

Fosfolipáza A₂ viazaná na lipoproteíny a riziko ischemickej cievnej mozgovej príhody

Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and the risk of ischemic stroke

Súhrn

Ciel: Fosfolipáza A₂ viazaná na lipoproteíny (Lp-PLA₂) je enzým kumulujúci sa v aterosklerotickom pláte, ktorý vyvoláva zápal plátu, čo môže viesť k ruptúre plátu. Cieľom práce je porovnať hodnoty sérovej koncentrácie Lp-PLA₂ medzi skupinou zdravých jedincov a skupinami ľudí s arteriálnou hypertenziou (AH), ischemickou chorobou srdca (ICHS) a ischemickou cievnu mozgovou príhodou (iCMP) a tým posúdiť vhodnosť Lp-PLA₂ ako biomarkera rizika iCMP. AH a ICHS srdca sú považované za rizikové faktory iCMP, preto sme sérovú koncentráciu Lp-PLA₂ merali aj u pacientov s týmito ochoreniami. **Metódy:** Sérovú koncentráciu Lp-PLA₂ sme vyšetrovali enzýmovou imunoanalýzou metódou sedvičovej ELISA diaDexus PLAC® Test ELISA Kit (Diadexus, Inc., San Francisco, USA). Štatistické spracovanie súboru sme previedli v programe IBM SPSS Statistics 24 (IBM Corp., New York, USA) použitím Fisherovho exaktného testu a neparametrických korelácií. **Výsledky:** Celkovo sme vyšetrili 401 jedincov (muži 43 %), v skupine zdravých ľudí 80 jedincov (muži 35 %), v skupine s AH 96 jedincov (muži 43 %), v skupine s ICHS 85 jedincov (muži 39 %) a v skupine s iCMP 140 jedincov (muži 49 %). Sérová koncentrácia Lp-PLA₂ v skupine zdravých ľudí bola signifikantne nižšia ako v skupine s AH ($p = 0 \times 10^{-3}$), ICHS ($p = 0 \times 10^{-3}$) a iCMP ($p = 0 \times 10^{-3}$). **Záver:** Naša štúdia potvrdila predpoklad, že ľudia s AH, ICHS a iCMP majú vyššiu sérovú koncentráciu Lp-PLA₂ ako zdraví jedinci, a teda zvýšenú pravdepodobnosť výskytu zapálených aterosklerotických plátov s rizikom ruptúry ako zdraví ľudia. Ale zvýšená hladina Lp-PLA₂ sa u ľudí s AH, ICHS a iCMP v našom súbore vyskytovala aj napriek statínovej liečbe, čo nás viedlo k záveru, že úloha Lp-PLA₂ pri vzniku a prehlbovaní zápalu aterosklerotického plátu môže byť zložitejšia ako len hydrolyza oxidovaných LDL v aterosklerotickom pláte.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

**L. Danihel^{1,2}, Š. Madarász^{2,3},
P. Blažiček^{4,5}, A. Lacko^{2,6}, J. Luha⁷,
V. Lehotská^{8,9}**

¹ Radiologická klinika ÚVN SNP Ružomberok – FN, Ružomberok

² Fakulta zdravotníctva, Katolícka univerzita, Ružomberok

³ Neurologická klinika ÚVN SNP Ružomberok – FN, Ružomberok

⁴ Ústav chémie, klinickej biochémie a laboratórnej medicíny, LF SZU v Bratislave

⁵ Laboratórium 4vive, Bratislava

⁶ Interná klinika, Kardiologická ambulancia, ÚVN SNP Ružomberok – FN, Ružomberok

⁷ Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, LF UK a UN, Bratislava

⁸ II. Radiologická klinika, LF UK A UN, Bratislava

⁹ Onkologický ústav svätej Alžbety, Bratislava



MUDr. Libor Danihel, PhD.
Radiologická klinika
ÚVN SNP Ružomberok – FN
Generála Miloša Vesela 21
034 26 Ružomberok
e-mail: libordanihel@gmail.com

Prijato k recenzii: 29. 1. 2018

Prijato do tlače: 13. 3. 2018

Kľúčové slová

fosfolipáza A₂ viazaná na lipoproteíny – ateroskleróza – ischemická cievna mozgová príhoda

Key words

lipoprotein-associated phospholipase A₂ – atherosclerosis – ischemic stroke

Práca bola podporená projektom Európskej únie Mechanizmy a nové markery vzniku a priebehu cirkulárnych porúch mozgu ITMS 26220220099.

