acta medicinae
Kazuistiky
v onkologii a hematoonkologii
Léčba metastatického HER2 pozitivního karcinomu prsu v první linii léčby
doc. MUDr. Petra Tesařová, CSc.
Lokální použití 8% kapsaicinu u onkologické pacientky
MUDr. Štěpán Rusín
Léčba bevacizumabem u generalizovaného hormonálního triplet negativního karcinomu prsu
MUDr. Jiří Chalupa
Léčba průlomové bolesti intranazálním fentanylem
MUDr. Radovan Hřib | MUDr. Marek Hakl, Ph.D.
Použití Instanylu v terapii průlomové bolesti v ORL oblasti
MUDr. Štěpán Rusín
Axitinib v léčbě karcinomu ledviny
MUDr. Hana Studentová
Léčba kombinovaným preparátem oxykodon/naloxon
MUDr. Štěpán Rusín
Dlouhodobá parciální remise při léčbě sunitinibem
MUDr. Věra Hejzlarová
Pacientka s nádorovou průlomovou bolestí
MUDr. Jan Lejčko
Mikrokalcifikace
MUDr. Monika Grilli Wagnerová
Tapentadol v terapii bolesti
MUDr. Eduard Hájek
Nilotinib v první linii léčby chronické myeloidní leukemie
MUDr. Hana Klamová, CSc.
Mantle cell lymfom v sedmém deceniu života
doc. MUDr. Samuel Vokurka, Ph.D.
Idiopatická tromboza
doc. MUDr. Petr Duliček, Ph.D. | MUDr. Eva Ivanová | Mgr. Petr Sadílek
Pacient s chronickou myeloproliferací typu esenciální trombocytemie a s trombotickými komplikacemi
MUDr. Libor Červinek
www.actamedicinae.cz | Speciál 2014

Obsah

kazuistiky v onkologii a hematoonkologii

6 *Petra Tesařová*
Léčba metastatického HER2 pozitivního karcinomu prsu v první linii léčby

8 *Štěpán Rusín*
Lokální použití 8% kapsaicinu u onkologické pacientky

10 *Jiří Chalupa*
Léčba bevacizumabem u generalizovaného hormonálního triplet negativního karcinomu prsu

12 *Radovan Hřib | Marek Hakl*
Léčba průlomové bolesti intranazálním fentanylem

15 *Štěpán Rusín*
Použití Instanylu v terapii průlomové bolesti v ORL oblasti

16 *Hana Študentová*
Axitinib v léčbě karcinomu ledviny

18 *Štěpán Rusín*
Léčba kombinovaným preparátem oxykodon/naloxon

21 *Věra Hejzlarová*
Dlouhodobá parciální remise při léčbě sunitinibem

22 *Jan Lejčko*
Pacientka s nádorovou průlomovou bolestí

24 *Monika Grilli Wagnerová*
Mikrokalcifikace

26 *Eduard Hájek*
Tapentadol v terapii bolesti

28 *Hana Klamová*
Nilotinib v první linii léčby chronické myeloidní leukemie

31 *Samuel Vokurka*
Mantle cell lymfom v sedmém deceniu života

34 *Petr Duliček | Eva Ivanová | Petr Sadílek*
Idiopatická trombóza

37 *Libor Červinek*
Pacient s chronickou myeloproliferací typu esenciální trombocytemie a s trombotickými komplikacemi

aktuálně

39 *Ondřej Zítka | Vojtěch Adam | René Kizek | Jaromír Hubálek*
Elektrochemie jako nástroj pro studium antioxidační kapacity

