

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

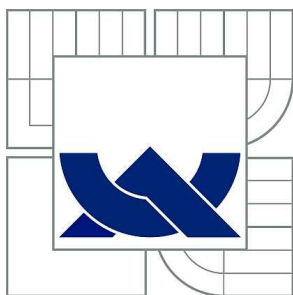
VYUŽITÍ FLOWCYTOMETRIE PRO MULTIPLEXOVÉ ANALÝZY V
KLINICKÉ BIOCHEMII

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. LUCIE BABUŠÍKOVÁ

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

VYUŽITÍ FLOWCYTOMETRIE PRO MULTIPLEXOVÉ ANALÝZY V KLINICKÉ BIOCHEMII

APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY FOR MULTIPLEX ANALYSES IN CLINICAL
BIOCHEMISTRY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. LUCIE BABUŠÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Miroslava Beňovská, Ph.D.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0650/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. Lucie Babušíková	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	RNDr. Miroslava Beňovská, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.	

Název diplomové práce:

Využití flowcytometrie pro multiplexové analýzy v klinické biochemii

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Zpracujte získané experimentální výsledky
4. Vyhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Lucie Babušíková
Student(ka)

RNDr. Miroslava Beňovská, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce pojednává o technice flow cytometrie pro multiplexové analýzy a jejím využitím ve spojení s imunochemickými metodami. V rámci této práce byla provedena klinická studie, která se zabývá sekundární prevencí infarktu myokardu a aterosklerózy u souboru 186 pacientů. V dnešní době představuje infarkt myokardu celosvětový civilizační problém. Řada možných parametrů pro monitorování aterosklerózy představuje ve světě dosud nevyřešenou problematiku. V praktické části této práce jsme prováděli analýzu pomocí xMAP technologie Luminex u nových parametrů (adiponektin, resistin, osteopontin) předpovídajících aterosklerotické onemocnění ve spojitosti s infarktem myokardu. Také jsme chtěli zjistit, jak se tyto parametry změny u pacientů po zvýšení dávky léčebných medikamentů.

ABSTRACT

This thesis discusses the technique of flow cytometry for multiplex analysis and its use in conjunction with immunochemical methods. As part of this work was carried out clinical studies dealing with secondary prevention of myocardial infarction and atherosclerosis in 186 patients. In this time represents myocardial infarction worldwide civilizational problem. A number of possible parameters for monitoring atherosclerosis in the world is still an unresolved issue. In the practical part of this work we performed an analysis using Luminex xMAP technology for new parameters (adiponectin, resistin, osteopontin) to predict atherosclerotic disease associated with myocardial infarction. Also we wanted to see how these parameters are changed in patients after increasing the dose of therapeutic drugs.

KLÍČOVÁ SLOVA

flow cytometrie, xMAP technologie Luminex, imunoanalýza, ateroskleróza, infarkt myokardu, adiponektin, resistin, osteopontin, Lp-PLA₂, myeloperoxidáza

KEY WORDS

flow cytometry, Luminex xMAP technology, immunoassay, atherosclerosis, myocardial infarction, , adiponectin, resistin, osteopontin, Lp-PLA₂, myeloperoxidasa

BABUŠÍKOVÁ, L. *Využití flowcytometrie pro multiplexové analýzy v klinické biochemii*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 97 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Miroslava Beňovská, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce RNDr. Miroslavě Beňovské PhD. za ochotu, laskavost a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala Ing. Martině Lízalové PhD., doc. RNDr. Josefu Tomanandovi, Mgr. Marii Tomandlové za pomoc při vypracování praktické části této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Simoně Littnerové za pomoc při vyhodnocení statistických údajů v programu SPSP. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému příteli a rodině za psychickou podporu, kterou mně poskytovali po celou dobu studia.

Obsah

1 ÚVOD	8
2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	9
3 POUŽITÉ METODIKY	10
3.1 Imunoanalýza.....	10
3.1.2 Rozdělení imunoanalytických metod	11
3.2 Luminiscence.....	13
3.2.1 Druhy luminiscence.....	13
3.2.2 Luminofory a fluofory.....	14
3.2.3 Přístroj k měření chemiluminiscence	14
3.3 Fotometrie a imunoturbidimetrie	14
3.3.1 Fotometrie.....	14
3.3.2 Imunoturbidimetrie.....	15
3.4 Flow cytometrie s využitím xMAP technologie LUMINEX	16
3.4.1 Flow cytometrie.....	16
3.4.2 xMAP technologie Luminex	16
3.4.3 Výhody a přednosti xMAP technologie Luminex.....	19
3.4.4 Přístroje řady Luminex	20
3.5 Využití automatických biochemických analyzátorů při běžné biochemické analýze a imunoanalýze	22
3.5.1 Automatické imunochemické analyzátory - ARCHITECT i 2000 SR	22
3.5.2 Využití fotometrie a imunoturbidimetrie na automatických biochemických analyzátorech.....	23
3.5.2.1 Princip analyzátoru.....	23
3.5.2.2 Cobas 6000 a cobas 8000	24
4 STANOVOVANÉ PARAMETERY	26
4.1 Adiponektin.....	26
4.1.2 Adiponektin a ateroskleróza	26
4.1.3 Možnosti stanovení adiponektinu.....	28
4.2 Resistin	28
4.2.1 Resistin ve spojení s aterosklerotickým onemocněním.....	29
4.2.2 Možnosti stanovení resistinu	29
4.3 Osteopontin	30
4.3.1 Osteopontin a jeho význam při aterogenezi	30
4.3.2 Možnosti stanovení osteopontinu.....	30
4.4 Myeloperoxidáza.....	31
4.4.1 Myeloperoxidáza a aterosklerotické onemocnění	32
4.4.2 Možnosti stanovení MPO	32
4.4.2.1 Stanovení koncentrace MPO na imunochemickém modulu automatického analyzátoru ARCHITECT i 2000 SR.....	32
4.4.2.2 Imunochemické stanovení koncentrace MPO založené na principu ELISA	32
4.5 Lp-PLA2.....	33
4.5.1 Lp-PLA2 a ateroskleróza.....	33
4.5.2 Možnosti stanovení Lp-PLA2	34
4.5.2.1 Stanovení koncentrace Lp-PLA2 imunoturbidimetrickou metodou	34

4.5.2.2 Stanovení koncentrace Lp-PLA2 metodou ELISA	35
4.5.2.3 Stanovení koncentrace Lp-PLA2 enzymatickou metodou	35
4.6 Cholesterol.....	35
4.6.1 Možnosti stanovení cholesterolu	37
4.6.1.1 Enzymatická, fotometrická metoda	37
4.7 HDL-cholesterol.....	37
4.7.1 Možnosti stanovení HDL-cholesterolu.....	38
4.7.1.1 Homogenní enzymatické fotometrické stanovení	38
4.8 LDL-cholesterol	38
4.8.1 Možnosti stanovení LDL-cholesterolu	39
4.8.1.1 Homogenní enzymatické fotometrické stanovení	39
4.9 Triacylglyceroly	40
4.9.1 Možnosti stanovení triacylglycerolů	41
4.9.1.1 Enzymatické, fotometrické stanovení	41
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
5.1 Soubor pacientů a kontrolní skupiny	42
5.2 Popis analýzy jednotlivých parametrů	44
5.2.1 Stanovení adiponektinu, resistinu a osteopontinu na přístroji Luminex	44
5.2.1.1 Stanovení adiponektinu a resistinu.....	44
5.2.1.1.1 Příprava a použité reagentie.....	44
5.2.1.1.2 Příprava vzorků	45
5.2.1.1.3 Pracovní postup	46
5.2.1.1.4 Měření na přístroji Luminex 200.....	47
5.2.1.2 Stanovení osteopontinu	47
5.2.1.2.1 Příprava a použité reagentie.....	47
5.2.1.2.2 Příprava vzorků	48
5.2.1.2.3 Pracovní postup	48
5.2.1.2.4 Měření na přístroji Luminex 200.....	49
5.2.2 Stanovení MPO na automatickém analyzátoru ARCHITECT i 2000 SR... ..	49
5.2.2.1 Zavedení metody	50
5.2.2.2 Postup měření	50
5.2.3. Stanovení Lp-PLA2 na automatickém analyzátoru cobas 6000 od firmy Roche.....	50
5.2.4 Stanovení lipidových parametrů na automatickém analyzátoru cobas 8000	50
5.3 Prezentace výsledků a statistika.....	51
5.3.1 Analytické aspekty jednotlivých metodik	51
5.3.1.1 Adiponektin	51
5.3.1.2 Resistin	53
5.3.1.3 Osteopontin	54
5.3.1.4 Myeloperoxidáza	55
5.3.1.4.1 Stanovení opakovatelnosti.....	55
5.3.1.4.2 Stanovení reprodukovatelnosti (mezilehlé přesnosti)	55
5.3.1.5 Lp-PLA2.....	56
5.3.1.5.1 Srovnání imunoturbidické a enzymatické metody	57
5.3.1.5.2 Stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti	59
5.3.1.6 Lipidy	60
5.3.2 Statistické vyhodnocení.....	61
5.3.2.1 Histogram	61

5.3.2.2 Studentův t-test.....	62
5.3.2.3 Korelační koeficient	67
5.3.2.4 ROC křivka.....	67
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	69
7 ZÁVĚR	71
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	72
9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	74
10 SEZNAM PŘÍLOH	78

1 ÚVOD

Infarkt myokardu spolu s aterosklerózou jsou hlavní příčinou úmrtí a invalidity na celém světě. Ateroskleróza a její rizikové faktory představují jeden z nejvýznamnějších zdravotních problémů západní civilizace. Tímto onemocněním se zabývá celá řada nejkvalifikovanějších výzkumných týmů po celém světě.

Hlavním cílem této práce bylo seznámit se s technikou flow cytometrie pro multiplexové analýzy a jejím využitím ve spojení s kardiovaskulárním onemocněním. Experimentální část se zabývá také dalšími technikami stanovujícími parametry, které by mohly předpovídat zvýšené kardiologické riziko u pacientů po infarktu myokardu a uplatnit se v rámci sekundární prevence.

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Osvojení techniky flowcytometrie pro multiplexové analýzy a její využití ve spojení s imunochemickými metodami pro účely klinické studie zabývající se sekundární prevencí infarktu myokardu a aterosklerózy.
2. Zpracování rozsáhlého souboru pacientů po infarktu myokardu a u vybrané skupiny z nich monitorování účinnější léčby na základě naměřených moderních biochemických parametrů jako Lp-PLA₂, interleukiny a myeloperoxidáza.
3. Praktické využití dalších analytických metod jako chemiluminiscence, imunoturbidimetrie, fotometrie a turbidimetrie.

3 POUŽITÉ METODIKY

Při analýze měřených parametrů byly využity jak speciální kombinace analytických principů (jako např. imunoanalýza ve spojení s flow cytometrií, fosforescencí, imunoanalýza ve spojení s chemiluminiscencí), tak běžné metodiky jako fotometrie či turbidimetrie.

3.1 Imunoanalýza

Imunoanalytické metody jsou založeny na reakci antigenu a specifické protilátky za vzniku imunokomplexu. U běžné imunoanalytické metody antigen tvoří stanovovaný analyt a protilátka je obsažena v reagentii. [1,2]

Na tomto základě pracují metodiky **xMAP (multiplex analyt profilig) technologie** na přístroji Luminex 200 a taktéž **chemiluminiscenční technika** na přístroji ARCHITECT i 2000 SR využívané v této práci.

Antigeny jsou makromolekuly přirozeného nebo umělého původu. Po chemické stránce se většinou jedná o proteiny, lipidy, nukleové kyseliny, karbohydráty. Antigeny mají dvě základní vlastnosti - navozují specifickou imunitní odpověď, buněčného nebo protilátkového typu, a také specificky reagují s produkty této reakce. Na vlastní reakci antigenu s protilátkou se neúčastní celá molekula antigenu, ale pouze některé z jejich povrchových skupin - jedná se o determinantní skupiny neboli epitopy. Antigenní determinantu představuje jen určitá skupina atomů (část struktury, funkční skupiny) na povrchu molekuly antigenu a charakterizuje jeho specifitu se schopností reagovat s vazebným místem protilátky. Molekula antigenu musí mít dostatečně velkou molekulovou hmotnost

($M_r > 5000$ Da) a velikost musí mít kompletní strukturu. Jedna molekula antigenu na svém povrchu může nést různé množství antigenních determinantů. Počet epitopů, které reagují s vazebným místem protilátek udává valenci antigenů. Antigeny v živém organismu vyvolávají tvorbu specifických protilátek. Pouze kompletní antigen může vyvolat imunitní odpověď. Hapten (hormony, léky, nízkomolekulární peptidy, atd.), což je nekompletní antigen, vyvolá tvorbu protilátek jen tehdy, pokud je navázán na bílkovinný nosič. [1,2]

Protilátky jsou produkovány plazmatickými buňkami, vyvíjejícími se z B-lymfocytů po stimulaci antigenem. Protilátky představují heterogenní skupinu glykoproteinů živočišného původu. Vznikají v organismu jako odpověď na přítomnost antigenů a vykazují specifickou vazebnou aktivitu k antigenu, proti kterému byly připraveny. Jedná se o imunoglobuliny, v laboratorní praxi jsou obsaženy v tzv. antisérech. Imunoglobulin G je z analytického pohledu nejvíce převládající imunochemickou reagentií. Specifita a senzitivita imunoanalytických metod je ovlivněna používanou protilátkou. Používané protilátky využívané v imunoanalytických metodách mohou být vyrobeny různým způsobem. [1,2]

Monoklonální protilátky jsou produkty jednoho klonu plazmatických buněk odvozených od B-lymfocytů, jsou připravovány v laboratorních podmínkách pomocí hybridomové technologie. Jejím podstatou je buněčná fúze nádorových (myelomových) buněk s lymfocyty sleziny imunizovaných myší. Monoklonální protilátky jsou namířené proti jednomu epitopu určeného antigenu. Představují identické kopie molekul imunoglobulinů, které mají stejnou primární strukturu a stejnou specifitu vazebných míst. Tyto protilátky jsou charakteristické významnou specifitou, avšak špatně precipitují. [1,2]

Polyklonální protilátky se připravují imunizací zvířat (nejčastěji se jedná o králíky, kozy, ovce), obvykle opakovaným intravenózním podáním antigenu (lidské sérum). Krevní sérum imunizovaného zvířete, které obsahuje protilátky proti antigenu použitému k imunizaci, se označuje jako antisérum. Jestliže byl k imunizaci použit jeden antigen (např. jedna bílkovina), vytvářejí se **monospecifické protilátky** (antisérum). Každý epitop v molekule antigenu stimuluje pro tvorbu protilátek jeden klon B-lymfocytů. Kompletní antigeny mají více epitopů, protože aktivují několik klonů B-buněk. Imunizované zvíře proto syntetizuje směs monoklonálních protilátek lišících se tím, že jejich vazebná místa mají různou afinitu a tím i specifitu k jednotlivým epitopům určitého antigenu, který vyvolal jejich tvorbu. Při imunizaci zvířat směsí antigenů dochází k tvorbě **polyspecifických protilátek**, které obsahují imunoglobuliny proti většímu počtu antigenů. [1,2]

Na vazbě antigen - protilátka se uplatňuje několik vazebných sil. Jedná se o nekovalentní interakce jako např. elektrostatická interakce, vodíkové můstky, Van der Waalsovy síly, hydrofobní síly a iontové interakce hlavně mezi COO^- a NH_4^+ skupinami antigenu a protilátky. [1,2]

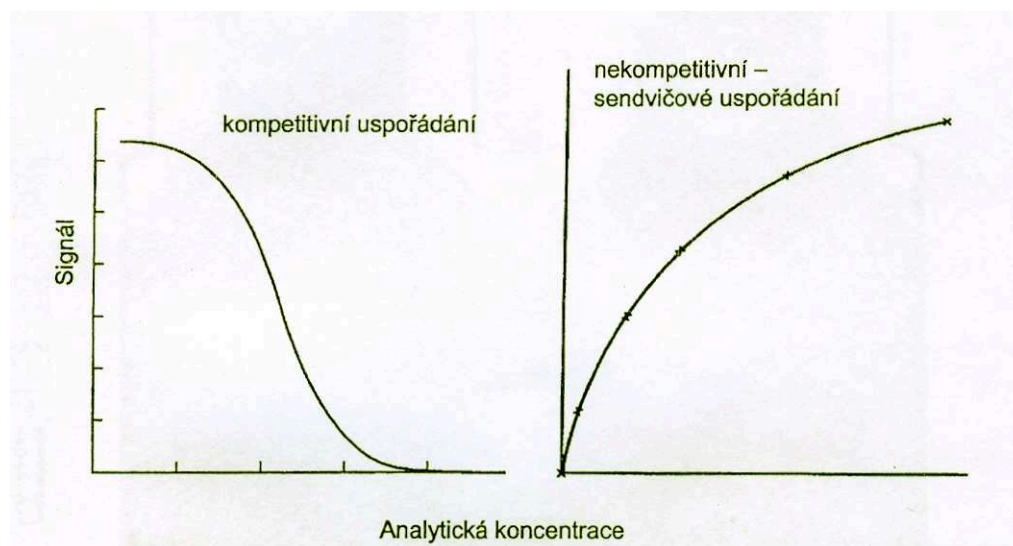
3.1.2 Rozdělení imunoanalytických metod

Imunoanalytické metody se mohou dělit podle uspořádání reakce na kompetitivní (soutěživou) imunoanalýzu nebo nekompetitivní (sendvičovou) imunoanalýzu. Podle prostředí, ve kterém reakce probíhá se může jednat o homogenní či heterogenní imunoanalýzu. Dále je možné imunoanalytické metody dělit podle techniky použité k měření signálu jako je např. luminiscenční imunoanalýza, fluoroimunoanalýza, radioimunoanalýza, enzymoimunoanalýza. Dále je možno tyto metody rozdělit dle toho, zda využívají značku (enzym, fluor, substráty atd.) či nevyžívají značek (např. imunoturbidimetrie). [3,4,5]

U **nekompetitivní (sendvičové) metody** stanovovaný antigen ze vzorku reaguje se dvěma protilátkami, které jsou v reakční směsi v přebytku. Jedna protilátka je značená, funkce druhé protilátky závisí na použité technologii např. u heterogenní imunoanalýzy je navázána na pevnou fázi a umožňuje separaci imunokomplexu. Ve vzniklém imunokomplexu je analyt (antigen) vázán mezi dvěma protilátkami (sendvič). Velikost měřeného signálu je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu. Kalibrační křivka má parabolický tvar. [3,4,5]

Tato nekompetitivní (sendvičová) metoda se využívá pro molekuly s vyšší molekulovou hmotností, které umožňují vazbu protilátek na dvě antigenní determinanty např. adiponektin, osteopontin, resistin, srdeční troponiny aj. Používají se dvě monoklonální nebo jedna monoklonální a jedna polyklonální protilátka. Pokud se v reakci využívají monoklonální protilátky specifické pro určitý epitop, je možno provádět simultánní inkubaci vzorku a konjugátu s ukotvenou protilátkou, což stanovení zjednodušuje. [3,4,5]

Při využití **kompetitivní metody** stanovený antigen soutěží se stejně značeným antigenem ve vazbě na specifickou protilátku proti stanovovanému antigenu, který je v limitovaném množství. Vzniknou imunokomplexy, které obsahují značku, a imunokomplexy bez značky. Čím je koncentrace stanovovaného antigenu vyšší, tím více vznikne imunokomplexů bez značky. Po ukončené reakci se měří signál imunokomplexů se značkou. Velikost odezvy je nepřímo závislá na koncentraci stanovovaného analytu. Dle typu použité značky měříme luminiscenci, fluorescenci, případně další veličiny. Kalibrační křivka má hyperbolický tvar. Tato kompetitivní metoda je vhodná především pro nízkomolekulární analyty, které mají malou molekulu a pouze jednu antigenní determinantu (např. steroidní hormony). [3,4,5]



Obr. č. 1 Kalibrační závislosti u kompetitivního a nekompetitivního uspořádání [3]

Homogenní imunoanalýza nevyžaduje separaci vázané (v imunokomplexu) a volné značené protilátky či antigenu. U homogenního stanovení není potřeba odstraňovat reaktanty. Stanovení a detekce probíhá přímo v reakční směsi. U těchto případů je aktivita značky navázaná na antigen modulovaná přímo navázáním protilátky. [3,4]

Při **heterogenní** imunoanalýze jsou z reakční směsi odstraňovány pomocí různých způsobů (např. magnetickou separací nebo ukotvením na pevném nosiči a promytím) nepotřebné reaktanty a imunokomplexy. Separuje se značka volná od značky vázané. Reakce s detekcí proběhne až po této separaci. Obecně stanovení probíhá v těchto

krocích – smíchání komponent, inkubace, při které dochází ke vzniku komplexu antigen – protilátka, separace a detekce. [3,4]

3.2 Luminiscence

Princip luminiscence je rovněž využíván při analýze parametrů měřených v této práci. Luminiscence je principem mnoha analytických systémů a to především pro vysokou citlivost.[3]

Luminiscence je jev, který představuje vyzařování přebytečné energie ve formě fotonů, ke kterému dochází při návratu excitovaných elektronů na základní hladiny. K excitaci atomů dochází působením jiného záření, elektronů nebo při chemické reakci. Při návratu excitovaného atomu do základního stavu dochází k emisi světla. Existují excitované energetické hladiny, na kterých může atom setrvávat relativně dlouho (10^{-8} s a déle). Tyto hladiny se nazývají **metastabilní hladiny**. Je možno také konstatovat, že luminiscence je děj, při kterém záření o kratší vlnové délce (větší frekvenci) vyvolává v látce určitého složení vznik záření o delší vlnové délce (nižší frekvenci) a část energie se vyzáří ve formě tepla (nesvítivé deexcitační procesy). [6]

3.2.1 Druhy luminiscence

Ke vzniku luminiscence je nutné dodat látce energii v různé podobě. Dle druhu energie rozlišujeme několik druhů luminiscence: chemiluminiscence, fotoluminiscence, elektroluminiscence, termoluminiscence.

V laboratorní medicíně je nejvíce využita chemiluminiscence a fluorescence.

Fotoluminiscence - luminiscence je vyvolána prostřednictvím elektromagnetického záření, do této kategorie patří **fosforescence** a **fluorescence**.

Chemiluminiscence - je druh luminiscence vyvolaný pomocí energií chemické reakce. Vzniká vyzářením fotonu z molekuly luminoforu po jeho chemické oxidaci za působení oxidantů jako je např. O_2 , H_2O_2 atd. Během chemiluminiscence dochází k produkci světelného záření excitovanými molekulami v průběhu chemické reakce. V přírodě je přirozenou formou chemiluminiscence - bioluminiscence, která označuje chemiluminiscenci v živých organismech. [6]

Pro chemiluminiscenční reakci musí být splněny tři základní požadavky:

1. Při reakci musí vznikat dostatek energie, aby došlo k excitaci elektronů. Reakce musí být exotermní a obvykle je to oxidace.
2. Musí existovat způsob jak tuto energii usměrnit do excitace elektronů. Pokud se chemická energie ztrácí ve formě tepla jako obvykle, pak se chemiluminiscence neobjevuje.

3. Excitovaný produkt musí být schopný ztrácet svoji energii buď ve formě fotonu, nebo ji převádět na fluoreskující sloučeniny. Přímá emise fotonu z excitovaného produktu obvykle poskytuje jen krátké záblesky světla, zatímco transfer energie na fluoreskující sloučeniny se většinou projevuje jako dlouhodobá (v minutách) světelná emise. [8]

3.2.2 Luminofory a flurofory

Látky, u kterých dochází k luminiscenci, se nazývají luminofory. Ve většině fluoreskujících organických molekul jsou obsaženy konjugované dvojně vazby. Jen málo biologických molekul, jako je např. tryptofan a malá skupina některých porfyrinů, fluoreskuje spontánně. Právě molekuly spontánně nefluoreskující je možné převést na fluoreskující produkty. Je možné využít látky, které při určitých chemických reakcích produkují chemiluminiscenční záření. Při imunoanalytických reakcích jsou luminofory a fluorofory navázány jako značka na protilátky, antigeny nebo tvoří substrát anebo vznikají až po jeho rozštěpení. [6] Luminofory používané ke značení nemají interference v biologickém materiálu a jsou velmi stabilní. [3] Uplatňují se látky jako je akridin a jeho estery, cheláty platinových kovů (např. ruthenium), cheláty lanthanoidů (europium). [6]

3.2.3 Přístroj k měření chemiluminiscence

K měření luminiscence je využíváný přístroj luminometr. Je složen z měřicí komůrky a detektoru, jeho součástí je fotonásobič. Měřicí komůrka spolu se vzorkem a ostatními reaktanty obsahuje systém zrcadel. Tato zrcadla soustřeďují co nejvíce světelného záření na detektor. Pokud při chemiluminiscenční reakci vznikají záblesky světla, využívá se počítání fotonů. Pomocí fotonásobiče dochází k zachycení počtu fotonů s velmi rychlou odezvou, která je proporcionální produktu chemiluminiscenční reakce. Množství produkovaného světla je úměrné počtu molekul, které emitují světelné záblesky. [6]

3.3 Fotometrie a imunoturbidimetrie

3.3.1 Fotometrie

Fotometrií rozumíme měření absorpce světla vzorkem při jedné nebo několika určitých vlnových délkách. V klinické biochemii velká řada stanovení využívá skutečnosti, že mnoho látek pohlcuje elektromagnetické záření v oblasti viditelné nebo ultrafialové části spektra. Množství absorbovaného záření o určité vlnové délce závisí na charakteru a množství absorbující látky. K měření absorpčního spektra analyzovaného vzorku využíváme spektrofotometr, který je schopen měření při více vlnových délkách. Spektrofotometrie vychází z Lambert-Beerova zákona, který

vyjadřuje vztah mezi koncentrací látky v roztoku a její absorbcí, tj. schopností molekul látky pohlcovat elektromagnetické záření o dané vlnové délce. [3,6,9]

Ve viditelném spektru se nejčastěji jako **zdroj záření** používají žárovky nebo halogenové lampy. **Monochromátor** je zařízení, které rozkládá polychromatické bílé světlo na spektrum barev – světelné záření o různých vlnových délkách. Obvykle jako monochromátor slouží optická mřížka. **Optický systém** je složen ze štěrbin a optických zrcadel. Vstupní a výstupní štěrbina monochromátoru slouží k ovládnutí velikosti a pozice světelného paprsku. Čím je výstupní štěrbina širší, tím větší je intenzita vycházejícího světla, avšak za cenu menší specifčnosti měření. Užší výstupní štěrbina zajišťuje přesnější dodržení požadované vlnové délky, ovšem za cenu menší intenzity světla a zhoršení odstupu signálu od šumu.

Absorpční prostředí ve fotometrii představuje kyveta s měřeným vzorkem. [3,6,9]

K převodu světelného záření na elektrický signál je využíván detektor. Ve viditelné oblasti se pro detekci záření používá fotodiody, fotonásobiče, nebo také detektor diodového pole.[6] Ve fotonkách se elektrony po uvolnění z fotokatody po dopadu fotonů pohybují k anodě účinkem sacího napětí. Fotonásobiče jsou uspořádány takovým způsobem, že elektrony dopadnou po ozáření fotokatody na první zesilovací elektrodu, dynodu, kde je počet fotoelektronů násoben sekundární emisí. Takových dynod je ve fotonásobiči 10 i více. U detektoru diodového pole je světlo rozptýleno mřížkou na pole několika světlocitlivých diod a vzniká napětí, které je převáděno na digitální signál. [3,9]

3.3.2 Imunoturbidimetrie

Optická metoda založená na měření procházejícího světla zeslabeného rozptylem na částicích se nazývá turbidimetrie. [8]

V klinické biochemii se často využívají reakce antigenu s protilátkou, kdy dochází k imunoprecipitaci. Výsledkem smísení roztoku antigenu s odpovídající protilátkou je vznik imunokomplexů. V daném roztoku dochází k zakalení. Světlo, které prochází zakaleným roztokem je rozptylováno na rozdíl od roztoku, kde neproběhla žádná imunochemická reakce. Stupeň zákalu je *v oblasti nadbytku protilátky* úměrný koncentraci antigenu.

