

Doktorand: **MUDr. Josef Bis**

Pracoviště: Katedra interních oborů, Lékařská fakulta UK v Hradci Králové
1. interní klinika Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice
Hradec Králové
Subkatedra kardiologie, Lékařské fakulty UK,
Hradec Králové

Typ doktorandského studia: kombinované

Studijní program: vnitřní nemoci

Název disertační práce: **Metabolická odezva na akutní koronární syndrom se zaměřením na tkáňový faktor, metaloproteinázy a solubilní ligady CD40**

Školitel: Prof. MUDr. Jan Vojáček, DrSc.
1. interní klinika Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice,
Hradec Králové

Školitel specialista: Prof. MUDr. Zdeněk Zadák, DrSc.
Klinika gerontologická a metabolická Lékařské fakulty UK a
Fakultní nemocnice, Hradec Králové

Prohlášení autora:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 3.10.2011

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval všem spolupracovníkům, především školitelům prof. MUDr. Janu Vojáčkovi, DrSc. a Prof. MUDr. Zdeňku Zadákovi, DrSc. Pod jejichž laskavým odborným vedením celý projekt vznikl. Další poděkování vedoucímu laboratorní části oddělení klinické hematologické 2. interní kliniky pod vedením Doc. RNDr. Miroslava Pecky, CSc. a jmenovitě Vieře Dytrychové. Velký dík patří Doc. MUDr. Josefu Šťáskovi, PhD jehož osobní podpora spolu s kolegy katetrizační laboratoře I. interní kliniky byla zásadní.

Velmi významnou byla podpora ze strany přednosty subkatedry gastroenterologie 2. interní kliniky Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UK pana prof. Jana Bureše, za kterou také velmi děkuji.

Za pomoc se zpracováním dat patří díky také Janě Fridrichové z 1. Interní kliniky Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Za celkové směrování patří velký dík a vzpomínky dnes již zesnulému Prof. MUDr. Vladimíru Pidrmanovi DrSc.

Josef Bis

Práce vznikla při práci na grantu IGA MZČR NR 9176-3 a byla částečně z tohoto grantu podpořena.

Obsah

1. Teoretická východiska práce.....	6
1.1. Úvod	6
1.2. Základní patogenetické děje akutního koronárního syndromu.....	6
1.2.1. Koronární ateroskleróza	8
1.2.2. Nestabilní plát	10
1.2.3. Aterotrombóza.....	11
1.3. Systém metaloproteinázy a systém inhibitorů tkáňových metaloproteináz.....	13
1.3.1. Tkáňové metaloproteinázy	13
1.4. Tkáňový faktor a inhibitor tkáňového faktoru.....	20
1.4.1. Tkáňový faktor (TF).....	20
1.4.2. Inhibitor tkáňového faktoru (TFPI).....	24
1.5. Solubilní ligand CD40 (sCD40L).....	27
2. Cíle práce	29
3. Metodika	30
3.1. Soubor pacientů	30
3.2. Kriteria zařazení do studie.....	30
3.3. Postup odběru vzorků a jejich zpracování.....	31
3.3.1. Odběr vzorků.....	31
3.3.2. Zpracování vzorků po odběru	32
3.4. Metody užití ke stanovení plasmatických hladin.....	32
3.4.1. tkáňový faktor (TF)	32
3.4.2. inhibitor tkáňového faktoru (TFPI)	32
3.4.3. metaloproteináza 2 (MMP-2).....	33
3.4.4. metaloproteináza 3 (MMP-3)	33
3.4.5. metaloproteináza 9 (MMP-9)	33
3.4.6. inhibitor tkáňových metaloproteináz 2 (TIMP-2)	33
3.4.7. hsCRP.....	33
3.4.8. solubilní ligand CD40 (sCD40L)	33
3.5. Statistické zpracování výsledků.....	34
4. Výsledky	35

4.1. Demografické složení a klinická charakteristika souboru	35
4.2. Výsledky	37
4.2.1. Tkáňový faktor	37
4.2.2. Inhibitor tkáňového faktoru.....	39
4.2.3. Metaloproteináza 2	41
4.2.4. Metaloproteináza 3	42
4.2.5. Metaloproteináza 9	43
4.2.6. Inhibitor tkáňových metaloproteináz-2	45
4.2.7. Vysoce senzitivní CRP	47
4.2.8. Solubilní ligand CD40.....	49
4.2.9. Korelační výsledky.....	52
5.Diskuse	55
5.1. Tkáňový faktor a inhibitor tkáňového faktoru.....	55
5.2. Metaloproteinázy	61
5.3. sCD40L.....	65
6.Závěr	68
7.Seznam zkratk	70
8.Seznam použité literatury	71
9.Přílohy	92

1. Teoretická východiska práce

1.1. Úvod

Akutní koronární syndrom je stále jednou z hlavních příčin mortality a morbidit ve všech rozvinutých zemích. V jeho terapii se dosáhlo v posledních letech významných úspěchů zavedením zejména direktní balonkové koronární angioplastiky, s cílem minimalizovat ložisko výsledné nekrózy a zlepšit prognózu pacientů.

Podstatou akutního koronárního syndromu je ruptura ateromového plátu. V patogenezi nestability koronárního plátu se předpokládá souběh řady mechanismů. Za klíčový mechanismus se kromě obsahu lipidů v jádru plátu považuje nerovnováha trombotické aktivity krve a proteolytických enzymů cévní stěny. Stabilní koronární pláty vlivem lytických enzymů podléhají změnám se vznikem křehké čepičky s rizikem ruptury a následné trombózy. Vedle lytických enzymů spolupůsobí i protrombotická aktivita krve prezentovaná destičkami a tkáňovým faktorem.

Pochopení těchto dějů by mohlo vést k možnosti ovlivňovat tyto procesy a minimalizovat tak riziko vzniku akutního koronárního syndromu.

1.2. **Základní patogenetické děje akutního koronárního syndromu**

Základním mechanismem vzniku akutního koronárního syndromu je ruptura ateromového plátu bohatého na lipidy s nasedající trombózou. Tradiční pojetí akceptuje nestabilní koronární plát jako příčinu akutního koronárního syndromu, který vede k jednomu lokálnímu

poškození v koronární tepně – používáme výraz „culprit“ léze¹. V posledních letech se ale pomocí analýz koronárních tepen ukazuje, že nestabilní koronární pláty jsou převážně multifokální^{2, 3, 4, 5} a zánětlivý proces v koronárních tepnách je generalizovaný^{6, 7}. Klíčovými ději v tomto procesu mohou být jak lokální degradace pojivové tkáně systémem aktivovaných tkáňových metaloproteináz, který vede k nestabilitě plátu⁸, tak protrombotický proces v koronární cirkulaci. Tyto procesy se zdají vzájemně závislé, a proto by měl být používán termín „aterotrombotické“ děje⁹.

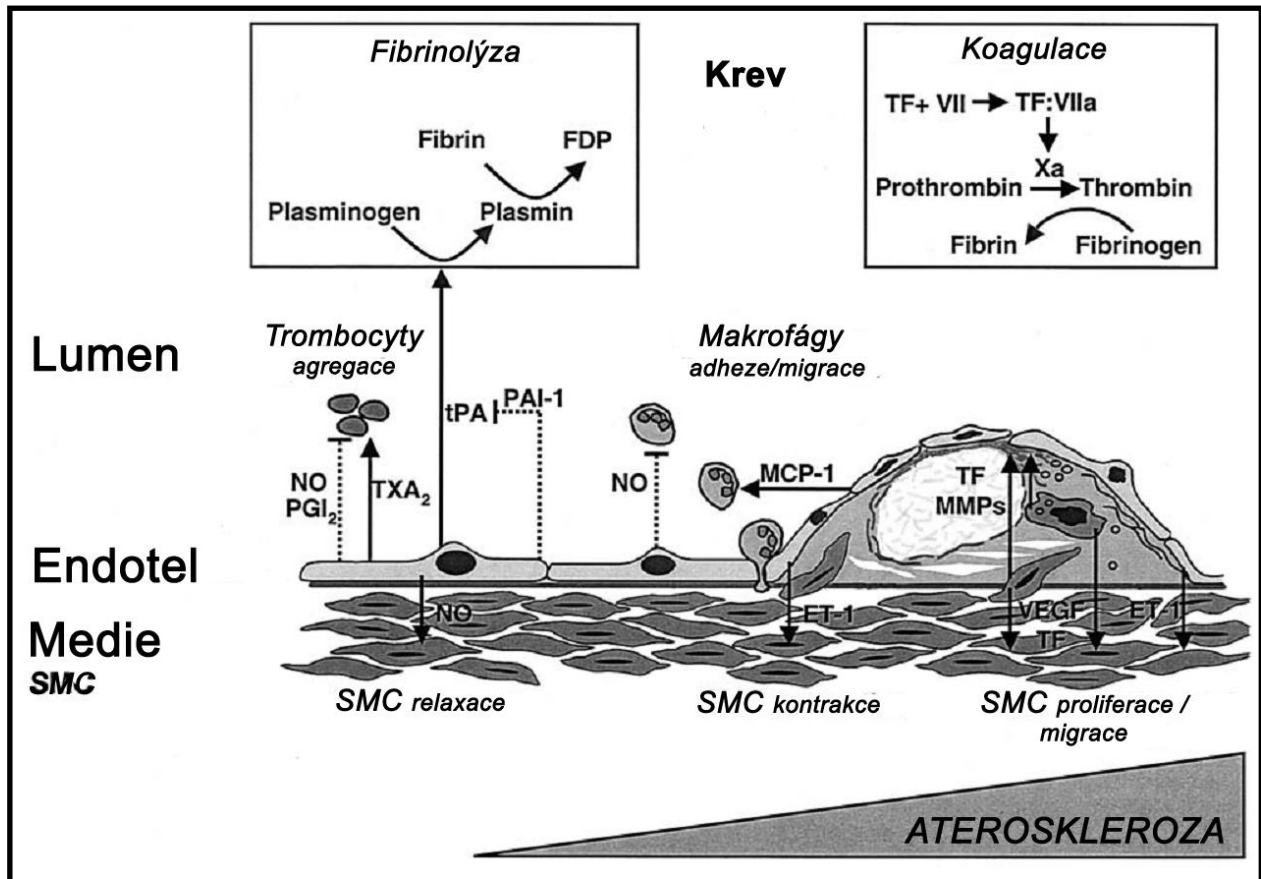
Původní termín vulnerabilní plát byl specificky užíván k popisu plátu náchylného k ruptuře. U pacientů umírajících náhlou srdeční smrtí nalézáme histopatologicky ruptury plátu, eroze plátu a kalcifikované noduly v plátu. Ruptura plátu tak není jediným nálezem, který vede ke vzniku trombózy, a proto by měl být vulnerabilní (nestabilní) plát definován jako plát náchylný k trombóze vedoucí k akutnímu koronárnímu syndromu se vznikem akutního infarktu myokardu nebo nestabilní anginy vznikem permanentního nebo tranzitorního uzávěru tepny. Koncept vulnerability musí být tedy spojen s výskytem tvorby trombu. Vulnerabilní plát je tedy lépe možné definovat jako výsledek procesu nedostatečného hojení v místě aterogeneze¹⁰.

V současné době máme kardiospecifické troponiny k ověření diagnostiky akutního koronárního syndromu¹¹. Troponiny ale nejsou zapojeny do patofyziologie akutních koronárních syndromů, kde dochází ke vzájemné interakci subendoteliálních struktur cévní stěny a ateromového plátu a aktivaci krevních destiček a monocytů.

1.2.1. Koronární ateroskleróza

Ateroskleróza je systémová choroba postihující intimu velkých a středně velkých tepen – aorty, karotid, koronárních a periferních tepen. Normálně fungující endotelové buňky hrají klíčovou roli v homeostáze cévní stěny (regulují funkce cévní stěny) a zabraňují vývoji aterosklerózy. Endotel reguluje cévní tonus, trombogenicitu, funkci destiček, proliferaci a migraci hladkých svalových buněk a tonus cévní stěny. Za normálních okolností uvolňuje endotel řadu působků, které zajišťují rovnováhu mezi vasodilatací (produkce oxidu dusného = NO) a vasokonstrikcí (endotelin-1) cévní stěny, brání excesivní agregaci destiček (produkce NO a prostacyklinu = PGI₂) a zajišťují rovnováhu hemokoagulační kaskády regulací tvorby fibrinu komplexem tkáňového faktoru (TF) a inhibitoru tkáňového faktoru (TFPI) a aktivace fibrinolýzy komplexem tkáňového aktivátoru plasminogenu a inhibitoru tkáňového aktivátoru plasminogenu-1⁹.

Dysfunkce endotelu je vstupním patogenetickým faktorem aterosklerózy. Ta je způsobována rizikovými faktory (tj. arteriální hypertenzí, hyperlipidémií, kouřením, oxidačním stresem atp...), které mohou spouštět aterosklerózu bez vlastního morfologického poškození endotelu. Dysfunkční endotel pak podporuje adhezi a migraci makrofágů produkcí monocyty chemoatraktivujícího proteinu-1, podporuje růst plátu a indukuje vasokonstrikci (viz Obrázek 1)⁹.



Obrázek 1: Antiaterogenní a antitrombotické vlastnosti endotelu. Upraveno dle Corti et al⁹. (TF= tkáňový factor, VII= factor VII, Xa= factor Xa, NO = oxid dusnatý, PGI₂ = prostacyklin I₂, TXA₂ = tromboxan A₂, SMC = hladké svalové buňky, tPA = tkáňový aktivator plasminogenu, PAI-1 = inhibitor tkáňového aktivátoru plasminogenu-1, MCP-1 = monocyty chemoatraktivující protein 1, MMPs = metaloproteinázy, ET1= endotelin 1, VEGF = vaskulární růstový factor).

Ateroskleróza je charakterizována ztluštěním intimy následkem akumulace buněk a lipidů, způsobené nerovnováhou mezi přísunem a výstupem (odsunem) lipidů¹². Sekundární změny mohou být zaznamenány jak v přilehlé medii a adventicii, zejména v pokročilých stupních choroby. Postupná progresa tukových proužků (nalézány už v intimě dětí¹³) progreduje do fibroateromu tvořeného čepičkou hladkých svalových buněk a kolagenu. Tyto časně fáze aterosklerózy mohou progredovat bez změny velikosti lumen pomocí kompenzačního zvětšení tepny (pozitivní remodelace)¹⁴.

Dysfunkční endotel vede ke vzniku výrazně proaterogenního prostředí se vznikem atherosklerotických lézí a trombotických komplikací. Tvorba cytokinů a exprese adhezních molekul (např. selektinů, VCAM = vascular cell adhesion molecule, ICAM = intercellular cell adhesion molecule), napomáhá leukocytům a monocytům k zachycení a infiltraci do cévní stěny¹⁵. Monocyty migrují subendoteliálně, zde se transformují na makrofágy a regulují zánětlivou reakci a tvorbu dalších chemokinů atrahujících buňky¹⁵.

1.2.2. Nestabilní plát

Akutní koronární syndrom je způsobený nestabilním nebo tzv. vulnerabilním plátem, který je náchylný k ruptuře. Léze zodpovědná za koronární postižení (culprit lesion) je často původně málo stenotická a nedetekovatelná na koronární angiografii¹⁶. Plát náchylný k ruptuře má obvykle objemné lipidové jádro s tenkou fibrosní čepičkou a vysoký počet zánětlivých buněk a to zejména na okrajích plátu, kde nejčastěji k ruptuře plátu dochází¹⁷.

Monocyty a makrofágy jsou klíčovými v rozvoji nestability ateromového plátu. Makrofágy produkují růstové, mitogenní, prozánětlivé a lytické působky, které zvýrazňují progresi atherosklerotických plátů¹⁸. Destičky a zánětlivé buňky mohou být zdrojem i cílem prozánětlivých působků¹⁹.

Mechanické faktory vedoucí k vulnerabilitě plátu jsou tři: obvodové napětí stěny tj. napětí na obvodu ateromové léze neboli „únava“ čepičky, charakteristiky léze (lokalizace, velikost a konzistence) a charakteristika krevního průtoku. V případě, že lipidové jádro překročí více než 40% objemu plátu, je plát považován za nestabilní²⁰. Hladké svalové buňky jsou přítomny v ateromové čepičce a produkují kolagenní vlákna (pojivovou tkáň), na které závisí integrita

povrchové čepičky. Povrchová čepička je dynamicky se měnící v závislosti na rovnováze mezi produkcí pojivové tkáně hladkými svalovými buňkami a její degradací²¹. Snížení množství hladkých svalových buněk vede ke snížené produkci pojiva. Kromě mechanických vlivů hraje důležitou roli zánět. Aktivované zánětlivé buňky jsou nalézány v oblasti ruptur plátu ze vzorků z aterektomií u pacientů s akutním koronárním syndromem²². Tyto buňky jsou schopny degradovat extracelulární matrix vylučováním proteolytických enzymů – zejména metaloproteináz²³. T-lymfocyty izolované z oblastí náchylných k ruptuře mohou stimulovat makrofágy k produkci metaloproteináz a mohou predisponovat rupturu lézí zeslabením jejich fibrosní čepičky²⁰. Metaloproteinázy a jejich inhibitory ovlivňují remodelaci cévní stěny a migraci hladkých svalových buněk přes bazální membránu²³. Makrofágy produkované růstové faktory a kyslíkové radikály jsou pravděpodobně zodpovědné také za apoptózu hladkých svalových buněk v plátu²⁴.

1.2.3. Aterotrombóza

Ruptura plátu a následná tvorba trombu je zodpovědná za vznik akutního koronárního syndromu, jehož závažnost je ovlivňována množstvím a stabilitou trombu. Opakované příhody ruptury plátu a asymptomatické tvorby trombu mohou být zodpovědné za progresi koronárních lézí^{25, 26}.

Jakmile dojde k ruptuře plátu, ovlivňují další rozvoj jak lokální, tak systémové faktory. Lokálními faktory jsou složení plátu a dynamika tekutin. Ruptura plátu bohatého na lipidy napomáhá interakci mezi tkáňovým faktorem a protékající krví, spouští aktivaci koagulační kaskády, syntézy trombinu a tvorby trombu^{30, 27}. Složení plátu může také regulovat aktivaci destiček; zvýšené hladiny tromboxanu A₂ zjišťované u ischemické choroby srdeční svědčí pro

podíl destiček na aterotrombóze²⁸. Navíc léčba protideštičkovými léky zlepšuje prognózu nemocných s akutním koronárním syndromem²⁹.

Makrofágy mohou být zdrojem cirkulujícího tkáňového faktoru. Trombogenicita léze koreluje s obsahem tkáňového faktoru; lokální TFPI snižuje trombogenicitu. Vysoké hladiny cirkulujícího tkáňového faktoru jsou u pacientů s hyperlipidemií, diabetem a u akutního koronárního syndromu^{30, 31, 32}.

Asi jedna třetina akutních koronárních syndromů vznikne bez ruptury plátu nebo pouze na podkladě drobné povrchové eroze fibrosního plátu, který tepnu významně stenozuje²⁵. V těchto případech tvorba trombu závisí na zvýšené trombogenicitě spouštěné systémovými faktory. K těmto faktorům patří zvýšené hladiny LDL cholesterolu, snížené hladiny HDL cholesterolu, kouření cigaret, diabetes mellitus a některé poruchy hemokoagulace zvyšující trombotické komplikace^{33, 34, 35}. Ovlivněním rizikových faktorů, jako je hyperlipidémie a kompenzace diabetu, je možné dosáhnout normalizace trombogenicity³⁶.

1.3. Systém metaloproteinázy a systém inhibitorů tkáňových metaloproteináz

1.3.1. Tkáňové metaloproteinázy

Metaloproteinázy jsou velkou rodinou endopeptidáz s obsahem zinku, které rozkládají mezibuněčnou hmotu (matrix). Souhrnně celou skupinu nazýváme tkáňové metaloproteinázy (MMPs). Jejich společnými vlastnostmi jsou:

1. schopnost degradace složek mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix)
2. vylučování v neaktivní pro-formě a dodatečná aktivace
3. přítomnost molekuly zinku (Zn^{2+}) v aktivním místě
4. přítomnost ionizovaného kalcia (Ca^{2+}) ke stabilitě
5. aktivita pouze za chemicky neutrálního pH
6. inhibice aktivity specifickými inhibitory tkáňových metaloproteináz.

Zdrojem metaloproteináz jsou monocyty, makrofágy a hladké svalové buňky. Jejich klíčovou funkcí je degradace extracelulární matrix, akcelerace angiogeneze, indukce leukocytární infiltrace a indukce apoptózy.

Skupina tkáňových metaloproteináz je dnes velmi rozsáhlá a v současnosti je známo více než 20 typů. Podle substrátové specificity a své primární struktury jsou rozděleny do čtyř skupin (viz Tabulka 1)³⁷

Tabulka 1: Skupina metaloproteináz a jejich substráty (upraveno dle ³⁷ a ⁴⁵)

Enzym	MMP klasifikace	Substrát	Aktivátor	Inhibitor	Induktor	Hlavní distribuce
Kolagenázy						
Intersticiální kolagenáza	MMP-1	Kolagen I,II,III, VII a X, gelatin,entactin, aggrecan	Plasmin,MMP-3, 7, -10, MT-MMP	TIMP-1, -2, -3, -4 Tetracyklin	TNF α , IL-1 β , PDGF, phorbol, TGF- β	Významně zastoupen v myokardu
Neutrofilní kolagenáza	MMP-8	Kolagen I,II,III, aggrecan, gelatin	MMP-3, -7, -10	TIMP-1, -2	TNF α , IL-1 β	Neutrofilly Postpartální uterus
Kolagenáza-3	MMP-13	Kolagen I, II, III, gelatin, fibronectin, laminin, tenascin	MT-MMP		LIF, TNF α , IL-1 β , phorbol	Široce zastoupena vč. myokardu postpartální uterus
Kolagenáza-4	MMP-18	Kolagen				
Gelatinázy						
Gelatináza A	MMP-2	Gelatin, kolageny I, IV, V, VII a X, fibronectin, laminin, aggrecan, tenascin-C, vitronektin	MT-MMP	TIMP-1, -2, -3, -4	TGF- β	Ubikvitní
Gelatináza B	MMP-9	Gelatin, kolagen IV, V, VII, XIV, aggrecan, elastin, entactin, vitronektin	Plasmin MMP-2	TIMP-1, -2, -3, -4 Tetracycline	TGF- β , TNF α , IL-1 β , LPS, phorbol, EGF, ischemie	Leukocyty Ostoklasty Trofoblast
Stromelysiny						
Stromelysin 1	MMP-3	Gelatin, fibronectin, laminin, kolagen III, IV, V, IX a X, tenascin-C, vitronektin		TIMP-1, -2, -3, -4	TNF α , IL-1 β , phorbol, EGF	Srdce, plíce, játra

Stromelysin 2	MMP-10	Kolagen IV, fibronektin, aggrecan		TIMP-1, -2		Srdce, plíce, játra, střevo
Stromelysin 3	MMP-11	Fibronektin, gelatin, laminin, kolagen IV, aggrecan		TIMP-1, -2		
Mebránové typy MMPs						
MT1-MMP	MMP-14	Kolagen I, II a III, fibronektin, laminin, vitronektin, progeoglykany proMMP-2 a proMMP-13		TIMP-2, -3	TNF α , IL-1 β , EGF, phorbol, concavalin A	Plíce, ledviny, slezina, placenta
MT2-MMP	MMP-15	proMMP-2		Napětí		Srdce, plíce, játra, colon, ledviny
MT3-MMP	MMP-16	proMMP-2				Mozek, plíce, placenta
MT4-MMP	MMP-17	-				Srdce, mozek, colon, leukocyty, ovaria
MT5-MMP	MMP-24	proMMP-2				
MT6-MMP	MMP-25	-				
Další						
Matrilysin	MMP-7	Gelatin, fibronektin, laminin, kolagen IV, vitronektin, tenascin-C, elastin, aggrecan		TIMP-1, -2, -4	LPS	Postpartální uterus
Metalloelastaza	MMP-12	Elastin				
Enamelysin	MMP-20	Aggrecan				
Endometase	MMP-26	-				

První skupina – kolagenázy jsou zejména aktivní ve vazbě k molekulám kolagenu, který štěpí na N-terminálním konci za vzniku krátkého (¼ délky) a dlouhého fragmentu. Tyto fragmenty ztrácejí svou konformaci helix a mění se na fragmentované řetězce zvané gelatiny.

