Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Preventivní medicína

MUDr. Eva Tůmová

Nové markery kardiovaskulárního rizika v diagnostice a monitoraci léčby

Emerging cardiovascular risk markers in diagnostics and therapy

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Michal Vrablík, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 3.6.2015

Eva Tůmová

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Michalu Vrablíkovi, Ph.D., předsedovi České společnosti pro aterosklerózu, za vedení nejen v průběhu celého doktorského studia, ale také v profesní dráze. Díky odborným znalostem, zkušenostem a v neposlední řadě lidskému přístupu a podpoře svého školitele mi bylo doktorské studium velmi obohacujícím a současně příjemným.

Identifikační záznam:

TŮMOVÁ, Eva. *Nové markery kardiovaskulárního rizika v diagnostice a monitoraci léčby. [Emerging cardiovascular risk markers in diagnostics and theapy].* Praha, 2015. 73 s., 7 příl. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 3. interní klinika 1. LF UK. Školitel Vrablík, Michal.

Klíčová slova: kardiovaskulární oněmocnění, rizikové faktroy aterosklerózy, zánětlivé parametry, režimová opatření

Key words: cardiovascular disease, atherosclerosis risk factors, inflammatory markers, lifestyle measures

Obsah

1. Úvod....7
1.1. Etiopatogeneze aterosklerózy....7
1.2. Patologická anatomie aterosklerózy....10
1.3. Klasické rizikové faktory aterosklerózy....11
1.3.1. Neovlivnitelné....12
1.3.1.1. Věk....12
1.3.1.2. Pohlaví....12
1.3.1.3. Genetické faktory....12
1.3.1.4. Existující kardiovaskulární onemocnění....13
1.3.2. Ovlivnitelné....13
1.3.2.1. Dyslipidémie....13
1.3.2.2. Kouření....13
1.3.2.3. Arteriální hypertenze....14
1.3.2.4. Diabetes mellitus....14
1.3.2.5. Metabolický syndrom....15
1.3.2.6. Obezita....16
1.3.2.7. Aterogenní dieta....17
1.3.2.8. Psychosociální stres....17
1.3.2.9. Systémová zánětlivá onemocnění....17
1.3.2.10. Nízká fyzická aktivita....17
1.3.3. Odhad kardiovaskulárního rizika....18
1.3.3.1. SCORE....18
1.3.3.2. Framinghamská rovnice....21
1.3.3.3. Reynoldsova rovnice....21
1.3.3.4. Nejnovější schéma odhadu kardiovaskulárního rizika dle AHA....21
1.4. Zánětlivé rizikové faktory aterosklerózy....22
1.4.1. Vysoce senzitivní C-reaktivní protein....24
1.4.2. Fibrinogen....25
1.4.3. Interleukin 6....25
1.4.4. Oxidované LDL částice....26

1.4.5. Myeloperoxidáza.....26
1.4.6. Fosfolipáza A_2 asociovaná s lipoproteiny.....27
1.4.6.1. Úvod.....27
1.4.6.2. Struktura.....27
1.4.6.3. Funkce.....28
1.4.6.4. Genetická determinace.....28
1.4.6.5. Principy stanovení.....29
1.4.6.6. Vztah ke kardiovaskulárnímu riziku.....30
1.4.6.7. Ovlivnění.....33
1.4.6.7.1. Nefarmakologické.....33
1.4.6.7.2. Farmakologické.....34
2. Provedené práce v dané oblasti.....38
2.1. Efekt redukce hmotnosti obézních dětí na parametry kardiovaskulárního rizika.....38
2.1.1. Soubor.....38
2.1.2. Metodika.....38
2.1.3. Výsledky.....39
2.1.4. Závěr a diskuse.....41
2.2. Efekt redukce hmotnosti obézních dospělých s metabolickým syndromem na parametry oxidačního stresu.....43
2.2.1. Soubor.....43
2.2.2. Metodika.....44
2.2.3. Výsledky.....44
2.2.3.1. Vstupní charakterisktika.....44
2.2.3.2. Efekt hmotností redukce.....47
2.2.4. Závěr.....54
2.2.5. Diskuse.....54
2.3. Shrnutí závěrů práce.....56
3. Seznam použité literatury.....58

1. Úvod

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou hlavní příčinou morbidity a mortality v rozvinutých zemích. Patofyziologickým podkladem kardiovaskulárních (KV) příhod je ateroskleróza, komplexní proces modifikace cévní stěny, na němž se podílí řada faktorů.

1.1. Etiopatogeneze aterosklerózy

Ateroskleróza je degenerativní proces cévní stěny, který byl dlouhá léta považovaný za prostou akumulaci lipidů. Tato tzv. lipidová teorie vzniku aterosklerózy je postavena na prokázané souvislosti vysoké hladiny cholesterolu s progresí aterosklerózy a považuje cholesterol, později konkrétně lipoproteiny o nízké hustotě (LDL), za prvotní příčinu jejího vzniku. Důsledkem vysoké hladiny cholesterolu je jeho vyšší průnik cévní stěnou do intimy, kde dochází k hromadění lipidů a vzniku pěnových buněk, což jsou základní buněčné elementy ateromové léze. Podkladem pro vznik pěnové buňky je akumulace lipidů především ve formě esterů cholesterolu v makrofázích nebo buňkách hladké svaloviny.

Další teorie, tzv. teorie endoteliálního poškození formovaná Rossem v roce 1976 (1), považuje ovšem za primární příčinu vzniku aterosklerózy narušení endotelu, ke kterému může dojít mnoha způsoby (mechanicky, chemicky, imunologicky). Následně dochází k adherenci trombocytů v místě poškození endotelu, zvýšené proliferaci hladké svaloviny, kolagenu a extracelulární matrix. Narušeným endotelem do cévní stěny migrují monocyty, z nichž aktivací vznikají makrofágy produkující cytokiny. Touto kaskádou dějů se v cévní stěně spouští zánětlivý proces a aterosklerotická léze progreduje. Akumulace lipidů v cévní stěně je podle této teorie tedy jev druhotný, následující poškození endotelu, a samotný vznik aterosklerózy nezapříčiňuje.

Každá z výše uvedených teorií popisuje samotný vznik aterosklerózy odlišně a zároveň s ohledem na jeho komplexnost ne zcela dostatečně. Právě komplexnost tohoto procesu si vyžádala formulaci tzv. jednotné hypotézy, která vychází z obou dříve formulovaných teorií, na první místo ovšem staví samotnou dysfunkci endotelu následovanou zvýšením propustnosti pro lipidiy a makrofágy. Dle této „jednotné teorie“ je tedy ateroskleróza složitý multifaktoriální proces, na jehož vzniku i progresi se podílí celá řada faktorů, přičemž na počátku aterosklerózy stojí dysfunkce endotelu, ne tedy nutně jeho mechanické poškození. Endoteliální dysfunkce je zde definována jako postižení endotelu vedoucí ke zvýšené

propustnosti cévní stěny se vznikem nerovnováhy mezi vazoaktivními mechanismy a hemokoagulačními působky, s následnou převahou mechanismů aterogenních, vazospastických a protrombotických. Příčiny vzniku endoteliální dysfunkce jsou především mechanické, uplatňují se ale také vlivy imunologické, toxické, či infekční. Prvotní změny funkcí endotelu následuje jeho vyšší propustnost pro lipidy a makrofágy, stupňuje se oxidace LDL částic a proliferace buněk hladké svaloviny, což ve výsledku ústí ve vznik aterosklerotických lézí.

Pohled na aterosklerózu se v průběhu let posunul od teorie prostého ukládání lipidů přes teorii endoteliálního poškození až k tzv. zánětlivé teorii, která pohlíží na aterosklerózu jako na zánětlivý proces v cévní stěně (2). Probíhající zánět jde ruku v ruce s počínající akumulací lipidů v cévní stěně, proto již v časných aterosklerotických lézích jsou kromě jiných buněk přítomné leukocyty. Zdravý endotel není za normálních okolností schopen vázat buňky bílé krevní řady, nicméně v případě aktivace endotelu vhodným stimulem dochází na povrchu endoteliálních buněk k expresi selektivních adhezivních molekul, které atrahují různé druhy leukocytů, především monocyty a T-lymfocyty (3). Tímto prozánětlivým spouštěčem může být nevhodná dieta bohatá na nasycené tuky, dyslipidémie, obezita, hyperglykemie, inzulinová rezistence, arteriální hypertenze, kouření – všechny tyto stavy navozují endoteliální expresi adhezivních molekul, navázání leukocytů a jejich následnou migraci do cévní stěny (4). Mezi zmíněné adhezivní molekuly patří selektiny, které podněcují rolování leukocytů po povrchu poškozeného endotelu a tím zprostředkovávají bližší kontakt s endotelem, a dále pak integriny, které zajišťují jejich pevnější zachycení k endotelu (5). Uvnitř počínající ateromové léze jsou exprimovány prozánětlivé cytokiny, které mají chemotaktický potenciál zapříčiňující další adherenci leukocytů k dysfunkčnímu endotelu a jejich migraci do intimy, kde dochází k aktivaci monocytů v makrofágy. Zánětlivé mediátory mají také na svědomí zvýšenou expresi tzv. scavengerových receptorů na povrchu aktivovaných makrofágů, vedoucí k vychytávání modifikovaných lipoproteinových částic, které jsou poté fagocytovány makrofágy za vzniku pěnových buněk, typických pro vyvíjející se ateromovou lézi. Následně dochází k replikaci a proliferaci makrofágů v intimě a produkci většího množství cytokinů a růstových faktorů, které podporují migraci a proliferaci hladkých svalových buněk a podněcují T-lymfocyty k tvorbě dalších prozánětlivých cytokinů (např. interferon-γ, tumor necrosis factor-β), které mohou dále stimulovat makrofágy, buňky endotelu a hladké svaloviny cévní stěny (6, 7). Akumulace buněk monocyto-makrofágového

systému v cévní stěně vede k chronickému subklinickému zánětu a progresi aterosklerózy. S pokračujícím zánětlivým procesem mohou aktivované leukocyty a buňky endotelu uvolňovat mediátory fibrogeneze (zahrnující množství peptidových růstových faktorů), které podporují další replikaci hladkých svalových buněk a přispívají k formaci husté extracelulární matrix, která je typická pro pokročilé ateromové léze (8). V průběhu proliferace buněk a růstu aterosklerotické léze často dochází k apoptóze zde přítomných buněk a vzniku na lipidy bohatého nekrotického jádra plátu (9).

Zánětlivý proces kromě ovlivnění formace a růstu aterosklerotického plátu také zásadně přispívá k rozvoji trombotických komplikací. Marofágy aktivované uvnitř léze prozánětlivými cytokiny jsou schopné produkovat proteolytické enzymy jako je kolagenáza, způsobující ztenčení fibrózní čepičky ateromové léze, která se tímto stává vysoce náchylnou k ruptuře. Současně dochází k utlumení syntézy kolagenu hladkými svalovými buňkami pod vlivem interferonu-γ produkovaného aktivovanými T-lymfocyty, načež je limitováno obnovování kolagenu (10) a fibrózní kryt ateromu se nevrtaně stává tenčím. Makrofágy, opět pod kontrolou prozánětlivých mediátorů, také exprimují tkáňový faktor s významnou prokoagulační schopností, který v případě ruptury plátu podněcuje tvorbu nasedajícího trombu (11). Zánětlivý proces hraje tedy zcela zásadní roli v etiopatogenezi aterosklerózy, nicméně základním předpokladem pro vznik plátu je stále akumulace lipoproteinových částic v cévní stěně, přičemž tyto částice jsou v subentoteliálním prostoru pod vlivem zánětlivých mediátorů mnoha způsoby modifikovány.

Lipoproteinové LDL částice zachycené v intimě podléhají oxidativní modifikaci pod vlivem různých biologicky aktivních působků, které se nacházejí v ateromové lézi (např. hydroperoxidázy) (12). Zde jsou lipoproteinové částice izolované od plazmatických antioxidantů, což dále podporuje jejich oxidativní modifikaci (13). Oxidativně pozměněné lipidové zbytky dále aktivují endoteliální buňky, indukují expresi adhezivních molekul, chemokinů, prozánětlivých cytokinů a dalších mediátorů zánětu v makrofázích a endoteliálních buňkách. Apoproteinové zbytky lipoproteinových částic mohou v cévní stěně také podléhat podobné modifikaci, následně získávají antigenní potenciál aktivující T-lymfocyty a antigen specifickou imunitní odpověď (14). Podobně mohou oxidativní modifikaci podléhat také ostatní lipoproteiny, jako lipoprotein o velmi nízké hustotě (VLDL) a střední hustotě (IDL). Závěry některých studií naznačují, že i samotné VLDL částice jsou schopné spustit prozánětlivou činnost endoteliálních buněk (15). Na druhou stranu,

ateroprotektivní lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL) se mohou podílet na transportu antioxidantů do cévní stěny, které mají schopnost rozkládat oxidované lipidy a neutralizovat tím jejich potenciální prozánětlivý účinek.

Z uvedeného vyplývá, že formace aterosklerotického plátu je vysoce komplexní a složitý proces, kde dochází k propojení nespočtu patofyziologických kaskád. Z rozmanitých faktorů, které se na tomto ději podílí, se mnoho let pokoušíme najít ideální parametr – marker KV rizika, který by umožnil stanovit individuální riziko rozvoje KVO.

1.2. Patologická anatomie aterosklerózy

Morfologicky jsou popsána stadia vývoje aterosklerotické léze, která v sebe mohou vzájemně přecházet, progredovat, ale při správné léčbě i regredovat. První stadium rozvoje aterosklerózy je charakteristické přítomností již zmíněné endoteliální dysfunkce. Toto stadium společně se stadiem charakteristickým přítomností tukových proužků je přítomno prakticky u každého jedince, tukové proužky lze někdy prokázat i u novorozenců. Další vývoj v pokročilejší aterosklerotickou lézi je dán vlivy rizikových faktorů a jejich kombinací u konkrétního jednotlivce.

Klasifikace aterosklerotických lézí:

1. typ I – iniciální: intracelulární depozita lipidů v intimě detekovatelná pouze mikroskopicky, izolovaně pěnové buňky
2. typ II – tukové proužky: žlutavé fokusy v intimě, akumulace lipidů intracelulárně, kromě pěnových buněk jsou již přítomné makrofágy, T lymfocyty, buňky hladké svaloviny
3. typ III – přechodné léze: již extracelulárně přítomné kapénky lipidů
4. typ IV – aterom: extracelulárně vzniká lipidové jádro, je zde minimum kolegenu; v tomto stadiu již plát prominuje do lumina cévy a narušuje proudění krve, může již být příčinou částečné obstrukce lumina
5. typ V – fibroaterom: kromě lipidového jádra v lézi dominuje pojivová tkáň, vznikají kalcifikace
6. typ VI – komplikované léze: dochází ke vzniku ruptury, hematomu, hemoragie nebo trombózy v lézi typi IV a V

1.3. Klasické rizikové faktory aterosklerózy

Porucha funkcí endotelu je prvotním spouštěčem aterosklerózy. K samotné manifestaci onemocnění vede interakce faktorů genetických a vlivů zevního prostředí. Jedná se v obou případech o rizikové faktory (RF) aterosklerózy, které přispívají ke vzniku aterosklerózy a podporují usazování lipidů ve stěně cév. Jejich vlivem může dojít k rychlejší manifestaci cévní nedostatečnosti a navíc kombinací těchto rizikových faktorů se riziko rozvoje aterosklerózy nesčítá, nýbrž násobí. Rizikových faktorů aterosklerózy (16), tedy takových, které přímo souvisejí s rozvojem KVO, známe celou řadu. Tradičně dělíme RF na dvě velké skupiny, neovlivnitelné a ovlivnitelné – mezi neovlivnitelné RF patří pohlaví, věk, genetická zátěž a přítomnost existujícího KVO. Ovlivnitelných RF je velké množství, nejčastěji monitorované a intervenované reprezentuje na poli režimových opatření především nikotinismus, abdominální obezita, aterogenní dieta, psychosociální stres a nedostatek fyzické aktivity. Hlavními terapeuticky ovlivnitelnými RF aterosklerózy zůstávají dyslipidémie, arteriální hypertenze a diabetes mellitus 2. typu.

tabulka č.1: Tradiční rizikové faktory aterosklerózy

Neovlivnitelné		Ovlivnitelné
Věk	Muži nad 45 let	Dyslipidémie
	Ženy nad 55 let	Nikotinismus
Mužské pohlaví		Arteriální hypertenze
Pozitivní rodinná anamnéza Genetické faktory Existující KVO		Porušená glukózová homeostáza
		Metabolický syndrom
		Obezita s abdominální akumulací tuku
		Aterogenní dieta
		Psychosociální stres
		Systémová zánětlivá onemocnění
		Nízká fyzická aktivita

1.3.1. Neovlivnitelné rizikové faktory

1.3.1.1. Věk

Pravděpodobnost onemocnění aterosklerózou stoupá s věkem, protože jde o dlouhodobý proces remodelace cévní stěny (17). U mužů považujeme za rizikový věk nad 45 let, u žen, vzhledem k protektivnímu vlivu estrogenů, nad 55 let (případně nižší, pokud žena prodělá předčasnou menopauzu).

1.3.1.2. Pohlaví

U ženského pohlaví se uplatňuje protektivní efekt estrogenů související s vyššími hladinami HDL cholesterolu (HDL-c) a výrazně nižším rizikem ischemické choroby srdeční (ICHS) v období do menopauzy (18). Zajímavým zjištěním je, že přítomnost diabetu, chronického zánětlivého onemocnění, kuřáctví, rodinná anamnéza a hladiny HDL-c, triglyceridů (TG) a vysoce senzitivního C-reaktivního proteinu (hs-CRP) představují významnější RF u žen, zatímco v případě mužského pohlaví má větší vliv jako RF lipoprotein(a) (Lp(a)) (19).

1.3.1.3. Genetické faktory

Výskyt předčasné manifestace ICHS (infarktu myokardu či náhlé smrti) u prvostupňového mužského příbuzného ve věku do 55 let a u prvostupňového ženského příbuzného do 65 let (20) je dalším z RF KVO, přičemž pozorujeme dědičnost samotných RFaterosklerózy a následný rozvoj KVO. Nově byly v posledních letech pomocí celogenomových asociačních studií (GWAS) identifikovány genetické lokusy související s vyšším výskytem KVO, ačkoli nekódují žádný ze známých RF aterosklerózy (21). Pouze minimum lokusů asociovaných s KVO je spojeno také s výskytem některého z tradičních RF aterosklerózy (např. s hladinami LDL-c či arteriální hypertenzí), které jsou samy o sobě geneticky determinované. Na druhou stranu, 17 z 23 lokusů, které jsou prokazatelně spojené s vyšším výskytem KVO, se uplatňuje prozatím neznámými mechanismy nezávislými na tradičních RF. Jedná se o nově nalezené regulační oblasti genomu, jejichž význam je v současné době testován a jistě kruciální pro lepší porozumění patofyziologickým procesům vzniku KVO a nalezení nových léčebných postupů.

1.3.1.4. Existující kardiovaskulární onemocnění

Přítomnost pre-existujcího KVO u jedince je nejvyšší prioritou KV prevence (22). Pacient je sledován v rámci tzv. sekundární prevence, kde důsledně intervenujeme veškeré další RF aterosklerózy.