Turbidimetrie využívá optické detekční systémy, které měří intenzitu světla prošlého v přímém směru jako u klasické fotometrie. A proto je možné využívat běžné spektrofotometry. Fotometrická citlivost je nepřímě úměrná vlnové délce, proto se nejčastěji pro turbidimetrické měření používá vlnová délka 340 nm. Výhody turbidimetrického stanovení spočívají ve velké specifitě metody (je možnost měřit vzorky o koncentraci

5 – 20 mg/l), další výhodou je jednoduché a rychlé provedení, možnost vyhodnotit velké množství vzorků za krátkou dobu a potřeba malého objemu vzorku (10 µl). [2,8,9]

3.4 Flow cytometrie s využitím xMAP technologie LUMINEX

3.4.1 Flow cytometrie

Flow cytometrii řadíme mezi techniku, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu buněk nebo jiných částic (jadérka, latexové částice, mikroorganismy aj.) v suspenzi. Za pomoci definovaných měřených parametrů jako je rozptyl světla, fluorescence, dovoluje rozlišovat buňky na základě jejich fyzikálních a chemických vlastností (velikost, obsah DNA) a po označení buněk fluorescenčním konjugátem monospecifických protilátek umožňuje taktéž studium povrchových molekul, diferenciačních antigenů, intracelulárních molekul.

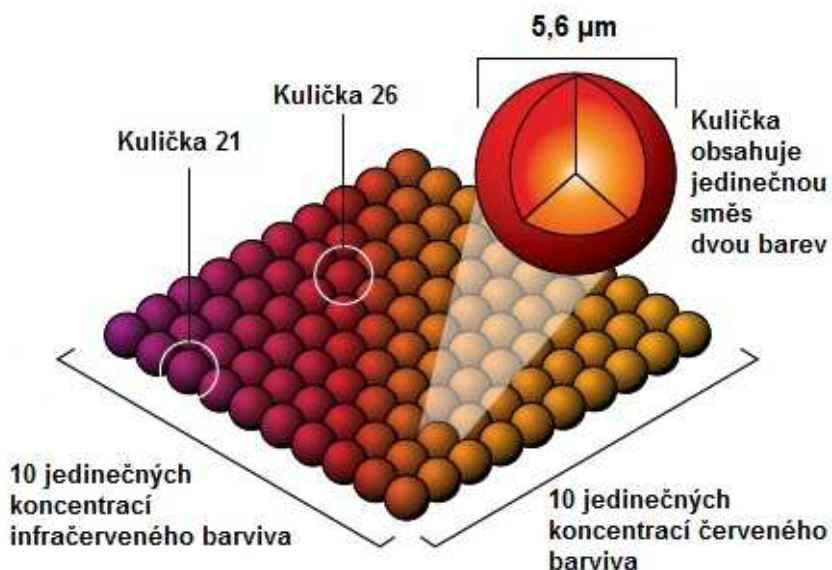
Buňky v suspenzi (usměrněné do velmi tenkého proudu) protékají kapilárou a postupně protínají dráhu paprsku světla (nejčastěji laseru) kolmého na směr toku buněk. Každá buňka se chová jako sférická čočka a podle své velikosti a vnitřní struktury (granulace) rozptyluje světlo do různých směrů. Vyhodnocením rozptylu lze buňky roztrždit na jednotlivé buněčné populace (např. lymfocyty, monocyty, granulocyty). Jestliže byly buňky obarveny fluorescenčním barvivem, dochází k excitaci fluorochromů laserovým paprskem a následné emisi fluorescenčního záření. Tímto způsobem můžeme vyšetřit např. vnitřní strukturu buňky. Světlo vznikající interakcí buněk při průchodu laserovým paprskem (rozptýlené světlo a emitovaná fluorescence) je rozděleno optickou soustavou hranolů, filtrů a zrcadel podle vlnové délky fluorescence. [6]

Tuto techniku v kombinaci s imunoanalýzou využívá přístroj Luminex 200, na kterém byly v rámci diplomové práce měřeny parametry adiponektin, resistin a osteopontin.

3.4.2 xMAP technologie Luminex

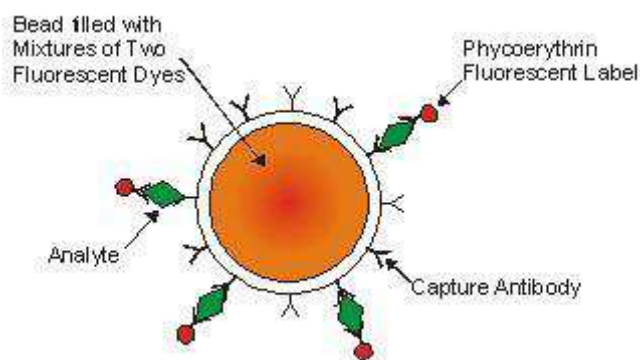
xMAP technologie je založena na využití několika dobře zavedených technik: flow cytometrie, xMAP technologie, digitální zpracování signálu, imunoanalýza, fluorescence, které byly kombinovány jedinečným způsobem.

xMAP technologie využívá polystyrénové mikročástice o velikosti 5,6 μm , které jsou interně označené s různou intenzitou, kterou určují dvě různá fluorescenční barviva (červené, infračervené). Pomocí odlišné intenzity barev pro mikročástice bylo vyvinuto 100 xMAP barevně kódovaných sad mikročástic, každá s jedinečným rozsahem spektra. Jejich vzájemné kombinace tvoří až 500 různých barevných odstínů (typů) mikročástic. [46]



Obr. č. 2 Schéma principu barevného značení mikročástic u xMAP technologie [30]

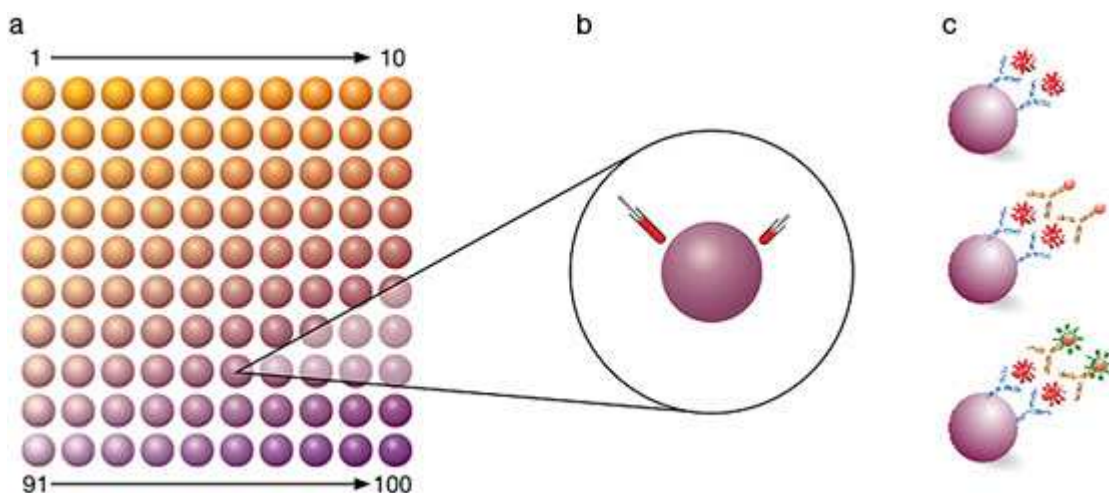
Na každém typu mikročástice je vázána specifická protilátka nebo proba rozpoznávající a vázající určitou molekulu (antigen, protilátku, substrát enzymu atd.). Po smísení vzorku (sérum, plazma, buněčný lyzát) s mikročásticemi dojde v jamce mikrotitrační destičky ke specifickému navázání příslušného analytu ze vzorku na povrch mikročástice. Ke směsi je poté přidána fluorescenčně značená protilátka proti navázanému analytu. Jako fluorescenčně značená protilátka se nejčastěji využívá phycoerytrin, neboť poskytuje velmi dobrý signál. [46]



Obr. č. 3 Mikročástice xMAP technologie [31]

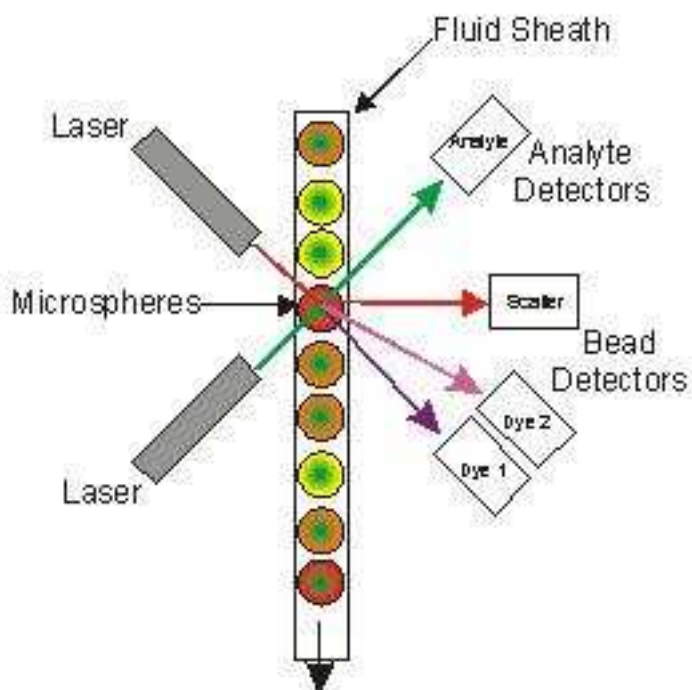
Mikročástice s navázaným vzorkem postupují pomocí nosné tekutiny jednotlivě za sebou úzkou kapilárou a vstupují do detekční komůrky, skrze kterou procházejí paprsky dvou laserů. Červený laser o vlnové délce 635 nm detekuje intenzitu fluorescence uvnitř mikročástic a tím určuje typ stanovovaného analytu. Zelený laser s vlnovou délkou 532 nm je typický pro phycoerytrin. Tento laser měří intenzitu

fluorescence phycoerytrinu na povrchu mikročastic a ta je přímo úměrná koncentraci navázaného analytu na mikročastici. [46]

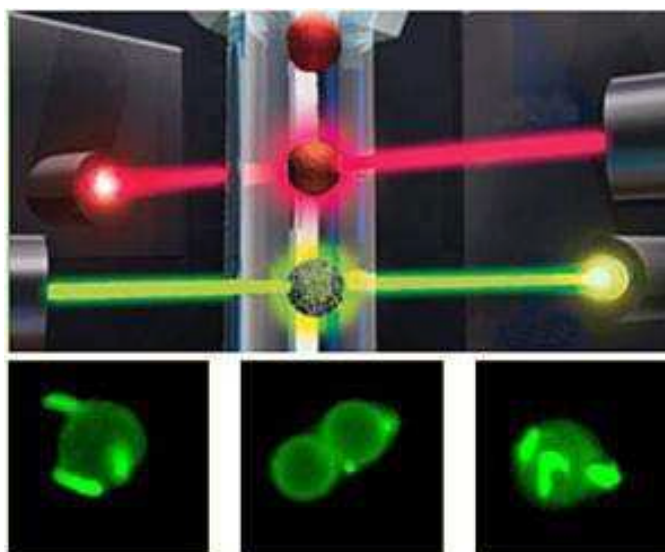


Obr. č. 4 *Multiplexová imunoanalýza: uvnitř mikročastice jsou dvě různé fluorescenční barviva (červené a infračervené). K výrobě 100 barevně kódovaných sad mikročastic se používá deset různých koncentrací červeného a infračerveného barviva. Každá mikročastice je schopna specificky vázat určitý analyt (a). Ten pak reaguje s biotinylovanou protilátkou (b), na kterou se naváže konjugát streptavidin – phycoerytrin (c) [32]*

Detekční zařízení analyzátoru Luminex: jeden detektor měří rozptýlené záření emitované z mikročastic a odstraňuje signály, které souvisejí s jinými materiály procházející detektorem např. vzduchové bubliny, mikročasticové agregáty. Druhý detektor měří koncentraci prvního barviva uvnitř mikročastice a třetí měří koncentraci druhého vnitřního barviva. Integrace těchto údajů definuje a identifikuje mikročastici. Fotonásobič spojený se zeleným laserem poté měří intenzitu signálu na základě množství a obsahu barviva jednotlivých mikročastic. Existuje 100 různých typů kuliček, takže teoreticky můžeme analyzovat 100 analytů ve stejné jamce mikrotitrační destičky. [46]



Obr. č. 5 Popis detekce na přístroji [31]



Obr. č. 6 Mikročástice s navázanými protilátkami při průchodu lasery [33]

3.4.3 Výhody a přednosti xMAP technologie Luminex

Z malého množství vzorku je možné analyzovat až 100 analytů ve stejné jamce mikrotitrační destičky. Možnost stanovení většího počtu analytů odpovídá potřebám dnešní doby v různé škále aplikací, jako např. u autoimunitních onemocnění,

genetického onemocnění, infekčního onemocnění na molekulární úrovni, atd. xMAP technologie nám přináší více dat o pacientech v kratším časovém úseku v porovnání s imunochemickými metodami typu ELISA. [26]

3.4.4 Přístroje řady Luminex

Přístroje řady Luminex využívající xMAP technologii pracují s imunokomplexy nekompetitivního charakteru (sendvičová technika).

LUMINEX 200 je speciální průtokový cytometr, který byl vyvinut pro xMAP technologii.

Tento cytometr pracuje na principu flow (průtokové) buněčné fluorometrie a speciálně značených mikročastic. Jedná se o techniku, která umožňuje simultánní analýzu velkého počtu analytů v jednom vzorku (až 100 analytů). Takto lze měřit parametry jako osteopontin, resistin a adiponektin.

Součástí přístroje Luminex 200 jsou dvě fluidní cesty a vyhřívací blok, který umožňuje provádět analýzu při kontrolované teplotě. První fluidní cesta zajišťuje dávkování vzorku pomocí pipetoru (automatické dávkování vzorku). Nasávací mechanismus umožňuje transport vzorku do měřicí kyvety.

Při analýze pipetor dávkuje vzorky z klasické 96 jamkové mikrotitrační destičky, která je opatřena ve spodní části filtrační membránou. Následně jsou analyzované vzorky injektovány do měřicí kyvety. Filtrační membrána dovoluje provádět jednotlivé promývací kroky bez ztráty mikročastic odsáváním přes membránu s využitím vývěvy. Jako transportní médium slouží nosná tekutina Luminex xMAP, která transportuje vzorky do optické části přístroje. Pomocí této tekutiny jsou analyzované mikročastice před vstupem do detekční komory vedeny úzkou kapilárou v řadě za sebou, což umožňuje měření jednotlivých mikročastic. Analyzované mikročastice po průchodu kapilárou vstupují do detekční komory, kde jsou následně měřeny.

Optická část přístroje je složena ze dvou laserů. Červený laser o vlnové délce 635 nm podněcuje excitaci fluorescence v oblasti viditelného světla a tím identifikuje jednotlivé mikročastice se specificky navázaným antigenem, respektive protilátkou. Zelený laser s vlnovou délkou 532 nm excituje fluorofor navázaný na povrchu mikročastic xMAP.

Detektor diodového pole měří intenzitu záření barevně kódované směsi uvnitř mikročastic (určuje barvivo ze základní sady 100 barev) a fotonásobič detekuje intenzitu excitační energie molekuly navázané na povrch mikročastice. Vysokorychlostní digitální procesor a moderní počítačový algoritmus zajišťují analýzu mikročastic.

Po ukončení analýzy je cesta vzorku automaticky propláchnuta nosnou tekutinou Luminex xMAP s využitím druhé fluidní cesty. Pohyb této tekutiny pod tlakem odstraní zbytky [34] vzorku z hadiček, ventilů, pipetoru. Technologie Luminex

umožňuje měřit vzorky nepřetržitě po dobu 48 hodin bez doplnění kontejneru s nosnou tekutinou ($V=20\text{ l}$). [34]



Obr. č. 7 Příklad přístroje Luminex 200 [35]

V současné době je na trhu další přístroj řady Luminex **FLEXMAP 3D**. Systém sdílí společné prvky s přístrojem Luminex 200, avšak využívá polystyrénové mikročástice, které jsou vnitřně obarveny větším počtem fluorescenčních barviv o různých koncentracích. Další předností u přístroje FLEXMAP 3D je automatické nastavení výšky jehly, rychlejší měření díky zdvojené fluidní cestě a rychlejší pipetování. Taktéž je možno využít větších mikrotitračních destiček, které obsahují 384 jamek. V kombinaci s xMAP technologií může současně měřit až 500 analytů z jednoho vzorku. [26]



Obr.č. 8 *FLEXMAP 3D* [36]

3.5 Využití automatických biochemických analyzátorů při běžné biochemické analýze a imunoanalýze

3.5.1 Automatické imunochemické analyzátoary - ARCHITECT i 2000 SR

Spojení luminiscenčních technik a imunoanalýzy představují automatické imunochemické analyzátoary, na kterých se v současnosti provádí většina imunoanalytických metod v laboratorní medicíně. Tyto analyzátoary jsou na trhu značně rozšířené. Vyznačují se vysokou citlivostí, takže jsou pro stanovení analytů obsažených v biologických materiálech v nízkých koncentracích velmi vhodné. Nejrozšířenější jsou analyzátoary, jejichž detekce je založena na principu chemiluminiscence, případně fluorescence. [6,7]

Analyzátoary využívají **reakce antigen – protilátka** založené jak na **kompetitivním** tak i **nekompetitivním principu**. Rozšířenější než homogenní je heterogenní imunoanalýza, která pracuje se značenou protilátkou či antigenem. Detekce využívá vysoce citlivých reakcí jako chemiluminiscence, elektrochemiluminiscence, fluorescence. Oddělení komplexu antigen - protilátka se nejčastěji provádí separací na paramagnetických mikročasticích. Jde o oxidy železa, které vykazují magnetické vlastnosti. Na svém povrchu, který je mnohonásobně větší než stěny reakční nádoby, mají mikročastice vazebná místa pro navázání stanovovaných a značených analytů. Po proběhlé imunoanalytické reakci je třeba z reakční směsi odstranit pro detekci nepotřebné součásti. Působením magnetu se mikročastice s navázaným imunokomplexem během promývání přidržují na stěně reakční nádoby a nepotřebné součásti jsou odmyty. [6,7]

Příkladem imunoanalytického analyzátoru je modul **Architect i 2000 SR** od firmy Abbott, na kterém lze v rámci laboratorní medicíny analyzovat parametry jako kardiomarkery, myeloperoxidáza, natriuretické peptidy, hormony apod.



Obr. č. 9 *ARCHITECT i 2000 SR* [38]

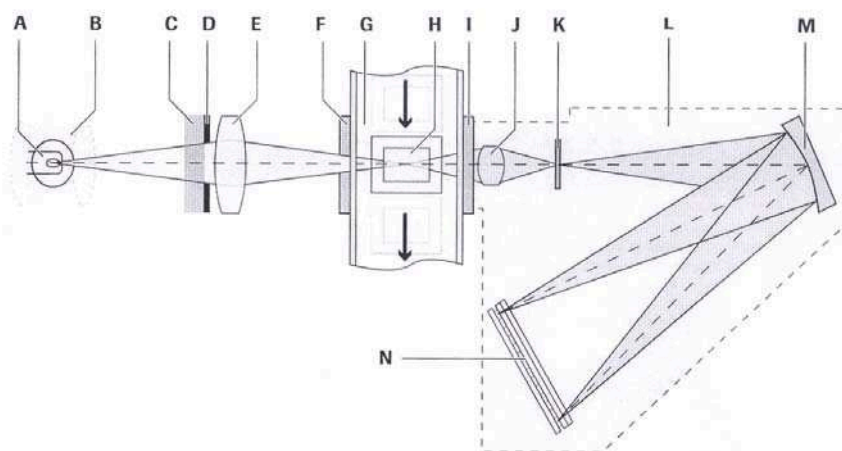
3.5.2 Využití fotometrie a imunoturbidimetrie na automatických biochemických analyzátořech

Na principech fotometrie a turbidimetrie (imunoturbidimetrie) pracují automatické biochemické analyzátoř. Na těchto analyzátořech se zpracovávají vzorky plazmy, séra a moče. [6,7]

3.5.2.1 Princip analyzátoř

Zdrojem světelného záření je většinou halogenová wolframová žárovka nebo xenonová výbojka, světelný paprsek spojitého spektra je po průchodu absorpčním prostředím (kyvetou) rozložen monochromátorem (optickou mřížkou) na paprsky s definovanou vlnovou délkou (monochromatické záření), které dopadají na detektor diodového pole (diode array). Změny absorbance reakční směsi v kyvetě jsou monitorovány (zaznamenávány) při každém průchodu kyvety paprskem optického

systemu. K transportu světelných signálů z místa, kde je měřena reakční směs, do detekční jednotky se využívají optická vlákna. [6,7]



Obr. č. 10 *Optická dráha fotometru modulu c501 systému Cobas 6000, Roche [39]*

Vysvětlivky:

A Lampa fotometru	F Štěrbina (vstupní)	K Štěrbina
B Vodní plášť	G Reakční lázeň	L Fotometr
C Filtr k eliminaci infračervené složky	H Reakční kyveta s obsahem	M Mřížka
D Masky	I Štěrbina (výstupní)	N Detektor
E Čočky kondenzoru	J Zobrazovací čočka	

Velká většina fotometrických testů využívá při výpočtu výsledků hodnot dvou vlnových délek tzv. bichromatickou analýzu. Jedna vlnová délka je v blízkosti vrcholu absorpance chromogenu vytvářeného při reakci, druhá vlnová délka je v oblasti, ve které daný chromogen vykazuje malou nebo žádnou absorpaci. Použitím rozdílu mezi odečty dvou vlnových délek (bichromatický systém) může být eliminován vliv interferencí a šumu fotometru, čímž se zlepšuje citlivost fotometru. [6,7]

3.5.2.2 Cobas 6000 a cobas 8000

Na výše uvedeném fotometrickém principu pracují např. klinické moduly analyzátorů cobas 6000 a cobas 8000 od firmy Roche. Slouží k analýze enzymů, lipidů (fotometrie), specifických proteinů (imunoturbidimetrie).



Obr. č. 11 *cobas 6000 od firmy Roche [37]*



Obr. č. 12 *cobas 8000 od firmy Roche*

4 STANOVOVANÉ PARAMETERY

4.1 Adiponektin

Adiponektin byl poprvé identifikován roku 1995 v tukové tkáni myši, o rok později v tukové tkáni a plazmě u lidské populace. Je to bílkovinný hormon produkováný buňkami tukové tkáně - adipocyty a poté postupně uvolňovaný do cirkulace. Skládá se z 244 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 30 kDa. Strukturně je molekula adiponektinu podobná molekulě kolagenu VIII a kolagenu X. Adiponektin působí pomocí svých specifických receptorů. Jedná se o receptory, které se vyskutují ve dvou izoformách AdipoR1 a AdipoR2. Tyto receptory jsou exprimovány v mnoha tkáních např. srdeční svalovina, makrofágy, aterosklerotické léze, β -buňky pankreatu. Receptor AdipoR1 se vyskytuje převážně v kosterních svalech, AdipoR2 v játrech. [10,11]

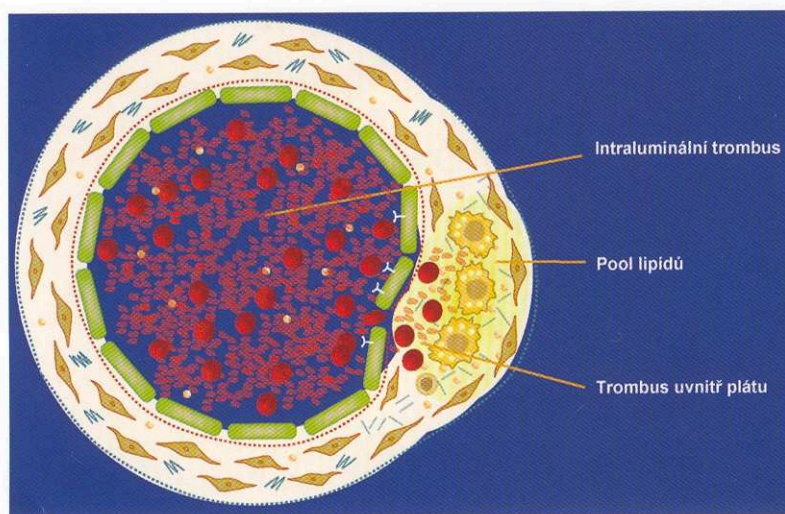
Funkce adiponektinu v organismu je velmi rozličná. Adiponektin potlačuje proliferaci a migraci hladkých svalových buněk a tím chrání organismus před rozvojem aterogenních změn, inhibuje přeměnu makrofágů v pěnové buňky. Adiponektin inhibuje zánětlivé procesy snížením exprese adhezivních molekul v buňkách endotelu a snížením produkce cytokinů v makrofázích. Podílí se na zvýšení β -oxidace ve svalech a pomocí tohoto zvýšení zlepšuje inzulínovou rezistenci ve svalech a játrech. Taktéž zvyšuje oxidaci mastných kyselin ve svalech a snižuje plazmatické hodnoty triacylglycerolů, glukózy a volných mastných kyselin v krvi. Obecně má adiponektin protizánětlivé, antiaterogenní a protiapoptické účinky a celkově ovlivňuje metabolismus. [10,11]

4.1.2 Adiponektin a ateroskleróza

Adiponektin působí jako protektivní faktor při iniciaci a progresi aterosklerózy díky svým protizánětlivým a protiaaterogenním vlastnostem. Nižší plazmatické hladiny adiponektinu se vyskytují u obézních jedinců, u pacientů s diabetem 2. typu, u pacientů s ischemickou chorobou srdeční. Fyziologická koncentrace adiponektinu se pohybuje v rozmezí 5 – 10 mg/l. [12]

Řada studií pojednává o úloze adiponektinu v souvislosti s aterosklerotickým onemocněním. Tento polypeptidický hormon je přítomný v krevním oběhu, představuje přibližně 0,01 % z celkové plazmatické bílkoviny. Hraje velmi důležitou roli při zánětu, v imunitním systému a při ateroskleróze. V cévní výstelce snižuje adhezi monocytů k endotelu, potlačuje transformaci makrofágů v pěnové buňky, brání proliferaci a migraci hladkých svalových buněk. Ateroskleróza je chronické degenerativní onemocnění cévní stěny. Ateroskleróza představuje jeden z nejvýznamnějších zdravotních problémů civilizace. [23] První změnou, která

předchází vzniku aterosklerotické léze je poškození cévního endotelu, což je způsobeno zánětlivými podněty. Dochází taktéž k přesunu hladkých svalových buněk do místa zánětu a k jejich proliferaci. Do cévní stěny začnou pronikat lipoproteiny, cholesterol, vazivové tkáně a další komponenty a následně dochází k jejich akumulaci. [7] Tento stav přechází do stádií, které se označují jako tukové proužky (vyskytují se již v dětském věku a jsou uloženy v intimě), ateromy – fibrózní pláty až po komplikované léze, které vznikají postupným ztvárňováním aterosklerotických plátů, jejich prasknutím a trombotizací. Ateroskleróza způsobuje postupné zužování až uzavření postižené cévy. Při prasknutí aterosklerotického plátu a následné trombotizaci dochází k uzávěru cévy. [29]



Obr. č. 13 *Ruptura aterosklerotického plátu a tvorba trombu* [42]

Experimentální studie prokázaly, že adiponektin se při poškození cévní výstelky akumuluje v subintimálním prostoru arteriální stěny. Bylo zjištěno, že adiponektin stimuluje produkci oxidu dusného v buňkách endotelu. [13]

Nižší hladiny adiponektinu byly stanoveny u pacientů s esenciální hypertenzí, s diabetem a u pacientů s koronárním arteriálním onemocněním (CAD). Plazmatická koncentrace adiponektinu je významně snížena u osob s ischemickou chorobou srdeční. Měření plazmatických koncentrací adiponektinu mohou být použity pro hodnocení rizika CAD a souviset s rozvojem akutního koronárního syndromu (AKS). [13]

Účelem další studie bylo prozkoumání účinků čtyř běžně používaných hypolipidemických medikamentů (statiny, fibráty, niacin, omega 3 - mastné kyseliny) na cirkulující koncentrace adiponektinu a resistinu, viz dále str. 21.

