



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Novější biochemické markery aterosklerózy

Recent biochemical markers of atherosclerosis

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor práce: **Barbora Dratvová**

Vedoucí práce: as. MUDr. Lenka Fialová

Kladno 2016

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Barbora Dratvová**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Novější biochemické markery aterosklerózy**
Téma anglicky: Recent biochemical markers of atherosclerosis

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

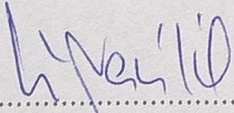
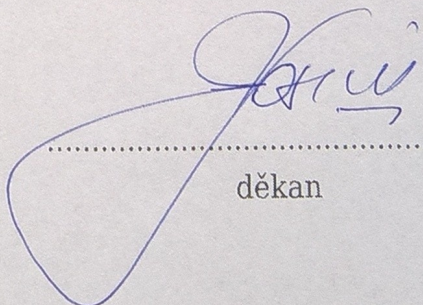
Při posuzování aterosklerózy se významně uplatňují klinicko-biochemická vyšetření. S neustálým rozvojem poznatků o ateroskleróze přibývá i biochemických vyšetření, která mohou přispět k diagnostice, sledování i prognóze různých projevů aterosklerózy. Základní vyšetření posuzující zejména stav lipidového metabolismu (celkový cholesterol, triacylglyceroly, LDL a HDL cholesterol) jsou doplňována stanovením novějších analytů, které poskytují informaci o intenzitě zánětlivých procesů (např. vysoce senzitivní C-reaktivní protein, vybrané cytokiny) či stabilitě aterosklerotického plátu (např. PAPP-A pregnancy-associated plasma protein A, fosfolipáza A2 asociována s lipoproteiny). Přehledová práce si klade za cíl shrnout poznatky o vybraných novějších biomarkerech aterosklerotického procesu. Zaměří se na jejich fyziologické účinky, úlohu v aterosklerotickém procesu, metody stanovení a přínos jejich vyšetřování.

Seznam odborné literatury:

- [1] ČEŠKA, Richard, Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií, ed. 4., Praha: Triton, 2012, 406 s., ISBN 978-80-7387-599-2.
[2] ZIMA, Tomáš, Laboratorní diagnostika. Třetí, doplněné a přepracované vydání, ed. 3., Praha: Galén, c2013, 1146 s., ISBN 978-80-7492-062-2
[3] ŽÁK, Aleš a Jaroslav MACÁŠEK, Ateroskleróza: nové pohledy, ed. 1., Praha: Grada, 2011, 183 s., ISBN 978-80-247-3052-3

zadání platné do: 30.09.2017

Vedoucí: as. MUDr. Lenka Fialová, CSc.


.....
vedoucí katedry / pracoviště
.....
děkan

V Kladně dne 18.12.2015

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „**Novější biochemické markery aterosklerózy**“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

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

V Kladně dne 20. května 2016

.....

Barbora Dratvová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala as. MUDr. Lence Fialové za ochotu, pomoc, odborné vedení, konstruktivní kritiku a čas, který mi věnovala během zpracování bakalářské práce.

ABSTRAKT:

Jedná se o teoretickou práci jejímž hlavním cílem je seznámit čtenáře s novými biochemickými markery aterosklerózy. Shrnuje základní poznatky o ateroskleróze. Je zde popsán charakter onemocnění, příčiny jeho vzniku, aterosklerotický proces a rizikové faktory ovlivňující jeho vznik. Dále je popsán metabolismus lipidů a lipoproteinů, které hrají v aterogenezi důležitou roli.

Druhá část práce je pak věnována biochemickým markerům. Jsou zmíněny klasické parametry vyšetřované v souvislosti s aterosklerózou, ale hlavní důraz je kladen na novější biomarkery, informace o jejich vlastnostech, fyziologickém i patologickém významu, jejich roli v aterosklerotickém procesu, přínos pro diagnostiku a jsou popsány metody stanovení jednotlivých analytů.

KLÍČOVÁ SLOVA:

ateroskleróza, biochemický marker, zánět, vulnerabilní plát

ABSTRACT:

This bachelor theoretical thesis deals with the subject of recent biochemical markers of atherosclerosis. Firstly, the thesis sums up basic knowledge of atherosclerosis, the signs and symptoms, causes of the disease, atherogenesis and risk factors contributing to emergence of the disease. It also contains a description of lipid and lipoprotein metabolism which plays an important role in the process of atherogenesis.

Second part of the thesis is focused on biochemical markers. Standard parameters examined in connection with atherosclerosis are mentioned, however emphasis is put on recent biomarkers, their properties, physiological and pathological significance, their role in atherogenesis, contribution to diagnostic, and methods of determination of each analyte are described.

KEY WORDS:

atherosclerosis, biochemical markers, inflammation, vulnerable plaque

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíle práce	9
3	Ateroskleróza	10
3.1	Rizikové faktory	10
3.2	Metabolismus lipidů	11
3.2.1	Lipoproteiny	13
3.2.2	Chylomikrony	15
3.2.3	VLDL	15
3.2.4	LDL	15
3.2.5	HDL	16
3.2.6	Lipoprotein (a)	17
3.3	Aterosklerotický proces	18
3.4	Stabilita aterosklerotického plátu	21
3.5	Zánět.....	22
4	Základní biochemická vyšetření	25
4.1	Celkový cholesterol.....	25
4.2	LDL-C	26
4.3	Non-HDL-C	27
4.4	HDL-C.....	27
4.5	Apolipoprotein B	28
4.6	Triacylglyceroly	28
5	Novější biochemické markery	29
5.1	Markery intenzity zánětlivých procesů	29
5.1.1	C-reaktivní protein	30
5.1.2	Cytokiny.....	32
5.2	Markery stability aterosklerotického plátu	35
5.2.1	PAPP-A	35
5.2.2	Fosfolipáza A ₂ asociovaná s lipoproteiny	36
5.2.3	CD40L	38
5.3	Markery dalších rizikových faktorů	39
5.3.1	Homocystein.....	39
5.3.2	Fibrinogen.....	40
5.3.3	Adiponektin.....	41
5.3.4	Cystatin C	42
5.3.5	Matrixové metaloproteinázy	43
5.3.6	Myeloperoxidáza	43
5.3.7	Sérový amyloid A.....	44
6	Hodnocení kardiovaskulárního rizika	46
7	Prevence a léčba	48
8	Diskuze	49
9	Závěr	52
	Seznam použité literatury	53
	Seznam symbolů a zkratk	58
	Seznam obrázků	59

1 Úvod

Ateroskleróza je komplexní onemocnění, jehož mechanismus byl osvětlen až v posledních desetiletích. Co se v dobách minulých vysvětlovalo jako prosté usazování tuku v cévách, které je důsledkem vysokého příjmu tuků potravou, je dnes již popsáno jako komplikovaný proces ovlivňovaný mnoha faktory. A i přes to, že jsou patofyziologické mechanismy a rizikové faktory toho onemocnění popsány, míra úmrtnosti na důsledky komplikací aterosklerózy je stále velmi vysoká a ve vyspělých zemích se stále zvyšuje. To sebou nese nejen psychosociální dopady, ale také stále se zvyšující finanční nároky na léčbu takto nemocných pacientů. Proto je kladen důraz na výzkum nových rizikových faktorů a nových markerů, které by nám mohly pomoci patologický proces odhalit včas, monitorovat jeho průběh, případně bychom jejich mechanismů mohli využít k samotné léčbě.

Tato práce tvoří stručný přehled o základních poznatcích o ateroskleróze, jejích příčinách, rizikových faktorech a rozvoji. Také se věnuje metabolismu lipidů a lipoproteinů jako neodmyslitelné součásti celého procesu. Hlavním přínosem práce by však mělo být shromáždění informací o nových biochemických markerech, které by nám mohly pomoci s rychlejším a přesnějším odhadem rizika kardiovaskulárních příhod a volbou léčby.

2 Cíle práce

Cílem práce je podat čtenáři přehled o dosavadních poznatcích o ateroskleróze. V jednotlivých kapitolách bude popsán charakter onemocnění, rizikové faktory, příčiny vzniku a fáze aterosklerotického procesu. Pro ucelenost bude uveden popis metabolismu lipidů a lipoproteinů.

Druhá část práce se bude věnovat již samotným biochemickým markerům aterosklerózy. V samostatné kapitole budou popsány klasické, v současné diagnostice používané, biochemické markery a metody jejich stanovení. Dále budou popsány novější biomarkery rozdělené na markery zánětu a na markery stability aterosklerotického plátu. Budou popsány jejich fyziologické účinky, úloha v aterosklerotickém procesu, metody stanovení a přínos jejich vyšetřování.

3 Ateroskleróza

Ateroskleróza je onemocnění postihující cévní systém člověka. Jedná se o chronický patologický proces, na kterém se podílí zejména přílišné hromadění lipidů (zejména cholesterolu) v intimě cévy a je ovlivňován mnoha faktory. V procesu hrají roli lipoproteiny, buňky imunitního systému a krevní buňky, ale i genetická výbava jedince. Ty se společně s usazováním cholesterolu podílejí na formování tzv. aterosklerotického plátu, který zužuje lumen cévy, ztenčuje její stěnu, snižuje její pružnost a při jeho ruptuře dochází k ucpání cév a s tím souvisejícím akutním stavem jako je infarkt myokardu či centrální mozková příhoda. Typická místa vzniku aterosklerózy jsou oblasti rozdvojení větších cév, kde dochází k vířivému proudění krve a tím je narušován nepřilnavý povrch epitelu.

3.1 Rizikové faktory

Rizikový faktor obecně popisuje, o kolik vyšší pravděpodobnost onemocnění má jedinec, který byl vystavený danému faktoru, oproti jedinci, který rizikovému faktoru vystaven nebyl. Rizikové faktory můžeme dělit do několika skupin, nejčastěji na faktory ovlivnitelné a neovlivnitelné

Neovlivnitelné rizikové faktory:

Mezi neovlivnitelné rizikové faktory aterosklerózy patří pohlaví, věk, genetická výbava, rodinná anamnéza a předchozí prodělání kardiovaskulárního onemocnění.

Fakt, že muži jsou ohroženi kardiovaskulárními chorobami více než ženy, je všeobecně znám po celém světě. Riziko onemocnění u žen se zvyšuje po menopauze, což souvisí se snížením hladiny estrogenu, který má pravděpodobně spojitost s vyššími hladinami HDL-cholesterolu a vyšším počtem LDL-receptorů v játrech. Po menopauze tedy ženy tuto výhodu ztrácejí.

Podobně je známo, že se zvyšujícím se věkem riziko aterosklerózy roste. Souvisí to s chronickým charakterem onemocnění, kdy patologický proces může

být započat již v dětském věku, ale manifestuje se až ve věku pokročilém. Rizikovým věkem u muže je věk 45 let a výše, u ženy je to 55 let a výše.

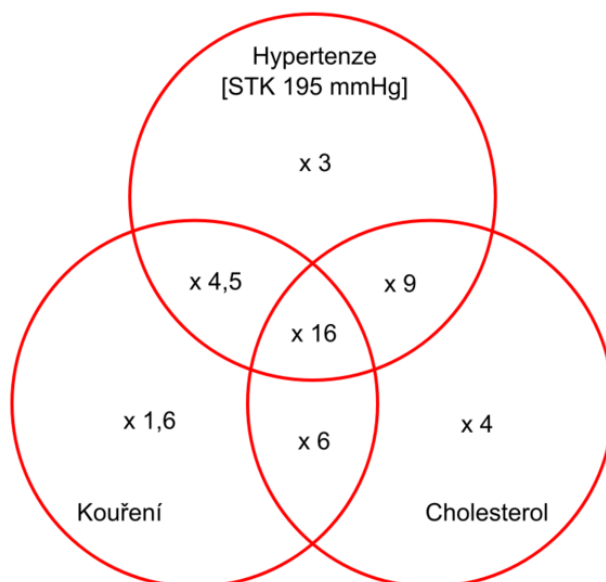
Ovlivnitelné rizikové faktory:

Mezi ovlivnitelné faktory patří dieta se zvýšeným energetickým příjmem a především vysokým obsahem živočišných tuků, nedostatek fyzické aktivity, obezita, kouření, nadměrné požívání alkoholu. Mezi další ovlivnitelné faktory patří i některá onemocnění, např. diabetes mellitus, hypertenze a hyperhomocysteinémie, které pacient může ovlivnit doporučenou léčbou.

Na rozdíl od neovlivnitelných (nemodifikovatelných) rizikových faktorů můžeme rizika rozvoje aterosklerózy spojená s ovlivnitelnými faktory snižovat například změnou životního stylu, změnou diety a kompenzací souvisejících onemocnění.

Pokud se u člověka kombinuje několik rizikových faktorů, jejich působení se nesčítá, ale násobí.

Vzájemná potenciace rizikových faktorů aterosklerózy



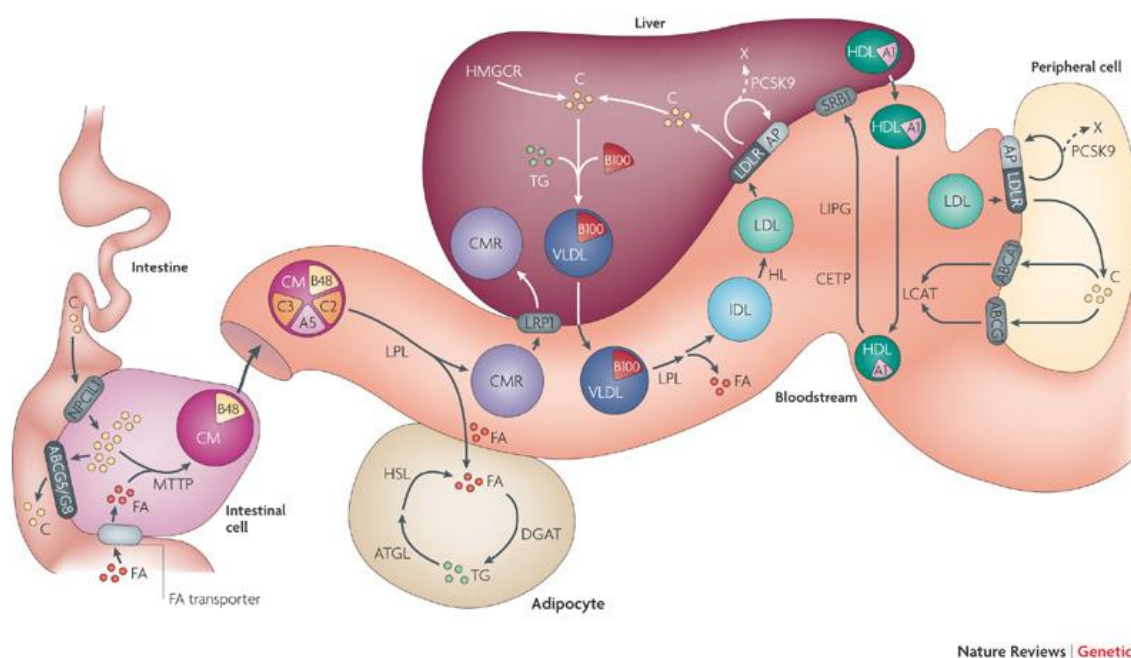
Obr. 1: Interakce rizikových faktorů (Mareš, 2012)

3.2 Metabolismus lipidů

Lipidy jsou jednou ze základních složek potravy člověka. Jedná se o heterogenní skupinu látek, mezi jejichž společné vlastnosti patří špatná nebo

žádná rozpustnost ve vodě a v polárních rozpouštědlech, biogenní původ a rozpustnost v organických rozpouštědlech. Do skupiny lipidů patří cholesterol, triacylglyceroly a volné mastné kyseliny.

