

Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové

## **DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program

**Vnitřní nemoci**

**Vybrané imunitní parametry v průběhu akutního infarktu myokardu**

**Selected Immune Markers During Acute Myocardial Infarction**

**MUDr. Lucie Horáková**

Školitel: Prof. MUDr. Radek Pudil, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Obhajoba dne: .....

## **Prohlášení autora**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty Univerzity Karlovy 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.

MUDr. Lucie Horáková

## **Poděkování**

Touto formou bych velmi ráda poděkovala mému školiteli Prof. MUDr. Radku Pudilovi, Ph.D. za jeho cenné rady a pokyny, které mi poskytl v průběhu celého postgraduálního studia a při vypracování disertační práce. Poděkování dále patří Prof. RNDr. Miloši Tichému, CSc. a RNDr. Martině Vašatové, Ph.D. z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN HK a Prof. RNDr. Janu Krejskovi, CSc., Doc. RNDr. Ctiradu Andrýsovi, Ph.D. a Mgr. Martině Koláčkové, Ph.D. z Ústavu klinické imunologie a alergologie FN HK za pomoc při zpracovávání, měření a vyhodnocování odebraných vzorků.

<b>1</b>	<b>OBSAH</b>	
<b>2</b>	<b>POUŽITÉ SYMBOLY A ZKRATKY.....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>PŘEDMLUVA.....</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>AKUTNÍ INFARKT MYOKARDU S ELEVACEMI ST SEGMENTŮ .....</b>	<b>12</b>
4.1	Definice akutního infarktu myokardu s elevacemi ST segmentů .....	12
4.2	Epidemiologie .....	14
4.3	Etiologie.....	15
4.4	Diagnostika.....	15
4.4.1	Anamnéza, fyzikální vyšetření a EKG záznam.....	16
4.4.2	Zobrazovací vyšetření .....	17
4.4.3	Biochemická detekce myokardiální nekrózy.....	18
4.4.4	Další markery s možným využitím pro diagnostiku ischemie a nekrózy myokardu .....	20
4.5	Terapie .....	22
<b>5</b>	<b>ISCHEMICKO REPERFUZNÍ POŠKOZENÍ.....</b>	<b>24</b>
5.1	Změny v průběhu ischemicko reperfuzního poškození.....	24
5.2	Terapeutické ovlivnění ischemicko reperfuzního poškození.....	26
<b>6</b>	<b>CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH PARAMETRŮ .....</b>	<b>29</b>
6.1	Markery ischemie a nekrózy myokardu .....	29
6.1.1	Troponin T (hsTnT) a troponin I (TnI) .....	29
6.1.2	Kreatinkináza (CK) a její MB izoenzym (CK-MB) .....	29
6.1.3	Myoglobin (MYO, MB) .....	30
6.1.4	Karboanhydráza III (CAIII).....	31
6.1.5	Glykogenfosforyláza BB (GPBB).....	31
6.1.6	Srdeční izoforma proteinu vázajícího mastné kyseliny (h-FABP) .....	32

6.2	Imunitní markery.....	34
6.2.1	Pentraxin 3 (PTX3).....	34
6.2.2	Solubilní glykoprotein 130 (sGP130).....	35
6.2.3	CD163 a jeho solubilní forma (sCD163).....	35
6.2.4	Solubilní CD95/fas, CD95, CD95L.....	36
<b>7</b>	<b>CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....</b>	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>STANOVENÍ PARAMETRŮ HUMORÁLNÍ IMUNITY.....</b>	<b>39</b>
8.1	Metodika.....	39
8.1.1	Soubor pacientů.....	39
8.1.2	Stanovení jednotlivých parametrů.....	42
8.1.3	Statistika.....	43
8.2	Výsledky parametrů humorální imunity.....	43
8.2.1	Analýza změn hladin sledovaných parametrů v průběhu 96 hodin akutního STEMI.....	43
8.2.2	Porovnání hladin parametrů humorální imunity s markerem strukturálního poškození myokardu (hsTnT).....	48
8.2.3	Posouzení vztahu parametrů humorální imunity k rozsahu poškození myokardu LK vyjádřeným hodnotou ejekční frakce levé komory.....	54
8.3	Diskuse.....	64
<b>9</b>	<b>VYUŽITÍ NOVÝCH BIOČIPOVÝCH TECHNOLOGIÍ KE STANOVENÍ VYBRANÝCH PARAMETRŮ.....</b>	<b>68</b>
9.1	Metodika.....	68
9.1.1	Soubor pacientů.....	68
9.1.2	Stanovení jednotlivých parametrů.....	71
9.1.3	Statistika.....	72
9.2	Výsledky použité metody proteinových biočipů.....	72
9.2.1	Analýza změny hladin sledovaných parametrů v průběhu 96 hodin akutního STEMI.....	72
9.2.2	Porovnání hladin těchto parametrů s markerem strukturálního poškození	

myokardu (hsTnT).....	79
9.2.3 Posouzení vztahu sledovaných parametrů k rozsahu poškození myokardu LK vyjádřeným hodnotou ejekční frakce levé komory.....	89
9.3 Diskuse.....	101
<b>10 ZÁVĚR .....</b>	<b>106</b>
<b>11 SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>108</b>
<b>12 LITERATURA.....</b>	<b>110</b>

## 2 Použité symboly a zkratky

ACT	Aktivovaný koagulační čas
AIM	Akutní infarkt myokardu
ATP	Adenosintrifosfát
BNP	Mozkový natriuretický protein
CAIII	Karboanhydráza III
CK	Kreatinkináza
CK-MB	Myokardiální izoenzym kreatinkinázy
CK-MB mass	Koncentrace myokardiálního izoenzymu kreatinkinázy
CRP	C-reaktivní protein
EF	Ejekční frakce
EKG	Elektrokardiogram
ET-1	Endotelin-1
Gal-3	Galektin 3
GDF-15	Růstový diferenciační faktor 15
GPBB	Glykogenfosforyláza BB
GPLL	Glykogenfosforyláza LL (liver isoform)
GPMM	Glykogenfosforyláza MM (muscle isoform)
H-FABP	Srdeční izoforma proteinu vázajícího mastné kyseliny
HSP	Heat shock protein
hsTnT	Vysoce senzitivní srdeční troponin T
ICAM-1	Mezibuněčná adhezní molekula 1
I-FABP	Střevní izoforma proteinu vázajícího mastné kyseliny



IL-6	Interleukin 6
IR	Ischémie reperfuze
IRI	Ischemicko reperfuční poškození
IRAK-1	Kináza asociovaná s receptorem pro interleukin 1
IRF3	Interferon regulační faktor 3
LBBB	Blok levého Tawarova raménka
LD	Laktátdehydrogenáza
L-FABP	Jaterní izoforma proteinu vázajícího mastné kyseliny
LK	Levá komora srdeční
MCP-1	Monocyty chemoatrahující protein-1
MKK3	Mitogeneticky aktivovaná proteinkináza 3
MLC-1	Lehké řetězce myosinu
MMP	Matrixmetaloproteináza
MPO	Myeloperoxidáza
mPTP	Mitochondriální permeabilní transivní póry
MyD88	Protein 88 pro primární odpověď na myeloidní diferenciaci
MYO	Myoglobin
NT-proBNP	N-terminální fragment mozkového natriuretického proteinu
NYHA	New York Heart Association
PAF	Destičky aktivující faktor
PAMPs	Patogenem asociované molekulární vzory
PCI	Perkutánní koronární intervence
PTX 3	Pentraxin 3

RBBB	Blok pravého Tawarova raménka
sGP130	Solubilní glykoprotein 130
STEMI	Akutní infarkt myokardu s elevacemi ST segmentů
TIMI	Skórovací systém hodnotící rychlost průtoku koronární cévou
TLR	Toll-like receptory
TNF alfa	Tumor nekrotizující faktor alfa
TnI	Troponin I
TRAF	Faktor asociovaný s receptorem pro TNF
TRAIL	Liganda spojená s TNF indukující apoptózu
TRAM	Molekula související s TRIF
TRIF	TIR doména obsahující protein indukující IFN- $\beta$ - transkripční faktor

### 3 Předmluva

Akutní koronární syndromy, především akutní infarkt myokardu, patří i v současnosti mezi nejzávažnější onemocnění v kardiologii. Současná terapie, kterou představuje co nejrychlejší reperfúze uzavřené koronární tepny, velmi významně přispěla ke zlepšení přežívání nemocných, a to především díky zmenšení výsledného rozsahu ložiska myokardiální nekrózy, snížení výskytu mechanických komplikací a rozvoje srdečního selhání. Stále otevřenou otázkou ale zůstává samotná patogeneze tzv. ischemicko-reperfúzního poškození myokardu a případné možnosti terapeutického ovlivnění tohoto procesu s cílem dosáhnout zvýšeného přežívání myocytů, a zlepšit tak další prognózu pacientů. Ukazuje se, že proces ischemie a reperfúze je komplexní, zahrnuje řadu patogenetických procesů a aktivuje řadu systémů, mezi kterými má významné místo aktivace imunitního systému. Pro případné terapeutické intervence je třeba nejdříve beze zbytku pochopit procesy, ke kterým dochází po zprůchodnění koronární tepny v myokardu.

Cílem této disertační práce je přispět k pochopení některých procesů ischemie a reperfúze a to především bližším poznáním některých imunopatologických procesů, které proces ischemie a reperfúze v průběhu akutního infarktu myokardu s elevacemi ST segmentů provázejí. Dalším přínosem je poukázat na možnosti využití nových technologií ve stanovení kardiálních markerů.

## 4 Akutní infarkt myokardu s elevacemi ST segmentů

### 4.1 Definice akutního infarktu myokardu s elevacemi ST segmentů

Definice akutního infarktu myokardu s elevacemi ST segmentů (STEMI) zaznamenaly v posledních letech velké změny. Podle současných doporučení je akutní infarkt myokardu definován jako průkaz myokardiální nekrózy při klinickém stavu odpovídajícímu myokardiální ischemii. Kritéria pro stanovení diagnózy akutního infarktu myokardu byla publikována v podobě tzv. třetí definice infarktu myokardu v roce 2012 [1]. Následně byla tato kritéria přijata a zveřejněna Českou kardiologickou společností [2]. Podle těchto doporučení lze termínem akutní infarkt myokardu (AIM) označit stavy, které jsou provázeny průkazem myokardiální nekrózy za současné přítomnosti klinických známek konzistentních s akutní ischemií myokardu a při splnění kteréhokoliv z následujících kritérií:

- průkaz vzestupu a/nebo poklesu srdečních markerů (preferenčně srdečního troponinu) s alespoň jednou hodnotou přesahující 99. percentil a současné splnění alespoň jedné podmínky: příznaky ischemie, nové změny ST-T segmentu nebo nový blok levého Tawarova raménka (LBBB), vznik nového kmitu Q na EKG, průkaz nové ztráty viabilního myokardu nebo regionální poruchy kinetiky či přítomnost intrakoronárního trombu zjištěného při koronarografii či pitvě
- srdeční smrt s příznaky svědčící pro ischemii a s nálezem nových ischemických změn nebo LBBB na EKG a pokud smrt nastala ještě před odběrem kardiálních markerů nebo tehdy, pokud ještě nemohlo dojít k jejich vzestupu
- o periprocedurálním infarktu myokardu při perkutánní koronární intervenci (PCI) hovoříme tehdy, pokud dojde k alespoň 5ti násobnému vzestupu TnT nad URL nebo vzestupu TnT alespoň o 20% v případě jeho zvýšené hladiny a to za přítomnosti: symptomů ischemie, nových ischemických změn na EKG, angiografického průkazu periprocedurální komplikace nebo průkazu ztráty viabilního myokardu či nové lokální poruchy kinetiky
- o periprocedurálním infarktu myokardu při aortokoronárním bypassu mluvíme tehdy, pokud dojde k alespoň 10ti násobnému vzestupu TnT nad URL nebo k vzestupu TnT alespoň o 20% v případě jeho předchozí zvýšené hladiny a to za přítomnosti: symptomů, nových ischemických změn na EKG, angiografického

průkazu periprocedurální komplikace nebo ztráty viabilního myokardu či nové regionální poruchy kinetiky

- trombóza stentu asociovaná s infarktem myokardu prokázaná angiograficky nebo při pitvě, předcházejí-li jí příznaky ischémie a vzestup a/nebo pokles kardiálních markerů s alespoň jednou hodnotou přesahující 99. percentil URL.

Tabulka č. 1: Definice akutního infarktu myokardu podle dokumentu Third universal definition of myocardial infarction. Upraveno podle Thygesena K et al. European Heart Journal (2012) 33, 2551–2567).

<b>Definice infarktu myokardu</b>
<b>Kritéria akutního infarktu myokardu</b>
Termín akutní infarkt myokardu lze použít v případě průkazu myokardiální nekrózy a příznaků akutní ischémie myokardu při splnění kteréhokoliv z následujících kritérií: <ul style="list-style-type: none"><li>• vzestup a/nebo pokles srdečních markerů (preferenčně srdečního troponinu, cTn) s alespoň jednou hodnotou přesahující 99. percentil URL a současně alespoň jedné podmínky:<ul style="list-style-type: none"><li>- příznaky ischémie</li><li>- nové změny ST-T segmentu nebo nový blok levého Tawarova raménka (LBBB)</li><li>- rozvoj nového Q kmitu na EKG</li><li>- průkaz nové ztráty viability myokardu nebo nové regionální poruchy kinetiky</li><li>- průkaz intrakoronárního trombu při angiografii nebo pitvě</li></ul></li><li>• srdeční smrt se symptomy svědčícími pro ischémii myokardu a nálezem nových ischemických změn nebo LBBB na EKG, kdy smrt nastala ještě před odběrem kardiálních markerů nebo v době, kdy ještě nemohlo dojít k jejich vzestupu</li><li>• periprocedurální infarkt myokardu při perkutánní koronární intervenci je definován alespoň pětinásobným vzestupem cTn nad URL nebo vzestup cTn alespoň o 20% v případě jeho předchozí zvýšené hladiny a to za přítomnosti: 1) symptomů ischémie, 2) nových ischemických EKG změn, 3) angiografického průkazu periprocedurální</li></ul>

komplikace nebo 4) průkazu ztráty viabilního myokardu či lokálních poruch kinetiky

- trombóza stentu asociovaná s infarktem prokázaná angiograficky nebo při pitvě za předchozích příznaků myokardiální ischemie a se vzestupem a/nebo poklesem kardiálních markerů s alespoň jednou hodnotou přesahující 99. percentil URL
- periprocedurální infarkt myokardu při aortokoronárním bypassu je definován alespoň desetinásobným vzestupem cTn nad URL nebo vzestup cTn alespoň o 20% v případě předchozí zvýšené hladiny a to za přítomnosti: 1) symptomů ischemie, 2) nových ischemických EKG změn, 3) angiografického průkazu periprocedurální komplikace nebo 4) průkazu ztráty viabilního myokardu či lokálních poruch kinetiky

### **Kritéria prodělaného infarktu myokardu**

Kterákoliv z následujících podmínek splňuje diagnózu prodělaného infarktu myokardu:

- patologický kmit Q s nebo bez příznaků po vyloučení neischemických příčin
- průkaz oblasti ztráty viabilního myokardu (ztenčení stěny a porucha kontraktility) po vyloučení neischemických příčin
- patologický průkaz

Upraveno podle Thygesena K et al. European Heart Journal (2012) 33, 2551–2567) [1]

U pacientů se STEMI dochází téměř pravidelně ke změnám hladin markerů myokardiální nekrózy a k rozvoji patologického kmitu na EKG záznamu. Současná doporučení rozlišují několik typů AIM: spontánní infarkt myokardu (Typ I), infarkt myokardu způsobený ischemickou nerovnováhou (Typ II), srdeční smrt v důsledku AIM (Typ III), AIM při perkutánní koronární intervenci (Typ IV) a AIM při aortokoronárním bypassu (Typ V) [1, 2].

## **4.2 Epidemiologie**

Na akutní infarkt myokardu zemře v Evropě každý šestý muž a každá sedmá žena. Incidence STEMI se liší podle jednotlivých regionů, nicméně dle švédského registru je incidence STEMI 66 pacientů na 100 000 obyvatel/rok. Podobné výsledky jsou i z České republiky nebo Belgie [3]. Dle registru z USA dochází v průběhu posledních 8 let ke snížení incidence pacientů se STEMI. Mortalita těchto pacientů je ovlivňována celou řadou faktorů: věk, komorbidity, přítomnost srdečního selhávání, rozsah koronárního

postižení, ejekční frakce (EF) levé komory nebo poskytnutou léčbou (PCI, moderní antitrombotická léčba, sekundární prevence). Nemocniční mortalita v neselektované skupině pacientů se STEMI je udávána mezi 6-14%, mortalita v následujících 6 měsících se pohybuje okolo 12% [3].

V Královéhradeckém kraji bylo v roce 2012 ošetřeno 623 akutních infarktů myokardu a direktní PCI byla provedena u 459 pacientů (poskytnuto oddělením intervenční kardiologie I. Interní kardiologické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové).

### **4.3 Etiologie**

Existuje celá řada příčin vedoucích k postižení koronárních cév. Více jak v 90% je za příčinou infarktu myokardu ateroskleróza. Mezi vzácnější příčiny můžeme zařadit trombózu, embolii do věnčitých cév způsobujících jejich okluzi, zánětlivá onemocnění (tj. arteritidy), spazmy anebo disekce koronární tepny (spolupodíl stresové zátěže, silný náraz do prekordia např. při autonehodách aj.).

Ateroskleróza, které se budeme věnovat v další kapitole, častěji vzniká u pacientů s rizikovými faktory, jako jsou dyslipidémie, nekorigovaná arteriální hypertenze, obezita, diabetes mellitus, kouření, mužské pohlaví, vyšší věk, pozitivní rodinná zátěž nebo nedostatečná fyzická aktivita.

### **4.4 Diagnostika**

Základem pro stanovení diagnózy AIM, resp. STEMI, je anamnéza, fyzikální a biochemické vyšetření, EKG záznam a také zobrazovací metody (viz tabulka č. 1). Iniciální diagnostika STEMI je zásadní pro management onemocnění (tabulka č. 2) - rozhoduje o volbě optimální efektivní terapie, kterou je včasná reperfuze uzavřené koronární tepny.

Tabulka č. 2: Doporučení pro časnou diagnostiku AIM podle doporučení Evropské kardiologické společnosti (Upraveno podle dokumentu ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in the patients presenting with ST-segment elevation, Steg G., European Heart Journal, 2012, 33, p. 2569-2619).

Doporučení	Třída doporučení	Úroveň důkazů
Provedení 12ti svodového EKG jak jen je to možné, optimálně do 10 minut od prvního kontaktu s lékařem.	I	B
Monitorace EKG musí být u všech pacientů s podezřením na STEMI zajištěna co možná nejdříve.	I	B
V akutní fázi AIM je rutinně doporučováno odebrání krevního vzorku k biochemickému vyšetření, čekání na výsledky ale nesmí zbrzdit zahájení reperfuční terapie.	I	C
Je doporučeno použití zadních svodů u pacientů s vysokou suspekci na inferobazální infarkt myokardu (okluze ramus circumflexus).	IIa	C
V nejasných případech nám může k diagnostice AIM pomoci echokardiografické vyšetření, které by ale nemělo oddálit provedení koronarografického vyšetření.	IIb	C

Pozn.: Třída doporučení: I (všeobecné doporučení je jednoznačně potvrzeno jako prospěšné, bezpečné a je tudíž doporučováno), II (a - doporučený postup je považovaný za přijatelný a užitečný a studie i experti tyto postupy podporují, b - doporučený postup je přijatelný a užitečný, ale studie i názory expertů tento postup silně neupřednostňují), III (není doporučeno, postup není přijatelný).

Úroveň důkazů: A (data podporována několika randomizovanými studiemi a metaanalýzami), B (data podporována jednou randomizovanou studií a nerandomizovanými studiemi), C (data podporována konsenzem vědců, malými studiemi, registry a retrospektivními studiemi).

#### 4.4.1 Anamnéza, fyzikální vyšetření a EKG záznam

Pro diagnostiku AIM je typická tlaková, svíravá bolest lokalizovaná nejčastěji za hrudní kostí, která trvá déle než 20 minut a nereaguje na podání krátkodobých nitrátů (nitroglycerinu). Bolest nemusí být intenzivní a velmi často se propaguje do krku, dolní



čelisti, ramen nebo do horních končetin (častěji levé) [4]. Až 30% pacientů se prezentuje ne zcela typickými obtížemi, jako jsou: nauzea a zvracení, únava, dušnost, palpitace nebo synkopa. Těmito pacienty jsou nejčastěji ženy, diabetici a starší pacienti [3].

Nedílnou součástí ke stanovení diagnózy AIM je provedení 12ti svodového EKG, které by mělo být zhotoveno a interpretováno do 10ti minut od prvního kontaktu pacienta s lékařem. V případě STEMI nalézáme typické elevace ST segmentů nebo srdeční arytmii, je-li v akutním stavu AIM provázen komorovou tachykardií či fibrilací komor. V časně fázi AIM mohou také předcházet elevacím ST segmentů symetrické hrotnaté vlny T, které nacházíme alespoň ve dvou sousedních svodech. K posouzení elevací ST úseků používáme bod J a nová elevace bodu J o  $\geq 0,1$  mV musí být přítomna u mužů i u žen ve všech svodech kromě svodu V2-3. Ve svodech V2-3 je za elevaci ST segmentů považována nová elevace J bodu o  $\geq 0,2$  mV u mužů starších 40 let, o  $\geq 0,25$  mV u mužů mladších 40 let a o  $\geq 0,15$  mV u žen bez ohledu na věk [2, 3]. O STEMI spodní stěny hovoříme při elevaci ST segmentů ve svodech II, III a aVF, STEMI laterálně se projevuje elevacemi ST ve svodech I, aVL, V5-6, pro STEMI přední stěny jsou typické elevace ST V1-4, pro anteroextenzivní elevace ST ve V1-6, elevace ve svodech V3R a V4R vypovídají o postižení volné stěny pravé komory (jako pozitivní jsou hodnoceny elevace o  $\geq 0,05$  mV a u mužů pod třicet let o více než  $\geq 0,1$  mV) a svody V7-9 ukazují postižení lokalizované inferobazálně [2, 3]. Tyto prahové hodnoty ale neplatí u pacientů s LBBB nebo s hypertrofií levé komory srdeční. U pacientů s blokem pravého Tawarova raménka (RBBB) se objevují abnormality ST úseků velmi často a o AIM uvažujeme pouze v přítomnosti stenokardií či nových změn ST segmentů či rozvoje kmitu Q. V diferenciální diagnostice elevací ST segmentů je třeba mít na paměti, že ke změnám ST úseků dochází také velmi často u akutní perikarditidy, syndromu Brugadaových, kardiomyopatií (např. Tako-tsubo kardiomyopatie) nebo u syndromu časně repolarizace [2].

Diagnostika AIM u pacientů s LBBB je mnohdy velmi obtížná a ke správné diagnostice nám napomáhá: přítomnost symptomů (stenokardie udávané pacientem), pokud je LBBB nově vzniklý anebo přítomnost konkordantních elevací ST segmentů [3].

#### **4.4.2 Zobrazovací vyšetření**

Nová doporučení České kardiologické společnosti i Evropské kardiologické společnosti vymezují důležitou roli zobrazovacích metod v diagnostice akutních koronárních syndromů, a to průkazem nové ztráty viability myokardu a nové regionální

poruchy kinetiky (viz tabulka č. 1). Mezi snadno dostupné, relativně levné a rutinně prováděné vyšetření patří echokardiografie, která nám okamžitě určí celkovou funkci LK (EF) a lokální poruchy kinetiky, posoudí tíži chlopenních vad a možné komplikace AIM. Provedení echokardiografického vyšetření je tedy velmi často využíváno již v akutní fázi AIM, ale v žádném případě by nemělo oddálit provedení koronarografického vyšetření s eventuální PCI. V některých specifických situacích (např. při nutnosti prokázat čerstvý infarkt myokardu v indikacích pro implantaci ICD) je možné využít např. magnetickou rezonanci, která v případě nově vzniklého infarktu myokardu ukáže edém myokardiální tkáně. Podobně je v některých případech indikována počítačová tomografie, která může přispět k upřesnění některých morfologických poměrů či komplikací infarktu myokardu (např. intramurální hematom a podobně). V době mimo akutní fázi je možné využít některých specifických zátěžových vyšetření k posouzení viability myokardu (např. dobutaminovou echokardiografii, SPECT, MR srdce apod.) [3].

#### **4.4.3 Biochemická detekce myokardiální nekrózy**

O akutním infarktu myokardu hovoříme pouze tehdy, je-li biochemicky prokázána nekróza myokardu, která je doprovázená symptomy odpovídajícími akutní ischemii myokardu (viz tabulka č. 1). K nekróze myocytů dochází vždy až po určité době (cca po 2-4 hodinách) a tato doba do vzniku nekrózy je závislá na celé řadě dalších faktorů: vnímavosti, resp. adaptaci myocytů k ischemii (preconditioning), přítomnosti kolaterálního řečiště, závažnosti okluze koronární cévy anebo trvání délky uzávěru [1, 2].

V dnešní době máme k dispozici celou řadu markerů, jejichž hladiny se v případě nekrózy kardiomyocytů mění (viz text níže). Českou i Evropskou kardiologickou společností je ale preferovaným a v současné době jednoznačně doporučovaným markerem k průkazu myokardiální nekrózy stanovení srdečních troponinů T nebo I (hsTnT nebo TnI). V současné době jsou používány vysocesenzitivní metody, které zvyšují především senzitivitu metody a umožňují stanovit diagnózu podstatně dříve. V případě nedostupnosti stanovení troponinů může být použito stanovení MB frakce kreatinkinázy (CK-MB) [1, 2]. Pro diagnostiku AIM má význam nejenom přítomnost vyšší koncentrace troponinů, ale důležitou roli hraje i jejich dynamika (vzestup a pokles koncentrací v krevním odběru při přijetí a s odstupem 3-6 hodin, kdy je alespoň jedna hodnota zvýšená). Za zvýšenou hodnotu hsTnT považujeme vzestup koncentrace nad 99. percentil referenční populace zdravých osob a tato hodnota je pro diagnostiku AIM

stěžejní. Přesnost stanovení je pak vyjádřena variačním koeficientem (optimálně je-li variační koeficient pod 10%, metody s variačním koeficientem nad 20% by neměly být používány) [1, 2].

K vzestupu koncentrací troponinů dochází nejenom v průběhu AIM, kdy jde o primárně ischemické poškození, ale z řady dalších příčin, které mohou být také provázeny nekrózou myokardu. Tyto stavy pak neoznačujeme jako infarkt myokardu, ale měli bychom mluvit o poškození myokardu. Mezi možné příčiny poškození myokardu patří srdeční selhání, selhání ledvin, popáleniny, cévní mozkové příhody, extrémní fyzická zátěž a jiné (viz tabulka č. 3).

Tabulka č. 3: Přehled některých stavů, které vedou k vzestupu hladiny srdečních troponinů.

<b>Primárně ischemické poškození myokardu</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• ruptura plátu</li><li>• intrakoronární trombus</li></ul>
<b>Ischemické poškození myokardu v důsledku nerovnováhy mezi zásobením a potřebami myokardu</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• tachy/brady arytmie</li><li>• disekce aorty nebo těžké postižení aortální chlopně</li><li>• hypertrofická kardiomyopatie</li><li>• kardiogenní, hypovolemický nebo septický šok</li><li>• těžké respirační selhání</li><li>• těžká anémie</li><li>• hypertenze s/nebo bez hypertrofie levé komory</li><li>• koronární spasmus</li><li>• embolie koronární arterie, vaskulitida</li><li>• koronární endoteliální dysfunkce</li></ul>
<b>Neischemické poškození myokardu</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• kontuze myokardu, chirurgické výkony, ablace, stimulace, výboj defibrilátoru</li><li>• rhabdomyolýza s postižením myokardu</li><li>• myokarditida</li><li>• kardiotoxicita, např. antracykliny, herceptin, aj.</li></ul>

### **Multifaktoriální nebo neurčená poškození myokardu**

- srdeční selhání
- stresová (Tako-tsubo) kardiomyopatie
- těžká embolizace plicní nebo plicní hypertenze
- sepse, kritické stavy
- renální selhání
- těžká neurologická onemocnění, např. CMP, subarachnoidální krvácení
- infiltrativní procesy, např. amyloidóza, sarkoidóza
- extrémní fyzická zátěž

Upraveno podle Thygesena K et al., J Am Coll Cardiol 2012;60:1581–98 [1]

V posledních letech je věnována objevování nových markerů, které mají vztah k ischemii anebo nekróze myokardu, stále velká pozornost. Snahou je objevit markery, které mají časnou dynamiku při AIM, které by byly snadno dostupné, levné a snadno stanovitelné i reprodukovatelné.

#### **4.4.4 Další markery s možným využitím pro diagnostiku ischemie a nekrózy myokardu**

V klinické praxi je k průkazu nekrózy myokardu možné využít i některých dalších markerů, které jsou v porovnání se stanovením srdečních troponinů podstatně méně specifické pro průkaz myokardiální nekrózy. Patří mezi ně: stanovení enzymu kreatinkinázy (CK) [5, 6, 7] a jejího izoenzymu MB (CK-MB) [8, 9, 10, 11], v tzv. perakutní fázi je možné využít stanovení myoglobinu (MYO) [11, 12, 13], naopak v pozdější fázi je možné využít stanovení laktátdehydrogenázy (LD), a to především její izoformy LD-1 [14, 15]. Obě stanovení mají pro průkaz nekrózy myokardu velmi nízkou specifitu. Na pomezí vstupu do klinické praxe stojí novější, avšak méně specifické markery ischemického poškození myokardu, mezi které se řadí srdeční mastné kyseliny vázící protein (hFABP) [16, 17, 18] a glykogenfosforyláza BB (GPBB) [17, 19, 20, 21]. Jejich stanovení společně s určením hladiny troponinů může být užitečné v rámci tzv. multimarkerové strategie pro diferenciální diagnostiku bolestí na hrudi s cílem zvýšit specifitu a senzitivitu. V tabulce č. 4 je uvedena kinetika hladin těchto markerů v průběhu akutního infarktu myokardu s elevacemi ST segmentů.

Tabulka č. 4: Kinetika hladin vybraných markerů nekrózy myokardu v průběhu akutního infarktu myokardu s elevacemi ST segmentů.

Parametr	Čas první detekce	Dosažení maxima	Doba
hsTnT	2 – 4 hodiny	12 – 30 hodin	10 – 14 dnů
TnI	4 – 6 hodin	12 - 30 hodin	6 – 10 dnů
CK	4 – 6 hodin	16 – 36 hodin	3 – 6 dnů
CKMB mass	3 – 8 hodin	16 – 24 hodin	2 – 3 dny
MYO	2 – 4 hodiny	6 – 12 hodin	24 hodin
LD	6 – 12 hodin	24 - 60 hodin	10 dnů
hFABP	30 minut	4 – 6 hodin	20 – 24 hodin
GPBB	60 minut	6 – 10 hodin	24 – 30 hodin

Vysvětlení zkratk: hsTnT – vysoce senzitivní troponin T, TnI – troponin I, CK - kreatinkináza, CKMB mass – koncentrace myokardiálního izoenzymu kreatinkinázy, MYO - myoglobin, LD - laktátdehydrogenáza, hFABP – heart-fatty acid binding protein, GPBB – glykogenfosforyláza BB.

Do současnosti byl popsán velký počet markerů, jejichž hladina se mění v průběhu infarktu myokardu a její výše je asociována s rozsahem nekrózy myokardu. Zároveň jejich stanovení může mít i prognostický význam. Patří mezi ně markery strukturálních změn provázejících akutní infarkt myokardu (např. lehké řetězce myosinu (MLC-1) [22], matrixmetaloproteinázy (MMP) a jejich inhibitory [23, 24, 25, 26], galektin 3 [25, 26], aj.) a dále markery odrážející poškozenou funkci myokardu (endotelin 1 [27], natriuretické peptidy, urokortin, kopeptin [28], arginin-vasopresin a podobně). Některé z těchto parametrů jsou klinicky využitelné (natriuretické peptidy, které odrážejí stupeň poškození kontraktility myokardu a je možné jich využít i pro stratifikaci rizika), většina je však doposud předmětem výzkumu. Tabulka č. 5 ukazuje přehled některých potenciálně zajímavých parametrů, které jsou předmětem intenzivního výzkumu v průběhu ischémie a reperfuze myokardu.

Tabulka č. 5: Přehled vybraných markerů zasahujících do procesu ischémie a reperfuze v průběhu infarktu myokardu.

Proces	Jednotlivé markery
Poškození myokardu a apoptóza	troponiny T a I, srdeční izoforma proteinu vázající mastné kyseliny (h-FABP), MB frakce kreatinkinázy (CK-MB), lehké řetězce myosinu (MLC-1), dále pak solubilní

	apoptózu stimulující fragment (sFas), sTRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), heat shock protein 60
Markery oxidativního stresu	oxidované LDL částice, myeloperoxidáza (MPO), 8-hydroxy-2-deoxyguanosin v moči, plazmatický malonyldialdehyd, plazmatické a močové isoprostany
Markery napětí myocytu	natriuretické peptidy (BNP, NT-proBNP) a midregionální pro-atriální natriuretický peptid (MR-proANP), solubilní receptor ST2 (sST2), růstový diferenciační faktor 15 (GDF-15)
Markery remodelace extracelulární matrix	matrixmetaloproteinázy (MMP2, MMP3, MMP9), tkáňový inhibitor metaloproteináz 1 (TIMP 1), interleukin 6 (IL 6), kolagenové propeptidy, N-terminální kolagenový peptid III, myostatin, syndecan 4 a galectin 3
Neurohormony	noradrenalin, renin, angiotenzin II, aldosteron, arginin vasopresin, kopeptin, endothelin-1, urokortin, chromogranin A a B, midregionální proadrenomedulin (MR-proADM) a další
Markery zánětu	C-reaktivní protein (CRP), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF $\alpha$ ), TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis), interleukiny 1, 6, 10 a 18, fosfolipáza A <sub>2</sub> asociovaná s lipoproteiny (LP-PLA <sub>2</sub> ), solubilní receptory pro TNF, antagonist receptoru IL-1, pentraxin 3 (PTX3), Ca 125, solubilní endoglin, adiponektin

#### 4.5 Terapie

Základem terapie pacientů s AIM je jeho časná diagnostika a z doporučení vychází, že by měl mít každý pacient přicházející s podezřením na AIM monitorované EKG. EKG záznam by měl být natočen a vyhodnocen do 10 minut od prvního kontaktu pacienta s lékařem. Podstatou léčby je časná reperfúze okludované cévy – perkutánní koronární intervence (PCI) nebo fybrinolýza.

Každý pacient se STEMI by měl být co nejrychleji transportován do PCI centra, které je k dispozici 24 hodin 7 dnů v týdnu. Optimální časový interval převozu je do 90 minut a

v případě pacientů prezentujících se časně od vzniku obtíží, by měl být transport do PCI centra uskutečněn do 60 minut od prvního kontaktu s lékařem. Pokud je PCI centrum nedostupné anebo pokud by byl časový interval transportu delší než 120 minut, pak by měla být podána léčba fibrinolytická (altepláza, retepláza, streptokináza, aj.) a to do 30 minut od diagnostiky AIM, která by měla být v intervalu 3-24 hodin od podání fibrinolýzy doplněna koronární angiografií [2, 3].

V dlouhodobé léčbě u pacientů se STEMI je indikována duální antiagregační léčba, tj. kyselina acetylsalicylová spolu s inhibitory ADP receptorů (př. clopidogrel, prasugrel nebo ticagrelor), která se standardně podává po dobu 12 měsíců. Do základní léčby pacientů po AIM dále patří betablokátory, statiny a inhibitory renin-angiotensinového systému.

## 5 Ischemicko reperfuční poškození

Akutní koronární syndromy, i přes obrovský pokrok v kardiologii (zlepšení léčebných možností - dostupnost perkutánních koronárních intervencí či akutně provedených aortokoronárních bypassů, síť kardiocenter i následné specializované péče), stále patří k prognosticky nejzávažnějším onemocněním (rozvoj srdečního selhávání, chlopenní vady aj.). Bylo prokázáno, že právě následná reperfuze myokardu vede k řadě metabolických změn a k vyplavení řady buněk imunitního systému, které přispívají ke vzniku ischemicko-reperfučního poškození (ischemia reperfusion injury, IRI) myokardu. Snahou je tedy pochopit děje, ke kterým dochází v průběhu reperfuze, a zmenšit tak celkový rozsah poškození srdečního svalu.

### 5.1 Změny v průběhu ischemicko reperfučního poškození

Trvá-li ischemie déle než 20 minut, pak dochází k ireverzibilnímu poškození kardiomyocytů, které postupuje směrem od endokardu k epikardu. Nedostatek kyslíku se projeví řadou biochemických a metabolických změn. Dochází k potlačení oxidativní fosforylace, která vede k depolarizaci mitochondriální membrány a depleci adenosintrifosfátu (ATP), které vyústí v poruchu kontraktilní funkce kardiomyocytů. Nedostatek kyslíku vede k aktivaci anaerobní glykolýzy, která přispívá ke zvýšení koncentrace laktátu a výraznému snížení pH. Zároveň dochází k potlačení funkce  $3\text{Na}^+-2\text{K}^+$  ATPázy s následným nahromaděním iontů  $\text{Ca}^{2+}$  uvnitř buněk a naopak zvýšení  $\text{Na}^+$  extracelulárně [29].

V současné době jsou uznávány 4 formy ischemicko-reperfučního poškození:

- Omráčení myokardu: Jde o poischemickou reverzibilní kontraktilní dysfunkci srdečního svalu, která je zapříčiněna oxidativním stresem a zvýšeným množstvím  $\text{Ca}^{2+}$  uloženého intracelulárně.
- Reperfuží indukované arytmie: Velmi časté jsou komorové arytmie, které se objevují časně po obnovení perfuze a většinou spontánně terminují a dobře reagují na léčbu. Jde o reverzibilní poškození.
- Obstrukce na mikrovaskulární úrovni: Příčinou obstrukce je mikroembolizace (uvolněné hmoty aterosklerotického plátu), otok okolních kardiomyocytů, poškozená schopnost vazodilatace, destičkové mikrotromby nebo hmoty neutrofilů. Často se také setkáváme s výrazným ireverzibilním poškozením



endotelu, které je spojené s prokrvácením infarktového ložiska. Přítomnost tohoto poškození je spojeno s větším rozsahem nekrózy, systolickou dysfunkcí, remodelací myokardu a horším klinickým stavem pacienta.

- Letální reperfuzní poškození: Příčinou ireverzibilního letálního reperfuzního poškození je oxidativní stres, intracelulární zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , otevření mitochondriálních permeabilních transitivních pórů (mPTP) a hyperkontrakce. Předpokládá se, že se až v 50% podílí na výsledném rozsahu infarktového ložiska. V současné době není k dispozici účinná léčba tohoto poškození.

