

LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY

V BRNĚ

**GENETICKÉ A LABORATORNÍ MARKERY U
PACIENTŮ S ISCHEMICKOU CHOROUBOU
SRDEČNÍ
(SOUBOR PUBLIKACÍ)**

MUDr. Vladimír Kincl, Ph.D.

HABILITAČNÍ PRÁCE

BRNO 2018

Pokládám za milou povinnost poděkovat

svému učiteli:

prof. MUDr. Jaroslavu Meluzínovi, CSc, za odborné vedení, cenné rady, podněty a velkou trpělivost při konzultacích

pednostím I.interní kardiologické kliniky:

prof. MUDr. Jiřímu Vítovcovi, CSc a prof.MUDr. Lence Šepinarové, Ph.D., za vytváření prostředí pro vědeckou práci

svým kolegům:

doc. MUDr. Romanovi Panovskému, Ph.D., MUDr. Janu Máchalovi, Ph.D., za pomoc při zpracování získaných dat

pracovníkům Ústavu patologické fyziologie LF MU pod vedením **prof. MUDr. Anny Vaýk, CSc**, za genetické analýzy a cenné rady a konzultace

Obsah:

1. Úvod

1.1. Ateroskleróza v n ítých tepen a její komplikace

1.1.2. Stabilní ischemická choroba srde ní

1.1.3. Akutní koronární syndromy

1.2. Genové polymorfismy u vybraných gen

1.2.1. Endoteliální NO syntáza (eNOS)

1.2.2. Eotaxin

1.2.3. Matrix metaloproteináza 13

1.3. Laboratorní markery u ICHS

1.4. Literatura k úvodní ásti

2. Vlastní práce

2.1. Vztah polymorfism eNOS 4a/b a -786T/C k ischemické chorob srde ní, obezit a diabetes mellitus

2.1.1. Soubor a metodika

2.1.2. Výsledky

2.1.3. Diskuse

2.1.4. Literatura k práci Vztah polymorfism eNOS 4a/b a - 786T/C ischemické chorob srde ní, obezit a diabetes mellitus

2.2. Souvislost rs640198 polymorfismu v genu pro matrix metaloproteinázu 13 a záva0nosti ICHS

2.2.1. Soubor a metodika

2.2.2. Výsledky

2.2.3. Diskuse

2.2.4. Literatura k práci Souvislost rs640198 polymorfismu v genu pro matrix metaoproteinázu 13 a závažností ICHS

2.3. Vztah mezi těmi jednonukleotidovými polymorfismy v genu pro eotaxin (CCL 11), hexanukleotidovým opakujícím se zcelem a závažností ICHS

2.3.1. Soubor a metodika

2.3.2. Výsledky

2.3.3. Diskuse

2.3.4. Literatura k práci Vztah mezi těmi jednonukleotidovými polymorfismy v genu pro eotaxin (CCL 11), hexanukleotidovým opakujícím se zcelem a závažností ICHS

2.4. Laboratorní markery u pacientů s ICHS

2.4.1. Soubor a metodika

2.4.2. Výsledky

2.4.3. Diskuse

2.4.4. Literatura k práci Laboratorní markery u pacientů s ICHS

2.5 Vztah mezi dlouhodobými klinickými výsledky pacientů a eNOS 786 C/T, 4 a/b, MMP-13 rs640198 G/T, Eotaxin 426 C/T, 384 A/G, and 67 G/A polymorfismy

2.5.1. Soubor a metodika

2.5.2. Výsledky

2.5.3. Diskuse

2.5.4. Literatura k práci Vztah mezi dlouhodobými klinickými výsledky pacientů a eNOS 786 C/T, 4 a/b, MMP-13 rs640198 G/T, Eotaxin 426 C/T, 384 A/G, and 67 G/A polymorfismy

3. Shrnutí

4. Abstrakt

5. Originály publikovaných prací

1. ÚVOD

1.1. Ateroskleróza v renálních tepen a její komplikace

Aterosklerotické poškození cévní stěny je příčinou řady chorob. V koronární lokalizaci se ateroskleróza může manifestovat jako ischemická choroba srdeční (ICHS), a to jak v podobě chronické (stabilní) tak i v akutních formách. Vznik a progresse aterosklerózy jsou podmíněny mnoha příčinami, mezi základní patří hlavně hyperlipoproteinémie, diabetes mellitus, hypertenze a kouření [1,2,3]. Z dalších faktorů je nutné jmenovat renální insuficienci, která zejména v posledním stadiu, tedy u pacientů v predialyzační fázi a u chronicky dialyzovaných představuje závažné riziko progresse aterosklerózy [4,5]. Naproti tomu vliv poškozených stadií renální nedostatečnosti, sérové hladiny kyseliny močové a různých genových polymorfismů je stále předmětem výzkumu [6 - 9].

Ateroskleróza se vyvíjí v několika fázích, klasifikace American Heart Association popisuje dělení aterosklerotických lézí na 6 typů. Prvním stadiem jsou poraněné buňky (léze typu I), které jsou viditelné pouze mikroskopicky v intimě cévy. Dalším stadiem jsou tukové proužky, které už jsou patrné jako olutavé tečky a proužky na povrchu intimy. Tyto změny mohou být přítomny už od první dekády života člověka. Od druhé dekády života se objevuje třetí stadium, které představují tzv. intermediární léze a čtvrtý stupeň jsou ateromy, kde dochází k dalšímu hromadění lipidů a formování lipidového jádra. Mezi lipidovým jádrem a endotelem se nachází makrofágy a poraněné buňky, ojedinelé buňky hladké svaloviny a malé množství kolagenu. Ve čtvrté dekádě se potom objevují léze typu V, které se podle množství pojivové tkáně dělí na podtypy. Va (fibroaterom), který má lipidové jádro, Vb - kalcifikovaná léze, Vc - dělí se na 2 skupiny: bez lipidového jádra, který bývá příčinou významných koronárních stenóz a tzv. gelatinozní léze s obsahem

edematozní tekutiny a fibrinogenu. Poslední stadium, charakterizované typem VI, má podtypy VIa . léze s rupturou, VIb . s hemoragií (krvácením/hematomem v plátu) a VIc . kde jsou přítomny všechny předchozí komplikace [10,11]. Na rozvoji aterosklerozy podílejí mechanismy genové, molekulární a buněčné, které představují dlouhodobý soubor reakcí s primárně zánětlivým charakterem. V různých stádiích se projevují zánětlivé mechanismy v kombinaci s usazováním lipidů ve stěně cévy, které mohou být dále potencovány i dalšími lokálními a systémovými infekcemi. Přítomné další rizikové faktory jako hypertenze, diabetes mellitus a samozřejmě hyperlipoproteinemie dále podporují aktivitu aterosklerotického procesu. Zánětlivé reakce mají i hlavní podíl na komplikacích aterosklerozy, tj. hlavně rozvoji akutních koronárních syndromů .

1.1.2. Stabilní ischemická choroba srdeční

První manifestace onemocnění koronárních tepen se u většiny pacientů projevuje jako endoteliální dysfunkce a mikrovaskulární postižení [12,13]. Endoteliální dysfunkce je stav poškození funkce endotelu se zvýšenou permeabilitou cévní stěny a nerovnováhou mezi vazodilatačními a vazokonstrikčními eventuálně protrombogenními a antitrombogenními faktory [11]. Na dysfunkci endotelu adherují leukocyty a tato adheze je usnadněna zvýšenou expresí tzv. adhezivních molekul. Tento děj nastává obzvláště v místech s narušeným laminárním prouděním krve a zvýšeným smykovým napětím (např. bifurkace tepen). To má za následek snížení produkce oxidu dusnatého (NO), který má protizánětlivé účinky. Leukocyty (monocyty) migrují dále do intimy, akumulují oxidované LDL částice a mní se na nové buňky. S narůstajícím zužováním lumen koronární tepny se projevuje ischemie myokardu jako kontraktilní dysfunkce myokardu, arytmie a angina pectoris.

1.1.3. Akutní koronární syndromy

Nejčastěji příčinou akutních koronárních syndromů je snížení perfuze myokardu při významné koronární ateroskleróze se současnou přítomností trombu. Tyto komplikace vznikají nejčastěji na tzv. vulnerabilním aterosklerotickém plátu. Vulnerabilní aterosklerotický plát je charakterizován hlavně svým složením. Obsahuje velké lipidové jádro pokryté tenkou fibrozní epikou a přítomností velkého množství zánětlivých buněk (makrofágů a neutrofilů) [11]. Aktivované buňky produkují některé enzymy, například matrixmetalloproteinázu (MMP), což má za následek oslabení fibrozní epiky plátu a tedy větší sklon ke vzniku ruptury. Dalšími změnami, které způsobují progresi nestability aterosklerotického plátu jsou kalcifikace a krvácení do plátu.

1.2. Genové polymorfismy u vybraných genů

Genové polymorfismy jsou varianty sekvence deoxyribonukleové kyseliny (DNA), které se nazývají alely. Místo v sekvenci DNA je polymorfní, pokud výskyt vzácnější alely v populaci přesahuje 1%. Efekty genových polymorfismů mohou být pozitivní, negativní nebo neutrální. Jednonukleotidové polymorfismy (SNP - single nucleotide polymorphism) jsou substituce jedné nukleotidové báze v určitém místě DNA s frekvencí nad 1% v populaci. Jejich celkový počet se odhaduje na 10 milionů a jsou považovány za jednu z příčin multifaktoriálních onemocnění (hypertenze, ateroskleróza apod.) [14]. U těchto onemocnění dochází k současnému ovlivňujícím se působení mnoha relativně vzácných genových variant a interakcí z prostředí a k postupnému rozvoji patologických stavů [11].

1.2.1. Endoteliální NO syntáza (eNOS)

Endoteliální NO syntáza je jednou ze tří izoforem tohoto enzymu, dalšími jsou neuronální NOS a indukibilní NOS. Za normálních podmínek se eNOS podílí na regulaci cévního tonu, proliferace buněk, adheze leukocytů a agregaci trombocytů [15]. Z toho úink vyplývá protektivní vliv eNOS na kardiovaskulární systém. Je známo několik hlavních SNP v genu pro eNOS, které mohou ovlivňovat aktivitu enzymu a produkci NO. Jeden z nich, T-786C polymorfismus má thymin nahrazen cytosinem v nukleotidu -786 v 5' regionu eNOS genu [16]. Tato varianta genu způsobuje redukci aktivity promotoru genu a byla popsána jako rizikový faktor pro ICHS v japonské populaci [16]. Další polymorfismus . opakovací (repeat) 27 pár bazí (bp) je lokalizován v intronu 4 eNOS genu - 4a4b polymorfismus, byla publikována souvislost se změnami v plazmatických hladinách NO [17]. U tohoto polymorfismu jsou publikované údaje o vztahu k ICHS rozporné [18, 19, 20].

1.2.2. Eotaxin

Eotaxin (CCL 11) je chemokin, který má atraktivní vlastnost pro přilnutí krevních buněk, popsán byl v 90. letech 20. století pro eozinofily [21,22] a později i pro neutrofilny, bazofily, makrofágy a prekurzory mastocytů [23, 24, 25]. Tato látka byla identifikována jako jeden z mediátorů zánětu cévní stěny [25]. Gen pro eotaxin je lokalizován na 17. chromozomu v regionu q21.1-q21.2 [26]. Byl zkoumán vliv několika polymorfismů v genu pro eotaxin na rozvoj ICHS. První z nich se nachází v prvním exonu genu, jedná se o 67G>A polymorfismus, vedoucí k nahrazení aminokyseliny alaninu na pozici 23 threoninem. Další dva polymorfismy jsou promotorové: 426C>T a 384A>G [27]. U 67G>A polymorfismu jsou popsány

výsledky ve vztahu k ICHS rozporné [28, 29, 30] a závisí na použitém modelu dědičnosti. U promotorových polymorfismů není dostatek prací na toto téma, v naší práci [31] jsme prozkoumali vztah mezi výskytem a rozsahem ICHS a -426C>T a -384A>G polymorfismy neprokázali. U polymorfismu -67 G>A byl nalezen signifikantní vztah mezi výskytem varianty GG u pacientů s akutním koronárním syndromem.

1.2.3. Matrix metaloproteináza 13

Tato metaloproteináza (MMP-13) je jednou ze skupiny metaloproteináz, což jsou enzymy schopné zničit strukturu kolagenu, a tím se podílejí na rozvoji aterosklerózy, ruptuře aterosklerotického plátu a vzniku aneurysmat [32,33]. Expresí různých podtypů MMP a jejich inhibitorů je rozdílná v závislosti na stupni aterosklerotické léze [34]. Matrix metaloproteináza 13 je aktivní proti typu kolagenu typu I a III [35,36] a má zásadní úlohu v depozici kolagenu v organismu [36]. Hlavním producentem MMP-13 jsou makrofágy v intimě cév [34,37]. U aterosklerotických plátů byly nejvyšší hodnoty MMP-13 a také MMP-1 zjištěny u fibrozních plaků, což odpovídá výzvěmu zastoupení makrofágů [37]. Dalším zvažovaným účinkem MMP-13 je preventivní vliv na aterosklerotický plát na základě zničení molekuly ICAM-1 pomocí aktivity MMP-13 [38]. Tato molekula je spojena s rozvojem aterosklerózy a výskytem ICHS, gen pro MMP-13 je lokalizován na chromozomu 11 (11q22.2-q22.3) [33]. Expresí MMP-13 téměř neprobíhá v normální stěně arterií, ale je zvýšená v narůstajících aterosklerotických lézích [34,37].

1.3. Laboratorní markery u ICHS

Byla popsána řada markerů vztahujících se k výskytu, závažnosti a klinickému průběhu koronární aterosklerózy a ICHS. Vzhledem k tomu, že ateroskleróza je

považována za primární zánětlivý proces, jsou publikované práce zaměřeny zejména na primární a sekundární markery zánětu jako jsou hs-CRP, hladina leukocytů a fibrinogen [39-41]. Z dalších parametrů bychom potom uvést kyseliny močové [42] nebo kreatinin [43].

1.4. Literatura k úvodní části:

1) Nicholls SJ, Hsu A, Wolski K, Hu B, Bayturan O, Lavoie A, Uno K, Tuzcu EM, Nissen SE. Intravascular ultrasound-derived measures of coronary atherosclerotic plaque burden and clinical outcome. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2399-2407.

2) Pekkanen J, Linn S, Heiss G, Suchindran CM, Leon A, Rifkind BM, Tyroler HA. Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N Eng J Med* 1990;322:1700-1707.

3) Bayturan O, Tuzcu EM, Uno K, Lavoie AJ, Hu T, Shreevatsa A, Wolski K, Schoenhagen P, Kapadia S, Nissen SE, Nicholls SJ. Comparison of rates of progression of coronary atherosclerosis in patients with diabetes mellitus versus those with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2010;105:1735-1739.

4) Levin A. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease prior to dialysis. *Semin Dial*. 2003 Mar-Apr;16(2):101-5

5) Collins AJ. Cardiovascular mortality in end-stage renal disease. *Am J Med Sci*. 2003 Apr;325(4):163-7.

6) Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 2007;116:85-97.

7) Matsushita K, Coresh J, Sang Y, Chalmers J, Fox C, Guallar E, Jafar T, Jassal SK, Landman GW, Muntner P, Roderick P, Sairenchi T, Schottker B, Shankar A, Shlipak M, Tonelli M, Townend J, van Zuilen A, Yamagishi K, Yamashita K, Gansevoort R, Sarnak M, Warnock DG, Woodward M, Arnlov J, Consortium CKDP. Estimated glomerular filtration rate and albuminuria for prediction of cardiovascular outcomes: a collaborative meta-analysis of individual participant data. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015;3:514. 525.

8) G.Abraham, O.G.Bhalala, P.I.W.deBakker, S.Ripatti, and M. Inouye, %Towards a molecular systems model of coronary artery disease, +*Current Cardiology Reports*, vol.16, article 488,2014.

9) B. P. Prins, V. Lagou, F. W. Asselbergs, H. Snieder, and J. Fu, %Genetics of coronary artery disease: genome-wide association studies and beyond, +*Atherosclerosis*, vol. 225, no. 1, pp. 1. 10, 2012.

10) Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et. al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 1995; 92:1355-1374

11) Aschermann M a kol., *Kardiologie*, Galén 2004

12) Kitta Y, Obata JE, Nakamura T, Hirano M, Kodama Y, Fujioka D, Saito Y, Kawabata K, Sano K, Kobayashi T, Yano T, Nakamura K, Kugiyama K. Persistent impairment of endothelial vasomotor function has a negative impact on outcome in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:323. 330

- 13) Gulati M, Cooper-DeHoff RM, McClure C, Johnson BD, Shaw LJ, Handberg EM, Zinehl, Kelsey SF, Arnsdorf MF, Black HR, Pepine CJ, Merz CN. Adverse cardiovascular outcomes in women with nonobstructive coronary artery disease: a report from the Women's Ischemia Syndrome Evaluation Study and the St James Women Take Heart Project. *Arch Intern Med* 2009;169:843-850.
- 14) Collins FS, Guyer MS, Charkravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science*, 1997;278:1580-1581
- 15) Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006; 113 (13): 1708-14.
- 16) Nakayama T, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T-786C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 1999;99:2864-70
- 17) Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Wang J, Blangero J, Almasy L, Badenhop RB, Wilcken DEL. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol* 1997;17:3147-53
- 18) Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DEL. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1996;2:41-5
- 19) Gardemann A, Lohre J, Cayci S, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The T allele of the missense Glu298Asp endothelial nitric oxide gene polymorphism is

associated with coronary heart disease in younger individuals with high atherosclerosis risk profile. *Atherosclerosis* 2002;160:167-75

20) Hwang JJ, Tsai CT, Yeh HM, Chiang FT, Hsu KL, Tseng CD, Liao CS, Tseng YZ, Lai LP. The 27-bp tandem repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene is not associated with coronary artery disease in a hospital-based Taiwanese population. *Cardiology* 2002;97:67-72

21) Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Rossi AG, Jose PJ, Williams TJ The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils in vitro and causes their accumulation into the lung in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197:1167-1172

22) Ponath PD, Qin S, Ringler DJ, Clark-Lewis I, Wang J, Kassam N, Smith H, Shi X, Gonzalo JA, Newman W, Gutierrez-Ramos JC, Mackay CR Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J Clin Invest* 1996;97:604-612

23) Yamada H, Hirai K, Miyamasu M, Iikura M, Misaki Y, Shoji S, Takaishi T, Kasahara T, Morita Y, Ito K. Eotaxin is a potent chemotaxin for human basophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:365-368

24) Menzies-Gow A, Ying S, Sabroe I, Stubbs VL, Soler D, Williams TJ, Kay AB (2002) Eotaxin (CCL11) and eotaxin-2 (CCL24) induce recruitment of eosinophils, basophils, neutrophils, and macrophages as well as features of early- and late-phase allergic reactions following cutaneous injection in human atopic and nonatopic volunteers. *J Immunol* 169:2712-2718

- 25) Haley KJ, Lilly CM, Yang JH, Feng Y, Kennedy SP, Turi TG, Thompson JF, Sukhova GH, Libby P, Lee RT. Over expression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation* 2000;102:2185. 2189
- 26) Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Weremowicz S, Sarafi MN, Morton CC, Luster AD. Genomic organization, complete sequence, and chromosomal location of the gene for human eotaxin (SCYA11), an eosinophil-specific CC chemokine. *Genomics* 1997;41:471. 476
- 27) Miyamasu M, Sekiya T, Ohta K, Ra C, Yoshie O, Yamamoto K, Tsuchiya N, Tokunaga K, Hirai K. Variations in the human CC chemokine eotaxin gene. *Genes Immun* 2001;2:461. 463
- 28) Zee RY, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Lee RT, Ridker PM. Threonine for alanine substitution in the eotaxin (CCL11) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2004;175:91. 94
- 29) Sheikine Y, Olsen B, Gharizadeh B, Jatta K, Tornvall P, Ghaderi M. Influence of eotaxin 67G>A polymorphism on plasma eotaxin concentrations in myocardial infarction survivors and healthy controls. *Atherosclerosis* 2006;189:458. 463
- 30) Rosner SA, Ridker PM, Zee RY, Cook NR. Interaction between inflammation-related gene polymorphisms and cigarette smoking on the risk of myocardial infarction in the Physician's Health Study. *Hum Genet* 2005;118:287. 294
- 31) Máchal J, Vazk A, Kincl V, Hlavna M, Bartáková V, Jurajda M, Meluzín J. Association between three single nucleotide polymorphisms in eotaxin (CCL 11)

gene, hexanucleotide repetition upstream, severity and course of coronary atherosclerosis. *J Appl Genet.* 2012 Aug;53(3):271-8

32) H.H. Lu, Z.Q. Sheng, Y. Wang, L. Zhang, Levels of soluble adhesion molecules in patients with various clinical presentations of coronary atherosclerosis. *Chin Med J (Engl)* 123 (2010), 3123-3126

33) A.M. Pendás, I. Santamaría, M.V. Alvarez, M. Pritchard, C. López-Otín, Fine physical mapping of the human matrix metalloproteinase genes clustered on chromosome 11q22.3. *Genomics* 37 (1996), 266-268

34) Y. Yu, T. Koike, S. Kitajima, E. Liu, M. Morimoto, M. Shiomi, K. Hatakeyama, Y. Asada, K.Y. Wang, Y. Sasaguri, T. Watanabe, J. Fan, Temporal and quantitative analysis of expression of metalloproteinases (MMPs) and their endogenous inhibitors in atherosclerotic lesions. *Histol Histopathol* 23 (2008), 1503-1516

35) R.Kato, Y.Momiyama, R.Ohmori, H.Taniguchi, H.Nakamura, F. Ohsuzu, Plasma matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circ J* 69 (2005), 1035-1040.

36) D. Mao, J.K. Lee, S.J. VanVickle, R.W. Thompson, Expression of collagenase-3 (MMP-13) in human abdominal aortic aneurysms and vascular smooth muscle cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; (261), 904-910.

37) G.K. Sukhova, U. Schönbeck, E. Rabkin, F.J. Schoen, A.R. Poole, R.C. Billingham, P. Libby, Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 1999; (99) 2503-2509.

- 38) C. Tar´n, M. Gomez, E. Calvo, J.A. L´opez, C. Zaragoza, Endothelial nitric oxide deficiency reduces MMP-13-mediated cleavage of ICAM-1 in vascular endothelium: a role in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (2009), 2732.
- 39) Taniguchi H, Momiyama Y, Ohmori R, Yonemura A, Yamashita T, Tamai S, Nakamura H, Ohsuzu F. Associations of plasma C-reactive protein levels with the presence and extent of coronary stenosis in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2005; 178:173. 177
- 40) Sabatine MS, Morrow DA, Cannon CP, Murphy SA, Demopoulos LA, DiBattiste PM, McCabe CH, Braunwald E, Gibson CM. Relationship between baseline white blood cell count and degree of coronary artery disease and mortality in patients with acute coronary syndromes: a TACTICS-TIMI 18 (Treat Angina with Aggrastat and determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative strategy-Thrombolysis In Myocardial Infarction 18 trial) substudy. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:1761. 1768.
- 41) Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease. *JAMA* 1998; 279:1477. 1482.
- 42) Jelic-Ivanovic Z, Memon L, Spasojevic-Kalimanovska V, BogavacStanojevic N, Spasic S. Independent association of high serum uric acid concentration with angiographically defined coronary artery disease. *Tohoku J Exp Med* 2007; 211(4):369. 77.
- 43) Cerne D, Kaplan-Pavlovic S, Kranjec I, Jurgens G. Mildly elevated serum creatinine concentration correlates with the extent of coronary atherosclerosis. *Renal Failure* 2000; 22(6):799. 808.

2. Vlastní práce

2.1. Vztah polymorfism eNOS 4a/b a -786T/C k ischemické chorobě srdce, obezitě a diabetes mellitus

Cílem práce bylo zjistit eventuální závislost různých variant eNOS 4a/b a -786T/C polymorfismu k angiograficky prokázané ICHS a k dalším rizikovým faktorům, jako jsou obezita a diabetes mellitus.

2.1.1. Soubor a metodika

V této studii bylo zahrnuto 1313 pacientů, kteří podstoupili koronarografické vyšetření na I.interní kardiologické klinice FN U sv. Anny v Brně. U pacientů bylo dále provedeno základní fyzikální vyšetření, anamnéza, EKG, odběry krevního obrazu a základní biochemické vyšetření. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se zaezením do studie a s odebíráním krevního vzorku na genetickou analýzu a studie byla schválena ústavní etickou komisí. Pacienti se selháním jater, ledvin, těžkou anémií, závažnými neurologickými nebo endokrinními onemocněními a malignitami byli vyloučeni. Po koronarografickém vyšetření byli dále vyloučeni pacienti s nevýznamnou aterosklerózou nebo spastickou anginou pectoris. Následný počet zaezených pacientů byl 1161. Základní klinická charakteristika souboru pacientů je zachycena v tab.1.

Koronarografie

Koronarografické vyšetření bylo provedeno standardní technikou, lékaři specializovanými v invazivní a intervenční kardiologii. Stenotické léze byly hodnoceny ve více projekcích k co nejpřesnější kvantifikaci. S ohledem na morfologii koronárních tepen byli pacienti rozděleni do dvou skupin; 1) pacienti s významnou

koronární aterosklerózou, tj. alespo jedna koronární tepna se stenóza \geq 50%, 2) pacienti s hladkost nnými v n itými tepnami.

Kardiovaskulární rizikové faktory

Rizikové faktory ICHS byly definovány následovně : hypercholesterolemie jako probíhající léčba hypolipidemiky nebo hladina celkového cholesterolu nad 5,0mmol/l při vyšetření, diabetes mellitus jako probíhající léčba inzulinem, perorálními antidiabetiky nebo dietou nebo la ná glykemie nad 7,0mmol/l za hospitalizace, hypertenze jako terapie antihypertenzivy, nebo opakovaná hodnota TK nad 140/90, obezita jako body mass index (BMI) nad 30kg/m².

Genetická analýza

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) byla extrahována z leukocytů v periferní krvi s použitím proteinázy K, a vysrážena isopropanolem a chloroformem. Isolované vzorky DNA byly testovány na polymorfismy eNOS 4a/b a -796T/C pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Tato byla provedena pro polymorfismus 4a/b s použitím DNA primerů 5'-ACCTCAG-CCCAGTAGTG-3'sense, 5'-GCAAGTGTCAGATAGGATT-3' antisense a Taq polymerázy. Produkty PCR měly 573 párů bazí (bp) pro genotyp aa, 604 bp pro bb a 573+604 bp pro ab alely. Tyto fragmenty byly rozdělěny elektroforézou na agarozovém gelu s přidáním ethidium bromidu. Pro analýzu polymorfismu -796T/C byly použity primery 5'-TGGAGAGTGCTGGTGTACCCCA-3' sense, 5'-GCCTCCACCCCCACCCTGTC-3' antisense a Taq polymeráza. Produkty PCR o velikosti 180bp byly inkubovány s restrikní endonukleázou Msp I při 37 °C po dobu 5 hodin. Konečné fragmenty měly 140+40 bp pro TT genotyp, 90+50+40 pro CC genotyp a 140+90+50+40 pro TC alely a byly rozdělěny elektroforézou na agarozovém gelu s ethidium bromidem.

Statistická analýza

Vztahy mezi genotypy a angiograficky potvrzenou ICHS a dalšími rizikovými faktory byly určeny pomocí multivariátní analýzy (Wilksův test), významné závislosti mezi genotypy nebo alelami a onemocněními byly hodnoceny pomocí χ^2 a Fisher exact testu, s použitím software Statistica (verze 8.0, StatSoft, Tulsa, USA).

Počet pacientů / mužů	1161 / 813
Průměrný věk (roky)	64,2
ICHS/ hladkostenné koronární tepny (n)	939 / 222
Hypertenze (n/%)	906 / 78%
Hyperlipoproteinemie (n/%)	712 / 61,3%
Diabetes mellitus (n/%)	348 / 30%
Obezita (n/%)	345 / 29,7%
Celkový cholesterol (průměr \pm SD)	4,53 \pm 1,1 mmol/l
Body mass index (průměr \pm SD)	28,7 \pm 4,2

Tabulka 1. Demografická a klinická charakteristika souboru

2.1.2. Výsledky

Distribuce genotypů v celém souboru byla následující: CC = 13 %, CT = 50 %, TT = 37 %; frekvence T alely 62.5 %, C alely 37.5 % pro -786T/C polymorfismus. Pro intronový 4a/b polymorfismus byla distribuce: aa = 3.8 %, ab = 28.8 %, bb = 67.4 %. Alelová frekvence byla 81.8 % pro b a 18.2 % pro a. Genotypy obou polymorfismů byly v Hardyho-Weinbergově rovnováze.

Multivariánní analýza neprokázala žádnou významnou interakci mezi -786T/C polymorfismem a samotnou ICHS nebo ICHS v kombinaci s diabetem, hyperlipoproteinemií nebo obezitou. Pro 4a/b polymorfismus, nebyla prokázána vztah mezi tímto polymorfismem a samotnou ICHS (Tabulka 2) nebo ICHS v kombinaci s obezitou (Tabulka 3). Naproti tomu byly nalezeny významné interakce mezi genotypy a diabetes mellitus. Genotypy aa+ab byly téměř trojnásobně zastoupeny u diabetiků bez ICHS proti nediabetickým pacientům bez ICHS - OR 2.79; 95% CI 1.27-6.07, P = 0,009, P_{corr} = 0,03 (Tabulka 4).

Celková tabulka četností 4a/b polymorfismu a ICHS

ICHS	4a/b ě ab	4a/b ě bb	4a/b ě aa	Celkem
1	272	632	35	939
2	63	150	9	222
All	335	782	44	1161

Tabulka 2 - Vztah mezi 4a/b polymorfismem a ICHS, podle pacientů podle genotypu; p pro genotypy = 0,964, p pro alely = 0,987

ICHS 1 = ICHS ano ICHS 2 = ICHS ne

Souhrnná tabulka etností . 4 a/b polymorfismus a ICHS a obezita						
Gr.	ICHS	Obezita	4a/b Ě ab	4a/b Ě bb	4a/b Ě aa	ádek celkem
1	1	1	83	190	6	279
2	1	2	189	442	29	660
	Celkem		272	632	35	939
3	2	1	20	45	1	66
4	2	2	43	105	8	156
	Celkem		63	150	9	222
	Sloupec celkem		335	782	44	1161

Tabulka 3 - 4a/b polymorfismus a ICHS a obezita, po ty pacient podle genotypu .
neprokázán významný vztah

ICHS 1 = ICHS ano, ICHS 2 = ICHS ne, Obezita 1 = obézní , obezita 2 = neobézní

Souhrnná tabulka etností . 4 a/b polymorfismus a ICHS a diabetes mellitus						
Gr.	ICHS	Diabetes	4a/b - ab	4a/b - bb	4a/b - aa	ada - celkem
1	1	1	92	215	11	318
2	1	2	180	417	24	621
	Celkem		272	632	35	939
3*	2	1	15	14	1	30
4*	2	2	48	136	8	192
	Celkem		63	150	9	222
	Sloupec celkem		335	782	44	1161

Tabulka 4 - 4a/b polymorfismus a ICHS s diabetes mellitus, po ty pacient podle genotypu

*Významné rozdíly mezi skupinami 3 a 4 pro ab+aa: 16/14 vs. 56/136, OR=2.79, 95% CI 1.27-6.07, P=0,009, Pcorr=0,03

ICHS 1 = ICHS ano, ICHS 2 = ICHS ne, Diabetes 1 = diabetici, Diabetes 2 = pacienti bez diabetu

Byl rovn 0 nalezen vztah mezi 4a/b polymorfismem a ICHS v kombinaci s obezitou a diabetem. Genotyp bb je signifikantn ast jzí u pacient s ICHS, obezitou a diabetem ve srovnání s obézními diabetiky bez ICHS (OR=3.63, 95% CI 1.23-10.67, Pcorr=0.05); a rovn 0 u ischemik bez obesity a diabetu proti obézním diabetik m bez ICHS (OR=3.38, 95% CI 1.21-9.46, Pcorr=0.05). Dále byl nalezen rozdíl u pacient bez ICHS, obesity a diabetu, proti obézním diabetik m bez ICHS (OR=3.59 (1.23-10.50), Pcorr=0.05) (Tabulka 5).

Souhrnná tabulka etností . 4 a/b polymorfismus a ICHS s obezitou a diabetes mellitus

Sk.	ICHS	Diabetes	Obezita	4a/b - ab	4a/b - bb	4a/b - aa	ádek celkem
1	1	1	1	39	87	1	127
2	1	1	2	53	128	10	191
	Celkem			92	215	11	318
3	1	2	1	44	103	5	152
4	1	2	2	136	314	19	469
	Celkem			180	417	24	621
5	2	1	1	10	6	0	16
6	2	1	2	5	8	1	14
	Celkem			15	14	1	30
7	2	2	1	10	39	1	50
8	2	2	2	38	97	7	142
	Celkem			48	136	8	192
	Sloupec celkem			335	782	44	1161

Tabulka 5 - 4a/b polymorfismus a ICHS s obezitou a diabetes mellitus, po ty pacient podle genotyp

Významné rozdily:

Skupina 1 vs 5 pro bb: 87/40 vs. 6/10, OR=3.63, 95% CI 1.23-10.67, Pcorr=0.05

Skupina 4 vs 5 pro bb: 314/155 vs. 6/10, OR=3.38, 95% CI 1.21-9.46, Pcorr=0.05

Skupina 5 vs 7 pro bb : 6/10 vs 39/11, OR =5.91 (1.76-19.88), Pcorr=0.01

Skupina 5 vs 8 pro bb : 6/10 vs. 97/45, OR=3.59 (1.23-10.50), Pcorr=0.05

ICHS 1 = ICHS ano, ICHS 2 = ICHS ne, Diabetes 1 = diabetici, Diabetes 2 = nediabetici, obezita 1 = obézní, obezita 2 = neobézní pacienti

2.1.3. Diskuse

Vztah mezi T-786C polymorfismem a ICHS byl zkoumán v mnoha pracích, ale výsledky jsou stále rozporné [1-4]. Auto i Fatini a kol. [1] zjistili, že genotyp 4a/a je nezávislý predisponující faktor k akutním koronárním syndromům (ACS) (OR 2,5, 95% CI 1,1-5,4, $p=0,02$), ale nebyla nalezena žádná spojitost u polymorfismu eNOS -786CC and 894TT, pouze přítomnost genotypu -786CC zesilovala predispozici k ACS u 4a/a homozygotů.

Metanalýza 26 studií zahrnující 23028 subjektů [2], ukázala významně vyšší riziko ICHS u 4a/a homozygotů, avšak ne u homozygotních nositelů -786C alely. Další práce [4] zjistila více kardiovaskulárních úmrtí u -786TT než u -786 TC + CC nositelů ve follow-up studii na více než tisícovce pacientů. Auto i předpokládají, že tato genetická varianta je spojena vyšší aktivitou NO, což znamená zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku a dusíku. To vede k aktivaci matrix metalloproteináz a následné predispozici k ruptu aterosklerotického plátu. V naší studii, multivariátní analýza neprokázala významnou spojitost mezi -786T/C polymorfismem a samotnou ICHS, nebo ICHS v kombinaci s obezitou a diabetes mellitus.

Vliv intronového polymorfismu 4a/b na plasmatické hladiny NO zkoumalo několik prací [5,6], jejich výsledky však nebyly potvrzeny dalšími studiemi [7,8]. Tento polymorfismus je lokalizován v intronu genu, a je tedy nepravděpodobné, že by ovlivňoval strukturu proteinu, ale může hrát roli jako marker vazebné nerovnováhy s jinými variantami eNOS genu [8,9].

Alvarez a kol. [10] popsali, že CC varianta polymorfismu T-786C zvyšuje riziko ischemické ICHS u kanadské populace, ale 4a/b polymorfismu nikoliv. Naproti tomu, další auto i [1] popsali, že náchylnost ke vzniku ICHS je specificky podpořena kombinací genotypů 4a/a a 786CC.

Vztah mezi intronovým polymorfismem 4a/b a diabetes mellitus byl popsán Galanakisem a kol.[11], auto i našli významnou závislost mezi přítomností a alely a diabetesem, bez ohledu na to jestli jde o diabetes 1. nebo 2. typu. Tyto výsledky jsou v souladu s našimi, kde jsme potvrdili vyšší zastoupení aa a ab genotypu u pacientů s diabetes mellitus bez ICHS ve srovnání s pacienty bez ICHS a bez diabetu. Vztah mezi eNOS genem a diabetesem stále není přesně objasněn. Laboratorní studie s microarray prokázaly, že u inzulin produkujících buněk stimulovaných cytokiny je asi 50% genů ovlivněných cytokiny NO₂-dependentních [12].

Interakce mezi 4a/b polymorfismem a obezitou rovněž nebyla příliš zkoumána, Hofmann a kol. [13] neprokázali významný vztah mezi obezitou nebo zvýšenou hladinou glykemií, krevním tlakem a 4a/b nebo Glu298Asp polymorfismem. Tento náález je rovněž ve shodě s našimi výsledky, kdy obezita ani u pacientů s ICHS ani u kontrol nekorelovala s 4a/b polymorfismem. Limitací naší práce byla selektovaná populace, jednalo se o pacienty přijaté k provedení koronarografie, a další limitací byly menší počet pacientů v některých podskupinách.

Závěrem lze konstatovat, že v naší studii jsme našli významnou závislost mezi 4a/b polymorfismem a diabetes mellitus u pacientů bez ICHS, a dále mezi 4a/b polymorfismem a ICHS v kombinaci s diabetem a obezitou. Nebyla nalezena významná závislost mezi tímto polymorfismem a samotnou ICHS.

