

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení matrixových metaloproteináz u pacientů  
s kardiovaskulárním onemocněním a u diabetiků  
Diplomová práce

2022

Bc. Kateřina Baudyšová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Baudyšová**  
Osobní číslo: **C20468**  
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**  
Téma práce: **Stanovení matrixových metaloproteináz u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním a u diabetiků**  
Téma práce anglicky: **The Determination Of Matrix Metalloproteinases In Cardiovascular Patients And In Diabetics**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

Seznamte se s literárními údaji o vztahu mezi hladinami metaloproteináz -2 a -9, perkutánní koronární intervencí a celkovou krátkodobou i dlouhodobou prognózou pacienta. Dále pak o vlivu diabetu na hladiny obou enzymů.

### Experimentální část:

V návaznosti na předchozí diplomové práce dokončete stanovení koncentrace metaloproteináz -2 a -9 ve vzorcích pacientů, kteří prodělali perkutánní koronární intervenci. Pro stanovení využijte želatinovou zymografii. Stanovení proveďte také pro skupinu vybraných pacientů s diabetem mellitus. Výsledky porovnejte s aktuální dostupnou literaturou.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.** v.r.  
děkan

LS.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení matrixových metaloproteináz u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním a u diabetiků jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4. 5. 2022

Bc. Kateřina Baudyšová v. r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Pavle Žákové, PhD. za odborné vedení, velkou ochotu a trpělivost při zpracovávání mé diplomové práce.

V neposlední řadě patří poděkování mé rodině, která mě velmi podporovala v době studia.

## **ANOTACE**

Cílem této diplomové práce bylo navázat na předchozí práce a dokončit stanovení koncentrace metaloproteináz-2 a -9 pomocí želatinové zymografie ve vzorcích pacientů, kteří podstoupili perkutánní koronární intervenci. Dále se tato diplomová práce zaměřuje na stanovení hladin metaloproteináz-2 a -9 u vybrané skupiny pacientů s diabetem mellitus.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

želatinová zymografie, perkutánní koronární intervence, ischemická choroba srdeční, matrixové metaloproteinázy-2 a -9, koronární stenty, diabetes mellitus

## **TITLE**

The determination of matrix metalloproteinases in cardiovascular patients and in diabetics

## **ANNOTATION**

This master's thesis aims to extend the previous work and complete the determination of the concentration of metalloproteinase-2 and -9 by means of gelatin zymography in samples from patients who underwent percutaneous coronary intervention. Moreover, the thesis focuses on determining the levels of metalloproteinase-2 and -9 in a selected group of patients with diabetes mellitus.

## **KEYWORDS**

gelatin zymography, percutaneous coronary intervention, ischemic heart disease, matrix metalloproteinase-2 and -9, coronary stents, diabetes mellitus

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	10
ÚVOD.....	11
A. TEORETICKÁ ČÁST .....	12
1. ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ.....	12
1.1 Rizikové faktory .....	13
1.1.1 Neovlivnitelné rizikové faktory .....	14
1.1.2 Ovlivnitelné rizikové faktory.....	14
1.2 Formy ICHS.....	15
1.2.1 Akutní forma ICHS.....	16
1.2.2 Chronická forma ICHS .....	17
2. PERKUTÁNNÍ KORONÁRNÍ INTERVENCE.....	19
2.1 Komplikace PCI.....	20
3. STENTY .....	22
3.1 Kovové stenty .....	22
3.2 Lékové stenty .....	23
3.3 Biodegradabilní stenty .....	26
3.4 Komplikace po implantaci stentů .....	27
3.4.1 Restenóza ve stentu.....	27
3.4.2 Trombóza stentu .....	28
4. MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY .....	29
4.1 Želatinázy.....	30
4.2 Matrixová metaloproteináza – 2 .....	31
4.3 Matrixová metaloproteináza – 9 .....	31
4.4 Biologický materiál a jeho stabilita .....	32
5. SOUVISLOST MEZI METALOPROTEINÁZAMI A PERKUTÁNNÍ KORONÁRNÍ INTERVENCÍ .....	35
6. DIABETES MELLITUS .....	39
6.1 Souvislost metaloproteináz s diabetem mellitus.....	40
7. CÍL PRÁCE .....	42
B. PRAKTICKÁ ČÁST.....	43

8. MATERIÁL, PACIENTI A METODA.....	43
8.1 Použité přístroje a pomůcky .....	43
8.2 Použité chemikálie .....	45
8.3 Pacienti.....	46
8.4 Vzorky .....	46
8.5 Příprava potřebných roztoků.....	47
8.6 Postup želatinové zymografie.....	51
8.7 Vyhodnocování gelů .....	58
9. VÝSLEDKY .....	59
10. DISKUZE .....	64
ZÁVĚR .....	69
POUŽITÁ LITERATURA .....	70
PŘÍLOHY .....	80