Ischemicko reperfuzní poškození je velmi složitý a komplexní děj, který přispívá k rozšíření ložiska nekrózy i po úspěšně provedené PCI. Na molekulární úrovni vedou k IRI následující dosud známé mechanismy [29]:

- Zvýšení intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ : Zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  uvnitř kardiomyocytů i mitochondrií je způsobeno protražovanou ischemií a poškozením buněčných membrán (jejich depolarizací). Zároveň oxidativní stres indukuje poškození sarkoplazmatického retikula. Tyto děje vedou ke stimulaci transportu  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulárně a k následnému otevření mPTP pórů.
- Uvolnění zánětlivých buněk: Není dosud zcela zřejmé, zda buňky imunitního systému přispívají k samotné patogenezi letálního reperfuzního poškození nebo zda jde o reakci na akutní poškození. Zásadní roli hrají především monocyty/makrofágy [30, 31, 32, 33, 34], krevní destičky, mastné buňky a dále také komplementová kaskáda [35, 36], T-lymfocyty [37], cytokiny, buňky přirozené imunity (toll like receptory) [38, 39, 40, 41, 42], aj.
- Oxidativní stres: V průběhu ischemie dochází k řadě změn uvnitř buňky a výsledný rozsah poškození kardiomyocytů závisí na několika faktorech: délce trvání a rozsahu okluze věnčité cévy, teplotě a kolaterální cirkulaci. Nedostatečný přísun kyslíku je příčinou mitochondriální dysfunkce, která vede k nedostatku vysoceenergetických ATP [43, 44]. Bylo zjištěno, že ischemie v délce trvání 15 minut vede ke snížení produkce ATP až o 65% a při ischemii 45 minut je snížena produkce ATP až o 95% [45]. Není-li přítomen kyslík, je okamžitě zastavena oxidativní fosforylace, nastává přechod aerobního metabolismu na metabolismus anaerobní (snížení kontraktility kardiomyocytu) a dochází k rozvoji endoteliální

dysfunkce (nedostatek vazodilatačních mediátorů, zvýšená migrace leukocytů, aj.). Příčinou poklesu pH je zablokovaná  $\beta$ -oxidace vedoucí k tvorbě volných mastných kyselin spolupodílejících se na arytmích, nahromadění volných kyslíkových radikálů, laktátu a fosfátu a produkce  $\text{CO}_2$  z Krebsova cyklu (ve studii na zvířecím modelu došlo v průběhu ischemie k poklesu pH na 6,2 již po uplynutí 10 minut) [45]. Výše zmíněné změny vedou k hromadění  $\text{Ca}^{2+}$  v sarkoplazmatickém retikulu, které způsobuje aktivaci proteáz, přispívá k rozvoji acidózy a dochází k otoku buňky přestupem vody z extracelulárního prostoru [46]. Dále dochází k akumulaci  $\text{Na}^+$  uvnitř buňky sníženou aktivací  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -ATPázy a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPázy a naopak ke snížené koncentraci  $\text{K}^+$  uvnitř buňky inhibicí  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy [44, 45]. V průběhu reperfuze dojde v první řadě k normalizaci pH. Nízké pH v průběhu ischemie potlačuje otevření mPTP a teprve vzestup pH zvyšuje jejich schopnost se otevřít, a tak nastartovat smrt buňky. Tento jev je označován jako pH paradox [47]. Za druhé paradoxně zvýšený přísun kyslíku do buněk vede ke zvýšené produkci volných kyslíkových radikálů, a pokud je produkce volných kyslíkových radikálů vyšší než jejich eliminace, pak dochází opět k poškození buňky. Dalším negativním faktorem je vysoká hladina  $\text{Ca}^{2+}$  uvnitř buňky, která přispívá k buněčné smrti aktivací proteáz a lipáz, porušením kontraktilních funkcí poškozením sarkoplazmatického retikula a otevřením mPTP pórů [45].

- Rychlá normalizace pH: V průběhu ischemie dochází k intracelulárnímu snížení pH ( $\text{pH} < 7,0$ ). Při reperfuzi je velmi promptně upraveno pH odplavením laktátu a aktivací  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a  $\text{Na}^+/\text{HCO}^-$  kanálu. Tyto prudké změny pH vedou k reperfuznímu poškození.
- Otevření mPTP: mPTP kanály jsou umístěné na vnitřní straně mitochondriální membrány a jejich otevření vede k depleci ATP a smrti buňky. mPTP póry zůstávají v průběhu ischemie uzavřené a otvírají se až při reperfuzi v důsledku nakupení  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulárně, oxidativního stresu, rychlé korekci pH a depleci ATP.

## 5.2 Terapeutické ovlivnění ischemicko reperfuzního poškození

I přes včasné provedenou PCI a efektivní antiagregační a antitrombotickou léčbu dochází k reperfuznímu poškození myokardu, které je v současné době neovlivnitelné medikamentózně nebo jinými léčebnými zásahy. Snahou je tedy najít a co nejvíce

zasáhnout do mechanismů, které se na IRI podílejí. V dnešní době ale máme zatím k dispozici jen několik málo zvířecích nebo klinických studií, které se zaměřují na ovlivnění rozsahu IRI [29].

Preconditioning byl zkoumán na psech (Murry a kolektiv) a představuje působení krátkých epizod okluze věnčité cévy před protražovanou ischemií. Tato práce prokázala v porovnání s kontrolami výrazné snížení rozsahu výsledné ischemie [45, 48, 49]. Předpokládá se, že k podobným dějům dochází i u pacientů s anginou pectoris a že jejich srdce tak mají jistou míru kardioprotekce před vlastní protražovanou ischemií. Zároveň u těchto pacientů dochází k pomalejšímu nástupu buněčné smrti a jejich srdce tak mají delší časové okno, ve kterém musí dojít k reperfuzi [48, 50, 51].

Jako postconditioning jsou označovány krátké epizody okluze a reperfuze, které následují po vlastní reperfuzi uzavřené cévy. Touto metodou bylo dosaženo snížení rozsahu infarktu myokardu v rozmezí až 35-60% ve srovnání s kontrolními skupinami [29, 49]. Nejčastěji užívaným studijním protokolem je postconditioning v celkové délce 8 minut – v první minutě po zastavení stenotické cévy je zaveden a nafouknut balón na 4-6 atm. Poté je na 1 minutu obnoven průtok, který je následován opětovnou inflací balonu na 1 minutu. Tento cyklus se opakuje 4x [52, 53]. Postconditioning brání rychlé změně pH uvnitř buněk, snižuje produkci volných kyslíkových radikálů a edém tkáně, potlačuje akumulaci polymorfonukleárů, hladiny plazmatického malonyldialdehydu a endoteliální dysfunkci v infarktové oblasti, snižuje koncentraci  $Ca^{2+}$  uvnitř mitochondrií a potlačuje výskyt reperfuzních arytmií (stabilizuje srdeční rytmus), zvyšuje aktivitu anti-apoptotických a anti-autofagických mechanismů [45, 53]. V obou výše zmíněných metodách nebyl prokázán statisticky významný rozdíl [54].

Jak preconditioning, tak i postconditioning představují metody, které jsou invazivní. Neinvazivní technikou je metoda vzdáleného formování ischemie. Jde například o opakované nafukování a vyfukování tlakové manžety umístěné na paži vedoucí k intermitentní ischemii a reperfuzi. Největšího benefitu bylo dosaženo u pacientů s předním STEMI s okludovaným ramus interventricularis anterior. Řada studií ale tyto výsledky vylučuje [29]. Dále byl zkoumán efekt hyperoxémie, která redukuje vznik kyslíkových a peroxidových radikálů, edému tkání a potlačuje adherenci leukocytů. Hypotermie (32-33°C) přispívá k redukci poškození kardiomyocytů potlačením zánětlivé odpovědi a agregace trombocytů [29].

Řada studií testovala farmaka s cílem potlačení IRI. Studie s adenosinem, který byl podaný na začátku reperfuze v průběhu následujících 3 hodin, prokázala snížení IRI a velikost výsledné ischemie byla závislá na výši podaného adenosinu [49]. Jiní autoři se zabývali potlačením imunitních dějů cestou antagonisty interleukin-1 receptoru (Anakinra) podaného před samotnou reperfuzí (interleukin-1 receptor zasahuje do aktivace makrofágů, ovlivňuje chemotaxi leukocytů, endoteliální dysfunkci, množství volných kyslíkových radikálů a apoptózu kardiomyocytů) a prokázali pozitivní efekt na rozsah IRI (v experimentu byla použita dávka Anakinry 2mg/kg tělesné hmotnosti) [49, 55]. Velká pozornost byla věnována rodině natriuretických peptidů. Wu a jeho kolektiv prokázali, že podáním infúze mozkového natriuretického peptidu (BNP) v dávce 1ml/kg/hod po dobu 5 minut před vlastní reperfuzí dosáhnou nižších hladin CK a laktátdehydrogenázy ve srovnání s kontrolní skupinou [56, 57]. Experimentální studie s rekombinantním humánním atriálním natriuretickým peptidem (carperitidem) prokázaly snížení infarktu myokardu o 15% a zlepšení funkce levé komory [49].

Dále byly testovány antagonisté  $Ca^{2+}$  kanálu umístěné na sarkolemě nebo mitochondriích a dle některých studií došlo ke zmenšení rozsahu IRI až o 50%. Stejně tak potlačení rychlého vzestupu pH, užití inhibitorů otevření mPTP (cyklosporin A), blokátorů aktivace buněk komplementu či aktivace adhezních molekul, nicorandilu (zasahuje do otevření  $K^+$  kanálu), sevofluranu (přispívá k ochraně glykokalyxu) nebo eniporidu (inhibuje  $Na^+/H^+$  transporter) přispělo ke snížení rozsahu ischemie [29, 45, 58, 59]. Bylo zjištěno, že v případě preconditioningu dosáhneme nižších koncentrací destičky aktivujícího faktoru (PAF) a převáží tak kardioprotektivní mechanismy, které brání otevření mPTP pórů v průběhu reperfuze [60].

## **6 Charakteristika sledovaných parametrů**

### **6.1 Markery ischémie a nekrózy myokardu**

#### **6.1.1 Troponin T (hsTnT) a troponin I (Tnl)**

Troponin T (hsTnT) je dnes považován za zlatý standard v diagnostice akutních koronárních syndromů (viz kapitola 4.1). Troponin je strukturální protein příčně pruhovaného svalu a jeho molekula je tvořena 3 specifickými proteiny: troponin C (vazba na vápník), troponin T (vazba na tropomyosin) a troponin I (vazba na aktin). Cut off hodnota pro muže je 14 ng/l (dříve v laboratořích Fakultní nemocnice používaná cut off hodnota 0,014 µg/l), pro ženy 10 ng/l a ve smíšené populaci 13,5 ng/l. V případě akutního koronárního syndromu je doba do první detekce 2 - 4 hodiny, maximum je dosaženo za 12 - 30 hodin a k normalizaci hodnot dochází za 10 - 14 dnů. O periprocedurální infarkt myokardu při PCI jde tehdy, dojde-li k 5 násobnému vzestupu TnT (10 násobnému vzestupu TnT v případě kardiologického výkonu) nebo vzestupu TnT alespoň o 20% v případě jeho zvýšené hladiny za přítomnosti: symptomů, nových ischemických změn na EKG, angiografického průkazu periprocedurální komplikace nebo průkazu ztráty viabilního myokardu či nové lokální poruchy kinetiky. Existuje ale také mnoho dalších stavů, které jsou spojeny s vyšší hladinou hsTnT (viz tabulka č. 3) [1, 2].

Troponin I (Tnl) je jednou ze tří podjednotek molekuly troponinu zabraňující v klidovém stavu vzniku vazebného můstku mezi aktinem a myosinem. K jeho vyplavení dochází u pacientů s akutním koronárním syndromem: k první detekci hladin Tnl dojde za 4 – 6 hodin, maxima je dosaženo za 12-30 hodin a k normalizaci hodnot dochází za 6 – 10 dnů. Cut off hodnota Tnl závisí na metodě jeho stanovení (cut off hodnota metodou fluorescenční imunoanalýzy 1,5 µg/l, heterogenní sendvičovou magnetickou separační imunoanalýzou 0,1 µg/l, chemiluminiscenční analýzou 0,15 µg/l atd.) a předpokládá se, že rozdíly mezi muži a ženami jsou ještě vyšší než v případě hsTnT. Pro správnou interpretaci výsledků je vždy nutno znát i používanou laboratorní metodu. Se zvýšenými hladinami Tnl se setkáváme také v řadě jiných situací, jako je cvičení, cévní mozková příhoda, renální insuficience, aj.

#### **6.1.2 Kreatinkináza (CK) a její MB izoenzym (CK MB)**

Kreatinkináza (CK) byla donedávna doporučována pro diagnostiku akutního infarktu myokardu, ale v současných doporučeních je preferováno stanovení srdečních

troponinů. Jde o enzym, který se vyskytuje v cytoplasmě a v mitochondriích kosterního svalstva (CK-MM), mozku (CK-BB) nebo myokardu (CK-MB). Referenční rozmezí jsou odlišná v závislosti na pohlaví a věku (ve věkovém rozmezí 15 - 90 let je referenční rozmezí u mužů 0,41 - 3,24  $\mu\text{kat/l}$  a u žen 0,41 - 2,85  $\mu\text{kat/l}$ , do 15 let 0,19 - 2,27  $\mu\text{kat/l}$ ) a u zdravého jedince nepřevyšují naměřené hodnoty 5% celkové CK. [5]. Zvýšené hodnoty můžeme naměřit již za 4 – 6 hodin od vzniku AIM, maximálních hladin je dosaženo za 16 - 36 hodin a k normalizaci hodnot dochází s odstupem 3 - 6 dnů [6, 7]. Se zvýšenými hladinami se nesetkáváme ale jenom u akutních koronárních syndromů, ale také u zánětlivých onemocnění myokardu, po kardiopulmonálních resuscitacích nebo elektrických kardioverzích, ale také u rhabdomyolýzy, cévní mozkové příhody, hypertermie nebo svalového postižení (rhabdomyolýza, traumata, myozitidy) a jiné.

Myokardiální izoenzym kreatinkinázy (CK MB) je stejně jako CK využíván podle současných doporučení k diagnostice akutních koronárních syndromů pouze v případě nedostupnosti stanovení troponinů. Je stanovována buď jeho katalytická aktivita (referenční rozmezí 0,0 – 0,42  $\mu\text{kat/l}$ ) nebo jeho koncentrace (CK MB mass, referenční rozmezí u mužů 0,0 - 7,2  $\mu\text{g/l}$  a u žen 0,0 – 3,4  $\mu\text{g/l}$ ) [8]. Hladiny se zvyšují nad normu za 3 - 8 hodin, maximálních hladin je dosaženo za 16 – 24 hodin a naměřené hladiny CK MB klesají k normě v průběhu 2 - 3 dnů [9, 10, 11]. Stejně jako v případě CK, i zde se setkáváme s dalšími klinickými stavy, které jsou doprovázeny zvýšenými hladinami CK MB (popáleniny, svalové léze, šokové stavy, zánětlivé postižení myokardu a jiné).

### **6.1.3 Myoglobin (MYO, MB)**

Myoglobin (MYO, MB) je monomerní protein o molekulové hmotnosti 17,8 kDa, patří do rodiny hemoproteinů a podílí se tak na transportu kyslíku v buňkách myokardu a kosterního svalstva. Zvýšené hladiny lze naměřit již za 2 – 4 hodiny od jejich poškození, maxima je dosaženo za 6 – 12 hodin a k normě se hodnoty vrací za 24 hodin [11, 12]. Referenční hodnoty jsou opět závislé na věku a pohlaví, tj. u pacientů nad 15 let jsou normální hodnoty u mužů v rozmezí 12,8 – 69,9  $\mu\text{kat/l}$  a u žen 7,2 – 36,7  $\mu\text{kat/l}$  [12, 13]. Pokud je ale hodnota v perakutní fázi AIM negativní, pak s vysokou pravděpodobností vylučuje akutní koronární syndrom. Negativní prediktivní hodnota vyšetření myoglobinu je velmi užitečná v diferenciální diagnostice bolestí na hrudi a je 60% v době 3 hodiny od vzniku bolesti, za 4 hodiny od vzniku bolesti dosahuje již 90%. Pro zvýšení kardiospecifity myoglobinu se doporučuje současné stanovení karboanhydrázy III, která

se vyskytuje pouze v kosterním svalstvu a ne v myokardu. Podobně jako CK není ale ani myoglobin specifický pouze pro postižení myokardu, ale se zvýšenými hladinami se setkáváme i u traumat, rhabdomyolýzy, šokových stavů nebo poškození ledvin.

#### **6.1.4 Karboanhydráza III (CAIII)**

Karboanhydráza je enzym hrající významnou roli v transportu iontů a plynů, regulaci acidobazické rovnováhy, resorpci kostí a jejich kalcifikaci a má řadu sekrečních funkcí. Dosud je známo 11 izoenzymů (v cytosolu I-III a VII, na mitochondriích V a na povrchích membrán IV, IX, XII a XIV) [61]. CA III je cytoplazmatický protein, který se u člověka vyskytuje běžně v cytosolu buněk kosterního svalstva, ale není přítomen v myokardu. Některé pozdější studie zkoumající přítomnost karboanhydrázy v myokardu zjistily, že v myokardu je přítomna karboanhydráza typu IV. Sender a kolektiv potvrdili přítomnost CA IV pouze na povrchu buněk endotelu uvnitř myokardu, naopak Vandenberg zjistil aktivitu CA IV jak na buňkách endotelu, tak na membránách sarkolemy kardiomyocytů [62]. Dále bylo prokázáno, že CA III nese na svém povrchu dvě sulfhydrylové skupiny (Cys 181 a Cys 186), které v případě oxydativního stresu podléhají velmi rychlé glutathionylaci. CAIII hraje tedy důležitou roli v odpovědi na oxidační stres a také v reperfučním poškození [63].

Řada studií potvrdila hlavní význam CAIII, tj. dosažení vyšší senzitivity i specificity stanovením poměru MYO/CA III v časně fázi akutního infarktu myokardu v porovnání se stanovením MYO, CK nebo CK MB a zároveň poukázali, že poměr MYO/CA III je dobrým markerem pro diagnostiku časněho reinfarktu [64, 65]. U zdravých dobrovolníků byla stanovena horní hranice pro CA III 45µg/l a pro MYO 55µg/l u žen a 65µg/l u mužů. V průběhu prvních 2 hodin od vzniku AIM vykazovaly pouze MYO a MYO/CA III senzitivitu 40%, resp. 60%. V okně 2-6 hodin byla senzitivita MYO/CA III v porovnání s CK MB opět vyšší (100% vs. 43%). V průběhu následujících hodin byla senzitivita všech stanovovaných parametrů srovnatelná [66]. Specificita poměru MYO/CA III je 96%. Pozitivní prediktivní hodnota pro CK byla 48% a pro MYO/CA III 76% a naopak negativní prediktivní hodnota byla u všech parametrů 86-97% (nejvyšší opět pro MYO/CA III) [66].

#### **6.1.5 Glykogenfosforyláza BB (GPBB)**

Glykogenfosforyláza je glykolytický enzym, který se účastní anaerobní glykolýzy a má zásadní roli v karbohydrátovém metabolismu. Existují tři izoformy, které se odlišují strukturou i rozdílnou funkcí: GPLL (liver isoform), GPMM (muscle isoform) a GPBB

(brain isoform, který byl prokázán v mozku i v myokardu) [66, 67]. GPBB je v kontaktu s glykogenem, s kterým vytváří makromolekulární komplex na povrchu sarkoplazmatického retikula uvnitř kardiomyocytu a katalyzuje přeměnu glykogenu na glukosa-1-fosfát, k čemuž dochází v případě ischemie nebo hypoglykémie. Časně uvolnění GPBB do krve v průběhu ischemie nebo nekrózy myokardu je způsobené vystupňovanou glykogenolýzou a zvýšenou permeabilitou buněk [66]. GPBB patří mezi časně specifické markery ischemie a nekrózy myokardu, protože dochází k vzestupu hladin GPBB již v prvních 1 - 2 hodinách od vzniku obtíží (po uplynutí 5 hodin od vzniku AIM je zvýšená hladina GPBB u 100% pacientů), maximálních hladin dosahuje za 6 - 10 hodin od vzniku ischemického infarktu a k normalizaci hladin dochází v následujících 24 - 30 hodinách. GPBB je nejenom ukazatelem ischemie a nekrózy myokardu, ale k elevaci jejích hodnot dochází také po aplikaci intramuskulárních injekcí, při preeklampsii nebo při fyzické zátěži [20, 21]. GPBB nejen že ukazuje rozsah AIM, ale určuje i prognózu pacientů, proběhlý perioperační AIM, efekt léčby a nebo reinfarkt. GPBB má i své úskalí, protože falešně pozitivní výsledky byly zaznamenány u pacientů po traumatu nebo s významným postižením centrálního nervového systému [66, 67, 68].

Rabitzsch a jeho kolektiv srovnávali GPBB, MYO, CK MB a TnT u pacientů s AIM, stabilní a nestabilní anginou pectoris a u pacientů přijatých na pohotovost pro bolest na hrudi jiné etiologie. Všichni pacienti s chronickou anginou pectoris či bez průkazu akutního koronárního syndromu měli koncentraci GPBB < 7µg/L, u pacientů s AIM byl vzestup koncentrace GPBB signifikantně významný (již 4 hodiny od vzniku obtíží byl zaznamenán vzestup GPBB u 70% pacientů, MYO u 43%, CK MB 56% a TnT 33%). Hladiny GPBB byly výrazně vyšší nejen u pacientů s AIM, ale také s nestabilní anginou pectoris či přechodnými změnami ST úseků na EKG [68]. U úspěšně trombolyzovaných pacientů byly hladiny GPBB mnohonásobně vyšší a dříve dosahovaly vrcholu (marker monitorace úspěšné léčby) [68].

#### **6.1.6 Srdeční izoforma proteinu vázajícího mastné kyseliny (hFABP)**

Proteiny vázající mastné kyseliny (FABP) se vyskytují v cytosolu řady buněk a název je odvozen od jejich schopnosti vázat se silně s mastnými kyselinami [68]. FABP se vyskytuje v 9 izoformách, z nichž nejznámější jsou: I-FABP (jaterní izoforma), i-FABP (intestinální izoforma) a h-FABP (srdeční izoforma). Srdeční izoforma proteinu vázajícího mastné kyseliny (hFABP) je malý protein o hmotnosti 15 kDa, který nekovalentně váže



volné mastné kyseliny. Je exprimován v myokardu. Dále byl v mnohem menší míře prokázán v příčně pruhované svalovině, v buňkách distálních tubulů, v některých částech mozku, placentě a laktující mléčné žláze, a také u pacientů se srdečním selháním, arteriální hypertenzí, renální dysfunkcí, aortální insuficiencí nebo po fyzické námaze [69, 70]. hFABP tedy výrazně ovlivňuje transport mastných kyselin v cytosolu kardiomyocytů a ovlivňuje jejich  $\beta$ -oxidaci v mitochondriích. V případě poškození kardiomyocytů dochází, pro jejich malý rozměr, k jejich časnému vyplavení extracelulárně [71].

Pro hFABP je typické, že se vyplavuje velmi časně od vzniku poškození (zvýšené hladiny nacházíme již za 30 minut od vzniku poškození srdečního svalu a je považován za velmi specifický marker). Je-li stanovován spolu s hsTnT, pak se výrazně zvyšuje specifická i senzitivita tohoto vyšetření. hFABP lze stanovit nejenom v plazmě (referenční hodnota do 5  $\mu\text{g/l}$ ), ale i v moči (referenční hodnota do 10  $\mu\text{g/l}$ ) [18].

Zvýšené hladiny v plazmě jsou zaznamenány již cca 1,5 - 2 hodiny od vzniku symptomů akutního koronárního syndromu, maxima dosahují za 4 - 6 hodin a k normě se vracejí za 20 - 24 hodin od vzniku obtíží (cytoplazmatická versus plazmatická koncentrace je 200 000:1, koncentrace hFABP v kardiomyocytech je 2 - 10x vyšší než v kosterní svalovině) [72]. h-FABP je považován za časný marker nekrózy myokardu a je mu věnována velká pozornost. Řada prací se zabývala porovnáním senzitivity hFABP s jinými standardními kardiomarkery (MYO, CK MB, TnT) v jednotlivých časových odstupech od vzniku AIM. hFABP a EKG stanovené do 2 hodin mají mnohem vyšší senzitivitu (60,0% a 53,3%), hFABP a MYO stanovené mezi 2 - 4 hodinou ukazují senzitivitu 82,4% resp. 76,5% (zatímco TnT a CK MB mají senzitivitu okolo 50%). hFABP má vyšší specifitu než MYO. [69, 73, 74]. Pro zvýšení specifity tohoto markeru byl stanovován i poměr MYO a hFABP: hodnoty okolo 5 jsou specifické pro postižení myokardu, hodnoty 21-70 jsou typické pro postižení svalů kosterní svaloviny [72, 75].

Dále bylo zjištěno, že hFABP neslouží jenom jako marker časného poškození kardiomyocytů, ale jeho stanovení může určit reinfarkt a efekt reperfúze, stanovit prognózu pacientů a bylo prokázáno, že jeho uvolnění z cytosolu do extracelulárního prostoru způsobuje vyšší náchylnost kardiomyocytů ke škodlivým noxám v průběhu reperfúze. Někteří autoři prezentují, že vzestup hFABP 1,5x do 30 minut od zahájení trombolytické léčby ukazuje maximální efekt reperfúze [72]. Jiní prokázali, že hladina hFABP nad 6,48  $\mu\text{g/l}$  u troponin negativních pacientů (nezávisle na věku a sérového

kreatininu) prezentuje vysoce rizikovou skupinu pacientů, kteří by měli být časně kompletně revaskularizováni [76, 77]. Vyšší hladiny hFABP byly také zjištěny u všech pacientů s chronickým renálním selháním a u pacientů s kardiopulmonální zástavou [76]. Ishii a jeho tým prokázali, že vyšší hladiny hFABP jsou významně spojené se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem v následujících 6 měsících bez závislosti na pozitivě TnT [77]. O'Donoghue zjistil, že elevované hladiny hFABP byly spojené s 2,5x vyšším rizikem smrti z kardiovaskulárních příčin a 2x vyšším rizikem rozvoje srdečního selhání v následujících 10ti měsících [78]. Již jsou k dispozici hFABP bedside testy, které stanoví hladinu hFABP do 15 minut [79]. Lze využít i multianalytový přístup (např. mikročipovou technologii na principu enzymové imunoanalýzy v sendvičovém uspořádání od firmy Randox) nebo komerční sady na bázi ELISA metody [79, 80].

## **6.2 Imunitní markery**

### **6.2.1 Pentraxin 3 (PTX3)**

Pentraxin 3 patří, stejně jako C-reaktivní protein, do rodiny proteinů označovaných jako proteiny akutní fáze. Je pro něho typická cyklická multimerická struktura a na rozdíl od CRP, který je produkovaný hepatocyty, je uvolňování PTX3 do cirkulace vázáno na přítomnost řady cytokinů jako IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 nebo TLR [81]. PTX3 je produkovaný buňkami cévní stěny, oxidovanými low-density lipoproteiny a buňkami, které jsou součástí aterosklerotických plátů (monocyty, makrofágy, endoteliální a dendritické buňky, fibroblasty a epiteliální buňky) [82]. Hladiny PTX3 korelují se závažnou aterosklerózou karotid a femorálních tepen a jsou výrazně zvýšené u pacientů s vícečetnou aterosklerózou [83]. Zvýšené hladiny PTX3 byly prokázány u vaskulitid, chronického srdečního selhání a u akutních koronárních syndromů [81]. Naopak nebyl zjištěn v normálním zdravém srdci [84]. V průběhu akutního infarktu myokardu jsou zvýšené hodnoty PTX3 v plazmě naměřeny s odstupem 6-8 hodin od vzniku symptomů a k normalizaci dochází v průběhu několika dnů [81].

PTX3 je také označován jako nezávislý prediktor mortality u pacientů s akutním infarktem myokardu (Latini a kolektiv studií prokázali, že pacienti se vstupně výrazně zvýšenou hladinou PTX3 mají až 3x vyšší riziko smrti v následujících třech měsících) [82, 85] a někteří autoři považují PTX3 za časný indikátor ireverzibilního poškození kardiomyocytů (u pacientů s AIM není koncentrace PTX3 ovlivněna ani trombolýzou ani podáním aspirinu a nezávisí na hladině cholesterolu, glykovaném hemoglobinu, kouření,

pohlaví nebo obezitě) [86, 87]. Zvýšené hladiny PTX3 jsou naměřeny také u pacientů s chronickým srdečním onemocněním a reflektují akutní změnu, tj. akutní aterotrombózu [80]. V jedné studii bylo prokázáno, že vyšší vzestup PTX3 15 minut od dokončené implantace stentu je spojen s vyšším rizikem restenózy [88].

### **6.2.2 Solubilní glykoprotein 130 (sGP130)**

Glykoprotein GP130 je vyjádřen na membránách řady buněk včetně myokardu a sestává ze dvou podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ . GP130 slouží k vazbě řady cytokinů z rodiny interleukinu 6 (IL-6), jako jsou IL-6, IL-10, leukemia inhibitory factor (LIF), cardiotrophin-1 (CT-1), ciliary neurotrophic factor (CNTF) nebo onkostatin (OSM), a uvolněná forma v plazmě se označuje jako solubilní GP130 [89]. K aktivaci GP130 dochází již v průběhu embryogeneze (ovlivnění kardiocytoogeneze, růst a přežití kardiomyocytů) nebo cestou IL-6 jako odpověď na zánětlivý podnět či ischemické poškození. Stimulace GP130 vede k aktivaci několika mechanismů cestou JAK/STAT kinázy, PI3K/Akt nebo ERK kinázy (extracellular signal-regulated kinázy), které se ve svém důsledku podílí uvnitř myokardu na rozvoji a hypertrofii myokardu, protekci myokardu k zevním stimulům nebo rozvoji srdečního selhávání [89, 90].

Názory na funkci GP130 jsou rozporuplné. Některé experimenty zjistily, že modulace GP130, respektive snížení receptoru GP130 na hepatocytech, vede k nižšímu rozsahu ložisek aterosklerózy [91]. Ichiki a kolektiv naměřili výrazně vyšší hladiny sGP130 na počátku AIM a následně jeho hladiny klesaly [92]. Další studie zjistily, že trvalá aktivace GP130 cestou IL-6 snižuje riziko apoptózy kardiomyocytů a tak rozsah nekrózy po AIM [89, 93, 94]. Jiní autoři naopak tvrdí, že pouze přechodná stimulace GP130/STAT po AIM je kardioprotektivní, protože trvalou stimulací spíše přispívá k vyššímu riziku ruptury myokardu či srdečnímu selhání [90].

### **6.2.3 CD163 a jeho solubilní forma (sCD163)**

CD163 je membránový protein umístěný na povrchu cirkulujících monocytů nebo na tkáňových makrofázích a jeho solubilní forma (sCD163) byla prokázána také v lidské plazmě [95]. Hlavní funkcí CD163 navázaného na povrchu cirkulujících monocytů a makrofágů je vylučování komplexu hemoglobin-haptoglobin, který vzniká např. po zakrvácení do aterosklerotických plátů [95, 96].

Moreno a jeho kolektiv zkoumali CD163 a jeho vztah k ateroskleróze a potvrdili, že CD163 se vyskytuje především v hemoragických plátech, kde vycytává komplexy Hb-Hp a tím přispívá ke stabilitě plátů [95]. Prokázali, že CD163 i elastáza se vyskytují ve vyšších koncentracích v culprit lézích než ve stabilních plátech nebo u pacientů bez průkazu aterosklerózy a mohou být (jak sCD163, tak i elastáza) citlivým markerem aterosklerózy a prediktorem akutního koronárního syndromu nezávisle na dalších rizikových faktorech [95]. Také Aristoteli ve své práci potvrdil vztah sCD163 k progresi aterosklerózy a prokázal, že naměřené hodnoty sCD163 jsou výrazně vyšší u pacientů s třívětвовým postižením než u pacientů s počínající aterosklerózou [97]. Sanak dosáhl podobných výsledků - naměřil vysoké hladiny sCD163 pacientům s progresí aterosklerotických plátů [98].

Moller prokázal, že CD163 nemá vztah jenom k ateroskleróze, ale je také významným prediktorem rozvoje diabetu mellitu 2. typu u obézních pacientů. Kumulativní incidence tohoto onemocnění se zvyšuje s vyšší koncentrací CD163 a můžeme tak rozlišovat mezi vysoce a nízké rizikovými pacienty [96].

#### **6.2.4 Solubilní CD95/fas, CD95, CD95L**

Solubilní CD95/fas ligand je do krevního oběhu uvolňován myokardem časně po vzniku ischemie a v průběhu následné reperfuze a výrazně zasahuje do apoptózy (programované smrti) buněk, resp. kardiomyocytů. Apoptóza v zóně ischemicko-reperfuzního poškození či vlivem hypoxie je regulována intracelulárními signály, které mohou být spouštěny buněčným stresem, metabolickým poškozením (kyslíkové radikály) či vazbou liganda-receptor. Do rodiny ligandů indikujících smrt buněk patří: CD95 ligand (CD95L), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) a TNF $\alpha$  [99, 100]. Jde o proteiny vázající se na membrány buněk, které ale mohou být přeměněny na solubilní formy vlivem metaloproteináz, cysteinoproteinázami nebo TNF $\alpha$  konvertujícím enzymem, a které byly ve zvýšené míře prokázány v ischemickém myokardu [99]. CD95 je mnohými autory považován za multifunkční ligandu a receptor, který v rozdílných formách ovlivňuje krom AIM také řadu nádorových onemocnění, autoimunitních onemocnění (systémový lupus, revmatoidní artritida), HIV infekci a řadu jiných (neovlivňuje jen apoptózu buněk, ale ovlivňuje také aktivitu některých T buněk, aj.) [101].

Jeremias a jeho kolektiv na zvířecích modelech potvrdil, že systém CD95 hraje významnou roli v autodestrukci myocytů v průběhu ischemicko-reperfuzního poškození

[99]. Také Shimizu se snažil definovat molekuly, které regulují apoptózu kardiomyocytů v průběhu AIM. Zjistil, že Fas (nebo také CD95, APO-1) působí prostřednictvím kaspáz a je vyjádřen na řadě buněk včetně kardiomyocytů, zatímco Fas ligand (FasL nebo také CD95L, APO-1 ligand) je cytokin působící prostřednictvím vazby na receptory a je vyjádřen na NK buňkách, aktivovaných T-lymfocytech a makrofázích [100]. Vysoké hladiny sFasL byly naměřeny v koronárním sinu než v periferní krvi, což svědčí pro mnohem vyšší koncentraci v místě culprit léze (hladiny sFasL stoupají velmi časně po AIM) [100, 102]. Podobné výsledky přinesla i práce Leeho, který prokázal, že potlačení FasL přispívá ke snížení rozsahu ischémie myokardu [103]. Bossowska se spolupracovníky měřila expresi Fas/FasL na lymfocytech získaných z periferní krve a opět byly vyšší hladiny naměřeny u pacientů s AIM nebo nestabilní anginou pectoris. Dále prokázala významně pozitivní korelaci mezi koncentrací LDL-cholesterolu, arteriální hypertenzí a hladinou Fas/FasL [104].

## **7 Cíle disertační práce**

Hlavním cílem naší práce je posouzení změn hladin vybraných imunitních parametrů, které se podílejí na procesu ischemie a reperfuze v průběhu akutního infarktu myokardu provázeného elevacemi ST segmentů léčeného přímou koronární angioplastikou, a zhodnocení využití nových technologií při stanovování těchto parametrů.

### **Dílčí cíle disertační práce:**

1/ Stanovení parametrů humorální imunity (PTX3, sCD163, sGP130 a sCD95/Fas).

- Analýza změny hladin sledovaných parametrů v průběhu 96 hodin akutního STEMI
- Porovnání hladin těchto parametrů s markerem strukturálního poškození myokardu (hsTnT)
- Posouzení jejich vztahu k rozsahu poškození myokardu LK vyjádřeným hodnotou ejekční frakce levé komory

2/ Využití biočipových technologií při stanovení vybraných parametrů (TnI, CK MB, MYO, GPBB, hFABP a CAIII).

- Analýza změny hladin sledovaných parametrů v průběhu 96 hodin akutního STEMI
- Porovnání hladin těchto parametrů s markerem strukturálního poškození myokardu (hsTnT)
- Posouzení jejich vztahu k rozsahu poškození myokardu LK vyjádřeným hodnotou ejekční frakce levé komory

Pro řešení otázek každého z dílčích cílů byla provedena podstudie na samostatném definovaném souboru pacientů. Ve všech skupinách bylo provedeno jednorozční sledování mortality.

## **8 Stanovení parametrů humorální imunity**

### **8.1 Metodika**

#### **8.1.1 Soubor pacientů**

Parametry humorální imunity byly stanoveny u skupiny pacientů, kteří splňovali základní kritérium, tj. akutní infarkt myokardu s elevacemi ST segmentů léčený přímou koronární angioplastikou v době do 6 hodin od vzniku bolesti na hrudi a kteří podepsali souhlas se zařazením do studie, jejíž protokol byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Hradci Králové. Ze studie byli vyloučeni pacienti, u kterých byl znám nebo v průběhu hospitalizace diagnostikovaný stav, který by mohl ovlivnit hladiny sledovaných parametrů (tj. závažná porucha funkce ledvin, jater, imunodeficientní stavy, systémová onemocnění pojiva, přítomnost nádorového onemocnění, imunosupresivní terapie nebo aktivní zánětlivé onemocnění), a dále nemocní, kteří byli mladší 18 let a kteří nepodepsali souhlas se studií.

Soubor pacientů: Kritéria splňovalo celkem 29 pacientů (86,2% mužů a 13,8% žen průměrného věku 64,55 let  $\pm$  7,55 let, ve věkovém rozmezí 54-81 let, rizikové faktory jsou rozepsány v tabulce č. 6) a jednotlivá klinická data jsou detailně uvedena v tabulce č. 7. Základním zdrojem klinických dat byl chorobopis pacienta, zprávy od ambulantních lékařů, údaje zaznamenané v nemocničním informačním systému a anamnestická data získaná nebo doplněná přímo od pacienta. U zařazených pacientů byly i po propuštění do domácího prostředí sledovány recidivy kardiálních příhod. Všichni pacienti byli telefonicky kontaktováni za 6 měsíců a za 1 rok od propuštění. Hodnocenými parametry byla recidiva AIM, vznik nebo zhoršení srdečního selhávání, smrt pacienta z kardiálních příčin a zhoršení anginy pectoris nebo nutnost rekonarografie s provedením PCI. Smrt z kardiálních příčin byla definována jako smrt z důvodu AIM, srdečního selhávání nebo jako náhlá smrt, která nastala do 1 hodiny od vzniku symptomů. Srdeční selhávání bylo anamnesticky hodnoceno škálou NYHA (New York Heart Association, stupně I-IV) a v případě jeho další progresse s nutností rehospitalizace bylo vedle klinických známek potvrzeno i změnami na rentgenogramu hrudníku či progresí systolické dysfunkce levé komory srdeční. Recidiva AIM byla definována jako recidiva symptomů ischemie s ischemickými změnami na EKG a laboratorně pozitivními markery nekrózy myokardu.

Tabulka č. 6: Přehled rizikových faktorů u zařazených pacientů, kde byla sledována humorální imunita.