Druhá skupina – gelatinázy (metaloproteináza-2 a -9) mají významnou schopnost degradace gelatinu. Gelatinázy jsou schopné degradovat kolagen typu IV, který je zastoupen v bazálních membránách.

Třetí skupina - stromelysiny (MMP-3, -10 a -11) jsou zaměřeny specificky proti širokému spektru extracelulárních komponent zahrnujících proteoglykany, lamininy, fibronektin, vitronektin a další typy kolagenu.

Čtvrtá skupina - membránové typy metaloproteináz degradují některé extracelulární komponenty a jsou schopné aktivace dalších metaloproteináz. Tato forma metaloproteináz je vázána na buněčných membránách a jejich aktivace hraje roli v buněčné migraci²⁴.

Z dnešního pohledu toto dělení není striktní, například gelatinázy jsou schopny štěpit i instersticiální kolagen a hrají důležitější roli v remodelaci kolagenní extracelulární matrix³⁷.

Regulace aktivity metaloproteináz probíhá na třech úrovních – ovlivnění transkripce a sekrece MMPs do extracelulárního prostoru makrofágy, aktivace latentních proenzymů a inhibice aktivních enzymů endogenními inhibitory (zejména tkáňovými inhibitory metaloproteináz = TIMP)²⁴.

Regulace exprese MMP

Induktory exprese metaloproteináz je velká skupina prozánětlivých cytokinů, hormonů a růstových faktorů, zejména interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor nekrosis faktor (TNF- α), epidermální růstový faktor, destičkový růstový faktor (PDGF), bazický

fibroblastový faktor a CD40³⁸ ³⁹. Dalším aktivátorem je povrchový buněčný protein indukující expresi metaloproteináz, který je zastoupen na normálních i poškozených tkáních myokardu⁴⁰. Naopak jiné faktory, kortikosteroidy, kyselina retinová, heparin a interleukin-4 (IL-4), inhibují expresi genu pro MMPs⁴¹. Existují ale i diverzifikované stimulační efekty, kdy transformující růstový faktor β stimuluje syntézu MMP-2 a MMP-9, ale inhibuje syntézu MMP-1 a MMP-3⁴².

Aktivační mechanismus neaktivních MMP

Neaktivní formy metaloproteináz musí být aktivovány proteolytickým štěpením do účinných forem z prekurzorů MMP odštěpením karboxylové skupiny z proenzymu. Byly popsány tři různé aktivační mechanismy:

1. postupná aktivace
2. aktivace pomocí buněčného povrchu a systémem membránových MMP (MT-MMP)
3. intracelulární aktivace

Aktivace metaloproteináz může proběhnout intracelulárně, ale většina MMP je secernována a uložena v extracelulární matrix⁴². Aktivace proMMP v intersticiu je řízena plasmin-independentní nebo plasmin-dependentní cestou⁴³. Plasmin vytvořený urokinasa-like aktivátorem plasminogenu (uPA) spolu s MMP-2 aktivuje MMP-9⁴⁴. uPA spojená s receptorem uPA upřednostňuje extracelulární degradaci. Aktivované membránové typy metaloproteináz a MMP-2 nebo TIMP-2 slouží k transmembránovému řízení aktivace dalších metaloproteináz⁴⁵. I koncentrace TIMP-2 má důležitou roli v povrchové aktivaci MMP-2. V nízkých koncentracích slouží TIMP-2 jako receptor pro prekurzor MMP-2, zatím co ve

vysokých koncentracích TIMP-2 neutralizuje povrchové komplexy membránových metaloproteináz a brání aktivaci zejména MMP-2⁴⁵.

Lokální aktivace MMP je facilitována vazbou na kolagen. Přítomnost solubilního kolagenu stimuluje kolagenázy a kolagenolytickou aktivitu – kultury monocytů v prostředí kolagenu typu I uvolňují více MMP-9, než buňky kultivované bez tohoto média⁴⁶. Stejně tak aktivace MMP-2 je indukována kolagenem typu I, zatím co specifické protilátky proti hlavnímu receptoru pro kolagen I částečně inhibují aktivaci MMP-2⁴⁷.

Inhibice MMP

Metaloproteinázy jsou inhibovány inhibitory tkáňových metaloproteináz, syntetickými komponenty a α 2-makroglobulinem⁴⁸. TIMP jsou bílkoviny s mnohočetnými funkcemi, TIMP-1, 2 a 3 mají růstovou stimulační aktivitu⁴⁹.

Důsledky nadměrné exprese nebo deficitu MMPs nebo TIMPs

V modelu bylo sledováno navození tvorby TIMP-1 pomocí adenovirového vektoru. Tato indukce zvýšené exprese vedla k inhibici migrace hladkých svalových buněk a i snížení neointimální hyperplazie navozené poškozením při balonkové angioplastice^{50 51}. Nadměrná produkce TIMP-1, -2 a -3 inhibuje chemotaxi hladkých svalových buněk a invazi přes bazální membránu. Adenoviry navozená produkce TIMP-2 snižuje neointimální ztlustění cévní stěny primárně inhibicí MMP aktivity a migrace hladkých svalových buněk in-vitro i in-vivo⁴⁵. Zvýšená aktivita MMP-3 je spojena se zvýšenou tvorbou kolagenu a fibrotizací⁴⁵.

U aterosklerotického plátu je popisována zvýšená koncentrace metaloproteináz (MMP) a jejich aktivity, zvláště v oblastech s vysokým obsahem pěnových buněk, které jsou spojeny s vyšším rizikem nestability plátu. V makrofázích nestabilních plátů byla zjištěna zejména

vysoká produkce a obsah MMP-9 (gelatinasy B) a MMP-3 (stromelysinu)⁵², současně s výraznou převahou aktivních lytických enzymů nad jejich přirozenými inhibitory. Nejvyšší absolutní koncentrace i rozdíly koncentrace jsou ve vulnerabilních oblastech čepičky⁵³.

Metaloproteináza 2 = kolagenáza (MMP-2), degraduje kolagen typu IV. V aortě se vyskytuje MMP-2 ve vyšším množství u aterosklerotických lézí více než u tukových proužků a to více než v normální stěně – poměr AS plát : tukový proužek : normální stěna je 4:2:1⁵⁴.

Extracelulární matrix a angiogeneze

Angiogeneze je primárně řízena tkáňovou hypoxií a odehrává se za fyziologických podmínek jako je během hojení rány, růstu endometria během menstruačního cyklu nebo při použití tkáňového štěpu a ischemii.

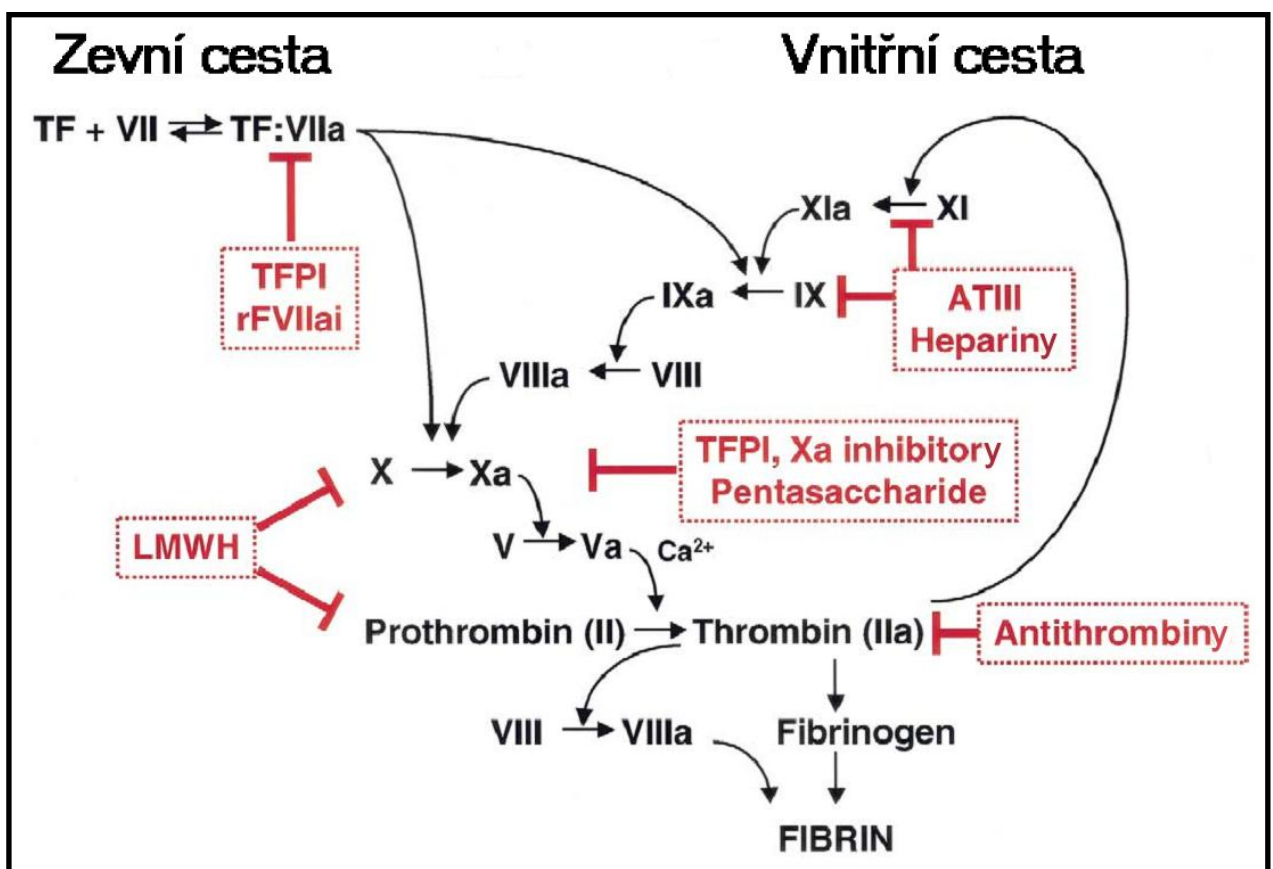
MMP-9 a ateroskleróza

Ve studii plátu u králíků živených dietou bohatou na lipidy byla zjištěna vysoká hladina MMP-9 v pěnových buňkách. Aktivita metaloproteinázy v tomto modelu plátu vykazovala vysokou aktivitu enzymů nad jejich inhibitory. V případě intervence N-acetylcysteinem, jako kyslíkovým radikálem, dochází v pěnových buňkách ke snížení exprese jak prekurzoru MMP-9, tak i její aktivní formy⁵⁵. Vysazení lipidové diety vede ke snížení obsahu MMP-9 a její aktivity v plátu⁵⁶.

1.4. Tkáňový faktor a inhibitor tkáňového faktoru

1.4.1. Tkáňový faktor (TF)

Tkáňový faktor je klíčovou molekulou aktivace koagulační kaskády. Uvolnění tkáňového faktoru vede ke spuštění koagulační kaskády tzv. zevní cestou a facilituje aktivaci koagulační kaskády. Slouží také jako signální receptor v průběhu hemokoagulace. Historické označení cesty pochází z vyjádření nutnosti zevního činitele (tj. tkáňového faktoru) spouštět koagulační kaskádu. (viz Obrázek 2)



Obrázek 2: Schéma koagulační kaskády. Upraveno dle ⁵⁷ a ⁵⁸. (TF = tkáňový faktor, VII = faktor VII, TFPI= inhibitor tkáňového faktoru, LMWh = nízkomolekulární heparin, AT III= antitrombin III, XI=faktor XI, IX = faktor IX, VIII = faktor VIII, X = faktor X.

Tkáňový faktor je transmembránový protein s krátkou cytoplasmatickou a dlouhou extracelulární doménou o velikosti cca 45 kilodaltonů. TF má vysokou afinitu k faktoru VII i v VIIa, které váže. Komplex TF:VIIa spouští koagulační kaskádu aktivací plasmatických

faktorů IX a X. Další komplexy TF:VIIa jsou tvořeny lokálně z inaktivních komplexů TF:VII autoaktivací a pozitivní zpětnou vazbou působením f Xa a f IXa. Malé množství f Xa je schopno vyvolat změnu stopového množství protrombinu na trombin, který zpětnou vazbou aktivuje faktor VIII a f. V⁵⁷. Komplex aktivovaného faktoru Xa s faktorem Va spouští štěpení protrombinu na trombin; trombin je klíčová molekula koagulační kaskády s mnohočetným efektem: 1. přeměna fibrinogenu na fibrin, 2. přeměna f VIII na VIIIa tvořícím následně aktivní komplex s faktorem IXa, 3. přeměna faktoru XIII na XIIIa měnícím rozpustný fibrin do nerozpustné formy, 4. přeměna fV na Va, který je zásadním kofaktorem přeměny protrombinu na trombin, 5. aktivace destiček, které uvolňují faktor V⁵⁸.

Tkáňový faktor je běžně tvořen monocyty, fibroblasty a destičkami, na jejichž membránách je exprimován. Při stimulaci (poranění nebo ateroskleróza, CD40L) je exprimován na povrchu aktivovaných endotelií, monocytů a také subendoteliálně uloženými buňkami hladkého svalstva a fibroblasty⁵⁹. V jádru aterosklerotického plátu je velké množství tkáňového faktoru tvořeno makrofágy. Naopak v normálních tepnách je tvorba tkáňového faktoru omezena na adventicii, kromě sporadického výskytu v medii⁶⁰. V adventicii se tkáňový faktor vyskytuje ve vazbě na faktor VII, což umožňuje v případě poranění rychlejší aktivaci srážení⁶¹. Malé množství cirkulujícího tkáňového faktoru je přítomno v plné krvi i v séru zdravých jedinců⁶².

Přítomnost TF se liší dle jednotlivých orgánů. Vysokým obsahem TF jsou známy mozek, plíce, srdce, uterus, placenta a testes. Naopak nízké hladiny TF jsou přítomny ve svalech, kloubech a játrech⁶³. Zvýšené množství TF by mohlo pro výše uvedené orgány znamenat snížení rizika krvácení⁶⁴.

V krvi je část aktivního TF vázán na mikropartikule (fragmenty membrán) vzniklé apoptózou buněk aterosklerotického plátu. TF cirkulující v této podobě má vysokou prokoagulační

aktivitu⁶⁵. Mikropartikule na sebe váží TF původně vytvořený monocyty, polymorfonukleárními leukocyty, lymfocyty, destičkami, endoteliemi a hladkými svalovými buňkami⁶⁶.

U normálních jedinců je schopnost rychle reagovat na cévní poškození zajištěna systémem trvalé nízké bazální aktivace srážecího systému⁶⁴. Bazální aktivitu srážecího systému lze potvrdit bazálními hodnotami faktoru XIa a Xa^{67, 68} a hladinou komplexu trombin-antitrombin. Podání protilátky anti-TF vede u šimpanzů k inhibici TF a snížení bazálních hladin faktoru XIa a Xa⁶⁹. Také snížení hladiny tkáňového faktoru, v modelu geneticky modifikované myši, vede ke snížení plasmatických hladin trombin-antitrombinového komplexu⁷⁰. Tyto nálezy ukazují, že zevní aktivační cesta je zodpovědná za spouštění srážecí kaskády u normálních jedinců a myši⁶⁴.

Existují dva modely možného spouštění koagulační kaskády cestou tkáňového faktoru. První model se opírá o spouštění extravaskulárně uloženým tkáňovým faktorem. V tomto případě, je možný mechanismus „prosakování“ srážecích faktorů z krve do cévní stěny nebo únik po subklinickém poranění cévní stěny, což vede k tvorbě malé dávky trombinu⁷¹. Je možné spekulovat, že v cévní stěně přítomný komplex TF a f VIIa⁶¹ spolu se srážecími faktory unikajícími do cévní stěny, dochází ke vzniku trombinu. Difuze tohoto trombinu zpět do krve umožňuje jeho kontakt s fibrinogenem⁶⁴. Alternativně může docházet k úniku srážecích faktorů do cévní stěny jejím poraněním. Model intravaskulární aktivace tkáňovým faktorem se opírá o přítomnost malého množství tkáňového faktoru v krvi, nazývané cirkulující tkáňový faktor, který by mohl být zodpovědný za spouštění srážecí kaskády⁷². V krvi je TF zastoupen na povrchu krevních buněk (cirkulující monocyty), v mikropartikulích a jako plasmatický protein rozpuštěný v plazmě. Zejména monocyty exprimují malé množství TF a mohou být hlavním zdrojem intravaskulárního TF, který by pak udržoval bazální koagulaci⁷³. Tento mechanismus je ale zpochybňován, neboť zejména práce Butenase

neprokázala přítomnost funkčního TF v krvi normálních jedinců. Při vyloučení další stimulace monocytů se odhaduje množství bazálního TF na méně než 20 femtomolu⁷⁴.

TF a ateroskleróza

Infiltrace intimálních vrstev monocyty a jejich transformace na makrofágy a pěnové buňky reprezentuje zánětlivý původ aterosklerózy. Tvorba zánětlivých cytokinů jako TNF- α a interleukinů vede k uvolnění a zvýšení indukce exprese TF. V časných fázích aterogeneze je zvýšená exprese TF pozorována v monocytech⁷⁵, v pozdějších fázích je TF nalézán v pěnových buňkách, endoteliích a hladkých svalových buňkách⁷⁶. TF je také přítomen v nekrotickém jádru plátu, zejména ve vazbě na mikropartikule ze zaniklých pěnových buněk, makrofágů a lymfocytů⁷⁶. Tyto mikropartikule reprezentují hlavní část aktivity TF v aterosklerotickém plátu⁷⁷. Exprese TF je úzce spojena s apoptózou makrofágů v plátech bohatých na lipidy, což ukazuje, že nejen zánět, ale také apoptóza může určovat trombogenicitu plátu⁷⁸.

Narůstající velikost aterosklerotického plátu může vést až ke stenóze tepny, spojené se vzestupem střižného napětí, které indukuje expresi TF endoteliemi. Za hlavní faktor následné ruptury ale není považován stupeň zúžení tepny, ale spíše složení plátu, tj. na lipidy bohatý plát s tenkou čepičkou, masivním lipidovým jádrem a excesivní infiltrací makrofágy a TF. Ruptura plátu vystaví vysoce trombogenní obsah cirkulující krvi. Na TF bohaté makrofágy a TF obsahující mikropartikule z nekrotického jádra iniciují formaci trombu a s tím související komplikace jako akutní infarkt myokardu⁷⁸.

Kromě aktivace koagulační kaskády, je TF zapojen v jiných patogenetických událostech, které se odehrávají během tvorby aterosklerotické léze. TF je receptor pro faktor VIIa a tímto mechanismem může ovlivňovat migraci a proliferaci hladkých svalových buněk⁷⁹,¹⁵³. Tento proces má přímý vliv na cévní remodelaci, protože hladké svalové buňky migrují a proliferují

v neointimě poraněných tepen. Efekt komplexu TF/fVIIa na migraci a proliferaci hladkých svalových buněk je závislý výhradně na cytoplasmatické doméně TF. Cévní remodelace, jako odpověď na poranění, je redukována u myši s absencí této domény⁸⁰. Tvorba mikrocév v aterosklerotickém plátu může vést k progresi plátu přispívající k destabilizaci plátu a ruptuře¹⁴⁹. Stejně jako je TF zapojen do aterogeneze, může také hrát roli v neovaskularizaci plátu a tedy i spouštět jeho destabilizaci. TF tedy nemusí být zapojen do aterogeneze vyvoláním trombózy, ale také přímým působením na cévní remodelaci, progresi plátu a jeho nestabilitu⁷⁸.

In-vitro vytvořený komplex TF/VIIa během koagulace zvyšuje migraci hladkých svalových buněk, toto nabízí možnou roli komplexu TF/VIIa na remodelaci cévní stěny⁸¹.

Hladiny tkáňového faktoru lze ovlivnit i farmakologicky – podání statinů snižuje expresi TF na endoteliálních buňkách⁸².

1.4.2. Inhibitor tkáňového faktoru (TFPI)

Inhibitor tkáňového faktoru je přirozeným mechanismem bránícím prokoagulačnímu efektu způsobenému komplexem tkáňový faktor/faktor VIIa a faktoru Xa⁵⁸

Normální hladina TFPI v plazmě je 2,25 nmol/l s výrazným rozptylem v rámci populace^{83, 84}. TFPI je uvolňován endoteliálními buňkami a destičkami, v plazmě cirkuluje ve vazbě na plasmatické lipoproteiny⁸⁵. Množství TFPI obsaženého v destičkách je odhadováno jako 5-10% plasmatické hladiny⁸⁶. Hlavní pool TFPI (více než polovina celkového množství v destičkách a plazmě) je vázán na endotel⁸⁷. Malé množství TFPI je exprimováno i hladkými svalovými buňkami, megakaryocyty, monocyty, fibroblasty a kardiomyocyty^{88, 89}. Byl nalezen i v makrofázích a T-buňkách aterosklerotických plátů⁹⁰.

