

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Hladiny metaloproteináz -2 a -9 u pacientů po perkutánní koronární
intervenci**

Bc. Lenka Ryšavá

Diplomová práce
2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Ryšavá**
Osobní číslo: **C17450**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Hladiny metaloproteináz -2 a -9 u pacientů po perkutánní koronární intervenci**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část:

Seznamte se s literárními údaji o vztahu mezi hladinami metaloproteináz -2 a -9, perkutánní koronární intervencí a celkovou krátkodobou i dlouhodobou prognózou pacienta.

Experimentální část:

Stanovte koncentrace metaloproteináz -2 a -9 ve vzorcích pacientů, kteří prodělali perkutánní koronární intervenci. Pro stanovení využijte elektroforézu ve vertikálním uspořádání. Výsledky porovnejte s aktuální dostupnou literaturou.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavla Královcová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 05. 2019

Bc. Lenka Ryšavá

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Pavle Královcové, PhD., za všestrannou pomoc, množství cenných rad, podnětů, doporučení, připomínek, za čas, který mi věnovala a zároveň za velkou trpělivost a obdivuhodnou ochotu při konzultacích poskytnutých ke zpracování této práce. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině, bez které bych tuto práci nemohla dokončit.

ANOTACE

Cílem této diplomové práce je stanovit hladinu matrixové metaloproteinázy-2 a matrixové metaloproteinázy-9 metodou želatinové zymografie u pacientů s ischemickou chorobou srdeční, kteří podstoupili implantaci koronárních stentů pomocí perkutánní koronární intervence, se zaměřením na sledování dynamiky hladin těchto enzymů. Dále se tato diplomová práce zaměřuje na porovnání hladiny matrixové metaloproteinázy-2 a matrixové metaloproteinázy-9 ve vzorcích těchto pacientů u lékových a vstřebatelných stentů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Matrixová metaloproteináza-2 a -9, ischemická choroba srdeční, perkutánní koronární intervence, želatinová zymografie, koronární stenty

TITLE

Levels of metalloproteinases -2 and -9 in patients after percutaneous coronary intervention

ANNOTATION

The aim of this thesis is to determine the level of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 by gelatin zymography in patients with coronary artery disease who have undergone coronary stent implantation using percutaneous coronary intervention, focusing on the dynamics of these enzymes after intervention. Furthermore, the work focuses on the level comparison of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in samples of these patients in drug eluting stents and biodegradable stents.

KEYWORDS

Matrix metalloproteinase-2 and -9, coronary artery disease, percutaneous coronary intervention, gelatin zymography, coronary stents

OBSAH

ÚVOD	1
A. TEORETICKÁ ČÁST.....	2
1. PERKUTÁNNÍ KORONÁRNÍ INTERVENCE.....	2
1.1. Možné komplikace po PCI.....	4
2. STENTY	5
2.1. Kovové stenty.....	5
2.2. Lékové stenty.....	6
2.3. Biodegradabilní neboli vstřebatelné stenty	7
2.4. Komplikace po implantaci stentů	8
2.4.1. Restenóza v koronárním stentu.....	8
2.4.2. Trombóza v koronárním stentu.....	9
3. ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ	11
3.1. Formy ICHS	11
3.1.1. Akutní formy ICHS.....	11
3.1.2. Chronické formy ICHS	13
3.2. Cévní zásobení srdce	15
4. MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY	17
4.1. Ateroskleróza	17
4.2. Želatinázy.....	18
4.2.1. Matrixová metaloproteináza – 2	19
4.2.2. Matrixová metaloproteináza – 9	19
4.3. Role matrixové metaloproteinázy – 2 a matrixové metaloproteinázy - 9 v ateroskleróze	21
5. VZTAH MEZI MATRIXOVOU METALOPROTEINÁZOU - 2 MATRIXOVOU METALOPROTEINÁZOU –9 A PERKUTÁNNÍ KORONÁRNÍ INTERVENCÍ.....	23

6.	CÍL PRÁCE	26
B.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
7.1.	Používané přístroje a pomůcky	27
7.2.	Používané chemikálie	28
7.3.	Pacienti.....	30
7.4.	Vzorky	32
7.5.	Příprava potřebných roztoků	33
7.6.	Postup želatinové zymografie	36
7.7.	Vyhodnocování gelů.....	41
8.	VÝSLEDKY	42
9.	DISKUSE	53
10.	ZÁVĚR.....	58
11.	POUŽITÁ LITERATURA	59
12.	PŘÍLOHY	67

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Perkutánní koronární intervence	2
Obrázek 2 – Příklad kovového stentu.....	6
Obrázek 3 - Příklad lékového stentu	7
Obrázek 4 - Příklad vstřebatelného stentu (Absorb)	8
Obrázek 5 – Cévní zásobení srdce ⁷	16
Obrázek 6 - Struktura MMP-2	19
Obrázek 7 - Struktura MMP-9	20
Obrázek 8 - Distribuce MMP v aterosklerotických lézích	22
Obrázek 9 - Hladiny MMP-9 po implantaci stentu do krční tepny ¹¹	24
Obrázek 10 - Aparatura pro elektroforézu a přípravu gelů	27
Obrázek 11 - Základní vyhodnocovací panel programu ImageJ.	41
Obrázek 12 - Příklad zymogramu	42
Obrázek 13 - Korelace proMMP-9 v odběrech A a D napříč skupinami pacientů.....	49
Obrázek 14 - Korelace proMMP-2 v odběrech B a D napříč skupinami pacientů	50
Obrázek 15 - Průměrné hladiny proMMP-9 u pacientů s DES	51
Obrázek 16 - Průměrné hladiny proMMP-9 u pacientů s BVS	51
Obrázek 17 - Průměrné hladiny proMMP-2 u pacientů s DES	52
Obrázek 18 - Průměrné hladiny proMMP-2 u pacientů s BVS	52

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Klasifikace anginy pectoris podle CCS.....	14
Tabulka 2 - NYHA klasifikace.	15
Tabulka 3 - Základní informace o pacientech (skupiny).....	31
Tabulka 4 - Rozdělení pacientů dle typů stentů.....	32
Tabulka 5 - Reagencie pro přípravu dělicího gelu.....	38
Tabulka 6 - Reagencie pro přípravu zaostřovacího gelu.....	38
Tabulka 7 - Hodnoty proMMP-9 a MMP-9 u pacienta 64 a 76.....	43
Tabulka 8 - Hodnoty proMMP-2 a MMP-2 u pacienta 64 a 76.....	43
Tabulka 9 - Hodnoty proMMP-9 a MMP-9 skupiny pacientů – dokončení revaskulizace po akutní ICHS.....	44
Tabulka 10 - Hodnoty proMMP-2 a MMP-2 skupiny pacientů – dokončení revaskulizace po akutní ICHS.....	45
Tabulka 11 - Hodnoty proMMP-9 a MMP-9 u skupiny pacientů – dokončení revaskularizace po chronické ICHS.....	46
Tabulka 12 - Hodnoty proMMP-2 u skupiny pacientů – dokončení revaskularizace po chronické ICHS.....	46
Tabulka 13 - Hodnoty proMMP-9 a MMP-9 u skupiny pacientů s chronickou ICHS.....	47
Tabulka 14 - Hodnoty proMMP-2 a MMP-2 u skupiny pacientů s chronickou ICHS.....	47
Tabulka 15 - T-test významnosti či nevýznamnosti proMMP-9 v různých časech odběru.....	48
Tabulka 16 - T-test významnosti či nevýznamnosti hladin proMMP-9 u jednotlivých skupin pacientů.....	48
Tabulka 17 - T-test významnosti či nevýznamnosti hladin proMMP-2 u jednotlivých skupin pacientů.....	48
Tabulka 18 - Korelační závislost proMMP-2 a proMMP-9 v odběrech A a D, B a D.....	49
Tabulka 19 - T-test významnosti či nevýznamnosti proMMP-2 a proMMP-9 u pacientů s implantovaným DES vs. BVS.....	52

SEZNAM ZKRATEK

AKS	Akutní koronární syndrom
AMI	Akutní infarkt myokardu
APMA	Acetoxymerkurioanilin
APS	Persíran amonný
BMS	Holé kovové stenty
BVS	Vstřebatelný koronární stent
DES	Lékový koronární stent
DR	Dokončení revaskulizace
ECM	Extracelulární matrix
EKG	Elektrokardiogram
ICHS	Ischemická choroba srdeční
ISR	In stent restenóza
MI	Infarkt myokardu
MMP	Matrixové metaloproteinázy
NAP	Nestabilní angina pectoris
NGAL	Neutrofilní želatináza asociovaná s lipocalinem
NSTEMI	Akutní infarkt myokardu bez elevací ST
PCI	Perkutánní koronární intervence
proMMP	Neaktivní forma matrixové metaloproteinázy
SAP	Stabilní angina pectoris
SDS	Dodecylsíran sodný
SMC	Buňky hladkého svalstva
STEMI	Akutní infarkt myokardu s elevacemi ST
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin
TIMP	Tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz

ÚVOD

Onemocnění oběhové soustavy se podílí na více než polovině všech úmrtí. Perkutánní koronární intervence a implantace koronárního stentu je lékařský postup, který se v dnešní době stal nejčastější léčebnou metodou v medicíně. České republice, co se týče úmrtí na srdeční choroby, patří jedno z čelních míst v Evropě. I z tohoto důvodu se vývoji této metody a koronárních stentů věnuje velká pozornost, což pomáhá úmrtnost pacientů na kardiovaskulární onemocnění nadále snižovat.

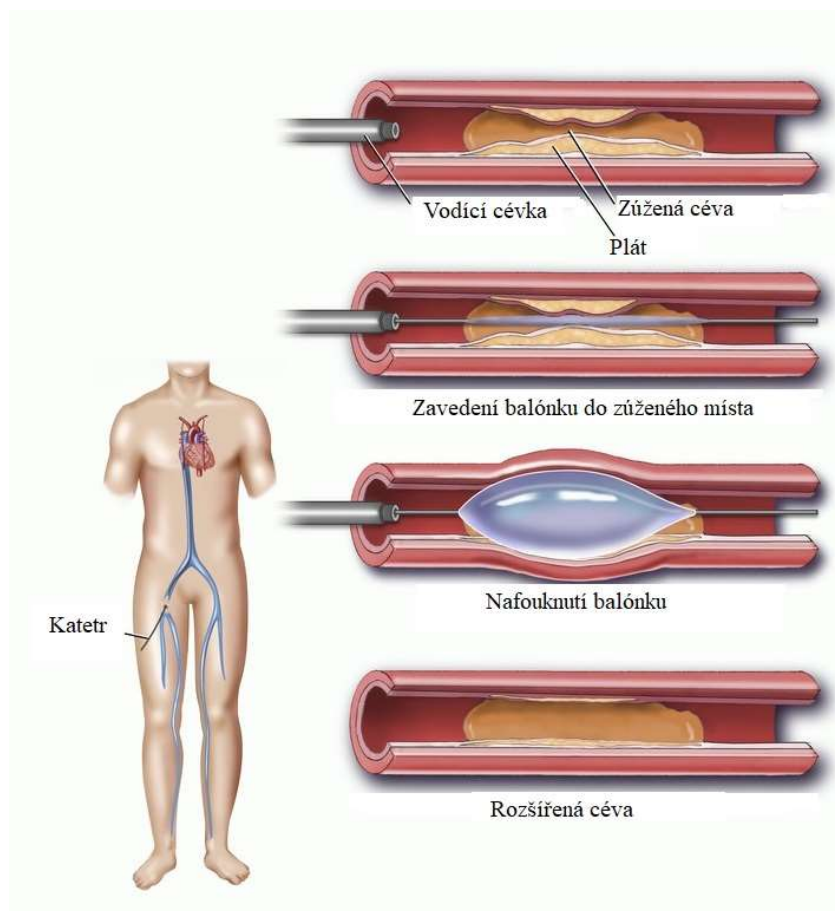
Příčinou ischemické choroby srdeční bývá většinou ateroskleróza. Je znám vztah mezi matrixovou metaloproteinázou- 2 a -9 a aterosklerózou. Tyto enzymy jsou přítomné v aterosklerotických plátech, kde jsou produkovány pěnovými buňkami. Jejich proteolytickou aktivitou způsobují narušení plátu, což může vést až k jeho ruptuře. Toto zjištění vede k tomu, že by se dané enzymy mohly stát markerem nestability plátu a zánětu a ukazatelem prognózy u pacientů s ischemickou chorobou srdeční.

Cílem této diplomové práce je stanovit hladiny želatináz u pacientů s ischemickou chorobou srdeční pomocí metody želatinové zymografie. Tato metoda je založena na elektroforéze v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným. Želatinová zymografie využívá gely, které jsou kopolymerovány s želatinou, což je hlavní substrát těchto enzymů. Všichni pacienti podstoupili implantaci stentů pomocí metody perkutánní koronární intervence. Všechny vzorky séra pacientů pochází z Interní kliniky - Kardiologického oddělení se sídlem v Pardubicích (Nemocnice Pardubického kraje, a.s.).

A. TEORETICKÁ ČÁST

1. PERKUTÁNNÍ KORONÁRNÍ INTERVENCE

Perkutánní koronární intervence (PCI) neboli angioplastika koronárních cév je nechirurgická léčebná metoda, jejímž cílem je opravit zúžené místo (tzv. stenózu) nebo úplný uzávěr koronární (věňčité) tepny, která zásobuje srdce. Jedná se o zákrok, který navazuje zpravidla na koronarografii. Uplatňuje se při léčení chronických a dlouhodobě stabilních koronárních postižení, ale především v léčbě akutních stavů, kde se ve spoustě případů jedná o život zachraňující výkon. Slovo „perkutánní“ znamená, že se jedná o metodu, která se provádí vpichem přes kůži a termín „intervence“ nám říká, že jde o techniku, pomocí které lze roztahovat (dilatovat) zúžené nebo uzavřené cévy (1; 2; 3; 4).



Obrázek 1 – Perkutánní koronární intervence¹

¹ What is percutaneous coronary intervention (PCI)? Summit Medical Group [online]

Metoda PCI se zakládá na zprůchodnění nebo roztažení zúženého místa věnčité tepny pomocí balónkového katetru, což je jakási cévka na jejímž konci se nachází miniaturní roztažitelný balónek. Princip PCI je zobrazen na obrázku 1. Tento zákrok je prováděn pod rentgenovou kontrolou na katetrizačním sále. Přístupem pro tuto metodu může být radiální neboli palcová tepna v oblasti zápěstí pacienta nebo vpichem v oblasti třísla přes stehenní tepnu (V Pardubicích dělali asi nejvíce přes radiální tepnu) (1; 3).

Po lokálním umrtvení se do tepny zavádí speciální umělohmotná trubička tzv. vodící cévka neboli vodič, a to až do ústí příslušné věnčité tepny. Vnitřkem této vodící cévky je pak zaveden velmi tenký a ohebný drátek až za místo zúžení. Následně je po tomto vodiči (jako po kolejnici) zaveden balónek do zúženého místa. Lékař provádějící zákrok kontroluje několikrát polohu balónku pomocí kontrastní látky. Jakmile je balónek přesně umístěn doprostřed tepny, kde je nejvíce zúžená, dochází k jeho nafouknutí. Během toho dochází k tomu, že aterosklerotické pláty jsou tlačeny proti stěně dané tepny, čímž se rozšíří vnitřní průsvit cévy. V průběhu nafukování balónku je pozorně monitorován celkový stav pacienta a často se dostaví i charakteristická svíravá bolest a mírný tlak na hrudi. Poté pomocí kontrastní látky lékař kontroluje, zda se postižená céva rozšířila. Pokud je nález přijatelný, zákrok v této fázi končí. Nicméně ve většině případů je dnes po rozšíření tepny implantován intrakoronární stent (viz dále), který zůstane uvnitř koronární tepny. Pak se balónek sfoukne a stáhne ven vodící cévkou (2; 3; 4; 5).

Následně se z těla pacienta odstraní všechny katetry kromě zaváděcího katetru (vodící cévky), ten zůstává zaveden ve stehenní tepně. Zhruba po 4-6 hodinách se tento katetr z tepny odstraní. Po vyjmutí katetru lékař manuálně stlačí tepnu po dobu zhruba 15-20 minut a poté je bandážována elastickým kompresním obvazem na dobu 6-8 hodin, během které je nutné udržovat klid na lůžku a ležet s nataženou nohou na straně, kde byl proveden vpich. Je nutné, aby pacient zůstal v nemocnici po dobu minimálně jednoho dne. U druhého, radiálního přístupu se katetr odstraní zpravidla do jedné hodiny od výkonu. Poté je provedeno jen krátké manuální stlačení tepny a následné bandážování na 3-4 hodiny. Během této doby může pacient sledován a může eventuálně z lůžka vstát. Pokud je po uplynutí doby pacient bez komplikací, je propuštěn domů a poučen, aby do dalšího dne danou horní končetinu udržoval v klidu. Po zákroku je zapotřebí, aby pacient dlouhodobě užíval léky, které zabraňují shlukování krevních destiček, čímž snižují vznik krevní sraženiny, a to například kyselinu acetylsalicylovou (Anopyrin). V případě, že je implantován stent je podáván například lék clopidogrel (Plavix), který brání agregaci krevních destiček. Velká část pacientů užívá léky na snížení hladiny cholesterolu v krvi (statiny) (2; 4; 3; 5).

PCI je dnes nejčastější intervenční způsob léčby ischemické choroby srdeční (ICHS). Asi největší význam u akutního infarktu myokardu (AMI), kdy pomocí této metody lze za krátký čas zprůchodnit uzavřenou věnčitou tepnu, čímž se zamezí dalšímu odumírání srdečního svalu. U takových pacientů je důležité, aby byl zákrok proveden co nejdříve od počátku potíží (bolest na hrudi). PCI dále spolu se zavedením dalších nových léčebných postupů dokázaly snížit úmrtí pacientů na AMI z 25 % na 6 %. Další velký význam má metoda PCI u nemocných kde infarkt myokardu (MI) zatím jen hrozí, a to například u pacientů s nestabilní anginou pectoris, u kterých se místo postižené stenózou opraví dříve, než se daná tepna zcela uzavře. Metoda PCI je každý rok provedena u více než 1000 pacientů (3; 5).

1.1. Možné komplikace po PCI

Jako téměř každý lékařský zákrok, tak i PCI mohou doprovázet jisté komplikace. Lze je rozdělit na akutní, kam patří komplikace vzniklé během výkonu anebo krátce po výkonu a pozdní. Jednou ze zásadních akutních komplikací je uzávěr léčené tepny, což může vyústit ke vzniku srdečního infarktu. V dnešní době se této komplikaci dá v jisté míře předejít použitím stentu, o čemž bude pojednáno dále. Vzácně může být navrženo chirurgické řešení (bypass). Problémem po PCI může být krvácení v místech vpichů, které se občas vyskytuje. I když většinou jde výhradně jen o krevní podlitinu (hematom). Ve výjimečných případech se jedná o závažnější krvácení, které je nutné řešit například podáním krevní transfúze nebo v krajním případě chirurgickým zákrokem (2; 4).

Dalším velmi ojedinělou komplikací je vznik výdutě v místě vpichu (pseudoaneurysma) nebo spojky mezi tepnou a žílou (AV píštěl). Pseudoaneurysma se řeší prodloužením stlačování třísla nebo použitím speciálního lepidla. AV píštěl většinou pacienta neomezuje. Asi největší pozdní komplikací je vznik restenózy, což by se dalo popsat jako opakované zúžení koronární tepny v místě původního rozšíření. Tato komplikace nastane asi v 15-25 % případů a to během 2-6 měsíců, v pozdějším období je vzácná. Z velké části lze restenózu úspěšně vyřešit opakováním PCI nebo použitím speciálních stentů, čímž se zabrání novému zužování poškozené tepny. Nicméně u skupiny pacientů je nutné tento stav řešit pomocí operace (bypass) (2; 4). Vznik restenózy je detailněji popsán v kapitole 2.4.1.

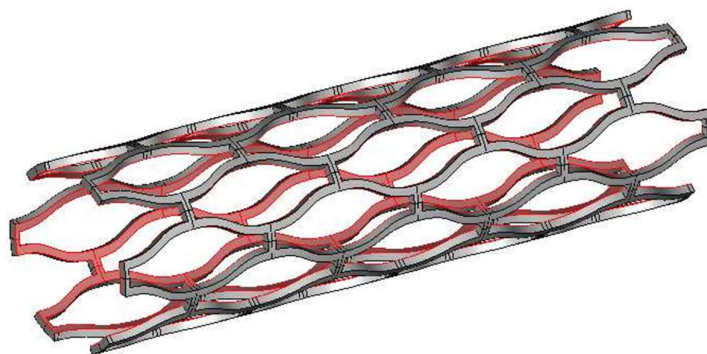
2. STENTY

Stent by se dal popsat jako malá výztuž, která pomáhá udržet tepnu roztaženou (I. Interní kardioangiologická klinika FNHK). Poprvé byly použity koronární stenty na konci osmdesátých let. Vzhledem k tomu, že tyto první pokusy vedly ke značným problémům (výskyt akutních a subakutních trombotických uzávěrů), nezaznamenaly v té době koronární stenty větší pokrok. Nicméně i přes počáteční potíže se pokračovalo v dalším vývoji stentů s cílem omezení vzniku cévních komplikací. Pomocí několika studií se povedlo zdokonalit postup implantace stentů a otevřít tak cestu k hojnému využití v klinické praxi. Ke zvýšení počtu provedených zákroků zejména v Evropě přispělo rovněž uvedení na trh celé řady nových typů stentů, které měly zdokonalené technické parametry. V dnešní době je PCI většinou doplněna o zavedení intrakoronárního stentu, čímž stenty přispěly ke zvýšení účinnosti a bezpečnosti této metody (4; 6).

Koronární stenty lze rozdělit na základě jejich mechanismu rozpínání na samoexpandabilní a balon-expandabilní stenty. Poté je můžeme rozdělovat podle složení na stenty z nerezové oceli, tantalu, slitiny na bázi kobaltu, nitinolu, přítomnosti či nepřítomnosti aktivního povlaku (vrstvy) a biologicky odbouratelné (biodegradabilní) stenty. V neposlední řadě je lze rozdělit i podle designu na stenty se síťovou strukturou (drátěné sítě), strukturou šroubovicovou, kombinovanou či strukturou vyřezávané trubičky (6; 7).

2.1. Kovové stenty

Holé kovové stenty (z angl. bare metal stents, BMS) byly jedny z prvních používaných koronárních stentů. Kovové stenty pomohly zabránit předčasnému náhlému uzavření tepny v důsledku akutního elastického recoilu (zúžení v místě ošetřené tepny) a obecně lepších výsledků u pacientů. Vyrábí ze speciální slitiny, dnes nejčastěji ze slitiny chromu a kobaltu nebo titanu. (8; 9) Příklad kovového stentu je na obrázku 2.



Obrázek 2 – Příklad kovového stentu²

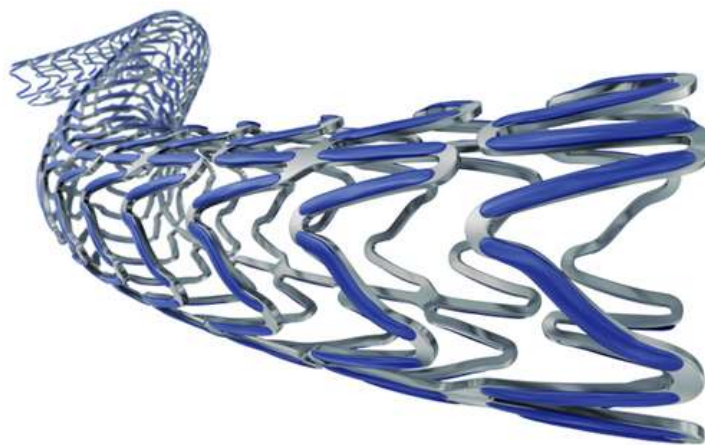
2.2. Lékové stenty

Zavedení lékových stentů (z angl. Drug eluting stents, DES) do klinické praxe znamenalo velký pokrok v léčbě pacientů s ICHS. Byly vyvinuty z BMS především ve snaze snížení rizika vzniku restenózy a dalších patologických procesů (Např.: hyperplazie neointimy, hypersenzitivní reakce a další). Lékové stenty se skládají ze tří komponent. První je základní povrch stentu (platforma stentu), který je vyroben z nerezové oceli nebo nejčastěji ze speciální slitiny kobaltu a chromu. Druhou komponentu tvoří polymer, který řídí načasování, uvolňování a dodávání léčiva. Polymer je trvalou součástí stentu. Poslední částí, která tvoří DES, je uvolňující se lék. (10; 11; 12) Příklad struktury DES je uveden na obrázku 3.

