

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Nové markery kardiovaskulárního rizika v diagnostice a monitoraci léčby

MUDr. Eva Tůmová

2015

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Preventivní medicína

Předseda oborové rady: doc. MUDr. Alexander Čelko, CSc.

Školící pracoviště: 3. interní klinika 1. LF UK a VFN

Školitel: doc. MUDr. Michal Vrablík, PhD.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Hypotézy a cíle práce.....	8
3. Efekt redukce hmotnosti obézních dětí na parametry kardiovaskulárního rizika.....	9
a. Soubor.....	9
b. Metodika.....	10
c. Výsledky.....	10
d. Závěr a diskuse.....	10
4. Efekt redukce hmotnosti obézních dospělých s metabolickým syndromem na parametry oxidačního stresu.....	12
a. Soubor.....	13
b. Metodika.....	14
c. Výsledky – vstupní charakteristika.....	14
a. Výsledky - efekt hmotnostní redukce.....	15
d. Závěr.....	15
e. Diskuse.....	16
5. Závěr.....	17
6. Použitá literatura.....	18

Abstrakt

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou dlouhodobě jednou z vedoucích příčin morbidity a mortality v rozvinutých zemích s komplexním vlivem jak na zdraví jednotlivce, tak i významným socioekonomickým dopadem. Snahou lékařů z mnoha oborů je v posledních desetiletích najít co možná nejlépe vypovídající rizikový faktor (RF) (či kombinaci několika RF), který by napomohl stanovení individuálního rizika rozvoje KVO. Tato stratifikace rizika slouží k identifikaci rizikových pacientů a intenzifikaci léčby, případně nastolení včasných preventivních opatření. V současné době je známo několik rutinně vyšetřovaných RF aterosklerózy, potažmo KVO, díky nimž je možné individualizovat zdravotní péči. Nicméně stále dochází k rozvoji KVO a výskytu náhlých příhod i u jedinců, kteří nesplňovali kritéria pro vysoce rizikové pacienty. Proto stále přetrvává snaha o nalezení co možná nejvíce specifického RF, v posledních letech je vkládána velká naděje v tzv. zánětlivé parametry, které hrají zásadní roli v rozvoji aterosklerózy.

V naší práci jsme se věnovali vyšetřování hladin zánětlivých parametrů u specifických skupin pacientů (obézní děti a pacienti s metabolickým syndromem) a sledovali efekt poklesu hmotnosti při úpravě životního stylu. Hlavním pilířem našeho zájmu byl enzym fosfolypáza A₂ asociovaná s lipoproteiny (Lp-PLA₂), oxidované LDL částice (ox-LDL) a myeloperoxidáza (MPO).

Výsledky obou dvou provedených studií prokázaly jednak jednoznačně zvýšený prozánětlivý stav organismu u obézních jedinců a pacientů splňujících kritéria metabolického syndromu. Tato skutečnost zcela jistě souvisí s již dokumentovaným vyšším rizikem rozvoje KVO u obézních, které ještě stoupá v případě metabolického syndromu. Dále jsme pozorovali pokles hodnot zánětlivých markerů po nastolení režimových opatření, v podobě redukční diety a pravidelné fyzické aktivity, následovaných redukcí hmotnosti. Vzhledem k opakovaně prokázané souvislosti elevace zánětlivých parametrů s výskytem KVO je možné usuzovat, že poklesem hmotnosti úpravou životního stylu dochází zároveň ke snížení individuálního rizika rozvoje KVO. Kromě jiných benefitů mají tedy vhodná režimová opatření zcela zásadní dopady na prozánětlivý stav organismu, čímž dochází k poklesu KV rizika a zlepšení prognózy pacientů.

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) have been one of the leading causes of morbidity and mortality in developed countries with an enormous influence on individual health and significant socioeconomic impact as well. The aim of most physicians in recent decades is to seek the best possible predicative risk factor (RF) (or combination of several RF) which could help to determine the individual risk of developing CVD. This risk stratification can be used to identify the high risk patients and treatment intensification or establishment of early preventive measures. Currently, several RF of atherosclerosis and CVD are commonly used to individualize health care. However, individuals with low levels of these RF suffer of CVD, therefore the effort to find as much as possible specific RF still persists. In recent years, the inflammatory markers, crucial in the atherosclerosis development, raise great expectation

In our studies, we focused on investigating the levels of inflammatory parameters in specific groups of patients (obese children and patients with metabolic syndrome) and observed the effect of weight loss following lifestyle changes. Our main concern was lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂), oxidized LDL particles (ox-LDL) and myeloperoxidase (MPO).

The results demonstrated significantly elevated proinflammatory state in the obese individuals, especially in patients with metabolic syndrome. This is certainly related to previously documented high risk of CVD development in obese people, which even raises in those who meet criteria of metabolic syndrome. We also observed decrease of inflammatory markers after lifestyle changes including diet and regular physical activity followed by weight loss. Due to repeatedly demonstrated connection of inflammatory markers elevation and CVD incidence we can conclude that weight loss following lifestyle modification reduces individual risk of developing CDV. Among other benefites, suitable regime measures are essential to improve the inflammatory state, thereby eliminating CVD risk and improving patients' prognosis.

1. Úvod

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou hlavní příčinou morbidity a mortality v rozvinutých zemích. Patofyziologickým podkladem KV příhod je ateroskleróza, komplexní proces modifikace cévní stěny, na němž se podílí řada faktorů. Známe tradiční rizikové faktory (RF) aterosklerózy, které přímo souvisejí s rozvojem KVO – mezi neovlivnitelné RF patří pohlaví, věk a genetická zátěž. Ovlivnitelných RF je velké množství, nejčastěji monitorované a intervenované reprezentuje na poli režimových opatření především nikotinismus, obezita a nedostatek fyzické aktivity. Hlavními ovlivnitelnými RF aterosklerózy zůstávají dyslipidémie, arteriální hypertenze a diabetes mellitus 2. typu.

