

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
UNIVERZITY KARLOVY
V PRAZE**

Katedra analytické chemie



DIZERTAČNÍ PRÁCE

**VÝVOJ A VYUŽITÍ VYSOKOÚČINNÝCH
SEPARAČNÍCH METOD PRO ANALÝZU
POJIVOVÝCH TKÁNÍ.**

2009

MARTIN BRAUN

Předmětová hesla:

Analytická chemie

Separční metody

Revmatologie

Pojivo

Klíčová slova:

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapilární elektroforéza (CE)

Pojivové tkáně

Příčné vazby

Kolagen

Elastin

Pentosidin

Pyridinoliny

Desmosiny

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci zpracoval samostatně a všechny použité literární prameny a zdroje řádně ocitoval.

Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Předkládaná práce byla vypracována v laboratořích Revmatologického ústavu v Praze a katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2002-2009.

Kromě výše uvedených institucí se na finanční podpoře mé práce spolupodílelo i Ministerstvo zdravotnictví ČR, resp. Interní grantová agentura MZČR, a proto bych na tomto místě rád všem zmíněným subjektům poděkoval za poskytnutí účelových prostředků na řešení řady výzkumných záměrů a grantů, na nichž jsem jako hlavní řešitel či odborný spolupracovník během svého postgraduálního studia aktivně participoval a které přímo souvisely s touto prací (Výzkumné záměry registr. č. MZ 00023728 a MZ 00023841, granty IGA MZČR - reg. č. NR/7895-3, NK/7732-3, NR/8447-4, NR/7886-3, NK 5366-4).

V Praze dne

Mgr. Martin Braun

Poděkování:

Nejprve bych chtěl upřímně poděkovat svým školitelům, Prof. Ing. Karlu Štulíkovi, DrSc. a Prof. MUDr. Milanu Adamovi, DrSc., za odborné vedení, cenné připomínky a všestrannou pomoc při zpracovávání této dizertační práce.

Své velké díky chci vyjádřit zejména Ing. Pavlu Špačkovi, CSc. za uvedení do problematiky HPLC analýzy příčně-vazebných elementů pojivových tkání, předávání praktických zkušeností z této oblasti a přínosné konzultace, ale i všem ostatním spolupracovníkům z Laboratoře pro výzkum pojiva Revmatologického ústavu v Praze a členům katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty UK v Praze za jejich pomoc, vytvoření příjemné pracovní atmosféry, podnětné diskuze a rady.

Tato práce by nemohla vzniknout bez úzké aktivní spolupráce s mnoha lékaři z Revmatologického ústavu v Praze, především pak s MUDr. Ladislavem Šenoltem, Ph.D. Zároveň bych však rád velmi poděkoval také Doc. MUDr. Martě Kalousové, Ph.D. z Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK v Praze, Prof. MUDr. Janu Škrhovi, DrSc. z III. interní kliniky VFN a 1. LF UK v Praze, MUDr. Marii Imramovské z Kliniky dětského a dorostového lékařství VFN Praha, Doc. MUDr. Ivo Maříkovi, CSc. z pražského Ambulantního centra pro vady pohybového aparátu, firmě Orling s.r.o. z Ústí nad Orlicí, firmě AnLab s.r.o. z Prahy, MUDr. Olze Marečkové z nefrologické kliniky IKEM Praha, MUDr. Vojtěchu Melenovskému, CSc. z kardiologické kliniky IKEM Praha, MUDr. Janu Vaculíkovi z ortopedické kliniky FN Bulovka a mnoha dalším za poskytnutí vzorků a spolupráci při řešení výzkumných projektů, grantů a realizaci četných klinických studií.

Své zvláštní poděkování bych rád vyjádřil své rodině za všestrannou podporu během mého vysokoškolského studia.

Seznam použitých zkratk

$\alpha_{1,2}$	relativní retence (selektivita, separační faktor)
AGEs	konečné produkty pokročilé glykace (Advanced Glycation End-products)
AC	afinitní chromatografie
ACN	acetonitril
ALEs	produkty pokročilé lipoperoxidace (Advanced Lipoperoxidation End Products)
AOPP	produkty pokročilé oxidace proteinů (Advanced Oxidation Protein Products)
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CMC	kritická micelární koncentrace
CT _x	C-koncové telopeptidy kolagenu
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	UV spektrofotometr s diodovým polem
DES	desmosin
DETAPAC	kyselina diethyltriaminpentaoctová
DM	diabetes mellitus (cukrovka)
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DPD	deoxy pyridinolin
ECM	mimobuněčná hmota (extracelulární matrix)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	enzymová imunoanalýza s enzymem vázaným na imunosorbent (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EOF	elektroosmotický tok
F	průtoková rychlost mobilní fáze (ml/min)
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HFBA	kyselina heptafluoromáselná
HPCE	vysokoúčinná kapilární elektroforéza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
i.d.	vnitřní průměr kapiláry
IDES	isodesmosin
IEC	iontově-výměnná chromatografie
IEF	izoelektrická fokusace
ITP	izotachoforéza
k_i	kapacitní faktor (poměr) analytu
kDa	kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)
λ	vlnová délka
l_c	celková délka kapiláry
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LDR	lineární dynamický rozsah
l_d	délka kapiláry k detektoru
LLC	rozdělovací chromatografie (liquid-liquid chromatography)
LOD	mez detekce (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)
LSC	adsorpční chromatografie

MALDI TOF/MS	ionizace pomocí laserové desorpce s přispěním matrice v kombinaci s hmotnostně spektrometrickou detekcí typu time-of-flight (Matrix Assisted Laser Desorption / ionization Time-of-Flight/ Mass Spectrometry)
MDA	malondialdehyd
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
M_r	relativní molekulová hmotnost
n	účinnost kolony (počet dosažených teoretických pater)
NTx	N-koncové telopeptidy kolagenu
OA	osteoartróza
OP	osteoporóza
PBS pufr	fosfátový pufr (Phosphate Buffer Saline)
PD	pyridinolin
PEN	pentosidin
PICP	C-terminální propeptid prokolagenu typu I
PINP	N-terminální propeptid prokolagenu typu I
PsA	psoriatická artritida
R^2	kvadrát korelačního koeficientu
$R_{1,2}$	rozlišení pík
RA	revmatoidní artritida
RAGE	specifický receptor AGE
RIA	radioimunologické stanovení (Radioimmunoassay)
RP HPLC	reverzní vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný
SEC	vylučovací chromatografie (Size Exclusion Chromatography)
SPE	extrakce na pevné fázi
SpeedVac	rotační vakuová odparka s vymražovacím zařízením
SSc	systémová sklerodermie
t_{cof}	migrační čas látek setrvávajících v MEKC v základním pufru (migrujících rychlostí EOF)
TEP	totální endoprotéza
t_m	migrační čas v CE
t_{mc}	migrační čas látek zůstávajících v MEKC zcela uvnitř micel
t_R	retenční čas
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	detekce v ultrafialové spektrální oblasti

SUMMARY

This work is concerned with the development and application of high performance separation methods suitable for determination of clinically considerable fragments of collagen and elastin as the most important proteins of connective tissues. For their analyses, various chromatographic and electrophoretic methods have been used, including high performance liquid chromatography (HPLC), capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic liquid chromatography (MEKC).

This work has aimed at optimization of analytical separation procedures and their utilization for determination of clinically important markers of connective tissue degradation.

High performance methods are described which have been suggested and optimized for separation and quantitative determination of pentosidine, pyridinolines and desmosines as the most important collagen and elastin cross-links. The methods have already been successfully applied in analysis of real patient samples and the results obtained utilized in clinical practice.

Keywords:

HPLC; Capillary Electrophoresis; Collagen; Elastin; Pentosidine;
Pyridinoline; Desmosine; Connective Tissue; Cross-link

OBSAH

1.	ÚVOD	10
2.	CÍLE PRÁCE	14
3.	TEORETICKÁ ČÁST	15
3.1	Pojivové tkáně	15
3.1.1	Stárnutí tkání pojiva	17
3.1.2	Struktura kolagenu	19
3.1.3	Biosyntéza kolagenu	25
3.2	Charakteristika a klasifikace sledovaných analytů	27
3.2.1	Kolagenní příčné vazby	29
3.2.2	Struktura elastinu	37
3.2.3	Příčně-vazebné elementy v elastinu	38
3.3	Metody použitelné pro stanovení sledovaných látek – analytický přístup ke studiu struktury kolagenu a elastinu	40
3.3.1	Principy využitých analytických separačních metod	43
3.3.2	Klasifikace metod kapalinové chromatografie	46
3.3.3	Teorie a separační mechanismus použitých HPLC metod	48
3.3.4	Elektromigrační metody – teorie a princip kapilární elektroforézy	51
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	54
4.1	Využití laboratorní postupy a operace předcházející vlastní analýze	54
4.2	Použité chemikálie	54
4.3	Instrumentace	56
4.3.1	Hydrolýza	56
4.3.2	SPE a odpaření nadbytečných rozpouštědel	56
4.3.3	Další laboratorní zařízení a pomůcky	57
4.3.4	HPLC	57
4.3.5	Přístroj pro kapilární elektroforézu	58
4.4	Typy a charakterizace vzorků	59
4.5	Preanalytická fáze	59
4.5.1	Zpracování vzorků krve.....	59
4.5.2	Zpracování ostatních tělních tekutin	60
4.6	Předběžná úprava vzorků pro stanovení pentosidinu a jejich analýza	60
4.6.1	Zpracování vzorků pojivových tkání	60
4.6.2	Příprava extraktů z vzorků pojivových tkání	61
4.6.3	Zpracování kapalných vzorků	61
4.6.4	Kyselá hydrolýza	62
4.6.5	Extrakce na pevné fázi (SPE)	62

4.6.6	Příprava mobilních fází pro stanovení PEN	63
4.6.7	Chromatografická analýza PEN	63
4.7	Předběžná úprava vzorku pro stanovení PD a DPD a jejich analýza	64
4.7.1	Kyselá hydrolýza	64
4.7.2	Extrakce na pevné fázi (SPE)	64
4.7.3	Příprava mobilních fází pro analýzu PD a DPD	65
4.7.4	HPLC metoda pro stanovení pyridinolinových příčných vazeb kolagenu	65
4.8	Analýza izomerů desmosinu	66
4.8.1	Chromatografické dělení desmosinů	66
4.8.2	Separace desmosinů pomocí kapilární elektroforézy	66
4.9	Statistické vyhodnocení experimentálních dat	67
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE	68
A)	ANALYTICKÉ ASPEKTY	68
5.1	Spektrální charakteristika analytů a volba vlnové délky	69
5.2	Úprava vzorků a vlastní HPLC analýza příčných vazeb kolagenu	70
5.2.1.	Kalibrace HPLC metod pro stanovení PEN, PD a DPD	75
5.2.2.	Volba optimálních podmínek HPLC a CE separace	78
5.3	Posouzení reálných možností a omezení použitých metod a jejich srovnání s jinými alternativními přístupy analýzy pojiva	94
B)	KLINICKÉ ASPEKTY	104
5.4	Příklady uplatnění původních výsledků HPLC analýz v klinické praxi	110
5.4.1	Výsledky stanovení PEN u diabetických pacientů a experimentálních zvířat ...	110
5.4.2	Publikované výsledky vybraných klinických prací	114
6.	ZÁVĚR	115
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	119
8.	PŘEHLED PUBLIKACÍ A PREZENTOVANÝCH VÝSLEDKŮ AUTORA	127
9.	SEZNAM PŘÍLOH	135

1. ÚVOD

Analytická chemie nachází dnes široké uplatnění v řadě oborů, mezi jedny z nejnámějších oblastí, kde má své nezastupitelné místo, patří její klinické aplikace. V současné medicíně má kromě základního lékařského vyšetření, využití fyzikálních metod a tradičních terapeutických přístupů velmi důležité postavení laboratorní diagnostika, založená především na biochemické analýze odebraných vzorků tělních tekutin a tkání. Analytické a biochemické metody jsou v různé podobě přítomny při operaci s téměř každým vzorkem biologického materiálu, počínaje jeho odběrem, dále např. oddělením séra či plazmy od zbytku biologické matrice, přes úpravu vzorku, vlastní separaci a kvantitativní analýzu požadovaných klinicky významných látek, až po statistické vyhodnocení, interpretaci výsledků souboru dat a způsob šetrného uchování zbývajících vzorku pro případné další použití.

Mezi hlavní cíle této práce proto kromě návrhu a otestování nových separačních metod, použitelných pro kvantitativní analýzu významných ukazatelů degradace pojiva, patřilo především provedení vnitřní validace stávajících metod. Pouze jejich jednoznačná charakterizace analytickými parametry popisujícími jasně chromatografický systém pak může nabídnout možnost srovnání s jinými metodami, založenými na odlišných analytických přístupech.

Mezi nejčastější požadavky lékařů, směřující na analytika v klinických studiích, patří kvantitativní analýza více či méně specifických molekul v tělních tekutinách či tkáních pacientů a kontrolních jedinců, jejichž koncentrace v organismu mají pro kliniku významnou roli indikátoru lokálních či systémových patologických změn. Z nich lze ve spojitosti s objektivním klinickým nálezem usuzovat na míru postižení organismu, případně pomoci odhalit i vlastní příčinu onemocnění. V klinickém výzkumu je ze strany lékařů často požadována opakovaná analýza vzorků téhož pacienta, které byly odebrány po určitém sledovaném intervalu, aby bylo možno zhodnotit časové změny hladin v průběhu vývoje onemocnění a případnou odezvu na nasazenou léčbu. Významné je také sledování kinetiky metabolických procesů, k nimž dochází v průběhu aktivního stádia nemoci či v důsledku přirozeného stárnutí tkání. Zajímavým aspektem klinického výzkumu je též sledování transformace biogenních látek při působení vnějších faktorů. V případě narušení metabolické rovnováhy vznikají otázky, jakým způsobem jsou tyto metabolity odbourávány a vylučovány z organismu, či v jakých lokalizacích se

akumulují. Důležité je také sledování chemických podmínek, za nichž mohou nežádoucí produkty v organismu vznikat a jak lze tyto reakce inhibovat.

Pro analytika vyplývá z těchto zadání řada úkolů. Musí stanovit vhodné načasování, správný způsob odběru vzorku a typ matrice, aby sledované analyty nebyly ovlivněny nevhodnými podmínkami ještě před tím, než analytik vzorek převezme. Analytik by měl na základě znalostí chemických vlastností sledovaných látek rozhodnout o optimální volbě uložení, způsobu uchování a zpracování vzorku v preanalytické fázi, aby nedošlo např. k rozpadu či znehodnocení analytů. Jeho hlavním úkolem je však navržení a testování vhodného způsobu zpracování vzorků i analytické metody, která bude dostatečně přesná, správná, citlivá, opakovatelná a robustní. Jedině tak bude možno i s odstupem času poskytovat spolehlivé výsledky, srovnatelné s předchozími analýzami. Výhodou je také univerzalita použití metody pro řadu různých matric a také možnost poskytnutí výsledků stanovení klinikům v přijatelně krátkém čase.

Zdaleka ne všechny relevantní látky, přítomné v dodaných vzorcích v nízkých koncentracích, lze stanovit pomocí automatických biochemických a imunochemických analyzátorů, rutinně pracujících v laboratořích klinické biochemie. Ty bývají obvykle založeny na principech jednoduchých optických či turbidimetrických metod, srážecích a imunochemických reakcí s využitím komerčně dostupných kitů. Proto je stále větší pozornost věnována vývoji nových citlivých a selektivních metod, které dokážou s vysokou přesností a reprodukovatelností stanovit látky, jež nebylo možno dříve používanými způsoby a technikami v patřičných koncentracích stanovit. Rovněž látky nově objevené, jejichž úloha v organismu není dosud zcela objasněna, jsou v rámci klinického výzkumu studovány jako potenciální indikátory významných metabolických či patobiochemických procesů.

Ve výše uvedených případech představují moderní vysokoúčinné separační metody (zejména chromatografické a elektroforetické) významný přínos, neboť umožňují stanovit koncentrace vybraných biomarkerů a na molekulární úrovni sledovat vztahy mezi jednotlivými laboratorními ukazateli. Při jejich porovnání s aktuálním zdravotním stavem pacienta lze usuzovat na možné příčiny onemocnění, monitorovat průběh patologických pochodů v postižených tkáních a kinetiku katabolických dějů probíhajících *in vivo*. Často tak lze odhalit souvislosti mezi orgánovým postižením a hladinami speciálních laboratorních indikátorů, a to dříve,

než se tyto biochemické změny manifestují klinicky či rentgenologicky. Pro lékaře představují tedy tyto speciální analytické metody užitečný nástroj laboratorní diagnostiky, umožňující v řadě případů odhalit prvotní příčiny onemocnění (etiopatogeneze), zachycení patologických změn v jejich ranném stádiu (např. při screeningu), reagovat na ně včasnou a přiměřenou léčbou. Při dlouhodobém sledování lze na základě těchto stanovení usuzovat též na aktivitu choroby a predikovat její další vývoj (progresi). Velmi často jsou stanovení těchto speciálních biomarkerů požadována lékaři též v rámci výzkumných záměrů a četných klinických studií, kdy je pomocí nich hodnocena odezva pacienta na aplikovanou terapii a podávání nově testovaných léčebných preparátů.

Jedny z nejrozšířenějších závažných onemocnění patří v současné době choroby pojiva, která vznikají v důsledku narušení metabolické rovnováhy mezi novotvorbou a odbouráváním pojivových tkání nebo díky jejich dalším modifikacím. Tyto tkáně plní v organismu hlavní funkci strukturního základu těla obratlovců, a to nejen nosného kosterního a kloubního systému, ale tvoří také povrchové elastické a podpurné tkáně všech orgánů, včetně vnitřní struktury buněk.

Nejvýznamnějšími strukturními proteiny pojiva je kolagen a elastin. Nosným tématem této dizertační práce je proto vývoj a aplikace vysokoúčinných separačních metod, vhodných pro stanovení klinicky a diagnosticky významných fragmentů kolagenu a elastinu, tj. klíčových proteinů pojivových tkání s dlouhým biologickým poločasem.

Tato práce navazuje na dlouholetý výzkum v oblasti struktury a metabolismu kolagenu a pojivových tkání, realizovaný v Laboratoři pro výzkum pojiva na Revmatologickém ústavu v Praze. Současný základní výzkum je zde nyní zaměřen především na vývoj a zavedení metod pro analytické stanovení nově popsaných potenciálních ukazatelů metabolického obratu kosti a chrupavky v kloubním kompartmentu. Pozornost je věnována také systémovým změnám pojiva (především degenerativní a zánětlivé povahy) a studiu jejich role v rámci fyziologických a patobiochemických procesů, k nimž dochází při stárnutí a rozvoji závažných chronických revmatických onemocnění.

Zároveň však bylo cílem zjednodušení a modifikace dříve používaných analytických postupů a metod pro stanovení sledovaných komponent pojiva tak, aby poskytly co nejpřesnější, nejsprávnější, opakovatelné a spolehlivé výsledky stanovení. Separace analytů je dnes požadována u řady vzorků s vysokou citlivostí.

Proto bylo třeba optimalizovat experimentální podmínky každého kroku tak, aby tyto metody umožnily provádět požadovaná stanovení s minimální spotřebou vzorku a použitých reagensů, a to v relativně krátkém čase a s nízkými finančními náklady. Aplikace navržených postupů a zavedení metod splňujících tato kritéria umožňuje pak přejít od modelového vzorku k větším sériím reálných vzorků pacientů a uplatnit tak tyto analytické výsledky v klinické praxi v rámci speciální diferenciální diagnostiky.

K analýze bylo v této práci využito zejména různých variant vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a metod elektroforetických, tj. kapilární elektroforézy v provedení kapilární zónové elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC).

Sledované příčné vazby kolagenu a elastinu (pentosidin, pyridinolin, deoxypyridinolin, desmosin, isodesmosin) jsou z praktického hlediska využívány jako ukazatelé metabolických poruch kosti, chrupavky či elastických pojivových tkání. Vzhledem k mému profesnímu zaměření na Revmatologickém ústavu jde zejména o využití HPLC metod (v analytickém měřítku) při separaci a kvantitativním stanovení obsahu vybraných fragmentů kolagenu a elastinu, vyskytujících se v pojivových tkáních. Tyto molekulární ukazatele patologických metabolických procesů jsou stanovovány buď v hydrolyzátu nebo v extraktech z pojivových tkání či v tělních tekutinách, do nichž jsou secernovány.

V rámci této práce byly analyzovány vzorky převážně revmatických pacientů, ale v rámci výzkumných studií byla provedena stanovení i u vybraných skupin diabetiků, pacientů s nefropatií i u laboratorních zvířat. Stanovení těchto biologicky aktivních látek doplňuje a zpřesňuje diagnostické a klinické nálezy a umožňuje komplexní hodnocení aktuálního zdravotního stavu pacienta a aktivitu jeho choroby.

Z analytického hlediska má tato práce určitá specifika, daná jak povahou a velmi komplexním složením zpracovávaných vzorků biologického materiálu (tělní tekutiny a pojivové tkáně kloubního kompartmentu), tak velmi nízkými koncentracemi studovaných analytů. Tyto překážky, vyžadující náročnou úpravu vzorku, byly překonány použitím sekvence separačních a prekoncentračních kroků, volbou velmi citlivých analytických metod s vhodnou detekcí i s ohledem na šetrnost při vlastním zpracování vzorku po jeho odběru.

2. CÍLE PRÁCE

Vývoj a využití analytických separačních principů a optimalizace metod pro stanovení klinicky významných příčně-vazebných elementů kolagenu a elastinu, indikujících v organismu odbourávání pojivových tkání (především kostní a chrupavčité).

Dalším záměrem bylo zjednodušení a urychlení stávajících separačních postupů při poměrně náročném zpracování vzorků před vlastní HPLC analýzou a minimalizace množství potřebného vzorku tělních tekutin či odebraných tkání.

Vzhledem k tomu, že sledování koncentrace kloubních markerů patří k významným ukazatelům kinetiky degradačních procesů a odezvy na následnou terapii, může mít analýza těchto látek i prediktivní diagnostický význam při hodnocení stádia a aktivity choroby, příp. i při screeningovém vyšetření. Na základě srovnání výsledků od různých skupin pacientů lze pak usuzovat i na počáteční příčiny vzniku a rizikové faktory pro progresi revmatických i dalších onemocnění a může přispět k objasnění metabolických komplikací na molekulární úrovni.

Konkrétním záměrem této práce bylo:

- 1) Využití HPLC metod ke stanovení markerů degradace a resorpce kostního kolagenu, tj. pyridinolinu (PD), deoxypyridinolinu (DPD) a pentosidinu (PEN) jako ukazatele glykační a oxidační zátěže organismu a nespecifického odbourávání kolagenu.
- 2) Aplikace analytických metod ke kvantifikaci významných ukazatelů metabolického obratu kostí a chrupavky v tělních tekutinách (sérum, moč, synoviální tekutina) a pojivových tkání pacientů s odlišnou etiopatogenezí a vzájemné porovnání naměřených koncentrací s kontrolními skupinami zdravých jedinců pro účely diferenciální diagnostiky.
- 3) Vývoj analytických metod pro separaci nejvýznamnějších příčných vazeb elastinu, tj. desmosinu (DES) a isodesmosinu (IDES).
- 4) Provedení vnitřní validace těchto nových a modifikovaných metod pro stanovení příčných vazeb pojivových tkání.

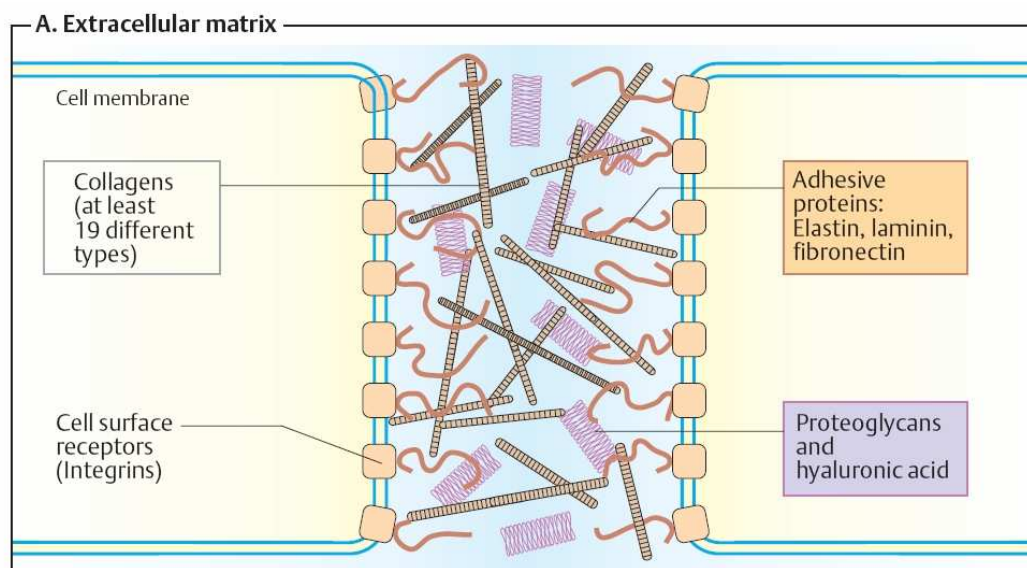
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Pojivové tkáně

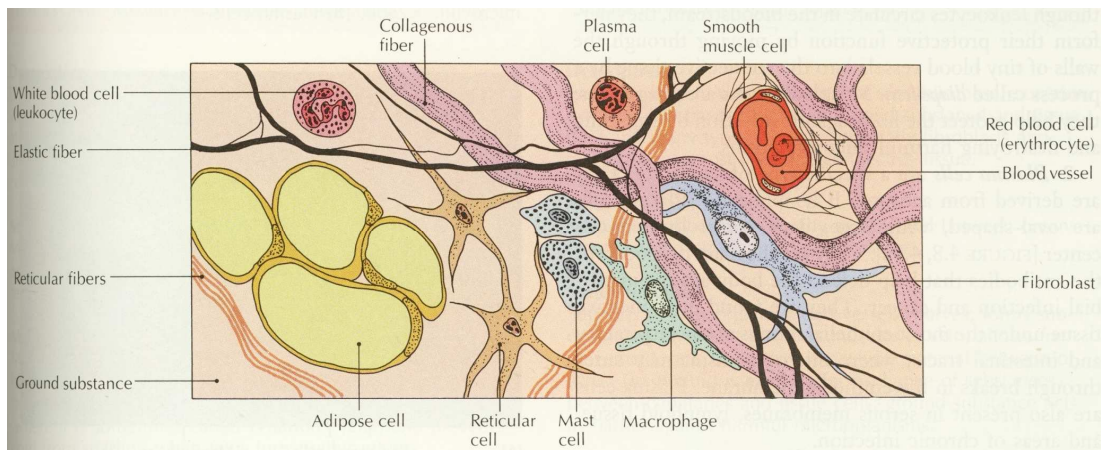
Pojivové tkáně (někdy označované též jako tkáně vazivové), či jen zkráceně pojivo, tvoří základní strukturní jednotku těl živých organismů¹. Pojivo vyplňuje značnou část extracelulárního prostoru a pomáhá spojovat buňky jednotlivých tkání dohromady. Kromě této základní podpůrné funkce též chrání tělní orgány a navíc má i funkci zásobní, transportní a reparační.

Tkáně pojiva existují v několika různých a strukturně značně odlišných podobách, od volné formy přes pevnou a kompaktní až po formu elastickou. Jsou tudíž důležitými komponentami natolik odlišných biologických struktur, jakými jsou např. kost, chrupavka, kůže, šlachy či krev.

Všechny tkáně pojiva jsou tvořeny nejen různými typy vláken, ale i různě specializovanými buňkami (např. fibroblasty, osteoblasty, osteoklasty, chondrocyty, adipocyty, makrofágy či krevními buňkami) a extracelulární (mimobuněčnou) gelovitou hmotou, složenou převážně z glykoproteinů a proteoglykanů (např. kyselina hyaluronová, chondroitinsulfát, glukosaminsulfát) – viz obr. 1 a 2. Jednotlivé typy pojiva se tak mohou významně lišit složením, uspořádáním i funkcí, jíž plní - nejvýznamnějšími molekulami pojiva jsou kolagen a elastin.

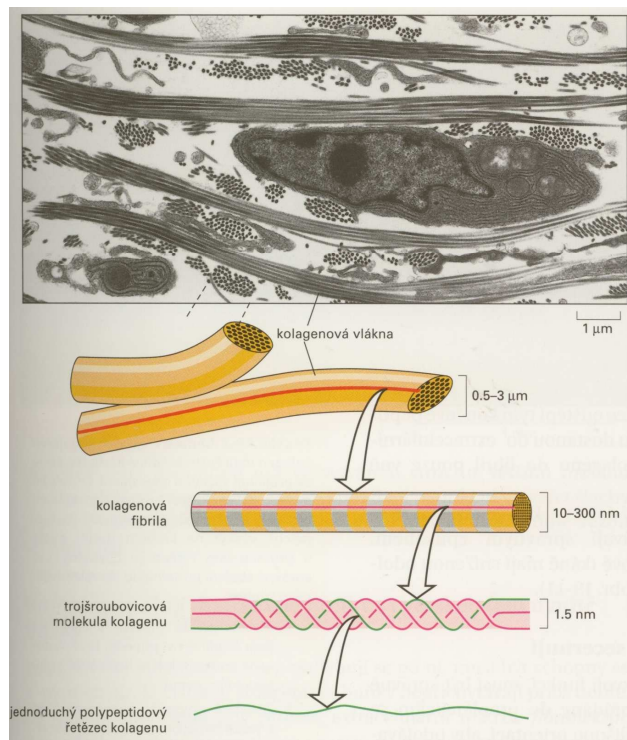


Obr. 1 Složení extracelulární matrix s hlavními komponentami pojiva²



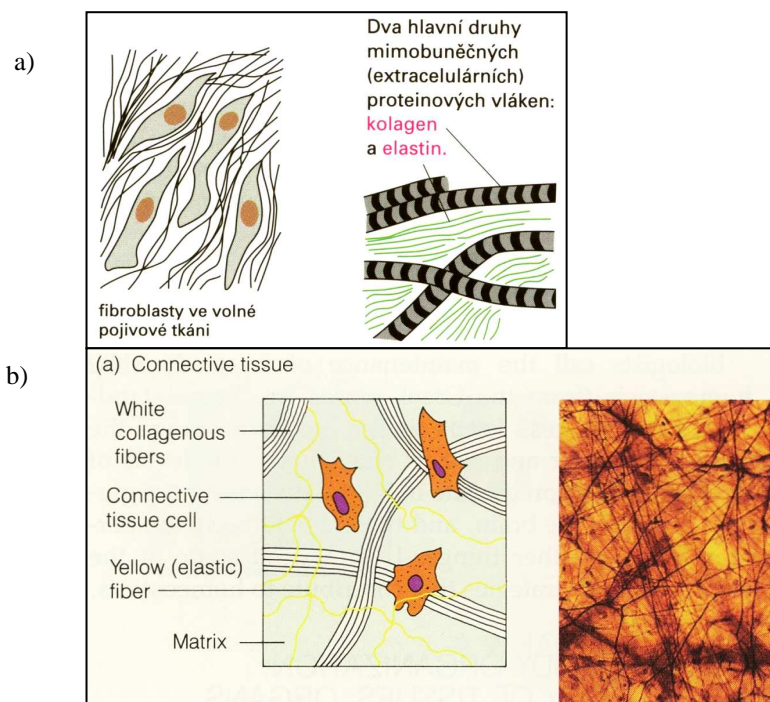
Obr. 2 Schematické znázornění buněk a vláken proteinů pojivových tkání ¹

Kolagenní vlákna jsou mimořádně silná a houževnatá, jejich pevnost v tahu je srovnatelná s ocelí. Tato bělavá vlákna mohou zaujímat v prostoru uspořádání od volně ohebného, jak je tomu u podpurných tkání orgánů, až po rigidní, přísně orientovanou konformaci, např. ve šlachách. Kolagen je ve skutečnosti tvořen svazkem paralelně uspořádaných fibril (slabých vláken), složených z ještě menších mikrofibril (viz obr. 3 a 4).



Obr. 3 Organizace a struktura kolagenu ³

Naopak nažloutlá vlákna elastinu se nachází v pojivových tkáních jako jednotlivá vlákna pospojovaná do podoby pružné sítě a nelze je tedy nikdy nalézt ve svazcích (viz obr. 4). Sestávají se též z mikrofibril, ovšem nemají tak hrubý povrch, jak je tomu u kolagenu. Vlákna jsou vysoce elastická a odolávají značnému napětí, přičemž se po ukončení působení vnějších sil kontrakcí vrací do svého původního tvaru (vhodným příkladem této vlastnosti je např. elasticita kůže).



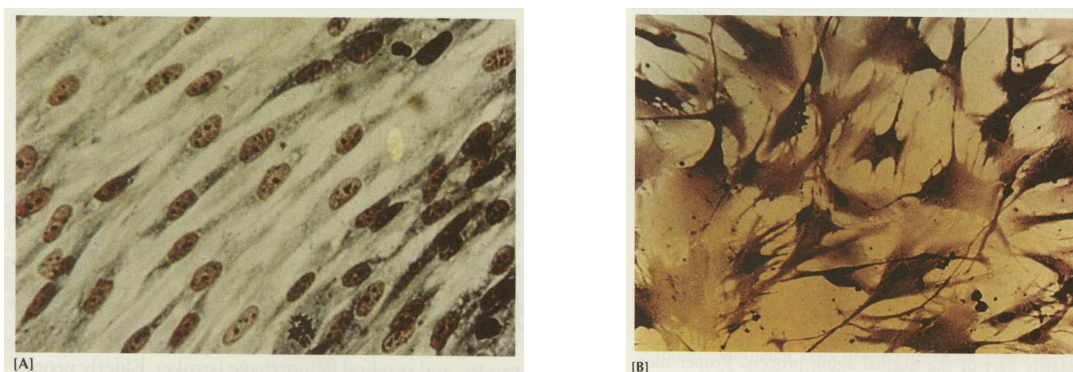
Obr. 4 Majoritní proteiny pojivových tkání – kolagen a elastin (a)³; b)⁴)

3.1.1 Stárnutí tkání pojiva

Mezi typické vlastnosti pojivových tkání úzce související s degradací a mutací biologických struktur patří jejich stárnutí¹. Existuje řada hypotéz o příčinách stárnutí, z nichž vyplývají klíčové rizikové faktory akcelerující tyto nežádoucí změny pojiva. Jedním z nejvýznamnějších faktorů při stárnutí je poškozování buněk a tkání volnými radikály. Metabolická aktivita tvoří v mitochondriích superoxidové radikály (záporně nabitě molekuly kyslíku), jež jsou za fyziologických podmínek enzymaticky eliminovány konverzí na neškodný kyslík a vodu. Stárnutím buněk však dochází k tomu, že organismus není schopen dostatečně rychle produkovat tyto enzymy, což vede k hromadění superoxidových radikálů a peroxidu vodíku

v tkáních. Tyto akumulované nebezpečné radikály umožňují uvnitř buněk průběh škodlivých řetězových radikálových reakcí vedoucích k zesíťování molekul, jež pak zhoršují normální funkce fosfolipidů, bílkovin, nukleových kyselin i enzymů.

Dalším faktorem jež hraje důležitou roli při stárnutí je omezený počet dělení buněk. Buňky pojiva v embryonálním stádiu jsou schopny přibližně 50násobného dělení, než tato jejich schopnost ustane a buňky zaniknou. S pokročilejším věkem tato schopnost klesá – u 40letého jedince proběhne pouze 40 těchto cyklů, u 80letého jsou schopny se buňky pojiva rozdělit již jen asi 30krát (viz obr. 5).



Obr. 5 Názorná demonstrace stárnutí pojivových tkání a omezeného buněčného dělení¹: a) mikrofotografie dobře organizovaného uspořádání buněk pojiva v mladé pojivové tkáni; b) patrné degenerativní změny ve stárnoucí pojivové tkáni po 50tinásobném buněčném dělení

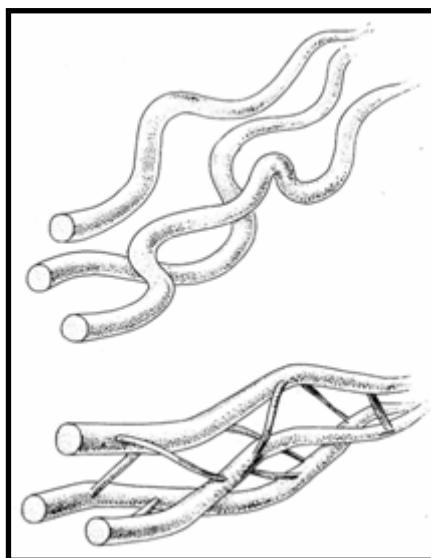
Tyto pochody na biochemické úrovni úzce souvisí též s hladinou specializovaných proteinů nazývaných růstové faktory, jež zodpovídají za růst a dělení buněk. Při jejich patologickém nedostatku nastává i zde předčasné stárnutí tkání a pojivové tkáně složené z buněk, které se již nejsou schopny obnovovat se stávají neuspořádanými a náchylnými k nevratným degenerativním změnám.

Mezi další příčiny přispívající ke stárnutí organismu se řadí občasné mutace DNA, akumulace buněčných odpadů v těle, hormonální nerovnováha, poruchy imunitního systému (způsobující poškozování vlastních buněk místo cizích) a buněčná smrt (apoptóza).

Bylo též prokázáno, že nadměrná expozice ultrafialovému (UV) záření způsobuje poškození DNA, což podporuje vznik rakoviny kůže. Novější studie poukazují zároveň na fakt, že UV záření přímo poškozují vlákna kolagenu a

elastinu , která za normálních okolností udržují pokožku pružnou a odolnou. Především energetičtější složka záření (UV-A) urychluje proces stárnutí kůže, což lze snadno makroskopicky pozorovat jako vrásky vznikající na pokožce v důsledku jejího celkového povolení a zkrěhnutí ⁴.

Při stárnutí dochází též k úbytku elastinu a zesílení (ztluštění) kolagenu, což ve svém důsledku vede např. ke kornatění (tvrdnutí) cév, ztuhlosti kloubů, svalové ochablosti, zvrásnění kůže. Toto zesílení kolagenu (často způsobené přítomností volných radikálů) je do značné míry dáno právě zesílením. Další příčinou zesílení proteinů bývá glykosylace, připojení glukózy či dalších sacharidů na protein bez účasti enzymů. Vznikající příčné vazby síťující molekuly bílkovin jsou lokalizovány na jejich polypeptidových řetězcích víceméně náhodně a jsou hlavní příčinou neohebnosti a ztráty pružnosti tkání při jejich stárnutí (viz obr. 6).



Obr. 6 Schematické znázornění zesíťování molekul proteinů pomocí příčných vazeb vznikajících mezi jejich polypeptidovými řetězci ⁵.

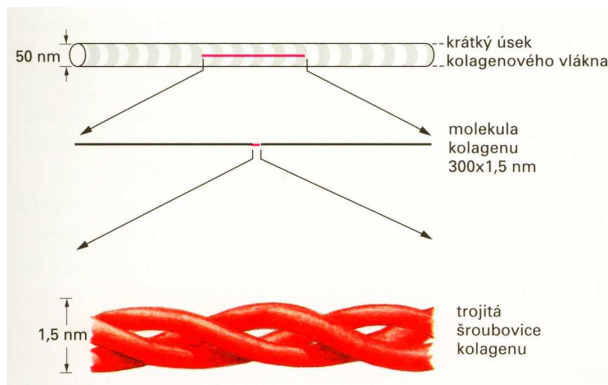
3.1.2 Struktura kolagenu

Kolagen je klíčovou bílkovinou tvořící strukturní základ pro výstavbu těla mnohobuněčných organismů, jeho název je příhodně odvozen z řeckého kolla – lepidlo a genes – vyrábět, rodit. U obratlovců představuje kolagen nejhojněji zastoupený protein vůbec a reprezentuje téměř jednu třetinu všech bílkovin obsažených v jejich těle. U savců je známo přibližně 20 genů pro kolagen, jež kódují jeho různé formy podle využití v jednotlivých tkáních. Kolagen je lokalizován

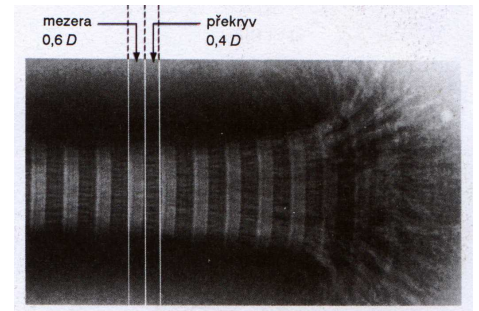
v mezibuněčném prostoru, kde je součástí tzv. extracelulární matrix (ECM) a je uspořádán do nerozpustných vláken vyznačujících se vysokou pevností, zejména v tahu. Tato, v přírodě unikátní, sekundární struktura umožňuje kolagenu plnit jeho nezbytnou biologickou a mechanickou funkci základní stavební jednotky řady typů pojivových tkání. Specifické vlastnosti kolagenu jej předurčují do role nejvíce namáhaných komponent pojiva, jakými jsou zejména nosné strukturní elementy tvořící skeletální systém – kosti a chrupavky, ale tvoří i šlachy, cévy, zuby, oční rohovku, vláknité struktury kůže, biologické membrány či další tělní tkáně (viz obr.7) ⁶.

V současné době rozlišujeme více než 20 kolagenních typů, lišících se jednak svojí primární strukturou (identifikována byla řada geneticky odlišných polypeptidových řetězců), délkou svého triplhelikálního úseku, příp. globulárními doménami, kvartérním intermolekulárním uspořádáním i rozdílnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi vyplývajícími z těchto odlišností ⁷. V důsledku toho jsou pak i různě zastoupeny v jednotlivých tkáních pojiva a v organismu plní příslušné biologické funkce dle svých vlastností a strukturních předpokladů. Kolageny typu I, II, a III představují přibližně 90% ze všech známých kolagenů, ostatní kolagenní typy jsou považovány za minoritní ⁸⁻¹¹.