Mezi lékové stenty první generace řadíme především sirolimem potažené stenty. Sirolimus je antibiotikum, jinak nazývané rapamycin, které bylo poprvé izolováno z mikroorganismu *Streptomyces hygroscopicus*. Působí antifroliferačně a je využíván v transplantační medicíně jako imunosupresivum. Implantace takovýchto stentů výrazně snížila nutnost další revaskulizace stentované tepny. Po dlouhodobém sledování byla ale zjištěna hypersenzitivita na tyto lékové stenty a také, že chybí reendotelizace potahovaných stentů, a to i po několika měsících až letech. Závažnějším problémem však bylo zvýšení výskytu velmi pozdní trombózy stentu po více než jednom roce od implantace DES, často po vysazení duální antiagregační léčby (10; 13; 14).

² PONTRELLI, G. a F. DE MONTE.cit. s. 21

Dalším milníkem ve vývoji DES byl rok 2015 a příchod lékových stentů druhé generace. Obsahují novější léky (everolimus a zotarolimus), více biokompatibilní polymery a využívají platformy z kobaltu nebo platinového chromu. Další vývoj lékových stentů spočíval v optimalizaci dávky a kinetiky uvolňovaného léku ze stentu a také v tloušťce strutů (vzpěr stentu), která se dále snižovala. Everolimus je syntetickým analogem sirolimu a zotarolimus je lipofilní derivát sirolimu. Nová generace DES s biokompatibilními nebo biologicky odbouratelnými polymery významně zlepšila klinickou bezpečnost a účinnost DES (11; 13; 14).



Obrázek 3 - Příklad lékového stentu³

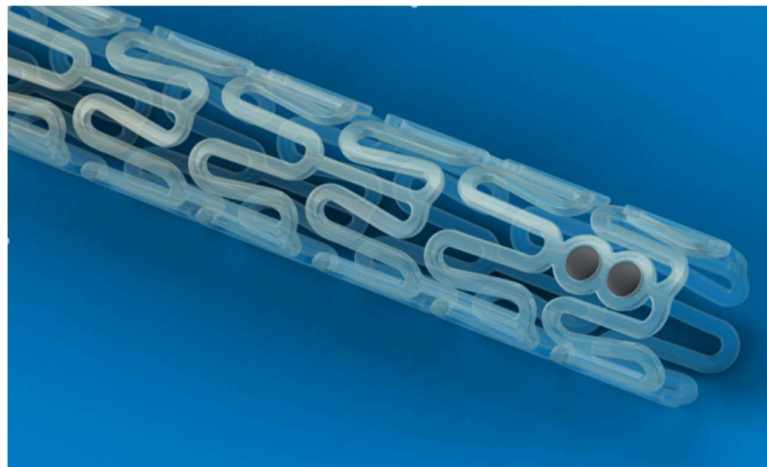
2.3. Biodegradabilní neboli vstřebatelné stenty

Vstřebatelné stenty (z angl. bioresorbable vascular scaffold, BVS) jsou za posledních pár let jedním z hlavních předmětů zájmu skloňovaných v intervenční kardiologii. Jedná o velmi atraktivní alternativu, jelikož základní myšlenkou BVS je, že poskytnou dočasnou oporu cévní stěně po PCI a poté se rozloží a kompletně vstřebají. Prvním implantovaným vstřebatelným stentem byl na přelomu tisíciletí Igaki-Tamai BVS, který se nedostal do klinického použití pro PCI (15).

Nejvíce dat a klinických zkušeností je v současné době pro systém Absorb BVS™, který je uveden na obrázku 4. Kostru tohoto vstřebatelného stentu tvoří polymer poly-D, L-laktádová kyselina (PLLA), který je pokrytý antiproliferativní látkou everolimem. PLLA je hydrolyticky degradována v několika krocích na pyruvát. Pyruvát vstupuje do Krebsova cyklu, kde je metabolizován na konečné produkty, kterými jsou oxid uhličitý a voda. V preklinických

³Ultimaster® - Drug eluting stent. TERUMO EUROPE [online]

modelech trvá úplné vstřebání stentu Absorb 2 roky, nicméně při klinickém testování bylo zjištěno, že trvalé vstřebání je ukončeno po 3 letech. Podle současných publikovaných výsledků se zdá, že Absorb stent má horší klinické výsledky než kovový lékový stent potažený everolimem. Jedná se zejména o vysoké riziko vzniku pozdní trombózy ve stentu, která se zdá být spojena se suboptimální technikou výkonu. Vyšší výskyt subakutní trombózy vstřebatelného stentu je omezený na tepny menšího kalibru. V důsledku těchto a dalších skutečností (Např.: technická omezení při implantaci, nejasná doba duální antiagregační léčby po implantaci BVS) byl tento typ stentu stažen z klinického použití. Výjimku tvořily probíhající studie a registry (17; 18; 19; 20)



Obrázek 4 - Příklad vstřebatelného stentu (Absorb)⁴

2.4. Komplikace po implantaci stentů

Mezi závažné akutní komplikace, které mohou nastat při implantaci koronárních stentů lze zařadit perforaci nebo rupturu věnčité tepny, dále pak disekci tepny, akutní trombózu stentu, AMI, embolizaci stentu a úmrtí. Naopak chronickou komplikací po zavedení stentu může být restenóza ve stentu a také velmi pozdní trombóza ve stentu (6; 16). Nejvíce závažnými a diskutovanými komplikacemi je restenóza a trombóza v intrakoronárním stentu.

2.4.1. Restenóza v koronárním stentu

Obecně pojem restenóza znamená opětovné zúžení léčené tepny. Jedná se o novou lékařským výkonem vytvořenou nemoc. Kritérium restenózy je přítomnost stenózy větší než

⁴ Bioresorbable Stents Are the Way of the Future. Diagnostic and Interventional Cardiology [online]

50 % průměru cévy. Restenóza se může vyskytovat přímo ve stentu, pak jí nazýváme in stent restenóza (ISR), nebo v blízkém okolí stentu do 3-5 mm, která se nazývá in segment. ISR vzniká nejčastěji do 6 měsíců po implantaci stentu. Hlavní mechanismus, který se podílí na restenóze po implantaci stentu, je neointimální hyperplázie. K neointimální hyperplazii vedou čtyři procesy. Mezi ně patří tvorba trombu v místě poranění, zánět, proliferace a migrace buněk hladkého svalstva (SMC) a tvorba extracelulární matrix. Výrazně vyšší riziko ISR představuje přítomnost některých dalších onemocnění, především diabetes mellitus a chronické renální insuficience (17; 18; 19).

ISR není zdaleka tak neškodným jevem, jak se zdálo (v minulosti), jelikož mnoho případů se klinicky projevovala akutním koronárním syndromem. Nejlepší prevencí vzniku ISR je implantace DES druhé generace, kdy je riziko vzniku ISR nízké. U moderních BMS je riziko výskytu ISR 20–30 % a u DES druhé generace je toto riziko sníženo na 5–12 %. I přes pokroky u DES, které mají antiproliferativní účinek, není výskyt restenózy nulový (17; 19).

2.4.2. Trombóza v koronárním stentu

S nástupem DES první generace došlo k významnému omezení vzniku restenózy v porovnání s BMS a tím pádem i ke snížení počtu opakovaných revaskularizací. Bylo zjištěno, že se u nich vyskytují nebezpečné a letální vedlejší účinky, čímž DES přinesly do intervenční kardiologie nový do té doby neznámý pojem – akutní, subakutní, pozdní a zejména velmi pozdní trombóza stentu, která se projeví teprve po více než jednom roce. Původ pozdní trombózy DES není s jistotou stanoven. Nicméně jsou známy čtyři základní patologické mechanismy, mezi které patří nedokonalá endotelizace stentu, přetrvávající zánětlivá reakce, která je vyvolaná polymerem, nedokonalá apozice stentu a urychlená neoateroskleróza ve stentu. Několik randomizovaných studií porovnálo DES první generace s BMS. Tyto studie prokázaly zvýšený výskyt velmi pozdní trombózy právě u první generace DES. Toto zjištění vedlo k vývoji DES druhé generace, které jsou již z biokompatibilního polymeru a obsahují nové léky. V porovnání s předchozími DES první generace ukázaly DES druhé generace, konkrétně everolimem potažené stenty (Např.: stent Promus, Boston Scientific), významně méně případů velmi pozdní trombózy (20; 21; 22).

Bylo prokázáno, že pozdní trombóza stentu není výhradou jen lékových stentů, ale že se ve stejné míře týká i BVS. Riziko pozdní trombózy stentu je srovnatelné s DES první generace a její příčina je zejména v tloušťce stentu. Příkladem může být případ pacienta, u kterého došlo k trombóze ve stentu 17 měsíců od implantace BVS. Výsledky tříletého sledování studie ABSORB III, do které bylo zařazeno přes 2000 pacientů, prokázaly nárůst výskytu

trombóz stentu a akutního infarktu myokardu v povodí intervenované tepny u pacientů ošetřených BVS. V prvním roce sledování postihovaly trombózy BVS, které byly implantované do velmi malých cév, které nejsou pro tento typ stentu příliš vhodné. Nicméně trombózy vzniklé mezi prvním a třetím rokem sledování postihovaly spíše BVS, které byly implantované do tepen vhodnějších pro tento typ stentu. Většina pacientů s trombózou stentu užívala dvojitou protidestickovou léčbu. Důležité zprávy přinesou výsledky studie ABSORB IV, jenž je zaměřena na prokázání klinické převahy vstřebatelného stentu v pozdním období. Výsledky budeme znát po roce 2020 (20; 23; 24).

Akutní trombózy stentů se často vyskytovaly v začátcích jejich implantace, kdy se používaly BMS. Akutní trombóza nastala až u 10 % pacientů, a to i přes důraznou antikoagulační léčbu. Ke zlepšení a snížení incidence akutní trombózy přispělo zavedení nových technik implantace. Z toho důvodu je vznik akutní trombózy ve stentu považován za vzácnou i když závažnou komplikaci (10; 25).

3. ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ

Mezi onemocněním srdce stojí na prvním místě ischemická choroba srdeční (ICHS). V průmyslově rozvinutých zemích se ICHS a další komplikace spojené s aterosklerózou podílí na většině případů úmrtí u mužů starších 45 let a žen nad 65 let (5).

ICHS je název pro celou skupinu patologických stavů, které mají společné, že dochází k ischemii myokardu, tedy nedostatečnému prokrvení. Toto onemocnění by se dalo popsat jako porucha funkce srdce, jejíž příčinou je ischemie srdeční svaloviny, které je způsobeno zúžením nebo uzávěrem ve věnčitých tepnách. Pokud dojde k zúžení některé tepny, je daná oblast srdečního svalu méně prokrvena, což se projevuje svíravou bolestí za hrudní kostí - angina pectoris (5). Nejčastější příčinou ischemie myokardu je ateroskleróza, která vede k tvorbě aterosklerotických plátů v lumen koronární arterie (26). U starších pacientů je ICHS zároveň s hypertenzí hlavní příčinou srdeční dysfunkce (27).

3.1. Formy ICHS

Klinicky se ICHS projevuje několika formami, které se mohou mezi sebou různě kombinovat. ICHS dělíme na formu akutní a chronickou (27; 28).

3.1.1. Akutní formy ICHS

Tyto formy ICHS můžeme rovněž nazvat jednotným pojmem akutní koronární syndrom (AKS). AKS se považuje za závažné onemocnění a představuje pro pacienta bezprostřední ohrožení života, které se musí většinou neodkladně řešit. Může k němu dojít i bez jakýchkoli předchozích známek ICHS, tedy tzv. z plného zdraví. Je způsoben náhlou změnou průsvitu srdeční tepny, která způsobí přerušeni dodávky kyslíku do části srdce. Následně dochází k přechodné nebo trvalé ischemii myokardu. Nejčastější příčinou vzniku akutních forem ICHS je přítomnost nestabilního aterosklerotického plátu. Akutní forma ICHS zahrnuje nestabilní anginu pectoris (NAP), akutní infarkt myokardu (AMI) a náhlou srdeční smrt (28; 29; 30; 31).

NAP by se dala popsat jako přechodná ischemie myokardu, která může vzniknout i v klidu. Jedná se o nově vzniklou anginu pectoris nebo jakýmkoliv způsobem zhoršenou dosavadní anginu pectoris v posledních 30 dnech. Zhoršením se myslí například zvýšení frekvence a prodloužení záchvatů, změna charakteru bolesti netrvajících déle než 20 minut. Důvodem bývá ruptura nestabilního aterosklerotického plátu a následně tvorba trombu, který zvětší stupeň neprůchodnosti věnčité tepny, čímž dojde ke zhoršení ischemie. Rozdíl oproti MI

je, že bolest celkem rychle odezní a pacient nemá zvýšené biochemické markery nekrózy myokardu (Např.: troponiny) (28; 29).

AMI vzniká jako příčina nekrózy myokardu, která je způsobená nestabilním ischemickým syndromem. Dochází k náhlému uzavření koronární tepny, která zásobuje danou oblast krví nebo k jejímu výraznému zúžení. Ve většině případů, stejně jako u NAP, stojí za vznikem AMI ruptura aterosklerotického plátu, na kterém se následně vytvoří trombus. Nekróza myokardu v důsledku ischemie začíná již za 20–30 minut po uzavěru dané tepny a zhruba do 6 hodin postihne celou tloušťku stěny komory. V klinické praxi je toto onemocnění diagnostikováno na základě výsledků z elektrokardiogramu (EKG, dvanáctisvodový), biochemických markerů, invazivních i neinvazivních zobrazovacích technik. Existuje několik typů infarktů. AMI je klasifikovaný na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti elevace ST-úseků na křivce EKG. MI, kde jsou přítomné elevace úseků ST na EKG křivce nazýváme STEMI (z angl. ST-Elevation Myocardial Infarction), což zpravidla odpovídá staršímu označení Q-infarkt. Ke STEMI vede typicky naprostá okluze (uzávěr) trombu v tepně. Naopak MI, u kterého nejsou přítomné elevace ST-úseků na EKG křivce označujeme NSTEMI (z angl. Non-ST-Elevation Myocardial Infarction), který obvykle odpovídá staršímu termínu non-Q infarkt. NSTEMI nebo NAP jsou důsledkem vzniku částečného uzavěru tepny trombem nebo uzavěrem s přítomností kolaterální cirkulace (29; 28; 30).

Termínem náhlá srdeční smrt se označuje přirozená smrt z kardiální příčiny. Je doprovázena náhlou ztrátou vědomí se srdeční zástavou, k čemuž dochází do 1 hodiny od vzniku akutních symptomů, a to u osob bez známého onemocnění srdce. To znamená, že daný jedinec byl během předchozích 24 hodin bez potíží. Ve většině případů se jedná o důsledek závažné poruchy rytmu srdce (Např.: fibrilace komor, komorová tachykardie). Největším rizikovým faktorem náhlé srdeční smrti je právě ICHS, kde u některých jedinců je náhlá srdeční smrt vůbec prvním projevem doposud bezpříznakové ICHS. Dále to pak může být například kardiomyopatie, vrozená onemocnění srdce a vodivého systému a strukturální onemocnění a chlopenní vady (29; 31; 32).

3.1.2. Chronické formy ICHS

Chronické formy ICHS představují oproti akutním formám ICHS skupinu onemocnění, která nevyžadují bezprostřední hospitalizaci. Jedná se o stabilizované formy ICHS, kam řadíme stabilní anginu pectoris (SAP), stav po prodělaném MI, tzv. němou ischemii, koronární syndrom X a chronické srdeční selhání (33; 34). Existuje mnoho způsobů dělení chronických forem ICHS, proto zde uvádím jen, dle mého názoru, ty nejdůležitější.

SAP, nebo také námahová angina pectoris, je jedním z nejčastějších projevů chronické ICHS. Jedná se o klinický syndrom, který doprovází typické svíravé bolesti na hrudi, v rameni, v dolní čelisti, v pažích a zádech. Bolesti se objevují při fyzické námaze, působením chladu anebo při emočním stresu. Charakteristické pro tyto bolesti je, že poměrně rychle ustupují (nejdéle do 5 minut) po přerušení vyvolávajícího momentu (námahy) nebo při podání krátkodobě působícího sublingválního (*vstřebání látky skrze sliznici dutiny ústní*) nitrátu (nitroglycerinu). Nazýváme je odborným termínem stenokardie. Jsou způsobeny dočasnou ischemií myokardu, která je způsobená nepoměrem mezi dodávkou a spotřebou kyslíku. Příčinou tohoto nepoměru je většinou omezení průtoku některé z koronárních tepen z důvodu přítomnosti aterosklerotického plátu, který zúží vnitřní průsvit cévy o více než 70 %. Stupeň zátěže vyvolávající bolest se nazývá anginózní práh a je většinou nepřímě úměrný závažnosti stenózy koronárních tepen. K posuzování závažnosti anginy pectoris se používá klasifikace podle Kanadské kardiologické společnosti (CCS), která je uvedena v tabulce 1 na následující stránce. Léčbu pacienta s SAP představují především režimová opatření, koronární intervence (chirurgické nebo katetizační) a zejména pak farmakologická léčba (Např.: léčba statiny, betablokátory a další) (28; 35; 36; 37).

Tabulka 1 – Klasifikace anginy pectoris podle CCS⁵

Stupeň I	Stenokardie je vyvolána jen mimořádně velkou námahou
Stupeň II	Stenokardie je vyvolána větší, ale v běžném životě obvyklou námahou, např. výstupem do vyššího než 2. podlaží, chůzí do kopce apod.
Stupeň III	Stenokardie je vyvolána již malou námahou, např. chůzí po rovině, výstupem do nižšího než 2. podlaží apod.
Stupeň IV	Stenokardie se objevuje při minimální zátěži nebo v klidu.

Další chronickou formou ICHS je stav po prodělaném MI. Jelikož pacienti, kteří již prodělali MI, jsou ohroženi dalšími kardiovaskulárními onemocněními. Před tím, než jsou tito pacienti propuštěni z nemocnice, stanoví u nich kardiolog pomocí neinvazivních testů riziko reinfarktu. Na základě toho jsou pacienti zařazeni buď do skupiny pacientů s nízkým rizikem a na nemocné s vysokým rizikem reinfarktu, u kterých lze nepříznivou prognózu změnit pomocí sekundární prevence, která se nijak razantně neliší od primární. Tvoří jí opět především farmakologická léčba (28).

Termín němá ischemie myokardu (asymptomatická) představuje skupinu chronických ischemií, u kterých dochází k postupnému zužování koronárních tepen. Nejsou provázeny typickými bolestmi, a tudíž u těchto pacientů probíhá ICHS skrytě a bez příznaků. Ischemie se u takto nemocných pacientů projevuje jen nepřímo typickými změnami na EKG křivce (deprese úseků ST během ambulantního monitorování EKG anebo při zátěžovém EKG). Němá ischemie myokardu může přejít v jakoukoliv jinou formu ICHS. Častější bývá daná chronická forma ICHS u pacientů s onemocněním diabetes mellitus (29; 35; 38).

Mezi chronickou formu ICHS řadíme i koronární syndrom X. Jedná se o abnormální typ anginy pectoris neboli mikrovaskulární angina, která se projevuje opakovanými stenokardiemi. Na EKG jsou přítomné změny, které jsou příznačné pro ICHS, nicméně při provedení koronární angiografie není nalezena stenóza koronárních tepen. Dále chybí pozitivní účinek na nitroglycerin. Základem této formy je mikrovaskulární dysfunkce koronárního řečiště na úrovni prearteriol. Vyšší výskyt byl zaznamenán u žen a obézních lidí (29; 35; 38).

Chronické srdeční selhání vzniká jako následek poruchy funkce srdce nebo poruch srdečního rytmu. Je charakterizováno jako pokles srdečního výdeje se vzestupem plnicích tlaků.

⁵ HRADEC, J. a S. BÝMA cit. s. 7

V současné době je podkladem pro většinu případů chronického srdečního selhání dysfunkce levé komory jako následek MI, hypertenze a velmi často obou najednou. Jako příznak vévodí (dominuje) námahová dušnost, únavnost a zhoršení tolerance zátěže nebo případně otoky dolních končetin. Pro posouzení a diagnózu srdečního selhání (akutního i chronického) lze použít funkční klasifikaci New York Heart Association (NYHA), která je asi nejpoužívanější klasifikací v kardiologii. NYHA klasifikace je uvedena v tabulce č 2 (39; 40).

Tabulka 2 - NYHA klasifikace⁶.

NYHA	Definice
Třída I	Bez omezení činnosti. Běžná tělesná aktivita nevyvolává potíže a nepůsobí vyčerpání. Řadíme sem nemocné, u kterých vymizeli příznaky po léčbě.
Třída II	Mírné omezení tělesné činnosti. Každodenní námaha vyčerpává a způsobuje dušnost. Zvládnutí lehké tělesné aktivity (Např.: nemocní vyjdou jedno patro schodů bez zastavení).
Třída III	Značné omezení tělesné činnosti. Nevelká námaha vede k vyčerpání a dušnosti. V klidu bez obtíží. Dušnost nastává již při základních činnostech jako oblékání, mytí apod.
Třída IV	Obtíže při kterékoliv tělesné činnosti invalidizují. Dušnost se objevuje i v klidu. Jakákoli aktivita obtíže zhoršuje. Nemocní jsou neschopní samostatného života.

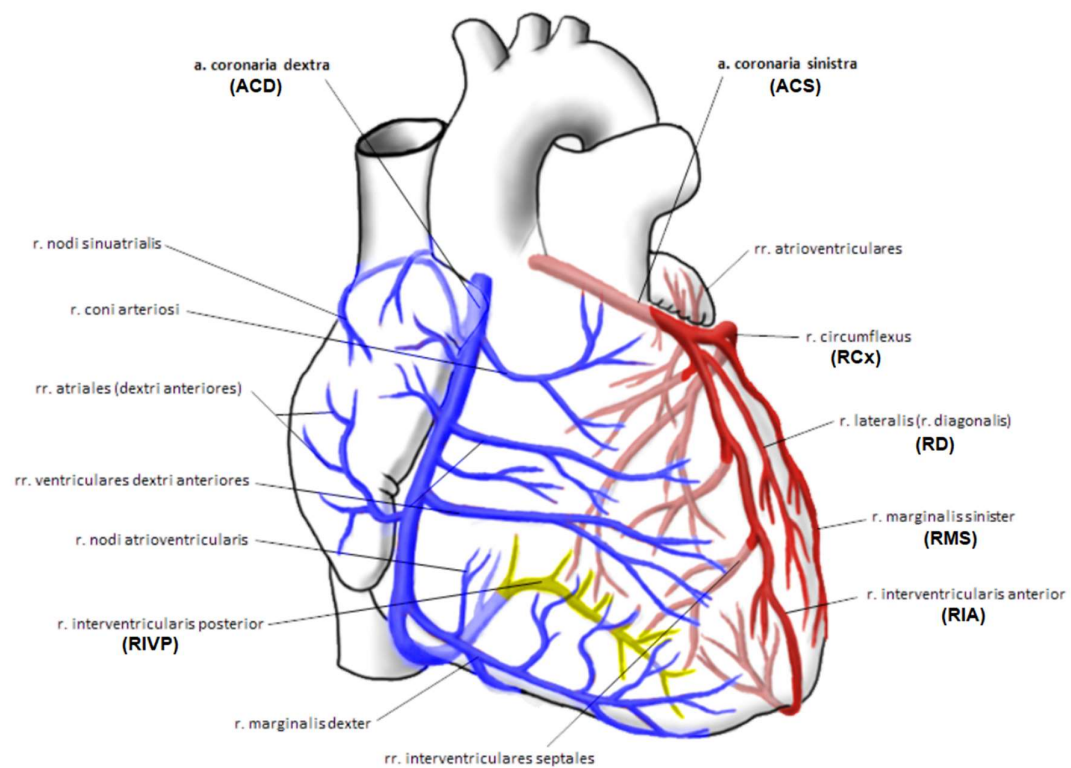
3.2. Cévní zásobení srdce

Koronární stenty se implantují do věnčitých (srdečních) tepen, jak už bylo popsáno výše. Z tohoto důvodu bych zde ráda také uvedla, o jaké tepny se jedná, a to pro názornou (lepší) představu kam konkrétně jsou stenty pacientům vpravovány. Uvedla jsem zde arterie, kam se stenty pacientům implantují nejčastěji. Detailní popis koronárního řečiště uvádí obrázek 5, který je na následující stránce

Výživu srdečních stěn zajišťují dvě koronární arterie, které odstupují ze samého začátku aorty těsně nad aortální chlopní. První se nazývá *arteria coronaria dextra* (ACD) neboli pravá věnčitá tepna. Zásobuje stěny celé pravé komory. Druhá koronární arterie se jmenuje *arteria coronaria sinistra* (ACS), levá věnčitá tepna, která zásobuje ostatní části srdce (tj. většinu stěn levé komory). ACS se poté dělí na dvě větve: přední sestupnou větev – *ramus interventricularis*

⁶ ŠPINAROVÁ, M. a kol. cit. s. 132 a ŠPINAR, J. a kol. cit. s 164

anterior (RIA) a zadní sestupnou větev – *ramus circumflexus* (RCx). Dále se ještě větví na: *ramus diagonalis* (RD), což je větev RIA, *ramus marginalis sinister* (RMS), která je větví RCx. Poté ještě na *ramus intermedius* (RIM), *ramus posterolateralis sinister* (RPLS) či *dexter* (RPLD). Spodní část srdce zásobuje *ramus interventricularis posterior* (RIVP) (41; 42).



