

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové



Vybrané imunitní parametry v průběhu akutního infarktu myokardu

Lucie Horáková

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program Vnitřní nemoci

Hradec Králové

2016

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Vnitřní nemoci na I. Interní kardiologické klinice, Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Lucie Horáková

I. Interní kardiologická klinika

LF UK a FN Hradec Králové

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

I. Interní kardiologická klinika

LF UK a FN Hradec Králové

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby disertačních prací DSP Vnitřní nemoci dne v od hodin.

S disertací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

.....

Prof. MUDr. Jan Bureš, CSc.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu Vnitřní nemoci. Garant studijního programu.

Obsah

1. Souhrn	4
2. Summary.....	4
3. Cíle disertační práce.....	5
4. Stanovení parametrů humorální imunity.....	6
4.1 <i>Metodika</i>	6
4.2 <i>Výsledky parametrů humorální imunity</i>	7
4.2.1 <i>Analýza změn hladin sledovaných parametrů v průběhu 96 hodin akutního STEMI</i>	7
4.2.2 <i>Porovnání hladin parametrů humorální imunity s markerem strukturálního poškození (hsTnT)</i>	11
4.2.3 <i>Posouzení vztahu parametrů humorální imunity k rozsahu poškození myokardu LK vyjádřeným hodnotou ejekční frakce levé komory</i>	11
4.3 <i>Diskuse</i>	14
5. Využití nových biočipových technologií ke stanovení vybraných parametrů	15
5.1 <i>Metodika</i>	15
5.2 <i>Výsledky použité metody proteinových biočipů</i>	17
5.2.1 <i>Analýza změn hladin sledovaných parametrů v průběhu 96 hodin akutního STEMI</i>	17
5.2.2 <i>Porovnání hladin těchto parametrů s markerem strukturálního poškození myokardu (hsTnT).....</i>	18
5.2.3 <i>Posouzení vztahu sledovaných parametrů k rozsahu poškození myokardu vyjádřeným hodnotou ejekční frakce LK...21</i>	
5.3 <i>Diskuse.....</i>	24
6. Závěr - Klinický význam studie pro praxi	27
7. Použitá literatura.....	28
8. Přehled publikační činnosti	30

1. Souhrn

Akutní infarkt myokardu patří i v současnosti mezi nejzávažnější onemocnění v kardiologii. Stále otevřenou otázkou ale zůstává samotná patogeneze tzv. ischemicko-reperfučního poškození myokardu. Ukazuje se, že je proces ischemie a reperfúze komplexní, zahrnuje řadu patogenetických procesů a aktivuje řadu systémů, mezi kterými má významné místo aktivace imunitního systému. V této studii jsme vybrali některé markery, u kterých sledujeme jejich dynamiku v průběhu ischemie (tj. před koronární intervencí) a reperfúze, porováváme je se standardními markery nekrózy a hledáme jejich možný vztah k systolické dysfunkci levé komory srdeční.

Cílem této disertační práce je přispět k pochopení některých procesů ischemie a reperfúze v průběhu akutního infarktu myokardu s elevacemi ST segmentů. Dalším přínosem je poukázat i na možnosti využití nových technologií ke stanovení kardiálních markerů.

2. Summary

Acute myocardial infarction belongs currently to the most important diseases in the cardiology and the pathogenesis of the ischemic-reperfusion injury still remains an open question. The process of ischemia and reperfusion is complex, it involves a number of pathogenetic processes and activates number of systems among which the activation of immune system has the important place. In this study we have chosen some of the markers and followed their dynamics during the ischemia and reperfusion. We compared them with the standard markers of necrosis and we analysed possible relationship between these markers and the systolic dysfunction of the left ventricle.

The aim of this study is to contribute to understanding of ischemia and reperfusion during acute myocardial infarction with the ST segment elevation. Moreover, further benefit of this study is pointing out the possibilities of new technologies in the determination of cardiac markers.

3. Cíle disertační práce

Hlavním cílem naší práce je posouzení změn hladin vybraných imunitních parametrů, které se podílejí na procesu ischémie 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 (Tnl, 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 jednorocní sledování mortality.

4. Stanovení parametrů humorální imunity

4.1 Metodika

Soubor pacientů: Parametry humorální imunity byly stanoveny u pacientů s akutním infarktem myokardu s elevacemi ST segmentů, který byl 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 byl diagnostikován stav, který by mohl ovlivnit hladiny sledovaných parametrů, a dále nemocní, kteří byli mladší 18 let a kteří nepodepsali souhlas se studií.

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). Kouření bylo přítomno u 79,3% pacientů, pozitivní rodinná anamnéza (51,7%), obezita (27,5%), diabetes mellitus (24,1%), dyslipidémie (68,8%) a arteriální hypertenze (44,8%). 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.