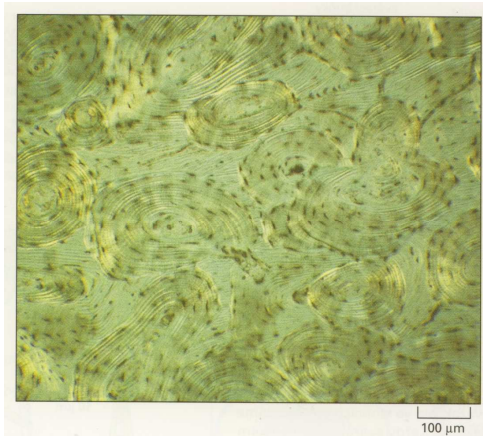
Z hlediska chemického složení a struktury však mají všechny kolagenní typy mnoho společných rysů. Mezi proteiny ojedinelá a charakteristická je trojnásobná pravotočivá šroubovice (s prudkým stoupáním 3,3 aminokyselinových zbytků na jeden závit a fibrilami posunutými o jednu čtvrtinu své délky), která tvoří centrální část kolagenní molekuly a nese na obou koncích nehelikální úseky tvořené C-koncovými a N-koncovými telopeptidy a propeptidy (viz obr. 7-9). Výše uvedený vzájemný posun fibril vůči sobě je dobře patrný i na snímcích z elektronového mikroskopu (viz obr.7 a 8), kde se jeví jako pravidelně se střídající světlé a tmavé proužky.



a)



b)



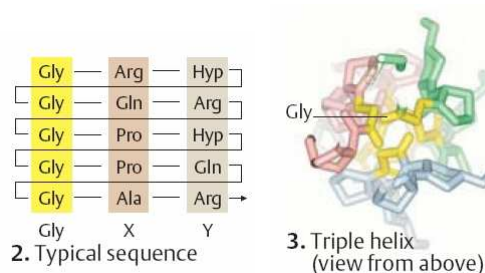
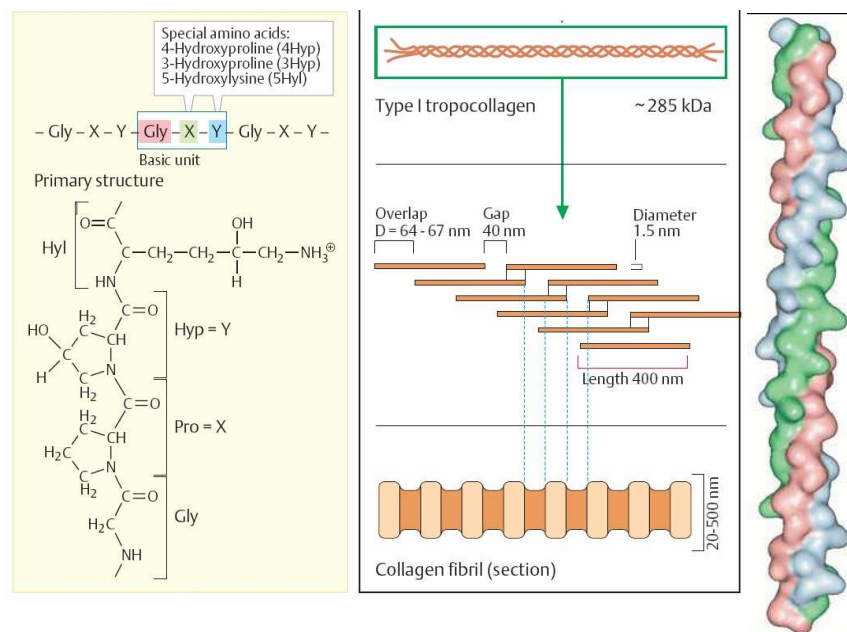
c)



d)

Obr. 7 Uspořádání vláken v kolagenu ⁶

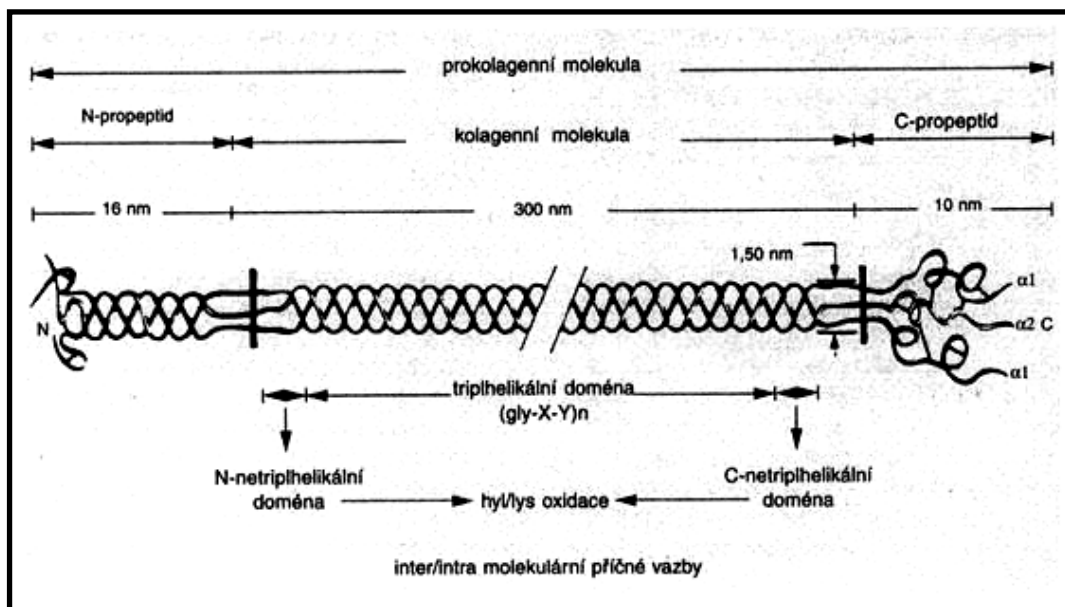
a) Schéma kolagenní fibrily; b) Úsek kolagenní fibrily s charakteristickým příčným pruhováním na snímku z elektronového mikroskopu; c) Příčný řez kostí s uspořádanými svazky kolagenních vláken u kolagenu typu I ³; d) Snímek z elektronového mikroskopu zobrazující uspořádání fibrilární sítě kolagenu typu IV v kůži.



Obr. 8 Charakteristické složení a prostorové uspořádání molekuly kolagenu ²

Důležitou složkou molekulární stavby tohoto proteinu jsou intramolekulární a intermolekulární příčné vazby zodpovědné za rigiditu kolagenní struktury ^{7, 12-15}. Jedinečnost kolagenu vyplývá už z jeho primární struktury s pravidelně se opakujícím motivem Gly-X-Y. Z jedné třetiny je tvořen glycinem (v aminokyselinové sekvenci lokalizován pravidelně na každé třetí pozici) a obsahuje též některé méně obvyklé aminokyseliny. Často se na pozici X či Y objevuje především prolin a dále bývá přítomen také 3- a 4-hydroxyprolin (úhrnně až 30 %) a 5-hydroxylysin (viz obr. 8 a 9). Tyto posttranslačně hydroxylované aminokyseliny vznikající hydroxylací aminokyselin jednotlivých peptidových řetězců až po biosyntéze proteinu jsou pro kolagen velmi charakteristické ^{2,8}. Tvorba hydroxyprolinu a hydroxylysinu je katalyzována oxygenázami obsahujícími železo (prolin a lysin hydroxyláza). Podmínkou správné syntézy a funkce kolagenu je také přítomnost kyseliny askorbové, v důsledku nedostatku vitamínu C dochází totiž

k narušení biosyntézy kolagenu a tento jev se patologicky projevuje jako kurděje. Varem přechází kolagen na amorfni formu, tj. želatinu ².



Obr. 9 Struktura celistvé molekuly prokolagenu a lokalizace jeho podjednotek ¹⁶

Aminokyselinové zbytky hydroxyprolinu stabilizují trojšroubovicovitou strukturu kolagenu tvorbou vodíkových můstků mezi jednotlivými α -řetězci. Hydroxylysin, resp. jeho hydroxylové skupiny naopak podléhají částečné glykosylaci s disacharidy (-Glc-Gal).

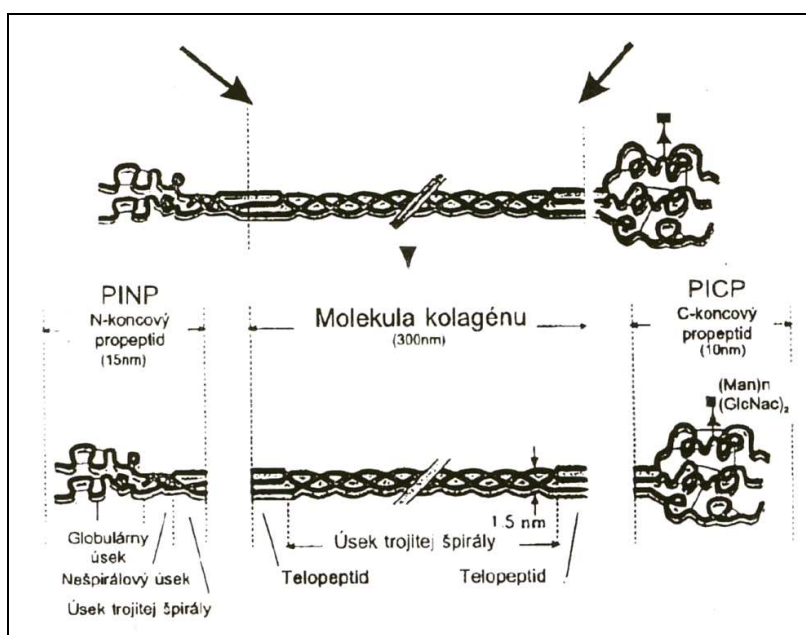
Různorodost struktury α -řetězců umožňuje klasifikaci kolagenů na jednotlivé podskupiny ^{7,14}. Tyto kolagenní typy vznikají kombinací tří, buď identických či odlišných, α -řetězců (označovaných jako $\alpha 1$ až $\alpha 3$). Řetězce všech kolagenů jsou homologní, rozdíl je však v pořadí aminokyselin (primární struktuře), velikosti molekul a jejich prostorovém uspořádání (fibrily, mikrofibrily, sítě), stupni hydroxylace aminokyselinových zbytků prolinu a lysinu a obsahu sacharidů. Tím je dána i schopnost odlišných typů kolagenu plnit v těle různé funkce.

Například nejběžnější kolagen typu I (přítomný zejména v kostech, kůži, šlachách, cévách, ale i v oční rohovce, zubní dentině či dalších tkáních) je tvořen dvěma řetězci $\alpha 1$ a jedním řetězcem $\alpha 2$, což je obvykle zapisováno jako $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$. Mezi další heterotrimery, tvořené různými α -řetězci, patří např. kolageny typu IV (hlavní složka bazálních membrán), typ V (ve svalech a membránách), VI, IX

a další. Různé biologické membrány, které jsou tvořeny síťovitou strukturou kolagenu typu IV se vyznačují i různou průchodností pro jednotlivé látky. Jejich permeabilita je dána velikostí ok v kolagenní síti. Tento selektivní síťový efekt má v organismu významné uplatnění, např. při glomerulární filtraci v ledvinách. Naopak jiné typy, jako chrupavkový kolagen typu II (např. v meziobratlových ploténkách), typ III (v kůži a cévách) či XI, jsou tvořeny třemi identickými α -řetězci (homotrimery) ⁹.

Jako první z nich byl díky částečné rozpustnosti v neutrálních a kyselých pufrách izolován a charakterizován kolagen typu I, jež se skládá ze tří řetězců obsahujících přibližně 1050 aminokyselin a délka jeho molekuly se pohybuje kolem 300 nm (obr. 9 a 10).

Triplhelikální část kolagenu, resp. N- a C- koncové telepeptidy kolagenu (označované jako NTx a CTx), se od netriplhelikálních oblastí odštěpuje za účasti specifických enzymů aminoprokolagenpeptidázy a karboxyprokolagenpeptidázy v místě, kde je molekula široká jen 1,5 nm (viz obr. 10). Šířka v místě N-koncové globulární domény propeptidu kolagenu (PINP) se pohybuje kolem 2 nm, oblast C-koncového propeptidu (PICP) je oproti tomu poněkud širší - přibližně 10 nm ⁶.



Obr. 10 Struktura prokolagenu a umístění kolagenních propeptidů a telopeptidů ¹⁷

Kolagen a další organické komponenty pojiva jsou produkovány specializovanými buňkami pojivových tkání jako jsou fibroblasty (např. v kůži

a šlachách), osteoblasty (v kosti) či chondrocyty (v chrupavce). Tyto intracelulárně syntetizované molekuly jsou z buňky uvolňovány exocytózou.

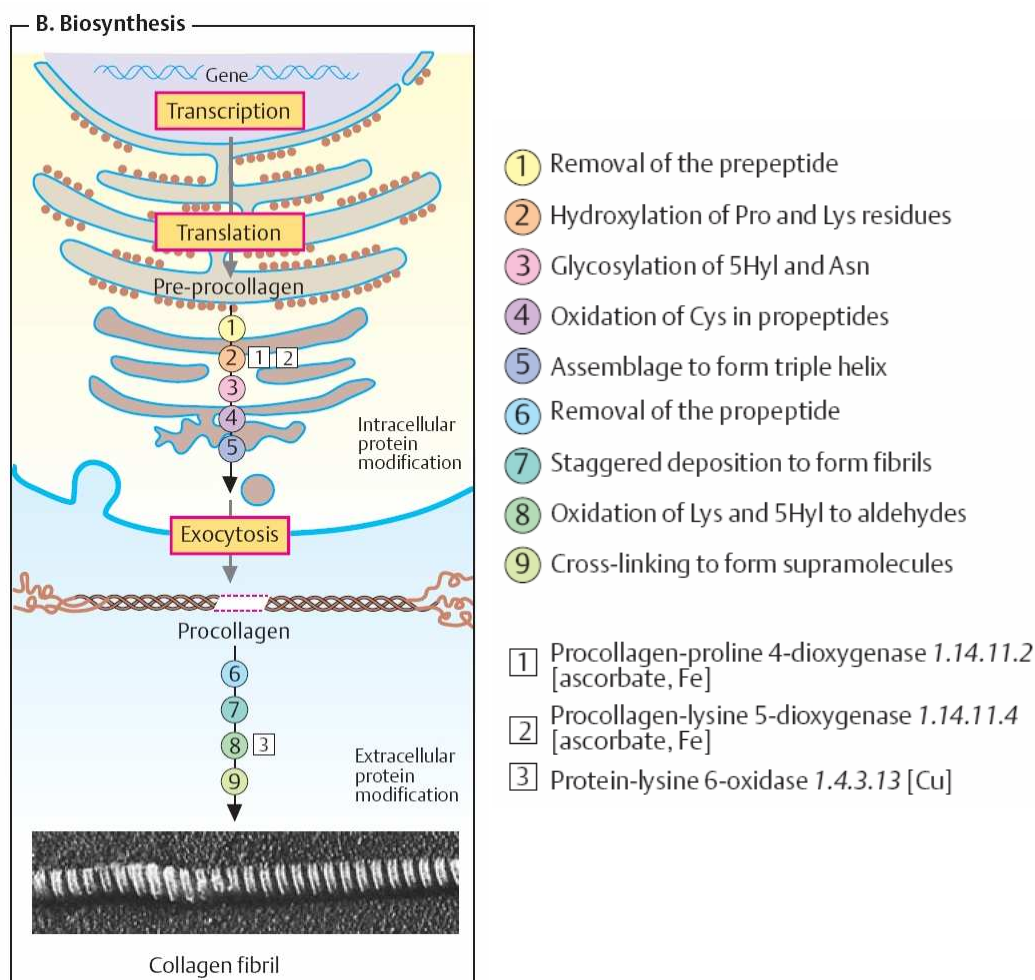
Molekuly tropokolagenu (s M_r kolem 285 kDa) se po přechodu z nitra buňky přes buněčnou membránu do extracelulárního prostoru sdružují a vytváří zde mdefinovaně organizované uspořádání vláken válcového průřezu (o průměru 20-500 nm). Tyto uspořádané polymery (kolagenové fibrily) s pravidelně se opakujícím proužkovým motivem po každých 64–67 nm (viz obr. 7 a 8), se převážně svými konci spojují dohromady pevnými kovalentními vazbami (vznikajícími zvláště z modifikovaných postranních řetězců lysinu a hydroxylysinu) v silnější vlákna kolagenu. Počet těchto kovalentních příčných vazeb významně roste s věkem a v případě určitých patologických poruch v metabolismu pojiva.

3.1.3 Biosyntéza kolagenu

Na níže uvedeném diagramu (obr. 11) je zjednodušeně znázorněn kompletní postup vzniku a stabilizace kolagenních jednotek - počínaje intracelulárními procesy, přes přechod intermediátů buněčnou membránou až po finální fixaci prostorového uspořádání v důsledku tvorby příčných vazeb stabilizujících molekulu.

Prekurzory kolagenu vznikají v endoplazmatickém retikulu buněk a zde či v Golgiho aparátu následně dochází k jejich významným post-translačním modifikacím. Odštěpením signálního peptidu vzniká prokolagen nesoucí na každém svém konci ještě C- a N- propeptidy. V této fázi též dochází k hydroxylaci většiny prolinových a části lysinových zbytků, a pak i glykosylaci prokolagenu. Intramolekulární a intermolekulární disulfidické vazby v propeptidech umožňují vznik trojšroubovicového uspořádání. Většina molekul tvořících organické složky pojiva je syntetizována intracelulárně a agreguje až vně buňky, jinak by se buňka mohla „zahltit“ svými vlastními produkty³. Proto teprve po proběhnutí těchto složitých přípravných procesů může být prokolagen jako intermediární produkt vyloučen exocytózou přes buněčnou membránu do extracelulárního prostoru, kde jsou proteolyticky odštěpeny N- a C- terminální propeptidy za vzniku molekul tropokolagenu a vláknitého uspořádání^{11,17}. Následně mohou být některé ϵ -aminoskupiny ve zbytcích lysinu oxidací transformovány na aldehydové skupiny a v důsledku kondenzačních reakcí dojde ke vzniku kovalentních vazeb mezi molekulami kolagenu. Tím nabývají fibrily svou konečnou podobu a tato struktura se

vyznačuje vysokou pevností v tahu a také značnou odolností vůči působení proteináz^{2,11}.



Obr. 11 Biosyntéza kolagenu²

Správné uspořádání fibril kolagenu je nezbytné pro vykonávání různých biologických funkcí v jednotlivých tkáních – např. v kůži kde je zapotřebí odolnost napětí v tahu v různých směrech vytváří kolagen proplétané vzory nebo střídající se vrstvy s odlišnou orientací, zatímco ve šlachách upínajících svaly ke kostem jsou fibrily ukládány do svazků orientovaných paralelně s hlavní osou napětí³.

Mezi buňky pojivových tkání se řadí především fibroblasty a chondrocyty (chrupavkové buňky) a osteoblasty (buňky tvořící kostní hmotu). Jedná se o buňky specializované na produkci kolagenů a dalších minerálních látek nezbytných pro tvorbu extracelulární matrix. Naopak buňky nazývané osteoklasty kostní hmotu „rozpuští“ uvolňováním specifických enzymů (kolagenáz) a kyselin.

Buňky pojiva jsou schopny dokonce i pozdějšího přeorganizování uspořádání vláken v průběhu vývoje tkáně. Fibroblasty zpracovávají mechanicky kolagen i tím, že se po něm pohybují, napínají jej a pomáhají ho zpevňovat a protahovat do provazců, což bylo demonstrováno četnými experimenty v tkáňových kulturách³. Těto vlastnosti lze využít i při zavádění implantátů do živých organismů¹⁸.

Kolagen představuje téměř třetinu všech proteinů přítomných v lidském organismu, přičemž přibližně polovina celkového množství kolagenu je uloženo v kostech¹⁹. Významnou úlohou kosti, jako typického představitele pojivové tkáně, je nejen funkce podpůrná, ale slouží též jako zásobárna vápenatých a fosforečnanových iontů a je místem kde se tvoří krevní buňky. Nejvýznamnějším kostním minerálem je apatit, tj. krystalická modifikace fosforečnanu vápenatého (může se vyskytovat v různých formách např. jako hydroxyapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, fluoroapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ nebo ve formě uhličitanu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$). Celkově je v kostech dospělého jedince v této formě uložen více než kilogram vápníku.

Novotvorba a odbourávání kostí je dynamickým procesem, jehož se účastní především kostní buňky, tj. osteoblasty (s rolí anabolickou) a osteoklasty (účinné při kostním katabolismu), které v těle v součinnosti s vybranými hormony neustále regulují hladinu vápenatých iontů. Například kalcitonin zvyšuje depozici Ca^{2+} v kostní matrix, zatímco parathormon podporuje mobilizaci zásob Ca^{2+} iontů a kalcitriol přispívá ke kostní mineralizaci. Z organických složek kosti mají největší význam kolageny a proteoglykany, ale studovány jsou i role dalších méně zastoupených proteinů a látek. Např. enzymy jako je alkalická fosfatáza (přítomná v osteoblastech), tak kyselá fosfatáza (v osteoklastech) se v laboratorní diagnostice hojně využívají jako ukazatelé kostního metabolismu^{2,20-25}.

3.2 Charakteristika a klasifikace sledovaných analytů

Všechny sledované analyty (pentosidin, pyridinoliny a desmosiny) se společně řadí mezi síťující, příčně-vazebné elementy (cross-links), kovalentně navzájem spojující jednotlivé fibrily kolagenu či elastinu. Tyto příčné vazby vznikají posttranslačními modifikacemi proteinů pojivových tkání (dnes sledovanými zejména při patobiochemických procesech *in vivo*).

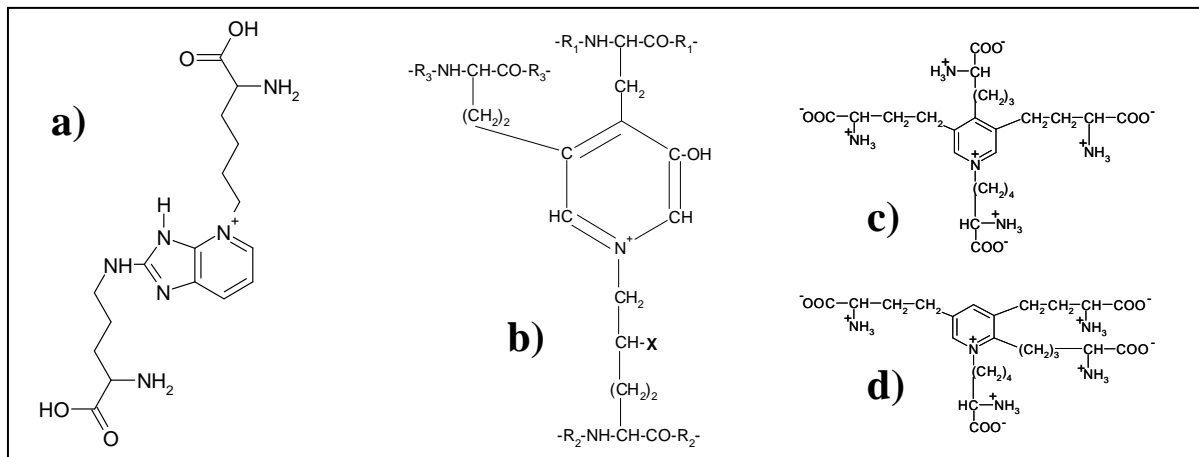
Například v nejběžnější formě kolagenu, tj. v kostním kolagenu typu I, lze nalézt kromě charakteristické trojšroubovicové části na obou koncích molekuly

krátké nehelikální úseky, tzv. telopeptidy^{17,20,26}. Právě tato koncová místa kolagenní molekuly jsou lokalitou, kde se nejčastěji tvoří intermolekulové a intramolekulové příčné vazby, které celou strukturu stabilizují. Jako příklad těchto kovalentních vazeb lze uvést příčně-vazebné elementy pyridinolinového typu. Ačkoli vznikají na obou koncích molekuly, jejich četnější výskyt je na N-koncových telopeptidech.

Nerovnováha mezi syntézou a odbouráváním tkáňového kolagenu či elastinu je často příčinou vzniku řady chronických kloubních chorob či jiných patologických stavů postihujících tkáň pojiva. Při nich jsou příčné vazby jako degradační produkty rozpadajících se struktur kolagenu či elastinu uvolňovány a secernovány do krve a dále do moči. Zde pak obvykle slouží jako ukazatelé kinetiky osteoklastické činnosti a indikátory resorpce a degradace kosti, chrupavky či elastických tkání^{20,22,25,27-35}.

Zesíťování polypeptidových řetězců proteinů s dlouhým biologickým poločasem významným způsobem ovlivňuje fyzikální, chemické a funkční vlastností fundamentálních proteinů pojivových tkání. Důsledkem zvýšeného příčného síťování kolagenu a elastinu u revmatických i jiných, tímto způsobem postižených, pacientů je pokles elasticity příslušných pojivových tkání, větší rigidita a křehkost tkáňových proteinů. Při významném snížení koncentrace příčných vazeb v tkáních pojiva v důsledku jejich patologicky zvýšeného odbourávání dochází i ke snížení rezistence těchto atakovaných proteinů vůči působení specifických proteáz (kolagenázy, elastázy).

Sledované příčné vazby přítomné v kolagenu a elastinu můžeme v zásadě dělit na dva typy - ty, které vznikají enzymatickou cestou (pyridinolin, deoxypyridinolin, desmosin, isodesmosin) a na neenzymaticky vznikající (pentosidin). Struktura těchto „kroslinků“ je znázorněna na obr. č. 12.



Obr. 12 Chemická struktura sledovaných analytů: a) pentosidin; b) pyridinolin (X = OH), resp. deoxypyridinolin (X = H); c) desmosin; d) isodesmosin.

3.2.1 Kolagenní příčné vazby

Konečné produkty pokročilé glykace (AGEs) a jejich role v organismu AGEs

Především ve světové literatuře lze nalézt v poslední době řadu odborných článků³⁶⁻⁴⁵ poukazujících na signifikantně vyšší hladinu tzv. konečných produktů pokročilé glykace (advanced glycation end-products, AGEs) u chronických zánětlivých a degenerativních procesů, především u pacientů s revmatoidní artritidou a osteoartritidou (oproti kontrolní, věkově adekvátní zdravé skupině jedinců). Další četné práce se týkají diabetických pacientů s prokázanou hyperglykemií, či renální insuficiencí. Časté jsou i publikace související s otázkou zvýšeného oxidačního stresu, neurologických patologií a procesu stárnutí^{46-60, 67}. V domácích podmínkách se stanovením pentosidinu zabývá pouze několik výzkumných pracovišť, většinou z oblasti lékařského aplikovaného výzkumu^{61-63, 69}.

Mechanismus negativního působení AGEs na organismus je dobře patrný např. u diabetu mellitu či při chronickém selhání ledvin jako jedněch z nejsledovanějších diagnóz souvisejících s akumulací těchto látek v těle v souvislosti s působením oxidačního a karbonylového stresu^{42,43,54,64}.

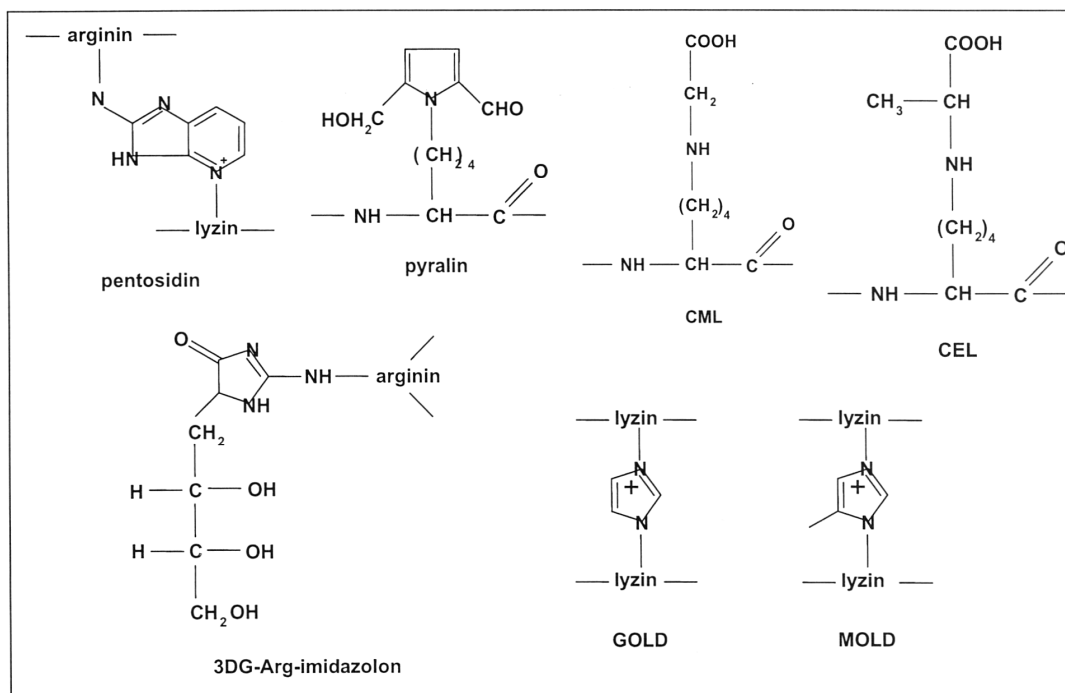
Diabetes mellitus (DM) představuje metabolickou poruchu charakterizovanou neschopností správně regulovat hladinu glukózy v organismu. U diabetu I. Typu

(DM I) jde v první řadě o genetickou predispozici, která se záhy u mladých jedinců projeví závažnou autoimunitní reakcí a ztrátou β -buněk pankreatu. V případě diabetu II. Typu (DM II), přítomného u starších jedinců nad 30 let věku je zhoršený stav pacientů podmíněn dysfunkcí β -buněk pankreatu a zásadní roli hraje tzv. inzulinová rezistence, kdy fyziologické množství inzulinu způsobí oproti zdravým jedincům jen sníženou biologickou odezvu. Častým rizikovým faktorem při vzniku DM II je nadměrný energetický příjem, jež vede k hyperinzulinemii a hyperglykemii⁶⁵. Je známo, že narušení metabolismu lipidů se záhy projeví i poruchou metabolismu sacharidů. Mezi nejvýznamnější mechanismy vzniku diabetických komplikací je řazena právě neenzymatická glykace, kdy při zvýšené akumulaci AGEs dochází postupně poškození celé extracelulární matrix (pojivové mezibuněčné hmoty). Oxidační a karbonylový stres je podnětem k glykoxidaci a lipoperoxidaci, tj. procesů podporujících vznik pro tělo nebezpečných AGEs.

Při renální insuficienci (selhání ledvin) stojí za komplikacemi z hlediska patobiochemie opět oxidační stres, dalšími významnými faktory je zde mj. mikrozánět a přítomnost zvýšených koncentrací AGEs. Oxidační stres nejenže snižuje schopnost antioxidační ochrany organismu, ale vede též k modifikaci řady biologických struktur a může způsobit i negativní autoimunitní odpověď (tvorba autoprotilátek)⁶⁵.

Vlivem oxidačního a karbonylového stresu, např. při uremii (hromadění odpadních dusíkatých látek v krvi při nedostatečné funkci ledvin), vznikají konečné produkty typu AGEs (viz obr. 13), ale i AOPP (advanced oxidation protein products) či ALEs (advanced lipoperoxidation end products). Kromě toho při tom mohou vznikat i další produkty radikálových reakcí jako např. malondialdehyd (MDA) či oxidy dusíku nebo sloučeniny karbonylové (aldehydy).

Struktura AGEs



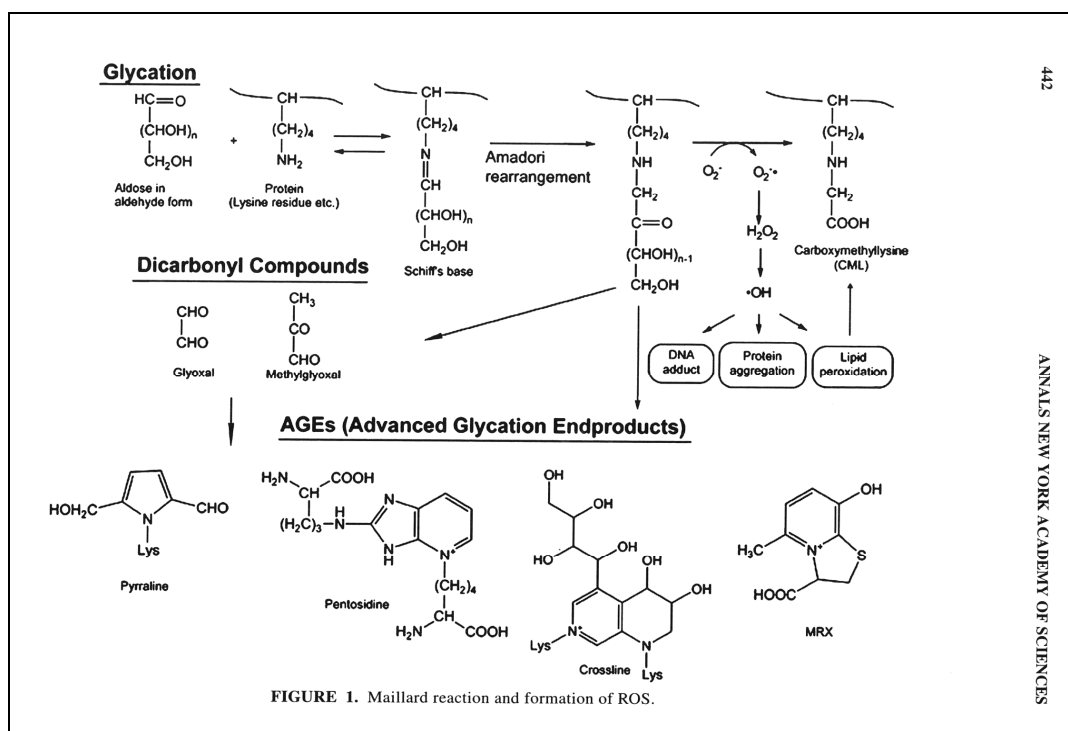
Obr. 13 Příklady produktů pokročilé glykace a jejich struktura ⁴³

Oxidační stres představuje obecně převahu volných radikálů nad antioxidanty, což může ve svém důsledku vést kromě síťování proteinů i k narušení dalších pro život klíčových látek jako jsou lipidy (lipoperoxidace), sacharidy (glykoxidace) i nukleové kyseliny (mutace DNA).

Karboonylový stres je podmíněn zvýšením tvorby reaktivních karboonylových sloučenin (např. malondialdehyd, glyoxal, glykolaldehyd) nebo sníženým odbouráváním specifickými reduktázami a vylučováním ledvinami. Tyto *species* mohou vznikat jednak autooxidací sacharidů, polynenasycených mastných kyselin nebo askorbátu, ale i neoxidační degradací fosfátových částí sacharidů. Reaktivní karboonylové sloučeniny neenzymatickými reakcemi s volnými aminoskupinami bílkovin vedou ke vzniku sloučenin typu AGEs a ALEs a v důsledku toho pozměňují biologické struktury (obr. 14).

Patologické působení AGEs *in vivo* je nejen přímé (zesíťování klíčových bílkovin pojiva a z něj vyplývající změny jejich vlastností či indukce lipoperoxidace), ale i prostřednictvím specifického receptoru AGE (RAGE) způsobujícího stimulaci buněčné proliferace a tvorby řady klíčových metabolických mediátorů (cytokiny, růstové faktory, adhezivní molekuly), ale může vést např. i ke

zvýšení syntézy kolagenu typu IV (tvořícího kolagenní sítě bazálních membrán), fibronektinu a proteoglykanů nebo též k mutaci DNA.



Obr. 14 Příklady molekul vznikajících v důsledku negativního působení reaktivních kyslíkových radikálů na proteiny při oxidačním a karbonylovém stresu ⁶⁶

Skupinu AGEs lze obecně charakterizovat jako látky schopné síťovat a modifikovat biologické struktury (proteiny), jimž je vlastní typická žlutohnědá pigmentace a přirozená fluorescence. AGEs dokáží reagovat se specifickými receptory, např. RAGE, přičemž lze pozorovat produkci významných buněčných mediátorů jakými jsou např. prozánětlivé cytokiny, růstové faktory či adhezivní molekuly. Kromě již zmíněných komplikací onemocnění jako je diabetes a chronické selhání ledvin (včetně komplikací s dialýzou), hrají AGEs významnou roli i v patogenezi aterosklerózy (vliv na zesilování cévních stěn), neurodegenerativních chorob (systémová skleróza, Alzheimerova choroba), chronických revmatických onemocnění kde AGEs přispívají ke kloubní a kostní destrukci i zánětlivým procesům (revmatoidní artritida, osteoartróza), ale i při cirhóze jater a chronických onemocněních plic.

Hladinu AGEs lze ovlivňovat potlačením neenzymatické glykace, oxidačního a karbonylového stresu (např. aplikací antioxidantů) ^{43,68}, zajištěním dobré funkčnosti

ledvin (či hemodialýzou), ale i složením přijímané potravy (zejména z hlediska proteinů a sacharidů) či příp. zajištěním kompenzace hyperglykemie a hyperlipidemie.

Zesítním modifikované proteiny vykazují oproti svým nativním formám odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. Zesítnění příčnými vazbami se projeví změnou rozpustnosti a náboje proteinů (nižší izoelektrický bod), zvýšenou odolností vůči proteolytickému štěpení, tepelné denaturaci i působení kyselin^{43,70,71}.

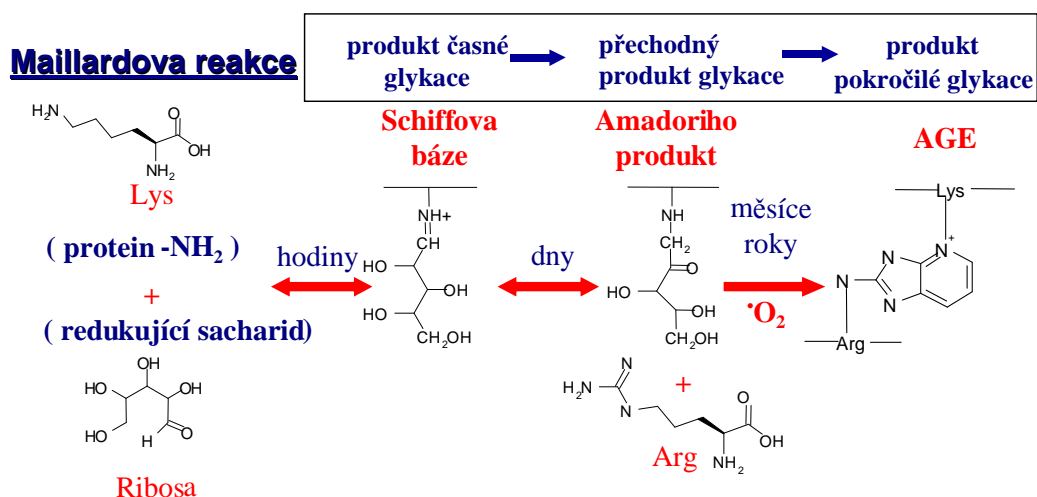
Produkty pokročilé glykace lze stanovovat buď nescificky jako celou skupinu fluoreskujících AGEs pomocí spektrofluorimetrie (excitace 350-370 nm, emise 430-460 nm) či imunochemicky metodou ELISA s využitím polyklonálních protilátek, některé lze specificky stanovit pomocí ELISA s použitím monoklonální protilátky (např. karboxymetyllysin a imidazolón)^{62,72,73}. Přesnější a spolehlivější je však aplikace HPLC a kombinací chromatografických metod s hmotnostní detekcí (LC-MS, MALDI-TOF/MS, GC-MS)⁷⁴ lze dokonce charakterizovat i nové *species* z rodiny AGEs.

Pentosidin

Značná část experimentální práce byla věnována stanovení fluoreskujícímu síťujícímu elementu – pentosidinu, celým názvem imidazo(4,5-b)pyridinum, který patří mezi nejlépe chemicky definované reprezentanty tzv. konečných produktů pokročilé glykace. Vyskytuje se zejména v proteinech s dlouhým biologickým poločasem – nejvíce jej lze nalézt v kostním a chrupavkovém kolagenu.

Vzniká ze zbytků lysinu a argininu neenzymatickou glykací, tzv. Maillardovou reakcí. Ta představuje sled kondenzačních reakcí, zahájený kovalentní vazbou oxoskupiny redukujícího sacharidu (zejména pentózy – nejreaktivnější bývá ribosa) na volnou ϵ -amino-skupinu lysinu, která je součástí polypeptidového řetězce síťovaného proteinu. Během několika hodin vznikají časné produkty glykace (nestabilní Schiffova báze), pomalu dochází k přeuspořádání vazeb (Amadoriho přesmyk) a vzniká, stále ještě reverzibilní reakcí, Amadoriho produkt (glykovaný protein). Jde o meziproduct, jež je stabilní vůči hydrolýze. Přítomnost volných kyslíkových radikálů, např. při oxidačním stresu však již během týdnů až měsíců startuje a urychluje konečný, již ireverzibilní, krok vzniku AGEs, tj. adičních sloučenin (aduktů) či příčně-vazebných elementů (kroslinků)^{75,76}. Stručný přehled jednotlivých dílčích reakcí vedoucích k jejich tvorbě je naznačen na obr. 15.

PEN je obecně považován za indikátor celkového rozpadu kolagenu a glykační a oxidační zátěže organismu (významné je jeho zvýšení zejména v souvislosti se zánětlivými procesy, artritidou, diabetem, oxidačním stresem a dalšími projevy stárnutí pojivových tkání)^{39,77-81}. Při těchto klinických stavech je pozorováno zvýšení tvorby PEN *in vivo* a jelikož není dále metabolizován, dochází k jeho akumulaci, což může vést až k toxickému působení v organismu. K postupnému zvýšení hladin PEN dochází i u fyziologicky probíhajících procesů, výraznější vzrůst jeho koncentrace je však za těchto okolností pozorován obvykle až po 6. dekádě života, ovšem u výše uvedených patologických procesů lze pozorovat vzrůst jeho hodnot již mnohem dříve.



Obr. 15 Schéma Maillardovy reakce se znázorněním vzniku pentosidinu, resp. Dalšíh konečných produktů pokročilé glykace (AGEs)

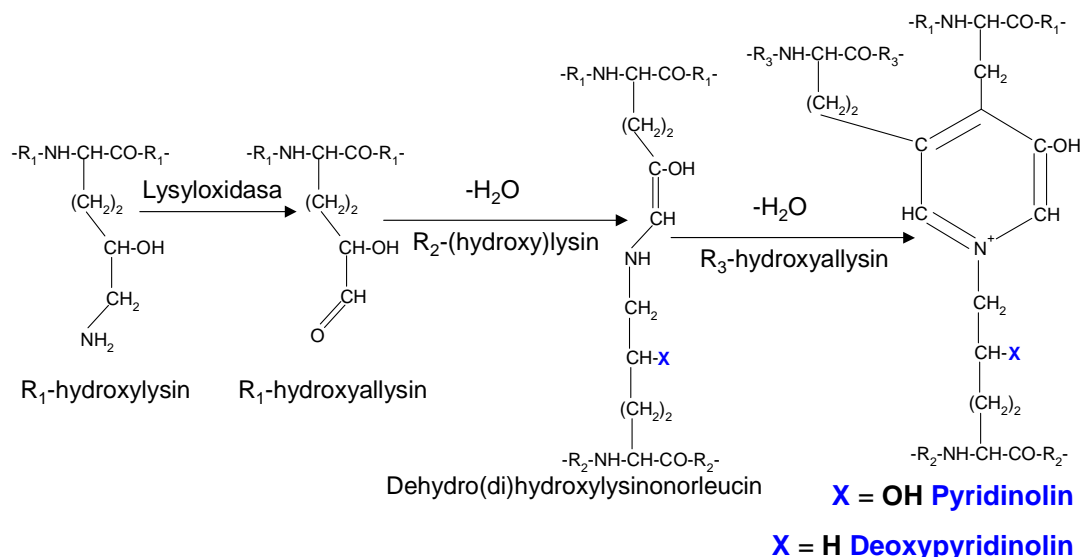
Jak významným faktorem při akumulaci PEN v tělních tkáních je věk, dokládá např. fakt, že mezi adolescencí a 80. rokem věku vzrůstá v kloubní chrupavce množství pentosidinu více než 30krát^{36,77,82}. Důvodem pro to je velmi dlouhý biologický poločas kolagenu hyalinní chrupavky (přes 100 let). Neenzymatická modifikace kolagenu negativně ovlivňuje kvalitu, metabolický obrat a reparační kapacitu chrupavky a finálně tak může přispět ke snížení odolnosti vůči působení

mechanických sil, kterým je chrupavka v průběhu života vystavena⁴⁶. Zvýšená akumulace AGE v kloubní chrupavce je proto považována např. za jeden z molekulárních mechanismů, kterými se věk podílí na patogenezi OA.

Pyridinolinové příčné vazby

Dalšími sledovanými ukazateli, odrážejícími kostní katabolismus je pyridinolin (celým názvem hydroxylysylpyridinolin) a deoxypyridinolin (tj. lysylpyridinolin).

Jak v případě PD ($M_r = 429$), tak DPD ($M_r = 413$) jde o stabilní, neredukovatelné, příčně-vazebné elementy specificky vázané na kolagen, vznikající enzymatickou cestou za účasti lisyloxidáz sledem chemických reakcí zahrnujícím např. aldolovou kondenzaci, přesmyky, oxidaci a dehydrataci (obr. 16).