Naše možnosti stanovení kardiovaskulárního rizika a cílení intervence k jeho snížení se v posledních letech významně zlepšily díky důslednému využívání standardních skórovacích systémů. Navíc můžeme využít zobrazovacích metod k detekci subklinické aterosklerózy, pátráme po známkách inzulínové rezistence a hodnotíme genetické faktory rizika prostřednictvím rodinné anamnézy.

Snahou lékařů působících v oblasti preventivní medicíny je co možná nejvíce eliminovat vliv RF na pacienta včasným rozpoznáním rizika a jeho intervencí. Přesto přibližně polovina koronárních a cerebrovaskulárních příhod proběhne u osob, které standardní skórovací systémy neidentifikují jako vysoce rizikové. Proto se výzkumné úsilí zaměřuje na nalezení dalších biomarkerů kardiovaskulárního rizika, které by zpřesnily odhad rizika u jednotlivce.

Obezita (zejména abdominální) a její metabolické důsledky představují jeden ze zásadních rizikových faktorů vzniku kardiovaskulárních onemocnění a stává se vedoucí příčinou morbidity a mortality ve vyspělých zemích, přičemž její prevalence stále narůstá (1) a postupně dosahuje až pandemických rozměrů (2,3). Existuje několik spojovacích článků mezi obezitou a aterosklerózou – narušení metabolismu lipidů, inzulínová rezistence, arteriální hypertenze a v neposlední řadě vystupňovaný chronický subklinický zánět (4). Hladiny zánětlivých markerů u obézních dospělých jsou prokazatelně vyšší než u jedinců s normální tělesnou hmotností (5). Jelikož chronický zánět hraje zásadní roli v patogenezi aterosklerózy, může být vyšší úroveň subklinického zánětu u obézních jedním z důvodů vyšší incidence KVO v této skupině populace (6).

Ateroskleróza je vnímána jako zánětlivý proces cévní stěny, jehož progresi se účastní nespočet molekul. Právě chronický zánět a jeho ukazatele jsou hlavním předmětem zájmu výzkumu v posledních letech. Vedle tradičních zánětlivých parametrů, jako je CRP, jsou stále více upřednostňovány specifitější markery z hlediska predikce rizika KVO.

Mezi slibné faktory umožňující zpřesnění odhadu rizika aterosklerotických komplikací patří fosfolipáza A₂ asociovaná s lipoproteiny (Lp-PLA₂). Jedná se o vysoce vaskulárně specifický parametr zánětu, jehož zvýšené hladiny jsou spojené s vyšším rizikem KV příhod nezávisle na tradičních rizikových faktorech a také nezávisle na CRP (7). Prokázána byla elevace Lp-PLA₂ u pacientů s KVO v závislosti na tíži stenózy koronárních tepen, která vypovídala o závažnosti nálezu signifikantně lépe než hs-CRP (8). Lp-PLA₂ je enzym, jehož tvorba je kontrolována zánětlivými mediátory jako je interferon- γ a bakteriální lipopolysacharidy (9). Vlastními producenty Lp-PLA₂ jsou buňky monocytomakrofágového systému, v plazmě cirkuluje ve vazbě na lipoproteiny, přičemž přibližně 80% je asociováno s lipoproteiny o nízké hustotě (LDL). Podle proběhlých studií má Lp-PLA₂ zvýšenou afinitu k malým denzním LDL částicím (10, 11).

Komplex Lp-PLA₂ a LDL částice vstupuje do subendoteliálního prostoru, kde zůstává zachycen proteoglykany extracelulární matrix (12). Zde dochází k oxidaci LDL částice činností volných radikálů a následné aktivaci fosfolipázy vázané na oxidované LDL částici, která katalyzuje hydrolýzu mastných kyselin. Touto enzymatickou činností jsou uvolňovány vysoce prozánětlivé a cytotoxické mastné kyseliny o krátkém řetězci a lysofosfatidylcholin, jež inhibují endoteliální produkci oxidu dusnatého, navozují expresi adhezivních molekul buňkami endotelu a následný vstup monocytů do stěny cévní (13,14). Aktivací monocytů vznikají makrofágy fagocytující oxidované LDL částice za vzniku pěnových buněk a nekrotického jádra aterosklerotické léze. Aktivované makrofágy rovněž zvyšují produkci Lp-PLA₂, čímž se propojuje kruh pokračujícího aterosklerotického poškození. Největší koncentraci Lp-PLA₂ můžeme najít v aterosklerotickém plátu náchylném k ruptuře, tedy v plátu nekrotickém a v tenké fibrózní čepičce aterosklerotické léze (15).

Dřívější studie zabývající se asociací hladiny Lp-PLA₂ s angiograficky dokumentovaným KVO byly provedeny na malém vzorku, proto přinesly rozporuplné výsledky (7, 16). Po provedení dalších studií byl získán jasný důkaz vztahu Lp-PLA₂ s rozsahem aterosklerózy (17-22). Provedené studie poukázaly i na souvislost mezi hladinou Lp-PLA₂ a rekurencí KV příhody u jedinců v sekundární prevenci, nezávisle na tradičních RF a ostatních zánětlivých

markerech. (16, 23, 24, 25). Podle metaanalýzy 32 studií provedené v roce 2010 existuje přímá úměra mezi stoupající aktivitou či hmotnostní koncentrací Lp-PLA₂ a výskytem KVO (26).