Stanovení jednotlivých parametrů: Pro potřeby studie byla odebírána periferní žilní krev a 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 (stanovení CK, CKMBmass a hsTnT). Stanovení ostatních parametrů bylo prováděno metodou ELISA: PTX3 (detekční limit stanovený výrobcem 0,007 - 0,116 μ g/l, mean 0,025 μ g/l, Quantikine, R&D Systems, USA), sCD163 (detekční limit stanovený výrobcem 0,613 μ g/l, Quantikine, R&D Systems, USA), sGP130 (detekční limit stanovený výrobcem < 0,05 μ g/l, mean 306 μ g/l, Quantikine, R&D Systems, USA), sCD95/Fas (detekční limit stanovený výrobcem < 20

pg/ml, mean 9406 pg/ml, Quantikine, R&D Systems, USA). Stejná vyšetření byla provedena i u skupiny zdravých dárců krve (odběr K).

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 \pm 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 analýzy. Za statisticky významné jsou považovány hodnoty $p < 0,05$.

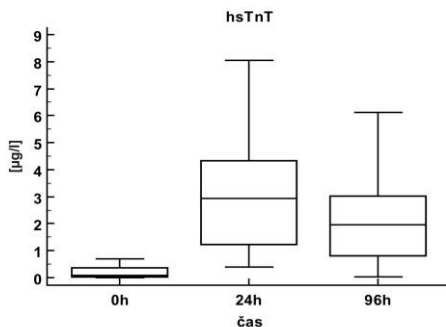
4.2 Výsledky parametrů humorální imunity

4.2.1 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. Jako referenční marker strukturálního poškození byl zvolen hsTnT, jehož hladiny byly také stanoveny.

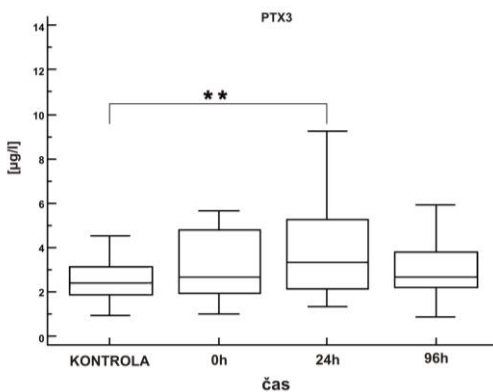
Vysoce senzitivní troponin T (hsTnT): Hladina hsTnT byla statisticky významně zvýšena v čase 24 hodin od přijetí a poté jen pozvolna klesala (čas 0h: 0,09 (0,034; 0,34), vs. kontroly 0,007 (0,005;0,009), $<0,001$, 24 hod.: 2,7 (1,19; 3,83), vs. kontroly 0,007 (0,005;0,009), $<0,001$, 96h: 1,93 (0,80;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



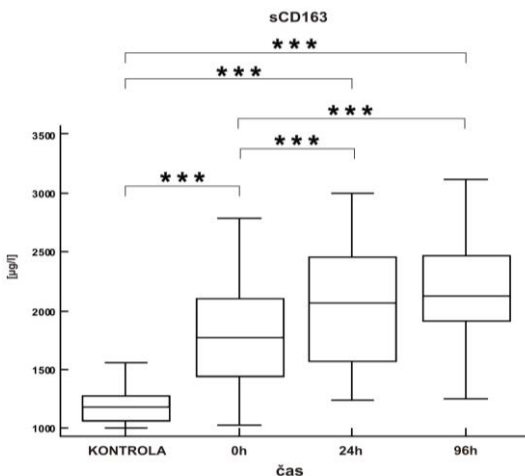
Pentraxin3 (PTX3): Hladina PTX3 byla statisticky zvýšena v čase 24 hodin od přijetí (čas 0h: 2,69 (2,04;4,98) vs. kontroly 2,4 (1,9;3,1), $p=0,181$, 24 hod.: 3,36 (2,28;5,25) vs. kontroly 2,4 (1,9;3,1), $p=0,011$, 96h: 2,69 (2,29;3,89) vs. kontroly 2,4 (1,9;3,1), $p=0,16$). Viz graf č. 2.