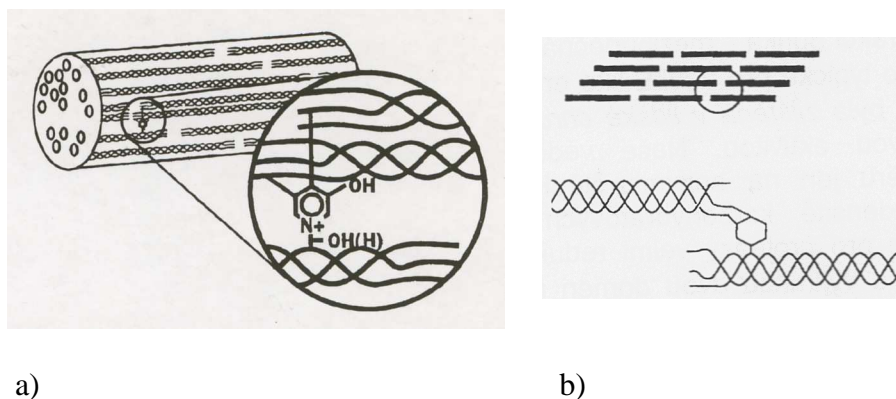
Obr. 16 Vznik trifunkčních příčně-vazebných elementů pyridinolinového typu

Oba tyto kolagenní fragmenty, patří mezi přirozeně fluoreskující nízkomolekulární látky, 3-funkční síťující elementy tvořené zbytky hydroxylysinu a lysinu (PD vzniká ze 3 hydroxylysilových zbytků, DPD ze 2 hydroxylysilových a 1 lysilového).

Strukturálním základem PD je pyridinový heterocyklus se substituenty na pozici 1, 3, 4 a 5, přičemž obsahuje 3 karboxyskupiny a 3 aminoskupiny. Při kyselém pH se PD chová jako hydrofilní kationt. Absorpční maximum je při 295 nm (v kyselém prostředí) a 325 nm (v neutrálním či alkalickém prostředí). Fluorescenční excitační maxima jsou 295 a 325 nm, emisní maximum je při 400 nm. Pyridinolin je extrémně

stabilní vůči kyselinám. Může se částečně měnit na hydroxylysin varem ve vodě nebo zářením v UV oblasti ⁶⁵.

Nejčastěji tyto trojvazné pyridinolinové sloučeniny propojují dva řetězce α sousedních molekul kolagenu (přednostně jde o dva řetězce $\alpha 2(I)$, a poslední vazebné místo pak zasahuje do spirálové části molekuly kolagenu (viz obr. 17).



Obr. 17 a) Typické umístění trojvalentních příčných vazeb pyridinolinového typu v molekule kolagenu ¹⁷; b) Uspořádání kolagenu s fibrilami posunutými o jednu čtvrtinu své délky a provázanými pyridinolinovými příčnými vazbami ¹⁶

Výskyt obou pyridinolinových spojek je nejhojnější v kostním kolagenu typu I, v chrupavkovém kolagenu typu II a dále pak v typech III a IX. Nejvyšší poměr deoxypyridinolinu k pyridinolinu je u kostního typu (přibližně 1:3,5). V ostatních kolagenních typech je tento poměr významně menší (až 1:10), a to je i důvodem, proč je deoxypyridinolin považován za specifitější marker kostní resorpce než pyridinolin ¹⁷.

V těle se pyridinolinové příčné vazby vyskytují ve zralém kolagenu, nejsou ovšem dále metabolizovány a u chronických kostních chorob jsou tedy při rozpadu kolagenních struktur secernovány do krve a dále do moči, kde se koncentrují a kde jsou také obvykle stanovovány.

Při degenerativním onemocnění skeletu nastává často uvolnění příčných vazeb pyridinolinového typu z matrice tkání pojiva a vede posléze k jejich postupnému rozpadu. V klinické praxi proto slouží jejich hladiny v moči jako markery osteoklastické aktivity, resp. Jako ukazatele kinetiky odbourávání kostního kolagenu – zejména u chronických, degenerativních revmatických chorob spojených

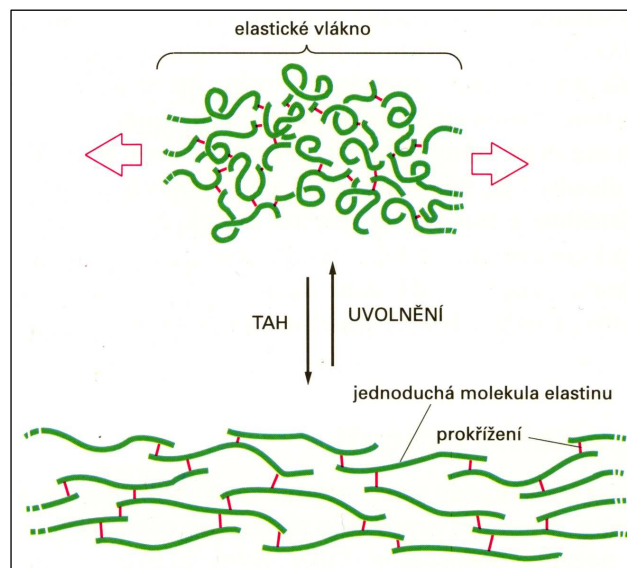
s úbytkem kostní hmoty (např. osteoporóza, osteomalácie, osteopenie i osteoartróza)
83-87 .

Na základě měření jejich koncentrací byla mezi oběma pyridinolinovými příčnými vazbami nalezena vysoká korelace (korelační koeficient $r = 0,97$), přičemž dominantní pyridinolin bývá u výše zmíněných chorob obvykle přítomen v koncentraci 3-5krát vyšší oproti deoxypyridinolinu⁸⁸ .

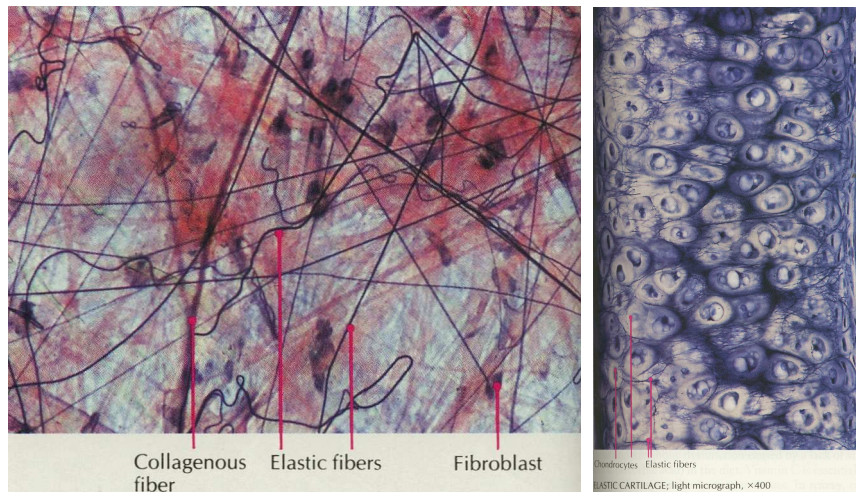
3.2.2 Struktura elastinu

Po kolagenu je druhou nejvýznamnější složkou pojivových tkání elastin, a proto je logicky předmětem zájmu kliniků při studiu změn pojiva také sledování koncentrací jeho příčně-vazebných elementů. U řady chorob, např. u pacientů se systémovou sklerodermií (SSc) či s psoriatickou artritidou (PsA), je proto zajímavé analyticky kvantitativně monitorovat obsah desmosinu a isodesmosinu jako ukazatelů kinetiky odbourávání elastinu. Tento fibrózní protein, vznikající ze svého prekurzoru tropoelastinu ($M_r = 74\ 000$), tvoří měkké elastické pojivové tkáně (např. cévní stěny, elastické chrupavky, plíce, kůže, játra, ledviny apod.) a tvoří na rozdíl od kolagenu ze svých vláken vysoce elastické síť^{3,11,70,71,89} (viz. Obr. 18).

Při řadě patologických metabolických dějů postihujících pojivo podléhá tato bílkovina změnám, v jejichž důsledku dochází k uvolnění elastinových příčných vazeb (DES a IDES), které lze citlivými analytickými metodami stanovit v moči^{90,91} .



a)



b)

Obr. 18 Struktura elastinu s typickým zesítněním

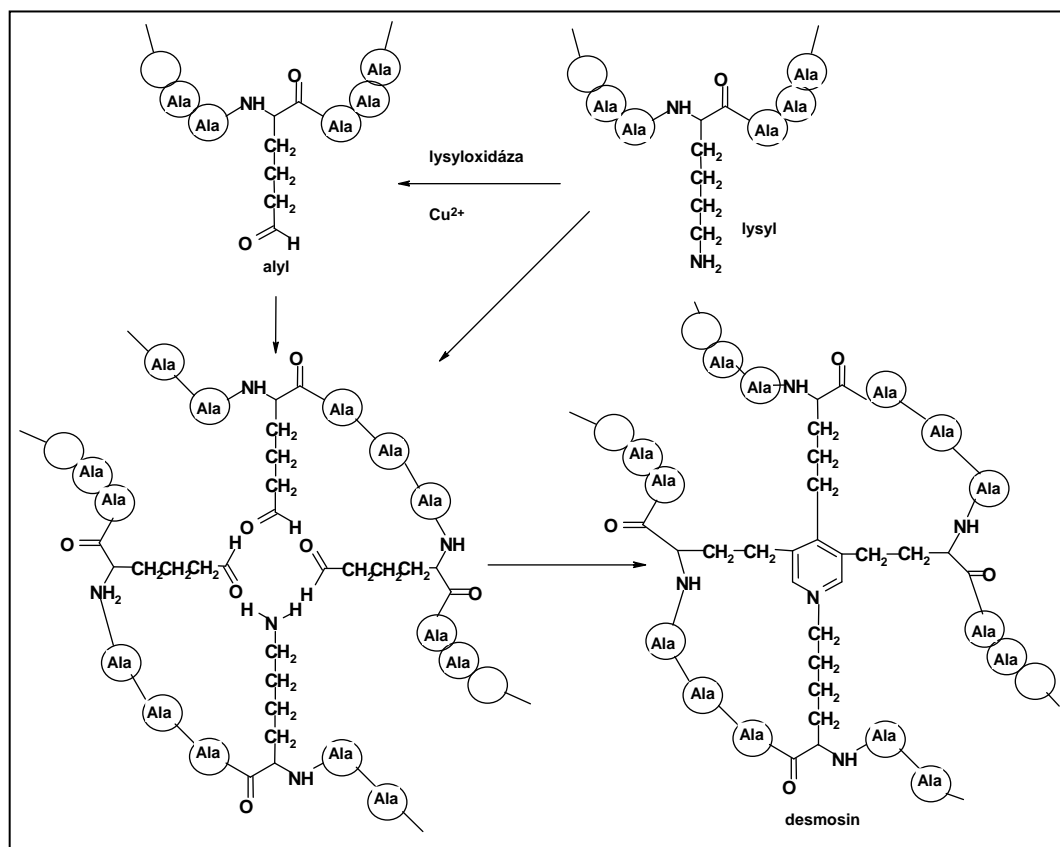
a) Ukázka změny konformace elastinu při působení síly v tahu ³; b) Mikrofotografie zobrazující vlákna v elastických tkáních ¹

3.2.3 Příčně-vazebné elementy v elastinu

Analogické příčně-vazebné elementy jako pyridinoliny v kolagenu se tvoří i v elastinu – zde jde o desmosin (DES) a isodesmosin (IDES). Oba vzácně se vyskytující izomery vznikají kondenzací postranních řetězců 4 lisylových zbytků obsažených v tropoelastinu za účasti lisyloxidázy a měďnatých iontů a tvoří pyridinové cykly. Absorbují v UV oblasti, jsou ve struktuře elastinu specificky

vázány a v žádných jiných proteinech se nevyskytují (jejich obsah je však velmi malý – cca 2 zbytky DES a IDES na 1000 jiných aminokyselinových zbytků přítomných v elastinu). Jejich stanovení může tedy sloužit jako ukazatel odbourávání elastinu při patologických metabolických dějích postihujících měkké, elastické pojivové tkáně (cévní stěny, elastické chrupavky, plíce či kůže, např. při systémové sklerodermii) ^{11,14,27,28,89}.

Tyto degradační produkty elastinu, vznikající ze 4 lisylových zbytků (viz obr. 19), jsou neobvyklými aminokyselinami obsahujícími ve svých molekulách 4 karboxylové skupiny a 4 aminoskupiny a jako síťující elementy zajišťují svými pevnými kovalentními vazbami unikátní mechanické vlastnosti elastinu ^{3,92}. Oba isomery patří mezi nízkomolekulární látky s relativní molekulovou hmotností $M_r = 526$, mají velmi podobnou strukturu a jako standardy jsou komerčně dostupné (jejich nevýhodou je, že jsou značně hygroskopické), ale v reálných biologických vzorcích se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Vykazují však dostatečnou absorpci v ultrafialové oblasti spektra (s absorpčním maximem: $\lambda_{DES} = 268$ nm; $\lambda_{IDES} = 278$ nm), díky níž lze oba isomery po předchozí kyselé hydrolýze a prekoncentraci vzorků detekovat a kvantitativně stanovit. Tím, že se DES ani IDES nenachází v jiných proteinech v organismu a jsou specificky vázány na elastin, lze jejich koncentrace v tkáních a tělních tekutinách považovat za dobrý laboratorní ukazatel obsahu elastinu v těle. Oproti některým jiným indikátorům metabolického obratu pojivových tkání je však obsah DES a IDES v elastinu velmi malý (jejich zastoupení je jen cca 2 zbytky DES a IDES na 1000 jiných aminokyselinových zbytků obsažených v elastinu), a proto jsou před jejich vlastní kvantitativní analýzou nezbytně vyžadovány náročné prekoncentrační kroky ^{11,13}.



Obr. 19 Schematické znázornění vzniku desmosinových tetravalentních příčných vazeb v elastinu ¹¹

3.3 Metody použitelné pro stanovení sledovaných látek – analytický přístup ke studiu struktury kolagenu a elastinu

Pro potřeby stanovení příčných vazeb kolagenu či elastinu existuje několik odlišných analytických přístupů. Volba analytické metody je pak podmíněna účelem stanovení, potřebou specifity a selektivity stanovení konkrétního analytu, typem vzorku, charakterem matrice a koncentrací sledovaného analytu v reálném vzorku. V neposlední řadě pak hraje důležitou roli též čas potřebný k analýze, ekonomické možnosti pracoviště a dostupnost patřičné instrumentace.

Pro některé účely stanovení skupiny látek fluoreskujících AGE se využívá jednoduchého měření integrální fluorescence, které však není specifické pro konkrétní analyty a může přitom docházet k řadě interferencí daných přítomností rušivých fluoreskujících komponent ve vzorku ^{62,68,72}.

Stanovení některých AGE derivátů (např. karboxymetyllysin, imidazolon), pyridinolinových kroslinků, nebo diagnosticky zajímavých kolagenních propeptidů či telopeptidů je dnes možné i pomocí imunochemických testů, které jsou již v některých případech komerčně dostupné v podobě kitů. Tyto sady jsou nejčastěji založeny na principu ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), kdy je komplex antigen-protilátka značen enzymem, příp. pomocí značení konjugátu radioaktivními izotopy u metod RIA (Radioimmunoassay), dodávají se též kity určené pro speciální analyzátory s chemiluminiscenční detekcí (např. typu IMMULITE).

Tyto imunotesty jsou však většinou omezeny pouze na určitý typ vzorku, dokáží v tělních tekutinách stanovit sledované látky přítomné pouze ve volné formě (nezohledňují obsah těchto látek vázaných v peptidech a proteinech), většinou také není možno rozlišit jednotlivé epitopy stanovovaných látek. Oproti separačním metodám jsou navíc principiálně zatíženy větší chybou měření a menší reprodukovatelností, nezanedbatelným rizikem falešně pozitivních či negativních výsledků a značný je i rozptyl naměřených hodnot při mezilaboratorním porovnání. Proto je při jejich použití třeba vycházet z referenčních hodnot stanovených na konkrétním pracovišti.

Tyto metody se tedy využívají spíše v rutinním provozu jako orientační, rychlá, sériová stanovení nevyžadující větší množství vzorku ani jeho náročnější předchozí úpravu (např. na typická ELISA stanovení je na mikrotitrační destičku obvykle nanášeno 10-100 μ l vzorku). Na rozdíl od některých jiných metod nedovoluje tento přístup možnost stanovení více různých analytů současně, využití izotopových metod vyžaduje navíc i dodržování zvláštních bezpečnostních předpisů vyplývajících z práce s radioaktivním materiálem (manipulace s izotopy i jejich přechovávání a představuje potenciálně zvýšená rizika pro laboratorní personál). Nevýhodou popsaných imunochemických metod je také značně vysoká cena za jednotlivé stanovení – cena za samotný osteologický kit (bez započtení nákladů na obsluhu a nezbytnou instrumentaci) pro typické imunochemické stanovení přibližně 70 vzorků se obvykle pohybuje řádově mezi 20 000 až 30 000 Kč⁹⁴⁻⁹⁶.

Vzhledem k tomu, že komerčně dodávané ELISA či RIA soupravy jsou určeny pro jednorázové použití a mikrotitrační destičky potažené již jednou protilátkami nelze použít opakovaně, vyplatí se pořízení takového kitu až po nashromáždění většího počtu vzorků, pro stanovení několika málo jednotlivých vzorků by nebyl

nákup této sady rentabilní. Nejde-li tedy o pracoviště s rutinním provozem, čekání na výsledek stanovení konkrétního vzorku se může tedy protáhnout na několik týdnů či měsíců. Navíc je i při správném uskladnění doba použitelnosti takových sad velmi omezená (v řádu několika měsíců).

Vysokou účinnost separační metody nabízí při těchto požadovaných analýzách mnohem větší variabilitu, větší přesnost a reprodukovatelnost stanovení. Ve spojení s moderními způsoby detekce je dosahováno vysoké citlivosti měření a jsou velmi vhodné pro spolehlivé kvantitativní měření i více analytů současně. Cena za použítá rozpouštědla a další nezbytné reagentie je oproti drahým imunochemikáliím výrazně nižší. Metody na základě HPLC či plynové chromatografie a od nich odvozené „hyphenated“ techniky jsou také často voleny jako referenční validované metody pro daná stanovení, které poskytují věrohodné a spolehlivé výsledky dosahující dobré shody i v rámci interlaboratorního porovnání. Některé z těchto metod, zejména ty využívající k detekci hmotnostní spektrometrii, nabízí kromě výše uvedených předností i možnost určování strukturního a prostorového uspořádání molekul. Limitujícím faktorem v tomto případě však i zde může být cena analýzy.

Naopak, poměrně snadné, rychlé a nepříliš nákladné řešení řady separačních úkolů nabízí možnost využití některé z řady modifikací kapilárních elektroforetických metod. Tyto moderní analytické techniky jsou dnes stále více vyhledávány, především pro jejich velmi vysokou separační účinnost, které ostatní známé metody nejsou schopné dosáhnout. Mezi další přednosti nepochybně patří miniaturní spotřeba vzorku a reagentií a krátký čas analýzy, což vše představuje značné úspory oproti ostatním metodám. Ačkoli se dosud kapilární elektroforéza obvykle nevyužívá k analýzám rutinního charakteru, existuje mnoho úspěšných aplikací zaměřených na analýzu biologicky aktivních látek.

Velký význam má dnes zejména kapilární zónová elektroforéza a micelární elektrokinetická chromatografie, které nachází značné uplatnění např. při vysokou účinných separacích aminokyselin, peptidů a bílkovin. Přestože elektromigrační kapilární metody vychází v mnoha rysech z teoretických základů kapalinové chromatografie, není dosud po všech stránkách natolik propracovaná a instrumentačně vyzrálá jako HPLC. Proto se stále ještě naráží na specifické problémy týkající se např. adsorpce proteinů na stěny kapiláry, zajištění stálosti elektroosmotického toku⁹⁷ a není dosahováno takové reprodukovatelnosti jako u metod chromatografických⁹⁸⁻¹⁰⁰. Vzhledem k miniaturizaci ve všech aspektech

kapilárních metod, včetně dávkování zanedbatelných objemů vzorku (v řádu nl až pl), nehodí se příliš pro preparativní účely a je zde také dosud instrumentačně obtížné propojení s určitými typy detektorů, což v případě některých analytů ovlivňuje i citlivost stanovení. Kapilární elektroforéza je pro své přednosti oblíbena především při kvalitativní analýze, je vhodná např. pro porovnávání složení komplexních vzorků biologického materiálu, při kontrole čistoty izolovaných frakcí či srovnávání jednotlivých šarží léčiv. Relativně snadná možnost automatizace, rychlost a nízká cena analýzy předurčuje kapilární elektroforéze slibnou budoucnost i na poli proteomiky.

3.3.1 Principy využitých analytických separačních metod

Extrakce na pevné fázi (SPE)

SPE představuje užitečnou a dnes stále častěji využívanou techniku předběžné úpravy vzorku a nahrazuje v mnoha případech dříve běžnou extrakci v systému kapalina-kapalina. SPE při optimálních podmínkách umožňuje z většího objemu kapalné matrice spolehlivě oddělit sledované složky vzorku od řady balastních látek přítomných v komplexní směsi původního vzorku (často biologické povahy), které by mohly při následné vlastní analýze (např. chromatografické) nepříznivě ovlivňovat či rušit stanovení.

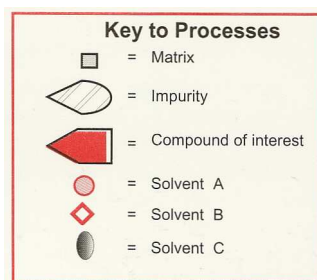
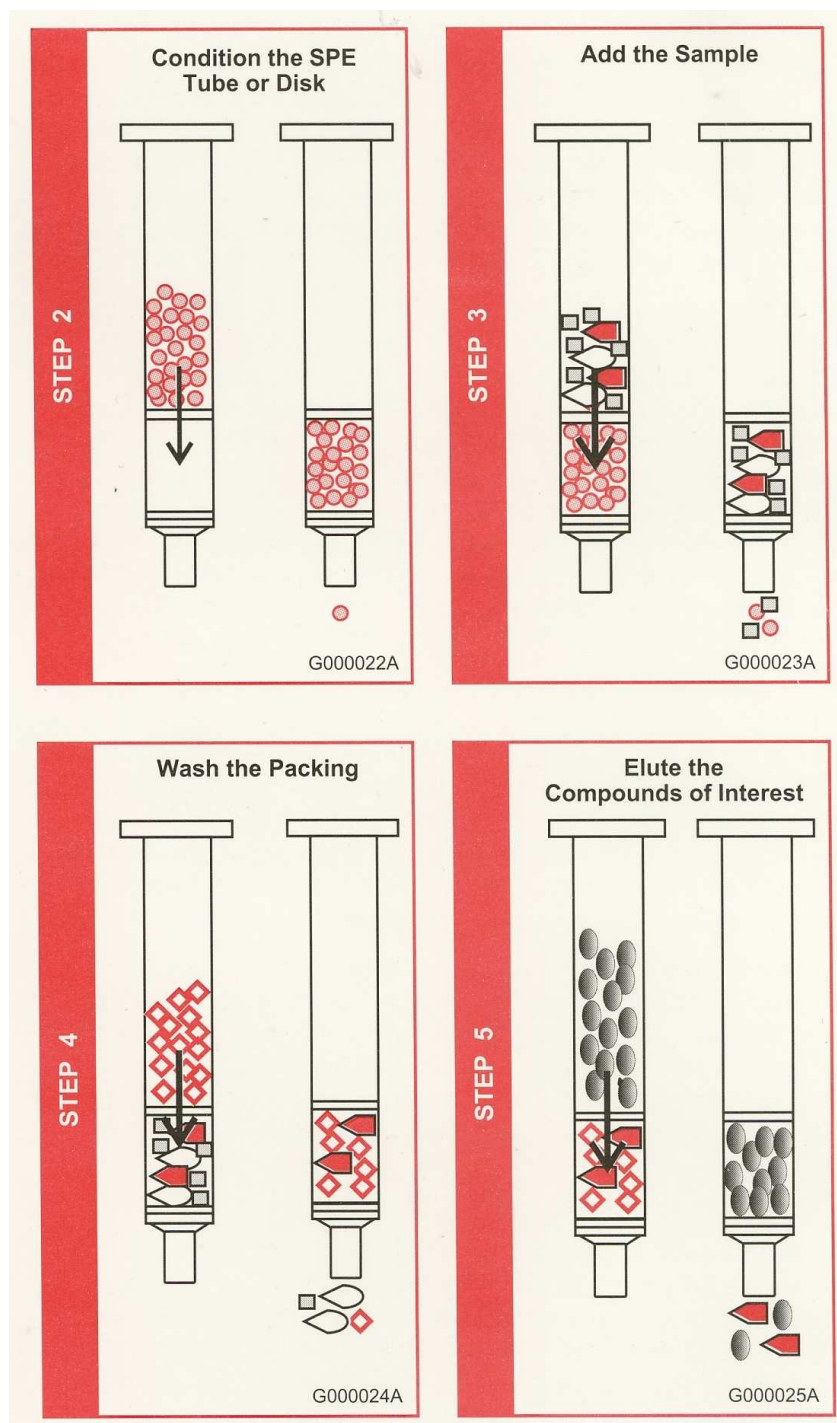
Principem SPE je selektivní zachycení (sorpce) analyticky významných složek vzorku na speciálním sorbentu, umístěném v malé extrakční kolonce, odstranění balastních interferujících látek promytím vhodnou směsí rozpouštědel a v konečném kroku se uplatňuje selektivní desorpce sledovaných analytů z pevné fáze (jímané frakce jsou obohacené o cíleně zadržované analyty) ¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

Klíčovým mechanismem je zde silná, ale reverzibilní interakce mezi analytem a povrchem stacionární fáze. Podle druhu uplatňujících se interakcí lze tedy rozlišovat několik variant SPE – nejběžnějšími jsou interakce hydrofobní (vliv Van der Waalsových sil), polární (síly dipól-dipól a vodíkové můstky) a iontově-výměnné interakce. Celý postup je urychlen použitím podtlaku na výstupu z kolonky, event. působením přetlaku na opačném konci (u jejího ústí).

Tato relativně snadná separační technika dokáže od nežádoucích příměsí ve vzorku selektivně oddělit a izolovat směs analytů zakoncentrovanou (obohacenou) oproti původnímu vzorku i 100 až 5000krát. Mezi nejčastěji používané sorbenty pro

plnění těchto kolonek patří chemicky modifikovaný či neupravovaný silikagel, oxid hlinitý, celulóza či speciální polymery (dle typu je lze získat buď jako komerčně dostupné jednorázové již naplněné „cartridge“, nebo je možno je připravovat přímo na pracovišti pečlivým naplněním polypropylenových stříkaček (k tomuto účelu upravených a s vhodnými rozměry) partikulárním sorbentem, jehož vrstva je ve stříkačce z obou stran těsně uzavřena pomocí dvou frit (obvykle z polyethylenu, teflonu, event. nerez oceli). Velikost částic sorbentu je volena tak, aby umožňovala průchod vzorku a promývacích roztoků kolonou již při použití poměrně malého podtlaku, kterého lze dosáhnout i vodní či membránovou vývěvou.

Vlastní postup při separaci pomocí SPE obnáší čtyři základní kroky^{101,104} (viz obr. 20). Prvním krokem je kondicionace sorbentu (prováděná promytím kolony příslušnými rozpouštědly vhodné polarity), jež připraví extrakční kolonku na interakci s přečištěným vzorkem. Na takto připravenou kolonku je ve druhém kroku nanesen vlastní vzorek. Sledované složky vzorku jsou při vakuovém průchodu kolonou zachycovány a zakoncentrovávány v podobě úzké zóny v sorbentu, zatímco ostatní interferující složky původní matrice se v ideálním případě na sorbent neabsorbují a odchází do odpadu. Ve třetím, promývacím kroku, jsou pomocí směsi vhodných rozpouštědel ze stacionární fáze specificky odstraněny zbývající balastní látky. Následuje konečný čtvrtý krok, spočívající v desorpci žádaných složek matrice (obsahujících zakoncentrované analyty) z pevné fáze (sorbentu). Pomocí vhodné kombinace rozpouštědel způsobujících zeslabení interakcí mezi analyty a sorbentem je tato frakce jako úzká zóna opět vakuově eluována z kolonky a jímána. Získaný eluát je pak možno buď přímo analyzovat či podrobit dalšímu zpracování.



Obr. 20 Schematické znázornění postupu při separaci analytů od balastních látek pomocí SPE ¹⁰¹

Pro optimalizaci separačních podmínek při SPE, zejména pro volbu rozpouštědel, je důležité mít dostatek informací o analytech – například údaje o rozpustnosti, polaritě a strukturním uspořádání analytů. Z důvodu co největšího výtěžku extrakce a vysoké selektivity je žádoucí, aby rozdíly mezi chemickými vlastnostmi sledované látky a samotné matečné matrice byly co největší. K tomu lze dospět zejména přizpůsobením pH či iontové síly roztoku vzorku.

Kapalinová chromatografie

Společným základem kolonových chromatografických technik je dělení směsi látek na jednotlivé složky díky zadržení (retenci) směsi stacionární fází a postupnému a opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi fází stacionární a mobilní. Po nástřiku vzorku do kolony je směsná zóna unášena mobilní fází a současně na koloně naplněné sorbentem separována na jednotlivé složky registrované detektorem jako eluční píky.

Tento princip, objevený již na počátku dvacátého století M.S. Cvetem při dělení listových barviv¹⁰⁵, umožnil později vznik mnoha variant kapalinové chromatografie. To spolu s rozvojem instrumentální techniky, objevem nových technologií a materiálů (využívaných jako stacionární fáze) s lepší chemickou odolností i rezistencí vůči působení vyššího tlaku, pak od 80. let 20. století způsobilo prudký nárůst aplikací po nástupu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Faktory, které ovlivňují chromatografickou separaci lze obecně rozdělit na termodynamické a kinetické. Termodynamické zahrnují vliv interakce chromatografovaných komponent se složkami mobilní fáze a sorbentem a z toho též vyplývají rozdílné mechanismy separace – těmi hlavními jsou adsorpce, rozdělování mezi dvě fáze, chemisorpce a síťový efekt.

Kinetické faktory separace představují především vlivy rychlosti průtoku mobilní fáze a difúze složek v mobilní i stacionární fázi na rozšiřování elučních křivek⁹⁹.

3.3.2 Klasifikace metod kapalinové chromatografie

Pro většinu metod kapalinové chromatografie je společným rysem, že dochází k dělení složek směsi mezi mobilní fází (eluent) a stacionární fází (sorbent), přičemž při postupu vzorku kolonou se složky dělí, zóny analytů se

rozšiřují a v různém čase dospějí do detektoru (v závislosti na individuálních chemických vlastnostech komponent a jejich rozdílných interakcích s náplní kolony).

Podle separačního mechanismu můžeme chromatografické metody dělit na adsorpční (LSC), rozdělovací (LLC), iontově-výměnnou (IEC), afinitní (AC) a vylučovací (SEC). Dalším významným kritériem je polarita obou fází, lze proto rozlišovat chromatografii v normální fázi (tj. nepolární mobilní fáze a polární stacionární fáze) a chromatografii v reverzní fázi (RP HPLC), kde je polární mobilní a nepolární stacionární fáze^{102,106-111}.

V této práci jsem z možných typů využil ke stanovení HPLC metod v analytickém měřítku založených na iontově výměnné chromatografii a chromatografii na chemicky vázaných fázích (RP HPLC).

Ačkoli se pro HPLC hodí řada detekčních systémů, z hlediska analytů (PEN, PD, DPD) sledovaných v této práci, jež se vyznačují silnou přirozenou fluorescencí, byl jako nejvhodnější pro daný účel zvolen detektor fluorescenční (fluorimetrický). Jde o detektor vysoce selektivní s mimořádně vysokou citlivostí. Vlastní podstata měření fluorescence spočívá v tom, že budící UV záření ze zdroje je vedeno do průtokové cely, kde je absorbováno a jako vyzářené světelné kvantum s nižší energií (o větší vlnové délce) se měří fotonásobičem jeho intenzita a elektronicky zpracovaný signál je poté registrován a kvantitativně vyhodnocen.

Pro analýzu desmosinů, jež tak vysokou přirozenou fluorescenci nemají, bylo v této práci využito detekce v UV oblasti. Fotometrické UV/VIS detektory pracují buď s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm), příp. je možný výběr z několika vlnových délek (filtrové), nebo jsou opatřeny monochromátorem a pracují na principu spektrofotometru (obvykle v rozsahu 190 - 400 nm). Poslední z jmenovaných typů byl použit i v této práci. Podstatou takové detekce je průchod záření ze zdroje průtokovou celou, přičemž je intenzita prošlého paprsku měřena fotonásobičem a měřené signály kontinuálně monitorující jednotlivé složky analyzované směsi procházející separačním systémem jsou jako píky elektronicky registrovány.

3.3.3 Teorie a separační mechanismus použitých HPLC metod

Iontově-výměnná chromatografie (IEC)

Iontově výměnná chromatografie probíhá na iontoměničích, přičemž je ion katexu či anexu vyměněn za ion obsažený v mobilní fázi nebo ve vzorku. Separace probíhá na principu soutěžení ionexu o tyto ionty.

Princip iontové výměny spočívá tedy v elektrostatických interakcích, kde jsou rozhodujícími faktory koncentrace, velikosti a náboje iontů, relativní permitivita a iontová síla prostředí, disociační konstanta ionogenních skupin měniče iontů i analytů a s tím související i pH mobilní fáze. Při IEC se však uplatňuje i difúze iontoměničem, adsorpce či hydrofobní interakce^{65,102,106}.

Retence při iontově výměnných interakcích (při nízkých koncentracích a běžných teplotách) vzrůstá také spolu s nábojem iontu a při téže náboji pak roste s atomovým číslem. Velkou afinitu k měničům iontů vykazují zejména velké organické ionty.

IEC nachází uplatnění při analýze látek iontového charakteru, např. silných elektrolytů (kyselin, zásad, solí), příp. i elektrolytů slabých, které je možné disociací či protonizací převést na iontovou formu. Častou aplikací je také analýza aminokyselin nebo purifikace peptidů a proteinů. Pomocí iontoměničů lze analyzovat i některé ionizovatelné neutrální látky.

Stacionární fáze pro IEC bývají založeny buď na silikagelu nebo polymerních nosičích, jež mají značnou kapacitu pro aplikované vzorky^{106,111}. Výhodou silikagelových iontoměničů je jejich větší účinnost a rychlé ustavení rovnováhy, čehož lze využít při gradientové eluci. Matrice obou typů nosičů jsou modifikovány dle účelu buď slabě či silně disociujícími iontově výměnnými funkčními skupinami (s kladným či záporným nábojem). Příkladem slabého měniče kationtů může být karboxylová skupina (-COOH), naopak silným katexem je sulfoskupina (-SO₃H), z měničů aniontů lze uvést např. aminoskupinu (-NH₂) jako ukázkou slabého měniče, silný pak reprezentuje skupina tetraalkylamoniová (-N⁺(R)₃)^{99,102,106}.

Mobilními fázemi bývají obvykle vodné roztoky pufrů, jejichž ionty (ozn. též jako protiionty) jsou v rovnováze s ionty samotných měničů. Zadržování látek v koloně lze ovlivnit nejen koncentrací solí, ale i pomocí pH, změnou teploty, event. přidáním organickým modifikátorem. S rostoucí koncentrací

protiiontů stoupá i jejich retence ionexem, čímž se urychluje eluce samotných analytů z kolony.

Reverzní vysokoúčinná kapalinová chromatografie (RP HPLC)

Použití kolon naplněných nepolárními (reverzními), chemicky vázanými fázemi nachází ze všech HPLC aplikací největší uplatnění (kolem 80 %). Výhodou těchto kolon je široký rozsah polarit analytů i značná variabilita separačních systémů daná velkým výběrem komerčně dostupných stacionárních fází (nejčastěji s počtem uhlíkových atomů C4-C30), které lze kombinovat s poměrně levnými fázemi mobilními, přičemž je dosaženo rychlého ustavení rovnováhy v koloně. Nejběžnější použití z komerčně dostupných náplní kolon nachází oktadecylsiloxanové fáze (C18) ^{65,102,106,112}.

RP HPLC představuje ve srovnání s ostatními variantami metodu rychlejší a reprodukovatelnější, v kombinaci s vodnými mobilními fázemi a často umožňuje přímou analýzu vzorků biologické povahy.

Omezením pro kolony se silikagelovou náplní může být použitelný rozsah pH (obvykle 2,5-8,0). V silně kyselém prostředí jsou hydrolyzovány funkční skupiny navázané na povrchu silikagelu, při silné bazicitě je napadán vlastní povrch silikagelu. Navíc nezreagované silanolové skupiny adsorbentu bývají častou příčinou nežádoucí adsorpce. V současné době je snahou eliminovat tento handicap použitím jiných materiálů jako nosičů, jež jsou stabilnější v širším intervalu pH ¹¹¹.

Mezi takové alternativní nosiče lze řadit ZrO₂, TiO₂ či různé organické polymery, ovšem i tyto materiály mají své nevýhody – např. rušivé interakce se soluty (hydrofobní interakce, vylučovací efekt apod.). Jako tuhé stacionární fáze (sorbenty) lze kromě obvyklých nepolárních uhlovodíkových fází imobilizovaných na anorganických nosičích, použít i čistého uhlíku, organických polymerů nebo náplní s chemicky vázanými arylovými či středně polárními (jako např. éterovými, nitrilovými či diolovými) fázemi; při experimentech v ryze vodných fázích lze použít dokonce i nemodifikovaného silikagelu ^{105,109}.

Mezi nejběžnější mobilní fáze se řadí vodné roztoky jednoho či více organických rozpouštědel (nejčastěji metanolu, acetonitrilu a tetrahydrofuranu). Pro separaci iontových látek či látek kyselé a bazické povahy je třeba k mobilním fázím přidávat pufrы, neutrální soli, slabé kyseliny nebo látky vytvářející

s ionizovanými soluty iontové asociáty. Extrémně nepolární látky lze separovat i s použitím čistě organických mobilních fází (tzv. nevodná chromatografie v systému s obrácenými fázemi) ^{105,106}.

Podstatou vlastního separačního mechanismu RP HPLC je interakce solutu s mobilní fází, interakce mobilní a stacionární fáze a distribuce solutu mezi mobilní a stacionární fází. Pro separaci je klíčová první interakce, jež je dána hydrofobními interakcemi ⁹⁹. Velikost těchto interakcí silně závisí jednak na polaritě solutu, tak na permitivitě a povrchovém napětí mobilní fáze. Retence při RP HPLC klesá s povrchovým napětím a to lze snížit přidáním organického modifikátoru do mobilní fáze. Selektivita je též dána složením mobilní fáze (vzrůstá s rostoucím obsahem vody), při vyšším obsahu organického modifikátoru jsou alkyly solvatovány a solut může reagovat s celým alkylovým řetězcem ^{109,111}.

V případě silikagelu jako nosiče jsou na jeho povrchu přítomny hydroxylové (silanolové) skupiny buď jako volné nebo vzájemně vázané vodíkovou vazbou vedle nereaktivních siloxanových skupin. Chemická modifikace je však možná pouze u volných silanolových skupin, a proto je žádoucí, aby jejich počet na povrchu silikagelu byl co nejvyšší.

Typ a koncentrace funkčních skupin (stupeň pokrytí silikagelu) významně ovlivňují vlastnosti chemicky vázaných fází. Selektivita je zde dána délkou navázaného alkylového řetězce – čím delší alkyl je, tím vzrůstá také retence nepolárních látek. V případě velmi značného zadržování analytů v koloně lze tedy situaci řešit buď zvýšením podílu organického modifikátoru nebo použitím stacionární fáze s kratším alkylem.

Nejčastější oktadecylová fáze v kombinaci s mobilní fází obsahující jak vodu, tak organická rozpouštědla umožňuje dobrou separaci nepolárních látek. Na reverzní fázi lze však separovat i látky polarizovatelné a slabé kyseliny a zásady po potlačení jejich disociace úpravou pH. Látky iontové povahy lze v tomto systému dobře separovat, přidá-li se do mobilní fáze iontově párové činidlo opačného náboje, než jaký mají sledované analyty, čímž pak dochází k tvorbě méně polárního iontového páru. Ve vodné fázi vzniká komplex a vlastní ionogenní látka je převedena do organické fáze.

3.3.4 Elektromigrační metody – teorie a princip kapilární elektroforézy

Elektromigrační metody patří mezi nejvýznamnější separační techniky a nalézají často uplatnění při kvalitativní i kvantitativní analýze biologických vzorků. Ačkoli vlastní principy migrace elektricky nabitých částic v elektrickém poli jsou známy již déle než století a od té doby vzniklo již mnoho variant, zaznamenaly tyto metody dynamický rozvoj až v posledních letech. Elektroforetické techniky získaly na významu a popularitě především díky rozvoji kapilárních technik a využití moderní výpočetní techniky a elektroniky, jež je součástí současné sofistikované instrumentace ¹¹⁴.

Ačkoli dnes existuje mnoho modifikací elektroforézy, jejich principiální základ je společný. Nabité látky se dělí ve stejnosměrném elektrickém poli na základě svých odlišných elektroforetických pohyblivostí daných poměrem náboje k velikosti molekul. Moderní přístroje pro kapilární elektroforézu umožňující využití velké intenzity elektrického pole dosahují řádově vyšší separační účinnosti oproti klasickým metodám chemické analýzy a tyto techniky lze pak právem označovat pojmem vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE) ^{100,109,115,116}.

V křemenných kapilárách se uplatňují dva hlavní transportní jevy: elektroforetická migrace iontů v elektrickém poli a elektroosmotický tok (EOF). Ionty různého poloměru a náboje se v homogenním elektrickém poli pohybují konstantní elektroforetickou rychlostí ($v_{ef,i}$), jež je přímo úměrná intenzitě elektrického pole (E) a velikosti náboje iontu (q_i) a nepřímo úměrná jeho poloměru (r_i). EOF je významný faktor, ovlivňující výsledný směr a rychlost pohybu separovaných iontů. U kapiláry z taveného křemene naplněné elektrolytem dochází k disociaci silanolových skupin, čímž vzniká záporný náboj a uvolňované protony H^+ vytváří v povrchové vrstvě elektrolytu kladný náboj (vzniká elektrická dvojvrstva). Při vloženém napětí se tyto hydratované protony (resp. elektrolyt jako celek) pohybují směrem ke katodě, a vzniká tak elektroosmotický tok ⁹⁷.

Elektroosmotický tok v kapilární elektroforéze vykazuje prakticky plochý rychlostní profil, čímž se odlišuje od parabolického Poiseuilleho profilu známého z HPLC, jež vzniká v případě tlakem hnané kapaliny, a proto je také v elektroforéze oproti jiným analytickým metodám dosahováno mnohem vyšší účinnosti separace ^{100,102}.

V případě separace proteinů a jejich fragmentů je jedním z hlavních problémů jejich adsorpce na stěnách kapiláry, jež vede k chvostování píků a má negativní vliv na účinnost¹¹¹.

Kapilární elektroforéza (CE) se vyznačuje vysokou separační účinností (často v řádu až 10^5 teoretických pater/m), mimořádnou citlivostí na úrovni femtomol - zeptomol (10^{-15} – 10^{-21} mol) a minimální spotřebou vzorku i chemikálií (v objemech \approx nl – pl). Kapiláry byly využity v případě řady separačních technik. Kapilární techniky nachází uplatnění u řady elektromigračních technik – např. v izotachoforéze (ITP), v kapilární zónové elektroforéze (CZE), micelární elektrokinetické kapilární chromatografii (MEKC), kapilární elektrochromatografii (CEC), izoelektrické fokusaci (IEF) i kapilární gelové elektroforéze (CGE)¹¹⁴.

Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza představuje nejjednodušší elektromigrační techniku a je vhodnou metodou pro separaci nabitých molekul, které se liší velikostí a nábojem. Vlastní dělení iontů probíhá v CZE na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí (mobilit). Elektroosmotický tok separačního pufru uvnitř kapiláry unáší kladné i záporné ionty k detektoru a tyto ionty navíc migrují svými rozdílnými elektroforetickými rychlostmi uvnitř pufru, a tím se vzájemně dělí. Během jednoho experimentu lze dělit a detekovat oba dva druhy iontů (kladné i záporné)¹¹⁵.