Obrázek 5 – Cévní zásobení srdce⁷

⁷ BLAHÚT, P. Cievne zásobenie srdca. TECHMED [online]

4. MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY

Matrixové metaloproteinázy (MMP), které jsou také nazývané jako matrixiny, tvoří rozsáhlou rodinu 24 zinek dependentních endopeptidáz. Jsou zapojené v remodelaci extracelulární matrix (ECM) a to proteolýzou jejích komponent. Remodelace ECM patří mezi stěžejní fáze několika fyziologických procesů, kterými jsou například tkáňová morfogeneze, vývoj a reparace a reprodukce. Uplatňují se ale i v několika patologických procesech zahrnující karcinogenezi, zánětlivá onemocnění a kardiovaskulární onemocnění. Zdrojem MMP je celá řada buněk, kterými jsou především makrofágy, endoteliální buňky a buňky hladkého svalstva. Většinou jsou MMP syntetizovány do extracelulárního prostoru jako neaktivní zymogeny - proenzymy (proMMP), což vyžaduje následné štěpení na katalyticky aktivní enzymy. Hlavním regulátorem jejich proteolytické aktivity je skupina endogenních inhibitorů, které nazýváme tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMP). Jedná se o čtyřčlennou skupinu (TIMP-1 až TIMP-4) s různými biochemickými vlastnostmi a afinitou k MMP. MMP můžeme rozdělit do několika skupin podle substrátové specifity a mechanismů, jakými substrát štěpí na kolagenázy, stromelysiny, matrilysiny, membránově vázané MMP a želatinázy (43; 44; 45; 46; 47). Skupinou želatináz se ve své práci budu zabývat nejvíce.

4.1. Ateroskleróza

Ateroskleróza je chronický zánětlivý proces, který bývá nejčastější příčinou ICHS. Za prvo počátek koronární aterosklerózy je pokládáno subendoteliální ukládání LDL s vysokým obsahem apolipoproteinu B do predisponovaného úseku tepny, které jsou následně modifikovány většinou vlivem oxidativních změn. Odpovědí na ukládání modifikovaných lipoproteinů je chronická zánětlivá reakce, která je zprostředkována monocyty a T buňkami. Současně se mění fenotyp SMC medie tepny a migrují do subintimálních prostor. Monocyty se za účasti dalších specifických látek mění na makrofágy. Pohlcováním modifikovaných lipoproteinů se makrofágy mění na pěnové buňky. Hromaděním pěnových buněk dochází k tvorbě tukových proužků. Pro tyto léze je kromě přítomnosti pěnových buněk charakteristická přítomnost SMC a extracelulárně uložených lipidů. Prohlubováním endoteliální dysfunkce vzniká aterosklerotický plát (48; 49; 50).

Aterosklerotické pláty jsou tvořeny velkým lipidovým jádrem obsahující T lymfocyty a pěnové buňky, které produkují řadu tkáňových faktorů a metaloproteináz. Lipidové jádro je pokryté tenkou fibrózní čepičkou, která obsahuje velké množství aktivovaných buněk zánětu (makrofágy) produkující řadu cytokinů a proteolytických enzymů. Pokud má aterosklerotický

plát fibrózní čepičku silnou a neporušenou, označujeme ho jako stabilní. Naopak, má-li aterosklerotický plát čepičku tenkou, je označován jako nestabilní (vulnerabilní). Sekrecí proteolytických enzymů, jakou matrixové metaloproteinázy, degradují makrofágy ECM, což způsobí oslabení fibrózní čepičky, které může způsobit rupturu nebo erozi nestabilního aterosklerotického plátu. Jakmile dojde k ruptuře plátu a krev pronikne z lumen tepny do lipidového jádra, dojde ke spuštění vnější hemokoagulační kaskády (kontakt krve s tkáňovým faktorem). To vše vede ke vzniku trombu, který je bohatý na fibrin a krevní destičky. K ruptuře plátu a následnému vzniku trombu přispívá i probíhající zánětlivá reakce. Ruptura takového plátu způsobuje většinu AKS (49; 51; 52).

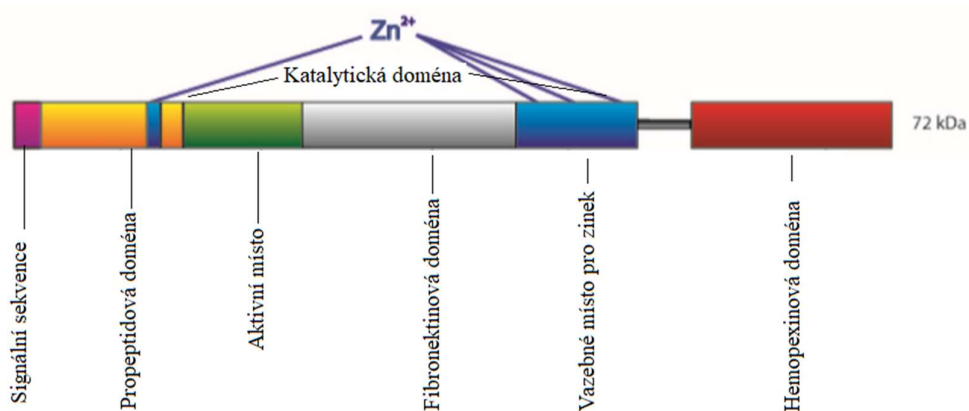
4.2. Želatinázy

Matrixová metaloproteináza – 2 (MMP-2) a matrixová metaloproteináza – 9 (MMP-9) patří do skupiny MMP nazývané želatinázy. Z toho důvodu se MMP-2 někdy také říká želatináza A a MMP-9 je naopak nazývána jako želatináza B. Tato skupina MMP štěpí řadu substrátů, které zahrnují denaturovaný kolagen, tedy želatinu, dále pak elastin, fibronectin a několik typů nativních kolagenů jako je například kolagen typu IV, což je hlavní komponenta bazální membrány (46; 53).

Stejně jako ostatní MMP jsou i želatinázy syntetizovány ve formě inaktivních zymogenů (proenzymů). Základní struktura těchto proteinů je charakterizována pre-peptidovou doménou, dále pak auto-inhibiční pro-peptidovou doménou, katalytickou doménou a C-terminální doménou podobnou hemopexinu. Pro-peptidová doména sahá od N-konce po katalytickou doménu a je zodpovědná za latenci enzymu. Dále obsahuje cysteinový zbytek, který chrání sousední katalytickou doménu. Katalytická doména želatináz je vysoce konzervovaná a obsahuje vazebná místa pro zinek. Liší se od katalytické domény ostatních MMP, jelikož obsahuje tři domény podobné fibronectinu typu II. Tyto domény tvoří tzv. oblast vázající kolagen, což umožňuje vazbu a následné štěpení kolagenu typu IV nebo denaturované želatiny (43; 46; 54).

4.2.1. Matrixová metaloproteináza – 2

MMP-2 je v normálních cévách trvale produkována SMC a endoteliálními buňkami. Dále je exprimována ve fibroblastech a epiteliálních buňkách. Stejně jako ostatní MMP je vylučována jako proenzym, který má molekulovou hmotnost 72 kDa a aktivována na povrchu buněk pomocí membránově vázaných MMP. Aktivní forma MMP-2 má molekulovou hmotnost 62 (66) kDa. Regulace aktivity je zprostředkována pomocí TIMP-2. V plazmě je tato MMP přítomná striktně jako monomer. MMP-2 štěpí několik substrátů ECM, jako například nativní kolagen typu I, II a III, fibronectin, laminin, elastin a další. Základní struktura MMP-2 je zobrazena na obrázku 6 (55; 56).



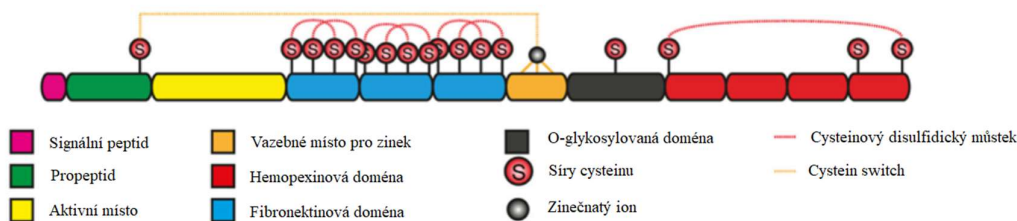
Obrázek 6 - Struktura MMP-2⁸

4.2.2. Matrixová metaloproteináza – 9

Želatináza B hraje hlavní úlohu v degradaci ECM v celé řadě fyziologických a patofyziologických procesů, které zahrnují remodelaci tkáně. Například exprese MMP-9 je důležitá pro implantaci embrya, počínaje trofoblastickou invazí v časném stádiu těhotenství. Uvádí se také, že MMP-9 hraje významnou roli v neovaskularizaci skrze proteolytické degradace proteinů v bazální vrstvě cév a také, že se podílí na funkci buněk imunitního systému. MMP-9 je za fyziologických podmínek produkována celou řadou buněk, jako například neutrofily, makrofágy, fibroblasty a endotelovými buňkami. V plazmě je želatináza B přítomná jako monomer nebo jako dimer v komplexu s neutrofilní želatinázou asociovanou s lipocalinem (NGAL). MMP-9 štěpí většinou podobné substráty jako MMP-2, zejména elastin, želatinu, několik druhů kolagenu (Např.: typ I, IV, V), dále pak fibronectin či laminin (55; 56; 57).

⁸ TVEITA, A. a kol. cit. s.3

Struktura zymogenu MMP-9 s plnou délkou řetězce zčásti zůstává neznámá, protože proMMP-9 se přirozeně vyskytuje jako monomery, heterokomplexy (NGAL-proMMP-9 komplex) a homomultimery. Primární strukturu lidské proMMP-9 o plné délce udává obrázek 7. Na tomto obrázku je vidět, že MMP-9 obsahuje navíc ještě O-glykosylovanou doménu, která se rovněž nazývá doména podobná kolagenu typu V. ProMMP-9, je produkována buňkami v komplexu s TIMP-1, který je navázaný na hemopexinovou doménu zymogenu. Klasická aktivace MMP-9 představuje narušení interakce mezi molekulou zinku v katalytické doméně a cysteinovým zbytkem (cystein switch) v pro-doméně. Tato strukturální modifikace vede ke štěpení proformy a produkci aktivního enzymu. MMP-9 je aktivována jinými MMP, včetně MMP-2. Aktivita MMP-9 je regulována pomocí všech TIMP a v cirkulaci inhibuje MMP-9 α 2-makroglobulin, aby se zabránilo její systémové aktivaci. V *in vitro* experimentech je nejčastěji používaným aktivátorem acetoxymerkurioanilin (APMA) (57; 58; 59; 60).



Obrázek 7 - Struktura MMP-9⁹

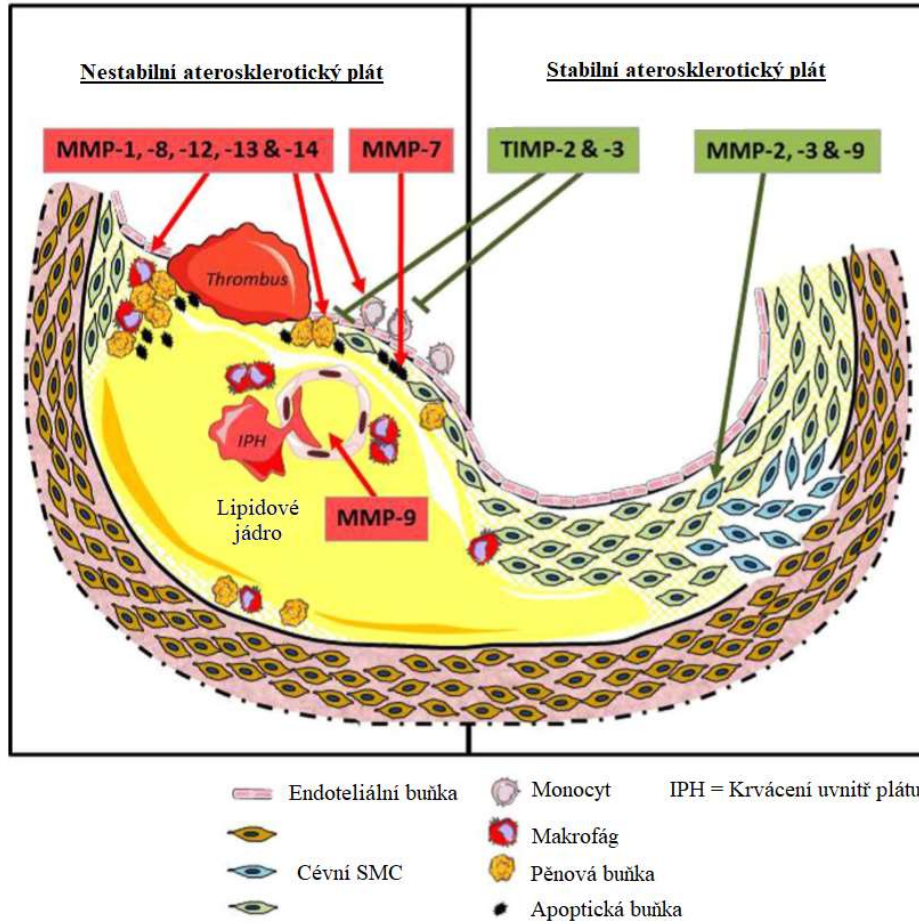
MMP-9 je syntetizována jako pre-proenzym. Během translace je odstraněn signální peptid za vzniku proenzymu o molekulové hmotnosti 92 kDa. Aktivace pomocí ostatních MMP, konkrétně matrixovou metaloproteinázou – 3, může produkovat dvě různé formy aktivních enzymů o molekulové hmotnosti 82 kDa (zkrácená o N-konec) a 65 kDa (zkrácená o C konec). Rozdíl mezi těmito dvěma aktivními formami je ten, že 65 kDa formě chybí hemopexinová doména. NGAL-proMMP-9 komplex má molekulovou hmotnost přibližně 116 kDa a multimerní formy mají molekulovou hmotnost přibližně nad 200 kDa (60; 61).

⁹ VANDOOREN, J. a kol. cit s. 17

4.3. Role matrixové metaloproteinázy – 2 a matrixové metaloproteinázy - 9 v ateroskleróze

Roli MMP-2 a MMP-9 u lidských onemocnění podporuje několik důkazů provedených *in vivo* a *in vitro*, které se shodují v tom, že MMP-9 má prozánětlivé vlastnosti, zatímco MMP-2 má pro-homeostatické vlastnosti. V současné době je již všeobecně známo, že želatinázy se podílejí na etiologii velkého množství onemocnění, jako jsou kardiovaskulární a autoimunitní nemoci a v posledních letech se intenzivně studuje jejich vliv v progresi u různých druhů karcinomů. V případě kardiovaskulárních onemocnění se želatinázy účastní jak geneze aterosklerotických lézí, tak i akutních událostí, jako je mrtvice nebo MI. Vysoké hladiny MMP byly detekovány v aterosklerotickém plátu a zdá se, že aktivace MMP usnadňuje aterogenezi, agregaci destiček a destabilizaci plátu, což předchází ruptuře fibrózní čepičky (56).

Bohatým zdrojem těchto a dalších MMP v aterosklerotických lézích jsou pěnové buňky, tedy modifikované makrofágy. Uvolněné MMP umožňují migraci SMC přes vnitřní elastickou vrstvu do intimy, především MMP-2 a MMP-9 jsou důležitými promotory migrace SMC. Ukázalo se, že MMP-2 a MMP-9 hrají stěžejní roli právě v ruptuře aterosklerotického plátu, jelikož degradují ECM a podněcují apoptózu SMC a infiltraci zánětlivých buněk, čímž přispívají k destabilizaci aterosklerotického plátu. Bylo zjištěno, že MMP-2 usnadňuje aktivaci krevních destiček, čímž se podílí na tvorbě trombu při ruptuře plátu. U pacientů s AKS byly v periferní krvi zvýšené hladiny MMP-2 a MMP-9, což naznačuje na jejich roli v destabilizaci plátů. Vyšší hladiny MMP-2 byly přítomny u pacientů s NAP a SAP v porovnání s kontrolní skupinou. Hladiny MMP-2 jsou významně vyšší u nemocných s nestabilními aterosklerotickými pláty v porovnání s pacienty, kteří mají pláty stabilní. Zdá se, že zvýšená exprese a aktivita MMP-9 je odpovědí na převahu prozánětlivých molekul, jako je například interleukin-1 β a tumor necrosis factor α , v aterosklerotických lézích (43; 55; 62; 63). Distribuce MMP, které jsou nejčastěji přítomné v aterosklerotických lézích včetně MMP-2 a MMP-9, je zobrazena na obrázku 8. Podrobněji je toto téma popsáno v bakalářské práci Vztah mezi matrixovými metaloproteinázami a interleukiny-1 a -6 a vznikem akutního koronárního syndromu (64).



Obrázek 8 - Distribuce MMP v aterosklerotických lézích

10

¹⁰ JOHNSON, J.L cit. s. 101

5. VZTAH MEZI MATRIXOVOU METALOPROTEINÁZOU - 2 A MATRIXOVOU METALOPROTEINÁZOU -9 A PERKUTÁNNÍ KORONÁRNÍ INTERVENCÍ

Post intervenční restenóza je jednou z hlavních dlouhodobých komplikací a hlavním limitujícím faktorem dlouhodobé účinnosti postupu PCI (65).

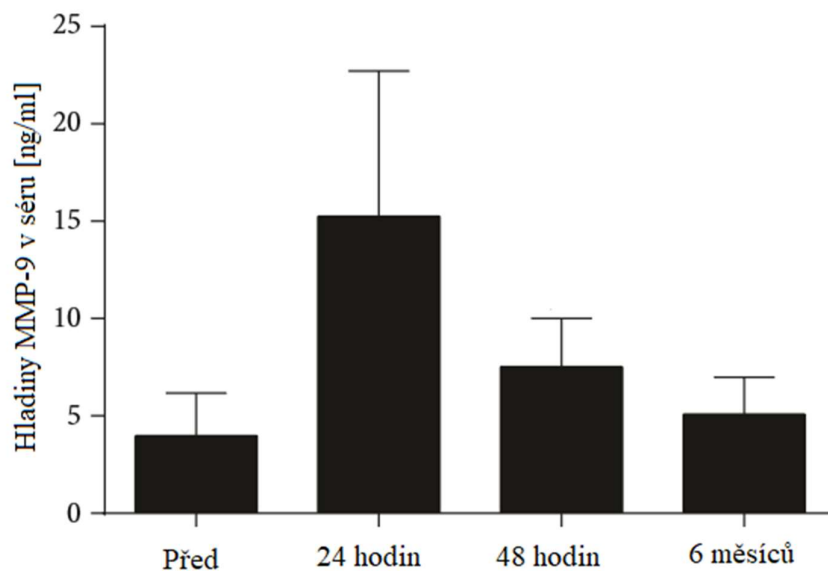
Ateroskleróza je pokládána za cévní zánětlivý proces, a proto chronický zánět hraje důležitou roli v patologickém vývoji a progresi aterosklerotického plátu. Ukázalo se, že MMP-9 by mohla být citlivý marker zánětu. Zvýšená exprese MMP-2 a MMP-9 byla již dříve nalezena u pacientů s AKS. Ukázalo se ale, že hladina MMP-9 v séru by mohla být ve vztahu k dlouhodobé prognóze po koronární revaskularizaci, například po PCI, u pacientů se stabilní ICHS. Počáteční *in vitro* a *in vivo* studie potvrdily obecně zvýšené hladiny MMP v koronárních arteriích po prodělané PCI, čímž mohou přispívat k cévní remodelaci a restenóze podpořením migrace SMC. Z tohoto důvodu by hladina MMP-9 mohla být nezávislým ukazatelem budoucích kardiovaskulárních příhod u pacientů se stabilní ICHS po prodělané PCI (66).

Zánětlivé reakce se také objevují brzy po implantaci koronárního stentu a hrají tak důležitou roli v patogenezi neointimální hyperplazie. Po implantaci stentu se T buňky, makrofágy a buňky hladkého svalstva verbují do místa implantace stentu. Předpokládá se, že tato lokální zánětlivá odpověď koreluje s restenózou (67).

Jak již bylo výše zmíněno, zánět ovlivňuje stabilitu aterosklerotického plátu a podněcuje jeho rupturu. AKS je způsoben následnou trombózou po ruptuře plátu. MMP-9 podněcuje destabilizaci a komplikace nestabilních plátů. Rovněž bylo nalezeno, že hladiny MMP-9 v séru jsou spojené s budoucími kardiovaskulárními příhodami u pacientů s kardiovaskulárními onemocněními. Z tohoto důvodu se jiná studie z roku 2013 (Liu a kol.) snažila najít korelaci mezi hladinou MMP-9 a rizikem vzniku ISR. Všem pacientům s ICHS byl úspěšně pomocí PCI implantován DES (sirolimus) na základě koronární stenózy. Bylo přijato 241 pacientů s ICHS s přítomností nebo klinickými příznaky ischemie po PCI a byli rozděleni na skupinu s ISR a bez ISR. Zjistili, že hladina MMP-9 významně vzrostla od přijetí, na vrcholu byla po 24 hodinách a po dvou týdnech poklesla. Koncentrace MMP-9 v plazmě byla významně zvýšena 24 hodin po PCI a poté se vrátila na hladiny před PCI. Hladiny MMP-9 jsou tedy zjevně vyšší u skupiny pacientů s ISR oproti skupině bez restenózy. Tento výsledek tedy podporuje to, že vyšší hladiny MMP-9 jsou spojené s restenózou po implantaci koronárního stentu, čímž by mohly pomoci odhalit ty pacienty, kteří mají vyšší riziko ISR (68).

Technologie DES podstatně snížila výskyt restenózy v porovnání s BMS. Nicméně současné DES však nejsou dokonalé a nemusí přinášet prospěch všem pacientům s onemocněním koronárních tepen. Narušená reendotelializace může zpozdit hojení ran a způsobit recidivu zánětu, jakmile zmizí protizánětlivé účinky léků potažených DES. Kromě farmakologických účinků léků potažených na stentu může toxicita nebo hypersenzitivita polymerní vrstvy na povrchu stentu také eventuálně způsobit pozdní fázi zánětu. Studie z roku 2014 (Taguchi a kol.) dále ukázala u všech pacientů pomocí vícenásobné regresní analýzy, že nezávislými prediktory zvýšení hladiny interleukinu-8 bylo použití DES, stejně jako počet implantovaných stentů (69).

MMP-9 má stěžejní roli v patogenezi restenózy po implantaci stentu. Zhang a kol. poprvé monitorovali hladiny několika prozánětlivých cytokinů jako i hladiny MMP-9 u pacientů, kteří podstoupili implantaci BMS do krční tepny a poté sledovali tyto faktory u pacientů po dobu 6 měsíců. Výsledky naznačují, že MMP-9 je zapojena v patofyziologickém procesu po implantaci stentu. Hladiny MMP-9 před, po 24 hodinách, 3 měsících a po 6 měsících po stentování krční tepny jsou uvedeny na obrázku 9 (70).