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



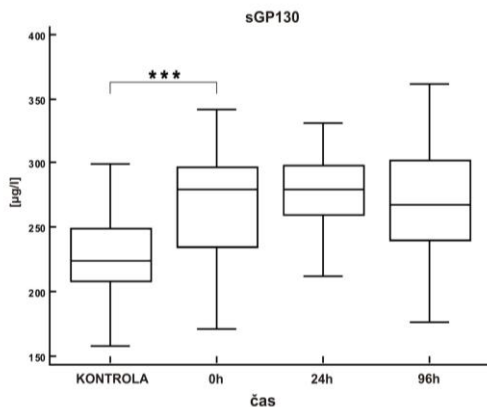
sCD163: Hladina sCD163 byla statisticky významně zvýšená již v čase přijetí a v dalších měřeních se dále zvyšovala (čas 0h: 1770,5 (1451; 2096,25) vs. 1178 (1078; 1265), $p < 0,001$, 24 hod.: 2063 (1589; 2453) vs. 1178 (1078; 1265), $p < 0,001$, 96h: 2116 (1924; 2458) vs. 1178 (1078; 1265), $p < 0,001$).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

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



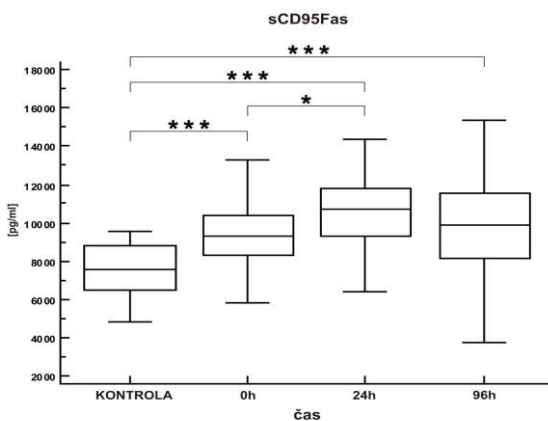
sGP130: Hladina sGP130 stoupá časně již při přijetí a její zvýšení přetrvávalo až do konce sledovaného období (čas 0h: 279,6 (235,75; 296,73) vs. 223,6 (208,9; 248,9), $p < 0,001$, 24 hod.: 279,4 (261,1; 296,4) vs. 223,6 (208,9; 248,9), $p < 0,001$, 96h: 267,6 (240,9; 301,7) vs. 223,6 (208,9; 248,9), $p < 0,001$). 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 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



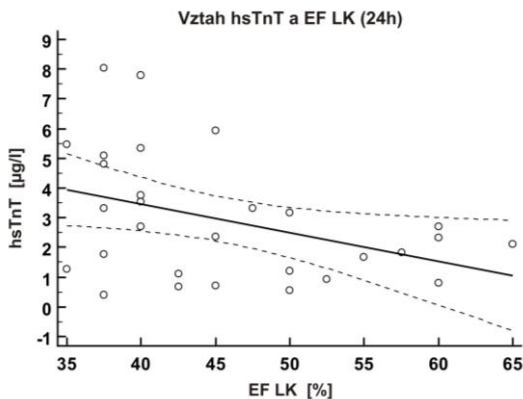
4.2.2 Porovnání hladin parametrů humorální imunity s markerem strukturálního poškození (hsTnT)

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 vysoce senzitivní metodou v jednotlivých časových intervalech (čas 0, 24 a 96 hodin od přijetí). Vztah hladiny hsTnT ke stanovovaným parametrům humorální imunity byl metodou regresní analýzy statisticky nevýznamný ve všech námi sledovaných intervalech.

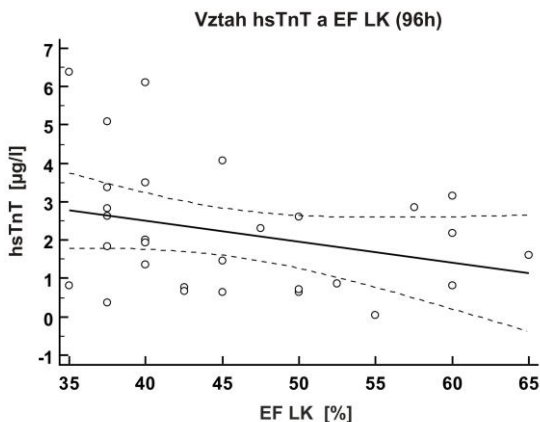
4.2.3 Posouzení vztahu parametrů humorální imunity k rozsahu poškození myokardu LK vyjádřeným hodnotou ejekční frakce levé komory

Vztah hsTnT a ejekční frakce levé komory srdeční: 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. 6, 7).

Graf č. 6: Asociace hodnot hsTnT k systolické funkci LK (EF \leq 40%) při odběru za 24 hodin ($p=0,01$).