1.3.2. Ovlivnitelné rizikové faktory

1.3.2.1. Dyslipidémie

Vyšší hladiny celkového, a především pak LDL cholesterolu (LDL-c) a TG v kombinaci s nízkým HDL cholesterolem, se ukázaly být významným RF vzniku aterosklerózy (23). Velký aterogenní potenciál mají především malé denzní LDL částice, které snadno pronikají endotelem, podléhají oxidaci a jsou špatně rozpoznatelné LDL-receptorem (24). Výsledky epidemiologických studií jednoznačně prokazují klesající KV riziko se snižováním hladin LDL-c, redukce LDL-c je tedy hlavním cílem v prevenci KVO (25). Vyšší riziko ICHS je spojováno s vysokými koncentracemi apolipoproteinu B (apo B) a nízkými koncentracemi apolipoproteinu A-I (apo A-I) (26). Samostatným nezávislým rizikovým faktorem je Lp(a), který se účastní procesu trombogeneze (27). Lp(a) je plazmatický lipoprotein složený z LDL částice bohaté na cholesterol, jedné molekuly apo B100 a apolipoproteinu(a). Vykazuje strukturální homologii s plazminogenem a plazminem, nemá ale žádnou fibrinolytickou aktivitu. Současně je Lp(a) schopen akcelerovat proces aterosklerózy zvýšenou depozicí cholesterolu v intimě.

1.3.2.2. Kouření

Kouření je významným rizikovým faktorem rozvoje ICHS a obecně úmrtnosti na KVO (28). Kuřáci starší šedesáti let mají přibližně dvojnásobně vyšší riziko fatální KV příhody než nekuřáci. U věkových kategorií pod padesát let je toto riziko u kuřáků dokonce pětinásobně vyšší ve srovnání s nekuřáky (29), přičemž riziko KVO stoupá i u pasivních kuřáků (30). Přesný mechanismus, kterým kouření přispívá k rozvoji aterosklerózy, není zcela jasný. Řada složek tabákového kouře včetně nikotinu byla poznána jako potenciálně aterogenní. Významnou roli hraje přítomnost reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) ve vdechovaném kouři, které způsobují oxidaci plazmatických LDL částic a zvýšenou adherenci monocytů k endotelu (31).

1.3.2.3. Arteriální hypertenze

Hodnoty krevního tlaku nad 140/90 mmHg jsou prokazatelně spjaté s vyšším rizikem ICHS i dalších komplikací aterosklerózy a podávání antihypertenziv má tak pozitivní vliv na snížení rizika aterosklerózy (32). Na patogenezi aterosklerózy se v případě arteriální hypertenze podílí především angiotensin II (AII), který kromě svých vazokonstrikčních schopností může vyvolat zánětlivý proces intimy spuštěním produkce superoxidového aniontu v buňkách endotelu a hladkých svalových buňkách (33) a zvyšováním exprese prozánětlivých cytokinů (např. interleukinu-6) hladkými svalovými buňkami a adhezivních molekul endoteliálními buňkami (34).

1.3.2.4. Diabetes mellitus 2. typu

Porušená glukózová homeostáza, inzulinová rezistence a diabetes mellitus 2. typu jsou také spojené s předčasnou manifestací aterosklerózy (riziko diabetiků 1. typu je zvýšené méně). Diabetes mellitus provází hyperglykémie, která vede k modifikaci molekul a vzniku pokročilých produktů glykace, tzv. advanced glycation end products (AGEs) (35). Těmto změnám podléhají bílkoviny, které poté mohou zapříčinit zvýšenou produkci prozánětlivých cytokinů endoteliálními buňkami. U diabetiků bývá také vyšší stupeň oxidačního stresu zprostředkovaný ROS a karbonylovými skupinami (36). Je tedy zřejmé, že diabetes mellitus 2. typu je onemocnění spojené s vystupňovaným oxidačním stresem.

Vzhledem k vysokému riziko rozvoje KV příhody u diabetiků je diabetes mellitus 2. typu nově hodnocen jako tzv. „ekvivalent KV rizika“, tedy pacienti s diabetem bez známého KVO mají shodné desetileté riziko KV příhody jako nediabetici se známým KVO (37). K diabetikům bychom proto měli přistupovat jako k rizikovým pacientům a léčit je stejně jako nemocné s již známým KVO. Ekvivalentem KV rizika rozumíme jiné onemocnění nebo jiné klinické formy aterosklerózy. Pacienti s ekvivalentním rizikem KVO mají riziko rozvoje infarktu myokardu (IM) nebo náhlé srdeční smrti vyšší než dvacet procent v následujících 10 letech. Ekvivalenty KVO jsou symptomatická ateroskleróza karotid, onemocnění periferních tepen (ischemická choroba dolních končetin), aneurysma abdominální aorty, diabetes mellitus 2. typu a chronické renální selhání (38).

1.3.2.5. Metabolický syndrom

Kombinací několika rizikových faktorů u jednotlivce dochází k násobení rizika progrese aterosklerózy do fáze klinické manifestace. Pozorování častého sdružení rizikových faktorů cévního poškození u nemocných s abdominální obezitou a inzulínovou rezistencí vyústila v popis tzv. metabolického syndromu (MS), což je kombinace aterogenní dyslipidémie (vyšší hladiny TG, nízké hladiny HDL, vyšší podíl malých denzních LDL částic), inzulinové rezistence, arteriální hypertenze a abdominální obezity. Klinická kritéria metabolického syndromu přijatá Českým institutem metabolického syndromu shrnuje tabulka 2.

tabulka č.2: Kritéria metabolického syndromu (39, 40):

Obvod pasu Muži Ženy	 > 102 cm > 88 cm
Triglyceridy	≥ 1,7 mmol/l nebo specifická léčba
HDL cholesterol Muži Ženy	 < 1 mmol/l < 1,3 mmol/l nebo specifická léčba
Krevní tlak	≥ 130/≥85 mmHg nebo antihypertenzní léčba
Glykemie nalačno	≥ 5,6 mmol/l nebo porušená glukózová tolerance, DM 2. typu nebo léčba antidiabetiky

Jedinci splňující kritéria MS (tedy alespoň 3 z uvedených charakteristik) mají velmi vysoké riziko rozvoje aterosklerózy a potažmo rozvoje KVO (41) a dokonce vyšší celkovou mortalitu, kterou lze ale jen částečně vysvětlit jenotlivými složkami MS (42). Arteriální hypertenze a diabetes mellitus 2. typu jsou spojené s vystupňovaným zánětlivým procesem stejně jako ateroskleróza. Prozánětlivý stav je tedy jakýmsi spojovacím můstkem těchto patofyziologických jednotek a parametry zánětu jsou výrazně elevované i u pacientů s MS ve srovnání s běžnou populací (43, 44). Zánětlivé parametry jsou u jedinců splňujících kritéria

MS bez jakéhokoli jiného onemocnění signifikantně vyšší než u osob se stejným body mass indexem (BMI) bez MS (45). Zvýšený oxidační stres by tedy mohl být jakýmsi pojítkem, které je zodpovědné za vyšší KV riziko nemocných s MS a lze se domnívat, že ovlivnění subklinického zánětu by mohlo vést ke snížení individuálního KV rizika. Prvním krokem v klinické praxi jsou jistě režimová opatření, která by v případě MS při dobré compliance nemocného mohla vést k pozitivnímu ovlivnění složek MS a následnému zmírnění prozánětlivého stavu organismu. I mírná redukce hmotnosti (pokles hmotnosti o 5%) vede k výrazným zdravotním benefitům a dramatickému zlepšení ve všech parametrech MS, i přesto, že BMI setrvává v pásmu obezity (46).

1.3.2.6. Obezita

Obezita s abdominální akumulací tuku je jak samostatným RF aterosklerózy, tak je i spojena s manifestací dalších významných RF, jako je diabetes mellitus, dyslipidémie a arteriální hypertenze, čímž také nepřímo přispívá k rozvoji KVO (47). Abdominální akumulace tuku má za důsledek tzv. aterogenní dyslipidémii, kdy se vysoké hladiny volných mastných kyselin uvolňovaných z viscerální tukové tkáně dostávají portální cirkulací do jater a stimulují v hepatocytech syntézu VLDL bohatých na TG (48). Buňky tukové tkáně jsou také schopny produkovat prozánětlivé cytokiny, především TNF-α a IL-6, čímž samotná obezita spouští zánětlivý proces a urychluje rozvoj aterosklerózy zcela nezávisle na dyslipidémii či inzulinové rezistenci (49). Tuková tkáň je producentem adiponektinu, který je významným autokrinním a parakrinním působkem v tukové tkáni ovlivňující diferenciaci preadipocytů ve zralé adipocyty. Má významné inzulin-senzitizující vlastnosti, je antiaterogenní a protizánětlivý, nicméně jeho koncentrace jsou u obézních osob prokazatelně nižší než u štíhlých jedinců (50). Mezi další funkce adiponektinu patří snižování množství viscerálního tuku, hladiny plazmatických TG a zvyšování HDL-c (51). Tímto zasahováním do poměru proaterogenních a antiaterogenních lipoproteinů krevní plazmy má de facto vliv na proces aterosklerózy (52), v neposlední řadě také přímo ovlivňuje funkci endoteliálních buněk redukcí exprese adhezivních molekul, snižuje také produkci TNF-α makrofágy a počet scavengerových receptorů na jejich povrchu (53).

Abdominální obezita a její metabolické důsledky představují tedy jeden ze zásadních rizikových faktorů aterosklerózy a rozvoje KVO, stává se tak vedoucí příčinou morbidity a mortality ve vyspělých zemích, přičemž její prevalence stále narůstá a postupně dosahuje až

pandemických rozměrů (54, 55). Existuje několik výše podrobněji zmíněných spojovacích článků mezi abdominální akumulací tuku a aterosklerózou – narušení metabolismu lipidů, inzulinová rezistence, arteriální hypertenze a v neposlední řadě vystupňovaný chronický subklinický zánět (56). Hladiny zánětlivých markerů u obézních dospělých jsou prokazatelně vyšší než u jedinců s normální tělesnou hmotností (57), byl prokázán vztah mezi množstvím tukové tkáně a hladinou CRP, ale také obvodem pasu a hladinou CRP (58). Jelikož chronický zánět hraje zásadní roli v patogenezi aterosklerózy, může být vyšší úroveň subklinického zánětu u obézních jedním z důvodů vyšší incidence KVO v této skupině populace (59).

1.3.2.7. Aterogenní dieta

Vysoké zastoupení transnenasycených mastných kyselin, nasycených mastných kyselin, jednoduchých sacharidů a soli spolu s nedostatkem zeleniny, vlákniny a vícenenasycených mastných kyselin přispívá k rozvoji aterosklerózy (60, 61). Takováto dieta působí silně prozánětlivě a protromboticky, což má za následek zvýšení rizika KVO.

1.3.2.8. Psychosociální stres

Podstatnou roli v patogenezi aterosklerózy a tedy rozvoji KVO hraje v současné době míra stresu. Lidé dlouhodobě žijící ve stresovém prostředí vykazují měřitelné změny v rovnováze sympatického a parasympatického systému a osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny, což negativně ovlivňuje KV systém ať už akutně (vznik IM, dysfunkce levé komory srdeční či arytmie) či chronicky (progrese aterosklerózy) (62, 63.)

1.3.2.9. Systémová zánětlivá onemocnění

Pacienti trpící systémovým zánětlivým onemocněním jako je revmatoidní artritida, systémový lupus erytematodes, Sjogrenův syndrom a systémová skleróza mají vyšší pravděpodobnost vzniku KVO, která jsou nejčastější příčinou morbidity a mortality mezi těmito nemocnými a intenzivní léčba základního onemocnění má pozitivní vliv i na případný rozvoj KVO (64).

1.3.2.10. Nízká fyzická aktivita

Sedavý způsob života patří bezpochyby mezi RF aterosklerózy (65), oproti tomu pravidelná fyzická aktivita má pozitivní vliv nejen na KV zdraví, ale na celkovou mortalitu

(66). Aktivní životní styl modifikuje také ostatní RF aterosklerózy svým pozitivním efektem na krevní tlak, zvyšuje HDL-c, pomáhá udržovat tělesnou hmotnost v pásmu normálního BMI, snižuje riziko rozvoje diabetu a v neposlední řadě funguje jako výborná prevence stresu (67).

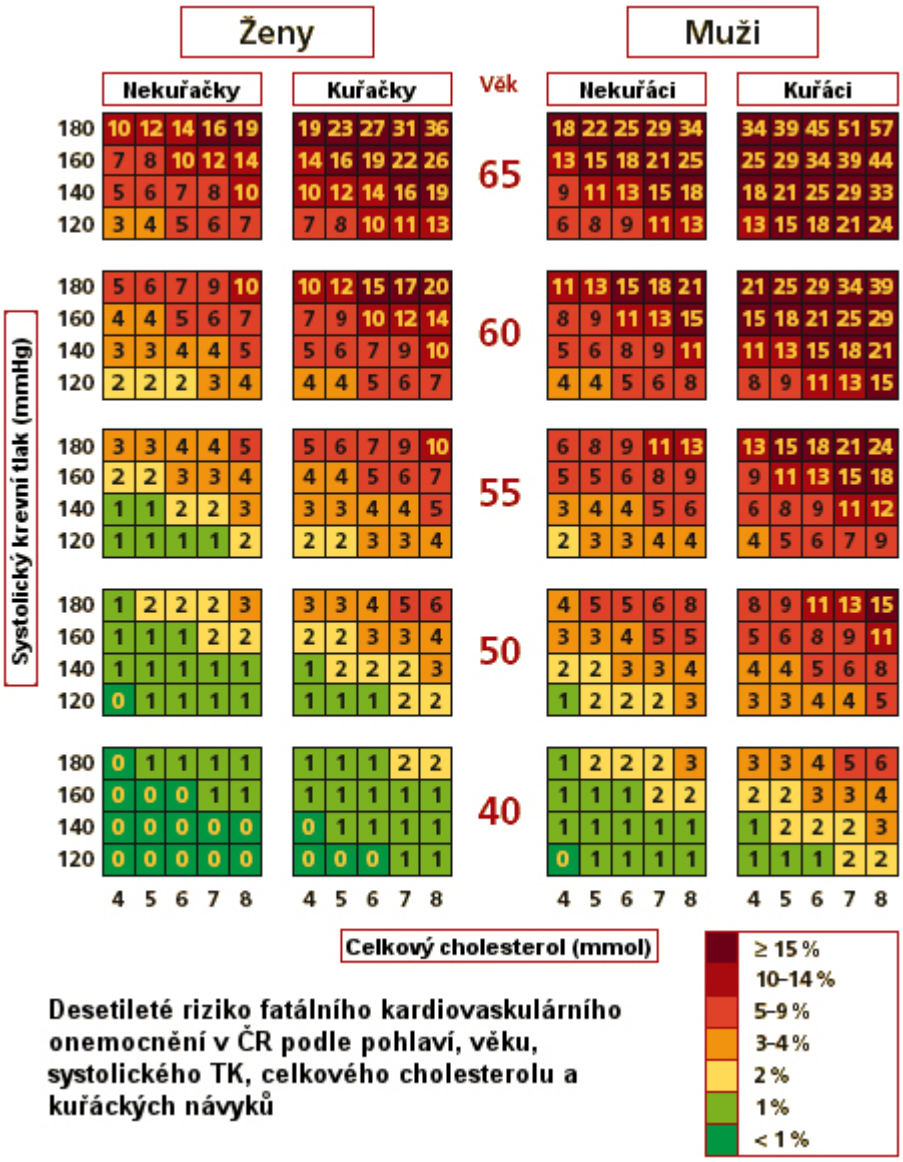
1.3.3. Odhad KV rizika

V klinické praxi často potřebujeme určit riziko rozvoje KVO u konkrétního pacienta. Naše možnosti stanovení KV rizika a cílení intervence k jeho snížení se v posledních letech významně zlepšily díky důslednému využívání standardních skórovacích systémů, které zohledňují několik rizikových faktorů u jednotlivce a pomáhají nám zpřesnit odhad KV rizika. Podle něj se následně stanovuje např. indikace k farmakologické léčbě.

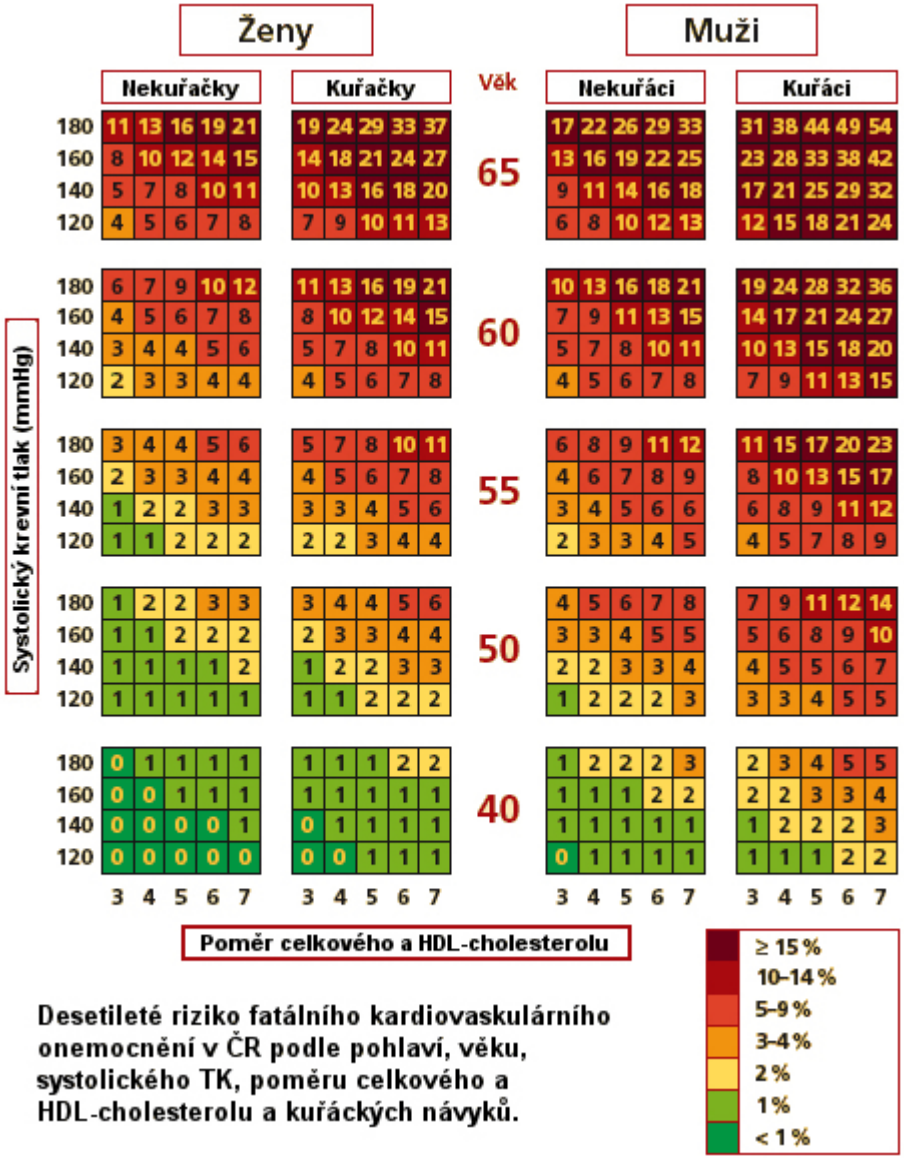
1.3.3.1. SCORE

Projekt SCORE provádí odhad rizika fatální KV příhody v následujících deseti letech na základě věku, pohlaví, kouření, hodnoty systolického krevního tlaku a hladiny celkového cholesterolu nebo poměru celkového a HDL cholesterolu. Využívá se u osob bez anamnézy KVO anebo diabetu či renálního onemocnění – tyto nemocné považujeme automaticky za vysoce nebo velmi vysoce rizikové. Za vysoce rizikové pacienty považujeme jedince s 5% a za velmi vysoce rizikové nemocné s pravděpodobností rozvoje fatální KV příhody vyšší než 10% . Toto riziko odečítáme z barevných nomogramů, které vycházejí z mortalitních dat České republiky a hodnot hlavních RF. (68, 69, 70)

tabulka č.3: Tabulka SCORE k odhadu KV rizika s využitím hodnot celkového cholesterolu



tabulka č.4: Tabulka SCORE k odhadu KV rizika s využitím poměru celkového a HDL cholesterolu



Hodnoty absolutního rizika KVO jsou u níže jmenovaných skupin osob vyšší než hodnoty odečtené z tabulky SCORE. Konkrétně jde o osoby, které: se věkem přibližují vyšší věkové kategorii, u asymptomatických osob s preklinickými známkami aterosklerózy, u osob s pozitivní rodinnou anamnézou KVO, nízkou koncentrací HDL-c nebo zvýšenou koncentrací TG, porušenou glukózovou tolerancí, zvýšenou hladinou CRP, fibrinogenu, homocysteinu, apo B nebo Lp(a), u obézních nebo fyzicky inaktivních osob.