Metabolismus lipidů můžeme rozdělit na endogenní (cesta lipidů přijímaných potravou) a exogenní (cesta lipidů uvnitř organismu). Vzhledem k nerozpustnosti lipidů je jejich transport plasmou zprostředkováván hydrofilními lipoproteinovými částicemi.



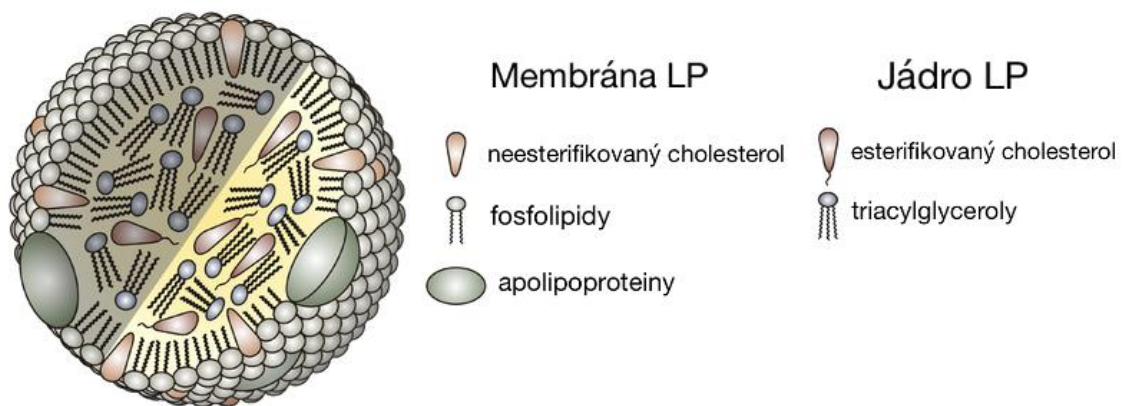
Obr. 2: Schéma lipoproteinového metabolismu (Hegele, 2011)

Schéma na obr. 2 naznačuje, jak vypadá metabolismus lipoproteinů a transport lipidů. Cholesterol (C) a triacylglyceroly (TG) jsou vstřebávány v tenkém střevě do enterocyty. Z cholesterolu a TG vznikají chylomikrony (CM), na jejichž povrchu je apolipoprotein B-48, a díky transferovému proteinu (MTTP) se lymfatickými cestami dostávají do krevního oběhu. Tam chylomikron interaguje s lipoproteinovou lipázou (LPL), která z něj uvolní volné mastné kyseliny, které vstupují do okolních buněk, a chylomikronový remnant je pomocí LDL receptoru eliminován v játrech. V játrech jsou z TG, cholesterolu a apolipoproteinu B-100 syntetizovány lipoproteiny VLDL a jsou sekrenovány do krve. Po interakci s LPL jsou triacylglyceroly hydrolyzovány, uvolňují se mastné kyseliny a lipoproteinový remnant je označován jako IDL. Ten je dále hydrolyzován jaterní lipázou (HL) a vzniká tak LDL. LDL je vychytáván játry,

ale i periferními buňkami, pomocí receptoru LDLR. HDL je syntetizován v játrech a zprostředkovává reverzní transport cholesterolu. Má na svém povrchu apolipoprotein A-I (A1), který interaguje s transportérem periferních buněk (ABCG1). Enzym LCAT esterifikuje cholesterol pro transport HDL částic. HDL je následně upraven pomocí bílkoviny přenášející estery cholesterolu CETP a endoteliální lipázy LIPG a přes scavengerové receptory (SRB1) vstupuje do jater (Hegele, 2009).

3.2.1 Lipoproteiny

Vzhledem k nerozpustnosti lipidů ve vodě je pro jejich transport plazmou nezbytně nutná přítomnost hydrofilních nosičů. Tuto pozici zaujímají právě lipoproteiny. Jedná se o částice, jejichž povrch tvoří vrstva fosfolipidů, menší množství neesterifikovaného cholesterolu a apolipoproteiny. Uvnitř částice se nachází esterifikovaný cholesterol a triacylglyceroly.



Obr. 3: Struktura lipoproteinové částice (AntiSense, 2010)

Tab. 1: Přehled lipoproteinových částic (Zdroj: Češka, 2012, s. 51)

	Hustota [g/ml]	Velikost [nm]	Cholesterol [%]	TG [%]	Apolipoproteiny
CM	0,94	75 – 1200	3	88	A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III, E
VLDL	1,006	28 – 75	17	56	C-I, C-II, C-III, E
IDL	1,019	31	41	32	C-I, C-II, C-III, E
LDL	1,064	22	59	7	B-100
HDL	> 1,21	7 – 10	38 – 43	6 – 7	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, E

3.2.1.1 Apolipoproteiny

Společnou vlastností všech lipoproteinových částic je přítomnost apolipoproteinů na jejich povrchu. Jedná se o specifické bílkoviny, mezi jejichž funkce patří udržovat strukturu lipoproteinu, účastnit se enzymatických reakcí (kofaktory), zprostředkovávat vazbu na specifické receptory a transportovat lipidy mezi jednotlivými lipoproteiny.

Existuje několik tříd apolipoproteinů (označují se písmeny A až M), které se liší svou funkcí a jejich přítomnost je charakteristická pro jednotlivé typy lipoproteinů. Apo A-I, II, IV se vyskytují na chylomikronech a HDL částicích, apo B-48 se nachází pouze na chylomikronech, apo B-100 zase pouze na LDL částicích, apo C-I, II, III a apo E jsou společným apolipoproteinem pro chylomikrony, VLDL, IDL i HDL částice (Češka, 2012, s. 54).

Příslušnost jednotlivých apolipoproteinů má nesmírný přínos pro diagnostiku, jelikož podle poměru jejich koncentrace můžeme rozpoznávat různé patologie. Například na konci 80. let 20. století bylo zjištěno, že snížení apo A-I (tj. snížená koncentrace HDL) a zvýšení apo B (zvýšení LDL) je daleko přesnějším markerem pro stanovení časného stádia rozvoje srdečních chorob než běžně vyšetřované parametry.

3.2.2 Chylomikrony

Lipidy přijímané potravou, tzv. dietní lipidy, jsou ve střevě vázány na chylomikrony. Chylomikrony jsou největší lipoproteinové částice. Jsou tvořeny ve sliznici tenkého střeva, přesněji jsou produkovány Golgiho komplexy buněk střeva – enterocyty. Jedná se o částici kulovitého tvaru skládající se z fosfolipidové membrány a její vnitřek je vyplněn cholesterolem a triacylglyceroly. Tyto částice se lymfatickými cestami dostávají do krevního oběhu a na povrchu endotelu kapilár jsou štěpeny lipoproteinovou lipázou a jsou z nich uvolněny mastné kyseliny, které tkáním slouží jako zdroj energie. Zbytek chylomikronu nazýváme chylomikronový remnant. Obsahuje zejména cholesterol a apoproteiny. Tato zbytková částice ještě může předat některé své části ostatním lipoproteinům, ale nakonec je vycytávána v játrech pomocí apo E receptoru. Tím se cholesterol dostává do jater, kde je buď zabudováván do částic VLDL, nebo je použit na tvorbu žlučových kyselin.

3.2.3 VLDL

Další důležitou částicí v metabolismu lipidů jsou VLDL částice neboli lipoproteiny o velmi nízké hustotě. Jejich syntézou je započata endogenní metabolická cesta. Tyto molekuly jsou tvořeny v játrech a obsahují převážně triacylglyceroly, dále volný i esterifikovaný cholesterol a apoprotein B-100. VLDL částice je stykem s lipoproteinovou lipázou štěpena a hydrolyzou dochází k uvolnění mastných kyselin do tkání. Z VLDL částice vzniká remnant nazývaný IDL. Zhruba poloviční část IDL je po navázání na apo E hepatální receptor odbourána, druhá polovina je katabolizována na LDL částice.

3.2.4 LDL

LDL částice jsou molekuly s nejvyšším obsahem cholesterolu. Zprostředkovávají transport pro zhruba 70 % celkového cholesterolu v plazmě a transportují ho jak do jater, tak i do ostatních tkání. Důležitou složkou LDL částice je apoprotein B-100, který se v játrech váže na LDL receptor a zajišťuje tím odbourávání LDL z plazmy. Většina LDL se odbourává právě takto – po navázání na receptor následuje endocytóza, částice se od receptoru oddělí

(receptor se vrací zpět na membránu hepatocytu) a v lysozymu je rozložena na volný cholesterol.

Malá část LDL molekul může být odbourávána pomocí scavengerových receptorů (acetyl-LDL-receptory), které se nacházejí na makrofázích. Zvýšené odbourávání přes scavengerové receptory je dáváno do souvislosti s akcelerovanou aterosklerózou. Vzhledem k vysokému obsahu cholesterolu v LDL částicích znamená jejich zvýšená hladina v plazmě velké riziko rozvoje předčasné aterosklerózy.

S LDL částicemi pak souvisí další problém - jejich modifikace. Chemickou modifikací rozumíme jejich oxidaci, acetylaci či glykaci (u DM), která probíhá především v intimě arterií a v plazmě. LDL se objevuje v několika podtřídách – LDL I – LDL IV a právě menší LDL částice, nazývané také *small-dense*, podléhají modifikaci daleko snadněji, a proto jsou daleko větším rizikem pro rozvoj aterosklerózy. Modifikované lipoproteinové částice totiž nejsou rozpoznávány LDL receptory v játrech a váží se především na receptory scavengerové. Při vstupu modifikovaného LDL do buňky přes scavengerový receptor nefunguje zpětná vazba, která by měla regulovat koncentraci cholesterolu v buňce, a cholesterol se tak v makrofázích nekontrolovaně hromadí. Z takovýchto buněk pak vznikají buňky pěnové, které jsou již základem aterosklerotického ložiska.

Oxidativně modifikovaný LDL je prozatím nejprozkoumanějším modifikovaným lipoproteinem. Dělíme ho podle míry oxidace na mírně a silně oxidovaný, přičemž silně oxidovaný LDL má větší proaterogenní vliv. Tyto transformované částice ulehčují vniknutí monocytů do intimy cévy – iniciují syntézu chemotaktických proteinů, které navádí monocyty do stěny cévy a syntézu adhezivních molekul na povrchu endotelu, na které se monocyty mohou snadno navázat. Dále syntetizují kolonie stimulující faktor, který diferencuje monocyty v makrofágy. Jsou přímo toxické pro endotel cév, jsou odpovědné za imunitní reakce a znemožňují relaxaci cév.

3.2.5 HDL

Poslední, ale nezbytnou součástí lipidového transportu jsou molekuly lipoproteinu o vysoké hustotě HDL. HDL jsou syntetizovány v játrech a v tenkém

střevě a mají podobu diskoidních útvarů. Tyto nascentní molekuly se pohybují plazmou a přijímají volný cholesterol, fosfolipidy a apolipoproteiny z tkání a částečně i z ostatních lipoproteinů, a diskoidní molekula se mění v molekulu sférickou. Volný cholesterol uvnitř HDL esterifikuje a vzniká tak další typ lipoproteinu – HDL-3. Ten dále interaguje s ostatními lipoproteiny a přejímá od nich další složky, zvětšuje svůj objem a stává se z něj HDL-2. Většina částic je pak pomocí apolipoproteinu A-I rozpoznána a navázána na specifický HDL receptor v játrech a odbourána. Část HDL-2 však může být navracena do podoby HDL-3, a to působením enzymu CETP. Tento enzym je schopen transportovat část cholesterolu z HDL částic na částice LDL a VLDL (obsahující apolipoprotein B) a ty jsou pak odbourávány v játrech.

Celý tento děj, tj. od uvolnění volného cholesterolu tkáněmi až po jeho odbourání v játrech, nazýváme reverzní transport cholesterolu.

HDL, často neodborně nazývaný také jako „hodný cholesterol“, však nemá význam pouze pro reverzní transport cholesterolu. Zásadní roli hraje také v dalších antiaterogenních mechanismech – inhibuje zánět a apoptózu, snižuje viskozitu plazmy, aktivuje fibrinolýzu, zabraňuje oxidaci LDL, snižuje expresi adhezivních molekul a chemokinů a mnohé další (Češka, 2012).

3.2.6 Lipoprotein (a)

Lp(a) je často zmiňován v souvislosti s apolipoproteiny. Jedná se o částici velmi podobnou LDL, lišící se přítomností apoproteinu (a) navázaného disulfidickými můstky na bílkovinu apoB-100. Apo(a) má rozmanitou délku a strukturou je velmi podobný plasminogenu. Plasminogen je bílkovina důležitá pro fibrinolýzu. Po jeho aktivaci na plasmin rozpouští fibrinovou sraženinu. Pokud se v organismu tvoří lipoprotein(a), soutěží s plasminogenem o jeho vazebná místa a snižuje tím aktivitu fibrinolýzy. Zároveň podněcuje sekreci inhibitoru plasminového aktivátoru (serpin E1; PAI-1), která vede k trombogenezi. Dalším proaterogenním faktorem je schopnost podněcovat expresi adhezivních molekul na endotelu cév, a tím zvyšovat jejich přilnavost. Lp(a) má specifickou vlastnost precipitovat i při fyziologické koncentraci vápníku v séru a vazba tohoto precipitátu do stěny cév zvyšuje jeho retenci, a tím i zadržování cholesterolu

a možnou oxidaci LDL (Zima, 2013c, s. 190). Popsané mechanismy jsou příčinou velké míry aterogenity částice a souvisejícím zvýšeným rizikem pro rozvoj ICHS. Je prokázáno, že toto riziko nese i samostatné zvýšení koncentrace Lp(a), nezávislé na ostatních parametrech metabolismu lipidů (Češka, 2012, s. 55). Fyziologická funkce Lp(a) není známa.

3.3 Aterosklerotický proces

Pokud si rozložíme slovo ateroskleróza na původní řecká slova *athero* = kaše a *sclerosis* = tuhý, získáme zjednodušenou představu o tom, co je důsledkem aterosklerózy. Co se však zpočátku zdálo jako prosté hromadění tuku v cévách, se s prohlubujícími se znalostmi medicíny ukazuje být velmi komplexním onemocněním a dnes již víme, že problémem není pouze porušený metabolismus lipidů, ale hlavní roli hraje také stav imunitního systému a genetická predispozice.