42 **studie**

ACTA MEDICINAE 3. ročník, Speciál 2014 Kazuistiky v onkologii a hematoonkologii, MK ČR E 20738, ISSN 1805-398X, www.actamedicinae.cz **Redakce** ACTA MEDICINAE, V Olšinách 2300/75, 100 00 Praha 10 | Mgr. Dana Frantálová (šéfredaktorka, frantalova@actamedicinae.cz) **Redakční rada** prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc. | prof. MUDr. Petr Arenberger, DrSc. | MUDr. Monika Arenbergerová, Ph.D. | JUDr. Přemysl Frýda | prof. MUDr. Jan Holčík, DrSc. | doc. MUDr. Iva Holmerová, Ph.D. | doc. MUDr. Pavel Kohout, Ph.D. | prof. MUDr. Vítězslav Kolek, CSc. | prof. MUDr. Milan Kvapil, CSc. | prof. MUDr. Robert Lischke, Ph.D. | prof. MUDr. Petr Neužil, CSc. | prof. MUDr. Karel Pavelka, DrSc. | MUDr. Miroslav Procházka | prof. MUDr. Roman Prymula, CSc., Ph.D. | prof. MUDr. Jaroslav Rybka, DrSc. | MUDr. Přemysl Sobotka | MUDr. Zdena Staňková | prof. MUDr. Jindřich Špinar, CSc. | prof. MUDr. Marek Trněný, CSc. | prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc. **Grafická úprava, sazba, jazykové korektury** JoshuaCreative, s. r. o. **Tisk** Tiskárna Helbich, a.s. **Inzerce** Andrea Balonová (business director, balonova@actamedicinae.cz, tel.: +420 608 280 892), Jitka Peterková (project manager, peterkova@actamedicinae.cz, tel.: +420 777 979 252) **Produkce** Jana Urbanová, urbanova@eramedia.cz, tel.: +420 736 611 929 **Vydává** ERA Média, s.r.o., IČO: 26947757, Chleborádova 69/22, 619 00 Brno, tel.: +420 530 500 801, fax: +420 541 219 278 **Datum vydání** 18. 4. 2014 **Upozornění** Periodikum ani jeho části nesmějí být publikovány ani šířeny jakýmkoli způsobem a v jakékoli podobě bez výslovného svolení vydavatele. Redakce neodpovídá za obsah zveřejněné inzerce a reklamy. Za obsah článků odpovídá autor. Vydavatel získává otištěním příspěvku výlučné nakladatelské právo k užití.

Elektrochemie jako nástroj pro studium antioxidační kapacity

Ondřej Zítka | Vojtěch Adam | René Kizek | Jaromír Hubálek Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Ústav mikroelektroniky, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, VUT v Brně, Středoevropský technologický institut, VUT v Brně

Detekce hladiny antioxidačních sloučenin a stanovení antioxidační kapacity jsou významné z několika pohledů včetně diagnostiky onemocnění či monitoringu průběhu léčby. Jednou z možností provedení detekce je využití elektrochemických metod. Jejich největší výhodou je možnost miniaturizace, finanční nenáročnost a robustnost.Tento přehledný článek popisuje aplikace jak stacionárních, tak průtokových elektrochemických metod pro analýzu klinických vzorků s ohledem na studium jejich antioxidačních vlastností. Předmětem diskuze jsou výhody a nevýhody těchto metod.

Antioxidační kapacita patří k nejdůležitějším antioxidačním parametrům. Kapacita je definována jako schopnost sloučeniny (nebo směsi sloučenin) inhibovat oxidativní degradaci různých sloučenin, jako je zabránění peroxidace lipidů (obr. 1). Tyto metody jsou obvykle založeny na přímé reakci mezi studovanými sloučeninami a volnými radikály (zhášení nebo vychytávání) nebo na reakci s přechodnými kovy [1–6]. Při analýze antioxidačních vlastností se používají především spektrometrické metody. Nicméně tyto metody jsou závislé na mnoha parametrech, jako jsou teplota, čas analýzy, charakter sloučeniny nebo směsi sloučenin (extraktů), koncentrace antioxidantů a prooxidantů a mnoha dalších látek [7–15].

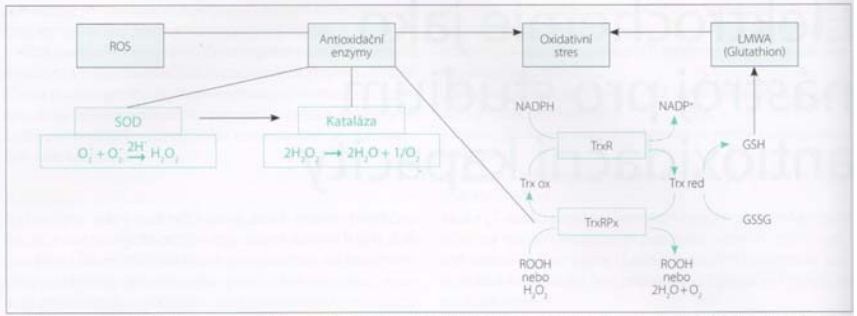
Elektrochemické metody používané pro určení antioxidační kapacity se stále vyvíjejí. Umožňují rychlým, jednoduchým a citlivým alternativním způsobem analyzovat bioaktivní sloučeniny související s vychytáváním radikálů či samotnou antioxidační kapacitu. Jsou nízkonákladové a obvykle nevyžadují časově náročnou přípravu vzorků. Používají se jak pro stacionární systémy, přičemž diferenční pulzní polarografie a voltamperometrické metody patří k nejvíce používaným technikám, tak pro dynamický průtokový, případně elektromigrační systém, s ohledem na výhody voltametrie a amperometrie. Vývoj nové instrumentace s možností miniaturizace kontrastující s konvenčními, běžně využívanými systémy je hlavním směrem vývoje elektrochemických technik pro analýzu bioaktivních sloučenin včetně těch majících antioxidační vlastnosti [16–21].

