

Úvod

Předložená dizertace zahrnuje poměrně široké spektrum analytických technik, a to vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), afinitní HPLC a afinitní kapilární elektroforézu (ACE). Společným rysem těchto technik je jejich využití ke stanovení biologicky aktivních látek. Všechny analyzované látky jsou přirozenou součástí těla savců a stanovení jejich patologických koncentrací hraje významnou roli v identifikaci určitých onemocnění [1–5].

První skupinou sledovaných látek byly žaludeční enzymy pepsiny. Pepsiny, resp. jejich prekurzory pepsinogeny, náleží mezi aspartátové proteasy a jsou produkovány buňkami žaludeční sliznice obratlovců. Jako modelové vzorky pro stanovení lidských pepsinů byly využity prasečí pepsiny vzhledem k jejich velmi podobným vlastnostem (Mr, pI) [6–8].

V souvislosti se stanovením pepsinů má klinický význam především stanovení sérové hladiny pepsinogenů A a C. Pepsinogen A je markerem slizniční atrofie a současně i vředové choroby. Nizká koncentrace pepsinogenu A v séru je považována za ukazatel rakoviny žaludku a podobně jen u nižší obsah vzhledem k pepsinogenu C [9–11]. Pepsinogen C se používá především jako marker stavu žaludeční sliznice [12,13].

Pro analýzu pepsinů byly vybrány afinitní HPLC a ACE. Techniky významně rozšiřují spektrum doposud užívaných metod [14–16]. V experimentech byla využita zvýšená afinita pepsinů k substrátům obsahujícím jodem substituované tyrozinové zbytky [17–19]. V této práci byl konkrétně použit 3,5-dijod-L-tyrozin (DIT). Substrát DIT byl navázán na stacionární fáze pro afinitní HPLC a na modifikované kapiláry pro afinitní kapilární elektroforézu. Takto připravené stacionární fáze a modifikované kapiláry poté umožnily selektivní adsorpci pepsinu.

Druhou skupinu sledovaných analytů tvořily plazmatické metanefriny neboli O-methyl metabolity hormonů dřeně nadledvin, katecholaminů. Mezi metanefriny můžeme zařadit metanefrin (MN), normetanefrin (NMN) a 3-methoxytyramin (3-MT).

Z metanefrinů byla největší pozornost věnována volnému plazmatickému MN a NMN, jejichž významně zvýšený obsah v plazmě souvisí s přítomností tumorů pocházejících z chromafinní tkáně sympatického nebo parasympatického nervového systému [20–22]. Nejčastěji se jedná o nádor dřeně nadledvin feochromocytom (FEO).

Metodou zvolenou pro stanovení plazmatických metanefrinů byla HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC-EC). Tato metoda byla validována a byla posouzena její schopnost správně zařadit pacienty (s nádorem, bez nádoru). Ověření přítomnosti (nepřítomnosti) FEO bylo potvrzeno vyšetřením pomocí počítačové tomografie (CT) nebo magnetické rezonance (MRI), případně histologicky. Výsledky stanovení byly porovnány s jinou dostupnou metodou, která rovněž interpretuje změřené koncentrace stanovených látek vzhledem k FEO. Srovnávaná metoda stanovuje volné katecholaminy v moči pomocí HPLC-FLD. U obou metod byla určena diagnostická senzitivita a specificita. Senzitivita je definována jako pravděpodobnost, že výsledek stanovení bude metodou zařazen jako pozitivní u nemocných, specificita jako pravděpodobnost, že výsledek bude negativní u osob bez nemoci [23]. Pro určení hranice mezi normálními (fyziologickými) a patologickými (u pacientů s nádorem) koncentracemi analytů byly stanoveny analytické koncentrace metanefrinů od zdravých dobrovolníků, pacientů s hypertenzí a pacientů s feochromocytomem.