1.3.3.2. Framinghamská rovnice

Tato rovnice byla navržena na základě dat získaných Framinghamskou studií v roce 1998 (71) a mírně upravena v roce 2002 (36). Do rovnice dosazujeme jednotlivé rizikové faktory KVO a výpočtem dostaneme pravděpodobnost jakékoli budoucí kardiovaskulární i cerebrovaskulární příhody u jedinců bez manifestního KVO. Tento skórovací systém je tedy možné použít pouze v primární prevenci a, na rozdíl od projektu SCORE, také u diabetiků. Při výpočtu se bere v úvahu věk, pohlaví, systolický krevní tlak, kuřáctví a hodnoty celkového a HDL cholesterolu. Výpočet je možné provést na mnoha internetových stránkách jednoduchým dosazením rizikových faktorů (např. http://cvdrisk.nhlbi.nih.gov/calculator.asp). V původní verzi rovnice bylo kalkulováno i s diabetem, který je nyní hodnocen jako ekvivalent KV rizika.

1.3.3.3. Reynoldsova rovnice

Během let používání framinghamské rovnice ke stanovení KV rizika sílila snaha o zdokonalení výpočtu a zpřesnění odhadu rizika. Proto byl mezi proměnné původní rovnice přidán hs-CRP a předčasný výskyt KV příhody u rodiče (72, 73).

1.3.3.4. Nejnovější schéma odhadu KV rizika dle American Heart Association (AHA)

V roce 2013 byla AHA upravena kritéria ke stratifikaci rizika KVO. Vycházejí z novějších a širších dat z epidemiologických studií. Jsou určena pro populaci ve věku 40-79 let. Ke stanovení rizika je třeba zhodnotit věk, pohlaví, rasu, celkový a HDL cholesterol, systolický krevní tlak léčený či neléčený, diabetes mellitus a nikotinismus. V případě potřeby (pokud je výsledek stratifikace nejasný, eventuálně se pacient dle kritérií nachází v pásmu středního KV rizika) je doporučeno dále zjistit přadčasný výskyt KVO v rodině, hladinu hs-CRP, vyšetřit kalciové skóre koronárních tepen a index kotník-paže (16).

Kromě klasických skórovacích systémů můžeme také využít zobrazovacích metod k detekci subklinické aterosklerózy, pátráme po známkách inzulínové rezistence a hodnotíme genetické faktory rizika prostřednictvím rodinné anamnézy. Snahou lékařů působících v oblasti preventivní medicíny je co možná nejvíce eliminovat vliv RF na pacienta včasným rozpoznáním rizika a jeho intervencí. Přesto přibližně polovina koronárních a

cerebrovaskulárních příhod proběhne u osob, které standardní skórovací systémy neidentifikují jako vysoce rizikové a více než polovina případů primomanifestace koronární ateroskleróz je náhlá srdeční smrt nebo akutní infarkt myokardu bez jakýchkoli předchozích symptomů. Mnoho pacientů, kteří prodělali akutní infarkt myokardu, má hladinu cholesterolu v rámci fyziologického rozmezí pro běžnou populaci, nebo i nižší (74). Trombotické komplikace, které vyústí v akutní infarkt myokardu, se obvykle neodehrávají v místech dříve zjištěné kritické stenózy. Naopak, většina akutních uzávěrů koronárních tepen nasedá na oblast nevýznamné stenózy nestabilním (vulnerabilním) plátem náchylným k ruptuře. Zdá se tedy, že aktivace probíhajícím zánětem je pro rupturu plátu zásadnější než stupeň stenózy (75). Proto se výzkumné úsilí zaměřuje na nalezení dalších biomarkerů KV rizika, které by zpřesnily odhad rizika KV příhody u jednotlivce.

1.4. Zánětlivé rizikové faktory aterosklerózy

Nové markery KV rizika by mohly pomoci zpřesnit odhad rizika v primární i sekundární prevenci, protože mezi pacienty po prodělaném akutním koronárním syndromu (AKS) stále přetrvává 12-16% incidence velké KV příhody v horizontu 4-6 měsíců po ukončení hospitalizace (76). Současné možnosti stanovení KV rizika v běžné praxi zahrnují anamnestické, fyzikální a laboratorní vyšetření, která nás informují o hodnotách tradičních RF u konkrétního pacienta. Z těchto údajů vycházíme při diagnostice a zhodnocení individuálního rizika a samozřejmě i při léčbě. Máme také k dispozici ultrasonografické vyšetření krčních tepen, případně koronární angiografii nebo intravaskulární ultrasonografii, ale žádné z uvedených vyšetření nepřináší informaci o vulnerabilitě plátu. Ačkoli je v současné době ve fázi vývoje mnoho nových nadějných technologií (např. magnetická rezonance karotid, virtuální intravaskulární ultrasonografie, zobrazování cévní stěny pomocí PET CT vyšeřtení zachycující metabolickou aktivitu aterosklerotického plátu), které mohou pomoci upřesnit vlastnosti aterosklerotického plátu včetně jeho stability, všechny tyto metody jsou invazivní nebo velice nákladné, což limituje jejich běžné praktické využití. Bylo by tedy vhodné najít spolehlivý, ale zároveň neinvazivní a co možná nejlevnější způsob identifikace plátu s vysokou tendencí k ruptuře. V roce 2012 bylo Evropskou kardiologickou společností doporučeno vyšetřovat u pacientů ve středním riziku některé nové markery KV rizika (21), které u konkrétního pacienta mohou modifikovat 10-leté riziko stanovené pomocí klasických RF. V řadě studií bylo identifikováno několik nových rizikových faktorů

s doporučením zvážit agresivnější hypolipidemickou léčbu v případě, že konkrétní marker byl u vyšetřovaného nad doporučeným limitem pro zdravou populaci. Mezi tyto markery patří některé biomarkery zánětu (již používaný hs-CRP, fibrinogen, fosfolipáza A_2 asociovaná s lipoproteiny (Lp-PLA_2) a trombotické biomarkery (homocystein a Lp-PLA_2 u pacientů s vysokým rizikem rekurence aterotrombotické příhody). Procesu trombogeneze se také účástní Lp(a), který je také novým nadějným RF KVO, stejně jako myeloperoxidáza (MPO), oxidované LDL částice (ox-LDL), dále tzv. kalciové skóre koronárních tepen, tloušťka intimy-medie karotid, index kotník-paže. Snahou výzkumných týmů v současné době je najít takový parametr, který by umožnil stratifikaci rizika u pacientů, kteří podle nyní posuzovaných RF patří do skupiny se středním rizikem rozvoje KVO. K těmto jedincům bychom na základě přesnějšího zhodnocení rizika adekvátně přistupovali z hlediska dalšího vyšetřování a především případné agresivnější léčby. Monitorace nových RF v čase u konkrétního pacienta by pak pomohla sledovat úspěšnost léčby. V našich studiích jsme se zaměřili na vybrané prozánětlivé faktory, které jsou stále častěji pod drobnohledem odborníků jako nadějné markery KV rizika.

tabulka č.5: Nové rizikové faktory aterosklerózy

Biochemické parametry	Ostatní vyšetření
Biomarkery zánětu hs-CRP fibrinogen IL-6 Lp-PLA_2 MPO ox-LDL SAA	kalciové skóre koronárních tepen tloušťka intimy-medie karotid index kotník-paže angiografie s využitím počítačové tomografie magnetická rezonace tepen PET-CT tepen se zobrazením aktivity aterosklerotického plátu Virtuální histologie s 3D mapováním
Biomarkery trombózy homocystein Lp-PLA_2 trombin tkáňový faktor	
Lipoprotein(a)	

hs-CRP – C-reaktivní protein měřený vysoce senzitivní metodou; Lp-PLA_2 – fosfolipáza A_2 asociovaná s lipoproteiny; MPO – myeloperoxidáza; ox-LDL – oxidované částice o nízké hustotě; IL-6 – interleukin 6; SAA – sérový amyloid A, PET– pozitronová emisní tomografie

Právě chronický zánět jako podstata rozvoje aterosklerózy a jeho ukazatele jsou hlavním předmětem zájmu výzkumu v posledních letech. Výše podrobněji popsaný proces vzniku aterosklerotického plátu, jeho progrese i následné komplikace jsou doprovázené zánětlivou reakcí ve stěně cévní, mnoho prozánětlivých působků ve zvýšeném množství cirkuluje v krevním oběhu a je možné jejich hladiny stanovovat. V posledních letech byly velké naděje z hlediska vhodného markeru KV rizika vkládány například v interleukin-6, sérový amyloid A, ox-LDL, MPO, ale především hs-CRP a Lp-PLA_2.

1.4.1. High-sensitivity C-reaktivní protein

Mezi poměrně tradičně sledované parametry zánětu patří nepochybně reaktant akutní fáze C-reaktivní protein (CRP) měřený vysoce senzitivní metodou, tedy hs-CRP, kterým se v posledních desetiletích zabývala řada klinických studií jako velice nadějným markerem

KV rizika. Nicméně závěry provedených studií nebyly konzistentní. Některé považovaly hs-CRP za silný prediktor KV příhody (77, 78) a doporučovaly stanovení hs-CRP ke zpřesnění KV rizika u pacientů v primární prevenci. Byla také nalezena asociace mezi hladinou CRP a pravděpodobností ruptury aterosklerotického plátu u pacientů s IM (79) a přímá úměrnost mezi hladinou CRP a počtem makrofágů v plátech s tenkou fibrózní čepičkou náchylných k ruptuře (80). Jiné studie ovšem prokázaly adjustací na konvenční rizikové faktory KVO oslabení asociace mezi hs-CRP a rizikem KV příhody (81, 82, 83), další studie zpochybnily kauzální podíl CRP na procesu aterosklerózy (84, 85, 86). Následně došlo ke snížení zájmu o stanovení CRP v rámci predikce rizika KVO v klinické praxi. Dle doporučení ESC/EAS z roku 2011 není rutinní stanovení CRP v rámci hodnocení individuálního rizika KVO považováno za přínosné (25), pouze u osob se středním KV rizikem dle tradičních rizikových markerů může být stanovení hs-CRP vodítkem k intenzifikaci léčby k dalšímu snížení tohoto rizika (87). Parametry systémového zánětu ale nesplňují podmínky vaskulárně specifického markeru a mohou dávat falešně pozitivní výsledky. Vedle tradičních zánětlivých parametrů, jako je CRP, jsou tudíž v posledních letech upřednostňovány specifičtější markery z hlediska predikce rizika KVO.

1.4.2. Fibrinogen

Fibrinogen coby prekurzor fibrinu je jedním z proteinů účastnících se koagulační kaskády, jeho funkce ale spočívá také ve stimulaci migrace hladkých svalových buněk, zvyšováníť viskozity krve a podporování agregace trombocytů. Fibrin má schopnost vázat se na lipoproteiny v cévní stěně a akcelerovat růst aterosklerotického plátu stimulací akumulace lipidů (88). Několik prospektivních epidemiologických studií prokázalo asociaci koncentrací fibrinogenu s KV rizikem, nicméně výsledky nebyly konzistentní a chybí studie na větších skupinách pacientů. Metaanalýzou zhodnocující studie na 150 tisících pacientů bylo zjištěno, že přibližně 7% variability koncentrace fibrinogenu je daná jeho závislostí na klasických RF a dalších 10% variability je možné vysvětlit ostatními zánětlivými parametry (89).

1.4.3. Interleukin 6

Interleukin 6 (IL-6) je produkován T-lymfocyty , makrofágy a endoteliálními buňkami jako odpověď na zánětlivý stimul. IL-6 je schopný zánětlivý proces jak akcelerovat tak i

inhibovat. Jako protein akutní fáze způsobuje upregulaci jiných zánětlivých markerů, např. CRP. Vzestup hladin IL-6 následuje také po svalových kontrakcích hladkých svalových buněk v cévní stěně, byla zjištěna možná role IL-6 v katabolismu lipidů a inzulinové rezistenci (90). Metaanalýza 17 prospektivních epidemiologických studií publikovaná v roce 2008 zahrnující 5730 případů KVO zjistila vyšší riziko KVO u pacientů s elevací IL-6 (91). Existuje ale vysoká individuální variabilita koncentrací IL-6, což spolu s jeho krátkým poločasem ovlivňuje hodnocení studií a limituje využitelnost vyšetření. Jsou proto potřeba další studie k potvrzení asociace IL-6 s KVO.

1.4.4. Oxidované LDL částice

LDL částice mohou byt oxidované v plazmě nebo v cévní stěně činností volných radikálů. Částice oxidované v cirkulaci ztrácejí schopnost vazby na LDL-receptor a jsou vychytávány různými druhy scavengerových receptorů. V cévní stěně dochází k fagocytóze ox-LDL makrofágy, vzniku pěnových buněk a následně formování aterosklerotické léze. Ox-LDL mají také schopnost indukovat aktivaci buněk v subendoteliálním prostoru, což vyústí v endoteliální dysfunkci a proliferaci hladkých svalových buněk (92-97). Plazmatické hladiny ox-LDL jsou signifikantně vyšší u obézních jedinců s MS (45, 98), podle jiné studie byla zjištěna přímá úměra mezi hladinami ox-LDL a tíží aterosklerotického postižení, přičemž hladina ox-LDL korelovala s jinými zánětlivými markery (CRP, TNF-α) (99).

1.4.5. Myeloperoxidáza

MPO je enzym ze skupiny peroxidáz obsažený v azurofilních granulích neutrofilních granulocytů a v lyzosomech monocytů. V přítomnosti chloridových aniontů katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na kyselinu chlornou, tedy vznik ROS, které jsou nezbytné v obranných reakcích organismu (100). MPO se aktivuje při tzv. respiračním vzplanutí leukocytů a významně se podílí na destrukci fagocytovaných mikroorganismů. MPO je také produkovaná leukocyty přítomnými v aterosklerotickém plátu, kde její činností vznikající ROS, které jako vysoce nestabilní látky rychle reagující s ostatními molekulami oxidativně modifikují LDL částice (101). Také apo A-I, hlavní apolipoprotein HDL částice, je terčem MPO katalyzované oxidace, která činí tento lipoprotein dysfunkčním (102). Další z vedlejších efektů činnosti tohoto enzymu je spotřebovávání oxidu dusnatého (NO), což má významný vliv v rozvoji zánětlivé reakce endotelu a vzniku endotelové dysfunkce (103). MPO je také

spojena s vyšší vulnerabilitou aterosklerotického plátu (104), pravděpodobně aktivací proapoptotických a protrombogenních kaskád, které hrají významnou úlohu při progresi plátu (105). Toto komplexní ovlivnění metabolismu lipoproteinů a funkcí endotelu vedlo k teorii uplatnění MPO v patogenezi aterosklerózy a provedené studie skutečně prokázaly asociaci hladin MPO s rizikem rozvoje KVO (106). Byla prokázaná souvislost mezi koncentracemi MPO a rozvojem AKS (107). Dále byla prokázána asociace MPO s vyšším výskytem KV příhody přetrvávající i po adjustaci na tradiční RF, clearence kreatininu, B-natriuretický peptid a hs-CRP (108).

1.4.6. Fosfolipáza A2 asociovaná s lipoproteiny

1.4.6.1. Úvod

Mezi slibné faktory umožňující zpřesnění odhadu rizika aterotrombotických komplikací patří Lp-PLA_2. Jedná se o vysoce vaskulárně specifický parametr zánětu neovlivnitelný běžnými infekčními nebo autoimunitními nemocemi s nízkou biologickou variabilitou podobně jako plazmatické lipoproteiny (109). Lp-PLA_2 je enzym objevený roku 1980, poprvé popsán svou schopností hydrolyzovat faktor aktivující destičky (PAF) – nejprve byl tedy znám pod názvem acetylhydroláza faktoru aktivujícího destičky (PAF-AH) (110). Producentem enzymu je řada buněk monocytomakrofágového systému, převážně makrofágy, T-lymfocyty a žírné buňky, přičemž tvorba enzymu je kontrolovaná zánětlivými mediátory jako je interferon-γ a bakteriální lipopolysacharidy (111).

1.4.6.2. Struktura

Existuje několik odlišných izoforem enzymu, mezi častěji zastoupené patří izoformy přítomné v intracelulárním a extracelulárním prostoru. Intracelulární Lp-PLA_2 se vyskytuje ve dvou variantách, přičemž typu II jsou připisované antioxidační vlastnosti (112). Extracelulární forma enzymu, identifikovaná v plazmě, cirkuluje v aktivní formě ve vazbě na lipoproteiny, což bylo spolu s objevením dalších substrátů důvodem změny názvu enzymu. Přibližně 80% je asociováno s LDL, tato vazba je založena na specifické interakci mezi N-terminálním koncem Lp-PLA_2 a C-terminálním koncem apo B100 LDL částice (113). Z 15% se enzym váže

na HDL a další lipoproteiny (113,114). Podle proběhlých studií má Lp-PLA_2 zvýšenou afinitu k malým denzním LDL částicím (115, 116).

1.4.6.3. Funkce

Jedná se o člena rodiny tzv. fosfolipáz, které jsou charakteristické svou schopností hydrolyzovat sn-2 esterovou vazbu fosfolipidů. Specifickou schopností Lp-PLA_2 je katalyzovat hydrolýzu acetylové skupiny v sn-2 pozici PAF za vzniku lyso-faktoru aktivujícího destičky (lyso-PAF) a acetátu, čímž dochází k inaktivaci PAF (110).

Komplex Lp-PLA_2 a LDL částice vstupuje do subendoteliálního prostoru, kde zůstávázachycen proteoglykany extracelulární matrix (117). V intimě dochází k oxidaci fosfolipidů LDL částice a následné aktivaci fosfolipázy vázané na LDL, která katalyzuje hydrolýzu oxidovaných fosfolipidů lipoproteinů (především fosfatidylcholinu) a buněčných membrán. Touto enzymatickou činností jsou uvolňovány vysoce prozánětlivé a cytotoxické oxidované mastné kyseliny o krátkém řetězci a lysofosfatidylcholin, které inhibují endoteliální produkci NO, navozují expresi cytokinů a adhezivních molekul buňkami endotelu a usnadňují následný vstup monocytů do stěny cévní (118, 119). Aktivací monocytů vznikají makrofágy fagocytující ox-LDL za vzniku pěnových buněk a rozvoje nekrotického jádra aterosklerotické léze. Aktivované makrofágy a pěnové buňky produkují další množství Lp-PLA_2, která má schopnost vystupovat ze subendoteliálního prostoru opět do krevního řečiště (120). Největší koncentraci Lp-PLA_2 můžeme najít v aterosklerotickém plátu náchylném k ruptuře, tedy v plátu s mohutnou nekrotickou vrstvou a tenkou fibrózní čepičkou (121, 122). Na druhou stranu stabilní ateromový plát má jen nízkou koncentraci enzymu, nízký obsah zánětlivých buněk a je krytý silnější fibrózní vrstvou, ačkoli v jeho místech bývá signifikantně výraznější stenóza. Fakt, že více než 66% AIM nastává u osob s dříve koronarograficky dokumentovanou stenózou méně než 50% (123), jednoznačně dokazuje rozhodující úlohu zánětlivých kaskád probíhajících v aterosklerotickém plátu v procesu nestability plátu a tedy zvýšené tendenci k jeho ruptuře.