TFPI zajišťuje regulaci prokoagulačních stimulů tak, aby malý podnět nevyvolal nekontrolovanou tvorbu trombinu. Mechanismus působení TFPI je dvojitý, nejprve rychlé vytvoření komplexu TFPI:Xa, který je silným inhibitorem komplexu TF:VIIa⁸⁵. Aby došlo ke spuštění koagulační kaskády, musí množství f Xa vytvořeného TF:VIIa nejprve překročit inhibiční schopnost lokálního TFPI. TFPI je zásadní v regulaci koagulace spouštěného komplexem TF:VIIa⁹¹.

Exprese TFPI je v podmínkách in-vitro stimulována endotoxiny, interleukinem-1, TNF- α , PDGF, heparinem, bazickým fibroblastovým faktorem a střížným napětím⁹².

Podání heparinu, nefrakcionovaného i LMWh, zvyšuje uvolňování TFPI tvořeného endotelem a tím zvyšuje plasmatickou hladinu cca 1,5 – 3x. Heparin tímto mechanismem zvyšuje svoji anti-Xa aktivitu⁹³. Enoxaparin samostatně je schopen dosáhnout vyšších maximálních hladin TFPI než nefrakcionovaný heparin⁹⁴, TFPI je zodpovědné za cca 1/3 antikoagulačního efektu heparinu, zbylý efekt je vázán na antitrombin⁸⁷. Za antikoagulační efekt vyvolaný podáním heparinu/LMWh je zodpovědná ta frakce TFPI, která je jejich působením uvolněna z endotelu a nikoliv v plasmě přítomný TFPI. Podávání nefrakcionovaného heparinu v terapeutických dávkách vede k progresivnímu úbytku TFPI, což vede k rebound prokoagulačnímu fenoménu po jeho vysazení. Podání LMWh tento efekt na TFPI nemá, je tím vysvětlován lepší výsledek LMWh ve studiích na akutní koronární syndrom⁸⁷.

Endogenní TFPI inhibuje aktivitu TF vytvořením komplexu TF-fVIIa-fXa-TFPI a to jak na endotelu, tak na cirkulujících monocitech a pravděpodobně i na mikropartikulích¹³⁶. Dnes je tvorba komplexu vysvětlována nejčastěji dvoustupňově – nejprve vazba TFPI na volný fXa a následně vazba na komplex TF-fVIIa. Farmakokinetické studie ale podporují přímou vazbu TFPI na f Xa dosud neuvolněného z komplexu TF-fVIIa⁹².

Plasmatický TFPI cirkuluje v plasmě ve spojení s LDL lipoproteiny a zdá se, že jeho hladina s LDL hladinou koreluje⁹⁵. V plasmě je TFPI degradován na neaktivní formy trombinem, plasminem, elastázami a metaloproteinázami⁹⁶.

V normální tepně je TFPI soustředěn v endoteliálních buňkách a v buňkách hladkých svalů medie. V tepnách postižených aterosklerózou je TFPI přítomen v endoteliích nad plátem, ale i v endoteliích mikrotepen plátu, v hladkých svalových buňkách medie a i v neointimě. Navíc je obsažen i v makrofázích/pěnových buňkách a T-buňkách obklopujících nekrotické jádro. Aktivita TFPI je vyšší v místech s nižším obsahem TF. Celkové množství TFPI je vyšší v aterosklerotických lézích než ve zdravých tepnách, zejména u komplikovaného plátu s přítomností trombu⁹⁷.

1.5. Solubilní ligand CD40 (sCD40L)

CD40 ligand (CD40L/CD154) je transmembránový proteinový komplex strukturou blízký TNF- α . Původně byl nalezen na CD4⁺ T-lymfocytech⁹⁸. Dnes víme, že systém CD40/CD40 ligand je zastoupen jak na T i B leukocytech, tak na endoteliích a buňkách hladkých svalů⁹⁹, aktivovaných monocytech, makrofázích, endoteliích a dendritických buňkách^{100, 101}. Je přítomen zejména na aktivovaných destičkách¹⁰². Liganda CD40 je přítomna ve vázané i v solubilní formě, obě formy jsou stejně biologicky aktivní ve vztahu k receptoru CD40¹⁰³. Solubilní forma je aktivně uvolňována po aktivaci destiček a nebo po stimulaci lymfocytů¹⁰⁴.¹⁰⁵ CD40 receptor je exprimován na B-lymfocytech, makrofázích, endoteliálních buňkách a buňkách hladkého svalstva¹⁰². CD40 ligand pak působí prozánětlivě na endoteliální buňky a napomáhá hemokoagulaci stimulací tvorby tkáňového faktoru na monocytech¹⁰⁶ a na endoteliálních buňkách^{107, 108}. Solubilní ligand CD40 navíc obsahuje sekvenci KGD¹⁰³, která je shodná se sekvencí vazebného místa pro hlavní destičkový integrin α IIb β 3¹⁰⁹. Ligand CD40 se váže na glycoprotein IIb/IIIa a agonisticky působí na destičky ke stabilizaci arteriálního trombu¹¹⁰.

Membránová i solubilní forma má stejné biologické účinky. Vazbou na ateromový plát spouští tvorbu metaloproteináz produkovaných buňkami hladkého svalstva cévní stěny a makrofágy^{111, 106}, zvyšuje tvorbu buněčných adhezních molekul, prozánětlivých cytokinů, chemokinů (IL-1, 3, 4, TNF- α , interferon- γ)¹¹² a tkáňového faktoru^{113, 114}. Po iniciální stimulaci transkripčními faktory (nukleární faktor kappaB a aktivátory transkripčních kináz) nebo prozánětlivými cytokiny a oxidovaným LDL dochází za 6-12 hodin ke zvýšení koncentrace, která trvá na membránovém povrchu 24-72 hodin¹¹⁵. Aktivovaný CD40 vede ke stimulaci signálních cest zahrnujících nukleární faktor kappa-B s následnou up-regulací

prozánětlivých a proaterogenních genů¹¹⁶. Tyto změny vedou k progresi aterosklerózy, nestability plátu a tvorbě intravaskulárního trombu.

Naopak blokádu interakce CD40-CD40L/CD154 podáním protilátek proti CD40L/CD154 u myši s deficitem LDL receptoru nebo ApoE je možné navodit redukcí aterosklerózy a indukovat stabilizaci plátu.¹¹⁷

Zvýšená hladina sCD40L indukuje zvýšené uvolňování monocyty chemoatrahujícího peptidu-1 z mononukleárů a CC-chemokin, které se podílí na patogenezi aterosklerózy¹⁹⁴.

Zvýšená hladina sCD40L u jinak zdravých žen je spojena se zvýšeným rizikem kardiovaskulární příhody¹¹⁸. Z analýzy podskupiny zařazené do studie CAPTURE vychází, že u pacientů, kteří dle protokolu dostali placebo, jsou zvýšené hladiny sCD40L na 5000 pg/ml spojeny s vyšším rizikem smrti nebo nefatálního akutního infarktu myokardu během 6 měsíců (hazard ratio 2,71; 95% CI 1,51-5,35; p=0,001)¹¹⁹.

Hladina sCD40 není ovlivněna podáváním kyseliny acetylsalicylové ani podáváním inhibitorů IIb/IIIa¹⁹⁴.

2. Cíle práce

Základním cílem studie je průkaz zvýšené hladiny tkáňového faktoru a změn inhibitoru tkáňového faktoru, změny hladin solubilní ligandy CD40, tkáňových metaloproteináz a jejich inhibitorů u pacientů s akutním koronárním syndromem (skupina ACS) v porovnání s pacienty se stabilní ischemickou chorobou srdeční (skupina SCAD). Obě skupiny budou léčeny standardním způsobem.

Dílčí cíle:

1. Zjištění systémově detekovatelných projevů změn tkáňového faktoru, inhibitoru tkáňového faktoru, metaloproteinázy 2, 3, 9 a inhibitoru tkáňových metaloproteináz 2, solubilní ligandy CD40 (sICD40), vysoce senzitivního CRP (hsCRP).
2. Sledování kinetiky výše uvedených markerů u pacientů s akutním koronárním syndromem během prvního týdne.
3. Stanovení rozdílu markerů sledovaných dle bodu 1 v odběru z kmene levé věnčité tepny, femorální žíly a koronárního sinu a zjištění rozdílu hladin.

3. Metodika

3.1. Soubor pacientů

Sledovaná sestava pacientů představuje časově omezenou část pacientů hospitalizovaných na I. interní klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové s ischemickou chorobou srdeční. V době realizace studie, byli do sestavy zařazeni všichni nemocní, kteří přicházeli k nemocničnímu ošetření, pokud splňovali daná kritéria. Pacienti byli seznámeni s povahou studie, byl vyplněn informovaný souhlas schválený Etickou komisí Lékařské Fakulty v Hradci Králové.

Soubor pacientů byl rozdělen do dvou skupin, podle typu manifestace ischemické choroby srdeční na pacienty s akutní nebo stabilní formou.

3.2. Kritéria zařazení do studie

Do skupiny s akutním koronárním syndromem byli zařazeni pacienti s anamnézou bolesti na hrudi do 24 hodin od vzniku obtíží a přítomnosti jasných známek infarktu myokardu na EKG nebo pozitivitu troponinu T nebo CK_MB^{120, 121}.

Do skupiny se stabilní ischemickou chorobou srdeční byli zařazeni pacienti podstupující diagnostickou koronarografii z důvodu symptomatické anginy pectoris s nálezem alespoň 50% stenózy na jedné věnčité tepně nebo pacienti po proběhlém akutním infarktu myokardu před více než 6 měsíci, indikovaní k diagnostické koronarografii z jiného důvodu.

Do sledování nebyli zařazeni nemocní, kterým byl podán heparin 4 hodiny před nebo nízkomolekulární heparin 24 hodin před vyšetřením. Byli vyloučeni nemocní, kteří měli závažné limitující onemocnění, které by mohlo samo o sobě ovlivňovat hladiny sledovaných ukazatelů, současně nepřítomnost anamnestického údaje o jakékoliv terapii, která by mohla ovlivnit plazmatické hladiny sledovaných ukazatelů.

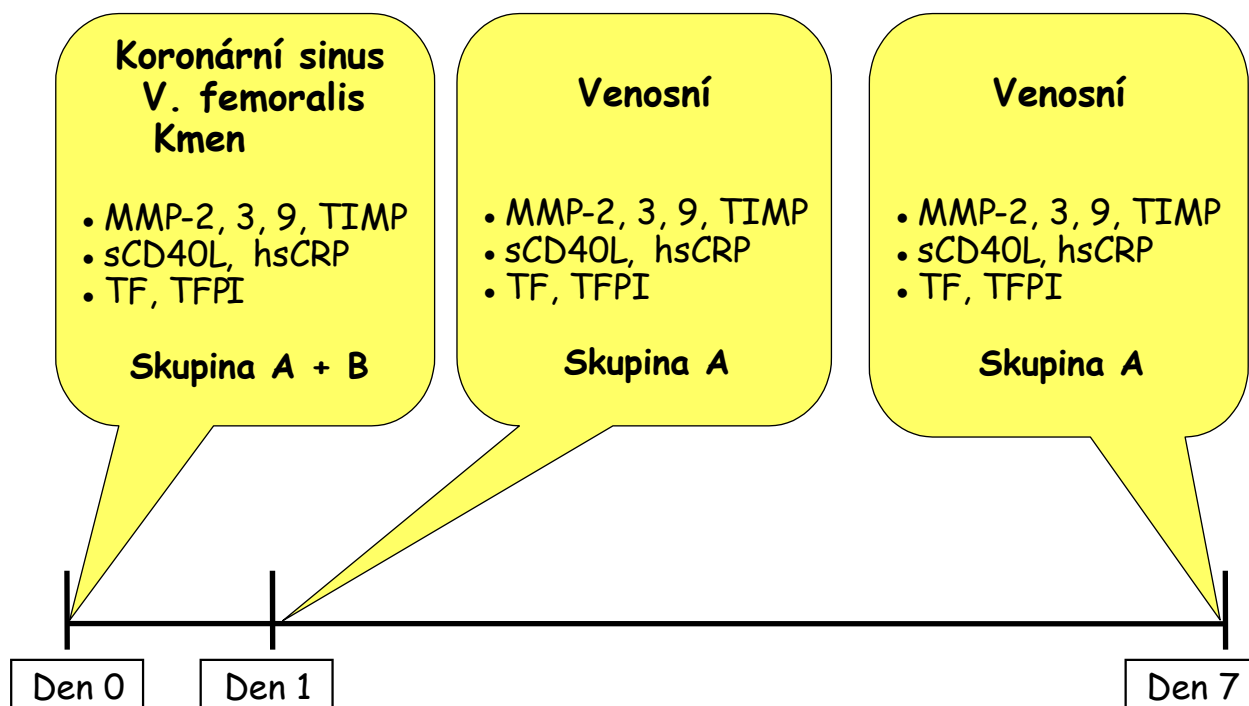
3.3. Postup odběru vzorků a jejich zpracování

Po splnění vstupních kritérií a podpisu informovaného souhlasu se zařazením byla provedena punkce arteria a vena femoralis v rámci rutinní diagnostické koronarografie.

3.3.1. Odběr vzorků

Do kmene levé věnčité tepny byl zaveden diagnostický Judgkinsův katetr, do koronárního sinu byl zaveden upravený diagnostický Amplatzův katetr s bočními otvory 0,5 cm od distálního konce. Během 20 sec byl proveden odběr z kmene levé věnčité tepny, z koronárního sinu a z femorální vény v obou skupinách pacientů.

Ve skupině pacientů s akutním koronárním syndromem byl proveden kontrolní odběr z periferní žíly za 24 hodin a za 7 dní (viz Obrázek 1).



3.3.2. Zpracování vzorků po odběru

Vzorky krve k biochemickému zpracování (MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-2) byly do 30 minut transportovány na Ústav klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové, kde byly centrifugovány rychlostí 3000 otáček/min a poté zamraženy na teplotu $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dávkového zpracování.

Vzorky krve ke zpracování hematologických parametrů (TF, TFPI) byly do 30 minut transportovány na Oddělení klinické hematologie FN Hradec Králové, kde byly centrifugovány rychlostí 6000 otáček/min a zamraženy do doby dávkového zpracování.

Vzorky krve ke zpracování imunologických parametrů (hsCRP, sCD40L) byly do 16 hodin transportovány, po 16 hodině uloženy do teploty $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zpracovány následující den. Zpracované vzorky byly centrifugovány na 3.000 otáček/min a zamraženy na $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dávkového stanovení.

Opakované rozmražení a zamražení vzorků bylo vyloučeno.

3.4. *Metody užití ke stanovení plasmatických hladin*

3.4.1. tkáňový faktor (TF)

Plasmatické koncentrace hladiny tkáňového faktoru byly stanoveny komerčně dostupnými ELISA kity (IMUBIND[®] Tissue Factor ELISA Kit, Product No. 845, fy American diagnostica inc.).

3.4.2. inhibitor tkáňového faktoru (TFPI)

Plasmatické koncentrace hladiny inhibitoru tkáňového faktoru byly stanoveny komerčně dostupnými ELISA kity (IMUBIND[®] Total TFPI Elisa Kit, Product No. 849, fy American diagnostica inc.).

3.4.3. metaloproteináza 2 (MMP-2)

Sérové koncentrace metaloproteinázy 2 byly stanoveny komerčními kity Quantikine[®] Human MMP-2 (total) Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA).

3.4.4. metaloproteináza 3 (MMP-3)

Sérové koncentrace metaloproteinázy 3 byly stanoveny komerčními kity Quantikine[®] Human MMP-3 (total) Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA)

3.4.5. metaloproteináza 9 (MMP-9)

Sérové koncentrace metaloproteinázy 9 byly stanoveny komerčními kity Quantikine[®] Human MMP-9 (total) Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA).

3.4.6. inhibitor tkáňových metaloproteináz 2 (TIMP-2)

Sérové koncentrace inhibitoru tkáňových metaloproteináz 2 byly stanoveny komerčními kity Quantikine[®] Human TIMP-2 (total) Immunoassay (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA).

3.4.7. hsCRP

Sérové koncentrace vysoce senzitivního CRP byly stanoveny chemoluminiscencí pomocí standardního kitu (DPC, USA).

3.4.8. solubilní ligand CD40 (sCD40L)

Sérové koncentrace solubilního ligandu CD40 byly stanoveny pomocí komerčně dostupných ELISA kitů (Quantikine human sCD40 Ligand, R&D Systems, MN, USA).

3.5. *Statistické zpracování výsledků*

Statistické zhodnocení výsledků bylo provedeno statistickým programem SigmaStat v.

3.1 (fy Systat Software Inc. USA)

Bylo otestováno normální rozdělení dat Kolmogorov-Smirnovovým testem.

Testování u normálně rozdělených dat bylo provedeno pomocí t-testu, v případě statistického zhodnocení vývoje hladin byl použit párový t-test nebo test ANOVA pro vícečetné párové porovnávání.

Při nesplnění normálního rozdělení dat byl použit Mann-Whitney znaménkový test pro porovnání dvou skupin, ke statistickému zhodnocení vývoje hladin byl použit Wilcoxonův test.

K analýze korelace byl v případě normálního rozdělení použit Pearsonův korelační koeficient, nebyla-li normalita splněna, byl použit Spearmanův korelační koeficient .

Za statisticky významné byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

4. Výsledky

4.1. Demografické složení a klinická charakteristika souboru.

Skupina pacientů s akutním koronárním syndromem (ACS) zahrnovala 29 pacientů, z toho 20 mužů (69%) a 9 (31%) žen. Průměrný věk skupiny byl 64 ± 11 let. Všichni pacienti byli hospitalizováni pro akutní koronární syndrom (STEMI, non-STEMI/NAP dle diagnostických kritérií Evropské kardiologické společnosti^{120, 121}). Výskyt rizikových faktorů – pozitivní rodinná anamnéza 4 pacienti (14%), BMI>25 22 pacientů (76%), arteriální hypertenze 18 pacientů (62%), hyperlipidémie 19 pacientů (66%), diabetes mellitus 10 pacientů (34%), kouření 2 pacienti (7%). Anamnézu dokumentované ischemické choroby srdeční v předchorobí mělo 10 pacientů (34%).

Skupina pacientů se stabilními formami anginy pectoris (SCAD) zahrnovala 24 pacientů, z toho 21 mužů (88%) a 3 ženy (12%). Průměrný věk skupiny byl 62 ± 8 let. Výskyt rizikových faktorů – pozitivní rodinná anamnéza 6 pacientů (25%), BMI>25 22 pacientů (92%), arteriální hypertenze 16 pacientů (67%), hyperlipidémie 23 pacientů (96%), diabetes mellitus 10 pacientů (42%), kouření 6 pacientů (25%). 13 pacientů (54%) mělo v anamnéze prodělaný AIM.

Skupina pacientů s akutním koronárním syndromem měla echokardiograficky stanovenou ejekční frakci levé komory 51 ± 10 %, skupina pacientů se stabilní ischemickou chorobou srdeční měla ejekční frakci 52 ± 15 %.

Farmakologicky byly obě skupiny léčeny v době zařazení kyselinou acetylsalicylovou – 26 pacientů (90%) ve skupině akutní a 24 pacientů (100%) ve skupině stabilní, thienopyridiny – 8 pacientů (28%) resp. 7 pacientů (29%), β -blokátory – 21 pacientů (72%) resp. 24 pacientů

(100%), ACEI/ATII blokátory - 11 pacientů (38%) resp. 20 pacientů (83%), statiny - 10 pacientů (34%) resp. 22 pacientů (92%).

Charakteristika souboru viz Tabulka 2.

Tabulka 2: Demografická a klinická charakteristika souboru pacientů

	<i>Akutní koronární syndrom (ACS)</i>		<i>Stabilní ICHS (SCAD)</i>	
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Celkem	29		24	
- muži	20	69	21	88
- ženy	9	31	3	12
Prům. věk (\pm SD)	64 (\pm 11)		62 (\pm 8)	
Rizikové faktory				
- pozit. RA	4	14	6	25
- BMI > 25	22	76	22	92
- art. hypertenze	18	62	16	67
- hyperlipidémie	19	66	23	96
- diabetes mellitus	10	34	10	42
z toho insulin	2	7	2	8
- kouření	2	7	6	25
Anam. ICHS	10	34	13	54
Akutní koron.sy				
- STEMI	9	31		
- NSTEMI/NAP	16	55	NA	NA
- subak. Q-IM	4	14		
EF (\pm SD)	51 (\pm 10)		52 (\pm 15)	
Medikace:				
- ASA	26	90	24	100
- thienopyridiny	8	28	7	29
- β -blokátory	21	72	24	100
- ACEI/ATII.bl.	11	38	20	83
- Ca-blokátory	6	21	5	21
- diuretika	8	28	16	67
- statiny	10	34	22	92

4.2. Výsledky

4.2.1. Tkáňový faktor

Plasmatické hladiny TF byly signifikantně vyšší u pacientů s akutním koronárním syndromem než u pacientů se stabilní ICHS ($239,0 \pm 99,3$ pg/ml vs $164,3 \pm 114,2$ pg/ml; $p=0,016$). Mezi CS, venosní krvi a kmenem LCA nebyl signifikantní rozdíl v hladinách plasmatického TF. Plasmatické hladiny TF měly sedmý den statisticky nesignifikantní trend k poklesu ($239,0 \pm 99,3$ pg/ml vs $224,4 \pm 109,8$ pg/ml).

Hodnoty hladin TF jsou uvedeny v tabulce 3.