2.1.4. Literatura k práci Vztah polymorfism eNOS 4a/b a -786T/C k ischemické chorob srde ní, obezit a diabetes mellitus

- 1) Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Gensini F, Gori AM, Fedi S, Lapini I, Rostagno C, Comeglio M, Brogi D, Gensini G, Abbate R, Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes Am Heart J 2004;147:516-21
- 2) Casas JP, Bautista LE, Humpries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease. Circulation 2004;109:1359-1365
- 3) Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Biagini A, Clerico A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. Clin Chem 2003;49 (3): 389-395
- 4) Rossi GP, Maiolino G, Zanchetta M, Sticchi D, Pedon L, Cesari M, Montemurro D, De Toni R, Zavattiero S, Pessina AC. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype predicts cardiovascular mortality in high risk patients. J Am Coll Cardiol 2006;48:1166-1174
- 5) Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T, Igari J.. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. Biochem Biophys Res Commun. 1998;245:190-193
- 6) Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GAC, Trudinger B, Wang J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. FEBS Lett. 2000;471:45-50

- 7) Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem*. 2000;46:1626-1630
- 8) Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, Cooper JA, Miller GJ, Vallance P, Humphries SE, Hingorani AD. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension*. 2001;38:1054-1061
- 9) Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Kaneshige T, Hiramatsu H, Yoshioka T, Kamitani S, Teraoka H, Nakao K. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786C and missense Glu298Asp variants. *J Investig Med* 2000;48:367-74
- 10) Alvarez R, Gonzales P, Batala A, Reguero JR, Iglesias-Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, Gonzalez I, Alvarez V, Coto E. Association between the NOS3 (-786T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease. *Nitric oxide* 2001;5:343-8
- 11) Galanakis E, Kofteridis D, Stratigi K, Petraki E, Vazgiourakis V, Fragouli E, Mamoulakis D, Boumpas DT, Goulielmos GN. Intron 4 a/b polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with both type 1 and type 2 diabetes in a genetically homogeneous population. *Human Immunol* 2008;69 (4-5):279-283
- 12) Kutlu B, Cardozo AK, Darville MI, Kruhoffer M, Magnusson N, Orntoft T, Eizirik DL. Discovery of gene networks regulating cytokine-induced dysfunction and apoptosis in insulin-producing INS-1 cells, *Diabetes* 52 (2003), p. 2701-2719

13) Hoffmann IS, Tavares-Mordwinkin R, Castejon AM, Alfieri AB and Cubeddu LX. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanic. *J Human Hypertension* (2005) 19, 233-240.

2.2. Souvislost rs640198 polymorfismu v genu pro matrix metaloproteinázu 13 a závažnosti ICHS

Cílem práce bylo zjistit vztah rs640198 polymorfismu k rozvoji ICHS a její závažnosti

2.2.1 Soubor a metodika

Studie zahrnuje 1071 pacientů s podezřením nebo známou ICHS, přijatých na Interní kardiologickou kliniku FN U sv. Anny k provedení koronarografie. Během krátkodobé hospitalizace pacienti podstoupili vyšetření a odběry jak popisováno v předchozí práci (viz výše). Byly definovány 2 skupiny pacientů podle nálezu na koronárních tepnách: 1) pacienti s významnou ICHS (tj. alespoň jedna koronární tepna se stenózou nad 50 %) 2) pacienti s nesignifikantní aterosklerózou, tj. stenózami do 50% a pacienti s hladkostennými koronárními tepnami. Dále byl stanoven celkový počet významných koronárních stenóz bez ohledu na počet postižených tepen. Dále bylo do analýzy zahrnuto 203 dobrovolníků bez anamnézy i rizikových faktorů ICHS z ordinace praktických lékařů.

Analýza MMP-13 polymorfismu (rs640198)

Krevní vzorky získané pro analýzu polymorfismu byly uchovávány při -18°C. Z leukocytů periferní krve byla získána DNA pomocí proteinázy K a vysrážena isopropanolem a chloroformem. Byla hodnocena polymorfismus rs640198, T/G na pozici 6373 v genu pro MMP-13. Genotypizace polymorfismu rs640198 byla provedena pomocí 5' exonukleázy (Taqman®) na přístroji ABI Prism® 7000 (Applied Biosystems, USA). Všechny analýzy byly verifikovány pomocí přímého sekvenování s použitím Big Dye v 1.1 přípravku (Applied Biosystems).

Analýza plazmatických hladin MMP-13

Plazmatické koncentrace MMP-13 byly stanoveny metodou ELISA u 20 zdravých dobrovolníků .

Statistická analýza

Spojité veličiny jsou prezentovány jako medián a rozsah, kategorické veličiny jako procenta. Pro analýzu rozdílů mezi skupinami byly použity neparametrické testy (Mann-Whitney U-test, Kruskal-Wallis ANOVA test nebo Fisherův exaktní test). Distribuce genotypů a alelických četností a jejich rozdíl byla vyhodnocována pomocí χ^2 -square testu. Bonferroniho korekce (Pcorr) byla použita pro mnohočetná srovnání, pokud to bylo nezbytné. Lineární regresní model byl použit k vytvoření multivariantačního modelu vztahů mezi MMP-13 genotypy (GG+GT vs TT), věkem, pohlavím, hladinou HDL cholesterolu, CRP a terapií statiny. Pro analýzy byl použit softwarový balík Statistica verze 9. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za významnou.

2.2.2. Výsledky

Základní popis souboru pacientů podle zkoumaného genotypu je v Tabulce 1, byly sledovány hranice významné rozdíly v MMP-13 polymorfismu mezi pacienty s ICHS a zdravými kontrolami ($P_g = 0,06$, $P_a = 0,04$, Tabulka 1) .

	MMP-13 GG (N = 521)	MMP-13 GT (N = 459)	MMP-13 TT (N = 91)	P-hodnota
V k (medián, rozsah)	41 (12. 94)	41 (18. 104)	40 (18. 61)	0.582
Pohlaví (M/ž, % mu0)	360 (69%)	309 (67%)	65 (71%)	Pg = 0.689 Pa = 0.975
Hyperlipidemie	325 (62%)	270 (59%)	57 (63%)	Pg = 0.490 Pa = 0.547
Hypertenze	418 (80%)	357 (78%)	75 (82%)	Pg = 0.481 Pa = 0.840
Diabetes mellitus	154 (30%)	143 (31%)	30 (33%)	Pg = 0.752 Pa = 0.455
Obezita	172 (33%)	123 (27%)	31 (34%)	Pg = 0.08 Pa = 0.230
Kou ení	66 (13%)	65 (14%)	19 (21%)	Pg = 0.113 Pa = 0.07
Rodinná anamnéza ICHS nebo CMP (do 60 let)	98 (N = 420, 23%)	68 (N = 373, 18%)	14 (N = 75, 19%)	Pg = 0.188 Pa = 0.108
ICHS	398 (76%)	368 (80%)	79 (87%)	Pa = 0.02 Pg = 0.06

Tabulka 1. Popisná statistika hlavních parametrů souboru. ICHS = ischemická choroba srdeční, CMP = cévní mozková příhoda, Pg-pravděpodobnost rozdílu mezi genotypy, Pa- pravděpodobnost rozdílu mezi alelami

Počet postižených tepen	MMP-13-TT	MMP-13-TG	MMP-13-GG	etnost alel T/G	Pg	Pa	Pg-corr	Pa-corr
ICHS1 (N=252)	24 (10%)	101 (40%)	127 (50%)	0,296/0,704	0,104	0,125		
ICHS2 (N=252)	20 (8%)	108 (43%)	124 (49%)	0,294/0,706	0,199	0,139		
ICHS3(N=272)	29 (11%)	127 (46%)	116 (43%)	0,340/0,660	0,01	0,006	0,05	0,03
ICHS4 (N=69)	6 (9%)	32 (46%)	31 (45%)	0,319/0,681	0,176	0,104		
Non-ICHS5 (N=106)	8 (8%)	41 (39%)	57 (53%)	0,269/0,731	0,364	0,508		
Non-ICHS6 (N=120)	4 (3%)	50 (42%)	66 (55%)	0,248/0,758				
Všechny skupiny (N=1071)	91 (8%)	459 (43%)	521 (49%)	0,300/0,700				
Zdravé kontroly (N=203)	21 (10%)	79 (39%)	103 (51%)	0,298/0,702	0,07	0,122		

Tabulka 2 – počty postižených tepen a MMP-13 genotypy

ICHS1-postižení 1 koronární tepny, ICHS2-postižení 2 tepen, ICHS3-postižení 3 tepen, ICHS4-postižení kmene levé věnčité tepny, Non-ICHS5-ateroskleróza věnčitých tepen bez významné stenózy, Non-ICHS6-hladkostěnné věnčité tepny, Pg-pravděpodobnost rozdílu mezi genotypy, Pa- pravděpodobnost rozdílu mezi alelami, Pgcorr, Pacorr- P hodnoty korigované pro vícečetná srovnání

Počet významných stenóz	MMP-13-TT	MMP-13-TG	MMP-13-GG	Frekvence alel T/G	Pg	Pa	Pg-corr	Pa-corr
5(N = 163)	14 (9%)	86 (53%)	63 (38%)	0.350/ 0.750	0.008	0.004	0.04	0.02
4(N = 123)	10 (8%)	54 (44%)	59 (48%)	0.301/ 0.699	0.308	0.188		
3(N = 187)	22 (12%)	67 (36%)	98 (52%)	0.297/ 0.703	0.06	0.174		
2(N = 167)	12 (7%)	76 (46%)	79 (47%)	0.299/ 0.701	0.346	0.162		
1(N = 205)	21 (10%)	85 (42%)	99 (48%)	0.310/ 0.690	0.120	0.07		
0(N = 226)	12 (5%)	91 (40%)	123 (54%)	0.254/ 0.746				
Všechny skupiny (N = 1071)	91 (8%)	459 (43%)	521 (49%)	0.300/ 0.700				

Tabulka 3. Počet významných stenóz a MMP-13 genotypy

Pg-pravděpodobnost rozdílu mezi genotypy, Pa- pravděpodobnost rozdílu mezi alelami

	OR (95% CI)	P - hodnota
Nosi ství T- alely (TT nebo TG)	1,34 (0,76-2,38)	0,31
Pohlaví (0eny vs mu0i)	0.19 (0.10. 0.37)	< 0.001
V k	1.06 (1.04. 1.09)	< 0.001
HDL	0.26 (0.12. 0.56)	< 0.001
CRP	1.03 (1. 1.06)	0.006

Tabulka 4. Multivariantní logistická regresní analýza pro interakce mezi MMP-13 genotypy a rozvojem ICHS, s úpravou na další faktory (HDL . high density lipoprotein, CRP . C reaktivní protein)

Kdy0 byla provedena další stratifikace rizika ICHS skupiny podle po tu posti0ených tepen, byly nalezeny významné rozdíly v distribuci genotypu MMP-13 stejn jako v alelických frekvencích mezi pacienty s posti0ením 3 koronárních tepen (ICHS3) a skupinou s hladkost nnými koronárními tepnami (Non-ICHS6); $P_{gcorr} = 0.05$, $P_{acorr} = 0.03$, Tabulka 2. V kodominantním modelu d di nosti byly genotypy TT a TG spojeny s významn vyzším rizikem posti0ení 3 tepen ve srovnání s pacienty bez aterosklerotických lézí (odds ratio 1,64, 95% CI 1,07-2,53; $P_{corr} = 0.05$, senzitivita 0.57, specificita 0.55). Nebyly pozorovány významné rozdíly mezi zdravými osobami a osobami bez posti0ení koronárních tepen (Tabulka 2).

Pokud byl dán do souvislosti celkový počet stenoz koronárních tepen a MMP-13 polymorfismu, byla nalezen významný vztah mezi distribucí genotyp a etností alel mezi pacienty s 5 a více stenózami ve srovnání s pacienty bez aterosklerotického

postižení (Pg corr = 0,04, Pa corr = 0,02, Tabulka 3). Zvýšené riziko přítomnosti 5 a více stenoz (odds ratio = 1,90, 95% CI 1,26-2,86, P corr = 0,004) bylo pozorováno u TT a TG nositelů. Tento marker má senzitivitu 0,61 a specifitu 0,54. Pokud byl použit lineární regresní model k vytvoření multivariantačního modelu vztahu mezi MMP-13 genotypy (GG+GT vs TT), v něm, pohlavím, hladinou HDL cholesterolu, CRP a statinovou terapií, genotyp MMP-13 nebyl potvrzen jako významný prediktor ICHS (Tabulka 4).

Dále byl analyzován vztah mezi cévními abnormalitami a MMP-13 genotypem v naší skupině pacientů. Přestože aneuryzma aorty se vyskytovala pouze u 7 pacientů (0,7%), byla v této malé skupině zjištěna vyšší frekvence T alely (Pa = 0,03).

Plazmatické hladiny MMP-13 byly analyzovány u zdravých jedinců bez ICHS, byly naměřeny jen nízké hladiny MMP-13 (0.021 ± 0.01 ng/mL). V této skupině nebyly nalezeny žádné významné rozdíly mezi MMP-13 genotypy (P = 0,571).

2.2.3. Diskuze

V jedné z předchozích prací byly popsány dva haplotypy v promotoru genu pro MMP-2, které byly signifikantně více nebo méně zastoupeny u pacientů s onemocněním 3 koronárních tepen ve srovnání s osobami bez ICHS [1]. V současně studii byl rs640198 (intronový) polymorfismus v MMP-13 genu spojený s postižením 3 koronárních tepen a také s přítomností 5 a více stenoz v koronárním řezi. Měly zde zvažovat funkční souvislosti mezi MMP-2 a MMP-13, protože MMP-2 je schopna aktivovat MMP-13 z proMMP-13 a působit vzájemně pomocí svých proteolytických aktivit na extracelulární matrix [2]. Uodříve bylo popsáno, že remodelace cévní stěny během aterosklerotického procesu (kolagen-elastin) je určena poměrem celkové MMP/TIMP. Tato souvislost byla potvrzena pokusem na potkanech [3]. Na základě této práce lze konstatovat, že nejen exprese MMP nebo hladiny MMP a jejich

inhibitor v krvi, ale také charakteristiky krevního toku ovlivní proces remodelace a progresi aterosklerózy [3]. Dalším aspektem důležitosti MMP-13 je prenatální role v průběhu organogeneze kardiovaskulárního systému [4]. Matrix metalloproteináza - 13 (RNA i protein) byla výrazně potlačena během druhého a třetího trimestru těhotenství, v porovnání s množstvím metaloproteináz jako celku, které jsou vytvářeny v decidua a trofoblastu [4]. To by mohlo znamenat, že MMP-13 účinkuje především v raných fázích vývoje kardiovaskulárního systému [4]. Předpokládaná snížená funkce T alely v rs640198 MMP-13 polymorfismu je spojena se ztrátou lokusu transkripčního faktoru Pbx-1 a může mít vztah ke snížené expresi MMP-13 během raných fází vývoje srdce a kardiovaskulárního systému [5]. Podle této hypotézy a na základě zde prezentovaných výsledků je otázkou, zda je možný vztah mezi ICHS a vrozenými abnormalitami kardiovaskulárního systému, i když s nízkou klinickou významností. Při použití multidetektorové výpočetní tomografie jako screeningu ICHS u velkého souboru pacientů (N=4 543) byly nalezeny neaterosklerotická postižení kardiovaskulárního systému u 200 pacientů (4,4%) [6]. Nejčastější koronární anomálie byly: vrozené variety koronárních tepen (38%, odstup pravé koronární tepny z levého koronárního sinu), aneuryzma ascendentní aorty > 40mm (22%), hypertrofická kardiomyopatie s apikálním zesílením myokardu (14%), chlopenní vady (8%), vrozené srdeční vady, jako defekt síňového septa (6%), a dále non-kompaktní kardiomyopatie LK, myxom levé síně i aneuryzma hrotu LK (po 2%). V naší studii byla frekvence T alely vyšší u pacientů s anamnézou plicní embolie a aneuryzmatu aorty. Tento náález je v souladu se souasnými poznatky, že polymorfismy v genech pro MMP-2, MMP-3, MMP-13 a ELN se mohou nezávisle podílet na patogenezi aneuryzmatu abdominální aorty [7,8]. Strukturální změny v ošlní stěně jsou spojeny se zvýšenou expresí MMP-2, MMP-9 a MMP-13 u ošlní dilatace a

trombembolické choroby mohou svědčit pro možnou roli těchto metaloproteináz v patogenezi těchto stavů [9].

U jiných polymorfismů v dalších genech pro MMP, zvláště MMP-3 a MMP-9, byl už dříve popsán jejich vztah ke vzniku koronární aterosklerozy a/nebo k její progresi, ke vzniku restenozy po koronárních intervencích a k rozvoji nestability aterosklerotických plátů vedoucím k infarktu myokardu [10-13]. Určité genotypy MMP-1, MMP-3 a MMP-9 s nižší transkripční aktivitou byly rovněž spojeny s výskytem selhání arteriovenózních shuntů u hemodialyzovaných pacientů, což může být způsobeno vztahem nahromaděním extracelulární matrix vedoucím ke stenóze shuntu [14]. O souvislosti MMP-13 a ICHS u lidí bylo dosud známo velmi málo. Exprese MMP-2 i MMP-13 byla popsána rozdílná v aortě, karotidách, femorální tepně a dolní duté žíle na zvířecím modelu [3], což zejména snižuje prediktivní hodnotu hladiny MMP-13 v krvi. V další publikované práci byla hladina MMP-8 spojena s výskytem ICHS [15]. Později byla publikována komplexní analýza komponent extracelulární matrix v rámci cévního proteomu [16]. Proteomické metody umožnily identifikaci proteinů přítomných v extracelulárním prostoru, nových glykoproteinů a objasnění řízení proteolytické aktivity ve tkáních interakcí proteolytických enzymů a degradací produktů. To může teoreticky být podkladem pro nové terapeutické přístupy v léčbě kardiovaskulárních nemocí [16].

Závěrem lze konstatovat, že nositelství T alely v rs640198 polymorfismu genu pro MMP-13 bylo v této studii spojeno se závažností ICHS vyjádřenou počtem postižených koronárních tepen stejně jako celkovým počtem stenóz v koronárním řečišti. Je však potřeba dalšího výzkumu role MMP-13 v patogenezi abnormalit kardiovaskulárního systému a aterosklerotického postižení.

2.2.4. Literatura k práci: Souvislost rs640198 polymorfismu v genu pro matrix metaloproteinázu 13 a závažnosti ICHS

1) A. Vasku, M. Goldbergová, L. Izakovicová Hollá, L. Sisková, L. Groch, M. Beránek, S. Tschöpova, V. Znojil, J. Vácha, A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease, *Matrix Biol* 22 (2004), 585-591.

2) J.L. Beaudoux, P. Giral, E. Bruckert, M.J. Foglietti, M.J. Chapman, [Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. Therapeutic aspects]. *Ann Biol Clin (Paris)* 61 (2003), 147-58.

