	56
Graf č. 16: Průměrné procentuální zastoupení kyseliny dokosaheptaenové během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	57
Graf č. 17: Průměrné procentuální zastoupení nasycených mastných kyselin během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	57

Graf č. 18: Průměrné procentuální zastoupení mononenasycených mastných kyselin během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	57
Graf č. 19: Průměrné procentuální zastoupení ω -6 mastných kyselin během celé léčby u pacientů s a bez CIPN.....	58
Graf č. 20: Průměrné procentuální zastoupení ω -3 mastných kyselin během celé léčby u pacientů s a bez CIPN.....	58
Graf č. 21: Průměrné procentuální zastoupení Δ -9 mastných kyselin během celé léčby u pacientů s a bez CIPN.....	58
Graf č. 22: Průměrné procentuální zastoupení poměru AA/EPA během celé léčby u pacientů s a bez CIPN	59
Graf č. 23: Průměrné procentuální zastoupení Δ -5 mastných kyselin během celé léčby u pacientů s a bez CIPN.....	59

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Strukturní vzorce kyseliny olejové, linolové a linolenové	9
Obrázek č. 2: Vzorec karnitinu (β -hydroxy- γ -trimethylamoniumbutyrát)	12
Obrázek č. 3: Transport acyl-CoA přes membránu do matrix mitochondrie	12
Obrázek č. 4: Porovnání degradace a syntézy mastných kyselin	16
Obrázek č. 5: Doporučený příjem lipidů	20
Obrázek č. 6: Tvorba polynenasycených mastných kyselin a mediátorů	22
Obrázek č. 7: Podélný řez prsní tkání s invazivním duktálním karcinomem.	25
Obrázek č. 8: Strukturní vzorec paklitaxelu	28
Obrázek č. 9: Strukturní vzorec docetaxelu	29
Obrázek č. 10: Struktura α - a β -tubulinové podjednotky mikrotubulů	30
Obrázek č. 11: Apoptóza.	31
Obrázek č. 12: Mechanismus účinku docetaxelu	32
Obrázek č. 13: Znázornění nervové soustavy u člověka.	36
Obrázek č. 14: Schéma plynového chromatografu	39
Obrázek č. 15: Typy kapilárních kolon	39
Obrázek č. 16: Schéma FID	40
Obrázek č. 17: Chromatogram standardního vzorku	47

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Přehled vybraných mastných kyselin	11
Tabulka č. 2: Informace o pacientech, kterým byla krev odebrána pouze jednou po léčbě doxorubicinem.....	42
Tabulka č. 3: Informace o pacientech, kterým byla krev odebrána dvakrát, po léčbě doxorubicinem a během léčby taxany	43
Tabulka č. 4: Informace o pacientech, kterým byla krev odebrána třikrát, po léčbě doxorubicinem, během léčby taxany a po léčbě taxany	44
Tabulka č. 5: Deskriptivní statistika pro jednotlivé mastné kyseliny a jejich skupiny..	49
Tabulka č. 6: Analýza dat pro nalezení signifikance rozdílu hodnot mezi jednotlivými odběry u pacientů s CIPN a bez CIPN	60

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. Barevný atlas biochemie. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-802-4729-770.
- [2] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMÁN. Biochemie pro studující medicíny. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009. ISBN 978-802-4614-168.
- [3] MURRAY, Robert K. Harperova ilustrovaná biochemie. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Praha: Galén, c2012. ISBN 978-807-2629-077.
- [4] TURŇOVÁ, Bc. Ivana. Stanovení mastných kyselin v lidských tkáních. Hradec Králové, 2017. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova. Vedoucí práce Mgr. Monika Kuchařová, Ph.D.
- [5] NOVOTNÝ, Michal. Soubor přednášek z biochemie. Hradec Králové, 2003.
- [6] BYERS, David M. a Huansheng GONG. Acyl carrier protein: structure–function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochemistry and Cell Biology* [online]. 2007, 85(6), 649-662 [cit. 2018-08-25]. DOI: 10.1139/O07-109. ISSN 0829-8211. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/O07-109>
- [7] BERÁNEK, Martin a Miloš TICHÝ. Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program Zdravotnická bioanalýtika. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-802-4621-869.
- [8] Co jsou nasycené. Nasycené škodí [online]. 2012, 2012 [cit. 2018-07-5]. Dostupné z: <http://www.nasyceneskodi.cz/co-jsou-nasycene/>
- [9] GROFOVÁ, Zuzana. Mastné kyseliny. In: *Medicína pro praxi* [online]. 2010, 1. listopad 2010, s. 388-390 [cit. 2018-08-30]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: https://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-201008-0010_Mastne_kyseliny.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Dzuzana%2Bgrofov%25E1%2Bin%253Aauth%2Bname%2Bkey%2Babstr%26sfrom%3D0%26spage%3D30
- [10] ROCHE, Helen M. Unsaturated fatty acids. *Proceedings of the Nutrition Society* [online]. 1999, 58(02), 397-401 [cit. 2018-08-02]. DOI: 10.1017/S002966519900052X. ISSN 0029-6651. Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S002966519900052X