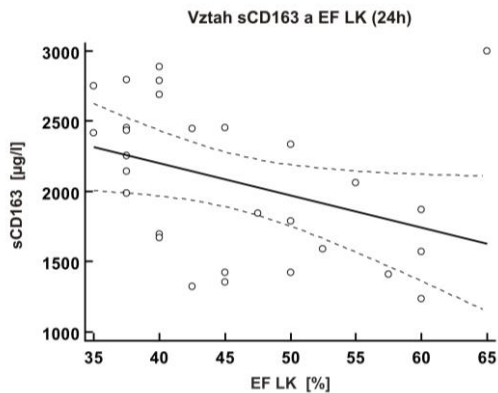
Graf č. 7: Asociace hodnot hsTnT k systolické funkci LK (EF≤40%) při odběru za 96 hodin ($p=0,02$).



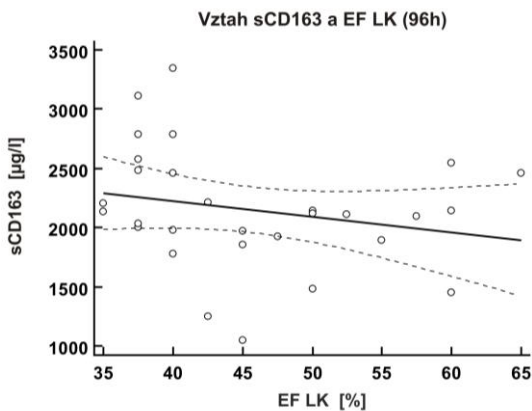
Vztah pentraxin3 a ejekční frakce levé komory srdeční: porovnání hladin PTX3 ve skupině s EF LK $\leq 40\%$ a nad 40% vyšla ve všech sledovaných periodách jako statisticky nevýznamná.

Vztah sCD163 a ejekční frakce levé komory srdeční: porovnání hladiny sCD163 ve skupině s EF LK $\leq 40\%$ a nad 40% ukazuje, že hladina sCD163 významně stoupá u pacientů s EF LK 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. 8, 9).

Graf č. 8: Asociace hodnot sCD163 k systolické funkci LK při odběru za 24 hodin ($p=0,003$).



Graf č. 9: Asociace hodnot sCD163 k systolické funkci LK při odběru za 96 hodin ($p=0,004$).



Vztah sGP130 a ejekční frakce levé komory srdeční: porovnání hladiny sGP130 ve skupině pacientů s EF LK $\leq 40\%$ a nad 40% byla v jednotlivých měřeních statisticky nevýznamná.

Vztah sCD95/Fas a ejekční frakce levé komory srdeční: stejně tak i porovnání hladiny sCD95/Fas ve skupině s EF LK $\leq 40\%$ a nad 40% byla v jednotlivých měřeních statisticky nevýznamná.

4.3 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 a zhodnocení jejich role ve stratifikaci rizika (ve vztahu k velikosti ložiska myokardiální nekrózy: 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. Molekula sCD163 je velmi těsně spjata se vznikem akutního infarktu myokardu, 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. 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 a maximálních hodnot bylo dosaženo při odběru za 24 hodin od přijetí. 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 ev. ukazatelem reinfarktu. V naší studii jsme nezjistili žádnou souvislost mezi dynamikou sCD95/Fas a hsTnT a ani ve vztahu k systolické dysfunkci. V případě PTX3 docházelo k pozvolnému vzestupu jeho koncentrací a při druhém odběru provedeném za 24 hodin od přijetí bylo dosaženo jeho maxima. Dynamika markeru PTX3 nevykazovala žádnou asociaci s hladinami hsTnT ani EF LK. Při hodnocení sGP130 dochází k již významnému

vzestupu koncentrací při prvním odběru ($p < 0,001$). Naše studie na základě vývoje koncentrací sGP130 neprokázala žádný těsný vztah mezi tímto sledovaným parametrem a hsTnT nebo EF LK. Naše práce podle vývoje dynamiky hodnot sGP130 poukázala na jeho vztah k AIM, kdy dochází k jeho detekci v plazmě velmi časně od vzniku ischémie.

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

5. Využití nových biočipových technologií ke stanovení vybraných parametrů

5.1 Metodika

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. Tato kritéria splňovalo celkem 44 pacientů (68,2% mužů, 31,8% žen, průměrného věku 66,1 let \pm směrodatná odchylka). Kouření bylo přítomno u 50% pacientů, arteriální hypertenze (59,1%), nadváha (43,2%), rodinná zátěž (40%), dyslipidémie (59,1%) a diabetes mellitus (34,1%). 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.

Stanovení jednotlivých parametrů: Pro potřeby studie byla odebírána periferní žilní krev podle schématu: první odběr v době přijetí, druhý odběr 24 hodin od přijetí a třetí odběr 96 hodin od přijetí. 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). 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 pro hsTnT a u zdravé populace (odběr K).

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 regresní analýzy. Za statisticky významné jsou považovány hodnoty $p < 0,05$.