3) P. Basu, U. Sen, N. Tyagi, S.C. Tyagi, Blood flow interplays with elastin: collagen and MMP: TIMP ratios to maintain healthy vascular structure and function. *Vasc Health Risk Manag* 6 (2010), 215-28.

4) Anacker J, Segerer SE, Hagemann C, Feix S, Kapp M, Bausch R, Kämmerer U. Human decidua and invasive trophoblasts are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod*. 2011 Oct;17(10):637-52.

5) C.P. Chang, K. Stankunas, C. Shang, S.C. Kao, K.Y. Twu, M.L. Cleary, Pbx1 functions in distinct regulatory networks to pattern the great arteries and cardiac outflow tract. *Development* 135 (2008), 3577-3586.

6) T. Knickelbine, J.R. Lesser, T.S. Haas, E.R. Brandenburg, B.K. Gleason-Han, B. Flygenring, T.F. Longe, R.S. Schwartz, B.J. Maron, Identification of unexpected nonatherosclerotic cardiovascular disease with coronary CT angiography. *JACC Cardiovasc Imaging* 2 (2009), 1085-1092.

- 7) K.D. Rizas, N. Ippagunta, M.D. 3rd Tilson, Immune cells and molecular mediators in the pathogenesis of the abdominal aortic aneurysm. *Cardiol Rev* 17 (2009), 201-210.
- 8) C. Saracini, P. Bolli, E. Sticchi, G. Pratesi, R. Pulli, F. So, C. Pratesi, G.F. Gensini, R. Abbate, B. Giusti, Polymorphisms of genes involved in extracellular matrix remodeling and abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 55 (2012), 171-179.
- 9) C. Irwin, A. Synn, i. Kraiss, O. Zhang, M.M. Griffen, G.C. Hunter, Metalloproteinase expression in venous aneurysms. *J Vasc Surg* 48 (2008), 1278-1285.
- 10) M.P. de Maat, J.W. Jukema, S. Ye, A.H. Zwinderman, P.H. Moghaddam, M. Beekman, J.J. Kastelein, A.J. van Boven, A.V. Bruschke, S.E. Humphries, C. Kluft, A.M. Henney, Effect of the stromelysin-1 promoter on efficacy of pravastatin in coronary atherosclerosis and restenosis. *Am J Cardiol* 83 (1999), 852-856.
- 11) S. Fallah, M. Sei, A. Ghasemi, M. Firoozrai, A. Samadikuchaksaraei, Matrixmetalloproteinase-9 and paraoxonase 1Q/R192 gene polymorphisms and the risk of coronary artery stenosis in Iranian subjects. *J Clin Lab Anal* 24 (2010), 305310.
- 12) M. Sei, S. Fallah, M. Firoozrai, Influence of genetic polymorphism in matrixmetalloproteinase-3 on extent of coronary atherosclerosis and risk of coronary artery stenosis. *ArchMed Res* 40 (2009), 600-604.
- 13) B. Zhang, S. Ye, S.M. Herrmann, P. Eriksson, M. de Maat, A. Evans, D. Arveiler, G. Luc, F. Cambien, A. Hamsten, H. Watkins, A.M. Henney, Functional

polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 99 (1999), 1788-1794.

14) C.C. Lin, W.C. Yang, M.Y. Chung, P.C. Lee, Functional polymorphisms in matrix metalloproteinases-1, -3, -9 are associated with arteriovenous, stula patency in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 5 (2010), 1805-1814.

15) R.Kato, Y.Momiyama, R.Ohmori, H.Taniguchi, H.Nakamura, F. Ohsuzu, Plasma matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circ J* 69 (2005), 1035-1040.

16) A.Didangelos, X.Yin, K.Mandal, M.Baumert, M.Jahangiri, M. Mayr, Proteomics characterization of extracellular space components in the human aorta, *MolCellProteomics* 9(2010), 2048-2062.

2.3. Vztah mezi třemi jednonukleotidovými polymorfismy v genu pro eotaxin (CCL 11), hexanukleotidovým opakujícím se zcelem a závažností ICHS

Cílem práce bylo zjistit závislost mezi 3 jednonukleotidovými polymorfismy (promotorovými 426C>T a 384A>G, v prvním exonu 67G>A), hexanukleotidovým zcelem (GAAGGA)_n 10.9 kb a rozvojem koronární aterosklerozy

2.3.1 Soubor a metodika

Bylo zahrnuto 1050 pacientů z I.interní kardiologické kliniky FN U sv. Anny v Brně přijatých k provedení koronarografie. Ischemická choroba srdce byla definována jako alespoň jedna stenóza koronární tepny \geq 50% v jakémkoliv segmentu. Skupiny s postižením 1, 2 nebo 3 koronárních tepen byly definovány jako postižení hlavních segmentů ramus interventricularis anterior, ramus circumflexus nebo pravé koronární tepny se stenózou \geq 50%. Pacienti s hladkostěnnými tepnami byli použiti jako kontrolní skupina, pacienti se stenózou do 50% byli vyřazeni, stejně jako pacienti s vazospastickou anginou a po srdeční transplantaci. Pacienti s bronchiálním astmatem byli rovněž vyřazeni pro možný vliv eotaxinových polymorfismů na toto onemocnění. Ve zbylé skupině 933 pacientů bylo 760 angiograficky prokázanou ICHS a 172 bylo zařazeno jako kontroly s hladkostěnnými koronárními tepnami. Podle klinických příznaků a laboratorních hodnot byli pacienti rozděleni na skupinu se stabilní anginou pectoris (N=529) nebo s akutním koronárním syndromem (AKS). Ode všech subjektů byl získán písemný informovaný souhlas a studie byla schválena ústavní etickou komisí.

Laboratorní metody

Genová DNA byla izolována z leukocytů periferní krve standardní metodou s použitím fenol-chloroformové extrakce. Byly zkoumány 2 jednonukleotidové

polymorfismy (SNP) v promotoru genu pro eotaxin a jeden SNP v exonu 1: C>T v pozici 426 (rs16969415), A>G v pozici 384 (rs17809012) a SNP 67 G>A (rs1129844). Jednonukleotidové polymorfismy byly analyzovány pomocí polymerázové reakce (PCR) a následně restrikční enzymové analýzy. Každá PCR byla provedena v objemu 25 μL s použitím Taq polymerázy (Finzymes). Všechny restrikční enzymové analýzy byly provedeny v objemu 10 μL. Restrikční analýzy C>T v pozici 426 a A>G v pozici 384 byly provedeny s použitím TaqI restrikčního enzymu podle instrukcí výrobce (NEB, UK). V případě SNP C>T 426 byla délka výsledných fragmentů 204 a 41 bp pro -426C, 245 bp pro -426T. U polymorfismu A>G 384 délka fragmentů byla 204 bp pro 384A, 184 bp pro -384G. Polymorfismus 67G>A byl stanoven pomocí restrikční endonukleázy BsrI podle pokynů výrobce (NEB, UK). Genotypy byly určeny pomocí elektroforézy. Analýza repetitivních sekvencí byla provedena pouze u 472 subjektů. Přípravky pro PCR reakci byly následující: Taq® polymeráza s Taq® 10X PCR Buffer (bez Mg²⁺, Fermentas), 1.5 mM Mg²⁺, dNTPs (dATP + dCTP + dGTP + dTTP, 200 μM každé, Fermentas), poátě ní primer (5'-AGCCTAACATTCAAGCCTCACAA-3'), reverzní primer (5'-GACCACAGCCCAAGTTTCTTTC-3'), 10 pmol/ l každé v 20 l reakčním objemu. Reakční podmínky PCR: 95 °C/1 min, 30x (95 °C/30 s, 58 °C/30 s, 72 °C/60 s, 72 °C/30 min, 4 °C/ ochlazení). Reakční směs 10 μL pro analýzu fragmentů se skládala z 0.5 l GeneScan® 400 HD ROX® Size Standard (Applied Biosystems), 0.5 l of 10x edněho PCR produktu a 9 l HiDi® Formamide (Applied Biosystems). Vzorek byl pak denaturován po dobu 5 minut v 95°C následované 5 minutovou inkubací na ledu. Analýza fragmentů byla provedena pomocí 4-kapilárního automatického analyzátoru ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). Výsledky byly analyzovány pomocí GeneMapper v. 3.5 software (Applied Biosystems).

Pro další hodnocení byly hodnoceny sekvence n8 repeticí jako krátké, 9 repeticí jako dlouhé. Tato hrani ní hodnota odpovídá mediánu celkového po tu alel.

Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí s pou0itím programu Statistica (StatSoft, verze 11). Fisher v exaktní test byl pou0it pro kategorická data, Mann-Whitney U-test pro spojité veli iny. Logistická regrese byla pou0ita pro výpo et odds ratio a interval spolehlivosti. Byly srovnány frekvence genotyp ve skupinách s akutním koronárním syndromem, stabilní ICHS a kontrolní skupin . Pro vyhodnocení genetického vlivu na rozsah ICHS byli srovnáváni pacienti s posti0ením jedné v n ité tepny proti t m s posti0ením 3 tepen. Proto0e nebyly známy 0ádné informace o vlivu r zných genotyp v eotaxinovém genu na ICHS, byly zkoumány 4 r zné modely d di nosti: alelový aditivní (jedna alela proti ostatním), genotypový dominantní (ast jzí homozygot proti nosi i vzácn jzí alely), recesivní (vzácn jzí homozygot proti nosi i obvyklejší alely) a kodominantní model (oba homozygoti pro heterozygot m). Kodominantní model je charakterizován výhodou heterozygot proti homozygot m [1,2]. U polymorfism 67 G>A a 426 C>T nebyl pou0it recesivní model z dvodu nízkého po tu vzácných homozygot v ka0dé skupin , stejný p ístup byl pou0it v p ípad hodnocení vlivu repetitivních sekvencí. Bonferroniho test byl pou0it pro mnoho etné testování korekcí v p ípad hodnocení vlivu r zných polymorfism .

2.3.2. Výsledky

Charakteristika souboru pacient je popsána v Tabulce 1. Dva ze zkoumaných SNP (-426C>T a 67G>A) byly v Hardyho-Weinbergov rovnováze. Mezi genotypy byla významná vazebná nerovnováha ($p < 0.005$). Frekvence -384A>G nebyly v Hardyho-Weinbergov rovnováze.

	Pacienti s ICHS	Kontroly
Celkem (mu0i)	760 (562)	173 (88)
Ku áci	107 (14,1%)	18 (10,4%)
V k (roky)	66 (59-74)	61 (54-67)
Systolický krevní tlak (mmHg)	140 (130-150)	135 (120-140)
Cholesterol (mmol/l)	4,30 (3,12-5,70)	4,73 (4,09-5,46)
HDL (mmol/l)	1,08 (0,93. 1,26)	1,27 (1,07. 1,60)
LDL (mmol/l)	2,35 (1,92. 3,09)	2,75 (2,20. 3,21)
Triacylglyceroly (mmol/l)	1,52 (1,19. 2,08)	1,27 (0,86. 1,89)
Diabetes mellitus (% z celkového po tu)	259 (34,1%)	23 (13,3%)
C-reaktivní protein	4,2 (1,9-8,3)	2,6 (1,3-4,8)

Tabulka 1. Základní charakteristika souboru. Všechny spojité veli iny s normálním rozlo0ením jsou prezentovány jako medián (dolní-horní kvartil).

Po et opakování	Akutní ICHS	Chronická ICHS	Kontroly
3	28 (12.4 %)	84 (16.9 %)	34 (15.3 %)
6	30 (13.3 %)	52 (10.5 %)	34 (15.3 %)
7	4 (1.7 %)	8 (1.6 %)	3 (1.4 %)
8	28 (12.4 %)	72 (14.5 %)	24 (10.8 %)
9	51 (22.6 %)	79 (15.9 %)	34 (15.3 %)
10	55 (24.3 %)	119(24.0 %)	57 (25.7 %)
11	30 (13.3 %)	82 (16.5 %)	36 (16.2 %)
celkem	226	496	222

Tabulka 2. Po et (GAAGGA)n hexanucleotidových opakování ve zkoumaném souboru

Počet (GAAGGA)_n opakování v našem souboru byl v rozsahu 3 až 12. Žádný pacient neměl 4 nebo 5 opakování. Frekvence rozdílných alel je uvedena v Tabulce 2. Distribuce tří SNP a krátké/dlouhé varianty (GAAGGA)_n je uvedena v Tabulce 3. Rozdíly mezi pacienty s ICHS a kontrolami nebyly významné, p hodnoty jsou prezentovány v Tabulce 4. Hodnoty p ukazující rozdíly mezi akutní a chronickou ICHS (CHICHS) jsou uvedeny v Tabulce 5. Exonový polymorfismus 67 G>A byl významně spojen s formou ICHS, pacienti s GG genotypem byli významně zastoupeni ve skupině akutních koronárních syndromů ve srovnání se skupinou se stabilní ICHS (p=0.0011, p_{corr}=0.0044, OR=1.86, 95 % CI 1.28-2.69), a také ve srovnání s kontrolní skupinou (p=0.0075, p_{corr}= 0.03, OR=1.87, 95 % CI 1.19-2.95). Závislost byla významněji prokázána použitím kodominantního modelu (AKS vs. CHICHS: p=0.0004, p_{corr}=0.0016, OR=1.97, 95 % CI 1.34-2.90, AKS vs. kontroly: p=0.0029, p_{corr}=0.0116, OR= 2.05, 95 % CI 1.28-3.27) (Graf 1). U žádných dalších zkoumaných alel nebyl zaznamenán významný rozdíl. Počet postižených tepen u různých genotypů je uveden v Tabulce 6. Hodnoty p popisující rozdíly mezi pacienty s postižením jedné koronární tepny a tří tepen prezentuje Tabulka 7.

SNP skupina	(GAAGGA) _n long/short*			67 G>A			426 C>T			384 A>G			Celkem
	S/S	S/L	L/L	GG	GA	AA	CC	CT	TT	AA	AG	GG	
AKS	17	55	39	185	41	5	206	24	1	62	124	45	231
CHICHS	47	114	79	362	158	9	449	74	6	119	292	118	529
Kontroly	13	34	22	118	53	2	150	21	2	42	97	34	173
Celkem	77	203	140	665	252	16	805	119	9	223	513	197	933

Tabulka 3. Distribuce 3 SNP a dlouhé/krátké varianty (GAAGGA)_n

hexanukleotidového opakování u pacientů s akutním koronárním syndromem, chronickou ICHS a kontrolami (* počet (GAAGGA)_n byl stanoven jen u části souboru)

Model	(GAAGGA) _n	-426C>T	384 A>G	67 G>A
dílnosti	long/short*			
Dominantní	0.8890	0.9032	0.9214	0.3519
Aditivní	0.8507	1.0000	0.7209	0.4568
Recesivní	0.8663	-	0.6799	-
Kodominantní	0.8957	0.8012	0.7996	0.2550

Tabulka 4. Hodnoty p ve vztahující se k frekvencím 3 SNP a po tu (GAAGGA)_n opakování, ICHS pacienti vs. kontroly. Nebyl nalezen žádný rozdíl mezi ICHS pacienty (n=760) a kontrolami (n=173).

Model	(GAAGGA) _n	-426C>T	384 A>G	67 G>A
dílnosti	long/short*			
Dominantní	0.7161	0.1371	0.1965	0.0011
Aditivní	0.4598	0.0887	0.2001	0.0048
Recesivní	0.3749	-	0.4422	-
Kodominantní	0.7318	0.1961	0.7514	0.0004

Tabulka 5. Hodnoty p ve vztahující se k frekvencím 3 SNP a po tu (GAAGGA)_n opakování, pacienti s AKS (n=231) vs. CHICHS (n=529). Byl nalezen významný rozdíl v četnosti 67 G>A genotyp mezi pacienti s AKS a CHICHS. Skupina s AKS se rovněž významně lišila od kontrolních subjektů bez ICHS.

SNP	(GAAGGA) _n			67 G>A			426 C>T			384 A>G			Celkem
	long/short*			GG	GA	AA	CC	CT	TT	AA	AG	GG	
Počet postižených tepen	S/S	S/L	L/L	GG	GA	AA	CC	CT	TT	AA	AG	GG	
1	12	53	44	154	72	3	199	28	2	53	128	48	229
2	22	61	41	174	59	5	207	30	1	55	129	54	238
3	30	55	33	219	68	6	249	40	4	73	159	61	293
Celkem	64	169	118	547	199	14	655	98	7	181	416	163	760

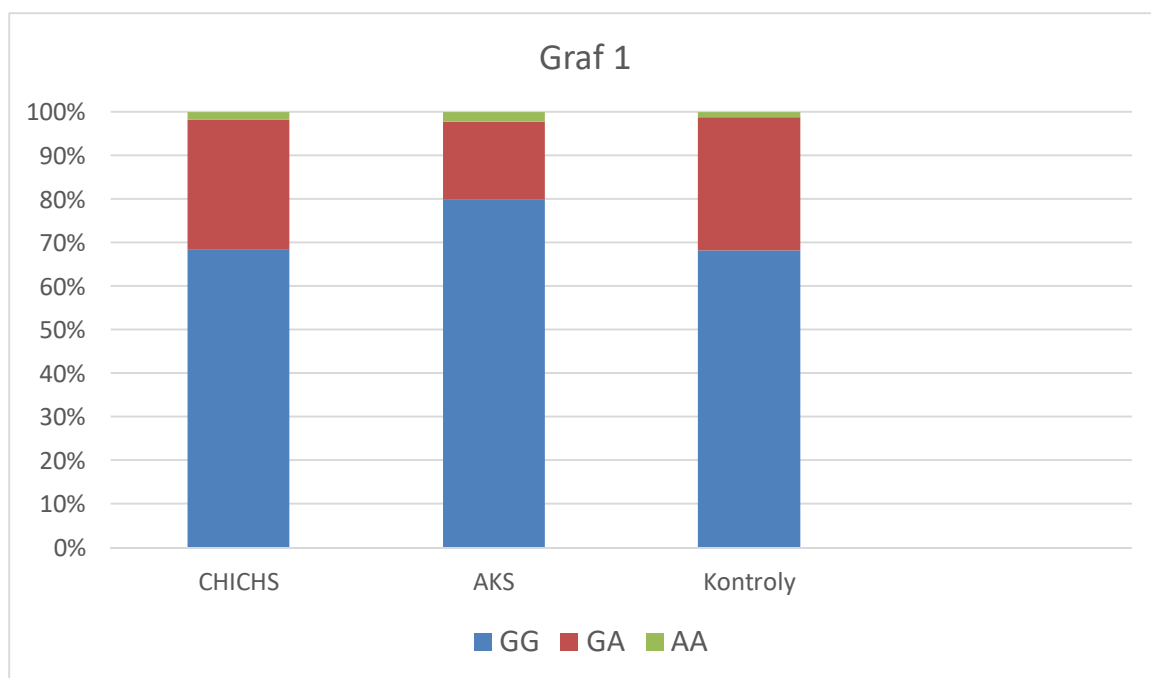
Tabulka 6. Distribuce tří SNP a dlouhé/krátké varianty (GAAGGA)_n

hexanukleotidového opakování u pacientů s postižením 1, 2 nebo 3 koronárních tepen.