Parametr		<b>Celý soubor</b> (n = 29)	<b>Muži</b> (n = 25)	<b>Ženy</b> (n = 4)	<b>p</b>
<b>Věk (roky) x ± SD</b>		65,58 ± 7,55	64,6 ± 6,37	71,75 ± 10,75	ns
<b>Anamnestická data</b>	kouření n (%)	23 (79,3)	21 (84)	2 (50)	0,03
	nadváha/obezita n (%)	8 (27,5)	7(28)	1 (25)	ns
	rodinná zátěž n (%)	15 (51,7)	14 (56)	1 (25)	ns
	arteriální hypertenze n (%)	13 (44,8)	10 (40)	3 (75)	ns
	diabetes mellitus n (%)	7 (24,1)	6 (24)	1 (25)	ns
	hyperlipoproteinemie n (%)	20 (68,8)	16 (64)	4 (100)	ns
	anamnéza IM n (%)	3 (10,3)	3 (12)	0	ns
	CMP/TIA n (%)	0	0	0	
<b>Předchozí medikace</b>	ACEi n (%)	7 (24,1)	6 (24)	1 (25)	ns
	BB n (%)	4 (13,8)	4 (16)	0	ns
	ASA n (%)	2 (6,8)	2 (8)	0	ns
	Ca blokátor n (%)	4 (13,8)	4 (16)	0	ns
	Statin/fibrát n (%)	3 (10,4)	3 (12)	0	ns
<b>Lipidy v periferní krvi v době přijetí</b>	celkový cholesterol (mmol/l) x ± SD	4,88 ± 1,45	4,78 ± 1,5	5,57 ± 0,79	ns
	HDL cholesterol (mmol/l) x ± SD	1 ± 0,43	1,1 ± 0,43	0,97 ± 0,47	ns
	LDL cholesterol (mmol/l) x ± SD	3,36 ± 1,05	3,39 ± 1,1	3,1925 ± 1,1	ns
	TAG (mmol/l) x ± SD	1,63 ± 0,99	1,67 ± 1,0	1,3925 ± 0,68	ns
<b>Hodnota kreatininu (umol/l) x ± SD</b>		82,41 ± 18,1	85,1 ± 17,1	65,75 ± 10,31	0.05



Tabulka č. 7: Klinická data zařazených pacientů, kde byla sledována humorální imunita.

Parametr		Celý soubor (n = 29)	Přední AIM (n = 15)	Spodní AIM (n = 12)	Ostatní AIM (n = 2)
Třída podle Killipa při přijetí	I n (%)	25 (86)	14 (93,3)	12 (100)	1 (50)
	II n (%)	1 (3,5)	1 (6,6)	0	0
	III n (%)	0	0	0	0
	IV n (%)	3 (10,3)	0	0	1 (50)
KCPR při přijetí n (%)		3 (10,3)	2 (13,3)	0	1 (50)
EF LK (%) x ± SD		45,60 ± 8,6	40,34 ± 4,2	51,4 ± 8,3	55,0 ± 5,1
Šíře QRS (ms) x ± SD		91 ± 18	91,1 ± 21,2	83,8 ± 13,2	90 ± 10
Tromboaspirace n (%)		6 (21)	2 (13,3)	4 (33,4)	0
Restenóza n (%)		1 (3,5)	1 (6,6)	0	0
TIMI flow	0 n (%)	0	0	0	0
	1 n (%)	0	0	0	0
	2 n (%)	8 (27,6)	4 (26,6)	4 (33,4)	0
	3 n (%)	21 (72,4)	11 (73,3)	8 (66,4)	2 (100)
Exitus n (%)		0	0	0	0
Kontrola za 6 měsíců	NYHA I n (%)	26 (89,6)	13 (86,6)	11 (91,6)	1 (50)
	NYHA II n (%)	2 (6,8)	1 (6,6)	1 (8,3)	1 (50)
	NYHA III n (%)	1 (3,5)	1 (6,6)	0	0
	NYHA IV n (%)	0	0	0	0
Kontrola za 12 měsíců	NYHA I n (%)	26 (89,6)	13 (86,6)	11 (91,6)	1 (50)
	NYHA II n (%)	2 (6,8)	1 (6,6)	1 (8,3)	1 (50)
	NYHA III n (%)	1 (3,5)	1 (6,6)	0	0
	NYHA IV n (%)	0	0	0	0

Terapie pacientů: Pacienti byli léčeni podle standardního protokolu, tj. 12ti svodový elektrokardiogram, biochemické vyšetření a vyšetření krevního obrazu, intravenózní podání 1 amp. Aspegicu (lysini acetylsalicylas, 500mg) a nefrakcionovaného heparinu (dávka stanovena podle hmotnosti pacienta). Poté transport do katetrizační laboratoře, kde byla provedena na přístroji Axiom Artis (Siemens, Německo) koronarografie a následně reperfúze uzavřené tepny. Přístupovou cestou byla arteria radialis, do které byl zaveden 5-6 F zavaděč. V případě positivity Allenova testu byl výkon proveden cestou a. femoralis. V průběhu vyšetření byl za kontrol ACT (aktivovaný koagulační čas) podáván

nefrakciovaný heparin a během výkonu byly zobrazeny všechny koronární cévy ve standardizovaných projekcích. Na základě získaných zobrazení věnčitých cév a jejich anatomie byla provedena koronární intervence, jejíž efekt byl hodnocen škálou TIMI (stupeň 0-3). Poté byli pacienti převezeni na jednotku intenzivní péče, kde probíhala následná standardní terapie - podávání duální antiagregační terapie (kyselina acetylsalicylová a clopidogrel), titrace betablokátoru, inhibitoru angiotenzin konvertujícího enzymu a statinu. U pacientů se známkami srdečního selhání byla podávána diuretika, u pacientů v kardiogenním šoku katecholaminy, oběhové podpory atd. Během prvních 24 hodin bylo provedeno echokardiografické vyšetření (přístroj HP Sonos 5500, Hewlett Packard, USA), rentgenogram hrudníku, kontrolní EKG a biochemické stanovení.

### **8.1.2 Stanovení jednotlivých parametrů**

Pro potřeby studie byla odebírána periferní žilní krev ze zavedené kanyly ve v.cubitalis. Odběry byly provedeny podle časového schématu: první odběr v době přijetí (před provedením PCI), druhý odběr – 24 hodin od přijetí a třetí odběr – 96 hodin od přijetí. Ihned po odběru byly zkumavky se vzorky krve odeslány ke zpracování do Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové, kde byla část odebraného materiálu ihned zpracována. Po stanovení aktivity kreatinkinázy v séru CK (komerčně používaná enzymatická metoda, norma 0,63-2,91  $\mu\text{kat/l}$ ), izoformy CK MB (norma 0,12-0,42  $\mu\text{kat/l}$ ) a vysoce senzitivního troponinu T (hs TnT, metoda elektroimunochemiluminiscence na analyzátoru COBAS e411 od firmy Roche, Švýcarsko, norma 0-0,014  $\mu\text{g/l}$ ) byla druhá část vzorku centrifugována při 3500 otáčkách/minuta po dobu 10 minut a sérum poté uchováno při teplotě  $-70^{\circ}\text{C}$  k pozdějším analýzám.

Stanovení ostatních parametrů: Metodou ELISA byly s využitím komerčně dostupných sad stanoveny tyto parametry: PTX3 (detekční limit stanovený výrobcem je 0,007 - 0,116  $\mu\text{g/l}$ , mean 0,025  $\mu\text{g/l}$ , Quantikine, R&D Systems, USA), sCD163 (detekční limit stanovený výrobcem 0,613  $\mu\text{g/l}$ , Quantikine, R&D Systems, USA), sGP130 (detekční limit stanovený výrobcem  $< 0,05 \mu\text{g/l}$ , mean 306  $\mu\text{g/l}$ , Quantikine, R&D Systems, USA), sCD95 Fas (detekční limit stanovený výrobcem  $< 20 \text{ pg/ml}$ , mean 9406  $\text{pg/ml}$ , Quantikine, R&D Systems, USA).

Stejná vyšetření byla provedena i u skupiny zdravých dárců krve (odběr K), u které nebylo zjištěno žádné onemocnění, které by interferovalo s hodnocenými parametry

(negativní anamnéza stran kardiovaskulárních, jaterních, renálních nebo nádorových onemocnění a byly vyloučeny všechny stavy, které by mohly ovlivnit výsledky imunitních měření – akutní nebo chronická zánětlivá onemocnění).

### 8.1.3 Statistika

Pro veškeré statistické zpracování získaných dat byl využit počítačový program MedCalc (MedCalc Software, Belgie). Normalita rozložení dat byla testována Kolmogorovovým-Smirnovým testem. Data s normálním rozložením jsou prezentována ve formě průměr ± směrodatná odchylka (SD), data s nenormální distribucí jsou prezentována ve formě mediánu, 25. a 75. percentilu, případně s uvedením minimální a maximální hodnoty. Kategorické proměnné jsou uvedeny ve formě počtů s uvedením procenta. Pro porovnání spojitých proměnných skupiny pacientů a kontrolní skupiny byl použit nepárový Studentův t-test, v případě nerovnoměrného rozložení byl použit Mann-Whitney test. Pro porovnání změn hladin spojitých veličin byl použit párový Studentův t-test, Wilcoxonův test v závislosti na normalitě rozložení. Vztah mezi spojitými veličinami byl hodnocen metodou lineární regrese. Za statisticky významné jsou považovány hodnoty  $p < 0,05$ .

## 8.2 Výsledky parametrů humorální imunity

### 8.2.1 Analýza změn hladin sledovaných parametrů v průběhu 96 hodin akutního STEMI

Z markerů humorální imunity jsme v průběhu akutního infarktu myokardu (STEMI) sledovali změnu koncentrací PTX3, sCD163, sGP130 a sCD95/Fas. Byla hodnocena dynamika změn ve sledovaném období (v čase 0, 24 a 96 hodin od přijetí) a zjištěné hodnoty byly porovnány s hodnotami kontrolní skupiny (tabulka č. 8). Jako referenční marker strukturálního poškození byl zvolen hsTnT, jehož hladiny byly také stanoveny.

Tabulka č. 8: Přehled naměřených hodnot sledovaných markerů humorální imunity.

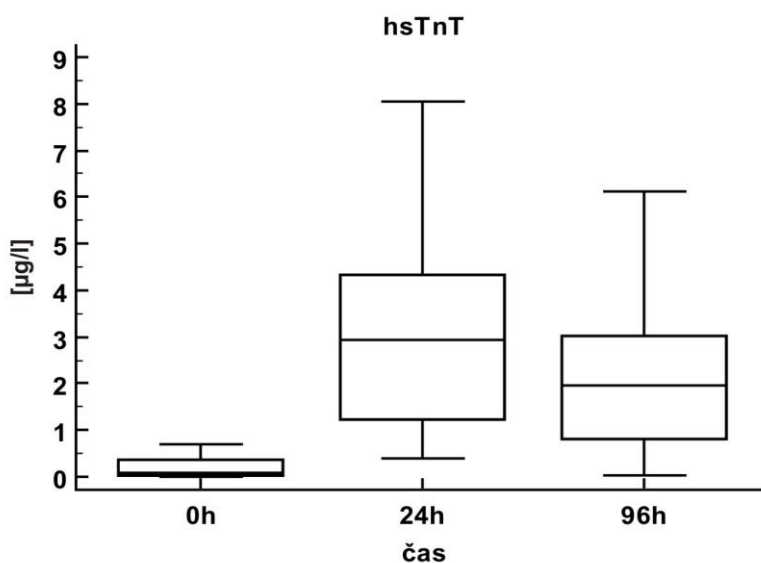
Parametr	Kontroly	Soubor pacientů					
	Kontroly	0 h	p	24 h	p	96 h	p
	medián (1Q;3Q)	medián (1Q;3Q)		medián (1Q;3Q)		medián (1Q;3Q)	
<b>PTX3</b>	2,4 (1,9;3,1)	2,69 (2,04;4,98)	0,181	3,36 (2,28;5,25)	0,011	2,69 (2,29;3,89)	0,16

<b>(µg/l)</b>							
<b>sCD163 (µg/l)</b>	1178 (1078;1265)	1770,5 (1451;2096,25)	<0,001	2063 (1589;2453)	<0,001	2116 (1924;2458)	<0,001
<b>sGP130 (µg/l)</b>	223,6 (208,9;248,9)	279,65 (235,75;296,73)	<0,001	279,4 (261,1;296,4)	<0,001	267,6 (240,9;301,7)	<0,001
<b>sCD95/Fas (pg/ml)</b>	7532 (6558;8756)	9340,5 (8363,25;10325)	<0,001	10700 (9550;12200)	<0,001	9883 (8258;11400)	<0,001
<b>hsTnT (µg/l)</b>	0,007 (0,005;0,009)	0,09 (0,034; 0,34)	<0,001	2,7 (1,19; 3,83)	<0,001	1,93 (0,80; 2,86)	<0,001

### Vysoce senzitivní troponin T (hsTnT)

Hladina hsTnT byla statisticky významně zvýšena v čase 24 hodin od přijetí a poté jen pozvolna klesala (čas 0h: 0,09 (0,034; 0,34), vs. kontroly 0,007 (0,005;0,009), <0,001, 24 hod.: 2,7 (1,19; 3,83), vs. kontroly 0,007 (0,005;0,009), <0,001, 96h: 1,93 (0,80; 2,86), vs. kontroly 0,007 (0,005;0,009), <0,001). Viz graf č. 1.

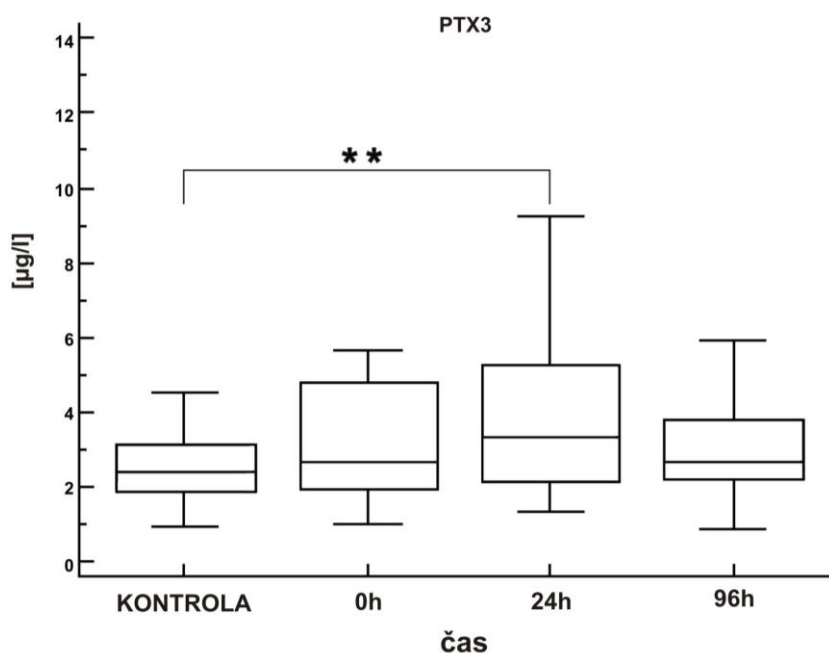
Graf č. 1: Naměřené koncentrace hsTnT v čase 0 a za 24 a 96 hodin od přijetí.



### Pentraxin3 (PTX3)

Hladina PTX3 byla statisticky zvýšena v čase 24 hodin od přijetí (čas 0h: 2,69 (2,04;4,98) vs. kontroly 2,4 (1,9;3,1),  $p=0,181$ , 24 hod.: 3,36 (2,28;5,25) vs. kontroly 2,4 (1,9;3,1),  $p=0,011$ , 96h: 2,69 (2,29;3,89) vs. kontroly 2,4 (1,9;3,1),  $p=0,16$ ). Viz graf č. 2.

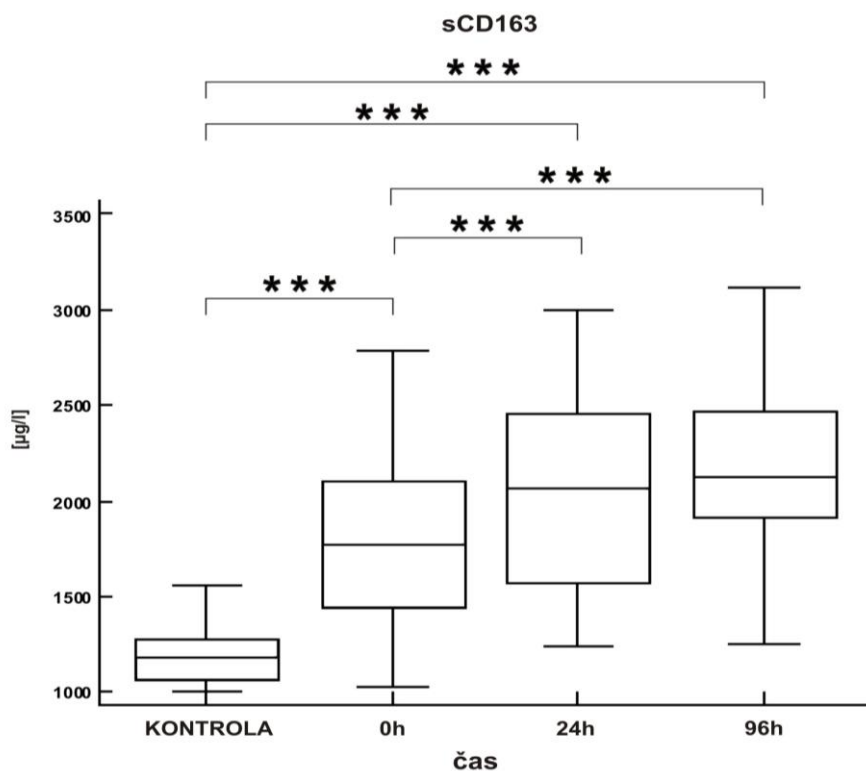
Graf č. 2: Naměřené koncentrace PTX3 v jednotlivých odběrech. Jejich vzájemné porovnání a určení statistické významnosti jednotlivých vztahů (\*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ ).



### sCD163

Hladina sCD163 byla statisticky významně zvýšená již v čase přijetí a v dalších měřeních se dále zvyšovala (čas 0h: 1770,5 (1451; 2096,25) vs. 1178 (1078; 1265),  $p<0,001$ , 24 hod.: 2063 (1589; 2453) vs. 1178 (1078; 1265),  $p<0,001$ , 96h: 2116 (1924; 2458) vs. 1178 (1078; 1265),  $p<0,001$ ). Viz graf č. 3.

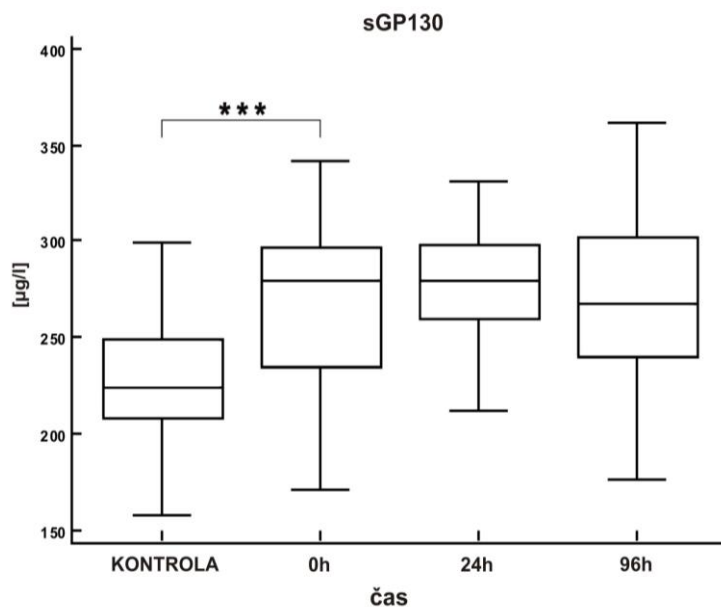
Graf č. 3: Naměřené koncentrace sCD163 v jednotlivých odběrech. Jejich vzájemné porovnání a určení statistické významnosti jednotlivých vztahů (\*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ ).



### sGP130

Hladina sGP130 stoupá časně již při přijetí a její zvýšení přetrvávalo až do konce sledovaného období (čas 0h: 279,6 (235,75; 296,73) vs. 223,6 (208,9; 248,9),  $p < 0,001$ , 24 hod.: 279,4 (261,1; 296,4) vs. 223,6 (208,9; 248,9),  $p < 0,001$ , 96h: 267,6 (240,9; 301,7) vs. 223,6 (208,9; 248,9),  $p < 0,001$ ). Viz graf č. 4.

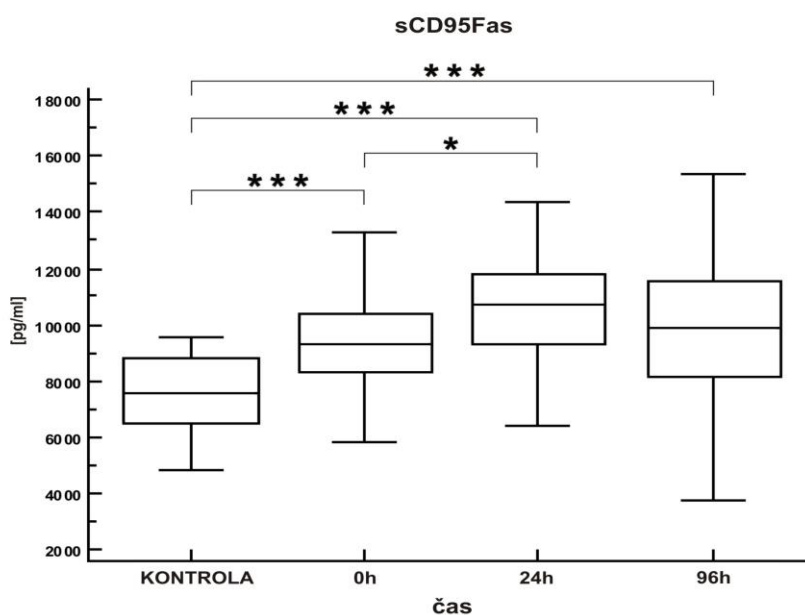
Graf č. 4: Naměřené koncentrace sGP130 v jednotlivých odběrech. Jejich vzájemné porovnání a určení statistické významnosti jednotlivých vztahů (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).



### sCD95/Fas

Hladina sCD95/Fas byla statisticky významně zvýšena již v čase 0 a teprve v odběru za 96 hodin se postupně snižovala (čas 0h: 9340,5 (8363,25; 10325) vs. 7532 (6558; 8756),  $p < 0,001$ , 24 hod.: 10700 (9550; 12200) vs. 7532 (6558; 8756),  $p < 0,001$ , 96h: 9883 (8258; 11400) vs. 7532 (6558; 8756),  $p < 0,001$ ). Viz graf č. 5.

Graf č. 5: Naměřené koncentrace sCD95/Fas v jednotlivých odběrech. Jejich vzájemné porovnání a určení statistické významnosti jednotlivých vztahů (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).



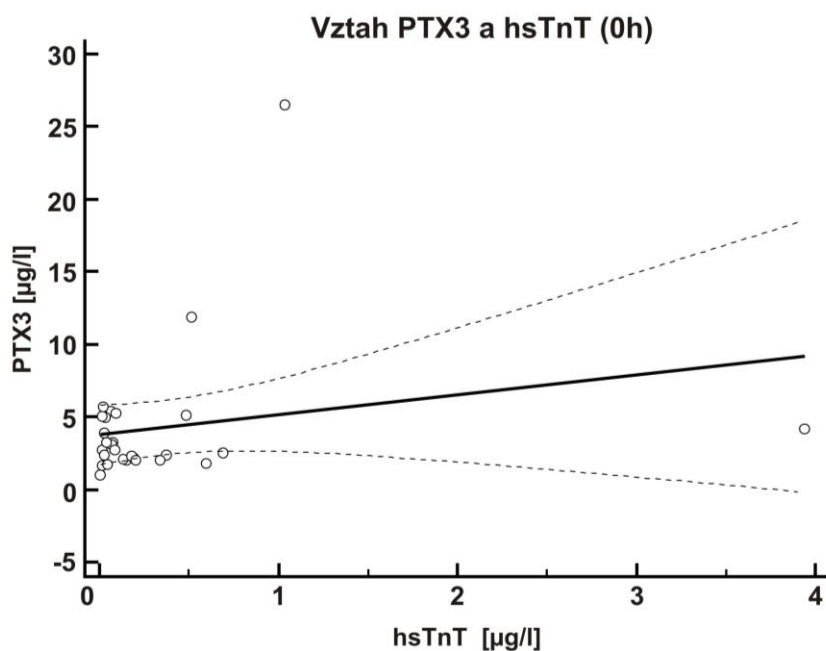
### 8.2.2 Porovnání hladin parametrů humorální imunity s markerem strukturálního poškození myokardu (hsTnT)

Vzhledem k tomu, že je koncentrace srdečních troponinů považována za ověřený parametr, jehož hladina významně koreluje s velikostí myokardiální nekrózy, byl hodnocen vztah každého sledovaného parametru humorální imunity (PTX3, sCD163, sGP130 a sCD95/Fas) k hodnotě troponinu T stanoveného vysocesenzitivní metodou v jednotlivých časových intervalech (čas 0, 24 a 96 hodin od přijetí).

#### Vztah hladiny hsTnT a pentraxinu 3

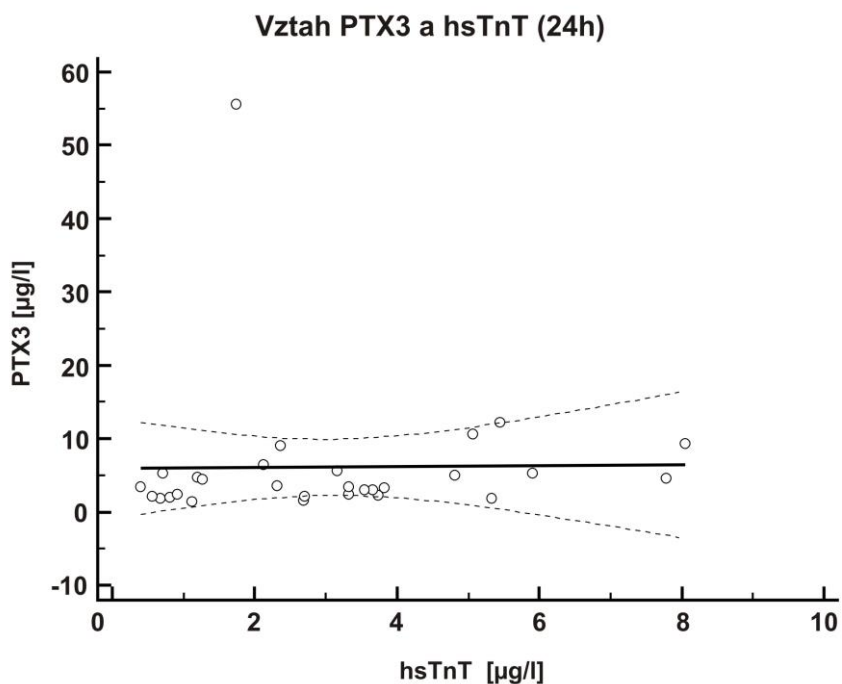
Ve vztahu PTX3 k hsTnT nebyla metodou regresní analýzy prokázána statisticky významná asociace (graf č. 6-8).

Graf č. 6: Asociace PTX3 ke koncentraci hsTnT v čase 0 stanovená metodou regresní analýzy ( $p=0,9$ ).

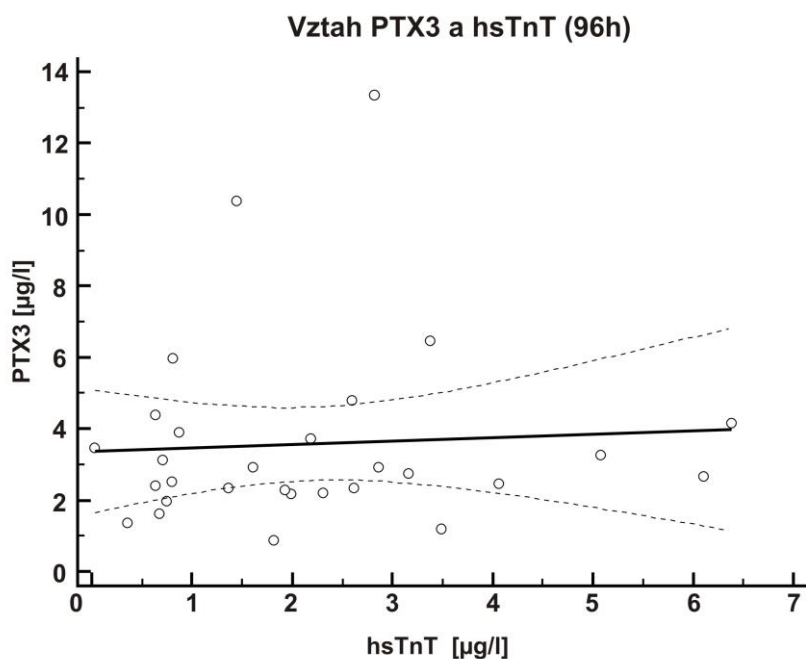


Graf č. 7: Asociace PTX3 ke koncentraci hsTnT v čase 24 hodin stanovená metodou regresní analýzy ( $p=0,94$ ).





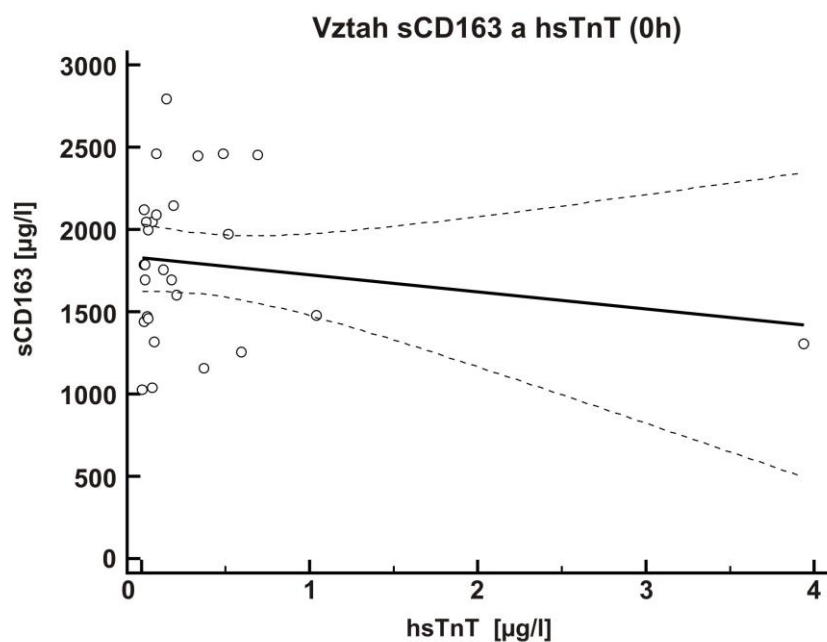
Graf č. 8: Asociace PTX3 ke koncentraci hsTnT v čase 96 hodin stanovená metodou regresní analýzy ( $p=0,78$ ).



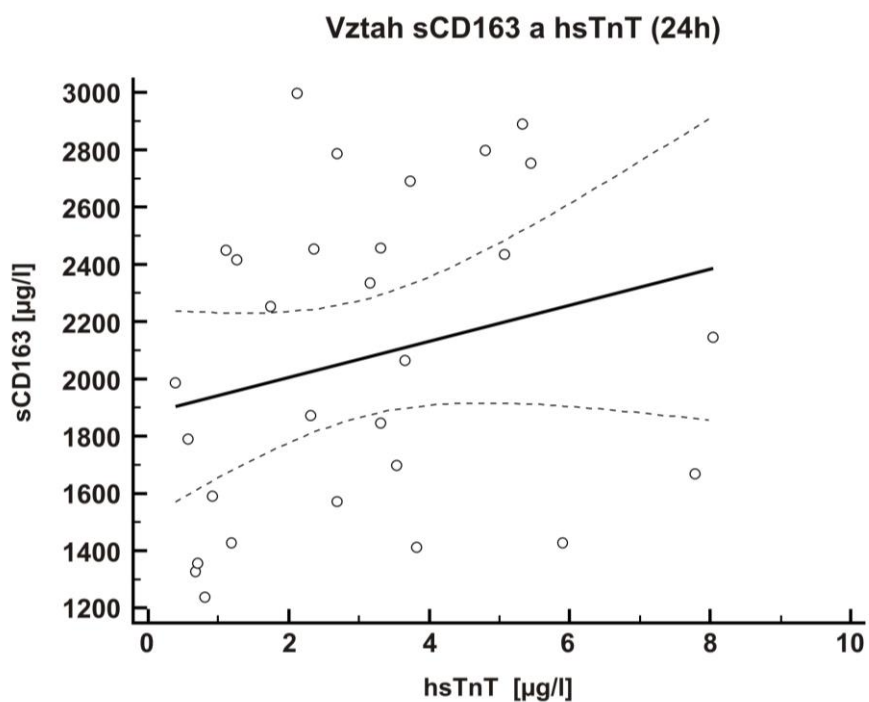
### Vztah hladiny hsTnT a sCD163

Vztah sCD163 k dynamice hsTnT byl ve všech měřeních statisticky nevýznamný (graf č. 9-11).

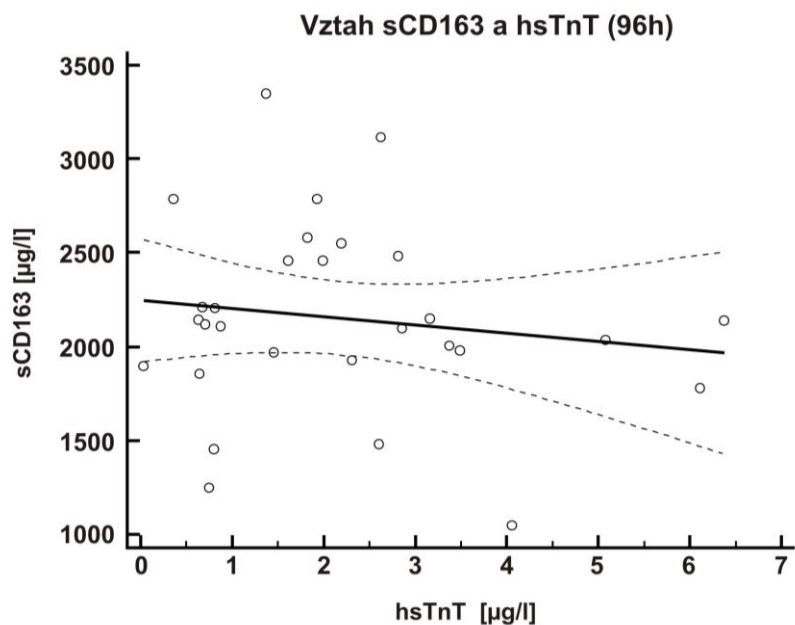
Graf č. 9: Asociace sCD163 ke koncentraci hsTnT v čase 0 stanovená metodou regresní analýzy ( $p=0,23$ ).



Graf č. 10: Asociace sCD163 ke koncentraci hsTnT v čase 24 hodin od přijetí stanovená metodou regresní analýzy ( $p=0,16$ ).



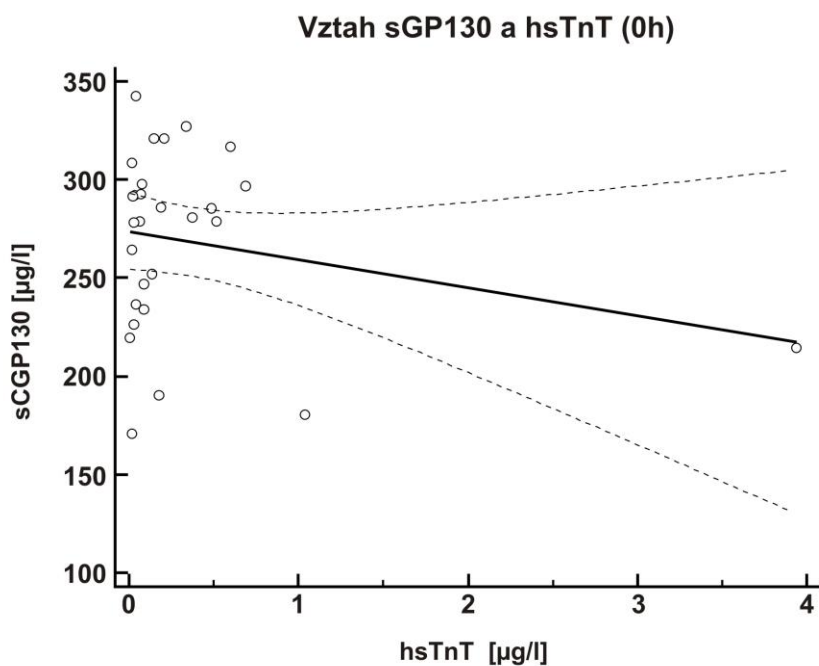
Graf č. 11: Asociace sCD163 ke koncentraci hsTnT v čase 96 hodin od přijetí stanovená metodou regresní analýzy ( $p=0,45$ ).



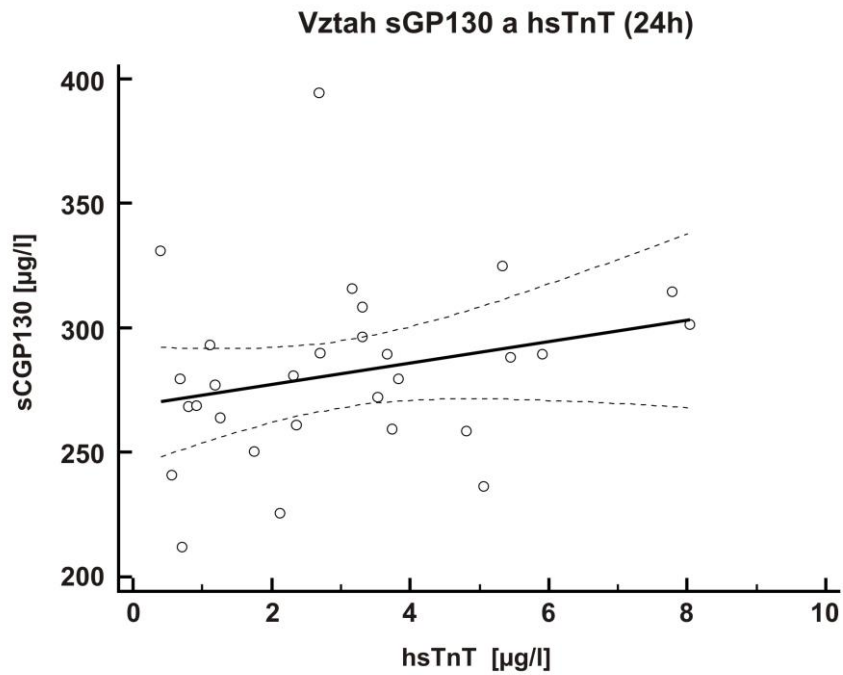
### Vztah hladiny hsTnT a sGP130

Také v případě sGP130 nebyla prokázána statisticky významná asociace ve vztahu k hsTnT (graf č. 12-14).

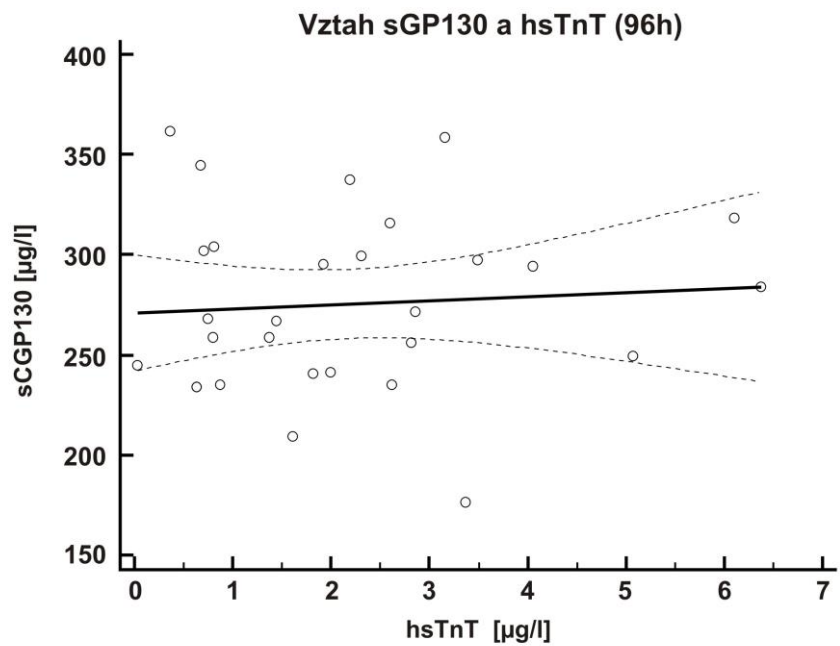
Graf č. 12: Asociace sGP130 ke koncentraci hsTnT v čase 0 stanovená metodou regresní analýzy ( $p=0,23$ ).