Obrázek 9 - Hladiny MMP-9 po implantaci stentu do krční tepny¹¹

¹¹ ZHANG, R. a kol. cit. s.5

Studie potvrdily, že MMP-9 hraje rozhodující roli v patogenezi ISR po umístění BMS nebo DES, což znamená, že MMP-9 je spojená s ISR koronárních tepen u lidí. Závěrem lze tedy říci, že MMP-9 se také podílí na chronické fázi po implantaci stentu (70).

Studie z roku 2015 (Muhsin a kol.) zkoumala asociaci mezi hladinou MMP-9 a in stent restenózou. Do dané studie byli zařazeni pouze pacienti s SAP, kteří podstoupili PCI s plánovanou implantací BMS. V této studii zjistili, že hladiny MMP-9 nevykazovaly žádnou souvislost s ISR u pacientů se SAP, kteří podstoupili implantaci BMS pro de novo léze (65).

Gregory a kol. hodnotili vztah mezi ISR a plazmatickými hladinami pro-MMP-9, latentní MMP-9 a aktivní MMP-9 u pacientů, kterým byl implantován BMS. Uvádějí, že aktivní MMP-9 vykazuje silnou souvislost s ISR a jeví se jako nejpředvídatelnější při plazmatických koncentracích > 2 ng / ml. Tato studie ukazuje, že aktivní forma MMP-9 je nezávislým ukazatelem rizika ISR u pacientů léčených BMS. Prognostická hodnota tohoto markeru musí být dále hodnocena v dlouhodobých studiích (71).

MMP-2 a MMP-9 jsou zapojené do změn v ECM (ECM turnover) a remodelaci srdce po infarktu. Jejich uvolnění a role po MI je závislá na čase. Studie z roku 2013 (Kruk a kol.) sledovala pacienty po MI, kterým byla provedena PCI, jeden rok a uvedla významné zvýšení hodnot MMP-2, zatímco hladiny MMP-9 se snížily. Podobné posuny těchto hladin biomarkerů během dlouhodobého sledování byly dříve pozorovány u pacientů po MI. V této studii zjistili, že zákrok pomocí PCI má tendenci významně snížit hodnoty MMP-9 u pacientů po MI (o 38 %). Na dynamiku MMP-2 nemá PCI viditelný efekt (72).

6. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo stanovit hladinu MMP-2 a MMP-9 u pacientů s ICHS, kteří podstoupili implantaci stentů pomocí PCI, metodou želatinové zymografie a zhodnotit získané výsledky vzhledem k dostupné literatuře. Dalším cílem této diplomové práce bylo porovnat u těchto pacientů hladiny MMP-2 a MMP-9 u lékových a vstřebatelných stentů. Hladiny MMP-2 a MMP-9 byly stanoveny ve vzorcích séra pacientů z Interní kliniky - Kardiologického oddělení se sídlem v Pardubicích (Nemocnice Pardubického kraje, a.s.).

B. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

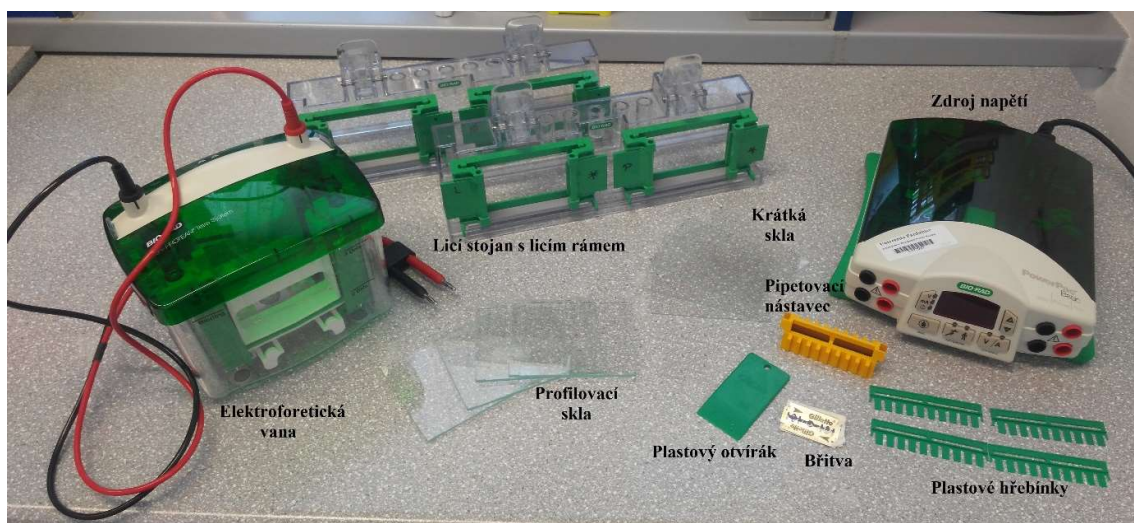
7. MATERIÁL, PACIENTI A METODA

7.1. Používané přístroje a pomůcky

a) Pomůcky na elektroforézu

- Zdroj Power Pac Basic Power Supply (Bio-Rad, USA)
- Elektroforetická vana Mini-PROTEAN Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Licí rám Mini – PROTEAN Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Licí stojan Mini – PROTEAN Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Těsnící pásy Mini – PROTEAN Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Profilovací skla System Glass Plates (Spacer plates) (Bio-Rad, USA)
- Krátká skla System Glass Plates (Short plates) (Bio-Rad, USA)
- Pipetovací nástavec Mini – PROTEAN Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Plastové hřebeny na tvorbu jamek Mini – PROTEAN Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Plastový otvírák gelů Mini – PROTEAN Tetra systém (Bio-Rad, USA)

b) Aparatura pro elektroforézu a přípravu gelů je znázorněna na obrázku 10.



Obrázek 10 - Aparatura pro elektroforézu a přípravu gelů

Ostatní používané pomůcky

- Analytické váhy LB-1050/2 (Laberte, Maďarsko)
- Digitální váhy 440-21N, 440-35A (KERN, Německo)
- Chladnička (Liebherr LH KTS 1414, Německo)
- Hlubokomrazicí box MDF – U3386S (Panasonic, Japonsko)
- Laboratorní třepačka Kavalier LT 2 (Votice, ČR)
- Termostat (Mettler, Německo)
- Blokový termostat ISOTEMP 145 D (Fisher Scientific, ČR)
- Portable analog pH metr HI 8314 (Hanna Instruments, Rumunsko)
- Ultrazvuková vana K1L (Kraintek, Slovensko)
- Pumpa vakuová (Merck, Německo)
- Sada reagenčních lahví 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml, 2000ml (Simax, ČR)
- Automatické pipety: 10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5 ml (BioHit, Finsko)
- Mikro zkumavky Eppendorf: 2 000 µl, 1 500 µl, 600 µl
- Skleněné a plastové zkumavky: 10 ml, 15 ml
- Petriho misky o průměru 17 cm
- Skleněné odměrné válce, kádinky
- Břitva Gillette Platinum (Procter & Gamble, UK)
- Parafilm (Bemis Flexible Packaging, USA)
- Celofánová fólie
- Vortex (Heidolph, Německo)
- Skener Perfection V600 Photo (EPSON, Japonsko)

7.2. Používané chemikálie

<i>Želatina, typ A pro elektroforézu</i>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<i>Persíran amonný (APS)</i>	(SIGMA-ALDRICH, Japonsko)
<i>Dodecylsírán sodný (SDS)</i>	(LACH-NER, ČR)
<i>Standard MMP-9</i>	(Merck, Německo)

<i>Standard MMP-2</i>	(Merck, Německo)
<i>30 % akrylamid/bis-akrylamid (polyakrylamid)</i>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<i>N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)</i>	(SIGMA-ALDRICH, Čína)
<i>Chlorid sodný</i>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Base)</i>	(PENTA, ČR)
<i>Hydroxid sodný</i>	(SIGMA-ALDRICH, Švédsko)
<i>Chlorid vápenatý (bezvodý)</i>	(PENTA, ČR)
<i>Glycin</i>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<i>Kyselina octová 99 %</i>	(LACH-NER, ČR)
<i>Methanol</i>	(LACH-NER, ČR)
<i>Ethanol 96 %</i>	(LACH-NER, ČR)
<i>Glycerol (bezvodý)</i>	(LACH-NER, ČR)
<i>Kyselina chlorovodíková 37 %</i>	(SIGMA-ALDRICH, Německo)
<i>Triton®X-100</i>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<i>Brij® L23</i>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<i>Coomassie Brilliant Blue R</i>	(SIGMA-ALDRICH, Velká Británie)
<i>Bromfenolová modř</i>	(Lachema N. P. Brno, ČR)

7.3. Pacienti

Biologické vzorky, které byly použity pro tuto diplomovou práci, byly sbírány od pacientů, kteří jsou začleněni do studie, která byla se zaměřená na zánětlivé a další biochemické parametry u pacientů s ICHS. Probíhala ve spolupráci s Interní klinikou – Kardiologického oddělení se sídlem v Pardubicích (Nemocnice Pardubického kraje, a.s.). V souladu s touto studií byl také 13.12.2013 vydán souhlas Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, který je uveden v Příloze A. Všichni pacienti, kteří jsou do studie začleněni, podepsali informovaný souhlas a vyplnili dotazník. Jako příklad je uveden informovaný souhlas pro účastníky studie v Příloze B.

V této práci jsme použili vzorky 41 pacientů, kteří byli rozděleni do třech základních skupin. První skupinu tvořili pacienti, kteří přišli do nemocnice pro dokončení revaskulizace po akutní ICHS (DR po akutní ICHS). Druhou skupinu tvořili pacienti, kteří přišli do nemocnice pro dokončení revaskulizace po chronické ICHS (DR po chronické ICHS). Třetí skupinu tvořili pacienti, kterým se zhoršila chronická forma ICHS, ale nejedná se o revaskulizaci (Chronická ICHS). Základní informace o těchto pacientech poskytuje tabulka 3. Zvláštní skupinu tvoří dva pacienti, které nelze zařadit do žádné z výše uvedených skupin (akutní zhoršení zdravotního stavu).

Tabulka 3 - Základní informace o pacientech (skupiny)

	DR po akutní ICHHS n = 22	DR po chronické ICHHS n = 6	Chronická ICHHS n = 11
Ženy	5 (22,7 %)	2 (33,3 %)	3 (27,3 %)
Muži	17 (77,3 %)	4 (66,7 %)	8 (72,7 %)
Věk	64,0 ± 8,8	67,8 ± 5,4	65,8 ± 8,1
BMI	28,5 ± 4,6	32,8 ± 6,2	28,6 ± 4,1
Kouření	4 (18,2 %) exkuřáci 9 (40,9 %)	1 (16,7 %) exkuřáci 3 (50,0 %)	2 (18,2 %) exkuřáci 5 (45,5 %)
Diabetes mellitus	5 (22,7 %)	1 (16,7 %)	4 (36,4 %)
Léčba hypertenze	19 (86,4 %)	5 (83,3 %)	7 (63,6 %)
Statiny před PCI	17 (77,3 %)	6 (100,0 %)	5 (45,5 %)
AIM v minulosti	4 (18,2 %)	1 (16,7 %)	0 (0,0 %)
CMP v minulosti	2 (9,1 %)	1 (16,7 %)	0 (0,0 %)
ICHDK v minulosti	1 (4,5 %)	0 (0,0 %)	2 (18,2 %)
HLP, DLP	17 (77,3 %)	5 (83,3 %)	10 (90,9 %)
Stenty během PCI	DES	11 (50 %)	4 (36,4 %)
	BVS	11 (50 %)	7 (63,6 %)

BMI – body mass index, AIM – akutní infarkt myokardu, CMP – cévní mozková příhoda, ICHDK – ischemická choroba dolních končetin, HLP – hyperlipoproteinémie DLP – dyslipoproteinémie, DES – lékové stenty, BVS – vstřebatelné stenty

V tabulce 3 a tabulce 4 je věk a BMI pacienta vyjádřen jako průměr se směrodatnou odchylkou. V ostatních případech je počet pacientů vyjádřen jednak číslem, jednak procentuálním zastoupením, které je uvedeno v závorce. Jednotlivé skupiny pacientů se mezi sebou významně statisticky neliší. Jediným, v čem se tyto skupiny statisticky významně lišily byla léčba statiny před zákrokem, a to ve skupině pacientů DR po chronické ICHS a skupinou s chronickou ICHS, kde hodnota P Studentova T-testu byla na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ rovna 0,02353. Pro pacienty ve studii je společným znakem to, že během léčby podstoupili implantaci jednoho nebo více koronárních stentů.

Následující tabulka uvádí přehled pacientů rozdělených podle typu stentu, kterým jim byl

během PCI implantován. Mezi pacienty v této tabulce není žádný statisticky významný rozdíl.

Tabulka 4 - Rozdělení pacientů dle typů stentů

	DES n = 20	BVS n = 21
Ženy	3 (15,0 %)	8 (38,1 %)
Muži	17 (85,0 %)	13 (61,9 %)
Věk	64,7 ± 6,9	64,6 ± 9,4
BMI	29,1 ± 3,8	28,8 ± 5,9
Kouření	4 (20,0 %) exkuřáci 7 (35,0 %)	3 (14,3 %) exkuřáci 12 (57,1 %)
Diabete mellitus	4 (20,0 %)	5 (23,8 %)
Léčba hypertenze	17 (85,0 %)	16 (76,2 %)
Statiny před PCI	14 (70,0 %)	15 (71,4 %)
AIM v minulosti	5 (25,0 %)	0 (0,0 %)
CMP v minulosti	2 (10,0 %)	1 (4,8 %)
ICHDK v minulosti	1 (5,0 %)	2 (9,5 %)
HLP, DLP	15 (75,0 %)	19 (90,5 %)
Stenty v minulosti	7 (35,0 %)	4 (19,0 %)

BMI – body mass index, AIM – akutní infarkt myokardu, CMP – cévní mozková příhoda, ICHDK – ischemická choroba dolních končetin, HLP – hyperlipoproteinémie DLP – dyslipoproteinémie, DES – lékové stenty, BVS - vstřebatelné stenty

7.4. Vzorky

Pro stanovení MMP-2 a MMP-9 jsme použili vzorky séra. Krev od pacientů pro získání séra byla odebírána před zákrokem, 24 a 48 hodin po PCI. Pacientům s číslem větší než 40 byl proveden ještě čtvrtý odběr D, a to v rozmezí 3, 6 až 12 měsíců po výkonu PCI (většinou 3 měsíce po zákroku). Během transportu byly vzorky uchovávány u ledu a následně zpracovány. Po transportu se zkumavky nechaly stát zhruba půl hodiny při laboratorní teplotě. Následně byla provedena centrifugace, 10 minut při 3500 otáčkách za minutu, při teplotě 4 °C. Získané sérum bylo rozpipetováno a alikvoty byly zamrazeny při teplotě – 80 °C.

7.5. Příprava potřebných roztoků

a) 10 % Dodecylsírán sodný

V 50 ml destilované vody rozpustíme 10 g SDS. Následně doplníme destilovanou vodou do celkového objemu 100 ml. Roztok uchováváme v chladničce zhruba 3 měsíce. Při nižší teplotě tento roztok krystalizuje, proto ho před použitím musíme zahřát v teplé vodní lázni a následně promíchat.

b) 12 % Dodecylsírán sodný

V 50 ml destilované vody rozpustíme 12 g SDS. Následně doplníme destilovanou vodou na celkový objem 100 ml. Roztok uchováváme v chladničce zhruba 3 měsíce. Při nižší teplotě tento roztok krystalizuje, proto ho před použitím musíme zahřát v teplé vodní lázni a následně promíchat.

c) 1,5 M Tris – HCl pufr s hodnotou pH 8,8

V 50 ml destilované vody rozpustíme 18,5 g Tris-Base a poté pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové upravíme pH na výslednou hodnotu 8,8. Následně doplníme 50 ml destilované vody do celkového objemu 100 ml. Tento roztok uchováváme v chladničce, kde je stabilní zhruba 3 měsíce.

d) 0,5 M Tris – HCl pufr s hodnotou pH 6,8

V 50 ml destilované vody rozpustíme 6 g Tris-Base a poté pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové upravíme pH na výslednou hodnotu 6,8. Následně doplníme 50 ml destilované vody do celkového objemu 100 ml. Tento roztok uchováváme v chladničce, kde je stabilní zhruba 3 měsíce.

e) 2 % Bromfenolová modř

V plastové zkumavce rozpustíme 0,1 g bromfenolové modři v 5 ml destilované vody. Roztok uchováváme v chladničce.

f) Inkubační pufr s hodnotou pH 7,8

V 500 ml destilované vody rozpustíme 6,04 g Tris-Base, 0,6 g chloridu sodného a 1,112 g chloridu vápenatého a doplníme 500 ml destilované vody. Poté pomocí

koncentrované kyseliny chlorovodíkové upravíme pH roztoku na výslednou hodnotu 7,8. Daný roztok uchováváme v chladničce, kde je stabilní zhruba měsíc.

g) Elektrodový pufr

V 500 ml destilované vody rozpustíme 30,3 g Tris-Base, 144 g glycinu a 10 g SDS a doplníme 500 ml destilované vody. Roztok uchováváme v chladničce, kde je stabilní zhruba měsíc a před elektroforézou ho ředíme v poměru 1:5 destilovanou vodou.

h) Standardový pufr pro MMP-9

Na analytických vahách postupně navážíme 0,3029 g Tris-Base, 0,0555 g chloridu vápenatého, 0,4383 g chloridu sodného a 0,025 g BRIJ L23. Následně tyto reagenty rozpustíme v celkem 40 ml destilované vody. Poté koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou upravíme pH na výslednou hodnotu 7,5. Nakonec objem doplníme na 50 ml a uchováváme v chladničce, kde je stabilní zhruba měsíc.

i) Standardový pufr pro MMP-2

Na analytických vahách postupně navážíme 0,1212 g Tris-Base, 0,0277 g chloridu vápenatého, 0,4383 g chloridu sodného a 0,025 g BRIJ L23. Následně tyto reagenty rozpustíme v celkem 40 ml destilované vody. Poté koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou upravíme pH na výslednou hodnotu 7,4. Nakonec objem doplníme na 50 ml a uchováváme v chladničce, kde je stabilní zhruba měsíc.

j) 1 % Dodecylsírán sodný

Do mikro zkumavky napipetujeme 1800 μ l destilované vody a poté 200 μ l 10 % SDS. Tento roztok připravujeme vždy v den přípravy gelů. Následně ho zahřejeme v horké vodní lázni, krátce před pipetováním daného roztoku k navážené želatině. Zahřátí 1 % SDS provádíme z toho důvodu, aby se želatina po smíchání s roztokem rychle a důkladně rozpustila.

k) 10 % Persíran amonný

Pro přípravu čtyř gelů navážíme na analytických vahách 0,2 g APS. Poté k tomuto množství napipetujeme 2 ml destilované vody. Roztok APS připravujeme vždy v den přípravy gelů.

l) Roztok želatiny v 1 % Dodecylsírany sodném

Pro přípravu čtyř gelů navážíme na analytických vahách 0,06 g želatiny a toto množství rozpustíme v 1500 μ l zahřátého 1 % roztoku SDS. Dokonale rozpustíme v horké vodní lázni a důkladně promícháme. Roztok želatiny připravujeme krátce před pipetováním ke zbylým reagensům pro přípravu dělicích gelů.

m) Vzorkový pufr

Do plastové zkumavky napipetujeme 1000 μ l 0,5 M Tris-HCl o pH 6,8, 3200 μ l 10 % SDS, 800 μ l glycerolu, 2800 μ l destilované vody a 200 μ l 2 % roztoku bromfenolové modři. Roztok důkladně promícháme a uchováváme v chladničce.

n) 2,5 % Triton X-100

V 243,75 ml destilované vody rozpustíme 6,25 ml Tritonu X-100. Jelikož je Triton X-100 špatně rozpustný, použijeme k jeho rozpuštění v destilované vodě ultrazvukovou vanu. Tento roztok připravujeme hned po spuštění elektroforézy a vždy v den použití.

o) Odbarvovací roztok

Pro odbarvení 4 gelů smícháme v reagenční láhvi 300 ml methanolu, 150 ml kyseliny octové a 750 ml destilované vody. Odbarvovací roztok připravujeme vždy v den barvení a odbarvování gelů.

p) Barvicí roztok

Pro obarvení 4 gelů smícháme v reagenční láhvi 200 ml methanolu, 50 ml kyseliny octové, 250 ml destilované vody a 1,5 g Coomassie Brilliant Blue R. Důkladně vše promícháme, aby se Coomassie Brilliant Blue R dobře rozpustila. Tento roztok připravujeme vždy v den barvení a odbarvování gelů.

q) 0,1 M NaOH

Ve 100 ml destilované vody rozpustíme 0,4 g NaOH. Tento roztok uchováváme v chladničce. Používá se pouze pro účely úpravy pH.

7.6. Postup želatinové zymografie

a) Příprava standardů

Standardy proMMP-2 a MMP-9 byly dodány od stejného výrobce (Merck). U standardu proMMP-2 a proMMP-9 bylo výrobcem garantováno, že se v něm nachází přirozené dimery, a to ne více než 10 %. Dále mohou obsahovat až 10 % TIMP proteinů a část standardu může být během skladování aktivována (méně než 10 % enzymu). Tyto standardy jsme používali jen v neaktivované formě.

Standard proMMP-2 jsme po doručení do výrobce rozmrazili při laboratorní teplotě a rozpípetovali do mikro zkumavek po 1 μ l a poté zamrazili na teplotu -80 °C. Byl dodán v koncentraci 0,481 mg/ml. V případě použití standard rozmrazíme při laboratorní teplotě a naředíme standartovým pufrem tak, že k 1 μ l koncentrovaného standardu v mikro zkumavce napipetujeme 480 μ l standartového pufru a zvortexujeme, aby výsledná koncentrace byla 1000 ng/ml. Poté tento naředěný standard dále ředíme na výslednou koncentraci 500 ng/ml a to tak, že do nové mikro zkumavky napipetujeme 50 μ l naředěného standardu o koncentraci 1000 ng/ml a 50 μ l standartového pufru (1:1) a následně zvortexujeme. Oba naředěné standardy (jeden o koncentraci 1000 ng/ml a druhý o koncentraci 500 ng/ml) proMMP-2 dále ředíme 18x vzorkovým pufrem tak, že ke 170 μ l vzorkového pufru napipetujeme 10 μ l naředěného standardu a poté promícháme na vortexu.

Standard proMMP-9 jsme po doručení do výrobce rozmrazili při laboratorní teplotě a rozpípetovali do mikro zkumavek po 1 μ l a poté zamrazili na teplotu -80 °C. Byl dodán v koncentraci 1,87 mg/ml. V případě použití standard rozmrazíme při laboratorní teplotě a naředíme standartovým pufrem tak, že k 1 μ l koncentrovaného standardu v mikro zkumavce napipetujeme 500 μ l standartového pufru a následně zvortexujeme. Poté do nové mikro zkumavky napipetujeme 732 μ l standartového pufru a 268 μ l z před ředěného standardu, aby výsledná koncentrace byla 1000 ng/ml a promícháme na vortexu. Následně tento naředěný standard dále ředíme na výslednou koncentraci 500 ng/ml a to tak, že do nové mikro zkumavky napipetujeme 50 μ l naředěného standardu o koncentraci 1000 ng/ml a 50 μ l standartového pufru (1:1) a následně zvortexujeme. Oba naředěné standardy (jeden o koncentraci 1000 ng/ml a druhý o koncentraci 500 ng/ml) proMMP-9 dále ředíme 18x vzorkovým pufrem tak, že ke 170 μ l vzorkového pufru napipetujeme 10 μ l naředěného standardu a poté promícháme na vortexu.