Model dědičnosti	(GAAGGA) _n long/short*	-426C>T	384 A>G	67 G>A
Dominantní	0.0512	0.6133	0.6807	0.0640
Aditivní	0.0043	0.4120	0.8029	0.1394
Recesivní	0.0060	-	1.0000	-
Kodominantní	0.7912	0.6949	0.7237	0.0370

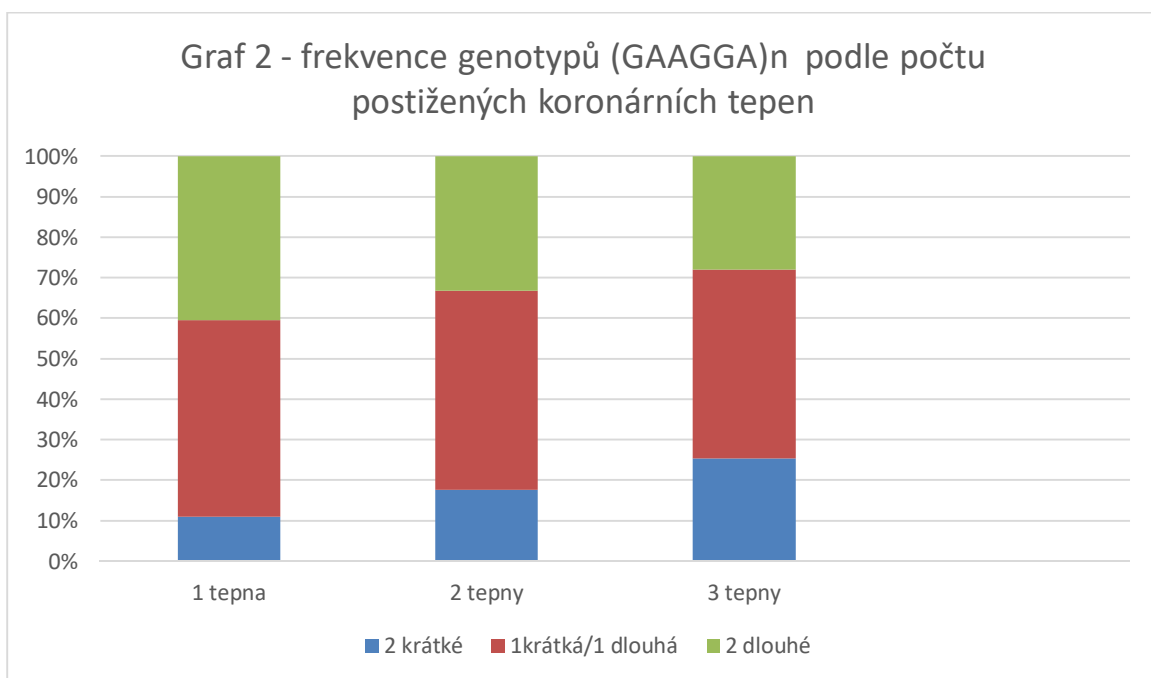
Tabulka 7. Hodnoty p vztahující se k těm SNP a počtu (GAAGGA)_n opakování, pacienti s onemocněním 1 koronární tepny vs pacienti s onemocněním 3 tepen.

Krátká varianta (GAAGGA)_n byla spojena s postižením 3 tepen. U 67 G>A byl rovněž zachycen trend, který byl po korekci nevýznamný. Frekvence genotypů u postižení 2 tepen byla v obou případech mezi hodnotami pro 1 a 3 tepny.



Graf 1. četnosti 67 G>A genotypů a klinické formy ICHS. Graf ukazuje výzší frekvenci GG homozygotů u pacientů s akutním koronárním syndromem ve srovnání s kontrolami [$p=0.0075$, $p(\text{corr}) = 0.03$] a skupinou s chronickou ICHS [$p=0.0011$, $p(\text{corr}) = 0.0044$]. V kodominantním modelu, byl GA heterozygotní genotyp méně častý u pacientů s AKS ve srovnání jak s kontrolní skupinou [$p=0.0029$], $p(\text{corr}) = 0.0116$ tak se skupinou s CHICHS [$p=0.0004$, $p(\text{corr}) = 0.0016$].

Frekvence krátkých variant (GAAGGA)n opakování vzr. stal s počtem postižených tepen. Nosiči obou krátkých alel měli větší postižení 3 koronárních tepen ve srovnání s nosiči alespoň jedné dlouhé alely (1 vs. 3 postižené tepny: $p=0.006$, $p_{corr}=0.024$, $OR=2.76$, 95 % CI 1.33-5.71). A naopak zde byl trend pro méně postižených tepen u nosičů 2 dlouhých variant. Alelově závislý efekt (předpokládající aditivní efekt 2 krátkých/dlouhých variant na fenotyp) byl ještě více významný ($p_{corr}=0.017$) (Graf 2). Rovněž byl zachycen trend u nosičů GG genotypu pro postižení více tepen (1 vs. 3 postižené tepny: $p=0.064$), tento trend byl více zjevný při použití kodominantního modelu, i když hodnota $p=0,037$ nebyla po Bonferroniho korekci významná. četnost genotypů u postižení 2 tepen byla mezi ostatními 2 skupinami. žádný ze dvou promotorových SNP (426 C>T nebo 384 A>G) neměl významný vztah k typu ICHS nebo počtu postižených tepen. Hlavním výsledkem je tedy efekt (GAAGGA)n opakování na počet postižených tepen a vztah 67 G>A polymorfismu k výskytu akutního koronárního syndromu. žádný vztah k ICHS nebyl nalezen pro polymorfismy 426 C>T nebo 384 A>G.



2.3.3. Diskuze

Vztah hladiny eotaxinu, různých variant jeho genu a zánětlivého procesu v cévní stěně byl zkoumán od první dekády 21. století. V mnoha studiích byla zvýšená hladina eotaxinu spojena s přítomností a rozsahem ischemické choroby srdeční [3-7], ale jiné práce tuto souvislost nepotvrdily [8,9]. Exprese eotaxinu je lokálně zvýšena v místech zánětu cévní stěny [10], a jeho hladina je rovněž zvýšena v krvi u pacientů s akutním koronárním syndromem [11]. Kromě svého atraktivního účinku na leukocyty stimuluje tento protein i migraci buněk hladkého svalstva z medie do intimy u naruzené arteriální stěny [12]. Tento proces je považován za jeden z hlavních kroků v progresi aterosklerozy a restenozy [13,14]. Také 67 G>A polymorfismus byl zkoumán ve vztahu k ICHS s různými výsledky. V prospektivní studii Zee a kol. [15] popsali vliv AA genotypu na riziko infarktu myokardu, což není v souladu s našimi výsledky. Avšak tato studie použila recesivní model dědičnosti, četnost A alely byla nevýznamná ani u kontrol ve srovnání s pacienty s AKS pokud byl použit dominantní model. V naší studii nízký počet AA homozygotů nedovolil použití validního recesivního modelu. Nejvýznamnější spojitost byla nalezena při použití kodominantního modelu, tj. že heterozygotní populace má nižší výskyt AKS než AA i GG homozygoti dohromady. Tento model dědičnosti má nejlepší výsledky, když byli pacienti s AKS srovnáváni s pacienty s CHICHS ($p=0.0004$, $p_{\text{corr}}=0.0016$, $OR=1.97$, 95 % CI 1.34-2.90) i s kontrolami ($p=0.0029$, $p_{\text{corr}}=0.0116$, $OR=2.05$, 95 % CI 1.28-3.27). Dominantní model (A alela vs GG homozygoti) ukazoval jen mírně slabší významnost. Vzhledem k tomu, že nebyl nalezen významný rozdíl mezi pacienty s chronickou ICHS a kontrolami, tato práce ukazuje větší náchylnost pacientů s genotypem 67 GG ke vzniku AKS. Akutní koronární syndrom je, na rozdíl od chronické ICHS, většinou spojen s rupturou aterosklerotického plátu [16], a ruptura

plátu je zase spojena s v t z í z á n t l i v o u reakcí [17,18], proto se dá o e k á v a t v t z í v l i v g e n e t i c k ý c h v a r i a n t o v l i v ů j í c h z á n t l i v o u o d p o v ů o r g a n i s m u . D a l š í s t u d i e o v z e m n e p o t v r d i l y z á v i s l o s t 67 G>A p o l y m o r f i s m e m a I C H S , i k d y 0 g e n e t i c k é v a r i a n t y o v l i v ů v a l y h l a d i n u c i r k u l u j í c í h o e o t a x i n u [19,20]. T y t o p r á c e s e a l e n e z a b ý v a l y k l i n i c k o u f o r m o u I C H S , p o u z e j e j í p ů t o m n o s t í i r o z s a h e m . K d y 0 j s m e v t é t o p r á c í z k o u m a l i s o u v i s l o s t m e z i r o z s a h e m I C H S v e s m y s l u p o s t í 0 e n ý c h t e p e n , p o s k y t o v a l k o d o m i n a n t n í m o d e l n e j l e p š í v ý s l e d k y . v e s r o v n á n í s h e t e r o z y g o t y m l i p a c i e n t i s I C H S s g e n o t y p y A A a G G a s t j í v ý s k y t p o s t í 0 e n í 3 t e p e n p r o t i p a c i e n t s p o s t í 0 e n í m j e d n é t e p n y (p = 0 . 0 3 7) . T o t o d á l e p o d p o r u j e h y p o t é z u , 0 e G A k o m b i n a c e j e v ý h o d n j í v e s m y s l u r o z v o j e I C H S . P r o m o t o r o v é p o l y m o r f i s m y - 4 2 6 C > T a 3 8 4 A > G , n e b y l y d o p u b l i k a c e t é t o p r á c e b l í 0 e z k o u m á n y v e v z t a h u k I C H S . V n a z í s t u d i i j s m e s o u v i s l o s t m e z i t m i t o p o l y m o r f i s m y a I C H S n e p o t v r d i l i , a l e b y l n a l e z e n v ý z n a m n ý v z t a h m e z i - 4 2 6 C > T p o l y m o r f i s m e m a l a b o r a t o r n í m i m a r k e r y m e t a b o l i c k é h o s y n d r o m u u p a c i e n t ů s I C H S , C C h o m o z y g o t i m l i v ý z n a m n v y z ů z í p l a z m a t i c k é h l a d i n y k y s e l i n y m o ů v é (p < 0 . 0 0 1) , f i b r i n o g e n u , t r i g l y c e r i d , a C R P (p < 0 . 0 5) , m l i v y z ů z í t l e s n o u h m o t n o s t (p < 0 . 0 1) a b o d y m a s s i n d e x (p < 0 . 0 5) . T y t o a b n o r m a l i t y j s o u o b e c n p o v a 0 o v á n y z a p r o z á n t l i v é [2 1] . R o v n 0 s t u d i e z k o u m a j í c í v z t a h h e x a n u k l e o t i d o v é h o o p a k o v á n í (G A A G G A) n n e b y l a d o p u b l i k a c e t é t o p r á c e z v e e j n a . V ý s l e d e k t é t o p r á c e u k a z u j e n a m o 0 n ý v l i v p o t u o p a k o v á n í n a p o e t p o s t í 0 e n ý c h k o r o n á r n í c h t e p e n . P o d l e n k t e r ý c h ů d a j ů z l i t e r a t u r y m 0 e m í t p o e t o p a k o v á n í v l i v n a s e k u n d á r n í s t r u k t u r u D N A [2 2] a l z e t e d y s p e k u l o v a t , 0 e r z n á d é l k a o p a k o v á n í m á r z n ý v l i v n a e x p r e s i D N A .

2.3.4. Záv r

V této práci byla nalezena významná souvislost mezi počtem (GAAGGA)_n hexanukleotidových opakování a rozsahem ICHS ve smyslu počtu postižených

tepen. Možné mechanismy zahrnují změny v sekundární struktuře DNA ovlivňující expresi eotaxinu a zánětlivé procesy v cévní stěně. Další dva promotorové SNP neměly vztah k ICHS, genotyp GG v exonovém polymorfismu 67 G>A byl spojen s akutními formami ICHS.

Literatura k práci: Vztah mezi těmi jednonukleotidovými polymorfismy v genu pro eotaxin (CCL 11), hexanukleotidovým opakujícím se zcelem a závažností ICHS

- 1) Kojima K, Role of epistasis and overdominance in stability of equilibria with selection. Proc Natl Acad Sci U S A 1959;45:984. 989
- 2) Buzbas EO, Joyce P, Abdo Z. Estimation of selection intensity under overdominance by Bayesian methods. Stat Appl Genet Mol Biol 2009;8:Article32
- 3) Emanuele E, Falcone C, D'Angelo A, Minoretti P, Buzzi MP, Bertona M, Geroldi D. Association of plasma eotaxin levels with the presence and extent of angiographic coronary artery disease. Atherosclerosis 2006;186:140. 145
- 4) Raaz-Schrauder D, Klinghammer L, Baum C, Frank T, Lewczuk P, Achenbach S, Cicha I, Stumpf C, Wiltfang J, Kornhuber J, Daniel WG, Garlachs CD. Association of systemic inflammation markers with the presence and extent of coronary artery calcification. Cytokine 2012;57:251. 257
- 5) Kaehler J, Tuleweit A, Steven D, Krempl T, Haar A, Carstensen M, Koester R, Terres W, Meinertz T. Association between eotaxin (CCL11), C-reactive protein, and antimicrobial antibodies in patients undergoing coronary angioplasty. J Investig Med 2006;54:446. 454
- 6) Ardigo D, Assimes TL, Fortmann SP, Go AS, Hlatky M, Hytopoulos E, Iribarren C, Tsao PS, Tabibiazar R, Quertermous T, Investigators A. Circulating chemokines accurately identify individuals with clinically significant atherosclerotic heart disease. Physiol Genomics 2007;31:402. 409

- 7) Economou E, Tousoulis D, Katinioti A, Stefanadis C, Trikas A, Pitsavos C, Tentolouris C, Toutouza MG, Toutouzas P. Chemokines in patients with ischaemic heart disease and the effect of coronary angioplasty. *Int J Cardiol* 2001;80:55. 60
- 8) Mosedale DE, Smith DJ, Aitken S, Schofield PM, Clarke SC, McNab D, Goddard H, Gale CR, Martyn CN, Bethell HW, Barnard C, Hayns S, Nugent C, Panicker A, Grainger DJ. Circulating levels of MCP-1 and eotaxin are not associated with presence of atherosclerosis or previous myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2005;183:268. 274
- 9) Canouï-Poitrine F, Luc G, Mallat Z, Machez E, Bingham A, Ferrieres J, Ruidavets JB, Montaye M, Yarnell J, Haas B, Arveiler D, Morange P, Kee F, Evans A, Amouyel P, Ducimetiere P, Empana JP, P. S. Group. Systemic chemokine levels, coronary heart disease, and ischemic stroke events: the PRIME study. *Neurology* 2011;77:1165. 1173
- 10) Haley KJ, Lilly CM, Yang JH, Feng Y, Kennedy SP, Turi TG, Thompson JF, Sukhova GH, Libby P, Lee RT. Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation* 2000;102:2185. 2189
- 11) Wyss CA, Neidhart M, Altwegg L, Spanaus KS, Yonekawa K, Wischnowsky MB, Corti R, Kucher N, Roffi M, Eberli FR, Amann-Vesti B, Gay S, von Eckardstein A, Lüscher TF, Maier W. Cellular actors, Toll-like receptors, and local cytokine profile in acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2010;31:1457. 1469
- 12) Kodali RB, Kim WJ, Galaria II, Miller C, Schechter AD, Lira SA, Taubman MB. CCL11 (Eotaxin) induces CCR3-dependent smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1211. 1216

- 13) Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1510. 1520
- 14) Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995;77:445. 465
- 15) Zee RY, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Lee RT, Ridker PM. Threonine for alanine substitution in the eotaxin (CCL11) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2004;175:91. 94
- 16) Hong MK, Mintz GS, Lee CW, Kim YH, Lee SW, Song JM, Han KH, Kang DH, Song JK, Kim JJ, Park SW, Park SJ. Comparison of coronary plaque rupture between stable angina and acute myocardial infarction: a three-vessel intravascular ultrasound study in 235 patients. *Circulation* 2004;110:928. 933
- 17) Choi SY, Mintz GS. What have we learned about plaque rupture in acute coronary syndromes? *Curr Cardiol Rep* 2010;12:338. 343
- 18) Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006;86:515. 581
- 19) Sheikine Y, Olsen B, Gharizadeh B, Jatta K, Tornvall P, Ghaderi M. Influence of eotaxin 67G>A polymorphism on plasma eotaxin concentrations in myocardial infarction survivors and healthy controls. *Atherosclerosis* 2006;189:458. 463
- 20) Rosner SA, Ridker PM, Zee RY, Cook NR. Interaction between inflammation-related gene polymorphisms and cigarette smoking on the risk of myocardial infarction in the Physician's Health Study. *Hum Genet* 2005;118:287. 294

21) Fulop T, Tessier D, Carpentier A. The metabolic syndrome. *Pathol Biol (Paris)* 2006;54:375. 386

22) Rippe K, Fritsch V, Westhof E, Jovin TM. Alternating d(G-A) sequences form a parallel-stranded DNA homoduplex. *EMBO J* 1992;11:3777. 3786

2.4. Laboratorní markery u pacientů s ICHS

Cílem práce bylo popsat vztah mezi některými základními laboratorními parametry jako je počet leukocytů, vysoce senzitivní C-reaktivní protein (hs-CRP), fibrinogen, kreatinin a kyselina močová u pacientů s akutními koronárními syndromy a stabilní ICHS a s postižením jedné nebo více tepen u stabilní ICHS.