V procesu vzniku aterosklerotické léze působí nespočet faktorů, jejichž vzájemnou interakcí dochází k proliferaci plátu s expanzí nekrotické vrstvy a zvýšenou tendencí k ruptuře léze. V naší práci jsme se také věnovali monitoraci myeloperoxidázy (MPO) jakožto zánětlivého parametru u obézních jedinců s MS, který by mohl poukazovat na zvýšené KV riziko pacienta. MPO je enzym ze skupiny peroxidáz katalyzující přeměnu peroxidu vodíku na kyselinu chlornou, tedy vznik kyslíkových radikálů (ROS), které jsou nezbytné v obranných reakcích organismu (27). MPO se aktivuje při tzv. respiračním vzplanutí leukocytů, ale je také produkovaná leukocyty přítomnými v aterosklerotickém plátu, kde její činností vznikající ROS, které oxidativně modifikují LDL částice (28). MPO komplexně ovlivňuje metabolismus lipoproteinů a funkce endotelu (29-32), což vedlo k teorii uplatnění MPO v patogenezi aterosklerózy a provedené studie skutečně prokázaly asociaci hladin MPO s rizikem rozvoje KVO (33).

Dalším z markerů zánětu, který lze detekovat z krevního oběhu a na základě jeho hladin usuzovat na zánětlivý stav organismu, jsou částice LDL oxidované činností volných radikálů (ox-LDL). V cévní stěně dochází k fagocytóze ox-LDL makrofágy, vzniku pěnových buněk a následně formování aterosklerotické léze. Plazmatické hladiny ox-LDL jsou signifikantně vyšší u obézních jedinců s MS (34, 35), byla také zjištěna přímá úměra mezi hladinami ox-LDL a tíží aterosklerotického postižení (36).

2. Hypotézy a cíle práce

V naší práci jsme studovali hladiny zánětlivých parametrů ve specifických skupinách pacientů. V první studii jsme se věnovali obézním dětem, což je velice riziková skupina z hlediska budoucího rozvoje KVO – v případě setrvání u zavedeného životního stylu, bohužel převzatého z rodiny, dochází velice často ke kumulaci RF aterosklerózy a nevyhnutelné manifestaci KVO dle individuálních charakteristik v různém období života. Ve druhé práci jsme se věnovali pacientům s MS a srovnání jejich charakteristik s jedinci obézními a zdravými, přičemž jsme zjišťovali rozdíly v prozánětlivém stavu organismu. V obou studiích

jsme především zkoumali vliv redukce hmotnosti po úpravě režimových opatření na parametry zánětu, převážně Lp-PLA₂, ox-LDL a MPO.

Klíčovým mechanismem expanze nekrotické vrstvy aterosklerotického plátu se zdá být vystupňovaná buněčná apoptóza v cévní stěně zapříčiněná prozánětlivými a cytotoxickými působky. Lze tedy předpokládat, že pokles hladin zánětlivých parametrů, případně inhibice aktivity enzymů působících v tomto procesu, by měly mít zásadní vliv na stabilizaci aterosklerotických lézí náchylných k ruptuře a tedy pozitivní efekt na riziko manifestace KVO. Ovlivnění RF aterosklerózy a potažmo snížení rizika rozvoje KVO je hlavním zájmem preventivní kardiologie a jedním z nejdůležitějších pilířů současné medicíny. Naši práci jsme se pokusili poukázat na význam zánětlivých parametrů v diagnostice KVO a především na zcela zásadní efekt režimových opatření na hladiny zánětlivých markerů.

V klinické praxi by zánětlivé parametry mohly teoreticky posloužit ke stratifikaci rizika KVO a umožnit individualizaci péče s intenzivnější terapií u rizikovějších skupin pacientů.

3. Efekt redukce hmotnosti obézních dětí na parametry kardiovaskulárního rizika

V posledních letech pozorujeme zvýšení prevalence obezity a nadváhy v mladších věkových kategoriích, čímž dochází k nárůstu kardiovaskulárního rizika mezi mladšími jedinci. Vliv obezity či poklesu hmotnosti v dětství na zánětlivý proces zkoumán nebyl, věnovali jsme proto pozornost metabolickým změnám u dětí s nadváhou/obezitou po rychlé redukci hmotnosti.

a. Soubor

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

b. Metodika

Děti byly vyšetřeny první a poslední den pobytu v lázních. Venózní krev byla odebrána po dvanáctihodinovém lačnění, stanoven byl celkový cholesterol, triglyceridy, LDLc, HDL-c, apolipoproteiny A-I (apo-A) a B (apo-B), glykemie. Hladiny byly stanoveny enzymatickou metodou za použití automatického analyzátoru (Hitachi, Japonsko). LDL-c byl spočítán pomocí Friedwaldovy formule ($LDL-c = TC - (HDL-c + TG/2,2)$). V naší studii jsme stanovovali hmotnostní koncentraci Lp-PLA₂ enzymovou imunoanalýzou s použitím monoklonální protilátky. Tělesná hmotnost byla změřena kalibrovanou elektronickou váhou s přesností 100 g, výška a obvod pasu a boků s přesností 0,5 cm, ze zjištěných hodnot byl spočítán BMI. Systolický a diastolický krevní tlak byl měřen automatickým sfigmomanometrem (BP-203 NA) po 10 minutách vsedě, zaznamenána byla hodnota průměru ze tří měření na pravé paži. Pro statistickou analýzu jsme použili Wilcoxonův test a Spearmanovu korelaci, pro adjustaci ANCOVA.

c. Výsledky

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

d. Závěr a diskuse

Redukce hmotnosti, BMI a tělesného tuku doprovázená zmenšením kožních řas a tělesných obvodů jsou beze sporu očekávané výsledky redukčního pobytu. Stejně tak změny lipidogramu jsou dané úpravou diety a pravidelnou fyzickou aktivitou, přičemž v tak krátkém časovém úseku nelze očekávat vzestup hladiny HDL cholesterolu, což je ve shodě s dřívějšími poznatky (37). Nicméně lze očekávat postupný vzestup HDL cholesterolu, pokud by nastolená režimová opatření pokračovala. Při vstupní prohlídce jsme u obézních dětí

nezaznamenali vysoké hladiny sérových lipidů, ve většině případů byly pouze mírně zvýšené. Na druhou stranu vzhledem k vyšší tělesné hmotnosti a vyšší hladině apo-B se s velkou pravděpodobností jednalo o aterogenní lipoproteinové částice (38).