5.2 Výsledky použité metody proteinových biočipů

5.2.1 Analýza změn hladin sledovaných parametrů v průběhu 96 hodin akutního STEMI

Koncentrace troponinu I (cTnI): Hladina cTnI 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), $p < 0,001$).

Koncentrace MB izoformy kreatinkinázy (CK MB): Hladina CKMB 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), $p < 0,001$).

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), $p = 0,003$).

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), $p < 0,001$).

Srdeční mastné kyseliny vázící 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), $p < 0,001$).

Poměr myoglobin/karboanhydráza III (MYO/CAIII): Hladina poměru MYO/CAIII byla statisticky významně zvýšena již v čase přijetí a v dalších měřeních strmě klesala (čas 0h: 4,55 (1,95; 10,74) vs. 0,69

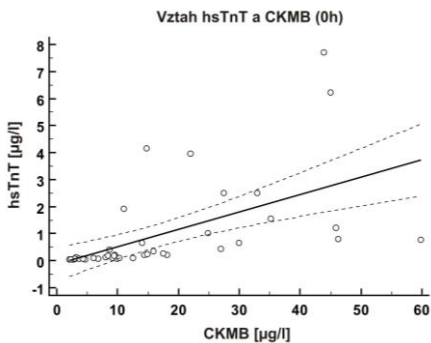
(0,52; 0,92), $p < 0,001$, 24 hod.: 1,59 (0,85; 2,27) vs. 0,69 (0,52; 0,92), $p = 0,026$, 96h: 1,62 (0,87; 2,22) vs. 0,69 (0,52; 0,92), $p < 0,001$).

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

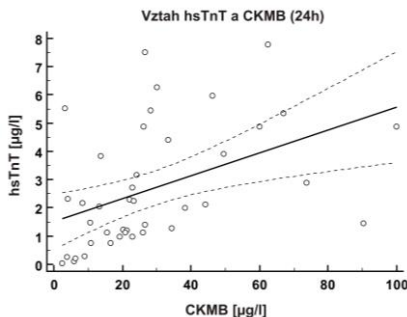
Vztah hsTnT a cTnI: Metodou regresní analýzy byla zjištěna velmi těsná asociace mezi cTnI a hsTnT při všech měřeních.

Vztah hsTnT a CKMB: Byl prokázán velmi těsný vztah CK MB k dynamice hsTnT při měření v čase 0 a za 24 hodin (graf č. 10, 11).

Graf č. 10: Vztah mezi hladinou CK MB a hsTnT v čase 0 ($p < 0,001$).

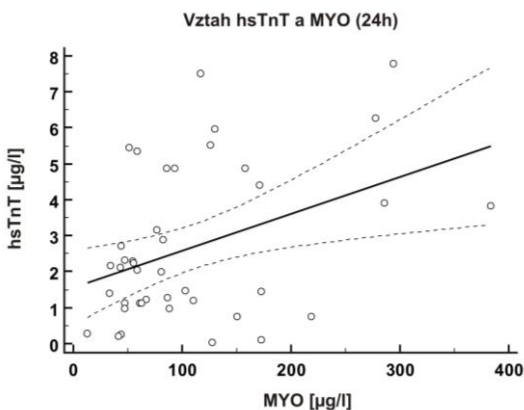


Graf č. 11: Vztah mezi hladinou CK MB a hsTnT v čase 24 hodin ($p = 0,003$).



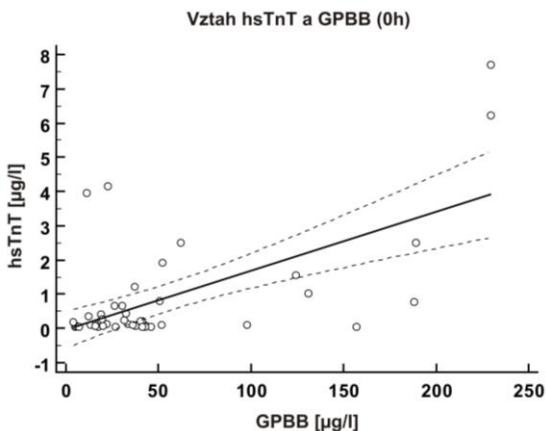
Vztah hsTnT a MYO: Statisticky významný vztah mezi MYO a hsTnT byl prokázán pouze při odběru za 24 hodin (graf č. 12).

Graf č. 12: Vztah mezi hladinou MYO a hsTnT v čase 24 hodin ($p=0,001$).