2.4.1. Soubor a metodika

Studie zahrnuje 1254 pacientů přijatých se známou či suspektní ICHS k provedení koronarografie. Skupina pacientů s ICHS byla tvořena pacienty jak s chronickou ICHS, tak s akutními formami jako nestabilní angina pectoris či akutní infarkt myokardu. Pacienti podstoupili kardiologické vyšetření včetně anamnezy, fyzikálního vyšetření, EKG, laboratorních odběrů, koronarografie a u nejasných diagnóz echokardiografie. Všechny laboratorní odběry byly odebrány ráno po celonocním laňení. Analýza krevního obrazu byla provedena na přístroji SysMed XE 2100, Japonsko, fibrinogen byl stanoven podle Clauseho metody systémem BCS XP, Siemens, Německo. Hodnoty CRP, kreatininu, lipidového spektra a kyseliny močové byly měřeny na analyzátoru Advia 1650, Siemens, Německo, s použitím kitů BLW a BioVendor. Pacienti s těžkou renální (hodnota kreatininu nad 200 $\mu\text{mol/l}$), jaterní nedostatečností, anemií, endokrinními nebo neurologickými poruchami nebo malignitami byli vyloučeni. Rovněž jsme vyloučili pacienty s anamnézou infarktu myokardu a hladkostěnnými koronárními tepnami, pacienty se spastickou anginou pectoris nebo pacienty s nekompletními laboratorními nebo jinými vyšetřeními. Anamneza infarktu myokardu nebo nestabilní anginy pectoris do 1 měsíce byla hodnocena jako akutní koronární syndrom. Hyperlipoproteinemie byla definována jako známá diagnóza hyperlipoproteinemie z dokumentace pacienta a/nebo terapie

hypolipidemiky nebo hodnota celkového cholesterolu nad 5 mmol/l, diabetes mellitus jako současná terapie perorálními antidiabetiky nebo inzulinem nebo opakovaná laňá glykemie nad 7,0 mmol/l za hospitalizace, hypertenze jako léba antihypertenzivy nebo opakovaný klidový krevní tlak nad 140/90 mmHg za hospitalizace. Všichni pacienti zahrnuti do této studie poskytli informovaný souhlas a studie byla schválena místní etickou komisí.

Koronarografie

Koronarografie byla provedena z femorálního nebo radiálního přístupu na přístroji Philips Allura Xper FD 10 (Philips, The Netherlands) a vyšetření byla hodnocena dvěma zkušenými intervenčními kardiology. Významná ICHS byla definována jako >50% stenóza lumina alespoň 1 koronární tepny. Pacienti s ICHS byli rozděleni do skupin s akutní a chronickou ICHS, pacienti ve skupině stabilní ICHS dále na podskupiny se stenózou 1 nebo více koronárních tepen. Pacienti s nevýznamnou aterosklerózou (zúžení lumen <50%) byli hodnoceni jako oddělená skupina. Pacienti s hladkostěnnými koronárními tepnami byli použiti jako kontroly.

Validace dat a statistická analýza

Do studie bylo zahrnuto celkem 1254 pacientů. Po zhodnocení všech údajů bylo 133 pacientů vyloučeno pro nekompletní údaje nebo nevyhovující laboratorní hodnoty. Při hodnocení dat byly hlavní parametry věk, pohlaví, body mass index, údaje z anamnézy (hypertenze, hyperlipoproteinemie, diabetes mellitus, cévní mozková příhoda, onemocnění periferních tepen, renální insuficience a kóma) a laboratorní hodnoty (hemoglobin, leukocyty, trombocyty, fibrinogen, protrombinový test, celkový cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triacylglyceroly, kyselina močová, kreatinin, glykemie, CRP. Pacienti u nichž nebyla k dispozici hodnota ejectionní frakce

z ventrikulografie p i koronarografii nebo z echokardiografie byli rovn 0 vy azení.

Po ty pacient v jednotlivých skupinách udává Tabulka 1a.

Skupina	Podskupina	P ed validací		Po validaci		Po et vy azených pacient
		po et	%	po et	%	
Akutní ICHS		270	21,5	249	22,2	21
Chronická ICHS		642	51,2	568	50,7	74
	Posti0ení 1 tepny	206	16,4	177	15,8	29
	Posti0ení více tepen	436	34,8	391	34,9	45
Nevýznamná ateroskleróza		126	10	109	9,7	17
Kontrolní skupina		216	17,2	195	17,4	21
Celkem		1254	100	1121	100	133

Tabulka 1a . po ty pacient v jednotlivých skupinách, p ed a po validaci dat

Kategorické veli iny jsou v analýze uvedeny jako procentuální hodnoty, spojité veli iny jako pr m r a 95% interval spolehlivosti nebo medián a percentilový rozsah.

Významné rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny pomocí ANOVA a Bonferroniho testu pro spojité veli iny a chi-square testu pro kategorické veli iny. Bonferroniho post-hoc test byl pou0it jako ezení pro problematiku mnoho etného testování.

Prediktory v logistické regresi byly ur eny pomocí jejich odds ratio a intervalu

spolehlivosti, jejich statistická významnost byla určena pomocí Wald testu, což je standardní test k určení statisticky významného vztahu mezi závisle a nezávisle proměnnou veličinou. Statistická významnost celého modelu byla testována pomocí Hosmer-Lemeshow testu, $p < 0,05$ bylo hodnoceno jako statisticky významné. Analýza byla provedena pomocí programu SPSS 12.0 a Statistica 8.0.

2.4.2. Výsledky

Po čtyřech pacientech podle přítomnosti nebo nepřítomnosti ICHS a její závažnosti ukazuje tabulka 1a. Pacienti jak s akutní tak chronickou ICHS měli významnější astmi, hypertenzi, hyperlipoproteinemii, diabetes, cévní mozkovou příhodu, onemocnění periferních tepen, kouření cigaret v anamnéze a byli významně starší. Rovněž ejectionní frakce levé komory byla významně nižší u pacientů s ICHS (Tabulka 1b). Základní rozdíly v laboratorních parametrech udává Tabulka 2. Pacienti s akutními formami ICHS měli významně vyšší hladinu leukocytů, C-reaktivního proteinu, fibrinogenu a rovněž glukózy. Toto je zřejmě, nebo zánětlivé procesy jsou fyziologické v případě ruptury aterosklerotického plátu nebo nekrózy myokardu. V těchto zánětlivých parametrech byl rovněž nalezen rozdíl mezi pacienty s chronickou ICHS a kontrolami, což demonstruje zánětlivé pozadí vzniku a rozvoje aterosklerózy. Z ostatních parametrů, pacienti s chronickou ICHS měli vyšší hladiny kyseliny močové, kreatininu a nižší HDL cholesterol. Ostatní hodnoty lipidového spektra mohou působit paradoxně, nebo pacienti s ICHS měli nižší celkový a LDL cholesterol, to je ale způsobeno vlivem hypolipidemické léčby, která byla u nich významnější. Prevalence hypolipidemické terapie byla následující: ve skupině chronické ICHS bylo 548 pacientů (96,5%) hypolipidemickou léčbu (530 pacientů užívalo statin, 1 fibrát a 17 kombinaci statin + fibrát). Ve skupině s akutní ICHS bylo na terapii 243 pacientů (97,6%, 239 statin, 1 fibrát, 3 kombinaci).

	Vzichni pacienti (N = 1121)	Akutní ICHS (N = 249)	Chronická ICHS (N = 568)	Nevýznamná ateroskleróza (N = 109)	Kontrolní skupina (N = 195)
Muži #	70.0	70.7	77.5	64.2	50.8
Věk (roky) #	64.8 (64.2;65.4)	65.9 (64.6;67.2)*	65.7 (64.9;66.5)*	65.7 (64;67,3)*	60 (58,6;61.4)
Výška (cm)	171.3 (170.8;171,8)	171.3 (170.2;172.4)	171.9 (171.2;172.6)	170.7 (168.9;172.5)	170 (168.7;171.2)
Váha (kg)	84.2 (83.4;85.1)	84.2 (82.4;86)	84.7 (83.5;85.9)	83.7 (81;86.3)	83.2 (81.2;85.3)
EF (%)	53.4 (52.6;54.2)	48.8 (47.3;50.4)*§+	52.7 (51.6 ; 53.8)*+	58.9 (56.7 ; 61.1)	58.2 (56.5; 59.9)
BMI (kg/m ²)	28.7 (28.4;28.9)	28.6 (28.1;29.2)	28.6 (28.3;28.9)	28.7 (27.9 ; 29.5)	28.8 (28.1;29.4)
Hypertenze #	78.1	79.1	79.8	81.7	69.7
Diabetes mellitus #	28.4	34.5	31.5	22.9	14.4
Hyperlipoproteinémie #	78.5	79.9	84.3	67.0	66.2
Onemocnění perif. tepen #	8.1	15.3	8.6	0.9	1.5
Anamnéza CMP #	9.6	14.1	10.7	5.5	3.1
Kouření (i stopkuáci) #	47.1	52.6	50.7	36.7	35.4

Tabulka 1b. Popis pacientů ve studii podle skupin s akutní a chronickou ICHS

Kategorické veličiny jsou uvedeny v % spojité veličiny jako průměr (95% interval spolehlivosti). EF - ejectionní frakce LK, CMP - cévní mozková příhoda. # významný rozdíl mezi skupinami $p < 0.05$, * významný rozdíl proti kontrolní skupině $p < 0.001$, § - významný rozdíl proti chronické ICHS $p < 0.001$, + významný rozdíl proti ateroskleróze $p < 0.001$

Ve skupin pacient s nevýznamnou aterosklerózou užívalo hypolipidemika 83 pacient (76,1%, všichni statin) a kontrolní skupin 49 pacient (25,2%, 47 statin, 1 fibrát, 1 kombinaci). Významné rozdíly mezi skupinou aterosklerózy a kontrolní byly pouze v hodnotách kreatininu a fibrinogenu. Detailní rozdělení na skupiny s postižením jedné nebo více tepen u chronické ICHS je uvedeno v Tabulce 3. Zánětlivé markery, kyselina močová a glukóza byly rovněž významně vyšší u pacientů jak s onemocněním jedné tak i více tepen proti kontrolám, a HDL cholesterol byl u těchto dvou skupin také nižší. U podskupin s onemocněním jedné nebo více tepen navzájem nebyly významné rozdíly v biochemických nebo zánětlivých markerech. Lineární logistická regrese ukazuje vztah biochemických markerů u pacientů k přítomnosti ICHS (Tabulka 4). Jak akutní tak chronická ICHS byly spojeny s hladinou leukocytů CRP, fibrinogenu, kyseliny močové, kreatininu, HDL cholesterolu, triglyceridů a glukózy. Naproti tomu, u pacientů s nevýznamnou aterosklerózou byla nalezena závislost pouze na fibrinogenu, kreatininu, HDL cholesterolu a glukóze. Z klinických faktorů byl významný vztah nalezen u věku, mužského pohlaví, hypertenze, diabetu, hyperlipidemie, anamnézou CMP, onemocněním periferních tepen a anamnézou kuřáctví vzhledem k akutní i chronické ICHS, u chronické jak s postižením jedné tak i více tepen. U nevýznamné aterosklerózy byl nalezen vztah pouze k věku, mužskému pohlaví a hypertenzi.

	Vzichni pacienti (N = 1121)	Akutní ICHS (N = 249)	Chronická ICHS (N = 568)	Nevýznamná ateroskleróza (N = 109)	Kontroly (N = 195)
Leukocyty« [x 109/l]	7.5 (7.3 ; 7.6)	8.2 (7.9 ; 8.5)§ ++**	7.5 (7.3 ; 7.6)**	7 (6.7 ; 7.3)	6.7 (6.5 ; 7)
C-reaktivní protein« [mg/l]	4.3 (4 ; 4.6)	7.9 (6.8 ; 9.3)§ ++**	3.8 (3.5 ; 4.1)*	3.5 (2.9 ; 4.2)	2.8 (2.5 ; 3.2)
Fibrinogen« [g/l]	4 (4 ; 4.1)	4.4 (4.3 ; 4.5)§+*	4 (3.9 ; 4)**	3.9 (3.8 ; 4)*	3.7 (3.6 ; 3.8)
Kys.mo ová« [umol/l]	355.2 (349.6 ; 361)	356.2 (343.5;369.3)	362.5 (354.7;370.6)*	352.7 (336.7;369.4)	335.1 (322.4;348.3)
Kreatinin« [umol/l]	100.3 (99.3 ;101.2)	102.4 (100.3;104.5)*	102.1 (100.7;103.5)*	98.7 (95.9 ; 101.7)*	93.3 (91.3;95.3)
Cholesterol« [mmol/l]	4.5 (4.4 ; 4.6)	4.4 (4.3 ; 4.6)*	4.4 (4.4 ; 4.5)*	4.6 (4.4 ; 4.8)	4.7 (4.6;4.8)
LDL [mmol/l]	2.5 (2.4 ; 2.5)	2.5 (2.4 ; 2.6)	2.4 (2.4 ; 2.5)*	2.5 (2.4 ; 2.7)	2.6 (2.5;2.7)
HDL« [mmol/l]	1.1 (1.1 ; 1.2)	1.1 (1 ; 1.1) +*	1.1 (1.1 ; 1.1) +*	1.2 (1.2 ; 1.3)	1.3 (1.3;1.4)
Triglyceridy« [mmol/l]	1.5 (1.5 ; 1.6)	1.6 (1.5 ; 1.6)*	1.6 (1.5 ; 1.7)*	1.5 (1.3 ; 1.6)	1.4 (1.3;1.5)
Glukóza« [mmol/l]	5.7 (5.6 ; 5.8)	6.1 (5.9 ; 6.4)§ + *	5.7 (5.6 ; 5.8)*	5.5 (5.2 ; 5.7)	5.2 (5;5.3)
Trombocyty« [x 109/l]	202.1 (198.7;205.4)	214.7 (206.6 ; 223)§	196.4 (191.9 ; 201)	199.5 (189 ; 210.5)	204.7 (197.7;211.9)

Tabulka 2. Laboratorní markery ve skupinách akutní a chronické ICHS. « významné rozdíly mezi skupinami (ANOVA/Chi-square test, $p < 0.05$), * významný rozdíl proti kontrolní skupin (Bonferroni test, $p < 0.05$), + významný rozdíl proti nevýznamné ateroskleróze (Bonferroni test, $p < 0.05$), § významný rozdíl mezi akutní a chron. ICHS (Bonferroni test, $p < 0.05$)

	Vzichni pacienti (N=763)	Chron. ICHS . 1 tepna (N=177)	Chron. ICHS . více tepen (N=391)	Kontrolní skupina (N=195)
Leukocyty« [x 109/l]	7.3 (7.2 ; 7.4)	7.6 (7.3 ; 7.9)§	7.4 (7.2 ; 7.6)§	6.7 (6.5 ; 7)
C-reaktivní protein« [mg/l]	3.5 (3.3 ; 3.8)	3.8 (3.3 ; 4.5)§	3.8 (3.4 ; 4.2)§	2.8 (2.5;3.2)
Fibrinogen« [g/l]	3.9 (3.9 ; 3.9)	3.9 (3.8 ; 4)§	4 (3.9 ; 4.1)§	3.7 (3.6;3.8)
Kys. Mo ová « [umol/l]	355.3 (348.5 ; 362.2)	369 (353.9 ; 384.7)§	359.6 (350.5 ; 369)§	335.1 (322.4;348.3)
Kreatinin« [umol/l]	99.8 (98.6 ; 101)	100.9 (98.6 ; 103.2)§	102.7 (101 ; 104.5)§	93.3. (91.3;95.3)
Celk. cholesterol« [mmol/l]	4.5 (4.4 ; 4.6)	4.5 (4.3 ; 4.6)	4.4 (4.3 ; 4.5)§	4.7 (4.6;4.8)
LDL [mmol/l]	2.5 (2.4 ; 2.5)	2.5 (2.3 ; 2.6)	2.4 (2.3 ; 2.5)	2.6 (2.5;2.7)
HDL « [mmol/l]	1.2 (1.1 ; 1.2)	1.2 (1.1 ; 1.2)§	1.1 (1.1 ; 1.1)§	1.3 (1.3;1.4)
Triglyceridy « [mmol/l]	1.6 (1.5 ; 1.6)	1.5 (1.5 ; 1.6)	1.6 (1.6 ; 1.7)§	1.4 (1.3;1.5)
Glukóza « [mmol/l]	5.6 (5.5 ; 5.6)	5.5 (5.4 ; 5.7)§	5.8 (5.6 ; 5.9)§	5.2 (5;5.3)

Tabulka 3. Laboratorní markery v podskupinách chronické ICHS s onem. 1 nebo více tepen. «

významné rozdíly mezi skupinami (ANOVA/Chi-square test $p < 0.05$), * významný rozdíl mezi chron.

ICHS s onem. 1 tepny a s onem. více tepen (Bonferroni test, $p < 0.05$), § významný rozdíl proti

kontrolní skupin (Bonferroni test, $p < 0.05$)

	Akutní ICHS (N = 249)	Chronická ICHS (N = 568)	Nevýznamná ateroskleróza (N = 109)	Chron. ICHS . 1 tepna (N = 177)	Chron. ICHS . více tepen (N = 391)
Leukocyty	1.45 (1.30; 1.61) ««	1.26 (1.14; 1.39) ««	1.08 (0.95; 1.24)	1.29 (1.15; 1.45) ««	1.24 (1.12; 1.38) ««
C-reaktivní protein	1.13 (1.08; 1.17) ««	1.05 (1.01; 1.08) «	1.03 (0.99; 1.07)	1.04 (1.00; 1.07) «	1.05 (1.01; 1.09) «
Fibrinogen	4.23 (3.06; 5.86) ««	1.95 (1.50; 2.54) ««	1.73 (1.2; 2.51) «	1.65 (1.21; 2.26) «	2.16 (1.62; 2.88) ««
Kys.mo ová (100 µmol)	1.27 (1.05 ; 1.54) «	1.38 (1.15 ; 1.65)«	1.21 (0.94 ; 1.56)	1.46 (1.18 ; 1.82)««	1.34 (1.1 ; 1.62)«
Kreatinin	1.04 (1.02; 1.05) ««	1.04 (1.03; 1.05) ««	1.02 (1.01; 1.04) «	1.03 (1.02; 1.05) ««	1.04 (1.03; 1.05) ««
Celk.cholesterol	0.79 (0.66; 0.95) «	0.78 (0.67; 0.91) «	0.88 (0.69; 1.12)	0.78 (0.64; 0.97) «	0.77 (0.65; 0.91) «
LDL	0.89 (0.72; 1.09)	0.79 (0.66; 0.96) «	0.89 (0.66; 1.2)	0.78 (0.60; 1.02)	0.79 (0.65; 0.96) «
HDL	0.07 (0.04; 0.15) ««	0.12 (0.07; 0.20) ««	0.50 (0.26; 0.98) «	0.23 (0.12; 0.43) ««	0.08 (0.04; 0.15) ««
Triglyceridy	1.4 (1.06; 1.84) «	1.52 (1.19; 1.94) ««	1.09 (0.78; 1.53)	1.33 (0.99; 1.79)	1.57 (1.22; 2.02) ««
Glukóza	1.56 (1.33; 1.82) ««	1.39 (1.20; 1.61) ««	1.23 (1.02; 1.48) «	1.30 (1.09; 1.55) «	1.42 (1.22; 1.65) ««

Tabulka 4. Vliv biochemických parametrů na přítomnost onemocnění podle lineární logistické regrese.