Medikamenty, které snižují hladiny sérových lipidů, mají velký vliv na sekreci proteinů, tyto proteiny - adipokiny jsou sekretovány pomocí tukové tkáně a hrají významnou roli při zánětlivých procesech. Skupina těchto jmenovaných medikamentů měla minimální vliv na koncentrace resistinu, zatímco koncentrace cirkulujícího adiponektinu se výrazně zvýšila vlivem každé skupiny léku. Největší efekt byl

pozorován pod vlivem niacinu. Prokázal se zde velmi silný vztah mezi redukcí lipidů a adiponektinu a užíváním těchto léků. [14]

Tuková tkáň je známá jako zdroj kalorií, její role jako endokrinní orgán nebyla oceněna až do doby popsání leptinu a adiponektinu v polovině 90. let. Od té doby bylo ve světě identifikováno více než 100 adipokinů v tukové tkáni. [14]

Hydrofilita statinů, jejich druh a velikost částice adiponektinu hraje velkou roli v účinnosti léčby. Její výsledky prokázaly, že medikamenty ze skupiny fibrátů zvyšují HMW (high molecular weight) adiponektin, nikoliv celkový adiponektin. Niacin se ukázal jako velmi robustní a konzistentní. Celková hladina adiponektinu se zvýšila díky léčbě niacinem o 54%. Také omega-3- mastné kyseliny vedly ke zvýšení celkového adiponektinu. [14]

U diabetických pacientů byla sledována korelace adiponektinu s HDL (high density lipoproteins) cholesterolem, triacylglyceroly (TG), C-reaktivním proteinem (CRP) a body mass indexem (BMI), tato studie zjistila, že adiponektin má vztah k zánětlivým markerům prostřednictvím obezity. U pacientů, kteří podstoupili léčbu Atorvastinem, nedošlo k poklesu adiponektinu ani resistinu. Je potvrzena pozitivní korelace adiponektinu s HDL cholesterolem. [15] Bylo taktéž prokázáno, že plazmatické koncentrace adiponektinu byly signifikantně nižší u pacientů s ischemickou chorobou srdeční ve srovnání se skupinou kontrolních subjektů (zdraví jedinci). Tyto klinické studie naznačují, že adiponektin moduluje endoteliální zánětlivou reakci a měření plazmatických hladin adiponektinu mohou být užitečná při posuzování rizika CAD. [27]

4.1.3 Možnosti stanovení adiponektinu

Jednou z možností stanovení hladiny adiponektinu je využití xMAP technologie LUMINEX. Vzoroky séra nebo plazmy mohou být analyzovány pomocí komerčně dostupného kitu vyrobeného společností Millipore Corporation, další společností je např. Bio-Rad spol. s r. o. Další způsobem stanovení adiponektinu je využití sendvičové techniky ELISA. Dodavatel komerčních kitů ELISA je např. firma BioVendor Laboratory Medicine, ČR nebo RIA kit dodává firma Linco Research.

4.2 Resistin

Resistin byl poprvé objeven roku 2001. Skládá se ze 108 aminokyselin. Je to endokrinní hormon vylučovaný výhradně tukovými buňkami. Resistin je velmi bohatý na aminokyselinu cystin. Molekulová hmotnost resistinu je 12,5 kDA. [16]

4.2.1 Resistin ve spojení s aterosklerotickým onemocněním

Resistin je považován za jeden z hlavních mediátorů kardiovaskulárního onemocnění. Hraje důležitou roli v patogenezi aterosklerózy, objevuje se především v zánětlivých buňkách. Vyvolává zvýšení adhezivních molekul ve vaskulárních endotelových buňkách, které se zásadně podílí na počátečním stadiu aterosklerotických změn. Resistin podporuje proliferaci další adhezivní molekuly VSMC (vascular smooth muscle cell), která podporuje tvorbu pěnových buněk. Zvýšená hladina resistinu koreluje s Lp-PLA₂ (fosfolipáza A2 asociovaná s lipoproteiny). [16]

Byly provedeny řady studií, u hlodavců se resistin vyskytuje v tukové tkáni a reguluje metabolismus glukózy a citlivost na inzulín, u lidí je detekován převážně v zánětlivých buňkách. V roce 2005 byla publikována studie, která se zabývala plazmatickými hladinami resistinu ve spojitosti se zánětlivými markery a ischemickou kalcifikací. U 879 pacientských sér byly změřeny hladiny koncentrací resistinu a zánětlivých markerů např. IL-6 (Interleukin-6), ICAM (Intercellular Adhesion Molecule 1), TNF (Tumor necrosis factor) a Lp-PLA₂. Ukázalo se, že hodnoty resistinu korelují s těmito zánětlivými markery a předpovídají koronární aterosklerózu u lidí, nezávisle na CRP. [17]

Resistin může být regulován zánětlivými signály. S poruchou imunity a taktéž s chronickým zánětem souvisejí obezita a diabetes 2. typu, což může také vysvětlit zvýšenou hladinu resistinu u takto nemocných. [17] V poslední době bylo zjištěno, že vysoké koncentrace resistinu způsobují vaskulární endoteliální dysfunkci a proliferaci buněk hladkého svalstva. Bylo zkoumáno vylučování resistinu z buněk makrofágů v místě aterosklerotického plátu a jeho vliv na vaskulární funkci buněk u lidské populace. Koncentrace resistinu u těchto studií byly podstatně vyšší než fyziologické koncentrace, které dosahují hodnot pod 20 ng/ml. Předpokládá se, že resistin hraje potencionální roli v procesu aterogeneze, je sekretován z makrofágů aterosklerotických tepen a může zásadně ovlivnit vaskulární buněčnou funkci a přispět tak k ateroskleróze. Na základě této hypotézy byly zkoumány makrofágy, které byly infiltrovány do aterosklerotické tepny a resistin vylučovaly místně. [18]

Odpověď resistinu na statinovou léčbu je kontroverzní. Ve většině studií se uvádí, že jeho koncentrace nebyla výrazně ovlivněna – po osmitýdenní terapii se jeho koncentrace snížila o 20% či ještě méně. Studie, které se zabývaly vlivem niacinu na pokles koncentrace resistinu, nezjistily žádný významný účinek tohoto medikamentu. [14]

4.2.2 Možnosti stanovení resistinu

Resistin lze stanovit imunoanalytickou metodou ELISA. Komerční soupravu ELISA poskytuje např. firma Biovendor Laboratory Medicine, ČR. Další možností stanovení resistinu je využití xMAP technologie LUMINEX. Vzorky séra nebo plazmy mohou

být analyzovány pomocí komerčně dostupného kitu vyrobeného společností Millipore Corporation, další společností je např. Bio-Rad spol. s. r. o.

4.3 Osteopontin

Osteopontin je hydrofilní, extracelulární protein. Skládá se přibližně z 300 aminokyselin a je vylučován do všech tělních tekutin. Je syntetizován různými typy tkání, kostními buňkami, makrofágy, kosterními svaly, hladkým svalstvem atd. Syntéza osteopontinu je stimulována prostřednictvím Calcitriolu (1,25-dihydroxyvitamin D₃). Funkce osteopontinu v organismu je různorodá. Osteopontin je velmi důležitým faktorem při remodelaci kostí. Má velký význam při ukotvení kostních buněk - osteoklastů na minerální matrix kostí. Účastní se v procesu mineralizace kostí, buněčné adhezi, buněčné migraci. [20]

Osteopontin je produkován buňkami imunitního systému, včetně makrofágů, neutrofilů, dendritických buněk, T a B lymfocytů, hladkými svalovými buňkami. Má chemotaktické vlastnosti, funguje také jako adhezivní bílkoviny, které se uplatňují při hojení ran. [20]

Osteopontin se nachází nejenom v kostní matrix, mléce, moči, plazmě, ale také v maligní a aterogenní tkáni a aterosklerotických plátech. [28]

4.3.1 Osteopontin a jeho význam při aterogenezi

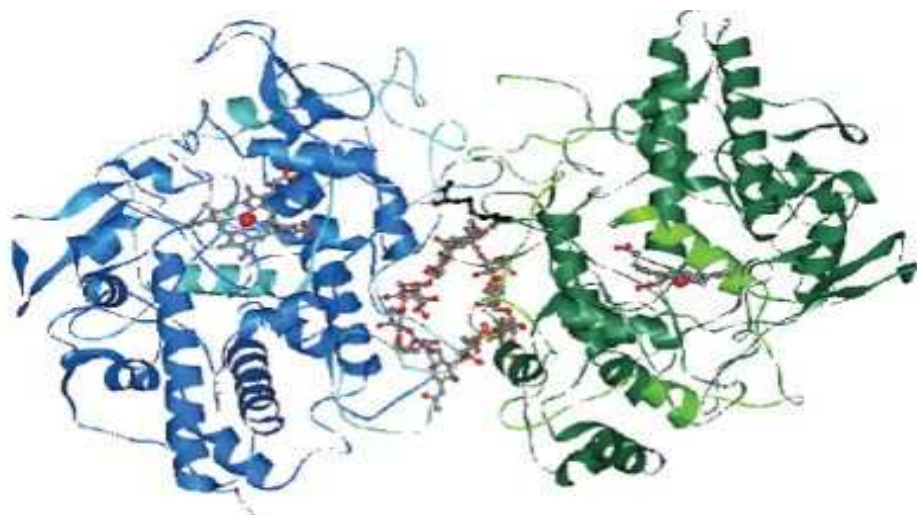
Osteopontin se vyskytuje v oblastech dystrofické kalcifikace, která je spojena s degenerativním, aterosklerotickým cévním onemocněním. [20] Osteopontin je zapojen do zánětlivých procesů, jeho vyšší koncentrace hrají roli při aterogenezi arteriální stěny a mohou vést k potenciální ruptuře aterosklerotického plátu. Dalším vysvětlením zvýšených hladin osteopontinu u kardiologických onemocnění je možná koronární kalcifikace arteriální stěny. Navíc současné nálezy naznačují souvislost mezi zánětem a kalcifikací. U pacientů se stabilní anginou pectoris, kteří užívali statiny, došlo k poklesu koncentrace osteopontinu. Fyziologická koncentrace osteopontinu u zdravých osob je do 1,2 ng/l. [21]

4.3.2 Možnosti stanovení osteopontinu

Jedním ze způsobů stanovení hladiny osteopontinu je využití xMAP technologie LUMINEX. Vzorky séra nebo plazmy mohou být analyzovány pomocí komerčně dostupného kitu vyrobeného společností Millipore Corporation, další společností je např. Bio-Rad spol. s. r. o. Další možností pro stanovení osteopontinu je využití sendvičové techniky ELISA. Dodavatelem komerčních ELISA kitů je firma Biovendor Laboratory Medicine, ČR.

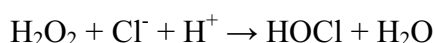
4.4 Myeloperoxidáza

Myeloperoxidáza (MPO) je enzym, který obsahuje molekuly hemu. Tento hemoprotein se vyskytuje v leukocytech - v granulech neutrofilů, monocytů a makrofágů. Z těchto buněk je MPO uvolňována v místě zánětlivého procesu. Je to silně bazofilní protein o molekulové hmotnosti 150 kDa, strukturou je tetramer, který je tvořen párem identických dimerů spojených disulfidickým můstkem. MPO se významně uplatňuje v procesu destabilizace aterosklerotického plátu. [22]

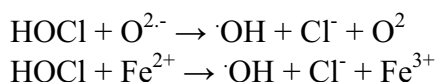


Obr. č. 14 *Struktura MPO* [40]

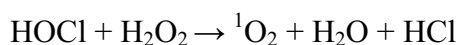
Aktivace leukocytů způsobí sekreci MPO a ta katalyzuje vznik kyseliny chlorné z peroxidu vodíku a chloridových iontů.



Z kyseliny chlorné mohou vznikat velmi účinné oxidačně působící látky. Reakcí se superoxidem nebo s ionty dvojmocného železa tak může vzniknout ještě reaktivnější hydroxylový radikál:



Při reakci HOCl s peroxidem vodíku může vzniknout nebezpečný singletový kyslík, který představuje další aktivní formu kyslíku:



Tyto produkty vyvolávají oxidační poškození právě v místě zánětu arteriální stěny. [22]

4.4.1 Myeloperoxidáza a aterosklerotické onemocnění

Bylo prokázáno, že MPO se akumuluje v aterosklerotických plátech a vzniklé oxidační produkty se zásadně podílí na nestabilitě plátů a přispívají k jejich ruptuře při ateroskleróze a při onemocněních koronárních arterií. [41]

Řada klinických studií prokázala, že měření koncentrací MPO je velmi důležité pro stratifikaci rizika u pacientů s akutním koronárním syndromem (AKS). Zvýšené koncentrace předpovídaly riziko infarktu myokardu u pacientů přijatých s bolestí na hrudi.

Nejnovější studie poukazují na roli MPO jako prediktoru onemocnění koronárních arterií, MPO může hrát značnou roli jako časný marker zánětu. MPO je prediktorem rizika kardiovaskulárních nemocí a umožňuje identifikovat pacienty s rizikem srdečních příhod při absenci nekrotického ložiska. Cut off hodnoty MPO pro muže jsou 354 pmol/l a pro ženy 247 pmol/l. [41]

4.4.2 Možnosti stanovení MPO

4.4.2.1 Stanovení koncentrace MPO na imunochemickém modulu automatického analyzátoru ARCHITECT i 2000 SR

Jedná se o chemiluminiscenční, heterogenní sendvičovou imunoanalýzu na mikročasticích. Metoda ARCHITECT MPO je dvoukroková imunoanalýza, která slouží ke kvantitativnímu stanovení MPO v lidské plazmě. Využívá technologii chemiluminiscenční analýzy na mikročasticích.

Princip:

Systém měří kvantitativní množství světla emitované během chemiluminiscenční reakce, pevnou fází tvoří paramagnetické částice, značkou je akridinium ester - chemiluminiscenční látka, která emituje světlo při oxidaci H_2O_2 v alkalickém prostředí v přítomnosti detergentu (Tritin X-100). Reakce probíhá během jedné sekundy a je velice citlivá (10^{-15}). [41]

4.4.2.2 Imunochemické stanovení koncentrace MPO založené na principu ELISA

Monoklonální anti-MPO protilátka je vázána na povrch jamek mikrotitrační destičky. Po přidání séra (plazmy) se naváže MPO na tuto protilátku; následuje promytí a přidání druhé monoklonální anti-MPO protilátky, zaměřené proti jiné antigenní determinantě enzymu a značené křenovou peroxidázou. Jedná se o sendvičovou metodu, aktivita peroxidázy měřená po přidání substrátu je přímo úměrná množství MPO ve vzorku. [22]

4.5 Lp-PLA₂

Lp-PLA₂ je fosfolipáza A₂ asociovaná s lipoproteiny. Poprvé byla izolována roku 1995

v lidské plazmě. Považuje se za cirkulující biomarker, který je součástí zánětlivého onemocnění. Její molekulová hmotnost je 45 kDa. Jde o sérinovou lipázu nezávislou na kaliu. Lp-PLA₂ je vázána na lipoproteiny s nízkou hustotou a vyskytuje se v séru i plazmě. Lp-PLA₂ cirkuluje vázána na LDL (low density lipoproteins)-cholesterol z 80%, na HDL-cholesterol z 20% a dále na Lp(a) (lipoprotein (a)) a ostatní lipoproteiny. [23,24]

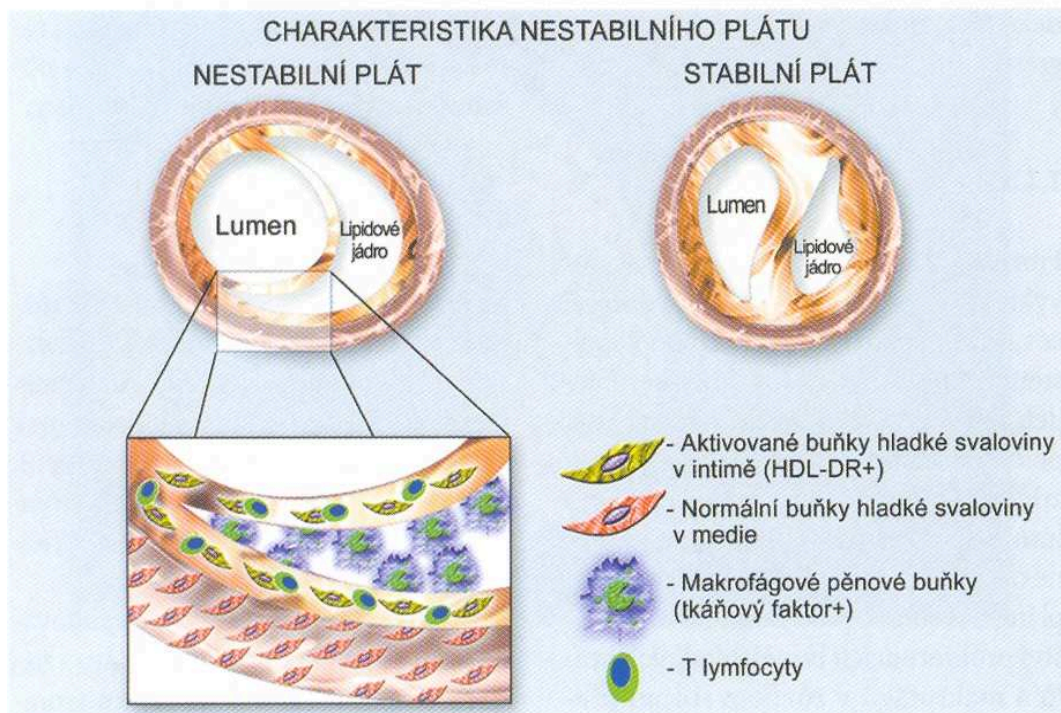
Lp-PLA₂ je enzym produkovaný makrofágy a pěnovými buňkami ve vaskulární intimě. Jeho fyziologickým účinkem je hydrolýza oxidovaných fosfatidylcholinů za vzniku lysofosfatidylcholinů a oxidovaných volných mastných kyselin. Podílí se na kaskádě zánětu, který probíhá v aterosklerotickém plátu. Lp-PLA₂ je produkována pouze místně v aterosklerotickém plátu a je tudíž velmi specifická. Zvýšená aktivita tohoto enzymu podporuje rupturu aterosklerotického plátu a uvolňuje ho do krevního řečiště. [23,24]

4.5.1 Lp-PLA₂ a ateroskleróza

Klinické studie prokázaly, že u 76% náhlých kardiovaskulárních úmrtí došlo k ruptuře aterosklerotického plátu a jen u 24% bylo příčinou úmrtí zúžení lumen postižené cévy. Zvýšené hladiny cholesterolu byly zjištěny pouze u 50% pacientů s koronárním onemocněním. [23]

Řada studií prokázala, že Lp-PLA₂ je nezávislým prediktorem zvýšeného kardiovaskulárního rizika i po adjustaci na tradiční rizikové faktory a hs-CRP (high sensitivity-CRP). Za zvýšené jsou považovány hodnoty Lp-PLA₂ > 200–235 ng/ml. Koncentrace Lp-PLA₂ jsou ovlivněny terapií statiny. V současné době jsou k dispozici inhibitory Lp-PLA₂, které jsou ve stádiu klinického hodnocení, aby se zjistilo, zda je možné ovlivnit kardiologické riziko. Takovým selektivním inhibitorem aktivity Lp-PLA₂ je Darapladib. V současné době je testován ve velké morbiditní a mortalitní studii STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy), která by mohla prokázat důležitou roli tohoto nového rizikového faktoru v procesu aterogeneze. [24]

V řadě studií byl prokázán účinek podání statinů na aktivitu Lp-PLA₂. Léčba statiny vedla k poklesu aktivity Lp-PLA₂ o 20 – 26 %, který koreloval s poklesem LDL-cholesterolu. K poklesu aktivity Lp-PLA₂ dochází především tím, že 80 % aktivity Lp-PLA₂ je navázáno na LDL částice. Dojde-li ke snížení koncentrace Lp-PLA₂, lze očekávat, že se zvýší stabilita aterosklerotického plátu pacienta a tím se zlepší i jeho prognóza. [19,24]



Obr. č. 15 Charakteristika stabilního a nestabilního plátu [42]

4.5.2 Možnosti stanovení Lp-PLA₂

4.5.2.1 Stanovení koncentrace Lp-PLA₂ imunoturbidimetrickou metodou

Jedná se o imunoturbidimetrické kvantitativní stanovení hladiny Lp-PLA₂, pomocí soupravy PLAC test od firmy diaDexus.

Princip:

V lidské plazmě či séru jsou pro přímé stanovení koncentrace Lp-PLA₂ využívány dvě vysoce specifické protilátky (2C10 a 4B4). Lp-PLA₂ reaguje s těmito specifickými monoklonálními protilátkami, které jsou vázané na polymerní mikročástice. Po navázání Lp-PLA₂ dochází v suspenzi ke vzniku zákalu a tím ke změně absorbance při 570 nm. Změna absorbance odpovídá koncentraci Lp-PLA₂, která se vyhodnotí z kalibrační křivky. Tato metoda při stanovení opakovatelnosti (počet měření bylo 20) kontrolních materiálů QC 1 a QC 2 vykazovala CV 1,1% u QC 1 a CV 0,9% u QC 2. Reprodukovatelnost s CV 3,1% u QC 1 a CV 3,5% u QC 2. [23]

4.5.2.2 Stanovení koncentrace Lp-PLA₂ metodou ELISA

Jde o sendvičovou imunoanalýzu, která využívá dvou vysoce specifických monoklonálních protilátek. Jedná se o přímé stanovení koncentrace Lp-PLA₂ v séru či plazmě.

Princip:

Souprava ELISA používá monoklonální protilátku 2C10 namířenou proti Lp-PLA₂. Tato protilátka 2C10 je v pevné fázi ukotvena na mikrotitrační destičce. Vzorky jsou pipetovány do jamek mikrotitrační destičky a inkubovány po dobu 10 minut při teplotě 20 – 26 °C. Druhá monoklonální protilátka 4B4 značená křenuvou peroxidázou je přidána do jamek mikrotitrační destičky a reaguje s imobilizovaným antigenem při teplotě 20 – 26 °C po dobu 180 minut. Molekula Lp-PLA₂ je zachycena mezi pevnou fází a označenou protilátkou (technika sendvič). Jamky mikrotitrační destičky se promyjí promývacím roztokem. V následujícím kroku se do jamek přidá substrát tetramethylbenzidin a následuje 20 minutová inkubace při teplotě 20 – 26 °C, kdy vzniká modré zbarvení. Reakce je zastavena pomocí stop činidla. Tím dochází ke změně zbarvení. Změna absorbance je měřena spektrofotometricky při 450 nm a je přímo úměrná koncentraci Lp-PLA₂. [43]

4.5.2.3 Stanovení koncentrace Lp-PLA₂ enzymatickou metodou

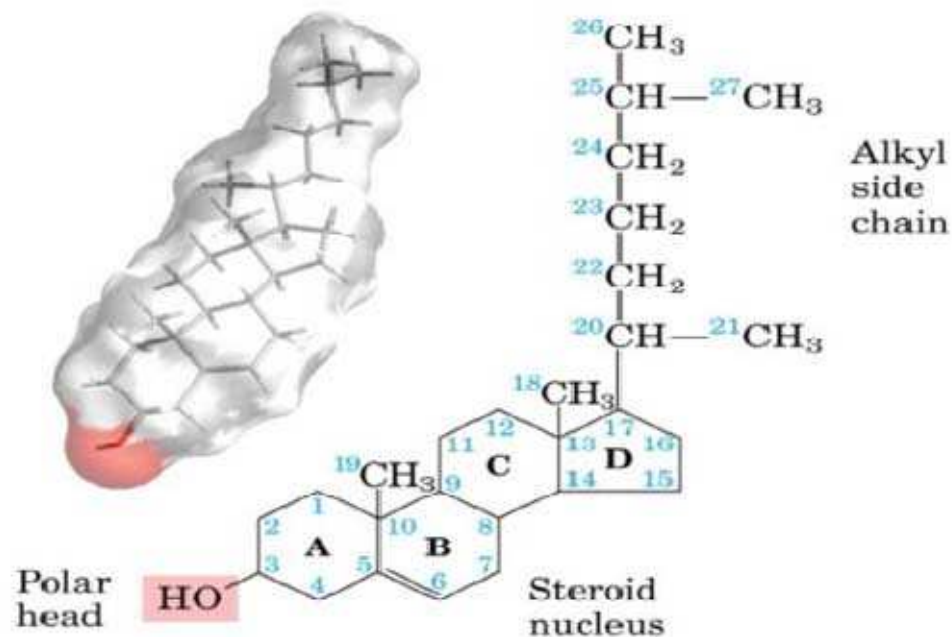
Jedná se o enzymatické stanovení koncentrace Lp-PLA₂ v séru či plazmě pomocí reagenčního setu firmy diaDexus.

Princip:

Lp-PLA₂ v séru či plazmě hydrolyzuje substrát fosfatidylcholin a produkuje barevný produkt 4- nitrofenol. Vzniklý 4- nitrofenol se spektrofotometricky stanovuje při vlnových délkách 410 a 520 nm. [43]

4.6 Cholesterol

Cholesterol patří mezi steroidy a je základní součástí buněčných membrán. Patří mezi základní zdroje pro syntézu steroidních a pohlavních hormonů, žlučových kyselin a krevních lipoproteinů. Významně se podílí na mezibuněčné komunikaci - přenos nervových vzruchů, buněčných signálů a intracelulární transport. Je složen z polární a nepolární části. Polární část obsahuje hydroxylovou skupinu a díky této skupině je rozpustná ve vodě. Nepolární část je složena ze steroidního jádra a uhlovodíkového řetězce. Cholesterol má sekundární hydroxylovou skupinu na uhlíku C3. [25]



Obr. č. 16 *Struktura cholesterolu [44]*

Cholesterol je syntetizován v mnoha tkáních, nejvíce však v játrech a ve stěně tenkého střeva. Denní bilance cholesterolu je asi 500 mg – příjem potravou a syntéza v játrech. Stejně množství se ztrácí stolicí. Cholesterol je v játrech metabolizován na žlučové kyseliny nebo je v nezměněné podobě vylučován do žluče. V lidské plazmě se cholesterol vyskytuje volný a esterifikovaný. Esterifikovaný cholesterol ve vazbě na mastnou kyselinu je transportní a zásobní formou cholesterolu. Jeho hladina se v krvi nestanovuje. [7]

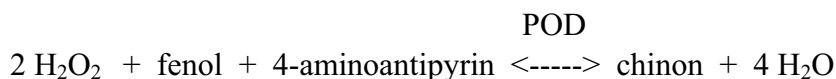
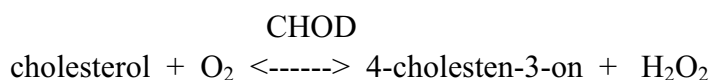
Stanovení cholesterolu je důležité pro hodnocení rizika aterosklerózy, diagnostiky a léčby onemocnění, se zvýšenou hladinou cholesterolu jako u metabolických poruch lipidů či lipoproteinů. Referenční meze celkového cholesterolu pro dospělé: 2,9 - 5,0 mmol/l. [7]

4.6.1 Možnosti stanovení cholesterolu

4.6.1.1 Enzymatická, fotometrická metoda

Princip:

Estery cholesterolu jsou štěpeny cholesterolesterázou na volný cholesterol a mastné kyseliny. Cholesteroxidáza pak katalyzuje oxidaci cholesterolu na cholest-4-en-3-on a peroxid vodíku. V přítomnosti peroxidázy (POD) vytváří peroxid vodíku při oxidační kopulaci fenolu a 4-aminoantipyrinu (4-AAP) červené chinoniminové zbarvení.