Pokud jde o samotnou Lp-PLA₂, hmotnostní koncentrace při vstupní prohlídce byla podstatně vyšší ve srovnání s dostupnými daty ze studií zdravých dospělých (20). Teoreticky je možné vysvětlit, že obezita v dětství stimuluje zánětlivou reakci organismu ještě intenzivněji než v dospělosti v důsledku vystupňovaných reakcí imunitního systému. Naše výsledky jsou ve shodě se studií z roku 2008, kde byly hmotnostní koncentrace fosfolipázy u obézních dětí taktéž vyšší než v běžné populaci (39), přestože námi měřené hodnoty byly ještě vyšší. Nicméně stejně jako v předchozí studii jsme i my sledovali jasnou asociaci mezi poklesem koncentrace Lp-PLA₂ a BMI, což je naprosto zásadní zjištění, které potvrzuje spojitost mezi obezitou a zvýšeným množstvím tělesného tuku, prozánětlivým stavem organismu a rizikem aterosklerózy mnohem dříve, než jsou jakékoli strukturální změny cévní stěny detekovatelné.

Současně jsme prokázali signifikantní korelaci koncentrace Lp-PLA₂ s plazmatickou hladinou TG a překvapivě pouze nesignifikantní trend asociace mezi Lp-PLA₂ a apo-B, která byla již dokumentována (40), což bude pravděpodobně dáno malým souborem v naší studii. Korelaci s plazmatickými TG lze vysvětlit faktem, že elevace TG je doprovázena vyšším podílem malých denzních LDL částic, které mají k Lp-PLA₂ prokazatelně zvýšenou afinitu (10).

Kalorická restrikce a pravidelná fyzická aktivita u dětí s nadváhou/obezitou doprovázená redukcí hmotnosti způsobila signifikantní pokles hmotnostní koncentrace Lp-PLA₂. Nicméně i po poklesu koncentrací setrvaly hladiny enzymu nad limitem doporučeným pro běžnou populaci (41). Možným důvodem je krátká doba intervence a nízký absolutní pokles hmotnosti. Delší sledování a následné kontrolní měření po větším poklesu BMI by pravděpodobně bylo spojené s větším poklesem koncentrace fosfolipázy. I přesto naše studie potvrdila předchozí pozorování velice rychlého pozitivního efektu změny životního stylu ve smyslu racionálních dietních opatření a zařazení pohybové aktivity na metabolické rizikové faktory aterosklerózy a subklinického zánětu v mladším věku (42).

Tato studie opětovně prokázala spojitost metabolických a zánětlivých RF aterosklerózy s obezitou, kterou můžeme detekovat již v dětském věku. Podle našich závěrů vede i rychlá redukce hmotnosti daná intenzivní změnou životního stylu k ovlivnění RF jedince. Poprvé jsme popsali výrazně zvýšené hmotnostní koncentrace Lp-PLA₂ u dětí s

nadváhou/obezitou, které spolu s redukcí hmotnosti sice poklesly, ale setrvaly vysoko nad hladinami zdravé populace.

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

V druhé práci jsme se opět zaměřili na efekt redukce hmotnosti, tentokrát u dospělých obézních osob s metabolickým syndromem (MS), tedy komplexním syndromem sdružujícím obezitu centrálního typu, dyslipidémii, inzulinovou rezistenci a arteriální hypertenzi (43).

Jedinci splňující kritéria MS mají prokazatelně vyšší incidenci KVO a riziko úmrtí na KV příhody i celkovou mortalitu (44), kterou lze jen částečně vysvětlit jednotlivými složkami MS, které jsou současně RF KVO (45). Důležitým patofyziologickým podkladem rozvoje aterosklerózy je vystupňovaný oxidační stres, který je u osob s MS prokazatelně zvýšený ve srovnání s běžnou populací (46, 47). Zánětlivé parametry jsou u jedinců splňujících kritéria MS bez jakéhokoli jiného onemocnění vyšší než u osob se stejným BMI bez MS (48). V naší studii jsme sledovali tři parametry chronického subklinického zánětu. Kromě již zmíněné Lp-PLA₂ jsme monitorovali koncentrace oxidované LDL částice (ox-LDL) a aktivitu myeloperoxidázy (MPO).

LDL částice mohou být oxidované v plazmě nebo v cévní stěně činností volných radikálů. Částice oxidované v cirkulaci ztrácejí schopnost vazby na LDL-receptor a jsou vychytávány různými druhy scavengerových receptorů. V cévní stěně dochází k fagocytóze ox-LDL makrofágy, vzniku pěnových buněk subendotelia a formování aterosklerotické léze. Ox-LDL mají také schopnost indukovat aktivaci buněk endotelia s následným rozvojem endoteliální dysfunkce a proliferace hladkých svalových buněk (49-54). Plazmatické hladiny ox-LDL jsou signifikantně vyšší u obézních jedinců s MS (48, 55) a asociované s tíží aterosklerotického postižení, přičemž hladina ox-LDL korelovala s jinými zánětlivými markery (CRP, TNF- α) (56).