- [11] MCCOLL, Janice. An Introduction to Essential Fatty Acids in Health and Nutrition. *Bioriginal* [online]. [cit. 2018-08-29]. Dostupné z: <https://www.bioriginal.com/page-articles/an-introduction-to-essential-fatty-acids-in-health-and-nutrition/>
- [12] Essential Fatty Acids. *Physicians Committee for Responsible Medicine* [online]. [cit. 2018-08-30]. Dostupné z: <https://www.pcrm.org/health/health-topics/essential-fatty-acids>
- [13] DI PASQUALE, Mauro G. The Essentials of Essential Fatty Acids. *Journal of Dietary Supplements* [online]. 2009, 6(2), 143-161 [cit. 2018-08-31]. DOI: 10.1080/19390210902861841. ISSN 1939-0211. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19390210902861841>
- [14] SIMOPOULOS, A.P. *The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids* [online]. 2002, 56(8), 365-379 [cit. 2018-08-31]. DOI: 10.1016/S0753-3322(02)00253-6. ISSN 07533322. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332202002536>
- [15] DAS, Undurti N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology Journal* [online]. 2006, 1(4), 420-439 [cit. 2018-08-31]. DOI: 10.1002/biot.200600012. ISSN 1860-6768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200600012>
- [16] Berquin IM, Edwards IJ, Chen YQ. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Lett.* 2008;269:363---77.
- [17] Lawrence GD. Dietary fats and health: dietary recommendations in the context of scientific evidence. *Adv Nutr.*2013;4:294---302.
- [18] Zheng JS, Hu XJ, Zhao YM, Yang J, Li D. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *BMJ.* 2013;346:f3706.
- [19] Sasazuki S, Inoue M, Iwasaki M, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, et al. Intake of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids and development of colorectal cancer by subsite: Japan Public Health Center-based prospective study. *Int J Cancer.*2011;129:1718
- [20] Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Shimazu T, Yamaji T, et al. Consumption of n-3 fatty acids and fish reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.*2012;142:1468-75.32
- [21] HUERTA-YÉPEZ, Sara, Ana B. TIRADO-RODRIGUEZ a Oliver HANKINSON. Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer. In: *Boletín*