Data jsou prezentována jako odds ratio s 95% intervalem spolehlivosti « významnost $p < 0.05$ Wald test, «« významnost $p < 0.001$ Wald test

2.4.3. Diskuze

V této naší studii jsme zkoumali vztah některých laboratorních parametrů k přítomnosti a závažnosti aterosklerózy koronárních tepen. Potvrdili jsme, že známé parametry jako je hladina leukocytů, C-reaktivního proteinu a fibrinogenu jsou primárně spojeny s akutními formami ICHS a rovněž s přítomností chronické ICHS, avšak ne s poškozenými tepenami. Rovněž další parametry jako kreatinin, kyselina močová, lipidy a glukóza nebyly významně spojeny s poškozenými tepenami. Všechny zmíněné parametry se významně lišily u pacientů s ICHS a kontrolami, pouze fibrinogen a kreatinin i mezi osobami s nevýznamnou ICHS a kontrolami. Naše práce tedy nepotvrzuje předchozí výsledky (Cavusoglu et al., Sabatine et al. [1,2], kde byl popsán vztah mezi hladinou leukocytů a poškozenými tepenami. Naopak závislost mezi nevýznamnými aterosklerotickými změnami a hladinou fibrinogenu a kreatininu je v souladu s předchozími studiemi. Levenson et al. [3,4] popsali, že přítomnost aterosklerotických plaků je silněji se vzrůstajícím tercilem hladiny fibrinogenu. Autoi rovněž popsali synergický efekt mezi hladinou fibrinogenu a poměrem celkový/HDL cholesterol ve vzniku subklinické extrakoronární a koronární aterosklerózy. Role renálních funkcí byla popsána v několika studiích, Bartnický et al. [5] popsali vzrůstající riziko ICHS u pacientů s klesající glomerulární filtrací. Cerne et al. [6] popsali, že mírně zvýšená hladina kreatininu je spojena s koronární aterosklerózou, bez ohledu na tradiční rizikové faktory. Mírná renální insuficience je rovněž spojena se sníženým koronárním průtokem u pacientů s neobstruktivní formou koronární aterosklerózy. Toto může být způsobeno podobnými změnami v renální a koronární mikrocirkulaci [7]. Závěrem, laboratorní parametry jako hladina leukocytů, C-reaktivní protein a kyselina močová jsou spojeny s přítomností jak akutní, tak chronické ICHS ale ne s poškozenými

postižených tepen. Fibrinogen a kreatinin mají dále navíc souvislost i s nevýznamnou aterosklerózou.

2.4.4. Literatura k práci Laboratorní markery u pacient s ICHS

1) Cavusoglu E, Chopra V, Gupta A, Ruwende C, Yanamadala S, Eng C, Clark LT, Pinsky DJ, Marmur JD. Usefulness of the white blood cell count as a predictor of angiographic findings in an unselected population referred for coronary angiography. *Am J Cardiol* 2006; 98:1189. 1193.

2) Sabatine MS, Morrow DA, Cannon CP, Murphy SA, Demopoulos LA, DiBattiste PM, McCabe CH, Braunwald E, Gibson CM. Relationship between baseline white blood cell count and degree of coronary artery disease and mortality in patients with acute coronary syndromes: a TACTICS-TIMI 18 (Treat Angina with Aggrastat and determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative strategy-Thrombolysis In Myocardial Infarction 18 trial) substudy. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:1761. 1768.

3) Levenson J, Giral P, Megnien JL, Gariépy J, Plainfosse MC, Simon A. Fibrinogen and its relations to subclinical extracoronary and coronary atherosclerosis in hypercholesterolemic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(1):45. 50.

4) Levenson J, Giral P, Razavian M, Gariépy J, Simon A. Fibrinogen and silent atherosclerosis in subject with cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15(9):1263. 1268.

5) Bartnicky P, Stolarek R, Rysz J. Coronary artery atherosclerosis in patients with the initial and the early stage of chronic renal failure. *Centr Eur J Med* 2009; 4(1):32. 36.

6) Cerne D, Kaplan-Pavlovic S, Kranjec I, Jurgens G. Mildly elevated serum creatinine concentration correlates with the extent of coronary atherosclerosis. *Renal Failure* 2000; 22(6):799. 808.

7) Chade AR, Brosh D, Higano ST, Lennon RJ, Lerman LO, Lerman A. Mild renal insufficiency is associated with reduced coronary flow in patients with non-obstructive coronary artery disease. *Kidney Int* 2006; 69(2):266. 271.

2.5 Vztah mezi dlouhodobými klinickými výsledky pacientů a eNOS 786 C/T, 4a/b, MMP-13 rs640198 G/T, Eotaxin 426 C/T, 384 A/G, and 67 G/A polymorfismy

Cílem práce bylo zhodnotit vztah mezi polymorfismy v genu pro eotaxin (67 G/A, 384 A/G, and 426 C/T), matrix metaloproteinázu 13 (rs640198) a endoteliální NO-syntázu (786C/Tand4a/b) a dlouhodobými klinickými výsledky u pacientů s ischemickou chorobou srdeční.

2.5.1 Soubor a metodika

Studie zahrnuje 532 pacientů s ICHS, kteří byli získáni ze souboru 1161 konsekutivních pacientů přijatých k provedení koronarografie po aplikaci následujících vyazovacích kritérií: známá malignita, pokročilá renální insuficience (hladina kreatininu nad 200 μ mol/l), hladkostenné koronární tepny nebo nevýznamná ateroskleróza nebo oekávaná délka života pod 1 rok. Od všech pacientů byla získána osobní a rodinná anamnéza, a podstoupili fyzikální vyšetření, laboratorní odběry, EKG a koronarografii. Ischemická choroba srdeční byla definována jako >50% zúžení lumen alespo jedné koronární tepny. Krevní vzorky pro DNA analýzu byly rovněž odebrány. Výběr DNA polymorfismů, analýza, výsledky a vliv na výskyt a závažnost ICHS byly publikovány v předchozích studiích [1,2,3].

Sledování

Klinický osud pacientů byl vyhodnocen v roce 2014 pomocí nemocniční databáze. Byly zaznamenávány následující příhody: akutní infarkt myokardu, nestabilní angina pectoris, nutnost revaskularizace myokardu (perkutánní intervence nebo aortokoronární bypass), hospitalizace pro srdeční selhání a implantace kardioverteru/defibrilátoru. Pacienti, kteří nebyli ve sledování v naší nemocnici,

pacienti bez angiograficky potvrzené ICHS a pacienti u kterých nebyla provedena DNA analýza byly vyloučeny z hodnocení.

Statistická analýza

Byl použit multivariantní Coxův regresní model pro stanovení podílu genových polymorfismů a ostatních faktorů na p ∞ ití. Genové varianty byly předselektovány z 8 polymorfismů v kandidátních genech s použitím Kaplan-Meierovy metody a log-rang testu v dominantním, recesivním a kodominantním modelu exprese alel. Hodnota p 0.05 byla uznána jako statisticky významná pro zahrnutí do Coxovy analýzy. Hardy-Weinbergova rovnováha byla vyšetřována pro každý polymorfismus s použitím χ^2 testu. Negenetické veličiny zahrnuté do analýzy byly následující: věk při vstupu do studie, pohlaví, diagnóza akutního koronárního syndromu při začátku do studie, infarkt myokardu v osobní anamnéze, ejectional frakce, počet postižených tepen, obezita, hypertenze, hyperlipoproteinemie, diabetes mellitus, současná diagnóza dilatační kardiomyopatie, významná chlopenní vada a klučství. Byly sledovány dva end-pointy: úmrtí, a složený kardiovaskulární end-point (infarkt myokardu, nestabilní angina pectoris, koronární revaskularizace a hospitalizace pro srdeční selhání). Byly použity 3 modely dominance alel: dominantní, recesivní a aditivní. Postupná konstrukce Coxova modelu s hraniční hodnotou p=0.05 byla finálně použita pro určení všech nezávislých faktorů podílejících se na p ∞ ití nebo na výskytu kardiálních příhod. Software STATISTICA (StatSoft, verze 12) byla použita pro statistickou analýzu.

2.5.2. Výsledky

Celkem 532 pacient s významnou ICHS bylo nakonec zahrnuto do analýzy.

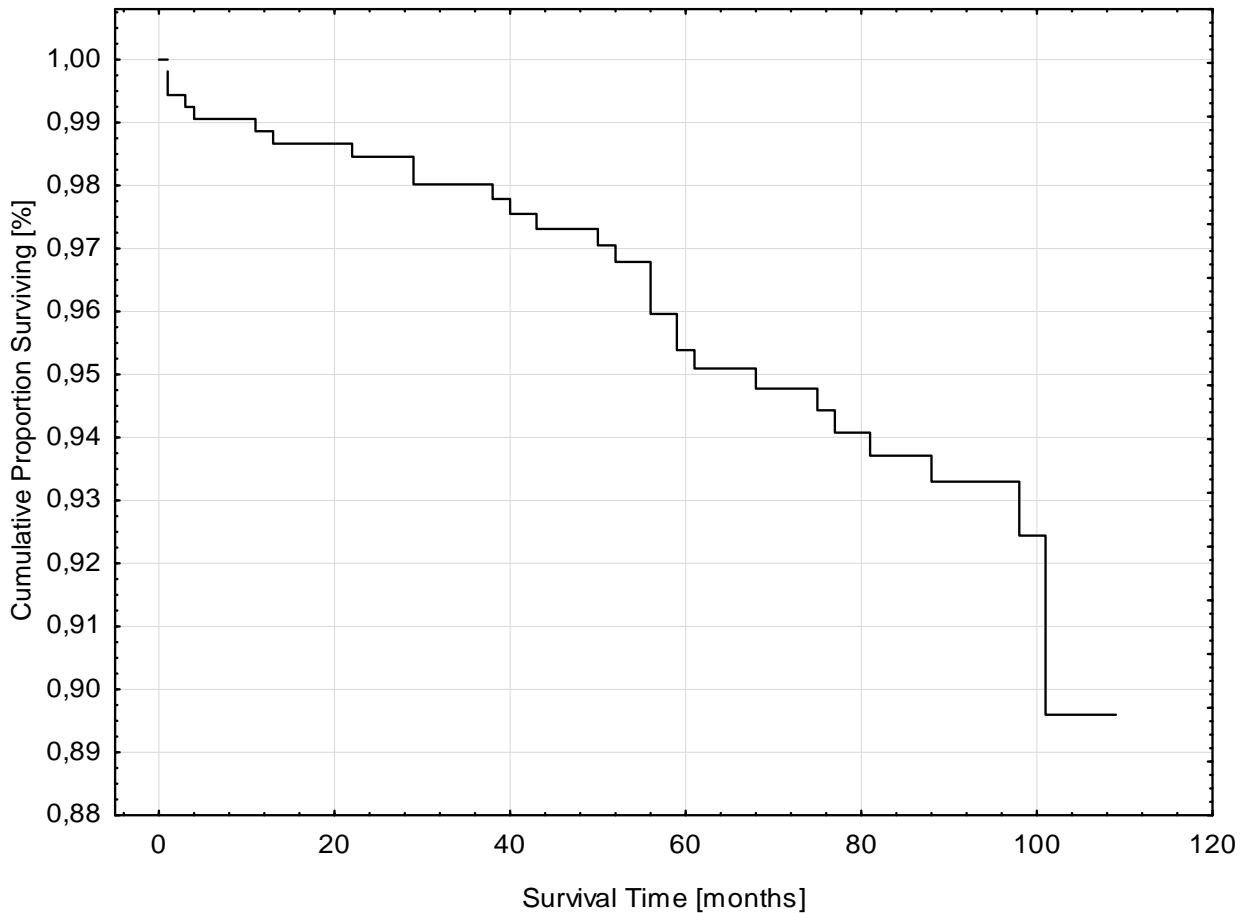
Základní charakteristika souboru je uvedena v Tabulce 1. Dvacet devět pacient zemřelo, zaznamenáno dále bylo 271 kardiálních příhod (26 pacient s nestabilní anginou pectoris, 44 akutních infarktů myokardu, 154 revaskularizací myokardu, 26 hospitalizací pro srdeční selhání a 21 implantací ICD). Průměrná doba sledování byla 77 měsíců. Kaplan-Meierovy křivky ukazující podíl přežití a přežití bez kardiálních příhod jsou uvedeny na Grafu 1 a 2.

Celkem/muži [n]	532/407
Věk [roky]	65.4 ± 9.6
BMI [kg/m ²]	28.7 ± 4.0
Kuřáci (%)	52 %
Hypertenze (%)	80 %
Diabetes (%)	34%
EF (%)	55 % (45 % - 60 %)

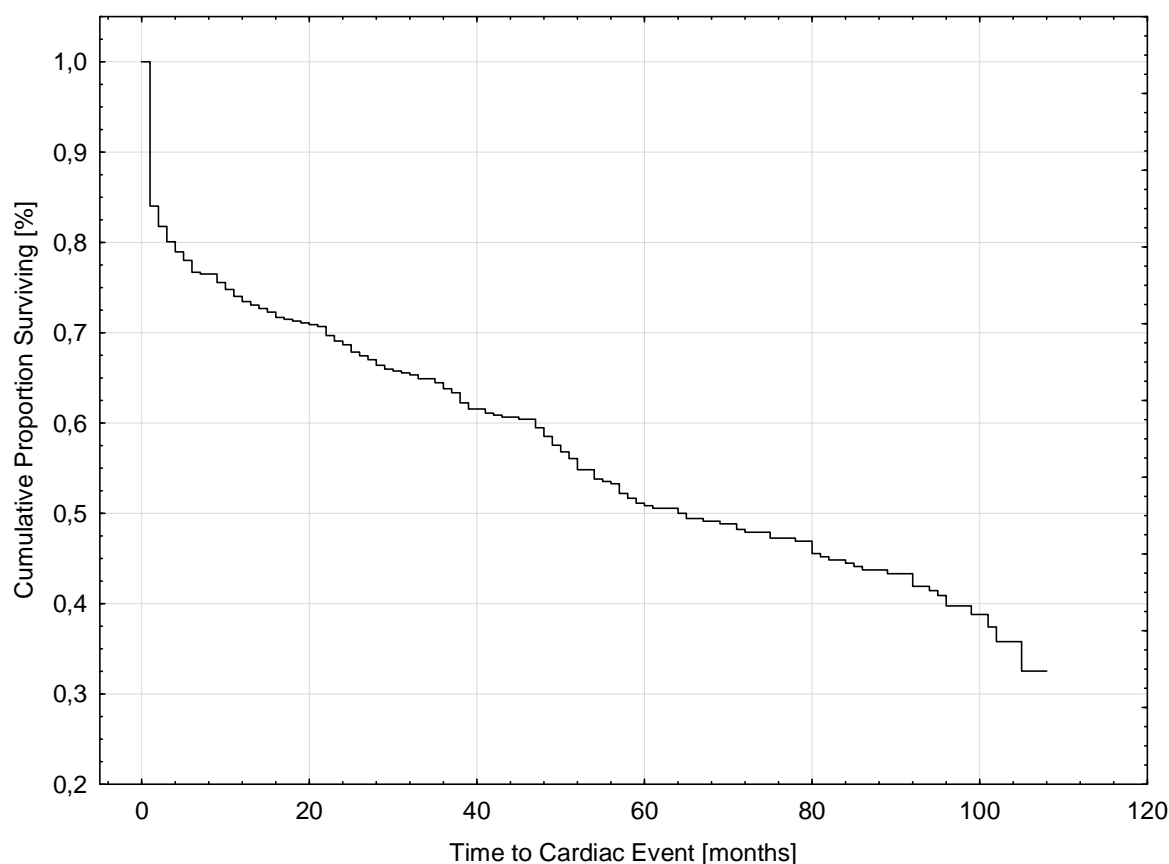
Tabulka 1. Základní charakteristika souboru pacientů. Data jsou prezentována jako průměr ± SD. BMI- body mass index, EF - ejectionní frakce levé komory

Seznam zkoumaných polymorfismů je na uveden v Tabulce 2. Preselekce kandidátních polymorfismů byla provedena na základě p-hodnot log-rank testu. Polymorfismy eNOS 4 a/b, eotaxin 426 C/T, eotaxin 384 A/G, a eotaxin 67 G/A byly významně spojeny s úmrtím, eotaxin 384 A/G s kardiálními příhodami. Byl rovněž zaznamenán nevýznamný trend pro eotaxin 67 G/A a kardiální příhody. Kompletní data jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4. Následně byl použit Coxův regresní model pro stanovení vlivu konkrétních genových variant na přežití a přežití bez kardiálních příhod. Eotaxin 67 G/A a eotaxin -384 A/G byly hodnoceny jako významné pro přežití, respektive přežití bez kardiálních příhod (Tabulka 5 a 6). Multivariátní Coxův postupný regresní model identifikoval věk, kouření a onemocnění 3 koronárních tepen (v porovnání s postižením jen jedné tepny) jako nezávislé prediktory úmrtí z

jakékoliv p í iny. Spolu s t mito factory byl eotaxin 67 G/A významný prognostický faktor po p idání do tohoto modelu (Tabulka 7, Graf 3). Pokud byl pou0it místo eotaxinu 67 G/A eotaxin -384 A/G, model poskytl podobné výsledky se stejnými prognostickými factory, avzak hazard ratio bylo pon kud nižší (GG versus GA+AA; HR = 2.63; 95%CI = 1.19. 5.83; \bar{p} = 0.017)..



Graf 1: Kaplan-Meierova analýza přežití v souboru pacientů



Graf 2: Kaplan-Meierova analýza přežití bez kardiální příhody

Polymorfismus	rs	MAF (%)	n	Distribuce genotyp	HWE
MMP 13 G/T	rs640198	G>T; 0.32	470	220/198/52	Ano
eNOS -786 C/T	rs2070744	T>C; 0.37	317	126/148/43	Ano
eNOS 4 a/b	VNTR *	b>a; 0.19	520	342/159/19	Ano
Eotaxin -426 C/T	rs16969415	C>T; 0.07	445	384/56/5	Ano
Eotaxin -384 A/G	rs17809012	A>G; 0.48	518	127/281/110	Ano
Eotaxin 67 G/A	rs1129844	G>A; 0.15	532	391/125/16	Ano

Tabulka 2. Preselekcce kandidátních polymorfismů pro úmrtí, dle log-rank p-hodnot, polymorfismy zahrnuté v Coxovém regresním modelu jsou tu nou kurzívou * VNTR = variabilní počet tandemových repetit, distribuce genotyp vyjádřena jako dominantní homozygot, heterozygote, recesivní homozygot, HWE . Hardy-Weinberg equilibrium

Polymorfismus	n	Log rank p (celkem)	Log rank p (dominantní)	Log rank p (recesivní)
MMP 13 G/T	470	0.941	0.811	0.909
eNOS -786 C/T	317	0.200	0.129	0.720
eNOS 4 a/b	520	0.458	0.025	0.419
Eotaxin -426 C/T	445	0.033	0.152	0.175
Eotaxin -384 A/G	518	0.084	0.533	0.050
Eotaxin 67 G/A	532	0.020	0.013	0.210

Tabulka 3. Preselekcce kandidátních polymorfismů pro úmrtí podle log-rank p-hodnot. Polymorfismy zahrnuté v Coxově regresním modelu jsou tučně kurzívou.