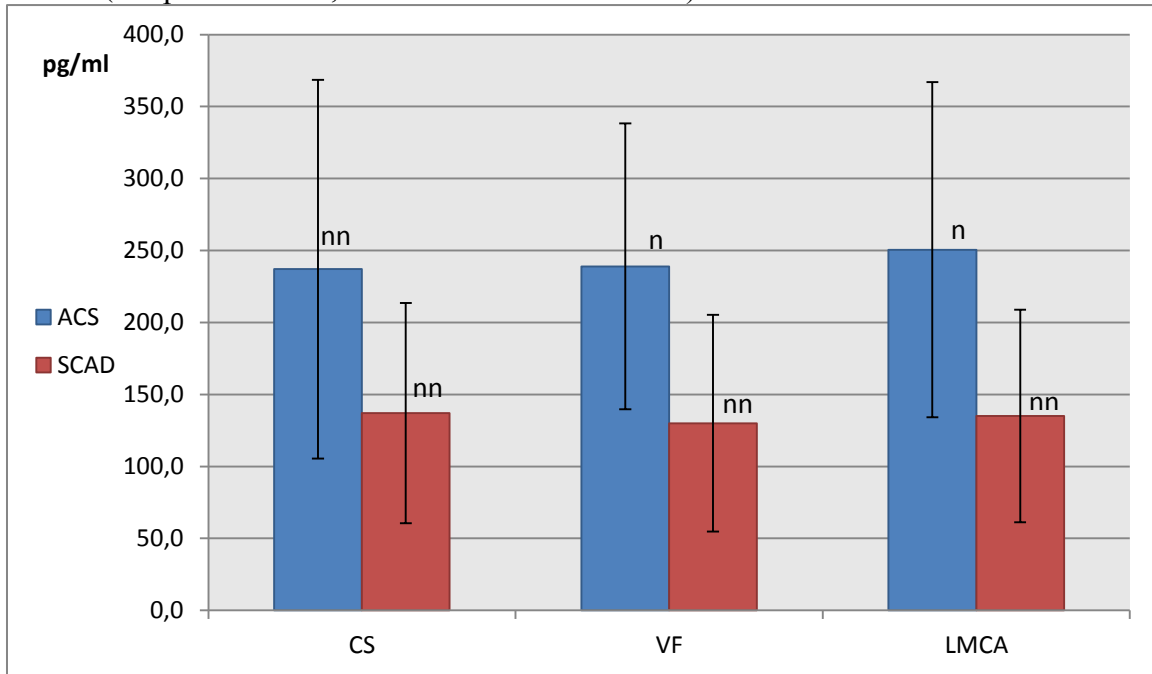
Tabulka 3: Výsledky stanovení hladiny tkáňového faktoru

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny, 1D = odběr za 24 hodin, 7D = odběr za 7 dní, n = normální rozdělení, nn = nenormální rozdělení

		N	Průměr [pg/ml]	SD	Median [pg/ml]	1. percentil	3. percentil	Rozdělení
ACS	CS	29	253,8	131,51	237,4	172,25	288,55	nn
	VF	29	239,0	99,33	235,9	171,05	301,55	n
	LMCA	29	250,6	116,42	244,7	176,65	284,5	n
	1D	29	251,5	176,20	199,4	116,55	340,85	nn
	7D	29	224,4	109,83	210,2	126,4	297,9	n
SCAD	CS	24	193,1	176,70	137,9	76,5	232,9	nn
	VF	24	164,3	114,21	130,5	75,35	245,5	nn
	LMCA	24	153,4	104,20	136,0	73,9	223,95	nn

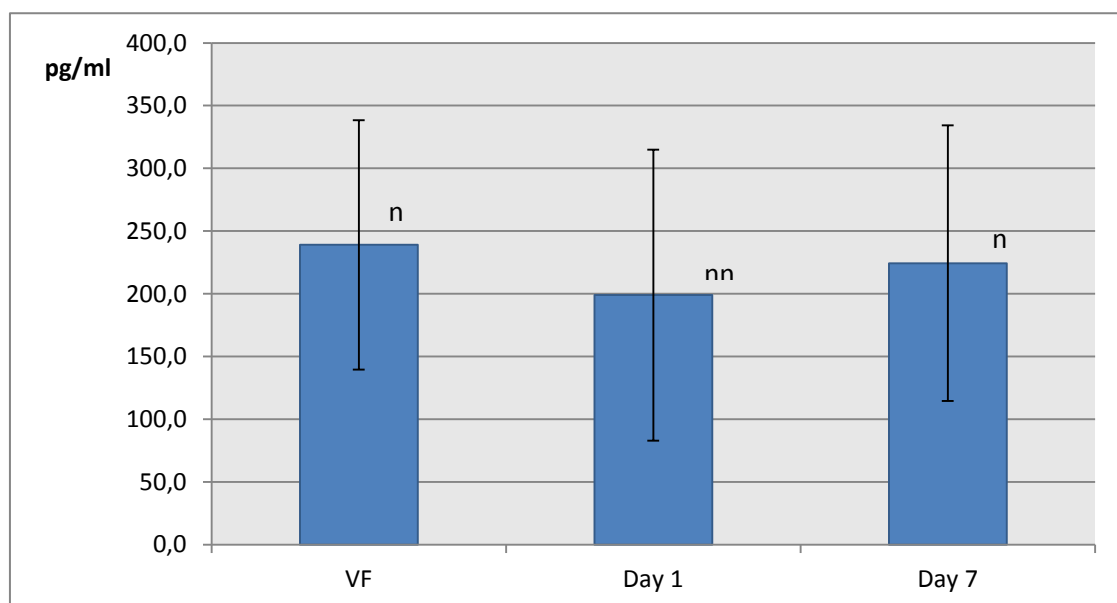
Graf č. 1: Porovnání hladin tkáňového faktoru u pacientů s akutní (n=29) a chronickou (n=24) ICHS

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny
(n= průměr ± SD, nn = median ±1 a 3 kvartil)



Graf č. 2: Vývoj hladin tkáňového faktoru u pacientů s akutním koronárním syndromem

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, VF = femorální žíla (n= průměr ± SD, nn = ±1 a 3 kvartil)



4.2.2. Inhibitor tkáňového faktoru

Plasmatické hladiny inhibitoru tkáňového faktoru se statisticky významně nelišily mezi koronárním sinem, žilní krví a kmenem levé koronární tepny v obou skupinách. Nebyl zjištěn rozdíl mezi skupinou s akutní a s chronickou ischemickou chorobou srdeční. Ve skupině s akutním koronárním syndromem nebyl statisticky významný rozdíl ve vývoji hladiny za 24 hodin a 7 den.

Plasmatické hladiny TFPI jsou uvedeny v tabulce 4.

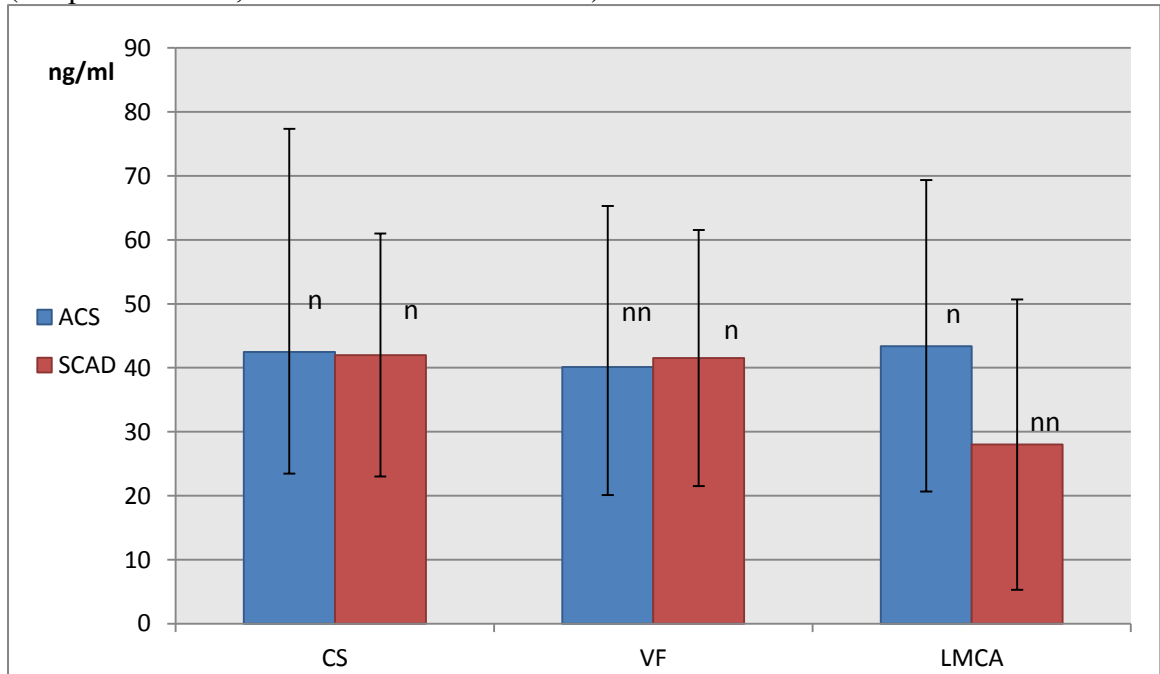
Tabulka 4: Výsledky stanovení hladiny inhibitoru tkáňového faktoru

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny, 1D = odběr za 24 hodin, 7D = odběr za 7 dní, n = normální rozdělení, nn = nenormální rozdělení

		N	Průměr [ng/ml]	SD	Median [ng/ml]	1. percentil	3. percentil	Rozdělení
ACS	CS	29	42,5	34,95	36,5	26,35	46,875	n
	VF	29	45,4	35,95	40,1	25,275	46,525	nn
	LMCA	29	43,4	26,04	38,6	29,725	52,5	n
	1D	29	41,9	26,51	35,0	25,925	52,95	nn
	7D	29	36,5	15,07	33,8	26,95	42,95	n
SCAD	CS	24	42,0	60,13	30,3	19,25	38,7	n
	VF	24	41,5	60,37	27,2	20,9	38,9	n
	LMCA	24	42,5	60,56	28,0	22,75	39,7	nn

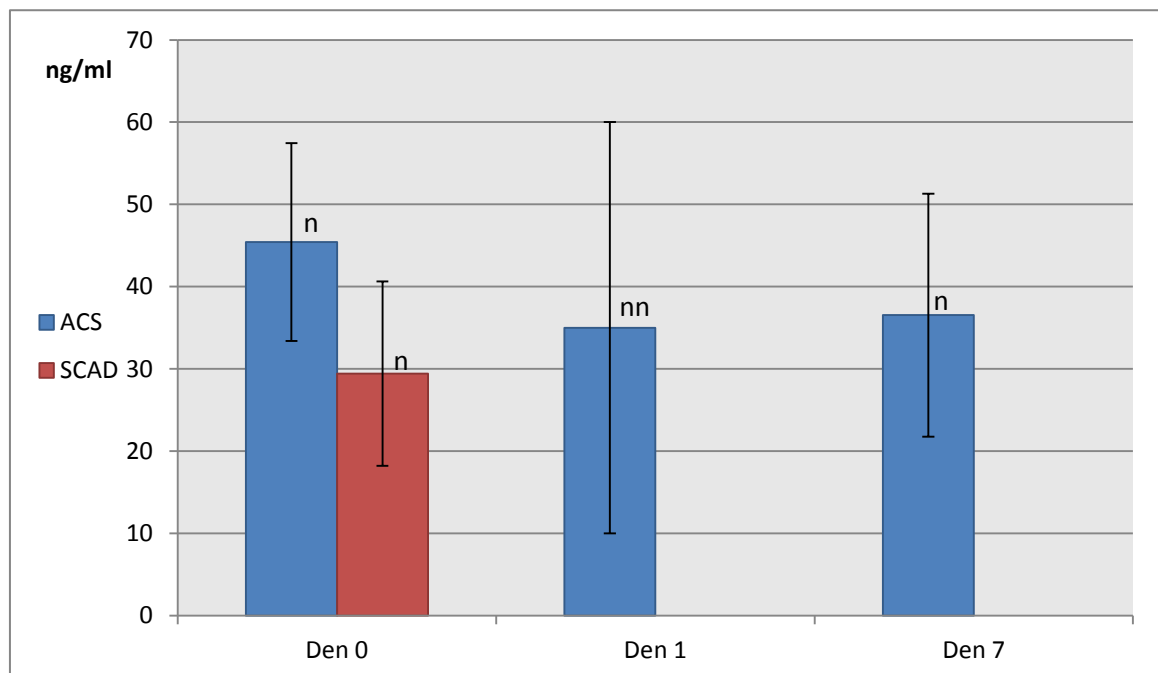
Graf č. 3: Porovnání hladin inhibitoru tkáňového faktoru u pacientů s akutní (n=29) a chronickou (n=24) ICHS

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny
(n = průměr ± SD, nn = median ±1 a 3 kvartil)



Graf č. 4: Vývoj hladin inhibitoru tkáňového faktoru u pacientů s akutním koronárním syndromem

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny
(n= průměr ± SD, nn = median ±1 a 3 kvartil)



4.2.3. Metaloproteináza 2

Sérové hladiny metaloproteinázy 2 se statisticky významně nelišily mezi koronárním sinem, žilní krví a kmenem levé koronární tepny v obou skupinách. Nebyl pozorován rozdíl v hladinách vstupně, za 24 hodin a za 7 dní. Nebyl zjištěn rozdíl mezi skupinou akutní a s chronickou ischemickou chorobou srdeční.

Sérové hladiny MMP-2 jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Výsledky stanovení hladin metaloproteinázy 2

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny, 1D = odběr za 24 hodin, 7D = odběr za 7 dní, n = normální rozdělení, nn = nenormální rozdělení

		N	Průměr [μg/ml]	SD	Median [μg/ml]	1. percentil	3. percentil	Rozdělení
ACS	CS	29	162,3	55,80	162,9	135,13	185,25	n
	VF	29	161,0	48,25	153	132,05	176,25	n
	LMCA	29	156,4	49,61	150,3	129,33	179,35	n
	1D	29	146,1	46,55	142,1	121,30	178,75	n
	7D	29	158,3	74,25	174	136,28	205,75	nn
SCAD	CS	24	176,8	65,85	167,75	138,00	198,75	n
	VF	24	175,8	66,43	162,25	136,00	191,50	nn
	LMCA	24	178,3	62,50	164	142,25	203,25	n

4.2.4. Metaloproteináza 3

Sérové hladiny metaloproteinázy 3 se statisticky významně nelišily mezi koronárním sinem, žilní krví a kmenem levé koronární tepny v obou skupinách. Nebyl pozorován rozdíl v hladinách vstupně, za 24 hodin a za 7 dní. Nebyl zjištěn rozdíl mezi skupinou s akutní a s chronickou ischemickou chorobou srdeční.

Sérové hladiny MMP-3 jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Výsledky stanovení hladin metaloproteinázy 3

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny, 1D = odběr za 24 hodin, 7D = odběr za 7 dní, n = normální rozdělení, nn = nenormální rozdělení

		N	Průměr [μg/ml]	SD	Median [μg/ml]	1. percentil	3. percentil	Rozdělení
ACS	CS	29	13,8	9,57	12,355	6,75	15,65	nn
	VF	29	14,4	9,58	12,4	6,66	16,80	nn
	LMCA	29	13,6	8,68	12,1	7,22	16,03	nn
	1D	29	10,7	6,87	9,88	5,78	12,75	nn
	7D	29	14,4	10,20	13,3	8,23	20,27	n
SCAD	CS	24	11,3	4,48	10,55	8,10	14,40	n
	VF	24	11,1	4,43	10	7,65	14,50	n
	LMCA	24	11,1	4,90	9,3	7,05	15,42	nn

4.2.5. Metaloproteináza 9

Plasmatické hladiny MMP-9 byly signifikantně vyšší u pacientů s akutním koronárním syndromem než u pacientů se stabilní ICHS (815,5+451,8 mg/l vs 504,8+245,7 mg/l; p=0,004). Mezi CS, venosní krvi a kmenem LCA nebyl singnifikantní rozdíl v hladinách MMP-9.

Ve skupině pacientů s akutním koronárním syndromem se hladiny metaloproteinázy 9 statisticky nelišily v provnání vstupně, za 24 hodin a 7 dní.

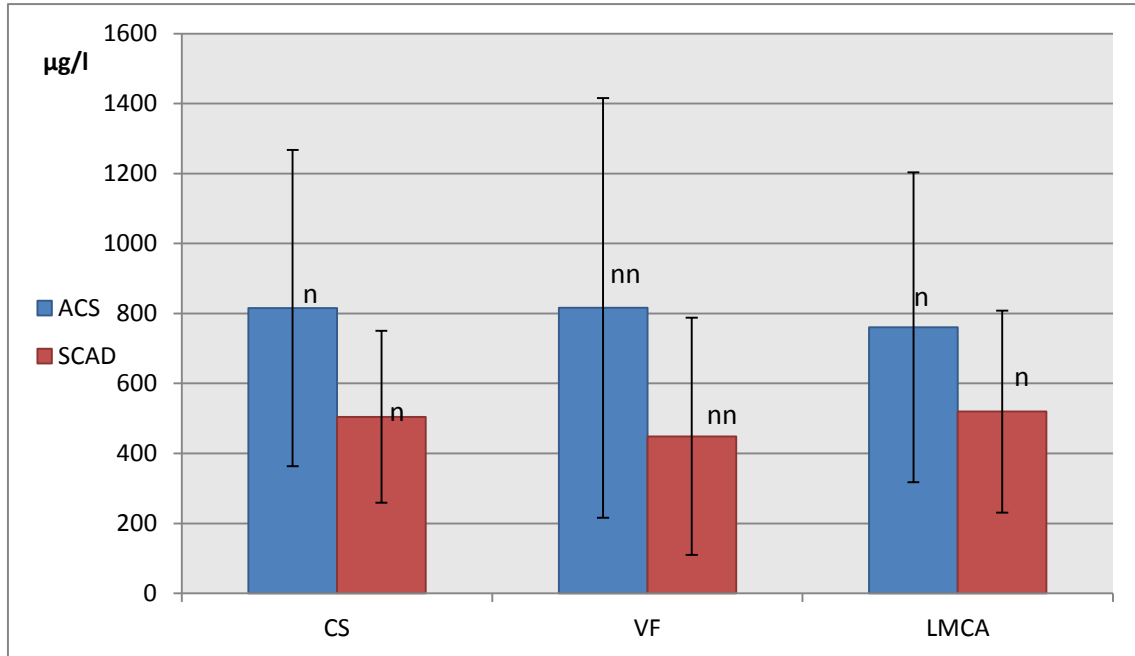
Tabulka 7: Výsledky stanovení hladin metaloproteinázy 9

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny, 1D = odběr za 24 hodin, 7D = odběr za 7 dní, n = normální rozdělení, nn = nenormální rozdělení

		N	Průměr [μg/ml]	SD	Median [μg/ml]	1. percentil	3. percentil	Rozdělení
ACS	CS	29	815,5	451,76	750,95	576,00	1045,00	n
	VF	29	842,4	453,15	816	601,75	1090,50	nn
	LMCA	29	760,5	442,78	770	417,00	987,00	n
	1D	29	761,5	429,11	716	388,50	1104,58	n
	7D	29	747,1	524,22	653,6	410,75	1065,00	n
SCAD	CS	24	504,8	245,72	483,5	331,50	603,00	n
	VF	24	571,8	304,32	449,5	339,50	701,00	nn
	LMCA	24	519,5	288,62	444	319,00	699,00	n

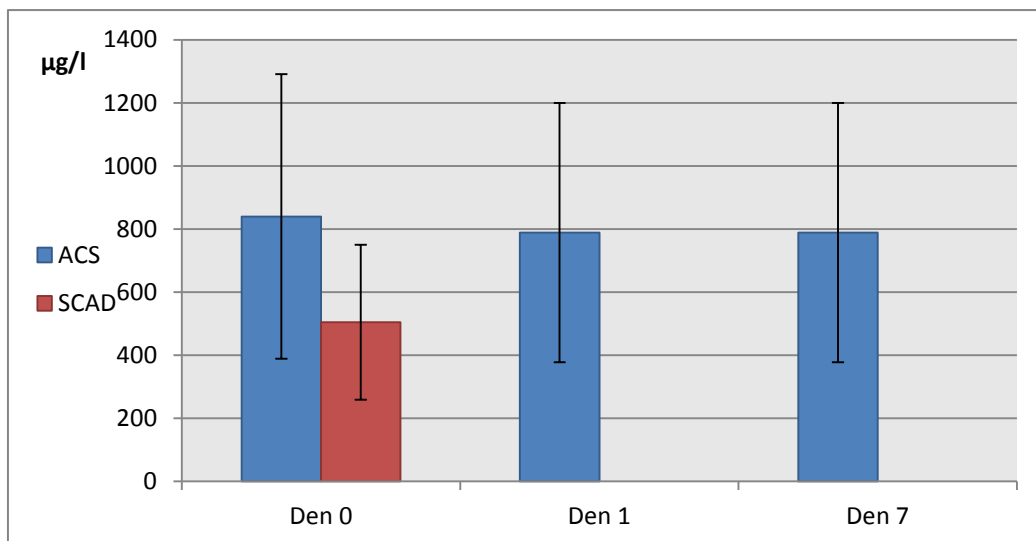
Graf č. 5: Vývoj hladin metaloproteinázy-9 u pacientů s akutní (n=29) a chronickou (n=24) ICHS

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny
 (* normální rozdělení - průměr ± SD, ** nenormální rozdělení - median ±1 a 3 kvartil)



Graf č. 6: Vývoj hladin metaloproteinázy 9 u pacientů s akutním koronárním syndromem

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční
 (hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SD)



4.2.6. Inhibitor tkáňových metaloproteináz-2

Hladiny inhibitoru tkáňových metaloproteináz (TIMP-2) se statisticky nelišily u pacientů s akutním koronárním syndromem od pacientů se stabilní ICHS. Mezi CS, venosní krví a kmenem LCA nebyl singnifikantní rozdíl v hladinách TIMP-2.

U pacientů s akutním koronárním syndromem došlo ke statisticky signifikantnímu poklesu hladin TIMP-2 za 24 hodin ($82,0 \pm 15,8$ vs. $74,4 \pm 12,8$; $p=0,23$), která se upravila sedmý den ($74,4 \pm 12,8$ vs. $90,9 \pm 19,8$; $p<0,001$). Hladiny TIMP-2 vstupně a sedmý den nebyly statisticky významně rozdílné.

Sérové hladiny TIMP-2 jsou uvedeny v tabulce 8.