Graf č. 13: Asociace sGP130 ke koncentraci hsTnT v čase 24 hodin stanovená metodou regresní analýzy ( $p=0,18$ ).



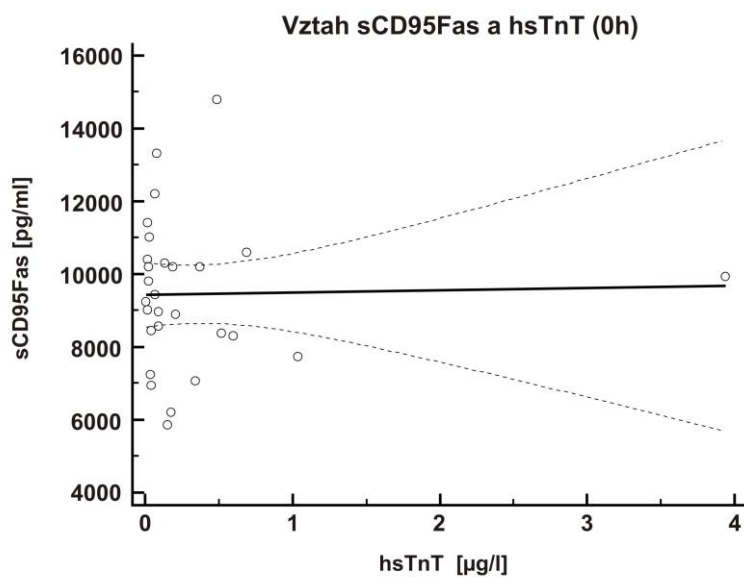
Graf č. 14: Asociace sGP130 ke koncentraci hsTnT v čase 96 hodin stanovená metodou regresní analýzy ( $p=0,69$ ).



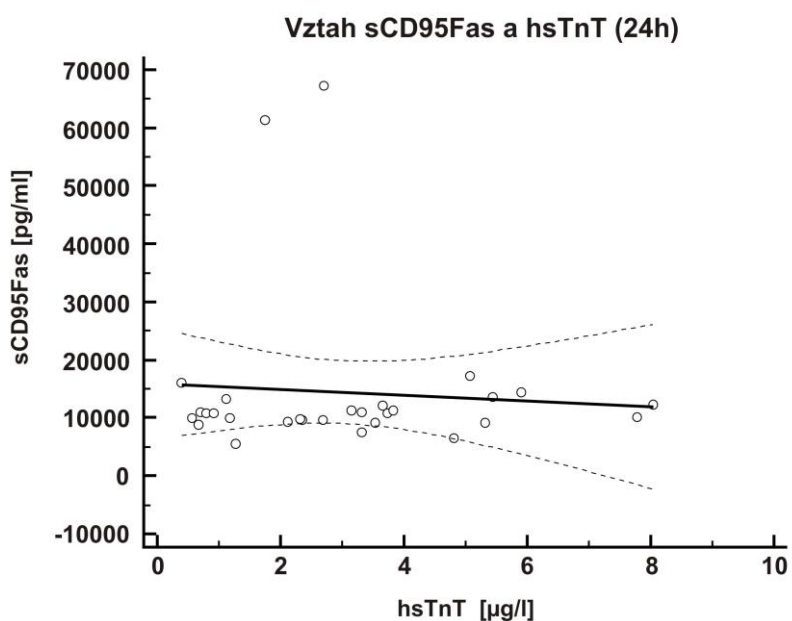
## Vztah hladiny hsTnT a sCD95/Fas

Vztah sCD95/Fas k hsTnT byl ve všech sledovaných měřeních statisticky nevýznamný (graf č. 15-17).

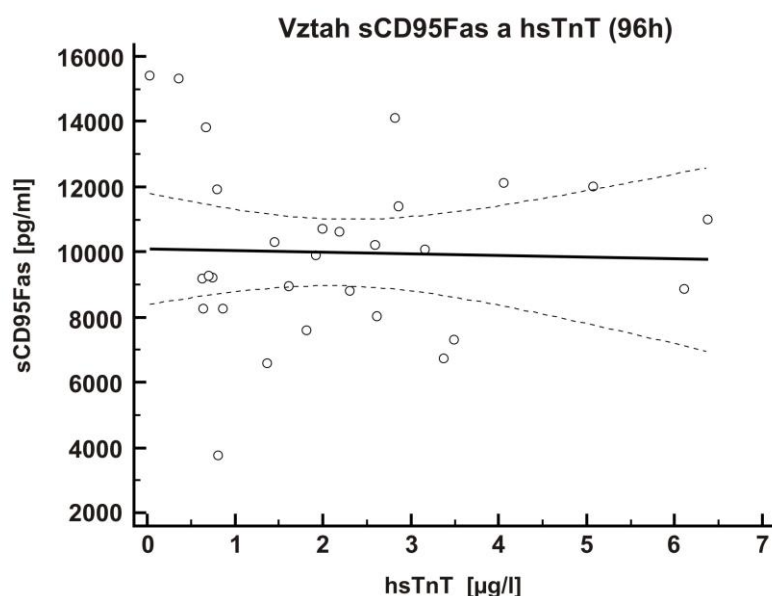
Graf č. 15: Asociace sCD95/Fas ke koncentraci hsTnT v čase 0 stanovená metodou regresní analýzy ( $p=0,97$ ).



Graf č. 16: Asociace sCD95/Fas ke koncentraci hsTnT v čase 24 hodin od přijetí stanovená metodou regresní analýzy ( $p=0,69$ ).



Graf č. 17: Asociace sCD95/Fas ke koncentraci hsTnT v čase 96 hodin od přijetí stanovená metodou regresní analýzy ( $p=0,84$ ).



### 8.2.3 Posouzení vztahu parametrů humorální imunity k rozsahu poškození myokardu LK vyjádřeným hodnotou ejekční frakce levé komory

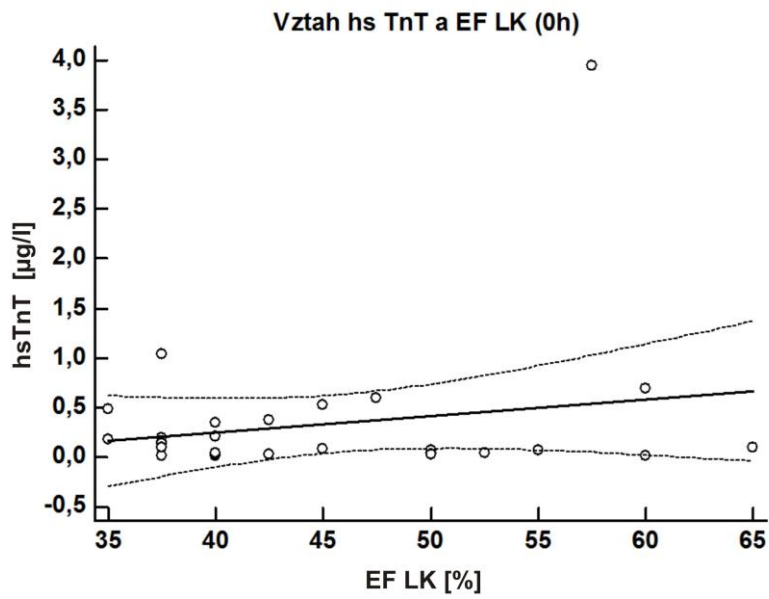
#### Vztah hsTnT a ejekční frakce levé komory srdeční

V tabulce č. 9 je provedeno porovnání hladiny hsTnT ve skupině s EF LK  $\leq 40\%$  a nad  $40\%$ . Analýza vztahu hodnot ejekční frakce LK a hodnot hsTnT prokázala, že hladina hsTnT významně stoupá u pacientů s EF LK pod  $40\%$  již za 24 hodin od přijetí [3,74 (2,7; 5,33) vs 2,22 (0,89; 3,2),  $p 0,01$ ] a statistická významnost přetrvává i v odběru za 96 hodin [2,62 (1,82; 3,49) vs (1,16 (0,69; 2,38),  $p 0,02$ )] (graf č. 18-20).

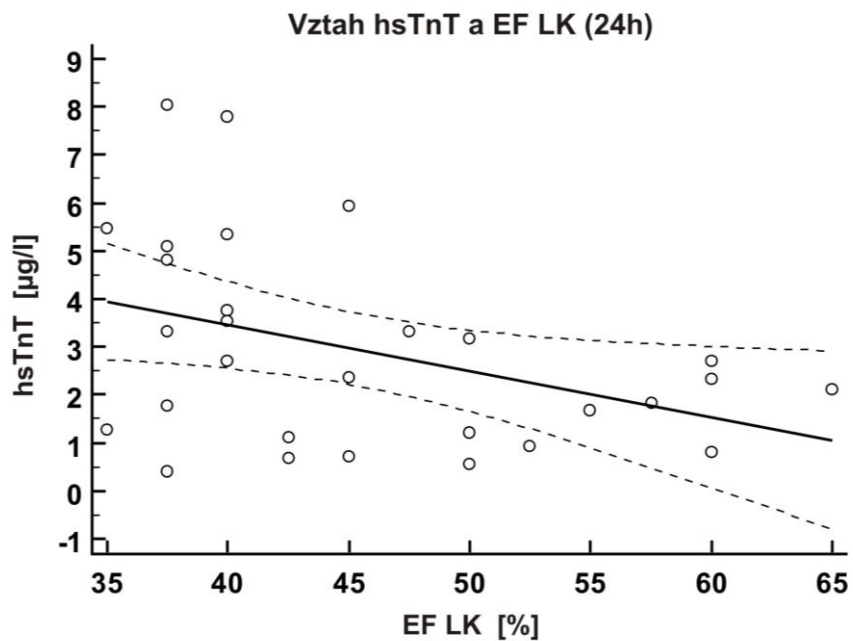
Tabulka č. 9: Hodnoty hsTnT ve vztahu k ejekční frakci LK.

Hodnoty hsTnT ve vztahu k ejekční frakci LK							
Čas odběru	EF LK $\leq 40\%$			EF LK $> 40\%$			p
	medián	25.percentil	75.percentil	medián	25.percentil	75.percentil	
0 h	0,151	0,043	0,208	0,069	0,0325	0,4455	0,46
24h	3,739	2,7	5,33	2,22	0,8885	3,2	0,01
96h	2,62	1,82	3,49	1,16	0,69625	2,3825	0,02

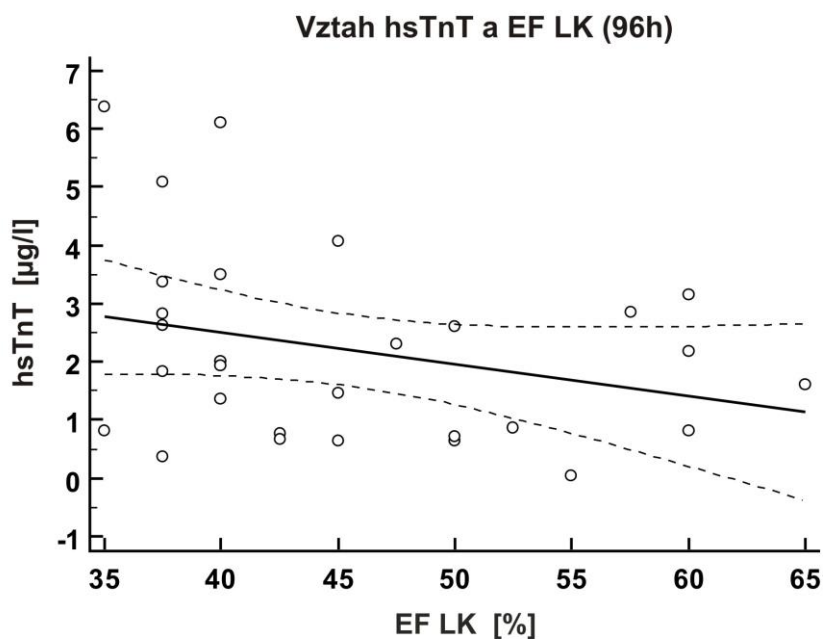
Graf č. 18: Asociace hodnot hsTnT k systolické funkci levé komory (EF $\leq 40\%$ ) při odběru v čase 0 ( $p = 0,30$ ).



Graf č. 19: Asociace hodnot hsTnT k systolické funkci LK (EF≤40%) při odběru za 24 hodin ( $p=0,01$ ).



Graf č. 20: Asociace hodnot hsTnT k systolické funkci LK (EF≤40%) při odběru za 96 hodin ( $p=0,02$ ).



### Vztah pentraxin3 a ejekční frakce levé komory srdeční

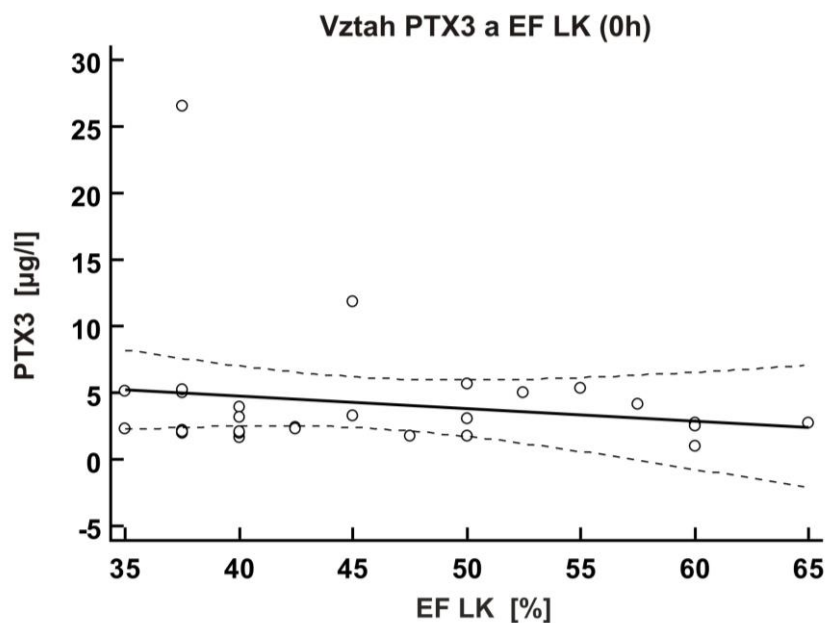
V tabulce č. 10 je provedeno porovnání hladiny PTX3 ve skupině s EF LK  $\leq 40\%$  a nad  $40\%$  (srovnání vyšla jako statisticky nevýznamná, graf č. 21-23).

Tabulka č. 10: Hodnoty PTX3 ve vztahu k ejekční frakci LK.

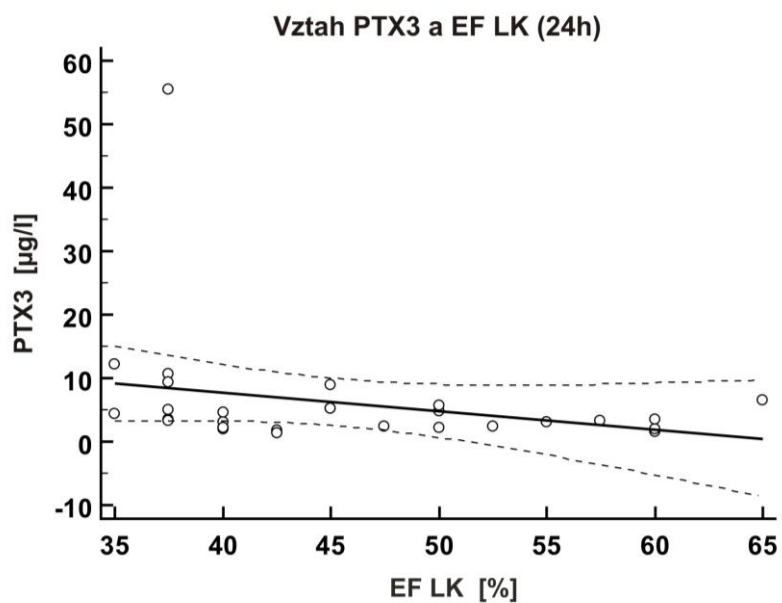
Hodnoty pentraxinu 3 ve vztahu k ejekční frakci LK							
Čas odběru	EF LK $\leq 40\%$			EF LK $> 40\%$			p
	medián	25.percentil	75.percentil	medián	25.percentil	75.percentil	
0 h	2,24	2,02	5,03	2,74	2,34	4,55	0,54
24h	4,35	2,97	9,24	3,09	2,11	5,21	0,15
96h	2,33	2,15	4,16	2,91	2,43	3,76	0,80

Graf č. 21: Asociace hodnot PTX3 k systolické funkci LK při odběru v čase 0 ( $p=0,54$ ).

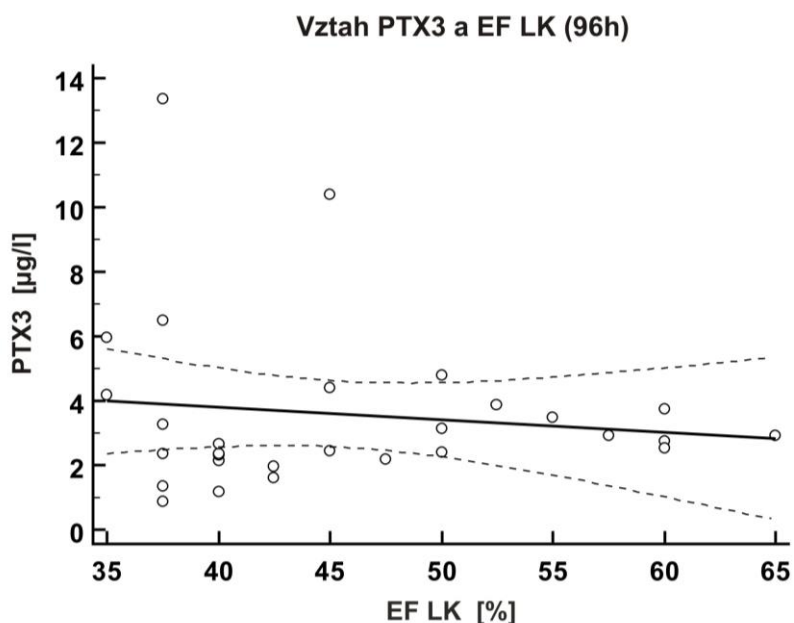




Graf č. 22: Asociace hodnot PTX3 k systolické funkci LK při odběru za 24 hodin od přijetí ( $p=0,15$ ).



Graf č. 23: Asociace hodnot PTX3 k systolické funkci LK při odběru za 96 hodin od přijetí ( $p=0,80$ ).



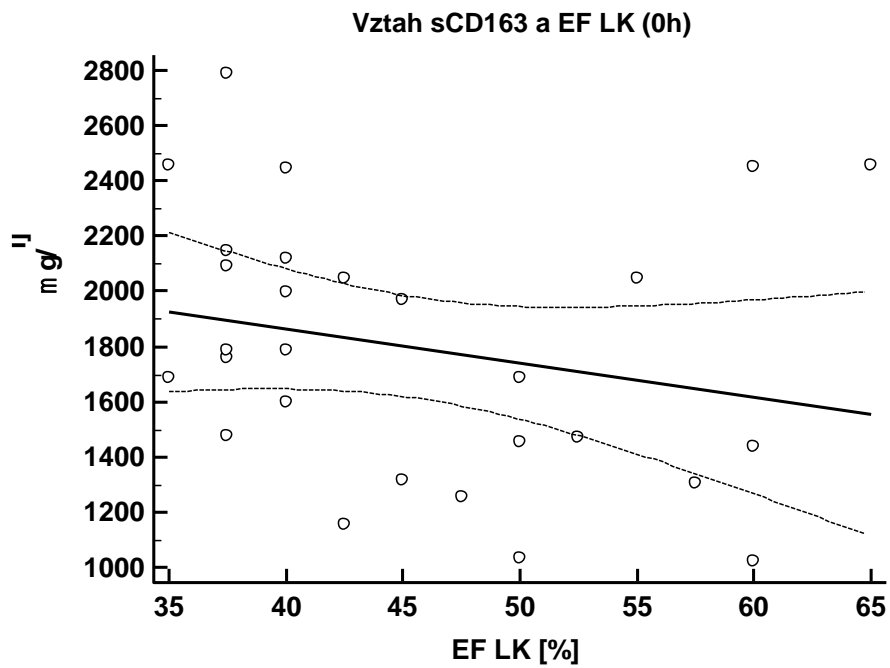
### Vztah sCD163 a ejekční frakce levé komory srdeční

V tabulce č. 11 je provedeno porovnání hladiny sCD163 ve skupině s EF LK  $\leq 40\%$  a nad  $40\%$ . Ukazuje se, že hladina sCD163 významně stoupá u pacientů s ejekční frakcí levé komory pod  $40\%$  již za 24 hodin [2435 (2145;2753) vs. 1689 (1421,5;2131)  $\mu\text{g/l}$ ,  $p=0,003$ ] a tento rozdíl přetrvává i v 96. hodině [2458 (2036;2783) vs. 2032 (1761,5;2143,5)  $\mu\text{g/l}$ ,  $p=0,004$ ] (graf č. 24-26).

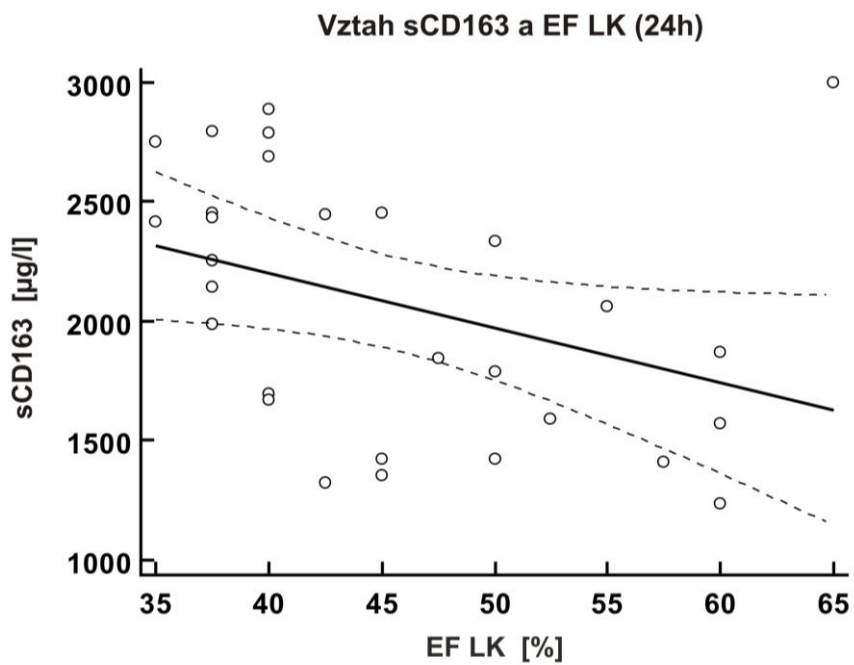
Tabulka č. 11: Hodnoty sCD163 ve vztahu k ejekční frakci LK.

<b>Hodnoty sCD163 ve vztahu k ejekční frakci LK</b>							
Čas odběru	EF LK $\leq 40\%$			EF LK $> 40\%$			p
	medián	25.percentil	75.percentil	medián	25.percentil	75.percentil	
0 h	1996	1756	2145	1456	1280,5	2006,5	0,022
24h	2435	2145	2753	1689	1421,5	2131	0,003
96h	2458	2036	2783	2032	1761,5	2143,5	0,004

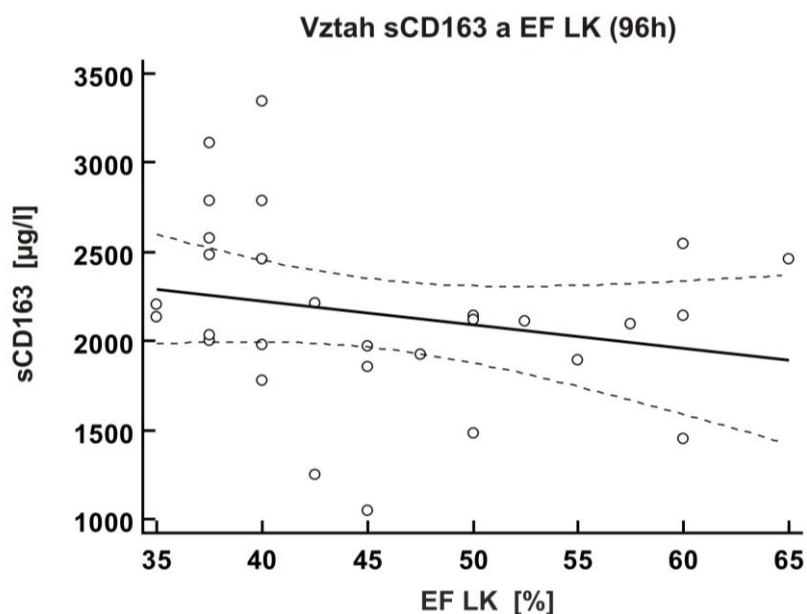
Graf č. 24: Asociace hodnot sCD163 k systolické funkci LK při odběru v čase 0 ( $p=0,022$ ).



Graf č. 25: Asociace hodnot sCD163 k systolické funkci LK při odběru za 24 hodin ( $p=0,003$ ).



Graf č. 26: Asociace hodnot sCD163 k systolické funkci LK při odběru za 96 hodin ( $p=0,004$ ).



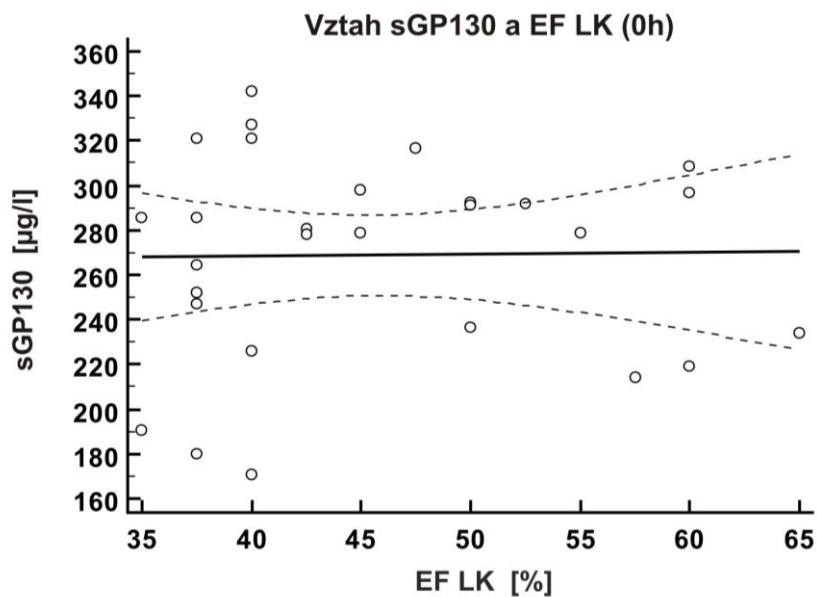
### Vztah sGP130 a ejekční frakce levé komory srdeční

V tabulce č. 12 je provedeno porovnání hladiny sGP130 ve skupině pacientů s EF LK  $\leq 40\%$  a nad  $40\%$ . Porovnání hladin jsou statisticky nevýznamná (graf č. 27-29).

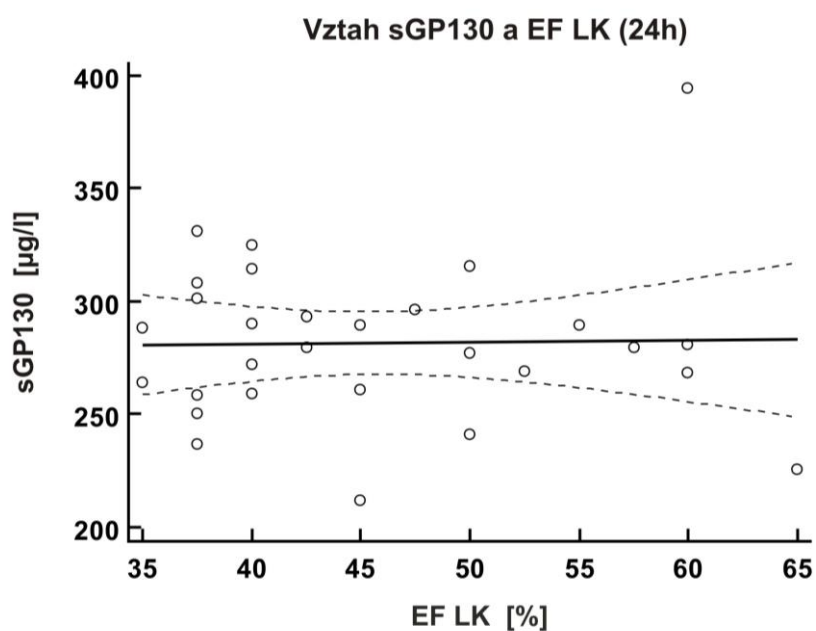
Tabulka č. 12: Hodnoty sGP130 ve vztahu k ejekční frakci LK.

Hodnoty sGP130 ve vztahu k ejekční frakci LK							
Čas odběru	EF LK $\leq 40\%$			EF LK $> 40\%$			p
	medián	25.percentil	75.percentil	medián	25.percentil	75.percentil	
0 h	264,3	226,1	320,8	280,6	257,25	294,45	0,50
24h	287,9	259,1	308,3	279,4	266,425	290,175	0,72
96h	258,5	240,9	297,1	269,55	242,375	305,15	0,90

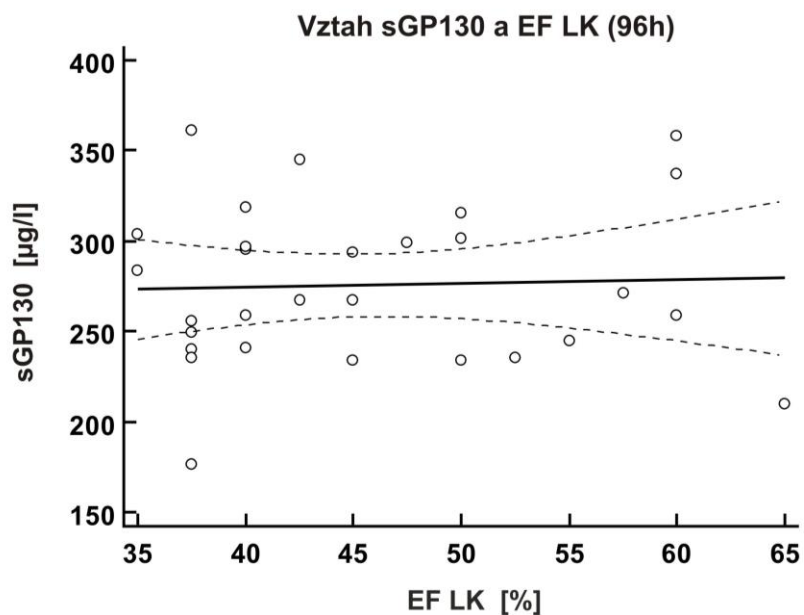
Graf č. 27: Asociace hodnot sGP130 k systolické funkci LK v průběhu prvního měření v čase 0 ( $p=0,50$ ).



Graf č. 28: Asociace hodnot sGP130 k systolické funkci LK při odběru za 24 hodin ( $p=0,72$ ).



Graf č. 29: Asociace hodnot sGP130 k systolické funkci LK při odběru za 96 hodin od přijetí ( $p=0,90$ ).



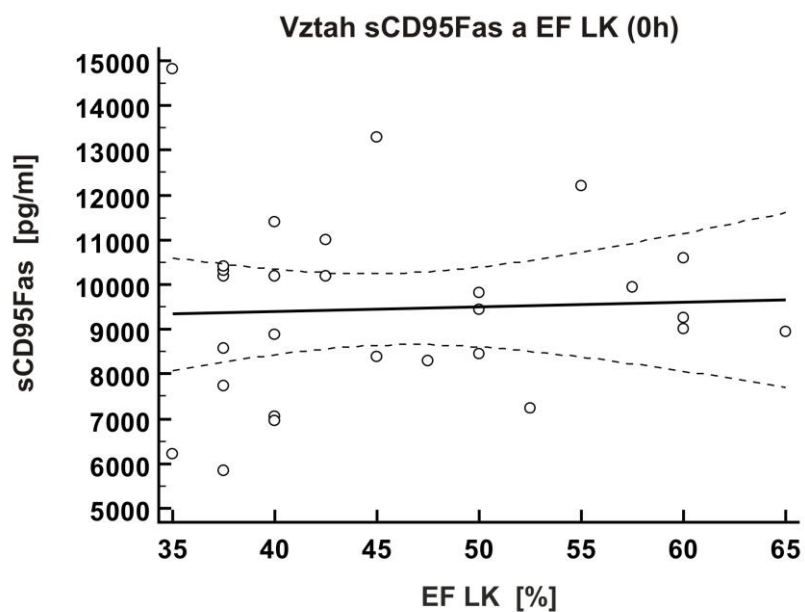
### Vztah sCD95/Fas a ejekční frakce levé komory srdeční

V tabulce č. 13 je provedeno porovnání hladiny sCD95/Fas ve skupině s EF LK  $\leq$  40% a nad 40%, které je u jednotlivých měření statisticky nevýznamné (graf č. 30-32).

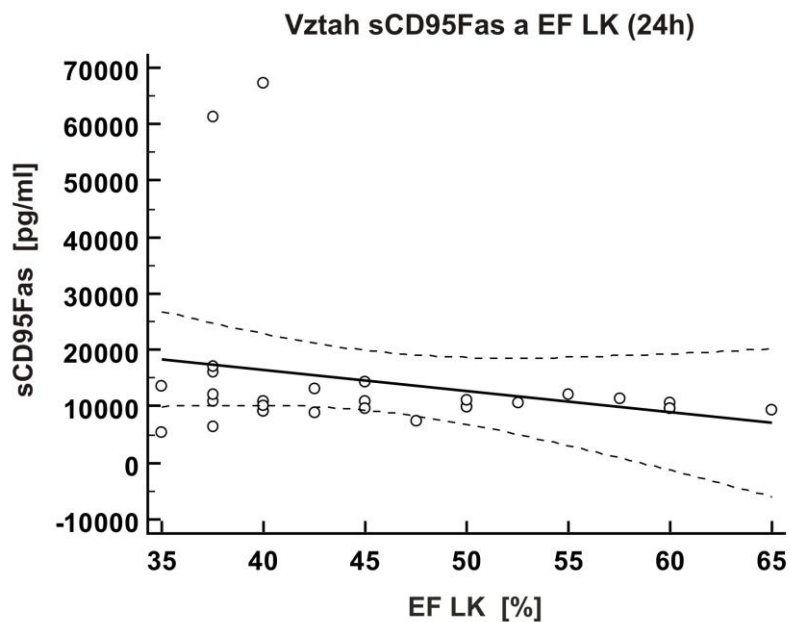
Tabulka č. 13: Hodnoty sCD95/Fas ve vztahu k ejekční frakci LK.

Hodnoty sCD95/Fas ve vztahu k ejekční frakci LK							
Čas odběru	EF LK $\leq$ 40%			EF LK $>$ 40%			p
	medián	25.percentil	75.percentil	medián	25.percentil	75.percentil	
0 h	8893	7055	10300	9436	8706	10400	0,42
24h	10900	9157	16000	10336,5	9636,25	11225	0,10
96h	8855	7307	11000	10140	9116,5	11525	0,26

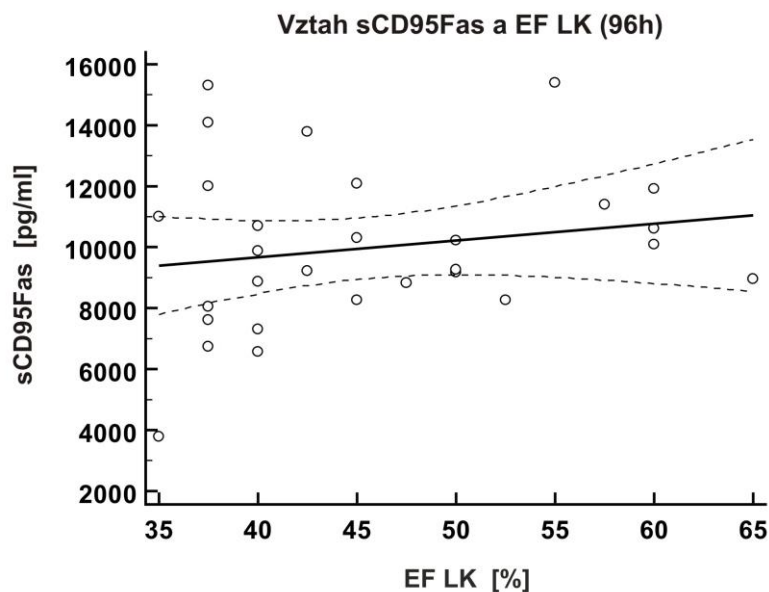
Graf č. 30: Asociace hodnot sCD95/Fas k systolické funkci LK při odběru v čase 0 ( $p=0,42$ ).



Graf č. 31: Asociace hodnot sCD95/Fas k systolické funkci LK při odběru za 24 hodin od přijetí ( $p=0,10$ ).



Graf č. 32: Asociace hodnot sCD95/Fas k systolické funkci LK při odběru za 96 hodin od přijetí ( $p=0,26$ ).



### 8.3 Diskuse

Cílem této podstudie bylo posouzení změn vybraných parametrů humorální imunity (PTX3, sCD163, sCD95/Fas a sGP130) v průběhu ischemie a reperfuze u akutního infarktu myokardu. Dalším cílem bylo zhodnocení jejich role ve stratifikaci rizika (ve vztahu k velikosti ložiska myokardiální nekrózy dvěma cestami: porovnáním s dobře známým markerem nekrózy - troponinem T, jehož hladina nepřímo odráží rozsah myokardiální nekrózy, a hodnotou ejekční frakce levé komory srdeční zjištěnou echokardiograficky).

U standardně užívaného markeru nekrózy hsTnT dochází k maximálnímu vzestupu koncentrací již v odběru za 24 hodin (změna je statisticky významná) a poté se jeho koncentrace pozvolna snižuje. Hladina hsTnT při měření za 24 hodin také významně koreluje se systolickou dysfunkcí levé komory srdeční (EF LK $\leq$ 40%) a můžeme tedy říci, že právě odběr provedený za 24 hodin od přijetí je potenciálním markerem pro další analýzu, tj. reflektuje velikost infarktového ložiska, je ukazatelem následné remodelace myokardu.

Solubilní forma znaku CD163 je jeho volná forma, která se vyskytuje v plazmě. Řada autorů potvrdila, že se protein CD163, který je přítomen na povrchu monocytů a makrofágů, vyskytuje především v nestabilních hemoragických plátech, kde potlačuje prozánětlivé funkce volného hemoglobinu jeho vychytáváním a přispívá ke stabilizaci plátů. Uvnitř těchto plátů je ale přítomna řada jiných neutrofilů, které uvolňují proteázy a



naopak tak přispívají k rozvolnění CD163 z povrchu buněk a jeho uvolnění do plazmy. Vyšší hladiny sCD163 byly také spojeny s dalšími rizikovými faktory jako vyšší věk, diabetes mellitus, nižší hodnoty HDL, aj. [95, 96, 98].