Takto připravené roztoky standardů necháme inkubovat v termostatu při 25 °C 2 hodiny. Neaktivovaný standard musíme připravit vždy čerstvý před každou analýzou.

b) Příprava vzorků

Vzorky séra naředíme připraveným vzorkovým pufrem. Využíváme ředění 18x pro stanovení MMP-9 a MMP-2. Do mikro zkumavky napipetujeme 170 µl vzorkového pufru a 10 µl vzorku. Naředěné vzorky dobře promícháme na vortexu a necháme 2 hodiny inkubovat v termostatu při 25 °C. Dodržení doby inkubace je důležité, jelikož během ní obsadí SDS aktivní místa na MMP a tím zabrání jejímu předčasnému navázání na želatinu před elektroforézou.

c) Příprava aparatury pro výrobu gelů

Nejdříve opláchneme profilovací a krátká skla destilovanou vodou a poté je důkladně vyčistíme buničinou řádně namočenou v ethanolu. Skla musí být dokonale čistá, zbavená všech nečistot a odmaštěná, jinak by mohlo dojít k propouštění skel. Následně přiložíme k profilovacímu sklu krátké sklo a vložíme je takto do licího rámu. Zespodu je můžeme přelepit proužkem parafilmu, který také brání propouštění skel, ale není to nutné. Licí rám spolu se skly vložíme do licího stojanu s těsníci pásky a následně mezi skla napipetujeme zhruba 1 ml destilované vody a necháme stát zhruba 5–10 minut, abychom se ujistili, že skla neprotékají. Tuto vodu potom vylijeme do odpadu a zbytek odsajeme filtračním papírem, aby mezi skly nezůstala žádná destilovaná voda.

d) Příprava dělicího gelu

Reagencie, které potřebné k přípravě dvou dělicích gelů (většinou byly připravovány čtyři gely najednou), jsou uvedeny v tabulce 5. Nejdříve si v plastové zkumavce smícháme reagencie kroku 1 v pořadí, jaké je uvedeno v tabulce 5. Po následném promíchání na vortexu tento roztok odvzdušníme pomocí vývěvy, a to za současného poklepu tužkou. Poté zchladíme v ledové vodní lázni přibližně 5 minut, aby gel mezi skly lépe tuhnul, kam zhruba na 2 minuty můžeme vložit roztok APS a TEMED. K takto zchlazenému roztoku napipetujeme nejdříve APS a následně TEMED (reagencie kroku 2). Celý roztok třikrát důkladně a krátce promícháme na vortexu a poté ihned a co nejrychleji pipetujeme mezi skla tak, aby hladina gelu sahala pod zelený okraj licího rámu. Nakonec gel rychle a opatrně převrstvíme zhruba 1 ml destilované vody, aby nedošlo k zavzdušení a vytvořila se rovná linie a necháme gel 30 minut tuhnout.

Tabulka 5 - Reagencie pro přípravu dělicího gelu

Pořadí	Reagencie	Množství [μl]	
1.	30 % Polyakrylamid	2500	
2.	Destilovaná voda	3600	
3.	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	935	Krok 1
4.	12 % SDS	75	
5.	Želatina v 1 % SDS	750	
1.	10 % APS	375	Krok 2
2.	TEMED	3,75	

e) Příprava zaostřovacího gelu

Reagencie, které potřebné k přípravě dvou zaostřovacích gelů (většinou byly připravovány čtyři gely najednou), jsou uvedeny v tabulce č. 6 Ke konci doby tuhnutí dělicího gelu si v plastové zkumavce smícháme reagencie kroku 1 v pořadí, jaké je uvedeno v tabulce č. 6 Po následném promíchání tento roztok dokonale odvzdušníme pomocí vývěvy za současného poklepu tužkou. Odvzdušněný roztok následně zchladíme v ledové vodní lázni. Po uplynutí doby potřebné k tuhnutí dělicího gelu, nad ním opatrně odsajeme vodu pomocí filtračního papíru. Následně ke zchlazenému roztoku přidáme nejdříve APS a poté TEMED (reagencie kroku 2). Poté jednou a krátce promícháme na vortexu a napipetujeme mezi skla nad dělicí gel až po okraj. Nakonec mezi skla zasuneme plastový hřebínek, který jsme si předem očistili ethanolem a necháme gel 30 minut tuhnout.

Tabulka 6 - Reagencie pro přípravu zaostřovacího gelu

Pořadí	Reagencie	Množství [μl]	
1.	30 % Polyakrylamid	625	
2.	Destilovaná voda	2800	
3.	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1250	Krok 1
4.	12 % SDS	50	
1.	10 % APS	250	
2.	TEMED	3,75	Krok 2

f) Příprava elektrodového pufru

Elektrodový pufr, který jsme si připravili dopředu podle návodu, naředíme destilovanou vodou před elektroforézou v poměru 1:5. Na 4 gely potřebujeme objem přibližně 1200 ml, takže smícháme 200 ml elektrodového pufru a 1000 ml destilované vody.

g) Umístění vzorků a standardů na gel

Po uplynutí doby, potřebné ke ztuhnutí gelů, vyjmeme z lícího stojanu lící rám a ze spodní strany skel, pokud jsme použili, odstraníme proužky parafilmu. Poté skla s gely vyndáme z rámu a po dvojicích umístíme do rámu pro elektroforézu tak, aby směřovaly krátkými skly k sobě. Poté je umístíme do elektroforetické vany dle barevné příslušnosti, která je označená červenou a černou barvou (červená elektroda na červenou značku) a následně opatrně a rovnoměrně vytáhneme plastové hřebínky. Připraveným naředěným elektrodovým pufrem nejdříve opatrně propláchneme jamky v gelu, následovně naplníme pufrem prostor mezi gely a poté jej nalijeme i do elektroforetické vany po příslušnou rysku. Pipetovací nástavec opláchneme destilovanou vodou a umístíme mezi skla. Následně do příslušných jamek pomocí malé (10 μ l) pipety dávkujeme opatrně a plynule 10 μ l vzorku či 10 μ l standardu. Po naplnění všech jamek vyjmeme pipetovací nástavec a nasadíme na elektroforetickou vanu víko. Pokud souhlasí barevná příslušnost elektrod, připojíme zdroj napětí.

h) Vlastní elektroforéza

Nejdříve na zdroji napětí nastavíme příslušné parametry elektroforézy. Hodnotu napětí nastavíme na 180 V a čas na 70 minut. Proud nenastavujeme, jelikož je během elektroforézy udržováno konstantní napětí. Zdroj si ho vypočítá sám na základě Ohmova zákona. Hodnota proudu záleží na počtech umístěných gelů. Pro čtyři gely je na začátku průměrně 185 mA a na konci elektroforézy klesne na průměrnou hodnotu 94 mA. Jakmile bromfenolová modř opustí gely, což je přibližně po 45 minutách, stopujeme dalších 15 minut, během kterých dojde k lepšímu rozdělení metaloproteináz. Po uplynutí této doby elektroforézu ukončíme. Během elektroforézy si připravíme Petriho misky, které důkladně vyčistíme buničinou namočenou v ethanolu a následně popíšeme, aby nedošlo k záměně gelů.

i) Postup před inkubací gelů

Po spuštění elektroforézy si co nejdříve připravíme dle návodu 2,5 % Triton X-100, který důkladně rozpustíme v ultrazvukové vaně, což trvá zhruba 45 minut. Po ukončení

elektroforézy sejmem z elektroforetické vany víko a slijeme elektrodotový pufr do odpadu. Následně vyjmeme skla z nástavců. Pro získání gelů skla pomocí plastového otviračku opatrně oddělíme od sebe a břitvou odřízneme jamky, které odstraníme pomocí papírové utěrky. Opatrně sloupneme jednotlivé gely ze skla do Petriho misek a to tak, že je smyjeme proudem destilované vody ze stříčky. Každý gel zalijeme zhruba 60 ml Tritonu X-100. Poté misky umístíme na třepačku a necháme třepat 1 hodinu. Po uplynutí této doby slijeme Triton X-100 do odpadu a snažíme se, pokud možno, již na gely nesahat. Nakonec na každý gel nalijeme 100 ml inkubačního pufru a necháme gely v termostatu inkubovat při 37 °C 19 hodin.

j) Barvení a odbarvování gelů

Krátce před ukončením inkubace si připravíme odbarvovací a barvicí roztok podle uvedeného návodu. Z gelů slijeme inkubační pufr do odpadu a poté na každý gel nalijeme 80 ml odbarvovacího roztoku, umístíme na třepačku a necháme 30 minut třepat. Během třepání si nastříháme celofánové fólie na obdélníky o trochu větší, než je velikost krátkého skla a ponoříme je do Petriho misky s odbarvovacím roztokem (zhruba 100 ml), do kterého jsme přidali 10 ml glycerolu a předem dobře promíchali. Takto ponořené celofánové fólie necháme inkubovat 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po uplynutí 30 minut slijeme odbarvovací roztok do speciálního odpadu a následně na všechny gely nalijeme 80 ml barvicího roztoku a necháme třepat 1 hodinu. Poté barvicí roztok slijeme do speciálního odpadu a každý gel v Petriho misce důkladně promícháme s malým množstvím odbarvovacího roztoku. Ten následně slijeme do speciálního odpadu a na jednotlivé gely nalijeme 100 ml čistého odbarvovacího roztoku a necháme gely třepat 45 minut. Po uplynutí této doby přidáme ke každému gelu s odbarvovacím roztokem 5 ml glycerolu, dobře promícháme a odbarvujeme dalších 15 minut na třepačce. Nakonec gely vložíme opatrně mezi připravené celofánové fólie, osušíme pomocí papírových utěrek a necháme uschnout na čistých papírových utěrkách a následně gely popíšeme.

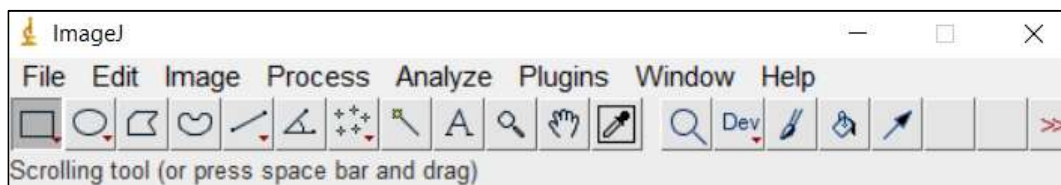
k) Skenování gelů

Skenování gelů probíhá nejdříve 1 týden po jejich obarvení. Nejprve odstraníme bílou desku ze skeneru a poté skener zapneme. V příslušném programu si nastavíme několik parametrů. Po vyzkoušení řady možností se na skenování gelů jako nejvhodnější jeví následující parametry: Zvolíme si Home mode a poté Positive film. Následně v nabídce zaškrtneme možnosti Color Restoration, Digital ICE, Backlight Correction a 400 dpi. Po provedení náhledu nastavíme gel na správnou orientaci a odstraníme přebytečné pozadí

(oříznutím). Pokud vše vypadá v pořádku, klikneme na tlačítko Scan. Poté naskenovaný gel exportujeme do námi zvolené složky a uložíme. Všechny gely byly skenovány minimálně dvakrát. Druhou variantou ve většině případů bylo zanechání předešlých parametrů doplněné o nastavení jasu na hodnotu -41. Může se stát, že jsou gely světlejší, v tom případě je potřeba na tuto skutečnost reagovat úpravou předešlých parametrů a různě je zkombinovat, jako například skenování bez Backlight Correction a Color Restoration nebo přidáním kontrastu. Vždy se ale snažíme, aby proužky na gelu byly co nejzářivější a nejostřejší, aby bylo možné gel vyhodnotit.

7.7. Vyhodnocování gelů

Naskenované gely vyhodnocujeme pomocí programu ImageJ. Hlavní panel tohoto programu znázorňuje obrázek 11

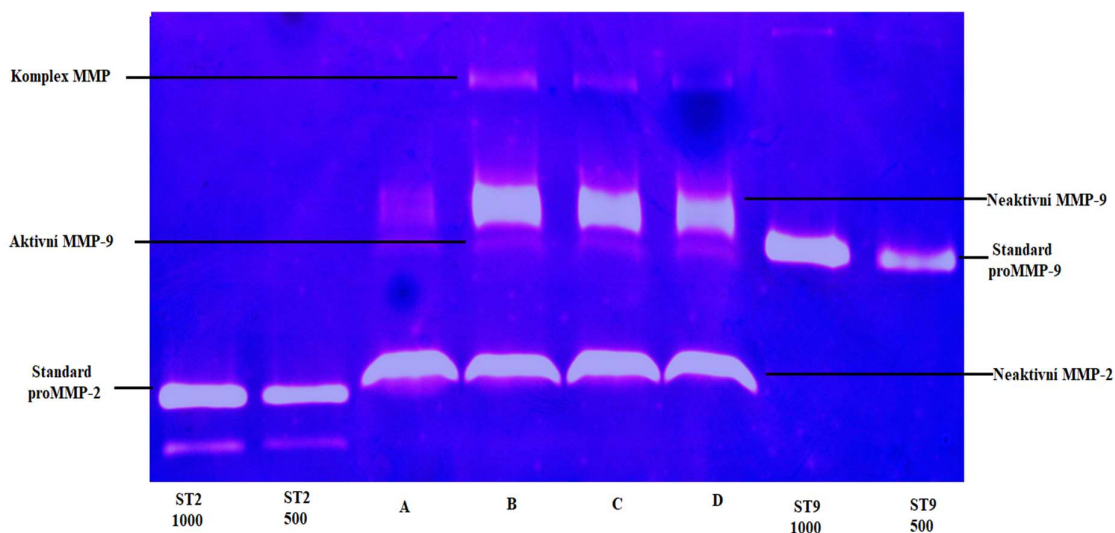


Obrázek 11 - Základní vyhodnocovací panel programu ImageJ.

Nejdříve si pomocí módu File a nabídky New otevřeme příslušnou fotografii gelu. V dalším kroku převedeme barevnou fotografii na negativ, což provedeme pomocí módu Image a nabídky Type na 8 bit. Poté si následujícím postupem vyznačíme první linii, která obsahuje daný proužek na gelu: Analyze → Gels → Select first lane. Takto označený obdélníček vždy přesouváme na ostatní linie s požadovanými proužky a nastavíme: Analyze → Gels → Select next lane. Zde je důležité, aby byla zachována stejná plocha obdélníčku pro všechny označené linie. Jinak by došlo k ovlivnění výsledných programem vygenerovaných hodnot. Pomocí módu Analyze → Gels → Plot lanes získáme křivky, u kterých si vyznačíme počáteční linie, a po kliknutí na ikonku ve tvaru hůlky (8 ikona zleva na obrázku 11) se nám objeví příslušné plochy, jejichž hodnoty odečteme. Poté pomocí standardu o známé koncentraci a ploch vzorků dopočítáme koncentrace metaloproteináz u jednotlivých pacientů. Jelikož jsme používali u vzorků a standardů stejné ředění 18x, nemusíme výsledné hodnoty dále přepočítávat. Naměřená data byla dále zpracována pomocí programu QC-Expert (Trilobyte, ČR) a tabulkového procesoru Microsoft Excel (73).

8. VÝSLEDKY

Pro vyhodnocení naměřených hodnot proenzymů MMP-2 a MMP-9 u vzorků jsme se rozhodli využít koncentraci standardů 1000 ng/ml proMMP-2 a proMMP-9. V případě, že se u vzorků objevily i aktivní formy MMP-2 a MMP-9, použili jsme pro jejich vyhodnocení standardy proMMP-2 a proMMP-9 s koncentrací 500 ng/ml. U obou případů jsme využili metodu jednoho standardu. Pacientům byl proveden odběr před zavedením stentu (odběr A), 24 hodin po zákroku (odběr B), 48 hodin po zákroku (odběr C) a u pacientů s číslem větším než 40 byl proveden ještě čtvrtý odběr, a to v rozmezí 3, 6 a 12 měsíců (většinou po 3 měsících) po implantaci stentu (odběr D). U několika pacientů se nicméně všechny výše uvedené odběry nepodařilo provést. Níže uvedený obrázek 12 uvádí příklad zymogramu. Další zymogramy jsou uvedeny v přílohách.



Obrázek 12 - Příklad zymogramu

ST2 – neaktivovaný standard MMP-2 o koncentraci 1000 ng/ml (ST2 1000) a 500 ng/ml (ST2 500);
ST9 – neaktivovaný standard MMP-9 o koncentraci 1000 ng/ml (ST 1000) a 500 ng/ml (ST 500)

Naměřené hodnoty aktivní a neaktivní formy MMP-2 a MMP-9 dvou pacientů, kteří nebyli zařazeni do žádné ze skupin, kvůli akutnímu zhoršení zdravotního stavu uvádí tabulka 7 a 8. V tabulkách jsou zaznamenány také průměry koncentrací jednotlivých enzymů včetně směrodatných odchylek.

Tabulka 7 - Hodnoty proMMP-9 a MMP-9 u pacienta 64 a 76

Skupina	Akutní stav							
	proMMP-9 [ng/ml]				MMP-9 [ng/ml]			
Enzym								
Odběr	A	B	C	D	A	B	C	D
Pacient 64	384,47	948,25	819,89	1090,09	-	-	-	-
Pacient 76	366,94	1879,33	1622,52	612,42	87,60	-	74,96	110,74
Průměr	375,71	1413,79	1221,21	851,25	87,60	-	74,96	110,74
Směrodatná odchylka	12,40	658,37	567,55	337,76	-	-	-	-

Tabulka 8 - Hodnoty proMMP-2 a MMP-2 u pacienta 64 a 76

Skupina	Akutní stav							
	proMMP-2 [ng/ml]				MMP-2 [ng/ml]			
Enzym								
Odběr	A	B	C	D	A	B	C	D
Pacient 64	1216,25	1457,84	1575,28	1591,11	-	-	-	-
Pacient 76	1867,73	1924,35	1323,88	1224,86	-	-	208,71	188,30
Průměr	1541,99	1691,10	1449,58	1407,98	-	-	208,71	188,30
Směrodatná odchylka	460,67	329,87	177,77	258,98	-	-	-	-

Tabulka 9 a 10 uvádí naměřené hodnoty aktivní a neaktivní formy MMP-2 a MMP-9 ve vzorcích pacientů, kteří přišli na dokončení revaskulizace po akutní ICHS (STEMI, NSTEMI). V tabulkách jsou zaznamenány také průměry koncentrací jednotlivých enzymů včetně směrodatných odchylek.

Tabulka 9 - Hodnoty proMMP-9 a MMP-9 skupiny pacientů – dokončení revaskulizace po akutní ICHS

Skupina	DR po akutní ICHS							
	proMMP-9 [ng/ml]				MMP-9 [ng/ml]			
Enzym	A	B	C	D	A	B	C	D
Odběr	A	B	C	D	A	B	C	D
Pacient 29	1367,85	1266,38	1447,67	-	-	-	-	-
Pacient 30	418,84	1303,77	1391,97	-	-	-	-	-
Pacient 33	1675,25	2128,21	2020,64	-	-	-	-	-
Pacient 34	1330,10	1090,79	1295,56	-	-	45,26	39,34	-
Pacient 35	1152,72	1321,90	1110,79	-	-	-	-	-
Pacient 36	1479,34	1762,52	1496,11	-	-	-	-	-
Pacient 37	1797,53	1820,87	1876,17	-	-	-	-	-
Pacient 39	1150,83	1189,56	1410,43	-	-	-	-	-
Pacient 43	454,49	1369,09	1060,64	781,27	23,02	40,42	31,20	13,57
Pacient 51	692,01	1195,27	1074,53	935,81	-	-	-	-
Pacient 52	435,79	854,43	1050,36	826,07	79,18	83,98	83,90	59,84
Pacient 56	143,06	548,01	586,75	682,59	-	-	-	-
Pacient 57	661,39	797,45	512,19	859,99	-	-	-	-
Pacient 59	735,09	1407,27	1322,87	1694,90	121,82	77,89	100,27	150,77
Pacient 60	1311,63	1676,55	1791,76	1196,96	-	-	-	-
Pacient 61	573,03	1061,80	979,32	1176,51	-	-	-	-
Pacient 63	1047,39	1263,45	1792,65	1502,32	-	-	-	-
Pacient 65	250,83	487,16	221,95	800,09	-	-	-	-
Pacient 66	1085,23	1435,89	1615,54	1664,40	-	-	-	-
Pacient 69	241,44	805,04	903,57	786,52	163,63	74,08	92,63	73,68
Pacient 71	1318,86	1407,79	1461,79	1304,98	-	-	-	-
Pacient 72	946,57	1579,53	1548,18	1345,01	-	-	-	-
Průměr	921,33	1262,40	1271,43	1111,24	96,91	64,33	69,47	74,46
Směrodatná odchylka	486,67	405,63	454,84	347,90	60,13	20,00	31,88	56,99

Tabulka 10 - Hodnoty proMMP-2 a MMP-2 skupiny pacientů – dokončení revaskulizace po akutní ICHS

Skupina	DR po akutní ICHS							
	Enzym	proMMP-2 [ng/ml]				MMP-2 [ng/ml]		
Odběr	A	B	C	D	A	B	C	D
Pacient 29	3117,07	3428,95	3402,04	-	-	-	-	-
Pacient 30	876,76	921,47	851,20	-	184,16	190,59	118,53	-
Pacient 33	2462,69	836,98	953,56	-	317,31	268,34	152,53	-
Pacient 34	2326,04	1772,98	1851,77	-	-	-	-	-
Pacient 35	1022,49	1135,41	1090,33	-	78,34	-	-	-
Pacient 36	734,72	815,21	808,94	-	345,19	346,94	270,43	-
Pacient 37	649,01	849,19	995,92	-	135,99	-	-	-
Pacient 39	923,63	794,60	853,74	-	328,99	203,04	194,73	-
Pacient 43	1724,80	1773,32	1606,61	1268,46	-	-	-	-
Pacient 51	1911,51	2002,54	2102,23	1853,11	-	-	-	-
Pacient 52	836,35	862,55	1073,29	1008,69	236,11	190,91	148,45	-
Pacient 56	1608,16	1325,54	1411,88	1155,96	-	-	-	-
Pacient 57	1521,80	1913,47	1479,67	1400,80	-	-	-	-
Pacient 59	2171,34	2464,21	2402,50	2585,18	-	-	-	-
Pacient 60	870,19	887,61	931,54	681,97	-	-	-	-
Pacient 61	1100,54	1289,40	1425,66	1359,98	-	-	-	-
Pacient 63	1242,92	898,10	1147,53	1015,80	-	-	-	-
Pacient 65	951,01	1438,01	1415,65	1359,11	-	-	-	-
Pacient 66	1322,96	1492,71	1563,16	1416,64	-	-	-	-
Pacient 69	1270,24	1213,53	1305,09	1336,89	-	-	-	-
Pacient 71	1644,12	1782,86	1746,28	1651,10	-	-	-	-
Pacient 72	1176,64	1422,73	1401,88	1263,02	-	-	-	-
Průměr	1430,23	1423,70	1446,38	1382,62	232,30	239,96	176,93	-
Směrodatná odchylka	641,12	646,71	604,19	446,20	103,79	67,92	58,90	-

Tabulka 11 uvádí naměřené hodnoty aktivní a neaktivní formy MMP-9 ve vzorcích pacientů, kteří přišli na dokončení revaskulizace po chronické ICHS (SAP). V tabulce jsou zaznamenané také průměry koncentrací jednotlivých enzymů včetně směrodatných odchylek.

Tabulka 11 - Hodnoty proMMP-9 a MMP-9 u skupiny pacientů – dokončení revaskularizace po chronické ICHS

Skupina	DR po chronické ICHS							
	proMMP-9 [ng/ml]				MMP-9 [ng/ml]			
Enzym								
Odběr	A	B	C	D	A	B	C	D
Pacient 40	1059,26	1001,80	1271,98	-	-	-	-	-
Pacient 44	821,47	1258,54	1275,20	-	-	-	-	-
Pacient 58	1008,00	1463,62	1175,15	1096,80	71,28	79,99	75,22	80,60
Pacient 67	891,04	-	-	1330,45	-	-	-	-
Pacient 75	1747,01	1617,51	1789,97	1720,26	-	43,11	-	-
Pacient 77	936,71	1693,67	1891,62	1764,29	63,47	110,12	140,58	87,21
Průměr	1077,25	1407,03	1480,78	1477,95	67,38	77,74	107,90	83,91
Směrodatná odchylka	338,69	281,04	333,04	320,28	5,53	33,56	46,21	4,67

Tabulka 12 uvádí naměřené hodnoty neaktivní formy MMP-2 ve vzorcích pacientů, kteří přišli na dokončení revaskulizace po chronické ICHS (SAP). Aktivní forma MMP-2 nebyla u žádného pacienta detekována. V tabulce jsou zaznamenány také hodnoty mediánu koncentrací jednotlivých enzymů a také hodnoty 25- a 75-percentilu. Medián jsme místo průměru zvolili z důvodu výskytu odlehlých hodnot.