- Médico del Hospital Infantil de México* [online]. 2016, 73(6), s. 446-456 [cit. 2018-08-31]. DOI: 10.1016/j.bmhix.2016.11.001. ISSN 16651146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1665114616301423>
- [22] DE AGUIAR PASTORE SILVA, Juliana, Maria EMILIA DE SOUZA FABRE a Dan Linetzky WAITZBERG. Omega-3 supplements for patients in chemotherapy and/or radiotherapy: A systematic review. *Clinical Nutrition* [online]. 2015, 34(3), 359-366 [cit. 2018-08-31]. DOI: 10.1016/j.clnu.2014.11.005. ISSN 02615614. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561414002696>
- [23] BYSTRICKÁ, Zuzana a Zdeňka ĎURAČKOVÁ. Gas chromatography determination of fatty acids in the human erythrocyte membranes – A review. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* [online]. 2016, 115, 35-40 [cit. 2018-09-03]. DOI: 10.1016/j.plefa.2016.09.007. ISSN 09523278. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952327816300400>
- [24] 3 typy omega mastných kyselin a proč je důležité znát rozdíly mezi nimi. *Semínka, oleje a superpotravin*y [online]. [cit. 2018-08-30]. Dostupné z: <https://seminka.webnode.cz//a3-typy-omega-mastnych-kyselin-a-proc-je-to-dulezite-znat-rozdily/>
- [25] ROBERTSON, Ruairi. Omega-3-6-9 Fatty Acids: A Complete Overview. *Healthline* [online]. January 2017 [cit. 2018-08-30]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/nutrition/omega-3-6-9-overview>
- [26] Mayo Clinic Staff. Breast Cancer. *MAYO Clinic* [online]. [cit. 2018-08-26]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/breast-cancer/symptoms-causes/syc-20352470>
- [27] Nordqvist, Christian. "What you need to know about breast cancer." *Medical News Today*. MediLexicon, Intl., 27 Nov. 2017. Web. 28 Aug. 2018. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/37136.php>
- [28] O nádorech prsu. *Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně: Pacient a rodina* [online]. [cit. 2018-08-29]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/nadory-prsu-c50/o-nadorech-prsu/>
- [29] GODET, Inês a Daniele M. GILKES. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integrative Cancer Science and Therapeutics* [online]. 2017, 4(1) [cit. 2018-08-31]. DOI: 10.15761/ICST.1000228. ISSN 20564546.

Dostupné z: <http://oatext.com/BRCA1-and-BRCA2-mutations-and-treatment-strategies-for-breast-cancer.php>

- [30] Types of breast cancer. *BREASTCANCER.ORG* [online]. [cit. 2018-08-29].
Dostupné z: <https://www.breastcancer.org/symptoms/types>
- [31] RICHTER, Igor, Josef DVOŘÁK, Jiří CHALUPA a Jiří BARTOŠ. TAXANY V LÉČBĚ KARCINOMU PRSU. Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně [online]. 2013 [cit. 2018-07-09]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/taxany-v-lecbe-karcinomu-prsu-1/>
- [32] PODZIMKOVÁ, Veronika. Úloha nových taxanů v indukci apoptosy u rezistentních nádorových buněk. Praha, 2010. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí práce RNDr. Julie Fidlerová.
- [33] Jordan, M.A. (2002): Mechanism of action of antitumour drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem.* 2: 1-17.
- [34] Paclitaxel. *Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně* [online]. [cit. 2018-08-26]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/paclitaxel-ucinna-latka/>
- [35] Greco F. A. and Hainsworth J.D.: Paclitaxel-based therapy in non-small-cell lung cancer: improved third generation chemotherapy. *Ann. Oncol.* 10: 63-67, 1999
- [36] Wikipedia contributors. (2018, July 17). Thymidine kinase. In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Retrieved 09:09, August 22, 2018, from https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Thymidine_kinase&oldid=850732282
- [37] SCHMIEDLOVÁ, Bc. Martina. Úloha mitochondriální dráhy v indukci apoptózy taxany u buněk nádorů prsu. Praha, 2012. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí práce Prof. RNDr. Jan Kovář, DrSc.
- [38] Schiff P. B. and Horwitz S. B.: Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 20: 3247-3252, 1981
- [39] Sackett D. and Fojo T.: Taxanes. *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.* 17: 59-79, 1997
- [40] ELMORE, Susan. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* [online]. 2016, 35(4), 495-516 [cit. 2018-08-01]. DOI: 10.1080/01926230701320337. ISSN 0192-6233. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1080/01926230701320337>