Celý proces začíná porušením smáčelnivosti endotelu cév. K tomu dochází v místech, kde je céva dlouhodobě namáhána turbulentním prouděním krve – nerovné části cévy či místa jejího rozvětvení. Buňky endotelu mění svůj původní elipsoidní tvar a orientaci ve směru proudění na tvar polygonu a ztrácí svoji nepropustnost. Zvýšená permeabilita v těchto místech zapříčiňuje vstup makromolekul – zejména LDL, ale například také lipoproteinu (a) – do intimy cév. Jeho kumulace ve stěně cévy je způsobena vazbou mezi apoB a proteoglykany mezibuněčné hmoty. A přestože cirkulující LDL není v plazmě modifikován, jeho zabudováním do mezibuněčné hmoty cévy se účinnost modifikace zvyšuje. Oxidované LDL vznikají především působením volných kyslíkových radikálů a reaktivních forem dusíku (ty jsou tvořeny endotelovými buňkami a makrofágy) (Češka, 2012, s. 32).

Kromě zvýšené permeability pro lipoproteinové částice se s poškozením endotelové vrstvy vytvářejí adhezni molekuly, růstové faktory a cytokiny, které k místu poškození cévy chemotakticky přitahují buňky imunitního systému – T-lymfocyty a monocyto-makrofágové buňky – a ty pomocí

adhezivních P a E selektinových molekul prostupují skrze endotel do subendotelového prostoru. Ten se začíná zvětšovat – makrofágy pohlcují volný cholesterol a mění se v buňky pěnové, růstové faktory stimulují proliferaci vaskulární hladké svaloviny, do místa jsou přitahovány další buňky a hromadí se zbytky rozpadlých buněk. Celý tento proces vede ke ztluštění cévní stěny a vzniku ateromového plátu (Osmančík, 2003, s. 8).

Proces aterogeneze můžeme dělit podle několika kritérií. Jako časně označujeme fáze hromadění lipidů v intimě cévy, pozdní je pak proliferace léze do lumen cévy a počínající trombóza. Podrobnější a přesnější rozdělení fází vzniku aterosklerotického plátu:

Typ I: Iniciální fáze

Typ II: Tukové proužky

Typ III: Intermediární fáze

Typ IV: Ateromový plát

Typ V: Fibroateromový plát

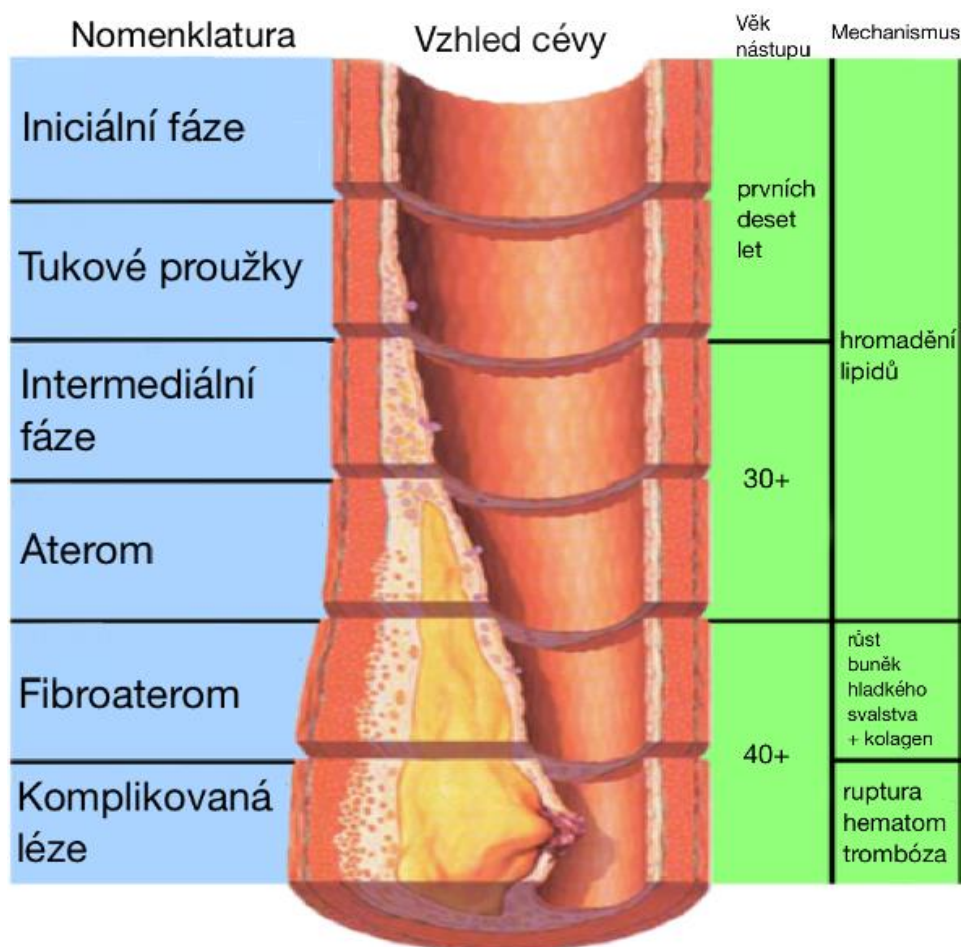
Typ VI: Komplikovaná léze

Celý proces zahajuje tzv. iniciální fáze, kdy se v intimě cévy začínají z makrofágů vytvářet pěnové buňky. Je identifikovatelná pouze mikroskopicky. Poté se hromaděním těchto buněk začínají tvořit tukové proužky. Jedná se o žluté nevystupující útvary v intimě velkých cév, které jsou tvořeny pěnovými buňkami, buňkami hladkých svalů a T-lymfocyty. Je dokázáno, že se objevují již v dětském věku (byly prokázány i u novorozenců) a během života se dále vyvíjejí – může dojít k jejich zániku, ale také k rozvoji v aterosklerotickou lézi.

Dalším stupněm aterogeneze je intermediární (přechodná) fáze, kdy dochází k uvolnění části intracelulárních lipidů z odumřelých pěnových buněk do extracelulárního prostoru, což zapříčiňuje vznik základu lipidového jádra. I přesto, že se řadí mezi časně fáze, může být případnou příčinou ICHS. Tyto první tři fáze patří do časně patogeneze aterosklerózy bez klinických projevů.

Fibrózní či ateromové pláty jsou většími útvary s lipidovým jádrem a jasným ohraničením. Mají tužší konzistenci, jsou žluté až šedé barvy (podle obsahu lipidů) a již prominují do lumina cévy, což znamená její zúžení a s tím spojené problémy. V místě léze nalezneme pěnové buňky, velké množství prolifерujících buněk hladkého svalstva a lymfocyty. Intracelulární prostor těchto buněk je v této fázi z většiny vyplněn lipidy. Nebuněčnou část léze pak tvoří především tukové kapénky a kolagen tvořený svalovými buňkami, které během celého procesu migrují z medie do intimy arterie. Může docházet také k nekrotizaci ve spodních vrstvách léze. Nekrotizovaná tkáň pak může kalcifikovat, a tím se stává nestabilnější. Fibroaterom se liší vyšším podílem kolagenu a můžeme ho dále dělit na několik typů – s lipidovým jádrem, s kalcifikovanou lézí, bez lipidového jádra, gelatinózní (obsahuje edematózní tekutinu a fibrinogen, který stimuluje tvorbu hladké svaloviny). Toto stádium aterogeneze se již může klinicky projevovat příznaky spojenými s lokalizací léze – bolestí nohou při chůzi, bolestí či necitlivostí rukou, ochabováním obličejových svalů, atd. (Češka, 2012, s. 33-35).

Komplikované léze jsou pak posledním stádiem aterosklerózy, kdy dochází k ruptuře plátu, hematomu/hemoragii či trombóze nebo kombinaci těchto komplikací. Právě tyto těžké degenerativní změny vedou k cévní obstrukci, ischemické příhodě a často i úmrtí jedince.



Obr. 4: Schéma jednotlivých fází aterogeneze (Grahams Child, 2006)

3.4 Stabilita aterosklerotického plátu

Aterosklerotický plát je produktem dlouhého a komplikovaného procesu aterosklerózy. Je jejím finálním stádiem a příčinou náhlých ischemických příhod, které jsou pro postiženého přímo život ohrožující.

Plát má charakteristické jádro a obal. Jádro je tvořeno pěnovými buňkami, makrofágy, T-lymfocyty, buňkami hladké svaloviny, vazivem a extracelulárními kapénkami lipidů. Fibrózní obal je z vaziva, a to především z kolagenu a proteoglykanů. Bylo vyzorováno, že osud aterosklerotického plátu závisí více na jeho stabilitě než na velikosti léze, tzn. velká, ale stabilní léze je spojena s menším rizikem komplikací (tj. ruptura, trombóza) než malá léze nestabilní.

Stabilní plát má malé jádro, menší obsah lipidů a pěnových buněk, silnou fibrózní čepičku a hladký povrch. Nejeví známky zánětu a není trombogenní.

Nestabilní plát má naopak velké jádro s velkým obsahem lipidů a pěnových buněk, ztenčenou fibrózní čepičku a cévní stěny jsou zaníceny. Dochází k praskání fibrózního krytu a trombóze.

Dříve převládala představa, že k ischemii dochází při uzavření cévy uloženými lipidy v lumen cévy, dnes již víme, že plát se tvoří ve stěně cévy, a tak průtok krve nemusí být nijak poznamenán. To vede k obtížné diagnostice především zobrazovacími metodami a v některých případech je objev léze náhodný, často až při infarktu myokardu.

3.5 Zánět

Bylo zjištěno, že zánět a infekce hrají důležitou roli v celém aterosklerotickém procesu, a to ať se jedná o akutní či chronické onemocnění. Můžeme mezi ně kromě samotného zánětu a sepse zařadit traumata, srdeční infarkt, velké operace, atp., a obecně je můžeme charakterizovat jako syndrom systémové zánětlivé odpovědi organismu (SIRS). Během těchto stavů se metabolismus lipidů a LP značně pozměňuje.

U SIRS dochází ke zvýšení syntézy TG z důvodu cytokiny (TNF- α , IL-1, INF- α,β,γ) stimulované lipolýzy tukové tkáně, díky které se zvyšuje plazmatická koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin. Cytokiny kromě destrukce tukové tkáně mohou inhibovat aktivitu LPL, a tím zamezovat správnému odbourávání lipoproteinů.

Mění se také složení lipoproteinů. V přítomnosti bakteriálního LPS (exotoxin) se zvyšuje podíl sfingomyelinu v částicích LDL, což zvyšuje jeho aterogenní účinek. Akutní stavy jsou doprovázeny oxidačním stresem, který přispívá k oxidační modifikaci LDL. Také zvýšená aktivita sekreční fosfolipázy A₂, která je spojena se zánětem a infekcí, svým působením modifikuje LDL částice, které pak svým charakterem připomínají malé denzní LDL (sd-LDL). Sd-LDL nejsou dostatečně afinní k LDL receptorům, proto nejsou správně odbourávány, a na místo toho jsou vyloučeny scavengerovými buňkami.

Další poznamenanou částicí je HDL. HDL plní rozhodující funkci v reverzním transportu cholesterolu a v ochraně LDL před oxidačním stresem. Během zánětu se koncentrace HDL snižuje. Snižuje se také koncentrace ApoA-I, který je během zánětu vytěšňován sérovým amyloidem A (reaktant akutní fáze), čímž se snižuje schopnost HDL transportovat cholesterol. Zároveň také klesá aktivita nejdůležitějšího enzymu – paraoxonázy (PON-1) – poskytujícího antioxidační kapacitu, a tím HDL ztrácí i svou ochrannou funkci. Tyto změny ve složení lipoproteinu vedou k jeho předčasnému katabolismu, a tím ke kolapsu zpětného transportu cholesterolu. Fosfolipidy s cholesterolem jsou pak ukládány v periferních tkáních (Žák, 2011, s. 106).

Nejsou to však pouze změny v lipoproteinech, které by byly pojítkem mezi zánětem a aterosklerózou. Ve spojitosti s aterosklerózou nacházíme v těle několik komplikovaných a komplexních procesů, které aterogenezi ovlivňují. Například zánět může vyvolat hypertenzi, při níž se produkuje angiotenzin II, který má přímý prozánětlivý vliv. Zvyšuje produkci IL1, IL-6 a podporuje expresi VCAM-1. Zároveň vysoký krevní tlak mechanicky poškozují cévní stěnu. U DM zase vznikají modifikované (glykované) molekuly, které indukují endoteliální buňky k produkci cytokinů. Při obezitě, především viscerální, sama tuková tkáň produkuje cytokiny (TNF- α , IL-6). Navíc se přidává predispozice k inzulinové rezistenci a DM.

Přestože se řadí spíše k hypotézám, jsou dalším důležitým podnětem infekční agens. I přes to, že výsledky studií nejsou vždy jasné, jsou mikroorganismy v aterosklerotických ložiscích morfoloogicky prokázány a v séru se vyskytuje titr protilátek proti specifickým antigenům mikroorganismu. Na základě přímé detekce v plátech a sérologického vyšetření se ve spojitosti s aterosklerózou nejvíce zmiňují *Chlamydia pneumoniae*, Cytomegalovirus, Herpes simplex virus, virus hepatitidy A, *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis* a další.

Infekční agens působí na cévu několika mechanismy – molekulární mimikry, produkce toxinů Gram negativních bakterií, přímá infekce cévní stěny (CMV), "echo" hypotéza. Molekulární mimikry jsou v podstatě autoimunitní odpověď na stresové proteiny. Za fyziologických stavů jsou stresové proteiny uvnitř všech

buněk lidského organismu. Při vystavení buňky chemickému, termickému či mechanickému stresu se bílkoviny teplotního šoku HSP 60 dostávají do plazmatické membrány a dávají signál imunitnímu systému, že dochází k poškození buňky či napadení infekčním agens. Chlamydia pneumonia má velmi podobný stresový protein, který spouští obranný mechanismus na endotelu cévy. "Echo" hypotéza spočívá v odezvě imunitního systému, která vede k produkci cytokinů a zánětlivých buněk. Ty pak mohou působit mimo původní místo infekce (Srovátka, 2007, s. 286).

Infekční agens nejsou hlavním samostatným spouštěčem onemocnění, nicméně infekce může vést k poškození cévy, rozvoji a urychlení aterosklerotického procesu.

4 Základní biochemická vyšetření

Jak bylo studiem zjištěno, z měřitelných analytů má nejbližší vztah k rozvoji aterosklerózy hodnota koncentrace cholesterolu. Nejkritičtější pro rozvoj aterosklerózy je tzv. lipidová triáda – vysoký celkový cholesterol, vysoký LDL-C a nízký HDL-C. Tyto parametry jsou proto sledovány a v klinických laboratořích běžně stanovovány.

Vyšetření se provádí ze séra či plazmy. Odběr krve se provádí do zkumavky ošetřené antikoagulačním činidlem. Pacient by den před odběrem neměl konzumovat tučné pokrmy a potraviny podporující lipolýzu. Odběr je prováděn po 12–14 h dlouhém lačnění (přes noc) a je doporučeno před odběrem nekouřit (Zima, 2013, s.192).