Četné aplikace nachází CZE též při separaci aminokyselin a peptidů. Technika CZE dovoluje možnost pracovat s velkými intenzitami elektrického pole, čímž lze dosáhnout velmi krátké doby analýzy.

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)

V micelární elektrokinetické kapilární chromatografii^{100,116,117} lze separovat jak nabitě, tak neutrální molekuly, na základě odlišné distribuce mezi vodnou a micelární (pseudostacionární) fází. Podmínkou vzniku micel je dosažení, resp. překročení kritické micelární koncentrace (CMC). U nejběžněji používaného anionogenního tenzidu, dodecylsulfátu sodného (SDS), je udávána hodnota CMC v čisté vodě přibližně 8,2 mmol při 25°C (agregační číslo = 62)^{100,116}.

V závislosti na polaritě povrchového náboje micel migrují buď ve směru EOF či proti němu. Tzv. eluční okno je pro případ micel, jež tvoří hydrofobní kavity,

vymezeno látkami výrazně polárními, které setrvávají v základním pufru (např. thiomocovina či methanol) a migrují v čase t_{eof} (retenční poměr $k_i \approx 0$), na opačném konci pak stojí látky velmi hydrofobní, které zůstávají zcela uvnitř micel (např. azobarvivo Sudan III) a migrují v t_{mc} ($k_i \approx \infty$)¹¹⁶.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část předkládané disertační práce zahrnuje volbu relevantních typů vzorků, jejich preanalytickou fázi, výběr vhodných separačních analytických metod a vlastní postup jejich provedení. Jsou zde shrnuty použité chemikálie a analyzované vzorky, metody jejich zpracování. Vzhledem k nezbytnosti použití různých, časově náročných kroků, předcházejících vlastní analýze, uvádím v následujícím odstavci navíc přehled operací metod chemické analýzy, separačních mechanismů a dalších analyticko-biochemických postupů uplatněných v složitém a náročném procesu preanalytické fáze, kterou nelze z hlediska konečných výsledků v žádném případě podcenit.

4.1 Využití laboratorní postupy a operace předcházející vlastní analýze

Centrifugace periferní krve a synoviální tekutiny, příprava mobilních fází (vakuová filtrace, odvzdušňování heliem), dialýza, konvekční míchání, ultrazvuková sonikace, mechanická desintegrace biologických vzorků, extrakce tkání v kapalině, extrakce na pevné fázi (SPE), vakuové sušení (odpařování nadbytku rozpouštědel), rozpouštění, UV spektrofotometrie, fluorescenční analýza, volumetrie, příprava a ředění standardů, statistická analýza naměřených dat.

4.2 Použité chemikálie

Kyselina heptafluoromáselná p.a. (HFBA), poly(L-lysin) hydrobromid ($M_r \sim 30\ 000$ až $70\ 000$), PBS pufr, D-ribosa, *N*- α -acetyl-arginin, kyselina diethyl-triaminптаoctová (DETAPAC), SDS, dialyzační střívka a mikrogranulární celulóza byly dodány firmou Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Německo. Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát p.a., acetonitril (ACN) v čistotě pro HPLC byl zakoupen od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Další použité chemikálie v kvalitě p.a. byly od firmy Lachema a.s., (Neratovice, Česká republika), tj. n-butylalkohol, kyselina chlorovodíková (konc. 35 %), hydroxid sodný, tetraboritan sodný (dekahydrát), kyselina fosforečná, thiomčovina a síran amonný. Firma Penta (Chrudim, Česká republika) dodala methylalkohol, kyselinu octovou (konc. 99%). K odvzdušení mobilních fází jsem použil Helium BIP, dodávané firmou Air Products Inc. (Allentown, USA).

Deionizovaná voda byla připravována na přístroji Milli Q od firmy Millipore přímo na našem pracovišti.

Použité standardy

a) Pentosidin

Standard pentosidinu není komerčně dostupný, a proto byl synteticky připraven přímo v naší laboratoři pomocí modifikace postupu, poskytnutého prof. V. M. Monnierem z Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA. Přesnou koncentraci vzorků našich standardů jsme nechali stanovit na uvedeném pracovišti Dr. D. Sellem pomocí kvantitativní HPLC^{55,118}.

Analýza těchto standardů prokázala, že se pentosidin nachází v čisté formě (při HPLC stanovení nebyly zaznamenány kromě dominantního signálu pentosidinu již žádné další píky). Postupným ředěním těchto primárních standardů vznikla sada standardních roztoků, které byly použity ke konstrukci kalibrační křivky.

K syntéze standardu PEN byla použita přímá neenzymatická reakce příslušných sacharidů s aminokyselinami (známá již dříve z nálezů zjištěných při studiu reakcí, k nimž dochází u potravin)⁴³. Poly(L-lysin) hydrobromid, D-ribosa, N- α -acetyl arginin, DETEPAC (který zde plní úlohu chelatačního činidla), byly rozpuštěny v 0,2M fosfátovém pufru (pH 9,0) a zreagovány za experimentálních podmínek, popsanych v uvedené literatuře^{118,119}.

Použití poly(L-lysinu) jako výchozího reaktantu v syntetické polymer-analogické reakci vedlo ke vzniku výhodné polymerní formy pentosidinu. Tento krok umožnil poměrně snadné odseparování polypentosidinu pomocí dialýzy od nezreagovaných a balastních nízkomolekulárních látek, přítomných v reakční směsi. Konečným krokem ke vzniku vlastního pentosidinu pak byla hydrolyza polymerního meziprojektu. Uvedený postup představuje relativně jednoduché a elegantní řešení s nízkými náklady ve srovnání s metodou preparativní vylučovací chromatografie (SEC).

b) Pyridinolin a deoxypyridinolin

Z důvodu komerční nedostupnosti byly standardy PD a DPD s deklarovanou hmotností získány darem od prof. S.P. Robinse z Rowett Research Institute (Biochemical Sciences Division, Aberdeen, Velká Británie), jehož skupina se

problematikou standardizace pyridinolinových příčných vazeb v minulosti intenzivně zabývala^{120,121}.

c) Desmosin a isodesmosin

Standardy DES a IDES ($M_r = 526$) byly zakoupeny od firmy MP Biomedicals (dříve ICN Biomedicals Inc.), Aurora, Ohio, USA.

4.3 Instrumentace

4.3.1 Hydrolýza

Hydrolýza kapalných vzorků probíhala v teplotně a časově programovatelném horkovzdušném sterilizátoru Stericell 55 (s objemem komory 55 litrů a nucenou cirkulací vzduchu) firmy BMT a.s., Brno. Kapalně vzorky s alikvotem koncentrované kyseliny chlorovodíkové byly hydrolyzovány ve skleněných vialkách o objemu 4 ml od firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA), jež byly opatřeny šroubovacími uzávěry z fenolové pryskyřice s chemicky a tepelně odolným těsněním (Black Viton septa).

4.3.2 SPE a odpaření nadbytečných rozpouštědel

K následné purifikaci a prekoncentraci hydrolyzátů vzorků pomocí extrakce na pevné fázi byl využit vakuový extraktor Visiprep™ SPE Vacuum Manifold DL firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA) – obr. 21.



Obr. 21 Manuální extraktor Visiprep™ SPE Vacuum Manifold DL využitý při úpravě biologických vzorků před vlastní HPLC analýzou.

K odpaření jímaných frakcí obsahující sledované analyty byla využita rotační vakuová odparka SpeedVac (Savant, USA), napojená přes vymrazovací kondenzační zařízení téže značky k třístupňové membránové vývěvě značky Vacuubrand (model MD1) - mezní tlak 0,15 kPa, výrobce: Vacuubrand GmbH, Wertheim, Německo.

4.3.3 Další laboratorní zařízení a pomůcky

Z další instrumentace jsem při práci využil mj. centrifugy MLW – typ: T 52.1 (MLW, Engelsdorf, Německo) a Jouan – typ: CR 3i (Jouan SA, St. Herblain, Francie), analytické váhy Sartorius - typ: 2024 MP6E (Sartorius GmbH, Göttingen, Německo) a Mettler Toledo - typ: AX205DR (Mettler, Švýcarsko), předvážky Sartorius - typ: 2254 MP6E (Sartorius-Werke GmbH, Göttingen, Německo).

Při úpravě vzorků a přípravě jednotlivých roztoků jsem pro urychlení práce a zjednodušení jednotlivých operací s výhodou využil též některých drobných a užitečných laboratorních zařízení a pomůcek: třepačka Vibrofix VF1 Electronic (Janke&Kunkel IKA-WERK, Staufen, Německo), vakuová filtrační aparatura značky Supelco (Bellefonte, PA, USA), pH-metr Jenway - typ: 3150 (Jenway Ltd., Dunmow, Velká Británie), magnetická míchačka Jenway – model 1100 (Jenway Ltd., Dunmow, Velká Británie), mikrocentrifuga Techne Cambridge (Denver Instrument Company, USA), ultrazvuková vana značky TESLA – typ UC 003 BS1, manuální dávkovače kapalin značek Hirschmann (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Německo) a Brand (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Německo), automatické pipety značek Nichipet EX (Nichiryo, Tokio, Japonsko) a Eppendorf.

4.3.4 HPLC

Na chromatografické analýzy jsem využil HPLC systém firmy SHIMADZU řady 10ADvp (Kyoto, Japonsko) počítačově řízený programem CLASS VP (verze 5.03) umožňujícím též integraci chromatografických píků a další zpracování naměřených dat (obr. 22a). Základ chromatografického systému tvořila kvarternární pumpa (model: LC-10ADvp) umožňující směšování mobilních fází a gradientovou eluci, napojená pomocí ocelových kapilár na HPLC kolonu s termostatem (typ CTO-10ACvp), systém byl osazen dvěma detektory - fluorescenčním (RF-10AXL) a UV spektrofotometrickým (SPD-10Avp) a dále vybaven zásobníkem mobilních fází, pneumatickým injekčním autosamplrem (SIL-10ADvp) a elektronickou řídicí

jednotkou (SCL-10Avp) zajišťující sběr dat a kontrolu funkcí celého systému. Odvzdušnění mobilních fází bylo zajištěno přes frity přiváděným čistým heliem třídy BIP (Air Products Inc., Allentown, USA) a on-line připojeným degaserem s jemnou manuální regulací průtoku (Shimadzu, typ DGU-10B Helium Degassing Unit).

Pro správnou interpretaci výsledků byly naměřené koncentrace příčně-vazebných elementů vztaženy na hladiny relevantních biochemických parametrů. Ve vzorcích moči šlo o hodnotu kreatininu, v séru byl zjišťován obsah celkové bílkoviny. Tyto parametry byly ve vzorcích paralelně stanoveny na Oddělení klinické biochemie Revmatologického ústavu v Praze rutinními, standardizovanými biochemickými metodami na japonském biochemickém analyzátoru Olympus (model AU 400).



a)



b)

Obr. 22 Použitá instrumentace: a) HPLC systém Shimadzu s fluorescenční/UV detekcí; b) Přístroj pro kapilární elektroforézu CRYSTAL CE System/ UV detektor.

4.3.5 Přístroj pro kapilární elektroforézu

Experimenty využívající k analýze kapilární elektroforézy probíhaly v provedení CZE i MEKC na přístroji CRYSTAL CE System, Model 310 (ATI UNICAM, Cambridge, Velká Británie) – obr.22 b. K němu byl připojen UV spektrofotometrický detektor Spectra 100 s volitelnou vlnovou délkou (Thermo Separation Products, USA). K separaci jsem využil nepokryvaných křemenných

kapilár TWC-S50 (značky CACO, Bratislava, Slovensko) s vnitřním průměrem 50 a 75 μm .

4.4 Typy a charakterizace vzorků

Ve své práci jsem analyzoval nejen standardy, ale především níže uvedené vzorky reálného biologického materiálu humánního původu:

- ranní moč
- krevní sérum a plazma (získané z periferní krve odebrané při běžném ambulantním žilním odběru)
- synoviální tekutina (odebraná u ambulantních pacientů při intraartikulární punkci postižených kloubů)
- likvor (mozkomíšní mok)
- chrupavka, synoviální membrána, granulační tkáň ze subchondrální kosti. (tento materiál byl získán při instalacích totální endoprotézy kyčelních či kolenních kloubů nebo při artroskopických vyšetřeních).
- tkáň z lidské aorty získaný z kardiologického oddělení IKEM Praha (získaného při zavádění bypassů v rámci operace srdce).

Kontrolní vzorky zdravých tkání byly v rámci spolupráce poskytnuty Ústavem soudního lékařství v Praze.

Kromě vzorků humánního původu jsem provedl též analýzy vybraných tělních tekutin a tkání některých laboratorních zvířat (laboratorní krysy, myši kmene C57/6 Black, miniprasata), které byly součástí experimentálních studií (podle projektů pokusů schválených místní etickou komisí a veterinární správou). Zpracování a analýza vzorků sér a tkání pokusných zvířat bylo obdobné jako v případě lidských vzorků (viz kap. 4.5 a 4.6).

4.5 Preanalytická fáze

4.5.1 Zpracování vzorků krve

Z krevních vzorků byly nejčastěji požadovány analýzy v krevním séru. Pro tato stanovení bylo tedy nejdříve zapotřebí oddělit krevní sérum od sedimentu tvořeného krevními buňkami. Vycházel jsem přitom z plné srážlivé krve odebrané intravenózně pacientům při běžném ambulantním žilním odběru. Pro typickou analýzu kolagenních příčných vazeb postačovala obvykle jedna 7 ml zkumavka plné

krve. Po dobu 1 až 2 hodin od odběru, kdy probíhala hemokoagulace, byl vzorek krve ponechán při laboratorní teplotě a dělení přitom probíhalo pouze v gravitačním poli. Poté byly předem vyvážené zkumavky se vzorky umístěny do protilehlých pozic nízkoobrátkové centrifugy a centrifugovány po dobu 10 minut při rychlosti 3 000 otáček za minutu (600 g). Působením odstředivých sil bylo tak od krevního sedimentu odseparováno lehčí sérum (za uvedených podmínek lze ze 7 ml plné krve získat přibližně 4 ml krevního séra). Oddělené sérum bylo automatickou pipetou opatrně odebráno od sedimentovaného podílu (který byl dle zdravotnických bezpečnostních předpisů zlikvidován), alikvotováno do plastových Eppendorfových mikrozkušavek a nebylo-li bezprostředně dále zpracováváno, bylo ihned zamraženo v hlubokomrazícím boxu (dle potřeby při teplotě buď -20°C či -80°C) a uchováno tak s patřičnou evidencí až do doby vlastní analýzy.

Při analýze PEN v krevní plazmě, byl proveden odběr žilní krve do speciální zkumavky, jejíž stěny byly potaženy protisrážlivým činidlem (např. EDTA či citrát sodný), další postup byl pak analogický jako v případě séra.

4.5.2 Zpracování ostatních tělních tekutin

Vzorky dalších tělních tekutin (např. moči nebo synoviální tekutiny) obvykle nebyly bezprostředně po odběru dále upravovány. Po jejich zaevidování se pouze alikvotovaly a poté byly uloženy před dalším zpracováváním v plastových nádobkách v hlubokomrazícím boxu.

4.6 Předběžná úprava vzorků pro stanovení pentosidinu a jejich analýza

4.6.1 Zpracování vzorků pojivových tkání

Malé množství (v řádu desítek miligramů) pevných vzorků pojivových tkání (chrupavka, synoviální membrána, granulační tkáň z patologicky změněné subchondrální kosti) bylo přesně naváženo, převedeno do malých polypropylenových zkumavek a sušeno ve vakuové odparce SpeedVac do konstantní váhy (přibližně 24 hodin). Vycházelo se přitom z takového množství původního vzorku, které po vysušení poskytlo přibližně 10 mg suchého vzorku (např. u chrupavek se toto množství pohybovalo kolem 30 mg vlhké hmotnosti vzorku).

Výpočtem vycházejícím z diferenčního vážení byl stanoven obsah sušiny v původním vzorku, na který byla pak vztažena chromatograficky stanovená koncentrace PEN. Takto získaný suchý vzorek byl skalpelem rozdělen na malé

kousky (velikosti zlomků mm), ve speciálních skleněných, těsně uzavíratelných vialkách (o objemu 4 ml) převrstven 2 ml 6M HCl a podroben kyselé hydrolyze při 105 °C po dobu 16 hodin. (viz kap. 4.6.4).

Ze získaného hydrolyzátu bylo pak dále 0,5 ml zpracováno pomocí extrakce na pevné fázi (viz kap. 4.6.5).

4.6.2 Příprava extraktů z vzorků pojivových tkání

Vycházelo-li se při stanovení z extraktů, pro zpracování vybraných tkání pojiva byla použita níže uvedená modifikace metody podle Zhanga et al.¹²². Pro extrakci bylo použito přibližně 100–500 mg odebrané pojivové tkáně (např. tělní orgány laboratorních zvířat či kloubní materiál). Vzorek tkáně byl nejprve rozdrcen a homogenizován v kapalném dusíku. Následně byl přidán 50 mM pufr TRIS (pH 7,5) o složení: 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0,02 % Brij 35 a 0,02 % NaN₃. Poměr činil 10 ml pufru TRIS na 1 gram vlhké hmotnosti původního vzorku tkáně. Extrakce probíhala v uvedeném pufru kontinuálním třepáním po dobu 48 hodin při teplotě 4°C. Získaný extrakt byl centrifugován po 10 minut při 5000 g a supernatant uchován pro další použití. K sedimentu bylo přidáno 10 ml téhož pufru a postup byl stejným způsobem zopakován. Poté byly oba supernatanty spojeny, alikvotovány a do doby analýzy zamraženy při teplotě -20 °C.

Vzhledem k tomu, že absolutní molární koncentrace PEN v extraktech jednotlivých pojivových tkáních byla následně vztahována na gram sušiny, byla část původního vzorku tkáně sušena do konstantní hmotnosti v polypropylenových mikrozkuvkách pomocí rotační vakuové odparky SpeedVac (přibližně 24 hodin). Na základě diferenčního vážení bylo pak vypočteno procentuální zastoupení sušiny v odebraném materiálu.

4.6.3 Zpracování kapalných vzorků

Analytický postup při prvotní úpravě vzorku je sledem níže popsaných laboratorních kroků: kyselé hydrolyza, purifikace a prekoncentrace pomocí extrakce na pevné fázi (SPE), vakuové odpaření rozpouštědel (SpeedVac), převedení do mobilní fáze.

4.6.4 Kyselá hydrolýza

Hydrolýza kapalných vzorků probíhala v teplotně a časově programovatelném horkovzdušném sterilizátoru Stericell 55. Kapalně vzorky (např. sérum, moč, synoviální tekutina) o objemu 0,5 ml byly po přidání alikvotu koncentrované kyseliny chlorovodíkové (12 M) hydrolyzovány po dobu 16 h při 105° C v malých skleněných, těsně uzavíratelných vialkách, jejichž uzávěry byly speciálně upraveny kvůli chemické a tepelné odolnosti (viz kapitola 4.3 Instrumentace). V případech, kdy se vycházelo přímo ze vzorku pevné tkáně, probíhala hydrolýza v 6M HCl.

4.6.5 Extrakce na pevné fázi (SPE)

Příprava roztoků pro SPE

Pro plnění, kondicionaci a promývání extrakčních kolonek byly připravovány následující roztoky:

- a) medium A: n-butylalkohol/ ledová kyselina octová/voda = 800/100/100 ml
- b) medium B: n-butylalkohol/ ledová kyselina octová = 800/100 ml
- c) 10% suspenze celulosy CC31 v mediu A (100 ml suspenze obsahovalo 10 g mikrogranulární celulosy)
- d) 0,05 M HCl

Příprava extrakčních kolonek na SPE

Extrakční kolonky využitě k přečištění vzorků jsem připravoval přímo na svém pracovišti. Využil jsem k tomu polypropylenové stříkačky firmy Supelco o objemu 6 ml se zakončením typu Luer. Na dno stříkačky byly vloženy frity z polyethylenu, které byly převrstveny 5 ml suspenze mikrogranulární celulosy a náplň se nechala pozvolna sedimentovat. Poté se kapalný podíl pozvolna odsál do odpadu ručním vakuovým extraktorem. Vytvořená vrstva sorbentu byla seshora uzavřena opět polyethylenovou fritou pro zabránění konvekce při aplikaci vzorku a rozpouštědel na kolonku během vlastního extrakčního procesu. Mechanickým tlakem na horní fritu byly vytěsněny ze sedimentu zbývající vzduchové bubliny. Tak vznikla přibližně 1 cm silná, kompaktní a homogenní vrstva celulosy, která po kondicionaci níže uvedeným způsobem sloužila jako adsorbent pro zachycení pentosidinu z komplexní směsi zpracovávaného biologického materiálu.

Separace a prekoncentrace na extrakčních kolonkách

Vlastní extrakce na pevné fázi pro stanovení PEN je založena na selektivní sorpci v systému celuloza/ voda/ n-butanol/ ledová kyselina octová.

Kroky přečištění vzorků a zakoncentrování sledovaného analytu jsem prováděl na výše popsaných SPE kolonkách nasazených na jednoduchý vakuový ruční extraktor, který umožňuje zpracovávat až 12 vzorků současně.

K 0,5 ml hydrolyzátu (obsahujícím v případě tělní tekutiny 250 µl původního kapalného vzorku) bylo přidáno 0,5 ml suspenze celulosy CC31 v médiu A, a poté 4,5 ml media B. Směs byla nanášena na rafinační, celulosou plněné, kolonky (předem vymyté 5 ml media A). Kapalina byla prosáta na vakuovém extraktoru, jímáný eluát byl kvůli účinnosti extrakce ještě jednou znovu nanášen na kolonku a odsát do odpadu. Vrstva sorbentu byla následně pozvolna promyta 30 ml media A. Frakce obsahující PEN byla v konečném kroku promyta 1 ml methanolu a desorbována z kolonky 3 ml 0,05 M HCl. Jímaná frakce byla za mírně zvýšené teploty (přibližně 40 °C) vysušena pomocí rotační vakuové odparky SpeedVac s vymrazovacím zařízením na kondenzaci par, residuum rozpuštěno v 250 µl mobilní fáze (resp. v 500 µl v případě analýzy vzorků pevných tkání) a použito k nástřiku do HPLC systému.

4.6.6 Příprava mobilních fází pro stanovení PEN

Ke stanovení PEN byla použita gradientová HPLC eluce. Mobilní fáze vznikla definovaným smíšením (viz kap. 4.6.7) následujících roztoků:

- roztok A: 5% acetonitril (ACN) / 0,02 M kyselina heptafluoromáselná (HFBA) / 0,01 M (NH₄)₂SO₄
- roztok B: 30% ACN / 0,02 M HFBA / 0,01 M (NH₄)₂SO₄

Všechny roztoky využit k přípravě mobilní fáze byly před analýzou filtrovány přes polyamidový membránový filtr NL17 s velikostí pórů 0,45 µm (Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel, Německo) a následně odvdušněny heliem.

4.6.7 Chromatografická analýza PEN

Pro stanovení PEN byla na našem pracovišti vyvinuta níže popsaná citlivá metoda založená na gradientové HPLC v reverzní fázi s fluorescenční detekcí.

Analýzy byly prováděny na výše popsaném kapalinovém chromatografu firmy Shimadzu.

Separace probíhala na skleněné koloně typu CGC Separon SGX C18, plněné sférickými částicemi silikagelu o průměru 7 μm s chemicky navázaným oktadecylsilanem (150x3 mm; Tessek Praha, Česká republika).

Mobilní fáze vznikla programovaným smíšením roztoků A a B (viz kapitola 4.6.6), přičemž volený lineární gradient byl dán časově proměnnou koncentrací acetonitrilu (12,5 – 25,0 % v průběhu 20 minut, s následným návratem k počátečnímu složení před každým nástřikem). Fluorescenční detekce byla monitorována při nastavení $\lambda_{\text{excitační/emisní}} = 335/385 \text{ nm}$ a kolona termostatována na 40 °C. Podle typu vzorku byl zvolen nástřik zpracovaného hydrolyzátu biologického materiálu v rozmezí 10 μl (pro sérum, plazmu, synoviální tekutinu) až 25 μl (pro moč, likvor, pevné tkáně). Při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min byla celková doba HPLC analýzy 30 minut (včetně ustálení počátečního složení mobilní fáze při gradientové separaci).

Naměřené chromatogramy jsem hodnotil na základě odečtené plochy píku PEN a jeho kvantitu určil podle naměřené kalibrační křivky (metodou vnějšího standardu).

4.7 Předběžná úprava vzorku pro stanovení PD a DPD a jejich analýza

4.7.1 Kyselá hydrolýza

Vzorek moči o objemu 0,5 ml byl hydrolyzován s alikvotem 12M HCl, analogicky jako v případě PEN (viz kap. 4.6.4).

4.7.2 Extrakce na pevné fázi (SPE)

Příprava roztoků a extrakčních kolonek

Příprava, kondicionace a promývání extrakčních kolonek byla prováděna následujícími roztoky:

- a) medium A: n-butylalkohol/ ledová kyselina octová = 400/100 ml
- b) medium B: n-butylalkohol/ ledová kyselina octová/ voda = 400/100/100 ml
- c) 10% suspenze celulosy CC31 v mediu A (100 ml suspenze obsahovalo 10 g celulosy)

SPE kolonky byly připraveny analogickým postupem jako u PEN (viz kap.4.6.5)

Separace a prekoncentrace na extrakčních kolonkách

K 0,5 ml hydrolyzátu každého vzorku bylo přidáno 2,5 ml media A, tyto směsi nanесeny na rafinační, celulosou plněné kolonky (předem vymyté 5 ml media A), jímané eluáty opětovně nanесeny ještě jednou na stejné kolonky a podtlakem na výstupu byla pomocí vakuového extraktoru Supelco odsáta všechna kapalina do odpadu. Následně byly SPE kolonky promyty 15 ml media B a frakce obsahující PD a DPD desorbovány z kolonek 3 ml demineralizované vody. Jímané frakce byly, stejně tak jako u pentosidinu, sušeny na vakuové rotační odparce (SpeedVac), residuum rozpuštěno v 250 μ l mobilní fáze a 25 μ l zpracovaného hydrolyzátu moči nadávkováno do HPLC systému.

4.7.3 Příprava mobilních fází pro analýzu PD a DPD

Mobilní fáze vznikla smíšením níže specifikovaných roztoků označených jako C (v mobilní fázi tvořil 75 objemových %) a D (25 objemových %).

roztok C: 0,3M CH_3COOH (pH = 3,0), kde pH bylo upraveno pomocí 4M NaOH

roztok D: 0,45M Na_2SO_4

4.7.4 HPLC metoda pro stanovení pyridinolinových příčných vazeb kolagenu

Citlivá metoda zavedená na Revmatologickém ústavu pro současné stanovení kolagenních příčně vazebných elementů, pyridinolinu (PD) a deoxypyridinolinu (DPD), je založena na iontově výměnné chromatografické separaci s citlivou fluorescenční detekcí. Izokratická HPLC je prováděna u hydrolyzátu moči a tkáňových extraktů (vzorek hydrolyzován v alikvotu 12M HCl, 105 °C, 16 hod., přečištěn a koncentrován selektivní frakcionací při SPE extrakci). Po vakuovém odpaření rozpouštědel (6 hod. SpeedVac) a převedení do mobilní fáze následuje vlastní HPLC analýza. Iontově výměnná izokratická separace probíhá na skleněné koloně (150 x 3,3 mm), typu CGC Separon HEMA-BIO 1000 plněné silným katexem (silikagel s navázanou sulfobutylovou skupinou) o velikosti částic 10 μ m. Mobilní fázi tvoří 0,3 M kyselina octová (pH = 3,0) s přídatkem 0,45 mol/l Na_2SO_4 , který tvořil 25 % objemu mobilní fáze; průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/ min; kolona byla termostatována na 48 °C, nástřik: 25 μ l zpracovaného hydrolyzátu moči, délka

HPLC analýzy 12 minut; fluorescenční detekce: $\lambda_{\text{emisní}} = 297 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{excitační}} = 400 \text{ nm}$. Dosažená mez detekce v nástřiku pro oba kroslinky je 200 femtomol.

Na základě čistých lyofilizovaných standardů PD a DPD poskytnutých jako dar profesorem S.P. Robinsem (Rowett Research Institute, Aberdeen, Velká Británie) byla postupným ředěním připravena sada interních standardů použitých pro kalibraci metody a vlastní kvantitativní stanovení v reálných vzorcích.

4.8 Analýza izomerů desmosinu

4.8.1 Chromatografické dělení desmosinů

Pro stanovení DES a IDES byla použita modifikace metody vypracované pro stanovení PEN, kde však fluorescenční detekci nahradil UV detektor a gradient acetonitrilu byl pozměněn na 5,0 - 17,5 % (kvalitativní složení a průtok mobilní fáze zůstal stejný jako při stanovení PEN). Jako optimální vlnová délka pro současnou UV detekci obou izomerů byla experimentálně zjištěna $\lambda = 273 \text{ nm}$, celková doba analýzy včetně ustavení počátečního složení mobilní fáze byla za uvedených podmínek 30 minut. Ke kalibraci vyvíjené metody jsem využil komerčně dostupných standardů DES and IDES firmy ICN, Costa Mesa, CA, USA.

4.8.2 Separace desmosinů pomocí kapilární elektroforézy

Kapilární zónová elektroforéza a micelární elektrokinetická chromatografie byly dalšími separačními metodami, které byly využity při pokusech o oddělení obou izomerů desmosinů. K separaci obou izomerů jsem použil slovenské kapiláry firmy CACO typu TWC-S50 $l_c/l_d=65/50 \text{ cm}$, vnitřního průměru $50 \mu\text{m}$ a TWC-S50 $l_c/l_d=70/55 \text{ cm}$, vnitřního průměru $75 \mu\text{m}$. Separací napětí aplikované na kapiláry jsem měnil v rozsahu od 10 do 30 kV a k zavedení vzorku do kapiláry využil hydrodynamického dávkování (obvykle 30 mbar po dobu 0,1 min).

V rámci mé experimentální práce jsem při optimalizaci metody měnil postupně složení, koncentraci základního elektrolytu a jeho pH. Z hlediska UV detekce jsem signál monitoroval v rozsahu vlnových délek $\lambda = 234\text{-}278 \text{ nm}$.

Při použití kapilární zónové elektroforézy jsem testoval následující elektrolyty: 100mM H_3PO_4 (pH = 2,2), 50 mM NaH_2PO_4 (pH 4,7) a 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH = 9,2). Při modifikaci v micelárním módu jsem jako pseudomicelární fázi použil 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pufr s přídatkem 50 mM SDS (pH = 9,2). Jako marker EOF jsem použil thiomocovinu v koncentraci 1 mg/ml. Spektra sledovaných analytů (viz obr. 23 a 24)

v koncentracích 10^{-5} mol/l byla měřena za využití UV spektrofotometru s diodovým polem (DAD) firmy Hewlet Packard (model 8453).

4.9 Statistické vyhodnocení experimentálních dat

Níže uvedené výsledky v tabulkách jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Pro statistickou analýzu byl použit k hodnocení statistické významnosti dvouvýběrový Studentův t-test s oboustranným rozdělením, za signifikantní byl považován výsledek na hladině významnosti 5 % ($\alpha = 0,05$)^{109,123,124}. Sledované parametry byly, vzhledem k rozdílným rozptylům hodnot ve skupinách pacientů, korelovány pomocí Spearmanova neparametrického korelačního koeficientu za využití statistického programu NCSS 2000 (Kaysville, Utah, USA).

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

A) ANALYTICKÉ ASPEKTY

V rámci mé disertační práce jsem se zabýval analýzou degradačních produktů kolagenu a elastinu (PEN, PD, DPD, DES, IDES). Ty byly vybrány jako potenciální ukazatelé řady metabolických poruch těchto klíčových strukturních proteinů. K jejich kvantitativní analýze byly vytipovány analytické separační metody, umožňující sledování těchto analytů i v nízkých koncentracích v biologickém materiálu.

Jako stěžejní analytické metody pro daný účel jsem zvolil:

- 1) HPLC v reverzní fázi
- 2) iontově-výměnnou chromatografii (v izokratickém i gradientovém provedení)
- 3) kapilární elektroforézu (CZE i v micelárním systému, tj. MEKC).

Při stanovování příčných vazeb pojiva bylo nezbytné kromě optimalizace a kalibrace těchto metod uplatnit i řadu dalších, časově náročných laboratorních operací, bez nichž by nebylo možno vlastní separaci a citlivou analýzu provést.

K analýze jsem využil nejen standardů, ale zejména reálných vzorků biologického materiálu. Ty byly získány jak od kontrolní skupiny zdravých dobrovolných dárců, tak od více než 1000 pacientů, kteří se (s informovaným souhlasem) účastnili řady probíhajících klinických studií. Celkový počet HPLC analýz, které jsem provedl a vyhodnotil v rámci mé disertační práce přesáhl 6000 stanovení. V průběhu mé práce jsem aplikoval navržené metody na různé typy testovaného biologického materiálu (viz kap. 4.4).

Na chromatografickou kolonu nelze odebraný biologický materiál dávkovat přímo, neboť koncentrace stanovovaných látek v neupraveném vzorku se pohybují pod limitem detekce metody. Navíc studované příčné vazby, obsažené v molekule kolagenu a elastinu, jsou doprovázeny řadou dalších látek z komplexní matrice, které ruší analýzu. Přítomnost některých látek ve směsi původního materiálu může kromě toho znehodnotit náplň kolony, což má negativní vliv na účinnost chromatografické kolony a zkrácení její životnosti. Z těchto důvodů bylo třeba vytipovat vhodnou metodu úpravy vzorků a obohacovací techniky, jež tato stanovení v příslušné matici umožní.

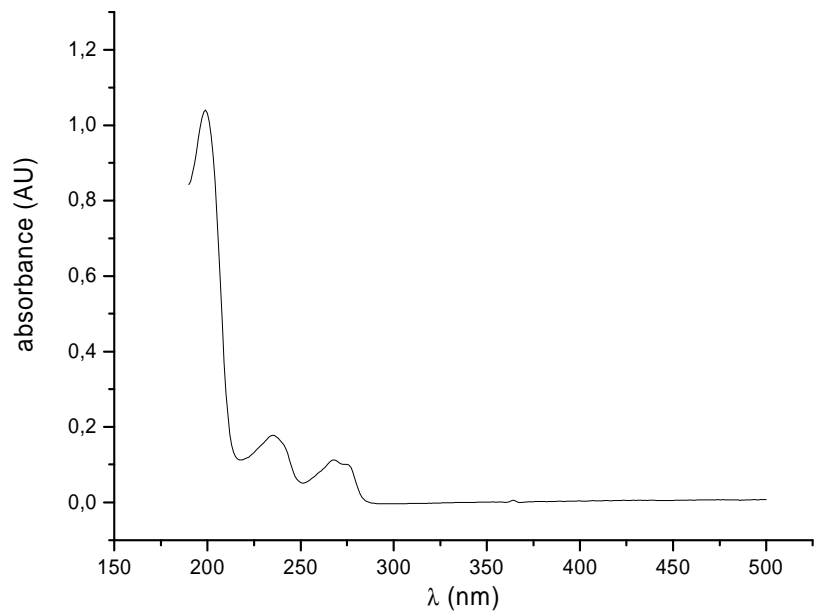
Při stanovení velmi nízkých koncentrací příčných vazeb pojivových proteinů v reálných vzorcích a s ohledem na heterogenitu analyzovaného materiálu je předúprava vzorků náročná, ale nezbytná. Byly však nalezeny způsoby jak tyto složité procedury vylepšit a zjednodušit. Oproti jiným publikovaným pracem týkajících se stanovení PEN^{55,58,125,126} jsem použitím modifikací jednotlivých analytických kroků dosáhl nejen zkrácení celkové doby, ale i snížení potřebného množství vzorku, reagensií a celkových nákladů.

Pomocí SPE se lze vyhnout řadě problémů, které se obvykle vyskytují u extrakce mezi dvěma kapalinami – především zde jde o nedokonalé oddělení obou fází, nižší výtěžnost extrakce oproti SPE a větší spotřebu čistých organických rozpouštědel. Nehledě na ekonomické náklady je výhodou SPE podstatně vyšší účinnost separace (výsledkem je kvantitativní extrakce), značná přesnost, opakovatelnost, rychlost a jednoduchost provedení, včetně možnosti případné automatizace. Souhrn všech těchto faktorů pak snižuje nejen finanční náklady, ale přináší i úsporu celkové doby potřebné na analýzu.

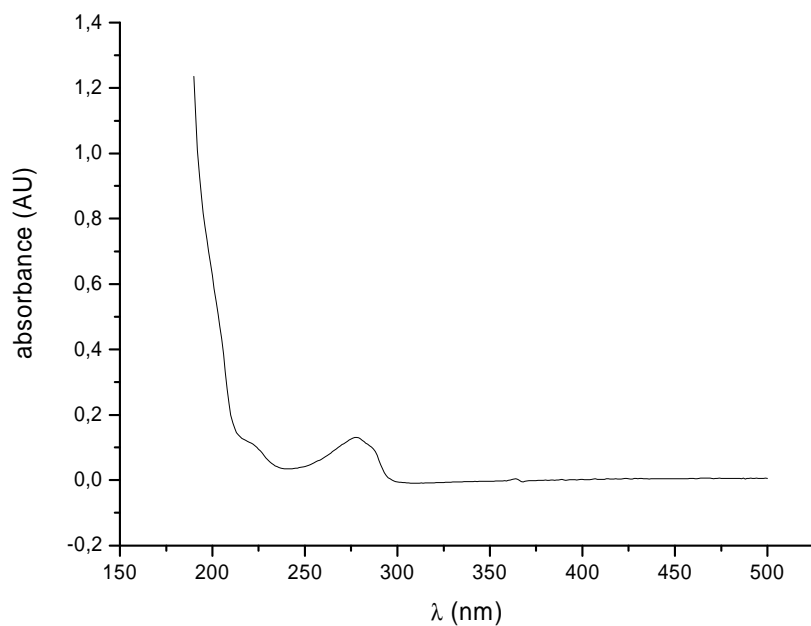
5.1 Spektrální charakteristika analytů a volba vlnové délky

Pro stanovení sledovaných analytů bylo třeba zjistit optimální způsob detekce. V případě pentosidinu a pyridinolinů jsem použil výhody přirozené fluorescence těchto látek, dovolující vysoce citlivou detekci separovaných složek. Optimální excitační a emisní vlnové délky byly zvoleny na základě provedené literární rešerše, ověřené navíc experimenty na Revmatologickém ústavu.

Maximální odezvy fluorescenčního detektoru byly u pentosidinu registrovány při nastavení vlnových délek $\lambda_{\text{excitační/ emisní}} = 335/ 385$ nm, u pyridinolinových kroslinek při $\lambda_{\text{excitační/ emisní}} = 297/ 400$ nm. Při měření spekter izomerů desmosinu je UV odezva oproti fluorescenci významnější. Signály desmosinů, jež jsem proměřil v UV oblasti pomocí detektoru s diodovým polem, prokázaly u desmosinu absorpční maxima při $\lambda = 199$ nm, 235 nm a 268 nm (viz obr. 23). U isodesmosinu jsem našel absorpční maximum při $\lambda = 278$ nm (viz obr. 24). Z hlediska dostatečně citlivé analýzy při současné detekci obou izomerů jsem zvolil pro většinu experimentů kompromisní vlnovou délku 273 nm. Naopak při analýze kolagenních příčných vazeb v UV oblasti se ukázalo, že intenzita signálu je výrazně nižší než fluorescenční odezva.



Obr. 23 UV spektrum desmosinu (absorpční maxima při $\lambda = 199$ nm, 235 nm a 268 nm)



Obr. 24 UV spektrum isodesmosinu (absorpční maximum při $\lambda = 278$ nm)

5.2 Úprava vzorků a vlastní HPLC analýza příčných vazeb kolagenu

Jedním z cílů této práce bylo praktické ověření použitelnosti chromatografických metod vyvíjených na modelových vzorcích na

Revmatologickém ústavu (pro kvantitativní analýzu příčných vazeb kolagenu) v semirutinní praxi pro různé typy biologických matric od pacientů zařazených do klinických studií.

Studované fragmenty kolagenu lze v biologickém materiálu sledovat buď ve formě volné nebo vázané, především na bílkoviny. V této práci jsem se zaměřil na klinicky více vypovídající stanovení úhrnného obsahu sledovaných příčných vazeb v poskytnutých vzorcích tělních tekutin a tkání. Toho bylo dosaženo hydrolytickým rozkladem vzorku kyselinou chlorovodíkovou za zvýšené teploty (105 °C), čímž došlo k rozrušení peptidických vazeb přítomných bílkovin. Pevné kovalentní vazby analyzovaných kolagenních kroslinek však zůstaly nedotčeny.

Touto desintegrací molekuly kolagenu a dalších, ve vzorku přítomných komponent pojiva, se mi podařilo uvolnit vlastní sledované (vůči hydrolyze stabilní) příčně-vazebné elementy. Před chromatografickou analýzou bylo však třeba získanou směs řady látek, která vznikla fragmentací, selektivně zbavit balastních nízkomolekulárních látek.

Výše uvedený způsob extrakce na pevné fázi mi posloužil současně i jako krok prekoncentrační. Při něm jsou analyty akumulovány ve vrstvě mikrogranulární celulózy, jež tvoří náplň extrakčních kolonek, a posléze selektivně vymyty. Dále jsou koncentrovány ve vakuové extrakční odparce. Po rekonstituci vzorku v mobilní fázi jsem pak pomocí výše popsané HPLC analýzy určil příslušnou koncentraci PEN v dodaném biologickém materiálu.

Zásadním vylepšením při zpracování vzorků pomocí extrakce na pevné fázi bylo použití metanolu jako mezifáze při promývání SPE kolonek po vymytí balastních látek fází s butanolem. Výhodou metanolu je zde jeho vzájemná mísitelnost jak s butanolem, tak s vodou, což dovoluje oproti metodám, které byly použity jinými autory, např. Yoshiharou et al.¹²⁶, významným způsobem snížit rozdíly v polaritě mezi solventy použitými k vymývání balastních a sledovaných látek z kolonky, a tím zredukovat potřebný objem zředěné kyseliny chlorovodíkové (jež je třeba následně pomocí SpeedVacu odpařit) použité k desorpci PEN z extrakčních kolonek.

Jak se ukázalo, je-li použito k desorpci pentosidinu z kolonek místo vody roztoku kyseliny chlorovodíkové, a to i velmi zředěné (0,05 M HCl), ušetří se tak velmi významně objem vodné fáze nezbytné k dokonalé desorpci analytu z kolonky.

Tímto jednoduchým a levným opatřením lze zároveň eliminovat případné použití jiných drahých chemikálií pro získání téhož efektu. Významným zkrácením odpařovacího kroku lze navíc snížit i spotřebu energie a opotřebení vlastních použitých zařízení.

Jedním z pozitivních přínosů této práce bylo též porovnávání výsledků získaných opakovaným zpracováním a měřením týchž vzorků a zjištění vysoké míry opakovatelnosti a robustnosti použité metody. Díky využití kombinace HPLC s fluorescenční detekcí se podařilo dosáhnout extrémně nízké meze detekce.

Pro zhodnocení přesnosti série paralelních stanovení bylo použito relativní směrodatné odchylky (RSD), považované za nejlepší relativní míru přesnosti.

Opakovatelnost vlastní HPLC byla zjišťována porovnáním integrované plochy píku standardu PEN při opakovaných nástřicích téhož vzorku a při jeho stanovení činila RSD pouhých 1,2 %.

Opakovatelnost celého analytického postupu včetně hydrolýzy a rafinace pomocí SPE byla 4,4 % (RSD), mez detekce byla stanovena na 2 nmol/l. Pro zjištění meze detekce bylo použito 10 μ l nástřiku standardu PEN o koncentraci 35 nmol/l, byla sledována oscilace základní linie a vyhodnocena jak výška šumu, tak výška vlastního signálu, která odpovídala uvedené koncentraci PEN.