1.4.6.4. Genetická determinace

Existuje několik polymorfismů genu PLA2G7, který kóduje Lp-PLA_2. Byla identifikována nefunkční, tzv. nulová alela 279F, jejíž homozygotní nosiči fosfolipázu v plazmě zcela postrádají, aktivita enzymu u heterozygotů je přibližně poloviční (124). Alela

279F je velice vzácná, nalezena byla u asiatů, podle provedených studií je prevalence homozygotů 279FF 0,4% v čínské, 1,2% v korejské a 3% v japonské populaci (125, 126). Zjištěné rozdíly v aktivitě enzymu mezi jednotlivými varianty genu vedly k myšlence sledování skupin homozygotů 279FF, heterozygotů a běžné populace s cílem srovnat incidenci KVO a její rozdíl mezi jednotlivými skupinami. V Jižní Koree byla provedena studie případů a kontrol srovnávající 2890 pacientů a předčasnou manifestací KVO s 3128 kontrolami bez známého KVO (127). Výsledky studie konzistentně prokázaly, že mezi homozygoty 279FF je signifikantně nižší výskyt KVO, především IM, než v běžné populaci, což je důkazem souvislosti mezi vyšší aktivitou Lp-PLA_2 a výskytem KVO. Byly objeveny i jiné varianty genu PLA2G7, např. A379V vykazuje rozdíl aktivity enzymu mezi variantou AA a VV pouze 7,2% (128). Další nalezené varianty genu jsou bez jakéhokoli efektu na aktivitu Lp-PLA_2.

1.4.6.5. Principy stanovení

Laboratorně je možné stanovit aktivitu nebo hmotnostní koncentraci Lp-PLA_2, přičemž ve většině provedených studií byla prokázána vysoká korelace mezi aktivitou enzymu a jeho hmotnostní koncentrací (129). Aktivitu Lp-PLA_2 lze detekovat pomocí konverze substrátu, kterým je PAF (130). Bohužel laboratorní metody založené na stanovování aktivity enzymu mají mnohé limitace. V tomto případě je jedním z nedostatků metody fakt, že aktivita Lp-PLA_2 se značně mění v závislosti na lipoproteinu, na kterém je enzym navázán (116), např. aktivita enzymu vázaného na HDL částici je osminová ve srovnání s jeho aktivitou při vazbě na LDL částici. Proto je tato metoda využívána prozatím pouze k výzkumným účelům.

Hmotnostní koncentraci enzymu lze stanovit pomocí enzymové imunoanalýzy. V současné době je pro každodenní praxi k dispozici kitová metoda umožňující laboratorní stanovení hmotnostní koncentrace Lp-PLA_2 imunoturbidimetricky. Jedná se o imunoanalýzu využívající dvou vysoce specifických monoklonálních protilátek pro přímé, turbidimetrické měření koncentrace fosfolipázy v lidském séru nebo plazmě. Lp-PLA_2 se ve vzorcích pacientů váže specificky k monoklonálním protilátkám, které jsou navázány na polymerní mikropartikule v suspenzi. Následně dochází ke změnám v turbiditě suspenze a jejím důsledkem je měřitelná změna absorbance poměrná ke koncentraci Lp-PLA_2 ve vzorku pacienta.

1.4.6.6. Vztah ke KV riziku

Zvýšené hladiny Lp-PLA2 jsou spojené s vyšším rizikem KV příhod nezávisle na tradičních RF jako je LDL-c a také nezávisle na CRP (131, 132, 133). Prokázaná byla elevace Lp-PLA_2 u pacientů s KVO v závislosti na tíži stenózy koronárních tepen, která vypovídala o závažnosti nálezu signifikantně lépe než hs-CRP (131). Aktivita Lp-PLA_2 v séru pacientů s KVO je schopna predikovat riziko ruptury aterosklerotického plátu, opět bez jakékoli závislosti na klasických RF nebo hs-CRP, dokonce s vyšší přesností než intravaskulární ultrasonografie (IVUS) (134). Dokumentovány byly i vyšší hladiny Lp-PLA_2 u pacientů s pokročilou stenózou v karotickém řečišti s výraznější elevací u nestabilních ateromových plátů opět nezávisle na hs-CRP (135).

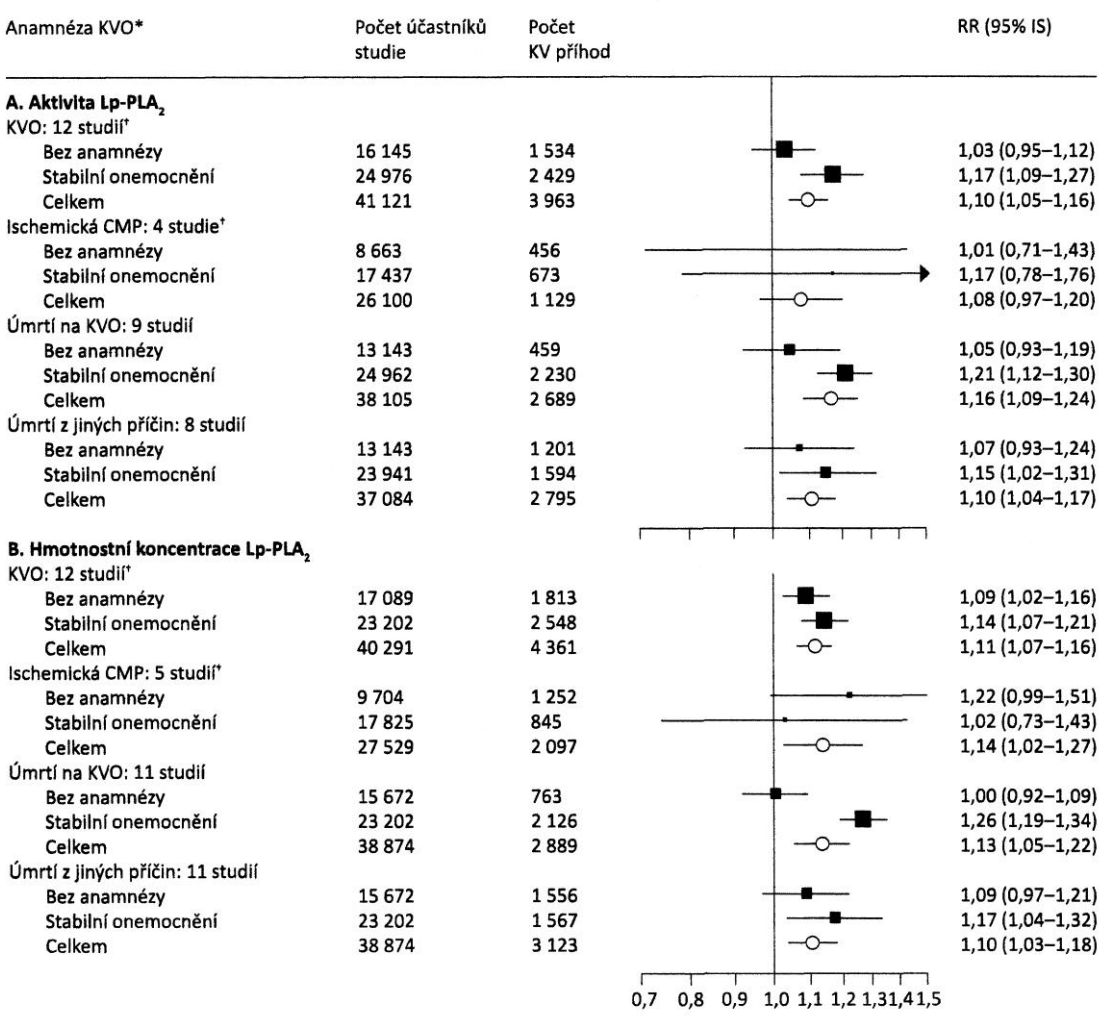
Na druhou stranu provedené studie také prokázaly, že enzym asociovaný s HDL částicemi může působit antiaterogenně. Theilmeier a spol. (136) svými in vitro a in vivo studiemi poukázali na spojení aktivity Lp-PLA_2 asociované s HDL se snížením adhezivity endotelu a migrace makrofágů do aterosklerotické léze.

Dřívější studie zabývající se asociací hladiny Lp-PLA_2 s angiograficky dokumentovaným KVO byly provedeny na malém vzorku, proto přinesly rozporuplné výsledky (114, 131, 137). Po provedení dalších studií byl získán jasný důkaz vztahu Lp-PLA_2 s rozsahem ateroskleózy. První rozsáhlá studie zkoumající efekt zánětlivých markerů na KV riziko byla studie WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study (138), která dokumentovala nárůst rizika fatální KV příhody při vzestupu hmotnostní koncentrace Lp-PLA_2, přičemž nebyla pozorována žádná korelace enzymu s ostatními sledovanými parametry zánětu (hs-CRP, fibrinogen) či klasickými RF. Women's Health Study (139) poukázala na asociaci hmotnostní koncentrace Lp-PLA_2 v plazmě s rizikem nefatálního IM, náhlé srdeční smrti nebo cévní mozkové příhody v kohortě perimenopauzálních žen, po adjustaci na LDL a HDL cholesterol došlo k oslabení asociace. Studie MONICA (140) demonstrovala vyšší riziko IM a náhlé srdeční smrti u mužů s vyšší hmotnostní koncentrací Lp-PLA_2, naopak výrazně nižší riziko KVO u jedinců obou pohlaví s nižšími hladinami Lp-PLA_2 bylo dokumentováno studií ARIC (141), kde ale také po adjustaci na LDL a HDL cholesterol docházelo k poklesu síly asociace. Podstatné bylo zjištění, že u osob s hladinami LDL-c pod 3,4 mmol/l zůstává asociace Lp-PLA_2 s rizikem KV příhod signifikantní. Stejně tak Rotterdamská studie (142), kterou bylo sledováno 7983 mužů a žen starších 55 let, potvrdila silnou asociaci aktivity Lp-PLA_2 s KVO nezávisle na klasických RF včetně hladin plazmatických lipoproteinů.

Opakovaně byla prokázána korelace hladin Lp-PLA_2 se stupněm koronarograficky dokumentované aterosklerózy (131, 143). Provedené studie poukázaly i na souvislost mezi hladinou Lp-PLA_2 a rekurencí KV příhody u jedinců v sekundární prevenci, nezávisle na tradičních RF a ostatních zánětlivých markerech (129, 137, 144, 145). Ojediněle byly pozorovány i asociace hladin Lp-PLA_2 s rozvojem srdečního selhání (129), pravděpodobně kvůli uplatnění chronického zánětu v remodelaci myokardu jako patofyziologickém podkladu srdečního selhání. Stejně tak se několik studií zabývalo vztahem chronického zánětlivého procesu k incidenci CMP, kdy Lp-PLA_2 hrála roli nezávislého RF ischemické CMP (146, 147). Na druhou stranu, studie PROVE-IT nenalezla vztah aktivity a hmotnostní koncentrace Lp-PLA_2 s CMP u kohorty s preexistujícím KVO (143). Ve vztahu fosfolipázy k ischemické CMP, na rozdíl od poměrně jednoznačných závěrů studií asociace s KVO, existuje řada kontroverzních zjištění. Zdá se, že je přítomna jistá asociace v populačních studiích, nikoli však u jednotlivců, kteří prodělali CMP. Tato pozitivní korelace Lp-PLA_2 s CMP v běžné populaci by mohla částečně vysvětlit „cholesterolový paradox"- známý rozpor mezi faktem, že terapie statiny snižuje ovlivněním plazmatických hladin cirkulujícího enzymu riziko CMP, ačkoli LDL cholesterol není rizikovým faktorem CMP. Současně byla provedenými studiemi prokázána vyšší aktivita Lp-PLA_2 u jedinců s MS (148), u nichž ovšem aktivita enzymu spojeného s HDL byla prokazatelně snížená (149).

Review mnoha studií provedené v roce 2008 (150) srovnávalo výsledky více než 25 prospektivních epidemiologických studií zabývajících se vztahem Lp-PLA_2 k riziku KV příhod a CMP. 10 z 11 studií prokázalo statisticky signifikantní asociaci mezi zvýšenou hladinou enzymu a výskytem koronární či KV příhody, 12 ze 13 studií zjistilo spojitost mezi vysokou aktivitou či hmotnostní koncentrací Lp-PLA_2 a rekurencí příhody, 6 studií prokázalo pozitivní asociaci s CMP. Výsledky napříč všemi studiemi jsou konzistentní stran zdvojnásobení rizika KV příhody u jedinců s Lp-PLA_2 v nejvyšším kvantilu ve srovnání s kvantilem nejnižším, kromě mírného oslabení této asociace u starších jedinců. Tyto výsledky jsou plně adjustované na tradiční RF a ostatní zánětlivé parametry, jako je hs-CRP, bez jakéhokoli oslabení asociace. Podle metaanalýzy 32 studií provedené v roce 2010 (151) existuje přímá úměra mezi stoupající aktivitou či hmotnostní koncentrací Lp-PLA_2 a výskytem KVO.

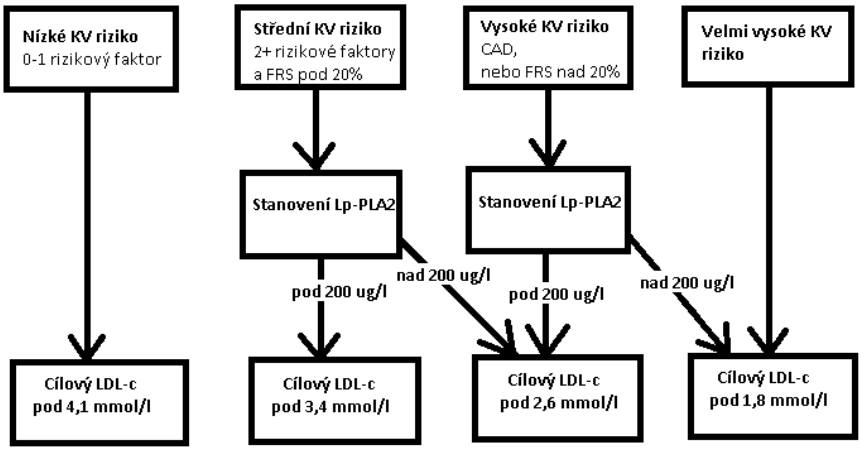
tabulka č.6 : Riziko rozvoje KVO a ischemické CMP stoupá s aktivitou či hmotnostní koncentrací Lp-PLA_2 i po adjustaci na tradiční RF (156).



V klinické praxi by tento zánětlivý parametr mohl teoreticky posloužit ke stratifikaci rizika KVO a umožnit individualizaci péče a intenzivnější terapii u rizikovějších skupin pacientů. Na základě výsledků veškerých dosud provedených studií National concensus panel v roce 2006 rozhodl o vhodnosti stanovení hmotnostní koncentrace Lp-PLA_2 spolu s tradičními RF k lepší stratifikaci individuálního rizika rozvoje KV příhody – k identifikaci pacientů ve vysokém riziku (152). Současně byl stanoven limit 200 ng/ml, hmotnostní koncentrace enzymu nad touto hranicí určuje zvýšené KV riziko. Tento limit byl dán výsledky studií, kde mezi jedinci s hmotnostní koncentrací enzymu 400 ng/ml a 250 ng/ml neexistuje prakticky žádný rozdíl z hlediska KV rizika (153). K analogickým závěrům dospěly studie aktivity enzymu, kde KV riziko stoupá v pásmu druhého tercilu aktivity, poté již zůstává víceméně neměnné (131).

Využití v klinické paxi by bylo přínosné u pacientů se středním rizikem KVO dle tradičních RF, kde by Lp-PLA_2 významně přispěla ke stratifikaci rizika a individualizaci léčby. K jedincům s vyšší aktivitou či hmotnostní koncentrací enzymu bychom přistupovali jako k rizikovějším z hlediska budoucího rozvoje KV příhody a volili bychom adekvátní agresivnější léčbu k nižším cílovým hodnotám LDL-c.

obrázek č.1: Možné využití Lp-PLA2 v klinické praxi – stratifikace KV rizika



MUDr. Janka Franeková, prof. MUDr. Antonín Jabor, CSc.; Fosfolipáza A2 asociovaná s lipoproteiny – nový marker kardiovaskulárního rizika; Postgradualni medicina, 2010, roč. 12

1.4.6.7. Ovlivnění Lp-PLA_2

Klíčovým mechanismem expanze nekrotické vrstvy aterosklerotického plátu se zdá být vystupňovaná buněčná apoptóza v cévní stěně zapříčiněná prozánětlivými a cytotoxickými působky. Lze tedy předpokládat, že inhibice aktivity Lp-PLA2 by měla mít zásadní vliv na stabilizaci aterosklerotických lézí náchylných k ruptuře. Možností ovlivnění Lp-PLA_2 je, stejně jako v případě snižování hladiny lipidů, vícero.

1.4.6.7.1. Nefarmakologické

Úpravou životního stylu kombinací pravidelné pohybové aktivity s dietními opatřeními dochází k poklesu Lp-PLA_2 o více než 30% (154). Omezením příjmu tuků dojde k poklesu fosfolipázy v kombinaci s ovlivněním dyslipidémie, nižší příjem jednoduchých sacharidů má pozitivní vliv na zánětlivé parametry – je tedy vhodná komplexní úprava

jídelníčku. Zcela zásadní efekt má zanechání kouření, které nejvyšší měrou přispívá k prozánětlivému stavu organismu. Proběhlé studie, které se zabývaly efektem režimových opatření, dokumentovaly ovlivnění Lp-PLA_2 spolu se snížením LDL-c, nicméně asociace mezi změnami Lp-PLA_2 a LDL-c byla pouze slabá (155).

1.4.6.7.2. Farmakologické

Na poli farmakoterapie můžeme k ovlivnění Lp-PLA_2 využít řadu léků. Vzhledem k asociaci fosfolipázy s plazmatickými lipoproteiny lze očekávat efekt hypolipidemické terapie na hladiny enzymu. Statiny, nejčastěji používaná hypolipidemika, snižují hladinu LDL-c o 20-50% dle typu a dávky léku, současně s efektem na LDL-c klesá při statinové léčbě i Lp-PLA_2 (156). Pokles aktivity enzymu koreluje s poklesem hladin LDL-c, přičemž přednostně dochází k útlumu aktivity enzymu asociovaného s malými denzními LDL částicemi (116, 117). Statiny vykazují velmi pravděpodobně dvojí efekt na plazmatickou hladinu Lp-PLA_2 – efekt poklesu LDL částic potřebných k navázání enzymu spolu s celkově protizánětlivým působením statinů, které je také dokumentováno poklesem hladin CRP (157). Provedené studie nicméně prokazují pouze mírnou korelaci mezi změnami hladin LDL-c a Lp-PLA_2. Silnou korelaci bychom pravděpodobně zaznamenali, pokud by byly studie orientované na subfrakce LDL-c, převážně se zaměřením na malé denzní LDL částice. V klinické praxi tedy nelze posuzovat aktivitu Lp-PLA_2 podle plazmatických hladin LDL-c (155). Zajímavým výsledkem jedné ze studií je kromě potvrzení snížení aktivity Lp-PLA_2 asociované s LDL také zvýšení antiaterogenní aktivity enzymu asociovaného s HDL při terapii atorvastatinem (156). Nicméně samotnou terapií statiny, třebaže intenzivní, lze dosáhnout pouze mírného poklesu Lp-PLA_2, k dalšímu snížení je třeba využít kombinované hypolipidemické léčby ať už přidáním niacinu (158) nebo užíváním omega-3 mastných kyselin (159). Pokles hmotnostní koncentrace enzymu byl zjištěn i u pacientů s intolerancí statinů, kteří byli léčeni pouze monoterapií specifickým blokátorem intestinální absorpce cholesterolu - ezetimibem (160).