Intenzita vzniklého zbarvení je přímo úměrná koncentraci cholesterolu. Stanovení se provádí fotometricky při vlnové délce 700 a 505 nm. [45]

4.7 HDL-cholesterol

Jedná se o cholesterol, který je nesen v lipoproteinech o vysoké hustotě (high density lipoproteins). Jeho funkcí je transport nadbytečného cholesterolu do jater, odtud je ho velká většina vyloučena do žluče. HDL částice jsou produkovány játry a méně pak střevem. Čím vyšší jsou hladiny HDL-cholesterolu, tím vyšší je ochranný účinek proti koronárním onemocněním. Nízké hladiny HDL-cholesterolu spolu s vyšší hladinou triacylglycerolů poukazují na vyšší riziko kardiovaskulární choroby. Referenční meze HDL-cholesterolu jsou pro muže 1,0 – 2,1 mmol/l, pro ženy 1,2 - 2,7 mmol/l. [7]

4.7.1 Možnosti stanovení HDL-cholesterolu

4.7.1.1 Homogenní enzymatické fotometrické stanovení

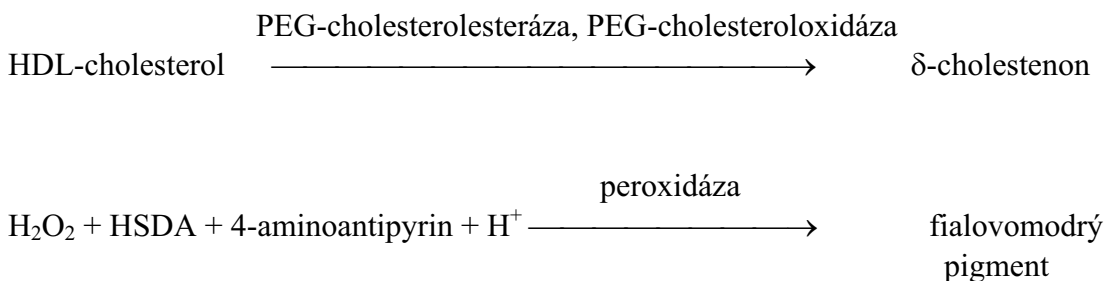
Princip:

V přítomnosti ionů hořčíku a dextransulfátu se vytváří ve vodě rozpustné komplexy s LDL (low density lipoproteins), VLDL (very low density lipoproteins) a chylomikrony, které jsou rezistentní vůči polyetylénglykolu (PEG) modifikovaným enzymům. Koncentrace HDL-cholesterolu je stanovena enzymaticky cholesterolesterázou a cholesteroxidázou s PEGem navázaným na aminoskupiny (přibližně 40 %). [45]

Estery cholesterolu jsou kvantitativně štěpeny cholesterolesterázou na volný cholesterol a estery. V přítomnosti kyslíku je cholesterol oxidován cholesteroxidázou na

Δ^4 -cholestenon a peroxid vodíku. V přítomnosti peroxidázy reaguje vytvořený peroxid vodíku s 4-aminoantipyrinem a HSDA [N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimetyoxyanilin sodný] za tvorby nachově modrého zbarvení. Vzniká fialovomodrý pigment, který se fotometruje při vlnové délce 700 a 600 nm a jehož koncentrace je úměrná

HDL-cholesterolu. [45]



4.8 LDL-cholesterol

Jde o cholesterol, který je nesený v lipoproteinech o nízké hustotě (low density lipoproteins). Hraje klíčovou roli v procesech souvisejících s rozvojem aterosklerózy. Za účasti lipolytických enzymů LDL částice vznikají přeměnou z částic lipoproteinů s velmi nízkou hustotou. Tyto částice jsou syntetizovány v játrech. Odstranění LDL-cholesterolu z plazmy se uskutečňuje v buňkách jaterního parenchymu prostřednictvím specifických receptorů. Velká většina cholesterolu, který je deponován v aterosklerotických plátech, pochází z LDL-cholesterolu. [7]

Hladina LDL-cholesterolu je specifický ukazatel pro aterosklerotické onemocnění.

Terapie, jejímž úkolem je snížení tuků, se zaměřuje primárně na redukci LDL-cholesterolu. To se projeví zlepšením funkce endotelu, prevencí aterosklerózy a rovněž

utlumením jejího postupu a prevencí ruptury aterosklerotických plátů. Optimální hodnota LDL-cholesterolu v krvi je 1,2 – 3,0 mmol/l pro osoby bez známek nebo komplikací aterosklerózy. U osob s aterosklerotickým onemocněním je horní hranice snižena, hladina LDL-cholesterolu by měla být menší než 2,0 mmol/l. [7,45]

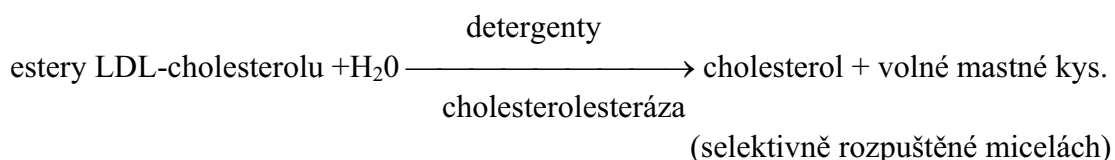
4.8.1 Možnosti stanovení LDL-cholesterolu

4.8.1.1 Homogenní enzymatické fotometrické stanovení

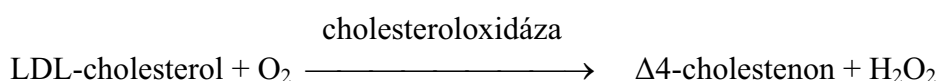
Princip:

LDL-cholesterol v prvním stupni reaguje s "ochraným" činidlem, které ho chrání před účinkem enzymů. Enzymatická reakce cholesterolesterázy a cholesteroxidázy proběhne pouze s cholesterolem v částicích HDL, VLDL a chylomikronech. Vzniklý peroxid vodíku je odstraněn katalázou. Ve druhém stupni se zruší účinek chránícího činidla a inaktivuje se kataláza. Cholesterolesteráza a cholesteroxidáza poté reagují pouze s

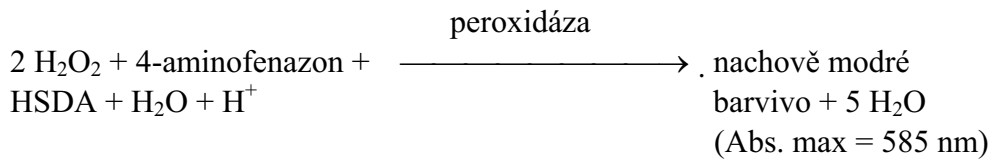
LDL-cholesterolem za tvorby peroxidu vodíku, který se dále stanovuje oxidační kopulací s 4-aminofenazonem a HSDA za katalýzy peroxidázou. Vzniká modrý komplex, který se stanoví fotometricky při 600 nm a jeho koncentrace je úměrná LDL-cholesterolu. [45]



Estery cholesterolu jsou kvantitativně štěpeny cholesterolesterázou na volný cholesterol a estery.



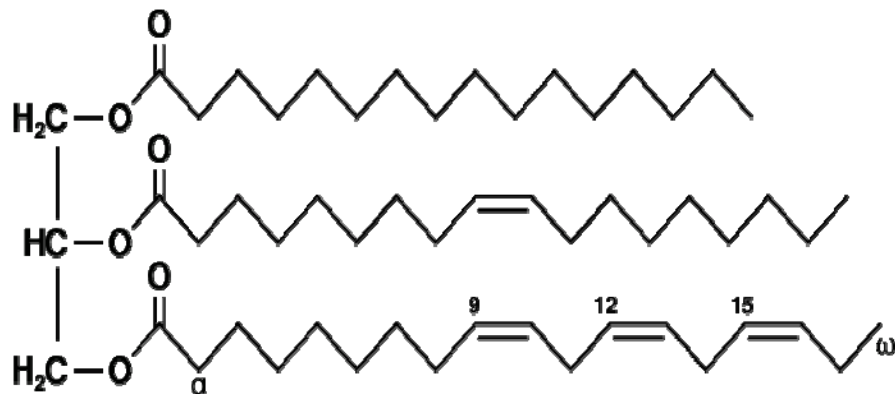
Za přítomnosti kyslíku je cholesterol oxidován cholesteroxidázou na Δ^4 -cholestenon a peroxid vodíku.



V přítomnosti peroxidázy reaguje vytvořený peroxid vodíku s 4-aminoantipyrinem a HSDA za vzniku nachově modrého zbarvení. [45]

4.9 Triacylglyceroly

Triacylglyceroly jsou estery glycerolu, alkoholu s třemi hydroxylovými skupinami, na které jsou připojeny tři mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Esterové vazby se tvoří mezi glycerolem a každou z mastných kyselin. Na tyto vazby působí enzym pankreatická lipáza, která hydrolyzuje tyto vazby a dochází k uvolňování mastných kyselin. Délka řetězců mastných kyselin může být rozdílná v přirozeně se vyskytujících triacylglycerolech, nejčastěji jsou to řetězce s 16, 18 či 20 atomy uhlíku.



Obr. č. 17 *Triacylglyceroly* [48]

Triacylglyceroly hrají velmi důležitou roli v metabolismu jako zdroj energie, transportní funkce výživového tuku. Energeticky jsou daleko více bohatší než bílkoviny či sacharidy. Zdrojem triacylglycerolů je potrava a syntéza probíhající v játrech, střevní sliznici, tukové tkáni. Zdrojem pro syntézu triacylglycerolů v játrech, jsou všechny ostatní energetické substráty jako jsou např. bílkoviny, glukóza, glycerol a mastné kyseliny, alkohol. Mezi jeho další funkce patří regulace tělesné teploty, strukturální význam (př. pouzdro kolem ledviny, apod.) Stanovení hladiny triacylglycerolů se využívá v diagnostice a léčbě pacientů s DM, jaterní obstrukcí, poruchami lipidového metabolismu a také u endokrinologických poruch.

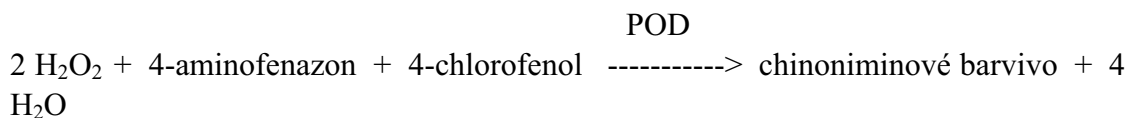
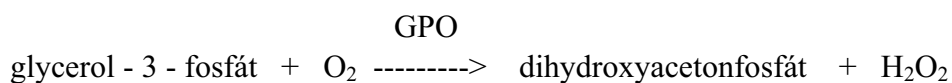
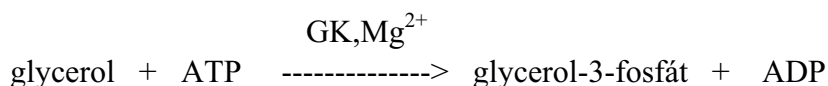
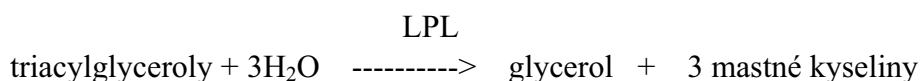
Optimální hladina triacylglycerolů v krevní plazmě je 0,45 - 1,7 mmol/l. [7,45,48]

4.9.1 Možnosti stanovení triacylglycerolů

4.9.1.1 Enzymatické, fotometrické stanovení

Princip:

Triacylglyceroly jsou hydrolyzovány lipoproteinovou lipázou (LPL) na glycerol a volné mastné kyseliny. Glycerol je fosforylován glycerolkinázou (GK) za vzniku glycerol-3-fosfátu, který je v následující reakci oxidován glycerolfosfátoxidázou (GPO). Produktem oxidace je H_2O_2 , který reaguje s 4-aminofenazonem a 4-chlorfenolem za vzniku červeného chinoniminového barviva, reakce je katalyzována peroxidázou (POD) Trinderova reakce. Absorbance se měří při 505 a 700 nm. [45]



5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

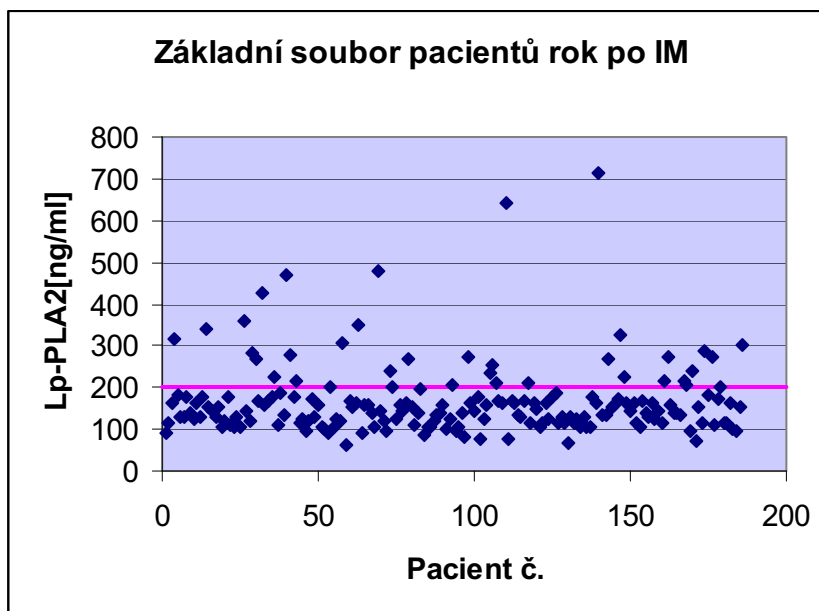
5.1 Soubor pacientů a kontrolní skupiny

V rámci této diplomové práce jsme ve spolupráci s koronární klinikou FN Brno provedli klinickou studii. K dispozici jsme měli **soubor pacientů** po prodělaném infarktu myokardu (IM). Tento soubor zahrnoval 186 pacientů, ve věku 41 až 90 let. Pacienti byli vyšetřeni těsně po IM a pak po roce, kdy byla změřena kromě běžných parametrů také koncentrace Lp-PLA₂. Na základě výsledků koncentrace Lp-PLA₂ byl vybrán užší soubor 26 pacientů s Lp-PLA₂ >200 ng/ml (cut off hodnota pro vyšší riziko aterosklerózy), se kterým jsme nadále pracovali. U tohoto souboru byly po dalších třech měsících následně změřeny hodnoty níže uvedených parametrů a současně indikoval kardiolog u těchto pacientů navýšení dávek statinů (medikamenty ke snížení lipidů). Po třech měsících agresivnější léčby byly zvolené parametry analyzovány opětovně, avšak dostavilo se pouze 22 pacientů.

Jednalo se o stanovení adiponektinu, resistinu, osteopontinu, myeloperoxidázy, Lp-PLA₂, a lipidový soubor (CHOL, TG, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol).

Počet stanovení jednotlivých analyzovaných parametrů byl limitován finančními prostředky, které byly pro tuto práci k dispozici.

U všech pacientů zařazených do testování byl předem získán informovaný souhlas.



Obr. č. 18 Grafické zobrazení koncentrace Lp-PLA₂ u základního souboru pacientů rok po IM U vzorků pacientů po IM s hodnotou Lp-PLA₂ >200 ng/ml (nad růžovou čarou), byly analyzované parametry uvedené v této práci

Tabulka č. 1 *Charakteristika pacientů, u kterých bylo provedeno měření nových i běžných biomarkerů*

N=22		N(%) průměr (95% CI)
pohlaví	muži	18 (81,8%)
	ženy	4 (18.2%)
věk		60 (57; 64)
BMI		26.5 (24.9; 28.1)
DM (diabetes mellitus)		
Ne		19 (86.4%)
Ano		3 (13.6%)

Parametry pohlaví a DM jsou popsány aritmetickým průměrem a procentuálním zastoupením. Parametry věk a BMI jsou popsány aritmetickým průměrem a intervalem spolehlivosti.

N - počet vzorků

95% Interval spolehlivosti (95% CI) - s 95% jistotou můžeme říct, že při opakovaném experimentu bude průměr naměřených hodnot ležet v rozmezí tohoto intervalu.

Zdravá - kontrolní skupina (jedinci) zahrnovala 30 osob ve věku 32 – 59 let, s počtem 23 žen a 7 mužů.

V dnešní době představuje infarkt myokardu celosvětový problém, ve více než 95% je hlavní příčinou IM koronární ateroskleróza s rupturou a trombózou v místě aterosklerotického plátu. Řada možných parametrů pro monitorování aterosklerózy představuje ve světě nevyřešenou problematiku.

Jedním z hlavních cílů této práce je vyzkoušet nové parametry předpovídající aterosklerotické onemocnění ve spojitosti s IM - **adiponektin, resistin, osteopontin, Lp-PLA₂**. Taktéž jsme chtěli zjistit, jak se tyto parametry změní u pacientů po zvýšení dávky statinů. Současně jsme měli zájem vyzkoušet novou xMAP technologii Luminex.

5.2 Popis analýzy jednotlivých parametrů

5.2.1 Stanovení adiponektinu, resistinu a osteopontinu na přístroji Luminex

Principem stanovení je multiplexová analýza s využitím flow cytometrie a imunoanalýzy- xMAP technologie Luminex.

Ke stanovení těchto parametrů byly použity vzorky séra.

5.2.1.1 Stanovení adiponektinu a resistinu

Ke stanovení adiponektinu jsme zvolili komerční soupravu Fluorokine MAP Human Obesity Panel Base Kit od firmy R&D Systems. Souprava obsahuje tzv. base kit společný pro všechny analyty panelu. Pro každý analyzovaný analyt je třeba dále objednat mikročástice s navázanou specifickou protilátkou.

5.2.1.1.1 Příprava a použité reagensy

Promývací pufr

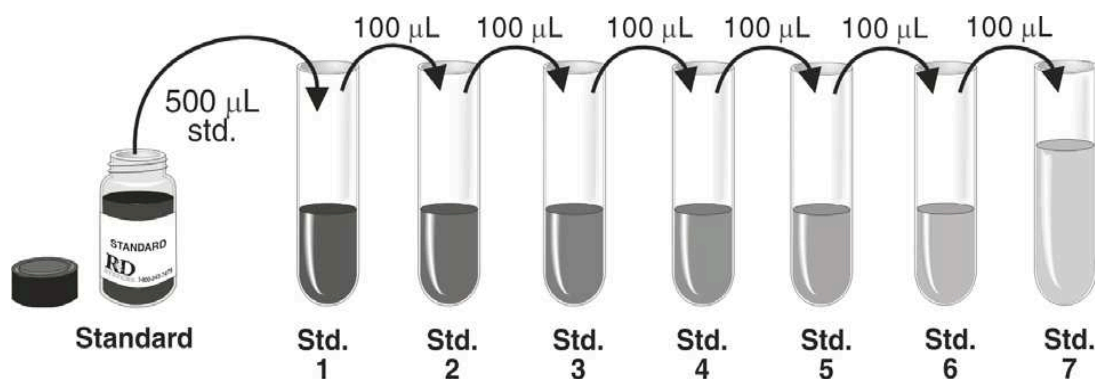
20 ml koncentrovaného promývacího pufru bylo smícháno s 480 ml demineralizované (Mili Q) vody za vzniku 500 ml promývacího pufru.

Standard

Ke koktejlu standardu bylo přidáno 0,9 ml Calibration Diluent RD6-46 (součástí kitu) a za mírného míchání 15 minut rozpouštěno na třepačce.

Příprava kalibrační řady

Do zkumavky č. 1 bylo pipetováno 500 μ l rozpuštěného standardu. Do zkumavek č. 2. až 7 bylo pipetováno 200 μ l Calibration Diluent RD6-46. Ze zkumavky č. 1 bylo odebráno 100 μ l a následně pipetováno do zkumavky č. 2. Obsah zkumavky č. 2 byl důkladně promíchán a poté bylo odebráno 100 μ l do zkumavky č. 3. Následovalo sériové ředění, odebráním objemu 100 μ l až po zkumavku č. 7. Jako blank nám sloužil Calibration Diluent RD6-46.



Obr. č. 19 Příprava standardu pro kalibrační křivku adiponektinu [47]

Mikročástice

Malá zkumavka (vialka) se směsí mikročástic byla míchána na vortexu a poté centrifugována po dobu 15 – 30 sekund. Následně byly mikročástice resuspendovány opakovaným, šetrným pipetováním o objemu 25 µl (10 krát byl tento objem nasát a následně vypuštěn zpět do vialky). Do vialky značené Mixing Bottle bylo napipetováno 5,0 ml Microparticle Diluent a 50 µl mikročástic z vialky.

Biotin Antibody Cocktail

Vialka Biotin Antibody Concentrate byla míchána na vortexu a následně centrifugována po dobu 30 sekund. Poté bylo napipetováno 50 µl Biotin Antibody Concentrate do vialky Biotin Antibody Diluent.

1x Streptavidin-PE

Vialka se Streptavidin-PE byla míchána na vortexu a centrifugována (30s). Do tmavé polypropylenové lahvičky bylo pipetováno 5,5 ml promývacího puftru spolu s 55 µl Streptavidin-PE. Následovalo promíchání a vortexování polypropylenové lahvičky.

5.2.1.1.2 Příprava vzorků

a) příprava vzorků ke stavení adiponektinu

Vzorky byly rozmrazeny, poté byly míchány na vortexu a centrifugovány. Vzorky pro stanovení adiponektinu byly ředěny 200 krát. Nejdříve bylo do zkumavky pipetováno 20 µl vzorku a 180 µl Calibrator Diluent RD6-46. Po důkladném promíchání byl z této

zkumavky pipetován objem 10 μ l z takto naředěného vzorku a 190 μ l Calibrator Diluent RD6-46.

b) příprava vzorků ke stanovení resistinu

Vzorky byly rozmrazeny, poté byly míchány na vortexu a centrifugovány. Vzorky pro stanovení resistinu byly ředěny 4 krát. Do zkumavky bylo pipetováno 50 μ l vzorku a 150 μ l Calibrator Diluent RD6-46.

Z důvodu různého ředění, které vycházelo z firemních kalibračních křivek a publikovaných koncentrací nalezených v lidských sérech, bylo nutno pro každý analyt zakoupit speciální base kit a stanovit separátně.

5.2.1.1.3 Pracovní postup

- 1) Všechny jamky mikrotitrační destičky byly zvlhčeny 100 μ l promývacího pufu. Poté byla mikrotitrační destička odsáta pomocí vakuové pumpy.
- 2) Do všech jamek bylo napipetováno 50 μ l mikročástic.
- 3) Podle pipetovacího protokolu bylo pipetováno 50 μ l standardů a 50 μ l vzorků do příslušných jamek mikrotitrační destičky.
- 4) Destička byla překryta folií a následovala inkubace 3 hodiny při laboratorní teplotě na třepačce.
- 5) Po inkubaci byla destička opatrně odsáta pomocí vakua a následně byly všechny jamky 3 krát promyty 100 μ l promývacího pufu. Mezi jednotlivými promývacími kroky bylo provedeno opět odsátí pomocí vakua.
- 6) Do všech jamek bylo pipetováno 50 μ l Biotin Antibody Cocktail.
- 7) Destička byla překryta folií a následovala inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě na třepačce.
- 8) Dle kroku č. 5 bylo provedeno promytí.
- 9) Bylo přidáno 50 μ l 1x Streptavidin-PE do všech jamek mikrotitrační destičky.
- 10) Destička byla překryta folií a následovala inkubace 30 minut při laboratorní teplotě na třepačce.
- 11) Dle kroku č. 5 bylo provedeno promytí.
- 12) Následovalo přidání 100 μ l promývacího pufu do všech jamek mikrotitrační destičky, poté byla mikrotitrační destička vložena do třepačky a po dobu 2 minut probíhalo třepání při laboratorní teplotě.

13) Vlastní měření vzorků na přístroji LUMINEX 200 proběhlo do 90 minut.

Pozn.: Set ke stanovení adiponektinu a resistinu neobsahoval kontrolní materiály.

5.2.1.1.4 Měření na přístroji Luminex 200

Před každým měřením na přístroji Luminex 200 byla nastavena výška pipetovací jehly. Při nesprávném nastavení této výšky jehly by mohla být porušena membrána mikrotitrační destičky. Dále byla provedena na přístroji kalibrace dle doporučení výrobce. Před i po ukončení měření následovalo promytí přístroje.

5.2.1.2 Stanovení osteopontinu

Ke stanovení osteopontinu jsme použili komerční soupravu Human CVD Panel 3 6-Plex Panel od firmy Merck.

5.2.1.2.1 Příprava a použité reagensie

Standard

Lyofilizát Human CVD Panel 3 Standard Mix byl rozpuštěn ve 150 μ l MiliQ vody (demineralizovaná voda). Lyofilizát Standard Curve Diluent Type 1 byl rozpuštěn v 1,0 ml MiliQ vody.

Příprava kalibrační řady

Do zkumavek č. 7 až č. 1 bylo napipetováno 80 μ l Standard Curve Diluent Type 1. Do zkumavky č. 7 bylo pipetováno 40 μ l Human CVD Panel 3 Standard Mix. Obsah zkumavky č. 7 byl míchán na vortexu. Následovalo sériové ředění přenášením objemu 40 μ l (ze zkumavky č. 7 byl pipetován objem 40 μ l do zkumavky č. 6 až do zkumavky č. 1.) Do zkumavky č. 8 bylo napipetováno 150 μ l Human CVD Panel 3 Standard Mix.

Mikročástice

Vialku se směsí mikročástic jsme homogenizovali a poté byla míchána na vortexu po dobu 15-30 sekund, následovala centrifugace (10 s). Mikročástice byly resuspendovány opakovaným, šetrným pipetováním o objemu 25 μ l (10 krát byl tento objem nasát a následně vypuštěn zpět do vialky). Do vialky značené Bead Mixing Vial bylo napipetováno 1,045 ml 1x Bead Diluent a 55 μ l mikročástic z vialky.

1x Streptavidin-PE

Vialka s 15x Streptavidin-PE byla míchána na vortexu a centrifugována (30s). Do předem připravené tmavé lahvičky bylo pipetováno 2,0 ml Assay Buffer Type 2 a 143 μ l 15x Streptavidin-PE. Následovalo promíchání lahvičky a míchání na vortexu.

Kontroly

Lyofilizát Human CVD Panel 3 Control 1 a Control 2 byl rozpuštěn v 1,5 ml MiliQ vody. Lahvičky s obsahem kontrol byly míchány 5 minut a spotřebovány do jedné hodiny od jejich přípravy.

Blocking Buffer Type 1

V 1,5 ml MiliQ vody byl rozpuštěn lyofilizát Blocking Buffer Type 1.

Detection Antibodies

Lyofilizát Human CVD Panel 3 Detection Antibodies byl rozpuštěn v 4,4 ml MiliQ vody.

5.2.1.2.2 Příprava vzorků

Vzorky byly rozmrazeny a následně byly míchány na vortexu a poté centrifugovány. Pro stanovení osteopontinu jsme vzorky ředili 5 krát. Do zkumavky bylo pipetováno 15 μ l vzorku a 60 μ l Sample Dilution Buffer Typ 1.

5.2.1.2.3 Pracovní postup

- 1) Všechny jamky mikrotitrační destičky byly zvlhčeny 50 μ l Assay Buffer Type 2.
- 2) Mikrotitrační destička byla inkubována po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
- 3) Poté byla mikrotitrační destička odsáta pomocí vakuové pumpy.
- 4) Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 10 μ l Blocking Buffer Type 1.
- 5) Podle pipetovacího protokolu bylo pipetováno 30 μ l standardů, kontrol a vzorků do příslušných jamek mikrotitrační destičky.
- 6) Vialka s mikročásticemi byla homogenizována a následně míchána na vortexu.
- 7) 10 μ l mikročástic bylo pipetováno do všech jamek mikrotitrační destičky.
- 8) Mikrotitrační destička byla opatrně promíchána postupným zvyšováním otáček míchačky (10 s).
- 9) Destička byla překryta folií a následovala inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě na třepače.

- 10) Po inkubaci byla destička opatrně odsáta pomocí vakua a následně byly všechny jamky 2 krát promyty 100 μ l Assay Buffer Type 2. Mezi jednotlivými promývacími kroky bylo provedeno opět odsátí pomocí vakua.
- 11) 40 μ l Detection Antibodies bylo přidáno do všech jamek mikrotitrační destičky.
- 12) Mikrotitrační destička byla opatrně promíchána postupným zvyšováním otáček míchačky (10 s).
- 13) Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 20 μ l 1x Streptavidin–PE.
- 14) Destička byla překryta hliníkovou folií a zabalena do potravinové fólie, následovala inkubace 30 minut při laboratorní teplotě na třepačce.
- 15) Dle kroku č. 10 bylo provedeno promytí.
- 16) Následovalo přidání 100 μ l Assay Buffer Type 2 do všech jamek mikrotitrační destičky, poté byla mikrotitrační destička vložena do třepačky a po dobu 5 minut probíhalo třepání při laboratorní teplotě.
- 17) Vlastní měření vzorků proběhlo do 90 minut na přístroji LUMINEX 200.

5.2.1.2.4 Měření na přístroji Luminex 200

Před každým měřením na přístroji Luminex 200 byla nastavena výška pipetovací jehly. Při nesprávném nastavení této výšky jehly by mohla být porušena membrána mikrotitrační destičky. Dále byla na přístroji provedena kalibrace a kontroly dle doporučení výrobce. Před i po ukončení měření bylo nutno přístroj promýt.