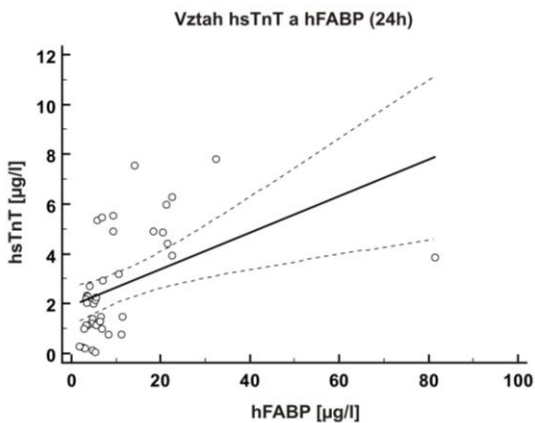
Vztah hsTnT a GPBB: Ukázalo se, že statisticky významný vztah mezi GPBB a hsTnT existuje pouze při odběru v čase 0 (graf č. 13).

Graf č. 13: Vztah mezi hladinou GPBB a hsTnT v čase 0 ($p<0,0001$).

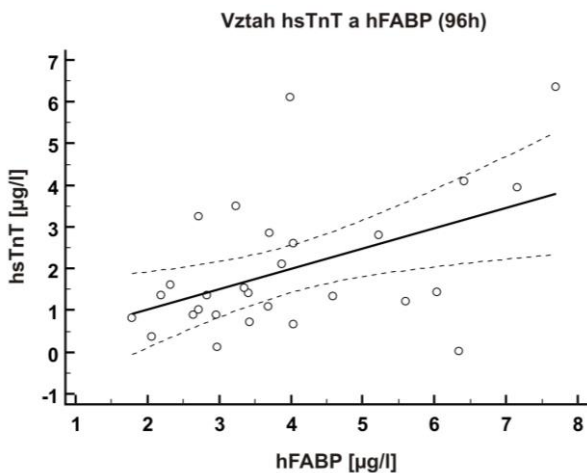


Vztah hsTnT a hFABP: V případě hFABP byl prokázán těsný vztah k hsTnT při odběru za 24 hodin a 96 hodin (graf č. 14, 15).

Graf č. 14: Vztah mezi hladinou hFABP a hsTnT za 24 hodin ($p=0,0023$).



Graf č. 15: Vztah mezi hladinou hFABP a hsTnT za 96 hodin ($p=0,001$).

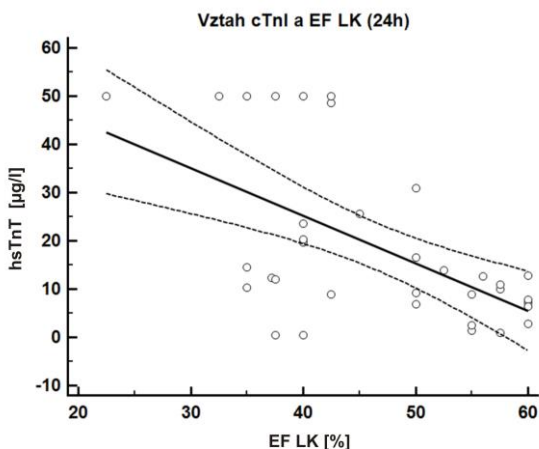


Vztah hsTnT a poměru MYO/CAIII: Pomocí metody regresní analýzy nebyl zjištěn v žádném z měření statisticky významný vztah mezi MYO/CAIII a hsTnT.

5.2.3 Posouzení vztahu sledovaných parametrů k rozsahu poškození myokardu vyjádřeným hodnotou ejekční frakce levé komory

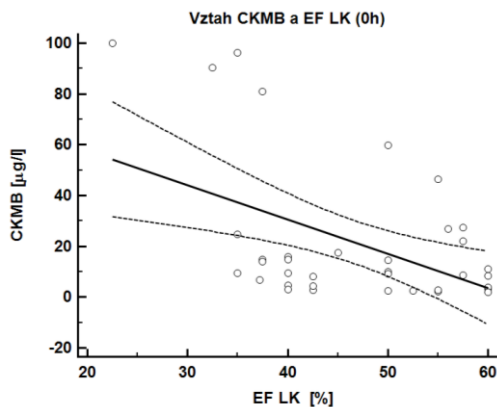
Vztah mezi cTnI a hodnotou ejekční frakce LK: Metodou regresní analýzy byla zjištěna velmi těsná asociace mezi cTnI a systolickou funkcí LK pouze při odběru za 24 hodin ($r = -0,47$, $p < 0,001$), v pozdějším měření nebyla již tato asociace potvrzena (graf č. 16).

Graf č. 16: Vztah mezi cTnI a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 24 hodin ($r = -0,47$, $p < 0,001$).