- [41] CHIEN, A. Jo a Mark M. MOASSER. Cellular Mechanisms of Resistance to Anthracyclines and Taxanes in Cancer: Intrinsic and Acquired. *Seminars in Oncology* [online]. 2008, 35, S1-S14 [cit. 2018-09-03]. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2008.02.010. ISSN 00937754. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009377540800050X>
- [42] MCGROGAN, Barbara T., Breege GILMARTIN, Desmond N. CARNEY a Amanda MCCANN. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* [online]. 2008, 1785(2), 96-132 [cit. 2018-09-03]. DOI: 10.1016/j.bbcan.2007.10.004. ISSN 0304419X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X07000455>
- [43] Rao, S., He, L., Chakravarty, S., Ojima, I., Orr, G.A. a Horwitz, S.B. (1999): Characterization of the Taxol binding site on the microtubule. Identification of Arg(282) in beta-tubulin as the site of photoincorporation of a 7-benzophenone analogue of taxol. *J Biol Chem* 274: 37990-37994. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608867>
- [44] SNYDER, J. P., J. H. NETTLES, B. CORNETT, K. H. DOWNING a E. NOGALES. The binding conformation of Taxol in β -tubulin: A model based on electron crystallographic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, 98(9), 5312-5316 [cit. 2018-09-03]. DOI: 10.1073/pnas.051309398. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051309398>
- [45] CUI, Shi-Yun, Rui WANG a Long-Bang CHEN. MicroRNAs: key players of taxane resistance and their therapeutic potential in human cancers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2013, 17(10), 1207-1217 [cit. 2018-09-03]. DOI: 10.1111/jcmm.12131. ISSN 15821838. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jcmm.12131>
- [46] DERRY, W. Brent, Leslie WILSON, Israr A. KHAN, Richard F. LUDUEÑA a Mary Ann JORDAN. Taxol Differentially Modulates the Dynamics of Microtubules Assembled from Unfractionated and Purified β -Tubulin Isotypes †. *Biochemistry* [online]. 1997, 36(12), 3554-3562 [cit. 2018-09-03]. DOI: 10.1021/bi962724m. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi962724m>
- [47] Doxorubicin. *Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně* [online]. [cit. 2018-08-26]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/doxorubicin-ucinna-latka/>

- [48] Pegylace. *Velký lékařský slovník online* [online]. [cit. 2018-08-26]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/pegylace-1>
- [49] O lécích: *Poznejte své léky - Doxorubicin* [online]. [cit. 2018-08-26]. Dostupné z: http://www.olecich.cz/modules/medication/search.php?search=Vyhledat&data%5Bsearch_for%5D=&data%5Bmaterial%5D=doxorubicin&data%5Bcat_group%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=brail-no&data%5Bwith_adv%5D=0&data%255
- [50] NAGARAJ, MD, Gayathri a Ellen D'ERRICO, PHD. Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy (CIPN). *ClinicalTrials.gov* [online]. September 6, 2017 [cit. 2018-07-10]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03272919>
- [51] Clinical and preclinical perspectives on Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN): a narrative review., S. J. L. Flatters, P. M. Dougherty, L. A. Colvin, *Br J Anaesth.* 2017 Oct 1; 119(4): 737–749. doi: 10.1093/bja/aex229
- [52] MCMILLAN, Pam. How Can We Help Patients Who Suffer from CIPN?. *Oncology Nursing News* [online]. October 17, 2017 [cit. 2018-07-10]. Dostupné z: <https://www.oncnursingnews.com/contributor/pam-mcmillan-rn/2017/10/chemotherapy-induced-peripheral-neuropathy>
- [53] KOSKO, Katie. CIPN Experienced by Many Patients Years After Treatment. *Oncology Nursing News* [online]. September 22, 2017 [cit. 2018-07-11]. Dostupné z: <https://www.oncnursingnews.com/publications/oncology-nurse/2017/september-2017/cipn-experienced-by-many-patients-years-after-treatment>
- [54] The American Cancer Society medical and editorial content team. What is chemotherapy-induced peripheral neuropathy or CIPN?. *American Cancer Society* [online]. March 18, 2015 [cit. 2018-07-11]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects/peripheral-neuropathy/what-is-cipn.html>
- [55] The American Cancer Society medical and editorial content team. How does CIPN start? [online]. March 18, 2015 [cit. 2018-08-12]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects/peripheral-neuropathy/how-does-cipn-start.html>
- [56] WINDEBANK, Anthony J. Chemotherapeutic neuropathy. *Current Opinion in Neurology* [online]. 1999, October 1999, 12(5), 565-571 [cit. 2018-09-03]. ISSN 1350-7540. Dostupné z: <https://ovidsp.tx.ovid.com/sp->