4.1 Celkový cholesterol

Cholesterol je základní strukturální molekulou všech buněčných membrán. Jedná se o důležitou látku pro syntézu steroidních hormonů, tvorbu žlučových kyselin, resobci, transport a utilizaci TG a vitaminů rozpustných v tucích.

Fyziologická hodnota koncentrace cholesterolu by měla být v rozmezí 3,5–5,2 mmol/l. Při zvyšování koncentrace riziko roste exponenciálně. Již při zvýšení koncentrace na hodnotu 6,5 mmol/l se riziko zdvojnásobuje, při hodnotě 7,4 mmol/l je riziko čtyřnásobné (Racek, 2006, s.173).

V plázmě se vyskytuje cholesterol volný, neesterifikovaný (cca 25–40 %) a cholesterol esterifikovaný (60–75 %), který je jeho zásobní a transportní formou. Cholesterol esterifikovaný mastnými kyselinami je hydrofóbní, a proto musí být transportován pomocí lipoproteinů. V laboratoři však tyto dvě formy nerozlišujeme a měříme pouze celkový cholesterol.

Stanovení cholesterolu

Cholesterol se stanovuje enzymovou metodou. Nejprve jsou estery cholesterolu pomocí cholesterolesterázy (CE) rozštěpeny na volný cholesterol a mastné kyseliny. Volný cholesterol je dále oxidován cholesteroxidázou

(CHOD) na cholestenon a peroxid vodíku, a ten pak v přítomnosti peroxidázy (POD) reaguje s fenolem a 4-aminoantipyrinem za vzniku barevného komplexu chinoniminu. Vzorek je fotometricky změřen a absorbance barevného produktu je přímo úměrná koncentraci cholesterolu v krevní plazmě.

4.2 LDL-C

Nestanovujeme množství samotného lipoproteinu v séru, ale množství cholesterolu přenášené těmito částicemi. Stanovení může být buď nepřímé, tj. výpočtem, a nebo přímé, měřením koncentrace v séru.

Stanovení přímé

Během přímého stanovení je nutné zajistit, aby nereagovali s LDL i další lipoproteiny. Je toho možné docílit několika postupy.

Cholesterol se z non-LDL uvolní pomocí detergentu, reaguje s CHE, CHOD, POD a 4-aminoantipyrinem za vzniku bezbarvého produktu. V dalším kroku se uvolní cholesterol z LDL částic, který dále reaguje s enzymy a N,N-bis-m-toluidinem za vzniku barevného produktu, který je fotometricky odečten.

Dalším možným postupem je stabilizace LDL částic prováděná emulgací. Zbylé lipoproteiny reagují s CHE, CHOD, katalázou a N-3,5-dimethoxyanilinem za vzniku bezbarvého produktu. Poté se do směsi přidá činidlo obsahující detergent, který uvolní cholesterol z LDL, a ten pak reaguje s enzymy z prvního činidla, s peroxidázou a 4-aminoantipyrinem za vzniku barevného produktu, který je fotometricky odečten (Štern, 2011).

Stanovení nepřímé

Vzhledem k tomu, že přímé stanovení LDL-cholesterolu nemusí být kvůli heterogenitě částic a podobnosti jednotlivých non-HDL částic spolehlivé, se v praxi často používá stanovení nepřímé pomocí Friedewaldova výpočtu.

Vzorec vychází z úvahy, že celkový cholesterol je dán součtem cholesterolu neseného všemi LP částicemi. Pokud tedy chceme získat hodnotu LDL-C,

musíme od celkového cholesterolu odečíst všechny non-LDL částice (VLDL, IDL, HDL). S IDL se kvůli zanedbatelné koncentraci nepočítá, a tak se dostáváme ke vzorci: $LDL-C = \text{celkový cholesterol} - (HDL-C + VLDL-C)$. Vzhledem k tomu, že koncentrace VLDL-C je obtížně stanovitelná, nahradil ji Friedewald poměrovým zastoupením TG a cholesterolu v částici - 2,2:1 a ve vzorci tak nahradíme neznámou VLDL-C za $TG/2,2$.

$$LDL-C = \text{celkový cholesterol} - (HDL-C + TG/2,2)$$

Výpočet však neplatí, pokud se v séru vyskytují chylomikrony, koncentrace TG je vyšší než 4,5 mmol/l nebo při vyšší koncentraci IDL (Soška, 2008, s. 943).

4.3 Non-HDL-C

Stanovení non-HDL cholesterolu, resp. jeho výpočet, se provádí v situacích kdy není možné přímo vyšetřit hladinu LDL-C. Do non-HDL cholesterolu patří cholesterol v chylomikronech, VLDL, IDL, LDL a Lp(a). Výsledkem výpočtu je přijatelná orientační koncentrace aterogenního cholesterolu v séru pacienta.

$$\text{Non-HDL-C} = \text{celkový cholesterol} - \text{HDL-C}$$

Jak plyne ze vzorce, pro výpočet non-HDL cholesterolu je nutné znát koncentraci celkového cholesterolu a HDL cholesterolu (Zima, 2013, s. 196).

4.4 HDL-C

Stanovení HDL-C je podobné stanovení cholesterolu v LDL částicích. Má také dva kroky - v prvním dochází k zablokování lipoproteinů, které nejsou předmětem našeho stanovení, ve druhém kroku pak dochází k samotné reakci cholesterolu a jeho změření.

Blokaci non-HDL lipoproteinů můžeme provést dvěma metodami. Použitím protilátek namířených proti apoB, který se nachází ve struktuře LDL, VLDL a chylomikronů, dosáhneme vytvoření imunokomplexu, který s přidávanými činidly nereaguje. V jiné metodě se zase využívá polyaniontů a polymerů, které

se naváží na non-HDL. Ty pak nereagují stejně jako imunoinhibované LP v předchozí metodě. Cholesterol je pak pomocí detergentu uvolněn z lipoproteinové částice a reaguje s enzymy CHE, CHOD, POD, fenolem a 4-aminoantipyrinem za vzniku barevného komplexu, který se fotometricky odečítá.

4.5 Apolipoprotein B

ApoB je protein tvořící bílkovinnou složku LDL částice. Díky tomu můžeme pomocí jeho stanovení určit obsah LDL v séru pacienta. Hodnota LDL-C nemusí být při stanovení výpočtem vždy zcela přesná, a proto se jako doplňující vyšetření stanovuje také apoB.

Ke stanovení se používá imunoturbidimetrická metoda, kdy reaguje antigen s protilátkou, tedy apolipoprotein B a protilátka proti lidskému apoB. Vyhodnocení je prováděno pomocí fotometrie a výsledek je odečten z kalibrační křivky. Ke stanovení apoB-48 je možné využít elektroforézy či imunoblottingu (Zima, 2013, s.199).

4.6 Triacylglyceroly

Triacylglyceroly jsou estery glycerolu a mastných kyselin. Jsou syntetizovány v játrech, tukové tkáni a tenkém střevě, jsou také přijímány potravou. V organismu tvoří zásobu energie.

Triacylglyceroly se stanovují pomocí enzymové metody. TG jsou rozštěpeny na glycerol a mastné kyseliny pomocí lipoproteinové lipázy. Hydrolyzovaný glycerol fosforyluje pomocí glycerolkinázy na glycerol-3-fosfát, který je dále oxidován na dihydroxyacetonfosfát. Během poslední reakce vzniká peroxid vodíku. Můžeme tedy využít reakci peroxidu s 4-aminoantipyrinem a 4-chlorfenolem a fotometricky pak změřit absorbanci vzniklého červeného zabarvení chynoniminového barviva při 500 nm. Lze také oxidovat přímo glycerol pomocí glyceroldehydrogenázy. Vzniká pak dihydroxyaceton a současně se NAD⁺ redukuje na NADH, což můžeme pozorovat jako změnu absorbance (při 340 nm) (Štern, 2011).

5 Novější biochemické markery

V současné době vyšetřované analyty nejsou vhodné pro sledování postupu aterosklerotického procesu. Jedná se o parametry metabolismu lipidů, které nám dávají informaci o bilanci lipidů v těle, ale ne o samotném průběhu onemocnění. Kvůli vysoké incidenci aterosklerózy v populaci je nutné hledat látky, které by nám o fázi a závažnosti onemocnění řekly více.

Jsou popisovány nové biomarkery, které mohou v budoucnosti vést k lepší, a hlavně rychlejší, identifikaci rizika vzniku aterosklerózy a napomoci lékařů k indikaci vhodné léčby. Vzhledem k závažnosti onemocnění je nutné tyto biomarkery hledat, popisovat, zjistit jejich funkci v aterosklerotickém procesu a snažit se poznatky uplatnit k diagnostice v praxi.

Definice biomarkeru

Biologický marker, zkráceně biomarker, je látka, která je syntetizována v daném organismu a její přítomnost či změna koncentrace indikuje výskyt patologie v organismu, poukazuje na abnormality ve fyziologii, existenci onemocnění a jeho vývoj. Tato substance musí splňovat několik kritérií. Mělo by se jednat o stabilní analyt, jehož vlastnosti v daném organismu jsou jasně definované a zároveň je známa jeho biologická variabilita, index individuality a kritická diference. Měl by být v laboratoři snadno měřitelný, a to nejlépe metodou, která se dá automatizovat. Také by měl být jasně popsán vztah mezi markerem a prognózou onemocnění, a měla by existovat specifická léčba tohoto onemocnění, jejíž účinek se dá prokázat pomocí změny v koncentraci biomarkeru. Jeho výpovědní hodnota by měla být vyšší, než u již existujících a používaných vyšetření (Racek, 2012).

5.1 Markery intenzity zánětlivých procesů

Jak se ve studiích zkoumajících vznik a procesy aterosklerózy ukázalo, ateroskleróza je se zánětem velmi úzce spjata. Pokud by se tedy našel vyhovující biomarker, mohlo by být zánětlivého charakteru onemocnění využito ke včasné diagnostice a monitoringu aterosklerózy.

5.1.1 C-reaktivní protein

CRP je protein akutní fáze, který se podílí na imunitní odpovědi organismu. Pravděpodobně se jedná o fylogenetického předchůdce adaptivní imunity. Strukturou se řadí mezi pentraxiny – proteiny uspořádané do diskoidního útvaru tvořeného pěti nekovalentně vázanými podjednotkami, které jsou schopny vázat vápník. Je syntetizován v játrech a jeho syntéza je zapříčiněna zvýšenou hladinou cytokinů, především IL-6 (Kvasnicová, 2003). Během akutního poškození je hepatocyty sekrenován do krve a jeho funkcí je se při poškození organismu navázat na poškozené části (membrány, chromatin, celé postižené buňky, lipoproteiny), při napadení patogeny provádí jejich opsonizaci, aktivuje komplementový systém a pomocí fagocytů dochází k eliminaci mikroorganismů a poškozených struktur.

Fyziologická koncentrace CRP v plazmě je do 5 mg/l a jeho biologický poločas eliminace je cca 19 hodin, při navázání na ligand 5–9 hodin.

Běžně se jeho stanovení používalo pro účely diagnostiky a monitoringu stavů akutního zánětu, traumat, operací, autoimunitních chorob, malignit a podobně. Kromě jeho důležité role v průběhu akutního zánětu se však zjistilo, že se nachází v samotných aterogenních lézích a nejedná se pouze o biomarker – CRP má proaterogenní vlastnosti. Jeho přítomnost podporuje expresi adhezivních molekul (ICAM-1, VCAM-1, E-selektin), což zvyšuje adhezi makrofágů k endotelu, podporuje vazokonstrikci, agregaci trombocytů a proliferaci buněk hladké svaloviny cévní stěny, ovlivňuje koagulaci stimulací tvorby PAI-1 a inhibicí tPA a podporuje tvorbu volných radikálů, které vedou k modifikaci LDL (Racek, 2014).

Velkým přínosem je však zjištění, že zvýšené hodnoty CRP znamenají vysoké riziko rozvoje kardiovaskulárního onemocnění i pro pacienty bez anamnézy KVO. Tyto nízké, ale směrodatné koncentrace jsou měřeny vysoce senzitivní metodou a výsledek je vydáván pod označením hs-CRP. Tento biomarker naměříme zvýšený nejen ve vztahu k infarktu myokardu, ale také u cévních mozkových příhod i uzávěru periferních cév. Hodnoty hs-CRP by měly být menší než 1 mg/l, aby pro pacienta nepředstavovaly zdravotní riziko. Hladiny

mezi 1–3 mg/l znamenají střední riziko, hodnoty nad 3 mg/l znamenají vysoké riziko postižení KVO. Vyšetření je doporučováno v případech podezření na možný rozvoj KVO u mužů ve věku do 50 let, u žen do věku 60 let. Vyšetření u starších, ale asymptomatických pacientů může být indikováno pro správnou volbu léčby (AACC, 2015).

Stanovení hs-CRP

Vyšetření se provádí ze séra pacienta. Odebírá se plná srážlivá krev, která se následně centrifuguje. Při vyšetření CRP k určení míry rizika kardiovaskulární příhody je doporučováno provést odběr na lačno.

Klasicky se CRP v laboratořích měří pomocí turbidimetrie či nefelometrie. Tyto metody jsou však pro ultrasenzitivní stanovení nevhodné. Pro citlivější stanovení jsou proto používány imunochemické metody, které jsou schopné detekovat reaktivní protein v koncentracích již cca 0,1 mg/l a jsou dodávány v komerčních kitech, vhodné pro automatizaci. Soupravy dodávané dnes již téměř všemi laboratorními výrobci však nejsou dostatečně standardizovány, a tak výsledky mezi soupravami často nejsou porovnatelné a může docházet k chybám v interpretaci. Navíc se napříč výrobci liší senzitivita kitů – nejvýhodnější by bylo, aby diagnostická souprava nabízela dostatečnou citlivost pro určení jak CRP, tak i hs-CRP. Tomu tak ale v praxi není (Šprongl, 2003).

Analytickou metodou volenou pro měření koncentrace hs-CRP je imunoturbidimetrie. Jedná se o využití principu turbidimetrie ve spojení s imunochemickou reakcí. Protilátka s proteinem precipituje a vytváří komplex, který je pomocí ochranného roztoku (polyethylenglykol) unášen na místo spektrofotometrického měření. Je měřena absorpce procházejícího světla (záření). Naměřená absorbance je pak přímo úměrná obsahu imunokomplexů (Zima, 2013, s. 1026).