Při analýze všech látek sledovaných v této práci byl pro určení meze detekce (LOD) uvažován vždy trojnásobek odhadu standardní odchylky šumu, což odpovídá pravděpodobnosti 99,7 %, že signál dokazuje přítomnost analytu. Mez stanovitelnosti (LOQ) byla zvolena jako desetinásobek standardní odchylky šumu (odpovídá přesnosti ± 10 %) ¹¹⁰.

Pro pentosidin byla vypočtena hodnota LOD = 1,76 nmol/l, odpovídající mezní koncentraci pro identifikaci PEN, tj. množství přibližně 20 femtomol v 10 μ l nástřiku. Zjištěná mez stanovitelnosti činila v tomto případě 5,87 nmol/l. Výtěžnost (recovery) celé metody je $77,3 \pm 3,5$ %. Ta byla určena porovnáním naměřených koncentrací rozpuštěného standardu PEN bez předchozích úprav a jeho identických alikvotů, paralelně zpracovaných stejným postupem, jaký je použit pro reálné vzorky, tj. po provedení hydrolýzy, SPE přečištění, odpaření eluátu a HPLC separaci rozpuštěného odparku.

Kompletní postup úpravy vzorku a jeho následné HPLC analýzy jsem aplikoval kromě standardu PEN i na náhodně vybrané vzorky močí revmatiků

a provedl od každého z nich 10 paralelních srovnávacích měření. Chtěl jsem tak posoudit míru vlivu vlastní matrice vzorku na variabilitu a přesnost stanovení pro praktické využití v laboratorní diagnostice.

Na základě provedených měření opakovatelnosti v reálných vzorcích moči pacientů (viz tab. 1) mohu konstatovat velmi dobrou shodu při kvantitativním určení obsahu PEN (resp. integrované plochy píku) v nezávisle zpracovaných vzorcích téhož pacienta.

Tab.1 Příklad testování opakovatelnosti integrované plochy píku PEN v moči pacienta s osteoartrózou.

č.měř.	plocha píku (μVs)
1	824180
2	950659
3	1025528
4	1033394
5	922373
6	925616
7	1017605
8	1039323
9	1001957
10	1005854
průměr	974649
RSD (%)	6,66

Vzhledem k počtu jednotlivých operací při zpracování vzorků biologického materiálu je dosažená opakovatelnost celého postupu včetně hydrolýzy, SPE přečištění a chromatografické separace, pohybující se u integrované plochy píku velmi dobrá (kolem 90 %). Protože rozdíly mezi hladinami PEN se mezi porovnávanými skupinami pacientů a kontrolními vzorky často liší i o 50, 100 a v některých případech i více procent, lze považovat odchylky dané povahou matrice, příp. nehomogenitou vzorků a nepřesnostmi při zpracování za nevýznamné oproti absolutním naměřeným hodnotám.

Zjištěný rozptyl výsledků paralelních měření tedy umožňuje použít tuto metodu v klinické praxi. Z kvalitativního hlediska jsem navíc ověřil, že opakovatelnost retenčních časů deseti, po sobě analyzovaných vzorků, je velmi vysoká (99,9 %).

Opakovatelnost měření jsem sledoval i v delším intervalu. Příkladem verifikace stability experimentálních podmínek, nastříkovaného standardu a spolehlivosti HPLC systému je v následující tab. 2, kde jsem zaznamenal výsledky měsíčního sledování koncentrací i retence identického naředěného interního standardu PEN v týdenním intervalu. V průběhu tohoto sledování jsem mj. zjišťoval, zda má na přesnost stanovení PEN významnější vliv doplňování čerstvě připravené mobilní fáze, opotřebením HPLC kolony, fluorescenční lampy detektoru a eventuální drobné fluktuace průtoku mobilní fáze, helia na její odvodušnění, teplota a tlak na koloně, nedochází-li k odchylkám přednastaveného objemu nástřiku standardu či jeho případné desintegraci při jeho uchovávání a opakovaném rozmrazování.

Jak je však zřejmé z tab. 2, i při dlouhodobějším monitorování základních parametrů separačního systému nebyly v průběhu měsíčního sledování patrné významné odchylky hodnot od dlouhodobého průměru (vypočtená RSD v případě hodnocení koncentrace PEN činila 1,72 %, u retenčního času píku PEN byla RSD dokonce jen 1,46 %). Zavedená metoda je tedy dostatečně robustní a spolehlivá pro běžné aplikace v našem semirutininním provozu.

Tab.2 Závěry dlouhodobého sledování ovlivnění koncentrace a retence zředěného standardu PEN fluktuacemi v HPLC systému po týdenních intervalech.

č. měření	PEN (nmol/l)	t _R (min)
1	1359,71	16,44
2	1403,01	16,22
3	1348,87	16,34
4	1343,08	16,87
průměr	1363,67	16,47
RSD (%)	1,72	1,46

Analogicky jako v případě PEN byly s využitím fluorescenčního detektoru stanovena mez detekce pro pyridinolinové příčné vazby. Mezní detekovatelné množství pro oba kroslinky (PD a DPD) bylo při 20 µl nástřiku standardů určeno na 200 femtomol, což odpovídá molární koncentraci 10 nmol/l.

Na základě porovnání výše uvedených mezí detekce sledovaných příčných vazeb kolagenu je zřejmé, že citlivost stanovení PEN je přibližně 5krát vyšší oproti stanovení PD a DPD.

5.2.1. Kalibrace HPLC metod pro stanovení PEN, PD a DPD

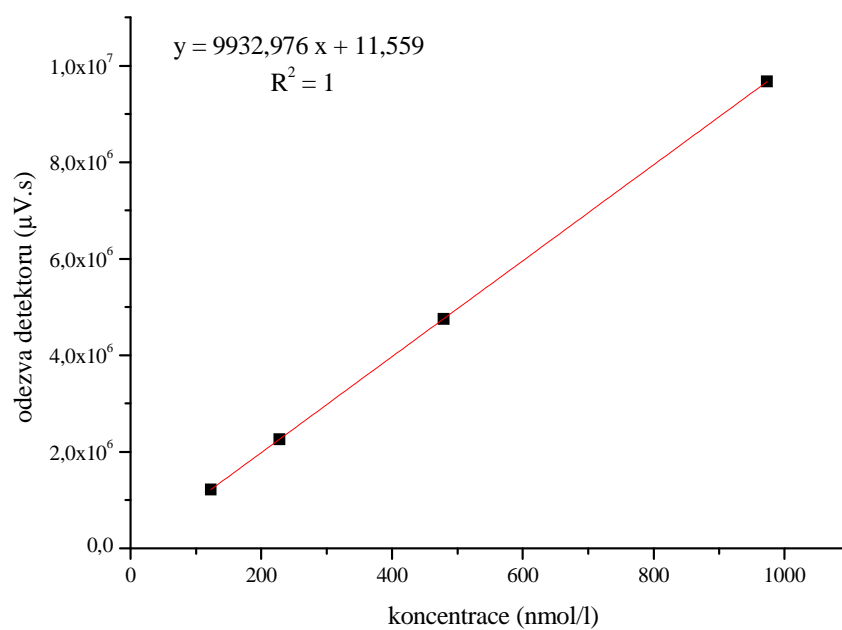
Při kvantitativní analýze sledovaných příčně-vazebných elementů jsem hodnotil množství složek ve vzorku na základě integrované plochy píků a využil metody vnějšího standardu, založené na dávkování známých množství analyzovaného vzorku a standardu za identických podmínek. Koncentrace analytů jsem vypočítával na základě naměřených kalibračních křivek. Koncentrační rozsah kalibračních závislostí byl zvolen tak, aby pokrýval oblast fyziologických koncentrací analytů ve sledovaných matricích.

Pro hodnocení kvantity pentosidinu jsem měl k dispozici dva, na našem pracovišti individuálně syntetizované standardy, z nichž jsem vyšel při kalibraci metody. Z obou rozpuštěných standardů o známé koncentraci jsem postupným ředěním připravil sadu interních standardů a použil je ke konstrukci kalibračních závislostí odezvy signálu (resp. integrované plochy píku) na jejich koncentraci.

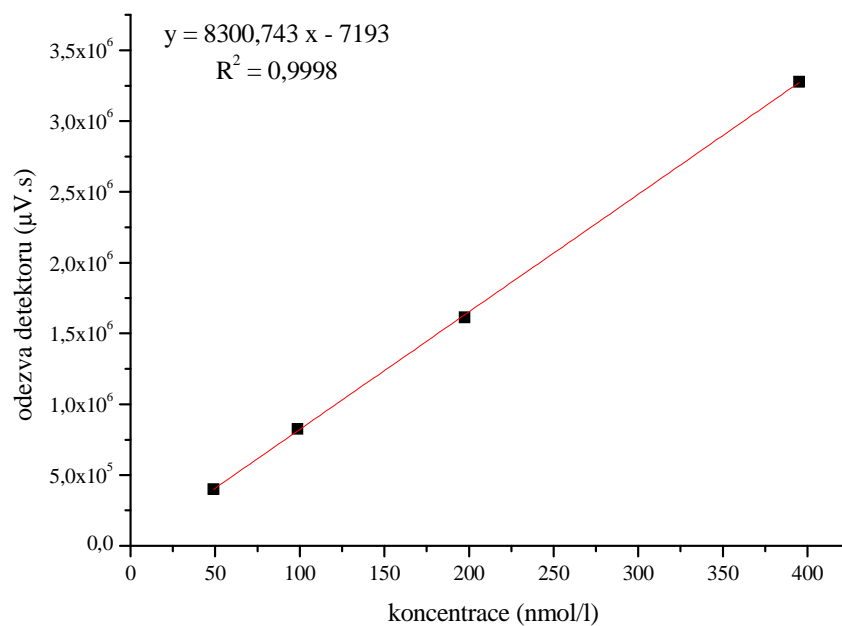
Obě vynesené kalibrační přímky (obr. 25) vykazovaly ideální regresní závislost (kvadrát korelačního koeficientu R^2 přesahoval hodnotu 0,9990) a jednotlivé body se tedy prakticky neodchylovaly od přímkové závislosti.

Na následujícím obr. 26 jsou zobrazeny chromatogramy sady interních standardů PEN syntetizovaných v naší laboratoři, z nichž je patrná jednak jejich čistota a obrázek svědčí i o dobré opakovatelnosti retenčních parametrů.

Pro kvantitativní analýzu pyridinolinu a deoxy pyridinolinu analogicky posloužily kalibrační závislosti uvedené na obr. 27.

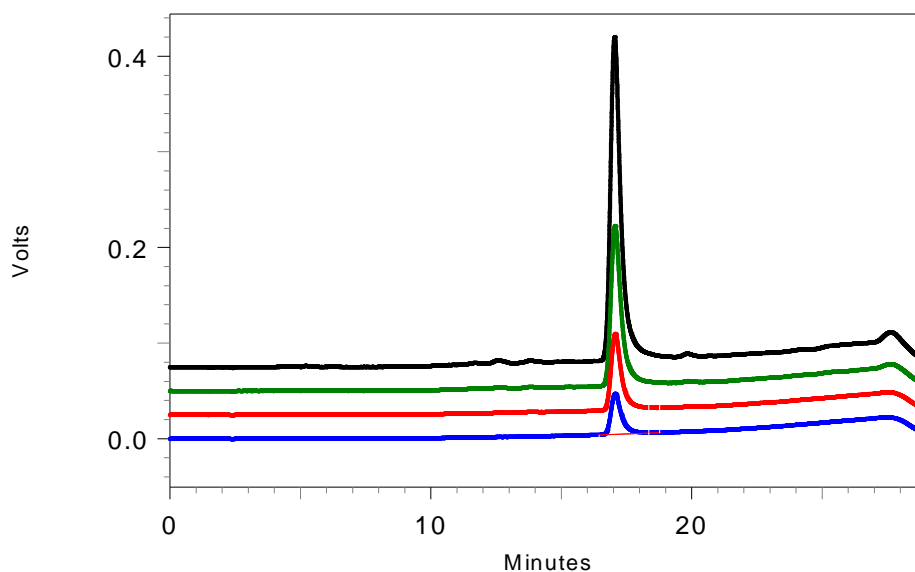


a)

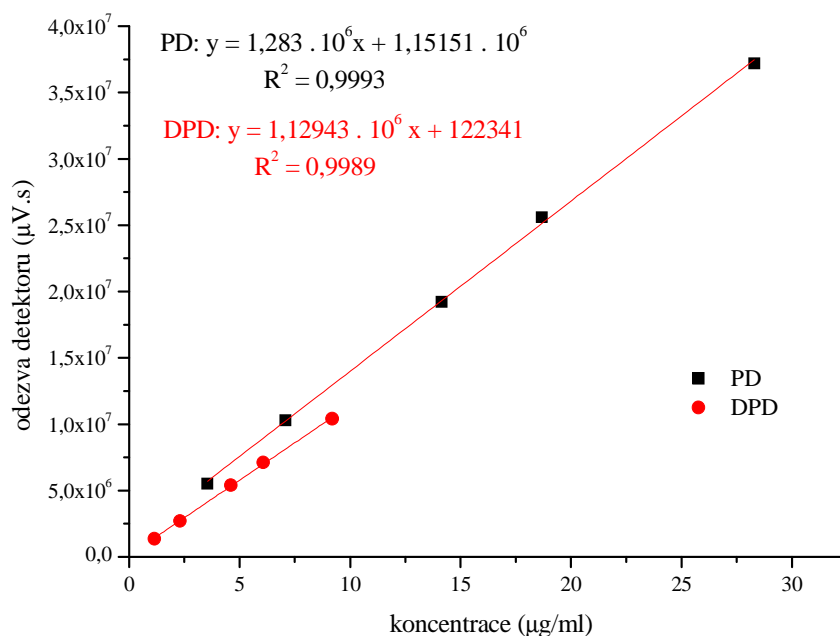


b)

Obr. 25 Kalibrační přímky získané při použití dvou syntetizovaných standardů pentosidinu o různé koncentraci: a) PEN 1 = 1190 nmol/ml; b) PEN 2 = 395 nmol/ml



Obr. 26 Chromatogramy kalibračních standardních roztoků pentosidinu (PEN1) pro konstrukci kalibrační přímky; experimentální podmínky: fluorescenční detekce: $\lambda_{\text{excitační}} = 335 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisní}} = 385 \text{ nm}$; nástřik: $10 \mu\text{l}$ standardu; gradient ACN 12,5-25,0 % za 20 min; $F = 0,5 \text{ ml/min}$, $t = 40 \text{ }^\circ\text{C}$.



Obr. 27 Kalibrace pyridinolinových příčných vazeb

5.2.2 Volba optimálních podmínek HPLC a CE separace

Analýza pentosidinu

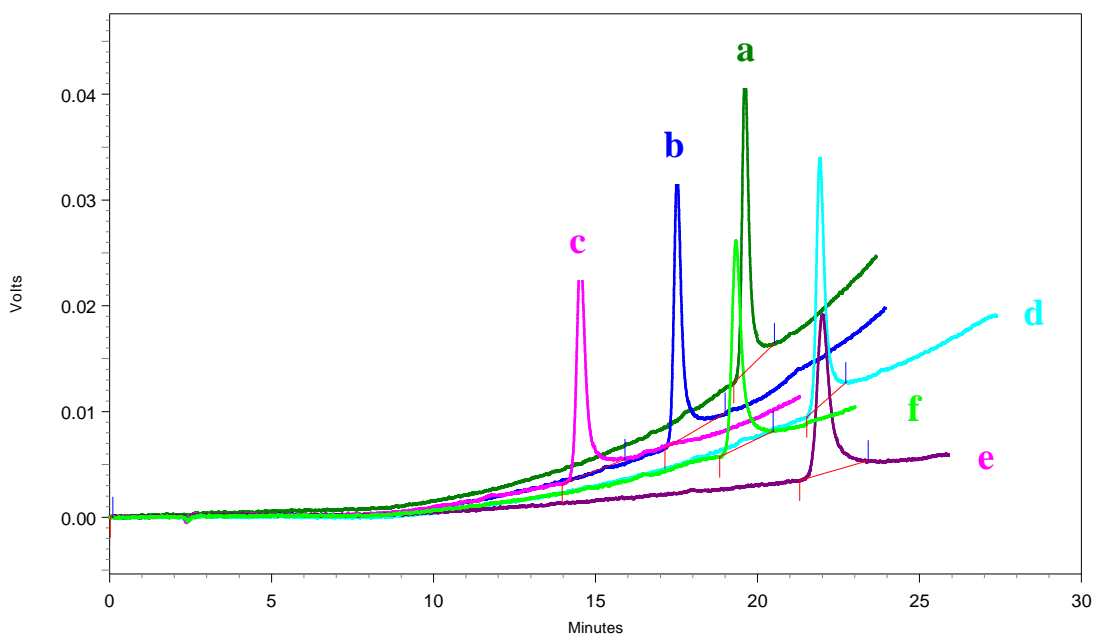
Na základě literární rešerše, chemických vlastností pentosidinu a dostupnosti analytických kolon byla jako vhodná vybrána oktadecylsilanová stacionární fáze C18, která se osvědčuje při analýze heterocyklických látek obdobné povahy v biologických matricích.

Úprava vzorků a následná analýza PEN v biologickém materiálu metodicky vycházela z postupů uplatněných při stanovení pyridinolinových kroslinek, přičemž první krok zahrnoval optimalizaci složení mobilní fáze. Pro stanovení PEN byla nejprve testována izokratická metoda, kde byl použit různý podíl acetonitrilu (ACN) jako organického modifikátoru v mobilní fázi, tj. 0,02M kyselina heptafluoromáselná s 0,01M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Při izokratickém použití 12,5% ACN v mobilní fázi přesahoval retenční čas PEN 30 minut, při 15% ACN byl kolem 15 minut, zatímco při 17,5% ACN jen cca 10 minut. Při použití nižšího procenta ACN se tvar píku více blížil optimálnímu gaussovskému profilu, délka analýzy by však za těchto podmínek byla značně dlouhá. Později byl proto zjišťován i vliv složení mobilní fáze na plochu píku, jeho symetrii a retenční čas i při použití gradientové eluce.

Zkoušeny byly následující lineární gradienty ACN: 10-30%, 12,5-30%, 15-30%, 10-25%, 12,5-20% a 12,5-25% během 20 minut. Následujících 10 minut bylo ponecháno na lineární pokles koncentrace ACN a ustálení počátečního složení mobilní fáze před dalším nástřikem. Jako optimální varianta z hlediska kompromisu mezi výše jmenovanými parametry se jevila poslední jmenovaná gradientová eluce s variabilním obsahem ACN od 12,5 do 25% během 20 minut. Délka celé analýzy, včetně ustavení původních počátečních podmínek, byla 30 minut (viz obr. 28).

K urychlení analýzy pomohl nejen zvolený gradient ACN, ale i mírně zvýšená teplota kolony (termostatována na 40 °C). To urychluje ustavení rovnováhy na povrchu stacionární fáze, a vede tak i ke zvýšení účinnosti použité kolony. Vyšší teplota zároveň snížila viskozitu mobilní fáze, a tedy i tlak v koloně. To dovolilo použití vyšší průtokové rychlosti (0,5 ml/min) než za běžné laboratorní teploty. Tlak v koloně za uvedených podmínek dosahoval přibližně 5,2 MPa.

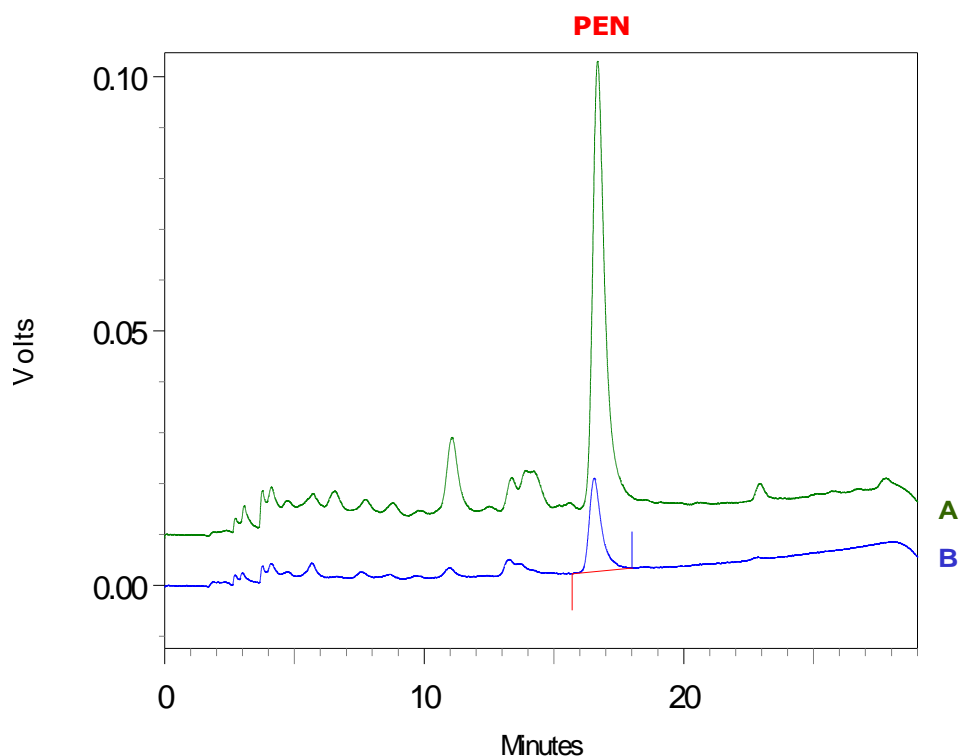


Obr. 28 Optimalizace gradientové separace při stanovení pentosidinu (změna lineárního gradientu acetonitrilu za 20 min.): a) 10-30% ACN, b) 12,5-30% ACN, c) 15-30% ACN, d) 10-25% ACN, e) 12,5-20% ACN, f) 12,5-25% ACN; ostatní experimentální podmínky konstantní: $F = 0,5 \text{ ml/min}$; $t = 40 \text{ }^\circ\text{C}$; nástřik standardu: $10 \mu\text{l}$ 37 nM PEN ¹¹⁹

Výsledné chromatogramy obsahovaly i v reálných vzorcích díky značně efektivnímu přečištění při předchozí SPE úpravě a vysoké selektivitě fluorescenční detekce ve většině případů charakteristický dominantní pík PEN. Ten obvykle ve svém nejbližším okolí neměl výraznější koeluující píky, které by znesnadňovaly jeho identifikaci. I přes vysoce intenzivní fluorescenci PEN se však ve vyjímecných případech v některých matricích, kde byly jeho hladiny nižší, objevily píky jiných fluoreskujících nízkomolekulárních látek, které by mohly být s PEN hypoteticky zaměněny. Zde však pomohla při rozhodování velmi dobrá zjištěná opakovatelnost retenčních časů i skutečnost, že bezprostředně před každou naprogramovanou sérií vzorků (série obsahovala běžně 20-60 vzorků) byl pro kontrolu proveden nástřik zředěného standardu, a bylo tak možno vzájemné srovnání těchto píků.

Účinnost 150 mm dlouhé skleněné kolony, použité pro stanovení PEN, byla relativně vysoká a pro daný účel vyhovující. Zjištěný počet teoretických pater se pohyboval kolem 40 tisíc teoretických pater na metr kolony.

Na obr. 29 je uveden příklad praktické analýzy kostních tkání reprezentativní pacientky s osteoporózou. Biologický materiál byl získán při operaci osteoporotické fraktury v rámci řešení výzkumných záměrů reg. č. MZ 00023841 (FN Bulovka, Praha).



Obr. 29 Ukázka HPLC stanovení PEN v kostních tkáních reprezentativní pacientky s osteoporózou: A = vzorek kosti z lopaty kyčelní, B = vzorek kosti z hlavičky femuru

Analýza pyridinolinů

Oproti dříve publikované práci Blacka et al.¹²⁰ založené na gradientové RP-HPLC s využitím iontových párů bylo v této práci pro stanovení pyridinolinových kroslinek použito jednodušší izokratické metody iontově-výměnné chromatografie, která se osvědčila v mnoha případech pro separace obdobných aminokyselin. V tomto případě bylo cílem současné stanovení obou fluoreskujících příčných vazeb (PD a DPD) během jedné analýzy, která však vyžadovala odlišnou excitaci a emisní vlnovou délku, jiný

separační systém než ten, co byl použit pro pentosidin. Stejně jako u PEN byla však před HPLC nezbytným krokem předchozí úprava reálných vzorků pomocí výše popsané SPE.

Při iontově-výměnné chromatografii lze retenci jednotlivých složek v koloně ovlivnit pomocí pH mobilní fáze, koncentrací solí, ale případně též změnou teploty či přidavkem organického modifikátoru. V této práci bylo ke stanovení obou analytů použito modifikované metody, vycházející z publikací a zkušeností mých předchůdců, kteří se této problematice v Laboratoři pro výzkum pojiva na Revmatologickém ústavu dříve věnovali¹²⁷⁻¹²⁹.

Oproti dřívějším postupům se podařilo některé kroky zjednodušit či zcela vypustit, což představuje úspory jak chemikálií, energie a financí, tak především času. Při použití aktuální metody pro stanovení PD a DPD stačí nyní zpracování pouze 0,5 ml vzorku ranní moči, přítomnost inertního dusíku při hydrolýze se ukázala jako nadbytečná. Také snížení teploty při hydrolýze na 105 °C nemělo na výsledné koncentrace významný vliv. Při SPE bylo zvýšením objemu promývacího média a opakovaným nanesením jímaného vzorku na kolonky dosaženo lepší prekoncentrace. Vzhledem k možnostem využití moderní instrumentace je eluent po SPE odpařován za vakua (pomocí rotační vakuové odparky SpeedVac) místo sušení v proudu dusíku.

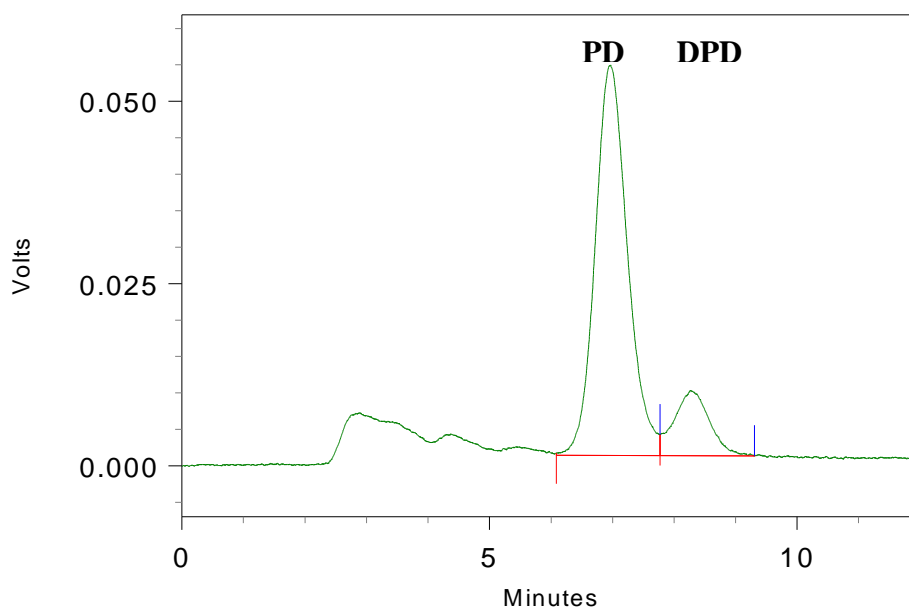
Z hlediska mobilní fáze se při HPLC jako ideální varianta osvědčila kombinace 0,3M CH₃COOH s pH = 3,0 a 0,45M Na₂SO₄. Nízké pH v tomto separačním systému zajišťuje dostatečnou retenci pyridinolinových analytů pro jejich účinnou separaci (s minimálním rozlišením $R_{1,2} \geq 1,0$).

Přídavek solí zde jednak zvyšuje iontovou sílu vzniklého pufru, ale omezuje i negativní působení nescifických interakcí separovaných komponent s funkčními skupinami stacionární fáze. Z hlediska uvažovaných anorganických solí, přidávaných do mobilní fáze, byly oproti některým starším pracem (citace Black 1988) vyloučeny soli s obsahem jodidových, bromidových a chloridových aniontů (např. často užívaný NH₄Cl), neboť je z literatury známo¹³⁰, že významným způsobem zhasí fluorescenci a snižují tak tedy vlastní citlivost metody. Pro tato stanovení stopových množství kroslinků v biologické matrici je však fluorescenční odezva zásadní a Na₂SO₄ byl proto pro analýzu vhodnější. Pozitivní vliv na separační účinnost mělo i zvýšení teploty na 48 °C (vzhledem k lepšímu převodu hmoty).

V rámci mé práce bylo nutné převést HPLC metodu ze staršího typu chromatografu firmy Spectra-Physics (SP 8100) na nový od japonské firmy Shimadzu (počítačově řízený). S tím souviselo i stanovení nového tzv. „response factoru“, který vyplývá z vypočtených ploch píků analytů odpovídající dané koncentraci a nástřiku interních standardů. Tím bylo dosaženo zachování kontinuity ve stanovení požadovaných markerů a použitelnosti dříve zjištěných hodnot. Toto nové moderní zařízení navíc nabídlo oproti předchozímu systému více možností zpracování dat, snazší programování a ovládání metody, kontrolu systému včetně možnosti automatického spouštění sekvencí vzorků.

Izokratická HPLC separace probíhala na koloně Separon HEMA-BIO 1000 plněné silným katexem (sulfobutyl) a k detekci je tak jako u PEN výhodně využito přirozené fluorescence analytů. Průtok mobilní fáze byl naprogramován na 0,3 ml/min a tlak na 150 mm skleněné koloně se za uvedených experimentálních podmínek pohyboval kolem 2,1 MPa. Vzhledem k relativní stabilitě základní linie a symetrii píků byla kvantita hodnocena pomocí softwarového integrátoru na základě plochy píku oproti dřívějšímu způsobu vyhodnocení výšky píku na grafickém integrátoru.

Vzhledem k tomu, že v daném systému oba sledované analyty eluovaly z kolony v relativně krátkém retenčním čase (do 9 minut), píků měly ideální Gaussovský tvar a jejich rozlišení bylo pro dané účely dostatečné ($R_{1,2} > 1,2$), nebylo potřeba analýzu dále zkracovat. Z hlediska jednoduchosti provedení vyhověla pro praktická měření v moči výše popsaná metoda za izokratických podmínek a i při ponechání určitého času na stabilizaci kolony před dalším nástřikem nezabrala analýza pyridinolinů celkově více než 15 minut. Ukázkový chromatogram současné analýzy PD a DPD je uveden na obr. 30.



Obr. 30 Příklad izokratické HPLC separace pyridinolinů v hydrolyzátu moči reprezentativního dětského pacienta s osteochondrodysplazií (vrozená vývojová vada pohybového aparátu charakterizovaná metabolickými poruchami růstu chrupavčité, vazivové a kostní tkáně a abnormalitami kostního obratu). Experimentální podmínky: fluorescenční detekce při $\lambda_{\text{excitační}} / \text{emisní}} = 297 / 400$ nm, $F = 0,3$ ml/ min, $t = 48^\circ\text{C}$, nástřík 25 μl .

V rámci této práce byly zjišťovány klíčové retenční a validační parametry separačního systému včetně opakovatelnosti stanovení, které jsou shrnuty v tab.3 (viz kap. 5.3).

K zajištění relevance měření je snahou eliminovat co nejvíce ovlivnitelných faktorů, jež mohou zvyšovat rozptyl měřených hodnot, jako je již výše zmíněná doba odběru, delší expozice vzorků UV záření (jež může přispívat k parciální přeměně pyridinolinu na hydroxylysin), důležitá je interní standardizace použité metody a při interpretaci výsledků je třeba v úvahu brát i věk a pohlaví pacientů.

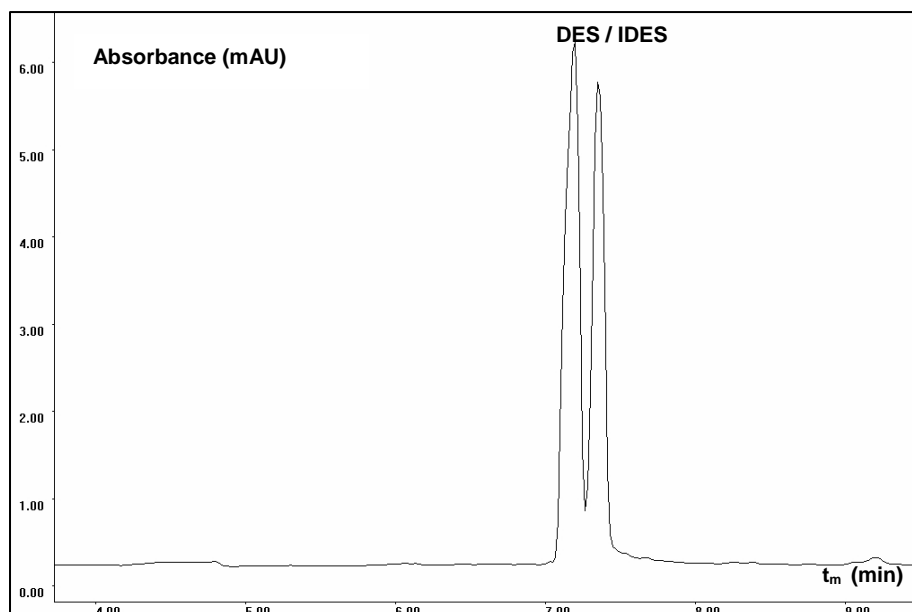
I na našem pracovišti byla potvrzena u dětí významně vyšší činnost jak odbourávání, tak novotvorby kostí, než jak je tomu u již zcela vyvinutého skeletu dospělých jedinců. K významnějšímu nárůstu obou příčných vazeb dochází také v důsledku hormonálních změn u postmenopauzálních žen. Obecným problémem

porovnání jednotlivých metod a přístupů ke kvantitativní analýze pyridinolinů je stále dosavadní absence jejich mezinárodních standardů.

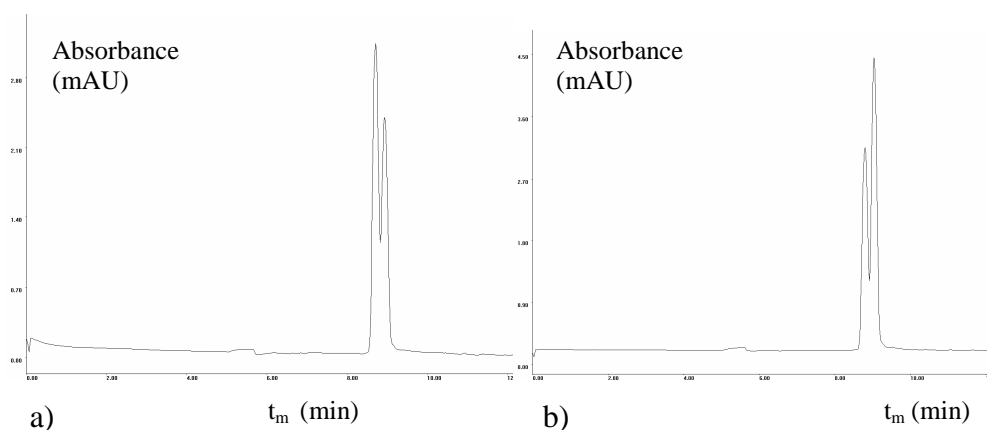
Separace příčných vazeb elastinu

Kromě modifikace starších metod pro stanovení kolagenních příčných vazeb jsem navrhl a na vzorcích tkání pacientů i úspěšně ověřil novou metodu pro separaci izomerů desmosinu, které patří mezi nejvýznamnější specifické ukazatele metabolismu elastinu. V tomto případě jsem použil dvou analytických přístupů s detekcí analytů v UV oblasti. V prvním případě šlo o testování různých variant kapilární elektroforézy modifikovaných na základě prací jiných autorů^{61,91,131}, v druhém případě jsem použil varianty RP-HPLC.

Obě metody založené na principu elektroforetické separaci (CZE, MEKC) byly optimalizovány a nejlepší výsledky bylo dosaženo při využití MEKC v prostředí bazického borátového pufru s přídavkem SDS s UV detekcí při $\lambda = 273$ nm, která byla kompromisní vlnovou délkou mezi absorpčními maximy obou izomerů. Pro modelovou směs standardů obou desmosinů byla separace úspěšná (viz obr. 31 a tab. 6).



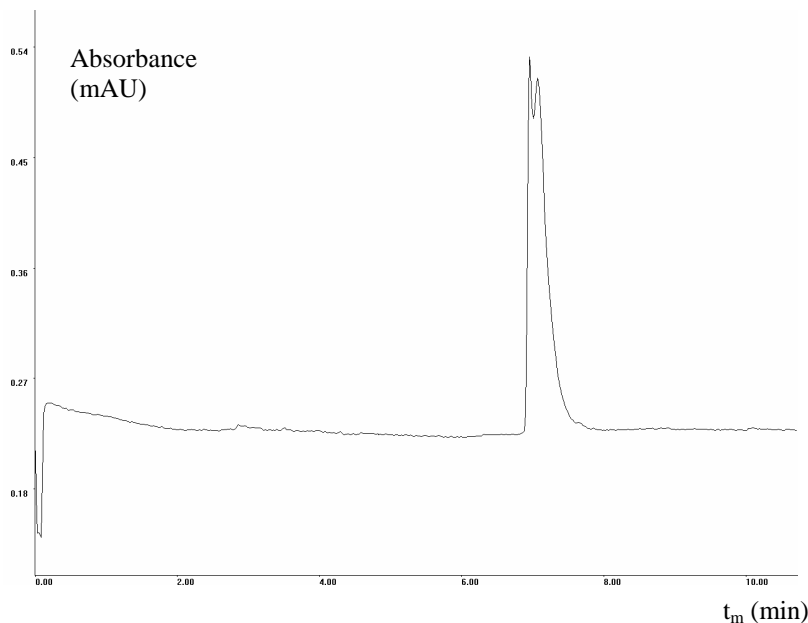
Obr. 31 Ukázka MEKC separace příčných vazeb elastinu (aliquotní směs standardů DES a IDES o koncentraci 1 mg/ml); experimentální podmínky: kapilára TWC-S50 (i.d.=50 μ m; l_c/l_d=65/50 cm); základní elektrolyt: 30mM Na₂B₄O₇ (pH=9,2) + 50mM SDS; separační napětí: U=30 kV, dávkování vzorku: 30 mbar/ 0,1 min.; UV detekce: $\lambda = 273$ nm



Obr. 32 MEKC separace alikvotní směsi standardů DES a IDES o koncentraci 1 mg/ml; a) UV detekce: $\lambda = 268$ nm (absorpční maximum DES); b) $\lambda = 278$ nm (absorpční maximum IDES); experimentální podmínky: kapilára TWC-S50 (i.d.=50 μ m; $l_c/l_d=65/50$ cm); základní elektrolyt: 30mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH=9,2) + 50mM SDS; separační napětí: $U=20$ kV, dávkování vzorku: 30 mbar/ 0,5 min

Na obr. 32 je patrný vliv změny vlnové délky na odezvu detektoru, která odpovídá v případě a) absorpčnímu maximu DES a v případě b) absorpčnímu maximu IDES. Pro optimální detekci směsi obou izomerů byla tedy zvolena kompromisní vlnová délka $\lambda = 273$ nm.

Pro srovnání použitých elektroforetických systémů je na obr. 33 uveden i příklad separace v CZE provedení (základní elektrolyt 100mM H_3PO_4 ; pH = 2,5), která se ovšem ukázala oproti MEKC jako méně účinná.



Obr. 33 CZE separace alikvotní směsi standardů DES a IDES o koncentraci 1 mg/ml; a) UV detekce: $\lambda = 273$ nm; experimentální podmínky: kapilára TWC-S50 (i.d.=50 μm ; $l_c/l_d=65/50$ cm); základní elektrolyt: 100mM H_3PO_4 (pH = 2,5); separační napětí: $U=30$ kV, dávkování vzorku: 30 mbar/ 0,1 min;

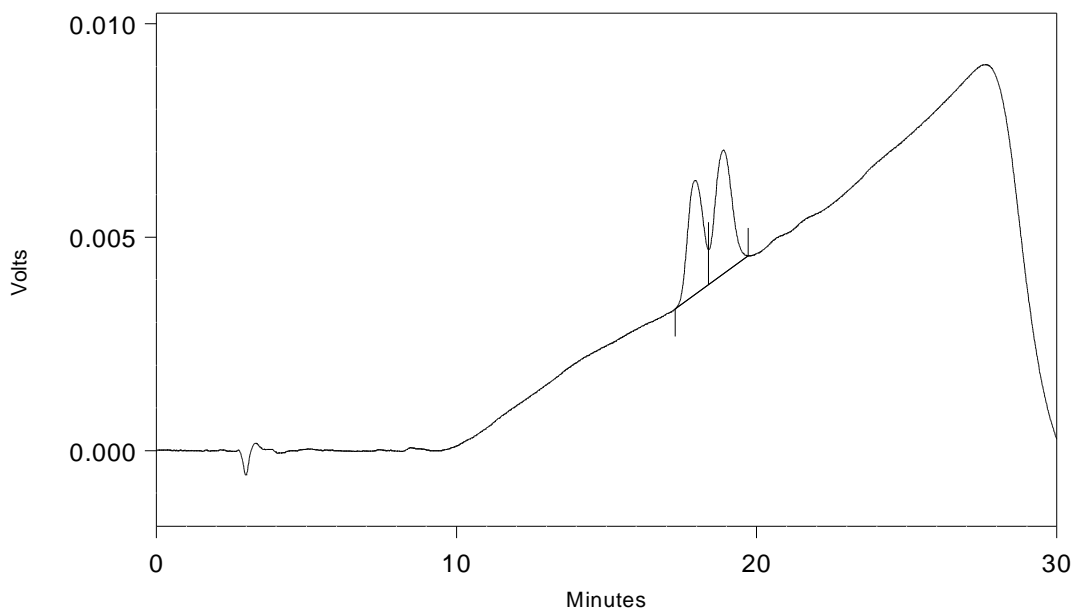
Jak se však ukázalo, pro reálné vzorky moči se testované CE techniky v daném provedení, zejména z hlediska požadované citlivosti, neukázaly jako příliš vhodné. Proto jsem dále zaměřil svoji pozornost na možnosti stanovení DES a IDES pomocí HPLC v kombinaci s UV detekcí.

HPLC analýza izomerů desmosinu

Pro chromatografickou separaci směsi DES a IDES jsem z několika testovaných variant dosáhl nejlepších výsledků při aplikaci modifikované HPLC metody pro stanovení PEN. Zde jsem však zvolil detekci v UV oblasti při $\lambda = 273$ nm.

Praktickou analýzu samotné směsi desmosinů jsem v režimu reverzní HPLC prováděl na kapalinovém chromatografu Shimadzu typu CLASS VP, verze 5.03. Použita byla, tak jako pro stanovení PEN, skleněná kolona typu CGC Separon SGX C18 (150 x 3 mm), kde stacionární fází tvoří sférické částice silikagelu (7 μm) s chemicky navázanou skupinou C18. Složení mobilní fáze zde přitom vycházelo ze stejně připravovaných mobilních fází používaných na stanovení PEN - označených A (obsahuje 5% acetonitrilu, ACN) a B (obsahuje 30 % ACN), tj. 0,02 M HFBA,

0,01M (NH₄)₂SO₄, lineární gradient byl v tomto případě dán proměnnou koncentrací ACN v rozmezí 5,0-17,5 % za 20 minut, průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, kolona byla termostatována na 40 °C. K nástřiku jsem použil 10 µl vzorku a v UV oblasti monitoroval signál při $\lambda = 273$ nm. Za těchto podmínek bylo dosaženo přijatelné separace píků s retenčními časy do 20 minut (obr. 34) a následně byla provedena, z důvodu potřeby budoucího kvantitativní hodnocení, kalibrace obou desmosinů.