Abstract

Aim: Lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) is an enzyme accumulated in atherosclerotic plaques and causes plaques inflammation that can induce plaque rupture. The aim of this work is to compare serum Lp-PLA₂ concentration in healthy subjects and in patients with arterial hypertension (AH), ischemic heart disease (IHD) and ischemic stroke (IS) so that we could assess utility of Lp-PLA₂ as a biomarker for IS risk. AH and IHD are considered risk factors for IS, therefore we measured serum Lp-PLA₂ concentration also in patients with these diseases. **Methods:** Serum Lp-PLA₂ concentration was determined by diaDexus PLAC® Test ELISA Kit (DiaDexus, Inc., San Francisco, USA), a sandwich enzyme immunoassay. The statistical analysis was performed with IBM SPSS Statistics 24 (IBM Corp., New York, USA) using the Fisher's exact test and non-parametric correlations. **Results:** Our cohort comprised of 401 subjects in total (43% males), 80 subjects in the group of healthy individuals (35% males), 96 subjects in the group with AH (43% males), 85 subjects in the group with IHD (39% males) and 140 subjects in the group with IS (49% males). Serum Lp-PLA₂ concentration in the group of healthy individuals was significantly lower than that in the group with AH ($p = 0 \times 10^{-3}$), IHD ($p = 0 \times 10^{-3}$) and IS ($p = 0 \times 10^{-3}$). **Conclusion:** Our study confirmed the assumption that people with AH, IHD and IS have higher levels of serum Lp-PLA₂ concentration than healthy people hence a higher incidence of inflamed atherosclerotic plaques and higher risk of rupture of these plaques, but a higher level of serum Lp-PLA₂ persisted in people with AH, IHD and IS in our cohort despite the statin therapy, leading us to conclude that the role of Lp-PLA₂ in the development and intensification of atherosclerotic plaque inflammation may be more complicated than only the hydrolysis of oxidized LDL in atherosclerotic plaque.

Úvod

Fosfolipáza A₂ viazaná na lipoproteíny (lipoprotein-associated phospholipase A₂; Lp-PLA₂), známa aj pod názvom acetylhydroláza doštičkového aktivačného faktora (platelet-activating factor acetylhydrolase), je na vápniku nezávislá sérová lipáza molekulej hmotnosti 45 000 g/mol (45 kDa) a do krvného obehu je uvoľňovaná v aktívnej forme [1,2]. Lp-PLA₂ patrí medzi fosfolipázy A₂, ktoré charakterizuje schopnosť hydrolyzovať membránové fosfolipidy v pozícii sn-2. Svoj názov získal tento enzým podľa schopnosti oddeliť acetylovú skupinu z sn-2 pozície aktivačného faktora krvných doštičiek podľa svojej väzby na lipoproteíny [3]. Z hľadiska posudzovania kardiovaskulárneho a cerebrovaskulárneho rizika je dôležitá iná vlastnosť Lp-PLA₂, a to, že v intíme arteriálnej steny v tvoriacom sa aterosklerotickom pláte po oxidácii lipoproteínov nízkej hustoty (low-density lipoproteins; LDL), ktorých súčasťou je aj oxidovaný fosfatidylcholín, má Lp-PLA₂ aj schopnosť hydrolyticky štiepiť v polohe sn-2 oxidovaný fosfatidylcholín na dve výrazne prozápalové a proaterogénne látky – lyzofosfatidylcholín (lysoPC) a oxidované masné kyseliny (oxFA) [3]. LysoPC a oxFA inhibujú produkciu endotelialného oxidu dusnatého, čím prehľbujú endotelialnú dysfunkciu v mieste už vzniknutého aterosklerotického plátu [3]. LysoPC a oxFA vyvolávajú chemotaxiu makrofágov a T-buniek do aterosklerotického plátu, stimulujú proliferáciu makrofágov v pláte [3]. Takto aktivované makrofágy produkujú ďalšiu Lp-PLA₂, ktorá je čiastočne uvoľňovaná do cirkulácie, a taktiež produkujú ďalšie chemoatraktanty pre makrofágy a T-bunky, čím zápalový proces v ateroskle-

rotickom pláte prehľbujú, čo môže vyvolať nestabilitu takého plátu a jeho náchylnosť k ruptúre. V čase projektovania a začiatku našej štúdie v rokoch 2010 a 2011 bola Lp-PLA₂ považovaná lekárskymi odbornými spoločnosťami za nádejný biomarker kardiovaskulárneho a cerebrovaskulárneho rizika (trieda odporúčaní IIb, úroveň dôkazov B) [4]. V najnovších európskych odporúčaniach z roku 2016 sa rutinne klinické používanie Lp-PLA₂ ako biomarkera kardiovaskulárneho a cerebrovaskulárneho rizika neodporúča, lebo Lp-PLA₂ priniesla len malé, klinicky zanedbateľné zlepšenie odhadu rizika kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych ochorení (trieda odporúčaní III, úroveň dôkazov B) [5]. Už v čase projektovania našej štúdie existoval alternatívny výklad pôsobenie Lp-PLA₂, a to, že Lp-PLA₂ nie je biomarkerom kardiovaskulárneho a cerebrovaskulárneho rizika, ale tým, že štiepi (hydrolyzuje) doštičkový aktivačný faktor má protizápalové účinky a *in vivo* je súčasťou fyziologického mechanizmu reakcie na zápalové noxy v cievnej stene [1,6].

Cieľom našej práce je porovnať hodnoty sérovej koncentrácie Lp-PLA₂ medzi skupinou zdravých jedincov a skupinami ľudí s arteriálnou hypertenziou (AH), ischemickou chorobou srdca (ICHS) a ischemickou cievnu mozgovou príhodou (iCMP) a tým posúdiť vhodnosť Lp-PLA₂ ako biomarkera rizika iCMP. AH a ICHS sú považované za rizikové faktory iCMP [4,5], preto sme sérovú koncentráciu Lp-PLA₂ merali aj u pacientov s týmito ochoreniami.