MPO je enzym produkovaný leukocyty spojovaný s oxidačním stresem. Katalyzuje vznik reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které jsou nezbytné v obranné reakci organismu (57). Na druhou stranu, ROS jsou vysoce nestabilní látky rychle po svém vzniku reagující s

jinými molekulami těla a jednou z vedlejších reakcí je oxidativní modifikace LDL částic (58). Také apolipoprotein A-I, hlavní apolipoprotein HDL částice, je terčem MPO katalyzované oxidace, která činí tento lipoprotein dysfunkčním (59). Ovlivnění metabolismu lipoproteinů vedlo k teorii uplatnění MPO v patogenezi aterosklerózy a provedené studie skutečně prokázaly asociaci hladin MPO s rizikem rozvoje KVO (60).

Zvýšený oxidační stres by tedy mohl být jakýmsi pojítkem, které je zodpovědné za vyšší KV riziko nemocných s MS a lze se domnívat, že ovlivnění subklinického zánětu by mohlo vést ke snížení individuálního KV rizika. Prvním krokem v klinické praxi jsou jistě režimová opatření, která by v případě MS při dobré compliance nemocného mohla bezpochyby vést k pozitivnímu ovlivnění složek MS a následnému zmírnění prozánětlivého stavu organismu. Byť jen mírná redukce hmotnosti vede k výrazným zdravotním benefitům a dramatickému zlepšení ve všech parametrech MS i přesto, že BMI setrvává v pásmu obezity (61). V naší práci jsme sledovali vliv rychlé redukce hmotnosti na parametry oxidačního stresu u jedinců s MS a vztah mezi MS a oxidačními markery.

a. Soubor

Vyšetřili jsme 80 obézních pacientů (56 žen a 24 mužů, průměrný věk $47,1 \pm 0,9$ let, průměrné BMI $38,3 \pm 0,7$ kg/m²), z nichž 40 splňovalo NCEP ATP III kritéria MS (42), 40 jedinců tato kritéria nespĺňovalo. Skupiny se nelišily v BMI a věku. Pacienti neužívali žádné léky, které by ovlivňovaly metabolismus glukózy, sekreci inzulínu nebo citlivost k inzulínu. Vstupní kritéria byla věk nad 18 let a BMI nad 30 kg/m². Vyloučeny byly osoby s poruchou příjmu potravy, nádorovým onemocněním, diabetes mellitus 1. typu, chronickým zánětlivým onemocněním střeva, dnou, jaterním onemocněním, recentní KV příhodou, endokrinologickou příčinou obezity, těhotenstvím, či jedinci užívající kortikosteroidy nebo lithium. Diuretická léčba byla vysazena před zahájením studie, pacienti nedostávali žádnou medikaci podporující redukci hmotnosti, ani nikdo z účastníků při zahájení studie nedodržel dietu za účelem redukce hmotnosti. Redukční program byl založen na dietě o nízkém množství kalorií s přibližnou denní dávkou 600-800 kcal, s individuálně určenou potřebou bílkovin na kg hmotnosti denně. Základ každodenního jídelníčku tvořily bílkovinné nápoje v kombinaci s rybami, libovým hovězím a kuřecím masem.

b. Metodika

80 pacientů a 20 zdravých kontrol bylo vyšetřeno na začátku redukčního programu, obézní dále po 4-6 týdnech a 12-20 týdnech. Provedli jsme sérii klasických antropometrických a biochemických měření. V této studii jsme stanovovali aktivitu Lp-PLA₂ pomocí kolorimetrické metody měřením konverze substrátu. Plazmatické hladiny ox-LDL byly měřeny přímou sendvičovou imunoanalýzou za použití monoklonální protilátky mAb-4E6 a detekce rozdílných epitopů oxidované molekuly apolipoproteinu B. Koncentrace MPO jsme měřili přímou sendvičovou imunoanalýzou. Plazmatické hladiny inzulinu byly měřeny systémem Luminex-100, inzulinová rezistence spočítání užitím homeostatického modelu HOMA-IR = glukóza (mg/dl) x inzulin (U/ml)/22,5 (62).

Statistická analýza byla provedena za použití Stata verze 11. Rozdíly vstupních hodnot mezi jednotlivými skupinami pacientů jsme testovali nepárovým t-testem nebo Wilcoxonovým testem. Párový t-test a Wilcoxonův test byly použity ke zhodnocení změn biochemických parametrů po redukci hmotnosti. Jakákoli chybějící data byla doplněna pomocí metody imputace. K vyhodnocení změn jednotlivých oxidačních markerů jsme použili multivariantní lineární regresi a Pearsonovu korelační analýzu, ke stanovení rozdílů v hladinách oxidačních markerů mezi jednotlivými skupinami logistickou regresi a ROC analýzu.

c. Výsledky - vstupní charakteristika

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

Pacienti splňující kritéria MS měli vstupně signifikantně vyšší hladiny ox-LDL ve srovnání se zdravými kontrolami ($64,26 \pm 2,2$ vs. $57,08 \pm 1,5$ U/l, $p=0,01$) i obézními bez MS ($64,26 \pm 2,2$ vs. $52,21 \pm 3,0$ U/l, $p=0,002$). Koncentrace MPO byly významně vyšší u všech obézních pacientů bez ohledu na přítomnost MS ve srovnání se zdravými kontrolami ($330,79 \pm 45,0$ respektive $375,28 \pm 65,1$ vs. $172,72 \pm 22,0$, $p=0,015$). Plazmatická aktivita Lp-PLA₂

se mezi jednotlivými skupinami statisticky významně nelišila. Ox-LDL a Lp-PLA₂ silně korelovaly vzájemně a s parametry dyslipidémie, zatímco MPO byla asociována s parametry inzulinové rezistence. Zaměřili jsme se na jednotlivé komponenty MS ve vztahu k parametrům oxidačního stresu a zjistili, že nejsilnější asociace při vstupním vyšetření vykazovaly ox-LDL částice, zatímco Lp-PLA₂ a MPO se nejeví jako spolehlivé markery spojené u obézních osob s MS. Pokusili jsme se sestavit model k predikci MS podle těchto tří parametrů oxidačního stresu, což se ukázalo být nejlepším způsobem při vyhledávání osob s nejvyšším rizikem rozvoje MS ($p=0,026$).