Obr. 34 Ukázka separace příčných vazeb elastinu (aliquotní směs standardů DES a IDES); Gradientová RP-HPLC separace DES a IDES – experimentální podmínky: separační kolona ($t=40^{\circ}\text{C}$): CGC Separon SGX C18 (150 x 3 mm); mobilní fáze (průtok 0,5 ml/min.): 0,02M kyselina heptafluoromáselná + 0,01M (NH₄)₂SO₄ / lineární gradient acetonitrilu (5,0-17,5 % za 20 min.); dávkování vzorku: 10 µl; UV detekce: $\lambda = 273$ nm.

Kalibrace desmosinů

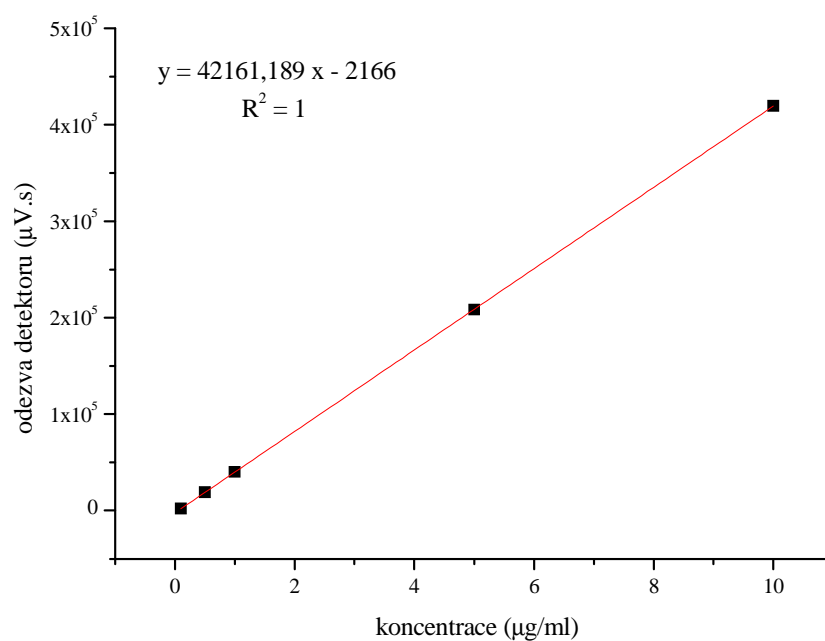
Obdobně jako u HPLC stanovení PEN jsem pro nové aplikace z připravené řady roztoků komerčních standardů proměřil v UV oblasti spektra i kalibrační závislosti pro kvantitativní stanovení obou izomerů desmosinu (DES a IDES).

Přitom jsem vycházel z komerčně dostupných standardů DES a IDES ($M_r = 526$) firmy MP Biomedicals (dříve ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA), kat. č. 191378 (DES, 1 mg) a č. 191379 (IDES, 1 mg). Nejprve jsem rozpuštěním 1 mg standardu 1 ml demineralizované vody připravil zásobní roztok

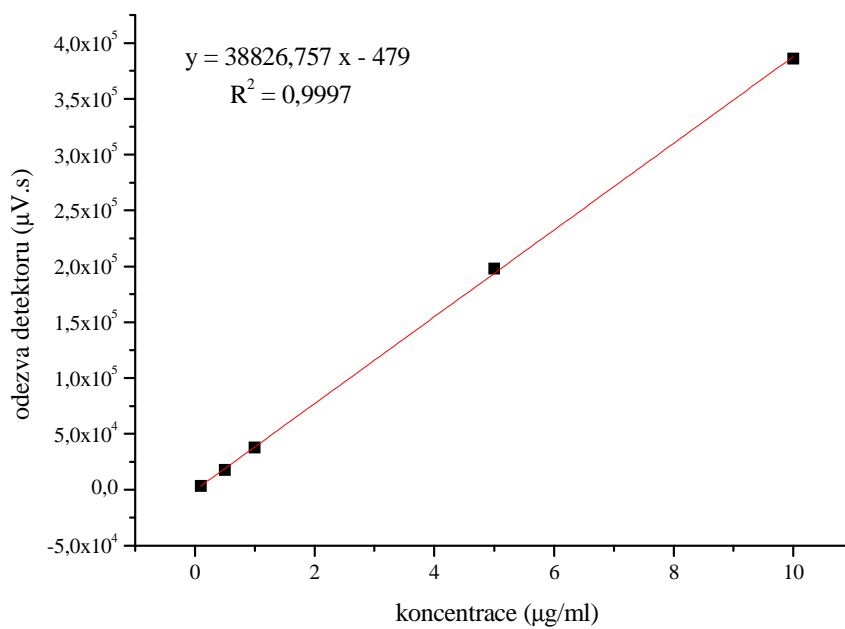
standardu DES. Ten byl pak dále 100x zředěn (0,1 ml do 10 ml) a označen jako D1 (koncentrace 10 µg/ml). Stejně jsem postupoval u IDEs - základní roztok byl označen I1 (koncentrace 10 µg/ml). Dalším postupným ředěním základních roztoků obou isomerů (DES a IDEs) vznikla škála standardů o koncentracích 10 µg/ml; 5 µg/ml; 1 µg/ml, 0,5 µg/ml; 0,1 µg/ml, které byly použity pro kalibraci.

Vynesené kalibrační přímky jsou uvedeny na obr. 35. Stejně tak jako v předchozích případech i zde přesahují korelační koeficienty vynesených lineárních závislostí odezvy detektoru na koncentraci analytů hodnotu 0,99.

Chromatogramy, které byly podkladem pro sestavení těchto kalibračních závislostí jsou pro ilustraci zobrazeny na dalších obrázcích (obr. 36 a, b). Minimální detekovatelná koncentrace v tomto chromatografickém systému byla pro oba izomery desmosinu 0,3 µg/ml.

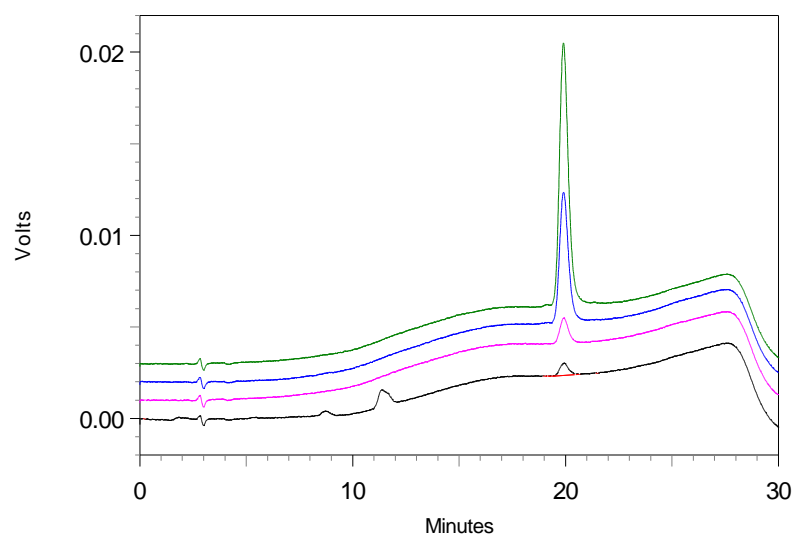


a)

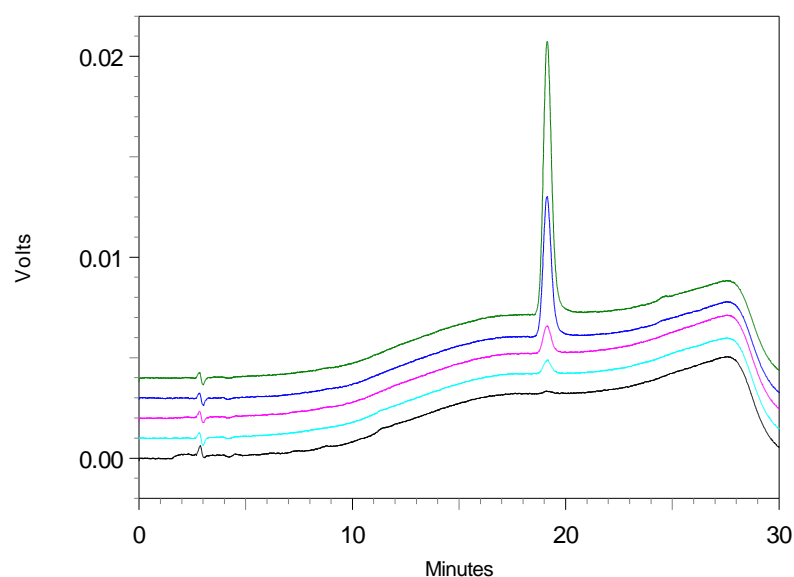


b)

Obr. 35 Kalibrační závislosti pro stanovení izomerů desmosinu: a) desmosin; b) isodesmosin.



Obr. 36 a) HPLC analýza standardů desmosinu - křivky odpovídají koncentracím: 10 µg/ml; 5 µg/ml; 1 µg/ml; 0,5 µg/ml (nástřík: 20 µl); Gradientová RP-HPLC - experimentální podmínky: separační kolona (t=40°C): CGC Separon SGX C18 (150x3 mm); mobilní fáze (průtok 0,5 ml/min.): 0,02M HFBA + 0,01M (NH₄)₂SO₄ / lineární gradient ACN (5,0-17,5 % za 20 min.); dávkování vzorku: 10 µl; UV detekce: $\lambda = 273$ nm.



Obr. 36 b) Chromatogramy standardů isodesmosinu – křivky odpovídají koncentracím: 10 µg/ml; 5 µg/ml; 1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,1 µg/ml (nástřík: 20µl); experimentální podmínky jsou identické jako na obr. 36 a.

Vývoj metody pro současné stanovení příčných vazeb kolagenu a elastinu

V poslední době se v rámci základního klinického výzkumu objevila nová myšlenka, která si klade za cíl studovat tkáňové a systémové determinanty mechanických vlastností pojivových tkání, konkrétně u aortální stěny pacientů podstupujících bypass. K separaci a senzitivní kvantitativní analýze vybraných biochemických ukazatelů, charakterizujících degenerativní změny kolagenu a elastinu v aortální tkáni, se jako nejlepší nabízí opět variabilita HPLC systému.

Faktory zodpovědné za zvýšenou tuhost tepenné stěny velkých artérií nebyly dosud dostatečně prozkoumány^{89,132}. Významně se však na těchto procesech podílí fragmentace a úbytek elastických vazivových vláken v tkáních aorty a jejich nahrazování kolagenem, který je o 2-3 řády tužší než elastin. Na degradaci elastinu se podílí jednak vlivy mechanické, ale důležitou roli má také remodelace cévní stěny zprostředkovaná aktivitou matrixových metaloproteináz. Mechanické vlastnosti elastinových lamel a kolagenních vláken jsou dále modifikovány také tvorbou příčných vazeb produktů pozdní glykace (AGEs) a tyto děje jsou také akcelerovány v přítomnosti hypertenze, diabetu či urémie.

Vzhledem k těmto potřebám kliniků biochemicky charakterizovat degenerativní a patologické změny pojiva, konkrétně v odebraném terčíku aortální tkáně, bylo třeba nalézt metody dostatečně citlivé a selektivní. Pro sledování jak PEN, tak specifických síťujících molekul v elastinu (DES, IDES) se jevila jako lákavá možnost simultánního stanovení těchto příčných vazeb v rámci jedné analýzy. Na základě předchozích HPLC měření v naší laboratoři a při současné instrumentální možnosti sériového zapojení UV spektrofotometrického a fluorescenčního detektoru se ukázala modifikace již dříve prověřených metod jako reálná.

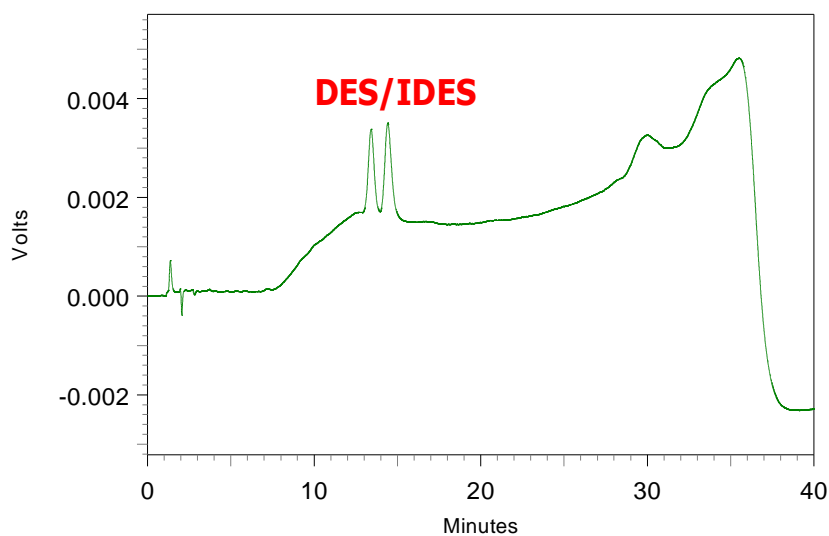
Experimentálně bylo ověřeno, že způsob zpracování vzorků, tj. hydrolytický rozklad a SPE používaný pro stanovení PEN v tkáních lze použít s úspěchem i pro izomery desmosinu. Z hlediska složení mobilní fáze, kolony, detekce a citlivosti byla situace již jasná na základě dříve vyvinutých metod, zvláště pro PEN a zvláště pro standardy desmosinu. Nejdůležitější bylo při separaci především zajištění dostatečného rozlišení píků DES a IDES. Použití lineárního gradientu ACN 5,0-17,5 % za 20 minut, které se osvědčilo pro separaci standardů desmosinu, při RP HPLC separaci však výrazně prodloužilo délku analýzy, neboť retence PEN byla za těchto okolností poměrně vysoká (nad 40 min). V nalezených pracích některých jiných autorů jsou uvedeny i jiné systémy kapalinové chromatografie,

kteře vřak při horřím rozliření obou izomerů měly retenční řasy přesahující 60 minut, což je doba neúměrně dlouhá¹³³. Proto jsem dále testoval různé varianty lineárního gradientu ACN a jako přijatelný kompromis byl nakonec vybrán gradient ACN 5-25 % za 30 minut.

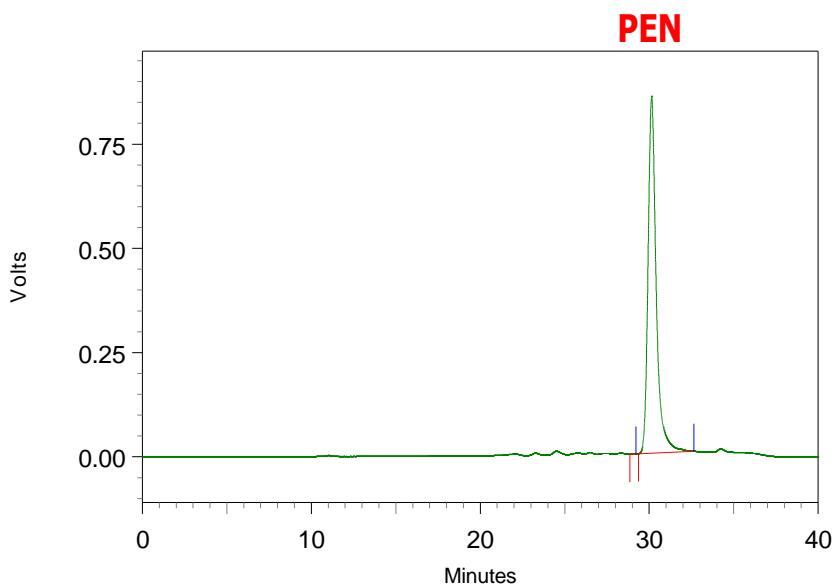
Tím se mně podařilo zkrátit retenční řas PEN na 30 minut a i s návratem systému do iniciačních podmínek nepřesáhla délka analýzy 40 minut. Za těchto experimentálních podmínek byla úspěšně analyzována alikvotní směs standardů PEN, DES a IDES (obr. 37), a proto bylo možno přistoupit k otestování této metody na malém množství vzácného reálného vzorku (aorta), jež byl k analýze poskytnut z kardiologické kliniky IKEM Praha.

Přibližně 50 mg tkáně (surového materiálu před sušením) bylo nejprve pomocí vakuové odparky SpeedVac vysušeno do konstantní hmotnosti a zpracováno analogicky jako v případě tkání kloubního kompartmentu (viz kap. 4.6.1). Po zakoncentrování, přečiřtění a SPE desorpci byla frakce obsahující všechny zmíněné síťující elementy kolagenu a elastinu pomocí zařizení SpeedVac odpařena a následně rozpuřtěna v 250 či 500 µl mobilní fáze.

Vzhledem k velmi nízkému obsahu obou vysoce specifických izomerů desmosinu v elastinu (výskyt přibližně 1 molekuly DES či IDES na 1000 molekul jiných) bylo zvoleno dávkování vzorku 25 µl. V obou případech bylo stanovení dostatečně citlivé, u všech sledovaných analytů bylo dosaženo velmi dobrého rozliření a i píky obou izomerů desmosinu byly odděleny prakticky na úroveň základní linie. Spojené chromatogramy získané simultánně z obou detektorů jsou zobrazeny na níže uvedeném obr. 38.



a)

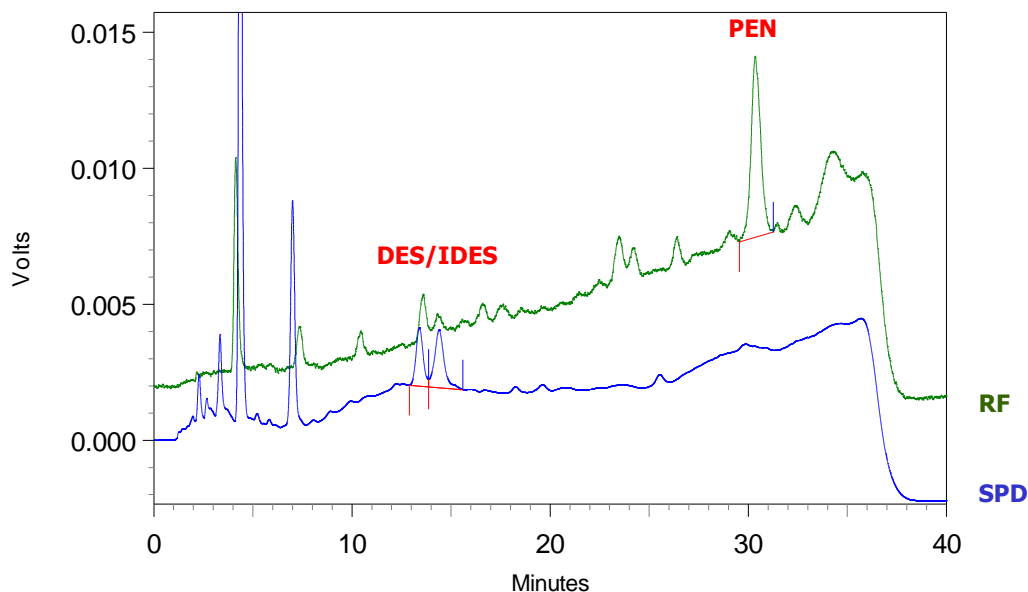


b)

Obr. 37 HPLC separace modelové směsi DES, IDES a PEN a jejich současná detekce pomocí 2 detektorů firmy Shimadzu; Mobilní fáze: 0,02 M HFBA + 0,01M (NH₄)₂SO₄, lineární gradient 5-25 % ACN za 30 min; nástřik 10 μl.

a) Izomery desmosinu: Detektor Shimadzu SPD-10A VP, UV detekce : $\lambda = 273$ nm;

b) Pentosidin: Detektor Shimadzu RF-10A XL, fluorescenční detekce: $\lambda_{exc./em.} = 335/385$ nm



Obr. 38 Ukázka reálné RP HPLC separace příčně-vazebných elementů elastinu (DES, IDES) a kolagenu (PEN) v aortální tkáni při současné detekci pomocí fluorescenčního (RF) a UV spektrofotometrického (SPD) detektoru; lineární gradient 5-25 % ACN za 30 min; F = 0,5 ml/min., t = 40 °C; nástřik 25 μ l.

Tkáň z lidské aorty získaná z kardiologického odd. IKEM Praha při operace srdce (zavádění bypassů).

5.3 Posouzení reálných možností a omezení použitých metod a jejich srovnání s jinými alternativními přístupy analýzy pojiva

V této pasáži bych rád shrnul své zkušenosti s praktickou použitelností metod analýzy uplatněných v této práci a zhodnotil jejich výhody i nedostatky. Vzhledem k požadavkům kliniků kvantitativně sledovat v průběhu času obsah patologicky vznikajících příčných vazeb akumulovaných v pojivových tkáních a k velmi nízkým koncentracím, v nichž se v komplexní analyzované matici nachází, byla pro přirozeně fluoreskující analyty (PEN, pyridinoliny) logickou volbou metoda HPLC s velmi citlivou fluorescenční detekcí. V případě desmosinů jsem však vzhledem k jejich spektrální charakteristice před fluorescenčním signálem upřednostnil detekci v UV oblasti, kde je odezva obou izomerů výrazně silnější.

Ve snaze docílit co nejlepších analytických výsledků a kvůli záměru umožnit využití jedné HPLC metody pro stanovení pentosidinu pro řadu odlišných typů biologických vzorků jsem optimalizoval jednotlivé separační podmínky

(např. z hlediska složení mobilní fáze a využití gradientu v HPLC) a zavedl oproti dříve publikovaným pracím vylepšení v rámci preanalytické fáze při zpracování vzorku^{125,126}.

Pro předběžné oddělení analytů od balastních látek bylo využito především výhod, které oproti jiným způsobům nabízí extrakce na pevné fázi. SPE představuje principiálně jednoduchou sorpčně-desorpční techniku účinného zakoncentrování analytu. Oproti jiným extrakčním technikám, např. extrakci v systému kapalina-kapalina, je její výhodou lepší selektivita, která je významným faktorem zejména u analýz komplexních biologických materiálů.

Značnou výhodou je použitelnost pro celou řadu matric (krev, moč, synoviální tekutina, extrakt z tkáně apod.) a možnost paralelního zpracování více vzorků současně. Technika SPE nabízí ve srovnání s extrakcí mezi 2 kapalinami účinnější, rychlejší a často i levnější způsob separace, navíc je zde omezena i spotřeba větších množství toxických, s vodou nemísitelných, rozpouštědel (např. halogenovaných uhlovodíků). Při vhodně zvolených podmínkách je dosaženo vysoké výtěžnosti (recovery) a dobré opakovatelnosti stanovení. Předností je také snadná komerční dostupnost sorbentů a rozpouštědel pro separaci. Pro případ selektivní rafinace hydrolyzátů tělních tekutin a tkání v menším počtu vzorků se tato technika bezpochyby osvědčila. Nezanedbatelná je také relativně nízká spotřeba rozpouštědel, a tím i cena za stanovení, možnost individuální regulace průtoku vzorků a rozpouštědel extrakční kolonou, případně možnost automatizace.

Přes nesporné přednosti má i SPE určité své nevýhody a omezení. Empirický přístup k vývoji SPE metody představuje poměrně složitý a časově náročný proces. Často je třeba řešit problém nedokonalého zadržování sledovaných látek sorbentem. Vývoj metody i sama SPE procedura probíhá v řadě na sebe navazujících kroků, které je třeba experimentálně optimalizovat, což od analytika vyžaduje dostatek času na otestování jednotlivých separačních podmínek.

Počet kroků při předseparaci pomocí SPE nese s sebou samozřejmě i potenciálně zvýšené riziko chyb. Vzhledem k tomu, že tyto kroky spojené s úpravou vzorku nejsou automatizovány, jsou tedy při SPE na analytika kladeny vysoké nároky na pečlivost zpracování jednak při přípravě a kondicionaci SPE kolonek, tak i při provádění každé z následujících laboratorních operací. Zejména u vzorků biologického původu vyžaduje tento způsob, vzhledem k možným interferencím a postupnému ucpávání pórů SPE disků pevnými suspendovanými

částicemi, po několika cyklech výměnu celulózové náplně a frit SPE kolonek. Pro SPE systémy existuje velké množství pevných sorbentů i široké spektrum promývacích a vymývacích činidel, z nichž je třeba zvolit vhodné pro daný analyt.

Separace a desorpce analytu z kolony značně závisí na polaritě, pH použitých solventů a dalších faktorech, které je třeba otestovat, aby bylo dosaženo úspěšné purifikace a prekoncentrace analytu uvolněného z původní matrice. Je-li při vývoji metody nízká výtěžnost, je třeba hledat řešení, jak eliminovat příliš silnou retenci či naopak předčasnou eluci.

Vzhledem k tomu, že vzorky, které byly aplikovány na SPE kolony, byly předtím vždy hydrolyzovány a získaný eluát bylo vhodné před nástřikem do HPLC systému dále zakoncentrovat pomocí vakuové odparky, nelze očekávat výsledky stanovení v den odběru vzorků. Dalším omezením je limitovaný počet pozic pro vzorky v manuálním extraktoru, které lze při práci uhlídat (v mém případě šlo o současné zpracovávání 12 vzorků). Některé kroky, jako je např. dávkování vzorků a promývacích solventů, je však možno v případě potřeby automatizovat. Protože nebyly k SPE používány komerčně dodávané jednorázové předplněné kolony, je třeba připočítat k době zpracování i čas potřebný na promývání a plnění kolonek novou stacionární fází. Obecně se tedy tento analytický postup nehodí pro běžné analyty, stanovované v rutinních klinicko-biochemických laboratořích. Pro zpracování menšího počtu vzorků ve výzkumné laboratoři bez potřeby okamžitého dodání výsledku však výše uvedený postup plně vyhovuje.

Mezi nejvýznamnější cíle této práce patří kromě návrhu nových analytických metod či modifikací jednotlivých separačních postupů také provedení vnitřní validace těchto nových či již dříve zaváděných metod pro stanovení příčných vazeb pojivových tkání. Tento validační proces, zjišťující vhodnost použití testovaných systémů pro získání relevantních analytických dat, nebyl dosud v našich podmínkách u HPLC analýz pojivových tkání dostatečně proveden.

Přestože této otázce nebyla dříve věnována patřičná pozornost, jsou tyto zdánlivě podružné aspekty verifikace separačních metod i postupů uplatněných v preanalytické fázi nezbytným předpokladem pro zhodnocení věrohodnosti a významu poskytovaných analytických výsledků a poskytují možnost širšího rozšíření vyvíjených či stávajících metod na další pracoviště.

Obecně lze považovat za klíčové validační parametry zejména přesnost, správnost, meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ), selektivita ($\alpha_{1,2}$), lineární dynamický rozsah (LDR) a robustnost^{109,124,134}.

Přesnost metody, vyjadřující těsnost shody po sobě následujících měření, lze kvantitativně hodnotit buď jako krátkodobou či dlouhodobou intralaboratorní opakovatelnost důležitých analytických parametrů separačního systému, tak jako tomu bylo v případě této práce. Zde šlo především o ověřování shody retenčních dat a průběžné sledování vlivu příp. fluktuací při chodu používaných zařízení (opakovatelnost dávkování, dosažení konstantního průtoku mobilní fáze, tlaku, teploty apod.).

V případech, kdy je již možno srovnat hodnoty stejných validačních parametrů mezi různými laboratořemi, lze z hlediska přesnosti metody hovořit o zjišťování reprodukovatelnosti. Tato možnost přímého srovnání výsledků, vzhledem k úzké specializaci naší laboratoře, bohužel u HPLC stanovení analytů popisovaných v této práci nebyla dosud reálná, nicméně analytické výsledky od vybraných skupin pacientů zhodnocené v rámci klinických studií, obsažených v této práci, dobře korespondují se závěry obdobných studií provedených alternativními chromatografickými či imunochemickými metodami na jiných nezávislých pracovištích v zahraničí.

Významnou vlastností u HPLC je také robustnost, představující testování odolnosti metody vůči malým změnám chromatografických podmínek, jako např. změny složení mobilní fáze, pH, průtoku, teploty, vlnové délky při detekci apod. Řada těchto drobných změn je způsobena reálnými výkyvy podmínek na pracovišti či fluktuacemi danými technickými možnostmi měřících přístrojů.

Důležitým přínosem této práce bylo zjištění, že uplatněné metody analýzy příčně-vazebných síťujících elementů kolagenu jsou s využitím několika menších otestovaných modifikací velmi dobře použitelné pro řadu typů biologických matric a koncentračních rozsahů, od tělních tekutin, přes měkké tkáně pojiva až po různé pevné vzorky biopsií z kloubního aparátu či kostní tkáně. Jak jsem prakticky ověřil, navržené postupy, na rozdíl od většiny imunochemických metod analýzy, navíc dovolují přímé srovnání výsledků a univerzální použití SPE a HPLC metod i v případě studií zaměřených kromě člověka na další *species*, což je důležité např. při sledování metabolických změn na zvířecích modelech.

Selektivitu metody zásadním způsobem ovlivňuje schopnost použitého systému odseparovat hlavní analyty od balastních látek či nežádoucích nečistot, které jsou se sledovanými látkami současně přítomny v původní matrici nebo vznikají později při zpracování vzorků (např. při hydrolytickém rozkladu, změně pH apod.).

Dalším pozitivním zjištěním, vyplývajícím z provedených stanovení je, že testované HPLC metody jsou pro sledované analyty dostatečně selektivní a nejsou významným způsobem rušeny koeluuujícími látkami či fyzikálními vlivy.

Na základě velkého množství měření provedených v rámci této práce (přes 6000 analýz) mohu konstatovat, že aplikované HPLC metody, navazující na předchozí výše popsané kroky předúpravy vzorků, jsou spolehlivé a poskytují lékařům relevantní analytické výsledky v relativně krátkém čase. Tyto závěry jsou dokumentovány v níže uvedených tab. 3-6, kde jsou shrnuty základní analytické charakteristiky použitých separačních metod.

Ověřil jsem, že zde použité HPLC metody mají i pro analýzy v biologických matricích dostatečně nízkou mez detekce (až v řádu nmol/l) a vyznačují se širokým lineárním dynamickým rozsahem. Uspokojivá je také jejich značná separační účinnost, výtěžnost (téměř 80 %) a opakovatelnost celého postupu včetně předběžného zpracování vzorků (přes 95 %).

V případě dostupnosti standardu lze proto tyto metody relativně snadno uvést do praxe i v dalších laboratořích. Navíc, je-li příslušné pracoviště vybaveno vhodným HPLC přístrojem s fluorescenčním detektorem, je taková analýza i poměrně levná (např. ve srovnání s drahými kity, založenými na různých imunochemických metodách, případně s metodami, využívajícími k detekci hmotnostní spektrometrii či nukleární magnetickou rezonanci). Další výhodou uvedeného postupu je vyhnutí se náročné derivatizaci vzorků před vlastní analýzou.

Při srovnání s rychlejšími imunochemickými testy (založenými nejčastěji na principech ELISA či při radioaktivním značení RIA) (jsou-li však pro dané analyty vůbec komerčně dostupné) jsou sice při uplatnění SPE/HPLC zapotřebí řádově 10krát větší objemy původních vzorků (obvykle ve stovkách mikrolitrů, typicky 500 μ l), nicméně chromatografické metody jsou mnohem přesnější, opakovatelnější a robustnější.

Použití kapilárních elektromigračních technik má řadu výhod. Patří mezi ně nejen vysoká separační účinnost, selektivita a rychlá „přestavitelnost“ systému na

jiný separační režim, ale i skutečnost, že kombinací existujících elektromigračních technik lze rozdělit téměř všechny typy sloučenin při minimální spotřebě elektrolytů a extrémně nízkých objemech vzorků (v řádu jednotek nl). Výhodou elektroforézy je mimojiné i krátký čas analýzy při zachování mimořádně vysoké separační účinnosti, jednoduchost a nízké náklady na stanovení.

V biochemické analýze je kapilární elektroforéza nepochybně velmi perspektivním směrem již proto, že při některých aplikacích je umožněna přímá analýza biologického materiálu. Na druhé straně je ale stále třeba řešit specifické problémy biologických matric (např. řádové rozdíly v koncentracích stanovovaných analytů, možné interference apod.). Postup od modelové separace standardních směsí ke stanovení analytů v biologickém materiálu bude vyžadovat i zde důkladnou optimalizaci podmínek nejen vlastní separace, ale také předseparačních úprav původního vzorku.

Oproti HPLC však nevykazují elektroforetické metody tak dobrou opakovatelnost ani robustnost, omezenější jsou i možnosti připojení tak širokého spektra detekčních systémů, jaké se nabízí pro HPLC. Hodí se však spíše pro účely kvalitativní analýzy. Výhodou elektroforézy je mimojiné i krátký čas analýzy při zachování mimořádně vysoké separační účinnosti, jednoduchost a nízké náklady na stanovení. Základní analytické parametry použitých HPLC systémů použitých v této práci jsou shrnuty níže v tab. 3.

Tab. 3 Vybrané analytické charakteristiky HPLC stanovení sledovaných látek:

LOD = mez detekce, LOQ = mez stanovitelnosti, n = účinnost separace (počet teoretických pater vztážený na metr separační kolony), RSD = relativní směrodatná odchylka, $\alpha_{1,2}$ = relativní retence (separační faktor), k_i = kapacitní faktor analytu.

hodnocený parametr	PEN	PD	DPD	DES	IDES
LOD (nmol/l)	1,76	10,00	10,00	570	570
LOQ (nmol/l)	5,87	33,33	33,33	1900	1900
n (teor. pater/m)	42 734	6 370	7 498	47 946	54 436
RSD opakovatelnosti plochy píku (%)	1,20	1,42	1,46	1,91	2,07
selektivita $\alpha_{1,2}$	1,34	1,26	1,26	1,07	1,07
k_i	7,50	6,68	8,08	8,00	8,59

Z výsledků HPLC měření vyplývá, že uplatněné metody jsou značně citlivé, a to i pro detekci velmi malých koncentrací, v nichž se nachází v tělních tekutinách a tkáních. Nejvyšší citlivosti bylo dosaženo samozřejmě u metod využívajících přirozené fluorescence PEN a obou pyridinolinů. V těchto případech lze detekovat uvedené analyty už v řádu jednotek nmol/l. O 2 řády je pak posunuta citlivost metody pro stanovení síťujících vazeb v elastinu (izomerů desmosinu). Ačkoli je již z principu citlivost detekce v UV spektrální oblasti nižší, pro určení obsahu DES a IDES ve vzorcích pojivové tkáně je však dostatečně senzitivní a metoda plně vyhovuje i pro jejich kvantitativní analýzu. LDR (určený jako rozsah koncentrací, v němž je citlivost detektoru konstantní, tj. odchylka od linearity $\leq 5\%$) byl shledán pro naměřené kalibrace jako dostatečně široký pro rozpětí fyziologických koncentrací analytů ve sledovaném materiálu.

V případě mé práce nešlo o rutinní postupy a metody ani rutinně stanovované analyty, a proto nebylo v našich podmínkách možno výsledky srovnávat s jinými pracovišti a hodnotit mezilaboratorní správnost a reprodukovatelnost výsledků v pravém slova smyslu. V rámci mé práce však byla zjišťována a hodnocena opakovatelnost měření alespoň v rámci naší laboratoře, a jednotlivé validační parametry byly sledovány i s několikaměsíčním odstupem.

Pokud jde o správnost měření, měl jsem možnost pouze nepřímého srovnání výsledků stanovení močového DPD pomocí HPLC s metodami imunochemickými (komerční ELISA kit Pyrilinks-D firmy Metra Biosystems Inc., San Diego, CA, USA) a z chemiluminiscenčního analyzátoru IMMULITE americké firmy DPC (Los Angeles, CA, USA). V obou případech imunochemických stanovení se však jedná o stanovení volné formy DPD v moči, zatímco HPLC hodnotí celkový obsah metabolicky odbouraného DPD (tj. včetně toho, jež je vázán na tkáň), a proto má chromatografické stanovení lepší výpovědní hodnotu. Nicméně orientačním stanovením identických vzorků moči byla nalezena poměrně dobrá korelace mezi hodnotami získanými pomocí HPLC a imunochemicky zjištěnou koncentrací DPD ($R^2 = 0,865$).

Obdobným způsobem byla na standardní směsi desmosinů testována korelace mezi kvantitou výsledků získaných pomocí HPLC a komerční sady Fastin Elastin (firmy Biocolor Ltd., N. Ireland), která je dodávána jako kvantitativní „dye-binding“ metoda založená na imunoprecipitačních metodách.

Srovnání těchto metod však opět nemůže nabídnout srovnatelné výsledky, neboť kit Fastin Elastin poskytuje pouze orientační stanovení obsahu elastinu v tkáních izomerů desmosinu specifických příčných vazeb elastinu. Přesto byla i zde sledována jistá asociace mezi oběma postupy.

Z hlediska účinnosti, jsou kolony použité pro analýzu všech analytů dostatečně efektivní, počet dosažených teoretických pater převyšující hodnotu 10 000 pater/metr je pro dané účely vyhovující.

Podstatným faktorem pro klinické analýzy je možnost poskytovat i s odstupem času dobře opakovatelné výsledky. To při verifikaci aplikované HPLC metody splnily více než dobře – relativní směrodatné odchylky při stanovení koncentrací se pohybovaly pod 5 % a ještě lepších výsledků (v řádu desetin %) bylo dosaženo při shodě retenčních časů analytů při opakovaných nástřicích.

Jako jedna ze základních charakteristik HPLC systému byl pomocí redukovaných retenčních časů a mrtvého času použitých kolon vypočítán pro jednotlivé analyty kapacitní poměr (k_i) a pro porovnání chromatografických systémů byla jako měřítko selektivity zhodnocena také relativní retence ($\alpha_{1,2}$).

Hodnoty $\alpha_{1,2}$ a k_i vypočtené pro jednotlivé analyty svědčí o dobré volbě mobilních a stacionárních fází a vhodně nastavených separačních podmínkách v chromatografickém systému.

K dostatečnému oddělení píků sledovaných analytů od většiny interferujících složek přítomných v biologické matrici významně přispěla již volba selektivních, HPLC předcházejících kroků, při zpracování vzorků. Jejich hydrolytický rozklad umožnil (při zachování integrity odolných, příčně-vazebných elementů svázaných pevnými kovalentními vazbami) rozštěpení většiny přítomných větších řetězců a molekul na drobné, nízkomolekulární fragmenty. Následná selektivní frakcionace a prekoncentrace analytů pomocí SPE, pak významným způsobem zjednodušuje konečnou interpretaci naměřených chromatogramů a identifikaci jednotlivých píků, především při použití vysoce selektivního fluorescenčního detektoru. Při separaci přirozeně fluoreskujících látek (PEN, PD, DPD) je tedy množství dalších látek, poskytujících při zvolených excitačních a emisních vlnových délkách odezvu, významně omezeno a sledované analyty lze tedy poměrně snadno identifikovat.

Kromě výše uvedené účinnosti kolon byly použité chromatografické systémy charakterizovány také pomocí relativní míry separace píků, tj. rozlišení ($R_{1,2}$). Tato veličina zde byla klíčová nejen z důvodů dokonalosti oddělení vlastních analytů od

nežádoucích koeluuujících balastních složek přítomných ve vzorku, ale zejména kvůli správnému provedení manuální integrace těsně za sebou eluuujících píků, patřících strukturně příbuzným, pyridinolinovým příčným vazbám v kolagenu a jejich analogickým fragmentům v elastinu (DES a IDES).

Při HPLC analýze PEN bylo i v reálných biologických vzorcích obvykle bez problémů dosaženo separace s rozlišením $R_{1,2} = 1,50$ či hodnotou ještě větší. Rozlišení při typické analýze pyridinolinových příčných vazeb v moči mělo hodnotu $R_{1,2} = 1,26$ (to odpovídá překrytí píků PD a DPD < 2 %), což je separace přijatelná a pro daný účel vyhovující. Při separaci izomerů desmosinu s detekcí v ultrafialové spektrální oblasti se podařilo oddělit oba píky až na úroveň základní linie a rozlišení dosáhlo ideální hodnoty $R_{1,2} = 1,50$ (překryv píků je zde již na úrovni pouhých 0,1 %).

Při stanovení PEN byla kromě výše uvedených analytických parametrů zjišťována i opakovatelnost a výtěžnost celé metody (tj. včetně předběžné úpravy vzorku). Odchyłka, vyjádřená z plochy píku jako RSD, činila 4,4 % a nalezená výtěžnost (recovery) tohoto kompletního postupu aplikovaného na standard PEN byla 77,3 %.

Tab. 4 Klíčové charakteristiky kalibračních závislostí sledovaných látek:

R^2 = kvadrát korelačního koeficientu, citlivost = směrnice kalibrační přímky, úsek = koeficient B z rovnice kalibrační přímky $y = A \cdot x + B$

parametr	PEN	PD	DPD	DES	IDES
R^2	1	0,9993	0,9989	1	0,9997
citlivost	9932,976 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}/\text{l}/\text{nmol}$)	$1,283 \cdot 10^6$ ($\mu\text{V}\cdot\text{s}/\text{ml}/\mu\text{g}$)	$1,12943 \cdot 10^6$ ($\mu\text{V}\cdot\text{s}/\text{ml}/\mu\text{g}$)	42161,189 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}/\text{ml}/\mu\text{g}$)	38826,757 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}/\text{ml}/\mu\text{g}$)
úsek na ose y (μV)	11,559	$1,15151 \cdot 10^6$	122341	-2166	-479

Tab. 5 Orientační časové nároky základních kroků analytického postupu při HPLC stanovení degradačních produktů tkání pojiva v reálném vzorku (v hodinách).

čas (h)	PEN	PD / DPD	DES / IDES
hydrolýza	16	16	16
SPE (20 vzorků)	4	2	4
sušení (SpeedVac)	6	6	6
HPLC (1 vzorek)	0,5	0,25	0,5

Limitujícím faktorem při praktickém zpracování vzorků dodaných k analýze byla zde kapacita rotační vakuové odparky SpeedVac, která má v uspořádání s daným rotorem k dispozici pouze 20 pozic pro umístění cca 5ml zkumavek s eluáty z předchozí SPE extrakce.

Tab. 6 Srovnání analytických parametrů použitých separačních metod pro stanovení příčných vazeb elastinu (u IDES):

LOD = mez detekce, LOQ = mez stanovitelnosti, n = účinnost separace (počet teoretických pater vztažený na metr separační kolony), RSD = relativní směrodatná odchylka, $R_{1,2}$ = rozlišení píků, $\alpha_{1,2}$ = relativní retence (separační faktor).

parametr	HPLC	CE
LOD (nmol/l)	570	17 603
LOQ (nmol/l)	1900	58 677
n (teor. pater/m)	54 436	74 166
doba analýzy (min)	30	15
opakovatelnost retenčních dat RSD (%)	0,14	4,49
dávkové množství vzorku (μ l)	10 - 25	$5,5 \cdot 10^{-3}$
$R_{1,2}$	1,50	1,80
$\alpha_{1,2}$	1,07	1,04

Na příkladu stanovení degradačních produktů elastinu s využitím detekce v UV oblasti spektra je možno porovnáním klíčových analytických parametrů demonstrovat rozdílnost chromatografického a elektroforetického přístupu při

typické analýze modelové směsi izomerů desmosinů. Zatímco elektroforéza pracuje s množstvím vzorku řádově 1000krát menším než v případě HPLC (viz tab. 6) a dosahuje v kratším čase vyšší účinnosti, předností HPLC je nejen významně vyšší citlivost detekce (více než 30krát), ale také lepší opakovatelnost retenčních parametrů.

Pro praktickou semirutinní kvantitativní analýzu katabolických produktů, odbourávaných z pojivových tkání, je tedy vhodnější alternativou stanovení příčných vazeb pojiva pomocí HPLC. Tento způsob se navíc jeví jako univerzálnější, neboť v dostupném instrumentálním zázemí nabízí oproti CE technikám také možnost zapojit za kolonu více detektorů a simultánně analyzovat i další komponenty obdobného charakteru, které se liší spektrálními vlastnostmi.