V čase našej výskumnej práce prebiehali 2 veľké klinické štúdie STABILITY [7] a SOLID-TIMI 52 [8] sponzorované farmaceutickou firmou GlaxoSmithKline, v ktorých sa skúmal

vplyv inhibície Lp-PLA₂ na redukciiu akútnych život ohrozujúcich stavov, ktoré postihujú kardiovaskulárny a cerebrovaskulárny systém. V oboch týchto štúdiách sa skúmal darapladib, prvý inhibitor Lp-PLA₂, ktorého vývoj dospel do štádia klinických štúdií. V štúdii STABILITY sa skúmal vplyv podávania darapladibu pacientom so stabilnou ICHS na redukciiu výskytu akútneho infarktu myokardu (IM) a akútnej iCMP v porovnaní s placebom v dvojito zaslepenej štúdii so záverom, že inhibícia Lp-PLA₂ signifikantne neredukovala výskyt akútneho IM a akútnej iCMP [7]. V štúdii SOLID-TIMI 52 bol skúmaný vplyv podávania darapladibu pacientom s akútnym IM na redukciiu výskytu ďalšej veľkej koronárnej príhody, t.j. náhlejšej srdcovej smrti, ďalšieho akútneho IM alebo urgentnej koronárnej revaskularizácie pre myokardiálnu ischémiu, taktiež v porovnaní s placebom v dvojito zaslepenej štúdii. Po randomizácii do darapladibovej alebo placebovej vetvy bol pacientom okrem štandardnej liečby podávaný aj darapladib alebo placebo v čase 0–30 dní od počiatku IM. Štúdia nezistila signifikantnú redukciiu veľkej koronárnej príhody po akútnom IM pridaním darapladibu k štandardnej liečbe [8]. Ešte pred uverejnením výsledkov týchto štúdií bol publikovaný názor vychádzajúci predovšetkým z genetického výskumu, že darapladib síce u ľudí redukuje rozvoj experimentálne navodenej aterosklerózy a obmedzuje rozšírenie nekrotického jadra v aterosklerotickom plaku, ale tento efekt nie je sprostredkovaný inhibíciou Lp-PLA₂ [9]. Podľa súčasných poznatkov inhibícia Lp-PLA₂ signifikantne neredukuje riziko akútneho IM a akútnej iCMP. V roku 2011, t.j. v čase, keď sme začali pracovať na našej štúdii, boli pub-

likované výsledky iného výskumného tímu zaoberajúceho sa vzťahom sekundárnej preventívnej liečby a koncentrácie a aktivity Lp-PLA₂ u pacientov po prvej iCMP [10]. Záver tejto výskumnej skupiny bol, že sekundárna preventívna liečba statínmi a antiangreganciom klopido-grelom bola spojená so znížením sérovej koncentrácie a aktivity Lp-PLA₂ o 3 mesiace po prvej iCMP [10]. Takže podľa v súčasnosti dostupných informácií je možné znižovať riziko ruptúry zapáleného aterosklerotického plaku podávaním statínov a klopido-grelu a nie podávaním inhibítora Lp-PLA₂ [7,8,10].

K dispozícii sú dve metódy stanovenie Lp-PLA₂, a to stanovenie enzymatickej aktivity a stanovenie sérovej koncentrácie. V čase projektovania našej štúdie v roku 2010 bola americkým úradom Food and Drug Administration (FDA) certifikovaná na klinické použitie len metóda stanovenia sérovej koncentrácie Lp-PLA₂ pomocou imunoanalýzy (PLAC test, diaDexus, South San Francisco, California, USA), ktorá získala FDA certifikáciu v roku 2005 [11]. Princípom tejto metódy je sendvičová enzýmová imunoanalýza s použitím dvoch špecifických protilátok, pričom výstupná sérová koncentrácia Lp-PLA₂ je meraná v µg/l s rozsahom merania v lineárnej oblasti 151–810 µg/l. Referenčné hodnoty získané v rámci Mayo Clinic Reference Value Donors Program sú pre mužov vyššie (266 ± 48 µg/l) ako pre ženy (227 ± 64 µg/l) s mediánom pre kombinovanú populáciu (muži aj ženy) 229 µg/l [12]. FDA odporúča uprednostniť na presnejšie kardiiovaskulárneho rizika pri osobách so stredným rizikom podľa klasických skórovacích systémov (Framingham, SCORE) cut-off hodnotu namiesto referenčných hodnôt [2,12]. Táto odporúčaná cut-off hodnota je 235 µg/l a bola stanovená na základe konsenzu vychádzajúceho zo štúdií poskytnutých FDA, z referenčných hodnôt určených v jednotlivých laboratóriách a podľa vyšetrovaní 17 026 jedincov v rámci klinickej praxe vo veľkých laboratóriách [13]. Hodnota, ktorá je odporúčaná ako cut-off v Adult Treatment Panel III, je 200 µg/l [14]. Druhá metóda, pomocou ktorej sa stanovuje aktivita Lp-PLA₂, je založená na štiepení substrátu (najčastejšie doštičkového aktivačného faktora) na jeho lyzo-formy a voľné mastné kyseliny. Táto metóda získala FDA certifikáciu na klinické použitie v roku 2014 [15]. Na základe multicentrickej štúdie REGARDS bola cut-off hodnota aktivity Lp-PLA₂ stanovená na 225 nmol/min/ml [16,17].