V průběhu prvního měření došlo k významnému vzestupu koncentrací sCD163 a naměřené maximální hodnoty byly v porovnání s kontrolní skupinou prakticky dvojnásobné. I v následujících odběrech se maximální hodnoty sCD163 ještě dále zvyšovaly. Pokud jsme porovnali jednotlivá měření s kontrolní skupinou, pak byly změny koncentrací vždy statisticky velmi významné ( $p < 0,001$ ) a také vzestup hodnot při odběru za 24 a 96 hodin vykazoval, v porovnání s prvním odběrem, výraznou změnu ( $p < 0,001$ ).

Prokázali jsme, že molekula sCD163 je snadno detekovatelná i z periferní krve a že je velmi těsně spjata se vznikem akutního koronárního syndromu, protože dochází velmi časně k významnému vzestupu její koncentrace. I přes tuto velmi výraznou dynamiku jsme ale nezjistili žádnou těsnou asociaci s dynamikou markerů nekrózy, jako je v praxi používaný hsTnT. Při porovnávání hodnot sCD163 změřených při druhém odběru byla metodou regresní analýzy prokázána souvislost se systolickou dysfunkcí LK (EF LK $\leq$ 40%). Můžeme tedy sCD163 považovat nejen za časný marker AIM, ale také za možný prediktor poinfarktové systolické dysfunkce LK (EF LK $\leq$ 40%).

Solubilní CD95/Fas je do oběhu uvolňován velmi časně v případě ischemie, IR a bylo prokázáno, že svým působením také výrazně ovlivňuje apoptózu buněk v oblasti IR poškození a tím tedy výsledný rozsah nekrózy. Někteří autoři také sledovali vztah sCD95/Fas k srdečnímu selhávání a systolické dysfunkci [100, 102, 103, 104].

Při jednotlivých námi prováděných měřeních docházelo v porovnání s kontrolní skupinou k časnému vzestupu koncentrací sCD95/Fas a maximálních hodnot bylo dosaženo při odběru za 24 hodin od přijetí. Při třetím posledním měření již docházelo k pozvolnému poklesu hodnot a maximální hodnoty byly srovnatelné s hodnotami při prvním měření v čase 0. Pokud jsme porovnali vzestup koncentrací sCD95/Fas z jednotlivých odběrů s hodnotami v kontrolní skupině, pak byl vypočítaný rozdíl vždy statisticky významný ( $p < 0,001$ ). K statisticky významné změně došlo i při porovnání hodnot prvního a druhého měření v čase 0 a za 24 hodin od přijetí ( $p < 0,05$ ). Na základě výše popsané dynamiky můžeme sCD95/Fas považovat za časný marker ischemie myokardu a protože již při třetím měření dochází k poklesu naměřených hodnot, může být i eventuelním ukazatelem reinfarktu (v naší studii ale žádný z pacientů časnou

recidivu AIM neprodělal, a proto nemůžeme tuto domněnku vyvrátit ani potvrdit). V naší studii jsme nezjistili žádnou souvislost mezi hodnotami sCD95/Fas a dynamikou hsTnT (vzájemná porovnání byla statisticky nevýznamná). Neprokázali jsme ani možnou souvislost mezi hladinou sCD95/Fas a systolickou dysfunkcí levé komory srdeční.

PTX3 je produkován řadou buněk, které jsou součástí aterosklerotického plátu a cévní stěny a do oběhu je uvolňován působením řady cytokinů. Bylo prokázáno, že hladiny PTX3 souvisí se závažností aterosklerózy a vyšší koncentrace se objevovaly i u pacientů se srdečním selháváním [81, 82, 83]. Naopak nebyl zjištěn ve zdravém srdci. Jiné studie sledovaly jeho prediktivní význam v posuzování mortality [81, 82, 85] nebo restenózy [88].

V případě PTX3 docházelo k pozvolnému vzestupu jeho koncentrací a při druhém odběru provedeném za 24 hodin od přijetí bylo dosaženo jeho maxima. V následujícím odběru se koncentrace pozvolna snižovaly a naměřené hodnoty se blížily hodnotám získaných při prvním odběru v čase 0. Pokud jsme porovnali jednotlivé odběry s kontrolní skupinou, pak byl nejvýraznější a tedy statisticky významný vzestup koncentrací zaznamenán při odběru za 24 hodin od přijetí ( $p < 0,05$ ). Vzájemná porovnání v postupně prováděných odběrech byla statisticky nevýznamná. Dynamika markeru PTX3 nevykazovala žádnou asociaci s hladinami hsTnT. Námi prováděná měření ani neprokázala souvislost koncentrací PTX3 se systolickou dysfunkcí LK (srovnání byla statisticky nevýznamná).

Solubilní GP130 je volná forma GP130, která je aktivována v odpovědi na zánět nebo ischemické poškození. Vlastní význam sGP130 v rozvoji aterosklerózy nebo ischemického poškození není zcela znám. Existují studie, které popisují jeho kardioprotektivní efekt (menší rozsah ischemie, stimulace tvorby kapilár, snížení rizika vzniku systolické dysfunkce myokardu), ale pak jsou jiné, které prokázaly jeho vztah k rozvoji hypertrofie LK, srdečního selhávání nebo ruptury myokardu [91, 93, 94].

Při hodnocení sGP130 dochází k již významnému vzestupu koncentrací při prvním odběru ( $p < 0,001$ ). Při druhém měření se koncentrace sGP130 již výrazně nezvyšují a při posledním měření za 96 hodin pozvolna klesají. Statisticky významné změny v koncentracích byly naměřeny pouze při porovnání hodnot mezi prvním odběrem v čase 0 a kontrolní skupinou, ostatní srovnání již byla statisticky nevýznamná. Naše studie na základě vývoje koncentrací sGP130 v průběhu prováděných měření neprokázala

žádný těsný vztah mezi tímto sledovaným parametrem a hsTnT a nebyla zjištěna ani možná souvislost se systolickou dysfunkcí LK srdeční.

Naše práce podle vývoje dynamiky hodnot sGP130 poukázala na jeho vztah k AIM, kdy dochází k jeho detekci v plazmě velmi časně od vzniku ischemie. Zda mají ale koncentrace sGP130 na myokard efekt čistě kardioprotektivní nebo kardiodestruktivní nemůžeme v naší studii hodnotit, protože neposuzujeme mikrocirkulaci ani skutečný rozsah IR. Přesto bychom se mohli přiklonit ke spíše kardioprotektivnímu působení, protože naše práce neprokázala statisticky významný vztah mezi sGP130 a systolickou dysfunkcí LK.

I přes omezený počet pacientů, kteří byli zařazeni do naší studie, byla u řady námi vybraných parametrů humorální imunity prokázána souvislost s probíhajícím AIM a pro jejich dynamiku je můžeme považovat za velmi časně ukazatele ischemie (sGP130, sCD95/Fas, sCD163, kde byl prokázán statisticky významný vzestup koncentrací). Pouze u parametru hsTnT a námi sledovaného nového markeru sCD163 byla v odběru provedeném za 24 hodin prokázána těsná asociace k systolické dysfunkci LK.

Hlavní limitaci studie představuje především nevelký počet zařazených pacientů. Z pohledu pro praktické využití je dalším nedostatkem fakt, že k měření vzorků je využíván Elisa set, který vždy slouží ke stanovení určitého parametru u několika krevních odběrů najednou. Není tedy především z finančních důvodů vhodný pro vyšetření jednotlivců a navíc je nutno pro větší náročnost samotného měření provádět toto vyšetření ve standardní pracovní době, což představuje velký nedostatek pro využití v pohotovostní praxi.

## 9 Využití nových biočipových technologií ke stanovení vybraných parametrů

### 9.1 Metodika

#### 9.1.1 Soubor pacientů

Do studie byli zařazeni pacienti, kteří splňovali základní kritérium, tj. akutní infarkt myokardu s elevacemi ST segmentů léčený přímou koronární angioplastikou v době do 6 hodin od vzniku bolesti na hrudi a kteří podepsali souhlas se zařazením do studie, jejíž protokol byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Hradci Králové. Ze studie byli naopak vyloučeni pacienti, u kterých byl znám nebo v průběhu hospitalizace byl diagnostikovaný stav, který by mohl ovlivnit hladiny sledovaných parametrů (tj. významná porucha funkce ledvin, jater, imunodeficitu, systémového onemocnění pojiva, anamnéza nebo přítomnost nádorového onemocnění včetně chemoterapie a iradiace, dále imunosupresivní terapie nebo aktivní zánětlivé onemocnění), pacienti mladší 18 let a kteří nepodepsali souhlas se studií.

Tato kritéria splňovalo celkem 44 pacientů (68,2% mužů, 31,8% žen, průměrného věku 66,1 let  $\pm$  směrodatná odchylka) a přítomnost jednotlivých rizikových faktorů je uvedena v tabulce č. 14. Základním zdrojem klinických i anamnestických dat byl chorobopis pacienta, zprávy od ambulantních lékařů, údaje zaznamenané v nemocničním informačním systému a anamnestická data získaná nebo doplněná přímo od pacienta.

U pacientů zařazených do této studie byly i po propuštění do domácího ošetřování sledovány recidivy kardiálních příhod. Všichni pacienti byli telefonicky kontaktováni za 6 měsíců a za 1 rok od propuštění. Hodnocenými parametry byla recidiva AIM, vznik nebo zhoršení srdečního selhávání, smrt pacienta z kardiálních příčin a zhoršení anginy pectoris nebo nutnost rekonarografie s provedením PCI. Smrt z kardiálních příčin byla definována jako smrt z důvodu AIM, srdečního selhávání nebo jako náhlá smrt, která nastala do 1 hodiny od vzniku symptomů. Srdeční selhávání bylo anamnesticky hodnoceno škálou NYHA (New York Heart Association, stupně I-IV) a v případě jeho další progresse s nutností rehospitalizace bylo vedle klinických známek potvrzeno i změnami na rentgenogramu hrudníku či progresí systolické dysfunkce levé komory srdeční. Recidiva AIM byla definována jako recidiva symptomů ischemie s ischemickými změnami na EKG záznamu a laboratorně pozitivními markery nekrózy myokardu. Klinická data jsou uvedena v tabulce č. 15.

Tabulka č. 14: Přehled rizikových faktorů u zařazených pacientů, kde byly měřeny parametry metodou proteinových biočipů.

Parametr		Celý soubor (n = 44)	Muži (n = 30)	Ženy (n = 14)	p
<b>Věk (roky) x ± SD</b>		69,79 ± 11,2	65,66 ± 9,26	78,64 ± 9,8	0,001
<b>Anamnestická data</b>	kouření n (%)	22 (50)	18 (60)	4 (28,5)	ns
	nadváha/obezita n (%)	19 (43,2)	11 (36,7)	8 (57,1)	ns
	rodinná zátěž n (%)	18 (40)	13 (43,3)	5 (35,7)	ns
	arteriální hypertenze n (%)	26 (59,1)	16 (53,3)	10 (71,4)	ns
	diabetes mellitus n (%)	15 (34,1)	9 (30)	6 (42,8)	ns
	hyperlipoproteinemie n (%)	26 (59,1)	15 (50)	11 (78,2)	ns
	anamnéza IM n (%)	10 (22,8)	8 (26,6)	2 (14,2)	ns
	CMP/TIA n (%)	4 (9,1)	1 (3,3)	3 (21,4)	ns
<b>Předchozí medikace</b>	ACEi n (%)	10 (22,7)	7 (23,3)	3 (21,4)	ns
	BB n (%)	9 (20,4)	6 (20)	3 (21,4)	ns
	ASA n (%)	7 (15,9)	5 (16,6)	2 (14,2)	ns
	Ca blokátor n (%)	6 (13,6)	5 (16,6)	1 (7,1)	ns
	Statin/fibrát n (%)	8 (18,2)	6 (20)	2 (14,2)	ns
<b>Lipidy v periferní krvi v době přijetí</b>	celkový cholesterol (mmol/l) x ± SD	4,88 ± 1,1	4,7 ± 1,1	5,30 ± 0,88	ns
	HDL cholesterol (mmol/l) x ± SD	1,17 ± 0,35	1,08 ± 0,3	1,38 ± 0,44	0,01
	LDL cholesterol (mmol/l) x ± SD	3,13 ± 0,96	3,01 ± 0,87	3,41 ± 0,8	ns
	TAG (mmol/l) x ± SD	1,43 ± 1,4	1,63 ± 1,6	0,98 ± 0,56	ns
<b>Hodnota kreatininu (umol/l) x ± SD</b>		79,23 ± 20,8	84,82 ± 20,1	66,76 ± 11,49	0,006

Tabulka č. 15: Klinická data zařazených pacientů, kde byly měřeny parametry metodou proteinových biočipů.

Parametr		Celý soubor (n = 44)	Přední IM (n = 23)	Spodní IM (n = 17)	Ostatní (n = 4)
<b>Třída podle Killipa při přijetí</b>	I n (%)	38 (86,1)	19 (82,6)	15 (88,1)	4 (100)
	II n (%)	5 (11,4)	3 (13,1)	2 (28,5)	0
	III n (%)	1 (2,3)	1 (4,4)	0	0
	IV n (%)	0	0	0	0
<b>KCPR při přijetí n (%)</b>		2 (4,5)	0	2 (28,5)	0

<b>EF LK (%) x ± SD</b>		47,1 ± 10,1	46,4 ± 9,4	49,5 ± 11,5	43,1 ± 4,8
<b>Šíře QRS (ms) x ± SD</b>		94,1 ± 18,2	98 ± 20	91 ± 15	92 ± 12
<b>Tromboaspirace n (%)</b>		1 (2,3)	0	0	1 (25)
<b>Restenóza n (%)</b>		0	0	0	0
<b>TIMI flow</b>	0 n (%)	0	0	0	0
	1 n (%)	0	0	0	0
	2 n (%)	2 (4,5)	1 (4,4)	1 (5,8)	0
	3 n (%)	42 (95,5)	22 (95,6)	16 (94,1)	4 (100)
<b>Exitus n (%)</b>		1 (2,3)	1 (4,4)	0	0
<b>Kontrola za 6 měsíců</b>	NYHA I n (%)	38 (86,1)	18 (78,5)	16 (94,1)	4 (100)
	NYHA II n (%)	4 (9,1)	3	1 (5,8)	0
	NYHA III n (%)	1 (2,3)	1 (4,4)	0	0
	NYHA IV n (%)	0	0	0	0
<b>Kontrola za 12 měsíců</b>	NYHA I n (%)	35 (79,5)	18 (78,5)	14 (82,3)	3 (75)
	NYHA II n (%)	4 (9,1)	2 (8,8)	1 (5,8)	1 (25)
	NYHA III n (%)	3 (6,8)	2 (8,8)	1 (5,8)	0
	NYHA IV n (%)	0	0	0	0
	exitus	1 (2,3)	0	1 (5,8)	0

Všichni pacienti byli léčeni podle standardního protokolu, který zahrnoval 12ti svodový elektrokardiogram, biochemické vyšetření a vyšetření krevního obrazu, intravenózní podání 1 amp. Aspegicu (lysini acetylsalicylas, 500mg) a nefrakcionovaného heparinu (dávka stanovena podle hmotnosti pacienta). Následoval transport na katetrizační sál, kde byla provedena na přístroji Axiom Artis (Siemens, Německo) koronarografie a následně reperfuze uzavřené tepny. Přístupovou cestou byla arteria radialis, do které byl zaveden 5-6 F zavaděč. V případě positivity Allenova testu byl výkon proveden cestou a. femoralis. V průběhu vyšetření byl za kontrol ACT (aktivovaný koagulační čas) podáván nefrakcionovaný heparin a během výkonu byly zobrazeny všechny koronární cévy ve standardizovaných projekcích. Na základě získaných zobrazení věnčitých cév a jejich anatomie byla provedena koronární intervence, jejíž efekt (ověření průchodnosti) byl hodnocen škálou TIMI (stupeň 0-3). Poté byli pacienti převezeni na jednotku intenzivní péče, kde probíhala terapie podle standardního protokolu (podávání duální antiagregační terapie - kyselina acetylsalicylová a

clopidogrel), titrace betablokátoru, inhibitor angiotenzin konvertujícího enzymu a statinu. U pacientů se známkami srdečního selhání byla podávána diuretika, u pacientů v kardiogenním šoku katecholaminy, oběhové podpory atd. Během prvních 24 hodin bylo provedeno echokardiografické vyšetření (přístroj HP Sonos 5500, Hewlett Packard, USA), rentgenogram hrudníku, kontrolní EKG a biochemické stanovení.

### **9.1.2 Stanovení jednotlivých parametrů**

Pro potřeby studie byla odebírána žilní krev z kubitální žíly podle schématu: první odběr v době přijetí, druhý odběr 24 hodin od přijetí a třetí odběr 96 hodin od přijetí. Ihned po odběru byly zkumavky se vzorky krve odeslány ke zpracování do Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové, kde byla část odebraného materiálu ihned zpracována. Po stanovení aktivity kreatinkinázy v séru (CK, komerčně používaná enzymatická metoda, norma 0,63-2,91  $\mu\text{kat/l}$ ), její izoformy MB (CK MB, norma 0,12-0,42  $\mu\text{kat/l}$ ) a vysoce senzitivního troponinu T (hs TnT, metoda elektroimunochemiluminiscence na analyzátoru COBAS e411 od firmy Roche, Švýcarsko, norma 0-0,014  $\mu\text{g/l}$ ) byla druhá část nesrážlivé krve centrifugována při 3500 otáčkách/minuta po dobu 10 minut a sérum poté uchováno při teplotě  $-70^{\circ}\text{C}$  k pozdějším analýzám.

U této skupiny pacientů byla ke stanovení vybraných parametrů testována nová technologie proteinových biočipů. Simultánně byly stanoveny: srdeční troponin I (cTnI), koncentrace MB izoformy kreatinkinázy (CK MB), myoglobin (MB), glykogenfosforyláza BB (GPBB), srdeční izoforma proteinu vážícího mastné kyseliny (hFABP) a karboanhydráza III (CA III) na biočipovém analyzátoru The Evidence Investigator™ od firmy Randox (Randox Laboratories Ltd., Velká Británie). Tato metoda je specifická tím, že biočip má na svém povrchu přesně definovaná místa, na kterých je navázána specifická protilátka, která reaguje vždy pouze s určitým analytem. K ozřejmění této reakce za vzniku komplexu antigen-protilátka nám slouží principy ELISA metody. Na povrch biočipu jsou pipetou přeneseny vzorky a kontroly, které jsou ředěny dle doporučení výrobce. Následně je analyzátor ponechán 30 minut při teplotě  $37^{\circ}\text{C}$  (inkubace). Nenavázaný materiál je poté odstraněn 4 promývacími cykly, přičemž každý cyklus trvá 2 minuty. Poté je přidán konjugát (250  $\mu\text{l}$ ), který se v průběhu druhé inkubace (30 minut) váže na již navázané analyty. Po dalším promytí je aplikován luminol a peroxid (v množství 250  $\mu\text{l}$  v poměru 1:1), které vyvolají chemiluminiscenci.

Luminiscence je detekována CCD kamerou, která snímá celou oblast biočipu a vede k sestavení mapy, která je následně počítačovým systémem převedena do numerických hodnot [80]. Cut off hodnoty stanovené výrobcem pro jednotlivé parametry jsou následující: TnI (0,40 µg/l), CK MB (3,9 µg/l), MYO (59 µg/l), GPBB (7,3 µg/l), hFABP (4,5 µg/l) a CAIII (55 µg/l).

Stejná vyšetření byla provedena i u skupiny zdravých dárců krve (odběr K), u které nebylo zjištěno žádné onemocnění, které by interferovalo s hodnocenými parametry (negativní anamnéza stran kardiovaskulárních, jaterních, renálních nebo nádorových onemocnění, a byly vyloučeny všechny stavy, které by mohly ovlivnit výsledky imunitních měření – akutní nebo chronická zánětlivá onemocnění).

### **9.1.3 Statistika**

Pro veškeré statistické zpracování získaných dat byl využit počítačový program MedCalc (MedCalc Software, Belgie). Normalita rozložení dat byla testována Kolmogorovovým-Smirnovým testem. Data s normálním rozložením jsou prezentována ve formě průměr ± směrodatná odchylka (SD), data s nenormální distribucí jsou prezentována ve formě mediánu, 25. a 75. percentilu, případně s uvedením minimální a maximální hodnoty. Kategorické proměnné jsou uvedeny ve formě počtů s uvedením procenta. Pro porovnání spojitých proměnných skupiny pacientů a kontrolní skupiny byl použit nepárový Studentův t-test, v případě nerovnoměrného rozložení byl použit Mann-Whitney test. Pro porovnání změn hladin spojitých veličin byl použit párový Studentův t-test, případně Wilcoxonův test v závislosti na normalitě rozložení. Vztah mezi spojitými veličinami byl hodnocen metodou lineární regrese. Za statisticky významné jsou považovány hodnoty  $p < 0,05$ .

## **9.2 Výsledky použité metody proteinových biočipů**

### **9.2.1 Analýza změny hladin sledovaných parametrů v průběhu 96 hodin akutního STEMI**

V tomto případě byla testována nová technologie stanovení markerů - biočipový panel Cardiac Array, který obsahuje již přesně stanovený, výrobcem definovaný soubor parametrů: srdeční troponin I (cTnI), koncentrace MB izoformy kreatinkinázy (CKMB), myoglobin (MB), glykogenfosforylázu BB (GPBB), srdeční izoformu proteinu vázajícího mastné kyseliny (hFABP) a karboanhydrázu III (CA III). Byla hodnocena dynamika změn



ve sledovaném období (v čase 0, 24 a 96 hodin od přijetí) a zjištěné hodnoty byly porovnány s hodnotami kontrolní skupiny.

V tabulkách č. 16 a 17 jsou uvedeny zjištěné hodnoty jednotlivých parametrů myokardiální nekrózy stanovené metodou multianalytové assaye (CK MB, myoglobinu, GPBB, hFABP, cTnl, CA III a poměru myoglobin/CA III) a hsTnT u sledovaných pacientů a u kontrolní skupiny. Výsledky ukazují, že ke statisticky významnému zvýšení došlo u všech parametrů již v době přijetí a toto zvýšení přetrvávalo až do konce sledovaného období.

Tabulka č. 16: Naměřené hodnoty jednotlivých parametrů panelu Cardiac Array v kontrolní skupině a v čase 0.

Parametr	Kontrola			0 hod.			
	medián	25.percentil	75.percentil	medián	25.percentil	75.percentil	p
CK MB (µg/l)	1,78	1,54	2,09	10,19	4,17	22,77	0,009
MYO (µg/l)	31,13	19,67	37,65	346,06	132,74	700	2,8.10 <sup>-6</sup>
GPBB (µg/l)	3,02	1,8	4,9	33,3	18,77	50,93	0,002
hFABP (µg/l)	1,36	1,27	1,675	69,91	13,77	150	1,51.10 <sup>-5</sup>
cTnl (µg/l)	0,27	0,27	0,305	0,99	0,51	3,78	0,047
myoglobin/CAIII	0,69	0,52	0,92	4,55	1,95	10,74	0,0004
hsTnT (µg/l)	0,007	0,005	0,009	0,184	0,07	0,77	<0,001

Tabulka č. 17: Naměřené hodnoty jednotlivých parametrů panelu Cardiac Array v čase za 24 a 96 hodin od přijetí.

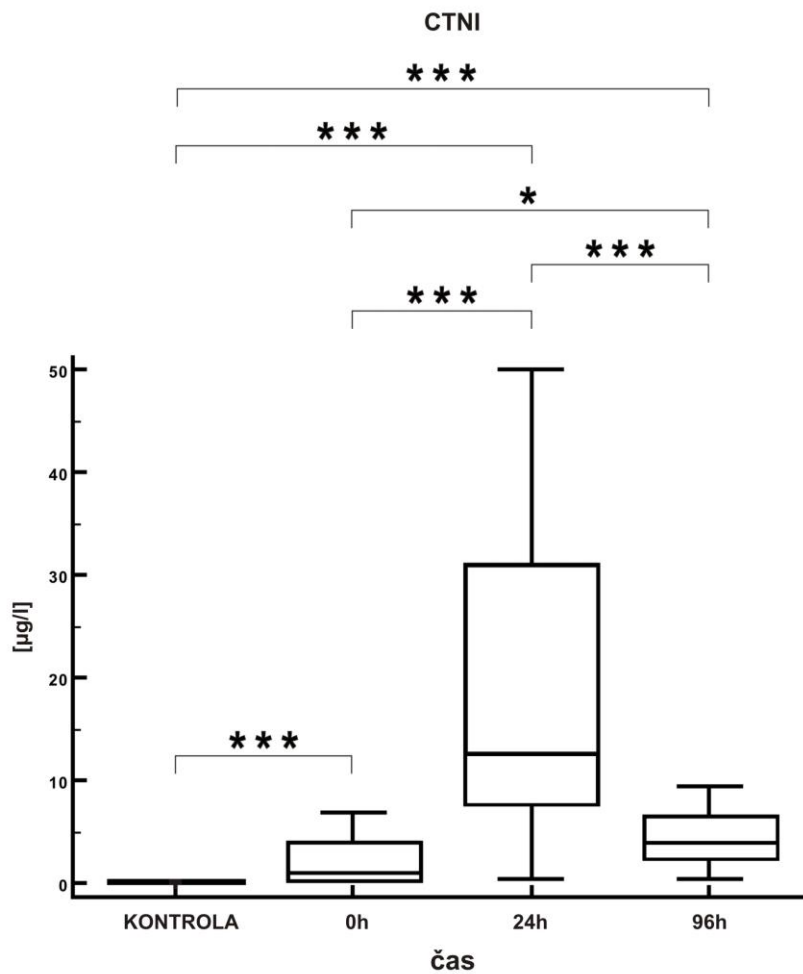
Parametr	24 hod.				96 hod.			
	medián	25.percentil	75.percentil	p	medián	25.percentil	75.percentil	p
CK MB (µg/l)	23,18	13,43	37,39	6,73.10 <sup>-5</sup>	2,93	2,39	3,58	0,0004
MYO (µg/l)	84,37	52,49	145,54	0,005	51,76	36,87	71,87	0,003
GPBB (µg/l)	14,81	10,01	27,21	0,027	13,42	8,53	21,48	8,34.10 <sup>-5</sup>
hFABP (µg/l)	6,15	4,24	11,44	0,061	3,55	2,80	4,74	5,70.10 <sup>-7</sup>
cTnl (µg/l)	12,54	8,09	29,55	6,91.10 <sup>-5</sup>	3,96	2,72	6,26	0,001
myoglobin/CAIII	1,59	0,85	2,27	0,026	1,62	0,87	2,22	5,81.10 <sup>-5</sup>
hsTnT (µg/l)	2,12	1,12	4,4	<0,001	1,39	0,89	2,81	<0,001

### Koncentrace troponinu I (cTnl)

Hladina cTnl byla statisticky významně zvýšena již v čase přijetí a její zvýšení přetrvávalo až do konce sledovaného období (čas 0h: 0,99 (0,51; 3,78) vs. 0,27 (0,27;

0,31),  $p < 0,05$ , 24 hod.: 12,54 (8,09; 29,55) vs. 0,27 (0,27; 0,31),  $p < 0,001$ , 96h: 3,96 (2,72; 6,26) vs. 0,27 (0,27; 0,31),  $p < 0,001$ ). Viz graf č. 33.

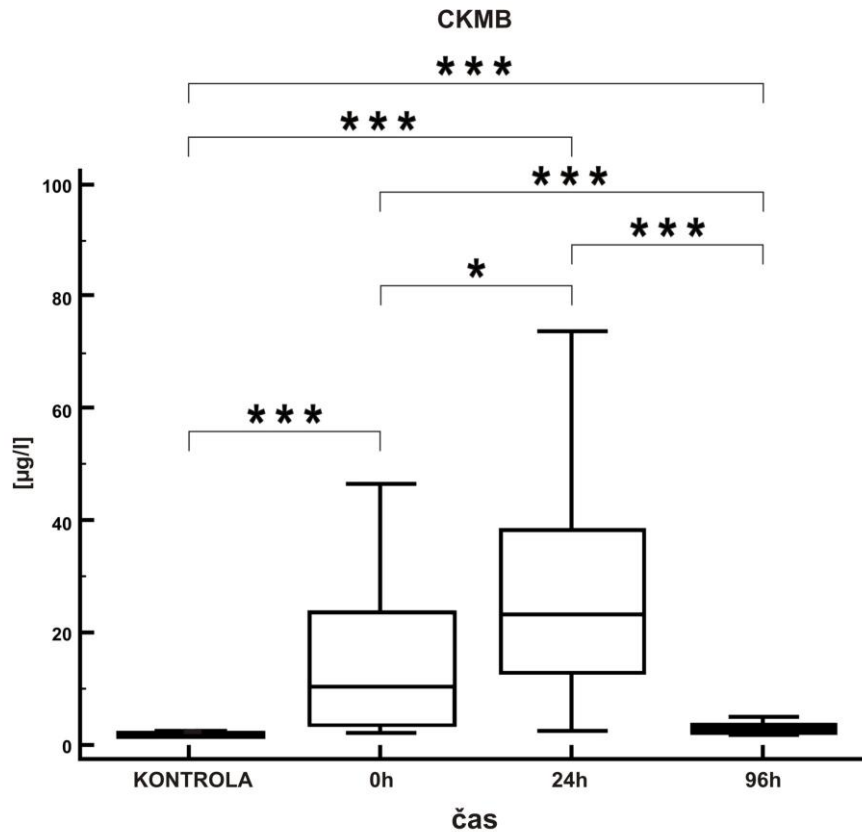
Graf č. 33: Naměřené koncentrace Tnl v jednotlivých odběrech. Jejich vzájemné porovnání a určení statistické významnosti jednotlivých vztahů (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).



### Koncentrace MB izoformy kreatinkinázy (CK MB)

Hladina CK MB byla po celou dobu sledování ve vztahu s kontrolami vždy statisticky významně zvýšená (čas 0h: 10,19 (4,17; 22,77) vs. 1,78 (1,54; 2,09),  $p < 0,001$ , 24 hod.: 23,18 (13,43; 37,39) vs. 1,78 (1,54; 2,09),  $p < 0,001$ , 96h: 2,93 (2,39; 3,58) vs. 1,78 (1,54; 2,09),  $p < 0,001$ ). Viz graf č. 34.

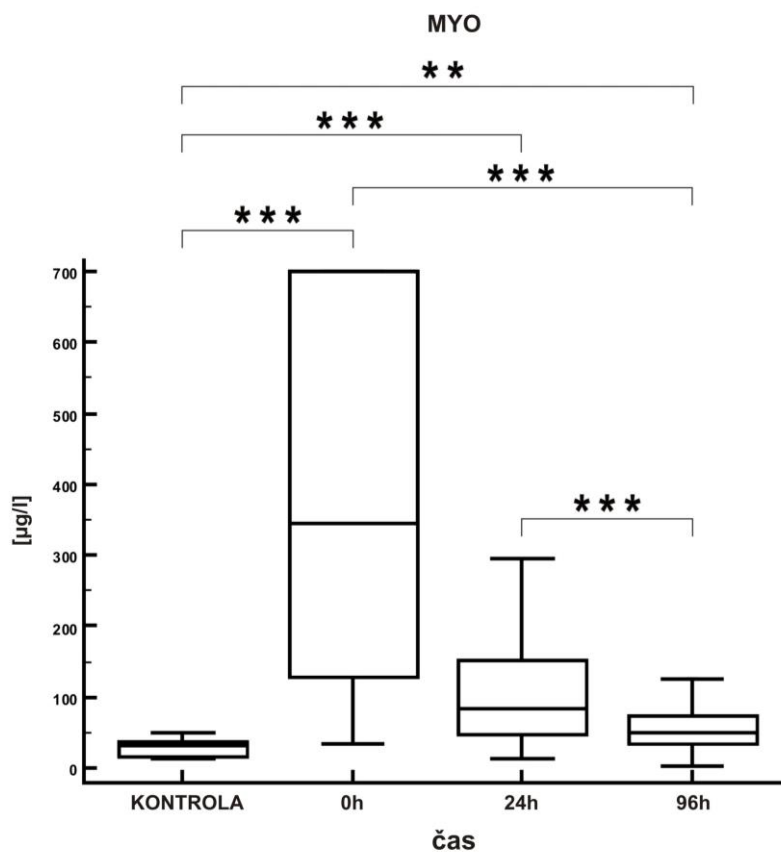
Graf č. 34: Naměřené koncentrace CK MB v jednotlivých odběrech. Jejich vzájemné porovnání a určení statistické významnosti jednotlivých vztahů (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).



### Myoglobin (MYO)

Hladina MYO byla statisticky významně zvýšena již v čase přijetí a poté do konce sledovaného období rychle klesala (čas 0h: 346,06 (132,74; 700) vs. 31,13 (19,67; 37,65),  $p < 0,001$ , 24 hod.: 84,37 (52,49; 145,54) vs 31,13 (19,67; 37,65),  $p < 0,001$ , 96h: 51,76 (36,87; 71,87) vs. 31,13 (19,67; 37,65),  $p = 0,003$ ). Viz graf č. 35.

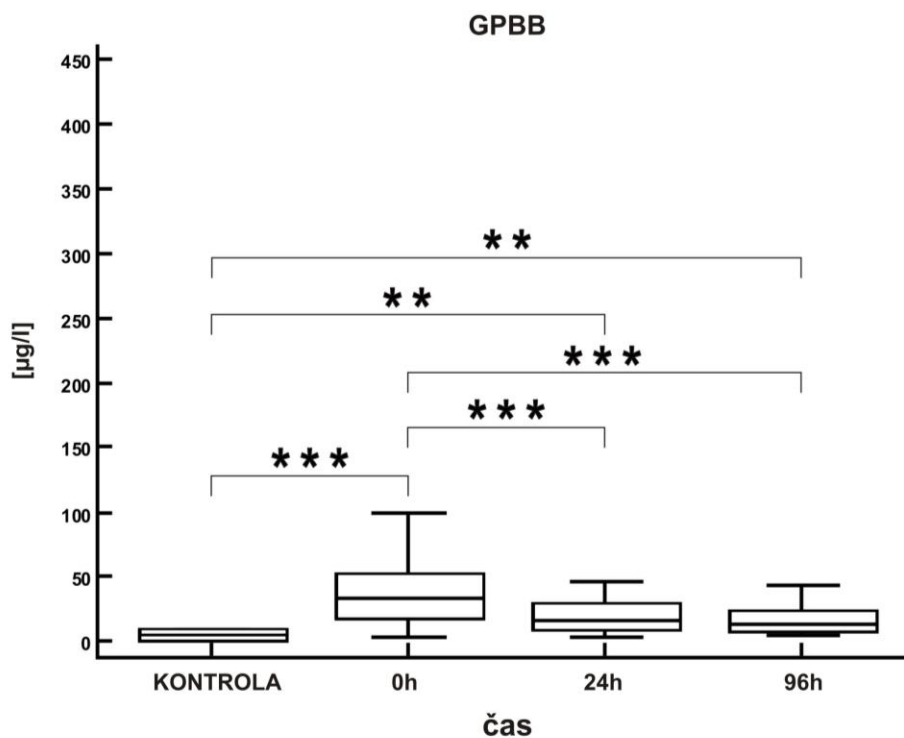
Graf č. 35: Naměřené koncentrace MYO v jednotlivých odběrech. Jejich vzájemné porovnání a určení statistické významnosti jednotlivých vztahů (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).



### Glykogenfosforyláza BB (GPBB)

Hladina GPBB byla statisticky významně zvýšena již v čase přijetí a její zvýšení přetrvávalo až do konce sledovaného období (čas 0h: 33,3 (18,77; 50,93) vs. 3,02 (1,8; 4,9),  $p=0,002$ , 24 hod.: 14,81 (10,01; 27,21) vs. 3,02 (1,8; 4,9),  $p=0,027$ , 96h: 13,42 (8,53; 21,48) vs. 3,02 (1,8; 4,9),  $p<0,001$ ). Viz graf č. 36.

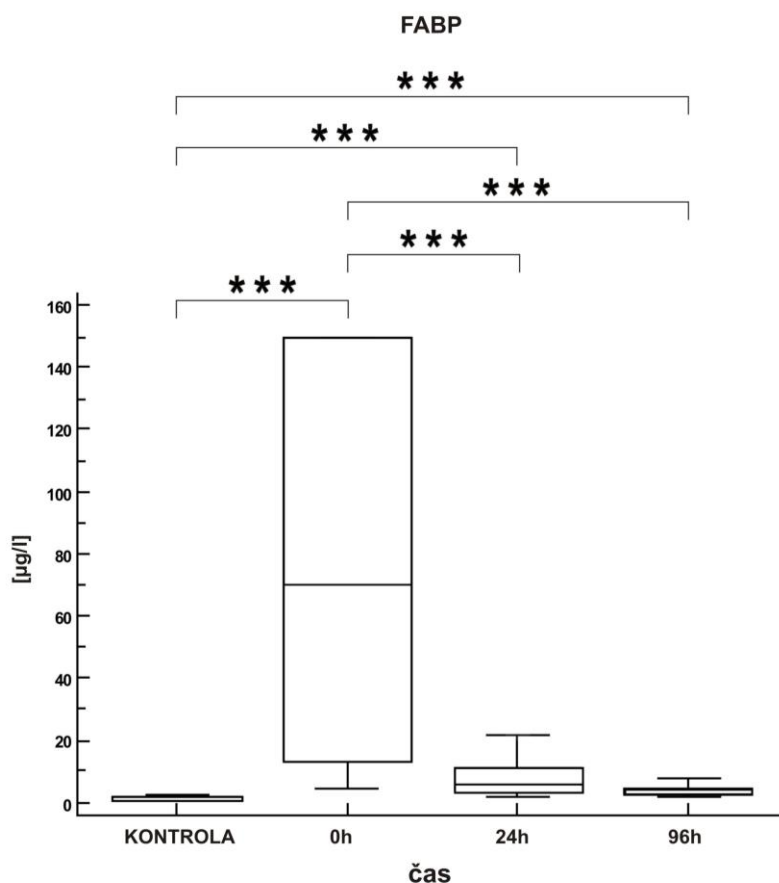
Graf č. 36: Naměřené koncentrace GPBB v jednotlivých odběrech. Jejich vzájemné porovnání a určení statistické významnosti jednotlivých vztahů (\*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ ).



### Srdeční mastné kyseliny vážící protein (hFABP)

Hladina hFABP byla statisticky významně zvýšena již v čase přijetí a poté rychle klesá k vstupním hodnotám (čas 0h: 69,91 (13,77; 150) vs. 1,36 (1,27; 1,675),  $p < 0,001$ , 24 hod.: 6,15 (4,24; 11,44) vs. 1,36 (1,27; 1,675),  $p = 0,061$ , 96h: 3,55 (2,8; 4,74) vs. 1,36 (1,27; 1,675),  $p < 0,001$ ). Viz graf č. 37.