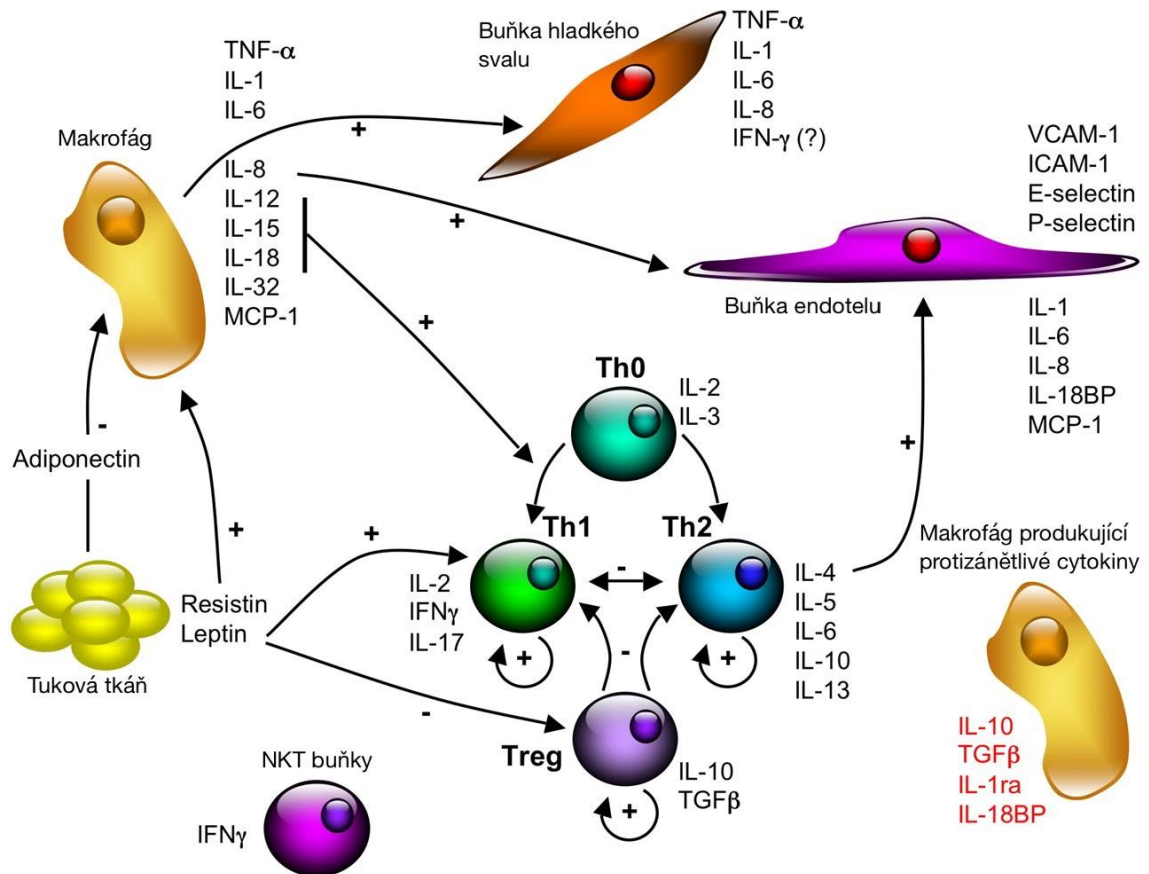
5.1.2 Cytokiny

Dalšími se zánětem souvisejícími látkami jsou cytokiny. Jedná se o různorodou skupinu polypeptidových hormonů, jejichž funkcí je komunikace mezi buňkami. Jsou syntetizované přímo v buňkách a ovlivňují buď vlastní růst a vývoj (jsou autokrinní), nebo jsou sekrenovány do okolí a ovlivňují metabolismus buněk v nejbližším okolí (parakrinní efekt). Cytokiny řídí proliferaci, diferenciaci a migraci různých typů buněk. Jsou důležité pro imunitní systém – jsou nezbytné pro diferenciaci buněk specifické i nespecifické imunity, kontrolují jejich vývoj, funkci, iniciují a řídí imunitní reakce.

Cytokiny můžeme rozdělit do několika skupin – interleukiny IL, tumor nekrotizující faktory TNF, interferony IFN, kolonie stimulující faktory CSF, transformující růstový faktor TGF a chemokiny.

V aterosklerotické lézi můžeme najít různé skupiny cytokinů – imunoregulační, prozánětlivé, chemokiny a růstové faktory (Češka, 2012, s. 27). Cytokiny doprovázejí celý aterosklerotický proces. Jsou uvolňovány aktivovanými buňkami imunitního systému jako reakce na infekci, toxické látky, protilátky, traumatické stavy, a podle některých hypotéz by primárním spouštěčem produkce cytokinů mohly být modifikované lipidy, přesněji oxidovaný LDL. OxLDL stimuluje expresi adhezivních molekul na povrchu endotelu, chemicky přitahuje monocyty, diferencuje je v makrofágy, které při pohlcení oxLDL produkují prozánětlivé cytokiny (TNF- α , IL-1, IL-6). Studie však neprokázaly, že by cytokiny byly samostatným spouštěčem aterosklerózy (Tedgui, 2005). V aterosklerotických plátech byla díky imunohistochemickým metodám, in situ hybridizace a PCR nalezena celá řada cytokinů - IFN- γ , IL-1, MCP-1, M-CSF, PDGF, TNF- α . V rozvinutějších lézích dochází kvůli působení prozánětlivých cytokinů k apoptóze makrofágů, pěnových buněk a buněk hladkého svalstva. To vede ke zvětšování lipidového jádra, ztenčení fibrózní čepičky a destabilizaci plátu. Ačkoliv apoptóza fyziologicky napomáhá k eliminaci zánětu, v tomto případě jsou během indukce apoptózy uvolňovány další prozánětlivé cytokiny (IL-1 β , IL-18). Díky vlivu cytokinů v lézi dochází také ke změně vlastností endotelu – IL-1, TNF- α regulují transkripci genu, který

ovlivňuje koagulaci a pravděpodobně tím napomáhají vzniku trombu. Zánětlivé cytokiny snižují produkci tPA, naopak zvyšují produkci PAI-1, zvyšují produkci krevních destiček, a tím zvyšují pravděpodobnost trombozy komplikované léze.



Obr. 5: Cytokiny účastníci se ateroskleróze (Tedgui, 2006)

Vzhledem k diverzitě rodiny cytokinů by bylo složité vyšetřovat všechny s aterosklerózou související cytokiny. Jako vhodný adept pro další výzkum byl vybrán IL-6 a IL-18.

IL-6 byl prohlášen za samostatný faktor rizika kardiovaskulárního onemocnění. Jedná se o multifaktoriální cytokin s prozánětlivými, proaterogenními a trombogenními účinky. Je produkován T-lymfocyty a makrofágy a je mediátorem akutní reakce a hořčnatých stavů, stimuluje produkci proteinů akutní fáze (CRP), způsobuje zvýšení tělesné teploty, podporuje vývoj B-lymfocytů a naopak zpomaluje vývoj T-lymfocytů. Studiemi bylo prokázáno, že zvýšená koncentrace IL-6 u asymptomatického pacienta znamená zhruba 2,5x zvýšené riziko kardiovaskulární příhody (Shah, 2014, s.3).

IL-18 je cytokin patřící do nadrodiny IL-1. Je produkován převážně makrofágy a má nezbytnou roli v buněčné imunitě. Stimuluje NK buňky a T-lymfocyty k produkci IFN- γ , který následně aktivuje další buňky imunitního systému. Patří mezi prozánětlivé cytokiny a má proaterogenní vlastnosti. Studie prokázaly zvýšené hladiny IL-18 jak u asymptomatických pacientů s možným kardiovaskulárním rizikem, tak i u pacientů, kteří mají již KVO diagnostikováno (Shah, 2014, s.3).

Stanovení cytokinů

Cytokiny se stanovují ze séra pacienta. Odebírá se plná krev a je doporučeno používat speciální odběrový materiál, aby nedošlo ke kontaminaci, a tím tvorbě cytokinů *in vitro*. Dále je nutné co nejdříve vzorek zcentrifugovat a uchovávat při nízkých teplotách (cca $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Živná, c2016). Nejčastější metodou využívanou pro stanovení sérových cytokinů je ELISA. Jedná se o imunochemickou reakci, která probíhá v mikrotitrační destičce, na jejímž dně jsou ukotvené monoklonální protilátky proti danému cytokinu. Na protilátku se naváže pouze specifický antigen a vytvoří komplex protilátka-antigen, nenavázaný zbytek je odmyt. Ke komplexu se přidá enzymem (peroxidáza) značená protilátka, která se naváže na komplex protilátka-antigen a po inkubaci se nekonjugovaný zbytek opět vymyje. Následně je přidán substrát, který reaguje s enzymem za vzniku barevného produktu, který se měří spektrofotometriky a naměřené hodnoty odpovídají aktivitě (koncentraci) cytokinu (Bartůňková, Špíšek, 2011). Cytokiny lze detekovat i jinými metodami (RIA, IRMA, RT-PCR, imunoblotting), ale díky své jednoduchosti a menším finančním nárokům je v klinické laboratoři preferována ELISA.

Vzhledem ke své rozporuplné výpovědní hodnotě nepřináší vyšetření aktivity (koncentrace) cytokinů o moc lepší informace, než běžněji prováděné vyšetření CRP. Mohlo by však být jedním z parametrů algoritmu hodnocení rizik a přispět tak k lepšímu, přesnějšímu zařazení pacientů podle rizika kardiovaskulární příhody.

5.2 Markery stability aterosklerotického plátu

Markery vulnerability fibrózního plátu stále velmi úzce souvisí se zánětem. Zánětlivé procesy uvnitř plátu totiž vedou k vytváření nekrotického jádra, zeslabování fibrózní čepičky a tím k jeho destabilizaci. Zvyšují tak riziko rozvoje komplikací.

5.2.1 PAPP-A

S těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A, tedy PAPP-A, je zinek vážící metaloproteináza. Odštěpuje IGF-1 (inzulinu podobný růstový faktor) z komplexů, a tím mu umožní navazovat se na receptory (podobné inzulinovým receptorům) na membránách buněk a stimulaci jejich dělení a diferenciaci. U těhotných se vyskytuje ve formě dimerického tetrameru a pro screeningové vyšetření v těhotenství se, společně s měřením hladiny volné podjednotky β -hCG a ultrazvukového vyšetření šijového projasnění, používá již delší dobu. Odhaluje chromozomové aberace, spontánní potraty či smrt plodu, nízké hodnoty PAPP-A jsou rizikové pro budoucí rozvoj preeklampsie (Málková, 2009, s. 15).

Kromě svého významu v prenatálním screeningu se však ukazuje, že by PAPP-A mohl být i vhodným markerem destabilizace fibromatózního plátu. Na jeho vztah k ateroskleróze jsou v literatuře různé pohledy. Jedna teorie tvrdí, že přispívá k zánětlivé reakci v aterosklerotické lézi, podporuje růst lipidového jádra a ztenčování kolagenové čepičky a má tudíž jasně proaterogenní účinky. Teorie druhá zase předpokládá, že díky aktivaci IGF-1, který má na kardiovaskulární systém ochranné účinky, by měl mít PAPP-A opačný efekt a zaznamenané zvýšené hladiny PAPP-A u akutních koronárních syndromů jsou dávány do souvislosti se snahou organismu zvýšit biologickou aktivitu IGF-1. Tomu by nasvědčovalo i zvýšení PAPP-A v těhotenství, kdy imunomodulační účinky IGF-1 suprimují imunitní systém matky, aby nedocházelo k odmítnutí plodu jako cizorodého tělesa (to by vysvětlovalo, proč při nízkých hodnotách PAPP-A dochází ke spontánním potratům) (Málková, 2009, s.16).

Stanovení PAPP-A

Stanovení je prováděno ze séra. Krev se odebírá do zkumavky bez antikoagulačního ošetření a provádí se nalačno. PAPP-A je v rámci těhotenského screeningu vyšetřována chemiluminiscenční metodou (Nezvedová, 2010, s.3). Dodávány jsou komerční kity a metoda je plně automatizovaná. Chemiluminiscence je schopnost vyzařovat světlo jako důsledek chemické reakce, kdy je vzniklá energie uvolněna ve formě fotonů a právě toto světélkování je zaznamenáno. Nicméně metoda, alespoň v současně nabízené citlivosti, není vhodná ke stanovování PAPP-A ve vztahu ke kardiovaskulárnímu riziku. Hodnoty analytu se totiž u kardiovaskulárních onemocnění pohybují zhruba kolem 20–30 mIU/l, zatímco hodnoty objevující se při screeningu chromozomálních aberací se pohybují v rozmezí 600–10 000 mIU/l (Málková, 2009, s.17).

Pro stanovení PAPP-A jako markeru aterosklerotického rizika je nutné použít ultrasenzitivní metody jako je ultrasenzitivní PAPP-A ELISA, která je schopná detekovat již 0,06 mIU/l. Jedná se o sendvičovou imunoanalýzu, kdy je na dně mikrotitrační testičky uchycena anti PAPP-A protilátka, na kterou se naváže PAPP-A ze séra pacienta. Na tento komplex se později naváže konjugát a po přidání substrátu vzniká barevný produkt, který je fotometricky odečten (ALPCO, 2010, s.2). Tyto metody nejsou prozatím dodávány pro klinické využití a slouží tedy pouze výzkumu.

5.2.2 Fosfolipáza A₂ asociovaná s lipoproteiny

Fosfolipáza A₂ asociovaná s lipoproteiny (Lp-PLA₂, může být označována také jako PAF-AH, *platelet activating factor acetylhydrolase* – acetylhydroláza destičkového aktivačního faktoru) je enzymem patřícím do rodiny fosfolipáz, které hydrolyzují membránové fosfolipidy. Fyziologický účinek fosfolipázy A byl poprvé popsán ve spojitosti s hadím jedem, kde hydrolýza vyvolává zvýšenou propustnost buněčných membrán, hemolýzu a nekrózu. Lp-PLA₂ je syntetizována v zánětlivých buňkách a secrenována do krve, kde se prostřednictvím apoB navazuje na lipoproteinové částice. Zhruba dvě třetiny jsou navázány na LDL, zbytek pak na HDL. Na povrchu lipoproteinu pak hydrolyzuje

oxidované fosfatidylcholiny za vzniku lysofosfatidylcholinu LysoPC a oxidovaných mastných kyselin OxFA. Oba tyto produkty mají silné prozánětlivé a apoptické účinky (exprese adhezivních molekul, chemoatrakce, stimulace proliferace zánětlivých buněk, indukce apoptózy, cytotoxicita, aj.). To vede k nekróze jádra plátu, a tím jsou aktivovány další makrofágy, které vychytávají další oxLDL molekuly, které jsou hydrolyzovány pomocí Lp-PLA₂ a produkcí silných chemoatraktantů se celý proces opět opakuje (Cibulka, 2011).

Existuje také hypotéza, že by Lp-PLA₂ mohla mít protektivní funkci. Hydrolyza aktivačního destičkového faktoru vedoucí k inhibici agregace trombocytů by mohla zabránit vzniku trombu u komplikovaných lézí. Ovšem tato hypotéza nebyla epidemiologickými studiemi potvrzena a Lp-PLA₂ je tedy stále považována pouze za proaterogenní faktor (Franeková, 2010).

Velká výhoda Lp-PLA₂ jako markeru je její vysoká specifita. Její koncentrace v krvi se totiž nezvyšuje z jiných příčin (zánět, zátěž, stres) jako tomu je u markerů zánětu, jejichž aktivita vzrůstá i při zánětech nevaskulárního původu, je specifická pouze pro zánět aterosklerotického plátu. Také její biologická variabilita je daleko nižší než např. u CRP a nevykazuje závislost na "velkých" rizikových faktorech. Díky těmto vlastnostem se zdá, že by se mohlo jednat o diagnosticky velmi významný marker (Franeková, 2013).