Této skutečnosti bylo prakticky využito např. při testování metody současného stanovení síťujících elementů kolagenu a elastinu (PEN, DES a IDES) ve vzorcích lidské aorty, jak je ilustrováno na obr. 38.

B) KLINICKÉ ASPEKTY

Vzhledem k interdisciplinárnímu charakteru předkládané práce bych v této kapitole rád zdůraznil, jak velký význam má pro volbu vhodného analytického přístupu a správné zhodnocení a interpretaci praktických výsledků v medicíně komunikace mezi analytikem a lékařem na patřičné odborné úrovni.

Kromě toho je v případě lékařských oborů třeba brát v úvahu i otázky etické. Výzkum v této oblasti je ve většině případů vázán na tzv. informovaný souhlas pacienta, jež je nezbytným předpokladem pro schválení klinických studií etickou komisí. Jeho podpisem pacient vyjadřuje, že byl poučen o důvodech, proč se takové studie konají, jaké jsou její hlavní cíle a způsob jejich naplnění, jak budou minimalizována případná rizika a jaký přínos lze realizací studie očekávat. Již zde, na tvorbě tohoto dokumentu individuálně připravovaného pro jednotlivé výzkumné úkoly, by se měl spolu s kliniky spolupodílet i ten, kdo bude analýzy nerutinní povahy provádět.

Zejména je třeba předem na základně dostupných informací pečlivě rozhodnout o typu, množství a formě odebraného biologického materiálu, který poskytne nejlépe relevantní odpovědi na vytyčené otázky. I analytik by měl tedy mít k dispozici alespoň základní údaje o etiopatogenezi sledovaných onemocnění. Měl

by vědět, zda jde o patologické změny systémové, které lze registrovat v krevním oběhu, nebo se u sledovaných látek jedná o metabolity přecházející do moči, či zda se projeví jen lokálně, např. akumulací v konkrétních tkáních a je-li možné je detekovat např. ve výpotku. Důležité je mít alespoň rámcovou představu o chemických vlastnostech analytu a koncentracích, v jakých se analyt v jednotlivých maticích nachází. Výhodou jsou informace o tom, podléhá-li sledovaná látka či matrice působením času či fyzikálně-chemických vlivů nějakým změnám, nebo zda jde o stabilní produkt biochemických reakcí probíhajících *in vivo*.

Živý organismus se na rozdíl od standardních látek chová jako dynamický biochemický systém, ovšem velmi variabilní, který často reaguje na vnější či vnitřní podněty velmi citlivě. Právě toho využívá laboratorní diagnostika. Je však třeba eliminovat rizika falešně pozitivních či negativních výsledků. Často rozhoduje i doba odběru, výsledky může ovlivnit složení předchozí stravy, medikace či přítomnost jiných současně probíhajících onemocnění.

Aby se vzácný biologický materiál neodebíral zbytečně, měl by mít analytik odhad, jaké množství odebraného materiálu bude pro předpokládanou analýzu skutečně potřeba, aby bylo možno s dostatečnou citlivostí kvantitativně stanovit obsah sledovaných látek v matici, jakým způsobem se vzorkem manipulovat a jak jej skladovat, aby do doby analýzy nedoznal podstatných změn analytických vlastností, jež budou měřeny. V zájmu pacienta je samozřejmě provést odběr co nejmenšího množství vzorku a v případě opakovaných odběrů je dobré se orientovat v kinetice patologických procesů, aby další odběr byl načasován správně, tak aby se změny v koncentracích biomarkerů mohly v daném čase dostatečně projevit. V neposlední řadě hraje významnou roli také počet pacientů ve sledovaných skupinách, aby bylo možno získaná analytická data s dostatečnou přesností statisticky zhodnotit a klinicky využít.

V případě analýzy degradačních produktů kolagenu a elastinu není příliš významný problém se stabilitou příčně-vazebných elementů. Důležitější je spíše, jakým způsobem tyto analyty z matrice komplexního složení uvolnit. Kritickým faktorem jsou také velmi nízké koncentrace v nichž se v pojivových tkáních či tělních tekutinách nachází. Vzhledem ke značné pevnosti kovalentních vazeb, tvořících základ cyklické struktury PEN, pyridinolinů i desmosinů, nabízí analytika v tomto případě možnost hydrolytického rozkladu vzorku, kdy se většina okolní matrice rozpadne na menší fragmenty. Hydrolýze odolné analyty je třeba následně co

nejlépe oddělit od balastních komponent, zejména hydrochloridů aminokyselin. Vzhledem k relativní molekulové hmotnosti analytů, pohybující se v řádu 10^2 , by bylo možné vzniklé nízkomolekulární látky v hydrolyzátu od nich odseparovat například dialýzou.

Mnohem efektivnější způsob přečištění a prekoncentrace analytů však představuje selektivní frakcionace pomocí SPE a následné vakuové odpaření odpaření eluátu do sucha ve SpeedVacu. Pro vlastní HPLC separaci je pak třeba na základě chemické povahy analytů optimalizovat složení mobilních a stacionárních fází a ostatní parametry separačního systému a podle spektrální charakteristiky zvolit nejlepší způsob detekce. V případě kolagenních příčných vazeb je velkou výhodou jejich významná přirozená fluorescence, u desmosinů se na základě proměření jejich spekter jako vhodnější ukázala detekce v UV spektrální oblasti.

Klinické aspekty stanovení pentosidinu

Tvorba PEN v organismu je tak jako u ostatních AGEs sledem řady biochemických reakcí. Tyto procesy jsou vždy závislé na experimentálních podmínkách, za nichž syntéza těchto látek probíhá. Vzhledem k tomu, že organismus si sám snaží udržovat stálost vnitřního prostředí (homeostázu) a tedy i veličiny jako je teplota, tlak, pH, jeví se při vzniku glykoxidačních produktů *in vivo* tyto parametry při správné regulaci organismem pro vznik PEN jako nepřilíš podstatné. Naopak, ze zbývajících proměnných v chemické reakci se jako klíčové faktory, jež mají zásadní vliv na množství produkovaných látek typu AGEs, jeví především množství reaktantů (glukózy a dalších sacharidů, aminokyselin, bílkovin, volných kyslíkových radikálů), vstupujících do kaskády glykačních a oxidačních reakcí, a dlouhý reakční čas (u tkání s dlouhým biologickým poločasem).

U jedinců s nálezy glykémie v normě dochází vzhledem k relativně nízkým koncentracím glukózy jen k velmi pomalé akumulaci AGEs. Přestože neenzymatické glykoxidační reakce nejsou přímou příčinou stárnutí, dlouhodobá akumulace takto modifikovaných bílkovin v organismu může vyvolávat řadu komplikací přisuzovaných stárnutí. U pacientů s hyperglykemií probíhají tyto reakce mnohem rychleji a stanovení AGE produktů Maillardovy reakce má velký klinický význam. Hladiny těchto látek jsou též zvýšeny v tkáních a tělních tekutinách pacientů s pokročilou renální insuficiencí, především v konečném stádiu.

Tato část práce si klade za cíl ilustrovat na základě provedených analýz skutečného biologického materiálu, získaného od pacientů v průběhu vybraných klinických studií, potřebu komunikace mezi lékařem a analytikem, aby bylo v co největší míře eliminováno riziko zkreslení analytických výsledků či jejich interpretace. Dalším účelem této pasáže je demonstrovat širokou použitelnost a robustnost navržených a optimalizovaných separačních metod pro praktické využití spolehlivých analytických informací lékaři.

Významná je především značná univerzalita HPLC metod aplikovaných na různé typy vzorků bez nutnosti provádět větší změny v chromatografickém systému, což je vhodné pro zachování dobré opakovatelnosti a přesnosti měření i po delším časovém intervalu. Tyto vlastnosti patří u klinických analýz mezi jedny z nejdůležitějších, neboť při sledování větších souborů pacientů, při dlouhodobém sledování téhož pacienta s progredujícím onemocněním či při nasazení terapie potřebují lékaři spolehlivé kvantitativní údaje, které budou mezi sebou či s referenčními daty vzájemně srovnatelné.

Robustní analytický systém navíc umožňuje získat požadované analytické výstupy v kratším čase, než při častém přestavování podmínek, které by vyžadovalo další hodiny potřebné do navrácení se opět do ustáleného stavu.

Vzhledem k tomu, že biologický systém v řadě patologických případů či naopak při léčbě poskytuje rychlou metabolickou odezvu, hraje kinetika těchto procesů velkou roli. Každý vzorek poskytnutý pacientem je svým způsobem unikátní a není prakticky možno zajistit vzorek o téže složení kdykoli později. Pro případné ověřování nebo pozdější plánované srovnávání výsledků je tedy kritickým krokem již způsob odběru a přechovávání vzorků, aby nedocházelo v průběhu času k jejich dezintegraci, přeměně metabolitů na jiné produkty nebo jiným změnám, jež by mohly ovlivnit sledované analytické vlastnosti.

Významnou roli při interpretaci experimentálních dat hraje posouzení odlehlosti výsledků od ostatních jedinců v téže skupině pacientů a posouzení, zda mohou být naměřené koncentrace analytů ovlivněny dalšími faktory, jako je např. věk, pohlaví, délka trvání choroby, předchozí medikace, anebo další, současně probíhající, patobiochemické děje.

Proto je před vlastním statistickým zpracováním dat potřeba kriticky uvážit, zda je třeba některé pacienty ze souboru vyloučit. Často je z hlediska objektivity závěrů nezbytné získané výsledky korigovat přepočtem na určité další parametry,

kteře mají u jedinců či vzorků větší variabilitu (např. obsah sušiny ve vzorku, kreatininová „clearance“ v moči využívaná pro posouzení funkce ledvin apod.).

Klinické aspekty stanovení pyridinolinů

PD i DPD se při metabolismu pojiya postupně uvolňují buď jako volné (cca 40 %) nebo peptidicky vázané (60 %) ¹⁷ do krevního řečiště a akumulují se v moči, kde stanovení jejich koncentrace slouží jako specifický a citlivý indikátor kinetiky resorpce kolagenu. Vzhledem k diurinálnímu kolísání koncentrací pyridinolinových kroslinků a pro zvýšení přesnosti stanovení bylo k analýze použito vždy první ranní moči. Hodnoty z ranního odběru bývají totiž nejvyšší, oproti 24-hodinovému sběru v průměru přibližně o jednu třetinu, a proto se tím zvyšuje též přesnost stanovení obou kroslinků.

Existují též menší sezónní variace se vzestupem v zimních měsících (zejména u žen). Tak jako u všech biochemických parametrů kostního metabolismu je třeba brát při hodnocení výsledků v úvahu četné vlivy jako např. pohlaví a věk pacienta, tělesnou hmotnost a pohybovou aktivitu, či vliv lékových přípravků. I přes možné výkyvy, dané některými z těchto četných vlivů, patří dosud močové koncentrace PD a DPD vztažené na kreatinin v moči mezi nejlepší biochemické ukazatele degradace kostní tkáně. Obecně lze pozorovat, že jejich vylučování u sledovaných klinických stavů kostního metabolismu je zde oproti jiným vlivům mnohem významnější, např. u postmenopauzálních žen s osteoporózou jde o nárůst v řádu 50 - 100 % ¹³⁵.

Výhodou stanovení pyridinolinů oproti některým jiným markerům kostního metabolismu (např. kolagenním telopeptidům a propeptidům typu CTX, NTX, PICP apod.) však je, že zde nedochází k zásadnímu ovlivnění hladin dietou (gastrointestinálním traktem jsou absorbovány jen minimálně). HPLC stanovení PD a DPD je z těchto důvodů výhodnější také oproti dříve používanému stanovení močové exkrece hydroxyprolinu, neboť je specifitější a koncentrace pyridinolinů nejsou ovlivněny kolagenem potravy a jejich stanovení není nutné provádět po standardní dietě ^{135,136}.

Ačkoli lze dnes již ke stanovení pyridinolinových příčných vazeb v určitých maticích možno využít i imunoanalytické metody (diagnostické kity určené pro stanovení pomocí metody ELISA či na imunoanalyzátoru IMMULITE), HPLC je oproti jiným (i přes větší časovou náročnost danou nezbytnou úpravou vzorku) metodou velmi přesnou, opakovatelnou a spolehlivou metodou určení obsahu těchto

kolagenních kroslinků. Její použití pro vzorky močí je po korekci na obsah močového kreatininu univerzální pro různé typy pacientů a dokáže citlivě registrovat změny v kinetice odbourávání kolagenu při různých chorobných stavech.

Pokud jde o často diskutovanou specifitu těchto stanovení pro rozpad kostní tkáně (s převažujícím kolagenem typu I), resp. vliv degradačních procesů, probíhajících v ostatních kolagenních tkáních – hlavně v chrupavce, např. u osteoartrózy či revmatoidní artritidy, jsou tyto hladiny PD jistě ovlivněny i katabolismem chrupavkového kolagenu typu II. Ovšem je třeba si uvědomit, že množství chrupavkové tkáně je oproti kostní řádově nižší (u lidí tvoří v organismu jen kolem 5 %), a proto vliv na močové koncentrace pyridinolinů není zásadní a významné změny v jejich hladinách lze přičíst především odbourávání majoritního, tj. kostního kolagenu typu I.

Při vzájemném porovnání obou příčně-vazebných elementů, se ukazuje, že PD je méně tkáňově specifický než DPD, neboť jej lze nalézt v různém zastoupení v téměř všech kolagenních strukturách. DPD se v chrupavce prakticky nevyskytuje, je však koncentrován v kostech a v zubním dentinu. Vzhledem k významné převaze kostní hmoty nad ostatním kolagenním pojivem je proto DPD považován za vhodný marker dobře odrážející kinetiku osteoresorpce¹³⁷.

Analýza pyridinolinových příčných vazeb byla intenzivně sledována zejména jako citlivý ukazatel kinetiky resorpce dominantního kostního kolagenu typu I u pacientů s osteoporózou (nejčastěji postmenopauzální či glukokortikoidy indukovanou), často nazývanou poměrně výstižně jako „řidnutí kostí“. Zde má v laboratorní diagnostice stanovení PD a DPD opravdu nezastupitelné místo a dobře ilustruje u takto postižených pacientů, jak významný vliv má síťování pomocí vazeb jako jsou PD a DPD na změny fyzikálně chemických vlastností kolagenu^{83,84,138}. V důsledku jeho zesítnění se stávají tyto kolagenní struktury křehčí, dochází k akceleraci odbourávání kostní trámčiny, a to se makroskopicky projevuje větší náchylností k mechanickému poškození a zvýšením rizika fraktur kostí i při nízké mechanické zátěži.

K značným abnormalitám kostního obratu však může docházet i dětských pacientů a dospívajících s dědičnými vadami pohybového aparátu. Močové hladiny PD a DPD patří proto mezi velmi významné ukazatele metabolických poruch růstu kostní, chrupavčité a vazivové tkáně. Jejich zvýšené vylučování do moči dobře koresponduje se zvýšenou osteoresorpcí. Dobře patrné to je například u kostních

dysplazií⁸⁵. Protože kostní kolagen je v těle dominantní a představuje přibližně 50 % veškerého kolagenu v organismu, změny v chrupavkách ovlivňují vylučované množství PD a DPD mnohem méně než tkáň kostní¹⁹.

Později bylo kvantitativní sledování těchto příčných vazeb pomocí HPLC metody úspěšně uplatněno i jako jeden z významných parametrů hodnotící odezvu pacientů na léčbu artritických onemocnění, zejména u zánětlivých forem. Ačkoli zde již nejde z výše uvedených důvodů o rozdíly tak vysoké jako u kostních defektů, citlivost HPLC s fluorescenční detekcí umožňuje zaznamenat statisticky významné rozdíly močové exkrece pyridinolinů již po několikátýdenním podávání přípravků pro kloubní výživu (artroneutraceutiky), o čemž jsem se přesvědčil např. při měření těchto markerů u OA pacientů ve studii testující účinnost preparátů Geladrink české firmy Orling, s.r.o. z Ústí nad Orlicí^{35,87}.

Nově jsme pomocí naší HPLC metody potvrdili také souvislosti mezi hladinami obou kolagenních kroslinků u onemocnění kůže (sklerodermie a lupénky), což je předmětem dlouhodobé studie, jejíž výsledky jsou shrnuty v příloze č. 8.

5.4 Příklady uplatnění původních výsledků HPLC analýz v klinické praxi

5.4.1 Výsledky stanovení PEN u diabetických pacientů a experimentálních zvířat

V rámci řešení mého grantu IGA MZ ČR, reg. NR/7895-3 (řešitel: Mgr. Martin Braun; odborní spolupracovníci: Prof. MUDr. Milan Adam, DrSc., Prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc.: Stanovení pentosidinu v etiopatogenezi revmatických a diabetických onemocnění a ovlivnění jeho hladiny podáváním vitamínu C při glykační a oxidační zátěži organismu.) byla pozornost věnována HPLC stanovení PEN nejen u pacientů revmatických, ale i u diabetiků a experimentálních skupin laboratorních myší. PEN byl stanovován v séru a moči jednak pacientů s diabetem 1. typu (DM1), představující spíše juvenilní formu onemocnění, tak se senilní formou 2. typu (DM2). Cukrovka úzce souvisí s problematikou tvorby AGEs, neboť představuje závažnou poruchu látkové přeměny vyznačující se zvýšenou hladinou glukózy v důsledku absolutního či relativního nedostatku inzulínu, který zodpovídá za odsun glukózy z krevní plazmy do tkání. Při DM1 se inzulín tvoří autoimunitním zánětem, DM2 způsobuje rezistence tělesných tkání na inzulín, což často vede k závažným komplikacím cévním, nervovým, očním nebo ledvinovým poruchám.

V rámci tohoto grantu byl z hlediska statistické významnosti nalezen nejmarkantnější signifikantní rozdíl ($p < 0,001$) při porovnání sérové hladiny PEN korigované na obsah celkové bílkoviny v séru (S-PEN/CB) mezi skupinami diabetiků 1. typu (1,02 nmol/g) a 2. typu (1,88 nmol/g). Porovnání hodnot PEN v séru (S-PEN) či v moči po korekci na močový kreatinin (U-PEN/creat.) u pacientů je názorně ukázáno v následujících tabulkách 7 a 8.

Tab. 7 Porovnání hladin PEN v séru a moči diabetiků

Charakteristika souboru	S-PEN (nmol/l)	S-PEN/CB (nmol/g)	U-PEN (nmol/l)	U-PEN/creat. (nmol/mmol)
DM 1 (věk 44,59±12,67)	76,07±16,41	1,02±0,25	21,75±18,76	1,92±0,81
DM 2 (věk 62,39±7,41)	97,29±44,90	1,84±1,09	27,46±16,89	2,15±1,14
Kontroly (věk 55,11±6,79)	67,22±12,67	0,98±0,18	20,98±15,35	1,72±0,78

Tab. 8 Porovnání hladin PEN v moči u dětských pacientů s DM

Charakteristika souboru	U-PEN (nmol/l)	U-PEN/creat. (nmol/mmol)
DM (věk 18,89±2,22)	18,00±11,31	1,95±0,83
Kontroly (věk 13,50±2,43)	7,28±3,89	1,22±0,16

Oproti kontrolním hodnotám je významně zvýšen PEN pouze u skupiny s DM 2. Akumulace AGE v organismu a expozice oxidačnímu a karbonylovému stresu spolu s glykací hraje významnou roli při rozvoji komplikací diabetu. Ty jsou patrné zejména u starších pacientů s DM2, u nichž byl zaznamenán významný nárůst PEN oproti pacientům s DM1 a zdravým kontrolám.

Experiment *in vivo* - zvířecí model osteoartrózy

Dle schváleného projektu pokusů probíhal v rámci výše uvedeného grantu experiment *in vivo* na inbredních laboratorních myších kmene Black mice (samice

C57Bl/6) s dispozicí ke spontánně se rozvíjející OA. Pokus byl navržen následovně: kromě skupiny kontrolní, čítající 10 laboratorních zvířat (stáří 1 měsíc), byly vytvořeny 3 skupiny myší. První skupině (n = 20) byla podávána standardní dieta. U těchto jedinců byl v průběhu pokusu očekáván nejmarkantnější spontánní rozvoj osteoartrotického procesu.

U 2. skupiny (n = 20), které byl v pití podáván rozpuštěný vitamin C (150 mg/l), byl očekáván pozitivní antioxidační účinek kyseliny askorbové na inhibici poslední fáze Maillardovy reakce zodpovědné za produkci PEN a ostatních AGEs. Antioxidační efekt vitaminu C by tak dle hypotézy mohl chránit strukturu chrupavky před působením škodlivých volných radikálů. Kromě antioxidačních a řady dalších pozitivních vlastností vitaminu C je často přidáván do nutraceutických přípravků právě pro jeho podporu syntézy kolagenu, elastinu, proteoglykanů a kostní hmoty.

3. experimentální skupině myší (n = 10) byl do stravy přidáván Boswellin. Toto aditivum je čistým rostlinným extraktem s vysokým obsahem boswellových kyselin, které inhibují prozánětlivé enzymy, zabraňují odbourávání pojivových tkání, potlačují jejich proliferaci při zánětu a zvyšují pohyblivost kloubů. Proto i zde předpokládáme tlumení spontánních artrotických procesů a sníženou hladinu PEN oproti první skupině se standardní dietou.

Očekávaným přínosem tohoto pokusu bylo přispět k objasnění mechanismu tvorby pentosidinu *in vivo* při progresi OA, porovnání akumulace PEN v séru a jednotlivých tkáních laboratorních myší a zjištění vlivu působení vitaminu C jako představitel antioxidačních či Boswellinu na inhibici konečného nevratného oxidačního kroku Maillardovy reakce, při níž vzniká PEN, resp. ostatní AGEs.

Na Revmatologickém ústavu byl v séru a extraktech z tkání stanoven PEN (tab. 10) a obsah sušiny ve vzorku (tab. 9). Ve firmě AnLab Praha, s.r.o. byl zpracován odebraný kloubní materiál (preparace tkání, dekalifikace, hematoxilin-eosinové barvení a příprava mikroskopických řezů) a proveden histologický rozbor řezů.

Ve skupině zdravých myší ve stáří 1 měsíc (u nichž nebyl ponechán čas na akumulaci PEN), byly odebrané tkáně extrahovány a sušeny pro zjištění podílu sušiny ve vzorcích (kloubní materiál 48,7 %; srdce 25,5 %; játra 33,1 %; ledviny 28,3 %; slezina 23,8 %). Následně byly podrobeny kyselé hydrolyze a zpracovány analogicky jako tělní tekutiny u lidí. Koncentrace PEN naměřené HPLC u takto mladých myší byly pod detekčním limitem metody. U druhé části kloubního materiálu kontrolní skupiny myší C57BL/6 byl proveden histologický

a rentgenový rozbor kolenních a kyčelních kloubů. Nález artrotických procesů u této kontrolní skupiny zvířat byl dle předpokladu negativní.

V rámci zvířecího modelu OA u laboratorních myší i u pacientů byla zjišťována hladina PEN v tělních tekutinách a tkáních. Nejmarkantnější rozdíly oproti kontrolním vzorkům byly zjištěny u diabetu typu 2 a revmatoidní artritidy. Zatímco se Boswellin osvědčil jako účinný preparát, zabraňující akumulaci PEN v pojivových tkáních, v případě vitamínu C hypotéza o inhibici glykoxidačních reakcí, vedoucích ke vzniku PEN v organismu, nebyla potvrzena.

Tab. 9 Procentuální zastoupení sušiny v extrahovaných tkáních sledovaných myší C57BL/6

Skupina	koleno	kyčel	játra	ledviny	plíce	srdce	slezina
Skupina 1 (Boswellin)	44,92	45,64	30,86	20,63	20,73	23,22	20,27
Skupina 2 (Vitamin C)	50,07	43,39	29,95	24,26	23,25	25,74	20,28
Skupina 3 (bez medikace)	47,55	45,11	29,52	20,15	17,88	24,29	23,23

Tab. 10 Absolutní koncentrace PEN (nmol/l) v séru a v extrahovaných tkáních sledovaných myší C57BL/6

Skupina	koleno	kyčel	játra	ledviny	plíce	srdce	slezina	sérum
Skupina 1 (Boswellin)	1,68	2,52	2,41	2,61	2,69	3,11	3,56	9,49
Skupina 2 (Vitamin C)	6,16	4,50	6,44	3,97	10,07	4,78	4,07	16,48
Skupina 3 (bez medikace)	2,98	2,68	3,55	2,85	3,24	2,89	3,65	12,97

Zatímco Boswellin se osvědčil jako účinný preparát, zabraňující akumulaci PEN v pojivových tkáních, v případě vitamínu C hypotéza o inhibici glykoxidačních reakcí, vedoucích ke vzniku PEN v organismu, nebyla potvrzena.

V extraktech z některých tělních tkání laboratorních zvířat se již koncentrace PEN pohybovaly na samé hranici stanovitelnosti, proto je třeba brát tato data jen jako orientační, nicméně sérové hladiny již výpovědní hodnotu mají a potvrzují i trendy zaznamenané v tkáních laboratorních myší.

Závěrem lze shrnout, že v rámci tohoto grantu potvrdilo HPLC stanovení pentosidinu účast zánětu, glykoxidace a věku na akumulaci konečných produktů pokročilé glykace v tělních tekutinách a tkáních při diabetu a u zvířecího modelu artrózy. Vliv vitamínu C na inhibici vzniku PEN *in vivo* nebyl prokázán.

5.4.2 Publikované výsledky vybraných klinických prací

V kapitole 9 jsou shrnuty závěry vybraných klinických studií ve formě publikovaných prací, v nichž jsem pro získání výsledků přímo využil analytických metod, popsanych v této dizertační práci. Studie zaměřené na revmatická onemocnění pojiva jsou uvedeny v přílohách č. 1, 2, 3, 5, 7 a 8. Přílohy č. 4 a 6 dokumentují uplatnění mých původních analytických výsledků u dalších typů metabolických poruch.

6. ZÁVĚR

Předkládaná práce vznikla primárně z potřeb mezioborové spolupráce mezi lékaři Revmatologického ústavu v Praze a Experimentální laboratoří pro výzkum pojiva v rámci řešení řady výzkumných úkolů vyžadujícími spolehlivá a citlivá analytická stanovení vybraných klinicky významných látek. Vzhledem k nerutinnímu výzkumnému zaměření a úzké specializaci této laboratoře i celorepublikovému spádu pacientů našeho ústavu patří metody vyvíjené a aplikované na našem pracovišti v českých podmínkách mezi unikátní a u získaných výsledků nebylo tedy možné přímé mezilaboratorní srovnání. Kvůli této skutečnosti zajišťovala naše laboratoř požadované speciální analytické výsledky i pro ostatní ústavy, výzkumné týmy a zdravotnická zařízení v České republice jako součást externí vědecké spolupráce. Proto byla značná pozornost cíleně věnována i interní kalibraci, verifikaci a kontrole stálosti hodnocených klíčových analytických parametrů. Kromě uvedené laboratoře byla z důvodů instrumentálních možností řada měření realizována také na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty UK v Praze. Stanovené cíle dizertační práce, popsané v kapitole 2, byly splněny.

Z důvodu nutnosti poznání současného stavu znalostí v oboru analýzy pojivových tkání a navržení nových vylepšených řešení a metodických přístupů byla nejprve provedena podrobná literární rešerše. Vzhledem ke správné interpretaci experimentálních dat, předávaných klinikům pro jejich účely, bylo třeba prostudovat práce nejen z oblasti chemické analýzy, ale i základního klinického výzkumu. Proto jsem v úvodní části této dizertační práce shrnul chemicko-fyzikální a biochemické charakteristiky kolagenu a elastinu (základních strukturních jednotek pojivových tkání) a sledovaných analytů, jež tvoří příčné vazby, síťující tyto proteiny. Dále jsem se zde věnoval principům a možnostem jednotlivých analytických separačních metod, využitelných pro stanovení vybraných analytů (PEN, PD, DPD, DES, IDES).

K získání výsledků, na nichž je tato práce založena, jsem použil jak vysokoúčinných metod kapalinové chromatografie (RP-HPLC, IEC), tak kapilární elektroforézy (v módu CZE a MEKC). Experimentální část obsahuje přehled nezbytných chemikálií a instrumentace, popisuje jednotlivé kroky předběžné úpravy různých typů vzorků včetně preanalytické fáze. Dále popisuje přípravu roztoků, mobilních fází a konkrétní experimentální podmínky použitých vysokoúčinných separačních metod. Popsáno je zde i statistické zpracování naměřených dat.

Výsledková část zahrnuje analytické a klinické aspekty stanovení sledovaných příčně-vazebných elementů pojivových tkání. Jde především o volbu vhodných podmínek při extrakci na pevné fázi a optimalizaci separace chromatografických a elektroforetických metod, jejich kalibraci a výsledky získané zjišťováním základních validačních parametrů. Tato partie je doplněna i ukázkami stanovení sledovaných látek u reálných vzorků pacientů. Diskutováno je i metabolické pozadí, které se podílí na zvýšení koncentrací analyzovaných biomarkerů u různých patobiochemických stavů.

Práci uzavírá přehled použité literatury a seznam publikovaných výsledků autora. V přílohách jsou obsaženy vybrané publikace, na nichž se autor svými analytickými výsledky spolupodílel a na které se v textu odkazuje.

Hlavním přínosem této práce je kromě zde dokumentovaných aplikovaných dopadů pro oblast klinického výzkumu zejména provedení důkladné charakterizace použitých separačních systémů pomocí v chromatografii standardně užívaných analytických parametrů. Ty mohou mít velký význam i pro další analytická pracoviště, protože nabízí možnost přímého srovnání různých metod a přístupů a jejich nově navržených modifikací. Důležitým výstupem mé experimentální práce je také hodnocení a porovnání přesnosti, citlivosti, robustnosti a použitelnosti separačních metod na různé typy reálných biologických vzorků. Tato verifikace, popis výtěžnosti a opakovatelnosti byla provedena i u řady kroků uplatněných při zpracování vzorků předcházejících HPLC stanovení.

Významným přínosem analytickým, ale i klinickým je vypracování a ověření nových HPLC a CE metod pro separaci izomerů degradačních produktů elastinu (DES, IDES). Nově navržené metody, založené na systémech kapilární elektroforézy (CZE, MEKC) pro separace DES a IDES izomerů byly optimalizovány a úspěšně testovány na standardech. Z CE systémů bylo lepších výsledků dosaženo pomocí MEKC. Experimentálně však bylo zjištěno, že pro praktické využití kvantitativního zjišťování obsahu DES a IDES poskytuje lepší výsledky RP HPLC. Především je však výhodná pro svoji univerzálnost, umožňující aplikovat a optimalizovat HPLC pro současné stanovení příčných vazeb elastinu i kolagenu, a to v rámci společného předchozího zpracování hydrolyzátů tkáně pojiva a HPLC analýzy při simultánním použití UV spektrofotometrického a fluorescenčního detektoru. Po optimalizaci na standardech jsem tuto metodu úspěšně ověřil i na reálných vzorcích lidské aortální tkáně. Tato skutečnost je významným přínosem zejména pro klinické sledování

mechanických vlastností elastických tkání pojiva, např. při studiu vlivu určitých rizikových metabolických stavů (kalcifikace tkání a stárnutí), na tuhost a stupeň zesílení aorty či jiných měkkých orgánů.

Univerzálnost použití těchto metod v nejrůznějších typech bioptického vzorku značně rozšířila potenciál základního výzkumu v medicíně. Například v revmatologii nabídla možnost objektivního sledování klinicky významných látek, účastnících se metabolismu kosti, chrupavky či synoviální tkáně. Mnou navržené a modifikované analytické postupy a separační metody jsem při zpracovávání této práce průběžně testoval a při celkovém počtu více než 6 000 provedených analýz ověřil v praxi jejich použitelnost při kvantitativní HPLC analýze na vzorcích několika tisíců pacientů. Tyto metody umožnily lékařům zajištění opakovatelného a citlivého kvantitativního stanovení požadovaných biomarkerů u velkého množství vzorků tělních tekutin a tkání u dlouhodobě sledovaných souborů pacientů, a to v přijatelně krátké době. Zároveň se mně vylepšením dříve používaných postupů podařilo minimalizovat nezbytné množství obtížně dostupného biologického materiálu a snížit časové nároky. Na základě provedené vnitřní validace těchto HPLC metod byla zjištěna vysoká citlivost, opakovatelnost a také jejich vysoká robustnost. Proto již lze tyto metody využívat v semirutinní laboratorní diagnostice a tato stanovení představují významné rozšíření panelu základních biochemických vyšetření o tyto speciální ukazatele, které mohou být přínosem při zpřesnění laboratorní diagnostiky závažných patologických stavů. V určitých případech mohou hrát i roli prediktivních biomarkerů řady onemocnění, postihující tkáň pojiva, a při rozpoznání aktivity patobiochemických mechanismů tak přispět k včasné a efektivní léčbě pacientů.

Korelace či asociace analytických výsledků s klinickými nálezy v dobře definovaných a dlouhodobě sledovaných souborech pacientů přineslo i řadu nových otázek, které se staly předmětem řešení dalších výzkumných projektů a grantů.

Vypracované a analyticky charakterizované laboratorní postupy a zvolené experimentální přístupy, popsané v této práci, mají obecně širší význam a představují velký potenciál zejména pro možnost zpracování řady typů biologického materiálu i velkého množství vzorků v relativně krátké době. Zde popsané analytické postupy a jejich aplikace na reálné vzorky pacientů s možností spolehlivého kvantitativního vyhodnocení stanovovaných biomarkerů mají tedy svůj význam a opodstatnění v rámci speciální laboratorní diagnostiky a dosažené výsledky již našly uplatnění v klinické praxi.

PROHLÁŠENÍ SPOLUAUTORŮ

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Carola R., Harley J.P., Noback C.R. Human Anatomy & Physiology, 2nd edition; McGraw-Hill, Inc., USA 1992.
2. Koolman J., Roehm K.H.: Color Atlas of Biochemistry, 2nd edition; Thieme, Stuttgart 2005.
3. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Základy buněčné biologie (český překlad, vydání, editor českého překladu); Espero Publishing, 2.vyd., Ústí nad Labem 2005.
4. Postlethwait J.H., Hopson J.L., Veres R.C. Biology! Bringing Science To Life, McGraw-Hill, USA 1991.
5. Glensk W., Neu S.: Enzymy. Stavební kameny života: Jak působí pomáhají a léčí.; Heyne Verlag, Mnichov, Německo, 1990.
6. Voet D., Voetová J.G.: Biochemie, Victoria Publishing, Praha 1995.
7. Adam M.: Struktura a syntesa kolagenních typů. In: Compendium diagnostiky a léčby nádorových kostních chorob; vydala Společnost pro výzkum a využití pojivových tkání, Praha 2001.
8. Adam M.: Kolagen: Molekulární struktura a její změny za patologických stavů. Prakt. Lék. 1987;67(15-16):565-569.
9. Hulejová H., Adam M.: Kolageny kloubní chrupavky a meziobratlové ploténky. Biochem. Clin. Bohemoslov. 1989; 18(5): 385-397.
10. Macek J, Lichý A, Tesařová E, Adam M.: Separation of type IX collagen from other cartilage collagens by hydrophobic interaction chromatography. J Chromatogr. 1988; 434(2):423-7.
11. Blažej A., Deyl Z., Adam M., Galatík A., Michlík I., Smejkal P.: Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovín. Veda, vydavateľstvo SAV, Bratislava 1978, Slovensko.
12. Entlicher G. a kol.: Biochemie – základní kurz; Karolinum, Praha 1993.
13. Vodrážka, Z.: Biochemie; Academia, Praha 2002.
14. Karlson P., Gerok W., Gross W.: Pathobiochemie; Academia, Praha 1987
15. Deyl Z., Adam M.: Connective tissue research: Chemistry, biology and physiology; Progress in clinical and biological research, vol. 54, Alan R. Liss, Inc., New York, USA 1981.
16. Adam M.: Rozdíly v etiopatogeneze osteoartrózy kolenního a kyčelního kloubu. In: Compendium osteoporózy a osteoartrózy; vydala Společnost pro výzkum a využití pojivových tkání, Praha 2000.
17. Stančíková, Ištók: Laboratórne vyšetřovacie metódy kostného metabolismu. Rheumatologia 1997; XI(1): 1-10.
18. Pešáková V., Kubies D., Hulejová H., Himmlová L.: The influence of implant surface properties on cell adhesion and proliferation. J. Mater. Sci. Mater. Med. 2007;18 (3):465-73.
19. Adam M.: Hlavní makromolekulární komponenty mezibuněčné hmoty kostní tkáně. In: Compendium osteoporózy, vydala Společnost pro výzkum a využití pojivových tkání, Praha 1995.
20. Poole R.: NIH White Paper: Biomarkers, the Osteoarthritis Initiative, 2000; <http://www.niams.nih.gov/ne/oi/oabiomarwhipap.htm>
21. Delmas P.D.: Biochemical markers for the assessment of bone turnover. Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management (editors: Riggs B.L., Melton L.J.); Philadelphia: Lippincott-Raven, 1995: 319-333.

22. Mazières B., Garnero P., Guéguen A., Abbal M., Berdah L., Lequesne M., Nguyen M., Salles J.-P., Vignon E., Dougados M.: Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis at baseline as predictors of structural progression of hip osteoarthritis. The ECHODIAH Cohort. *Ann. Rheum. Dis.* 2006; 65: 354-359.
23. Bruyere O., Collette J.H., Ethgen O., Rovati L.C., Giacovelli G., Henrotin Y.E., Seidel L., Reginster J.-Y.: Biochemical markers of bone and Cartilage remodeling in prediction of longterm progression of knee osteoarthritis. *Journal of Rheumatology* 2003; 30(5): 1043-1050.
24. Delmas P.D. Biochemical markers of bone turnover.: *J. Bone Miner. Res.* 1993; 8: 549-555.
25. Souberbielle J.-C., Cormier C., Kindermans C.: Bone markers in clinical practice. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1999;11(4): 312-326.
26. Garnero P., Buchs N., Zekri J., Rizzoli R., Coleman R.E., Delmas P.D.: Markers of bone turnover for the management of patients with bone metastases from prostate cancer. *Br. J. Cancer* 2000; 82 (4): 858-864.
27. Carmo M., Colombo I., Bruno A., Corsi F.R., Roncoroni L., Cuttin M.S., Radice F., Mussini E., Settembrini P.G.: Alteration of elastin, collagen and their crosslinks in abdominal aortic aneurysms. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2002; 23 (6): 543-549.
28. Bečvář R., Štork J., Hulejová H., Braun M., Zatloukalová A., Zatloukal P., Jansa P., Paleček T.: Degradční produkty kolagenu a elastinu jako možné ukazatele aktivity sklerodermie. *Čes.Revmatol.* 2009;17(1):23-29.
29. Watts N.B.: Clinical utility of biochemical markers of bone remodelling. *Clinical Chemistry* 1999; 45 (8):1359-68.
30. Calvo M.S., Eyre D.R., Gundberg C.M.: Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocrine Rev* 1996;17(4):333-68.
31. Christenson R.H.: Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clinical Biochemistry* 1997; 30 (8):573-93.
32. Risteli L., Risteli J.: Biochemical markers of bone metabolism. *Ann. Med.* 1993; 25: 385-93.
33. James I.T., Walne A.J., Perrett D.: The measurement of pyridinium crosslinks: a methodological overview. *Ann. Clin. Biochem.* 1996; 33: 397-420.
34. Eyre D.R., Koob T.J., Van Ness K.P.: Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1984;137: 380-388.
35. Pavelka K., Rovenský J. a kol.: *Klinická revmatologie*, Galén, 2003
36. Verzijl N., DeGroot J., Oldehinkel E., et al.: Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem. J.* 2000; 350: 381-387.
37. Šenolt L., Braun M., Olejárová M., Forejtová Š., Gatterová J., Pavelka K.: Increased pentosidine, an Advanced Glycation End product, in serum and synovial fluid from patients with knee osteoarthritis and its relation with cartilage oligomeric matrix protein. *Ann. Rheum. Dis.* 2005; 64: 886-890.
38. Drinda S., Franke S., Canet C.C., Petrow P., Bräuer R., Hüttich C., Stein G., Hein G.: Identification of the advanced glycation end products N^ε-carboxymethyllysine in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum.* 2002; 61; 488-492.

39. Miyata T., Ishiguro N., Yasuda Y., Ito T., Nangaku M., Iwata H., Kurokawa K.: Increased pentosidine, an advanced glycation end products, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 244: 45-49.
40. Chen J.R., Takahashi M., Suzuki M., Kushida K., Miyamoto S., Inoue T. Comparison of the concentrations of pentosidine in the synovial fluid serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.: *Br. J. Rheumatol.* 1999; 38: 1275-1278.
41. Rodríguez-García J., Requena J.R., Rodríguez-Segade S.: Increased concentrations of serum pentosidine in rheumatoid arthritis. *Clin. Chem.* 1998; 44: 250-255.
42. Kalousová M., Sulková S., Fialová L., Soukupová J., Malbohan I.M., Špaček P., Braun M., Mikulíková L., Fořtová M., Hořejší M., Tesař V., Zima T.: Glycooxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003; 18 (12): 2577-2581.
43. Kalousová, M. a kol.: *Patobiochemie ve schématech*; GRADA Publishing, Praha 2006.
44. Pavelka K., Forejtová Š., Olejárová M., Gatterová J., Šenolt L., Špaček P., Braun M., Hulejová H., Šťovíčková J., Pavelková A.: Hyaluronic acid levels may have predictive value for the progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12 (4): 277-83.
45. Braun M., Hulejová H., Adam M., Kryšťůfková O., Forejtová Š.: Stanovení pentosidinu a vybraných laboratorních ukazatelů kostního metabolismu u pacientů s heterotopními osifikacemi v oblasti páteře. *Rheumatologia* 2006;20(3):143-152.
46. Verzijl N., Bank R.A., TeKoppele J.M., DeGroot J. AGEing and osteoarthritis: a different perspective. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2003; 15: 616-622.
47. DeGroot J., Verzijl N., Wenting-vanWijk M.J., Jacobs K.M., Van El B., Van Roermund P.M., Bank R.A., Bijlsma J.W., TeKoppele J.M., Lafeber F.P.: Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50 (4): 1207-1215.
48. Verzijl N., DeGroot J., Bank R.A., Bayliss M.T., Bijlsma J.W., Lafeber F.P., Maroudas A., TeKoppele J.M.: Age-related accumulation of the advanced glycation endproduct pentosidine in human articular cartilage aggrecan: the use of pentosidine levels as a quantitative measure of protein turnover. *Matrix Biol.* 2001; 20: 409-417.
49. Schleicher E.D., Wagner E., Nerlich A.G.: Increased Accumulation of the Glycooxidation Product Nε-(carboxymethyl)lysine in Human Tissues in Diabetes and Aging. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 457-468.
50. Bailey A.J.: Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech. Ageing Dev.* 2001; 122: 735-755.
51. Reiser K.M.: Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998; 218: 23-37.
52. Bank R.A., Bayliss M.T., Lafeber F.P., Maroudas A., TeKoppele J.M. Ageing and zonal variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage.: *Biochem. J.* 1998; 330: 345-351.