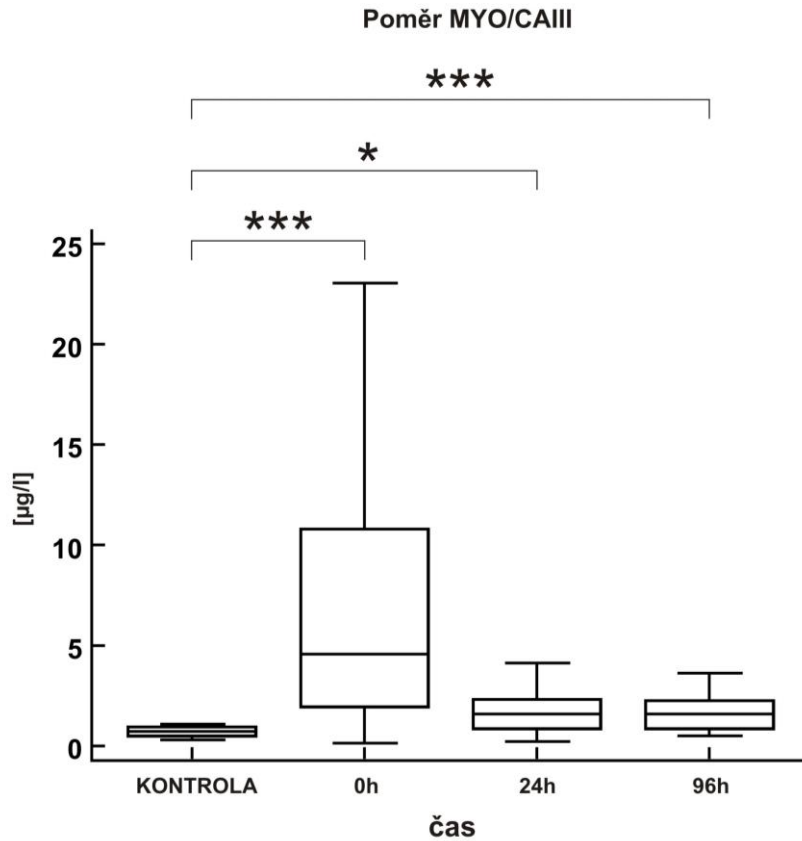
Graf č. 37: Naměřené koncentrace hFABP v jednotlivých odběrech. Jejich vzájemné porovnání a určení statistické významnosti jednotlivých vztahů (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).



### Poměr myoglobin/karboanhydráza III (MYO/CAIII)

Hladina poměru MYO/CAIII byla statisticky významně zvýšena již v čase přijetí a v dalších měřeních již byla výrazně snížena (čas 0h: 4,55 (1,95; 10,74) vs. 0,69 (0,52; 0,92),  $p < 0,001$ , 24 hod.: 1,59 (0,85; 2,27) vs. 0,69 (0,52; 0,92),  $p = 0,026$ , 96h: 1,62 (0,87; 2,22) vs. 0,69 (0,52; 0,92),  $p < 0,001$ ). Viz graf č. 38.

Graf č. 38: Naměřené koncentrace poměru MYO/CAIII v jednotlivých odběrech. Jejich vzájemné porovnání a určení statistické významnosti jednotlivých vztahů (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).



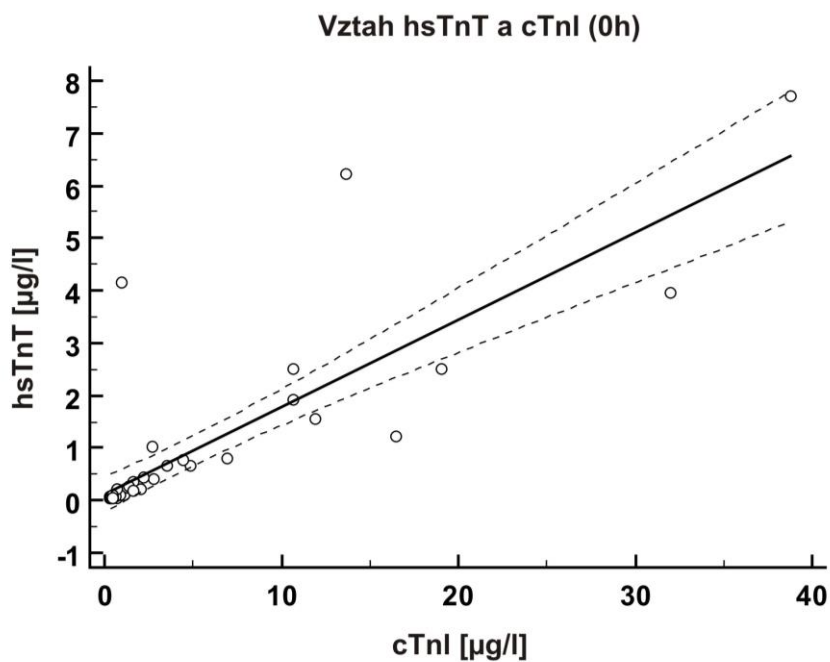
### 9.2.2 Porovnání hladin těchto parametrů s markerem strukturálního poškození myokardu (hsTnT)

Vzhledem k tomu, že je hladina srdečních troponinů považována za ověřený parametr, jehož hladina významně koreluje s velikostí myokardiální nekrózy, byl současně hodnocen vztah každého sledovaného parametru k hodnotě troponinu T stanoveného vysokosenzitivní metodou (hsTnT).

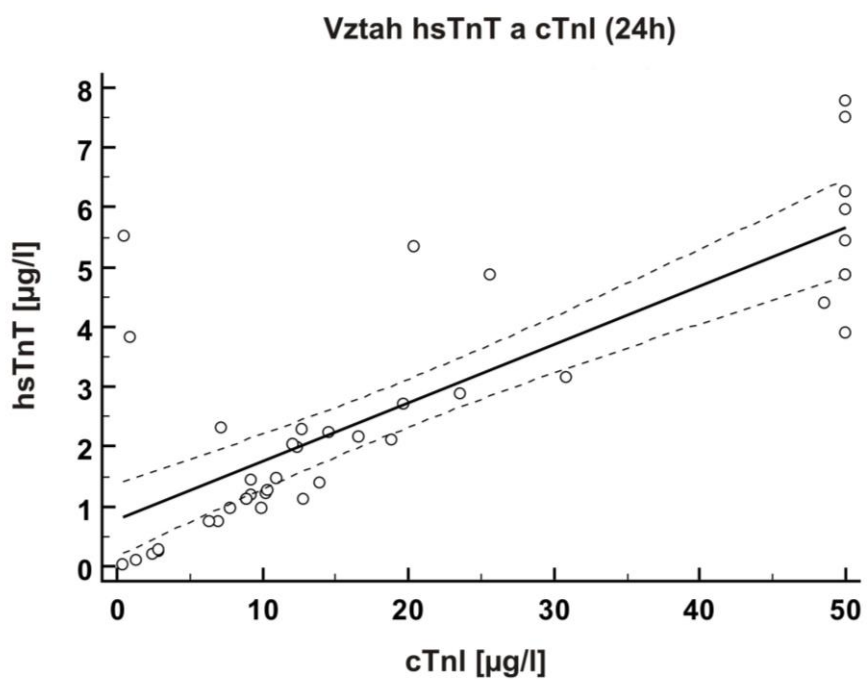
#### Vztah hsTnT a cTnI

Metodou regresní analýzy byla zjištěna velmi těsná asociace mezi cTnI a hsTnT při všech měřeních (graf č. 39-41).

Graf č. 39: Vztah mezi hladinou cTnI a hsTnT při odběru v čase 0 ( $p < 0,001$ ).

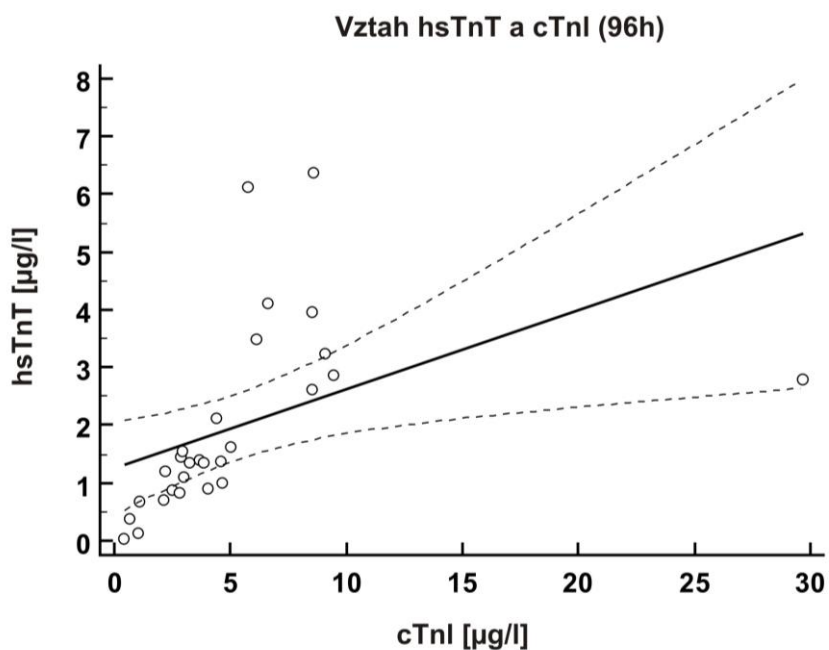


Graf č. 40: Vztah mezi hladinou cTnI a hsTnT při odběru za 24 hodin ( $p < 0,001$ ).





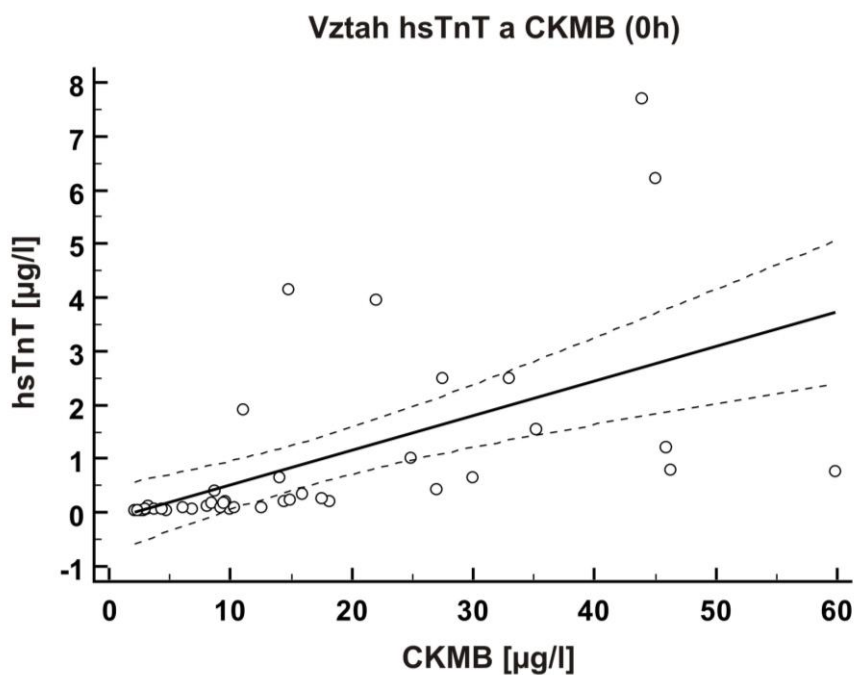
Graf č. 41: Vztah mezi hladinou cTnI a hsTnT při odběru za 96 hodin ( $p=0,02$ ).



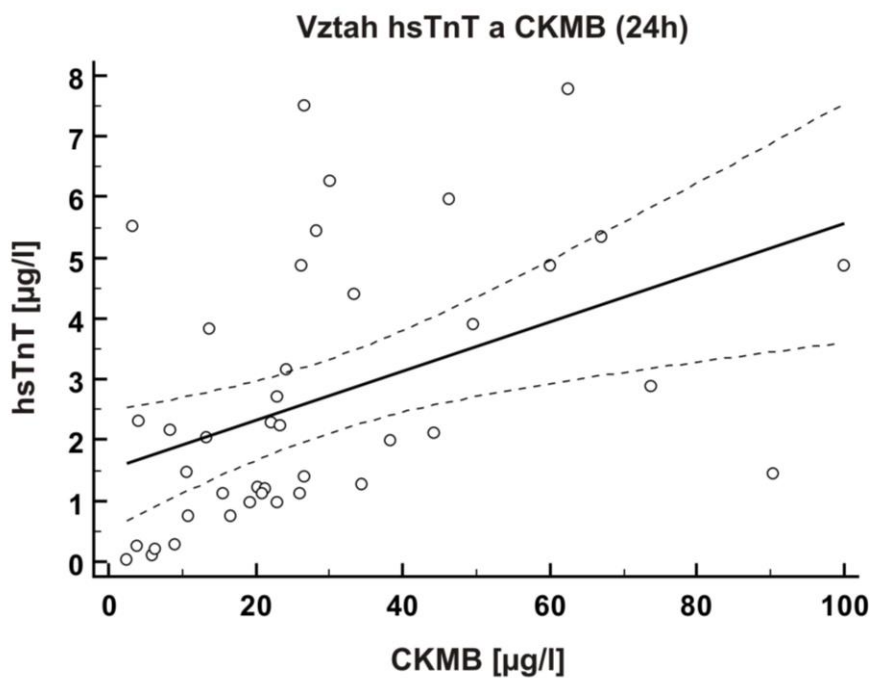
### Vztah hsTnT a CK MB

Zároveň byl prokázán velmi těsný vztah CK MB k dynamice hsTnT při měření v čase 0 a za 24 hodin (graf č. 42-44).

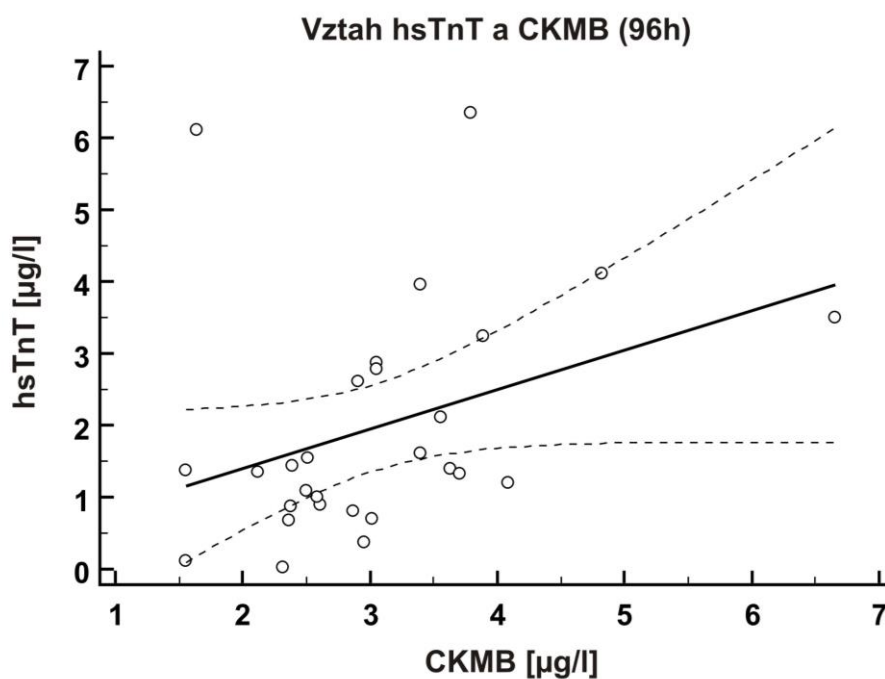
Graf č. 42: Vztah mezi hladinou CK MB a hsTnT v čase 0 ( $p<0,001$ ).



Graf č. 43: Vztah mezi hladinou CK MB a hsTnT v čase 24 hodin ( $p=0,003$ ).



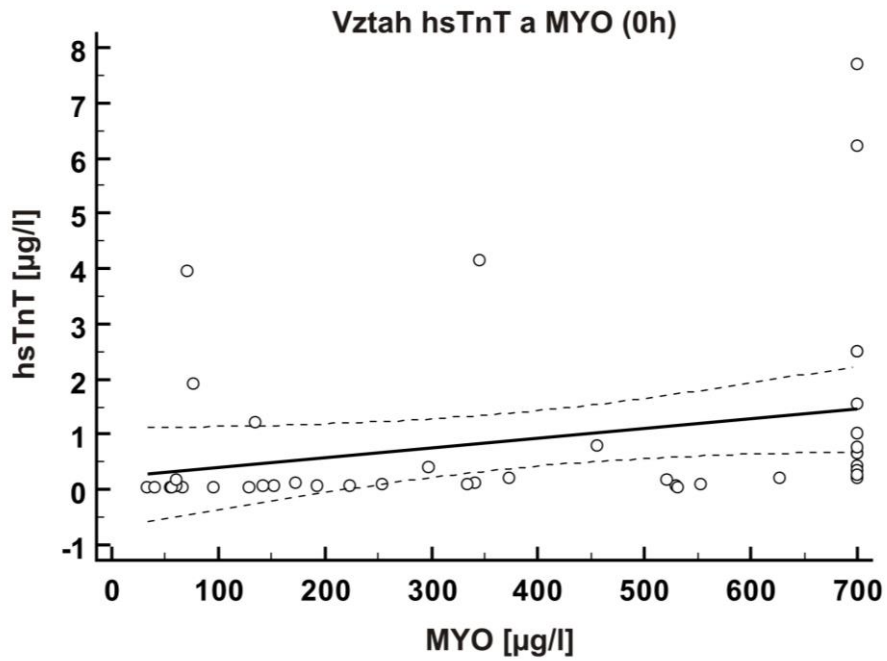
Graf č. 44: Vztah mezi hladinou CK MB a hsTnT v čase 96 hodin ( $p=0,06$ ).



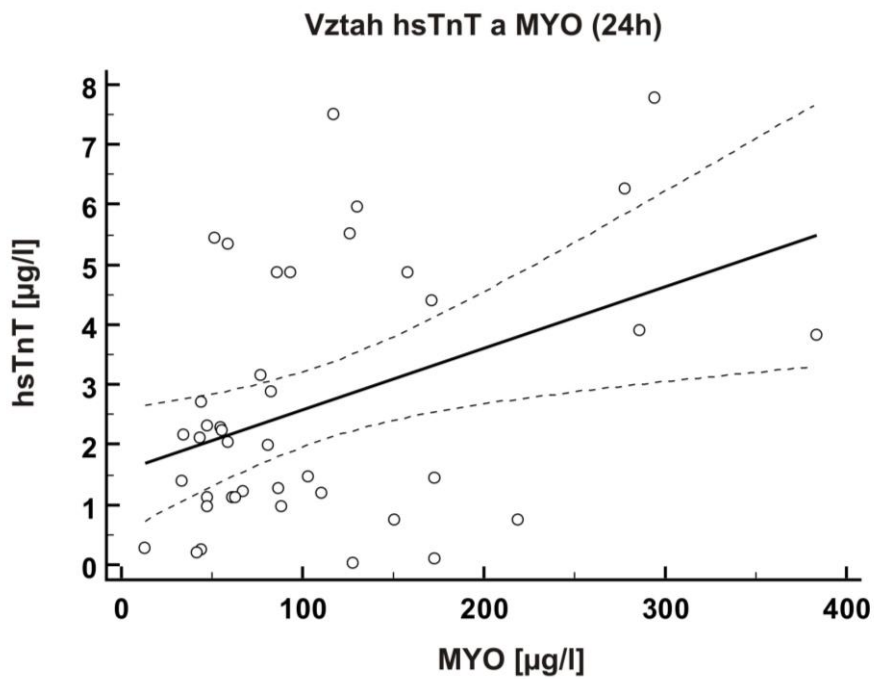
### Vztah hsTnT a MYO

Statisticky významný vztah mezi MYO a hsTnT byl prokázán pouze při odběru za 24 hodin (graf č. 45-47).

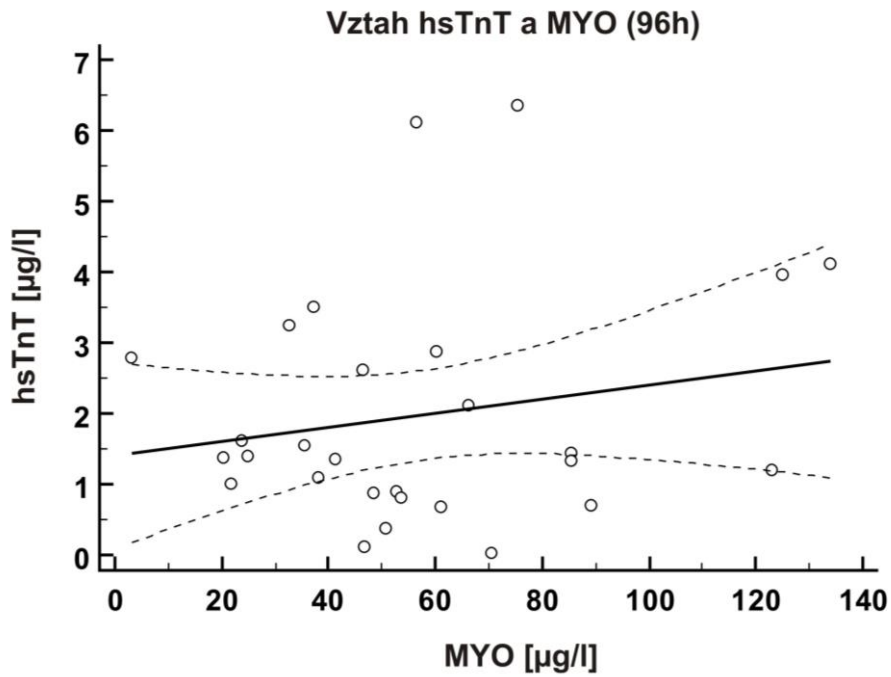
Graf č. 45: Vztah mezi hladinou MYO a hsTnT v čase 0 hodin ( $p=0,06$ ).



Graf č. 46: Vztah mezi hladinou MYO a hsTnT v čase 24 hodin ( $p=0,001$ ).



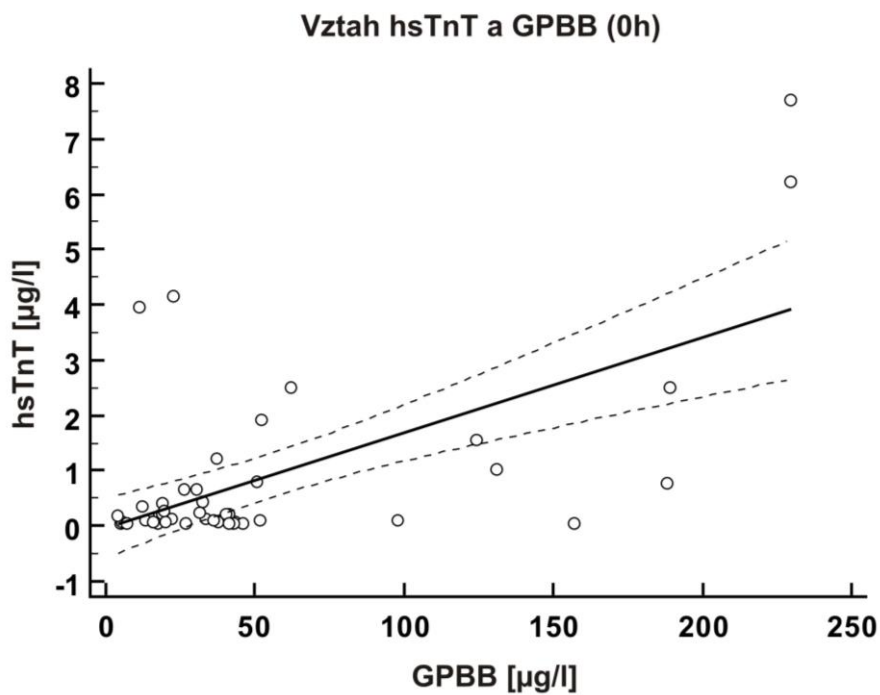
Graf č. 47: Vztah mezi hladinou MYO a hsTnT v čase 96 hodin ( $p=0,19$ ).



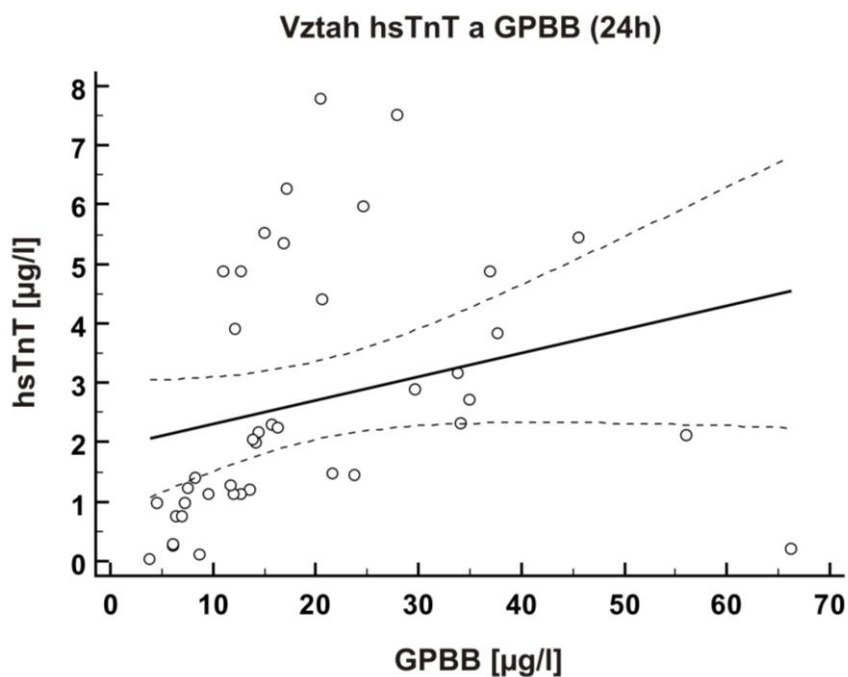
### Vztah hsTnT a GPBB

Ukázalo se, že statisticky významný vztah mezi GPBB a hsTnT existuje pouze při odběru v čase 0 (graf č. 48-50).

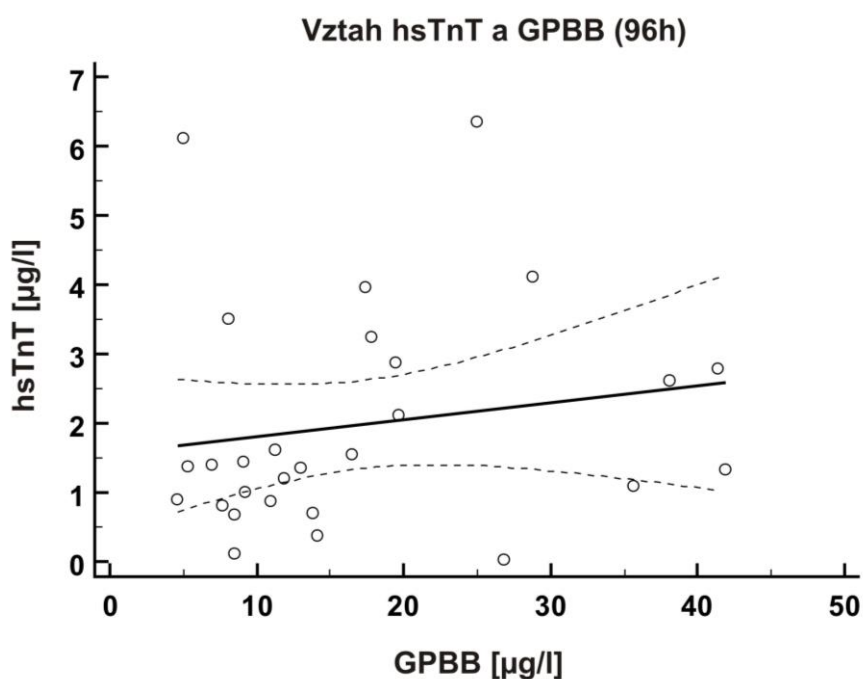
Graf č. 48: Vztah mezi hladinou GPBB a hsTnT v čase 0 ( $p<0,0001$ ).



Graf č. 49: Vztah mezi hladinou GPBB a hsTnT v čase 24 hodin ( $p=0,09$ ).



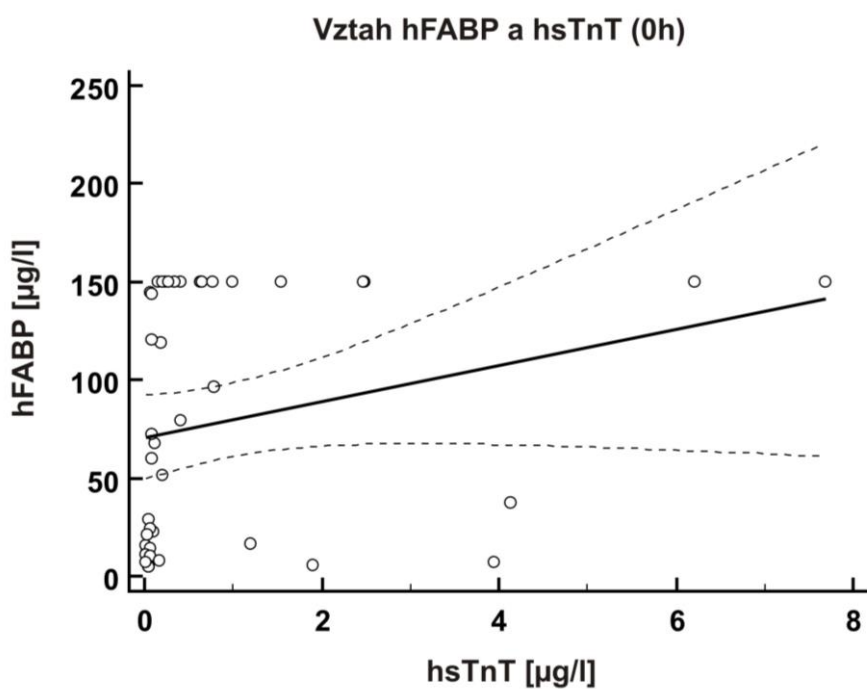
Graf č. 50: Vztah mezi hladinou GPBB a hsTnT v čase 96 hodin ( $p=0,16$ ).



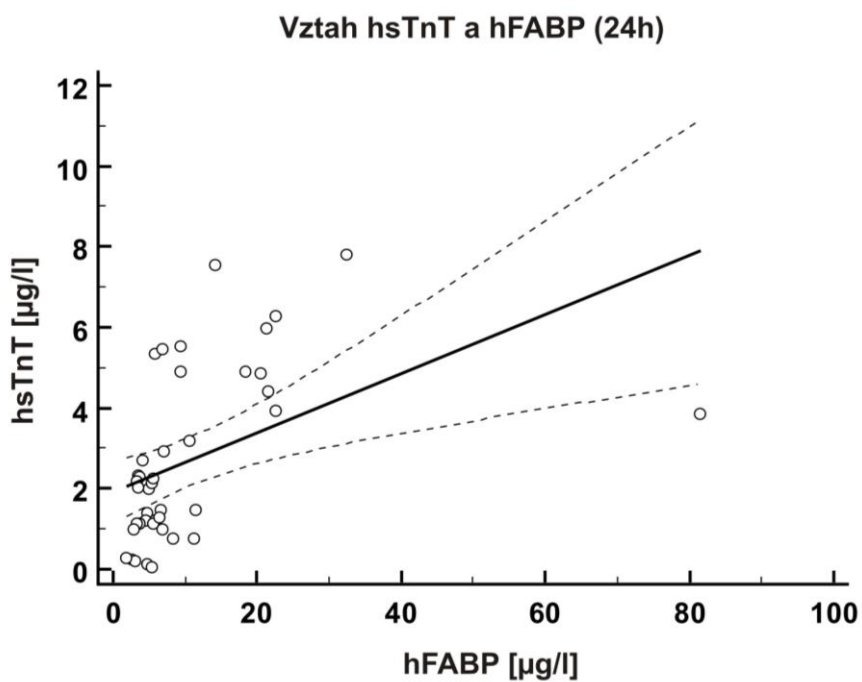
### Vztah hsTnT a hFABP

V případě hFABP byl prokázán těsný vztah k hsTnT při odběru za 24 hodin a 96 hodin (graf č. 51-53).

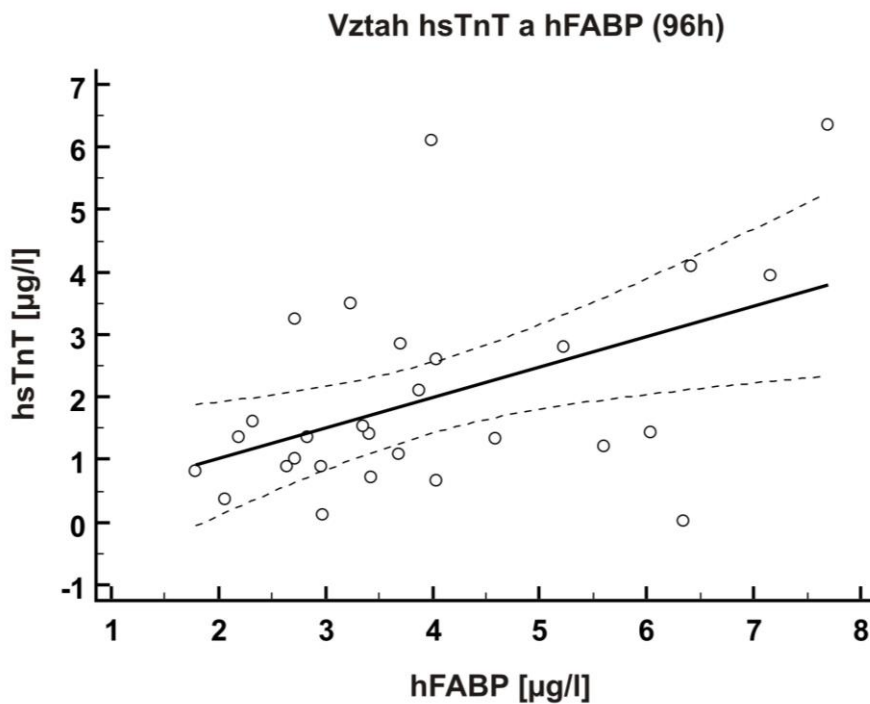
Graf č. 51: Vztah mezi hladinou hFABP a hsTnT v čase 0 hodin ( $p=0,11$ ).



Graf č. 52: Vztah mezi hladinou hFABP a hsTnT za 24 hodin ( $p=0,0023$ ).



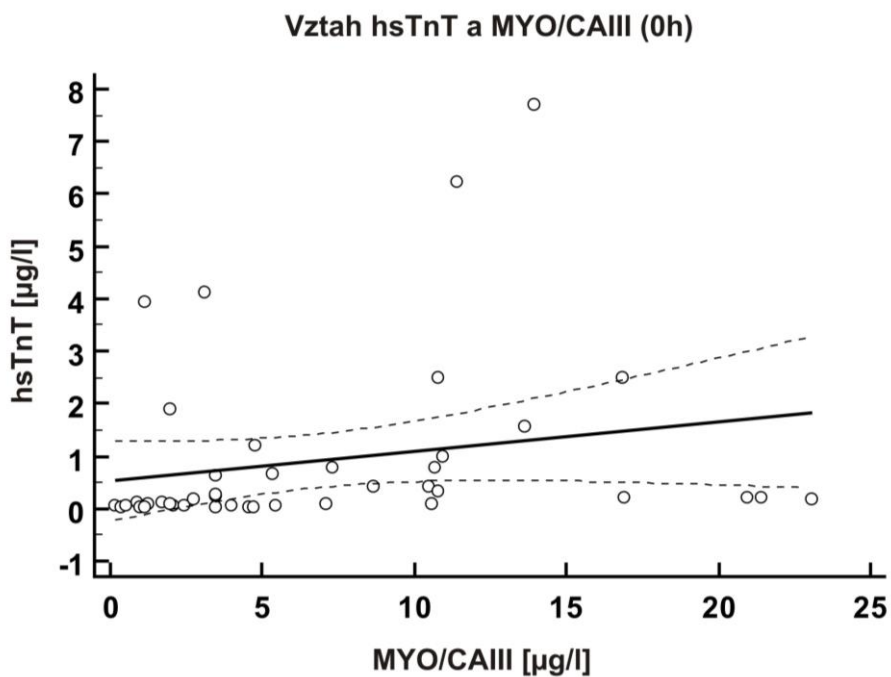
Graf č. 53: Vztah mezi hladinou hFABP a hsTnT za 96 hodin ( $p=0,001$ ).



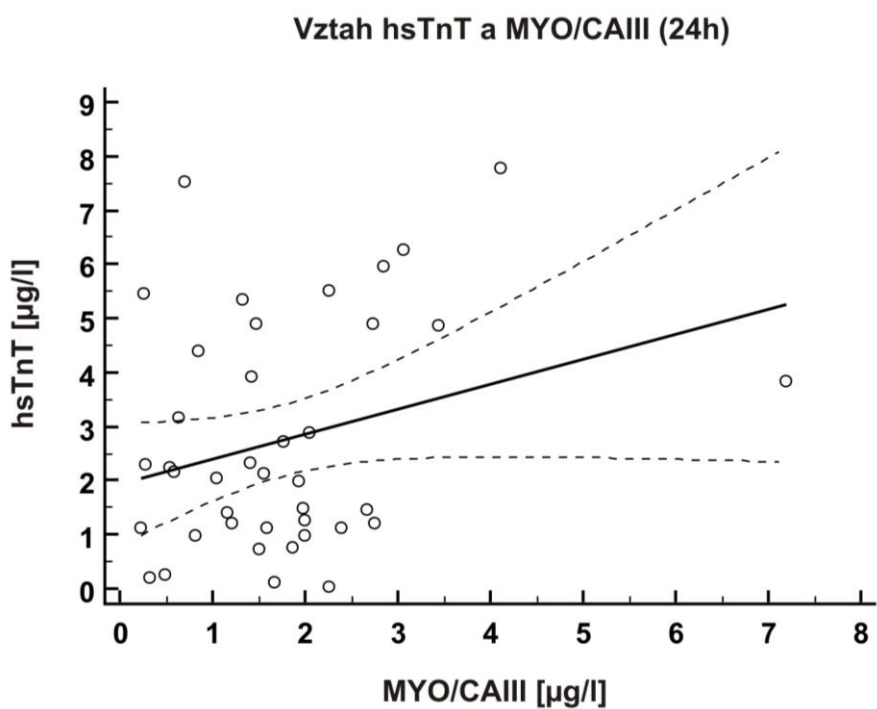
#### Vztah hsTnT a poměru MYO/CAIII

Pomocí metody regresní analýzy nebyl zjištěn v žádném z měření statisticky významný vztah mezi MYO/CAIII a hsTnT (graf č. 54-56).

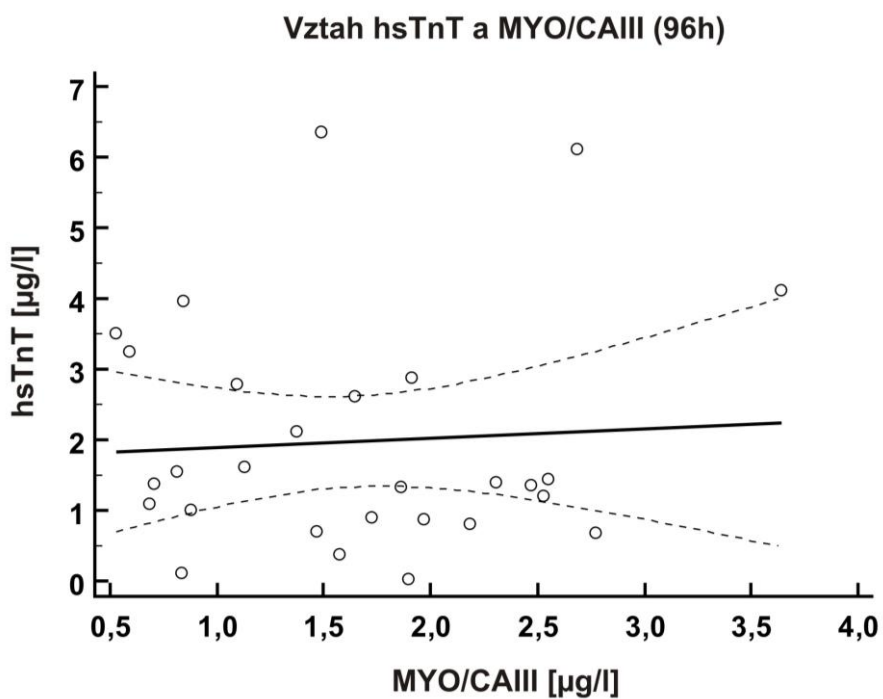
Graf č. 54: Vztah mezi poměrem MYO/CAIII a hsTnT v čase 0 hodin ( $p=0,17$ ).