V klinických laboratořích ve světě je Lp-PLA₂ již vyšetřována, nicméně v České republice stále není její stanovení rozšířeno.

Stanovení Lp-PLA₂

Stanovení se provádí ze séra či plazmy pacienta a je nutné dodržet speciální preanalytické podmínky. Krev je odebrána do zkumavky ošetřené heparinem či EDTA. Analyt je velmi citlivý na teplotu, vzorek se nesmí ohřát na pokojovou teplotu a je nutné ho nechat minimálně 2 dny po odběru v chladu (2–8 °C) nebo při urychlení procesu minimálně na 16 hodin vzorek zamrazit na teplotu –20 °C a méně. Poté můžeme stanovovat aktivitu enzymu či koncentraci enzymu ve vzorku.

Ke stanovení se využívá PLAC test dodávaný firmou diaDexus. Jedná se o jedinou soupravu ke stanovení Lp-PLA₂ na světovém trhu a je dodávána

ve dvou provedeních – jednak jako set pro imunoturbidimetrii a také jako souprava pro mikrodestičkovou ELISA metodu. Při imunoturbidimetrii se ke vzorku pacienta přidají specifické monoklonální protilátky a měří se intenzita procházejícího světla, která je ovlivněna částečnou absorpcí záření precipitovanými komplexy. Hodnota absorbance je pak přímo úměrná obsahu lipoproteinové fosfatázy. U mikrodestičkové ELISA metody je jedna anti-Lp-PLA₂ protilátka imobilizována v mikrojamkách, po přidání vzorku a inkubaci se na ní navazuje antigen (Lp-PLA₂). Do jamky se dále přidá druhá anti-Lp-PLA₂ protilátka značená peroxidázou a následuje dlouhá inkubace (180 min). Poté se jamka promyje pufrům a přidá se substrát, který reaguje s peroxidázou za vzniku modrého zbarvení. Tato reakce se ukončuje přidáním tzv. "stop roztoku", který zároveň změní barvu roztoku na žlutou. Intenzita zbarvení roztoku se měří spektrofotometricky při 450 nm a koncentrace je vypočítána z údajů kalibrační křivky (diaDexus, 2009).

Podle výsledků již vyhodnocených epidemiologických studií je lipoproteinová fosfolipáza vhodným novým biochemickým markerem. Některé její fyziologické vlastnosti jsou stále předmětem výzkumu, ale již dnes je zařazena do skórovacího panelu pro vyhodnocování kardiovaskulárního rizika. Další výzkum se bude pravděpodobně zaměřovat na možné terapeutické využití tohoto analytu.

5.2.3 CD40L

CD40L (CD ligand, označován také CD154) je glykoproteinem vyskytujícím se na membránách T-lymfocytů (v menší míře i na leukocytech, trombocytech, endoteliálních buňkách), který zprostředkává vazbu T-lymfocytu s B-lymfocytem a stimuluje ho k tvorbě protilátek. Je zařazen do skupiny tumor nekrotizujících faktorů TNF. Ve volné formě se v plazmě vyskytuje při aktivaci trombocytů, což může být ukazatelem vznikajícího trombu – souvisí tedy se stabilitou aterosklerotického plátu. Nekoreluje s hodnotami CRP a oproti stanovení kardiálních markerů se jeho hladina zvyšuje před samotnou akutní

příhodou, ve chvíli kdy ještě nedochází k nekróze myokardu (Osmančík, 2003, s. 3).

Stanovení CD40L

Cirkulující CD40L se stanovuje z krevní plazmy. Krev je odebrána do zkumavky ošetřené heparinátém a pro stanovení CD40 ligandů je k ní na 4 hodiny přidán phorbol 12-myristate 13-acetát (specifický aktivátor), ionomycin a monoklonální protilátka. Po 4hodinové inkubaci je vzorek vyhodnocen pomocí průtokové cytometrie (Thon, 2010).

5.3 Markery dalších rizikových faktorů

Aterosklerotický proces je velmi komplexní a složitý děj a faktorů pozitivně ovlivňujících vznik a vývoj aterosklerózy je mnoho. Patří mezi ně například metabolické faktory, hemokoagulační a fibrinolytické faktory, oxidační stres, hormonální faktory, aj. V každé z těchto skupin se nachází několik pro aterosklerotický proces důležitých analytů. Tato kapitola bude věnována těm, kterým je v současné literatuře připisován možný prognostický význam.

5.3.1 Homocystein

Homocystein patří do skupiny metabolických faktorů. Tato aminokyselina je meziproduktem přeměny methioninu na cystein. Aby byl schopen přeměny na cystein, vyžaduje přítomnost vitamínu B₁₂ a kyseliny listové. Studiemi byla prokázána významná korelace zvýšených hodnot Hcy a manifestací KVO, a hyperhomocysteinémie je tedy považována za nezávislý rizikový faktor. Zvýšená koncentrace Hcy bývá způsobena nedostatkem kys. listové a vitaminů B ve stravě, výjimečně se jedná o genetickou chorobu. Studie zkoumající vliv suplementace těchto vitaminů ale prokázala, že jejich doplnění potravou sice sníží hodnoty Hcy na fyziologické hodnoty, ale nemá žádný vliv na snížení četnosti kardiovaskulárních příhod (Češka, 2012). Homocystein zvyšuje vazbu lipoproteinu (a) na fibrin, stimuluje syntézu tromboxanu, aktivuje faktor V,

zabraňuje aktivaci proteinu C a tím působí protromboticky. Jeho působení indukuje proliferaci hladkých svalových buněk a naopak inhibuje proliferaci buněk endotelu. Molekula Hcy je schopná tvořit cyklickou formu a působí tím oxidační stres, který vede k oxidaci LDL částic. Také je svým působením schopen změnit metylaci genů a tím i jejich expresi (Žák, 2011).

Stanovení Hcy

Stanovení se provádí z krevní plazmy. Odběr je prováděn po 12hodinovém lačnění do zkumavky ošetřené EDTA, heparinem či citrátem sodným. Po odběru krve následuje centrifugace, která oddělí sérum od krevních elementů a zamezí vzrůstu koncentrace Hcy ve zkumavce. Metod stanovení je několik – těmi nejpoužívanějšími jsou metody imunologické, kdy dojde k uvolnění Hcy z vazby, je konvertován na S-adenosyl-L-homocystein a dále se postup dělí podle konečného detektoru, který má každý analyzátor jiný. Další metodou je enzymatické stanovení. Z Hcy získáváme po několika reakcích pyruvát, který se za přítomnosti laktátdehydrogenázy mění v laktát za redukce NAD^+ na $\text{NADH} + \text{H}^+$, což můžeme změřit jako změnu absorbance spektrofotometrem. Další, dnes již ne tak často používanou metodou, je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorescenční detekcí. Přestože tato metoda nabízí široký analytický rozsah pro stanovení aminokyselin, je příliš náročná na vybavení laboratoře a vyžaduje odborný, zkušený personál. Také je finančně náročnější než novější enzymatická či imunostanovení, a proto je využívána především ve výzkumu (Dubská, 2009, s. 93).

5.3.2 Fibrinogen

Jedná se o protein krevní plazmy, který je syntetizován ve formě dimeru v játrech. Je označován jako faktor I koagulační kaskády. Během krevního srážení jsou z něj působením trombinu vyštěpeny fibrinopeptidy a vzniká tak nerozpustný fibrin, který tvoří pevnou krevní zátku. V procesu aterosklerózy se uplatňuje při ruptuře fibrinózního krytu, kde vytváří trombus. Tato krevní sraženina pak může uzavřít cévu a podle lokace obstrukce dochází k IM, cévní mozkové příhodě, embólii či trombóze končetin. V několika studiích bylo potvrzeno,

že zvýšené hodnoty fibrinogenu v plazmě souvisí s kardiovaskulárním rizikem a byl uznán jako nezávislý rizikový faktor předpovědi kardiovaskulární příhody (Žák, 2011, s. 24).

Stanovení fibrinogenu

Vyšetřuje se z krevní plazmy. Krev je odebrána do zkumavky ošetřené citrátem sodným a je centrifugována. Princip používané metody je enzymatická přeměna protrombinu na trombin, který odštěpí z fibrinogenu peptid a vzniká fibrinová síť, která je detekována buď opticky či mechanicky. Měření je čas, který je ke koagulaci potřeba. Fibrinogen lze měřit také turbidimetricky po precipitaci v chloridu vápenatém za zvýšené teploty. Existují také imunochemické metody ke stanovení fibrinogenu, ale ty slouží pouze k semikvantitativnímu vyšetření (Štern, 2010).

5.3.3 Adiponektin

Adiponektin je hormonem tukové tkáně, patří do rodiny adipokinů a je syntetizován v adipocytech. Mezi jeho fyziologické účinky patří zvyšování inzulínové citlivosti tkání, snížení glukoneogeneze, zvýšení oxidace volných mastných kyselin a jejich využití v jaterních, svalových a tukových buňkách, snížení exprese adhezivních molekul endotelu a produkce protizánětlivých interleukinů (IL-1 a IL-10). Snižuje hladinu TG v séru a naopak zvyšuje počet HDL. Díky jeho protektivním vlastnostem se řadí mezi antiaterogenní faktory a v rámci aterosklerotického procesu je rizikové snížení jeho hladiny. Nižší koncentrace jsou zaznamenány u obézních jedinců, pacientů s DM II. typu a u pacientů s KVO (Žák, 2011, s. 25). Je pravděpodobné, že kromě využití ve formě biochemického markeru bude využíván k substituční léčbě (Haluzíková, 2007, s. 361).

Stanovení adiponektinu

Stanovení je prováděno ze séra metodou ELISA. Soupravy jsou dodávány několika firmami a touto metodou je možné stanovit také adiponektin o vysoké molekulové hmotnosti (HMW), který by s KVO mohl mít bližší vztah (Zima, 2013,

s. 14). V literatuře je uváděna také metoda RIA (radioimunoanalýza). Jedná se o kompetitivní stanovení, kdy antigen značený radioizotopem soutěží s nezačteným antigenem z vyšetřovaného séra a množství komplexu značeného izotopem je pak nepřímo úměrné množství adiponektinu v séru. Malý výsledný signál pak znamená vysokou hladinu adiponektinu – vzniklo méně komplexů se značeným antigenem, než s nezačteným. Od radiačních metod se však dnes již upouští.

5.3.4 Cystatin C

Cystatin C je jednoduchý neglykosylovaný protein patřící do skupiny proteáz. Je syntetizován všemi jadernými buňkami a je proto přítomen ve všech tkáních a biologických tekutinách. Společně s katepsiny zajišťuje regulaci katabolismu proteinů. Pokud je tato rovnováha porušena, dochází ke vzniku patologií (nádorové bujení, kardiovaskulární onemocnění). Nedostatek cystatinu C, respektive vyšší koncentrace katepsinů, vede k degradaci extracelulární matrix a zánětlivé reakci. Navzdory tomu můžeme v literatuře najít údaje o tom, že se zvýšením rizika kardiovaskulární příhody souvisí naopak zvýšená hladina cystatinu C. Byla také prokázána souvislost zvýšené hladiny cystatinu C s hyperhomocysteinémií (Franecková, 2010, s. 50). V klinické laboratoři se již stanovení cystatinu C provádí, ale pouze v souvislosti s glomerulární filtrací. Jeho produkce buňkami je konstantní a koncentrace v séru tedy zcela závisí na rychlosti glomerulární filtrace.

Stanovení cystatinu C

Cystatin C je stanovován ze séra či plazmy. Krev je odebrána do zkumavky ošetřené EDTA nebo heparinem. Stanovení je imunochemické pomocí metod PENIA (nefelometrie) a PETIA (turbidimetrie). Jsou využívány latexové částice se zabudovanou protilátkou, na kterou se po přidání séra naváže cystatin C a celý komplex je pak stanovován buď pomocí nefelometrie, nebo turbidimetrie. Během nefelometrie je měřena intenzita rozptýleného světla v různých (stanovených) úhlech, při turbidimetrii je měřena intenzita rozptýlení

paprsku v původním směru záření. Dostupné jsou také soupravy pro ELISA stanovení a western blot (Štern, 2010).

5.3.5 Matrixové metaloproteinázy

MMP jsou rodinou na zinku dependentních proteináz, které degradují extracelulární matrix a podílejí se tím na remodelaci tkáně. Vzhledem k jejich účinku jsou velmi důkladně regulovány. Jsou syntetizovány množstvím různorodých buněk, mezi které patří makrofágy, buňky endotelu a buňky hladkého svalstva. Jejich role v organismu má velký význam pro růst a vývoj člověka, při regeneraci tkání, hojení, zánětu a tvorbě jizev. V dospělém věku jsou jejich koncentrace velmi nízké, jelikož za fyziologických stavů nedochází k remodelaci tkáně. Jejich zvýšené hodnoty jsou spojené s řadou onemocnění, např. roztroušenou sklerózou, amyotrofickou laterální sklerózou, chronickou zánětlivou demyelinizační polyneuropatií, Guillainův-Barrého syndromem, vaskulární neuropatií, neurodegenerací, aj. (Hladíková, 2008, s. 531) a byla potvrzena jejich přítomnost v aterosklerotickém plátu, kde pravděpodobně přispívají ke ztenčení fibromatózního krytu a ruptuře. V několika studiích byla prokázána souvislost mezi zvýšenou hodnotou MMP a zvýšeným rizikem kardiovaskulárních příhod. Jako marker jsou však MMP stále ve fázi výzkumu (Shah, 2014, s. 4).

Stanovení MMP

MMP je možné stanovit imunochemicky pomocí diagnostické soupravy Biotrak Activity Assay System od firmy Amersham Biosciences (Kukačka, 2007, s. 86) či soupravy Matrix Metalloproteinases-2 od firmy GE Healthcare. Oba kity fungují na principu ELISA. V současné dostupné literatuře nejsou zmínky o dalších využívaných metodách stanovení.

5.3.6 Myeloperoxidáza

Jedná se o enzym z rodiny peroxidáz, který je produkován aktivovanými makrofágy a neutrofily. Funkcí MPO je obrana před mikroorganismy. MPO je

přítomna v azurofilních granulích neutrofilů a při fagocytóze je obsah granul uvolněn do fagolyzozomů, ve kterých vzniká volný reaktivní kyslík, který je pro mikroorganismy toxický. Má prozánětlivé účinky, přispívá k uvolňování reaktivního kyslíku, oxidaci LDL, dysfunkci endotelu, modifikuje apoA, a tím způsobuje modifikaci HDL (Novotný, 2013, s.122). Pravděpodobně by se mohlo jednat o prognosticky významný marker destabilizace aterosklerotického plátu.