d. Výsledky - efekt hmotnostní redukce

Skupina pacientů s MS dosáhla průměrného poklesu hmotnosti o 16,9 kg, snížení BMI o 5,6 kg/m² spolu se zmenšením obvodu pasu. Hmotnostní redukce měla také signifikantní vliv na pokles parametrů oxidačního stresu, jedinou výjimkou byla MPO. Hladina ox-LDL klesla z počátečních 64,3 na 54,7 U/l, což představuje 12% pokles ($p<0.001$). Tato změna byla asociována se snížením celkového cholesterolu i po adjustaci na věk a pohlaví ($p=0,019$). Překvapivě změna ox-LDL nekorelovala s poklesem LDL cholesterolu. Spolu s poklesem hmotnosti jsme také pozorovali klesající aktivitu Lp-PLA₂ o 4,7% z počátečních 136,6 na 127,7 nmol/ml/min ($p=0,024$), redukci asociovanou se snížením celkového a LDL cholesterolu a inzulinu. Změna MPO nebyla statisticky významná, nicméně spojená s poklesem celkového cholesterolu, TG a glukózy i po adjustaci na věk a pohlaví. Pokles všech markerů oxidačního stresu po redukci hmotnosti byl signifikantně spojen se snížením hladiny celkového cholesterolu.

e. Závěr

V naší studii jsme při vstupním vyšetření pomocí hladin parametrů oxidačního stresu nebyli schopni jednoznačně definovat jedince s MS. Pouze hladina ox-LDL byla u obézních osob s MS signifikantně vyšší v porovnání s obézními bez MS. Tento výsledek je v souladu s předešlou studií, kde byly dokumentovány zvýšené hladiny ox-LDL v plazmě pacientů s MS (56). Aktivita MPO je statisticky významně zvýšená u obézních jedinců ve srovnání se štíhlými kontrolami bez ohledu na přítomnost MS, což potvrzuje teorii zvýšeného subklinického zánětu u obézních. Pouze aktivita Lp-PLA₂ byla u všech osob při prvním vyšetření bez významných rozdílů.

f. Diskuse

Stejně jako jiné studie jsme po poklesu hmotnosti zjistili zlepšení metabolických parametrů u jedinců s MS (63) včetně parametrů zánětu, přestože valná většina prozatím provedených studií byla zaměřena na C-reaktivní protein a jeho změny. Tzotzas a spol. dokumentovali signifikantní pokles aktivity Lp-PLA₂ po poklesu hmotnosti u zdravých obézních žen (64). Na druhou stranu Hanusch-Enserer a spol., kteří sledovali vliv poklesu hmotnosti po bandáži žaludu na RF KVO, nezjistili žádnou změnu Lp-PLA₂ (65). Tyto výsledky mohou naznačovat zásadní vliv režimových opatření a životního stylu na aktivitu Lp-PLA₂. Pokles koncentrace ox-LDL po redukční dietou indukovaném snížení hmotnosti u obézních mužů a žen byl pozorován i v dalších studiích (66, 67). Přesto existuje velice málo prací, jejichž autoři se zabývali vlivem rychlé redukce hmotnosti na parametry oxidačního stresu u obézních osob s MS a spojitostí mezi těmito dvěma faktory. Rector a spol. se zaměřil na pacienty s MS a vyšetřoval oxidační markery a parametry inzulinové rezistence po poklesu hmotnosti dané pravidelnou aerobní aktivitou (68). Výsledkem byl signifikantní pokles ox-LDL, ale bez efektu na MPO nebo inzulinovou rezistenci, dospěl tedy k podobným závěrům jako v naší studii. Roberts a spol. pozoroval vliv 21denní diety a cvičení na muže s MS (69), což mělo za následek snížení sérových lipidů, ale také MPO, CRP a zlepšení inzulinové rezistence. Tyto výsledky mohou být ovlivněné velmi krátkým trváním intervence. Opačné výsledky dokumentoval Solá a spol., kteří sledovali efekt mírného poklesu hmotnosti morbidně obézních na hladiny zánětlivých cytokinů (70). Přestože vstupní hladiny CRP, TNF- α a leukocytů byly výrazně zvýšené, po redukci hmotnosti nepozorovali statisticky významný pokles žádného z těchto parametrů. Pravděpodobně nebyly použité markery dostatečně citlivé k probíhajícímu chronickému subklinického zánětu. Stanovení ox-LDL, Lp-PLA₂ a MPO by mohlo pomoci vyhledávat obézní jedince se zvýšeným rizikem budoucího rozvoje MS a přistupovat k tomuto pacientovi jako ke středně až vysoce rizikovému i z hlediska rizika KVO. Vyšetření jednotlivých markerů není ovšem dostatečně silným prediktorem rizika MS, kombinovaný screening je strategií mnohem účinnější.

Výsledky naší studie potvrdily předchozí nálezy, tedy že dietou indukovaný pokles hmotnosti je následován zmírněním prozánětlivého stavu organismu, což lze objektivizovat poklesem hladin parametrů oxidačního stresu. Prokázali jsme snížení chronického zánětu redukcí hmotnosti a dietními změnami u osob s MS, což znamená významné ovlivnění KV

rizika, které je u těchto jedinců vyšší než v běžné populaci. Nejen na základě našich výsledků lze rozhodně doporučit úpravu životního stylu všem pacientům s vyšší hladinou zánětlivých parametrů. V současnosti je kladen stále větší důraz na prevenci, proto by měla být snaha o vyhledávání osob s vysokým rizikem KVO jedním ze základních kamenů současné medicíny.