Problematický je aj vzťah koncentrácie a aktivity Lp-PLA₂ tesne pred akútnym IM a akútnou iCMP a po nich. Boli publikované štúdie, kde hodnoty týchto parametrov sú po akútnom IM alebo akútnej iCMP vyššie [18,19] ako pred nimi, ale aj štúdie, kde sú rovnaké [20] a tiež štúdie, kde sú nižšie [21,22]. Tieto protichodné výsledky svedčia pravdepodobne o zásadne sa meniacej hodnote sérovej koncentrácie a aktivity Lp-PLA₂ v čase pred akútnym IM a akútnou iCMP a po nich a na zdokumentovanie týchto zmien by bolo potrebné viacpočetné meranie týchto veličín v krátkych časových intervaloch pred akútnym IM a akútnou iCMP. Pre zaujímavosť v štúdiách, kde vyšli hodnoty koncentrácie alebo aktivity Lp-PLA₂ po akútnom IM a po akútnej iCMP nižšie ako pred nimi, sa to vysvetľuje súladom so znížením LDL po akútnom IM alebo po akútnej iCMP a kolokalizáciou (spoluumiestnením) Lp-PLA₂ a LDL alebo ovplyvnením väzobnej kapacity Lp-PLA₂ proteínmi akútnej fázy ako albumín a fibrinogén [22].

Súbor a metodika

Súbor vyšetrených

Do prospektívnej štúdie bolo zaradených celkovo 401 subjektov, ktorí boli vyšetrení na neurologických ambulanciách alebo boli hospitalizovaní na Neurologickej klinike ÚVN-FN SNP Ružomberok v období od decembra 2010 do novembra 2015 a súhlasili s účasťou v štúdiu a podpísali o tom informovaný súhlas. Účastníci štúdie boli vybraní zo 4 skupín:

1. kontrolná skupina zdravých osôb (K), čo v našom súbore znamenalo, že im nebola diagnostikovaná AH, ICHS, iCMP, ale mohli byť diagnostikovaná hyperlipidémia a mohli užívať statínovú liečbu;
2. pacienti s AH;
3. pacienti s ICHS;
4. pacienti s iCMP.

V prípade koincidencie diagnóz AH a ICHS bol pacient zaradený do skupiny ICHS, v prípade koincidencie AH a iCMP bol pacient zaradený do skupiny iCMP, v prípade koincidencie ICHS a iCMP bol pacient zaradený do skupiny iCMP a v prípade koincidencie AH, ICHS a iCMP bol pacient zaradený do skupiny iCMP. Celkovo sa akákoľvek z vyššie spomínaných koincidencií diagnóz vyskytovala v našom súbore v počte 148 prípadov (36,9 %). Ide o pomerne veľkú skupinu a vylúčením tejto skupiny z nášho súboru by utrpela objektivnosť našej štúdie. Z klinic-

kého hľadiska sú u pacientov s AH dôležité doba trvania AH a typ antihypertenzívnej liečby, ale zavedením kvantitatívnej premennej doba trvania AH a kvalitatívnej premennej typ antihypertenzívnej liečby v skupine AH by sa štatistické spracovanie skomplikovalo a viedlo by k ťažko interpretovateľným štatistickým výsledkom, takže tieto údaje sme v našej štúdiu nesledovali. Do skupiny ICHS boli zaradené prevažne stavy so stabilnou ICHS, len 7 prípadov tvorili pacienti s akútnym IM (8 %). Pacientov s akútnym IM bolo možné informovať o možnosti účasti na štúdiu až po stabilizácii ich stavu. Preto u tých, ktorí s účasťou v štúdiu súhlasili, bola Lp-PLA₂ vyšetrovaná v dobe 12–23 dní od začiatku hospitalizácie, takže z medicínskych a etických príčin nebolo možné, ani u pacientov s akútnym IM získať hodnoty Lp-PLA₂ v čase vzniku akútneho IM. Do skupiny iCMP boli zaradené aj stavy 15–23 dní po akútnej iCMP (37 prípadov, 26 %), ale aj stavy po starých iCMP prekonaných pred niekoľkými rokmi (103 prípadov, 74 %). To vedie k predpokladu nehomogenity skupiny ICHS, avšak homogenizujúcim faktorom je okolnosť, že z rovnakých dôvodov ako pri akútnom IM nebolo možné vyšetriť Lp-PLA₂ pacientom s akútnou iCMP hneď v prvých dňoch hospitalizácie, kedy hodnota Lp-PLA₂ kolíše najviac [18–22].

Základná charakteristika účastníkov štúdie je uvedená v tab. 1 a tab. 2.

Metodika vyšetrenia sérovej koncentrácie Lp-PLA₂

Sérovú koncentráciu Lp-PLA₂ sme vyšetrovali enzýmovou imunoanalýzou pomocou nekompetitívnej (sendvičovej) ELISA metódy firmy Diadexus (Diadexus, Inc., San Francisco, USA). Cut-off hodnota bola 235 µg/l. Takže, či má vyšetrovaný normálnu alebo zvýšenú sérovú koncentráciu Lp-PLA₂, sme určili podľa tejto schémy:

1. jedinci s normálnou sérovou koncentraciou Lp-PLA₂, ≤ 235 µg/l;
2. jedinci so zvýšenou sérovou koncentraciou Lp-PLA₂, > 235 µg/l.