Antioxidační sloučeniny mohou fungovat jako redukční činidla a v roztocích mají tendenci snadno se oxidovat na inertních elektrodách. Vzhledem k tomuto faktu je vztah mezi elektrochemickým chováním sloučenin s antioxidační aktivitou a jejich výslednou „antioxidační silou" (kapacitou) velmi zajímavý, protože „nízký oxidační potenciál" odpovídá „vysoké antioxidační síle" [22]. Je obecně známo, že oxidativní stres souvisí s nerovnováhou mezi koncentrací prooxidantů a antioxidantů. Navíc se zdá, že tyto změny jsou velmi důležité v patofyziologii smrtelně nemocných pacientů. Přímé měření přítomnosti reaktivního kyslíku a ukazatelů oxidativního stresu zůstává v klinické medicíně stále obtížným úkolem. Hladina oxidativního stresu je měřena jako celková změna antioxidační kapacity nebo eventuálně jako antioxidační status [23–29].

V předkládaném přehledovém článku jsou sumarizovány základní elektrochemické techniky používané k určování vlastností antioxidantů v klinické diagnostice, pro které byly elektrochemické metody navrženy a vyvinuty. Výhody a nevýhody aplikování elektrochemických metod pro analýzu různých druhů vzorků jsou předmětem diskuze.

Cyklická voltametrie pro určování antioxidační kapacity

Cyklická voltametrie (CV) je nejběžnější využívanou technikou pro charakterizaci redoxního systému. Podává informaci o počtu redoxních stavů a kvalitativní informaci o stabilitě těchto oxidačních stavů a kinetice elektronového přenosu [30–33]. CV zahrnuje



1 Schéma vzniku oxidativního stresu v souvislosti s reaktivními formami kyslíku (ROS) a ochrannými systémy tvořenými antioxidačním enzymem superoxiddismutáza (SOD, enzym zodpovědný za přeměnu superoxidového anionu na peroxid vodíku v cytoplazmě a v mitochondriální matici [48, 49]), katalázou (CAT, katalyzuje dismutaci peroxidu vodíku na kyslík a vodu [50]) a antioxidanty s nízkou molekulární hmotností (LMWAs, zejména glutathion a kyselina močová (urát). Upraveno podle [51]. Zkratky: ROS – reaktivní formy kyslíku; O_2^- – superoxidový anion; H_2O_2 – peroxid vodíku; SOD – superoxiddismutáza; TrxR – thioredoxinreduktáza; TrxPx – thioredoxinperoxidáza; Trx red – redukovaný thioredoxin; Trx ox – oxidovaný thioredoxin; GSH – redukovaný glutathion; GSSG – oxidovaný glutathion; LMWA – antioxidant s nízkou molekulární hmotností.

snímání napětí pracovní elektrody během zaznamenávání anodického proudu, který v roztoku vytvářejí antioxidanty s nízkou molekulární hmotností, které jsou oxidovány na povrchu pracovní elektrody [34]. Proudová odezva je úměrná kombinované koncentraci antioxidantů [35, 36]. CV na uhlíkové elektrodě se jeví jako vhodná metoda pro určení antioxidační kapacity, zejména pro svou jednoduchost, rychlost a možnost přímého použití v biologických a hrubých vzorcích [37–41]. Australští vědci studovali řadu sloučenin založených na kombinaci neuroprotektivní vlastnosti nekompetitivního receptoru antagonisty N-metyl-D-asparagové kyseliny s antioxidační funkčností [42]. Redoxní chemie těchto sloučenin byla hodnocena pomocí cyklické voltametrie a výsledky byly porovnány s vlastnostmi lapačů radikálů získanými ze dvou standardních biologických rozborů, z inhibice lipidové peroxidace a z kolorimetrického stanovení pomocí safirové modře. Antioxidační aktivita řady pyrimidinů vykazuje závislost na přítomnosti tří aminosubstituentů [42].