Nejlepší cestou k zabránění vzniku mnoha onemocnění je bezpochyby prevence obezity, přestože současný celosvětový trend je zcela opačný a počet obézních neustále narůstá. Za těchto podmínek nezbyvá než mezi obézními jedinci pátrat po osobách s vyšším rizikem a zaměřit se na úpravu jejich životního stylu s cílem zabránit rozvoji mnoha chronických chorob.

5. Závěr

Stanovení specifických zánětlivých parametrů je vhodným doplňkem k posouzení aterogenního rizika, respektive zánětlivé komponenty u osob s nadváhou, obezitou a metabolickým syndromem. Lp-PLA₂ se ukázala být citlivým markerem aterosklerózy a rizika kardiovaskulární příhody u pacientů se středním až středně vysokým kardiovaskulárním rizikem v rámci individualizace péče. Nevýhodou je citlivost metodiky na preanalytickou přípravu, ale po zvládnutí a standardizaci testování bude možné stanovení Lp-PLA₂ zahrnout do palety vyšetření v rámci stratifikace aterogenního kardiovaskulárního rizika. Významná je skutečnost, že s úpravou režimových opatření následovanou poklesem hmotnosti dochází k útlumu subklinického zánětlivého procesu. Opětovně tedy prokazujeme pozitivní efekt racionální diety a pravidelné pohybové aktivity jako základu zdravého životního stylu a pilíře preventivních opatření v rámci ovlivnění řady chronických onemocnění.

6. Použitá literatura

1. York DA, Rossner S, Caterson I, et al. (2004). Prevention Conference VII: Obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: Group I: worldwide demographics of obesity. *Circulation*. 110(18): E463–E470.
2. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, et al. (2002). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA*. 288: 1723–1727.
3. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, et al. (2002). The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*. 288: 2709–2716.
4. Lloyd LJ, Langley-Evans SC, McMullen S (2010). Childhood obesity and adult cardiovascular disease risk: a systematic review. *Int J Obes (Lond)*. 34: 18-28.
5. Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, et al. (2003). Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23: 434-439.
6. Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 105: 1135-1143.
7. Brilakis ES, McConnell JP, Lennon RJ, et al. (2005). Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels with coronary artery disease risk factors, angiographic coronary artery disease, and major adverse events at follow-up. *Eur Heart J*. 26(2): 137-44.
8. Uydu HA, Bostan M, Yilmaz A, et al. (2013). Comparison of inflammatory biomarkers for detection of coronary stenosis in patients with stable coronary artery disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 17(1): 112-8.
9. Cao Y, Stafforini DM, Zimmerman GA, et al. (1998). Expression of plasma platelet activating factor acetylhydrolase is transcriptionally regulated by mediators of inflammation. *J Biol Chem*. 273: 4012-4020.
10. Chae JS, Kim OY, Paik JK, et al. (2011). Association of Lp-PLA(2) activity and LDL size with interleukin-6, an inflammatory cytokine and oxidized LDL, a marker of oxidative stress, in women with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 218: 499-506.
11. Gazi I, Lourida ES, Filippatos T, et al. (2005). Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is a marker of small, dense LDL particles in human plasma. *Clin Chem*. 51: 2264-2273.

12. Skalern K, Gustafsson M, Rydberg EK, et al. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 417: 750-754.
13. Tselepis AD, Chapman JM (2002). Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: Potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor acetylhydrolase. *Atherosclerosis*. suppl 3: 57-68.
14. Zalewski A, Macphee C (2005). Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: Biology, epidemiology, and possible therapeutic target. *Arterioscler Tromb Vasc Biol*. 25: 923-931.
15. Lavi S, Lavi R, McConnell JP, et al. (2007). Lipoprotein-associated phospholipase A2: review of its role as a marker and a potential participant in coronary endothelial dysfunction. *Mol Diagn Ther*. 11: 219–226.
16. Blankenberg S, Stengel D, Rupprecht HJ, et al. (2003). Plasma PAF-acetylhydrolase in patients with coronary artery disease: Results of a cross-sectional analysis. *J Lipid Res*. 44: 1381-1386.
17. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, et al. (2000). Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 343: 1148-1155.
18. Blake GJ, Dada N, Fox JC, et al. (2001). A prospective evaluation of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels and the risk of future cardiovascular events in women. *J Am Coll Cardiol*. 38: 1302-1306.
19. Koenig W, Khuseyinova N, Lowel H, et al. (2004). Lipoprotein-associated phospholipase A2 adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: Results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *Circulation*. 110: 1903-1908.
20. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, et al. (2004). Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-age men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation*. 109: 837-842.
21. Van Vark LC, Kardys I, Bluemink GS, et al. (2006). Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and risk of heart failure: The Rotterdam study. *Eur Heart J*. 27: 2346-2352.
22. Winkler K, Winkelmann BR, Scharnagl H, et al. (2005). Platelet-activating factor acetylhydrolase activity indicates angiographic coronary artery disease independently of

- systemic inflammation and other risk factors: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Circulation*. 111: 980-987.
23. Virani SS, Nambi V (2007). The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 as a marker of atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 9: 97-103.
 24. Koenig W, Twardella D, Brenner H, et al. (2006). Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts future cardiovascular events in patients with coronary heart disease independently of traditional risk factors, markers of inflammation, renal function, and hemodynamic stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26: 1586-1593.
 25. Corsetti JP, Rainwater DL, Moss AJ, et al. (2006). High lipoprotein-associated phospholipase A2 is a risk factor for recurrent coronary events in postinfarction patients. *Clin Chem*. 52: 1331-1338.
 26. Thompson A, Gao P, Orfei L, et al. (2010). Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet*. 375: 1536-44.
 27. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005; 77: 598-625.
 28. Carr AC et al. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1716-1725.
 29. Shao B et al. Myeloperoxidase: an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein. *Curr Opin Cardiol*. 2006; 21: 322-328.
 30. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 1102-11.
 31. Rudolph V et al. Coronary plaque injury triggers neutrophil activation in patients with coronary artery disease. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42: 460-5.
 32. Meuwese MC et al. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals. The EPIC-Norfolk prospective population study. *J Am Col Cardiol*. 2007; 50: 159-165.
 33. Van Guilder GP et al. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity*. 2006; 14: 2127-31.
 34. Holvoet P et al. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. *JAMA*. 2008; 299: 2287-2293.