Fibráty jsou léky užívané především k ovlivnění plazmatických hladin TG, současně mění spektrum LDL částic v neprospěch malých denzních. Efekt léčby fibráty na hladiny Lp-PLA_2 byl předmětem několika klinických studií. Tříměsíční terapie 200 mg fenofibrátu vykazovala pokles aktivity enzymu o 22-28% (161), u pacientů s hypercholesterolemií byl pokles aktivity enzymu úměrný poklesu hladiny LDL cholesterolu. Filippatos a spol. (162) popsali efekt samotného fenofibrátu a v kombinaci s orlistatem u obézních pacientů s MS.

Hladiny Lp-PLA_2 byly každým z léků sníženy i v monoterapii, kombinace byla však účinnější než samotný fenofibrát – aktivita enzymu poklesla až o 35%. Lp-PLA_2 asociovaná s HDL-c při terapii fenofibrátem opět stoupla, a to přibližně o 40%, přičemž vzestup hladiny enzymu byl úměrný poklesu hladiny plazmatických TG ($r = 0,39$; $p < 0,0001$). Za předpokladu antiaterogenních vlastností enzymu asociovaného s HDL částicemi přispívá tento fakt ke kladům terapie fenofibrátem (163).

V současné době je ve třetí fázi klinického hodnocení jediný lék specificky působící přímo na Lp-PLA_2. Předpokládaná role tohoto enzymu v patogenetické sekvenci vedoucí od oxidace LDL částice k zánětlivým pochodům v cévní stěně vedla k cílenému pátrání po specifickém inhibitoru aktivity Lp-PLA_2. Tak byl navržen darapladib, jehož vlivem na Lp-PLA_2 se v současné době zabývá řada studií.

Darapladib, jako specifický inhibitor aktivity Lp-PLA_2, zamezuje hydrolýze substrátů enzymu (164), in vivo studie prokázaly snížení obsahu lysofosfatidylcholinuv aterosklerotických lézích prasat (165). Současně byla zjištěna schopnost komponenty darapladibu inhibovat in vitro apoptózu makrofágů indukovanou oxidovanými LDL částicemi (166), což by mohlo poukazovat na další z funkcí darapladibu, tedy zpomalení expanze nekrotické vrstvy aterosklerotického plátu (167).

První klinická studie (168) srovnávala efekt placeba a darapladibu u pacientů léčených atorvastatinem po dobu 12 týdnů. Aktivita enzymu klesala ve srovnání s placebem až o 66% v závislosti na dávce inhibitoru spolu s poklesem hladin IL-6 a hs-CRP, což poukazuje na pravděpodobnou redukci prozánětlivého stavu. Ve skupině pacientů užívajících placebo došlo během léčby k progresi nekrotické vrstvy aterosklerotických lézí koronárních tepen, zatímco jedinci užívající darapladib měli angiografický nález beze změny (167). Tato studie demonstrovala fakt, že nekrotická vrstva aterosklerotické léze roste nezávisle na komplexní kardiovaskulární terapii, dokonce aniž by docházelo ke zvětšování celkového objemu aterosklerotického plátu. Toto může být částečným důvodem rekurence KV příhod u vysoce rizikových pacientů s KV onemocněním. Specifická inhibice Lp-PLA_2 darapladibem zastavila proces růstu nekrotické vrstvy, proto by mohla významně přispět k terapeutickému ovlivnění ateroskleróz.

V nedávné době byla ukončena studie zaměřená na sekundární prevenci, která zkoumala vztah mezi výskytem KV příhody a aktivitou Lp-PLA_2, lipidogramem a změnami pro- a protizánětlivé reakce organismu při terapii darapladibem (169). Jednalo se o

multicentrickou, randomizovanou, dvojitě zaslepenou, placebem kontrolovanou studii STABILITY (STabilization of Atherosclerotic plaque By Initiation of darpLadIb TherapY) srovnávající efekt specifického inhibitoru Lp-PLA_2 a placeba na výskyt KV smrti, IM nebo CMP u patnácti tisíc pacientů se stabilním KVO. Podle výsledků studie nebyl pozorován rozdíl mezi léčbou darapladibem a placebem, specifický inhibitor Lp-PLA_2 snížil riziko KV příhody pouze nesignifikantně. Na druhou stranu byl pozorován signifikantní pokles koronárních příhod, což je náznak pravděpodobného efektu darapladibu. Nedostatečný vliv terapie darapladibem na incidenci KV úmrtí, IM a CMP je možné spojovat s menším efektem inhibitoru na vulnerabilní ateromový plát, než bylo očekáváno. Současně je pravděpodobné, že riziko sledovaných pacientů bylo již minimalizováno předchozí léčbou, většina pacientů v době zahájení studie užívala vysoké dávky léčby v sekundární prevenci, z nich 96% pacientů bylo léčeno statiny, které mají schopnost snižovat hladiny Lp-PLA_2. Toto potvrzuje dlouhotrvající studie LIPID (Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease) (170) zabývající se efektem pravastatinu na zdraví pacientů se stabilní ICHS. Dle jejích závěrů je až poloviční efekt pravastatinu na snížení počtu KV úmrtí nebo IM přičítán vlivu na snížení hladin Lp-PLA_2. Je tedy pravděpodobné, že inhibice aktivity enzymu specifickým inhibitorem darapladibem může být méně účinná u pacientů léčených statiny.

Dále proběhla studie SOLID-TIMI 52 (Stabilization Of pLaques usIng Darapladib-Thrombolysis In Myocardial Infarction 52), která se zabývala efektem darapladibu na rekurenci velké KV příhody u třinácti tisíc pacientů po prodělaném AIM nebo CMP (171). Ani touto studií nebyl pozorován vliv léčby darapladibem na incidenci KV příhod. Specifický inhibitor darapladib nepřinesl tedy dodatečný benefit pacientům v sekundární prevenci, nejspíše z důvodu ovlivnění hladin Lp-PLA_2 již zavedenou farmakoterapií a dietou, kdy další snížení Lp-PLA_2 nesplnila očekávání ohledně klinického zlepšení v podobě další stabilizace plátu. Pacienti byli již léčeni maximální možnou farmakoterapií a po všech stránkách dobře kompenzováni v rámci sekundární prevence ICHS, proto není absence dalšího benefitu z terapie darapladibem tak dalece překvapivá.

Stanovení Lp-PLA_2 by dle výše zmíněného mohlo být užitečné ve spojení s tradičními RF ke stratifikaci rizika u pacientů ve středním či vysokém riziku rozvoje KVO. Pacienti s vyšší hladinou enzymu, které následně překlasifikujeme jako vysoce rizikové, mohou profitovat z intenzivnější hypolipidemické léčby bez ohledu na výchozí hladiny LDL-c. Vhodné je

sledování variability enzymu v čase u jednotlivých pacientů a možnost zhodnocení individuálního vývoje rizika.

2. Provedené práce v dané oblasti

2.1. Efekt redukce hmotnosti obézních dětí na parametry kardiovaskulárního rizika

V posledních letech pozorujeme zvýšení prevalence obezity a nadváhy v mladších věkových kategoriích, čímž dochází k nárůstu kardiovaskulárního rizika mezi mladšími jedinci. Vliv obezity nebo poklesu hmotnosti v dětství na zánětlivý proces zkoumán nebyl, věnovali jsme proto pozornost metabolickým změnám u dětí s nadváhou/obezitou po rychlé redukci hmotnosti. Zaměřili jsme se především na zánětlivé markery a rizikové faktory aterosklerózy s cílem zjistit, zdali redukcí hmotnosti klesá kardiovaskulární riziko již v dětském věku.

2.1.1. Soubor

Vyšetřeno bylo 40 dětí s nadváhou/obezitou, 15 chlapců a 25 dívek ve věku 13,7 ± 2,1. Všichni účastníci studie podstoupili měsíční redukční pobyt v lázních Poděbrady, program pobytu zahrnoval individuální změnu jídelníčku pod dohledem nutričního terapeuta s ohledem na věk a pět hodin skupinové fyzické aktivity denně. Cvičení zahrnovalo minimálně 120 minut aerobní aktivity denně (míčové hry, plavání, rychlá chůze) s tepovou frekvencí 65-75% tepového maxima pro danou věkovou kategorii a posilování. Mezi vylučující kritéria patřil diabetes mellitus, arteriální hypertenze, kouření, užívání jakýchkoli léků a kontraindikace fyzické aktivity.

2.1.2. Metodika

Děti byly vyšetřeny první a poslední den pobytu v lázních. Venózní krev byla odebrána po dvanáctihodinovém lačnění, stanovili jsme celkový cholesterol (TC), triglyceridy (TG), cholesterol o nízké hustotě (LDL-c), cholesterol o vysoké hustotě (HDL-c), apolipoproteiny A-I (apo-A) a B (apo-B), glykemie. Hladiny byly stanoveny enzymatickou metodou za použití automatického analyzátoru (Hitachi, Japonsko). LDL-c byl spočítán pomocí Friedwaldovy formule (LDL-c = TC – (HDL-c – TG/2,2)). Tělesná hmotnost byla změřena kalibrovanou elektronickou váhou s přesností 100 g, výška a obvod pasu a boků s přesností 0,5 cm, ze zjištěných hodnot byl spočítán body mass index (BMI). Systolický a diastolický krevní tlak byl měřen automatickým sfigmomanometrem (BP-203 NA) po 10 minutách vsedě, zaznamenána

byla hodnota průměru ze tří měření na pravé paži. Pro statistickou analýzu jsme použili Wilcocsonův test a Spearmanovu korelaci, pro adjustaci ANCOVA. V naší studii jsme stanovovali hmotnostní koncentraci Lp-PLA2 enzymovou imunoanalýzou s použitím monoklonální protilátky.

2.1.3. Výsledky

Dle očekávání jsme po měsíci režimových opatření zjistili změnu ve všech antropometrických parametrech. Signifikantně poklesl BMI (z vstupního 29,8±2,6 kg/m2 na 27,3±2,6 kg/m2, $p<0,05$), ale i celkové množství tělesného tuku, obvod pasu a boků. Tyto změny byly doprovázeny laboratorním poklesem TC, LDL-c a TG. Vzhledem k rychlému poklesu hmotnosti za krátkou dobu došlo také k poklesu HDL-c. Hmotnostní koncentrace Lp-PLA2 poklesla z počátečních 402±94 ug/l na 368±105 ug/l po intervenci ($p=0,008$). Zjistili jsme silnou pozitivní korelaci mezi Lp-PLA2 a TG, ostatní proměnné byly nezávislé na Lp-PLA2.

tabulka č.7: Antropometrická data před a po intervenci

	Před intervencí	Po intervenci	P-hodnota
Hmotnost (kg)	76,5±11,0	70,04±10,6	<0,05
BMI (kg/m^2)	29,83±2,6	27,3±2,6	<0,05
STK (mmHg)	122,26±11,4	117,38±14,9	ns
DTK (mmHg)	78,05±9,9	72,92±10,7	<0,05
Procenta tělesného tuku (%)	31,86±13,1	28,4±12	<0,05
Obvod pasu (cm)	86,48±7	80,24±7	<0,05
Obvod boků (cm)	100,58±6,8	93,76±8	<0,05

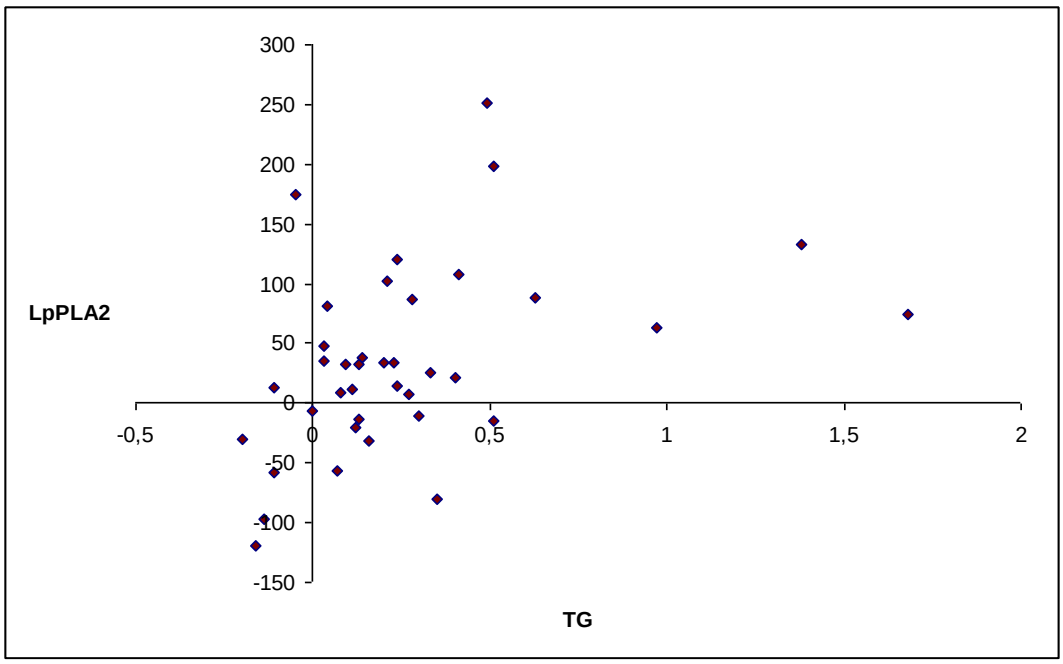
BMI – body mass index; STK – systolický krevní tlak; DTK – diastolický krevní tlak

tabulka č.8: Biochemické hodnoty před a po intervenci

	Před intervencí	Po intervenci	P-hodnota
TC (mmol/l)	4,36±0,7	3,49±0,8	<0,05
TG (mmol/l)	0,99±0,4	0,73±0,2	<0,05
HDL-c (mmol/l)	1,24±0,3	1,13±0,2	<0,05
LDL-c (mmol/l)	2,65±0,6	2,03±0,7	<0,05
apo-A (g/l)	1,29±0,2	1,09±0,2	<0,05
apo-B (g/l)	0,86±0,2	0,67±0,2	<0,05
lipoprotein(a) (mg/l)	0,37±0,3	0,29±0,3	<0,05
Lp-PLA2 (ug/l)	401,97±93,7	368,24±104,7	<0,05

TC – celkový cholesterol; TG – triglyceridy; HDL-c – cholesterol o nízké hustotě; LDL-c – cholesterol u vysoké hustotě; apo-A - apolipoprotein A-I; apo-B – apolipoprotein B

graf č.1: Korelace Lp-PLA$_2$ s TG



Lp-PLA$_2$ – fosfolipáza A$_2$ asociovaná s lipoproteiny; TG - triglyceridy

2.1.4. Závěr a diskuse

Redukce hmotnosti, BMI a tělesného tuku doprovázená zmenšením kožních řas a tělesných obvodů jsou beze sporu očekávané výsledky redukčního pobytu. Stejně tak změny lipidogramu jsou dané úpravou diety a pravidelnou fyzickou aktivitou, přičemž v tak krátkém časovém úseku nelze očekávat vzestup hladiny HDL-c, což je ve shodě s dřívějšími poznatky (172). Nicméně lze očekávat postupný vzestup hladin HDL-c, pokud by pokračovala nastolená režimová opatření po delší dobu. Při vstupní prohlídce jsme u obézních dětí nezaznamenali vysoké hladiny sérových lipidů, ve většině případ byly pouze mírně zvýšené. Na druhou stranu vzhledem k vyšší tělesné hmotnosti a vyšší hladině apo-B se s velkou pravděpodobností jednalo o aterogenní lipoproteinové částice (173).

Pokud jde o samotnou Lp-PLA2, hmotnostní koncentrace při vstupní prohlídce byla podstatně vyšší ve srovnání s dostupnými daty ze studií zdravých dospělých (141). Teoreticky -je možné vysvětlení, že obezita v dětství stimuluje zánětlivou reakci organismu ještě intenzivněji než v dospělosti v důsledku vystupňovaných reakcí imunitního systému. Naše výsledky jsou ve shodě se studií z roku 2008, kde byly hmotnostní koncentrace fosfolipázy u obézních dětí taktéž vyšší než v běžné populaci (174), přestože námi měřené hodnoty byly

ještě vyšší. Stejně jako v předchozí studii jsme i my sledovali jasnou asociaci mezi poklesem koncentrace Lp-PLA2 a BMI, což je naprosto zásadní zjištění, které potvrzuje spojitost mezi obezitou a zvýšeným množstvím tělesného tuku, prozánětlivým stavem organismu a rizikem aterosklerózy mnohem dříve, než jsou jakékoli strukturální změny cévní stěny detekovatelné.

Současně jsme prokázali signifikantní korelaci koncentrace Lp-PLA2 s plazmatickou hladinou TG a překvapivě pouze nesignifikantní trend asociace mezi Lp-PLA2 a apo-B, která byla již dokumentována (175), což bude pravděpodobně dáno malým souborem v naší studii. Korelaci s plazmatickými TG lze vysvětlit faktem, že elevace TG je doprovázena vyšším podílem malých denzních LDL částic, které mají k Lp-PLA2 prokazatelně zvýšenou afinitu (115).

Kalorická restrikce a pravidelná fyzická aktivita u dětí s nadváhou/obezitou doprovázená redukcí hmotnosti způsobila signifikantní pokles hmotnostní koncentrace Lp-PLA2. Nicméně i po poklesu koncentrací setrvávaly hladiny enzymu nad limitem doporučovaným pro běžnou dospělou populaci (176). Možným důvodem je krátká doba intervence a nízký absolutní pokles hmotnosti. Delší sledování a následné kontrolní měření po větším poklesu BMI by pravděpodobně bylo spojené s větším poklesem koncentrace fosfolipázy. I přesto naše studie potvrdila předchozí pozorování velice rychlého pozitivního efektu změn životního stylu ve smyslu racionálních dietních opatření a zařazení pohybové aktivity na metabolické rizikové faktory aterosklerózy a subklinického zánětu v mladším věku (177). Tato studie opětovně prokázala spojitost metabolických a zánětlivých RF aterosklerózy s obezitou, kterou můžeme detekovat již v dětském věku. Podle našich závěrů vede i rychlá redukce hmotnosti daná intenzivní změnou životního stylu k ovlivnění RF jedince. Poprvé jsme popsali výrazně zvýšené hmotnostní koncentrace Lp-PLA2 u dětí s nadváhou/obezitou, které spolu s redukcí hmotnosti sice poklesly, ale setrvávaly vysoko nad hladinami zdravé populace.

2.2. Efekt redukce hmotnosti obézních dospělých s metabolickým syndromem na parametry oxidačního stresu

V druhé práci jsme se opět zaměřili na efekt redukce hmotnosti, tentokrát u dospělých obézních osob s metabolickým syndromem (MS), tedy komplexním syndromem sdružujícím obezitu centrálního typu, dyslipidémii, inzulinovou rezistenci a arteriální hypertenzi (38). Jedinci splňující kritéria MS mají prokazatelně vyšší incidenci KVO a riziko úmrtí na KV příhody i celkovou mortalitu (41), kterou lze jen částečně vysvětlit jednotlivými složkami MS, které jsou současně RF KVO (42). Důležitým patofyziologickým podkladem rozvoje aterosklerózy je vystupňovaný oxidační stres, který je u osob s MS prokazatelně zvýšený ve srovnání s běžnou populací (43, 44). Zánětlivé parametry jsou u jedinců splňujících kritéria MS bez jakéhokoli jiného onemocnění vyšší než u osob se stejným BMI bez MS (45). V naší studii jsme sledovali tři parametry chronického subklinického zánětu, tedy Lp-PLA2, ox-LDL a MPO.