Polymorfismus	n	Log-rank p (celkem)	Log-rank p (dominantní)	Log-rank p (recesivní)
MMP 13 G/T	470	0.677	0.710	0.526
eNOS -786 C/T	317	0.603	0.959	0.711
eNOS 4 a/b	520	0.937	0.910	0.642
Eotaxin -426 C/T	445	0.922	0.882	0.874
Eotaxin -384 A/G	518	0.009	0.548	0.002
Eotaxin 67 G/A	532	0.098	0.496	0.343

Tabulka 4. Preselekcce kandidátních polymorfismů pro kardiální příhody podle log-rank p-hodnot. Polymorfismy zahrnuté v Coxově regresním modelu jsou tučně kurzívou.

Model	dominantní		recesivní		aditivní	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
Polymorphism						
eNOS 4 a/b	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Eotaxin -426 C/T	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Eotaxin -384 A/G	NS	NS	2.60 (1.15, 5.87)	0.022	NS	NS
Eotaxin 67 G/A	3.36 (1.57, 7.19)	0.0017	NS	NS	2.43 (1.39, 4.26)	0.0019

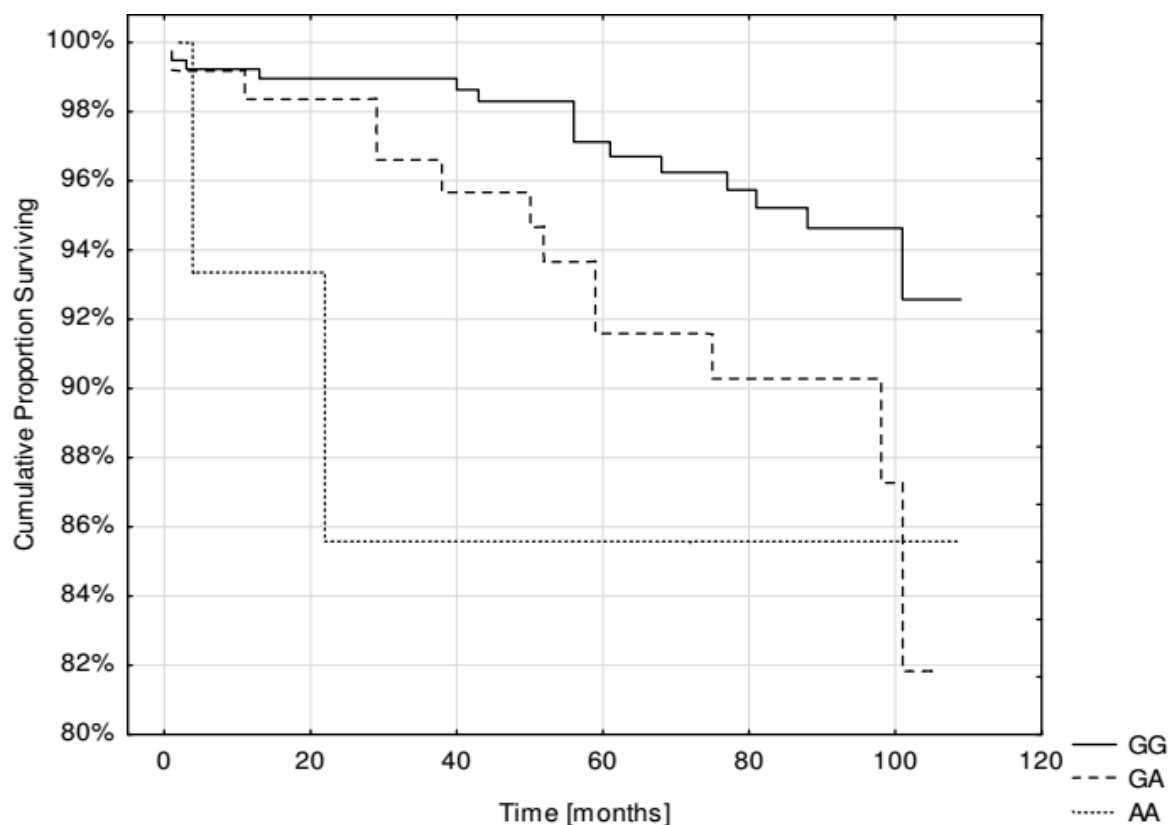
Tabulka 5. Predikce úmrtí pomocí různých modelů: dominantní, recesivní, aditivní, multivariátní Coxova regrese

Model	dominantní		recesivní		aditivní	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
Polymorfismus Eotaxin -384 A/G	NS	NS	1.59 (1.20. 2.10)	0.001	1.28 (1.07. 1.54)	0.006
Eotaxin 67 G/A	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tabulka 6. Predikce kardiální příhody pomocí různých modelů dědičnosti, multivariantní Coxova regrese

Faktor	HR (95% CI)	P-value
V k (na 10 let)	2.32 (1.44. 3.84)	0.0007
Kou ení	3.84 (1.66. 8.87)	0.002
Onemocn ní 3 tepen vs. onem. 1 koronární tepny	3.89 (1.15. 13.18)	0.029
Onemocn ní 2 tepen vs. onem. 1 koronární tepny	1.32 (0.32. 5.55)	0.701 (NS)
Eotaxin 67 G/A (GA+AA vs. GG)	2.81 (1.35. 5.85)	0.006

Tabulka 7. Postupný multivariantní Coxův regresní model pro přežití



Graf 3. Kaplan-Meierova analýza přežití podle 67 G/A genotypu.

Oba polymorfismy byly ve významné vazebné nerovnováze, a rizikové alely byly aso d d ny společně. V multivariální postupné regresní analýze kardiálních p íhod byl počet postižených koronárních tepen (dv í vs. jedna : HR=1.86 ; 95% CI = 1.23. 2.79; $p = 0.003$, t í vs. jedna: HR = 4.80; 95% CI = 3.32. 6.94; $p < 0.001$) jediným nezávislým prognostickým faktorem, p ídání polymorfismu -384 A/G nezm ěnilo výsledky i kdy0 byl tento polymorfismus spojen s vyzzím rizikem kardiálních p íhod, neposkytoval lepší prognostickou informaci ne0 počet postižených tepen. Dále byl u sledovaných polymorfism ů hodnocen výskyt vazebné rovnováhy. Byla zjižt ěna vazebná nerovnováha mezi polymorfismy 426 C/T and 384 A/G v promotoru genu pro eotaxin stejn ě jako 384 A/G a 67 G/A v tom samém genu. Riziková alela A z 67 G/A byla aso d d ěna společně s rizikovou alelou G z -384 G/A. Naopak polymorfismy . 426 C/T a 367 G/A byly ve vazebné rovnováze.

2.5.3. Diskuse

Bylo publikováno mnoho studií zabývající se vlivem plasmatických hladin eotaxinu a variant v genu pro eotaxin na výskyt a záva0nost aterosklerozy, ale výsledky jsou rozporné. N ěkte í auto i popsali vztah vyzzí hladiny eotaxinu k aterosklerotickému posti0ení [4-6], další studie ale toto nepotvrdily [7,8]. Vyzzí koncentrace eotaxinu byla zjižt ěna v krevních vzorcích pacient ů s akutním koronárním syndromem [9]. Byl popsán vliv polymorfism ů v genu pro eotaxin u ěnských diabetických pacient ů [10], hlavní výsledek byla zvýšená morbidita u pacient ů homozygotních pro G alelu v 67 G/A polymorfismu, tato alela je spojena s vyzzí produkcí a koncentrací eotaxinu [11,12]. Podobn ě v nazí p edchozí studii [2] byla nalezena souvislost GG genotypu a akutního koronárního syndromu. To je zdánliv ě v rozporu se zde prezentovanými výsledky, kde alela G má spíže protektivní efekt. Avzak v této práci jsou zkoumáni pouze pacienti s ICHS, kte í podstoupili koronarografické vyšet ění, tedy vysoce

selektovaná skupina, a jejich terapie, zvláště farmakoterapie statiny, mohla ovlivnit výsledky. Byly publikovány práce popisující významnou redukci hladin chemokin v etn eotaxinu, a to jak u lidí, tak na zvířecích modelech [13-15]. Protože nositelé alely A mají nižší hladiny eotaxinu [16], protektivní efekt terapie statiny může být snížený ve srovnání s GG homozygoty. Tento mechanismus se jeví jako pravděpodobná příčina i u našich pacientů s ICHS, kde prevalence terapie statiny byla velmi vysoká (514/532, 96.6%).

Na velké studii s 14 916 amerických mužů Zee a kol. [17] zkoumal tento polymorfismus s odlišnými výsledky. Autoři srovnali údaje od 523 pacientů po infarktu myokardu a 2092 osob bez kardiovaskulárního onemocnění během sledovacího období (průměrně 13,2 roku). Popsali, že homozygoti 67AA měli významně vyšší riziko infarktu myokardu (OR 1.86; 95% CI 1.15-3.01; $p = 0.012$), a tento efekt zůstal i po úpravě na body mass index, hypertenzi, přítomnost diabetu. Nebyly významné rozdíly mezi GG homozygoty a heterozygoty. I když nebyla popsána léčba pacientů v této studii, její vliv nelze vyloučit. Recesivní model (AA versus GA+GG) v naší studii měl relativně nízkou sílu, bylo pouze 16 AA homozygotů. Vazebná nerovnováha mezi 67G/A a 384 A/G musí být rovněž brána v potaz, nebo protektivní a rizikové alely jsou často dědičné. Vliv genových variant v genech pro matrix metaloproteinázu například MMP-9 [18,19] a MMP-3 [20] na klinické výsledky pacientů s ICHS byl popsán v předchozích studiích. V naší současné studii nebyl zjištěn vliv polymorfismu rs640198 v genu pro matrix metaloproteinázu 13 na výskyt kardiovaskulárních příhod nebo celkovou mortalitu. Podle těchto našich výsledků bychom tedy usoudili, že rs640198 polymorfismus pro MMP-13 neovlivňuje celkovou prognózu pacientů, i když jsme v naší předchozí práci našli významnou souvislost mezi tímto polymorfismem a onemocněním 3 tepen [1]. Postižení 3 koronárních

tepen je ale samo o sob významným prediktorem jak kardiálních p íhod, tak mortality, a vztah gen-prognóza m ůe být ovlivn ěn takté0 poskytnutou terapií, stejn jako u eotaxinu. Vztah eNOS polymorfismu a ICHS byl popisován v mnoha studiích. Velká metaanalýza zahrnující celkem 69 235 subjekt ů [21] potvrdila souvislost t í NOS3 polymorfism ů (Glu298Asp, 786 T/C, a 4 a/b) s p ítomností ICHS, ale ůádná souvislost nebyla nalezena u 4 a/b polymorfismu v subanalýze evropské populace. Naze studie nenalezla ůádnou souvislost mezi 786 T/C a 4 a/b polymorfismy a prognózou pacient ů s ICHS.

Záv ěrem lze říci, ůe v této nazí práci jsme potvrdili významný vztah mezi alelou A v 67 G/A polymorfismu v genu pro eotaxin a vyzzí mortalitou u pacient ů s ICHS i po korekci na dalzí rizikové faktory. Podobné vliv byl pozorován i u r 384A/G polymorfismu, který byl spojen i s vyzzím výskytem kardiovaskulárních p íhod. Jsou vzak pot ěbné dalzí rozsáhlé studie k objasn ění této problematiky.

2.5.4. Literatura

- 1) Vasku A., Meluzin J., Blahak J. et al. Matrix metallo proteinase 13 genotype in rs640198 polymorphism is associated with severe coronary artery disease, *Disease Markers* 2012;33(1):43. 49.
- 2) Machal J., Vasku A, Kincl V et al. Association between three single nucleotide polymorphisms in eotaxin (CCL 11) gene, hexanucleotide repetition upstream, severity and course of coronary atherosclerosis, *Journal of Applied Genetics* 2012;53(3):271. 278.
- 3) Kincl V., Vasku A., Meluzin J., Panovsky R, Semenka J, Groch L., Association of the eNOS 4a/b and -786T/C polymorphisms with coronary artery disease, obesity and diabetes mellitus, *Folia Biologica* 2009;55:187. 191.
- 4) E. Emanuele, C. Falcone, A. De Angelo et al., Association of plasma eotaxin levels with the presence and extent of angiographic coronary artery disease, *Atherosclerosis*, 2006;186:140. 145.
- 5) D. Raaz-Schrauder, L. Klinghammer, C. Baum et al., Association of systemic inflammation markers with the presence and extent of coronary artery calcification. *Cytokine* 2012;57:251. 257.
- 6) D. Ardigo, T. L. Assimes, S. P. Fortmann et al., Circulating chemokines accurately identify individuals with clinically significant atherosclerotic heart disease. *Physiological Genomics* 2007;31:402. 409.
- 7) D.E. Mosedale, D.J. Smith, S. Aitken et al., Circulating levels of MCP-1 and eotaxin are not associated with presence of atherosclerosis or previous myocardial infarction, *Atherosclerosis* 2005;183:268. 274.

- 8) F. Canouï-Poitrine, G. Luc, Z. Mallat et al. Systemic chemokine levels, coronary heart disease, and ischemic stroke events: the PRIME study. *Neurology* 2011;77:1165-1173.
- 9) C. A. Wyss, M. Neidhart, L. Altwegg et al., Cellular actors, Toll-like receptors, and local cytokine profile in acute coronary syndromes. *European Heart Journal* 2010;31:1457-1469.
- 10) Y. Wang, A. O. Y. Luk, R. C. W. Ma et al. Independent predictive roles of eotaxin Ala23Thr, paraoxonase 2 Ser311Cys and β 3-adrenergic receptor Trp64Arg polymorphisms on cardiac disease in type 2 diabetes: an 8-year prospective cohort analysis of 1297 patients. *Diabetic Medicine* 2010;27:376-383.
- 11) H. Nakamura, A. D. Luster, T. Nakamura et al., A variant eotaxin: its effects on the asthma phenotype. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001;108:946-953.
- 12) T.-N. Wang, W. Chiang, H.-I. Tseng et al. The polymorphisms of Eotaxin 1 and CCR3 genes influence on serum IgE, Eotaxin levels and mild asthmatic children in Taiwan. *Allergy* 2007;62:1125-1130.
- 13) B. V. Loughrey, A. McGinty, I. S. Young, D. R. McCance, and L. A. Powell, Increased circulating CC chemokine levels in the metabolic syndrome are reduced by low-dose atorvastatin treatment: evidence from a randomized controlled trial. *Clinical Endocrinology* 2013;79:800-806.
- 14) W. Wang, W. Le, R. Ahuja, D. Y. Cho, P. H. Hwang, D. Upadhyay. Inhibition of inflammatory mediators: role of statins in airway inflammation. *Otolaryngology: Head and Neck Surgery* 2011;144:982-987.

- 15) A.A. Zeki, P.Thai, N.J.Kenyon, R.Wu. Differential effects of simvastatin on IL-13-induced cytokine gene expression in primary mouse tracheal epithelial cells. *Respiratory Research* 2012;13:article 38.
- 16) Y. Sheikine, B. Olsen, B. Gharizadeh, K. Jatta, P. Tornvall, M. Ghaderi. Influence of eotaxin 67G>A polymorphism on plasma eotaxin concentrations in myocardial infarction survivors and healthy controls. *Atherosclerosis* 2006;189:458. 463.
- 17) R.Y.L. Zee, N.R.Cook, S.Cheng et al. Threonine for alanine substitution in the eotaxin(CCL11) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2004;175:91. 94.
- 18) T.B. Opstad,H.Arnese, A. A.Pettersen, and I.Seljeftot, %The MMP-9-1562C/T polymorphism in the presence of metabolic syndrome increases the risk of clinical events in patients with coronary artery disease. *PLoS ONE*, vol. 9, no. 9, Article ID e106816,2014.
- 19) T. B. Opstad, A. _A. Pettersen, H. Arnesen, I. Seljeftot, %The co-existence of the IL-18 +183 A/G and MMP-9 -1562C/T polymorphisms is associated with clinical events in coronary artery disease patients. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 9, Article ID e74498,2013.
- 20) S. Humphries, C. Bauters, A. Meirhaeghe, L. Luong, M. Bertrand, P. Amouyel. The 5A 6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP3) gene as a risk factor for restenosis. *European Heart Journal* 2002;23:721. 725.
- 21) H.Rai,F.Parveen,S.Kumar,A.Kapoor, N.Sinha. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with coronary artery disease: an updated meta-analysis and systematic review. *PLoS ONE* 2014;vol.9, no.11, Article ID e113363.

3. Abstrakt/shrnutí

Tato klinicky-experimentální práce přináší souhrn analýz vybraných genových polymorfismů a jejich vztahu k ICHS u relativně rozsáhlého souboru subjektů, kde byl zkoumán vztah genotypů a klinického nálezu. U zkoumaných polymorfismů pro endoteliální NO syntázu se nepotvrdil jejich vztah k výskytu nebo závažnosti ICHS. S rozsahem ICHS ve smyslu počtu postižených tepen souvisí polymorfismy (GAAGGA)_n hexanukleotidové opakování v genu pro eotaxin a rs640198 polymorfismus v genu pro MMP-13. U polymorfismu 67 G>A genotypu GG eotaxinového genu byl prokázán významný vztah k výskytu akutních koronárních syndromů. Na popisné studii navázala studie se sledováním vztahu klinických příhod a genotypů u stejných pacientů, což představuje relativně ojedinělou koncepci a možnou další perspektivu geneticko-klinických studií. V této následné studii byl u pacientů s ICHS prokázán vliv na mortalitní prognózu u 67 G/A polymorfismu v genu pro eotaxin.

Tato práce potvrzuje teorii, že ischemická choroba srdeční je multifaktoriální onemocnění, kde se vliv genetických predispozic vzájemně doplňuje s dalšími rizikovými faktory a může být i významným faktorem podporujícím rozvoj aterosklerózy což v konečném důsledku vede k progresi aterosklerotických lézí až do stadia hemodynamicky významných stenóz v koronárním řezišti.

4. Abstract

Background: this work is summary of several studies of selected genetic polymorphisms and laboratory markers and their relation to coronary artery disease.

Patients and methods: Over 1200 patients referred to coronary angiography (final numbers are different in each study) were comprised into studies. The blood samples were collected, and analysis of selected DNA polymorphisms (eNOS -786 C/T, 4 a/b; MMP 13 G/T; eotaxin -426C/T, -384 A/G, 67 G/A, (GAAGGA)_n hexanucleotide repetition) was performed.

Results: There was not significant association of tested eNOS polymorphisms to presence or extend of CAD. The extend od CAD by means of number of affected coronary arterie sis related with GAAGGA)_n hexanucleotide repetition in eotaxin gene and MMP 13 G/T in matrix metalloproteinase gene. There was found significant association of acute coronary syndromes and GG genotype of eotaxin 67 G/A polymorphisms. The descriptive studies were replenished by one follow-up study with assessment of the relation of clinical events and genotypes in same patients. In this study was found significant relation of 67 G/A eotaxine polymorphism and mortality.

Conclusion: This work confirms a multi-factorial origin of coronary artery disease, the influence of genetic predispositions is mutual with traditional risk factors and also may be a significant factors supporting occurence of atherosclerotic lesions.

5. Originály publikovaných prací