Tabulka 12 - Hodnoty proMMP-2 u skupiny pacientů – dokončení revaskularizace po chronické ICHS

Skupina	DR po chronické ICHS			
	proMMP-2 [ng/ml]			
Enzym				
Odběr	A	B	C	D
Pacient 40	1958,46	1656,62	1426,41	-
Pacient 44	2602,78	3195,99	2915,92	-
Pacient 58	2436,90	2548,71	2354,30	2243,28
Pacient 67	1421,73	-	-	1209,04
Pacient 75	1325,85	1346,82	1294,41	1112,58
Pacient 77	1264,85	1297,37	1246,99	1062,63
Medián	1690,10	1656,62	1426,41	1160,81
25-percentil	1310,60	1322,10	1270,70	1075,12
75-percentil	2478,37	2872,35	2635,11	1984,72

Tabulka 13 a 14 uvádí naměřené hodnoty aktivní a neaktivní formy MMP-2 a MMP-9 ve vzorcích pacientů, u kterých došlo ke zhoršení SAP, tedy chronické ICHS. V tabulkách jsou zaznamenány také průměry koncentrací jednotlivých enzymů včetně směrodatných odchylek.

Tabulka 13 - Hodnoty proMMP-9 a MMP-9 u skupiny pacientů s chronickou ICHS

Skupina	Chronická ICHS							
	proMMP-9 [ng/ml]				MMP-9 [ng/ml]			
Enzym								
Odběr	A	B	C	D	A	B	C	D
Pacient 31	835,52	1646,57	1417,58	-	-	-	-	-
Pacient 32	1434,18	1892,51	1774,32	-	-	-	-	-
Pacient 50	765,19	1024,77	1326,21	978,15	-	-	-	28,72
Pacient 53	787,84	1197,61	1018,26	1047,97	105,13	112,29	71,75	87,97
Pacient 54	1032,59	899,04	906,30	1302,79	64,35	41,03	45,01	68,54
Pacient 55	209,88	948,23	862,92	836,13	47,37	39,43	37,53	71,76
Pacient 62	571,32	1445,72	1292,79	1265,88	-	-	-	-
Pacient 68	478,40	1495,16	1017,81	1146,87	-	-	-	-
Pacient 70	135,04	917,80	1181,26	1287,46	101,92	-	-	-
Pacient 73	1426,12	1325,98	747,03	979,04	-	-	-	-
Pacient 74	562,95	1279,60	1154,37	1372,96	-	-	94,41	-
Průměr	749,00	1279,36	1154,44	1135,25	79,69	64,25	62,17	64,25
Směrodatná odchylka	427,16	323,07	292,00	184,09	28,41	41,61	26,03	25,17

Tabulka 14 - Hodnoty proMMP-2 a MMP-2 u skupiny pacientů s chronickou ICHS

Skupina	Chronická ICHS							
	proMMP-2 [ng/ml]				MMP-2 [ng/ml]			
Enzym								
Odběr	A	B	C	D	A	B	C	D
Pacient 31	799,98	1010,24	716,66	-	-	-	-	-
Pacient 32	800,46	617,11	556,87	-	370,89	272,37	222,16	-
Pacient 50	1501,28	1529,91	1446,50	1405,27	-	-	-	-
Pacient 53	1669,54	1732,33	1383,35	1407,49	-	-	-	-
Pacient 54	1537,20	1151,65	1204,71	1190,22	-	-	-	-
Pacient 55	1153,92	1003,49	1106,31	1015,29	-	-	-	-
Pacient 62	1173,31	1227,48	1127,77	1173,00	-	-	-	-
Pacient 68	1287,42	1532,77	1409,16	1278,24	-	-	-	-
Pacient 70	2082,97	2116,29	1370,03	2132,54	-	-	-	-
Pacient 73	1248,81	1236,65	1138,07	1271,08	-	-	-	-
Pacient 74	1553,59	1400,94	1456,46	1522,00	-	-	-	-
Průměr	1346,23	1323,53	1174,17	1377,24	370,89	272,37	222,16	-
Směrodatná odchylka	377,75	404,21	298,42	320,53	-	-	-	-

Dále jsme u naměřených hodnot zkoumali, zda jsou zjevné rozdíly mezi hladinami proMMP-2 a proMMP-9 v různých časech odběru. Rozdíly v dynamice hladin mezi aktivními formami MMP-2 a MMP-9 nebyly statisticky významné, a proto je zde neuvádíme. Rovněž nebyly statisticky významné ani hladiny proMMP-2 a proto je zde také neuvádíme. U neaktivní formy MMP-9 už však byly patrné rozdíly v koncentracích. tabulka 15 udává výsledky Studentova t-testu pro hodnoty proMMP-9 v různých časech odběru na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Hodnoty, jež jsou statisticky významné jsou zobrazeny červeně.

Tabulka 15 - T-test významnosti či nevýznamnosti proMMP-9 v různých časech odběru

Odběry	A x B	A x C	A x D	B x D	C x D
DR po akutní ICHS	0,01543	0,01787	0,21417	0,25833	0,26928
DR po chronické ICHS	0,11725	0,07877	0,09836	0,73362	0,99007
Chronická ICHS	0,00371	0,01717	0,02147	0,25092	0,86623

Dále jsme porovnávali naměřené hodnoty proMMP-9 a proMMP-2 v jednotlivých odběrech mezi skupinami pacientů. Tabulka a udává výsledky Studentova t-testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 16 - T-test významnosti či nevýznamnosti hladin proMMP-9 u jednotlivých skupin pacientů

proMMP-9	DR po akutní ICHS x DR po chronické ICHS	DR po akutní ICHS x Chronická ICHS	DR po chronické ICHS x Chronická ICHS
Odběr A	0,47017	0,32672	0,12660
Odběr B	0,45929	0,90479	0,46013
Odběr C	0,34351	0,44495	0,06668
Odběr D	0,07754	0,85144	0,03025

Tabulka 17 - T-test významnosti či nevýznamnosti hladin proMMP-2 u jednotlivých skupin pacientů

proMMP-2	DR po akutní ICHS x DR po chronické ICHS	DR po akutní ICHS x Chronická ICHS	DR po chronické ICHS x Chronická ICHS
Odběr A	0,17541	0,69238	0,05283
Odběr B	0,09448	0,64310	0,03980
Odběr C	0,21009	0,09314	0,11488
Odběr D	0,92856	0,97349	0,90422

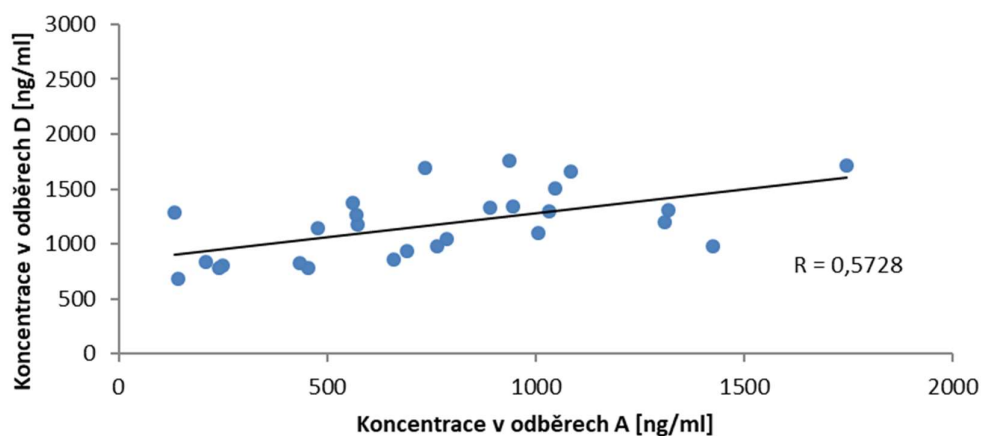
Provedli jsme také korelační analýzu pro zjištění možných vztahů mezi koncentracemi proMMP-2 a proMMP-9 v jednotlivých odběrech napříč všemi skupinami pacientů. Pro prokázání možné závislosti mezi odběry A a D a odběry B a D byly zjištěny Pearsonovy korelační koeficienty, které jsou uvedeny v tabulce 18. Jako statisticky významné se prokázaly všechny níže uvedené hodnoty a proto jsou vyznačeny červeně.

Tabulka 18 - Korelační závislost proMMP-2 a proMMP-9 v odběrech A a D, B a D

Odběr	A a D	B a D
MMP-2	0,847423	0,909047
MMP-9	0,572833	0,647107

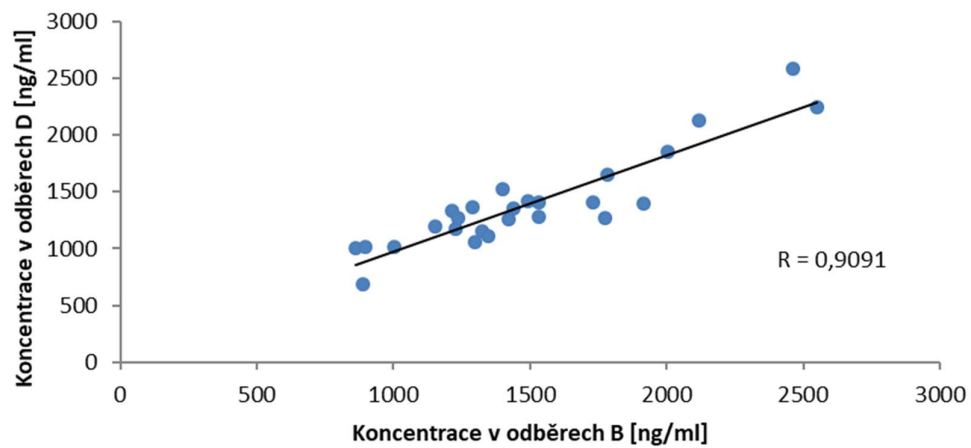
Na obrázku 13 je pak uveden příklad korelační závislosti hodnot proMMP-9 v odběrech A a D napříč skupinami pacientů. Kritická hodnota na hladině významnosti $\alpha = 0,01$ pro $n = 27$ odpovídá hodnotě 0,4915. Na obrázku 14 je uveden příklad korelační závislosti hodnot proMMP-2 v odběrech B a D napříč skupinami. Kritická hodnota na hladině významnosti $\alpha = 0,01$ pro $n = 26$ odpovídá hodnotě 0,5002.

Korelace proMMP-9 v odběrech A a D napříč skupinami



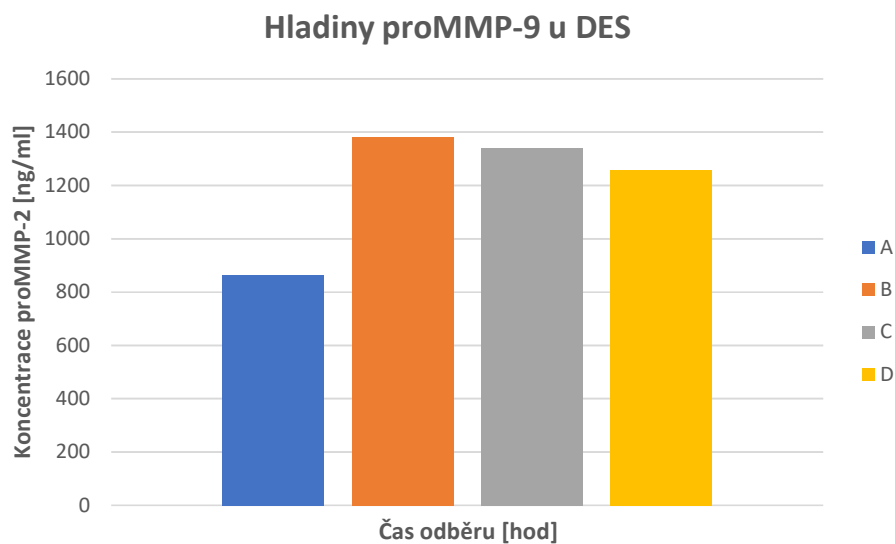
Obrázek 13 - Korelace proMMP-9 v odběrech A a D napříč skupinami pacientů

Korelace proMMP-2 v odběrech B a D napříč skupinami

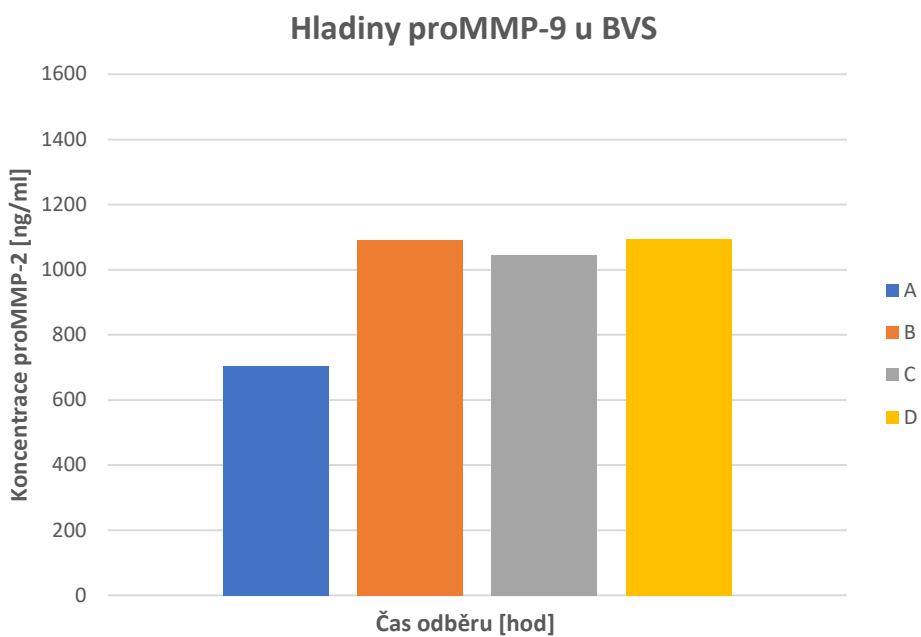


Obrázek 14 - Korelace proMMP-2 v odběrech B a D napříč skupinami pacientů

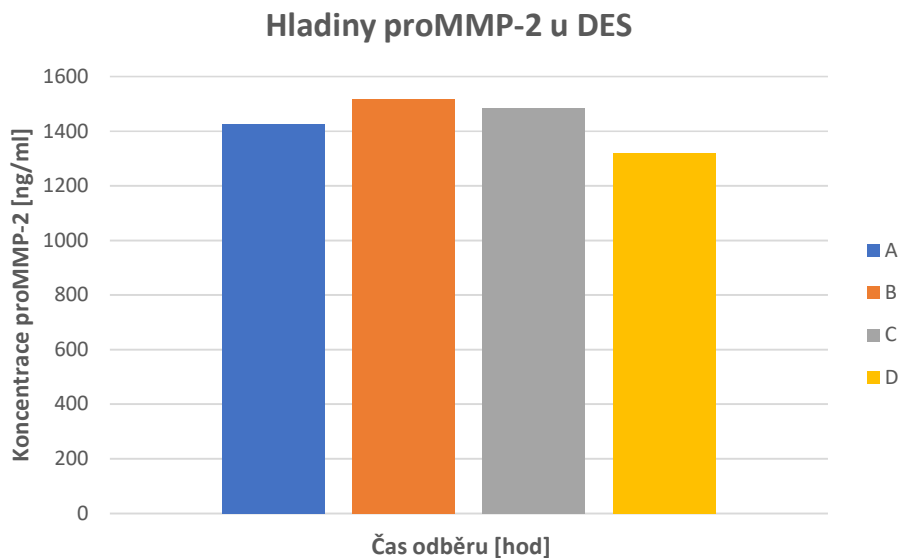
Na následujících obrázcích 15–18 jsou zobrazeny průměrné hodnoty koncentrací proMMP-9 a proMMP-2 jednotlivých pacientů, kterým byl během PCI implantován buď DES anebo BVS.



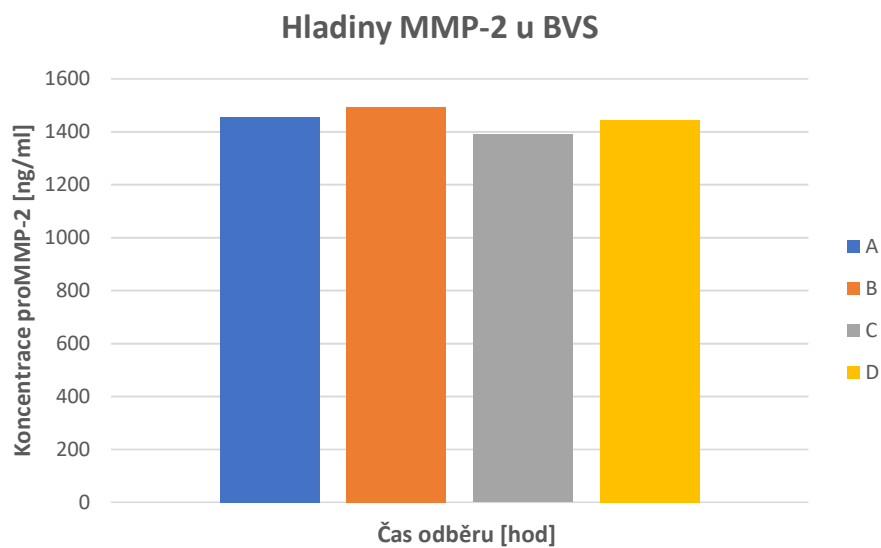
Obrázek 15 - Průměrné hladiny proMMP-9 u pacientů s DES



Obrázek 16 - Průměrné hladiny proMMP-9 u pacientů s BVS



Obrázek 17 - Průměrné hladiny proMMP-2 u pacientů s DES



Obrázek 18 - Průměrné hladiny proMMP-2 u pacientů s BVS

Následující tabulka 19 udává výsledky Studentova t-testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ v porovnání všech pacientů, kterým byly implantovány DES a BVS. Hodnota, která je statisticky významná je zvýrazněna červeně

Tabulka 19 - T-test významnosti či nevýznamnosti proMMP-2 a proMMP-9 u pacientů s implantovaným DES vs. BVS

Odběr	A	B	C	D
proMMP-2	0,44199	0,85601	0,91428	0,60611
proMMP-9	0,29445	0,02418	0,05305	0,18574

9. DISKUSE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo stanovit hladinu MMP-2 a MMP-9 metodou želatinové zymografie u pacientů s ICHS, kteří podstoupili implantaci stentů metodou PCI. Tito pacienti byli rozděleni do několika skupin. A to na pacienty, kteří podstoupili PCI v důsledku dokončení revaskulizace po akutní ICHS (STEMI, NSTEMI), dále na skupinu pacientů, kteří podstoupili PCI v rámci dokončení revaskulizace po chronické ICHS (SAP) a na skupinu pacientů, u kterých došlo ke zhoršení chronické formy ICHS, tedy bez předchozí revaskulizace (neměli žádné implantované stenty). Předchozími diplomovými pracemi již bylo potvrzeno, že tato metoda je vhodná pro účely proběhlé studie ve spolupráci s Interní klinikou – Kardiologického oddělení se sídlem v Pardubicích (Nemocnice Pardubického kraje, a.s.). Tato dlouhodobě probíhající studie byla rozdělena na dvě části. V první části se zabývala především krátkodobým sledováním dynamiky hladin MMP-2 a MMP-9 u pacientů po implantaci koronárních stentů, o čemž pojednává také předchozí diplomová práce z roku 2014 (73). Druhá část studie se zaměřila na dynamiku hladin MMP-2 a MMP-9 i v delším časovém odstupu od implantace stentů, konkrétně na porovnání lékových a vstřebatelných koronárních stentů. Porovnáním hladin MMP-2 a MMP-9 u lékových a vstřebatelných stentů jsme se rozhodli v této diplomové práci rovněž zabývat jako našim dalším cílem.

V návaznosti na diplomovou práci z roku 2014 (73) se ukázalo pro stanovení želatináz metodou želatinové zymografie jako klíčové použít vhodný standard pro MMP-2 a pro MMP-9. Pro stanovení MMP-2 jsme použili stejný standard od dodavatele Merck jako tato předchozí diplomová práce. Dostupná dokumentace uvádí, že tento standard může obsahovat přirozeně se vyskytující dimery (ne více než 10 %), TIMP proteiny (ne více než 10 %) a část enzymu se může během skladování samovolně zaktivovat (ne více než 10 %). Během všech použití standardu nebyly však žádné dimery zaznamenány a obsah aktivní formy MMP-2 nepřevyšoval 10 % a to ani při delším skladování při teplotě -80 °C. Pokud by se obsah aktivní formy skladováním zvýšil, bylo by lépe provádět aktivaci pomocí APMA a pro vyhodnocení používat aktivní formu enzymu, což by celou metodu velmi komplikovalo a prodlužovalo. Rozhodli jsme se použít pro vyhodnocení obou forem MMP-2 neaktivovaný standard, stejně jako v předchozí diplomové práci, kde bylo navíc zjištěno, že chyba způsobená přítomností aktivní formy enzymu ve standardu je srovnatelná s chybou vznikající při aktivačním postupu.

Jelikož se standard od dodavatele Merck pro stanovení proMMP-2 ukázal jako vhodný, rozhodli jsme se pro stanovení MMP-9 použít standard od stejného dodavatele. I u tohoto standardu dodavatel uvádí, že může obsahovat přirozeně se vyskytující dimery (ne více než

10 %), TIMP proteiny (ne více než 10 %) a rovněž se může část enzymu během skladování samovolně zaktivovat (ne více než 10 %). Při použití nového standardu proMMP-9 jsme zaznamenali výskyt dimerů, který opravdu nepřevyšoval 10 % a naopak jsme nezaznamenali výskyt aktivních forem MMP-9. Vzhledem ke zkušenostem se standardem pro MMP-2 jsme se rozhodli rovněž tento standard neaktivovat pomocí APMA a používat ho v jeho neaktivní formě.

Před každým novým měřením jsme používali čerstvý standard proMMP-2 a proMMP-9, který byl uskladněný při -80 °C. Na základě měření a výsledků z předchozí diplomové práce (73) jsme oba standardy ředili na výslednou koncentraci 1000 ng/ml a také na 500 ng/ml. Rovněž na základě těchto výsledků jsme používali ředění 18x jak pro vzorky, tak i pro standardy. Pro vyhodnocení proenzymů jsme používali standard o vyšší koncentraci a pro vyhodnocení případně vyskytujících se aktivních forem, jsme použili koncentraci nižší.

Všechny vzorky, které jsme měli k dispozici pro stanovení MMP-2 a MMP-9 pro měření v rámci studie, pocházely z Interní kliniky – Kardiologického oddělení se sídlem v Pardubicích (Nemocnice Pardubického kraje, a.s.). Jak již bylo v předchozí diplomové práci popsáno (73), získání těchto vzorků je velmi komplikované. Jelikož se zabýváme sledováním hladin daných MMP v intervalech před zavedením stentu, 24 hodin a 48 hodin po zavedení stentu a nově ještě i v rozmezí 3, 6 a 12 měsíců je sběr vzorku k našemu účelu testování dlouhodobou záležitostí. Je to z toho důvodu, že pacienti po provedení PCI jsou v nemocnici hospitalizováni pouze po dobu 24 hodin a poté jsou propuštěni, pokud nenastanou komplikace. Záleží poté na samotném pacientovi, zda zůstane v nemocnici déle (48 hodin) a poskytne vzorek. Prakticky se tento problém řešil, že pacienti byli po 24 hodinách propuštěni a podepsali souhlas o tom, že se následující den dostaví na odběr (ať už sami nebo s převozem pacienta pomocí sanitky). Odběr D se prováděl většinou v rámci kontroly pacienta po PCI. Bohužel se tento odběr neprováděl ve stejném časovém intervalu u všech pacientů.

Tato studie byla uzavřena na malém zkoumaném souboru pacientů, a proto i z důvodu výše popsaných komplikací se sbíráním vzorků, jsou získané výsledky pouze orientační.