2.2.1. Soubor

Vyšetřili jsme 80 obézních pacientů (56 žen a 24 mužů, průměrný věk 47,1±0,9 let, průměrné BMI 38,3±0,7 kg/m2), z nichž 40 splňovalo NCEP ATP III kritéria MS (178), 40 jedinců tato kritéria nesplňovalo. Skupiny se nelišily v BMI a věku. Pacienti neužívali žádné léky, které by ovlivňovaly metabolismus glukózy, sekreci inzulínu nebo citlivost k inzulínu. Vstupní kritéria byla věk nad 18 let a BMI nad 30 kg/m2. Vyloučeny byly osoby s poruchou příjmu potravy, nádorovým onemocněním, diabetes mellitus 1. typu, chronickým zánětlivým onemocněním střev, dnou, jaterním onemocnění, recentní KV příhodou, endokrinologickou příčinou obezity, těhotenstvím, či užívající kortikosteroidy nebo lithium. Diuretická léčba byla vysazena před zahájením studie, pacienti nedostávali žádnou medikaci podporující redukci hmotnosti, ani nikdo z účastníků při zahájení studie nedodržoval dietu za účelem redukce hmotnosti. Redukční program byl založen na dietě o nízkém množství kalorií s přibližnou denní dávkou 600-800 kcal, s individuálně určenou potřebou bílkovin na kg denně. Základ každodenního jídelníčku tvořily bílkovinné nápoje v kombinaci s rybami, libovým hovězím a kuřecím masem.

2.2.2. Metodika

80 pacientů a 20 zdravých kontrol bylo vyšetřeno na začátku redukčního programu, obézní dále po 4-6 týdnech a 12-20 týdnech. Provedli jsme sérii klasických antropometrických a biochemických měření. V této studii jsme stanovovali aktivitu Lp-PLA2 pomocí kolorimetrické metody měřením konverze substrátu. Plazmatické hladiny ox-LDL byly měřeny přímou sendvičovou imunoanalýzou za použití monoklonální protilátky mAb-4E6 a detekce rozdílných epitopů oxidované molekuly apolipoproteinu B. Koncentrace MPO jsme měřili přímou sendvičovou imunoanalýzou. Plazmatické hladiny inzulínu byly měřeny systémem Luminex-100, inzulinová rezistence spočítání užitím homeostatického modelu HOMA-IR = glukóza (mg/dl) x inzulín (U/ml)/22,5 (179).

Statistická analýza byla provedena za použití Stata vezre 11. Při výpočtech jsme uvažovali průměrnou hodnotu ± standardní chyba, pokud není uvedeno jinak. Rozdíly vstupních hodnot mezi jednotlivými skupinami pacientů (zdravé kontroly, MetS- MetS+) jsme testovali použitím univariantní analýzy rozdílnosti (ANOVA), stejně jako pro posuzování výsledků po redukci hmotnosti. V případě neobvyklého rozdělení dat byl užit Fisherův test přesnosti, případně Kruskal-Wallisův test. Párový t-test a Wilcoxonův test byly použity ke zhodnocení změn biochemických parametrů po redukci hmotnosti u jedinců s metabolickým syndromem. Jakákoli chybějící data byla doplněna pomocí metody imputace (180). K vyhodnocení změn jednotlivých oxidačních markerů jsme použili multivariantní lineární regresi a Pearsonovu korelační analýzu, ke stanovení rozdílů v hladinách oxidačních markerů mezi jednotlivými skupinami logistickou regresi a ROC analýzu. Za statisticky signifikantní jsme považovali P-hodnotu < 0,05.

2.2.3. Výsledky

2.2.3.1. Vstupní charakteristika

Průměrný věk vyšetřených pacientů byl 46 let (rozmezí 30-71 let). 68% pacientů byly ženy, 32% muži, obézní muži častěji splňovali kritéria MS. Skupina zdravých kontrol měla hmotnost v pásmu normálního BMI, normální krevní tlak, hladiny glukózy, inzulínu, lipidogramu. Ve srovnání se zdravými kontrolami mělo všech 80 obézních osob vyšší krevní tlak systolický a diastolický, vyšší hladiny glukózy a inzulínu, inzulinovou rezistenci. Pacienti s MS měli signifikantně vyšší plazmatické hladiny TG a nižší hladiny HDL-c ve srovnání se

zdravými kontrolami. Hladinami sérových lipidů se obézní jedinci bez MS ve srovnání se zdravými kontrolami významně nelišili.

Pacienti splňující kritéria MS měli vstupně signifikantně vyšší hladiny ox-LDL ve srovnání se zdravými kontrolami (64,26±2,2 vs. 57,08±1,5 U/l, p=0,01) i obézními bez MS (64,26±2,2 vs. 52,21±3,0 U/l, p=0,002). Koncentrace MPO byly významně vyšší u všech obézních pacientů bez ohledu na přítomnost MS ve srovnání se zdravými kontrolami (330,79±45,0 respektive 375,28±65,1 vs. 172,72±22,0, p=0,015). Plazmatická aktivita Lp-PLA_2 se mezi jednotlivými skupinami statisticky významně nelišila. Ox-LDL a Lp-PLA_2 silně korelovaly vzájemně a s parametry dyslipidémie, zatímco MPO byla asociována s parametry inzulinové rezistence. Zaměřili jsme se na jednotlivé komponenty MS ve vztahu k parametrům oxidačního stresu a zjistili, že nejsilnější asociace při vstupním vyšetření vykazovaly ox-LDL částice, zatímco Lp-PLA_2 a MPO se nejeví jako spolehlivé markery spojené u obézních osob s MS. Pokusili jsme se sestavit model k predikci MS podle těchto tří parametrů oxidačního stresu, což se ukázalo byt nejlepším způsobem při vyhledávání osob s nejvyšším rizikem rozvoje MS (p=0,026).

tabulka č.9: Vstupní charakteristika

	Kontroly (n=20)	Obézní jedinci		P hodnota		
		MetS- (n=40)	MetS+ (n=40)	kontroly vs. MetS-	kontroly vs. MetS+	MetS- vs. MetS+
Věk (roky)	44.35±2.0	46.85±1.0	48.05±1.6	0.280	0.113	0.527
Pohlaví (% žen)	60	83	58	0.076	0.842	0.016
Hmotnost (kg)	66.80±2.6	103.65±3.3	116.84±3.8	<0.001	<0.001	0.006
BMI	22.98±0.6	37.85±0.9	38.81±1.0	<0.001	<0.001	0.444
STK (mmHg)	112.95±2.8	120.3±2.0	136.63±2.9	0.080	<0.001	<0.001
DTK (mmHg)	68.45±2.0	78.9±1.4	84.8±1.5	<0.001	<0.001	0.005
Glukóza (mmol/l)	4.89±0,1	5,22±0,1	6,00±0,3	0.032	0.001	0.058
Inzulín (mU/l)	5.72±0.8	16.09±2.7	27.40±4.1	<0.001	<0.001	0.004
HOMA-IR	1.33±0.2	4.30±1.1	7.54±1.2	<0.001	<0.001	0.002
TG (mmol/l)	1,23±0,2	1,25±0,1	2,88±0,3	0.086	<0.001	<0.001
HDL-c (mmol/l)	1,56±0,1	1,58±0,1	1,14±0,0	0.853	<0.001	<0.001
LDL-c (mmol/l)	3,08±0.2	3,24±0,1	3,15±0,1	0.459	0.749	0.620
TC (mmol/l)	5,21±0,2	5.33±0.1	5,46±0,2	0.658	0.340	0.530
Ox-LDL (U/L)	52,21±3,0	57,08±1,5	64,26±2,2	0.153	<0.001	0.011
MPO (pM)	172.72±22.0	375.28±65.1	330.79±45.0	0.015	0.013	0.927
Lp-PLA_2 (nmol/ml/min)	128.09±9.3	125.57±3.4	136.58±4.9	0.764	0.307	0.113

BMI – body mass index; STK – systolický krevní tlak; DTK – diastolický krevní tlak; TG – triglyceridy; HDL-c – cholesterol o nízké hustotě; LDL-c – cholesterol o vysoké hustotě; TC – celkový cholesterol; ox-LDL – oxidované lipoproteiny o nízké hustotě; MPO – myeloperoxidáza; Lp-PLA_2 – fosfolipáza A_2 asociovaná s lipoproteiny

tabulka č.10: Vstupní korelace

	Ox-LDL		MPO		Lp-PLA_2	
	R	*p*	*R*	*p*	*R*	*p*
Hmotnost	0.195	0.056	0.275	0.007	0.203	0.047
Obvod pasu	0.202	0.052	0.253	0.015	0.234	0.024
BMI	0.128	0.212	0.300	0.003	0.062	0.544
STK	0.092	0.372	0.078	0.445	0.015	0.883
DTK	0.196	0.055	0.023	0.822	0.066	0.523
Glukóza	-0.033	0.749	0.095	0.357	0.106	0.303
Inzulín	0.153	0.134	0.296	0.003	0.064	0.536
HOMA-IR	0.129	0.207	0.283	0.005	0.079	0.445
TG	0.479	0.000	-0.018	0.858	0.292	0.004
HDL-c	-0.231	0.023	-0.108	0.292	-0.404	0.000
LDL-c	0.629	0.000	-0.001	0.993	0.309	0.003
TC	0.687	0.000	-0.052	0.612	0.297	0.003
Ox-LDL	**-----**	**-----**	**0.004**	**0.968**	**0.378**	**0.000**
MPO	**0.004**	**0.968**	**-----**	**-----**	**0.117**	**0.254**
Lp-PLA_2	**0.378**	**0.000**	**0.117**	**0.254**	**-----**	**-----**

BMI – body mass index; STK – systolický krevní tlak; DTK – diastolický krevní tlak; TG – triglyceridy; HDL-c – cholesterol o nízké hustotě; LDL-c – cholesterol o vysoké hustotě; TC – celkový cholesterol; ox-LDL – oxidované lipoproteiny o nízké hustotě; MPO – myeloperoxidáza; Lp-PLA_2 – fosfolipáza A_2 asociovaná s lipoproteiny

2.2.3.2. Efekt hmotnostní redukce

Skupina pacientů s MS dosáhla průměrného poklesu hmotnosti o 16,9 kg, snížení BMI o 5,6 kg/m_2 spolu se zmenšením obvodu pasu. Hmotnostní redukce měla také signifikantní vliv na pokles parametrů oxidačního stresu, jedinou výjimkou byla MPO. Hladina ox-LDL klesla z počátečních 64,3 na 54,7 U/l, což představuje 12% pokles ($p<0.001$). Tato změna byla asociována se snížením celkového cholesterolu i po adjustaci na věk a pohlaví ($p=0,019$).

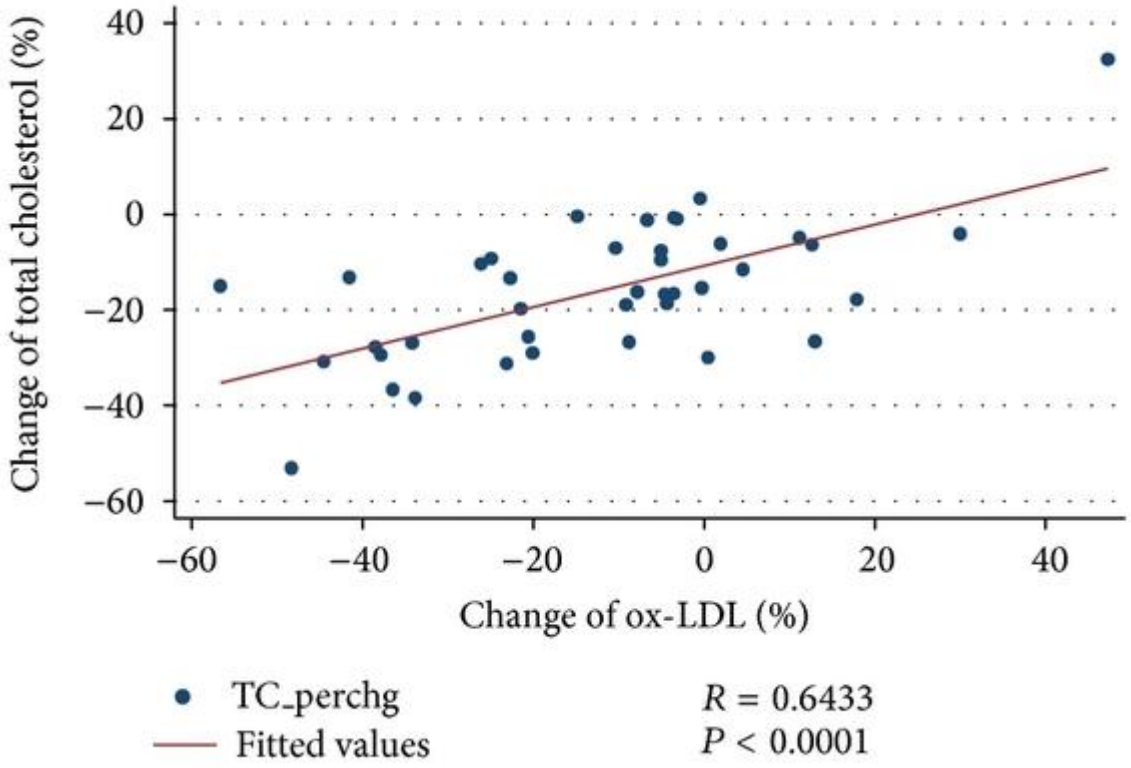
Překvapivě změna ox-LDL nekorelovala s poklesem LDL-c. Spolu s poklesem hmotnosti jsme také pozorovali klesající aktivitu Lp-PLA_2 o 4,7% z počátečních 136,6 na 127,7 nmol/ml/min ($p=0,024$), redukci asociovanou se snížením celkového a LDL-c a inzulínu. Změna MPO nebyla statisticky významná, nicméně spojená s poklesem celkového cholesterolu, TG a glukózy i po adjustaci na věk a pohlaví. Pokles všech markerů oxidačního stresu po redukci hmotnosti byl signifikantně spojen se snížením hladiny celkového cholesterolu.

tabulka č.11: Efekt hmotnostní redukce na antropometrické a metabolické parametry

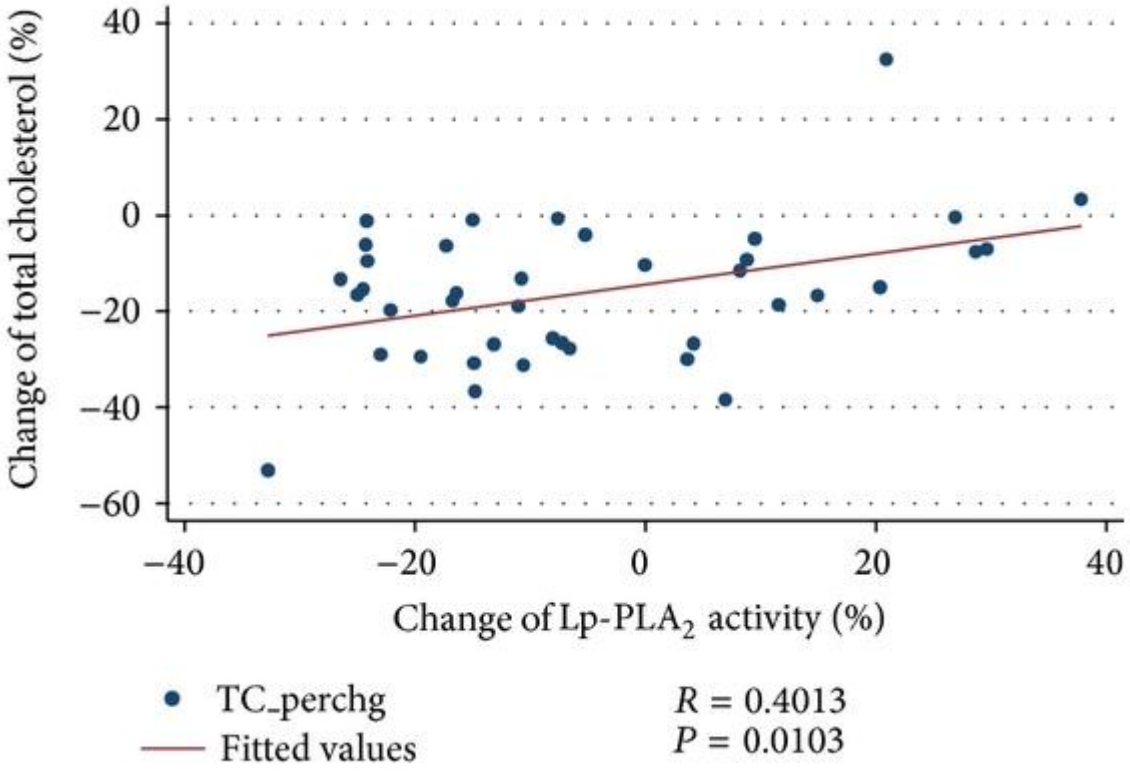
	Baseline	Po poklesu hmotnosti	Změna absolutní	Změna (%)	P hodnota
Hmotnost (kg)	116.84±3.8	99.92±3.2	-16.92±1.1	-14.32±0.7	<0.001
Obvod pasu (cm)	45.14±1.0	40.53±1.1	-4.61±0.5	-10.23±1.0	<0.001
BMI	38.81±1.0	33.17±0.8	-5.64±0.3	-14.32±0.7	<0.001
STK (mmHg)	136.63±2.9	128.04±2.0	-8.58±2.0	-5.50±1.4	<0.001
DTK (mmHg)	84.8±1.5	79.39±0.7	-5.41±1.4	-5.33±1.7	0.001
Glukóza (mmol/l)	6,00±0,3	5,00±0.1	-1.00±0,4	-10.04±3.3	0.004
Insulin (mU/l)	27.40±4.1	11.30±2.2	-16.09±4.4	-36.77±14.8	<0.001
HOMA-IR	7.54±1.2	2.53±0.5	-5.01±1.2	-43.02±13.5	<0.001
TG (mmol/l)	2,88±0,3	1,40±0,1	-1,48±0,3	-38.09±6.1	<0.001
HDL-c (mmol/l)	1,14±0,04	0,10±0,0	-0,14±0,0	-11.11±2.6	<0.001
LDL-c (mmol/l)	3,13±0,1	2,82±0,1	-0,31±0,1	-4.51±5.6	0.041
TC (mmol/l)	5,47±0,2	4,52±0,1	-0,94±0,1	-16.00±2.3	<0.001
Ox-LDL (U/L)	64.26±2.2	54.69±1.8	-9.57±2.4	-11.97±3.4	<0.001
MPO (pM)	330.79±45.0	275.85±34.9	-54.93±50.5	-15.36±14.8	0.354
Lp-PLA_2 (nmol/ml/min)	136.58±4.9	127.65±4.4	-8.93±3.8	-4.72±2.9	0.024

BMI – body mass index; STK – systolický krevní tlak; DTK – diastolický krevní tlak; TG – triglyceridy; HDL-c – cholesterol o nízké hustotě; LDL-c – cholesterol o vysoké hustotě; TC – celkový cholesterol; ox-LDL – oxidované lipoproteiny o nízké hustotě; MPO – myeloperoxidáza; Lp-PLA_2 – fosfolipáza A_2 asociovaná s lipoproteiny