Stanovení MPO

Stanovení se provádí z krevní plazmy a využívá se imunochemických metod. K dispozici jsou soupravy fungující na principu sendvičové ELISA metody, kdy je v jamce mikrotitrační destičky uchycena protilátka anti-MPO, na kterou se po přidání séra naváže MPO ze vzorku. Po promytí se k nově vzniklému komplexu přidá druhá anti-MPO protilátka značená peroxidázou. Dále se přidá substrát, který reaguje s peroxidázou, uvolní se chromogen a spektrofotometricky je odečtena absorbance vzorku, která je přímo úměrná koncentraci MPO v séru. Další možnou využitelnou metodou je průtoková cytometrie, při níž jsou antigenní struktury MPO využity ke značení fluorochromem a následně je v cytometru pomocí rozptylu laserového paprsku provedena samotná detekce. Novější metodou je chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročasticích, kdy jsou protilátky vázány na povrchu magnetických mikročastic. Po přidání vzorku se MPO obsažená v séru naváže na mikropartikelu a zbytek séra je odmyt. Do kyvety se poté přidají činidla, které vyvolají chemiluminiscenci, která je detekována a naměřená intenzita záření je přímo úměrná obsahu MPO ve vzorku (Racek, 2008, s. 224).

5.3.7 Sérový amyloid A

SAA patří mezi reaktanty akutní fáze. Jedná se o plazmatický lipoprotein, jehož fyziologická funkce není objasněna. Je obsažen v molekule HDL a předpokládá se, že přispívá ke kolagenázové aktivitě, inhibuje agregaci trombocytů, podílí se na snížení reverzního transportu cholesterolu (vytěsňuje apoA-I) do jater. Má proaterogenní účinky – podporuje růst aterosklerotického plátu a snižuje jeho stabilitu. Stejně jako CRP se syntetizuje v játrech jako

odpověď na zánětlivé podněty a jeho syntéza je indukována cytokiny IL-1, IL-6 a TNF. Hodnoty SAA rostou rychleji než hodnoty CRP, a je proto využíván například při sledování zamítnutí transplantátů (Kutišová, 2014).

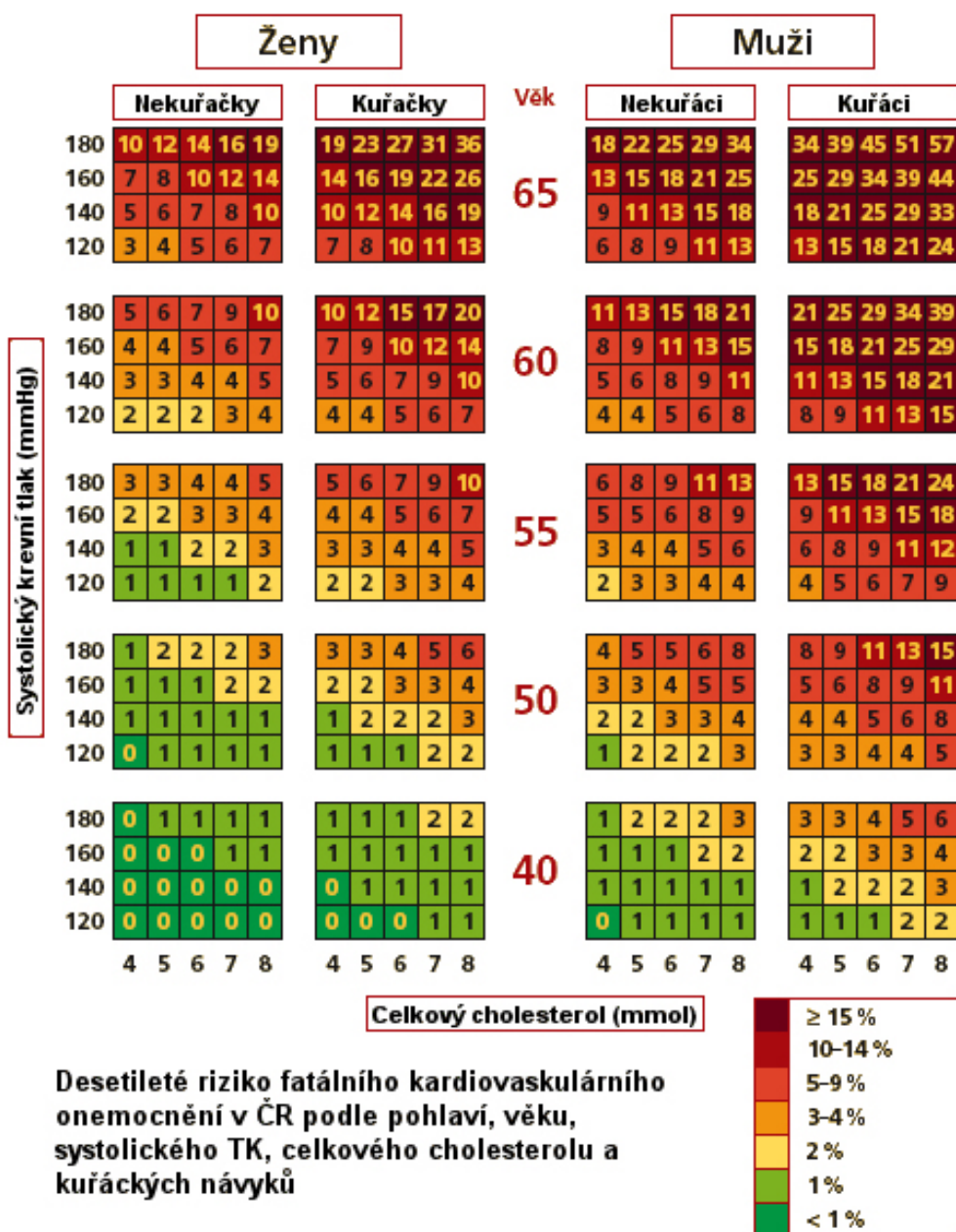
Stanovení SAA

Stanovení se provádí ze séra. Krev je odebrána do biochemické zkumavky, vzorek je nutné transportovat na ledu a centrifugovat do 30 minut od odběru. Pro samotné stanovení je využíváno sendvičové metody ELISA, imunonefelometrie či nekompetitivní chemiluminiscence (Štern, 2010).

6 Hodnocení kardiovaskulárního rizika

Jelikož je ateroskleróza multifaktoriálním onemocněním a jsou objevovány stále další nové rizikové faktory, bylo nutné navrhnout systém, podle něhož by bylo možné vyhodnocovat riziko ohrožení KVO. Ve světě existuje několik skórovacích systémů. Jedná se o algoritmy, které dokáží pacienty zařadit do jednotlivých kategorií rizika vzniku KVO podle předem zadaných parametrů – rizikových faktorů. Tyto odhady jsou důležité pro stanovení rizika úmrtí na akutní kardiovaskulární příhodu. S mírou rizika pak souvisí volba preventivních opatření a indikace farmakologické léčby.

V České republice se používá systém SCORE ("Systematic Coronary Risk Evaluation"), který hodnotí riziko úmrtí podle 5 "velkých" faktorů, tj. věk, pohlaví, kouření, systolický tlak a celkový cholesterol. Systém má podobu tabulky, ve které se vyhledává pomocí výše zmíněných parametrů a riziko vzniku fatální kardiovaskulární příhody v časovém intervalu 10 let se odečítá podle barevné škály (viz Obr. 6). V USA se k hodnocení rizik používá Framinghamské skóre, kdy jsou ke každému rizikovému faktoru přiřazeny body, které se sčítají, celkové riziko vyjadřuje konečný počet bodů. Nové rizikové faktory hrají důležitou roli například pro indikaci léčby, kdy zvýšené hodnoty nových markerů mohou pacienta posunout do rizikovější kategorie s intenzivnější léčbou (Zima, 2013, s. 204).



Obr. 6: Tabulka rizika úmrtí v důsledku KVO (Cífková, 2005)

Ve světě se pak můžeme setkat s dalšími rozdílnými skórovacími systémy jako jsou například PROCAM score, ESC score nebo Reynolds score, které ve svých výpočtech upřednostňují odlišné rizikové faktory.

7 Prevence a léčba

Jelikož výrazný podíl na rozvoji aterosklerózy mají ovlivnitelné rizikové faktory, je důležité se při prevenci aterosklerózy zaměřit právě na ně a začít úpravou životního stylu. Pro zdraví člověka je důležitý pohyb. Nejenže se pravidelným pohybem zvyšují hladiny HDL, ale aktivní způsob života vede také ke spalování tukových zásob (prevence nadváhy), posilování oběhové soustavy a snižování krevního tlaku. Pro snížení rizika rozvoje KVO je lepší, pokud je člověk silnější postavy ve fyzické kondici, než když je člověk naopak hubený, ale fyzicky neaktivní (Češka, 2012, s. 44). Dalším ovlivnitelným faktorem je kouření, které riziko rozvoje aterosklerózy zvyšuje 3–5x. Proto je namístě přestat kouřit. U hypertenze je vhodné pokusit se tlak snižovat např. pravidelným cvičením a omezením solení. Pokud tlak není těmito opatřeními ovlivnitelný, je na místě farmakologická terapie. Správná terapie je neopomenutelná u onemocnění jako je DM a hyperhomocysteinemie. Vhodná je také úprava stravovacích návyků spojená s nižší konzumací tuků, živočišných produktů a mléčných výrobků. Vhodné je omezit konzumaci alkoholu, který souvisí s vysokým krevním tlakem.

Léčba může být indikována až v případě pozitivních laboratorní testů lipidového profilu potvrzujících zvýšený cholesterol a po provedení vyšetření zobrazovacími metodami, která potvrdí diagnózu aterosklerózy. Léčba pak může být zvolena buď nefarmakologická nebo farmakologická. Pokud soubor nefarmakologických opatření nepomáhá stav pacienta zlepšit, přichází na řadu farmakologická terapie. Mezi režimová opatření nefarmakologické léčby patří změna životního stylu, zvýšená fyzická aktivita, léčba obezity, odvyknutí kouření a konzumace alkoholu a změna stravování, kde je doporučeno několik typů diet. Pokud nedochází ke zlepšení stavu, přechází se na farmakologickou terapii.

Existuje několik skupin léčiv s různým zaměřením – léčiva ovlivňující cholesterol a LDL-C, TG, HDL-C, nová léčiva ovlivňující LDL-C, atd. Mezi nejpoužívanější, a z pohledu studií neúčinnější léčiva patří statiny (Češka, 2012, s. 231).

8 Diskuze

Historie aterosklerózy sahá hluboko do minulosti. Aterosklerotické pláty byly objeveny v mumifikovaných tělech či tělech zakonzervovaných chladem z dob 15. století př. n. l., a tak není divu, že se vědci snažili odhalit příčiny tohoto onemocnění po několik století. Úspěchy byly však zaznamenány až v minulých desetiletích.

V 18. století se na aterosklerózu pohlíželo jako na degenerativní onemocnění a příčina úmrtí byla určena jako ruptura cévy kvůli aneurysmatu. O několik let déle byly pozorovány zánětlivé změny v okolí ruptury a objevila se domněnka, že by se mohlo jednat o základní příčinu vzniku aterosklerózy, ale většinou patologů bylo toto tvrzení odmítnuto a zánět byl vnímán jen jako důsledek onemocnění, ne jako příčina vzniku léze a její ruptury. Nicméně německý patolog Rudolf Virchow věřil tomu, že se jedná o chronický zánět intimy a nahromadění lipidů je až pozdním projevem celého procesu.

Na začátku 20. století byla tehdejší "arteriosclerosa" přejmenována na aterosklerózu a byly provedeny první pokusy. Bylo dokázáno, že zvýšením příjmu cholesterolu (králíci krmení mlékem a vejci, později čistým cholesterolem) se u králíků vytvářejí aterosklerotické léze. To podpořilo myšlenku, že ateroskleróza má souvislost s metabolismem lipidů. Další velký objev přišel až v sedmdesátých letech 20. století, kdy Brown and Goldstein zjistili, že LDL receptor, který objevili, není schopný rozpoznat acetylovaný LDL a předpověděli, že na makrofázích musí být jiný receptor, který modifikované LDL vychytává a že tyto modifikované LDL částice hrají důležitou roli v celém procesu aterosklerózy. V osmdesátých letech pak byla tato předpověď potvrzena, byly identifikovány scavengerové receptory a popsána úloha oxLDL v patologickém procesu. Dále bylo pokusem zjištěno, že u geneticky upravených myší postrádajících receptor pro apoE a LDL se tvoří rozsáhlé aterosklerotické léze. Tento experiment přivedl vědce k myšlence ovlivnění exprese genu pro terapeutické účely (Tedgui, 2006).

Problematika aterosklerózy je široká. Stále pravděpodobně nebyly objeveny všechny mechanismy účastníci se jejího vzniku, a tak můžeme čekat, že budou nalezeny další potenciálně využitelné markery pro její diagnostiku.

Pohled na aterosklerózu jako na pouhé mechanické usazování lipidů byl tedy dávno vyvrácen a dnes již víme, o jak složitý proces se jedná. Problémem ovšem zůstává, že i přes rozsáhlé laboratorní testy a lékařskou péči je procento úmrtí v důsledku aterosklerózy veliké. Proto se výzkum snaží hledat další analyty, které by pomohly aterosklerotický proces rozpoznat časněji, aby lékař mohl pacientovi doporučit případná opatření či včas indikovat farmakologickou léčbu.

Ze statistik vyplývá, že 51 % všech úmrtí v České republice je důsledkem kardiovaskulární příhody, přičemž 10 % příhod je způsobeno aterosklerotickým procesem (Česká republika je v tomto směru na vedoucí příčce v Evropě) (ÚZIS ČR, 2004). Přitom je známo, že stabilizace vulnerabilního plátu je možná, a při intenzivní léčbě dochází ke změně v plátu relativně brzy, v řádu týdnů (Češka, 2012, s. 23). Bohužel se lékaři v praxi setkávají s pacienty, kteří nerespektují režimová opatření a další doporučení či odmítají farmakologickou léčbu – u těchto případů je těžké rozvoj onemocnění končící kardiovaskulární příhodou s možnými fatálními následky ovlivnit. Také důraz při prevenci je kladen především na jedince vyššího věku (40–50 let), přičemž věková hranice ohrožení touto chorobou se stále snižuje. Špatné stravovací návyky, málo pohybu, kouření a stres jsou faktory, které dnes zatěžují již děti a adolescenty a mohou vést k vytváření aterosklerotického ložiska ve věku pod hranicí 40–50 let.

Pozitivně můžeme vnímat fakt, že podle statistik z let 2004–2012 má křivka znázorňující procenta úmrtnosti na KVO klesající tendenci a počet úmrtí v důsledku kardiovaskulárních příhod v čase pomalu, ale jistě klesá (Eurostat, 2015).

V minulosti se velký význam přikládal C-reaktivnímu proteinu. Je to protein akutní fáze zánětu, a jelikož ateroskleróza má zánětlivý charakter, využíval se jako ukazatel míry rizika kardiovaskulární příhody. Nevýhoda tohoto markeru je však v jeho nespecifičnosti. Jeho hodnoty vzrůstají s jakýmkoliv zánětlivým

procesem v těle. Byla proto navržena nová hypersenzitivní metoda stanovení a doporučení test opakovat v intervalu 2–3 týdnů, aby se hodnota hs-CRP mohla přiřadit opravdu jen k chronickému průběhu zánětu.