Pacienti byli rozděleni do několika skupin. První skupinu tvořili pacienti, kteří přišli do nemocnice pro dokončení revaskulizace po akutní ICHS (DR po akutní ICHS). Druhou skupinu pak tvořili pacienti, kteří přišli do nemocnice pro dokončení revaskulizace po chronické ICHS (DR po chronické ICHS). Třetí skupinu tvořili pacienti, kterým se zhoršila chronická forma ICHS, ale nejedná se o revaskulizaci (Chronická ICHS). Dva pacienty, které nelze zařadit do žádné z výše uvedených skupin, jsme zařadili do samostatné skupiny akutní zhoršení obtíží. Pacienti se ve skupinách významně nelišili v BMI, věku, kouření a Diabetes mellitus nebo léčbě

hypertenze, což je uvedeno v tabulce 3. Jediným, v čem se tyto skupiny statisticky významně lišily, byla léčba statiny před zákrokem, a to ve skupině pacientů DR po chronické ICHS a skupinou s chronickou ICHS, kde hodnota P Studentova T-testu byla na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ rovna 0,02353.

Porovnáme-li dynamiku MMP-2 a MMP-9 mezi jednotlivými časy odběru, tak významné je porovnání hladin proMMP-9 v odběru A a B a také mezi odběrem A a C u pacientů DR po akutní ICHS. MMP-2 není statisticky významná. Statistické významnosti se přibližuje i porovnání odběru A a C u proMMP-9 a také MMP-9 mezi A a D ve skupině DR po chronické ICHS. MMP-2 není u této skupiny statisticky významná. U skupiny pacientů s chronickou ICHS je významné porovnání hladin proMMP-9 v odběrech A a B, A a C a také v porovnání odběrů A a D. MMP-2 není u této skupiny statisticky významná. Je tedy zřejmé, že po provedení PCI dochází k významnému zvýšení hladin proMMP-9 a ve většině případů i proMMP-2 v porovnání s počátečními hodnotami těchto proenzymů před zákrokem, což je v souladu s dostupnou literaturou a také diplomovou prací z roku 2014. V literatuře se uvádí že zvýšené hladiny proMMP-2 a proMMP-9 po zákroku by mohly být ukazatelem vzniku pozdější restenózy (73; 74)R. Studie z roku 2017 (Jae Young Cho) uvedla, že zkoumaných biomarkerů byly pouze zvýšené hladiny proMMP-2 spojené s restenózou a to u pacientů s AKS (75).

Při rozdělení pacientů na jednotlivé skupiny a porovnání koncentrací proMMP-2 a proMMP-9 v jednotlivých odběrech napříč těmito skupinami, nám vyšly dva signifikantní rozdíly. A to v odběru D u proMMP-9 v porovnání skupiny pacientů DR po chronické ICHS a skupiny s chronickou ICHS a ve druhém případě to bylo v porovnání stejných dvou skupin, ale u proMMP-2 v odběru B. Skupina pacientů DR po chronické ICHS je velmi malá. Naměřené hodnoty zejména proMMP-2 byly u několika pacientů velmi vysoké, což jsme si i přes veškerou snahu nedokázali vysvětlit, a i z toho důvodu jsme byli nuceni použít ve výsledcích medián místo průměru. Nelze tedy těmto rozdílům přiřkládat velký význam a vyvozovat z toho závěry.

Oproti předchozí diplomové práci se nám povedlo zachytit aktivní MMP-2. Aktivní MMP-2 (62 kDa) jsou zobrazeny v příloze C. Záchyt aktivní formy MMP-2 je pravděpodobně způsoben jinou skladbou pacientů. Z naměřených dat vyplývá, že pokud jsou aktivní MMP-2 u pacientů zachyceny, tak ve většině případů jejich hodnoty v čase klesají a v odběru D již žádné aktivní MMP-2 nebyly zachyceny ani u jednoho z pacientů. V porovnání s aktivními MMP-9, jsou aktivní MMP-2 na gelech více zářivé a některých gelech je patrné i to, že příliš zářivé a silné proužky neaktivní MMP-2 překrývají i oblast výskytu aktivních MMP-2 a tudíž nemusí být ve většině případů od sebe rozeznatelné. Aktivní formu MMP-9 s molekulovou hmotností 65 kDa se nám rovněž nepodařilo zachytit. Vzhledem i k dostupné literatuře, kde se nepodařilo

doposud ve vzorcích pacientů tuto aktivní formu detekovat, se domníváme, že se skutečně jedná spíše o aktivní MMP-2 než 65 kDa aktivní MMP-9, jejichž molekulové hmotnosti jsou si velmi blízké (60). Ve vzorcích našich pacientů se nám podařilo zachytit aktivní MMP-9 o molekulové hmotnosti 82 kDa, jak je vidět v příloze C a D. Nicméně kvantifikace této aktivní formy MMP-9 je velmi obtížná vzhledem k velmi nízkým koncentracím, které jsme detekovali. V dostupné literatuře se přiklání i k názoru, že metoda želatinové zymografie je vhodné spíše pro neaktivní formy těchto enzymů (76). Ve většině případů byly detekované aktivní MMP-9 v mnohem menších koncentracích než detekované aktivní MMP-2. Oproti aktivním MMP-2 se nám aktivní MMP-9 podařilo zachytit i v odběrech D. Avšak dynamika aktivní MMP-9 není jednoznačná a vzhledem k malému počtu pacientů, u kterých tato forma byla detekována, nelze jejím hodnotám přiřkládat velký význam.

Zajímavým zjištěním je statisticky významná korelace mezi odběry A a D a také mezi B a D napříč všemi skupinami pacientů. Lze tedy říci, že hladiny proMMP-9 i proMMP-2 statisticky významně korelují, pokud porovnáme hodnoty v odběru A a hodnoty v odběru D, který byl proveden s časovým odstupem 3-12 měsíců. Korelace je ještě významnější, porovnáme-li hodnoty v odběru B a hodnoty v odběru D. Zdá se tedy, že vzhledem k hodnotám proMMP-2 a proMMP-9 bude dlouhodobější prognóza pacienta záviset jak na jeho zdravotním stavu před zákrokem, tak i 24 hodin po něm.

Pacienty jsme si také rozdělili na skupiny podle typu implantovaného stentu během PCI. Toto rozdělení pacientů uvádí tabulka 4. Pacienti se významně nelišili v BMI, věku, kouření, předchozí léčbě statiny, Diabetes mellitus nebo léčbě hypertenze. Na obrázcích 15-18, které jsou zobrazeny ve výsledcích je patrný jistý rozdíl v dynamice želatináz, porovnáme-li skupinu pacientů, kterým byl během PCI implantován DES a těm, kterým byl implantován BVS. Z obrázku A je patrné, že průměrná hladina proMMP-9 u pacientů s DES je vyšší v odběru B než v odběru B u pacientů s BVS, což potvrzuje i statisticky významný výsledek Studentova t-testu, který dokládá tabulka 19. Nicméně tato hladina proMMP-9 poté pozvolna klesá u pacientů s DES. Naopak u pacientů s implantovaným BVS se hladina proMMP-9 drží na poměrně vysoké hladině a oproti odběru C, který byl prováděn po 48 hodinách, je její hladina v odběru D naopak vyšší. Co se týče proMMP-2, tak oproti proMMP-9 nejsou rozdíly v odběrech B nijak signifikantní, což rovněž potvrzuje i výsledek Studentova t-testu (tabulka 19). Zajímavé je, že i proMMP-2 jsou vyšší v odběru D u pacientů s BVS oproti pacientům s implantovaným DES, což je zobrazeno na obrázcích 17 a 18.

Toto významné zvýšení proMMP-2 a proMMP-9 po 24 hodinách u pacientů s DES a následný pokles se shoduje s dostupnou literaturou a je pravděpodobně spojené s rozvojem ISR

po implantaci DES (68; 77; 78). Zda mají vysoké hladiny proMMP-2 a proMMP-9 vliv na rozvoj restenózy u pacientů s ICHS, kterým byl implantován BVS, není v dostupné literatuře zatím dohledatelné. Co však je dohledatelné u pacientů léčených pomocí PCI je fakt, že BVS jsou spojené se vznikem trombózy (77). Častěji dochází ke vzniku tzv. velmi pozdní trombózy stentu nejdříve rok po implantaci BVS (15; 20; 77). Mnohem závažnějším problémem ale jsou případy pacientů, u kterých došlo k rozvoji, tzv. subakutní trombózy. Mezi námi testovanými pacienty došlo u dvou z nich k subakutní trombóze BVS stentu. V prvním případě to bylo do druhého dne od implantace stentu a ve druhém za 4 dny. U dalších třech pacientů po implantaci BVS i zhruba po třech měsících přetrvávají poměrně závažné obtíže a někteří byli znovu objednáni k rekonarografii. Pouze u jednoho pacienta s přetrvávajícími závažnými obtížemi byl implantován DES. I z takto malého souboru pacientů se BVS nejeví jako vhodnější varianta DES vzhledem k pozdějším komplikacím.

10. ZÁVĚR

V souladu s dostupnou literaturou a s výsledky předchozí diplomové práce je i za našich výsledků patrné, že léčebná metoda PCI spojená se zavedením koronárního stentu je takovým zásahem do cévní stěny, že významně zvyšuje hladiny MMP-2 i MMP-9 a to jak proenzymů, tak také aktivních forem. Přestože je zkoumaný soubor pacientů malý, je možné říci, že hladiny proMMP-9 i proMMP-2 statisticky významně korelují, pokud porovnáváme hodnoty v odběru před zákrokem a hodnoty v kontrolním odběru s časovým odstupem 3-12 měsíců. Korelace je ještě silnější, pokud porovnáme hodnoty v odběru 24 hodin po zákroku a hodnoty s časovým odstupem. Tedy dlouhodobější prognóza pacienta vzhledem k hodnotám těchto markerů bude záviset na jeho zdravotním stavu před zákrokem, ale i 24 hodin po něm. Vyšší hladina proMMP-9 je dle dostupných literárních informací spojena se zánětlivou reakcí. Vyšší hladina proMMP-2 je spojena spíše se zvýšeným rizikem vzniku trombotického stavu.

Nejzávažnější komplikací léčby pomocí PCI v našem zkoumaném souboru byl vznik subakutní trombózy implantovaného stentu ve dvou případech, který naštěstí ani jeden neskonal úmrtím pacienta. V obou případech se jednalo o testovaný vstřebatelný stent Absorb. Další čtyři pacienti měli při zpětné kontrole neuspokojivý zdravotní stav a byli podrobeni dalším vyšetřením a někteří indikováni k rekonarografii. Ve třech případech šlo o pacienty se vstřebatelným stentem Absorb, v jednom se jednalo o lékový stent. Průměrné hladiny proMMP-2 i proMMP-9 se u pacientů se vstřebatelným stentem v kontrolním odběru, na rozdíl od lékových stentů, zvýšily oproti odběrům 24 hodin a 48 hodin po zákroku. To vše vnáší do širšího využití biodegradabilního stentu Absorb otazníky a bude třeba dalších výsledků studií a patrně i vylepšení tohoto typu stentu či posouzení jeho vhodnosti pro různé pacienty.

11. POUŽITÁ LITERATURA

1. PCI – Perkutánní koronární intervence. *Kardiologie na Bulovce* [online]. Praha: Kardiologie na Bulovce s.r.o., [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <http://www.kardiologie-sro.cz/vysetreni/pci-perkutanni-koronarni-intervence/>
2. Koronární intervence (PCI). *I. interní kardiologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové* [online]. Hradec Králové: Fakultní nemocnice Hradec Králové, 2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/int-1/oddeleni-intervencni-kardiologie/provadene-vykony/koronarni-intervence-pci>
3. Perkutánní koronární intervence (PCI), dříve angioplastika (PTCA). *Kardiologická klinika FN a LF Plzeň* [online]. Plzeň: Fakultní nemocnice Plzeň [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://kard.fnplzen.cz/cs/node/104>
4. INFORMACE PRO PACIENTY - PCI (PERKUTÁNNÍ KORONÁRNÍ INTERVENCE). *Klinika kardiologie IKEM* [online]. Praha: Institut klinické a experimentální medicíny, c2015-2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/UserFiles/article/files/1444913736letak-koronarni-angioplastika.pdf>
5. KMONÍČEK, P. a P. NIEDERLE. *Angioplastika věnčitých tepen a stenty*. 1. Praha: TRITON, 1999. ISBN 80-7254-034-3.
6. VOJÁČEK, J. *Koronární stenty*. 1. Praha: Grada Publishing, 1997. ISBN 80-7169-457-6.
7. COLOMBO, A., G. STANKOVIC a J. MOSES. Selection of coronary stents. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002, 40(6), 1021-1033. ISSN 07351097.
8. BARTŮNĚK, P. a D. JURÁSKOVÁ, J. HECZKOVÁ a kol. *Vybrané kapitoly z intenzivní péče*. 1. Praha: Grada Publishing, 2016. ISBN 978-80-247-4343-1.
9. LEE, P. P., A. CERCHIARI a T. A. DESAI. Nitinol-Based Nanotubular Coatings for the Modulation of Human Vascular Cell Function. *Nano Letters*. 2014, 14(9), 5021-5028. ISSN 1530-6984.
10. VOJÁČEK, J. Jak dále s lékovými stenty (DES)? *Intervenční a akutní kardiologie*. 2006, 5, 239.
11. STEINBERG, D., J. C. TOWNSEND a P. RIDEOUT. Everolimus-eluting stents in interventional cardiology. *Vascular Health and Risk Management*. 2012, 8, 393–405. ISSN 1178-2048.

12. DE WINTER, R. J., KATAGIRI Y., ASANO T. et al. A sirolimus-eluting bioabsorbable polymer-coated stent (MiStent) versus an everolimus-eluting durable polymer stent (Xience) after percutaneous coronary intervention (DESSOLVE III): a randomised, single-blind, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *The Lancet*. 2018, 391(10119), 431-440. ISSN 01406736.
13. ZHANG, Y., Y. ZHAO, B. XU et al. Clinical Impact of Dual Antiplatelet Therapy Use in Patients Following Everolimus-eluting Stent Implantation. *Chinese Medical Journal*. 2015, 128(6), 714-720. ISSN 0366-6999.
14. ŽELÍZKO, M. Biodegradabilní stenty: nejistá budoucnost. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2017, 16(3), 110-112.
15. NOVOTNÝ, V., I. VARVAŘOVSKÝ a J. MATĚJKA. Biodegradabilní stenty – kouzlo pomíjivého?. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2016, 15(3), 127-134.
16. VOJÁČEK, J. Pozdní trombóza stentu-nový, málo častý, ale závažný problém. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2006, 5, 103.
17. ROZSÍVAL, V. *Restenóza v koronárním stentu*. 1. Hradec Králové: Nucleus HK®, 2010. ISBN 978-80-87009-68-0.
18. GIACOPPO, D., G. GARGIULO, P. ARUTA a et al. CAPRANZANO. Treatment strategies for coronary in-stent restenosis: systematic review and hierarchical Bayesian network meta-analysis of 24 randomised trials and 4880 patients. *BMJ*: h5392. 2015, (3515392), 1-17. ISSN 1756-1833.
19. RICHER, D., M. SLUKA a D. VINDIŠ. Intervenční léčba in-stent restenóz dedikovanými „drug coated“ balonky SeQuent® Please (B. Braun Melsungen AG) – 5letý prospektivní registr s koronarografickými kontrolami. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2016, 15(3), 114-118.
20. VARVAŘOVSKÝ, I. Budoucnost vstřebatelných koronárních stentů. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2017, 16(3).
21. PALMERINI, T., A. J. KIRTANE, P. W. SERRUYS et al. Stent Thrombosis With Everolimus-Eluting Stents. *Circulation: Cardiovascular Interventions*. 2012, 5(3), 357-364. ISSN 1941-7640.
22. KOUNIS, N. G., I. KONIARI, A. ROUMELIOTIS et al.. Thrombotic responses to coronary stents, bioresorbable scaffolds and the Kounis hypersensitivity-associated acute thrombotic syndrome. *Journal of Thoracic Disease*. 2017, 9(4), 1155-1164. ISSN 20721439.

23. BUJDÁK, J., I. VARVAŘOVSKÝ, V. NOVOTNÝ a J. MATĚJKA. Velmi pozdní trombóza v biodegradabilním stentu – kazuistika. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2017, 16(3), 113-115.
24. PLÍVA, M. Tříleté klinické výsledky studie ABSORB III. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2018, 17(1), 42-43.
25. BOČEK, P., J. PEŠEK a I. BERNAT. Opakovaná subakutní trombóza ve stentu - smůla?. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2004, 3, 202-204.
26. ZAIN, M.A. a W.J. SIDDIQUI. Coronary Stents. *StatPearls*. 2019, 1-14.
27. MÁLEK, F. a I. MÁLEK. *Srdeční selhání*. 1. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2238-5.
28. HRADEC, J. a S. BÝMA. *Ischemická choroba srdeční*. 1. Praha: Společnost všeobecného lékařství, 2007. ISBN 80-86998-14-2.
29. ŠTEFÁNEK, J. Ischemická choroba srdeční. *Medicína, nemoci, studium na I. LF UK* [online]. Praha, 2011 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/ischemicka-choroba-srdecni>
30. CAMPION, E. W., J. L. ANDERSON a D. A. MORROW. Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*. 2017, 376(21), 2053-2064. ISSN 0028-4793.
31. Náhlá srdeční smrt. *IKEM-Institut klinické a experimentální medicíny* [online]. Praha: Institut klinické a experimentální medicíny, c2015-2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/cs/nahla-srdecni-smrt/a-443/>
32. MIKOLÁŠKOVÁ, M., M. SEPŠI a J. ŠPINAR. Náhlá srdeční smrt. *Kardiologická revue - Interní medicína*. 2015, 17(2), 106-111.
33. ŘEZANINOVÁ, J. *Srovnání intervalového tréninku s posilováním s intervalovým tréninkem bez posilování u pacientů s chronickou ischemickou chorobou srdeční: vývoj hemodynamických parametrů*. Brno, 2008. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Veronika Chludilová.
34. LIEDERMANOVÁ, L. *Ischemická choroba srdeční*. Pardubice, 2014. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta zdravotnických studií. Vedoucí práce Josef Fusek.
35. HRADEC, J., J. BULTAS a M. ŽELÍZKO. Stabilní angina pectoris: Doporučený diagnostický a léčebný postup České kardiologické společnosti. *Cor et Vasa*. 2010, 52(9), 543-561.
36. CHUDÍCOVÁ, A. a P. OŠŤÁDAL. Metabolická léčba stabilní anginy pectoris. *Interní medicína pro praxi*. 2013, 15(6-7), 215-219.

37. SOVOVÁ, E. Stabilní angina pectoris – nové trendy v léčbě. *Interní medicína pro praxi*. 2012, 14(89), 298-302.
38. ŠTEFÁNEK, J. Koronární syndrom X. *Medicína, nemoci a studium na 1. LF UK* [online]. Praha, 2011 [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/?q=koronarni-syndrom-x>
39. ŠPINAROVÁ, M., L. ŠPINAROVÁ a J. ŠPINAR. Klinické klasifikace a skórovací systémy u srdečního selhání. *Kardiologická revue - Interní medicína*. 2015, 17(2), 131-135.
40. MELUZÍN, J., L. ŠPINAROVÁ, L. HOŠKOVÁ et al. Czech Society of Cardiology Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure 2011. *Cor et Vasa*. 2012, 54(3-4), 113-134. ISSN 00108650.
41. ČIHÁK, R. *Anatomie 3. 2*. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN 978-80-247-1132-4.
42. BLAHÚT, P. Cievne zásobenie srdca. *TECHMED* [online]. b.r. [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.techmed.sk/cievne-zasobenie-srdca/>
43. BUSTI, C., E. FALCINELLI a S. MOMI. Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease. *Internal and Emergency Medicine*. 2010, 5(1), 13-25. ISSN 18280447.
44. SPINALE, F. G. Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function. *Physiological Reviews*. 2007, 87(4), 1285-1342. ISSN 00319333.
45. SHAH, P. K. Biomarkers of Plaque Instability. *Current Cardiology Reports*. 2014, 16(12), 5471-8. ISSN 15233782.
46. FONTANA, V., P. S. SILVA, R. F. GERLACH a J. E. TANUS-SANTOS. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clinica Chimica Acta*. 2012, 413(7-8), 656-662. ISSN 00098981.
47. ZÍTKA, O., S. KRÍŽKOVÁ, V. ADAM et al. Utilizing Automated Chip Electrophoresis for Study of Lactoferrin and Matrix Metalloproteinases. *Chemické listy*. 2010, 104(3), 197-201. ISSN 1213-7103.
48. SCHIEFFER, B. Impact of Interleukin-6 on Plaque Development and Morphology in Experimental Atherosclerosis. *Circulation*. 2004, 110(22), 3493-3500. ISSN 00097322.
49. GANDALOVIČOVÁ, J. Nový směr prevence akutních koronárních syndromů: Identifikace a stabilizace vysoce rizikového aterosklerotického plátu. *Interní medicína pro praxi*. 2002, 4(2), 72-77. ISSN 1803-5256.
50. VOJÁČEK, J. F. Regrese koronární aterosklerózy – teorie, fakta a klinická relevance. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2016, 15(4), 179-182.

51. VOJÁČEK, J., M: MATES a V. HRABOŠ. Nové názory na vznik akutního koronárního syndromu. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2003, 2(2), 69-72. ISSN 1213-807X.
52. KNOT, J., M. PĚNIČKA, K. ČURILA a P. WIDIMSKÝ. Akutní koronární syndrom. *Medicína pro praxi*. 2007, 4, 153-155. ISSN 1803-5310.
53. TVEITA, A., O. REKVIG a S. N. ZYKOVA. Glomerular matrix metalloproteinases and their regulators in the pathogenesis of lupus nephritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2008, 10(6), 1-8. ISSN 1478-6354.
54. CHOW, A K, J CENA a R SCHULZ. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *British Journal of Pharmacology*. 2007, 152(2), 189-205. ISSN 00071188.
55. BÄCK, M., D.F.J. KETELHUTH a S. AGEWALL. Matrix Metalloproteinases in Atherothrombosis. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2010, 52(5), 410-428. ISSN 00330620.
56. RICCI, S., V. D'ESPOSITO, F. ORIENTE, P. FORMISANO a A. DI CARLO. Substrate-zymography: a still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2016, 54(8), 1281–1290.
57. YABLUCHANSKIY, A., Y. MA, R. P. IYER et al. Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. *Physiology*. 2013, 28(6), 391-403. ISSN 1548-9213.
58. JOHNSON, J., B. BORN, I. SOLOMONOV et al. Circular trimers of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 constitute a distinct population of functional enzyme molecules differentially regulated by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Biochemical Journal*. 2015, 465(2), 259-270. ISSN 0264-6021.
59. FARINA, A. a A. MACKAY. Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. *Cancers*. 2014, 6(1), 240-296. ISSN 2072-6694.
60. BELLINI, T., A. TRENTINI, M. C. MANFRINATO et al. Matrix metalloproteinase-9 activity detected in body fluids is the result of two different enzyme forms. *Journal of Biochemistry*. 2012, 151(5), 493-499. ISSN 0021-924X.
61. ROSSANO, R., M. LAROCCA a L. RIVIELLO. Heterogeneity of serum gelatinases MMP-2 and MMP-9 isoforms and charge variants. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2014, 18(2), 242-252. ISSN 15821838.
62. JEON, S., S. CHUN a S. CHOI-KWON. Biomarkers and location of atherosclerosis: Matrix metalloproteinase-2 may be related to intracranial atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012, 223(2), 442-447. ISSN 00219150.