Technicko-organizačnou podmienkou zaradenia do štúdie bolo aj to, že účastník bol oslovený na účasť na štúdiu a súhlasil s ňou v čase, keď na hore uvedených pracoviskách bola možnosť odobrať a na ďalšie spracovanie uskladniť vzorky na stanovenie sérovej hladiny Lp-PLA₂. Vzorky krvi boli odobraté z antekubitálnych žíl účastníkov pred 9. h ráno v piatok. Po odbere ochladené a do

Tab. 1. Charakteristika jednotlivých skupín účastníkov podľa pohlavia.

	muži počet	ženy počet	celkovo počet	vek (roky)			
				muži		ženy	
				minimum–maximum	medián	minimum–maximum	medián
K	28	52	80	25–81	44,5	21–63	39
AH	41	55	96	30–73	57	41–81	55
ICHS	33	52	85	49–82	65	51–92	72
iCMP	69	71	140	39–89	69	32–91	75
celkovo	171	230	401	25–89	63	21–92	63

AH – skupina ľudí s arteriálnou hypertenziou; ICHS – skupina ľudí s ischemickou chorobou srdca; iCMP – skupina ľudí s ischemickou cievnou mozgovou príhodou; K – kontrolná skupina zdravých osôb

Tab. 2. Namerané hodnoty Lp-PLA₂ v jednotlivých skupinách účastníkov podľa pohlavia.

		muži			ženy		
		minimálna hodnota	maximálna hodnota	medián	minimálna hodnota	maximálna hodnota	medián
K	Lp-PLA ₂ [μg/l]	126,20	232,10	181,09	133,20	239,30	181,80
AH	Lp-PLA ₂ [μg/l]	152,34	664,90	199,05	115,40	417,54	195,87
ICHS	Lp-PLA ₂ [μg/l]	130,20	309,17	200,80	155,05	446,30	213,14
iCMP	Lp-PLA ₂ [μg/l]	141,20	543,80	228,59	129,70	443,81	208,18

AH – skupina ľudí s arteriálnou hypertenziou; ICHS – skupina ľudí s ischemickou chorobou srdca; iCMP – skupina ľudí s ischemickou cievnou mozgovou príhodou; K – kontrolná skupina zdravých osôb; Lp-PLA₂ – fosfolipáza A₂ viazaná na lipoproteíny

Tab. 3. Výsledky Fisherovho exaktného testu a následných komparatívnych testov.

	K ku AH	K ku ICHS	K ku iCMP
Lp-PLA ₂	0×10^{-3}	0×10^{-3}	0×10^{-3}
celkový cholesterol	0,017	0,013	0,001
LDL	0,040	0,104	0,002
HDL	0,105	0,060	0,103
triacylglyceroly	0×10^{-3}	0×10^{-3}	0,005
hs-CRP	0,013	0×10^{-3}	0×10^{-3}
statínová liečba	0×10^{-3}	0×10^{-3}	0×10^{-3}

AH – skupina ľudí s arteriálnou hypertenziou; HDL – high-density lipoproteins; hs-CRP – high-sensitivity C-reactive protein; ICHS – skupina ľudí s ischemickou chorobou srdca; iCMP – skupina ľudí s ischemickou cievnou mozgovou príhodou; K – kontrolná skupina zdravých osôb; LDL – low-density lipoproteins; Lp-PLA₂ – fosfolipáza A₂ viazaná na lipoproteíny

účastníkov podľa pohlavia sú zaznamenané v tab. 2.

Celkový cholesterol, HDL (high-density lipoproteins), LDL a triacylglyceroly sme vyšetrovali pomocou enzymatických farebných testov na kvantitatívne stanovenie týchto látok v ľudskom sére a plazme pomocou analyzátorov AU Beckman Coulter. High-sensitivity CRP (hs-CRP) sme vyšetrili pomocou imuno-turbidimetrického testu na kvantitatívne stanovenie hs-CRP v ľudskom sére a plazme pomocou analyzátorov AU Beckman Coulter.

Štatistické spracovanie

Štatistické vyhodnotenie bolo vykonané pomocou štatistického programu IBM SPSS Statistics 24 (IBM Corp., New York, USA). Keďže hodnoty sérovej koncentrácie Lp-PLA₂ v jednotlivých skupinách nemali normálne rozdelenie, na porovnanie hodnôt Lp-PLA₂ v skupine zdravých jedincov (K) a v skupinách AH, ICHS a iCMP sme použili neparametrické testy, a to Kruskal-Wallisov test. Následne sme vykonali neparametrickú korelačnú analýzu medzi Lp-PLA₂ a vekom,

30 min centrifugované pri 3 000 rpm 10 min. Sérum bolo uložené pri –80 °C a vždy v piatok večer vzorky v suchom lade dopravené do vyšetrojúceho biochemického laboratória. Analýza bola robená vždy nasledujúcu sobotu dopoludnia v akreditovanom laboratóriu špeciálnych metód Alpha Me-

dical Bratislava. Vzorky z jedného piatka boli vyšetrené pomocou jednej ELISA šarže Lp-PLA₂ (Diadexus) a vždy boli spracované aj kontrolné vzorky. Všetky séra pacientov boli analyzované do 36 h od odberu (od piatku do soboty). Namerané hodnoty sérovej koncentrácie Lp-PLA₂ v jednotlivých skupinách

diastolickým tlakom, systolickým tlakom, celkovým cholesterolom, LDL, HDL, triacylglycerolmi a hs-CRP v celom súbore vyšetrovaných a jednotlivu v skupinách K, AH, ICHS a iCMP.