Určování antioxidační aktivity klinických vzorků

CV lze také obecně aplikovat v klinických studiích. CV na samostatné uhlíkové elektrodě ze skelného uhlíku byla aplikována za účelem určení antioxidační aktivity krevní plazmy u lidí [25]. CV odezva lidské plazmy sestávala ze dvou širokých voltametrických píků, které byly pozorovány při napětí v rozmezí 0,2 až 0,6 V a v rozmezí 0,6 až 0,9 V. Parametry, které indikují antioxidační kapacitu vzorků, tj. potenciál píku Ep, proudová hustota proudu píku i (p) a náboj Q pod voltametrickými vlnami byly vypočítány pro obě vlny. Na základě CV skenů naměřených v lidské plazmě, které ukazují významně rozdílné koncentrace nízkého redoxního potenciálu antioxidantů s nízkou molekulární hmotností, lze konstatovat, že výsledky celkového antioxidačního statusu kalkulují s přispěním vysoce formálního redoxního potenciálu antioxidantů s nízkou molekulární hmotností (LMWAs, z angl. Low Molecular Weight Antioxidants) včetně druhé CV vlny.

Zajímavou studii publikoval vědecký tým z univerzity v Toulouse [43]. V této studii je CV navržena jako nová metoda pro vyhodnocení antioxidační kapacity kůže založená na redukčních vlastnostech antioxidantů s nízkou molekulární hmotností. Experimenty spočívaly v pouhém zaznamenávání anodického proudu při 0,9 V na platinové mikroelektrodě umístěné přímo na povrchu pokožky bez jakéhokoli gelu nebo vody. Tato metoda zaručila přímé, rychlé (méně než jedna minuta), spolehlivé (přesnost 12 %) a neinvazivní měření celkové antioxidační kapacity *stratum corneum* s vysokým časoprostorovým rozlišením.

CV byla dále použita k vyhodnocení antioxidačního statusu a oxidativního stresu zdravých osob a chronicky (diabetes mellitus) a akutně nemocných pacientů (vystavených celkovému ozáření před transplantací kostní dřeně) [44]. Závěrem studie bylo, že lze CV široce využít k rychlému vyhodnocení stavu zdravých i nemocných osob a monitorování odezvy na jejich léčbu nebo výživové doplňky i ke screeningu určitých populací [44]. V lidské krevní plazmě pacientů trpících diabetem mellitem byly zjištěny antioxidační vlastnosti kyseliny lipoové [45]. Metoda CV byla také využita k monitorování celkové kapacity plazmy k vychytávání oxidantů u pacientů s glykogenózou typu Ia, kde byla pozornost věnována zejména určení kyseliny močové coby jednoho z nejsilnějších antioxidantů v organismu [46]. Barroso et al. publikovali zajímavou studii s názvem „Electrocatalytic evaluation of DNA damage by superoxide radical for antioxidant capacity assessment" [47]. K určení antioxidační kapacity zde byla využita integrita purinových bází DNA. Na rozdíl od jiných publikovaných antioxidačních senzorů založených na DNA, označeným škodlivým agentem, byl

enzymaticky vytvořený systém xantin/xantinoxidázy. Oligonukleotid bohatý na adenin byl adsorbovaný na uhlíkových pastových elektrodách (CPE) a vystavený radikálnímu poškození za (ne)přítomnosti několika sloučenin antioxidantů. Ve výsledku bylo pozorováno částečné poškození DNA.

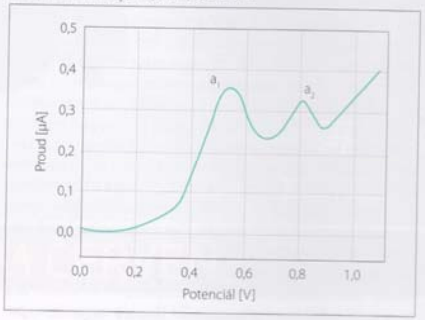
Square wave voltametrie pro určování antioxidační kapacity klinických vzorků

Studie Pohanky et al. [52] představila analýzu LMWAs v krevní plazmě pomocí SWV. Jako zástupci reálných biologických matic s různými hladinami LMWAs byly použity vzorky plazmy z pěti supů hnědých *Cinereous Vultures* (*Aegypius monachus* Linnaeus), nahodile intoxikované olovem. Odběr krve u ptáků proběhl před a měsíc po aplikaci Ca-EDTA. Výsledkem SWV měření byly dva píky. První pík, s hodnotou potenciálu 466±15 mV, byl rozpoznán jako kyselina askorbová a močová, zatímco druhý (743±30 mV) reprezentoval glutathion, tokoferol, kyselinu askorbovou a v menší míře také kyselinu močovou. Přínos jednotlivých antioxidantů byl zkoumán odděleně rozborem standardů LMWA.