63. JOHNSON, J.L. Metalloproteinases in atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology*. 2017, 816(2017), 93-106. ISSN 00142999.
64. RYŠAVÁ, L. *Vztah mezi matrixovými metaloproteinázami a interleukiny-1 a -6 a vznikem akutního koronárního syndromu*. Pardubice, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Pavla Královcová.
65. KALYONCUOGLU, M., Y. YUKSEL a A. OZKAN. Sensitive C-reactive protein, serum amyloid A, and neopterin with angiographic in stent restenosis. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*. 2015, 4(1), 144-151. ISSN 2319-5886.
66. YE, Z.X., H.B. LEU, T.C. WU et al.. Baseline serum matrix metalloproteinase-9 level predicts long-term prognosis after coronary revascularizations in stable coronary artery disease. *Clinical Biochemistry*. 2008, 41(4-5), 292-298. ISSN 00099120
67. KIM, W.H., Y.G. KO a K.W. KANG. Effects of Combination Therapy with Celecoxib and Doxycycline on Neointimal Hyperplasia and Inflammatory Biomarkers in Coronary Artery Disease Patients Treated with Bare Metal Stents. *Yonsei Medical Journal*. 2012, 53(1), 68-75. ISSN 0513-5796.
68. LIU, W., Y. LIU, H. JIANG a Rui ZHU. Plasma Levels of Interleukin 18, Interleukin 10, and Matrix Metalloproteinase-9 and -137G/C Polymorphism of Interleukin 18 Are Associated with Incidence of In-stent Restenosis After Percutaneous Coronary Intervention. *Inflammation*. 2013, 36(5), 1129-1135. ISSN 0360-3997.
69. TAGUCHI, I., S. YONEDA, S. ABE et al. The late-phase inflammatory response after drug-eluting stent implantation. *Heart and Vessels*. 2014, 29(2), 213-219. ISSN 0910-8327.
70. ZHANG, R., F. JIANG a C. Si CHEN. Serum Levels of IL-1 β , IL-6, TGF- β , and MMP-9 in Patients Undergoing Carotid Artery Stenting and Regulation of MMP-9 in a New In Vitro Model of THP-1 Cells Activated by Stenting. *Mediators of Inflammation*. 2015, 2015, 1-12. ISSN 0962-9351.
71. JONES, G. T., I. P. KAY a J.W.S. CHU. Elevated Plasma Active Matrix Metalloproteinase-9 Level Is Associated With Coronary Artery In-Stent Restenosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006, 26(7), 121-125. ISSN 1079-5642.
72. KRUK, M., V. MENON, J. KĄDZIĘLA et al. Impact of percutaneous coronary intervention on biomarker levels in patients in the subacute phase following myocardial

- infarction: the Occluded Artery Trial (OAT) biomarker ancillary study. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2013, 13(1). ISSN 1471-2261.
73. REGULOVÁ, J. *Dynamika vybraných metaloproteinás po zavedení stentu do koronárního řečiště*. Pardubice, 2014. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Pavla Žáková.
74. KATSAROS, K. M., S. P. KASTL a G. ZORN. Increased Restenosis Rate After Implantation of Drug-Eluting Stents in Patients With Elevated Serum Activity of Matrix Metalloproteinase-2 and -9. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2010, 3(1), 90-97. ISSN 19368798.
75. CHO, J. Y. Identification of Risk Factors Influencing In-Stent Restenosis with Acute Coronary Syndrome Presentation. *Chonnam Medical Journal*. 2017, 53(3), 203-210. ISSN 2233-7385.
76. HAWKINS, K. E., K. M. DEMARS a C. YANG. Fluorometric immunocapture assay for the specific measurement of matrix metalloproteinase-9 activity in biological samples: application to brain and plasma from rats with ischemic stroke. *Molecular Brain*. 2013, 6(1), 1-11. ISSN 1756-6606.
77. ELABBASSI, W., M. A. CHOWDHURY a R. HATALA. Bioresorbable scaffold technology: The yet unfulfilled promise of becoming the workhorse stent in the cardiac catheterization laboratory. *The Egyptian Heart Journal*. 2018, 70(4), 409-414. ISSN 11102608.
78. IELASI, A., V. PANOULAS, I. MASTORIS, K. KONSTANTINOOU a M. TESPILI. Everolimus-eluting stent platforms in percutaneous coronary intervention: comparative effectiveness and outcomes. *Medical Devices: Evidence and Research*. 2015. ISSN 317-329.
79. ASCHERMANN, M., J. HORÁK a V. ŘEZNÍČEK. Stenty s lokálním uvolňováním léků k prevenci restenózy po koronárních intervencích. *Interní medicína pro praxi*. 2002, (8), 392-395.
80. KOČKA, V. Vstřebatelné koronární stenty - správná myšlenka, která stojí za další úsilí. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2017, 16(3), 2017.
81. MATES, M. Biodegradabilní koronární stenty. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2010, 9(4), 195-197.
82. KÖLBEL, F. Ischemická choroba srdeční – definice, příčiny, klinické formy, význam. 2. lékařská fakulta: Univerzita Karlova [online]. Praha: 2. lékařská fakulta Univerzity

- Karlovy, 1999 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.lf2.cuni.cz/ischemicka-choroba-srdecni-definice-priciny-klinicke-formy-vyznam>
83. Ischemická choroba srdeční - ICHS. *IKEM-Institut klinické a experimentální medicíny* [online]. Praha: Institut klinické a experimentální medicíny, c2015-2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/cs/ischemicka-choroba-srdecni-ichs/a-420/>
84. Ischemická choroba srdeční. *Merck* [online]. Praha: Merck spol. s r.o., 2019 [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://www.medimerck.cz/cz/home/heart/ichs.html>
85. FAROOQ, V., B. D. GOGAS a P. W. SERRUYS. Restenosis. *Circulation: Cardiovascular Interventions*. 2011, 4(2), 195-205. ISSN 1941-7640.
86. KULICZKOWSKI, W., J. URBANIAK, J. HALLÉN et al. Aktywność metaloproteinaz macierzy i ich inhibitorów u pacjentów z zawałem serca z uniesieniem odcinka ST leczonych pierwotną angioplastyką wieńcową. *Kardiologia Polska*. 2013, 71(5), 453-463. ISSN 1897-4279.
87. What is percutaneous coronary intervention (PCI)?. Summit Medical Group [online]. New Jersey, c2014 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: https://www.summitmedicalgroup.com/library/adult_care/pci_dc/
88. PONTRELLI, G. a F. DE MONTE. Modeling of Mass Dynamics in Arterial Drug-Eluting Stents. *Journal of Porous Media*. 2009, 12(1), 19-28. ISSN 1091-028X.
89. Ultimaster® - Drug eluting stent. *TERUMO EUROPE* [online]. Terumo Europe NV, c1971-2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.terumo-europe.com/en-emea/interventional-cardiology/stents/drug-eluting-stent/ultimaster%C2%AE-drug-eluting-stent>
90. Bioresorbable Stents Are the Way of the Future. *Diagnostic and Interventional Cardiology* [online]. Scranton Gillette Communications, 2009 [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://www.dicardiology.com/article/bioresorbable-stents-are-way-future>

12. PŘÍLOHY

Příloha A/část I – Souhlas etické komise

1

Stanovisko Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s. **ze dne 13. 12. 2013 (15.00 h)**

Přítomní: MUDr. Josef Hájek, CSc., MUDr. David Stuchlík, MUDr. Jan Mejzlík, Ph.D.,
Mgr. Jaroslav Procházka, JUDr. Josef Rokos, Mgr. Jana Škvrňáková, Ph.D.,
MUDr. Marek Sychra, MUDr. Petr Formánek, doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc.,
Omluveni: MUDr. Zuzana Kala Grofová, Anna Němcová,

Schůzi zahájil a řídil MUDr. Josef Hájek, CSc.
Sekretářka EK seznámila členy s korespondencí se SÚKL a multicentrickými etickými komisemi za období
25.11.2013 – 13.12.2013.

434/13.12.2013

▪ MUDr. Vojtěch Novotný, lékař kardiologického odd. PKN, a.s., požádal členy EK o souhlas s prováděním studie s názvem „**Zánětlivá odpověď po implantaci absorbovatelných koronárních stentů**“. Studie je zaměřená na sledování zánětlivé reakce, nových markerů oxidačního stresu a dalších biochemických parametrů u pacientů s ischemickou chorobou srdeční a uskuteční se v rámci spolupráce Pardubické krajské nemocnice, a.s., Kardiologického centra Agel, a.s. a Univerzity Pardubice na Kardiologickém oddělení s vědomím a pod dohledem prim. MUDr. Petra Vojtíška, CSc. a MUDr. Iva Varvařovského, Ph.D. Studie nemá komerční charakter a rozšiřuje již probíhající studii, schválenou Etickou komisí při PKN, a.s. dne 11.5.2012. Získaná data využije MUDr. Vojtěch Novotný k sepsání disertační práce v rámci doktorského studijního programu (Ph.D.) na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, školitelem je doc. MUDr. Josef Štásek, Ph.D.

Na studii se budou podílet:

Kardiologické oddělení: prim. MUDr. P. Vojtíšek, CSc., MUDr. V. Novotný

Kardiologické centrum Agel, a.s.: MUDr. I. Varvařovský, Ph.D., MUDr. J. Matějka, Ph.D., MUDr. V.

Rozsíval, CSc., MUDr. V. Novotný.

Oddělení klinické biochemie a diagnostiky: prim. PharmDr. J. Skalický, Ph.D., Mgr. J. Kovařík

Univerzita Pardubice: MUDr. V. Mužáková, Ph.D., Mgr. P. Žáková, Ph.D., Doc. Mgr. R. Kand'ár, Ph.D.

Byly předloženy dokumenty: protokol studie, informovaný souhlas, patientský dotazník, informovaný souhlas s provedením koronarografie /PCI, informace výrobce o stentech.

Členové EK studii po prostudování předložených dokumentů – v souladu s ICH GCP – schválili.

V Pardubicích 13. 12. 2013

Zapsala: Ivana Faiklová

Predběžný termín příští schůze etické komise: **24. 1. 2014**

Etická komise
při Pardubické krajské nemocnici, a.s.
Kýjevká 44
532 03 Pardubice



MUDr. Josef Hájek, CSc.

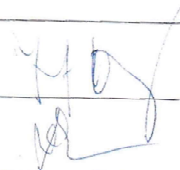
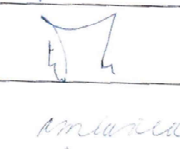
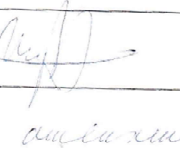
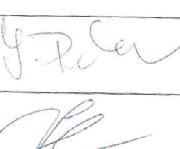
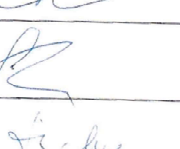
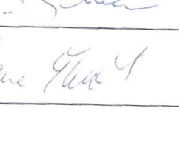
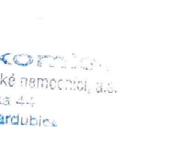



předseda Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.

Příloha A/část II – Souhlas etické komise

Etická komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.
- její složení na schůzi konané

dne 19. 12. 2013

podpis

MUDr. Josef Hájek, CSc. – předseda EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc. – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. Petr Formánek – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. Zuzana Kala Grofová – členka EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. Jan Mejzlík, Ph.D. – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
Anna Němcová zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
Mgr. Jaroslav Procházka – člen EK není zaměstnán v Pardubické krajské nemocnici, a.s.	
JUDr. Josef Rokos – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. David Stuchlík – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. Marek Sychra – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
Mgr. Jana Škvrňáková, Ph.D. není zaměstnána v Pardubické krajské nemocnici, a.s.	

Etická komise
při Pardubické krajské nemocnici, a.s.
Kyjevská 44
532 03 Pardubice

Prohlášení / Declaration

Tímto potvrzují, že Etická komise při Pardubické krajské nemocnici, a.s. postupuje v souladu s principy Správné klinické praxe (ICP GCP), novelizovaným zákonem o léčivech 378/2007 Sb. a novelizovanou vyhláškou o Správné klinické praxi č. 226/2008 Sb., a že vyjádření bylo poskytnuto dostatečným počtem členů EK.

I hereby certify that the ethics committee operates according to ICH GCP guidelines, the Amended Act on Pharmaceuticals No. 378/2007 Coll. and the Amended Decree of Good Clinical Practice No. 226/2008 Coll., and that the notification was provided by a sufficient number of members.

V Pardubicích dne 19. 11. 2013

Etická komise
při Pardubické krajské nemocnici, a.s.
Kyjovská 44
532 03 Pardubice

.....
podpis předsedy/pověřené osoby

Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a.s.

EC Chairman's /Designee's Signature

Příloha B/část I – Informovaný souhlas pro pacienty

INFORMACE PRO ÚČASTNÍKY STUDIE

Vážená paní, vážený pane,

v současné době probíhá na našem pracovišti ve spolupráci s Univerzitou Pardubice výzkumná práce (studie) s názvem „Zánětlivá reakce po implantaci koronárních stentů“.

Tato výzkumná práce je zaměřena na sledování ukazatelů zánětu a oxidačního stresu v krvi pacientů po perkutánní koronární intervenci (PCI) a vyhodnocení jejich významu v závislosti na typu použitého stentu.

V současné době je standardní léčbou ischemické choroby srdeční tzv. perkutánní koronární intervence (PCI), která spočívá v roztažení zúženého místa věnčité tepny speciálním balónkem a jeho následné vyztužení stentem. Stentů je několik typů, nejčastěji jsou používány stenty kovové, jejichž struktura je potažená léčivou látkou, která se postupně uvolňuje a brání následnému opětovnému zužování věnčité tepny v reakci na cizí materiál stentu. Tyto stenty označujeme jako tzv. „lékové stenty“. Nověji jsou dostupné stenty, které jako kostru místo kovu využívají organickou látku (kyselinu polymléčnou), která se v organismu postupně rozkládá, až přibližně po dvou letech z organismu zcela zmizí. Výhodou tohoto typu stentu je možnost navrácení věnčité tepny do stavu blízkého stavu původnímu, tedy se zachovanou schopností reagovat na přirozené podněty k rozšíření či zúžení tepny. Nevýhodou je pak nemožnost zavést tyto stenty do všech typů zúžení, tj. nelze je využít ve všech situacích. Tyto stenty nazýváme „absorbovatelné stenty“ a jsou rovněž potažené výše uvedeným léčivem zabráňujícím opětovnému zúžení tepny.

V předkládané práci budeme srovnávat laboratorní parametry zánětlivé odpovědi na zavedení těchto dvou typů stentů. Předchozí práce prokázaly, že čím vyšší je zánětlivá reakce po výkonu na věnčité tepně, tím vyšší je riziko pozdějších komplikací ve smyslu opětovného zužování věnčité tepny či srdečního infarktu.

K účasti v této výzkumné práci jste byl/a osloven/a vzhledem k tomu, že Váš zdravotní stav vyžaduje ošetření zúžení věnčité tepny stentem a zároveň jde o zúžení tepny, které je vhodné k zavedení obou typů stentů.

V případě, že se rozhodnete pro účast v této výzkumné práci, bude na základě náhodného výběru (tzv. randomizace) zvolen k ošetření zúžení věnčité tepny jeden z výše uvedených typů stentů. Rizika spojená s účastí ve studii se neliší od běžných rizik v souvislosti s PCI a zavedením stentu. Tato rizika jsou podrobně popsána v Informovaném souhlase s provedením koronarografie/PCI, který jste před výkonem podepsal/a.

Zátěž vyplývající ze zařazení do studie spočívá ve třech odběrech 19 ml krve během stávající hospitalizace a ve vyplnění dotazníku, dále v klinické kontrole a odběru krve po jednom roce. Další podrobnosti a informace Vám budou na požádání sděleny.

Vaše účast na této studii je zcela dobrovolná.

Příloha B/část II – Informovaný souhlas pro pacienty

Jméno:

Pořadové číslo:

PÍSEMNÉ PROHLÁŠENÍ O SOUHLASU S ÚČASTÍ VE STUDII

Byl(a) jsem seznámen(a) s povahou studie a souhlasím se zařazením do tohoto výzkumného projektu. Dále souhlasím s tím, že údaje o mé osobě, které byly získány během studie, budou předávány třetím osobám pouze v anonymní formě, tzn. bez uvedení mého jména a identifikačních údajů.

V Pardubicích dne

Podpis (účastníka studie):

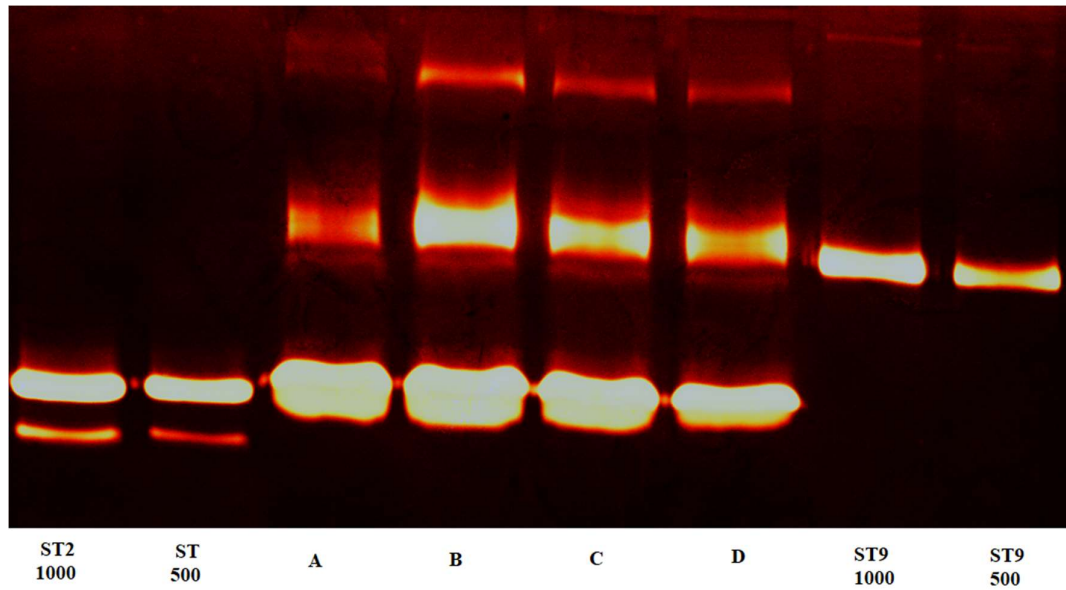
Se získanými osobními údaji bude nakládáno jako s ochraňovanými skutečnostmi a tyto údaje budou využity pouze pro potřeby studie a nebudou sdělovány třetím osobám.

V Pardubicích dne

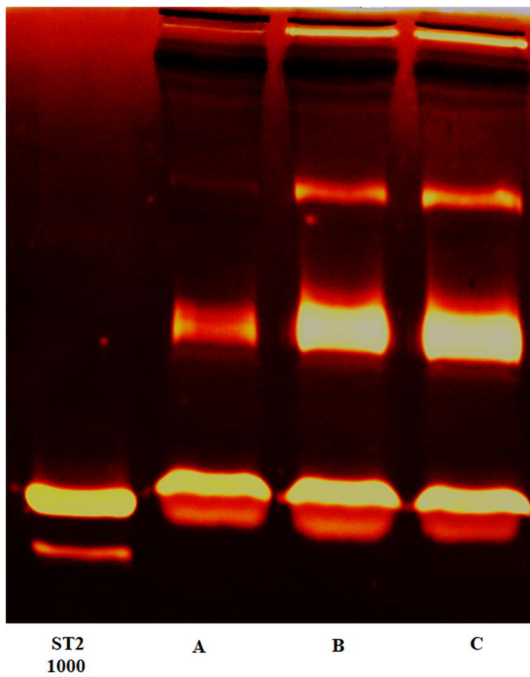
Jméno a podpis (řešitele- studie):

Příloha C – Zymogramy pacientů ze skupiny DR po akutní ICHS

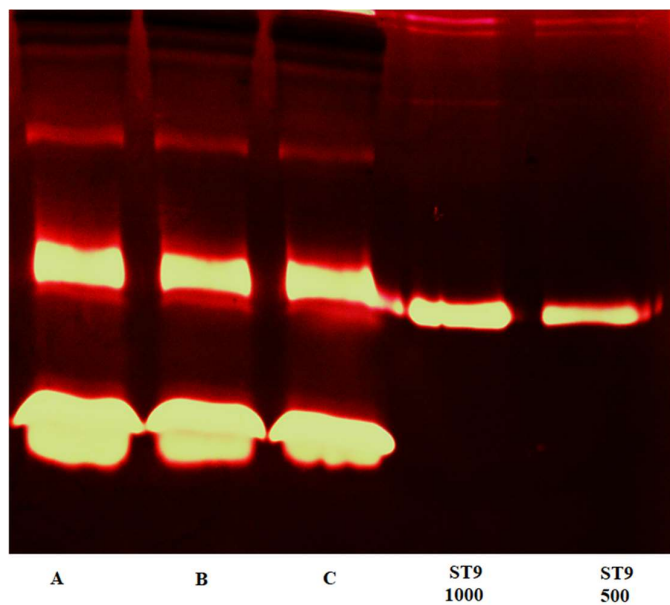
Na tomto zymogramu jsou v odběrech A až D viditelné aktivní MMP-9



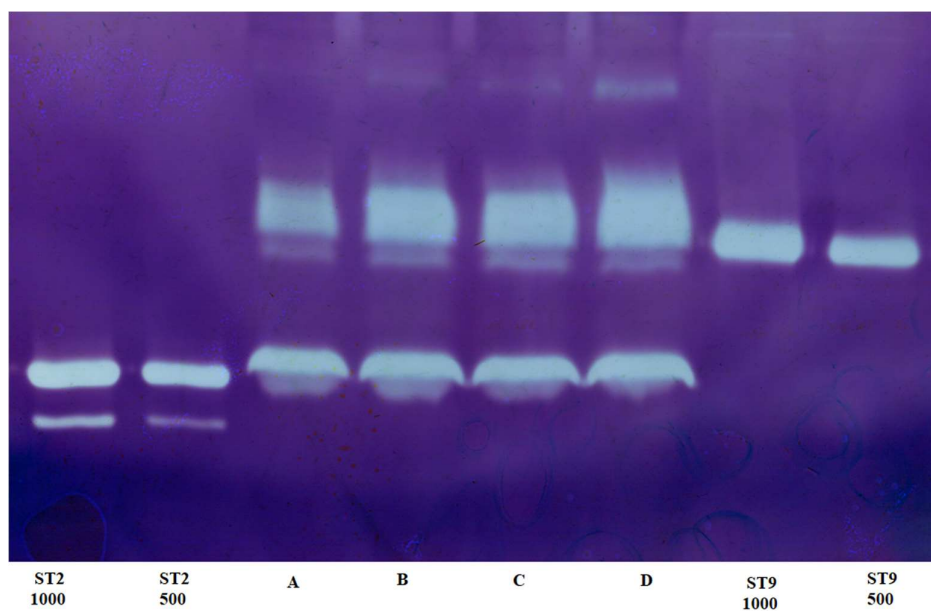
Následující zymogram naopak ukazuje aktivní MMP-2 v odběrech A až C



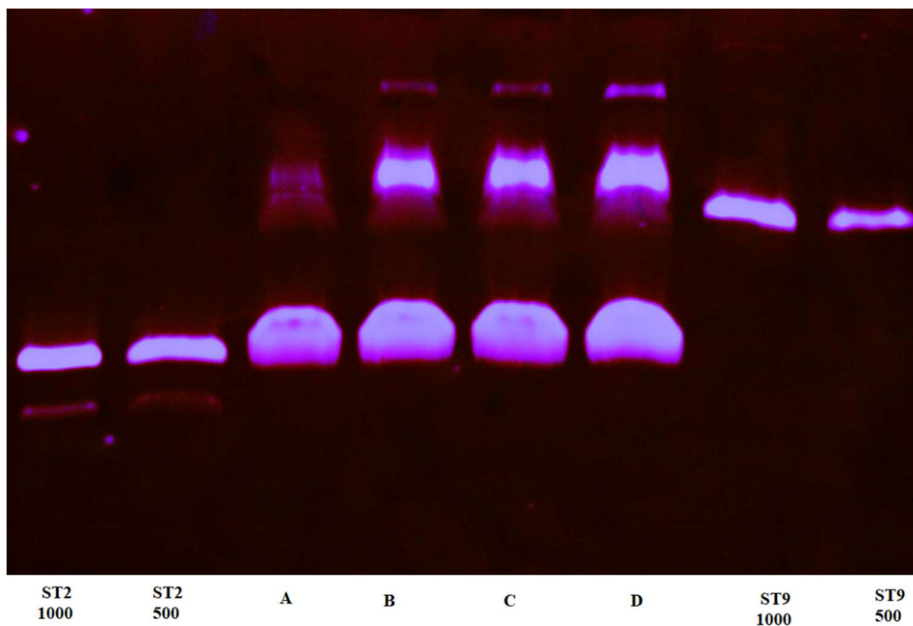
Příloha D – Zymogramy pacientů ze skupiny DR po chronické ICHS



Na zymogramu níže jsou viditelné aktivní MMP-9



Příloha E – Zymogramy pacientů ze skupiny s chronickou ICHS



Na obou gelech jsou celkem výrazně patrné i komplexy MMP