3.31.1b/ovidweb.cgi?&S=GGNHFPGNHLDDCHKFNCEKOCIBICMFAA00&Link+Set=S.sh.22%7c3%7csl_10

- [57] SERETNY M, CURRIE GL, SENA ES, et al. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a systematic review and meta-analysis. *Pain*. 2014, 155 (12), [cit. 2018-09-03]. ISSN 2461-2470.
- [58] TRIVEDI, Meghna S., Dawn L. HERSHMAN a Katherine D. CREW. *Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy* [online]. In: . [cit. 2018-09-03]. Dostupné z: <https://www.gotoper.com/publications/ajho/2015/2015jan/management-of-chemotherapy-induced-peripheral-neuropathy>
- [59] The American Cancer Society medical and editorial content team. What are the symptoms of CIPN?. American Cancer Society [online]. March 18, 2015 [cit. 2018-08-11]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects/peripheral-neuropathy/symptoms-of-cipn.html>
- [60] The American Cancer Society medical and editorial content team. What happens if I get CIPN?. American Cancer Society [online]. March 18, 2015 [cit. 2018-07-12]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects/peripheral-neuropathy/treating-cipn.html>
- [61] MECHL, Zdeněk a Dagmar BRANČÍKOVÁ. Nežádoucí účinky protinádorové léčby a jejich léčba. *Medicína pro praxi: Mezioborové přehledy* [online]. 2009, , 325-329 [cit. 2018-09-03]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: https://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-200906-0008_Nezadouci_ucinky_protinadorove_lecby_a_jejich_lecba.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Dmechl%26sfrom%3D0%26spage%3D30
- [62] The American Cancer Society medical and editorial content team. Can CIPN be prevented? [online]. March 18, 2015 [cit. 2018-07-12]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects/peripheral-neuropathy/preventing-cipn.html>
- [63] YANG, C. S., N. SUH a A.-N. T. KONG. Does Vitamin E Prevent or Promote Cancer?. *Cancer Prevention Research* [online]. 2012, 5(5), 701-705 [cit. 2018-08-31]. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0045. ISSN 1940-6207. Dostupné z: <http://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0045>
- [64] Katedra analytické chemie. *GC-MC*. Hradec Králové, 2017. Dostupné také z: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni->

materialy/KACH/?path=zdravotnick%c3%a1+bioanalytika%5civybran%c3%a9+separa%c4%8dn%c3%ad+metody%5cp%c5%99edn%c3%a1%c5%a1ky

- [65] VŠCHT. *Plynová chromatografie GC: Základy analýzy potravin*. Praha. Dostupné také z: https://web.vscht.cz/~koplikr/%c4%8c%c3%a1stA6_3.pdf
- [66] ČABALA, Radomír. *Plynová Chromatografie: Instrumentace, základní přednáška*. PŘF UK, Praha, 2008. Dostupné také z: <https://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/plynova-chromatografie-pro-studenty-kata/instrumentace-v-gc/>
- [67] SKLENÁŘOVÁ, Hana a Ludmila MATYSOVÁ. *Plynová chromatografie*. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy. Dostupné také z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/223918/mod_resource/content/1/GC_chromatografie.pdf
- [68] SKLENÁŘOVÁ, Hana. SEPARAČNÍ ANALYTICKÉ METODY - PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE: GC – plynová chromatografie. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy. Dostupné také z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/250874/mod_resource/content/3/GC.pdf
- [69] POOLE, Colin F. Ionization-based detectors for gas chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2015, 1421, 137-153 [cit. 2018-09-03]. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.02.061. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315003209>
- [70] MENDEL UNIVERSITY. *Detektory v plynové chromatografii* [online]. Brno [cit. 2018-09-02]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52965
- [71] Grim, J., Ticha, A., Hyspler, R., Valis, M., & Zadak, Z. (2017). Selected Risk Nutritional Factors for Chemotherapy-Induced Polyneuropathy. *Nutrients*, 9(6), 535. <http://doi.org/10.3390/nu9060535>
- [72] Ghoreishi Z, Esfahani A, Djazayeri A, et al. Omega-3 fatty acids are protective against paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A randomized double-blind placebo controlled trial. *BMC Cancer*. 2012;12:355. doi:10.1186/1471-2407-12-355.