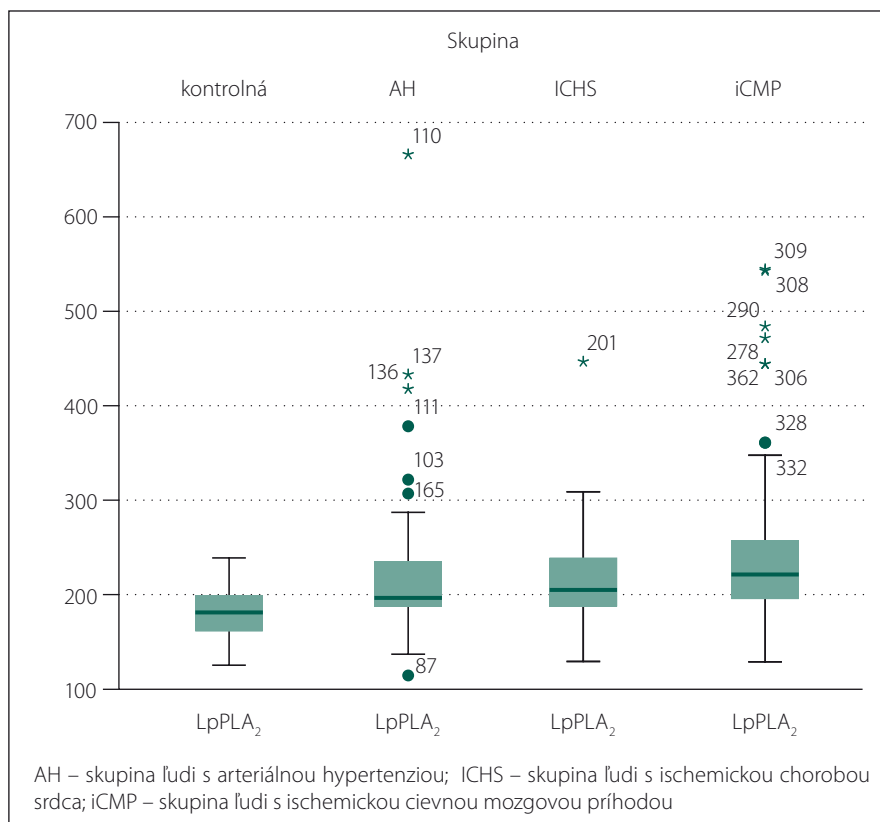
Schválenie etickými komisiami

Protokol štúdie bol schválený Etickou komisiou ÚVN SNP Rožumberok – FN a Etickou komisiou Katolíckej univerzity v Ružomberku a štúdia bola vykonaná v súlade s Helsinskou deklaráciou pre vykonávanie klinických štúdií z roku 1975 a revidovanou v roku 2000.

Výsledky

Kruskalov-Wallisov test a následné komparatívne testy preukázali, že v našom súbore vyšetrovaných bola sérová koncentrácia Lp-PLA₂ v skupine K signifikantne nižšia ako v skupinách jedincov s AH, ICHS a iCMP, kde p hodnota v Kruskalovom-Wallisovom teste bola nulová a stredné poradie (mean rank) Lp-PLA₂ v skupine K bolo 106,43; v skupine AH bolo 200,19; v skupine ICHS 206,91 a v skupine iCMP bolo 250,37. Obr. 1 graficky ukazuje, že oproti K skupine boli vo všetkých troch skupinách chorých (AH, ICHS a iCMP) hodnoty Lp-PLA₂ vyššie (obr. 1). Hladiny Lp-PLA₂ boli v skupinách AH, ICHS a iCMP signifikantne vyššie ako v K skupine aj napriek tomu, že vo všetkých troch skupinách chorých bolo percentuálne zastúpenie statínovej liečby výrazne vyššie ako v K skupine (tab. 3). V K skupine percentuálne zastúpenie statínovej liečby 4 %, v AH 28 %, v ICHS 44 % a v iCMP 34 %.

Pri zisťovaní úrovne korelácie medzi Lp-PLA₂ a systolickým a diastolickým tlakom, celkovým cholesterolom, LDL, HDL, triacyl-



Obr. 1. Krabicový graf sérovej koncentrácie Lp-PLA₂ (fosfolipáza A₂ viazaná na lipoproteíny) v jednotlivých skupinách vyšetrovaných.

Fig. 1. Box plot of serum Lp-PLA₂ (lipoprotein-associated phospholipase A₂) concentration in the study groups.

glycerolmi a hs-CRP v našom súbore nám vyšli nasledujúce výsledky.

V celom súbore vyšetrovaných (K, AH, ICHS a iCMP spolu) hodnoty Lp-PLA₂ korelovali s hodnotami veku, systolického a diastolického tlaku a hs-CRP, naopak korelácia hodnôt Lp-PLA₂ a všetkých vyšetrovaných zložiek lipidogramu (celkového cholesterolu, LDL, HDL a triacylglycerolov) nebola signifikantná

(tab. 4; pri signifikantnej korelácii sa Spearmanov ρ koeficient pohyboval v rozmedzí 0,167–0,279 a p hodnota 0–0,001 pri hladine významnosti $\alpha = 0,01$).