Graf č. 55: Vztah mezi poměrem MYO/CAIII a hsTnT za 24 hodin ( $p=0,06$ ).



Graf č. 56: Vztah mezi poměrem MYO/CAIII a hsTnT za 96 hodin ( $p=0,06$ ).



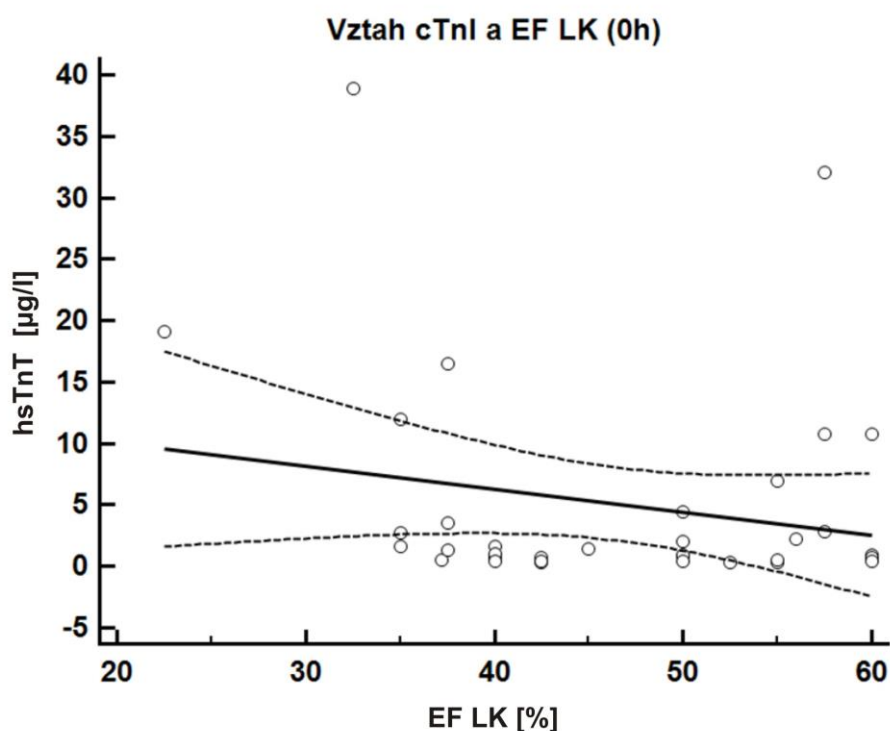


### 9.2.3 Posouzení vztahu sledovaných parametrů k rozsahu poškození myokardu LK vyjádřeným hodnotou ejekční frakce levé komory

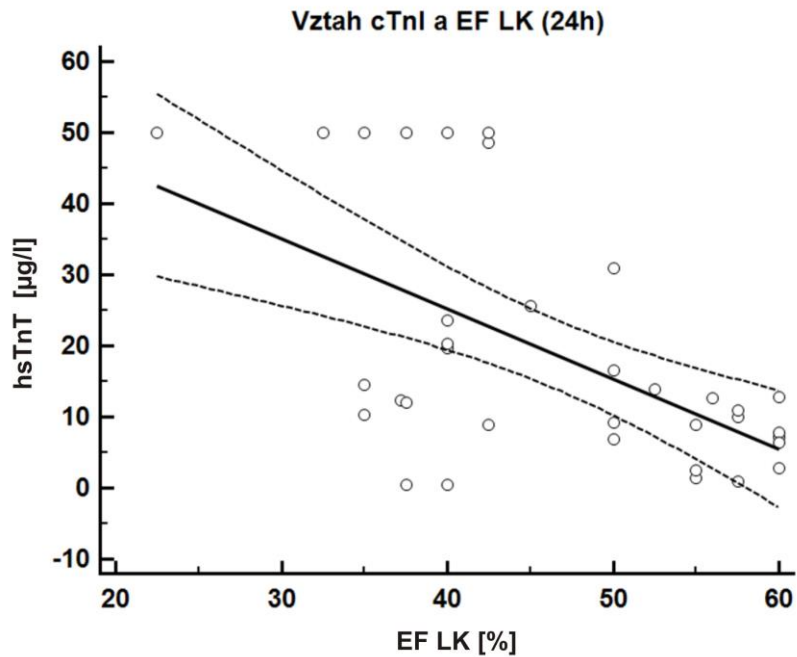
#### Vztah mezi cTnI a hodnotou ejekční frakce LK

Metodou regresní analýzy byla zjištěna velmi těsná asociace mezi cTnI a systolickou dysfunkcí LK při odběru za 24 hodin ( $r = -0,47$ ,  $p < 0,001$ ), v pozdějším měření nebyla již tato asociace potvrzena (graf č. 57-59).

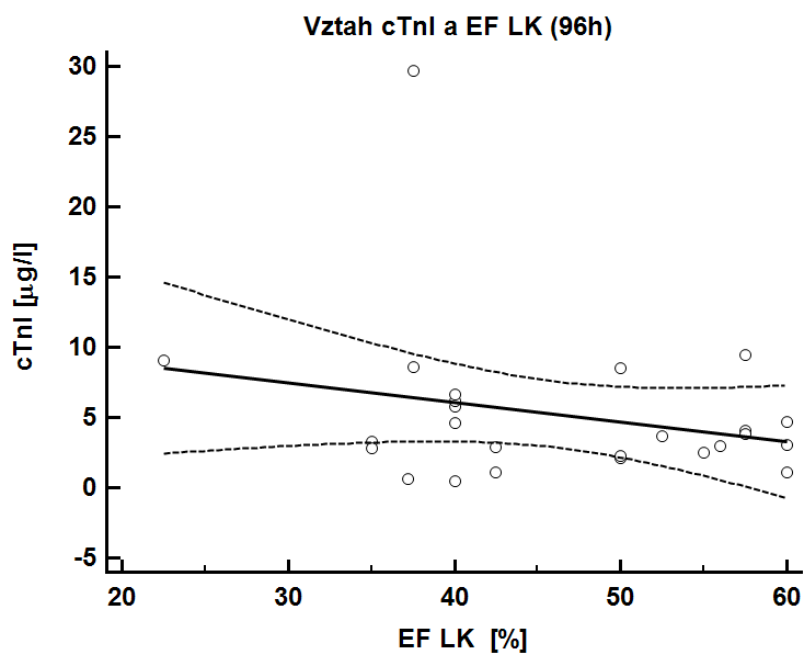
Graf č. 57: Vztah mezi cTnI a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 0 hodin ( $r = 0,22$ ;  $p = 0,190$ ).



Graf č. 58: Vztah mezi cTnI a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 24 hodin ( $r = -0,47$ ,  $p < 0,001$ ).



Graf č. 59: Vztah mezi cTnI a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 96 hodin ( $r = 0,23$ ;  $p = 0,250$ ).



Analýza hodnot cTnI ve vztahu k hodnotám ejekční frakce levé komory prokázala trvale vyšší hodnoty ve skupině pacientů s nižší hodnotou EF levé komory, ale statisticky významný rozdíl byl dosažen pouze v čase 24 hodin od přijetí (viz. tabulka č. 18).

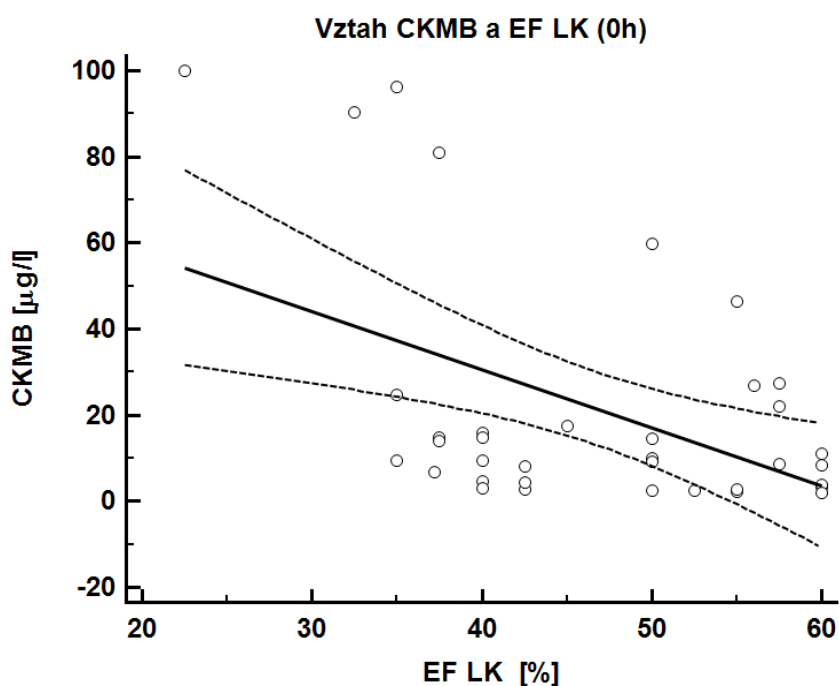
Tabulka č. 18: Hodnoty cTnI ve vztahu k ejekční frakci LK.

Odběr	Hodnota cTnI ve vztahu k EF LK						p
	EF LK ≤ 40%			EF LK > 40%			
	median	25.percentil	75.percentil	median	25.percentil	75.percentil	
0 h	1,65	0,82	9,87	0,91	0,48	2,67	0,13
24 h	20,03	12,17	50,00	9,60	7,02	13,93	0,04
96 h	5,80	3,04	7,61	3,01	2,37	4,02	0,15

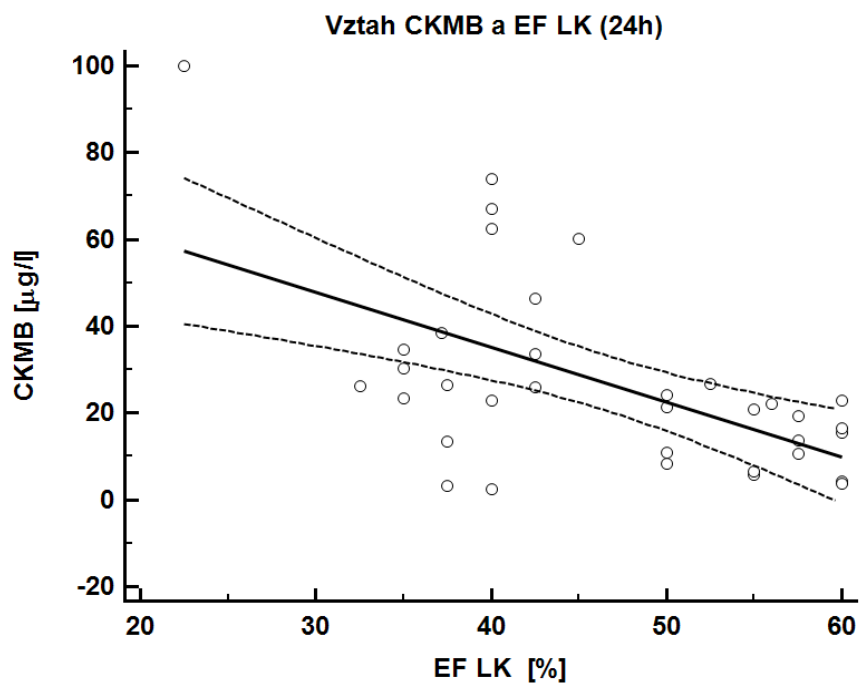
### Vztah mezi CK MB a hodnotou ejekční frakce LK

Stejně tak vykazuje CK MB nejtěsnější vztah k systolické dysfunkci LK při přijetí v čase 0 ( $r = 0,47$ ;  $p = 0,003$ ) a tato vlastnost zůstala zachována i při měření za 24 hodin ( $r = 0,50$ ;  $p = 0,002$ ) (graf č. 60-62).

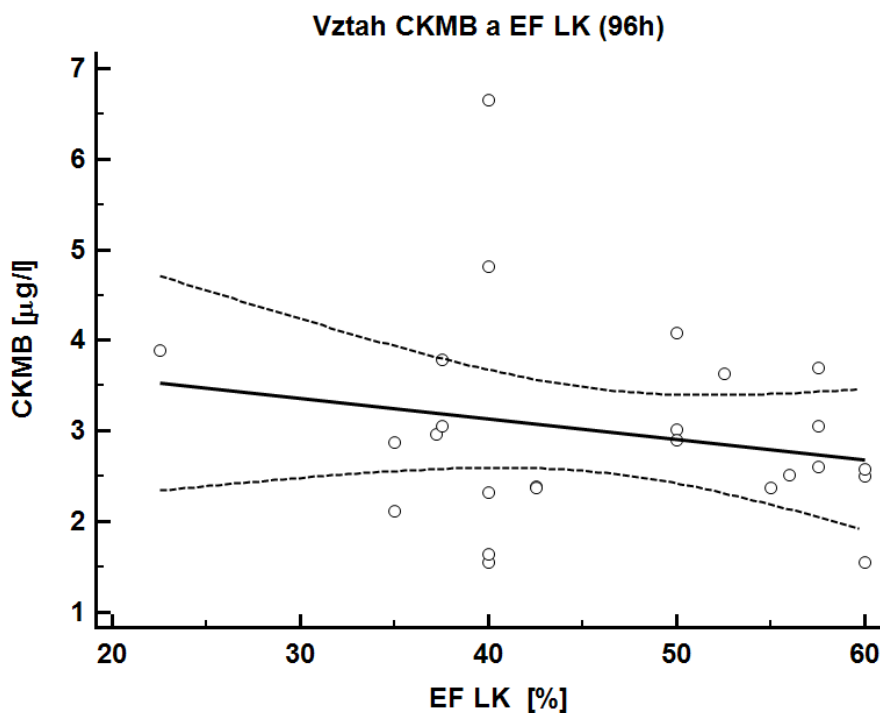
Graf č. 60: Vztah mezi CK MB a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 0 hodin ( $r = 0,47$ ;  $p = 0,003$ )



Graf č. 61: Vztah mezi CK MB a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 24 hodin ( $r = 0,50$ ;  $p = 0,002$ )



Graf č. 62: Vztah mezi CK MB a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 96 hodin ( $r = 0,17$ ;  $p = 0,414$ ).



Analýza hodnot CK MB ve vztahu k hodnotám ejekční frakce levé komory ukázala, že hodnota CK MB byla v době přijetí a za 24 hodin od přijetí signifikantně vyšší u skupiny pacientů s hodnotou ejekční frakce  $\leq 40\%$  (viz tabulka č. 19).

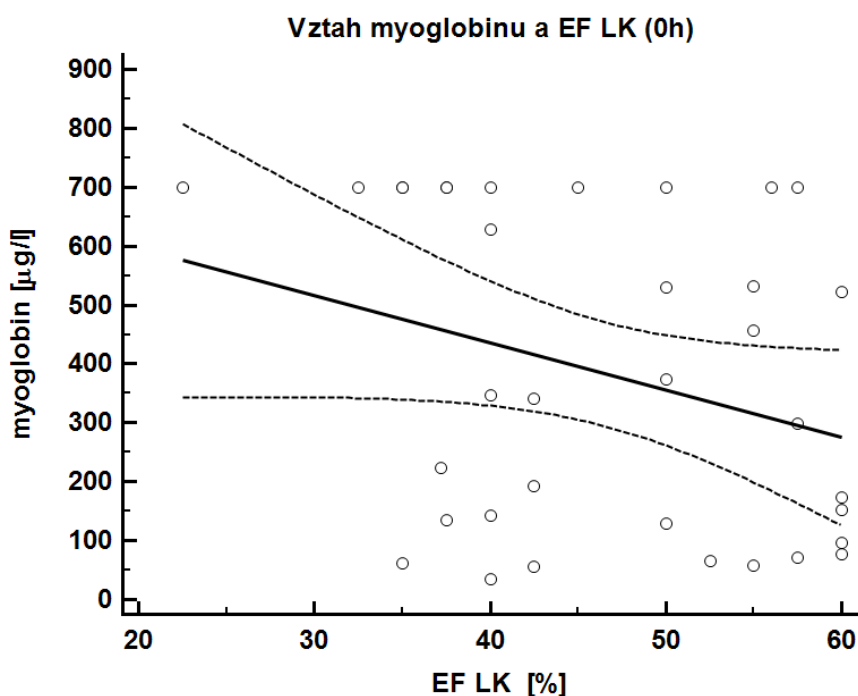
Tabulka č. 19: Hodnoty CK MB ve vztahu k ejekční frakci LK.

Odběr	Hodnota CK MB ve vztahu k EF LK						p
	EF LK ≤ 40%			EF LK > 40%			
	median	25.percentil	75.percentil	median	25.percentil	75.percentil	
0 h	14,89	9,45	66,95	8,74	3,06	16,81	0,02
24 h	28,37	22,99	56,41	20,06	10,70	24,14	0,03
96 h	2,96	2,22	3,84	2,61	2,45	3,04	0,37

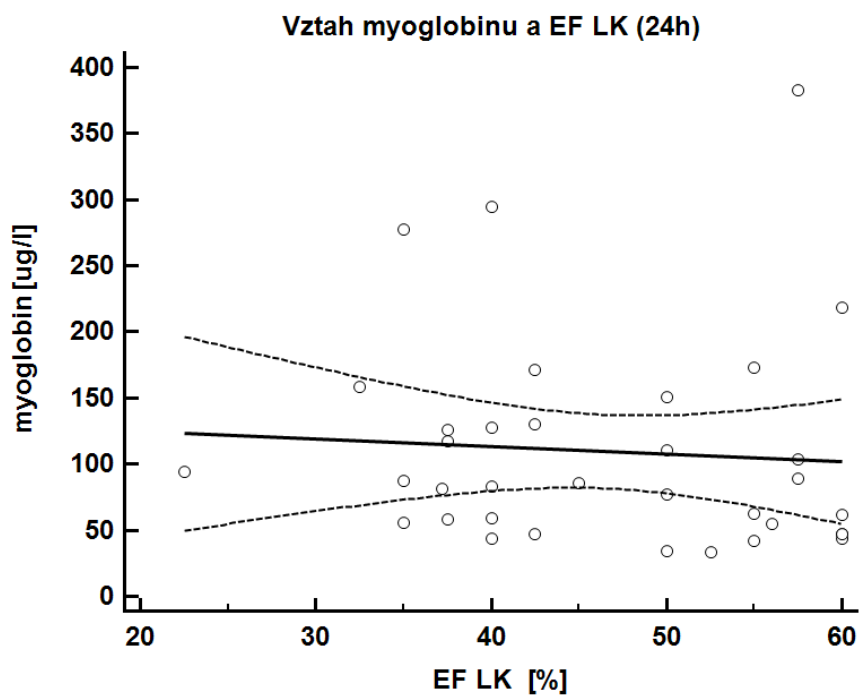
### Vztah mezi MYO a hodnotou ejekční frakce LK

V souboru pacientů byla nalezena významná asociace mezi sníženou EF LK a vstupní hodnotou myoglobinu ( $r = 0,31$ ;  $p = 0,063$ ), následující odběry nevykázaly významnější asociaci těchto parametrů (graf č. 63-65).

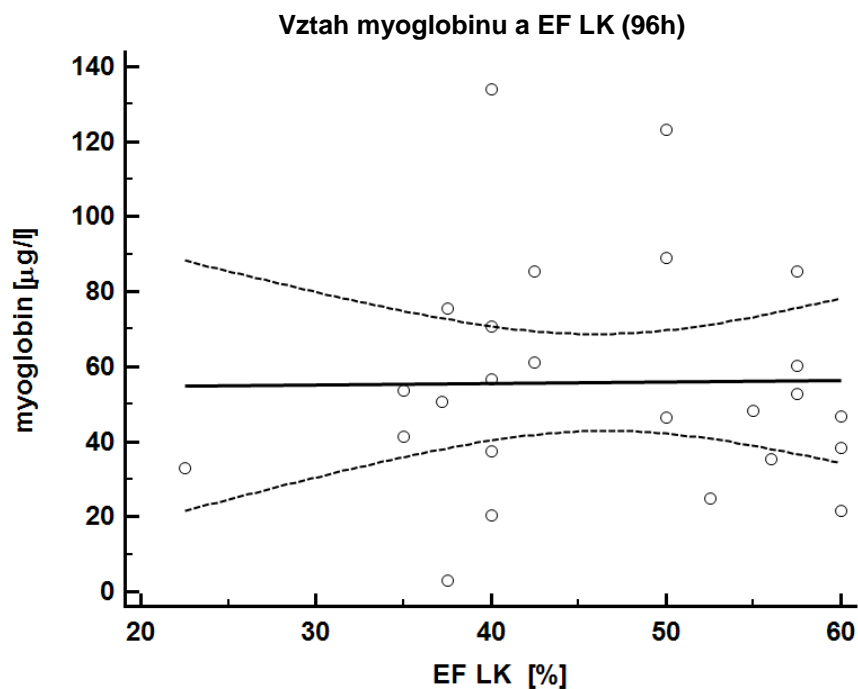
Graf č. 63: Vztah mezi MYO a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 0 hodin ( $r = 0,31$ ;  $p = 0,063$ ).



Graf č. 64: Vztah mezi MYO a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 24 hodin ( $r = 0,11$ ;  $p = 0,529$ ).



Graf č. 65: Vztah mezi MYO a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 96 hodin ( $r = 0,06$ ;  $p = 0,768$ ).



Přestože byly hodnoty myoglobinu ve skupině pacientů s nižší EF levé komory trvale zvýšené, nebylo toto zvýšení statisticky významné (viz tabulka č. 20).

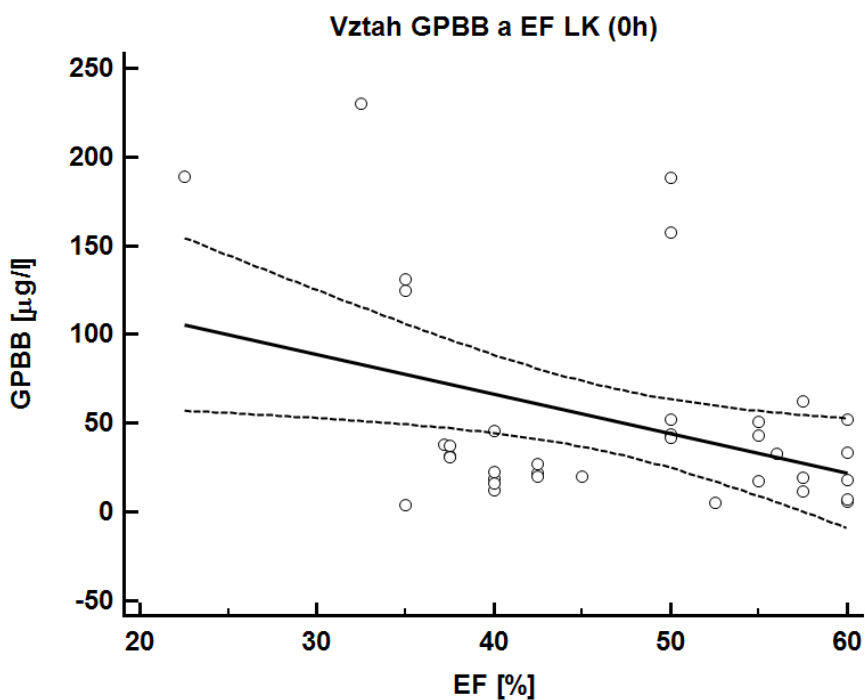
Tabulka č. 20: Hodnoty MYO ve vztahu k ejekční frakci LK.

Odběr	Hodnota myoglobinu ve vztahu k EF LK						p
	EF LK ≤ 40%			EF LK > 40%			
	median	25.percentil	75.percentil	median	25.percentil	75.percentil	
0 h	663,80	162,39	700,00	276,02	104,44	529,72	0,13
24 h	90,55	64,38	127,24	69,86	47,22	130,35	0,51
96 h	50,64	35,09	63,58	48,40	36,86	79,31	0,76

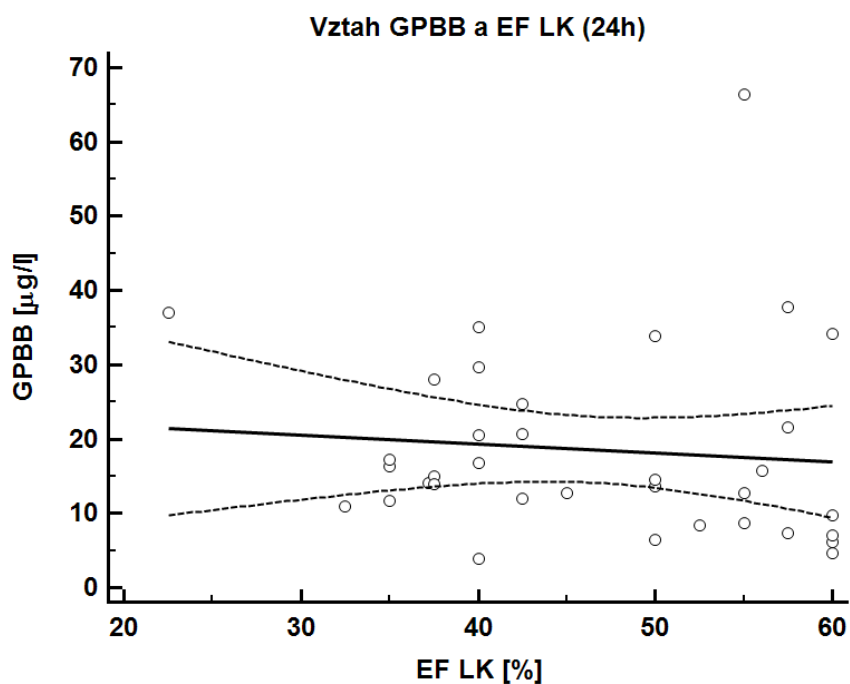
### Vztah mezi GPBB a hodnotou ejekční frakce LK

Ve sledovaném souboru pacientů byla zjištěna významná asociace mezi hodnotou GPBB a ejekční frakcí levé komory v čase 0 hodin ( $r = 0,38$ ;  $p = 0,020$ ). V době za 24 a 96 hodin již tento parametr nevykazoval významnější asociaci s hodnotou EF levé komory (graf č. 66-68).

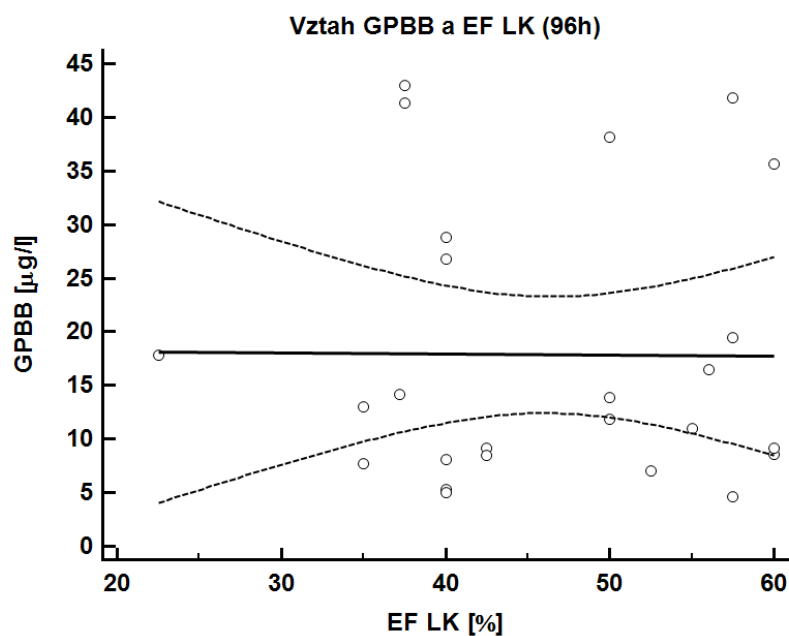
Graf č. 66: Vztah mezi GPBB a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 0 hodin ( $r = 0,38$ ;  $p = 0,020$ ).



Graf č. 67: Vztah mezi GPBB a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 24 hodin ( $r = 0,05$ ;  $p = 0,764$ ).



Graf č. 68: Vztah mezi GPBB a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 96 hodin ( $r = 0,04$ ;  $p = 0,833$ ).



Analýza hodnot GPBB ve vztahu k hodnotě EF levé komory ukázala trend vyšších hladin tohoto parametru ve skupině pacientů s EF LK  $\leq 40\%$  po celou dobu sledovaného období, ale přesto nedosáhl tento vztah statistické významnosti (viz. tabulka č. 21).



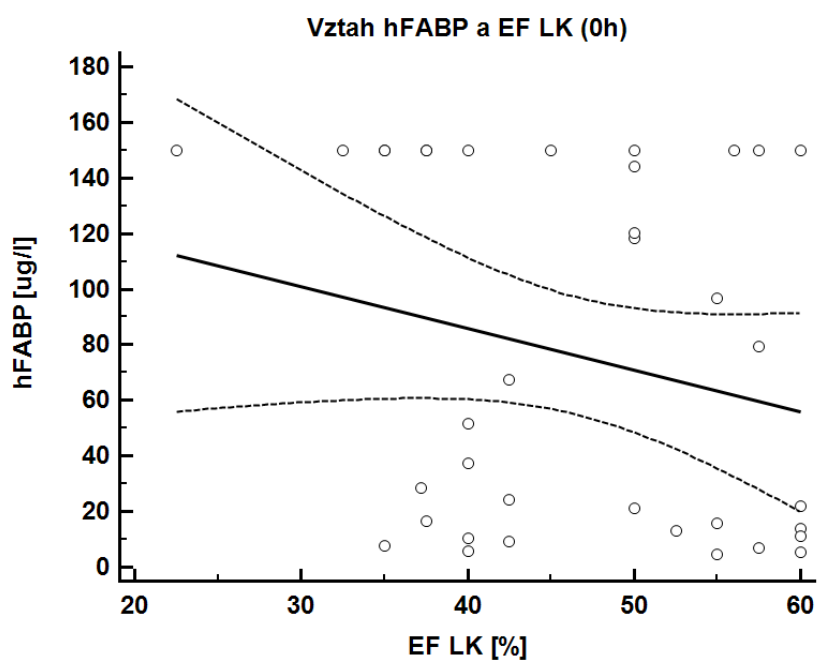
Tabulka č. 21: Hodnoty GPBB ve vztahu k ejekční frakci LK.

Odběr	Hodnota GPBB ve vztahu k EF LK						p
	EF LK ≤ 40%			EF LK > 40%			
	median	25.percentil	75.percentil	median	25.percentil	75.percentil	
0 h	34,59	19,90	104,90	32,86	18,66	48,87	0,21
24 h	16,63	14,01	26,14	13,18	8,47	21,62	0,93
96 h	14,17	7,91	27,81	11,27	8,85	18,68	0,59

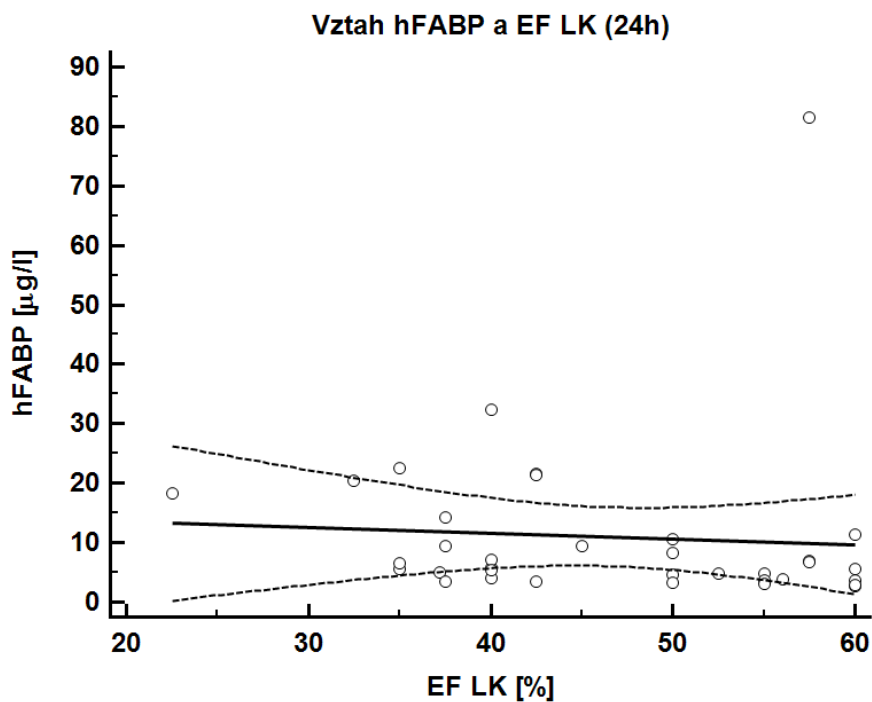
### Vztah mezi hFABP a hodnotou ejekční frakce LK

V případě hFABP byla ve vztahu k systolické funkci LK zjištěna těsná asociace pouze při měření v čase 24 hodin od přijetí, pozdější odběry nevykázaly významnější asociaci mezi hFABP a hodnotou EF LK (graf č. 69-71).

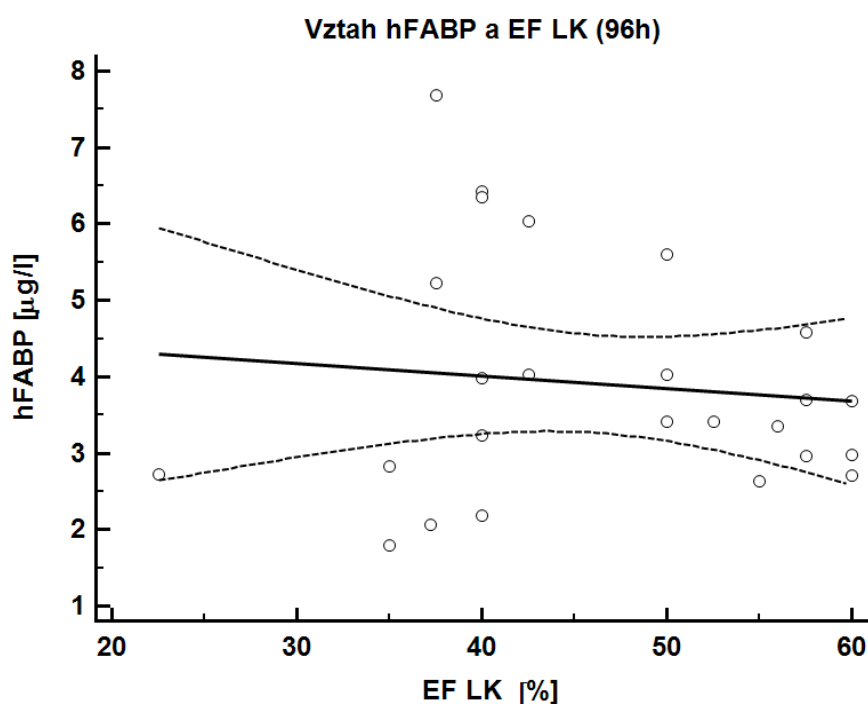
Graf č. 69: Vztah mezi hFABP a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 0 hodin ( $r = 0,23$ ;  $p = 0,174$ ).



Graf č. 70: Vztah mezi hFABP a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 24 hodin ( $r = 0,46$ ;  $p = 0,004$ ).



Graf č. 71: Vztah mezi hFABP a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 96 hodin ( $r = 0,17$ ;  $p = 0,401$ ).



Analýza hladiny hFABP ve vztahu k systolické dysfunkci levé komory ukázala trend vyšších hladin ve skupině pacientů s EF LK  $\leq 40\%$  po celou dobu sledovaného období, ale tento trend nebyl signifikantní (viz. tabulka č. 22).

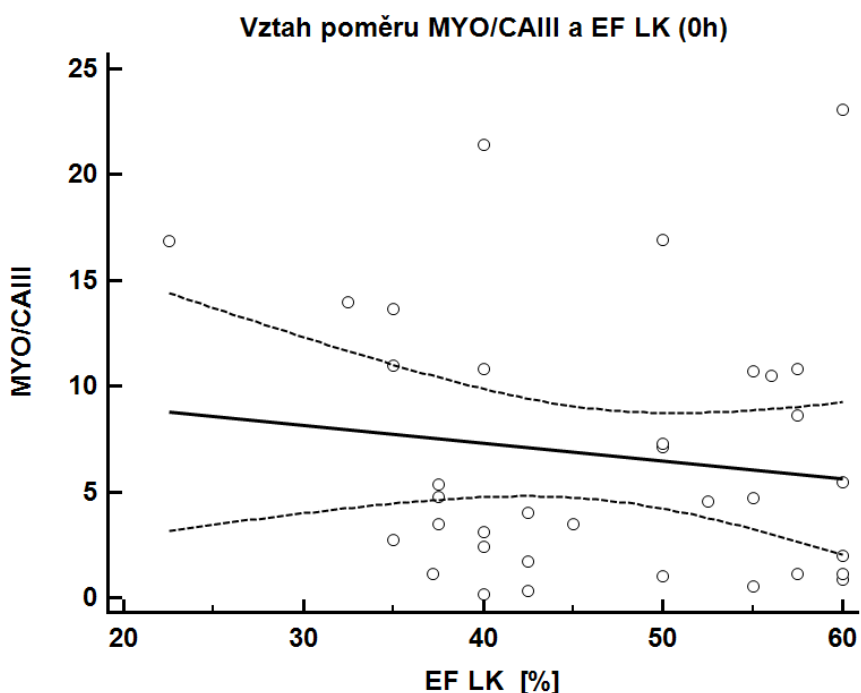
Tabulka č. 22: Hodnoty hFABP ve vztahu k ejekční frakci LK.

Odběr	Hodnota hFABP ve vztahu k EF LK						p
	EF LK ≤ 40%			EF LK > 40%			
	median	25.percentil	75.percentil	median	25.percentil	75.percentil	
0 h	100,75	19,48	150,00	67,39	13,57	138,17	0,43
24 h	6,80	5,50	17,37	5,08	3,64	9,50	0,83
96 h	3,23	2,46	5,79	3,42	2,97	4,03	0,58

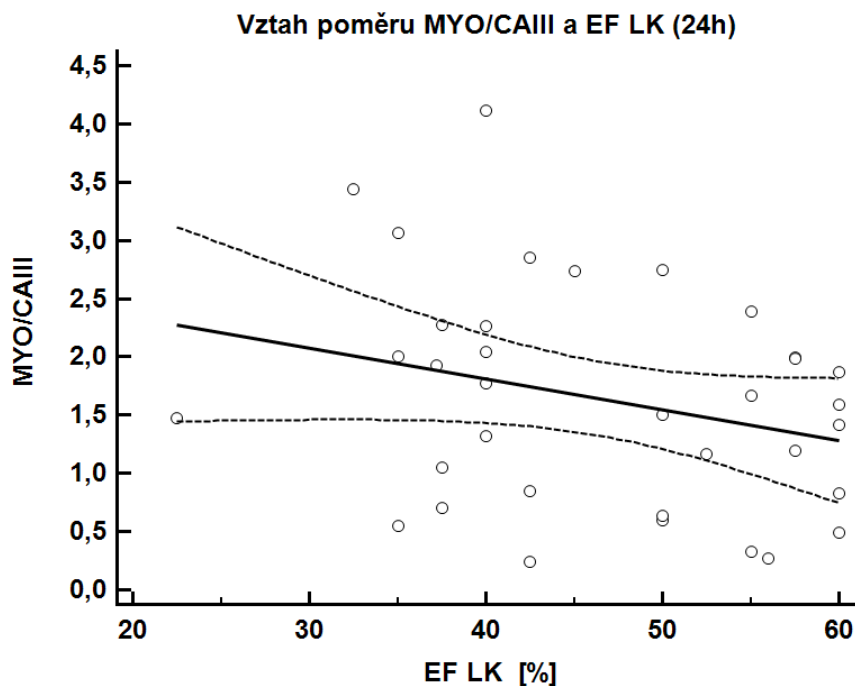
### Vztah mezi poměrem MYO/CAIII a hodnotou ejekční frakce

Ačkoliv by měl poměr myoglobinu a karboanhydrázy III zpřesňovat diagnostiku nekrózy myokardu, v naší studii jsme neprokázali asociaci tohoto parametru s hodnotou systolické dysfunkce levé komory srdeční (graf č. 72-74).