35. Hulthe J et al. The Metabolic syndrome, LDL Particle Size, and Atherosclerosis: Atherosclerosis and Insuline Resistance (AIR) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2140-2147.
36. Pacifico L, Anania C, Mertino F, et al. (2011). Management of metabolic syndrome in children and adolescents. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 21: 455-466.
37. Barter PJ, Ballantyne CM, Carmena R, et al. (2006). Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guilding therapy: report of the thirty-person/tencountry panel. *J Intern Med.* 259: 247-258.
38. Nagel G, Rapp K, Wabitsch M, et al. (2008). Prevalence and cluster of cardiometabolic biomarkers in overweight and obese schoolchildren: results from a large survey in southwest Germany. *Clin Chem.* 54: 317-325.
39. Mansikkaniemi K, Juonala M, Taimela S, et al. (2012). Cross-sectional associations between physical activity and selected coronary heart disease risk factors in young adults. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Ann Med.* 44: 733-44.
40. Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ, et al. (2008). Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. *Am J Cardiol.* 101: 51F-57F.
41. Würtz P et al. Metabolic signatures of adiposity in young adults: Mendelian randomization analysis and effects of weight change. *PLoS Med.* 2014 Dec 9; 11(12).
42. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol In Adults: Executive Summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285:2486–2497.
43. Galassi A, Reynolds K, He J (2006). Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: A meta-analysis. *Am J Med.* 119:812–819.
44. Ford ES, Giles WH, Dietz WH (2002). Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA.* 287: 356–359.
45. Hopps E, et al. (2009). A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 20: 72–77.
46. Leopold JA, Loscalzo J (2009). Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 47: 1673–1706.

47. Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, et al. (2006) Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity*. 14: 2127–31.
48. Van Guilder GP et al. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity*. 2006; 14: 2127–31.
49. Lee S et al. Role of phospholipid oxidation products in atherosclerosis. *Circ Res*. 2012; 111(6): 778-99.
50. Ishigaki Y et al. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation*. 2008; 118(1): 75-83.
51. Virella G, Lopes-Virella MF. Atherogenesis and the humoral immune response to modified lipoproteins. *Atherosclerosis*. 2008; 200(2): 239-46.
52. Watanabe N et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by lysophosphatidylcholine-induced mitochondrial reactive oxygen species generation in endothelial cells. *Am J Pathol*. 2006; 168: 1737–1748.
53. Cheng J et al. Oxidized low-density lipoprotein stimulates p53-dependent activation of proapoptotic Bax leading to apoptosis of differentiated endothelial progenitor cells. *Endocrinology*. 2007; 148: 2085–2094.
54. Holvoet P, Lee DH, Steffes M, et al. (2008). Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. *JAMA*. 299: 2287–2293.
55. Hulthe J, Bokemark L, Wikstrand J, et al. (2000). The Metabolic syndrome, LDL Particle Size, and Atherosclerosis: Atherosclerosis and Insuline Resistance (AIR) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20:2140-2147.
56. Klebanoff SJ (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 77: 598-625.
57. Carr AC, McCall MR, Frei B (2000). Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20: 1716-1725.
58. Shao B, Oda MN, Oram JF, et al. (2006). Myeloperoxidase: an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein. *Curr Opin Cardiol*. 21: 322-328.
59. Meuwese MC, Stroes ESG, Hazen SL, et al. (2007). Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals. The EPIC-Norfolk prospective population study. *J Am Col Cardiol* 50: 159-165.
60. Case CC, Jones PH, Nelson K, et al. (2002). Impact of weight loss on the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*. 4: 407–414.

61. Case CC et al. Impact of weight loss on the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab.* 2002; 4: 407–414.
62. Pérez-Guisado J, Muñoz-Serrano A (2011). A pilot study of the Spanish Ketogenic Mediterranean Diet: an effective therapy for the metabolic syndrome. *J Med Food.* 14: 681-7.
63. Tzotzas T, Filippatos TD, Triantos A, et al. (2009). Effects of a low-calorie diet associated with weight loss on lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity in healthy obese women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 18: 477-82.
64. Hanusch-Enserer U, Zorn G, Wojta J, et al. (2009). Non-conventional markers of atherosclerosis before and after gastric banding surgery. *Eur Heart J.* 30: 1516-24.
65. Pierce GL, Beske SD, Lawson BR, et al. (2008). Weight loss alone improves conduit and resistance artery endothelial function in young and older overweight/obese adults. *Hypertension.* 52: 72-9.
66. Shin MJ, Hyun YJ, Kim OY, et al. (2006). Weight loss effect on inflammation and LDL oxidation in metabolically healthy but obese (MHO) individuals: low inflammation and LDL oxidation in MHO women. *Int J Obes (Lond).* 30: 1529-34.
67. Rector RS, Warner SO, Liu Y, et al. (2007). Exercise and diet induced weight loss improves measures of oxidative stress and insulin sensitivity in adults with characteristics of the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293:E500-6.
68. Roberts ChK, Won D, Pruthi S, et al. (2006). Effect of a short-term diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation, MMP-9, and monocyte chemotactic activity in men with metabolic syndrome factors. *J Appl Physiol.* 100: 1657–1665.
69. Solá E, Jover A, López-Ruiz A, et al. (2009). Parameters of inflammation in morbid obesity: lack of effect of moderate weight loss. *Obese surg.* 19: 571-6.