Vědecký tým z Shandong Agricultural University [53] vyhodnotil poškození DNA a antioxidační kapacitu proteinu sericinu pomocí SWV elektrochemickým biosenzorem pro detekci DNA založeném na kompozitním materiálu z Au-Pd v chitosanu a dendrimeru. Předmětem studia byl vztah mezi koncentrací sericinu a procentem vychytávání OH. Se vzrůstající koncentrací sericinu narůstalo také procento vychytávání. Antioxidační kapacita sericinu byla ve srovnání s antioxidační kapacitou Troloxu (89 %) mírně odlišná.

Určení poškození DNA pomocí SWV, ale také CV a pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS), je popsáno ve studii autorů Ziyatdinova a Labuda [54]. Sestavili DNA biosenzor skládající se z dsDNA adsorpční vrstvy na karboxylovém jednostěnném uhlíkovém chitosanovém nanomateriálu deponovaném na komerční uhlíkové tištěné elektrodě. Tento senzor byl připraven a aplikován při komplexním výzkumu poškození DNA štěpením Fentonova typu (hydroxylové radikály ve směsi Cu^{2+}, H_2O_2 a kyseliny askorbové) a uspořádáním měď(II)–quercetin v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,0) za aerobních podmínek. Počáteční zvýšení SWV odezvy vnitřního guaninu a adeninu oproti odezvě původní dsDNA indikuje otevření helixové struktury v prvním stadiu poškození. Zároveň snížená odezva vmezeřeného thioridazinu potvrzuje poškození helixové sktruktury spolu s rozsáhlou degradací řetězce DNA a jeho odstraněním z povrchu elektrody [54]. S využitím SWV byl studován oxidační stress DNA vyvolaný UV zářením [55]. Technika je založena na enzymatické konverzi poškozených bází DNA na jednořetězcové zlomy (ssb) a jednořetězcové oblasti (ss)DNA, nebo obojí. Nadšroubovicová DNA vystavená UV záření byla specificky štěpena T4 endonukleázou V, enzymem rozpoznávajícím pyrimidinové dimery, hlavní produkty fotochemického poškození DNA. Tato technika se vyznačuje zvýšenou senzitivitou a selektivitou detekce poškozní DNA báze než jakákoli jiná elektrochemická metoda. Není limitována na poškození DNA *in vitro*, může detekovat také poškození DNA báze v živých bakteriálních buňkách [55]. Pro účely naší interní studie jsme se rozhodli použít metodu SWV na grafitových tištěných elektrodách, abychom určili antioxidační kapacitu vzorků krve pacienta trpícího maligním onemocněním hlavy. Tomuto pacientovi (šestiletému dítěti) byl diagnostikován neuroblastom. Voltamogram zobrazil dva píky označené a_1 a a_2. Respektive pozice píků a_1 a a_2 jsou při 562±20 mV a 839±17 mV. Typický voltamogram vzorku plazmy ukazuje obrázek 2. Průměrná plocha píků byla $6{,}88 \cdot 10^{-3}$ µAV u píku a_1 a $4{,}24 \cdot 10^{-3}$ µAV u píku a_2. Zatímco pík a_1 byl ve všech testovaných vzorcích, pík a_2 byl v některých vzorcích téměř nepozorovatelný. Lze tedy říci, že významná patologie se nevztahuje ke všem endogenním antioxidantům, nýbrž pouze ke specifické skupině, ale jejich vliv není zcela pochopen.

2 Typický voltamogram získaný rozborem plazmy zobrazuje dva píky: pík a_1 při nižším a a_2 při vyšším potenciálu.



Závěr

Tento příspěvek zdůrazňuje roli elektrochemických technik při určování antioxidační aktivity/kapacity v biologických vzorcích rostlinného původu a v klinických vzorcích. Elektrochemické techniky jsou vzhledem k selektivitě a senzitivitě vhodným nástrojem k určování antioxidační kapacity v biologických vzorcích, jelikož se jedná o citlivé metody při nízkých koncentracích antioxidantů. Získané píky a jejich pozice navíc umožňují určit potenciální přítomnost antioxidantu ve vzorku. V klinické diagnostice jsou kladeny vysoké požadavky na rychlou, přesnou a specifickou analýzu. Velmi důležitá je také možnost průběžného monitorování a multiplexování.

Jelikož je vyžadováno úplné a přímé stanovení antioxidantů, využívají se jako hlavní elektrochemické postupy techniky s řízeným potenciálem: cyklická voltametrie, diferenční pulzní voltametrie a další voltametrické přístupy či průtoková injekční analýza s amperometrickou detekcí. Všechny tyto techniky jsou vysoce hodnoceny v korelaci s běžně užívanými spektrofotometrickými metodami [56].

Kompletní literatura na www.actamedicinae.cz/literatura

Tato práce vznikla za podpory projektu SIX CZ.1.05/2.1.00/03.0072.