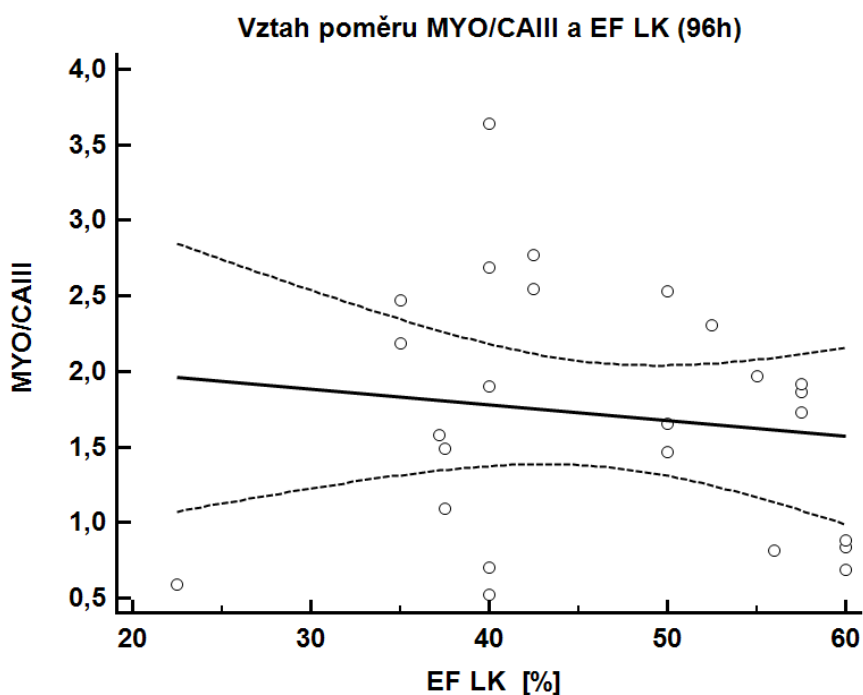
Graf č. 72: Vztah mezi poměrem MYO/CAIII a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 0 hodin ( $r = 0,17$ ;  $p = 0,312$ )



Graf č. 73: Vztah mezi poměrem MYO/CAIII a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 24 hodin ( $r = 0,27$ ;  $p = 0,106$ ).



Graf č. 74: Vztah mezi poměrem MYO/CAIII a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 96 hodin ( $r = 0,17$ ;  $p = 0,409$ ).



Analýza poměru hladiny myoglobinu a karboanhydrázy III ve vztahu k systolické dysfunkci levé komory srdeční ( $EF\ LK \leq 40\%$ ) neukázala signifikantní rozdíly mezi podskupinami těchto pacientů (viz tabulka č. 23).

Tabulka č. 23: Hodnoty poměru MYO/CAIII ve vztahu k ejekční frakci LK.

Odběr	Poměr myoglobinu/CAIII ve vztahu k EF LK						p
	EF LK ≤ 40%			EF LK > 40%			
	median	25.percentil	75.percentil	median	25.percentil	75.percentil	
0 h	5,06	2,84	12,98	4,28	1,18	8,64	0,32
24 h	1,97	1,36	2,27	1,53	0,68	1,99	0,48
96 h	1,58	0,90	2,33	1,73	1,00	2,22	0,90

### 9.3 Diskuse

Součástí naší studie bylo i posouzení nové technologie stanovení kardiomarkerů, a to využití metody proteinových biočipů. Jde o metodu, která vychází z principů enzymové imunanalýzy, která je nová, v klinické praxi dosud nerozšířená a mnohdy neznámá a zatím využívána pouze pro výzkumné účely (přesná metodika vyšetření je popsána v kapitole 9.1.2). Obrovskou výhodou této metody je, že umožňuje stanovení několika různých analytů najednou a my tím získáme komplexní pohled na danou problematiku, v našem případě na probíhající ischemii myokardu. K vyšetření postačuje jen nepatrné množství séra a měření touto elegantní metodou zároveň netrvá déle než je doba stanovení standardních biochemických markerů. V naší studii, jak bude uvedeno v následujících odstavcích, jsme také potvrdili spolehlivost této nové metody.

Jako každá metoda má i tato technologie své nedostatky. Jednou z nevýhod je, že je již výrobcem na každém biočipovém analyzátoru přesně definovaný určitý panel markerů, které lze stanovit. Nemůžeme si tedy sami určit a aktuálně podle situace nakombinovat markery, které budeme chtít stanovovat. Nutno ale podotknout, že se firma Randox snaží tento nedostatek vyřešit. Dalším handicapem je vedle velmi nízkého rozšíření této metody (dostupnost je v současné době pouze ve velkých nemocnicích s možností výzkumu), také malé povědomí o tomto novém způsobu stanovování markerů.

V naší studii jsme touto technologií otestovali panel kardiálních markerů, tj. panel Cardiac Array, který umožňuje stanovit MYO, TnI, CK MB, hFABP, GPBB a CAIII. U každého z markerů byla hodnocena jeho dynamika v průběhu STEMI, asociace k naměřeným koncentracím hsTnT jako standardního markeru nekrózy a posouzení vztahu každého měřeného parametru k rozvoji pohnfarktové systolické dysfunkce myokardu a tedy prognóze pacienta.

Jedním z vyšetřovaných parametrů je TnI, který patří mezi standardní markery nekrózy a který i touto metodou vykazoval v průběhu měření velmi výraznou dynamiku. Již při prvním odběru docházelo v porovnání s kontrolní skupinou k významnému vzestupu hodnot a maximálních koncentrací bylo dosaženo při odběru za 24 hodin. Při posledním měření se hodnoty TnI opět snižovaly a byly dokonce nižší než při prvním odběru. Pokud jsme porovnávali jednotlivé hodnoty s hodnotami, které byly získány od kontrolní skupiny, pak všechna srovnání byla statisticky významná ( $p < 0,001$ ) a stejné statistické významnosti bylo dosaženo i srovnáním odběru 0 a za 24 hodin a také mezi odběrem za 24 a 96 hodin. Mezi odběry 0 a za 96 hodin od přijetí byla statistická významnost o něco nižší ( $p < 0,05$ ). TnI tedy v průběhu AIM vykazuje velmi dramatickou změnu koncentrací, které jsou statisticky významné, a stává se tak významným markerem pro diagnostiku AIM.

Zároveň byla také potvrzena velmi těsná asociace s hsTnT, kdy byla nejtěsnější vazba zjištěna při prvním a druhém měření ( $p < 0,001$ ), při odběru posledním již byla o něco nižší ( $p < 0,05$ ). Tímto byla prokázána prakticky srovnatelná dynamika těchto dvou markerů nekrózy v průběhu AIM. Naši studií jsme také prokázali, že vyšší koncentrace TnI významným způsobem souvisí s následnou poinfarktovou dysfunkcí myokardu ( $p < 0,001$ ) a tedy s vyšším rizikem rozvoje srdečního selhávání.

V případě CK MB došlo k enormnímu vzestupu koncentrací ihned při prvním odběru a zároveň bylo dosaženo i maximálních hodnot. Za následujících 24 hodin byly hodnoty prakticky stacionární a i maximální koncentrace byla totožná s koncentrací z prvního odběru. Teprve při posledním měření docházelo k poklesu naměřených hodnot a tento pokles byl v porovnání s hodnotami v druhém odběru velmi nápadný. Pro výraznou dynamiku tohoto markeru byl potvrzen i jeho statisticky významný rozdíl ve vztahu s kontrolní skupinou a při vzájemném porovnání hodnot odběru 0 a za 96 hodin a odběru za 24 a 96 hodin ( $p < 0,001$ ). Rozdíl hodnot mezi odběrem 0 a za 24 hodin vykazoval nižší statistickou významnost ( $p < 0,05$ ). I v případě tohoto markeru byla potvrzena jeho těsná vazba s probíhajícím AIM. Pro svůj velmi časný a výrazný vzestup koncentrací je považován za jeden z časných markerů AIM a pro svou dynamiku je dobrým ukazatelem možné restenózy či recidivy akutní ischémie.

Také u parametru CK MB byla prokázána jeho velmi těsná asociace s dynamikou standardního markeru nekrózy hsTnT (při porovnání odběru 0 bylo  $p < 0,001$  a u odběru

za 24 hodin  $p < 0,05$ ). Porovnáním podskupiny pacientů, jejichž EF byla menší nebo rovna 40% s naměřenými hodnotami CK MB v průběhu druhého odběru, bylo zjištěno, že vyšší koncentrace CK MB korelují s rozvojem systolické dysfunkce myokardu ( $p < 0,01$ ). Tím jsme opět i touto metodou potvrdili význam hodnocení CK MB v průběhu AIM a zjistili jsme, že vyšší hodnoty CK MB souvisí s větším rozsahem ischemie a jsou tak spojeny s mnohem vyšším rizikem vzniku systolické dysfunkce a s následným srdečním selháváním.

hFABP ovlivňuje  $\beta$ -oxidaci mitochondrií obsažených v cytosolu myocytů a v případě poškození kardiomyocytů dochází k jeho vyplavení. V plazmě dosahují hladiny hFABP svého maxima již za 4-6 hodin od inzultu a po 24 hodinách dochází prakticky k jejich normalizaci. Pro svou rychlou dynamiku je hFABP označován také jako časný marker AIM, a protože k vyplavení dochází pouze v případě destrukce kardiomyocytů, je označován za ukazatele nekrózy myokardu. Řada autorů prokázala, že vyšší hladiny hFABP jsou spojené s vyšším rizikem restenózy, srdečního selhávání, reinfarktu nebo kardiopulmonální zástavy a korelují s prognózou pacientů [69, 71].

I v naší studii byl již při prvním měření zaznamenán významný vzestup koncentrací hFABP. Zároveň bylo dosaženo i maximálních koncentrací a při odběru provedeném za 24 hodin se hladiny hFABP již dramaticky snižovaly. Při posledním odběru byly hodnoty hFABP téměř srovnatelné s hodnotami v kontrolní skupině. Výraznou dynamiku tohoto markeru v průběhu AIM dokládá i statisticky významný rozdíl naměřený mezi jednotlivými měřeními a kontrolní skupinou a při vzájemném porovnání jednotlivých měření ( $p < 0,001$ ). Z výsledků naší studie vyplývá, že hFABP výrazným způsobem souvisí se vznikem AIM a pro jeho velmi rychlý vzestup koncentrací patří právem mezi časné markery probíhajícího AIM.

Také jsme prokázali těsný vztah tohoto parametru s hodnotami hsTnT v průběhu odběru za 24 a 96 hodin ( $p < 0,01$ , resp.  $p < 0,05$ ). Zároveň jsme potvrdili asociaci tohoto markeru k systolické dysfunkci LK ( $EF \leq 40\%$ ) a můžeme tedy hFABP označit za ukazatele srdečního selhávání a tedy horší prognózy pacientů. Protože naše studie nezahrnovala pacienty s reinfarktem, restenózou nebo srdeční zástavou, nemůžeme se k bližšímu posouzení vztahu hFABP k těmto modalitám blíže vyjádřit.

Naměřené hodnoty MYO korelují s dynamikou hFABP. První odběr je spojen s enormním nárůstem hodnot MYO a prakticky v této době je dosaženo i hodnot

maximálních. Již při měření za 24 hodin od přijetí dochází k výraznému poklesu koncentrací MYO a hodnoty při posledním měření se téměř blíží hodnotám zdravých jedinců. Rozdíly v koncentracích mezi jednotlivými měřeními a při porovnání s kontrolami jsou vždy statisticky významné ( $p < 0,001$ ). I metodou proteinových biočipů námi byla prokázána korelace mezi jednotlivými hodnotami MYO a probíhajícím AIM a stejně jako hFABP je i MYO zařazen mezi časné ukazatele ischemie.

V případě MYO byla také, stejně jako u hFABP, prokázána těsná vazba s hladinami hsTnT v průběhu měření za 24 hodin ( $p < 0,01$ ), při měření při přijetí (odběr 0) byl tento vztah hraniční, statisticky nevýznamný ( $p = 0,06$ ). I přes enormní vzestup koncentrací MYO při prvním měření nebyla prokázána žádná asociace se systolickou dysfunkcí LK. Poměr MYO/CAIII zvyšuje senzitivitu i specifitu samotného MYO.

Marker GPBB se svou dynamikou velmi podobá MYO. Již při prvním měření dochází k výraznému vzestupu naměřených koncentrací a zároveň je i dosaženo maximálních hodnot. V následujících měřeních sledujeme pozvolný pokles GPBB a při posledním měření za 96 hodin od přijetí se hodnoty blíží hodnotám v kontrolní skupině. Pokud jsme porovnávali koncentrace GPBB získané v jednotlivých odběrech, pak všechna vzájemná porovnání, i porovnání s kontrolní skupinou, byla statisticky významná. Můžeme tedy i marker GPBB zařadit mezi časné markery průkazu AIM.

Dále jsme u parametru GPBB hledali možnou asociaci k dynamice markeru hsTnT. Nejtěsnější vazba byla prokázána pouze při vzájemném srovnání koncentrací těchto markerů získaných při prvním odběru ( $p < 0,001$ ). Naopak jsme metodou regresní analýzy neprokázali žádný vztah koncentrací GPBB k systolické dysfunkci LK a nemůžeme tedy říci, že by byly hodnoty GPBB predikujícím ukazatelem rozvoje poinfarktového srdečního selhávání.

Těmito výsledky jsme potvrdili, že i méně standardní markery, jako jsou hFABP nebo GPBB, mají v průběhu AIM výraznou dynamiku a pro velmi časný vzestup jejich koncentrací je můžeme právem zařadit mezi časné markery AIM, jako jsou MYO nebo CK MB. Protože zároveň vykazují poměrně rychlou normalizaci měřených koncentrací, pak by tyto markery mohly být i dobrým ukazatelem reinfarktu nebo restenózy. Všechny sledované markery vykazují asociaci s dynamikou standardního markeru hsTnT a u většiny parametrů (TnI, CK MB a hFABP) byl metodou regresní analýzy potvrzen i jejich vztah k systolické dysfunkci LK a tedy k možnému rozvoji srdečního selhávání.



I přes omezený počet pacientů lze díky výše popsaným výsledkům považovat novou technologii stanovování markerů metodou proteinových biočipů za bezpečnou a rychlou (výsledky získáváme za časový interval, který je srovnatelný se standardními biochemickými metodami). Velkou výhodou je, že z malého objemu krevního vzorku získáme během jediného okamžiku výsledky několika parametrů najednou, a máme tak komplexnější pohled na danou problematiku. Nevýhoda této metody v dnešní době stále spočívá v její velmi omezené dostupnosti a jistým nedostatkem je i to, že každý panel nese již výrobcem přesně definovaný počet a seznam markerů, které lze stanovovat. Neexistuje tedy zatím možnost volného výběru parametrů, i když je to jedna z věcí, které se snaží firma Randox odstranit.

## 10 Závěr

Ischemicko-reperfuznímu poškození je v posledních letech věnována stále velká pozornost. Snahou je jeho jednotlivé děje blíže pochopit a poznat, a objevit tak nové možnosti jak účinně zmírnit, respektive jak co nejvíce zabránit vlastnímu ischemickému poškození dalších kardiomyocytů, ke kterému dochází i při včasné provedené reperfuzi. Mezi nejznámější metody, které vedou ke zmírnění ischemicko-reperfuzního poškození, patří preconditioning a postconditioning. Preconditioning představuje spíše experimentální a v praxi prakticky nepoužitelnou metodu založenou na střídání krátkých epizod okluze věnčité cévy před vlastní protražovanou ischemií [45, 48, 49]. Naopak postconditioning spočívá v opakování krátkých epizod okluze a reperfuze, které následují po vlastní reperfuzi uzavřené cévy [29, 49, 52, 53]. V praxi jde o zavedení balonku do zastentované koronární cévy a jeho opakované insuflace a desuflace, čímž bylo dosaženo pomalejších změn pH, snížení volných kyslíkových radikálů a koncentrace  $Ca^{2+}$  a potlačení celkové zánětlivé odpovědi [29, 45, 53, 54]. Pozornost je dále věnována efektu hyperoxémie, která vede ke snížení peroxidových radikálů, edému tkání a adherenci leukocytů, nebo hypotermii, která snižuje agregaci trombocytů a potlačuje aktivaci zánětlivých buněk [29]. Řada studií zkoumá efekt jednotlivých farmak a mediátorů, které přímo zasahují do jednotlivých úrovní ischemicko-reperfuzního poškození. Jde o studie s adenosinem [49], s antagonistou receptoru pro interleukin 1 [49,55], s natriuretickými peptidy [56, 57], cyklosporinem A [29, 58, 59] nebo s destičky aktivujícím faktorem [60].

Touto studií jsme potvrdili a poukázali na výraznou složitost děje jako je akutní infarkt myokardu a ischemicko – reperfuzní poškození, ke kterým dochází na molekulární úrovni. Jde o komplexní děj, v jehož průběhu je aktivována celá řada buněk, znaků a mediátorů imunitního systému. Některé markery mají destruktivní a jiné spíše ochranný mechanismus, koncentrace některých znaků se v průběhu koronárního syndromu a ischemicko – reperfuzního poškození zvyšují, jiné naopak klesají anebo se ovlivňují navzájem. U některých námi vybraných parametrů jsme prokázali těsný vztah k dynamice standardně používaného markeru nekrózy hsTnT nebo k systolické dysfunkci myokardu. Přesto zůstává mnohé ještě neobjasněné a i přes řadu provedených studií nemáme zatím k dispozici účinný terapeutický postup, který by ischemicko-reperfuzní poškození co nejvíce minimalizoval.

Zároveň jsme touto prací upozornili na neustálý vývoj nových technologií v diagnostice a v možnostech stanovování jednotlivých markerů. Ukázali jsme, v čem se tyto technologie liší od standardních běžně používaných metod, jak se s nimi pracuje, jaká jsou jejich úskalí a co nového nám tyto technologie přináší. Porovnáním se standardně sledovanými parametry jsme zároveň potvrdili bezpečnost a účinnost těchto metod. Poukázali jsme i na jejich nedostatky, jako je nemožnost náhodného výběru stanovovaných parametrů, vyšší cena a zatím i omezená dostupnost.

### **Klinický význam studie pro praxi**

V naší práci jsme se věnovali některým otázkám, které mohou být potenciálně velmi užitečné pro klinickou praxi.

1) Prokázali jsme, že během ischemie a reperfuze v průběhu akutního koronárního syndromu (STEMI) dochází k významné aktivaci imunitního systému a u řady parametrů jsme popsali dynamiku těchto změn.

2) U některých parametrů jsme současně prokázali jejich vztah k velikosti ložiska nekrózy a systolické dysfunkci levé komory srdeční.

3) V oblasti některých nových markerů strukturálního poškození myokardu jsme prokázali jejich vztah k systolické dysfunkci levé komory srdeční a tím také jejich možný vztah k prognóze pacientů s akutním infarktem myokardu.

4) Prokázali jsme, že výše uvedená nová biočipová multi-assay je schopna na poměrně dobré úrovni detegovat změny vybraných parametrů.

Práce přinesla některé nové poznatky o účasti vybraných složek imunity na průběhu akutního infarktu myokardu a ischemicko reperfuzního poškození a může tím sloužit jako podklad pro další zkoumání procesu ischemie a reperfuze u akutních koronárních syndromů. Může tak přispět ke snahám tento proces racionálně modifikovat s cílem minimalizovat výslednou velikost nekrotické či ischemizované tkáně.

## 11 Seznam tabulek

1/ Tabulka č. 1: Definice akutního infarktu myokardu podle dokumentu Third universal definition of myocardial infarction. Upraveno podle Thygesena K et al. European Heart Journal (2012) 33, 2551–2567).

2/ Tabulka č. 2: Doporučení pro časnou diagnostiku AIM podle doporučení Evropské kardiologické společnosti (Upraveno podle dokumentu ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in the patients presenting with ST-segment elevation, Steg G., European Heart Journal, 2012, 33, p. 2569-2619).

3/ Tabulka č. 3: Přehled některých stavů, které vedou k vzestupu hladiny srdečních troponinů.

4/ Tabulka č. 4: Kinetika hladin vybraných markerů nekrózy myokardu v průběhu akutního infarktu myokardu s elevacemi ST segmentů.

5/ Tabulka č. 5: Přehled vybraných markerů zasahujících do procesu ischemie a reperfuze v průběhu infarktu myokardu.

6/ Tabulka č. 6: Přehled rizikových faktorů u zařazených pacientů, kde byla sledována humorální imunita.

7/ Tabulka č. 7: Klinická data zařazených pacientů, kde byla sledována humorální imunita.

8/ Tabulka č. 8: Přehled naměřených hodnot sledovaných markerů humorální imunity.

9/ Tabulka č. 9: Hodnoty hsTnT ve vztahu k ejekční frakci LK.

10/ Tabulka č. 10: Hodnoty PTX3 ve vztahu k ejekční frakci LK.

11/ Tabulka č. 11: Hodnoty sCD163 ve vztahu k ejekční frakci LK.

12/ Tabulka č. 12: Hodnoty sGP130 ve vztahu k ejekční frakci LK.

13/ Tabulka č. 13: Hodnoty sCD95Fas ve vztahu k ejekční frakci LK.

14/ Tabulka č. 14: Přehled rizikových faktorů u zařazených pacientů, kde byly měřeny parametry metodou proteinových biočipů.

15/ Tabulka č. 15: Klinická data zařazených pacientů, kde byly měřeny parametry metodou proteinových biočipů.

16/ Tabulka č. 16: Naměřené hodnoty jednotlivých parametrů panelu Cardiac Array v kontrolní skupině a v čase 0.

17/ Tabulka č. 17: Naměřené hodnoty jednotlivých parametrů panelu Cardiac Array v čase za 24 a 96 hodin od přijetí.

18/ Tabulka č. 18: Hodnoty cTnI ve vztahu k ejekční frakci LK.

19/ Tabulka č. 19: Hodnoty CKMB ve vztahu k ejekční frakci LK.

20/ Tabulka č. 20: Hodnoty MYO ve vztahu k ejekční frakci LK.

21/ Tabulka č. 21: Hodnoty GPBB ve vztahu k ejekční frakci LK.

22/ Tabulka č. 22: Hodnoty hFABP ve vztahu k ejekční frakci LK.

23/ Tabulka č. 23: Hodnoty poměru MYO/CAIII ve vztahu k ejekční frakci LK.

## 12 Literatura

1. THYGESEN, K. Third universal definition of myocardial infarction. *European Heart Journal*. 2012, 33, p. 2551-2567.
2. VOJÁČEK, J. Třetí univerzální definice infarktu myokardu (Third universal definition of myocardial infarction). *Co ret Vasa*. 2013, 55, s. 228-235.
3. STEG, G. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in the patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal*. 2012, 33, p. 2569-2619.
4. ELLIOT, M. Acute myocardial infarction. In *Braunwald E. Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 1996, s. 1184-1272.
5. PENTTILA, I. Laboratory diagnosis of patients with acute chest pain. *Clin Chem Lab Med*. 2000, 38(3), p. 187-197.
6. KARRAS, DJ. Serum markers in the emergency department diagnosis of acute myocardial infarction. *Emerg Med Clin North Am*. 2001, 19(2), p. 321-337.
7. SAVONITTO, S. The prognostic value of creatine kinase elevations extends across the whole spectrum of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2002, 39(1), p. 22-29.
8. BAŠTECKÝ, J. Levels of CK MB mass in patients with acute myocardial infarction treated with fibrinolysis. Comparison with levels of CK, CKMB, CKMB mass and troponin T in the diagnosis of coronary ischemia. *Vnitr Lek*. 1997, 43(11), s. 715-721.
9. YOUNG, GP. Serial creatine kinase-MB results are a sensitive indicator of acute myocardial infarction in chest pain patients with nondiagnostic electrocardiograms: the second Emergency Medicine Cardiac Research Group Study. *Acad Emerg Med*. 1997, 4(9), p. 869-877.
10. SEO, H. Creatine kinase MB protein mass is better indicator for the assessment of acute myocardial infarction in the lower range of creatine kinase level. *Jpn Heart J*. 1993, 34(6), p. 717-727.

11. PENTTILA, K. Myoglobin, creatine kinase MB isoforms and creatine kinase MB mass in early diagnosis of myocardial infarction in patients with acute chest pain. *Clin Biochem.* 2002, 35(8), p. 647-653.
12. SALLACH, SM. A change in serum myoglobin to detect acute myocardial infarction in patients with normal troponin I levels. *Am J Cardiol.* 2004, 94(7), p. 864-867.
13. DAVIS, CP. Serial myoglobin levels for patients with possible myocardial infarction. *Acad Emerg Med.* 1996, 3(6), p. 590-597.
14. GERHARDT, W. Serum LD-1 activity in suspected acute myocardial infarction. *Clin Chem.* 1983, 29(6), p. 1057-1060.
15. JABLONSKY, G. Changes in the ratio of lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 2 during the first day after acute myocardial infarction. *Clin Chem.* 1985, 31(10), p. 1621-1624.
16. BANU, S. Comparative study of high sensitivity troponin T and heart-fatty acid binding protein in STEMI patients. *Saudi J Biol Sci.* 2015, 22(1), p. 56-61.
17. CUBRANIC, Z. Diagnostic accuracy of heart fatty acid binding protein (H-FABP) and glycogen phosphorylase isoenzyme BB (GPBB) in diagnosis of acute myocardial infarction in patients with acute coronary syndrome. *Biochem Med.* 2012, 22(2), p. 225-236.
18. CARROLL, C. Heart-type fatty acid binding protein as an early marker for myocardial infarction: systematic review and meta-analysis. *Emerg Med J.* 2013, 30(4), p. 280-286.
19. LIPPI, G. Glycogen phosphorylase isoenzyme BB in the diagnosis of acute myocardial infarction: a metaanalysis. *Biochem Med.* 2013, 23(1), p. 78-82.
20. FILIPIAK, KJ. New hope for markers h-FABP and GPBB as fast tests for acute myocardial infarction. *Kardiol Pol.* 2011, 69(1), p. 7-8.
21. RABITZSCH, G. Immunoenzymometric assay of human glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of ischemic myocardial injury. *Clin.Chem.* 1995, 41/7, p. 966-978.

22. MAIR, J. Different time courses of cardiac contractile proteins after myocardial infarction. *Clin Chim Acta*. 1994, 231(1), p. 47-60.
23. MAYYAS, FA. Level and significance of plasma myeloperoxidase and the neutrophil to lymphocyte ratio in the patients with coronary artery disease. *Exp Ther Med*. 2014, 8(6), p. 1951-1957.
24. SEARLE, J. The role of myeloperoxidase (MPO) for prognostic evaluation in sensitive cardiac troponin I negative chest pain patients in the emergency department. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2013, 2(3), p. 203-210.
25. GUO, C. Correlation between the severity of coronary artery lesions and levels of estrogen, hsCRP and MMP-9. *Exp Ther Med*. 2014, 7(5), p. 1177-1180.
26. WEIR, RA. Galectin 3 and cardiac function in survivors of acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail*. 2013, 6(3), p. 492-498.
27. FREIXA, X. Usefulness of endothelin-1 assessment on acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol*. 2011, 64(2), p. 105-110.
28. MOCKEL, M. Copeptin marker of acute myocardial infarction. *Curr Atheroscler Rep*. 2014, 16(7), p. 421.
29. HAUSENLOY, DJ. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013, 123 (1), p. 92-100.
30. CARDILO-REIS, L. When monocytes come (too) close to our heart. *JACC*. 2010, 55 (15), p. 1639-1641.
31. MARIANI, M. Significance of total and differential leukocyte count in patients with acute myocardial infarction treated with primary coronary angioplasty. *Eur Heart J*. 2006, 27, p. 2511-2515.
32. AOKI, S. Elevated peripheral blood mononuclear cell count is an independent predictor of left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Journal of Cardiology*. 57 (2), p. 202-207.
33. NAHRENDORF, M. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010, 121, p. 2437-2445.



34. FANG, L. Activation of peripheral blood mononuclear cells and extracellular matrix and inflammatory gene profile in acute myocardial infarction. *Clinical science*. 2010, 119, p. 175-183.
35. GRISELLI, M. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med*. 1999, 190, p. 1733-1740.
36. ZUIDEMA, MY. Ischemia/reperfusion injury: The role of immune cells. *World J Cardiol*. 2010, 2(10), p. 325-332.
37. HUANG, Y. Ischemia-reperfusion and immediate T cell responses. *Cell immunol*. 2007, 248, p. 4-11.
38. VILAHUR, G. Ischemia/reperfusion activates myocardial innate immune response: the key role of the toll-like receptor. *Frontiers in physiology*. 2014, 496 (5), p. 1-5.
39. WIDER, J. Ischemic conditioning: the challenge of protecting the diabetic heart. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2014, 4(5), p. 383-396.
40. LI, Y. Myocardial ischemia activates an injurious innate immune signaling via cardiac heat shock protein 60 and toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2011, 286(36), p. 31308-31319.
41. CHAO, W. Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009, 296(1), p. 1-12.
42. FRANGOIANNIS, NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*. 2008, 58, p. 88-111.
43. GANONG, WF. *Přehled lékařské fyziologie*. H&H nakladatelství, 1999, s. 681. ISBN 80-85787-36-9. Kapitola 3, Vzrušivé tkáně: svaly, s. 61-64.
44. FERDINANDY, P. Interactions of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning and postconditioning. *Pharmacol Rev*. 2007, 59, p. 418-458.
45. BOPASSA, JC. Protection of the ischemic myocardium during the reperfusion: between hope and reality. *Am J cardiovasc. Dis*. 2012, 2(3), p. 223-236.

46. FARBER, JI. Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol.* 1981, 102, p. 271-281.
47. HALESTROP, AP. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited of pH values bellow 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem J.* 1991, 278, p. 715-719.
48. MURRY, CE. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986, 74, p. 1124-1136.
49. MINAMINO, T. Cardioprotection from ischemia/reperfusion injury. *Circulation journal.* 2012, p. 1074-1082.
50. KUZUYA, T. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res.* 1993, 72, p. 1293-1299.
51. DORADO, DG. Twenty-five years of preconditioning: are we ready for ischemia? From coronary occlusion to systems biology and back. *Cardiovasc. Res.* 2011, 91 (3), p. 378-381.
52. THIBAUT, H. Long-term benefit of postconditioning. *Circulation.* 2008, 117, p. 1037-1044.
53. STAAT, P. Postconditioning in human heart. *Circulation.* 2005, 112, p. 2143-2148.
54. ZHAO, Z. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003, 285, p. 579-588.
55. GROTHUSEN, Ch. Impact of an interleukin-1 receptor antagonist and erythropoetin on experimental myocardial ischemia-reperfusion injury. *Scientific World Journal.* 2012, 6 pgs, 737585.
56. SINNAEVEL, PR. Reperfusion before percutaneous coronary intervention in ST-elevation myocardial infarction patients is associated with lower N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels during follow-up, irrespective of pre-treatment with full-dose fibrinolysis. *Eur Heart J.* 2009, 30 (18), p. 2213-2219.

57. WU, B. Pretreatment with B-type natriuretic peptide protects the heart from ischemia-reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis. *Tohoku J. Exp. Med.* 2009, 219, p. 107-114.
58. CHAPPELL, D. Sevoflurane reduces leukocyte and platelet adhesion after ischemia-reperfusion by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology.* 2011, 115, p. 483-491.
59. TSUJIOKA, H. Post-reperfusion enhancement of CD14+CD16- monocytes and microvascular obstruction in ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Circ J.* 2010, CJ-09-1045.
60. PENNA, C. Platelet activating factor: the good and the bad in the ischemic/reperfused heart. *Exp. Biol. and Med.* 2011, 236, p. 390-401.
61. GEERS, C. Carbonic anhydrase in skeletal and cardiac muscle from rabbit and rat. *Biochem. J.* 1992, 282, p. 165-171.
62. KNUPPEL-RUPPERT, AS. Immunochemical evidence for a unique GPI-anchored carbonic anhydrase isozyme in human cardiomyocytes. *AM J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000, 278, p. 1335-1344.
63. KIM, G. Molecular determinants of S-glutathionylation of carbonic anhydrase 3. *Antioxid Redox Signal.* 2005, 7 (7-8), p. 849-854.
64. BEUERLE, JR. Characteristics of myoglobin, carbonic anhydrase III and the myoglobin/carbonic anhydrase III ratio in trauma, exercise, and myocardial infarction patients. *Clin Chim Acta.* 2000, 294, p. 115-128.
65. VAANANEN, HK. Serum carbonic anhydrase III and myoglobin concentrations in acute myocardial infarction. *Clin Chem.* 1990, 36 (4), p. 635-638.
66. VUORI, J. Myoglobin/carbonic anhydrase III ratio: Highly specific and sensitive early indicator for myocardial damage in acute myocardial infarction. *Clinical Chemistry.* 1996, 42 (1), p. 107-109.
67. STEJSKAL, D. Use of glycogen phosphorylase BB measurement with Poct in the diagnosis of acute coronary syndromes. A comparison with the Elisa method. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc.* 2007, 151(2), p. 247-249.

68. RABITZSCH, G. Immunoenzymometric assay of human glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of ischemic myocardial injury. *Clin.Chem.* 1995, 41/7, p. 966-978.
69. CAVUS, U. Heart-type fatty acid binding protein can be a diagnostic marker in acute coronary syndromes. *Journal of the national medical association.* 2006, 98 (7), p. 1067-1070.
70. LI, Ch. Point-of-care test of heart-type fatty acid-binding protein for the diagnosis of early acute myocardial infarction. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2010, 31, p. 307-312.
71. KIM, KS. Heart-type fatty acid-binding protein as an adjunct to cardiac Troponin-I for the diagnosis of myocardial infarction. *J Korean Med Sci.* 2011, 26, p. 47-52.
72. ALHADI, H.A. Do we need additional markers of myocyte necrosis: the potential value of heart fatty-acid-binding protein. *QJ Med.* 2004, 97, p. 187-198.
73. McCANN, CJ. Novel biomarkers in early diagnosis of acute myocardial infarction compared with cardiac troponin T. *European Heart Journal.* 2008, 29, p. 2843-2850.
74. KIM, Y. Automated heart-type fatty acid-binding protein assay for the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Am J Clin Pathol.* 2010, 134, p. 157-162.
75. MAD, P. Human heart-type fatty-acid-binding protein as a point-of-care test in the early diagnosis of acute myocardial infarction. *QJ Med.* 2007, 100, p. 203-210.
76. IIDA, K. Relationship between heart-type fatty acid-binding protein levels and the risk of death in patients with serious condition on arrival at the emergency department. *Internal Medicine.* 2005, 44 (10), p. 1039-1046.
77. ISHII, J. Prognostic value of serum concentration of heart-type fatty acid-binding protein relative to cardiac Troponin T on admission in the early hours of acute coronary syndrome. *Clinical Chemistry.* 2005, p. 1397-1404.
78. O'DONOGHUE, M. Prognostic utility of heart-type fatty acid binding protein in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2006, 114, p. 550-557.

79. BRUINS SLOT, MHE. Heart-type fatty acid-binding protein in acute myocardial infarction evaluation (FAME): Background and design of a diagnostic study in primary care. *BMC Cardiovascular disorders*. 2008, 8, p. 8.
80. DI SERIO, F. Proteomic approach to the diagnosis of acute coronary syndrome: Preliminary results. *Clinica Chimica Acta*. 2005, 357, p. 226-235.
81. MAUGERI, N. Early and transient release of leukocyte Pentraxin 3 during acute myocardial infarction. *J Immunol*. 2011, 187, p. 970-979.
82. BRUGGER-ANDERSEN, T. The long pentraxin 3 (PTX3): a novel prognostic inflammatory marker for mortality in acute chest pain. *Thromb Haemost*. 2009, 102, p. 555-563.
83. KNOFLACH, M. Pentraxin-3 as a marker of advanced atherosclerosis results from the Bruneck, ARMY and AFRY studies. *PLoS One*. 2012, 7(2), e31474.
84. NEBULONI, M. PTX3 expression in the heart tissues of patients with myocardial infarction and infectious myocarditis. *Cardiovasc Pathol*. 2011, p. 27-35.
85. LATINI, R. Prognostic significance of the long Pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004, 110, p. 2349-2354.
86. PERI, G. PTX3, A prototypical long Pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation*. 2000, 102, p. 636-641.
87. INOUE, K. Establishment of a high sensitivity plasma assay for human Pentraxin3 as a marker for unstable angina pectoris. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007, 27, p. 161-167.
88. KOTOOKA, N. Pentraxin3 is a novel marker for stent-induced inflammation and neointimal thickening. *Atherosclerosis*. 2008, 197(1), p. 368-374.
89. FISCHER, P. Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *BJP*. 2008, 153, p. 414-427.
90. HILFIKER-KLEINER, D. Continuous glykoprotein 130-Mediated signal transducer and activator of transcription-3 Activation promotes inflammation, left ventricular rupture, and adverse outcome in subacute myocardial infarction. *Circulation*. 2010, 122, p. 145-155.

91. LUCHTEFELD, M. Signal transducer of inflammation GP130 modulates atherosclerosis in mice and man. *JEM*. 2007, 204 (8), p. 1935-1944.
92. ICHIKI, T. Plasma levels of soluble glycoprotein 130 in acute myocardial infarction. *J Cardiol*. 2007, p. 101-109.
93. JUGDUTT, BI. Preventing adverse remodeling and rupture during healing after myocardial infarction in mice and humans. *Circulation*. 2010, 122, p. 103-105.
94. PARRISH, DC. Absence of GP130 in dopamine  $\beta$ -hydroxylase-expressing neurons leads to autonomic imbalance and increased reperfusion arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009, 297, p. 960-967.
95. MMORENO, JA. In vitro and in vivo evidence for the role of elastase shedding of CD163 in human atherothrombosis. *European Heart Journal*. 2012, 33, p. 252-263.
96. MOLLER, HJ. Serum soluble CD163 predicts risk of type 2 diabetes in the general population. *Clinical Chemistry*. 2011, 57 (2), p. 291-297.
97. ARISTOTELI, LP. The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2006, 184(2), p. 342-347.
98. SANAK, M. Functional promoter polymorphism of cyclooxygenase-2 modulates the inflammatory response in stable coronary heart disease. *Polskie archiwum medycyny wewnetrznej*. 2010, 120(3), p. 82-87.
99. JEREMIAS, I. Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia. *Circulation*. 2000, 102, p. 915-920.
100. SHIMIZU, M. Increased plasma levels of the soluble form of Fas ligand in patients with acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol*. 2002, 39, p. 585-590.
101. LINKERMANN, A. Slowly getting a clue on CD95 ligand biology. *Biochem Pharmacol*. 2003, 66(8), p. 1417-26.
102. MIELCZAREK-PALACZ, A. Concentration of soluble Fas receptor (sFas) in serum of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Wiad Lek*. 2009, 62(4), p. 219-225.

103. LEE, P. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003, 284, p. 456-463.
104. BOSSOWSKA, A. Analysis of apoptotic markers Fas/FasL (CD95/CD95L) expression on the lymphocytes in patients with acute coronary syndrome. *Kardiol Pol*. 2007, 65, p. 883-889.