5.2.2 Stanovení MPO na automatickém analyzátoru ARCHITECT i 2000 SR

Vzorky byly měřeny na imunochemickém modulu automatického analyzátoru ARCHITECT od firmy Abbott - ARCHITECT i 2000 SR.

Ke stanovení MPO byly použity vzorky plazmy.

Principem stanovení je heterogenní sendvičová imunoanalýza s chemiluminiscenční detekcí.

5.2.2.1 Zavedení metody

Parametry metody MPO byly na ARCHITECT i 2000 SR nainstalovány s využitím CD od firmy Abbott. Po instalaci byla zajištěna komunikace metody s laboratorním informačním systémem (LIS). Přenos požadavků z LIS do softwaru ARCHITECT i 2000 SR a výsledků zpět umožňuje aplikační kód, který je součástí parametrů metody.

Dále byly v analyzátoru ARCHITECT i 2000 SR nainstalovány kontrolní materiály firmy Abbott na třech hladinách, taktéž byla provedena šestibodová kalibrace s kalibrátory od výše jmenované firmy.

5.2.2.2 Postup měření

Celá analýza je kompletně automatizována.

V prvním kroku se přidá vzorek k paramagnetickým částicím, které jsou potaženy protilátkami MPO. MPO přítomná ve vzorku se naváže na protilátky anti-MPO na mikročásticích. Poté následuje promytí, během druhého kroku se přidá konjugát protilátek anti-MPO s akridinem, čímž dojde ke vzniku imunokomplexu. Po dalším promývacím kroku se do reakční směsi přidají roztoky Pre- Trigger a Trigger (obsahují 1,32 % peroxidu vodíku).

Výsledkem je chemiluniscenční reakce, která se měří v relativních světelných jednotkách (RLU-Relative Light Units). Množství MPO přítomné ve vzorku je přímo úměrné signálu v jednotkách RLU detekovanému optikou systému ARCHITECT i Systém. [41]

5.2.3. Stanovení Lp-PLA₂ na automatickém analyzátoru cobas 6000 od firmy Roche

Jde o **imunoturbidimetrickou metodu**. Komerční soupravu ke stanovení Lp-PLA₂ dodává firma diaDexus. Ke stanovení Lp-PLA₂ byly použity vzorky séra. Metoda byla na cobas 6000 převedena ze staršího automatického analyzátoru firmy Roche Hitachi 917, kde byla zavedena v rámci bakalářské práce autorky [23]. Tato metoda je na modulu na klinickou chemii přístroje cobas 6000 zcela automatizována.

5.2.4 Stanovení lipidových parametrů na automatickém analyzátoru cobas 8000

Vzorky byly měřeny na modulu pro klinickou chemii automatického analyzátoru cobas 8000 firmy Roche. Celá analýza je kompletně automatizována a řídí se dle softwarově nastavených parametrů jednotlivých metod. Stanovení lipidových

parametrů je založeno na **fotometrickém principu**. Ke stanovení lipidových parametrů byly použity vzorky séra a kazetové reagentie pro cobas 8000. Na analyzátoru cobas 8000 byly měřeny koncentrace cholesterolu, TG, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu.

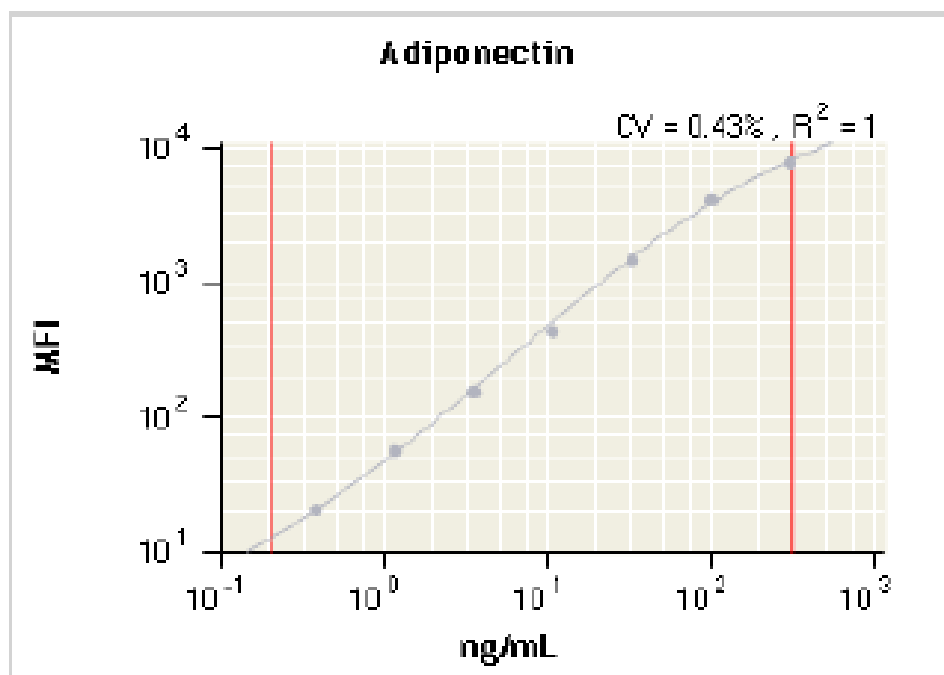
Na OKB FN Brno se stanovení uvedených parametrů včetně kalibrací a kontrol provádí v běžném provozu.

5.3 Prezentace výsledků a statistika

5.3.1 Analytické aspekty jednotlivých metodik

5.3.1.1 Adiponektin

Na obr. č. 20 a v tabulce č. 2 je uvedena sedmibodová kalibrační křivka. Jednotlivé body kalibrační křivky byly provedeny v duplikátech s CV 1-9% a výtěžností 93-106%. Kalibrační křivka byla vyhodnocena programem Milliplex Analyst.



Obr. č. 20 Kalibrační křivka adiponektinu

Tabulka č. 2 Výsledky sedmibodové kalibrace adiponektinu - každý kalibrátor je měřen duplicitně

Expected ng/mL(i)	MFI(i)	MFI	CV	ng/mL(i)	ng/mL	Recovery
270	7365.5	7314	1%	268	265	98 %
	7262.5			262		
90	3941.5	3719	8.46%	102	94.15	105 %
	3496.5			86.74		
30	1413	1432.5	1.93%	29.72	30.17	101 %
	1452			30.61		
10	426	452.75	8.36%	8.81	9.35	93 %
	479.5			9.89		
3.33	153.5	156	2.27%	3.28	3.33	100 %
	158.5			3.38		
1.11	56.5	55.75	1.9%	1.2	1.18	106 %
	55			1.16		
0.37	21	19.75	8.95%	0.39	0.36	98 %
	18.5			0.33		

Pozn.: **MFI** (Mean Fluorescence Intensity)

Variační koeficient (CV) vyjadřuje poměr směrodatné odchylky a aritmetického průměru, obvykle se uvádí v procentech. [7]

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} (\cdot 100\%)$$

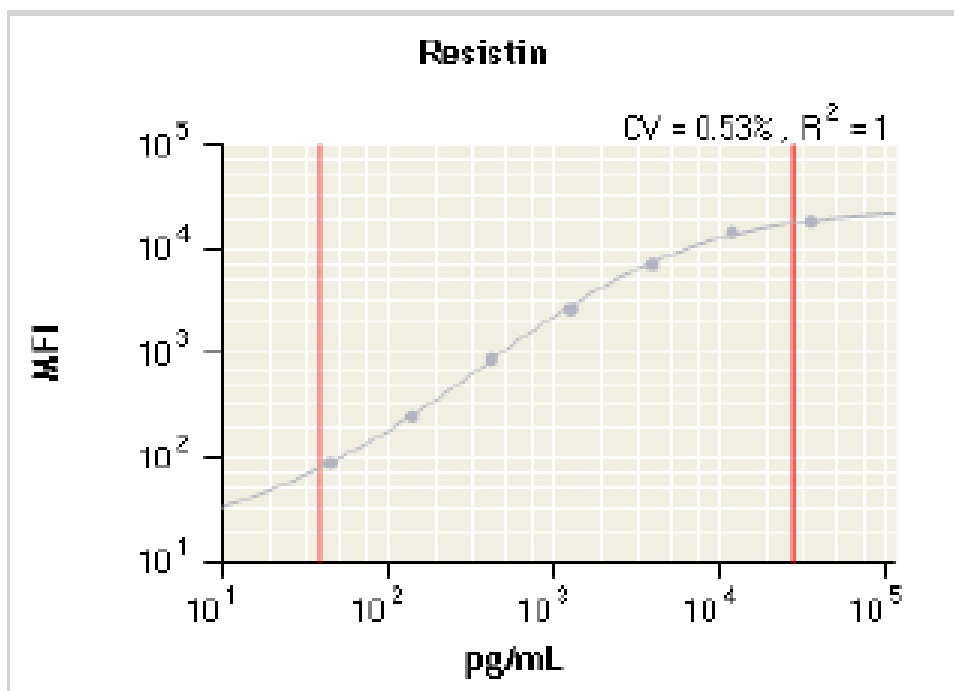
Směrodatná odchylka (s) je druhou odmocninou rozptylu. Je to údaj o nejistotě průměru. [7]

$$s = (s^2)^{1/2}$$

Výtěžnost (recovery) je podíl rozdílu mezi údaji měřicího systému při měření vzorku se známým přidaným množstvím analytu a vzorku bez přídavku. Udává míru schopnosti měřicí metody detekovat veškerý analyt v analyzovaném vzorku. Je mírou účinnosti dané metody. [7]

5.3.1.2 Resistin

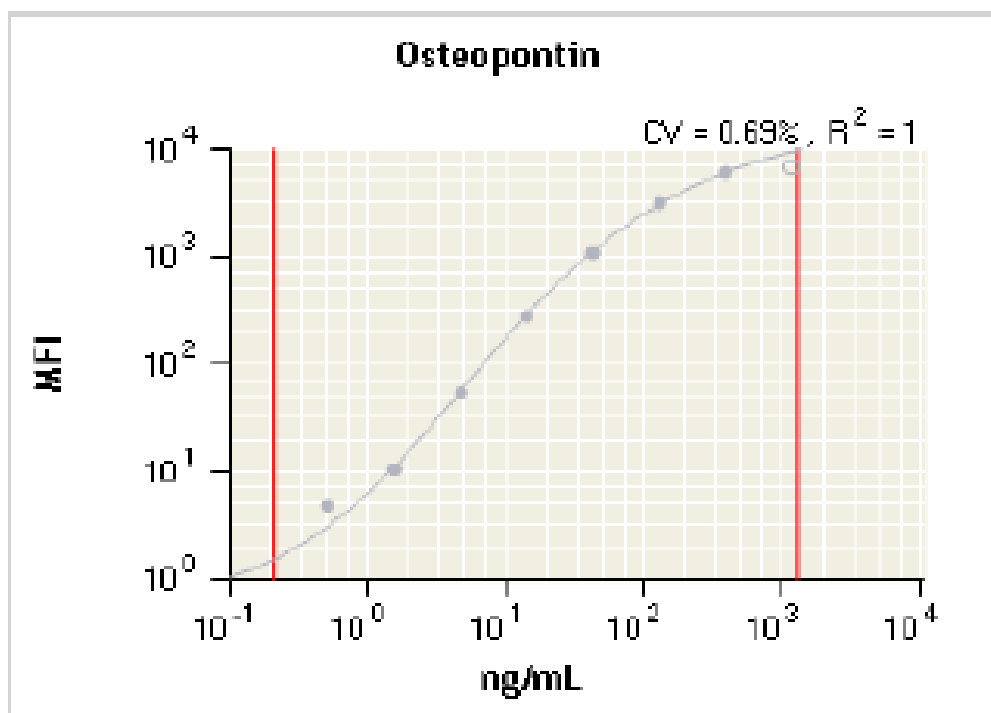
Na obr. č. 21 je uvedena sedmibodová kalibrační křivka resistinu. Jednotlivé body kalibrační křivky byly provedeny v duplikátech s CV 1-8% a výtěžností 92-115%. Kalibrační křivka byla vyhodnocena programem Milliplex Analyst.



Obr. č. 21 Kalibrační křivka resistinu

5.3.1.3 Osteopontin

Na obr. č. 22 je uvedena osmibodová kalibrační křivka osteopontinu. Jednotlivé body kalibrační křivky byly provedeny v duplikátech s CV 2-19% a výtěžností 99-104%. Kalibrační křivka byla vyhodnocena programem Milliplex Analyst.



Obr. č. 22 Kalibrační křivka osteopontinu

5.3.1.4 Myeloperoxidáza

5.3.1.4.1 Stanovení opakovatelnosti

Opakovatelnost byla stanovena pomocí kontrolního materiálu QC MPO Low. Kontrolní materiál jsme změřili 10 krát v řadě za sebou. Variační koeficient opakovatelnosti byl 4,3%.

Tabulka č. 3 *Opakovatelnost u kontrolního materiálu QC Low*

Opakovatelnost	MPO QC Low [pmol/l]
1	420,5
2	437,6
3	424,5
4	467,2
5	479,3
6	429,1
7	439,5
8	438,5
9	426,7
10	421,2
průměr	438,41
SV	18,8068
%CV	4,2898

5.3.1.4.2 Stanovení reprodukovatelnosti (mezilehlé přesnosti)

Ze všech naměřených hodnot kontroly kvality byla vypočítána reprodukovatelnost na třech kontrolních hladinách. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 4.

SD a CV reprodukovatelnosti může být rovněž odečten ze softwaru přístroje ARCHITECT i 2000 SR, kde je automaticky počítán.

Tabulka č. 4 Stanovení reprodukovatelnosti z interní kontroly kvality MPO [pmo/l]

Reprodukovatelnost	QC MPO Low	QC MPO Medium	QC MPO High
1. měření	445,5	1309,7	3708,1
2. měření	441,3	1230,8	3799,4
3. měření	451,4	1260,2	3644,6
4. měření	547,5	1326,8	4466,4
5. měření		1309,7	
6. měření		1247,1	
7. měření		1319,1	
8. měření		1562,9	
počet měření	4	8	4
průměr	471,4	1320,8	3904,6
SD	50,9	104,3	379,9
%CV	10,8%	7,9%	9,7%

Tabulka č. 5 Deklarované hodnoty kontrol od firmy Abbott

QC MPO Low [pmo/l]	QC MPO Medium [pmo/l]	QC MPO High [pmo/l]
400	1200	3600

5.3.1.5 Lp-PLA2

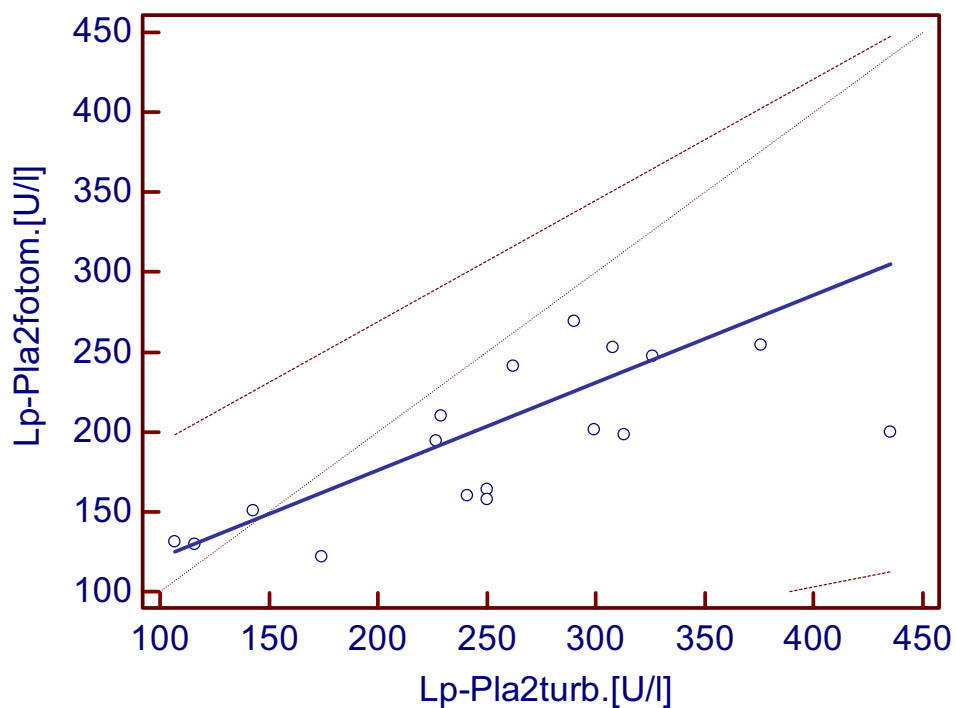
Firma diaDexus původně pro stanovení koncentrace Lp-PLA₂ využívala imunoturbidimetrické stanovení. Touto metodikou byly stanoveny všechny patientské vzorky v této práci. Kvůli nízké stabilitě metody, nutnosti časté kalibrace a případným interferencím nahradila firma diaDexus imunoturbidimetrii enzymatickým stanovením.

Proto je v následující kapitole provedeno srovnání těchto metod.

5.3.1.5.1 Srovnání imunoturbidické a enzymatické metody

Srovnání metod bylo provedeno pomocí regresní závislosti Passing-Bablock a grafického znázornění s využitím Bland-Altmanova diagramu ve statistické programu MedCalk. Data jsou uvedena v příloze č. 1.

Regresní analýza Passing-Bablock



Obr. č. 23 Srovnání imunoturbidimetrického a enzymatického stanovení Lp-PLA₂ pomocí regresní analýzy Passing-Bablock

Tabulka č. 6 Údaje z regresní analýzy

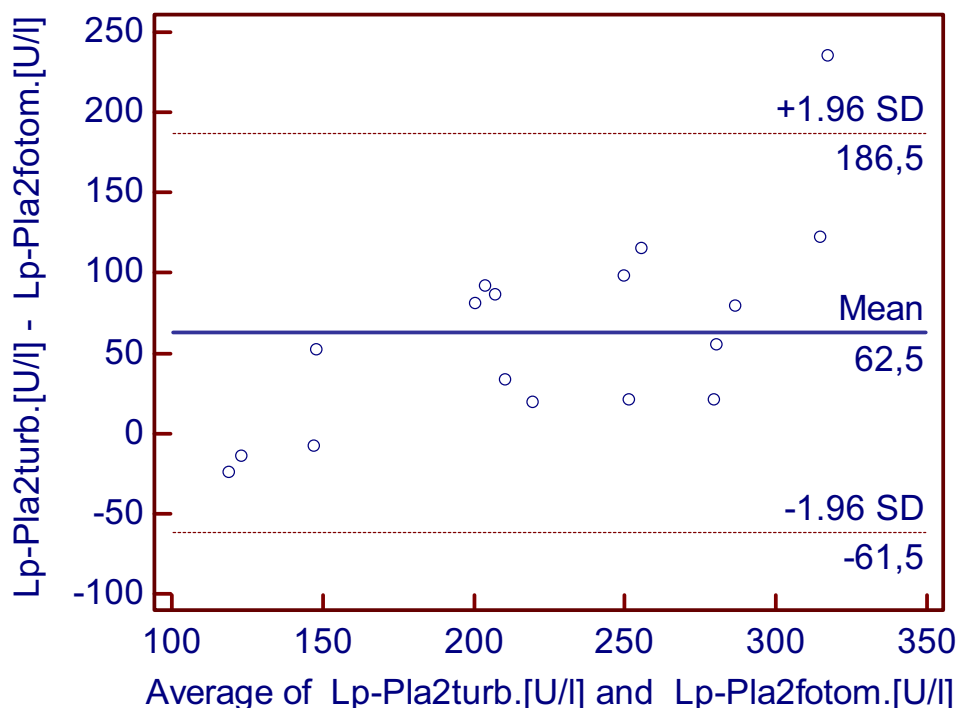
Velikost souboru	17	
	Variable X	Variable Y
Nejnižší hodnota	107	122
Nejvyšší hodnota	435	269
Aritmetický průměr	255,6	193,1
Medián	250,0	198,0
Standardní odchylka	87,9	47,8

Regresní rovnice

$y = 66,235138 + 0,549697 x$	
Systematické rozdíly	
Úsek, který vytne regresní přímka na ose y	66,2
95% CI	-1,4 do 116,3
Proporcionální rozdíly	
Směrnice přímky	0,5497
95% CI	0,2609 to 0,7619
Linear model validity	
Cusum test linearity	Statisticky významný rozdíl od linearity (P<0,01)

Směrnice (slope) a úsek, který vytne regresní přímka na ose y (intercept) se počítají s 95% intervalem spolehlivosti (CI). Tyto CI se používají k rozhodnutí, zda je statisticky významný rozdíl mezi směrnici a jedničkou a mezi interceptem a nulou (pokud CI zahrnuje srovnané číslo, pak se významně neliší).

Bland-Altmanův rozdílový graf



Obr. č. 24 Bland-Altmanův rozdílový graf - srovnání imunoturbidimetrického a enzymatického stanovení

Statisticky nevýznamný rozdíl mezi výsledky dvou metod znamená, že střední hodnota rozdílů (nejčastěji počítaná jako aritmetický průměr) mezi jednotlivými páry výsledků je poměrně malá a její interval spolehlivosti (mean \pm 1,96 SD) zahrnuje nulu. Naopak o statisticky významném rozdílu mluvíme, pokud tento interval spolehlivosti nulu nezahrnuje.

5.3.1.5.2 Stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti

Stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti imunoturbidimetrického stanovení

Lp-PLA₂ bylo provedeno v rámci bakalářské práce autorky a je uvedeno v kapitole

č. 4.5.2.1.

U enzymatického stanovení Lp-PLA₂ byly měřeny kontrolní vzorky na dvou hladinách. Ze všech naměřených hodnot kontrol kvality jsme ze softwaru přístroje

cobas 6000 odečetli CV reprodukovatelnosti. Pro kontrolu Lp-PLA₂ High byl 0,5%, pro kontrolu Lp-PLA₂ Low činil 1,1%.

5.3.1.6 Lipidy

U CHOL, TG, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu je opakovatelnost, reprodukovatelnost v rámci akreditačních požadavků vyhodnocována ve FN Brno OKB každoročně a nebyla v rámci této práce prováděna.

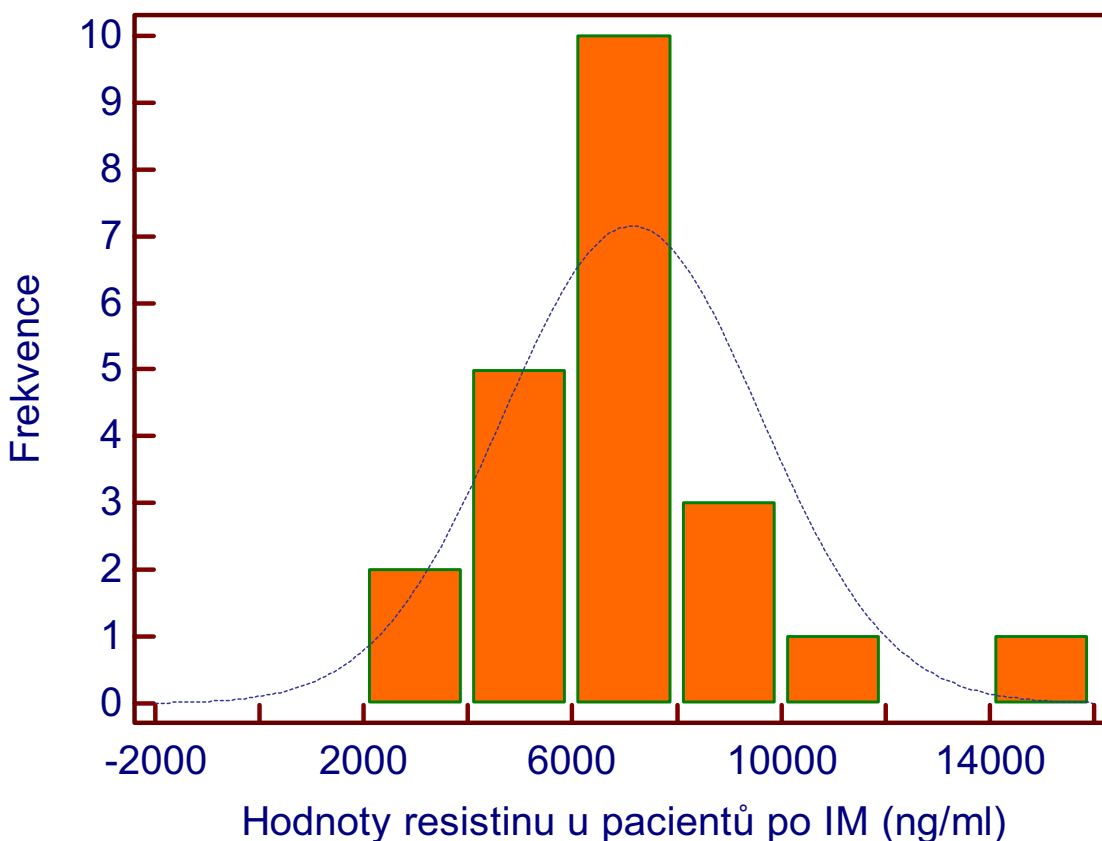
5.3.2 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení bylo provedeno ve statistickém programu SPSS a MedCalc. Byl při něm kladen důraz na dosud málo publikované parametry stanovené s využitím xMAP technologie – adiponektin, resistin, osteopontin. Výsledky všech měřených parametrů jsou uvedeny v příloze.

5.3.2.1 Histogram

Před provedením statistického zpracování dat bylo pro jednotlivé parametry zjištěno, zda je rozložení dat normální (pak byl použit aritmetický průměr), či ne (pak byl použit geometrický průměr).

K vizuálnímu ověření, zda se jedná o Gaussovo rozdělení dat či nikoliv se používá histogram. Příklad je uveden na obrázku č. 25, kde je vidět, že rozložení souboru naměřených hodnot u resistinu není Gaussovské (normální). Z toho důvodu byl při statistice použit geometrický průměr.



Obr. č. 25 Rozložení naměřených hodnot u resistinu na histogramu

5.3.2.2 Studentův t-test

Bylo provedeno statistické vyhodnocení srovnání hladin adiponektinu, resistinu, osteopontinu a Lp-PLA₂ před a po navýšení léčby statiny.

Pozn.: 1) t-test (nezávislých vzorků) – testuje dvě skupiny stejného parametru u odlišných vzorků

2) párový test – slouží k testování dvou různých vzorků od téhož pacienta

Bylo provedeno srovnání a statistické zpracování všech naměřených parametrů u pacientů po IM s výsledky získanými od zdravé kontrolní skupiny.