V K, AH a ICHS skupine nebola signifikantná korelácia ani medzi jedným skúmaným parametrom (vek, diastolický a systolický tlak, celkový cholesterol, LDL, HDL, triacylglyceroly a hs-CRP) a Lp-PLA₂ (tab. 4).

Tab. 4. Výsledky neparametrických korelácií (pred lomítkom je uvedený Spearmanov ρ koeficient, pod lomítkom p hodnota pri hladine významnosti $\alpha = 0,01$).

Lp-PLA ₂	vek	systolický tlak	diastolický tlak	celkový cholesterol	LDL	HDL	triacylglyceroly	hs-CRP
celý súbor	0,283/0,000	0,283/0,000	0,167/0,001	0,049/0,330	0,059/0,241	0,031/0,542	0,084/0,094	0,279/0,000
K	0,032/0,778	0,075/0,510	0,106/0,348	0,086/0,447	0,121/0,286	0,110/0,333	0,129/0,253	0,158/0,161
AH	-0,173/0,090	0,142/0,169	0,180/0,079	0,128/0,214	0,017/0,871	0,083/0,419	0,035/0,738	0,062/0,549
ICHS	0,179/0,102	0,077/0,485	0,075/0,497	-0,139/0,204	0,003/0,975	-0,010/0,927	-0,149/0,175	0,040/0,714
iCMP	0,058/0,495	0,102/0,229	0,028/0,744	-0,026/0,758	-0,051/0,552	0,080/0,350	-0,009/0,917	0,217/0,010

AH – skupina ľudí s arteriálnou hypertenziou; HDL – high-density lipoproteins; hs-CRP – high-sensitivity C-reactive protein; ICHS – skupina ľudí s ischemickou chorobou srdca; iCMP – skupina ľudí s ischemickou cievnou mozgovou príhodou; K – kontrolná skupina zdravých osôb; LDL – low-density lipoproteins; Lp-PLA₂ – Fosfolipáza A₂ viazaná na lipoproteíny

V skupine iCMP Lp-PLA₂ signifikantne korelovala iba s hs-CRP, s ostatným parametrami nie (tab. 4).

Diskusia

V našej štúdii sme potvrdili predpoklad, že hladina sérovej Lp-PLA₂ bude v K nižšia ako v skupine ľudí s AH, ICHS alebo iCMP, u ktorých je väčší predpoklad, že niekde v ich arteriálnom riečišti sa vyskytuje zapálený aterosklerotický plak, o čom nás informuje zvýšená sérová koncentrácia Lp-PLA₂.

Keďže všetky tri skupiny pacientov AH, ICHS a iCMP mali výrazne vyšší výskyt statínovej liečby ako K, dala by sa absencia signifikantnej korelácie medzi Lp-PLA₂ a zložkami lipidogramu (celkovým cholesterolom, LDL, HDL a triacylglycerolmi) vysvetľovať účinkom statínovej liečby, tým že statínová liečba znižuje prítomnosť substrátu, a to oxidovaných LDL, špeciálne oxidovaného fosfatidylcholínu, ktorý by mohla Lp-PLA₂ v aterosklerotickom pláte štiepiť. Tento výsledok našej štúdie je v súlade so závermi iných štúdií, v ktorých bolo preukázané, že statínová liečba znižuje riziko výskytu akútneho IM a akútnej iCMP [7,8,10]. Keďže aj napriek statínovej liečbe boli okrem Lp-PLA₂ signifikantne zvýšené hladiny aj hs-CRP v skupine ICHS a iCMP oproti K a absentovala korelácia medzi Lp-PLA₂ a zložkami lipidogramu a vo veľkých populačných štúdiách [7,8] bolo preukázané, že inhibícia Lp-PLA₂ darapladibom nevedla k signifikantnému zníženiu rizika akútneho IM a akútnej iCMP, viedlo nás to prikloniť sa k tej skupine názorov, že úloha Lp-PLA₂ v ateroskleroze je zložitejšia ako len hydrolýza oxidovaných LDL v aterosklerotickom pláte, prípadne k názoru, že Lp-PLA₂ by mohla mať protizápalový účinok v aterosklerotickom pláte [9].

Za zaujímavý a možno v klinickej medicíne v budúcnosti upotrebitelný považujeme aj výsledok, že v našom súbore pri vyššom výskyte statínovej liečby v skupine AH, ICHS a iCMP oproti K korelovala hladina hs-CRP s hladinou Lp-PLA₂ len v celom súbore (K, AH, ICHS a iCMP spolu) a samostatne v skupine iCMP, nie samostatne v skupine AH a ICHS. To nás viedlo k záveru, že posudzovanie zápalových zmien v bifurkácii a. carotis communis a odstupu a. carotis interna lacnou a dostupnou sonografiou a v prípade sonografického podozrenia na nestabilitu karotického plátu koreláciou tohto sonogra-

fického nálezu a následné vyšetrenie hladiny hs-CRP alebo Lp-PLA₂ by mohlo mať klinický význam na posúdenie ďalšieho manažmentu pacienta v zmysle posúdenia závažnosti zápalových zmien v karotickom pláte a hodnotenia stability alebo nestability karotického plátu.