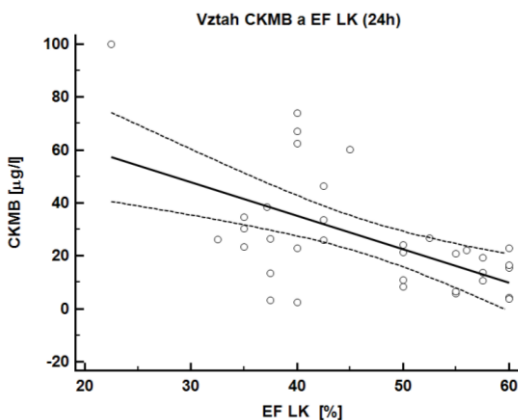


Vztah mezi CK MB a hodnotou ejekční frakce LK: CK MB vykazuje nejtěsnější vztah k systolické dysfunkci LK při přijetí v čase 0 ($r = 0,47$; $p = 0,003$) a za 24 hodin ($r = 0,50$; $p = 0,002$) (graf č. 17, 18).

Graf č. 17: Vztah mezi CK MB a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 0 hodin ($r = 0,47$; $p = 0,003$)

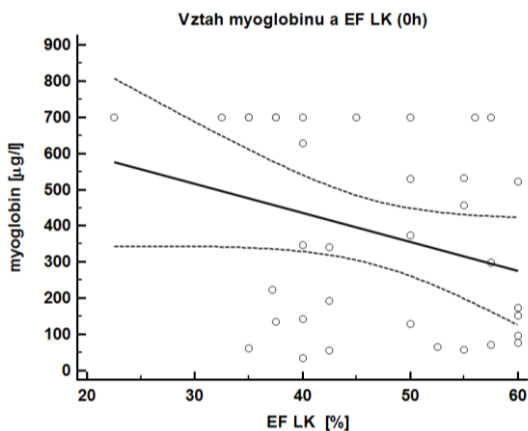


Graf č. 18: Vztah mezi CK MB a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 24 hodin ($r = 0,50$; $p = 0,002$)



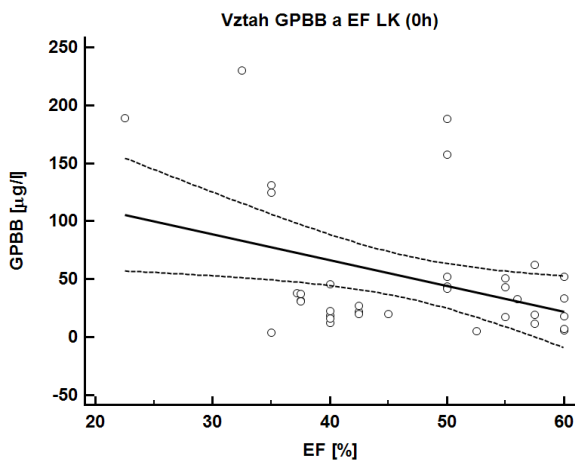
Vztah mezi MYO a hodnotou ejekční frakce LK: V souboru pacientů byla nalezena nejtěsnější asociace mezi EF LK a vstupní hodnotou myoglobinu ($r = 0,31$; $p = 0,063$), následující odběry nevykázaly významnější asociaci mezi těmito parametry (graf č. 19).

Graf č. 19: Vztah mezi MYO a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 0 hodin ($r = 0,31$; $p = 0,063$).



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 ($r = 0,38$; $p = 0,020$, graf č. 20). V době za 24 a 96 hodin již tento parametr nevykazoval významnější asociaci s hodnotou EF levé komory.

Graf č. 20: Vztah mezi GPBB a hodnotou ejekční frakce levé komory v čase 0 hodin ($r = 0,38$; $p = 0,020$).



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. Jednou z nevýhod této metody je výrobcem přesně definovaný panel markerů, který lze na biočipu stanovit. Nemůžeme si tedy sami určit a aktuálně podle situace nakombinovat markery, které budeme chtít stanovovat. Dalším handicapem je vedle velmi nízkého rozšíření této metody 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.

Jedním z vyšetřovaných parametrů je TnI, který patří mezi standardní markery nekrózy a který i touto metodou vykazoval v průběhu měření velmi výraznou dynamiku 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 ($p < 0,001$). Tímto byla prokázána prakticky srovnatelná dynamika těchto dvou markerů nekrózy v průběhu AIM. Naší studií jsme také prokázali, že vyšší koncentrace TnI významným způsobem korelují 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. 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 ischemie. 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 ($p < 0,01$).

hFABP ovlivňuje β -oxidaci mitochondrií obsažených v cytosolu myocytů a v případě poškození kardiomyocytů dochází k jeho vyplavení. Již při prvním měření byl zaznamenán významný vzestup koncentrací hFABP a zároveň bylo dosaženo i maximálních hodnot. 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. $p < 0,05$) a zároveň jsme potvrdili asociaci tohoto markeru k systolické dysfunkci LK ($EF \leq 40\%$).