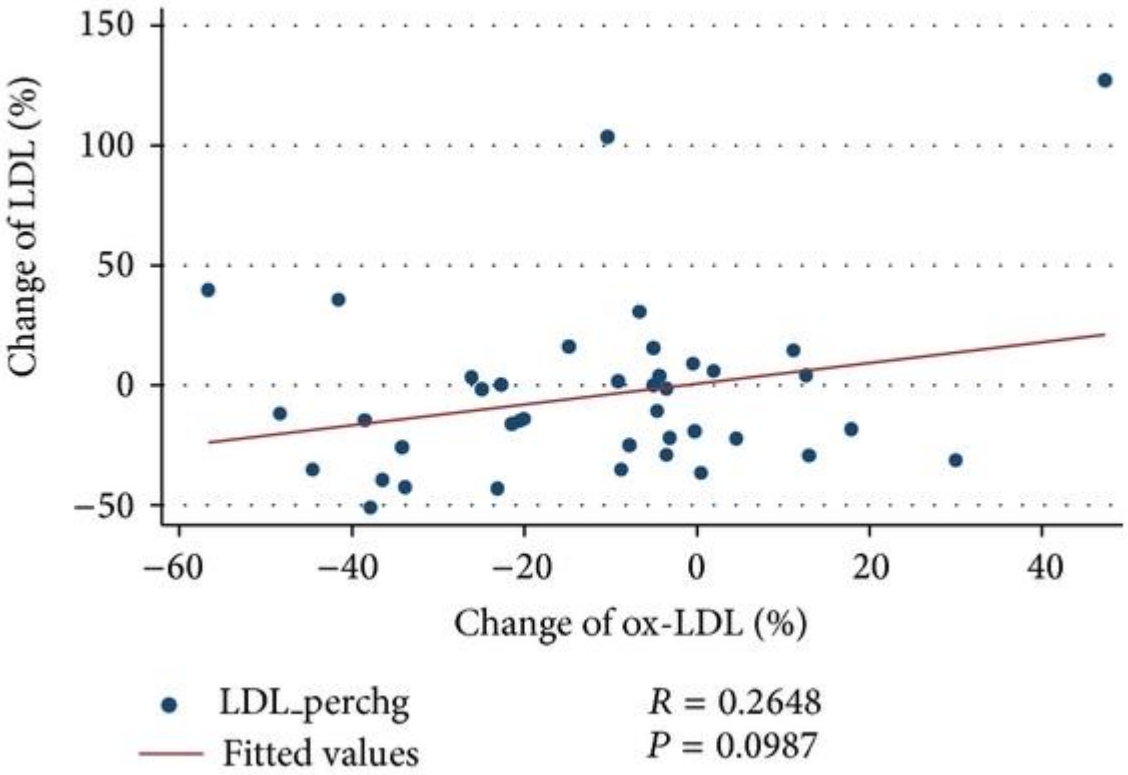
graf č.2: Korelace percentuální změny celkového cholesterolu a ox-LDL po redukci hmotnosti u MetS+



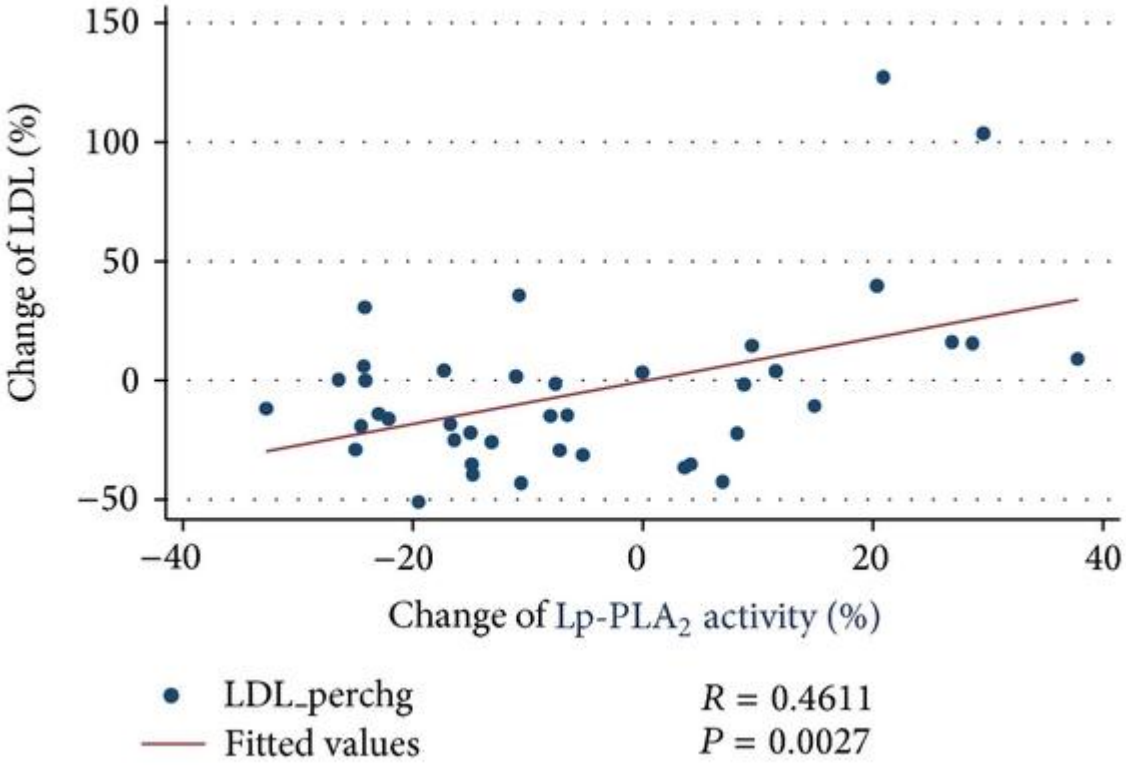
graf č.3: Korelace percentuální změny celkového cholesterolu a Lp-PLA_2 po redukci hmotnosti u MetS+



graf č.4: Korelace percentuální změny LDL a ox-LDL po redukci hmotnosti u MetS+



graf č.5: Korelace percentuální změny LDL a Lp-PLA_2 po redukci hmotnosti u MetS+



2.2.4. Závěr

V naší studii jsme při vstupním vyšetření pomocí hladin parametrů oxidačního stresu nebyli schopni jednoznačně definovat jedince s MS. Současně jsme prokázali, že dle počátečních hodnot jednotlivých zánětlivých parametrů nelze jednoznačně definovat osoby s MS. Tento záchyt je možné významně zlepšit kombinovaným skríningem za použití více zánětlivých markerů současně (v našem případě ox-LDL, aktivita Lp-PLA_2 a MPO). Rozdíly vstupních hodnot aktivity Lp-PLA_2 mezi jednotlivými skupinami pacientů nebyly statisticky signifikantní, ačkoli nejvyšší aktivitu enzymu jsme naměřili u jedinců s MS. Stejně tak vstupní hladiny ox-LDL u jedinců s MS byly vyšší ve srovnání se zdravými kontrolami i pacienty obézními nesplňující kritéria MS. Tento rozdíl již nabyl statistické významnosti, což je ve shodě s výsledky předešlých studií, které také dokumentovali zvýšené hladiny cirkulujících ox-LDL u pacientů s MS, přičemž obézní bez MS se hladinami ox-LDL nijak nelišili od zdravých kontrol (99). V naší studii byly vstupní hodnoty aktivity MPO statisticky významně vyšší u všech obézních jedinců ve srovnání se zdravými kontrolami bez ohledu na přítomnost MS, což potvrzuje teorii zvýšeného subklinického zánětu u obézních.

Výsledky naší studie naznačují vyšší zánětlivý stres u obézních jedinců, zvláště pak u pacientů, kteří splňují kritéria metabolického syndromu.

2.2.5. Diskuse

Stejně jako jiné studie jsme po poklesu hmotnosti zjistili zlepšení metabolických parametrů u jedinců s MS (181) včetně parametrů zánětu, přestože valná většina prozatím provedených studií byla zaměřena na C-reaktivní protein a jeho změny. Přesto existuje velice málo prací, jejichž autoři se zabývali parametry zánětlivého stresu u obézních, sledování těchto markerů po redukci hmotnosti a srovnání se zdravými, štíhlými kontrolami bez metabolického onemocnění. Tzotzas a spol. dokumentovali signifikantní pokles aktivity Lp-PLA_2 po poklesu hmotnosti u zdravých obézních žen (182). Na druhou stranu Hanusch-Enserer a spol., kteří sledovali vliv poklesu hmotnosti po bandáži žaludu na RF KVO, nezjistili žádnou změnu Lp-PLA_2 (183). Uvážíme-li závěry zmíněných studií a výsledek našeho pozorování, lze říci, že poklesem hmotnosti po změně režimových opatření bylo dosaženo poklesu aktivity enzymu (ačkoli v případě naší studie bez statistické významnosti). Rozdílné způsoby dosažení poklesu hmotnosti mohou mít tedy různý efekt na Lp-PLA_2, potažmo na zánětlivý stres jako takový. Tyto výsledky mohou naznačovat zásadní vliv režimových

opatření a životního stylu na subklinický zánět. Rector a spol. se zaměřili na pacienty s MS a vyšetřovali oxidační markery a parametry inzulinové rezistence po poklesu hmotnosti dané pravidelnou aerobní aktivitou (184). Výsledkem byl signifikantní pokles ox-LDL, ale bez efektu na MPO nebo inzulinovou rezistenci, dospěl tedy k podobným závěrům jako v naší studii. Pokles koncentrace ox-LDL po redukční dietou indukovaném snížení hmotnosti u obézních mužů a žen byl pozorován i v dalších studiích. Pierce a spol. (185) zjišťovali efekt redukční diety na endotel-dependentní dilataci tepen u mužů a žen s nadváhou či obezitou, přičemž redukce hmotnosti vyústila v pokles hladin ox-LDL. Shin a spol. (186) také popsali snížení hladin ox-LDL po dietou indukované redukci hmotnosti u obézních pacientů s metabolickým syndromem, zatímco hladiny u zdravých obézních se s poklesem hmotnosti nijak nezměnily. Naše závěry, že redukce hmotnosti ústí v signifikantní pokles cirkulujícího ox-LDL u obézních jedinců s metabolickým syndromem, jsou tedy v souladu s výše zmíněnými studiemi. Roberts a spol. (187) pozoroval vliv 21denní diety a cvičení na muže s MS, což mělo za následek snížení sérových lipidů, ale také MPO, CRP a zlepšení inzulinové rezistence. Ačkoli mezi zmíněnou prací a naší studií existují rozdíly ve sledované populaci, dietní intervenci a době sledování souboru, obecná zjištění obou studií ve smyslu efektu hmotnostní redukce na metabolické a zánětlivé parametry jsou podobná.

Opačné výsledky dokumentoval Solá a spol., kteří sledovali efekt mírného poklesu hmotnosti morbidně obézních na hladiny zánětlivých cytokinů (188). Přestože vstupní hladiny CRP, TNF-á a leukocytů byly výrazně zvýšené, po redukci hmotnosti nepozorovali statisticky významný pokles žádného z těchto parametrů. Pravděpodobně nebyly použité markery dostatečně citlivé k probíhajícímu chronickému subklinického zánětu.

Naše výsledky opětovně dokazují zvýšení oxidační stres u obézních s metabolickým syndromem. Markery oxidačního stresu je možné využít k vyhledání vysoce rizikových obézních jedinců - stanovení ox-LDL, Lp-PLA$_2$ a MPO by mohlo pomoci zachytit pacienty se zvýšeným rizikem budoucího rozvoje MS a přistupovat k nim jako ke středně až vysoce rizikovým i z hlediska rizika KVO. Vyšetření jednotlivých markerů není ovšem dostatečně silným prediktorem rizika MS, kombinovaný screening je strategií mnohem účinnější. Výsledky naší studie potvrdily předchozí nálezy, tedy že dietou indukovaný pokles hmotnosti je následován zmírněním prozánětlivého stavu organismu, což lze objektivizovat poklesem hladin parametrů oxidačního stresu. Prokázali jsme snížení chronického zánětu redukcí hmotnosti a dietními změnami u osob s MS, což znamená významné ovlivnění KV rizika,

které je u těchto jedinců vyšší než v běžné populaci. Rychlá redukce hmotnosti vedla ke zlepšení glukózového metabolismu a snížení subklinického zánětu jako důsledek snížení množství tukové tkáně a sekrece adipokinů.

Limitací naší studie je skutečnost, že jsme přímo neměřili antioxidační kapacitu u účastníků studie. Všichni účastníci studie dostávali denně 140% doporučené denní dávky antioxidantů, je tedy vysoce nepravděpodobné, že by během intervence došlo k poklesu antioxidační kapacity. Nicméně nelze vyloučit možné zvýšení antioxidančí kapacity, které teoreticky mohlo mít určitý vliv na snížení zánětlivých parametrů po intervenci. Kalorická restrikce vyústila v signifikantní pokles množství tělesného tuku (tedy snížení BMI a obvodu pasu) u obézních, nesledovali jsme ale efekt energetické restrikce na změny množství tělesného tuku a tedy závislost zánětlivých parametrů na změnách množství tělesného tuku u zdravých kontrol.

2.3. **Shrnutí závěrů práce**

Výsledky našich studií prokázaly vyšší prozánětlivý stav organismu u obézních, což bezesporu souvisí s jejich zvýšeným KV rizikem. Pozorovali jsme jednoznačný vliv režimových opatření následovaných poklesem hmotnosti, proto bude dietní a pohybová intervence prvním a hlavním doporučením pro všechny obézní pacienty bez ohledu na jejich momentální riziko rozvoje KVO – lze bezpochyby konstatovat, že vhodná úprava režimu je nejdůležitějším stavebním kamenem primární prevence KVO. V sekundární prevenci bude potom vhodná dieta a fyzická aktivita základem nutných léčebných opatření při péči o nemocného, ke které se přidá důsledná farmakoterapie, případně jiné terapeutické zákroky.

Nejen na základě našich výsledků lze rozhodně doporučit úpravu životního stylu všem pacientům s vyšší hladinou zánětlivých parametrů. V současnosti je kladen stále větší důraz na prevenci, proto by měla být snaha o vyhledávání osob s vysokým rizikem rozvoje onemocnění, včetně KVO, základním postupem současné medicíny. Nejlepší cestou k zabránění vzniku mnoha onemocnění je bezpochyby prevence obezity, přestože současný celosvětový trend je zcela opačný a počet obézních neustále narůstá. Za těchto podmínek nezbývá než mezi obézními jedinci pátrat po osobách s vyšším rizikem a zaměřit se na úpravu jejich životního stylu s cílem zabránit rozvoji mnoha chronických chorob včetně KVO.

Jednou z možných cest k určení těchto rizikových jedinců je laboratorní vyšetření zánětlivých parametrů, přičemž kombinovaný screening nabízí možnost přesnějšího

vyhledání pacientů s vysokým prozánětlivým stavem. Podaří-li se nám tímto způsobem selektovat vysoce rizikové pacienty a následně agresivněji upravit režimová opatření, případně adekvátně nastavit léčbu s cílem dosáhnout nižších cílových hodnot lipidogramu, můžeme dosáhnout lepších výsledků z hlediska prevence KV příhod. Což je naprosto zásadní cíl v rámci současného trendu vývoje moderní medicíny.

3. Seznam použité literatury

1. Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. Science. 1976; 193(4258): 1094-100.
2. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature. 2002; 420: 868–874.
3. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; 27: 2292–301.
4. Wittchen ES. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. Front. Biosci. 2009; 14: 2522-2545.
5. Luo BH et al. Structural basis of integrin regulation and signaling. Annu Rev Immunol. 2007; 25: 619–47.
6. Schulz C, Massberg S. Atherosclerosis-Multiple Pathways to Lesional Macrophages. Sci Transl Med. 2014; 6(239): 239ps2. Review
7. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. Nat Immunol. 2011; 12: 204-212.
8. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999; 340: 115–126.
9. Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22: 1370–1380.
10. Libby P. Collagenases and cracks in the plaque. J Clin Invest. 2013; 123(8): 3201-3.
11. Libby P, Simon DI. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. Circulation. 2001; 103: 1718–1720.
12. Navab M et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. J. Lipid. 2004; 45: 993-1007.
13. Skalen K et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. Nature (Lond) 2002; 417: 750-754.
14. Stemme S. Plaque T-cell activity: not so specific? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21(7): 1099-101.
15. Dichtl W et al. Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-κB in endothelial cells. Circ Res. 1999; 84: 1085–1094.
16. Goff DC Jr. et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Circulation. 2014; 129: 49-73.

17. Chen MA et al. Effect of age on aortic atherosclerosis. J Geriatr Cardiol. 2013; 10(2): 135-40.
18. Juonala M et al. Effect of age and sex on carotid intima-media thickness, elasticity and brachial endothelial function in healthy adults: The Cardiovascular Risk in Young Finns study. Eur Heart J. 2008; 29: 1198–1206.
19. van Lennep Roeters JE et al. Risk factors for coronary heart disease: implications of gender. Cardiovasc Res. 2002; 53: 538–549.
20. Scheuner MT et al. Relation of familial patterns of coronary heart disase, stroke, and diabetes to subclinical atherosclerosis: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Genet Med. 2008; 10: 879–887.
21. Schunkert H, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. Nat Genet. 2011; 43: 333–338.
22. Perk J et al. European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR); ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). Eur Heart J. 2012; 33(13): 1635-701.
23. Richard Češka prof. MUDr. CSc. a kolektiv. Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidémií. 2012
24. Koba S et al. Significance of small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations in relation to the severity of coronary heart disease. Atherosclerosis, 2006; 189: 206-214.
25. Reiner Z et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). Eur Heart J 2011; 32 :1769 – 1818.
26. Thompson A, Danesh J. Associations between apolipoprotein B, apolipoprotein AI, the apolipoprotein B/AI ratio and coronary heart disease: a literature-based meta-analysis of prospective studies. J Intern Med 2006; 259: 481 – 492.
27. Nordestgaard BG et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. Eur Heart J 2010; 31: 2844 – 2853.

28. Whitley E et al. Association of cigarette smoking from adolescence to middle-age with later total and cardiovascular disease mortality: theHarvard Alumni Health Study. J Am Coll Cardiol. 2012; 60: 1839–1840.
29. Edwards R. The problem of tobacco smoking. BMJ 2004; 328: 217–219.
30. Raupach T et al. Secondhand smoke as an acute threat for the cardiovascular system: a change in paradigm. Eur Heart J 2006; 27: 386–392.
31. Yamaguchi Y et al. Facilitated nitra- tion and oxidation of LDL in cigarette smokers. Eur J Clin Invest 2005; 35: 186–193.
32. Messerli FH et al. Essential hypertension. Lancet. 2007; 370: 591–603.
33. Doughan AK et al. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. Circ Res. 2008; 102(4): 488-96.
34. Daugherty A, Cassis L. Angiotensin II-mediated development of vascular diseases. Trends Cardiovasc Med. 2004; 14(3): 117-20.
35. Ramasamy R et al. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. Glycobiology. 2005; 15(7): 16-28.
36. Vivekanadan-Giri A et al. Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products identifies oxidative mechanisms of diabetic end-organ damage. Rev Endocr Metab Disord. 2008; 9(4): 275-87.
37. Juutilainen A et al. Type 2 diabetes as a “coronary heart disease equivalent”: an 18-year prospective population-based study in Finnish subjects. Diabetes Care. 2005; 28: 2901–2907
38. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation. 2002; 106(25): 3143-421.
39. Grundy S et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Curr Opin Cardiol 2006; 21(1): 1-6.
40. Karen I et al. Metabolický syndrom - diagnostika a léčba. Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře. Novelizace 2010. Praha: Společnost všeobecného lékařství, 2010.

41. Galassi A et al.. Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: A meta-analysis. Am J Med. 2006; 119: 812–819.
42. Ford ES et al. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. JAMA. 2002; 287: 356-359.
43. Hopps E et al. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2009; 20: 72–77.
44. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. Free Radic Biol Med. 2009; 47: 1673–1706.
45. Van Guilder GP et al. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. Obesity. 2006; 14: 2127–31.
46. Case CC et al. Impact of weight loss on the metabolic syndrome. Diabetes Obes Metab. 2002; 4: 407–414.
47. de Koning L et al. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. Eur Heart J. 2007; 28: 850–856.
48. Jensen MD. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2008; 93: 57–63.
49. Fontana L et al. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. Diabetes. 2007; 56: 1010–1013.
50. Okamoto Y et al. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. Clin Sci (Lond) 2006; 110: 267-278.
51. Matsuzawa Y. Therapy insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2006; 3: 35-42.
52. Lara-Castro C et al. Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. Curr Opin Lipidol. 2007; 18: 263-270.
53. Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; 27: 996-1003.
54. Finkelstein EA et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. Am J Prev Med. 2012; 42(6): 563-70.
55. Lakka HM et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. JAMA. 2002; 288: 2709-2716.