Tabulka č. 7 *Srovnání t-testem vyhodnocených parametrů pacientů po IM a zdravé kontrolní skupiny*

	Nemocní pacienti průměr (95% CI) N=22	Zdraví jedinci průměr (95% CI) N=30	p¹
CHOL vstupní hodnota (mmol/l)²	5.18 (4.81; 5.58)	4.71 (4.39; 5.05)	0.080
TG vstupní hodnota (mmol/l)²	1.49 (1.21; 1.81)	1.18 (0.95; 1.43)	0.121
HDL-C vstupní hodnota (mmol/l)²	1.34 (1.21; 1.48)	1.48 (1.36; 1.61)	0.153
LDL-C vstupní hodnota (mmol/l)²	3.10 (2.71; 3.54)	2.92 (2.64; 3.23)	0.490
LP-PLA₂ 12M (ng/ml)	312 (253; 371)	163 (149; 177)	<0.001*
CHOL 12M² (mmol/l)	4.29 (3.90; 4.72)	4.71 (4.39; 5.05)	0.122
TG 12M² (mmol/l)	1.63 (1.32; 1.98)	1.18 (0.95; 1.43)	0.034*
HDL-C 12M² (mmol/l)	1.24 (1.09; 1.40)	1.48 (1.36; 1.61)	0.020*
LDL-C 12M² (mmol/l)	2.23 (1.91; 2.58)	2.92 (2.64; 3.23)	0.004*
MPO 12M² (pmol/l)	379 (284; 509)	128 (87; 189)	<0.001*
OPN² před (ng/ml)	13.69 (10.68; 17.48)	3.04 (2.32; 3.93)	<0.001*
RESIS² před (pg/ml)	6 792 (5 946; 7 759)	7 247 (6 036; 8 701)	0.586
APN před (ng/ml)	7 718 (5 890; 9 546)	6 899 (6 050; 7 747)	0.412

¹ statisticky významný rozdíl mezi skupinami pacientů testovaných t-testem

* statisticky významný rozdíl

² parametr je popsán geometrickým průměrem a intervalem spolehlivosti

p¹-hladina významnosti (je-li < **0,05 jedná se o statisticky významný rozdíl**)

N - počet vzorků

Pozn.:1) u OPN a MPO se počet vzorků lišil od počtu vzorků uvedených v tabulce

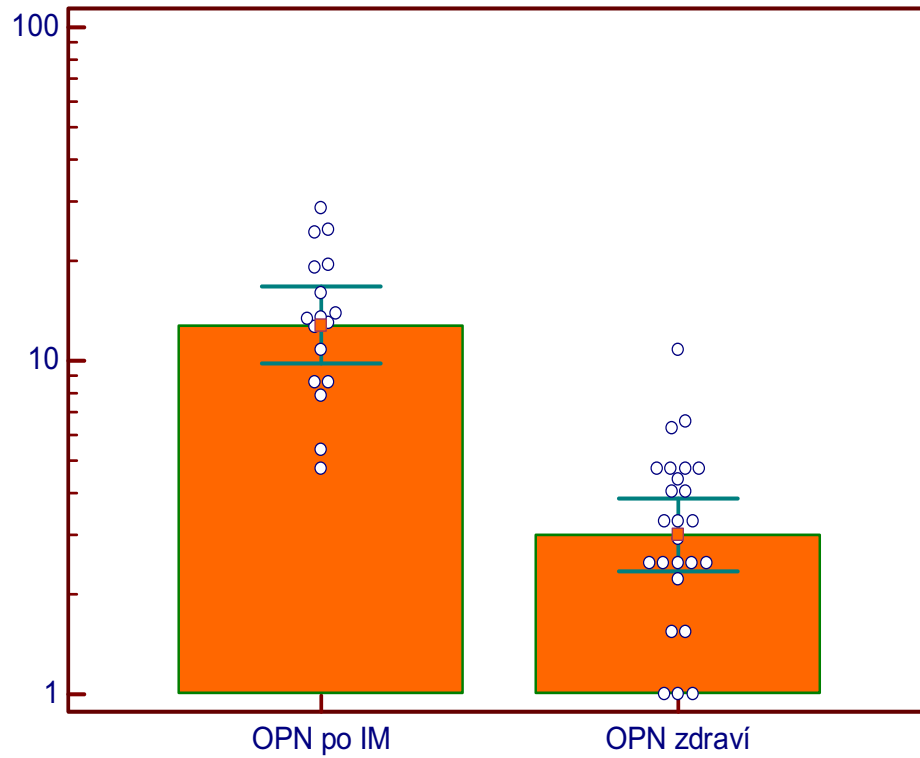
OPN po IM 10, MPO po IM 35, MPO zdraví 12

2) označení 12M znamená, že pacientům byly jednotlivé parametry stanovovány 1 rok po prodělaném IM

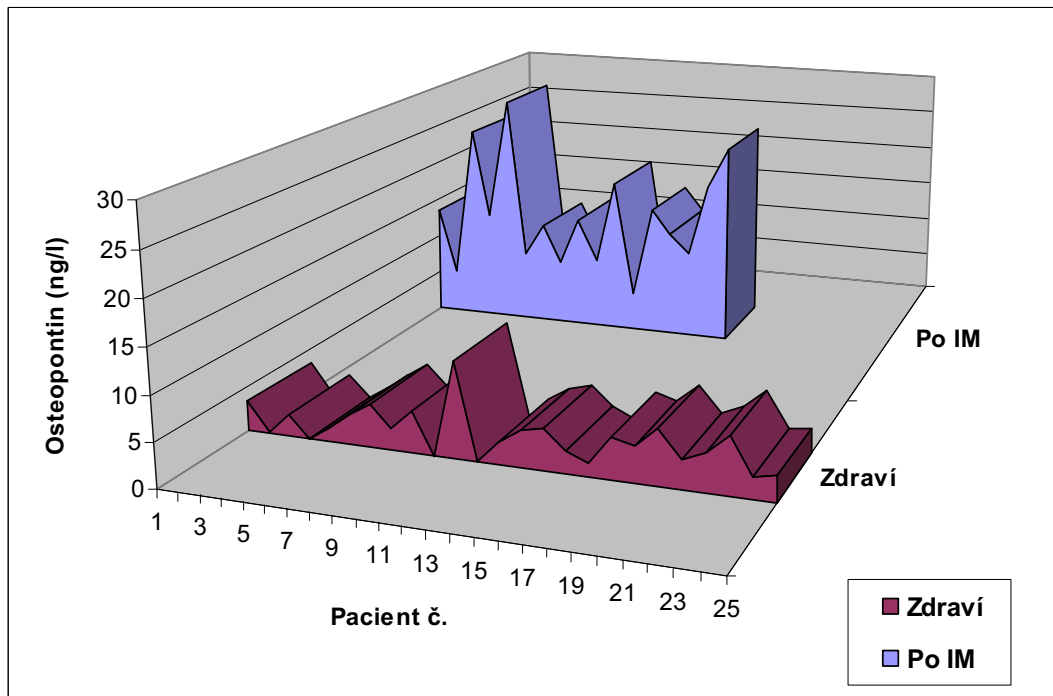
3) označení **před** a **po** znamená, že u souboru těchto pacientů byly stanovovány jednotlivé parametry před a po navýšení léčebných dávek statinů

4) APN, RESIS, OPN byl analyzován pouze u 26 osob u zdravé – kontrolní skupiny

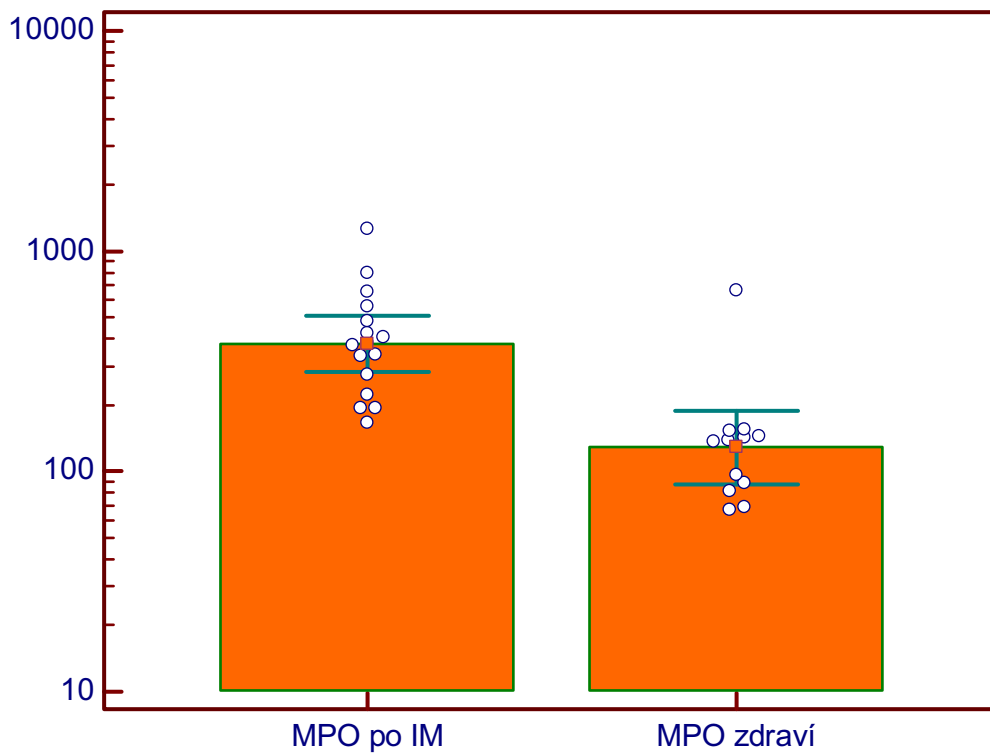
U parametrů, kde byla hladina významnosti při srovnání pacientů po IM a zdravé kontrolní skupiny $p < 0,001$, bylo rozložení dat zpracováno také graficky.



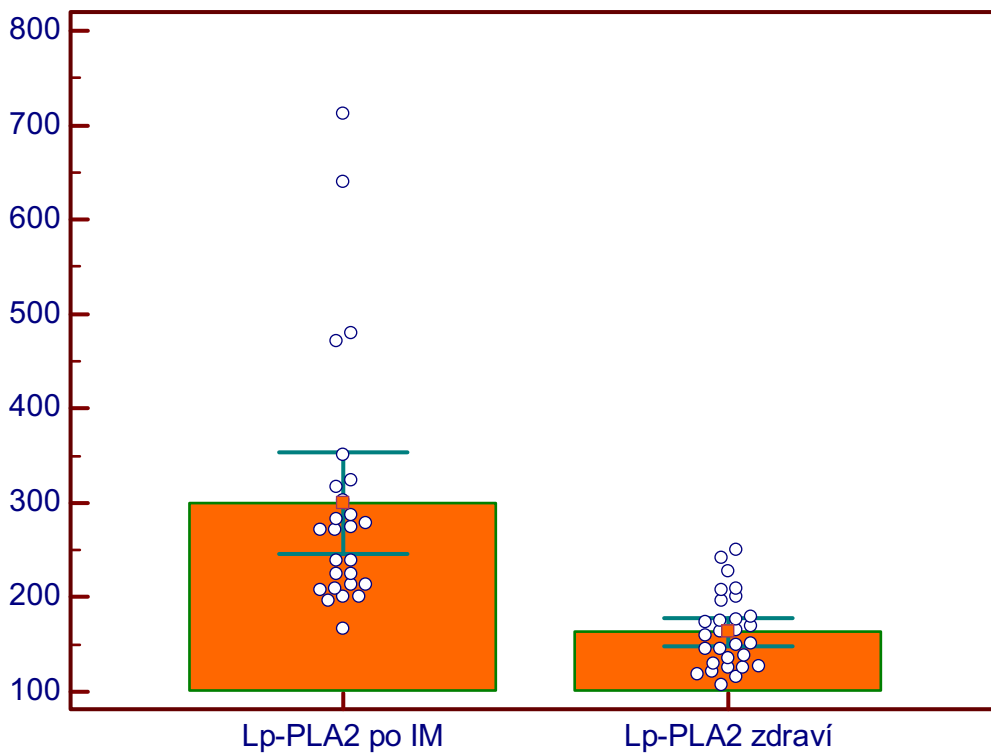
Obr. č. 26 Rozložení naměřených hodnot OPN u pacientů po IM a u zdravých jedinců



Obr. č. 27 Rozložení naměřených hodnot OPN u pacientů po IM a u zdravých jedinců-
trojrozměrné zobrazení



Obr. č. 28 Rozložení naměřených hodnot MPO u pacientů po IM a u zdravých jedinců



Obr. č. 29 Rozložení naměřených hodnot Lp-PLA₂ u pacientů po IM a u zdravých jedinců

Tabulka č. 8 *Statisticky zpracované výsledky koncentrací adiponektinu, resistinu, osteopontinu a Lp-PLA₂ před a po navýšení léčby statiny*

	N	před navýšení statinů	po navýšení statinů	p ¹
OPN² (ng/ml)	10	12.75 (9.56; 16.89)	12.47 (7.17; 21.23)	0.942
RESIS² (pg/ml)	22	6792 (5946; 7759)	6861(5681; 8286)	0.926
APN³ (ng/ml)	22	7718 (5890; 9546)	6890(5709; 8072)	0.421
Lp-PLA₂² (ng/ml)	20	286,0 (156,5;594,0)	229,0 (123,0;782,0)	0,016

p¹ hladina významnosti, testováno párovým testem

² parametr je popsán geometrickým průměrem a intervalem spolehlivosti

³ paramter je popsán aritmetrickým průměrem a intervalem spolehlivosti

N - počet vzorků

Pozn.: 1) geometrický průměr je n-tá odmocnina součinu n hodnot

2) při analýze OPN došlo k problému s přístrojem Luminex 200, takže ze skupiny pacientů po IM bylo změřeno pouze 10 vzorků

Dále bylo provedeno statistické vyhodnocení srovnání koncentrací osteopontinu, resistinu, adiponektinu před a po navýšení léčby statiny dle věkových kategorií a přítomnosti či nepřítomnosti diabetes mellitus.

Tabulka č. 9 *Statisticky zpracované výsledky koncentrací adiponektinu, resistinu a osteopontinu u pacientů s DM a bez DM, dle mediánu věku*

	Bez DM N=19	DM N=3	p ¹
OPN²před (ng/ml)	12.46 (9.32; 16.56)	18.67 (13.45; 25.76)	0.183
OPN²po (ng/ml)	10.45 (6.86; 15.69)	12.56 (2.40; 53.11)	0.778
RESIS²před (pg/ml)	6 781 (5 848; 7 864)	6 860 (4 891; 9 621)	0.955
RESIS²po (pg/ml)	6 907 (5 589; 8 535)	6 579 (4 287; 10 097)	0.868
APN před (ng/ml)	7 891 (5 842; 9 940)	6 617 (2 707; 10 527)	0.651
APN po (ng/ml)	7 018 (5 729; 8 307)	6 084 (2 724; 9 444)	0.607
	věk <60 let N=11	věk ≥ 60 let N=11	
OPN²před (ng/ml)	13.16 (9.68; 17.76)	14.60 (9.17; 22.91)	0.705
OPN²po (ng/ml)	9.17 (4.83; 16.72)	12.03 (7.16; 19.80)	0.510
RESIS²před (pg/ml)	6 127 (5 000; 7 508)	7 529 (6 430; 8 817)	0.132
RESIS²po (pg/ml)	7 238 (5 098; 10 278)	6 503 (5 561; 7 605)	0.591
APN před (ng/ml)	7 313 (3 909; 10 717)	8 122 (6 599; 9 646)	0.675
APN po (ng/ml)	7 442 (5 446; 9 439)	6 338 (5 057; 7 620)	0.373

¹ statisticky významný rozdíl mezi skupinami pacientů testovaných t-testem

*statisticky významný rozdíl

² parametr je popsán geometrickým průměrem a intervalem spolehlivosti

p¹-hladina významnosti

N - počet vzorků

u OPN bylo změřeno pouze 7 vzorků u pacientů bez DM, a 3 vzorky s DM

u OPN byly změřeny 3 vzorky u věkové kategorie <60 let, 7 vzorků u věkové kategorie ≥ 60 let

Pozn.: označení **před** a **po** znamená, že u souboru těchto pacientů byly stanovovány jednotlivé parametry před a po navýšení léčebných dávek statinů

5.3.2.3 Korelační koeficient

Korelační koeficient je číslo, které udává statistickou závislost (korelaci) mezi dvěma veličinami. Jeho hodnota se pohybuje od -1 do 1. Čím je jeho absolutní hodnota vyšší, tím je korelace těsnější.

Byla provedena korelace jednotlivých biomarkerů – adiponektin, resistin, osteopontin s dalšími měřenými parametry - Lp-PLA₂, triacylglyceroly, HDL a LDL cholesterolem.

Tabulka č. 10 *Korelace nových biomarkerů s dalšími měřenými parametry - Lp-PLA₂, triacylglyceroly, HDL a LDL cholesterolem*

	LP-PLA ₂ Korelační koeficient/ p	CHOL ¹ Korelační koeficient/ p	TG ¹ Korelační koeficient/ p	HDL ¹ chol. Korelační koeficient/ p	LDL ¹ chol. Korelační koeficient/ p
OPN ¹ před (ng/ml)	-0.283/0.348	-0.238/0.433	0.038/0.903	-0.029/0.926	-0.299/0.321
OPN ¹ po (ng/ml)	-0.173/0.492	-0.200/0.426	-0.404/0.097	0.384/0.116	-0.249/0.320
RESIS ¹ před (pg/ml)	-0.194/0.388	-0.105/0.643	-0.309/0.162	0.220/0.325	-0.085/0.708
RESIS ¹ po (pg/ml)	0.123/0.586	-0.144/0.523	0.202/0.367	-0.175/0.436	-0.184/0.412
APN před (ng/ml)	-0.316/0.152	0.211/0.345	0.312/0.158	0.156/0.489	0.036/0.872
APN po (ng/ml)	-0.079/0.728	0.280/0.206	0.099/0.660	0.345/0.116	0.087/0.699

¹parametr byl logaritmicky transformován

p - hladina významnosti

Pozn.: označení **před** a **po** znamená, že u souboru těchto pacientů byly stanovovány jednotlivé parametry před a po navýšení léčebných dávek statinů

5.3.2.4 ROC křivka

ROC křivka (operativní charakteristika testu) slouží k posouzení funkce testu – toho, jak test umožňuje rozlišit nemocné od zdravých. Čím strměji probíhá křivka v počáteční oblasti, tím je lepší rozlišení mezi nemocnými a zdravými. Záleží i na oblasti pod křivkou, čím je větší tato plocha, tím je reakce citlivější a specifitější.

Diagnostická senzitivita (citlivost) – udává procento správně pozitivních výsledků ze souboru zdravých osob. Čím vyšší je senzitivita, tím méně je falešně negativních výsledků. Udává se jako zlomek jedné nebo v procentech.

Diagnostická specifita – udává procento správně negativních výsledků ze souboru zdravých osob. Čím vyšší je specifita, tím méně je falešně pozitivních výsledků. Udává se jako zlomek jedné nebo v procentech.

Funkcí specifity a senzitivity je Yodenův index - ukazatel diagnostické správnosti. Bodu, ve kterém dosahuje nejvyšší hodnoty, odpovídá kritérium (hranice rozlišující zdravé od nemocných) a příslušná senzitivita a specifita.

ROC analýza byla prováděna pouze u myeloperoxidázy, a to u mužů (počet vzorků 37). Vycházeli jsme z jedinců, u kterých byla změřena koncentrace MPO původního souboru. ROC analýza byla provedena pouze u mužů vzhledem k tomu, že pro muže jsou jiné referenční meze než pro ženy a žen nebylo v souboru dostatečné množství.

MPO

Muži po prodělaném IM

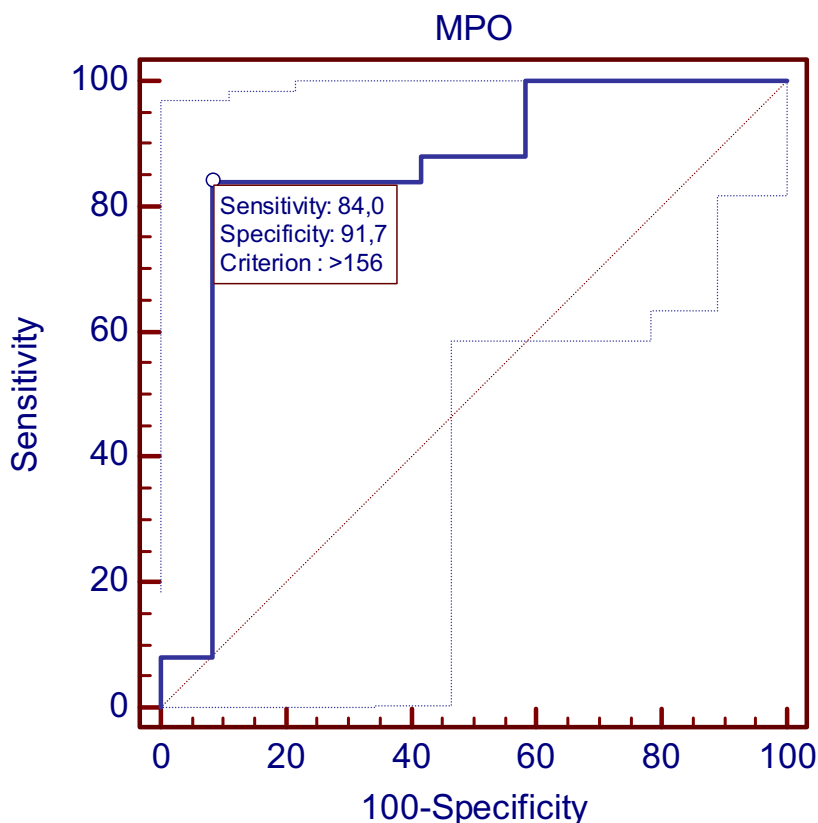
Počet vzorků: 25

Muži - zdravá kontrolní skupina

Počet vzorků: 12

Plocha pod křivkou = 0,850

Hladina významnosti p (plocha= 0,5) <0,0001



Obr. č. 30 ROC křivka MPO

Nejvyššímu Youdenovu indexu u MPO odpovídá senzitivita 96,2% a specifita 79,3%.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hodnocení analytických metodik

Luminex xMAP technologie se ukázala jako technika náročná na čas i přesnost, ale také jako dostatečně spolehlivá. V současné době vyžaduje velký podíl manuální práce se množstvím ručního pipetování. CV většiny duplikátů byl do 10%. Je uváděno, že xMAP technologie Luminex může během jedné analýzy stanovit až 100 analytů, ale v našem případě jsme zjistili, že se ukázalo nemožné stanovit současně dva analyty v jednom vzorku. Hlavním důvodem byla potřeba různého ředění biologického materiálu. Pro každý analyt jsme byli nuceni zakoupit separátní base kit a stanovit parametry samostatně.

Analýza na přístroji ARCHITECT i 2000 SR patří k rutinně zavedeným a používaným technikám, takže stanovení MPO bylo po analytické stránce zcela bezproblémové. Tato metoda se ukázala jako velmi robustní. CV reprodukovatelnosti byl do 11%. Soupravu reagensů na palubě tohoto analyzátoru jsme využívali poměrně dlouhou dobu, jinak by byl výsledek ještě nižší.

Sety ke stanovení Lp-PLA₂ v současné době vyrábí jediná firma na světě – diaDexus. Původní imunoturbidimetrické stanovení vyžadovalo častou kalibraci, zatímco nová kinetická metoda je velmi stabilní. U kinetického stanovení byl CV reprodukovatelnosti do 1,1% a souprava na palubě analyzátoru vydrží až 2 měsíce. Jak je vidět ze srovnání imunoturbidimetrické a kinetické metody, příliš nekorelují a je mezi nimi statisticky významný rozdíl. V budoucnu bude nutné stanovit vhodné cut off enzymatické metody.

Studentův t-test

Tímto testem byly hodnoceny hladiny všech naměřených parametrů u pacientů po IM ve srovnání s kontrolní skupinou. Statisticky významný rozdíl byl u Lp-PLA₂, MPO, OPN, TG, HDL-C a LDL - C. U OPN, Lp-PLA₂ a MPO byla hladina významnosti $p < 0.001$.

Při analýze krevních vzorků pacientů byly naměřeny u resistinu a adiponektinu hodnoty, které neodpovídaly námi očekávaným výsledkům. Hodnoty resistinu by ve srovnání se zdravou skupinou měly být vyšší u pacientů s aterosklerotickým onemocněním, zatímco koncentrace adiponektinu by u těchto pacientů měly být naopak nižší. Důvodem může být, že všichni pacienti užívali statiny a koncentrace řady parametrů se u nich tedy blížila kontrolní skupině.

Studentovým t-testem byly vyhodnoceny koncentrace adiponektinu, resistinu, osteopontinu a Lp-PLA₂ před a po navýšení léčebných dávek statinů. U naměřených koncentrací adiponektinu, resistinu, osteopontinu nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. U Lp-PLA₂ byla však po hladina významnosti $p 0,016$.

Z výsledků lze usuzovat, že biomarkery adiponektin, resistin ani osteopontin nejsou dostatečně citlivé, aby reagovaly na zvýšené dávky statinů. Na agresivnější léčbu velmi dobře reagoval parametr Lp-PLA₂. Po navýšení dávek statinů došlo k poklesu koncentrace Lp-PLA₂ téměř o 19%. Snížení hodnot Lp-PLA₂ by mohlo přispívat ke stabilizaci aterosklerotického plátu. Během sledování vybrané skupiny po zvýšení dávky statinů (1,5 roku) neměl žádný pacient infarkt myokardu ani cévní mozkovou příhodu.

Dále bylo provedeno srovnání koncentrací adiponektinu, resistinu, osteopontinu před a po navýšení léčebných dávek statinů dle věkových kategorií a přítomnosti či nepřítomnosti diabetes mellitus u těchto pacientů. Také výsledkem tohoto hodnocení nebyl žádný statisticky významný rozdíl.

Myeloperoxidáza u souboru pacientů před a po navýšení léčebných dávek statinů nebyla z finančních důvodů stanovena.

Korelační koeficient

Byla provedena korelace adiponektinu, resistinu a osteopontinu s dalšími měřenými parametry - Lp-PLA₂, triacylglyceroly, HDL a LDL-cholesterolem. Korelační koeficient v žádném případě nebyl vyšší než 0,4. U osteopontinu, resistinu ani adiponektinu tedy nebyla prokázána statistická závislost na častěji využívaných markerech koronárního onemocnění.

ROC křivka

ROC analýza byla provedena u výsledků myeloperoxidázy souboru mužů po prodělaném IM a mužů ze zdravé kontrolní skupiny. Nejvyššímu Youdenovu indexu odpovídala senzitivita 96,2% a specifická 79,3%. Vypočítané kritérium bylo větší než 156, což je výrazně nižší hodnota než referenční rozmezí pro muže dle výrobce reagensů (do 354 pmol/l). Diskrepance ukazuje, že je vhodné na pracovišti stanovit vlastní referenční rozmezí. Rozdíl může být v tomto případě způsoben také tím, že všichni pacienti v souboru byli dlouhodobě léčeni statiny.

Z našeho pohledu se jeví MPO jako parametr vhodný nejen k popisu rozsahu poškození myokardu při IM, jak je většinou uváděno v literatuře. MPO může také sloužit k posouzení stability aterosklerotického plátu.

Pozn.:

Původně jsme měli v úmyslu stanovovat u pacientů v experimentální části práce také interleukiny. Vzhledem k našim finančním možnostem a faktu, že se na trhu objevily komerční kity poměrně nových a málo publikovaných parametrů jako je adiponektin, resistin, osteopontin, jsme se rozhodli, že interleukiny nebudeme stanovovat a dali jsme přednost výše jmenovaným parametrům.

7 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce se podařilo splnit následující cíle:

1. Seznámili jsme se a zároveň jsme si v experimentální části této práce osvojili flow cytometrii pro multiplexové analýzy (Luminex xMAP technologii) na přístroji LUMINEX 200. Současně jsme využili dalších analytických metod jako je chemiluminiscence, imunoturbidimetrie a fotometrie na automatických biochemických analyzátoch.

2. Provedli jsme rozsáhlou klinickou studii, která se zabývala sekundární prevencí infarktu myokardu a aterosklerózou u pacientů po prodělaném infarktu myokardu. V rámci této klinické studie byly stanoveny jak běžné, tak moderní biochemické parametry, které by mohly být využívány k monitorování prevence infarktu myokardu.

3. Na přístroji ARCHITECT i 2000 SR jsme nainstalovali a následně prováděli chemiluminiscenční stanovení MPO. Dále jsme na automatizovaných biochemických analyzátoch cobas 6000 a cobas 8000 využili imunoturbidimetrii a fotometrii při stanovení Lp-PLA₂ a lipidových parametrů.

V experimentální části jsme se zaměřili na flow cytometrii a její využití pro multiplexové metody. Na přístroji Luminex 200 jsme analyzovali v literatuře dosud málo publikované parametry adiponektin, resistin a osteopontin. Nejnadějnější pro posouzení kardiologického rizika se jeví osteopontin.