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. 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 ischémie. 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. Pokud jsme porovnávali koncentrace GPBB získané v jednotlivých odběrech, pak všechna vzájemná porovnání, i porovnání s kontrolní skupinou, byla statisticky významná. 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 časně 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 (Tnl, 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).

6. Závěr - Klinický význam studie pro praxi

1) Prokázali jsme, že během ischémie a reperfuze v průběhu akutního infarktu myokardu (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 nekrózy a k systolické dysfunkci levé komory srdeční.

3) V případě 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.

7. Použitá literatura

THYGESEN, K. Third universal definition of myocardial infarction. *European Heart Journal*. 2012, 33, p. 2551-2567.

VOJÁČEK, J. Třetí univerzální definice infarktu myokardu (Third universal definition of myocardial infarction). *Co ret Vasa*. 2013, 55, s. 228-235.

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.

KARRAS, DJ. Serum markers in the emergency department diagnosis of acute myocardial infarction. *Emerg Med Clin North Am*. 2001, 19(2), p. 321-337.

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.

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.

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.

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.

LIPPI, G. Glycogen phosphorylase isoenzyme BB in the diagnosis of acute myocardial infarction: a metaanalysis. *Biochem Med*. 2013, 23(1), p. 78-82.

HAUSENLOY, DJ. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013, 123 (1), p. 92-100.

ZUIDEMA, MY. Ischemia/reperfusion injury: The role of immune cells. *World J Cardiol.* 2010, 2(10), p. 325-332.

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.

McCANN, CJ. Novel biomarkers in early diagnosis of acute myocardial infarction compared with cardiac troponin T. *European Heart Journal.* 2008, 29, p. 2843-2850.

KNOFLACH, M. Pentraxin-3 as a marker of advanced atherosclerosis results from the Bruneck, ARMY and AFRY studies. *PLoS One.* 2012, 7(2), e31474.

LATINI, R. Prognostic significance of the long Pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004, 110, p. 2349-2354.

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.

ICHIKI, T. Plasma levels of soluble glycoprotein 130 in acute myocardial infarction. *J Cardiol.* 2007, p. 101-109.

ARISTOTELI, LP. The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2006, 184(2), p. 342-347.

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.

JEREMIAS, I. Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia. *Circulation.* 2000, 102, p. 915-920.

Kompletní seznam použité literatury je obsažen ve vlastní disertační práci.

8. Přehled publikační činnosti

Publikace v časopisu s impakt faktorem: Pudil R, Pařízek P, Tichý M, Haman L, Horáková L, Ulrychová M, Vojáček J, Palička V: Use of the biochip microarray system in detection of myocardial injury caused by radiofrequency catheter ablation. *Clin Chem Lab Med.* 2008, 46(12), 1726-8.

Původní práce: 1/ Horáková L, Pudil R, Andrýs C, Vojáček J: Interleukin 18 a pentraxin 3 jako méně známé markery zánětu cévní stěny u pacientů s akutním infarktem myokardu. *Interv Akut kardiol.* 2015, 14(1), 10–13.

2/ Horáková L, Pudil R, Vašatová M, Tichý M: Využití proteinových biočipů v diagnostice ischemického poškození myokardu. *Klin Biochem Metab.* 2014, 22(43), No. 4, p. 204-208.

3/ Horáková L, Pudil R, Tichý M, Ulrychová M, Vojáček J: Kardiospecifické markery v průběhu akutního infarktu myokardu – zkušenosti s využitím proteinových biočipů. *Interv Akut Kardiol.* 2010, 9(4), 175-179.

4/ Pudil R, Tichý M, Ulrychová M, Horáková L, Vojáček J: Biomarkers of myocardial ischemia and necrosis in 2008. *Vnitř Lek.* 2008, Oct. 54(10), 965-70.

5/ Vašatová M, Tichý M, Horáček JM, Pudil R, Horáková L, Palička V: Multi-marker approach in the diagnostics of cardiac diseases by protein biochip technology. *Cas Lek Cesk.* 2009, 148(12), 591-6.

Kazuistiky, poster: 1/ Horáková L, Pudil R, Raupach J, Vojáček J: Thrombolytic treatment of thrombosis on the aortic valvular prosthesis complicated by brain embolism. *Acta medica (Hradec Králové).* 2008, 51(1), 59-62.

2/ Horáková L, Pudil R, Hrnčič Z, Vižďa J: Cardiomyopathy as one of the less frequent manifestations of Takayasu's arteritis. *Acta medica (Hradec Králové).* 2011, 54(4), 167-9.