Dnes vidíme budoucnost v markerech jako je například fosfolipáza A₂ asociovaná s lipoproteiny, která je vysoce specifickým indikátorem nestability aterosklerotického plátu, nekoreluje s ostatními "klasickými" markery, má nízkou biologickou variabilitu a navíc je její stanovení poměrně jednoduché a snadno automatizovatelné.

Ostatní, ne tak jednoznačně vypovídající, analyty mohou být a jsou využívány převážně k úpravě odhadu rizika kardiovaskulární příhody. Při vyšších koncentracích těchto markerů se riziko posunuje směrem do vyšší kategorie. Toto přeřazení pomáhá volit intenzivnější léčbu včas.

Pro léčbu pak mají význam nově objevené markery i kvůli farmakologickému výzkumu. Určení jejich role v patofyziologii napomáhá odkrývat ještě neznámé mechanismy aterosklerotického procesu, které by mohly být využity k tvorbě nových preparátů a terapií.

9 Závěr

Cílem této práce bylo shrnout poznatky o novějších biochemických markerech, které se využívají, či by se v budoucnu mohly využívat, pro odhad rizika kardiovaskulárních příhod. V úvodu práce jsou však stručně shromážděny i informace o vzniku a průběhu aterosklerózy, o metabolismu lipidů a lipoproteinů a o vyšetření klasických analytů, jež jsou stanovovány v běžné biochemické praxi. Spojení stručného teoretického základu s novějšími informacemi o diagnostice dává i čtenáři nepohybujícímu se v oboru možnost seznámit se s problematikou aterosklerózy.

Rozhodně bude zajímavé se k současným poznatkům vracet v průběhu let. Sledovat které analyty nakonec budou vybrány pro klinickou praxi, jejich standardizaci a automatizaci v laboratoři, zda budou schopny nahradit současná klasická biochemická stanovení či se alespoň stanou rovnocenným markerem hodnocení rizika KVO.

Seznam použité literatury

AIT-OUFELLA, H., S. TALEB, Z. MALLAT a A. TEDGUI. Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011, 31(5), 969-979. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.207415. ISSN 1079-5642. Dostupné také z:
<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.110.207415>

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011, s.53-54,119-121. ISBN 978-80-247-3533-7.

BEŇOVSKÁ, M. a Lucie BABUŠÍKOVÁ. Posouzení výsledků stanovení fosfolipázy A₂ asociované s lipoproteiny v souvislosti s aterosklerózou. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2010, 18(39), 38-44.

CIBULKA, Roman. Fosfolipáza A₂ asociovaná s lipoproteiny – perspektivní marker zvýšeného kardiovaskulárního rizika a možný terapeutický cíl. CEVA [online] 2011, [cit. 2016-05-08]. Dostupný z WWW: <http://www.ceva-edu.cz/mod/forum/discuss.php?d=481>. ISSN 1803-8999.

CÍFKOVÁ, R. Odhad kardiovaskulárního rizika metodou SCORE. In: *Státní zdravotní ústav* [online]. 2005 [cit. 2016-05-10]. Dostupné z:
<http://www.szu.cz/tema/prevence/score>

Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways[online]. 2006 [cit. 2016-05-16]. Dostupné z:
<http://physrev.physiology.org/content/physrev/86/2/515/F3.large.jpg?width=800&height=600&carousel=1>

ČEŠKA, Richard. *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*. Vyd. 4., V Tritonu 2. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-599-2.

DUBSKÁ, L. Stanovení homocysteinu v biologickém materiálu. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2009, 17(38), 93-95.

Endo dysfunction Athero [online]. 2006 [cit. 2016-05-16]. Dostupné z:
http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Endo_dysfunction_Athero.PNG

EUROSTAT. *Causes of death — standardised death rate per 100 000 inhabitants, males, EU-28, 2004–12* [online]. In: . 2015 [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/File:Causes_of_death_%E2%80%94_standardised_death_rate_per_100_000_inhabitants,_males,_EU-28,_2004%E2%80%9312_\(%C2%B9\)_\(2009_%3D_100\)_YB15.png](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/File:Causes_of_death_%E2%80%94_standardised_death_rate_per_100_000_inhabitants,_males,_EU-28,_2004%E2%80%9312_(%C2%B9)_(2009_%3D_100)_YB15.png)

FRANEKOVÁ, Jana. Fosfolipáza A2 asociovaná s lipoproteiny – nový marker kardiovaskulárního rizika. *Postgraduální medicína* [online]. 2010 [cit. 2016-05-14]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/fosfolipaza-a2-asociovana-s-lipoproteiny-novy-marker-kardiovaskularniho-rizika-454141>

FRANEKOVÁ, Janka. *Příspěvek k hodnocení stability ateromatózního plátu ve vztahu k rozvoji kardiovaskulárního rizika*. Brno, 2012. Doktorská disertační práce.

HALUZÍKOVÁ, D. Adiponektin a ateroskleróza. *Vnitřní lékařství*. 2007, 53(4), 359-363.

HEGELE, Robert A. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nature Reviews Genetics*. 2009-1-13, 10(2), 109-121. DOI: 10.1038/nrg2481. ISSN 1471-0056. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg2481>

HLADÍKOVÁ, M. a P. ŠŤOURAČ. Matrixové metaloproteinázy v patogenezi roztroušené sklerózy. *Cesk Slov Neurol N*. 2008, 71/104(5), 530-536.

HOPKINS, P. N. Molecular Biology of Atherosclerosis. *Physiological Reviews* [online]. 2013, 93(3), 1317-1542 [cit. 2016-05-12]. DOI: 10.1152/physrev.00004.2012. ISSN 0031-9333. Dostupné z: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00004.2012>

Hs-CRP: The Test. *Lab Tests Online* [online]. AACC, 2015 [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <https://labtestsonline.org/understanding/analytes/hscrp/tab/test/#what>

HUTYRA, Martin, David KARÁSEK, Milan HALENKA a Helena VAVERKOVÁ. *Zdravotnické noviny: Ateroskleróza a zánět*. Praha, 2004,25(2). ISSN 18052355.

KASALOVÁ, Šárka. Příčiny smrti – důraz na kvalitu zdrojových dat. In: *Ústav zdravotnických informací a statistik ČR* [online]. 2005 [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: www.uzis.cz/system/files/5_statistika_pricin.ppt

KUKAČKA, J., K. ZIKMUNDOVÁ a K. KOTAŠKA. PAPP-A a matrixové metaloproteinázy 3 a 9 u pacientů se smíšenou dyslipoproteinémií. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2007, 15(36), 85-88.

KUTIŠOVÁ, Silvie. *Sérový amyloid A*. Bratislava, 2014. Dostupné také z: <https://www.google.cz/?ion=1&espv=2#q=kuti%C5%A1ov%C3%A1%20s%C3%A9rov%C3%BD%20amyloid>

KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. *Klinická imunologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. ISBN 80-86225-50-X.

MÁLKOVÁ, Kateřina. Méně známé možnosti využití diagnostických markerů: 1. díl: PAPP-A: Dvojitá tvář jednoho biomarkeru. *Labor Aktuell*[online]. 2009, (1), 15-17 [cit. 2016-05-07]. Dostupné z: <http://roche-diagnostics.cz/LaborAktuell/LA2009/Documents/LA0109/Malkova.pdf>

NEZVEDOVÁ, Milada. Stanovení PAPP-A a free β hCG na analyzátoru Elecsys 2010. *Labor Aktuell*[online]. 2010, (4), 3-4. [cit.2016-05-07]. Dostupné z: http://roche-diagnostics.cz/LaborAktuell/LA2010/Documents/LA0410/Priloha_PAPP.pdf

NOVOTNÝ, D., D. KARÁSEK, H. VAVERKOVÁ a P. MALINA. HDL: funkce, dysfunkce a laboratorní metody stanovení. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2013, 21(42), 122-128.

OSMANČÍK, Pavel. Společná etiopatogeneza akutních koronárních syndromů. *Kardioforum*[online]. 2003, (2), 8-11 [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: www.kardiologickeforum.cz

Overview of lipoprotein metabolism [online]. 2009 [cit. 2016-05-10]. Dostupné z: http://www.nature.com/nrg/journal/v10/n2/fig_tab/nrg2481_F1.html

PAPP-A Ultrasensitive ELISA: For the quantitative determination of PAPP-A in serum. 3. Salem, 2010 [cit. 2016-05-07]. Dostupné z: <https://s3.amazonaws.com/alpco-docs/55/55-PAPHUU-E01.pdf>

PLAC® Test ELISA Kit Enzymová imunoassay pro kvantitativní stanovení Lp-PLA2 v lidském séru nebo plasmě. San Francisco, 2009. Dostupné z: <http://www.medista.cz/data/files/pribalovy-letak-plac-test-elisa-kit.pdf>

POLEDNE, Rudolf. CRP - marker proinflamačního stavu a kardiovaskulárního rizika. In: *Vnitřní lékařství* [online]. Praha, 2007 [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=vl_07_04_13.pdf

RAMJI, Dipak P. a Thomas S. DAVIES. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine*. 2015, 26(6), 673-685. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003. ISSN 13596101. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610115000325>

RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, c2006. ISBN 80-726-2324-9.

RACEK, Jaroslav. Myeloperoxidáza. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2008, 16(37), 222-227.

RACEK, Jaroslav. Nové biomarkery kardiovaskulárních onemocnění s ohledem na jejich prognostický význam CEVA [online] 17. 1. 2012, poslední aktualizace 17. 1. 2012 [cit. 2016-05-01]. Dostupný z WWW: <http://www.ceva-edu.cz/mod/forum/discuss.php?d=578>. ISSN 1803-8999.

RACEK, Jaroslav. Oxidované LDL a ateroskleróza. *Labor Aktuell* [online]. 2010, (3), 12-15 [cit. 2016-05-06]. Dostupné z: <http://roche-diagnostics.cz/LaborAktuell/LA2010/Documents/LA0310/OxidovaneLDL.pdf>

RF aterosklerózy [online]. 2012 [cit. 2016-05-16]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:RF_ateroskler%C3%B3zy.svg

SHAH, P. K. Biomarkers of Plaque Instability. *Current Cardiology Reports*. 2014, 16(12), -. DOI: 10.1007/s11886-014-0547-7. ISSN 1523-3782. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11886-014-0547-7>.

SOŠKA, Vladimír. Stanovení LDL cholesterolu - stále nevyřešený problém: vypočíst, nebo změřit? In: *Vnitřní lékařství* [online]. 2008 [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=vl_08_10_04.pdf

Structure of a Lipoprotein [online]. 2010 [cit. 2016-05-16]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Structure_of_a_Lipoprotein.png

SYROVÁTKA, Petr. Infekce a ateroskleróza. In: *Vnitřní lékařství* [online]. Praha, 2007 [cit. 2016-04-20]. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=vl_07_03_11.pdf

ŠPRONGL, Luděk. Vysoce citlivé stanovení CRP: Teorie a možnosti. *Labor Aktuell* [online]. 2003, (1), 5-7 [cit. 2016-05-02]. Dostupné z: <http://roche-diagnostics.cz/LaborAktuell/LA2003/Documents/LA0103/crp.pdf>

ŠTERN, Petr. Stanovení amyloidu A. *Encyklopedie lab. medicíny* [online]. 2010 [cit. 2016-05-10]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/C/STABA.htm>

ŠTERN, Petr. Stanovení triacylglycerolů. *Encyklopedie lab. medicíny* [online]. 2011 [cit. 2016-05-10]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/STADT.htm>

ŠTERN, Petr. Stanovení cholesterolu LDL. *Encyklopedie lab. medicíny* [online]. 2011 [cit. 2016-05-10]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/STAE0.htm>

ŠTERN, Petr. Stanovení fibrinogenu. *Encyklopedie lab. medicíny* [online]. 2010 [cit. 2016-05-10]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/STACA.htm>

ŠTERN, Petr. *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1979-8.

ŠTÍPEK, Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-716-9704-4.

TEDGUI, A. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiological Reviews* [online]. 2006, 86(2), 515-581 [cit. 2016-05-

11]. DOI: 10.1152/physrev.00024.2005. ISSN 0031-9333. Dostupné z:
<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00024.2005>

THON, V. a M. VLKOVÁ. A simple method for the detection of CD154 (CD40L) on peripheral blood lymphocytes. In: *National Center for Biotechnology Information* [online]. 2010 [cit. 2016-05-10]. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20925252>

ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2013. ISBN 978-80-7492-062-2.

ŽÁK, Aleš a Jaroslav MACÁŠEK. *Ateroskleróza: nové pohledy*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3052-3.

ŽIVNÁ, Helena a Pavel ŽIVNÝ. Cytokiny. In: *Ministerstvo zdravotnictví ČR* [online]. c2016 [cit. 2016-05-06]. Dostupné z:
<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/AJESQ.htm>

Seznam symbolů a zkratek

CE	cholesterolesteráza
CHOD	cholesteroxidáza
CMV	cytomegalovirus
CRP	C-reaktivní protein
DM	diabetes mellitus
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctovou
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
Hcy	homocystein
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HDL-C	cholesterol přenášený HDL
hs-CRP	vysocesenzitivní C-reaktivní protein
HSP 60	stresový protein "heat shock protein"
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IDL	lipoprotein o intermediální hustotě
IGF-1	inzulinu podobný růstový faktor
IL-1	interleukin
INF- α,β,γ	interferon
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
LDL-C	cholesterol přenášený LDL
Lp(a)	lipoprotein (a)
LP	lipoproteiny
LPL	lipoproteinová lipáza
Lp-PLA2	lipoproteinová fosfolipáza A2
lysoPC	lysofosfatidylcholin
M-CSF	makrofágový růstový faktor
MCP-1	monocytární chemoatraktant
MMP	matrixové metaloproteinázy
MPO	myeloperoxidáza
oxFA	oxidované mastné kyseliny
oxLDL	oxidovaný LDL
PAI-1	inhibitor plasminogenového aktivátoru
PAF-AH	acetylhydroláza faktoru aktivujícího destičky
PAPP-A	s těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A
PDGF	růstový faktor z destiček
POD	peroxidáza
RIA	radioimunoanalýza
RT-PCR	řetězová polymerázová reakce v reálném čase
SAA	sérový amyloid A
SIRS	syndrom systémové zánětlivé odpovědi organismu
TG	triacylglycerol
TNF- α	tumor nekrotizující faktor
tPA	tkáňový aktivátor plasminogenu
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě

Seznam obrázků

Obr. 1: Interakce rizikových faktorů (Mareš, 2012).....	11
Obr. 2: Schéma lipoproteinového metabolismu (Hegele, 2011).....	12
Obr. 3: Struktura lipoproteinové částice (AntiSense, 2010)	13
Obr. 4: Schéma jednotlivých fází aterogeneze (Grahams Child, 2006)	21
Obr. 5: Cytokiny účastnící se aterogeneze (Tedgui, 2006).....	33
Obr. 6: Tabulka rizika úmrtí v důsledku KVO (Cífková, 2005).....	47