Z parametrů měřených na automatizovaných biochemických analyzátoch se ukazují jako slibné aterosklerotické biomarkery Lp-PLA₂ a MPO. Zejména Lp- PLA₂ pro její citlivou reakci na dávky statinů je velmi zajímavý parametr.

xMAP technologie Luminex je z našeho pohledu technika, která najde v budoucnu větší uplatnění. Tato technologie se prozatím příliš nehodí do automatizovaného provozu klinických laboratoří, je vhodná spíše pro výzkumné účely.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

4-AAP	4-aminoantipyrin
Abs. max.	absorpční maximum
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
AKS	akutní koronární syndrom
APN	adiponektin
BMI	body mass index
CAD	koronární arteriální onemocnění (coronary artery disease)
CV	korelační koeficient
CRP	C-reaktivní protein
DM	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FN Brno	fakultní nemocnice Brno
GK	glycerolkináza
GPO	glycerolfosfát oxidáza
HDL	high density lipoproteins
HDL-C	HDL-cholesterol
HMW	high molecular weight
HSDA	[N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimetoxyanilin sodný]
CHES	cholesterolesteráza
CHOL	cholesterol
CHOD	cholesteroxidáza
ICAM	intercellular adhesion molecule 1
IM	infarkt myokardu
IL-6	interleukin-6
kDa	kilodaltony
LDL	low density lipoproteins
LDL-C	LDL-cholesterol
LIS	laboratorní informační systém
LPL	lipoproteinová lipáza
Lp(a)	lipoprotein _(a)
Lp-PLA ₂	fosfolipáza A ₂ asociovaná s lipoproteiny
MPO	myeloperoxidáza
OKB	oddělení klinické biochemie
OPN	osteopontin
PEG	polyetylénglykol
POD	peroxidáza
RESIS	resistin
RIA	radioimmunoassay
RLU	Relative Light Units
QC	kontrolní materiál
Streptavidin-PE	streptavidin – phycoerytrin
SD	směrodatná odchylka
TG	triacylglyceroly

TNF	tumor necrosis factor
VLDL	very low density lipoproteins
VSMC	vascular smooth muscle cell

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Imunochemické metody*. [online]. [cit. 2012-04-29]. Dostupné na [www: http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/kbc/Imunochemicke_metody.pdf](http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/kbc/Imunochemicke_metody.pdf)
- [2] Oficiální výukové stránky Ústavu lékařské biochemie 1. LF UK, Učební texty, *Imunochemické metody* [online]. 2008. [cit. 2012-10-02]. Dostupné na [www: http://che1.lf1.cuni.cz](http://che1.lf1.cuni.cz).
- [3] ŠTERN, P., A KOL.: *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*. 1. vydání, Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1025-6
- [4] BISHOP M.L., FODY E.P., SCHOEFF L.E.: *Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlation*. 2010. ISBN 978-0-7817-9045-1.
- [5] BURTIS C.A., ASHWOOD E.R., BRUNS D.E.: *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 2008. ISBN 978-0-7216-3865-2.
- [6] DASTYCH M.: *Instrumentální technika*. 1. vydání, MU Brno, 2007. ISBN 13: 978-80-210-4226-1
- [7] DASTYCH M., BREINEK P. A KOL.: *Klinická biochemie*. 2. přepracované vydání. Brno: Coprint s.r.o., 2011. ISBN 978-80-87192-18-4.
- [8] SCHNEIDERKA, P., A KOL.: *Kapitoly z klinické biochemie 2*. Doplněné a přepracované vydání, Praha : Karolinum 2004. ISBN 80-246-0678-X
- [9] WIKISKRIPTA: *Spektrofotometrie* [online]. [cit. 2012-04-29]. Dostupné na [www: www.wikiskripta.eu/index.php/Spektrofotometrie](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Spektrofotometrie)
- [10] BRYCHTA, T.: *Thiazolidindiony, PPAR receptory a metabolický syndrom*[online]. Mediforum 2008, s. 31. [cit. 2012-07-01]. Dostupné na [www: http://www.mediforum.cz/pdf/Brychta_tzd_metabolicky_syndrom.pdf](http://www.mediforum.cz/pdf/Brychta_tzd_metabolicky_syndrom.pdf) ISBN 978-80-7262-543-7.
- [11] VAVERKOVÁ, H.: *Adiponektin: nový spojující článek mezi zánětem, inzulinovou rezistencí a aterosklerotickým kardiovaskulárním onemocněním?* [online]. 2006, 4(3) [cit. 2012-04-29]. Dostupné na [www: http://www.kardiologickeforum.cz/pdf/kf_06_03_03.pdf](http://www.kardiologickeforum.cz/pdf/kf_06_03_03.pdf)
- [12] SHIMADA K., MIYAZAKI T., DAIDA H. *Adiponectin and atherosclerotic disease*. Clin Chim Acta. 2004; 344(1-2):1-12.
- [13] EKMEKCI H., EKMEKCI O. B.: *The Role of Adiponectin in Atherosclerosis and Thrombosis*. Clin Appl Thrombosis/Hemostasis. 2006; 12(2):163–168.

- [14] WANDERS D., PLAISANCE EP., JUDD RL.: *Pharmacological effects of lipid-lowering drugs on circulating adipokines*. World J Diabetes. 2010 Sep; 15;1(4):116-28.
- [15] SHETTY GK., ECONOMIDES PA., HORTON ES., MANTZOROS CS., VEVES A.: *Circulating adiponectin and resistin levels in relation to metabolic factors, inflammatory markers, and vascular reactivity in diabetic patients and subjects at risk for diabetes*. Diabetes Care. 2004 Oct; 27(10):2450-7.
- [16] SHARMA R., KUMAR Ch., GANGWANI S., SUGGA G. S., RANA A. C.: *Resistin and cardiovascular disorder*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 5(1), pp. 1-5, 2011 January.
- [17] LEHRKE M., WOLFE M. L., ROHATGI A., LAZAR M., RADER D.: *Plasma Resistin Levels, Correlated With Markers of Inflammation, are Predictive of Atherosclerosis in Human*. Circulation. 2005; 111: 932-939.
- [18] HYE S. J., KI-HO P., YOUNG M. CH., SUNG S. CH., HYUNG J. CH., SOO Y. CH.: *Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis*. Cardiovascular Research 69. 2006; 76-85.
- [19] PAŘENICOVÁ I., PRYMUSOVA K., BEŇOVSKÁ M., BABUŠÍKOVÁ L., JARKOVSKÝ J., DOSTALOVÁ L., KUBKOVÁ L., LOKAJ P., KALA P., POLOCZEK M., TOMAN O., ŠPINAR J., PAŘENICA J. : *Koncentrace Lp-PLA₂ u stabilních pacientův sekundární prevenci po STEMI a vliv dávky statinů na její hodnoty*. Cor Vasa. 2011; 53:712–716.
- [20] MAZZALI M., KIPARI T., OPHASCHAROENSUK V., WESSON J. A., JOHNSON R., HUGHES J. : *Osteopontin – a molecule for all season*. Q J Med. 2002; 95:3-13.
- [21] MINORETTI P., FALCONE C., CALCAGNINO M., EMANUELE E., BUZZI M., P., COEN E., GEROLDI D. : *Prognostic significance of plasma osteopontin levels in patients with chronic stable angina*. Eur Heart J. 2006; 27 (7): 802-807.
- [22] RACEK J. : *Myeloperoxidáza*. Klin. Biochem. Metab.16 (37). 2008; 222-227.
- [23] BABUŠÍKOVÁ L.: *Posouzení výsledků stanovení fosfolipáza A₂ asociované s lipoproteiny Lp-PLA₂ v souvislosti a aterosklerózou*. Bakalářská práce. 2009.
- [24] BEŇOVSKÁ M., BABUŠÍKOVÁ L., PAŘENICA J., TŮMOVÁ J.: *Fosfolipáza A₂ asociovaná s lipoproteiny – význam, metoda stanovení a klinické monitorování*. Klin. Biochem. Metab.18 (39), 2010; 38-44.
- [25] WIKISKRIPTA: *Cholesterol* [online]. [cit. 2012-04-01]. Dostupné na [www: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Cholesterol.png](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Cholesterol.png)

[26] Oficiální webové stránky firmy Luminex [online]. [cit. 2012-02-01]. Dostupné na www:

<http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/index.htm>

[27] OUCHI N., KIHARA S., ARITAY., ET AL.: *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin*. *Circulation*.1999; 100:2473-2476.

[28] TAKEMOTO M., ET AL.: *Enhanced expression of osteopontin in human diabetic artery and analysis of its functional role in accelerated atherogenesis*. *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000; 20: 624-628.

[29] KAŇKOVÁ K., A KOL.: *Patologická fyziologie pro bakalářské studijní programy*. dotisk 1. vydání, vydavatelství MU, Brno – Kraví Hora. 2007. ISBN 978-80-210-3112-8.

[30] Oficiální webové stránky firmy Panomic [online]. [cit. 2012-02-04]. Dostupné na www: www.panomics.com/images/96_2_Bead_v1.jpg

[31] Oficiální webové stránky firmy BioTek [online]. [cit. 2012-01-10]. Dostupné na www: <http://www.biotek.com/resources/articles/wash-luminex-xmap-assays.html>

[32] Oficiální webové stránky firmy Bio - Rad [online]. [cit. 2012-03-04]. Dostupné na www: http://www.biorad.com/webroot/web/images/lsr/solutions/technologies/protein_functional_analysis/multiplex_immunoassays/technology_detail/pft1_img1.jpg

[33] Oficiální webové stránky firmy Plant research international [online]. [cit. 2012-03-08]. Dostupné na www: <http://www.pri.wur.nl/UK/products/Prime+Diagnostics/Products/luminex>

[34] Manuál přístroje Luminex 200: Luminex 200 system user manual. [online]. [cit.2012-01-07]. Dostupné na www: http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/cell_tissue_analysis/pdfs.Par.34844.File.dat/Luminex%20200%20User%20Manual.pdf

[35] Oficiální webové stránky firmy Luminex [online]. [cit. 2012-01-10]. Dostupné na www: <http://www.luminexcorp.com/prod/groups/public/documents/lmncorp/luminex-100-200.jpg>

[36] Oficiální webové stránky firmy Luminex [online]. [cit. 2012-02-10]. Dostupné na www: <http://www.luminexcorp.com/prod/groups/public/documents/lmncorp/89-00002-00-187.pdf>

- [37] Oficiální webové stránky firmy Roche [online]. [cit. 2012-05-01]. Dostupné na www: <http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/produtos/equipamentos-de-diagnostico/products/diagnostico-centralizado/sistemaslab/cobas-6000/>
- [38] Oficiální webové stránky firmy Medical EXPO [online]. [cit. 2012-04-04]. Dostupné na www: <http://www.medicaexpo.com/prod/abbott/automatic-immunoassay-analyzers-71024-447996.html>
- [39] Manuál přístroje cobas 6000 od firmy Roche: Operator's manual, cobas 6000 analyzer series.
- [40]] Oficiální webové stránky firmy Abbott Diagnostics [online]. [cit. 2012-01-11]. Dostupné na www: <http://www.abbottdiagnostics.cz/nove-produkty/rok-2009/imunoanalyza/architect-mpo.html>
- [41] Uživatelská příručka svazek I. firmy Abbott Diagnostics. B3M427, 36-5131/R1. únor 2005.
- [42] ČEŠKA R., A KOLEKTIV: *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidémie*. 1. vydání, Praha : Triton, 2005. ISBN 80-7254-738-0.
- [43] Firemní prospekty firmy Medista.
- [44] Oficiální výukové stránky Ústavu chemie a biochemie Univerzity Texas. [online].[cit.2012-03-10]. Dostupné na www: http://courses.cm.utexas.edu/archive/Spring2002/CH339K/Robertus/overheads-2/ch11_cholesterol.jpg (leden 07)
- [45] Firemní příbalové letáky firmy Roche.
- [46] Oficiální webové stránky firmy Luminex [online]. [cit. 2012-01-02]. Dostupné na www: <http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/index.htm>
- [47] Příbalový leták firmy R&D Systems: Fluorokine MAP Human Obesity Panel Base Kit, R&D Systems.
- [48] WIKIPEDIA, the free encyclopedia. [online]. [cit. 2012-04-04]. Dostupné na www: http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Fat_triglyceride_shorthand_formula.PNG

10 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1 Výsledky pro srovnání koncentrací Lp-PLA₂

Příloha č. 2 Údaje a naměřená data u základního souboru 186 pacientů po IM

Příloha č. 3 Hodnoty naměřených koncentrací APN, OPN, RESIS, Lp-PLA₂ u souboru 26 pacientů po IM před a po navýšení léčebných dávek statinů

Příloha č. 4 Naměřené koncentrace parametrů u zdravé - kontrolní skupiny

Příloha č. 5 Seznam publikací autora

Příloha č. 1 Výsledky pro srovnání koncentrací Lp-PLA₂

Turbidimetrie Lp-PLA ₂ (ng/ml)	Fotometrie Lp-PLA ₂ (ng/ml)
107	131
116	130
143	151
174	122
227	194
229	210
241	160
250	164
250	158
262	241
290	269
299	201
308	253
313	198
326	247
376	254
435	200
755	231

Příloha č. 2 Údaje a naměřená data u základního souboru 186 pacientů po
IM - 1. část

P. č.	Pohl.	Roč.	BMI	DM	CHOL vst. (mmol/l)	TG vst. (mmol/l)	HDL-C vst. (mmol/l)	LDL-C vst. (mmol/l)	Reinfarkt 12M	LP-PLA ₂ 12M (ng/ml)	CHOL 12M (mmol/l)	TG 12M (mmol/l)	HDL-C 12M (mmol/l)	LDL-C 12M (mmol/l)
1	M	1956	26,81	False	6,0	4,47	1,3	2,7	False	92	3,1	0,77	1,4	1,3
2	Ž	1932	26,57	True	4,1	1,34	1,6	1,8	False	115	4,6	3,65	1,5	1,4
3	Ž	1927	25,3	False	5,6	0,85	2,7	2,5	False	162	4,6	0,82	2,2	2,0
4	M	1948	25,71	False	3,5	1,15	1,3	1,7	False	317	3,1	0,95	0,7	2,0
5	Ž	1927	22,95	False	4,5	1,58	1,9	1,9	False	184	4,6	1,34	1,9	2,1
6	M	1944	39,39	False	3,5	1,12	1,1	1,9	False	130	4,8	1,47	1,4	2,7
7	M	1931	26,23	False	4,7	1,63	1,4	2,6	False	128	4,3	1,72	1,7	1,8
8	M	1962	28,4	False					True	176	3,3	0,65		
9	M	1944	27,13	False	4,0	1,06	0,9	2,6	False	139	4,7	1,20	1,4	2,7
10	M	1959	30,72	False	6,1	6,29	0,8	3,0	False	124	3,8	2,49	0,7	2,0
11	Ž	1938	27,61	False	5,4	1,02	1,8	3,2	False	162	5,1	1,08	1,3	3,3
12	M	1951	34,31	False	6,5	1,08	1,2	5,0	False	130	3,7	1,04	1,1	2,2
13	M	1933	24,22	False	5,7	1,47	1,8	3,2	False	175	4,2	1,09	1,7	2,0
14	M	1937	31,14	False	4,1	1,68	1,3	2,0	False	341	4,7	2,29	1,1	2,5
15	M	1965	26,23	True	8,0	1,48	1,8	5,9	False	152	5,7	3,14	0,9	3,4
16	M	1931	26,42	False	3,1	0,94	1,2	1,5	False	142	2,7	0,66		
17	Ž	1935	29,75	True	5,1	0,99	1,8	2,8	False	131	4,1	1,13	1,7	1,9
18	M	1944	34,29	False	6,2	2,04	1,2	4,1	False	154	3,8	1,20	1,3	1,9
19	M	1951	27,47	False	6,4	2,54	1,0	4,2	False	105	3,4	1,46	1,1	1,6
20	M	1947	29,35	False	4,9	1,59	1,4	2,7	False	122	3,9	2,21	1,3	1,6
21	M	1929	24,16	False	4,2	0,90	1,5	2,3	False	175	4,2	2,43	1,1	2,0
22	M	1954	34,29	False	5,6	1,95	1,5	3,2	False	110	4,0	3,45	1,3	1,1
23	M	1943	33,1	False	4,1	1,44	1,0	2,4	False	105	4,3	1,07	1,1	2,7
24	M	1952	26,57	False	5,1	0,84	1,1	3,6	False	130	3,8	1,50	1,2	1,9
25	M	1929	24,77	False	4,4	0,78	1,7	2,3	False	105	4,7	0,91	1,5	2,8
26	M	1943	31,14	False	4,9	1,56	1,3	2,9	False	357	3,6	1,91	1,1	1,6
27	Ž	1940	29,69	True	4,4	2,11	1,0	2,4	False	143	5,1	2,03	1,0	3,2
28	M	1939	27,68	False	4,1	1,09	1,3	2,3	False	122	3,9	1,37	1,1	2,2
29	Ž	1948	31,25	True	3,8	1,41	1,5	1,7	False	283	4,2	3,41	1,2	1,4
30	Ž	1940	30,39	False	4,5	2,21	0,7	2,8	False	270	4,0	2,41	0,8	2,1
31	M	1952	29,05	False	4,7	1,30	1,4	2,7	False	166	5,1	2,94	0,9	2,9
32	M	1951	29,32	False	7,0	2,10	1,2	5,2	False	427	7,3	1,97	1,0	5,2
33	M	1935	30,39	True	4,0	0,64	1,5	2,2	True	157	2,9	0,69	1,4	1,2
34	Ž	1948	24,09	False	5,0	1,61	0,8	3,5	False	169	4,7	1,41	1,0	3,1
35	M	1930	26,37	False	5,0	1,01	1,2	3,3	False	176	3,5	1,06	1,5	1,5
36	M	1961	24,78	False	6,8	2,30	1,1	4,8	False	224	4,9	1,79	1,0	3,1
37	M	1946	28,33	False	4,6	1,42	1,2	2,7	False	110	3,6	2,92	0,9	1,4
38	M	1940	31,1	True	6,5	1,37	1,5	4,4	False	185	7,0	1,34	1,3	5,3
39	Ž	1934	29	False	5,6	3,73	1,6	2,3	False	135	4,7	2,36	1,5	2,1

P. č.	Pohl.	Roč.	BMI	DM	CHOL vst. (mmol/l)	TG vst. (mmol/l)	HDL-C vst. (mmol/l)	LDL-C vst. (mmol/l)	Reinfarkt 12M	LP-PLA ₂ 12M (ng/ml)	CHOL 12M (mmol/l)	TG 12M (mmol/l)	HDL-C 12M (mmol/l)	LDL-C 12M (mmol/l)
40	Ž	1942	23,44	False	5,4	2,13	1,2	3,2	False	471	4,1	1,49	1,4	2,0
41	M	1957	25,25	False	5,7	2,08	1,5	3,2	False	279	4,7	2,93	1,4	2,0
42	Ž	1935	24,39	False	5,7	1,73	1,0	3,9	False	178	3,9	1,31	1,2	2,1
43	M	1942	29,39	True	4,1	1,88	1,0	2,2	False	216	3,4	2,96	0,9	1,1
44	M	1947	28,4	True	15,4	5,75			False	115	3,3	3,34	1,6	0,2
45	M	1954	33,71	True	4,8	1,60	1,2	2,9	False	124	4,3	1,65	1,1	2,4
46	Ž	1954	35,11	False	6,2	1,98	1,6	3,7	False	94	4,6	1,47	1,2	2,7
47	M	1933	34,48	False	5,0	1,72	1,0	3,2	False	122	3,0	2,49	0,7	1,2
48	M	1951	24,22	False	6,8	1,96	1,2	4,8	False	172	3,7	1,27	1,3	1,8
49	M	1933	29,17	False	6,9	2,03	1,6	4,4	True	128	3,6	1,38	0,9	2,1
50	M	1948	30,93	True	4,11	2,40	1,0	2	False	156	6,8	4,99	1,0	4,6
51	M	1950	28,72	True	4,0	1,96	0,9	2,2	False	104	2,6	1,73		
52	M	1939	23,67	True	5,9	3,70	1,2	3	False	100	3,5	4,65	0,8	1,4
53	Ž	1937	25,83	False	5,6	2,29	1,4	3,1	False	92	4,8	2,87	1,1	2,4
54	Ž	1938	24,61	True	5,4	2,52	1,1	3,1	False	200	4,5	2,84	1,0	2,2
55	Ž	1931	22,77	False	4,8	1,65	1,3	2,7	False	104	2,6	1,69	1,0	0,8
56	M	1938	28,91	False	4,9	2,39	0,9	4,4	False	124	3,3	3,05	0,9	1,0
57	M	1948	27,76	False	8,0	1,86	1,4	6	False	121	4,7	1,65	1,3	2,6
58	Ž	1940	26,37	False	5,3	0,92	1,7	3,2	False	306	6,0	1,22	1,6	
59	Ž	1930	28,76	True	4,3	2,48	0,9	2,3	False	64	2,4	1,69	1,0	0,6
60	M	1945	26,23	False	5,9	0,67	1,5	4	False	167	3,3	0,82	1,8	1,1
61	Ž	1937	33,2	False	6,5	0,84	1,8	4,3	False	154	3,9	0,93	1,6	1,9
62	M	1941	29,34	True	4,3	2,84	1,3	1,7	False	165	3,3	1,87	1,0	1,4
63	M	1943	23,84	False	6,0	3,42	1,3	3,1	False	351	7,9	3,06	1,2	5,4
64	M	1940	23,3	False	4,0	0,95	1,1	2,5	False	91	2,8	1,05	1,1	1,2
65	Ž	1932	30,48	False	7,1	1,51	1,4	5,4	False	160	5,0	2,15	1,0	3,0
66	M	1937	26,59	False	6,4	2,48	1,1	4,2	False	156	4,1	1,26	1,2	2,3
67	M	1950	27,77	False	6,0	1,33	1,2	4,2	False	137	4,2	1,47	1,0	2,5
68	Ž	1958	27,04	False	4,7	3,35	1,4	1,8	False	103	5,0	5,65	1,5	1,8
69	M	1947	34,72	False	5,8	0,72	1,0	4,5	False	480	4,7	1,56	1,0	3,0
70	M	1946	29,22	False					False	146	3,6	2,52	1,0	1,4
71	Ž	1937	35,32	False	3,8	1,36	1,1	2,1	False	122	3,7	1,39	1,2	1,9
72	Ž	1936	28,04	True	5,8	2,48	1,5	3,1	False	95	4,9	3,93	1,1	2,0
73	M	1935	31,44	False	4,6	1,68	0,9	2,9	False	239	3,5	1,33	1,1	1,8
74	M	1948	24,76	False	5,0	0,75	1,4	3,3	False	200	4,3	1,40	1,4	2,3
75	Ž	1947	30,82	False	4,9	0,96	1,7	2,7	False	123	4,0	0,80	1,8	1,8
76	M	1932	24,49	False	6,0	1,00	1,4	4,1	False	160	5,0	3,04	0,8	2,8
77	Ž	1929	25,69	False	4,4	0,99	1,4	2,5	False	144	3,9	1,35	1,4	1,9
78	M	1936	22,77	False	4,9	0,85	1,3	3,2	False	164	3,8	0,52	1,9	1,7
79	M	1959	1959	False	5,3	3,37	1,1	2,7	False	266	3,7	1,94	1,0	1,8
80	M	1939	23,78	False	5,5	1,37	1,3	3,6	False	155	3,9	1,18	1,3	2,1
81	M	1962	27,68	False	3,6	3,30	0,9	1,2	False	111	5,7	9,88	0,7	1,1

P. č.	Pohl.	Roč.	BMI	DM	CHOL vst. (mmol/l)	TG vst. (mmol/l)	HDL-C vst. (mmol/l)	LDL-C vst. (mmol/l)	Reinfarkt 12M	LP-PLA ₂ 12M (ng/ml)	CHOL 12M (mmol/l)	TG 12M (mmol/l)	HDL-C 12M (mmol/l)	LDL-C 12M (mmol/l)
82	M	1954	29,41	False	6,5	2,25	1,2	4,3	False	137	5,1	1,94	1,5	2,7
83	M	1937	25,56	False					False	197	3,3	1,09	1,4	1,4
84	M	1950	31,74	False	4,2	2,31	0,8	2,3	False	87	4,8	3,19	1,0	2,3
85	M	1963	31,56	False	5,7	1,66	1,2	3,7	False	103	4,7	3,47	1,0	2,1
86	M	1953	26,87	False	6,7	1,84	1,2	4,5	False	106	4,2	1,12	1,4	2,3
87	M	1955	29,94	False	7,2	8,71	0,7	3,2	False	119	6,1	14,17		1,3
88	M	1940	24,09	False	4,0	2,32	0,7	2,2	False	135	3,7	2,46	1,0	1,6
89	M	1948	43,9	True	3	2,42	0,8	1,1	False	138	3,3	1,9	0,8	1,6
90	M	1931	27,77	True	4,4	1,20	1,1	2,7	False	159	3,1	0,76	1,1	1,7
91	M	1953	30,11	False	3,9	2,34	0,9	1,9	False	101	4,3	3,61	1,0	1,6
92	Ž	1927	29,38	False	7,2	1,46	1,4	5,1	False	123	4,5	1,14	1,8	2,2
93	Ž	1939	24,69	True	6,8	2,39	1,1	5,5	False	205	4,8	3,98	0,7	2,3
94	Ž	1937	28,37	False	7,7	3,33	1,6	5,3	False	94	4,8	2,45	1,7	2,0
95	M	1951	24,62	False	5,8	1,65	1,3	3,7	False	106	4,9	1,12	1,2	3,2
96	M	1937	24,69	False	2,9	1,82	1,1	1,0	False	137	3,3	1,76	1,5	1,0
97	M	1953	33,44	False	7,4	3,43	1,2	4,8	False	80	4,7	2,36	1,1	2,5
98	Ž	1933	22,41	True	4,6	1,61	1,5	2,4	False	271	6,9	2,67	1,8	3,9
99	M	1936	27,76	False	4,2	1,39	1,8	1,8	False	163	5,4	2,38	1,5	2,8
100	M	1931	27,73	True	3,2	0,89	1,5	1,3	False	144	4,1	1,10	1,8	1,8
101	M	1961	27,17	False	5,1	3,21	0,7	2,9	False	175	4,7	4,54	0,6	2,6
102	M	1945	27,82	False	4,4	2,73	0,8	2,3	False	75	2,1	1,43	0,8	0,6
103	M	1971	24,69	False	4,1	4,95	0,6	2,2	False	123	6,9	7,68	0,8	3,0
104	M	1922	25,25	False	4,3	0,95	1,5	2,3	False	158	3,2	0,86	1,6	1,2
105	M	1936	28,73	False	6,7	3,79	1	4,0	False	237	4,8	8,66	0,7	1,3
106	M	1946	28,74	False	6,2	2,64	0,8	4,2	False	255	8,0	6,51	0,9	4,0
107	M	1940	29,39	False	5,6	1,06	1,6	3,5	False	213	3,9	1,01	1,2	2,2
108	Ž	1948	26,57	False	4,6	1,04	1,4	2,7	False	167	3,4	2,63	1,0	1,2
109	M	1956	28,39	False	5,2	1,87	0,9	3,4	False	163	7,2	3,79	0,9	5,0
110	M	1954	24,69	True	6,0	2,69	1	3,8	False	640	3,3	2,66	1,0	1,1
111	M	1950	35,35	True	4,0	2,11	0,7	2,3	False	75	3,3	2,78	0,8	1,2
112	M	1942	25,28	False	6,3	2,06	1,4	4,0	False	169	3,5	1,01	1,4	1,6
113	Ž	1937	26,03	False	6,3	1,34	1	5,2	False	165	4,6	0,84	1,0	3,2
114	Ž	1933	27,34	False	4,3	1,58	1,4	2,2	False	133	4,5	1,23	1,8	2,1
115	M	1953	35,29	False	5,3	1,13	0,8	4,0	False	128	2,6	1,65	0,7	1,1
116	Ž	1942	30,86	False	4,5	2,59	1,1	2,2	False	167	4,6	1,89	1,0	2,7
117	Ž	1953	44,08	False	6,3	5,87	1,6	3,3	False	209	6,3	3,45	1,2	3,5
118	Ž	1928	26,77	True	6,1	2,53	1,2	3,7	False	115	6,3	3,61	1,0	3,6
119	M	1944	24,54	False	6,1	1,19	2,6	3,0	False	162	3,8	0,94	1,5	1,9
120	M	1961	28,72	False	4,9	1,20	1,2	3,1	False	147	3,1	0,77	1,4	1,3
121	M	1949	28,83	False	4,4	0,76	1,5	2,6	False	103	3,3	1,26	1,4	1,3
122	M	1943	26,73	False	5,8	2,26	1	3,8	False	114	3,8	2,39		
123	M	1952	25,46	False	3,8	1,81	1,2	1,8	False	163	3,9	2,97	1,0	1,5