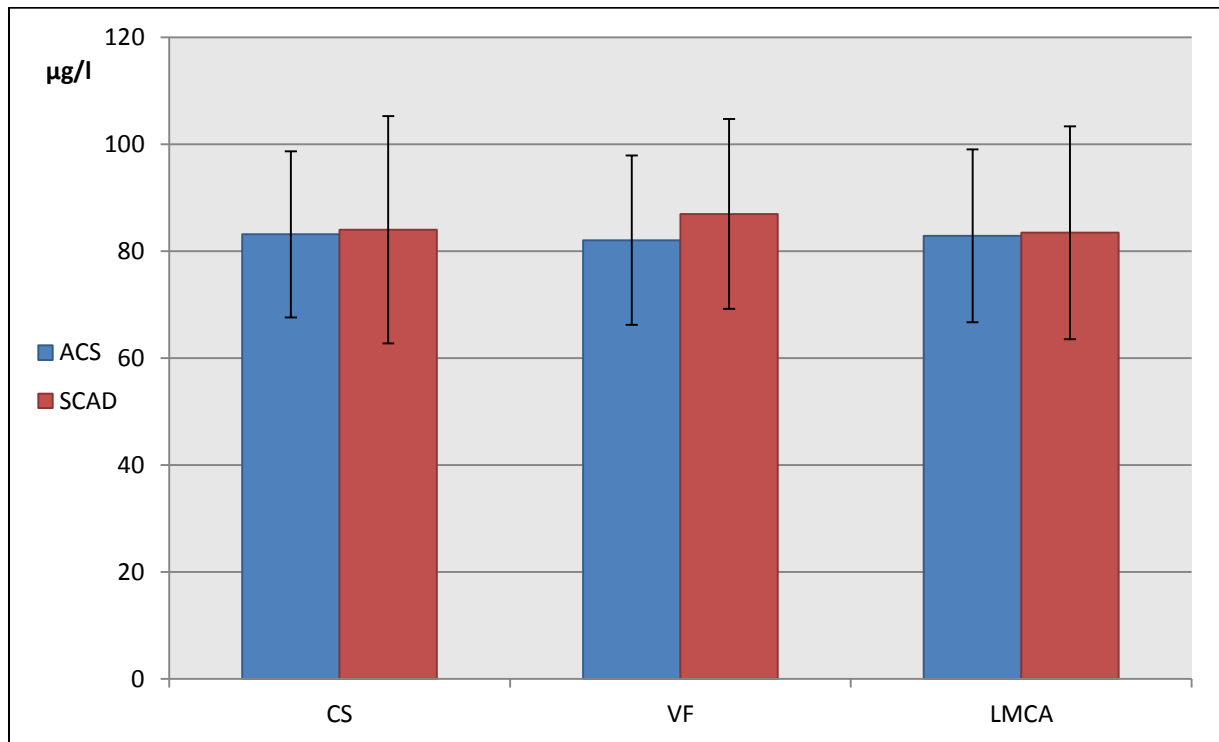
Tabulka 8: Výsledky stanovení hladin inhibitoru tkáňových metaloproteináz – 2

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny, 1D = odběr za 24 hodin, 7D = odběr za 7 dní, n = normální rozdělení, nn = nenormální rozdělení

		N	Průměr [$\mu\text{g/ml}$]	SD	Median [$\mu\text{g/ml}$]	1. percentil	3. percentil	Rozdělení
ACS	CS	29	83,1	15,52	80,05	73,00	89,25	n
	VF	29	82,0	15,83	82,3	72,18	88,05	n
	LMCA	29	82,9	16,13	78,4	72,40	90,15	n
	1D	29	74,4	12,80	72,95	66,35	85,75	n
	7D	29	90,9	19,85	85,4	77,70	106,55	nn
SCAD	CS	24	84,0	21,25	83,35	68,90	94,80	n
	VF	24	87,0	17,76	81,65	75,20	93,40	n
	LMCA	24	83,4	19,90	80,95	68,75	95,60	n

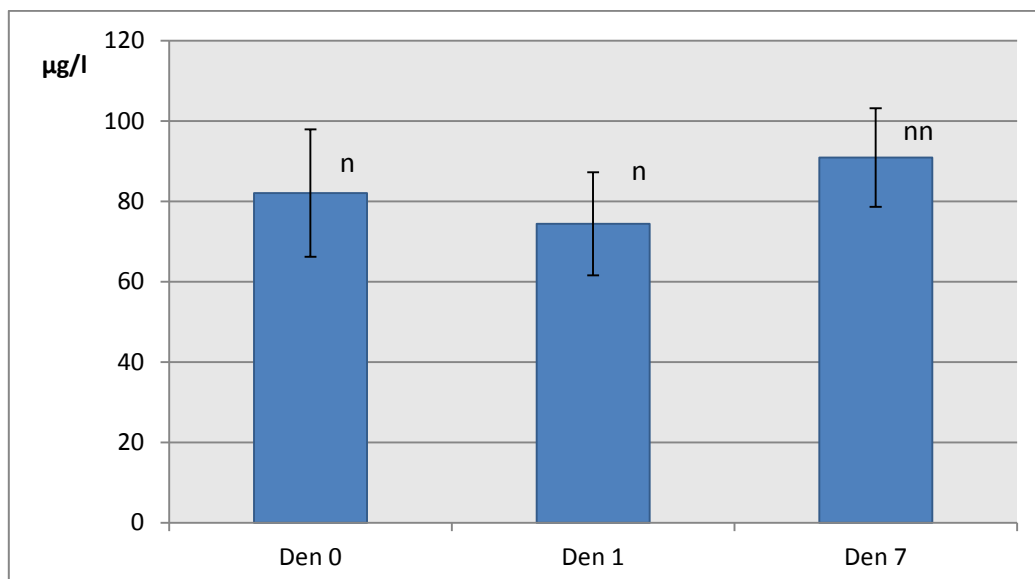
Graf č. 7: Vývoj hladin inhibitoru tkáňové metaloproteinázy-2 u pacientů s akutní (n=29) a chronickou (n=24) ICHS

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny (hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SD)



Graf č. 8: Vývoj hladin inhibitoru tkáňových metaloproteináz-2 u pacientů s akutním koronárním syndromem

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční (n = průměr ± SD, nn = ±1 a 3 kvartil)



4.2.7. Vysoce senzitivní CRP

Hladiny vysoce senzitivního CRP (hsCRP) byly signifikantně zvýšeny ve skupině akutní proti stabilní ICHS (14.7+20.9 ng/ml vs 3.99+7.05 ng/ml; p=0.013) s trendem nesignifikantního vzestupu první (20.9+26.6 ng/ml) a sedmý den (24.4+42.7 ng/ml).

Hladiny hsCRP se statisticky nelišily mezi koronárním sinem, femorální žílou a kmenem levé věnčité tepny.

Sérové hladiny hsCRP jsou uvedeny v tabulce 9.

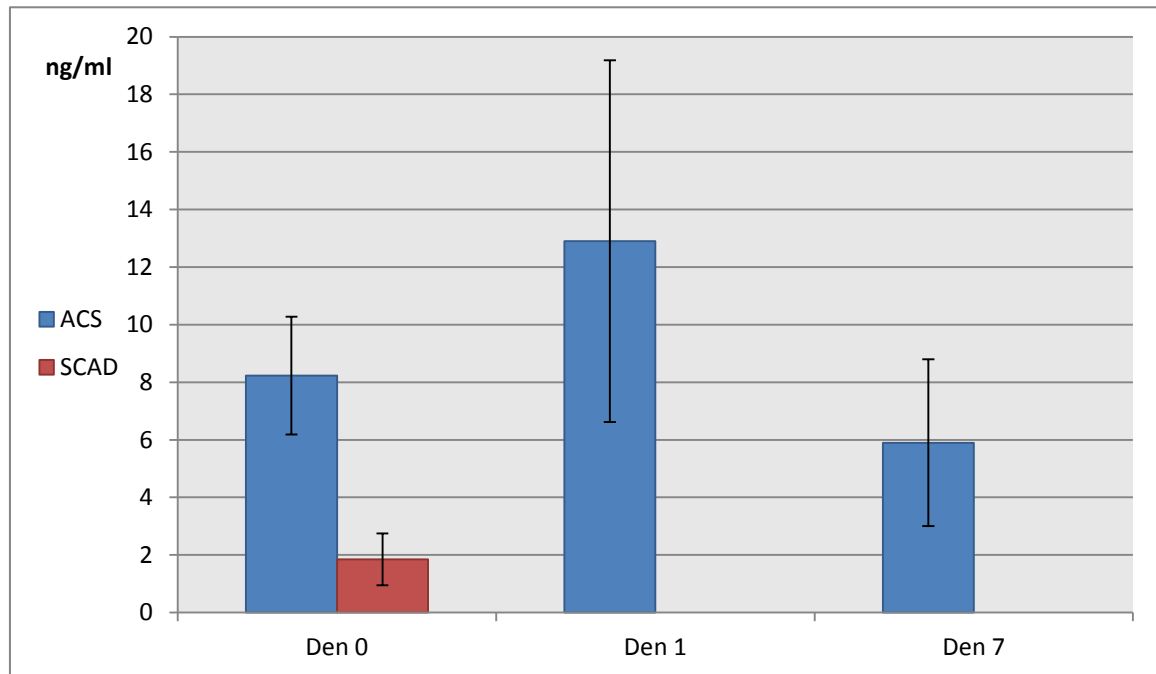
Tabulka 9: Výsledky stanovení hladin vysoce senzitivního CRP

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny, 1D = odběr za 24 hodin, 7D = odběr za 7 dní, n = normální rozdělení, nn = nenormální rozdělení

		N	Průměr [ng/ml]	SD	Median [ng/ml]	1. percentil	3. percentil	Rozdělení
ACS	CS	29	12,0	13,49	8,23	2,05	15,40	nn
	VF	29	14,7	20,90	9,5	2,33	14,15	nn
	LMCA	29	15,0	20,24	9,8	2,38	17,10	nn
	1D	29	20,2	26,40	12,9	6,28	20,85	nn
	7D	29	21,1	40,48	5,9	2,90	17,63	nn
SCAD	CS	24	3,8	6,88	1,85	0,90	3,10	nn
	VF	24	4,0	7,06	1,8	0,90	3,75	nn
	LMCA	24	3,6	5,61	1,85	0,80	3,70	nn

Graf č. 9: Vývoj hladin hsCRP u pacientů s akutní (n=29) a chronickou (n=24) ICHS

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny
(hodnoty udávají median \pm 1 a 3 kvartil)



4.2.8. Solubilní ligand CD40

Plasmatické hladiny solubilního ligandu CD40 (sCD40L) v koronárním sinu byly u nemocných s akutním koronárním syndromem významně vyšší než u nemocných ve skupině se stabilní ICHS ($9070,5 \pm 4539,3$ pg/ml vs $6841,4 \pm 3283,8$ pg/ml; $p=0,026$).

Hladiny sCD40L měly ve skupině akutního koronárního syndromu trend k nesignifikantnímu vzestupu sedmý den ($9679,6 \pm 4195,0$ pg/ml v.s. $11254,1 \pm 6528$ pg/ml).

Mezi koronárním sinem, femorální žílou a kmenem LCA nebyl singnifikantní rozdíl v hladinách sCD40L.

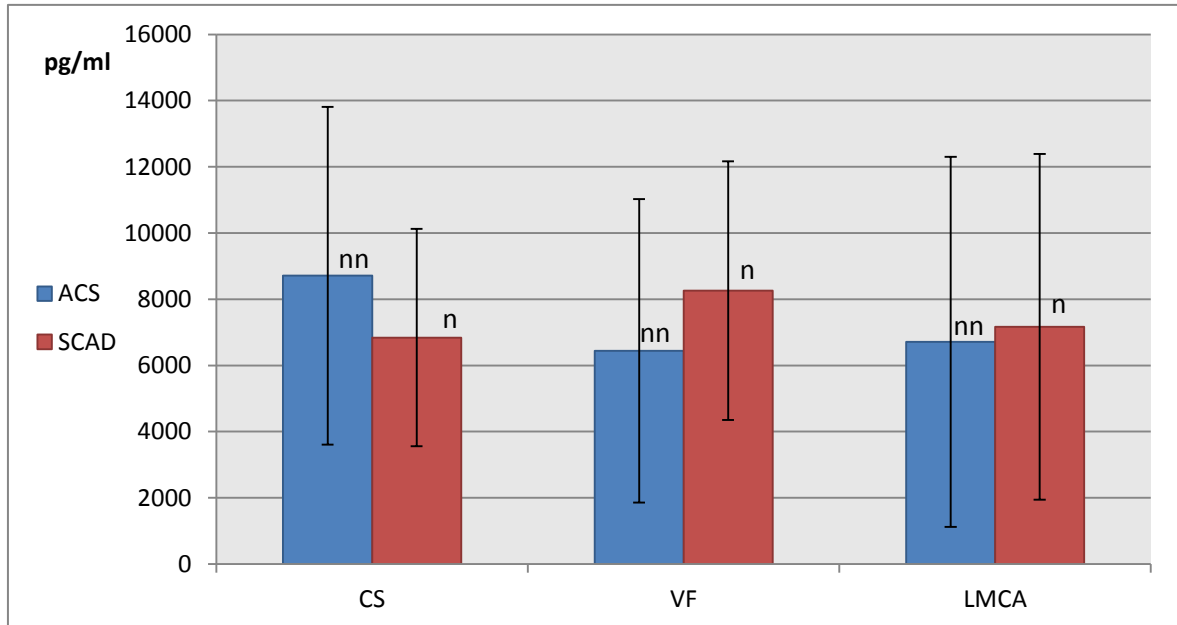
Tabulka 10: Výsledky stanovení hladin solubilního ligandu CD40

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny, 1D = odběr za 24 hodin, 7D = odběr za 7 dní, n = normální rozdělení, nn = nenormální rozdělení

		N	Průměr [pg/ml]	SD	Median [pg/ml]	1. percentil	3. percentil	Rozdělení
ACS	CS	29	8908	4539,3	8712	5101,0	12250,0	nn
	VF	29	8217	4080,0	6440	4583,8	11125,0	nn
	LMCA	29	8519	3966,9	6713	5591,3	11275,0	nn
	1D	29	9071	5258,1	7442	5263,0	9834,3	nn
	7D	29	11203	6528,2	9968	5545,5	15850,0	n
SCAD	CS	24	6841	3283,8	7546	4155,0	8943,5	n
	VF	24	8262	3908,4	7856	5300,3	9878,0	n
	LMCA	24	8348	4357,4	7164	5220,5	11005,0	nn

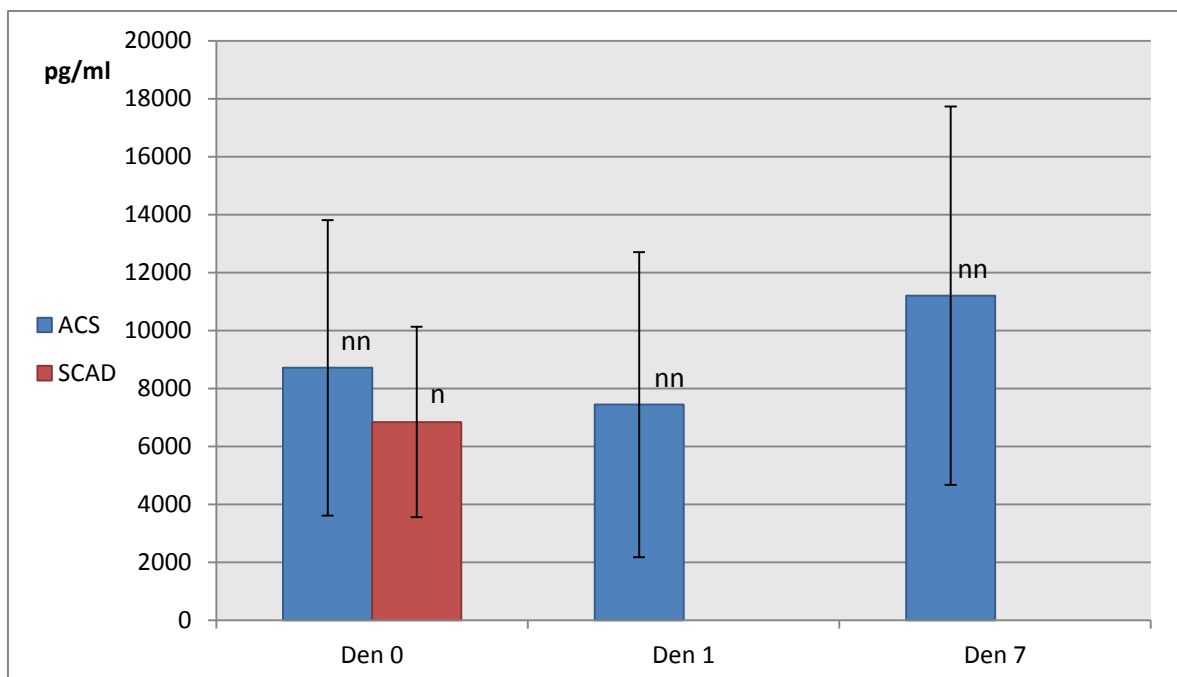
Graf č. 10: Vývoj hladin solubilního ligandu CD40 u pacientů s akutní (n=29) a chronickou (n=24) ICHS

ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny
(n= průměr ± SD, nn = median ±1 a 3 kvartil)



Graf č. 11: Vývoj hladin solubilního ligandu CD40 u pacientů s akutním koronárním syndromem

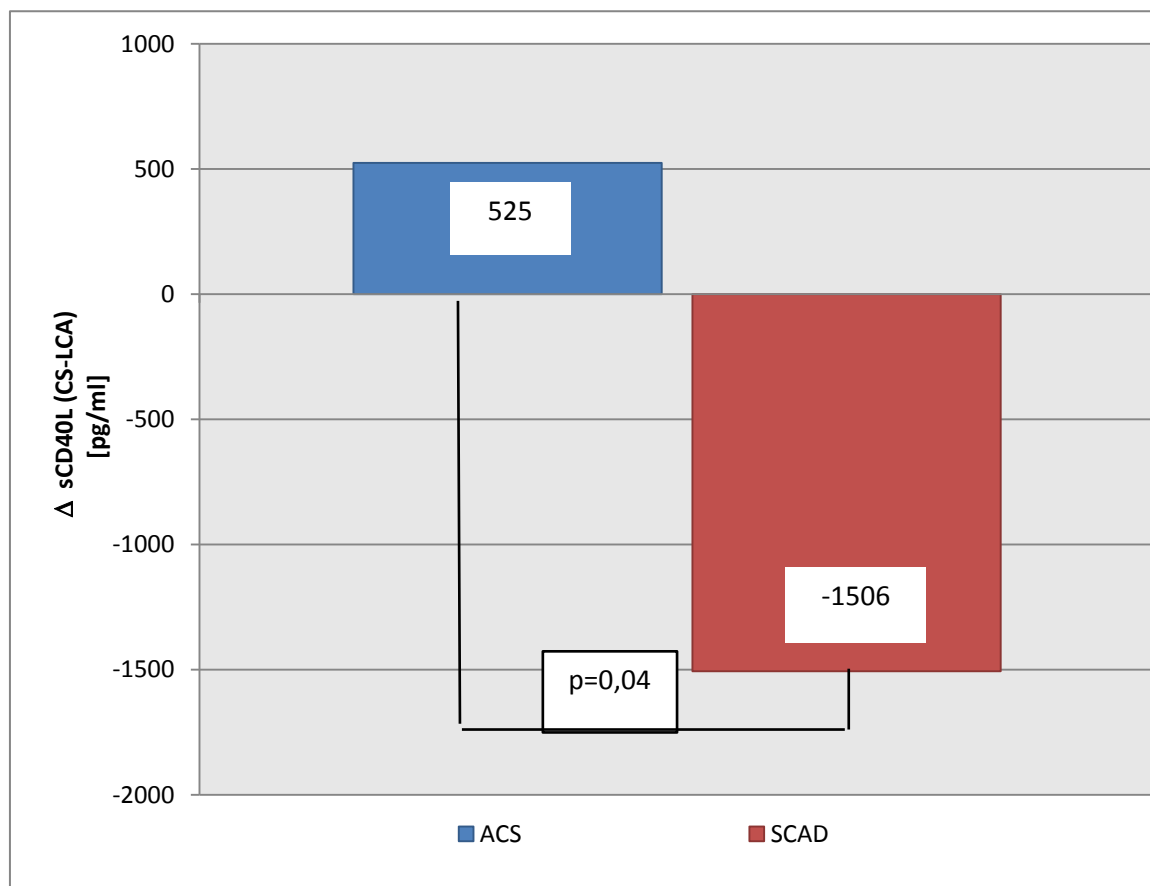
ACS = akutní koronární syndrom, SCAD = stabilní ischemická choroba srdeční, CS = koronární sinus, VF = femorální žíla, LMCA = kmen levé věnčité tepny
(n= norm. rozdělení - průměr ± SD, nn= nenorm. rozdělení median ±1 a 3 kvartil)



Transkoronární gradient sCD40L ve skupině ACS a SCAD

Transkoronární gradient – rozdíl hladin sCD40L mezi CS a kmenem levé věnčité tepny byl signifikantně vyšší u pacientů s akutním koronárním syndromem ($p=0,041$).

Graf č. 12: Transkoronární gradient hladin solubilního ligandu CD40 mezi koronárním sinem a kmenem levé věnčité tepny



4.2.9. Korelační výsledky

Korelace TF a TFPI

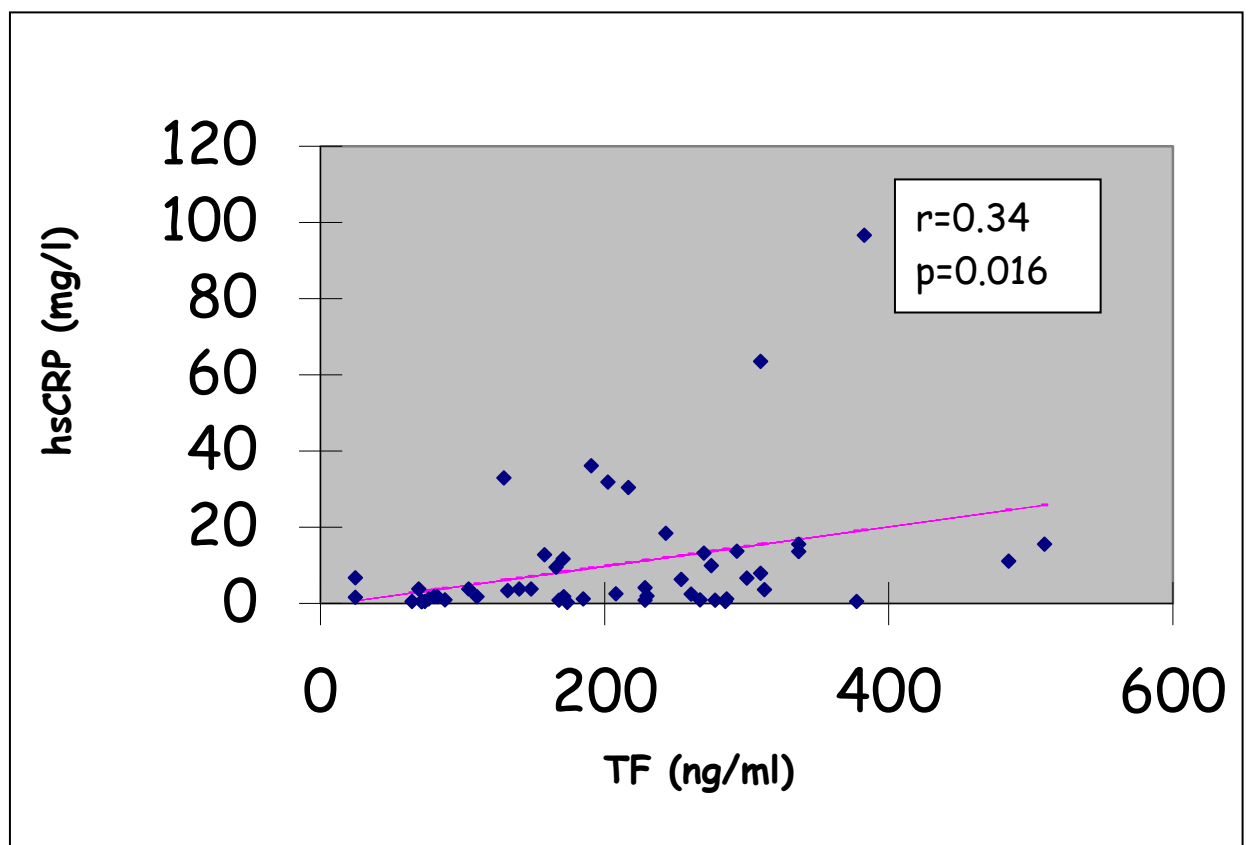
Korelační analýzou nebyla prokázána statisticky významná korelace mezi hodnotami tkáňového faktoru a inhibitoru tkáňového faktoru v obou skupinách.