Záver

V našej štúdii sa potvrdil predpoklad, že hladiny Lp-PLA₂ sú u pacientov s AH, ICHS a po iCMP vyššie ako u zdravých ľudí, a tým aj predpoklad, že Lp-PLA₂ má potenciál biomarkera rizika akútneho IM a akútnej iCMP, ktorý informuje o zvýšenej pravdepodobnosti výskytu zapálených aterosklerotických plátov s rizikom ruptúry. Avšak zvýšené hodnoty Lp-PLA₂ v našom súbore u pacientov s AH, ICHS a po iCMP pretrvávali aj napriek statínovej liečbe, ktorá sa u pacientov v skupine AH, ICHS a iCMP vyskytovala signifikantne častejšie ako v K skupine, čo nás viedlo k záveru pripojiť sa k názoru, že vysvetlenie úlohy Lp-PLA₂ v ateroskleroze by mohlo byť zložitejšie ako len, že Lp-PLA₂ hydrolýzuje oxidované LDL v aterosklerotickom pláte a tým prehľbuje zápal plátu a zvyšuje riziko ruptúry plátu.

Literatúra

- Stafforini DM. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2). *Cardiovasc Drugs Ther* 2009; 23(1): 73–83. doi: 10.1007/s10557-008-6133-8.
- Kollár J. (Bio)markery vulnerabilných plátov a prediktabilita ischemických príhod. In: Kollár J. Aterotrombóza-patofyziológia a epidemiológia. Košice: Equilibria 2016: 65–85.
- Franečková J, Jabor A. Fosfolipáza A2 asociovaná s lipoproteínmi – nový marker kardiovaskulárneho rizika. *Postgraduálny med* 2010; 12 (Suppl 3): 32–42.
- Greenland P, Alpert JS, Beller GA et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2010; 122(25): e584–e636. doi: 10.1161/CIR.0b013e3182051b4c.
- Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S et al. 2016 European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts): developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur J Prev Cardiol* 2016; 23(11): NP1–NP96. doi: 10.1177/2047487316653709.
- Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman GA et al. Sol Sherry lecture in thrombosis. Molecular events in acute inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(5): 727–733. doi: 10.1161/01.ATV.0000016153.47693.B2.

- White HD, Held C, Stewart R et al. Darapladib for preventing ischemic events in stable coronary heart disease. *N Engl J Med* 2014; 370(18): 1702–1711. doi: 10.1056/NEJMoa1315878.
- O'Donoghue ML, Braunwald E, White HD et al. Effect on darapladib on major coronary events after an acute coronary syndrome: the SOLID-TIMI 52 randomized clinical trial. *JAMA* 2014; 312(10): 1006–1015. doi: 10.1001/jama.2014.11061.
- Rosenson RS, Stafforini DM. Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A2. *J Lipid Res* 2012; 53(9): 1767–1782. doi: 10.1194/jlr.R024190.
- Massot A, Pelegri D, Panalba A et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 testing usefulness among patients with symptomatic intracranial atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* 2011; 218(1): 181–187. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.031.
- U.S. Food and Drug Administration. 510 (k) Summary diaDexus PLAC TM Test. [online]. Available from URL: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf5/k050523.pdf.
- Lanman RB, Wolfert RL, Fleming JK et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2: review and recommendation of clinical cut of point for adults. *Prev Cardiol* 2006; 9(3): 138–143.
- McConnell JP, Hoefner DM. Lipoprotein-associated phospholipase A2. *Clin Lab Med* 2006; 26(3): 679–697.
- Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ et al. Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. *Am J Cardiol* 2008; 101(12A): 51F–57F. doi: 10.1016/j.amjcard.2008.04.019.
- U.S. Food and Drug Administration. 510 (k) Summary diaDexus PLAC Test for Lp-PLA2 Activity. [online]. Available from URL: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf14/K141575.pdf.
- Mayo Clinic. Mayo Medical Laboratories. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity. Novel and effective testing for prediction of coronary heart disease. [online]. Available from URL: http://www.mayomedical-laboratories.com/media/mayo_client/marketing/cardiology/lp-pla2-PLACA-brochure-1115b.pdf.
- O'Riordan M. FDA approves Lp-PLA2 test for patients without existing coronary disease. [online]. Available from URL: <http://www.medscape.com/viewarticle/836640>.
- Jabor B, Choi H, Ruel I et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) in acute coronary syndrome: relationship with low-density lipoprotein cholesterol. *Can J Cardiol* 2013; 29(12): 1679–1686. doi: 10.1016/j.cjca.2013.09.026.
- Kara H, Akinci M, Degirmenci S et al. High-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein-related phospholipase A2, and acute ischemic stroke. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2014; 10: 1451–1457. doi: 10.2147/NDT.S67665.
- Tai W, Garcia M, Mlynash M et al. Lipoprotein phospholipase A2 mass and activity are not associated with the diagnosis of acute brain ischemia. *Cerebrovasc Dis* 2014; 38(5): 324–27. doi: 10.1159/000368218.
- Elkind MSV, Leon V, Moon YP et al. High-sensitivity C-Reactive protein and lipoprotein-associated phospholipase A2 stability before and after stroke and myocardial infarction. *Stroke* 2009; 40(10): 3233–3237. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.552802.
- Kocak S, Ertekin B, Girgin AS et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and its diagnostic potential in patients with acute coronary syndrome and acute ischemic stroke. *Turk J Emerg Med* 2016; 17(2): 56–60. doi: 10.1016/j.tjem.2016.10.001.