P. č.	Pohl.	Roč.	BMI	DM	CHOL vst. (mmol/l)	TG vst. (mmol/l)	HDL-C vst. (mmol/l)	LDL-C vst. (mmol/l)	Reinfarkt 12M	LP-PLA ₂ 12M (ng/ml)	CHOL 12M (mmol/l)	TG 12M (mmol/l)	HDL-C 12M (mmol/l)	LDL-C 12M (mmol/l)
124	M	1937	23,14	False	6,7	2,83	1,9	3,5	False	126	4,5	1,11	1,4	2,6
125	M	1942	18,52	False	4,2	1,57	1,3	2,2	False	175	2,8	1,23	1,0	1,2
126	M	1942	28,33	True	5,5	3,28	0,9	3,1	False	185	3,6	4,43	0,8	0,8
127	Ž	1945	25,39	False	5,0	1,35	1,1	3,3	False	117	4,8	1,76	1,5	2,5
128	M	1952	36,11	False	5,0	0,78	1,3	3,3	False	130	3,9	3,67	0,8	1,4
129	M	1947	30,67	False	4,5	1,87	0,7	2,9	False	117	2,8	3,54	0,7	0,5
130	M	1956	30,16	False	3,7	2,54	0,8	1,7	False	66	3,2	2,60	0,8	1,2
131	M	1943	22,46	True	4,2	1,24	1,2	2,4	False	131	3,4	1,28	0,7	2,1
132	Ž	1958	24,98	False	4,3	1,80	0,9	2,6	False	114	3,5	1,73	0,8	2,0
133	M	1939	26,57	True	5,2	4,25	1,4	3	False	123	3,2	1,81	1,1	1,3
134	M	1951	24,06	False	6,8	0,83	1,8	4,3	False	103	5,2	2,58	1,3	2,7
135	M	1947	30,67	False	5,7	3,47	1,5	2,6	False	131	4,2	2,42	0,9	2,2
136	M	1926	30,42	False	3,6	1,37	1,5	1,5	False	104	3,2	1,17	1,6	1,1
137	M	1950	34,82	False	6,3	1,48	1,2	4,4	False	106	4,2	2,48	0,8	2,3
138	M	1970	30,67	False	6,3	2,84	0,9	4,1	False	178	5,8	4,29	0,9	2,9
139	M	1939	34,29	False	4,9	1,9	1,1	3	False	162	3,9	1,36	0,9	2,4
140	M	1958	31,89	False	4,9	1,81	0,9	3,5	False	712	4,1	1,69	0,8	2,5
141	Ž	1955	21,34	False	5,3	1,17	2,1	2,7	False	135	4,4	1,40		
142	M	1952	26,08	False	4,5	2,49	0,9	2,5	False	135	4,6	3,12	1,2	2,0
143	M	1964	29,07	True	5,6	5,00	0,9	3,9	False	269	5,9	1,78	0,9	4,2
144	M	1955	27,17	True	4,7	1,67	1,9	2,1	False	154	4,2	1,66	1,1	2,3
145	Ž	1941	29,27	False	4,2	1,41	1,4	2,2	False	158	4,5	1,69		
146	M	1952	28,41	False	5,2	1,89	1,2	3,1	False	171	5,1	0,84	1,2	3,5
147	Ž	1950	20,28	False	5,4	0,78	1,4	3,6	False	324	3,8	1,07	1,2	2,1
148	M	1937	27,47	True	5,0	1,09	1,4	3,1	False	225	4,4	1,21	1,1	2,7
149	M	1936	31,14	True	3,9	1,00	1,5	1,9	False	162	4,0	2,73	1,0	1,9
150	Ž	1941	30,82	False	5,8	3,23	0,7	3,6	False	142	3,6	2,80	0,6	1,7
151	M	1951	27,1	False	4,9	4,66	1,3	2,4	False	164	5,3	2,40	1,8	2,4
152	M	1943	30,86	False	7,9	1,50	1,5	5,9	False	115	4,8	2,36	0,9	2,8
153	M	1937	29,32	True	3,2	0,67	1,8	1,1	True	104	3,0	1,68	1,1	1,1
154	Ž	1943	31,25	True	4,8	3,05	0,6	2,8	False	167	5,1	2,06	1,3	2,9
155	Ž	1955	29,3	False	6,1	3,38	1,5	3,0	False	140	5,6	4,90	2,0	2,2
156	M	1940	26,58	False	4,5	2,18	1,5	2,0	False	130	4,6	2,17	1,9	1,7
157	M	1944	26,83	False	6,0	0,83	2,2	3,4	False	162	3,8	0,98	1,5	1,9
158	M	1954	26,23	False	3,2	1,34	1,0	1,6	False	124	3,4	2,11	0,8	1,6
159	M	1955	24,22	False	4,2	1,32	1,2	2,4	True	145	5,6	5,09	1,1	3,4
160	M	1940	32,51	False	6,4	1,97	0,9	4,7	False	116	4,8	1,69	0,8	3,2
161	M	1936	24,45	False	6,1	1,58	1,6	3,8	True	214	4,6	2,49	1,3	2,2
162	M	1952	26,99	False	5,9	0,77	2,1	3,4	False	274	4,8	0,99	1,3	3,0
163	M	1957	25,95	False	4,5	6,46	0,7	1,8	False	158	4,1	4,01		
164	M	1943	27,46	True	4,7	1,78	1,1	2,8	False	137	3,6	0,86	1,5	1,7
165	M	1950	22,84	True	5,4	1,96	1,2	3,3	False	140	3,4	0,86	1,2	1,8

P. č.	Pohl.	Roč.	BMI	DM	CHOL vst. (mmol/l)	TG vst. (mmol/l)	HDL-C vst. (mmol/l)	LDL-C vst. (mmol/l)	Reinfarkt 12M	LP-PLA ₂ 12M (ng/ml)	CHOL 12M (mmol/l)	TG 12M (mmol/l)	HDL-C 12M (mmol/l)	LDL-C 12M (mmol/l)
166	M	1929	29,41	False	4,9	1,29	0,6	3,7	False	133	3,5	1,02	0,9	2,1
167	M	1937	29,39	True	5,0	0,77	1,4	3,3	False	214	3,7	1,76	1,0	1,9
168	Ž	1949	20,9	False	5,0	0,70	2,2	2,5	False	207	6,0	0,84	2,6	3,0
169	M	1962	29,22	False	6,6	2,48	1,1	4,4	False	95	3,9	1,51	0,9	2,3
170	M	1933	23,39	False	4,0	1,12	1,3	2,2	False	239	3,2	0,67	1,6	1,3
171	Ž	1952	34,53	False	5,0	2,28	0,9	3,1	False	71	4,6	2,75	1,0	2,3
172	M	1944	28,7	False	1,4	0,46	0,5	0,7	False	154	3,1	1,19	1,0	1,6
173	Ž	1944	23,74	False	4,0	1,09	1,9	1,6	False	115	3,8	1,32	1,9	1,3
174	M	1940	30,04	False	4,4	1,85	1,8	1,8	False	287	3,8	0,98	1,6	1,8
175	M	1964	23,84	False	5,0	1,28	1,3	3,1	False	180	4,0	1,30	1,3	2,1
176	M	1955	22,86	False	4,9	1,55	1,9	2,3	False	271	5,5	1,02	1,9	3,1
177	M	1935	20,29	True	5,4	0,69	2,3	2,8	False	108	3,3	1,24	1,2	1,5
178	Ž	1939	31,25	True	7,1	6,95	1,0	3,7	True	171	6,7	4,16	0,7	4,1
179	M	1958	26,59	False	6,6	1,16	1,2	5,4	False	200	4,8	1,62	1,0	3,1
180	M	1942	25,85	False	4,8	1,03	1,3	3,0	True	116	3,3	0,96	1,2	1,7
181	Ž	1935	28,26	True	4,1	2,07	1,3	1,9	False	115	3,1	1,38	1,2	1,3
182	M	1969	33,95	False	3,1	2,91	0,9	3,9	False	162	3,8	2,49	0,6	2,1
183	Ž	1941	35,32	True	5,1	0,76	1,7	3,1	False	99	3,1	1,39	1,2	1,3
184	M	1941	21,3	False	4,1	0,71	1,5	2,3	False	98	3,2	0,46	1,3	1,7
185	M	1952	28,41	False	5,9	3,44	0,9	3,4	False	154	5,3	2,18	1,4	2,9
186	M	1958	28,37	False	5,6	2,59	1,1	3,3	False	302	5,1	3,71	0,9	2,5

Pozn.: 1) P. č. = pacient číslo

2) Pohl. = pohlaví

3) Roč. = ročník

Příloha č. 2 - 2. část

P. č.	Pohl.	Ročník	LP- PLA ₂ před (ng/ml)	LP- PLA ₂ po (ng/ml)	MPO 12M (pmol/l)	CHOL před (mmol/l)	CHOL po (mmol/l)	HDL-C před (mmol/l)	HDL-C po (mmol/l)	TG před (mmol/l)	TG po (mmol/l)	LDL-C před (mmol/l)	LDL-C po (mmol/l)
1	M	1956											
2	Ž	1932											
3	Ž	1927											
4	M	1948	389	435	658	3,6	4,2	1,5	1,5	0,89	0,90	1,7	2,3
5	Ž	1927											
6	M	1944											
7	M	1931											
8	M	1962			164								
9	M	1944											
10	M	1959											
11	Ž	1938											
12	M	1951											
13	M	1933											
14	M	1937			223								
15	M	1965											
16	M	1931											
17	Ž	1935											
18	M	1944											
19	M	1951											
20	M	1947											
21	M	1929											
22	M	1954											
23	M	1943											
24	M	1952											
25	M	1929											
26	M	1943			1317								
27	Ž	1940											
28	M	1939											
29	Ž	1948	326	250	383	3,8	4,2	1,5	1,3	1,39	1,45	1,7	2,2
30	Ž	1940			1277								
31	M	1952											
32	M	1951			448								
33	M	1935											
34	Ž	1948											
35	M	1930											
36	M	1961	150	205		4,6	5,0	0,9	0,8	2,28	2,93	2,7	2,9
37	M	1946											
38	M	1940											

P. č.	Pohl.	Ročník	LP-PLA ₂ před (ng/ml)	LP-PLA ₂ po (ng/ml)	MPO 12M (pmol/l)	CHOL před (mmol/l)	CHOL po (mmol/l)	HDL-C před (mmol/l)	HDL-C po (mmol/l)	TG před (mmol/l)	TG po (mmol/l)	LDL-C před (mmol/l)	LDL-C po (mmol/l)
39	Ž	1934											
40	Ž	1942	485	385	333	7,2	6,6	1,4	1,5	2,16	2,28	4,7	4,1
41	M	1957	282	235	797	5,0	4,6	1,6	1,5	1,52	2,19	2,7	2,1
42	Ž	1935											
43	M	1942			215								
44	M	1947											
45	M	1954											
46	Ž	1954											
47	M	1933											
48	M	1951											
49	M	1933											
50	M	1948											
51	M	1950											
52	M	1939											
53	Ž	1937											
54	Ž	1938											
55	Ž	1931											
56	M	1938											
57	M	1948											
58	Ž	1940			137								
59	Ž	1930			189								
60	M	1945											
61	Ž	1937											
62	M	1941											
63	M	1943	313	297	424	6,2	5,6	1,3	0,9	1,73	1,46	4,1	4,0
64	M	1940											
65	Ž	1932											
66	M	1937											
67	M	1950											
68	Ž	1958											
69	M	1947	376	241	193	6,2	3,4	1,2	1,1	1,98	0,74	4,1	2,0
70	M	1946											
71	Ž	1937											
72	Ž	1936			157								
73	M	1935	290	229		4,6	3,9	1,2	1,5	0,96	0,92	3,0	2,0
74	M	1948	163	181		4,4	4,4	1,7	1,4	1,06	1,12	2,2	2,5
75	Ž	1947											
76	M	1932											
77	Ž	1929											
78	M	1936											
79	M	1959			160								

P. č.	Pohl.	Ročník	LP-PLA ₂ před (ng/ml)	LP-PLA ₂ po (ng/ml)	MPO 12M (pmol/l)	CHOL před (mmol/l)	CHOL po (mmol/l)	HDL-C před (mmol/l)	HDL-C po (mmol/l)	TG před (mmol/l)	TG po (mmol/l)	LDL-C před (mmol/l)	LDL-C po (mmol/l)
80	M	1939											
81	M	1962											
82	M	1954											
83	M	1937				2,6	3,8	1,2	1,2	1,32	1,39	0,8	2,0
84	M	1950											
85	M	1963											
86	M	1953											
87	M	1955											
88	M	1940			141								
89	M	1948											
90	M	1931											
91	M	1953	236										
92	Ž	1927											
93	Ž	1939			133								
94	Ž	1937											
95	M	1951											
96	M	1937											
97	M	1953											
98	Ž	1933	170		479	4,5		1,4		1,65		2,3	
99	M	1936			257								
100	M	1931											
101	M	1961											
102	M	1945											
103	M	1971											
104	M	1922											
105	M	1936			525								
106	M	1946			125								
107	M	1940	245	123		4,5	3,2	1,4	1,2	0,87	1,09	2,7	1,5
108	Ž	1948											
109	M	1956											
110	M	1954	433	478		3,4	3,5	1,2	1,2	1,6	1,74	2,2	2,3
111	M	1950											
112	M	1942											
113	Ž	1937											
114	Ž	1933											
115	M	1953											
116	Ž	1942											
117	Ž	1953	226			7,4		1,5		3,37		4,4	
118	Ž	1928											
119	M	1944											
120	M	1961											

P. č.	Pohl.	Ročník	LP- PLA ₂ před (ng/ml)	LP- PLA ₂ po (ng/ml)	MPO 12M (pmol/l)	CHOL před (mmol/l)	CHOL po (mmol/l)	HDL-C před (mmol/l)	HDL-C po (mmol/l)	TG před (mmol/l)	TG po (mmol/l)	LDL-C před (mmol/l)	LDL-C po (mmol/l)
121	M	1949											
122	M	1943											
123	M	1952											
124	M	1937											
125	M	1942											
126	M	1942											
127	Ž	1945											
128	M	1952											
129	M	1947											
130	M	1956			162								
131	M	1943											
132	Ž	1958											
133	M	1939											
134	M	1951											
135	M	1947											
136	M	1926											
137	M	1950											
138	M	1970											
139	M	1939											
140	M	1958	755	782	590	4,9	4,5	1,0	0,9	1,56	2,82	3,2	2,3
141	Ž	1955											
142	M	1952											
143	M	1964											
144	M	1955											
145	Ž	1941											
146	M	1952			226								
147	Ž	1950	280	247	193	4,1	3,3	1,2	0,9	1,09	0,94	2,4	1,9
148	M	1937	308			5,2	5,3	1,4	1,3	1,11	0,85	3,3	3,6
149	M	1936											
150	Ž	1941											
151	M	1951											
152	M	1943											
153	M	1937											
154	Ž	1943											
155	Ž	1955											
156	M	1940			116								
157	M	1944											
158	M	1954											
159	M	1955											
160	M	1940											
161	M	1936	217	198	111	6,3	4,9	1,5	1,3	1,33	1,27	4,2	3,0

P. č.	Pohl.	Ročník	LP-PLA ₂ před (ng/ml)	LP-PLA ₂ po (ng/ml)	MPO 12M (pmol/l)	CHOL před (mmol/l)	CHOL po (mmol/l)	HDL-C před (mmol/l)	HDL-C po (mmol/l)	TG před (mmol/l)	TG po (mmol/l)	LDL-C před (mmol/l)	LDL-C po (mmol/l)
162	M	1952	1065		167	5,8		1,8		0,84		3,6	
163	M	1957											
164	M	1943											
165	M	1950											
166	M	1929											
167	M	1937	247	248		4,2	3,7	1,1	0,9	1,15	0,97	2,6	2,4
168	Ž	1949	174	158		4,4	5,4	2,5	2,4	0,69	0,92	1,6	2,5
169	M	1962											
170	M	1933	259	141	340	3,4	2,8	1,6	1,4	1,04	0,9	1,8	1,4
171	Ž	1952											
172	M	1944											
173	Ž	1944											
174	M	1940	299	227	404	3,9	3,6	1,8	1,6	1,21	0,91	1,5	1,5
175	M	1964											
176	M	1955	275	228	374	6,5	6,4	2,3	1,5	1,75	1,51	3,4	4,2
177	M	1935											
178	Ž	1939											
179	M	1958	262	205		4,4	4,4	1,0	0,9	1,59	1,09	2,7	3,0
180	M	1942											
181	Ž	1935											
182	M	1969											
183	Ž	1941			371								
184	M	1941											
185	M	1952											
186	M	1958	326	209	275	5,2	3,4	0,9	0,8	2,14	1,43	3,3	1,9

Příloha č. 2 - 3.část

P. č.	Pohl.	Ročník	OPN před (ng/ml)	OPN po (ng/ml)	RESIS před (pg/ml)	RESIS po (pg/ml)	APN před (ng/ml)	APN po (ng/ml)
1	M	1956						
2	Ž	1932						
3	Ž	1927						
4	M	1948	chyba měření	7,62	14857	8569	6456	6382
5	Ž	1927						
6	M	1944						
7	M	1931						
8	M	1962						
9	M	1944						
10	M	1959						
11	Ž	1938						
12	M	1951						
13	M	1933						
14	M	1937						
15	M	1965						
16	M	1931						
17	Ž	1935						
18	M	1944						
19	M	1951						
20	M	1947						
21	M	1929						
22	M	1954						
23	M	1943						
24	M	1952						
25	M	1929						
26	M	1943						
27	Ž	1940						
28	M	1939						
29	Ž	1948	24,59	chyba měření	9687	10089	10567	9507
30	Ž	1940						
31	M	1952						
32	M	1951						
33	M	1935						
34	Ž	1948						
35	M	1930						

P. č.	Pohl.	Ročník	OPN před (ng/ml)	OPN po (ng/ml)	RESIS před (pg/ml)	RESIS po (pg/ml)	APN před (ng/ml)	APN po (ng/ml)
36	M	1961	chyba měření	3,31	3684	3844	3325	3252
37	M	1946						
38	M	1940						
39	Ž	1934						
40	Ž	1942	8,6	12,01	5342	5555	6524	5175
41	M	1957	chyba měření	2,48	6134	28686	20904	10532
42	Ž	1935						
43	M	1942						
44	M	1947						
45	M	1954						
46	Ž	1954						
47	M	1933						
48	M	1951						
49	M	1933						
50	M	1948						
51	M	1950						
52	M	1939						
53	Ž	1937						
54	Ž	1938						
55	Ž	1931						
56	M	1938						
57	M	1948						
58	Ž	1940						
59	Ž	1930						
60	M	1945						
61	Ž	1937						
62	M	1941						
63	M	1943	8,6	2,48	8068	6584	10615	6776
64	M	1940						
65	Ž	1932						
66	M	1937						
67	M	1950						
68	Ž	1958						
69	M	1947	19,44	chyba měření	5256	5964	7950	2194
70	M	1946						
71	Ž	1937						

P. č.	Pohl.	Ročník	OPN před (ng/ml)	OPN po (ng/ml)	RESIS před (pg/ml)	RESIS po (pg/ml)	APN před (ng/ml)	APN po (ng/ml)
72	Ž	1936						
73	M	1935	chyba měření	chyba měření	7671	4862	10553	2671
74	M	1948	chyba měření	8,6	7051	8419	10032	5563
75	Ž	1947						
76	M	1932						
77	Ž	1929						
78	M	1936						
79	M	1959						
80	M	1939						
81	M	1962						
82	M	1954						
83	M	1937	chyba měření	8,6	7791	9337	6221	5680
84	M	1950						
85	M	1963						
86	M	1953						
87	M	1955						
88	M	1940						
89	M	1948						
90	M	1931						
91	M	1953						
92	Ž	1927						
93	Ž	1939						
94	Ž	1937						
95	M	1951						
96	M	1937						
97	M	1953						
98	Ž	1933	24,34		8158		6179	
99	M	1936						
100	M	1931						
101	M	1961						
102	M	1945						
103	M	1971						
104	M	1922						
105	M	1936						
106	M	1946						
107	M	1940	28,63	9,96	6548	8841	12946	10878
108	Ž	1948						
109	M	1956						

P. č.	Pohl.	Ročník	OPN před (ng/ml)	OPN po (ng/ml)	RESIS před (pg/ml)	RESIS po (pg/ml)	APN před (ng/ml)	APN po (ng/ml)
110	M	1954	13,86	5,69	5749	5748	4154	4208
111	M	1950						
112	M	1942						
113	Ž	1937						
114	Ž	1933						
115	M	1953						
116	Ž	1942						
117	Ž	1953	13,41		7867		8826	
118	Ž	1928						
119	M	1944						
120	M	1961						
121	M	1949						
122	M	1943						
123	M	1952						
124	M	1937						
125	M	1942						
126	M	1942						
127	Ž	1945						
128	M	1952						
129	M	1947						
130	M	1956						
131	M	1943						
132	Ž	1958						
133	M	1939						
134	M	1951						
135	M	1947						
136	M	1926						
137	M	1950						
138	M	1970						
139	M	1939						
140	M	1958	10,81	chyba měření	6461	12344	2538	9437
141	Ž	1955						
142	M	1952						
143	M	1964						
144	M	1955						
145	Ž	1941						
146	M	1952						
147	Ž	1950	5,39	18,41	4971	7789	3230	6205
148	M	1937	4,75		4887		9153	
149	M	1936						

P. č.	Pohl.	Ročník	OPN před (ng/ml)	OPN po (ng/ml)	RESIS před (pg/ml)	RESIS po (pg/ml)	APN před (ng/ml)	APN po (ng/ml)
150	Ž	1941						
151	M	1951						
152	M	1943						
153	M	1937						
154	Ž	1943						
155	Ž	1955						
156	M	1940						
157	M	1944						
158	M	1954						
159	M	1955						
160	M	1940						
161	M	1936	chyba měření	18,41	7105	5227	8827	7251
162	M	1952	7,87		5286		11367	
163	M	1957						
164	M	1943						
165	M	1950						
166	M	1929						
167	M	1937	19	26,47	5796	4911	5131	4537
168	Ž	1949	chyba měření	29,91	11005	4750	11348	8930
169	M	1962						
170	M	1933	chyba měření	10,39	6892	6776	6320	5981
171	Ž	1952						
172	M	1944						
173	Ž	1944						
174	M	1940	15,9	57,8	8791	4776	5720	8829
175	M	1964						
176	M	1955	13,5	14,9	6477	3903	<40,55	12260
177	M	1935						
178	Ž	1939						
179	M	1958	12,96	5,39	7934	8511	8309	5054
180	M	1942						
181	Ž	1935						
182	M	1969						
183	Ž	1941						
184	M	1941						
185	M	1952						
186	M	1958	12,58	17,65	3802	4939	8075	10287

Příloha č. 3 Hodnoty naměřených koncentrací APN, OPN, RESIS, Lp-PLA₂ u souboru 26 pacientů po IM před a po navýšení léčebných dávek statinů

P.č	Pohl.	Roč.	Lp-PLA ₂ před (ng/ml)	Lp-PLA ₂ po (ng/ml)	OPN před (ng/ml)	OPN po (ng/ml)	RESIS před (pg/ml)	RESIS před (pg/ml)	APN před (ng/ml)	APN Po (ng/ml)
1	Ž	1953	226		13,41		7867		8826	
2	Ž	1950	280	247	5,39	18,41	4971	7789	3230	6205
3	Ž	1933	170		24,34		8158		6179	
4	M	1936	217	198	0	18,41	7105	5227	8827	7251
5	M.	1948	389	435	0	7,62	14857	8569	6456	6382
6	Ž	1949	174	158	0	29,91	11005	4750	11348	8930
7	M	1957	282	237	0	2,48	6134	28686	20904	10532
8	M	1955	275	228	13,5	14,9	6477	3903	<40,55	12260
9	M	1948	163	181	0	8,6	7051	8419	10032	5563
10	M	1940	245	123	28,63	9,96	6548	8841	12946	10878
11	M	1943	313	297	8,6	2,48	8068	6584	10615	6776
12	M.	1958	326	209	12,58	17,65	3802	4939	8075	10287
13	M	1952	1065		7,87		5286		11367	
14	M	1954	433	478	13,86	5,69	5749	5748	4154	4208
15	Ž	1942	485	385	8,6	12,01	5342	5555	6524	5175
16	M	1937	247	248	19	26,47	5796	4911	5131	4537
17	M	1937	308		4,75		4887		9153	
18	M	1940	299	227	15,9	57,8	8791	4776	5720	8829
19	M	1958	262	205	12,96	5,39	7934	8511	8309	5054
20	M	1961	150	205	0	3,31	3684	3844	3325	3252
21	M	1935	290	229	0	0	7671	4862	10553	2671
22	M	1958	755	782	10,81	0	6461	12344	2538	9437
23	M	1947	376	241	19,44	0	5256	5964	7950	2194
24	Ž	1948	326	250	24,59	0	9687	10089	10567	9507
25	M	1937	143	194	0	8,6	7791	9337	6221	5680
26	M	1933	259	141	0	10,39	6892	6776	6320	5981

Příloha č. 4 Naměřené koncentrace parametrů u zdravé - kontrolní skupiny

P.č.	Pohl.	Roč.	CHOL (mmol/l)	TG (mmol/l)	HDL-C (mmol/l)	LDL-C (mmol/l)	Lp- PLA ₂ (ng/ml)	MPO (pmol/l)	OPN (ng/ml)	RESIS (pg/ml)	APN (ng/ml)
1	Ž	1977	4,8	1,18	1,3	3,4	165		3,31	7981	7642
2	Ž	1965	6,8	1,49	2,2	5,0	174		<1,05	5532	7970
3	Ž	1968	4	1,38	1,2	2,8	118		2,48	37056	8703
4	Ž	1960	5,5	0,77	2,1	3,8	146		<1,05	7468	5929
5	Ž	1973	3,1	1,21	1,2	1,8	125		1,54	3884	7690
6	Ž	1964	5,0	0,52	1,9	2,9	241	97	3,31	5465	9414
7	Ž	1974	5,5	0,72	1,8	4,1	175	69	4,75	5762	10027
8	Ž	1965	5,2	1,53	1,6	3,5	126		2,48	11331	6994
9	Ž	1979	4,2	0,64	1,3	2,6	200	88	4,75	7987	7404
10	Ž	1968	4,7	1,91	1,8	2,0			<1,05	8528	10150
11	Ž	1953	5,8	0,94	1,8	3,9	228	82	10,81	9989	5036
12	Ž	1976	4,9	0,68	1,7	3,4	130		<1,05	11134	7322
13	Ž	1958	4,5	0,69	1,8	2,4	169	67	2,48	8706	8127
14	Ž	1966	4,2	0,51	1,6	2,9	197		4,06	6887	4784
15	Ž	1964	4,6	0,95	1,6	2,9	179		4,75	6797	9540
16	Ž	1963	5,7	0,91	1,6	4,0	138		2,48	4819	<40,55
17	Ž	1954	4,6	0,74	1,6	2,3	250	143	1,54	2608	7700
18	M	1971	4,4	1,14	1,3	2,6	176	139	4,75	6123	5444
19	M	1977	4,5	1,13	1,6	2,4	151	153	4,06	7691	6806
20	M	1966	7,6	3,11	1,2	5,0	207	137	6,28	6856	4970
21	Ž	1977	4,1	1,09	1,3	2,4	116		3,31	7395	7618
22	M	1974	4,9	1,59	1,6	2,6	160	156	4,41	6007	4970
23	Ž	1975	3,1	0,81	0,9	2,3	127		6,56	5387	5116
24	M	1967	5,4	5,4	0,9	2,8	121	663	2,48	7605	5777
25	Ž	1967	4,8	1,48	1,5	2,8	107		2,91	8277	7298
26	M	1971	4,6	1,98	0,7	3,4	164	144			
27	Ž	1979	3,4	0,47	1,9	1,3	209				
28	Ž	1971	3,9	0,86	1,2	2,5	150				
29	M	1980	5,5	1,91	1,4	3,8	135				
30	Ž	1971	4,3	1,28	1,6	2,7	146				

Příloha č. 5 Seznam publikací autora

PAŘENICOVÁ I., PRYMUSOVA K., BEŇOVSKÁ M., BABUŠÍKOVÁ L., JARKOVSKÝ J., DOSTALOVÁ L., KUBKOVÁ L., LOKAJ P., KALA P., POLOCZEK M., TOMAN O., ŠPINAR J., PAŘENICA J. : *Koncentrace Lp-PLA2 u stabilních pacientův sekundární prevenci po STEMI a vliv dávky statinů na její hodnoty. Cor Vasa.* 2011; 53:712–716.

BEŇOVSKÁ M., BABUŠÍKOVÁ L., PAŘENICA J., TŮMOVÁ J.: *Fosfolipáza A₂ asociovaná s lipoproteiny – význam, metoda stanovení a klinické monitorování. Klin. Biochem. Metab.*18 (39), 2010; 38-44.

BABUŠÍKOVÁ L., BEŇOVSKÁ M.: *Fosfolipáza A₂ asociovaná s lipoproteidy – význam, metoda stanovení a klinické monitorování, Sborník Biolab 2010 (poster)*