Korelace TF a hsCRP

Mezi hladinami tkáňového faktoru a hladinou vysoce senzitivního CRP byla nalezena středně silná pozitivní korelace ($r=0,34$; $p=0,016$).

Graf č. 13: Korelace hladin tkáňového faktoru a vysoce senzitivního CRP u pacientů s akutním koronárním syndromem

hsCRP= vysoce senzitivní C-reaktivní protein, TF = tkáňový faktor

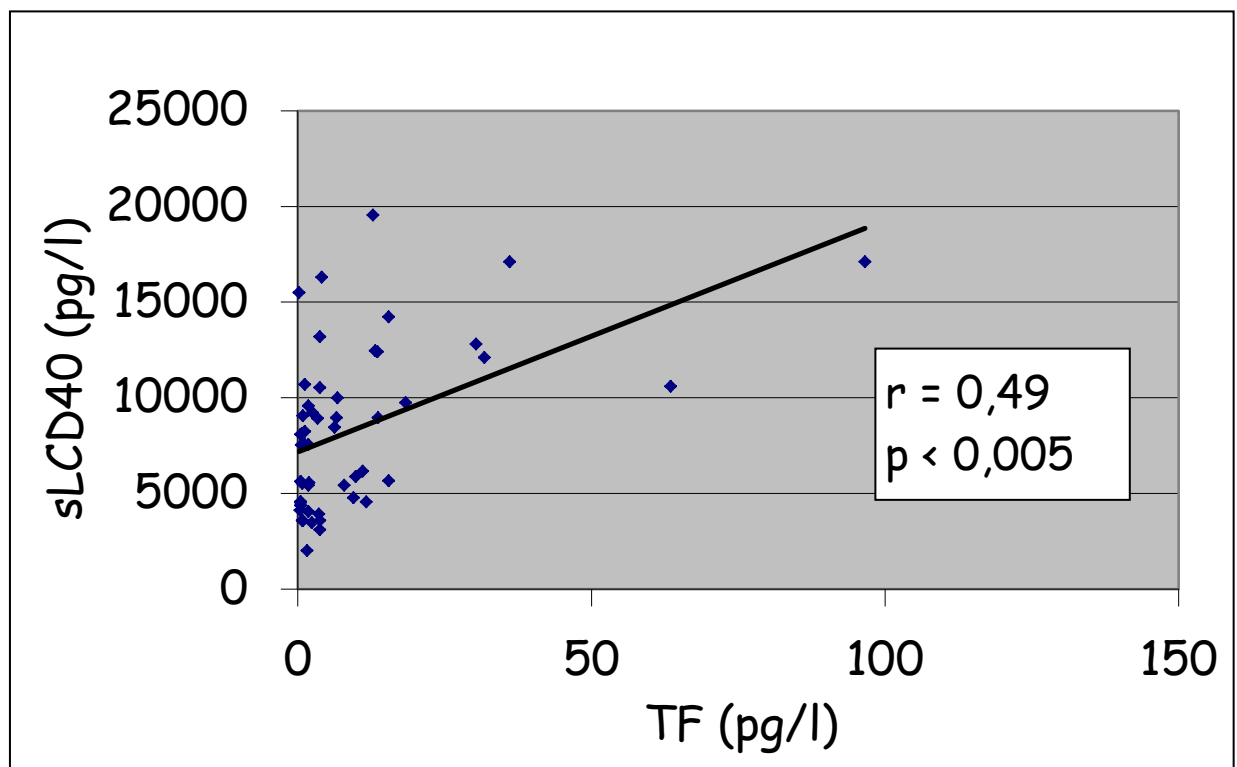


Korelace TF a sCD40L

Mezi hladinami tkáňového faktoru a hladinou solubilního ligandu CD40 byla nalezena středně silná pozitivní korelace ($r=0,49$; $p<0,005$).

Graf č. 14: Korelace hladin tkáňového faktoru a solubilní ligandy CD40 u pacientů s akutním koronárním syndromem

sLCD40= solubilní ligand CD40, TF = tkáňový faktor

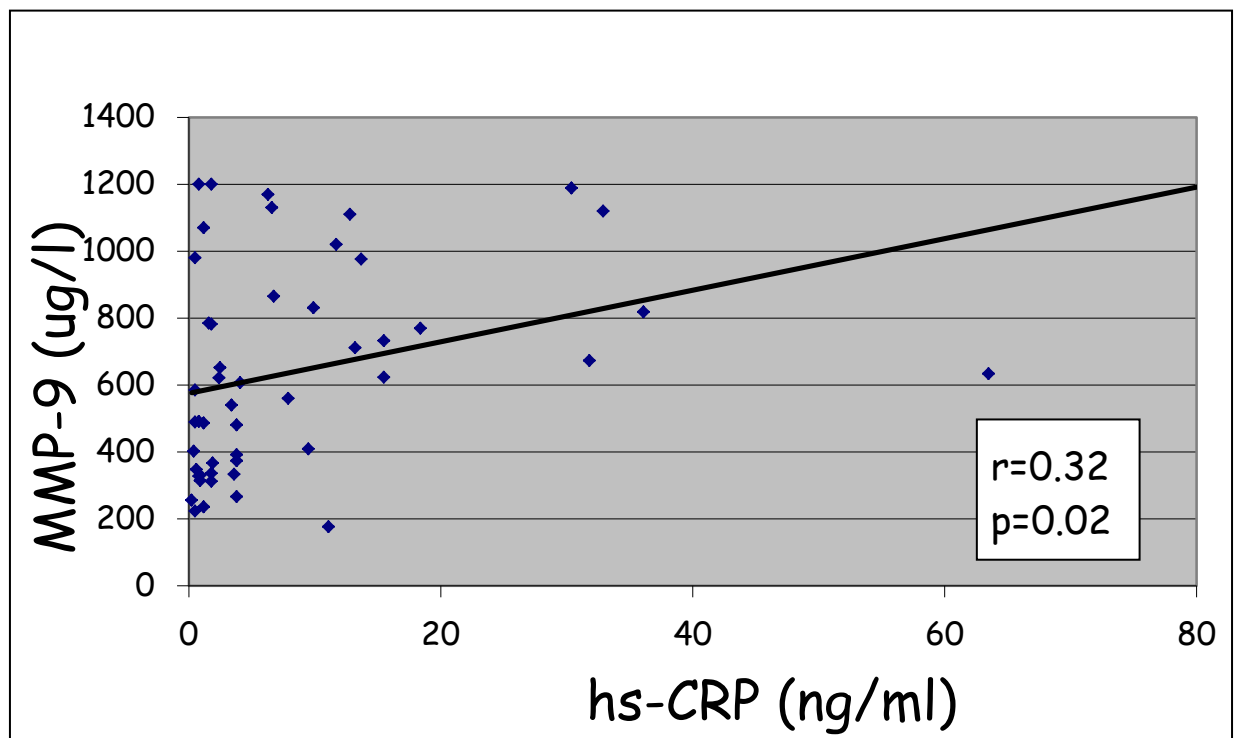


Korelace MMP-9 a hsCRP

Mezi hladinami metaloproteinázy 9 a hladinou vysoce senzitivního CRP byla nalezena středně silná pozitivní korelace ($r=0,32$; $p=0,02$).

Graf č. 15: Korelace hladiny metaloproteinázy 9 a hsCRP u pacientů s akutním koronárním syndromem

hs-CRP= vysoce senzitivní CRP, MMP-9 = metaloproteináza 9



5. Diskuse

5.1. *Tkáňový faktor a inhibitor tkáňového faktoru*

Tkáňový faktor a inhibitor tkáňového faktoru jsou exprimovány v cévní stěně k zajištění rovnováhy koagulační kaskády. Za normálních okolností při cévním poranění dochází k prezentaci tkáňového faktoru a spuštění vnitřní koagulační cesty, inhibitor tkáňového faktoru brání excesivnímu narůstání trombu. Jak tkáňový faktor, tak TFPI se ve zvýšeném množství vyskytují v ateromovém plátu, zejména v nestabilním^{125, 97}. Systémová aktivace cytokiny, endotoxiny a imunokomplexy stimuluje monocyty v ateromovém plátu i v systémové cirkulaci ke zvýšené tvorbě tkáňového faktoru a spolu se zvýšenou produkcí fibroblasty a hladkými svalovými buňkami může přispívat k prokoagulační aktivitě tkáňového faktoru. Tkáňový faktor, vytvořený aktivovanými krevními tělísky, může spouštět tvorbu trombů v mikrocirkulaci pacientů s akutním koronárním syndromem¹²². Hlavním rezervoárem cirkulujícího tkáňového faktoru jsou mikropartikule (drobné membránové váčky vzniklé apoptózou nebo při aktivaci destiček, monocytů, makrofágů, endotelií nebo erytrocytů)¹²³. Mikropartikule vykazují vysokou aktivitu TF⁶⁵.

Nadměrná produkce tkáňového faktoru může spouštět trombotický proces, přispívající k akutnímu zhoršení ischemické choroby srdeční. Experimentální data ukazují, že ateromový plát obsahuje vysoké koncentrace tkáňového faktoru v porovnání s okolní tkání¹²⁴. U pacientů s akutním koronárním syndromem je přítomno zvýšené množství tkáňového faktoru u 43% ateromových plátů, zatímco u pacientů se stabilní ICCHS má toto zvýšení TF jen 12 % plátů¹²⁵. Tento nálezn je potvrzován i v aterektomovaných vzorcích pacientů s nestabilní anginou nebo akutním IM¹²⁶.

Při vzniku akutního koronárního syndromu je plasmatická koncentrace zánětlivých cytokinů, jako TNF- α a interleukinů, v místě akutní okluze zvýšená a vede k dalšímu zvýšení tvorby TF cévními buňkami¹²⁷.

Ruptura plátu, která vede k expozici vysoce prokoagulačního obsahu plátu do cirkulace, může také přispět k elevaci plasmatické hladiny TF⁷⁷. Téměř 30% pacientů má pouze povrchovou erozi, na kterou nasadá trombus, a zvýšená hladina TF u těchto pacientů může být dána zvýšenou tvorbou TF v ateromové lézi⁷⁸.

U pacientů s ischemickou chorobou srdeční je popisována zvýšená plasmatická hladina tkáňového faktoru u akutního infarktu¹²⁸, nestabilní anginy pectoris¹²⁹, ale i u stabilní AP¹³⁰. U nestabilní anginy pectoris zvýšené hladiny korelují s horší prognózou pacientů¹²⁹. Je popsán nesignifikantní trend zvýšení plasmatických hladin tkáňového faktoru u pacientů s akutním infarktem myokardu a nestabilní anginou pectoris v porovnání s pacienty se stabilní ischemickou chorobou srdeční a zdravými dobrovolníky^{131,132}. Hladiny TF jsou zvýšené i u pacientů s diabetem¹³³. Zvýšené hladiny tkáňového faktoru jsou nezávislou proměnnou zvyšující riziko manifestace ischemické choroby srdeční u zdravých jedinců¹³⁴. Zvýšené hladiny tkáňového faktoru při přijetí pro akutní infarkt myokardu znamenají vyšší riziko mortality během 3 let¹³⁵. U pacientů s akutním koronárním syndromem i cirkulující monocyty a mikropartikule s TF zvyšují systémovou prokagulační aktivitu¹³⁶. Genové polymorfizmy TF mohou být spojeny s horší prognózou pacientů s akutním koronárním syndromem, pravděpodobně v souvislosti se zvýšenou expresí TF na monocyttech^{137, 138}.

Pro etiopatogenetické působení TF jako příčiny akutního koronárního syndromu svědčí také pozorování zjištěná při užívání koxibů v léčebné praxi. Zatím co rofekoxib vede ke zvýšení trombotických komplikací u nemocných s kardiovaskulárním onemocněním, u celekoxibu toto nebylo pozorováno. Jako vysvětlení se nabízí inhibice exprese TF

zprostředkovaná celekoxibem v endoteliálních buňkách (exprese TF je také inhibována dalším experimentálním koxibem NS-398). Efekt se zdá být nezávislý na inhibici cyklooxygenazy, naopak je zprostředkován snížením fosforylace indukované TNF- α ⁷⁸.

Protože hlavním zdrojem TF jsou destičky, lze si představit, že protideštičková léčba, která je užívána v léčbě AKS, snižuje expresi TF a plasmatické hladiny TF. Ve zvířecím modelu blokáda ADP receptoru destičky navozená clopidogrelem snižuje expresi TF v ischemické tepně¹³⁹. Také podání inhibitorů receptoru glykoproteinu IIb/IIIa abciximabu snižuje expresi TF monocyty a aktivitu destiček snížením interakce mezi trombocyty a monocyty¹⁴⁰, naopak eptifibatid tuto interakci neovlivní¹⁴¹. Inhibitor IIb/IIIa tirofiban není schopen blokovat tkáňovým faktorem zprostředkovanou aktivaci destiček, naopak podání nízkomolekulárního heparinu ve standardních terapeutických dávkách vede k blokádě z více než 70%¹⁴². Anopyrin inhibuje endotoxiny indukovanou transkripční aktivaci exprese TF v monocyttech a může tedy snižovat plasmatickou aktivitu tkáňového faktoru přímou regulací exprese TF¹⁴³.

Námi zjištěné hladiny tkáňového faktoru byly ve všech kompartmentech stejné, signifikantně vyšší byly hladiny u pacientů s akutním koronárním syndromem, s nesignifikantní tendencí k poklesu. Toto je ve shodě s pracemi Suefuji a kol.¹⁴⁴ a Misumi a kol.¹⁴⁵ srovnávající akutní koronární syndrom a stabilní formy ischemické choroby srdeční. Obě ve shodě zjistily zvýšenou hladinu TF u akutního koronárního syndromu a pokles hladiny TF v čase. Můžeme spekulovat, že hladina TF odráží celkovou prokoagulační aktivitu danou nejen koronární aterosklerózou, ale vícečetným postižením cév, a proto se zvýšené hladiny TF ukázaly jako negativně prognostické¹⁶¹.

Limitací našeho stanovení je měření pouze celkové hladiny tkáňového faktoru – měření na základě protilátek určujících aktivní i neaktivní formy tkáňového faktoru, bez stanovení

funkční aktivity na základě aktivity faktoru Xa závislého na TF. V pracích Malého a kol. u pacientů s akutním koronárním syndromem nepozorovali signifikantní rozdíl v hladinách celkového TF¹³¹, stejně tak analýza pacientů ve studii AtheroGene neprokázala ve skupině s akutním koronárním syndromem vyšší hodnoty TF v porovnání se stabilní ICHS¹⁶¹. Malý a kol. v recentní práci stanovovali aktivitu tkáňového faktoru a zjistili signifikantní snížení u pacientů s akutním koronárním syndromem v systémové a nejen koronární cirkulaci¹⁴⁶, jako možnou konzumci TF.

Není jasné, zda vlastní koronární intervence zvyšuje hladinu TF. Lze si dobře představit, že disekce plátu způsobená balonovou dilatací může vést k expozici obsahu plátu krevnímu proudu a tedy zvýšení hladin plasmatického TF. Při reperfuzi vytvořené kyslíkové radikály indukují zvýšení TF akutně, zatímco trvající zánětlivé poškození aterosklerotické koronární tepny může zvýšit hladiny TF v pozdějších fázích⁷⁸. Zvýšená hladina TF má negativně prognostický dopad na vznik restenózy po perkutánní koronární intervenci, což může být dáno stimulací migrace a proliferace hladkých svalových buněk pomocí TF vyúsťující v restenózu¹⁴⁷. Pacienti s nedostatečnou odpovědí na ASA mají vyšší hladiny TF¹⁴⁸.

Hladiny tkáňového faktoru korelovaly s hladinou hsCRP. CRP je syntetizován v játrech vlivem IL-6 jako primární odpověď na systémový záněť¹⁴⁹. Současně ale experimentální data ukazují, že CRP může být tvořeno v plátu hladkými svalovými buňkami a makrofágy^{150, 151} a může hrát roli v nestabilitě plátu a ruptuře. CRP má prozánětlivou a proaterosklerotickou funkci, zahrnující aktivaci a chemoatrakci cirkulujících monocytů, indukci endoteliální dysfunkce, uvolnění cytokinů, aktivaci komplementového systému, facilituje remodelaci extracelulární matrix a indukuje protrombotický stav stimulací syntézy TF^{152, 153}. Je proto pravděpodobné, že korelace TF a hsCRP vyplývá z aktivní koronární choroby jako výsledek aktivity zánětlivých buněk – zejména monocytů a neutrofilů¹²², dále destiček¹⁵⁴, endotelií¹⁵⁵ a

aterosklerotického plátu¹⁵⁶, jako odpověď na zánětlivé podněty a vlastní koncentrace TF může odrážet rozsah a tíži aterosklerotického procesu.

Byla zjištěna pozitivní korelace mezi hladinou tkáňového faktoru a hladinou solubilního ligandu CD40. Stimulace CD40 receptoru na monocytech a makrofázích v ateromovém plátu, prostřednictvím ligandu na membránách T-lymfocytů i jeho solubilní formy, vede k výrazné expresi tkáňového faktoru, intersticiální kolagenázy (MMP-1) a stromelysinu (MMP-3). Při stimulaci IL-1 nebo TNF- α však byla zjištěna stimulace tvorby tkáňového faktoru jen slabá. Zablokování efektu ligandu CD40 protilátkou inhibuje efekt na monocyty/makrofágy¹⁵⁷. Námí zjištěný nález podporuje význam a zapojení CD40 ligandu v aktivaci koagulačního systému.

Role TFPI

V normální tepně je TFPI soustředěn v endoteliálních buňkách a v buňkách hladkých svalů medie. V tepnách postižených aterosklerozou je TFPI přítomen v endoteliích nad plátem, ale i v endoteliích mikrotepen plátu, v hladkých svalových buňkách medie a i v neointimě. Navíc je obsažen i v makrofázích/pěnových buňkách a T-buňkách obklopujících nekrotické jádro. Aktivita TFPI je vyšší v místech s nižším obsahem TF. Celkové množství TFPI je vyšší v aterosklerotických lézích než ve zdravých tepnách, zejména u komplikovaného plátu s přítomností trombu⁸⁸.

Role TFPI v procesu regulace hemostázy je velmi důležitá. Lze očekávat, že nedostatek TFPI může přispět k patogenezi trombotických chorob. Práce Suefuji a kol.¹⁴⁴, Yamamota a kol.¹⁵⁸, Malého a kol.¹³¹ a analýza studie AtheroGene¹⁶¹ zjistily zvýšené plasmatické hladiny TFPI u pacientů s nestabilní anginou pectoris.

Při měření inhibice TFPI u pacientů s infarktem myokardu léčeným trombolýzou nebo přímou koronární angioplastikou, byla u trombolyzovaných pacientů zjištěna nižší inhibice aktivity TF zprostředkovaná TFPI. Vysvětlením je štěpení TFPI plazminem¹⁵⁹ nebo možná indukce tvorby trombinu¹³⁵ u trombolyzovaných pacientů. Alternativní je i vysvětlení, že plasmin zvýší vylučování TFPI do plasmy, kde je neúčinný, a sníží vaskulární pool, který má antitrombotický efekt⁹².

Asociace snížené hladiny TFPI s klinicky významnou symptomatologií dosud nebyla prokázána, pouze hladiny TFPI méně než desátý percentil, jsou slabým rizikovým faktorem žilní trombózy¹⁶⁰. U pacientů se stabilní ischemickou chorobou srdeční byla zvýšená hladina TFPI jako nezávislý rizikový faktor kardiovaskulární mortality¹⁶¹. Stejně tak u zdravých subjektů sledovaných v PRIME studii bylo zjištěno zvýšené riziko budoucí koronární příhody v případě snížení hladiny TFPI pod desátý percentil¹⁶².

TFPI interferuje s aktivitou komplexu TF/fVIIa vazbou k aktivnímu místu fXa, což vede k tvorbě kvarterního komplexu s TF/fVIIa. Za fyziologických podmínek je TFPI dominantně tvořen a uvolňován z endoteliálních buněk. Ve zvířecím modelu rekombinantní TFPI (rTFPI) snižuje depozita fibrinu a neointimální ztluštění po dilataci balonem¹⁶³. U pacientů s aterosklerotickým postižením tepen rekombinantní TFPI snižuje trombogenicitu plátu inhibicí destiček a deposit fibrinu¹⁶⁴. Adenoviry zvýšená exprese TFPI v postižené cévě inhibuje rekurující trombózy navozené střížným napětím bez ovlivnění systémových koagulačních parametrů¹⁶⁵. Podobně zvýšená exprese TFPI snižuje trombogenicitu stejně jako cévní remodelaci při balonkové dilataci aterosklerotických tepen¹⁶⁶.

V naší práci nebyly zjištěny zvýšené hladiny TFPI mezi skupinami s akutním koronárním syndromem a stabilní ischemickou chorobou srdeční. Stanovovaná hladina TFPI byla bazálně měřena ještě před podáním heparinu, ale ani po podání heparinu, dle standardního léčebného

protokolu u akutního koronárního syndromu, jsme nezjistili zvýšené hladiny TFPI. Jako možné vysvětlení se nabízí tři důvody: nízké cirkulující hladiny celkového plasmatického TFPI nebo velmi nízké hodnoty volného detekovatelného (celková délka) TFPI a v neposlední řadě nemožnost stanovit v buňkách vázanou TFPI. Dopad hladin TFPI není zcela jasný. Ve většině prací bývá zvýšený. V práci Morange a kol. korelovala hladina TFPI s troponinem a tedy mohla vyjadřovat míru postižení myokardiálního svalu ischemií¹⁶¹. TFPI je dominantně tvořen v endoteliích a zvýšená hladina může pouze vyjadřovat tíži hypoxie nebo zánětlivé odpovědi.

Stanovení hladiny TF u akutního koronárního syndromu může sloužit k upřesnění prognózy (zvýšená hladina je prediktorem mortality) a predikovat budoucí nestabilitu. TFPI může sloužit v korelaci s troponiny k posouzení rozsahu myokardiálního poškození¹⁶¹.

5.2. Metaloproteinázy

Role tkáňových metaloproteináz v aterosklerotickém plátu je komplexní. Jejich tvorba je indukována zánětlivou reakcí. Enzymy degradují extracelulární matrix a bazální membránu a umožňují migraci a proliferaci zejména endotelií se vznikem neovaskulárních lézí¹⁶⁷. Metaloproteinázy jsou zodpovědné za remodelaci tkání a angiogenezi.