56. Lloyd LJ et al.. Childhood obesity and adulet cardiovascular disease risc: a systematic review. Int J Obes (Lond). 2010; 34: 18-28.
57. Keaney JF et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003; 23: 434-439.
58. Lemieux I et al. Elevated C-reactive protein: Another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21: 961-967.
59. Libby P et al. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. Circ J. 2010; 74(2): 213-20.
60. de Oliveira Otto MC et al. Circulating and dietary omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids and incidence of CVD in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. J Am Heart Assoc. 2013; 18: 2(6).
61. Martins e Silva J, Saldanha C. Diet, atherosclerosis and atherothrombotic events. Rev Port Cardiol. 2007; 26(3): 277-94.
62. Brotman DJ et al. The cardiovascular toll of stress. Lancet. 2007; 370: 1089–1100.
63. Chumaeva N et al. Chronic stress and the development of early atherosclerosis: Moderating effect of endothelial dysfunction and impaired arterial elasticity. Int J Envinron Res Public Health. 2009; 6: 2934–2949.
64. Naranjo A et al. Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: results from the QUEST-RA study. Arthritis Res Ther. 2008; 10: R30.
65. Warren TY et al. Sedentary behaviors increase risk of cardiovascular disease mortality in men. Med Sci Sports Exerc. 2010; 42: 879–885.
66. Lollgen H et al. Physical activity and all-cause mortality: an updated meta-analysis with different intensity categories. Int J Sports Med. 2009; 30: 213–224.
67. US Department of Health and Human Services. Physical Activity Guidelines Advisory Committee Report. 2008
68. http://athero.cz/cze/odkazy-a-zdroje/vypocet-rizika.php?page=tabulky-rizika-podle-projektu-SCORE
69. http://athero.cz/cze/odborna-doporuceni/Doporuceni_CSAT-07.pdf
70. Filipovský J et al. Doporučení diagnostických a léčebných postupů u arteriální hypertenze - verze 2012. Doporučení České společnosti pro hypertenzi. Hypertenze KV prevence 2012; 1: 1-16.

71. Wilson PWF et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. Circulation 1998; 97: 1837–1847.
72. Ridker PM et al. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women. JAMA. 2007; 297: 611–619.
73. Ridker PM et al. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction: the Reynolds Risk Score for men. Circulation. 2008; 118: 2243–2251.
74. Yang N et al. Variability in lipid profile among patients presented with acute myocardial infarction, unstable angina and stable angina pectoris. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014; 18(24): 3761-6.
75. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes. N Engl J Med. 2013; 369(9): 883-4.
76. Schwartz GG et al. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes. The MIRACL study: a randomized controlled trial. JAMA. 2001; 285: 1711–1718.
77. Pearson TA et al. Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. Circulation, 2003; 107: 499-511.
78. Cushman M et al. C-reactive protein and the 10-year incidence of coronary heart disease in older men and women: the cardiovascular health study. Circulation, 2005; 112: 25-31.
79. Tanaka A et al. Multiple plaque rupture and C-reactive protein in acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol, 2005; 45: 1594-1599.
80. Burke AP et al. Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies. Circulation, 2002; 105: 2019-2023.
81. Danesh J et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. N Engl J Med, 2004; 350; 1387-1397.
82. Mendall MA et al. C-reactive protein: relation to total mortality, cardiovascular mortality and cardiovascular risk factors in men. Eur Heart J, 2000; 21: 1584-1590.

83. Folsom AR et al. C-reactive protein and incident coronary heart disease in the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. Am Heart J, 2002; 144: 233-238.
84. Lawlor DA et al. The association of C-reactive protein and CRP genotype with coronary heart disease: findings from five studies with 4,610 cases amongst 18,637 participants. PLoS ONE. 2008; 3: e3011.
85. Zacho J et al. Genetically elevated C-reactive protein and ischemic vascular disease. N Engl J Med. 2008; 359: 1897–1908.
86. Tennent GA et al. Transgenic human CRP is not pro-atherogenic, pro-atherothrombotic or pro-inflammatory in apoE−/− mice. Atherosclerosis. 2007; 196: 248–255.
87. Davidson MH et al. Clinical utility of inflammatory markers and advanced lipoprotein testing: advice from an expert panel of lipid specialists. J Clin Lipidol. 2011; 5(5): 338-67.
88. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions, J Thromb Haemost. 2005; 3(8): 1894–1904.
89. Fibrinogen Studies Collaboration, Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies: the fibrinogen studies collaboration, Am J Epidemiol. 2007; 166(8): 867–879.
90. Abeywardena MY et al.. Cardiovascular biology of interleukin-6, Curr Pharm. 2009; 15(15): 1809–1821.
91. Danesh J et al. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review, PLoS Med. 2008; 5(4): e78.
92. Lee S et al. Role of phospholipid oxidation products in atherosclerosis. Circ Res. 2012; 111(6): 778-99.
93. Ishigaki Y et al. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. Circulation. 2008; 118(1): 75-83.
94. Virella G, Lopes-Virella MF. Atherogenesis and the humoral immune response to modified lipoproteins. Atherosclerosis. 2008; 200(2): 239-46.

95. Watanabe N et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by lysophosphatidylcholine-induced mitochondrial reactive oxygen species generation in endothelial cells. Am J Pathol. 2006; 168: 1737–1748.
96. Cheng J et al. Oxidized low-density lipoprotein stimulates p53-dependent activation of proapoptotic Bax leading to apoptosis of differentiated endothelial progenitor cells. Endocrinology. 2007; 148: 2085–2094.
97. Martinet W, Kockx MM. Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation. Curr Opin Lipidol. 2001; 12(5): 535-41.
98. Holvoet P et al. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. JAMA. 2008; 299: 2287–2293.
99. Hulthe J et al. The Metabolic syndrome, LDL Particle Size, and Atherosclerosis: Atherosclerosis and Insuline Resistance (AIR) Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20: 2140-2147.
100. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. J Leukoc Biol. 2005; 77: 598-625.
101. Carr AC et al. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20: 1716-1725.
102. Shao B et al. Myeloperoxidase: an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein. Curr Opin Cardiol. 2006; 21: 322-328.
103. Baldus S et al. Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. Free Radic Biol Med. 2004; 37: 902–11.
104. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25: 1102–11.
105. Rudolph V et al. Coronary plaque injury triggers neutrophil activation in patients with coronary artery disease. Free Radic Biol Med. 2007; 42: 460–5.
106. Meuwese MC et al. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals. The EPIC-Norfolk prospective population study. J Am Col Cardiol. 2007; 50: 159-165.
107. Karakas M et al. Myeloperoxidase is associated with incident coronary heart disease independently of traditional risk factors: results from the MONICA/KORA Augsburg study. J Intern Med. 2012; 271(1): 43-50.

108. Tang WHW et al. Plasma myeloperoxidase predicts incident cardiovascular risks in stable patients undergoing medical management for coronary artery disease. Clin. Chem. 2011; 57(1): 33-39.

109. Wolfert RL et al. Biological variability and specificity of lipoprotein-associated phospholipase A_2 (Lp-PLA_2), a novel marker of cardiovascular risk [abstract]. Circulation. 2004; 110(suppl 3): 309.

110. Farr RS et al. Preliminary studies of an acid-labile factor (ALF) in human sera that inactivates plateletactivating factor (PAF). Clinical Immunology and Immunopathology 1980, 15: 318-30.

111. Cao Y et al. Expression fo plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is transcriptionally regulated by mediators of inflammation. J Biol Chem. 1998; 273: 4012-4020.

112. Prescott SM et al. Platelet-activating factor and related lipidmediators. Annu Rev Biochem 2000; 69: 419-45.

113. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 biochemistry. Cardiovasc Drugs Ther. 2009; 23(1): 49-59.

114. Caslake MJ et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase potential new risk factor for coronary artery disease. Atherosclerosis. 2000; 150: 413-419.

115. Chae JS et al. Association of Lp-PLA(2) activity and LDL size with interleukin-6, an inflammatory cytokine and oxidized LDL, a marker of oxidative stress, in women with metabolic syndrome. Atherosclerosis. 2011; 218: 499-506.

116. Gazi I et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is a marker of small, dense LDL particles in human plasma. Clin Chem. 2005; 51: 2264-2273.

117. Skalern K et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. Nature. 2002; 417: 750-754.

118. Tselepis AD, Chapman JM. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: Potencial roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factoracetylhydrolase. Atherosclerosis. 2002; 3: 57-68.

119. Zalewski A, Macphee C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: Biology, epidemiology, and possible therapeutic target. Arterioscler Tromb Vasc Biol. 2005; 25: 923-931.

120. Lavi S et al. Local production of lipoprotein-associated phospholipase A_2 and lysophosphatidylcholine in the coronary circulation: association with early coronary atherosclerosis and endothelial dysfunction in humans. Circulation. 2007; 115: 2715–2721.

121. Lavi S et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2: review of its role as a marker and a potential participant in coronary endothelial dysfunction. Mol Diagn Ther. 2007; 11: 219–226.

122. Kolodgie FD et al. Lipoprotein-associated phospholipase A_2 protein expression in the natural progression of human coronary atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; 26: 2523–2529.

123. Falk E et al. Coronary plaque disruption. Circulation. 1995; 92: 657–671.

124. Stafforini DM et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency: A missense mutation near the active site of an anti-inflammatory phospholipase. J Clin Invest 1996; 97:2784–2791.

125. Hou L et al. Associations of PLA2G7 gene polymorphisms with plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and coronary heart disease in a Chinese Han population: The Beijing atherosclerosis study. Hum Genet 2009; 125:11–20.

126. Jang Y et al. The Val279Phe variant of the lipoprotein-associated phospholipase A2 gene is associated with catalytic activities and cardiovascular disease in Korean men. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 3521–3527.

127. Jang Y et al. Carriage of the V279F null allele within the gene encoding Lp-PLA_2 is protective from coronary artery disease in South Korean males. PLoS One. 2011; Apr 5: 6(4).

128. Casas JP et al. PLA2G7 genotype, lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, and coronary heart disease risk in 10 494 cases and 15 624 controls of European Ancestry. Circulation. 2010; 121: 2284–2293.

129. Virani SS, Nambi V. The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 as a marker rof atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep. 2007; 9: 97-103.

130. Stafforini DM et al. Platelet-activating factor acetylhydrolases. J Biol Chem. 1997; 272: 17895-17898.

131. Brilakis ES et al. Association of lipoproteinassociated phospholipase A2 levels with coronary artery disease risk factors, angiographic coronary artery disease, and major adverse events at follow-up. Eur Heart J. 2005; 26(2): 137-44.

132. O'Donoghue M et al. Lipoprotein-associated phospholipase a2 and its association with cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes in the prove it-timi 22 (pravastatin or atorvastatin evaluation and infection therapy-thrombolysis in myocardial infarction) trial. Circulation. 2006; 113: 1745-1752.

133. Sabatine MS et al. Prognostic Utility of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 for Cardiovascular Outcomes in Patients With Stable Coronary Artery Disease. Arterioscler Thromb Vasc. 2007; 27: 2463-2469.

134. Liu CF et al. Elevated plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with plaque rupture in patients with coronary artery disease. Chin Med J (Engl). 2011; 124(16): 2469-73.

135. Sarlon-Bartoli G et al. Circulating lipoprotein-associated phospholipase A2 in high-grade carotid stenosis: a new biomarker for predicting unstable plaque. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2012; 43(2): 154-9.

136. Theilmeier G et al HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE-/- mice. FASEB J. 2000; 14(13): 2032-9.

137. Blankenberg S et al. Plasma PAF-acetylhydrolase in patients with coronary artery disease: Results of a cross-sectional analysis. J Lipid Res. 2003; 44: 1381-1386.

138. Packard CJ et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. N Engl J Med. 2000; 343: 1148-1155.

139. Blake GJ et al. A prospective evaluation of lipoproteinassociated phospholipase A2 levels and the risk of future cardiovascular events in women. J Am Coll Cardiol. 2001; 38: 1302-1306.

140. Koenig W et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: Results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany. Circulation. 2004; 110: 1903-1908.

141. Ballantyne CM et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-age men

and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Circulation. 2004; 109: 837-842.

142. Van Vark LC et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity adn risk of heart failure: The Rotterdam study. Eur Heart J. 2006; 27: 2346-2352.

143. Winkler K et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity indicates angiographic coronary artery disease independently of systemic inflammation and other risk factors: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. Circulation. 2005; 111: 980-987.

144. Koenig W et al.. Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts future cardiovascular events in patients with coronary heart disease independently of traditional risk factors, markers of inflammation, renal function, and hemodynamic stress. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; 26: 1586-1593.

145. Corsetti JP et al. High lipoprotein-associated phospholipase A2 is a risk factor for recurrent coronary events in postinfarction patients. Clin Chem. 2006; 52: 1331-1338.

146. Ballantyne CM et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitive C-reactive protein, and risk for incident ischemic stroke in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Arch Intern Med. 2005; 165: 2479-2484.

147. Oei HH et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: The Rotterdam Study. Circulation. 2005; 111: 570-575.

148. Rizos E et al. Lipoprotein-associated PAF-acetylhydrolase activity in subjects with the metabolic syndrome. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2005; 72: 203-209.

149. Lagos KG et al. Alterations in the high density lipoprotein phenotype and HDL-associated enzymes in subjects with metabolic syndrome. Lipids. 2009; 44(1): 9-16.

150. Corson MA et al. Review of the Evidence for the clinical Utility of Lipoprotein-Associated Phospholipase A_2 as a Cardiovascular Risk Marker. Am J Cardiol. 2008; 101: 41-50.

151. Thompson A et al. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. Lancet. 2010; 375: 1536-44.

152. Lanman RB et al. Lipoprotein-associated phospholipase A_2: review and recommendation of a clinical cut point for adults. Prev Cardiol. 2006; 9: 138–143.

153. Winkler K et al. Lipoprotein-associated phospholipase A_2 predicts 5-year mortality independently of established risk factors and adds prognostic information in patients with low and medium high-sensitivity C-reactive protein (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study). Clin Chem. 2007; 53: 1440–1447.

154. Forsythe CE et al. Comparison of low fat and low carbohydrate diets on circulating fatty acid composition and markers of inflammation. Lipids. 2008; 43: 65-77.

155. Ray KK, Cannon CP. Pathological changes in acute coronary syndromes: The role of statin therapy in the modulation of inflammation, endothelial function and coagulation. J Thromb Thrombolysis. 2004; 18: 89-101.

156. Tsimihodimos V et al. Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22: 306-311.

157. Reddy KJ et al. Effects of lifestyle counseling and combination lipid-modifying therapy on lipoprotein-associated phospholipase A2 mass concentration. J Clin Lipidol. 2009; 3: 275-80.

158. Kuvin JT et al. Effects of extended-release niacin on lipoprotein particle size, distribution, and inflammatory markers in patients with coronary artery disease. Am J Cardiol. 2006; 98: 495-505.

159. Davidson MH et al. COMBination of prescription Omega-3 with Simvastatin (COMBOS) Investigators, Efficacy and tolerability of adding prescription omega-3 fatty acids 4g/d to simvastatn 40 mg/d in hypertriglyceridemic patients: an 8-week, randomized, double-blind, placebocontrolled study. Clin-Ther. 2007; 29: 1354-1367.

160. Saougos VG et al. Differentials effect of hypolipidemic drugs on lipoprotein-associated phospholipase A2. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; 27: 2236-2243.

161. Tsimihodimos V et al. Fenofibrate induces HDL associated PAF-AH but attenuates enzyme activity associated with apoB-containing lipoproteins. J Lipid Res. 2003; 44: 927-934.

162. Filippatos TD et al. The effect of orlistat and fenofibrate, alone or in combination, on small dense LDL and lipoprotein-associated phospholipase A2 in obese patients with metabolic syndrome. Atherosclerosis. 2007; 193: 428-437.

163. Eisaf M, Tselepis AD. Effect of hypolipidemic drugs on lipoprotein-associated platelet activating factor acetylhydrolase. Implication for atherosclerosis. Biochem Pharmacol. 2003; 66: 2069-2073.

164. Blackie JA et al. The identification of clinical candidate SB-480848: a potent inhibitor of lipoprotein-associated phospholipase A_2. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003; 13: 1067–1070.

165. Wilensky RL et al. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A_2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development. Nat. Med. 2008; 14: 1059–1066.

166. Carpenter KL et al. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A_2 diminishes the death-inducing effects of oxidised LDL on human monocyte-macrophages. FEBS Lett. 2001; 505: 357–363.

167. Serruys PW et al. Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque. Circulation. 2008; 118: 1172–1182.

168. Mohler ER et al. The effect of darapladib on plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and cardiovascular biomarkers in patients with stable coronary heart disease or coronary heart disease risk equivalent: the results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Am Coll Cardiol. 2008; 52: 1632-1641.

169. White HD et al. Darapladib for preventing ischemic events in stable coronary heart disease. N Engl J Med. 2014; 370(18): 1702-11.

170. White HD et al. Changes in lipoprotein-associated phospholipase A2 activity predict coronary events and partly account for the treatment effect of pravastatin: results from the Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease study. J Am Heart Assoc 2013; 2.

171. O'Donoghue ML et al. Effect of darapladib on major coronary events after an acute coronary syndrome: the SOLID-TIMI 52 randomized clinical trial. JAMA. 2014 Sep 10; 312(10): 1006-15.

172. Pacifico L et al. Management of metabolic syndrome in children and adolescents. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2011; 21: 455-466.

173. Barter P et al. Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guilding therapy: report of the thirty-person/tencountry panel. J Intern Med. 2006; 259: 247-258.

174. Nagel G et al. Prevalence and cluster of cardiometabolic biomarkers in overweight and obese schoolchildren: results from a large survey in southwest Germany. Clin Chem. 2008; 54: 317-325.

175. Mansikkaniemi K et al. Cross-sectional associations between physical activity and selected coronary heart disease risk factors in young adults. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. Ann Med. 2012; 44: 733-44.

176. Davidson MH et al. Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. Am J Cardiol. 2008; 101: 51F-57F.

177. Würtz P et al. Metabolic signatures of adiposity in young adults: Mendelian randomization analysis and effects of weight change. PLoS Med. 2014 Dec 9; 11(12).

178. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol In Adults: Executive Summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 2001; 285: 2486–2497.

179. Matthews DR et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1998; 28: 412–419.

180. White IR et al. Multiple imputation using chained equations: issues and guidance for practice. Statistics in Medicine. 2011; 4: 377–399.

181. Pérez-Guisado J, Muñoz-Serrano A. A pilot study of the Spanish Ketogenic Mediterranean Diet: an effective therapy for the metabolic syndrome. J Med Food. 2011; 14: 681-7.

182. Tzotzas T et al. Effects of a low-calorie diet associated with weight loss on lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity in healthy obese women. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2009; 18: 477-82.

183. Hanusch-Enserer U et al. Non-conventional markers of atherosclerosis before and after gastric banding surgery. Eur Heart J. 2009; 30: 1516-24.

184. Rector RS et al. Exercise and diet induced weight loss improves measures of oxidative stress and insulin sensitivity in adults with characteristics of the metabolic syndrome. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007; 293: E500-6.

185. Pierce GL et al. Weight loss alone improves conduit and resistance artery endothelial function in young and older overweight/obese adults. Hypertension. 2008; 52: 72-9.

186. Shin MJ et al. Weight loss effect on inflammation and LDL oxidation in metabolically healthy but obese (MHO) individuals: low inflammation and LDL oxidation in MHO women. Int J Obes (Lond). 2006; 30: 1529-34.

187. Roberts ChK et al. Effect of a short-term diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation, MMP-9, and monocyte chemotactic activity in men with metabolic syndrome factors. J Appl Physiol. 2006; 100: 1657–1665.

188. Solá E et al. Parameters of inflammation in morbid obesity: lack of effect of moderate weight loss. Obese surg. 2009; 19: 571-6.