53. Vlassara H.: Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes* 1997, 46 (2): S19-S25.
54. Sell D.R., Monnier V.M.: End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. *J. Clin. Invest.* 1990; 85 (2): 380-384.
55. Sell D.R., Monnier V.M.: Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J. Biol. Chem.* 1989; 264 (36): 21597-21602.
56. Monnier V.M., Sell D.R., Abdul-Karim F.W., Emancipator S.N.: Collagen browning and cross-linking are increased in chronic experimental hyperglycemia. Relevance to diabetes and aging. *Diabetes*. 1988; 37 (7): 867-872.
57. Yoshida N., Okumura K., Aso Y.: High serum pentosidine concentrations are associated with increased arterial stiffness and thickness in patients with type 2 diabetes. *Metabolism Clinical and Experimental* 2005; 54 (3): 345-350.
58. Odetti P., Fogarty J., Sell D.R., Monnier V.M.: Chromatographic quantification of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes* 1992; 41(2): 153-159.
59. Kalousová M., Havrdová E., Mrázová K., Špaček P., Braun M., Uhrová J., Germanová A., Zima T.: Advanced glycoxidation end products in patients with multiple sclerosis. *Prague Med. Rep.* 2005;106 (2):167-74.
60. Colaco C., Ledesma M.D., Harrington C.R., Avila J.: The role of the Maillard reaction in other pathologie: Alzheimer's disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996; 11: 7-12.
61. Deyl Z., Mikšík I., Zicha J.: Multicomponent analysis by off-line combination of synchronous fluorescence spectroscopy and capillary electrophoresis of collagen glycation adducts. *J. Chromatogr. A.* 1999; 836 (1):161-71.
62. Kalousová M., Zima T., Popov P., Špaček P., Braun M., Soukupová J., Pelinková K., Kientsch-Engel R.: Advanced glycation end-products in patients with chronic alcohol misuse. *Alcohol Alcohol.* 2004; 39 (4):316-20.
63. Kalousová M., Novotný L., Zima T., Braun M., Vítek L.: Decreased levels of advanced glycation end-products in patients with Gilbert syndrome. *Cell. Mol. Biol.* 2005; 51 (4): 387-92.
64. Miyata M., Iida Y., Horie K., Cai Z., Sugiyama S., Maeda K.: Pathophysiology of advanced glycation endproducts in renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996; 11: 27-80.
65. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi; SEKK a IPVZ, Praha 2006.*
66. Osawa T., Kato Y.: In Baynes, J.W.; Monnier, V.M.; Ames, J.M.; Thorpe, S.R. *The Maillard Reaction. Chemistry at the Interface of Nutrition, Aging, and Disease; Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 1043, New York 2005.*
67. Deyl Z., Adam M. *Collagen in aging and disease; Academia, Praha 1982.*
68. Štípek S. a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví i v nemoci; Grada Publishing 2000.*
69. Mikšík I., Zicha J., Kuneš J., Deyl Z.: Glycation of collagen in hypertriglyceridemic rats. *Life Sciences* 1997; 60 (23): 2119-2127.

70. Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. Harperova biochemie (český překlad 23. vydání, editor českého překladu J. Kraml); Nakladatelství a vydavatelství H & H, Praha 1998.
71. Musil, J., Nováková, O. Biochemie v obrazech a schématech; Avicenum, Praha 1990.
72. Kalousová M., Zima T., Popov P., Špaček P., Braun M., Soukupová J., Pelinková K. Produkty pokročilé glykace u pacientů s chronickým abúzem alkoholu a nutriční parametry. *Klin. Biochem. Metab.* 2003; 11 (32), No.4: 250-256.
73. Hayashi C.M., Nagai R., Miyazaki K., Hayase F., Araki T., Ono T., Horiuchi S.: Conversion of Amadori Products of the Maillard reaction to N ϵ -(carboxymethyl)lysine by short-term heating: possible detection of artifacts by immunohistochemistry. *Laboratory Investigation* 2002; 82 (6): 795-807.
74. Kislinger T., Humeny A., Peich C.C., Becker C.-M., Pischetsrieder M.: Analysis of protein glycation products by MALDI-TOF/MS; In Baynes, J.W.; Monnier, V.M.; Ames, J.M.; Thorpe, S.R. *The Maillard Reaction. Chemistry at the Interface of Nutrition, Aging, and Disease; Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 1043, New York 2005.*
75. Nakamura K., Nakazawa Y., Ienaga K.: Acid-stable fluorescent advanced glycation and products: vesperlysines A, B, and C are formed as crosslinked products in the Maillard reaction between lysine or proteins with glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 232(1): 227-230.
76. Baynes, J.W.; Monnier, V.M.; Ames, J.M.; Thorpe, S.R. *The Maillard Reaction. Chemistry at the Interface of Nutrition, Aging, and Disease; Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 1043, New York 2005.*
77. Braun M., Adam M., Pavelka K., Šenolt L.: Stanovení pentosidinu v moči a tkáních kloubního kompartmentu pacientů s pokročilou osteoartrózou. *Čes. Revmatol.* 2007;15 (2): 59–63.
78. Basta G., Lazzarini G., Massaro M., et al. Advanced Glycation End Products Activate Endothelium Through Signal-Transduction Receptor RAGE. A mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* 2002; 105: 816-822.
79. Buckwalter J., Lotz M., Stoltz J.F. *Osteoarthritis, Inflammation and Degradation: A Continuum; IOS Press, Amsterdam 2007.*
80. Chen J.R., Takahashi M., Suzuki M., Kushida K., Miyamoto S., Inoue T. Pentosidine in synovial fluid in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: Relationship with disease activity in rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 1998; 25 (12): 2440-2444.
81. Vlassara H., Palace M.R.: Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of Internal Medicine* 2002; 251: 87-101.
82. Moskowitz R.W., Altman R.D., Hochberg M.C., Buckwalter J.A., Goldberg V.M. *Osteoarthritis. Diagnosis and medical/surgical management., 4th edition. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, USA 2007.*
83. Adam M., Špaček P., Hulejová H.: Dlouhodobé sledování ukazatelů kostního metabolismu u pacientek s osteoporózou léčených kalcie a kolagenními peptidy. *Čes. Revmatol.* 2002;10:131-137.
84. Adam M., Špaček P., Hulejová H.: Jak sledovat účinnost léčby postmenopauzální osteoporózy. *Prakt. Lék.* 2001;81(11):626-629.

85. Mařík I., Hulejová H., Špaček P., Hyánek J., Adam M., Hyánková E., Mazurová F., Zemková D.: Hodnoty některých biochemických ukazatelů kostního metabolismu u kostních dysplazií. *Čes.-slov. Pediat.* 2000;55(1):9-15.
86. Adam M., Špaček P., Hulejová H., Galiánová A., Blahoš J.: Postmenopauzální osteoporóza. *Čas. Lék. Čes.* 1996; 135 (3): 74-78.
87. Pavelka K., Bečvář R., Böhmová J., Dvořák Z., Šírová K., Urbanová Z., Vlasáková V.: Dvojitě slepá, randomizovaná, placebem kontrolovaná, multicentrická studie ověřující účinky přípravků Geladrink Forte u pacientů s osteoartrózou kolena. *Ortopedie* 2008; 2:25-30.
88. Adam M., Špaček P., Hulejová H.: Léčba postmenopauzální osteoporózy injekcemi Calsynaru (Rhone Poulenc-Rorer) a sledování efektu léčby pomocí močového pyridinolinu a deoxy pyridinolinu. In: *Compendium osteoporosy*, vydala Společnost pro výzkum a využití pojivových tkání, Praha 1995.
89. Winlove C.P., Parker K.H., Avery N.C., Bailey A.J.: Interactions of elastin and aorta with sugars in vitro and their effects on biochemical and physical properties. *Diabetologia* 1996; 39: 1131-1139.
90. Afdhal N.H., Keaveny A.P., Cohen S.B., Nunes D.P., Maldonado N., O'Brien M., Stone P.J.: Urinary assays for desmosine and hydroxylysylpyridinoline in the detection of cirrhosis. *Journal of Hepatology* 1997; 27(6): 993-1002.
91. Viglio S., Iadarola p., Lupi A., Trisolini R., Tinelli C., Balbi B., Grassi V., Worlitzsch D., Doring G., Meloni F., Meyer K.C., Dowson L., Hill S.L., Stockley R.A., Luisetti M.: MEKC of desmosine and isodesmosine in urine of chronic destructive lung disease patients. *Eur. Respir.J.* 2000; 15: 1039-1045.
92. Tamburro A.M.: Elastin: molecular and supramolecular structure. In: Deyl Z., Adam M.: *Connective tissue research: Chemistry, biology and physiology; Progress in clinical and biological research*, vol. 54, Alan R. Liss, Inc., New York, USA 1981.
93. Shiraki M., Kuroda T., Tanaka S., Saito M., Fukunaga M., Nakamura T. Nonenzymatic collagen cross-links induced by glycooxidation (pentosidine) predicts vertebral fractures. *J Bone Miner Metab.* 2008;26(1):93-100.
94. Robins S.P., Woitge H., et al.: Direct, enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J Bone Miner. Res.* 1994; 9: 1643-49.
95. Seyedin S.M., Kung V.T., et al.: Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 1993; 8: 635-641.
96. Uebelhart D., et al.: Urinary excretion of pyridinium crosslinks: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Miner.* 1990; 8:87-96.
97. Coufal P., Štulík K., Claessens H.A., Cramers C.A. J. *High Resolut. Chromatogr.* 1994; 17: 325
98. Deyl Z., Mikšík I., Tagliaro F.: Advances in capillary electrophoresis. *Forensic Science International* 1998; 92: 89-124.
99. Churáček J., Boček P., Deyl Z., Horna A., Janák J., Janča J., Jandera P., Kalvoda R., Komárek K., Kopanica M., Krejčí M., Novák J., Vytřas K.: *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*, Academia, Praha 1993

100. Claessens H.A., Billiet H.A.H.: Capillary electroseparation methods, Eindhoven University of Technology, Holandsko, 1995
101. Supelco Bulletin 910: Guide to solid phase extraction; Sigma-Aldrich Co. 1998.
102. Štulík, K. a kol. Analytické separační metody; Karolinum, Praha 2004.
103. Claessens H.A. Sample treatment in liquid chromatography; Eindhoven University of Technology, Holandsko 1994
104. Technical Report - Supelco: Systematic SPE Method Development; Sigma-Aldrich Co. 2003.
105. Chrombook (Merck); Darmstadt, Německo 1996.
106. Pacáková V., Štulík K.: Vysokoučinná kapalinová chromatografie, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1986
107. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z. Základní analytická chemie; Karolinum, Praha 2002.
108. Doležalová V. a kol. Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii (učební text); Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví (IDPVZ) Brno 1995.
109. Kellner, R.; Mermet, J.-M.; Otto, M.; Widmer, H.M. (editors) Analytical Chemistry; Wiley – VCH Verlag GmbH, Weinheim 1998.
110. Klouda, P. Moderní analytické metody, nakl. Pavel Klouda, Ostrava 2003.
111. Harvey D. Modern Analytical Chemistry; McGraw-Hill, Boston, USA 2000.
112. Claessens H.A.: Miniaturization in high performance liquid chromatography, Eindhoven University of Technology, Holandsko 1995.
113. Poole C.F., Poole S.K.: Chromatography Today, Elsevier Science Publisher B.V., Holandsko 1991.
114. Kašička V.: Chem. Listy 1997; 91: 320.
115. Coufal P.: Moderní separační techniky. In: Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek (skripta ke kurzu); vydalo Pražské analytické centrum inovací a VŠCHT Praha, Praha 2006.
116. Heiger D.N., High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction; Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn, Francie 1992.
117. Pacáková V., Štulík K., Tichá M.: J. Chromatogr. B. 1997; 699: 403.
118. Sell D.R., Monnier V.M.: Isolation, purification and partial characterization of novel fluorophores from aging human insoluble collagen-rich tissue. Connect Tissue Res. 1989;19 (1):77-92.
119. Špaček P., Adam M.: HPLC method for pentosidine determination in urine, serum and tissues as a marker of glycation and oxidation loading of the organism. J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 2002; 25 (12): 1807-1820.
120. Black D., Duncan A., Robins S.P.: Quantitative analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in urine using ion paired reversed phase high performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 1988;169:197-203.
121. Robins S.P., Black D., et al.: Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslink measurements as resorption markers in metabolic bone diseases. Eur. J. Clin. Invest 1991; 21:310-315.
122. Zhang W., Doherty M.: J. Rheumatol. 2005; 32: 1139-1142.
123. Berka A., Feltl L., Němec I. Příručka k praktiku z kvantitativní analytické chemie; SNTL, Praha 1985.
124. Ševčík, J.G.K. Metodologie měření v analytické chemii; Karolinum, Praha 1999.

125. Takahashi M., Suzuki M., Kushida K., Miyamoto S., Inoue T. Relationship between pentosidine levels in serum and urine and activity in rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 1997; 36: 637-642.
126. Yoshihara, K., Nakamura, K., Kanai, M. et al.: Determination of urinary and serum pentosidine and its application to elder patients. *Biol. Pharm. Bull.* 1998; 21(10): 1005-1008.
127. Macek J., Miterová A., Adam M.: Separation of collagen hydrolysate aminoacids by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 1986; 364: 253-257.
128. Lichý A., Macek J., Adam M.: Determination of hydroxylysylpyridinoline in tissues and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1991;563(1):153-7.
129. Špaček, P., Hulejová, H., Adam, M.: Ion exchange determination of pyridinium crosslinks in urine as markers of bone resorption. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 1997;20(12):1921-30.
130. Brdička R., Dvořák J. *Základy fyzikální chemie*; Academia, Praha 1977.
131. Deyl Z., Mikšík I.: Comparison of different electrokinetic separation modes applicable to a model peptide mixture (collagen type I and III CNBr fragments). *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2000; 745 (1): 251-60.
132. Royce P.M., Steinman B. *Connective tissue and its heritable disorders*, 2nd edition; Wiley-Liss, Inc., New York, USA 2002.
133. Covault H.P., Lubrano T., Dietz A.A., Rubinstein H.M.: Liquid-Chromatographic Measurement of Elastin. *Clin. Chem.* 1982; 28(7): 1465-1468.
134. Krejčí M., Pajurek J., Komers R. a kol. *Výpočty a veličiny v sorpční kolonové chromatografii*; SNTL, Praha 1990.
135. Palička V.: *Metody stanovení jednotlivých fází metabolismu kostí*. In: *Compendium osteoporosy*, vydala Společnost pro výzkum a využití pojivových tkání, Praha 1995.
136. Seregini E., Martinetti A., Ferrari L., Bombardieri E.: Clinical utility of biochemical marker of bone remodelling in patients with bone metastases of solid tumors. *Q. J. Nucl.Med.* 2001; 45: 7-17
137. Špaček P., Adam M.: Enzymatické a neenzymatické síťující elementy, jejich vznik a význam při fyziologických, patologických a gerontologických změnách v organismu. *Čas. Lék. Čes.* 2000; 139: 102-110.
138. Štěpán J., Pospíchal J., Presl J., Pacovský V.: Bone loss and biochemical indices of bone remodeling in surgically induced postmenopausal women. *Bone* 1987; 8: 279-284.

8. PŘEHLED PUBLIKACÍ A PREZENTOVANÝCH VÝSLEDKŮ AUTORA

Publikace (celkem IF = 21,841)

- 1) Šenolt L, Braun M, Pavelka K: Konečné produkty pokročilé glykace u pacientů s osteoartrózou a revmatoidní artritidou a jejich potenciální úloha v patogenezi těchto onemocnění.
Čes.Revmatol. 2003;11(3):146-156.
- 2) Kalousová M., Zima T., Popov P., Špaček P., Braun M., Soukupová J., Pelinková K.: Produkty pokročilé glykace u pacientů s chronickým abusem alkoholu korelují s nutričními parametry.
Klin Biochem Metab 2003;11(4):248-250.
- 3) Forejtová Š, Olejárová M, Gatterová J, Špaček P, Braun M, Štovičková J, Hulejová H, Pavelka K: Význam progresu biochemických markerů při predikci progresu koxartrózy.
Rheumatologia 2003;17(4):225-233
- 4) Kalousová M, Sulková S, Fialová L, Soukupová J, Malbohan IM, Špaček P, Braun M, Mikulíková L, Fořtová M, Hořejší M, Tesař V, Zima T.: Glycooxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients.
Nephrol Dial Transplant. 2003;18(12):2577-81. IF = 2,607
- 5) Pavelka K, Forejtová Š, Olejárová M, Gatterová J, Šenolt L, Špaček P, Braun M, Hulejová H, Štovičková J, Pavelková A: Hyaluronic acid levels may have predictive value for the progression of knee osteoarthritis.
Osteoarthritis Cartilage 2004;12(4):277-83. IF = 3,572
- 6) Kalousová M, Zima T, Popov P, Špaček P, Braun M, Soukupová J, Pelinková K, Kientsch-Engel R: Advanced glycation end-products in patients with chronic alcohol misuse.
Alcohol Alcohol. 2004;39(4):316-20. IF = 1,714
- 7) Šenolt L, Braun M, Olejárová M, Forejtová Š, Gatterová J, Pavelka K: Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in serum and synovial fluid from patients with knee osteoarthritis and its relation with cartilage oligomeric matrix protein.
Ann. Rheum. Dis. 2005;64(6):886-90. IF = 6,956
- 8) Kalousová M, Novotný L, Zima T, Braun M, Vitek L: Decreased levels of advanced glycation end-products in patients with Gilbert syndrome.
Cell. Mol. Biol. 2005;51(4):387-92. IF = 1,018
- 9) Kalousová M, Havrdová E, Mrázová K, Špaček P, Braun M, Uhrová J, Germanová A, Zima T: Advanced glycooxidation end products in patients with multiple sclerosis.
Prague Med. Rep. 2005;106(2):167-74.

- 10) Braun M, Hulejová H, Adam M, Kryštůfková O, Forejtová Š: Stanovení pentosidinu a vybraných laboratorních ukazatelů kostního metabolismu u pacientů s heterotopními osifikacemi v oblasti páteře. *Rheumatologia* 2006;20(3):143-152.
- 11) Kryštůfková O, Forejtová Š, Hulejová H, Braun M, Gatterová J, Hladíková M, Pavelka K, Vencovský J: Úloha osteoprotegerinu u difuzní idiopatické skeletální hyperostózy a ankylozující spondylitidy. *Čes. Revmatol.* 2006;14(2):53–64.
- 12) Braun M, Adam M, Pavelka K, Šenolt L: Stanovení pentosidinu v moči a tkáních kloubního kompartmentu pacientů s pokročilou osteoartrózou. *Čes. Revmatol.* 2007;15(2):59–63.
- 13) Bečvář R, Hulejová H, Braun M, Štork J: Collagen degradation products and proinflammatory cytokines in systemic and localized scleroderma. *Folia Biol.-Prague* 2007;53(2):66-68. IF = 0,387
- 14) Šenolt L, Braun M, Vencovský J, Šedová L, Pavelka K: Advanced glycation end-product pentosidine is not a relevant marker of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Physiol. Res.* 2007;56(6):771-777. IF 1,505
- 15) Tomčík M., Hulejová H., Filková M., Braun M., Bečvář R., Haluzík M., Šenolt L.: Vztah adiponektinu ke změnám v kůži u pacientů se systémovou sklerodermií. *Čes.Revmatol.* 2008; 16(4): 148-152.
- 16) Bečvář R., Štork J., Hulejová H., Braun M., Zatloukalová A., Zatloukal P., Jansa P., Paleček T.: Degradální produkty kolagenu a elastinu jako možné ukazatele aktivity sklerodermie. *Čes.Revmatol.* 2009;17(1):23-29.
- 17) Filková M, Šenolt L, Braun M, Hulejová H, Pavelková A, Šléglová O, Kupka K, Gatterová J, Pavelka K.: Serum hyaluronic acid as a potential marker with a predictive value for further radiographic progression of hand osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17(12):1615-1619. IF = 4,082

Další prezentované a otištěné příspěvky (prezentující autor podtržen)

Přednášky:

1. Braun M.: Využití moderních analytických metod v klinické revmatologii. Odborný seminář Revmatologického ústavu Praha, Praha 14.3. 2002. Invited lecture
2. Kalousová M., Sulková S., Fialová L., Soukupová J., Malbohan I.M., Špaček P., Braun M., Mikulíková L., Fořtová M., Hořejší M., Zima T., Tesař V.: Glycoxidation and inflammation in chronic hemodialysis patients. International Congress on Mechanisms of Uremic Toxicity, Würzburg, Německo 13.-16.9. 2002; abstrakt publikován ve sborníku kongresu
3. Braun M., Šenolt L., Špaček P., Pavelka K.: Význam stanovení pentosidinu v tělních tekutinách v patogenezi revmatoidní artritidy a osteoartrózy. V. Slapské symposium, Měříň 5. – 7.6.2003; abstrakt publikován v Čes. Revmatol. 2003; 4 (11): 198-199
4. Kalousová M., Zima T., Popov P., Špaček P., Braun M., Soukupová J., Pelinková K. : Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in patients with chronic alcohol abuse. 9th Congress of the European Society for Biomedical Research on Alcoholism, Praha 11.-14.9.2003; abstrakt publikován v Alcohol and Alcoholism 2003; 38(5): 480 S14-05
5. Braun M.: Separation Methods for Determination of Pentosidine as an Indicator of Glycoxidation Processes in the Organism, Anglický seminář katedry analytické chemie PřF UK, Praha 2.12. 2004
6. Braun M., Hulejová H., Špaček P., Adam M., Forejťová Š.: Stanovení příčně-vazebných elementů jako indikátorů změn pojiva u revmatických chorob. Pracovní den Společnosti pro výzkum a využití pojivových tkání, Praha 12.5.2004 (Invited lecture)
7. Imramovská M., Braun M.: Význam stanovení pentosidinu u dětských a mladistvých diabetiků I. typu. Dny dětské diabetologie, Karlovy Vary 17.-19.9. 2004
8. Braun M., Hulejová H., Adam M., Forejťová Š., Šenolt L., Pavelka K.: Determination of collagen cross-links as indicators of pathological changes in connective tissue diseases. XIXth Meeting of the Federation of the European Connective Tissue Societies (FECTS 2004), Taormina-Giardini Naxos, Italy 9-13 July, 2004. Abstract book of FECTS 2004
9. Adam M., Hulejová H., Braun M.: Význam laboratorních testů pro terapii osteoporózy. 48. výroční sjezd českých a slovenských revmatologů, České Budějovice 22-25.9.2004; abstrakt publikován v Čes. Revmatol. 2004; 12 (4): 202
10. Braun M.: Využití HPLC pro stanovení síťujících elementů v tělních tekutinách a proteinech pojivových tkání u revmatických pacientů. Odborný seminář uživatelů chromatografů Shimadzu, Vlachovice u Žďáru n. Sázavou 7.-8.10.2004 (1.cena firmy Shimadzu za nejlepší přednášku z oblasti HPLC) (Invited lecture)
11. Braun M., Špaček P., Adam M.: Stanovení příčně-vazebných elementů jako ukazatelů odbourávání kolagenu u revmatických pacientů. Determination of important cross-links as indicators of collagen breakdown in rheumatic patients, 6. Prague-Sydney Symposium, Praha 12.10.2005; abstrakt publikován v Pohybové ústrojí 2004; 11(3+4, Suppl.): 257-259. (Invited lecture)

12. Braun M.: HPLC determination of clinically important cross-links in connective tissue proteins as indicators of collagen breakdown. Abstract book of the Conference of Young Scientists, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Praha 25.1. 2005
13. Braun M., Hulejová H., Špaček P., Adam M., Škrha J., Kalousová M., Forejtová Š., Šenolt L., Pavelka K.: Glykační a oxidační modifikace proteinů pojiva u chronických revmatických a diabetických pacientů. VI. Slapské symposium, Měřín, 28.–30.6.2005; abstrakt publikován v Čes. Revmatol. 2005, 13 (3): 120-121
14. Braun M., Špaček P., Škrha J., Adam M.: HPLC pentosidinu jako indikátoru patologické glykace a oxidace u diabetických a revmatických pacientů. Sborník přednášek XVI. Konference Společnosti RFM v Jáchymově 25.-26.11. 2005
15. Adam M., Braun M.: Spontánní artróza u myší kmene C57 Black – změny koncentrace pentosidinu při podávání vitamínu C a Boswellinu. Sborník přednášek XVI. Konference Společnosti RFM v Jáchymově, 25.-26.11. 2005
16. Kryštůfková O., Forejtová Š., Hulejová H., Horáčková M., Braun M., Pavelka K.: Heterotropní osifikace u DISH nejsou způsobené nerovnováhou systému OPG/RANKL Jáchymovské revmatologické dny, Jáchymov 30.11.-2.12.2005; abstrakt publikován v Čes.Revmatol. 2006; 14 (1): 39-40
17. Adam M., Hulejová H., Braun M., Martínek J.: Collagen peptides act as nutraceuticals. XX. FECTS Meeting, Oulu, Finsko, 1.-5.7. 2006; abstrakt publikován ve Sborníku přednášek FECTS 2006, str. 168 M3194; Invited lecture (the lecture was presented by M.Braun on behalf of prof. M. Adam)
18. Adam M., Braun M., Hulejová H.: Indikace aplikace antiporotik při ostmenopauzální osteoporóze. XVII. Konference Společnosti RFM v Jáchymově, Jáchymov 1.-2.12.2006; abstrakt publikován ve Sborníku přednášek XVII. Konference Společnosti RFM
19. Braun M., Špaček P., Adam M., Škrha J., Pavelka K.: Nevratné změny pojivových tkání jako důsledek patologických oxidačních a glykačních procesů u artrotických a diabetických pacientů. XVII. Konference Společnosti RFM v Jáchymově, Jáchymov 1.-2.12.2006; abstrakt publikován ve Sborníku přednášek XVII. Konference Společnosti RFM
20. Braun M., Adam M., Štulík K.: High performance separation of collagen and elastin cross-links. 3. International Student Conference „Modern Analytical Chemistry“, Praha 29.-30.1.2007; abstrakt publikován v Book of Proceedings, str.9
21. Braun M.: Aplikace HPLC při separaci příčných vazeb kolagenu a elastinu jako ukazatelů odbourávání pojivových tkání. Odborný seminář uživatelů analytické instrumentace Shimadzu, Vlachovice 19.–20.4.2007 (Invited lecture)
22. Braun M.: Sledování konečných produktů pokročilé glykace (AGE) u revmatických pacientů. Odborný seminář IKEM, Praha 4.5.2007 (Invited lecture)
23. Braun M., Hulejová H., Olejárová M., Pavelková A., Gatterová J., Šenolt L., Pavelka K.: Sledování biochemických změn pojiva při erozivní osteoartróze rukou. VII. Slapské symposium, Měřín, 24.-26.5.2007; abstrakt publikován v Čes. Revmatol. 2007, 15 (3):169, příspěvek 22
24. Braun M., Hulejová H., Olejárová M., Pavelková A., Gatterová J., Šenolt L., Pavelka K.: Laboratory monitoring of biochemical changes in erosive osteoarthritis of the hands by determination of selected biomarkers of connective tissue metabolism. 9. Prague-Sydney symposium, Lékařský dům, Praha 19.-

- 20.10.2007 (Invited lecture) abstrakt publikován v Pohybové ústrojí 2007; 14 (3+4, Suppl.): 316-317
25. Růžičková Š., Pavelková A., Braun M., Hulejová H., Pavelka K.: The role of cytokine network in OA. 7. Central European Congress of Rheumatology (CECR), Praha 8.5.-10.5.2008; abstrakt publikován v Čes. Revmatol. 2008, 16 (Suppl.1): 23-24
26. Braun M.: HPLC analýza degradačních produktů kolagenu a elastinu v tkáních pojiva, Odborný seminář uživatelů instrumentace firmy Shimadzu, Hotel Valáškův grunt, Kozov-Bouzov 23.4.-24.4. 2009 (Invited lecture)
27. Braun M.: Progranulin a jeho potenciál (review), Postgraduální seminář Revmatologického ústavu Praha, RÚ Praha 13.11. 2009 (Invited lecture)

Postery:

1. Špaček P., Braun M., Adam M.: Stanovení pentosidinu v tělních tekutinách a ve tkáních jako indikátoru glykačního a oxidačního zatížení organismu při osteoartróze. 46. výroční Sjezd českých a slovenských revmatologů, Liberec 2.-5.10. 2002
2. Pavelka K., Šenolt L., Vilím V., Špaček P., Braun M., Forejtová Š.: Pentosidine in serum and synovial fluid in patients with knee osteoarthritis and its potential role of prediction of osteoarthritis progression. 3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network (GARN: International Arthritis Summit, Miyakazi, Japonsko 14. – 17.9.2003; abstrakt publikován v Arthritis Res. Ther. 2003, 5 (Suppl.3): S52, příspěvek 167
3. Šenolt L., Vilím V., Braun M., Špaček P., Pavelka K.: Pentosidine, well-characterized advanced glycation end product, in serum and synovial fluid in patients with primary knee osteoarthritis. Correlation of pentosidine with COMP. Výroční evropský kongres v revmatologii, EULAR 2003, Lisabon, Portugalsko 18.-21.6.2003
4. Kalousová M., Zima T., Popov P., Špaček P., Braun M., Soukupová J., Pelinková K.: Advanced glycation end products in patients with chronic alcohol abuse correlate with nutritional parameters. Second Symposium on Advanced Glycation End Products (AGEs), Jena, Německo, 9.-11.5.2003
5. Braun M., Šenolt L., Špaček P., Adam M., Pavelka K.: Stanovení pentosidinu jako indikátoru zánětlivých procesů v patogenezi chronických kloubních onemocnění. VI. Celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie, Hradec Králové 5.-7.10. 2003; abstrakt publikován v Pokroky v klin.biochem. 2003, str.161
6. Pavelka K., Forejtová Š., Gatterová J., Vilím V., Špaček P., Braun M., Pavelková A., Šenolt L.: Pentosidin and hyaluronic acid serum levels may predicts joint space narrowing in knee osteoarthritis. 8th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International (OARSI), Berlín, Německo 12.-15.10 2003
7. Braun M., Hulejová H., Adam M., Špaček P., Forejtová Š.: Stanovení molekulárních indikátorů patologických změn kolagenu u systémových a degenerativních revmatických onemocnění. 48. výroční sjezd českých a slovenských revmatologů, České Budějovice 22-25.9.2004; abstrakt publikován v Čes. Revmatol. 2004, 12(4): 213-214

8. Braun M., Hulejová H., Špaček P., Adam M., Forejtová Š., Šenolt L., Pavelka K.: Determination of molecular indicators of connective tissue changes in systemic and degenerative rheumatic diseases. 9th World's Congress OARSI, Chicago, Illinois, USA 2.-5.12.2004; abstrakt publikován v Osteoarthritis and Cartilage 2004, 12 (Suppl. B): 94.
9. Vítek L., Kalousová M., Novotný L., Kientsch-Engel R., Soukupová J., Špaček P., Braun M., Zima T.: Low degree of glyoxidation in subjects with benign hyperbilirubinemia. APASL 2004, New Delhi, Indie 11.-15.12.2004; abstrakt publikován v J. Gastr. Hepatol. 2004; 19 (Suppl.): A 758
10. Braun M., Adam M., Škrha J.: HPLC determination of pentosidine as a molecular indicator of glycooxidation and protein cross-linking in diabetic patients. 2nd Joint Meeting of ECTS and IBMS, Ženeva (Palexpo), Švýcarsko, 25.-29.6.2005; abstrakt publikován v Bone 2005, 36 (Suppl. 2): S165
11. Forejtová Š., Kryštůfková O., Braun M., Hulejová H., Peterová V.: OPG probably does not play any important role in heterotopic ossification in AS and DISH. EULAR 2005, Vídeň 8.-11.6.2005; abstrakt publikován v Ann. Rheum. Dis. 2005; 64 (Suppl III): 329 FRI 0242
12. Braun M., Hulejová H., Adam M., Skácelová S., Šimková G., Pavelka K., Dungl P.: Clinical importance of vitamin D in osteoporosis: analytical aspects of its determination. IOF World Congress on Osteoporosis, Toronto, Kanada, 2.-6.6. 2006; abstrakt publikován v Osteoporosis International 2006, 17 (Suppl.2): S219, příspěvek P742SA
13. Hulejová H., Braun M., Adam M., Skácelová S., Šimková G., Pavelka K., Dungl P.: The utility of bone turnover markers in osteoporotic patients. Toronto, Kanada, 2.-6.6. 2006; abstrakt publikován v Osteoporosis International 2006, 17 (Suppl.2): S218, příspěvek P741MO
14. Braun M., Špaček P., Škrha J., Adam M.: Influence of glycooxidation processes on pentosidine accumulation in arthritis and diabetes mellitus. XX. FECTS & ISMB Meeting, Oulu, Finsko 1.-5.7.2006; abstrakt publikován ve sborníku přednášek FECTS 2006, str. 95, příspěvek C3175
15. Adam M., Hulejová H., Braun M., Martínek J.: Collagen peptides act as nutraceuticals. XX. FECTS & ISMB Meeting, Oulu, Finsko 1.-5.7.2006; abstrakt publikován ve sborníku přednášek FECTS 2006, str. 168 M3194
16. Hulejová H., Bečvář R., Braun M., Štork J.: Collagen degradation products and proinflammatory cytokines in systemic and localized scleroderma. 6th Central European Congress of Rheumatology, Bled, Slovinsko 4.-6.5.2006; abstrakt publikován v Zdrav. Vestn. 2006, 75 (Suppl I): 22-23 P302
17. Kryštůfková O., Forejtová Š., Hulejová H., Braun M., Hladíková M., Pavelka K., Vencovský J.: The role of osteoprotegerin in ankylosing spondylitis and diffuse idiopathic skeletal hyperostosis. 6th Central European Congress of Rheumatology, Bled, Slovinsko 4.-6.5.2006; abstrakt publikován v Zdrav. Vestn. 2006, 75(Suppl I): 18 P205
18. Braun M., Hulejová H., Olejárová M., Pavelková A., Šenolt L., Pavelka K.: Determination of Surrogate Connective Tissue Biomarkers in Erosive Osteoarthritis, TERMIS EU Meeting, London 4.-7.9.2007; abstrakt publikován v Tissue Engineering 2007, 13 (7): 1667

19. Braun M., Hulejová H., Olejárová M., Pavelková A., Gatterová J., Šenolt L., Pavelka K.: Evaluation of selected connective tissue biomarkers in erosive osteoarthritis of the hands, OARSI, Fort Lauderdale Florida, USA 6.-9.12.2007; abstrakt č.122 publikován v Osteoarthritis and Cartilage 2007, 15 (Suppl. C): C76
20. Bečvář R., Hulejová H., Braun M., Štork J.: Collagen degradation products and inflammatory activity in systemic and localized scleroderma, EULAR 2007, Barcelona 13.-16.6.2007; abstrakt publikován v Ann. Rheum. Dis. 2007, 66 (Suppl II): 201 THU0242
21. Šimková G., Skácelová S., Scheinost M., Hulejová H., Braun M., Pavelka K., Vaculík J., Dungl P., Chroust K., Svobodník A.: Osteologic status of patients after low-impact fracture of proximal lemur. EULAR 2007, Barcelona 13.-16.6.2007; abstrakt publikován v Ann. Rheum. Dis. 2007; 66 (Suppl II): 623 AB0721
22. Pavelka K., Braun M., Šenolt L., Pavelková A., Hulejová H.: Biomarkers in erosive and non-erosive OA of the hands. World Congress on Osteoarthritis (OARSI), Fort Lauderdale, Florida USA, 6.12.-9.12.2007; abstrakt publikován v Osteoarthritis and Cartilage 2007, 15 (Suppl.C): C76
23. Šenolt L., Hulejová H., Ošlejšková L., Braun M., Haluzík M., Pavelka K.: Adiponectin and resistin serum levels in patients with erosive and non-erosive osteoarthritis of the hands. World Congress on Osteoarthritis (OARSI), Fort Lauderdale, Florida USA, 6.12.-9.12.2007; abstrakt publikován v Osteoarthritis and Cartilage 2007, 15 (Suppl.C): C77
24. Braun M., Hulejová H., Pavelková A., Olejárová M., Gatterová J., Šenolt L., Pavelka K.: Hyaluronic acid may represent a surrogate marker for erosive osteoarthritis of the hands. 7.Central European Congress of Rheumatology (CECR), Praha 8.5.-10.5.2008; abstrakt publikován v Čes. Revmatol. 2008, 16 (Suppl. 1): 27
25. Bečvář R., Hulejová H., Braun M., Štork J.: Collagen degradation products and elastin in systemic and localized scleroderma. EULAR 2008, Paříž, Francie 11.-14.6.2008; abstrakt publikován v Ann. Rheum. Dis. 2008 ; 67 (Suppl II): 362 FRI0245
26. Bečvář R., Hulejová H., Braun M., Štork J.: Connective tissue degradation products in systemic and localized scleroderma. 7. Central European Congress of Rheumatology (CECR), Praha 8.5.-10.5.2008; abstrakt publikován v Čes. Revmatol. 2008, 16 (Suppl.1): 25
27. Braun M., Hulejová H., Pavelková A., Olejárová M., Gatterová J., Šenolt L., Pavelka K.: Influence of erosions on levels of collagen degradation biomarkers and inflammation in hand osteoarthritis. TERMIS-EU Chapter Meeting, Porto, Portugalsko 22.6.-26.6.2008; Tissue Engineering 2008, part A, 14(5): 868
28. Filková M., Šenolt L., Braun M., Hulejová H., Pavelková A., Škeblová O., Kupka K., Gatterová J., Pavelka K.: Serum hyaluronic acid as a surrogate biomarker for erosive osteoarthritis of the hand. EULAR 2009, Kodaň, Dánsko 10.6.-13.6. 2009; abstrakt publikován v Ann. Rheum. Dis. 2009; 68 (Suppl 3): 473

29. Braun M., Hulejová H., Gatterová J., Filková M., Pavelková A., Šléglová O., Šenolt L., Pavelka K.: Analýza příčných vazeb kolagenu a kyseliny hyaluronové ve vztahu k progresi osteoartrózy rukou. IX. celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie, Národní dům na Smíchově, Praha 20.9.-22.9. 2009; abstrakt publikován v Klinická biochemie a metabolismus 2009, 17 (3): 185

Výzkumné zprávy:

V letech 2002-2009 pravidelné příspěvky do průběžných a závěrečných zpráv grantů a výzkumných záměrů Ministerstva zdravotnictví ČR na nichž doktorand participoval (reg. č. NR/8447-4, NR/7895-3, NR/7886-3, NK 7732-3, NK 5366-4, MZO 00023728 a MZO 00023841).

Závěrečná výzkumná zpráva ke grantu IGA MZ ČR (2004-2006), reg. č. NR7895.
Braun Martin, Adam Milan, Škrha Jan: Stanovení pentosidinu v etiopatogenezi revmatických a diabetických onemocnění a ovlivnění jeho hladiny podáváním vitamínu C při glykační a oxidační zátěži organismu.
Praha, 2007, 80 stran, 1. vydání, Revmatologický ústav Praha.
(Součást Výročních zpráv Revmatologického ústavu Praha a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy & Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za rok 2007).

9. SEZNAM PŘÍLOH

- 1) Braun M, Adam M, Pavelka K, Šenolt L: Stanovení pentosidinu v moči a tkáních kloubního kompartmentu pacientů s pokročilou osteoartrózou. *Čes. Revmatol.* 2007;15(2):59–63.
- 2) Šenolt L, Braun M, Olejárová M, Forejtová Š, Gatterová J, Pavelka K: Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in serum and synovial fluid from patients with knee osteoarthritis and its relation with cartilage oligomeric matrix protein. *Ann. Rheum. Dis.* 2005;64(6):886-90. IF = 6,956
- 3) Pavelka K, Forejtová Š, Olejárová M, Gatterová J, Šenolt L, Špaček P, Braun M, Hulejová H, Šťovíčková J, Pavelková A: Hyaluronic acid levels may have predictive value for the progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12(4):277-83. IF = 3,572
- 4) Kalousová M, Sulková S, Fialová L, Soukupová J, Malbohan IM, Špaček P, Braun M, Mikulíková L, Fořtová M, Hořejší M, Tesař V, Zima T.: Glycooxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(12):2577-81. IF = 2,607
- 5) Šenolt L, Braun M, Vencovský J, Šedová L, Pavelka K: Advanced glycation end-product pentosidine is not a relevant marker of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Physiol. Res.* 2007;56(6):771-777. IF 1,505
- 6) Kalousová M, Novotný L, Zima T, Braun M, Víték L: Decreased levels of advanced glycation end-products in patients with Gilbert syndrome. *Cell. Mol. Biol.* 2005;51(4):387-92. IF = 1,018
Nejlepší publikace z oboru klinické biochemie a laboratorní medicíny vydané v roce 2005:
1. cena České společnosti klinické biochemie ČLS JEP, Pardubice 19.9.2006
- 7) Braun M, Hulejová H, Adam M, Kryštůfková O, Forejtová Š: Stanovení pentosidinu a vybraných laboratorních ukazatelů kostního metabolismu u pacientů s heterotopními osifikacemi v oblasti páteře. *Rheumatologia* 2006;20(3):143-152.
- 8) Bečvář R, Hulejová H, Braun M, Štork J: Collagen degradation products and proinflammatory cytokines in systemic and localized scleroderma. *Folia Biol.-Prague* 2007;53(2):66-68. IF = 0,387
- 9) Braun Martin, Adam Milan, Škrha Jan: Stanovení pentosidinu v etiopatogenezi revmatických a diabetických onemocnění a ovlivnění jeho hladiny podáváním vitamínu C při glykační a oxidační zátěži organismu. Závěrečná výzkumná zpráva ke grantu IGA MZ ČR (2004-2006), reg. č. NR7895.
Praha, 2007, 80 stran, 1. vydání, Revmatologický ústav Praha.
(Součást Výročních zpráv Revmatologického ústavu Praha a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy & Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za rok 2007).

PŘÍLOHA 1

Braun M, Adam M, Pavelka K, Šenolt L: Stanovení pentosidinu v moči a tkáních kloubního kompartmentu pacientů s pokročilou osteoartrózou. Čes. Revmatol. 2007;15(2):59–63.

PŘÍLOHA 2

Šenolt L, Braun M, Olejárová M, Forejtová Š, Gatterová J, Pavelka K: Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in serum and synovial fluid from patients with knee osteoarthritis and its relation with cartilage oligomeric matrix protein.

Ann. Rheum. Dis. 2005;64(6):886-90. IF = 6,956

PŘÍLOHA 3

Pavelka K, Forejtová Š, Olejárová M, Gatterová J, Šenolt L, Špaček P, Braun M, Hulejová H, Šťovíčková J, Pavelková A: Hyaluronic acid levels may have predictive value for the progression of knee osteoarthritis.

Osteoarthritis Cartilage 2004;12(4):277-83. IF = 3,572

PŘÍLOHA 4

Kalousová M, Sulková S, Fialová L, Soukupová J, Malbohan IM, Špaček P, Braun M, Mikulíková L, Fořtová M, Hořejší M, Tesař V, Zima T.: Glycooxidation and inflammation in chronic haemodialysis patients.

Nephrol Dial Transplant. 2003;18(12):2577-81. IF = 2,607

PŘÍLOHA 5

Šenolt L, Braun M, Vencovský J, Šedová L, Pavelka K: Advanced glycation end-product pentosidine is not a relevant marker of disease activity in patients with rheumatoid arthritis.

Physiol. Res. 2007;56(6):771-777. IF 1,505

PŘÍLOHA 6

Kalousová M, Novotný L, Zima T, Braun M, Vítek L: Decreased levels of advanced glycation end-products in patients with Gilbert syndrome.

Cell. Mol. Biol. 2005;51(4):387-92. IF = 1,018

Nejlepší publikace z oboru klinické biochemie a laboratorní medicíny vydané v roce 2005 – 1. cena České společnosti klinické biochemie ČLS JEP, Pardubice 19.9.2006

PŘÍLOHA 7

Braun M, Hulejová H, Adam M, Kryštůfková O, Forejtová Š: Stanovení pentosidinu a vybraných laboratorních ukazatelů kostního metabolismu u pacientů s heterotopními osifikacemi v oblasti páteře.

Rheumatologia 2006;20(3):143-152.

PŘÍLOHA 8

Bečvář R, Hulejová H, Braun M, Štork J: Collagen degradation products and proinflammatory cytokines in systemic and localized scleroderma.

Folia Biol.-Prague 2007;53(2):66-68. IF = 0,387

PŘÍLOHA 9

Závěrečná výzkumná zpráva ke grantu IGA MZ ČR (2004-2006), reg. č. NR7895.

Braun Martin, Adam Milan, Škrha Jan: Stanovení pentosidinu v etiopatogenezi revmatických a diabetických onemocnění a ovlivnění jeho hladiny podáváním vitamínu C při glykační a oxidační zátěži organismu.

Praha, 2007, 80 stran, 1. vydání, Revmatologický ústav Praha.

(Součást Výročních zpráv Revmatologického ústavu Praha a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy & Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za rok 2007).