In vitro lidské endoteliální buňky po stimulaci mediátory přítomnými v aterosklerotickém plátu (interleukin-1 nebo TNF- α) exprimují intersticiální kolagenázu (MMP-1), gelatinázu A a B (MMP-2 a MMP-9) a stromelyzin (MMP-3)¹⁶⁸.

U hypertenzních pacientů korelují hladiny MMP-9 s rizikem ischemické choroby srdeční a po korekci TK dochází za 3 roky k poklesu hladiny¹⁶⁹. MMPs jsou považovány za marker

vaskulárního postižení¹⁷⁰, jsou zvýšeny i u dětí a adolescentů s diabetem mellitem I. typu¹⁷¹, koreluje s chronickou endoteliální dysfunkcí a tvorbou nestabilního plátu¹⁷².

Ze skupiny metaloproteináz jsme zjistili signifikantně vyšší pouze hladiny MMP-9, nezjistili jsme zvýšenou hladinu MMP-2, MMP-3. Zvýšené hladiny metaloproteinázy-9 a TIMP-2 spolu s sCD40L jsou zvýšeny u pacientů s ischemickou chorobou srdeční v porovnání s pacienty bez signifikantní aterosklerózy¹⁷³. Práce Kai a kol. našla zvýšení hladiny MMP-9 a nikoliv MMP-2 u pacientů s akutním koronárním syndromem¹⁷⁴, Inokubo a kol. zaznamenal jejich zvýšení pouze v koronární cirkulaci¹⁷⁵. V práci Ferroniho a kol. je popsáno signifikantní zvýšení MMP-9, ale hladina MMP-2 byla beze změny¹⁷⁶, což odpovídá našimi zjištěným výsledkům. Naopak pouze práce Eckarta a kol. pozorovala zvýšené hladiny MMP-2, zatímco hladiny MMP-9 byly ve skupině s akutním infarktem sníženy. Tímto zjištěním je ale práce ojedinělá¹⁷⁷. Po provedení perkutánní revaskularizace je popisován vzestup MMP-9, což podporuje roli MMP-9 jako vaskulárního faktoru odpovědi na cévní poranění¹⁷⁷, nevylučuje ale ani možnost uvolnění MMP-9 z aterosklerotického plátu při mechanické disrupci. U diabetiků s AKS jsou hladiny MMP-9, TIMP-2 a hsCRP vyšší než u pacientů nediabetiků¹⁷⁸, toto může svědčit pro možný přímý patogenetický podíl MMPs na ruptuře plátu.

Z dosud publikovaných prací tedy vyplývá souvislost mezi metaloproteinázami a vznikem akutního koronárního syndromu. Jejich zvýšené hladiny (zejména MMP-9) jsou detekovány v akutním aterosklerotickém plátu a to jak extracelulárně, tak intracelulárně¹⁷⁹. Odráží to jejich aktivní syntézu v nestabilním plátu a je zde možná příčinnost s rupturou plátu¹⁷⁴, ale přímá zodpovědnost za porušení fibrosní čepičky plátu je, i přes tyto průkazy zvýšené hladiny MMP-9 v nestabilním plátu obtížně průkazná^{180, 185}.

V dostupné literatuře je uváděná také vyšší koncentrace MMP-2, jejíž exprese je v koronárním plátu aktivována a její hladina koreluje s kalcifikacemi v ateromovém plátu¹⁸¹,¹⁸²,¹⁸³.

Námi zjištěné zvýšené hladiny MMP-9 korelují s hsCRP, a tedy se zánětlivou aktivací. Není jasné, zda aktivita MMP-9 v séru koreluje s aktivitou v ateromovém plátu. Práce Inokubeho a kol. pozorovala zvýšenou hladinu MMP-9 v koronární cirkulaci, což může svědčit pro aktivaci lytického procesu v koronárním řečišti s uvolněním MMPs¹⁷⁵, ale naše zjištění nepotvrdilo zvýšenou koronární produkci MMPs. V práci Fukudy a kol. vyšetřením pomocí intravaskulárního ultrazvuku prokázali korelaci výskytu ruptury plátu se zvýšenými hladinami MMP-9, ale nikoliv s MMP-2¹⁸⁴. Také práce Higa a kol. ukázala, že pacienti s akutním infarktem myokardu měli vyšší hladinu MMP-9 v culprit koronární tepně než v koronárním sinu nebo femorální tepně, což podporuje souvislost MMP-9 a nestabilního plátu spíše než souvislost s myokardiální nekrózou¹⁸⁵.

U pacientů s akutním koronárním syndromem bez elevací ST úseků Bittner a kol. zjistili korelaci mezi MDA jako markeru oxidativního stresu a MMP-9. Práce ve shodě s našimi závěry našla elevaci MMP-9 s poklesem během pětidenního sledovacího intervalu, stejně jako pokles hladin MDA u pacientů s akutním koronárním syndromem. Nebyly nalezeny změny v hladinách MMP-2¹⁸⁶.

Výše uvedená práce Kai a kol. popsala postupný pokles plasmatických hladin MMP-9 u pacientů s ACS po prvních 24 hodinách. V rozporu s naším zjištěním pozorovali vyšší hodiny MMP-2, které poklesly během 24 hodin k normě a neměnily se během 7 dnů¹⁷⁴.

Galis a kol. u na myším modelu s deficitem MMP-9 prokázali snížení intimální hyperplazie a ztráty lumen a současně k nahromadění intersticiálního kolagenu¹⁸⁷. To

podporuje možnost zvýšení mechanické stability tepen zvýšením obsahu kolagenu a snížení ztráty lumen ve spojitosti se snížením hladiny MMP-9.

U diabetiků a pacientů s akutním koronárním syndromem jsou pozorovány zvýšené hladiny MMP-2, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 v porovnání se zdravými kontrolami¹⁸⁸. Zvýšené hladiny proto svědčí pro možnost podílu MMPs na vlastní patogeneze aterosklerózy¹⁸⁸.

Excesivní převaha lytických metaloproteináz nad jejich přirozenými inhibitory je popisována v nestabilním plátu s maximem v oblasti vulnerabilní čepičky. Toto nabízí možnou cestu inhibice nebo prevence progresu aterosklerózy a klinických příhod snížením produkce metaloproteináz nebo snížením jejich aktivace. Je tedy nutné najít mechanismus, který vede k navýšení exprese a zvýšeného uvolňování proenzymu nebo zvýšené extracelulární aktivaci. Potenciálním cílem je ovlivnění působků TNF- α , IL-1, lymfocytů s CD40 a sCD40, respektive jejich regulace na zvýšení aktivity metaloproteináz stimulací makrofágů^{189, 39}.

S tímto souvisí potenciální terapeutické využití inhibice MMP. Přirozené inhibitory ale nejsou vhodné k farmakologické intervenci z důvodu jejich krátkého poločasu. Syntetické inhibitory MMPs, testované na zvířecích modelech, vykazovaly zlepšení funkce srdce blokadou progresu srdečního selhání¹⁹⁰. Batimastat (BB-94) byl prvním syntetickým inhibitorem MMPs se strukturou napodobující kolagen, který byl zkoušen na lidech. Chemicky modifikované tetracykliny byly prvními léky, které obdržely schválení ke klinickému využití v anti-MMPs léčbě periodontálních onemocnění¹⁹¹.

5.3. sCD40L

In vitro, lidské endoteliální buňky, po stimulaci mediátory přítomnými v ateromovém plátu (interleukin-1 nebo TNF- α), exprimují receptor CD40, následná interakce receptoru CD40 a ligandu CD40 indukuje tvorbu adhezních molekul^{192, 193}.

Zvýšené hladiny sCD40L jsou u pacientů s vysokým kardiovaskulárním rizikem spojeny s vyšším rizikem smrti nebo nefatálního akutního infarktu myokardu, kdy zvýšené hladiny jsou nezávislým rizikovým faktorem po adjustaci na troponin T, CRP, TNF- α , ICAM-1¹¹⁹.

Poprvé byla zvýšená sérová hladina sCD40L u pacientů s akutním koronárním syndromem popsána v práci Aukrusta a kol. v roce 1999. Tato práce měřila jak solubilní formu sCD40, tak její membránovou porci vázanou na leukocytárních membránách T-lymfocytů, a autoři potvrdili i vyšší membránovou expresi CD40L u pacientů s nestabilní anginou pectoris¹⁹⁴. T-lymfocyty CD4+ zvýšeně exprimují CD40L u pacientů s nestabilní anginou¹⁹⁴. Pacienti s akutním infarktem myokardu a nestabilní anginou pectoris mají na destičkách, v porovnání se stabilní ICHS, zvýšenou expresi CD40 ligandu¹⁹⁵. Během šesti měsíců dochází k poklesu hladin solubilního ligandu CD40, ale pacienti s rekurencí anginy pectoris nebo nutnosti opakované koronární angioplastiky mají trvale zvýšené hodnoty¹⁹⁵.

V naší práci jsme zjistili zvýšené hladiny sCD40L ve skupině pacientů s akutním koronárním syndromem v porovnání s pacienty se stabilní ischemickou chorobou srdeční. Toto pozorování je ve shodě se stávající literaturou o akutním koronárním syndromu a sCD40L¹⁹⁴.

sCD40L má biologický efekt na buňky hladkého svalů, T- i B-lymfocyty a trombocyty. Zvýšené hodnoty u pacientů s akutním koronárním syndromem mohou být odrazem možného patogenního působení sCD40L u akutního koronárního syndromu, neboť sCD40L je

významným aktivátorem MMPs v makrofázích a hladkých svalových buňkách, ale neovlivňuje expresi jejich inhibitorů – TIMP^{157, 196}.

Zvýšené hladiny sCD40L u pacientů s nestabilní anginou pectoris nejsou jen známkou imunitní aktivace, ale mohou být i patogenetickým faktorem. Cirkulující sCD40 může projít aterosklerózou postiženým endotelem a následnou aktivací leukocytů a uvolněním prozánětlivých cytokinů zvýšit expresi adhezních molekul a expresi tkáňového faktoru⁵⁹. Působí proaterogenně s následnou destabilizací aterosklerotického plátu indukci cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a MMP¹¹⁹.

Solubilní ligand CD40 je plně aktivní biologicky a je prozánětlivým působkem endotelových buněk a spouští koagulaci indukci exprese tkáňového faktoru na monocytech i endoteliích s přímým ovlivněním antikoagulačního efektu endotelu^{106, 107}. Současně je solubilní CD40L glykoproteinový ligand pro IIb/IIIa receptor a destičkový agonista, který může být nezbytný pro stabilitu arteriálního trombu¹¹⁰. Námi zjištěná korelace hladin sCD40L a TF u pacientů s akutním koronárním syndromem tak prokazuje vzájemnou interakci zánětlivého procesu vulnerabilního plátu a trombogenní aktivity.

Problémem je možnost zvýšení sCD40L nikoliv jako příčiny nestabilní anginy pectoris, ale jako důsledku akutního koronárního syndromu. Výrazné zvýšení sCD40L po mechanicky indukované ruptuře po perkutánní koronární angioplastice může napovídat, že zvýšené hodnoty sCD40L jsou sekundárním nálezem. Avšak skutečnost, že ruptura plátu způsobená koronární angioplastikou může vést k vzestupu sCD40, nevyklučuje patogenetickou etiologii pro CD40L v nestabilitě plátu. Navíc aktivované destičky produkují a uvolňují velké množství sCD40L¹⁰⁵. Provedení aortokoronárního bypassu vede k vzestupu plasmatických hladin sCD40L s odpovídajícím poklesem destičkového CD40L¹⁹⁷. Trombinem stimulovanou sekreci sCD40L z trombocytů nelze plně blokovat podáním aspirinu¹⁹⁴. Clopidogrel snižuje

expresi CD40L a hladiny sCD40L¹⁹⁸. Nález zvýšeného transkoronárního gradientu u pacientů s AKS potvrzuje zdroj v koronárním řečišti, jsou odrazem trombotického procesu z aktivace trombocytů a tedy nutnost maximální suprese destičkové aktivity¹⁹⁹.

6. Závěr

Léčba akutního koronárního syndromu, zahrnující akutní infarkt myokardu a nestabilní anginu, byla v posledních 30 letech jedním z neúspěšnějších pokroků v medicíně. Avšak i nadále nejsme schopni predikovat a tedy i dostatečně preventivně zasáhnout v incidenci akutního infarktu myokardu. Hlavní úsilí musí být cíleno na porozumění mechanismů, které mohou vést k akutní koronární okluzi a výzkum nestabilního plátu a jeho interakce s koagulačním systémem. Spolehlivá neinvazivní cesta k detekci časně aterosklerotické choroby a charakteristiky složení plátu může zlepšit porozumění patofyziologického mechanismu aterotrombózy s cílem individualizace léčby pacienta a přímé sledování metabolické reakce cévy.

Pacienti s rizikovými faktory, jako jsou hypertenze, diabetes, dyslipidémie a kouření, mají zvýšené plasmatické hladiny TF, solubilního ligandu CD40, MMP-9, které mohou být zapojeny jak do proaterosklerotického, tak do protrombotického procesu.

Tkáňový faktor má významnou funkci ve fyziologii a patofyziologii akutního koronárního syndromu. Dle našich výsledků dochází k zvýšené produkci tkáňového faktoru u akutního koronárního syndromu. Tento fakt může sloužit k upřesnění prognózy a nabízí se jako potenciální cíl k ovlivnění patogenetického faktoru stojícího na počátku koagulační kaskády, s možností podání např. protilátek proti TF, neaktivního faktoru VIIa nebo rekombinantního TFPI. Hladiny sCD40 souvisí s aktivitou destiček, transkoronární gradient ukazuje na výrazně zvýšenou aktivitu aterotrombotického procesu a dokládá nutnost maximální blokády destiček při akutním koronárním syndromu. Hladiny TF, sCD40 a hsCRP korelují a souvisí s aktivitou aterotrombotického procesu. Stejně tak MMP-9 koreluje s hsCRP. Změny sérových hladin MMP-9 odráží zvýšenou aktivitu lytického procesu plátu při akutním koronárním syndromu a podporují možný přímý vliv MMP-9 na indukci ruptury

a vzniku nestabilního plátu. Nabízí se zabránit destabilizaci podáváním přirozeného inhibitoru, ale toto ještě není zcela vyjasněno. MMP-2 pravděpodobně nemá v průběhu akutního koronárního syndromu patogenetickou roli.

Z našich závěrů vyplývá využití v praxi:

- hladiny sCD40L, hsCRP a TF korelují a souvisí s aktivitou aterotrombotického procesu, zaměření na postupy snižující hladiny tkáňového faktoru a sCD40L může přinést příznivé ovlivnění vzniku nebo průběhu akutního koronárního syndromu.
- aktivita MMP-9 je zvýšena při akutním koronárním syndromu – ovlivnění její hladiny nabízí možnost snížení rizika ruptury ateromového plátu.
- nález zvýšeného transkoronárního gradientu u pacientů s AKS potvrzuje zdroj v koronárním řečišti, jsou odrazem trombotického procesu z aktivace trombocytů a tedy nutnost maximální suprese destičkové aktivity

Práce prokazuje zvýšenou trombotickou aktivitu a zvýšenou aktivitu proteolytických enzymů u pacientů s akutním koronárním syndromem. Přispívá tak k dalšímu pochopení souvislosti dějů podílejících se na vzniku nestabilních forem ischemické choroby srdeční a vzniku nestability koronárního plátu s rizikem rozvoje akutního infarktu myokardu, porozumění patofyziologického mechanismu aterosklerozy s cílem optimalizace individuální léčby a přímého sledování reakce cévy.

7. Seznam zkratek

ACS	akutní koronární syndrom
CD40L	ligand CD40 (povrchový znak leukocytů)
CS	koronární sinus
EGF	epiteliální růstový faktor
f. IXa	aktivovaný faktor IX
f. Va	aktivovaný faktor V
f. VIIa	aktivovaný faktor VII
f. Xa	aktivovaný faktor X
hsCRP	vysoce senzitivní CRP
ICAM	intercellular cell adhesion molecule
IL-1	interleukin-1
IL-4	interleukin-4
IL-6	interleukin-6
LDL	low-density cholesterol = cholesterol o nízké hustotě
LMCA	kmen levé věnčité tepny (left main coronary artery)
LMWh	frakcionovaný (nízkomolekulární) heparin
LPS	lipopolysacharidy
MMP-2	metaloproteináza 2
MMP-3	metaloproteináza 3
MMP-9	metaloproteináza 9
MMPs	tkáňové metaloproteinázy
MT-MMPs	membránový typ metaloproteinázové matrix
PDGF	destičkový růstový faktor
sCD40L	solubilní ligand CD40
SCAD	stabilní ischemická choroba srdeční
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TIMP	inhibitory tkáňových metaloproteináz
TIMP-2	inhibitor tkáňových metaloproteináz 2
TNF- α	tumor nekrosis faktor- α
uPA	urokináza-like aktivator plasminogenu
VF	femorální vena

8. Seznam použité literatury

- ¹. Ambrose JA, Winters SL, Arora RR et al. Angiographic evaluation of coronary artery morphology in unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7: 472-8.
- ². Nissen SE, Yock P. Intravascular ultrasound. Novel pathophysiological insights and current clinical applications. *Circulation* 2001; 103: 604-16.
- ³. Asakura M, Ueda Y, Yamaguchi O et al. Extensive development of vulnerable plaques as a pan-coronary process in patients with myocardial infarction: an angioscopic study. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1284-88.
- ⁴. Goldstein JA, Demetriou D, Grines C et al. Multiple complex coronary plaques in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2000; 343: 915-22.
- ⁵. Rioufol G, Finet G, Ginon I et al. Multiple atherosclerotic plaque rupture in acute coronary syndrome. A three - vessel intravascular ultrasound study. *Circulation* 2002; 106: 804-8.
- ⁶. Spagnoli LG, Bonanno E, Mauriello A et al. Multicentric inflammation in epicardial coronary arteries of patients dying of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 1579-88.
- ⁷. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G et al. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med* 2002; 347: 5-12.
- ⁸. Davies MJ. Reactive oxygen species, metalloproteinases, and plaque stability. *Circulation* 1993; 88: 800-3.
- ⁹. Corti R, Farkouh ME, Badimon JJ. The Vulnerable Plaque and Acute Coronary Syndromes. *Am J Med* 2002; 113: 668-80.
- ¹⁰. Lafornt A. Basic aspects of plaque vulnerability. *Heart* 2003; 89: 1262-7.
- ¹¹. Hamm CW, Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation* 2000; 202: 118-22.

-
12. Starry HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92: 1355-74.
 13. Starry HC, Chandler AB, Glagov S et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994; 89: 2462-78.
 14. Glagov S., Wisenberg E, Zarins CK et al. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; 316: 1371-75.
 15. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
 16. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92: 657-71.
 17. Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J et al. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* 1996; 94: 3090-7.
 18. Hani J, Corti R, Hutter R et al. The interplay between inflammation and thrombosis in atherosclerosis. *Acute Coronary Syndromes* 2002; 4: 71-8.
 19. Libby P, Simon DI. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation* 2001; 103: 1718-20.
 20. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001; 104: 365-72.
 21. Libby P. The molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 336:1312-13.
 22. Moreno PR, Falk E, Palacios IF et al. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* 1994; 90: 775-8.

-
23. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90: 251-62.
 24. Davies MJ. Reactive oxygen species, metalloproteinases, and plaque stability. *Circulation* 1998; 98: 2382-83.
 25. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP et al. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1262-75.
 26. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A et al. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation* 2001; 103: 934-40.
 27. Kaikita K, Ogawa H, Yasue H et al. Tissue factor expression on macrophages in coronary plaques in patients with unstable angina. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2232-37.
 28. Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F et al. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 1986; 315: 983-9.
 29. Anithrombotic Trialists` Collaboration: Collaborative metaanalysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71-86.
 30. Toschi V, Gallo R, Lettino M et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; 95: 594-9.
 31. Badimon JJ, Lettino M, Toschi V et al. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* 1999; 99: 1780-7.

-
32. Drew AF, Davenport P, Apostolopoulos J et al. Tissue factor pathway inhibitor expression in atherosclerosis. *Lab Invest* 1997; 77: 291-8.
 33. Burke AP, Farb A, Pestaner J et al. Traditional risk factors and incidence of sudden coronary death with and without coronary thrombosis in blacks. *Circulation* 2002; 105: 419-24.
 34. Osende JJ, Badimon JJ, Fuster V et al. Blood thrombogenicity in type 2 diabetes mellitus patients is associated with glycemic control. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:1307-12.
 35. Kelleher CC. Plasma fibrinogen and factor VII as risk factors for cardiovascular disease. *Eur J Epidemiol* 1992; 8: 79-82.
 36. Corti R, Badimon JJ. Value of desirability of hemorheological-haemostatic parameter changes as endpoints in blood lipid-regulating trials. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 629-37.
 37. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF et al. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: A New Approach to prevent Heart Failure? *Circ Res* 2001; 89: 201-10.
 38. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF et al. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol* 1996; 156: 3952-60.
 39. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T-lymphocytes. *Circ Res* 1997; 81: 448-54.
 40. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ et al. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation* 2000; 102: 1944-49.
 41. Wassenaar A, Verschuur T, Kievits F et al. CD40 engagement modulates the production of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 161-7.

-
42. Makela M, Salo T, Larjava H. MMP-9 from TNF α -stimulated keratinocytes binds to cell membranes and type I collagen: a cause for extended matrix degradation in inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 325-35.
 43. Lijnen HR, Silence J, Lemmens G et al. Regulation of gelatinase activity in mice with targeted inactivation of components of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1171-6.
 44. Ramos-DeSimon N, Hahn-Dantona E, Siple J et al. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 1999; 274: 13066-76.
 45. Li YY, McTiernan ChF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res* 2000; 40: 214-24.
 46. Wesley RB 2nd, Meng X, Godin D et al. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 422-40.
 47. Theret N, Lehti K, Musso O et al. MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 30: 462-8.
 48. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinase inhibition. From Jurassic to the third milenium *Ann New York Acad Sci* 1999; 30: 462-8.
 49. Greenwald RA. Thirty-six years in the clinic without an MMP inhibitor. What hath collagenase wrought? *Ann New York Acad Sci* 1999; 878: 413-9.
 50. Forough R, Koyama N, Hasenstab D et al. Overexpression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 inhibits vascular smooth muscle cell functions in vitro and in vivo. *Circ Res* 1996; 79: 812-20.

-
51. Dollery CM, Humphries SE, McClelland A et al. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 by use of an adenoviral vector inhibits smooth muscle cell migration and reduces neointimal hyperplasia in the rat model of vascular balloon injury. *Circulation* 1999; 99: 3199-205.
 52. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M et al. Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation* 1995; 91:2125-31.
 53. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94: 2493-503.
 54. Li Z, Li L, Zielke HR et al. Increased expression of 72 kD type IV collagen (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1996; 148: 121-8.
 55. Galis ZS, Asanuma K, Godin D et al. N-Acetyl-cysteine decreases the matrix-degrading capacity of macrophage-derived foam cells: new target for antioxidant therapy? *Circulation* 1998; 97: 2445-53.
 56. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y et al. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 1998; 97: 2433-44.
 57. Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood* 1988; 71: 1-8.
 58. Selwyn A. Prothrombotic and antithrombotic pathways in Acute Coronary Syndromes. *Am J Cardiol* 2003; 91: 3H-11H.
 59. Schoenbeck U, Mach F, Sukhova GK et al. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 2000; 156: 7-14.
 60. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM et al. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2839-43.

-
61. Hoffman M, Colina CM, McDonald AG et al. Tissue factor around dermal vessels has been bound factor VII in the absence of injury. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1403-8.
 62. Giesen PL, Nemerson Y. Tissue factor on the loose. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 379-84.
 63. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; 134: 1087-97.
 64. Mackman N. The Role of Tissue Factor and Factor VIIa in Hemostasis. *Anesth Analg* 2008; 108: 1447-52.
 65. Mallat Z, Hugel B, Ohan J et al. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: A role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999; 99: 348-53.
 66. Muller I, Klocke A, Alex M et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 2003; 17: 476-8.
 67. Bauer KA, Kass BL, Cate HT et al. Factor IX is activated in vivo by the tissue factor mechanism. *Blood* 1990; 76: 731-6.
 68. Bauer KA, Kass BL, ten Cate H et al. Detection of factor X activation in humans. *Blood* 1989; 74: 2007-15.
 69. Cate HT, Bauer KA, Levi M et al. The activation of factor X and prothrombin by recombinant factor VIIa in vivo is mediated by tissue factor. *J Clin Invest* 1993; 92: 1207-12.
 70. Pawlinski R, Pedersen B, Schabbauer G et al. Role of tissue factor and protease activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood* 2004; 103:1342-7.
 71. Miller GJ, Howarth DJ, Attfield JC et al. Haemostatic factors in human peripheral afferent lymph. *Thromb Haemost* 2000; 83: 427-32.

-
- ⁷². Jesty J, Beltrami E. Positive feedback of coagulation their role in threshold regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2463-9.
- ⁷³. Osterud B, Bjorklid E. Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 11-23.
- ⁷⁴. Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE et al. Tissue factor activity in whole blood. *Blood* 2005; 10: 1155-6.
- ⁷⁵. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM et al. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 2839-43.
- ⁷⁶. Vojáček J, Dušek J, Bis J et al. Plasma Tissue Factor in Coronary Artery Disease: Further Step to the Understanding of the Basic Mechanisms of Coronary Artery Thrombosis. *Physiol. Res.* 2008; 57: 1-5.
- ⁷⁷. Mallat Z, Benamer H, Hugel B et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 101: 841-3.
- ⁷⁸. Steffel J, Lüscher TF, Tanner FC. Tissue factor in cardiovascular diseases: molekular mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2006; 113: 722-31.
- ⁷⁹. Sato Y, Asada Y, Marutsuka K et al.. Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells. *Thromb Haemost.* 1996; 75: 389-92.
- ⁸⁰. Ott I, Wigand B, Michl R et al. Tissue factor cytoplasmatic domain stimulates migration by activation of the GTPase Rac1 and the mitogen-activated protein kinase p38. *Circulation* 2005; 111: 349-55.
- ⁸¹. Siegbahn A, Jonell M, Rorsan C et al. Binding of factor VIIa to tissue factor on human fibroblasts leads to activation of phospholipase C and enhanced PDGF-BB-stimulated chemotaxis. *Blood* 2000; 96: 3452-8.

-
82. Eto M, Kozai T, Cosentino F et al. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and AKT pathways. *Circulation* 2002; 105: 1756-9.
 83. Warr TA, Warn-Cramer BJ, Rao LV et al. Human plasma extrinsic pathway inhibitor activity: I. Standardization of assay and evaluation of physiologic variables. *Blood* 1989; 74: 201-6.
 84. Novotny WF, Brown SG, Miletich JP et al. Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood* 1991; 78: 387-93.
 85. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995; 74: 90-3.
 86. Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP et al. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood* 1988; 72: 2020-5.
 87. Sandset PM, Bendz B, Hansen JB. Physiological function of tissue factor pathway inhibitor and interaction with heparins. *Haemostasis* 2000; 30: 48-56.
 88. Petit L, Lesnik P, Datchet C et al. Tissue factor pathway inhibitor is expressed by human monocyte-derived macrophages: relationship to tissue factor induction by cholesterol and oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 309-15.
 89. Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS et al. Expression of tissue factor pathway inhibitor in vascular smooth muscle cells and its regulation by growth factor. *Circ Res* 1998; 83: 1264-70.
 90. Crawley J, Lupu F, Westmuckett AD et al. Expression, localization and activity of tissue factor pathway inhibitor in normal and atherosclerotic human vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1362-73.

-
91. Jesty J, Loren A, Rodriguez J et al. Initiation of the tissue factor pathway of coagulation in the presence of heparin: control by antithrombin III and tissue factor pathway inhibitor. *Blod* 1996; 87: 2301-7.
 92. Crawley JTB, Lane DA. The Haemostatic Role of Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 233-42.
 93. Huang ZF, Wun T-C, Broze GJ Jr. Kinetics of factor Xa inhibition by tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem* 1993; 268: 26950-55.
 94. Hansen JB, Sandset PM, Huseby KR, et al. Differential effect of unfractionated heparin and low molecular weight heparin on intravascular tissue factor pathway inhibitor: evidence for a difference in antithrombotic action. *Br J Haematol* 1998; 101: 638-46.
 95. Brose GJ Jr, Lange GW, Duffin KL et al. Heterogeneity of plasma tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5: 551-9.
 96. Salemink I, Franssen J, Willems GM et al. Factor Xa cleavage of tissue factor pathway inhibitor is associated with loss of anticoagulant activity. *Thromb Haemost.* 1998; 80: 273-80.
 97. Crawley J, Lupu F, Westmuckett AD et al. Expression, localization and activity of tissue factor pathway inhibitor in normal and atherosclerotic human vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1362-73.
 98. Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A et al. Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation. *J Exp Med* 1992; 175: 1091-101.
 99. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 4-43.

-
- ¹⁰⁰. Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW et al. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med* 1993; 178: 669-74.
 - ¹⁰¹. Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP et al. Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J Exp Med* 1995; 182: 33-40.
 - ¹⁰². Henn V, Slupsky JR, Grafe M et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-4.
 - ¹⁰³. Graf D, Muller S, Korthauer U et al. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T-cell activation. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1749-54.
 - ¹⁰⁴. Lee Y, Lee WH, Lee SC et al. CD40L activation in circulating platelets in patients with acute coronary syndrome. *Cardiology* 1999; 92: 11-6.
 - ¹⁰⁵. Henn V, Steinbach S, Buchner K et al. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* 2001; 98: 1047-54.
 - ¹⁰⁶. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY et al. Activation of monocyte/macrophage function related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin and tissue factor. *Circulation* 1997; 96: 396-9.
 - ¹⁰⁷. Urbich C, Mallat Z, Tedgui A et al. Upregulation of TRAF-3 by shear stress blocks CD40-mediated endothelial activation. *J Clin Invest* 2001; 108: 1451-8.
 - ¹⁰⁸. Zhou L, Stordeur P, de Lavareille A et al. CD40 engagement on endothelial cells promotes tissue factor-dependent procoagulant activity. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 1025-8.
 - ¹⁰⁹. Scarborough RM, Naughton MA, Teng W et al. Design of potent and specific integrin antagonist: peptide antagonist with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. *J Biol Chem* 1993; 268: 1066-73.

-
110. Andre P, Prasad KS, Denis CV et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3integrin-dependent mechanism. *Nat Med* 2002; 8: 247-52.
 111. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res* 1997; 81: 448-54.
 112. Thienel U, Loike J, Yellin MJ. CD154 (CD40L) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets. *Cell Immunol* 1999; 198: 87-95.
 113. Miller DL, Yaron R, Yellin MJ. CD40L-CD40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 373-9.
 114. Slupsky JR, Kalbas M, Wiluweit A et al. Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost* 1998; 80: 1008-14.
 115. Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 4-43.
 116. Antoniades CH, Bakogiannis C, Tousoulis D et al. The CD40/CD40 Ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. *JACC* 2009; 54: 669-77.
 117. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK et al. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998; 394: 200-3.
 118. Schonbeck U, Varo N, Libby P et al. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation* 2001; 104: 2266-8.
 119. Heeschen CH, Dimmeler S, Hamm W et al. Soluble CD40 Ligand in Acute Coronary Syndromes. *NEJM* 2003; 348: 1104-11.

-
- ¹²⁰. The Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2008, 29: 2909-2945.
- ¹²¹. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007, 28: 1598-660.
- ¹²². Giesen PL, Rauch U, Bohrman B et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2311-15.
- ¹²³. George FD. Microparticles in vascular disease. *Thromb Res* 2008; 122: S55-S59.
- ¹²⁴. Marmur JD, Thiruvikraman SV, Fyfe BS. Identification of active tissue factor in human atherosclerotic plaques in human coronary atheroma. *Circulation* 1996; 94: 1226-32.
- ¹²⁵. Ardissino D, Merlini PA, Ariens R et al. Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1997; 349: 769-71.
- ¹²⁶. Annex BH, Denning SM, Channon KM et al. Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91: 619-22.
- ¹²⁷. Maier W, Altwegg LA, Corti R et al. Inflammatory markers at the site of ruptured plaque in acute myocardial infarction: locally increased interleukin-6 and serum amyloid A but decreased C-reactive protein. *Circulation* 2005; 111: 1355-61.
- ¹²⁸. Saigo M, Abe S, Ogawa M et al. Imbalance of plasminogen activator inhibitor-I/tissue plasminogen activator and tissue factor/tissue factor pathway inhibitor in young Japanese men with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1197-203.

-
- ¹²⁹. Soejima H, Ogawa H, Yasue H et al. Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. *Circulation* 1999; 99: 2908-13.
- ¹³⁰. Kim HK, Song KS, Park YS et al. Changes of plasma tissue factor and tissue factor pathway inhibitor antigen levels and induction of tissue factor expression on the monocytes in coronary artery disease. *Cardiology* 2000; 93: 31-6.
- ¹³¹. Maly M, Vojacek J, Hrabos V et al. Tissue factor, tissue factor pathway inhibitor and cytoadhesive molecules in patients with an acute coronary syndrome. *Physiol Res* 2003; 52, 719-28.
- ¹³². Bis J, Vojáček J, Dušek J et al. Time-course of tissue factor plasma level in patients with acute coronary syndrome. *Physiol. Res.* 2009; 58: 661-667.
- ¹³³. Sambola A, Osende J, Hathcock J et al. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation* 2003; 107: 973-7.
- ¹³⁴. Keller TT, Nagel C, Te Velthuis H et al. Tissue factor serum levels and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Circ Res* 2006; 99: 1261-9.
- ¹³⁵. Steppich B, Mattisek Ch, Sobczyk D et al. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2005; 93: 35-9.
- ¹³⁶. Ott I. Tissue factor in acute coronary syndrom. *Semin Vasc Med* 2003; 3: 185-92.
- ¹³⁷. Malarstig A, Tenno T, Johnston N et al. Genetic variations in the tissue factor gene are associated with clinical outcome in acute coronary syndrome and expression levels in human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2667-72.
- ¹³⁸. Ott I, Koch W, von Beckerath N et al. Tissue factor promoter polymorphism- 603 A/G is associated with myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2004; 177: 189-91.

-
- ¹³⁹. Molero L, Lopez-Farre A, Mateos-Caceres PJ et al. Effect of clopidogrel on the expression of inflammatory markers in rabbit ischemic coronary artery. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 419-24.
- ¹⁴⁰. Steiner S, Seidinger D, Huber K et al. Effect of glycoprotein IIb/IIIa antagonist abciximab on monocyte-platelet aggregates and tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1697-702.
- ¹⁴¹. Scholz T, Zhao L, Temmler U et al. The GPIIb/IIIa antagonist eptifibatid markedly potentiates platelet-leukocyte interaction and tissue factor expression following platelet activation in whole blood in vitro. *Platelets* 2002; 13: 401-6.
- ¹⁴². Ahmad S, Jeske WP, Ma Q et al. Inhibition of tissue factor –activated platelets by low-molecular weight heparins and glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist. *Throm Res* 2001; 102: 143-51.
- ¹⁴³. Osnes LT, Foss KB, Joo GB et al. Acetylsalicylic acid and sodium salicylate inhibits LPS-induced NF-kappa B/c-Rel nuclear translocation and synthesis of tissue factor (TF) and tumor necrosis factor alfa (TNF-alpha) in human monocytes. *Thromb Haemost* 1996; 76: 970-6.
- ¹⁴⁴. Suefuji H, Ogawa H, Yasue H et al. Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1997; 134: 253-9.
- ¹⁴⁵. Misumi K, Ogawa H, Yasue H et al. Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1998; 81: 22-6.
- ¹⁴⁶. Maly M, Hrachovinova I, Tomasov P et al. Patients with acute coronary syndomes have low tissue factor activity and microparticle count but normal concentration of tissue factor antigen in platelet free plasma: a pilot study. *Eur J Haematol* 2009; 82: 148-53.

-
- ¹⁴⁷. Pyo RT, Sato Y, Mackman N et al. Mice deficient in tissue factor demonstrate attenuated intimal hyperplasia in response to vascular injury and decreased smooth muscle cell migration. *Thromb Haemost* 2004; 92: 451-8.
- ¹⁴⁸. Vojacek J, Sevcikova H, Sevcik R et al. Increased platelet residual activity in patients treated with acetosalicylic acid is associated with increased tissue factor and decreased tissue factor pathway inhibitor plasma levels. *Int J Cardiol* 2011; 146: 479-81.
- ¹⁴⁹. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1686-95.
- ¹⁵⁰. Calabro P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 2003; 108:1930-2.
- ¹⁵¹. Tsojima K, Schwab C, McGeer EG et al. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Clin Pathol* 2001; 158: 1039-51.
- ¹⁵². Koenig W, Khuseyinova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 15-26.
- ¹⁵³. Cirillo P, Golino P, Calabro P et al. C-reactive protein induces tissue factor expression and promotes smooth muscle and endothelial cell proliferation. *Cardiovas Res* 2005; 68: 47-55.
- ¹⁵⁴. Keuren JF, Magdeleyns EJ, Govers-Riemslog JW et al. Effect of storage-induced platelet microparticles on the initiation of and propagation phase of blood coagulation. *Br J Haematol* 2006; 134: 307-13.
- ¹⁵⁵. Szotowski B, Antoniak S, Poller W et al. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ Res* 2005; 96: 1233-39.
- ¹⁵⁶. Schechter AD, Spirn B, Rossikhina M et al. Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 2000; 87: 126-32.

-
157. Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY et al. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40. *Circulation* 1997; 96: 396-9.
 158. Yamamoto N, Ogawa H, Oshima S et al. The effect of heparin on tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2000; 75: 267-74
 159. Li A, Wun TC. Proteolysis of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) by plasmin: effect of TFPI activity. *Thromb Haemost* 1998; 80: 423-7.
 160. Dahm A, Van Hylckama Vlieg A, Bendz B et al. Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2003; 101: 4387-92.
 161. Morange PE, Blankenberg S., Alessi MC et al. Prognostic value of plasma tissue factor and tissue factor pathway inhibitor for cardiovascular death in patients with coronary artery disease: The AtheroGene study. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 475-82.
 162. Morange PE, Simon C, Alessi MC et al. Endothelial cell markers and risk of coronary heart disease: the Prospective Epidemiological Study of myocardial Infarction (PRIME) study. *Circulation* 2004; 109: 1343-8.
 163. Abendschein DR, Meng YY, Torr-Brown S et al. Maintenance of coronary patency after fibrinolysis with tissue factor pathway inhibitor. *Circulation*. 1995; 92: 944-9.
 164. Badimon JJ, Lettino M, Toschi V et al. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* 1999; 99: 1780-7.
 165. Nishida T, Ueno H, Atsuchi N et al. Adenovirus-mediated local expression of human tissue factor pathway inhibitor eliminates shear stress-induced recurrent thrombosis in the injured carotid artery of the rabbit. *Circ Res* 1999; 84: 1446-52.

-
- ¹⁶⁶. Zoldeyi P, Chen ZQ, Shelat HS et al. Local gene transfer of tissue factor pathway inhibitor regulates intimal hyperplasia in atherosclerotic arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4078-83.
- ¹⁶⁷. Zhang Y, Cliff WJ, Schoefl GI et al. Immunohistochemical study of intimal microvessels in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol* 1993; 143: 167-72.
- ¹⁶⁸. Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Crecq L et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J* 1993; 296: 803-9.
- ¹⁶⁹. Tayebjee M, Nadar S, Blann AD et al. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension: relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Hypertens* 2004; 17: 764-9
- ¹⁷⁰. Maxwell PR, Timms PM, Cahndran S et al. Peripheral blood level alterations of TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 in patients with type 1 diabetes. *Diabet Medicine* 2001; 18: 777-80.
- ¹⁷¹. Derosa G, Avanzini MA, Geroldi D et al. Matrix metalloproteinase 2 may be a marker of microangiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 273-4.
- ¹⁷². Nakazawa T, Chiba T, Kaneko E et al. Insulin signalling in arteries prevents smooth muscle apoptosis. *Arterioscler Thomb Vasc Biol* 2005; 25: 760-5.
- ¹⁷³. Tayebjee MH, Lip GYH, Tan KT et al. Plasma matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and CD40 ligand levels in patients with stable coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2005; 96: 339-45.
- ¹⁷⁴. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 368-72

-
- ¹⁷⁵. Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H et al. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J* 2001; 141: 211–7.
- ¹⁷⁶. Ferroni P, Basili S, Martini F et al. Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. *J Invest Med* 2003; 51:295–300.
- ¹⁷⁷. Eckart RE, Uyehara CF, Shry EA et al. Matrix metalloproteinases in patients with myocardial infarction and percutaneous revascularization. *J Interv Cardiol* 2004; 17: 27–31
- ¹⁷⁸. Derosa G, Cicero AF, Scalise F et al. Metalloproteinase-2 and -9 in diabetic and nondiabetic subjects during acute coronary syndromes. *Endothelium*. 2007; 14: 45-51.
- ¹⁷⁹. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M et al. Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation* 1995; 91: 2125-31.
- ¹⁸⁰. Zeng B, Prasan A, Fung KC et al. Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 and -2 in patients with symptomatic coronary artery disease. *Intern Med J* 2005; 35: 331–5.
- ¹⁸¹. Noji Y, Kajinami K, Kawashiri M et al. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 380-4.
- ¹⁸² Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P.: Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 90: 775-778.
- ¹⁸³ Zempo N, Kenagy RD, AU YPT, Bendeck M, Clowes MM, REidy MA, Clowes AW.: Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery. *J Vasc Sur* 1994; 20: 209-217

-
- ¹⁸⁴ Fukuda D, Shimada K, Tanak A, Kusuyama T, Yamashita H, Ehara S, Nakamura Y, Kawarabayashi T, Iida H, Yoshiyama M, Yoshikawa J.: Comparison of Levels of Serum Matrix Metalloproteinase-9 in Patients With Acute Myocardial Infarction Versus Unstable Angina Pectoris Versus Stable Angina Pectoris. *Am Journal Cardiol* 2006; 97(2): 175-180.
- ¹⁸⁵ Higo S, Uematsu M, Yamagishi M, et al.: Elevation of plasma matrix metalloproteinase-9 in the culprit coronary artery in patients with acute myocardial infarction: clinical evidence from distal protection. *Circ J* 2005; 69: 1180-1185.
- ¹⁸⁶ Bittner A, Alcaino H, Castro PF, Pérez O, Corbalán R, Troncoso R, Chiong M, Rosemarie M, Moraga F, Zanolli D, Winter JL, Zamorano JJ, Díaz-Araya G, Lavandero S.: Matrix metalloproteinase-9 activity is associated to oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. *Int Journ Cardiol* 2008; 143(1):98-100.
- ¹⁸⁷ Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinase in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad and the ugly. *Circulation Res* 2002; 90: 251-262.
- ¹⁸⁸ Derosa G, D'Angelo A, Scalise F, Avanzini MA, Tinelli C, Peros E, Fogari E, Cicero AFG.: Comparison between metalloproteinases-2 and -9 in healthy subjects, diabetics and subjects with acute coronary syndrome. *Heart Vessels* 2007; 22: 361-370.
- ¹⁸⁹ Saren P, Welgus HG, Kovanen PT.: TNF- α and IL- β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol* 1996; 157: 4159-4165.
- ¹⁹⁰ Spinale FG, Coker ML, Krombach SR et al.: Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure: effects on left ventricular dimensions and function. *Circ Res* 1999; 85: 364-376.
- ¹⁹¹ Golub LM, Ramamurthy NS, Llaveneras A et al.: A chemically modified nonantimicrobial tetracycline (CMT-8) inhibits gingival matrix metalloproteinases, Periodontal breakdown,

-
- and extra-oral bone loss in ovariectomized rats. *Ann New York Acad Sci* 1999; 878: 290-310.
- ¹⁹² Karmann K, Hughes CCW, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 2: 4342-4346.
- ¹⁹³ Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP, Simons JC, Denfeld RW, Kiener PA, Aruffo A. Expression of functional CD40 by vascular Endothelial cells. *J Exp Med* 1995; 182: 33-40.
- ¹⁹⁴ Aukrust P, Muller F, Ueland T, et al.: Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina: possible reflection of T-lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 1999; 100: 614-620.
- ¹⁹⁵ Garlich C D, Eskafi S, Raaz D, et al.: Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart* 2001; 86: 649-655.
- ¹⁹⁶ Schönbech U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy J-Y, Fabunmi RP, Libby P. REgulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res.* 1997; 81: 448-454.
- ¹⁹⁷ Nannizzi-Alaimo L, Rubenstein MH, Alves VL, Leong GY, Phillips DR, Gold HK. Cardiopulmonary bypass induces release of soluble CD40 ligand. *Circulation* 2002; 105: 2849-2854.
- ¹⁹⁸ Yip HK, Chang LT, Sun CK et al.: Impact of clopidogrel on suppression of circulating levels of soluble CD40 ligand in patients with unstable angina undergoing coronary stenting. *Am J Cardiol* 2006; 97: 192-194.
- ¹⁹⁹ Vojáček J, Bis J, Dušek J et al. Tkáňový faktor a solubilní liganda CD40 u nemocných s akutním koronárním syndromem. *Cor et Vasa* 2007; 49: 152-154.