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1</b> Globální distribuce ICHS. Barvy označují míru prevalence na 100 000 obyvatel v roce 2017.....	13
<b>Obrázek 2</b> Perkutánní koronární intervence. A) Aterosklerotický plát B) Balónkový katétr C) Zprůchodnění tepny pomocí stentu.....	19
<b>Obrázek 3</b> Příklad kovového stentu. Nahoře v rozvinutém, dole v nerozvinutém stavu. ....	23
<b>Obrázek 4</b> Stent uvolňující zotarolimus. ....	25
<b>Obrázek 5</b> Vstřebatelný stent Absorb BVS. ....	27
<b>Obrázek 6</b> Typická MMP struktura. ....	30
<b>Obrázek 7</b> Průměrné hodnoty aktivit proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2 ve vzorcích séra a plazmy oddělených od odebrané krve do zkumavek se zvyšujícími se koncentracemi antikoagulancií.....	34
<b>Obrázek 8</b> Expres a trend změny MMP-2 a MMP-9 u stentu eluujícím inhibitor MMP (GM6001) a kontroly. ....	36
<b>Obrázek 9</b> Expres MMP-2 a MMP-9 v časových intervalech po zavedení stentu. ....	37
<b>Obrázek 10</b> A) Koncentrace MMP-2 u pacientů s perkutánní transluminární angioplastikou B) Koncentrace MMP-9 u pacientů s perkutánní transluminární angioplastikou. ....	38
<b>Obrázek 11</b> Aparatura pro elektroforézu a přípravu gelů.....	43
<b>Obrázek 12</b> Základní vyhodnocovací panel programu ImageJ .....	58
<b>Obrázek 13</b> Příklad zymogramu .....	59
<b>Obrázek 14</b> Průměrné hodnoty koncentrace proMMP-9 a proMMP-2 v séru a plazmě. ....	62
<b>Obrázek 15</b> Porovnání hladin enzymů proMMP-9 a proMMP-2 pro posouzení dlouhodobé stability vzorků .....	63
<b>Obrázek 16</b> Porovnání hladin enzymu MMP-9 pro posouzení dlouhodobé stability vzorků .....	63
<b>Tabulka 1</b> Klinické formy ICHS. ....	15
<b>Tabulka 2</b> Reagencie pro přípravu dělicího gelu.....	54
<b>Tabulka 3</b> Reagencie pro přípravu zaostřovacího gelu .....	55
<b>Tabulka 4</b> Hodnoty proMMP-9 a MMP-9 pacientů po PCI.....	60
<b>Tabulka 5</b> Hodnoty proMMP-2 pacientů po PCI .....	60
<b>Tabulka 6</b> Hodnoty proMMP-9 a proMMP-2 pacientů s DM.....	61
<b>Tabulka 7</b> T-test významnosti či nevýznamnosti hladin proMMP-9 a proMMP-2 mezi sérem a plazmou. ....	62

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AMI	akutní infarkt myokardu
APMA	acetoxymerkurioanilin
APS	persíran amonný
BDS	biodegradabilní stent
BMS	kovový stent
DES	lékový stent
DM	diabetes mellitus
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EKG	elektrokardiografie
ELISA	enzyme-linked imuno sorbent assay
ICHS	ischemická choroba srdeční
ISR	in stent restenóza
MI	infarkt myokardu
MMP	matrixové metaloproteinázy
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCI	perkutánní koronární intervence
proMMP-2	proenzym MMP-2
proMMP-9	proenzym MMP-9
SDS	dodecylsíran sodný
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin
TIMP	tkáňové inhibitory metaloproteináz

## ÚVOD

Srdeční selhání je jednou z hlavních příčin úmrtnosti a hospitalizace na celém světě. Nejčastějším důvodem selhání je ischemická choroba srdeční, kdy nedochází k dostatečnému prokrvení srdečního svalu. Ischemická choroba srdeční postihuje zhruba 1,72 % světové populace a předpokládá se, že globální prevalence bude stále stoupat. Nejčastější příčinou ischemické choroby srdeční je přítomnost plaku v koronární cévě, který téměř vždy vzniká aterosklerózou. Je známo, že matrixové metaloproteinázy-2 a -9 se nacházejí v aterosklerotických placích. Expresí těchto enzymů je větší v místě nestability plaku. Zvýšení hladin matrixových metaloproteináz-2 a -9 v periferní krvi u akutního koronárního syndromu může být užitečné jako neinvazivní testy pro detekci stability plaku. Jedním z rizikových faktorů ischemické choroby srdeční je diabetes mellitus. Zdá se, že u pacientů s diabetem mellitus jsou hladiny matrixových metaloproteináz nějakým způsobem zvýšené.

Léčebný postup pro ischemickou chorobu srdeční je perkutánní koronární intervence. Cílem je otevřít koronární tepnu pomocí malého balónkového katétru, zavést stent, a tak obnovit tok krve. Jednou z komplikací tohoto zákroku je restenóza ve stentu, kdy dochází z opětovnému zúžení cévy. Zdá se, že matrixové metaloproteinázy hrají důležitou roli při restenóze a jejich zvýšené hladiny zvyšují i riziko restenózy.

Cílem této práce je navázat na předešlé diplomové práce a dokončit stanovení koncentrace metaloproteináz-2 a -9 pomocí želatinové zymografie u pacientů s ischemickou chorobou srdeční. Pacientům byly implantované stenty pomocí perkutánní koronární intervence. Veškeré vzorky séra od pacientů pochází z Interní kliniky – Kardiologického oddělení se sídlem v Pardubicích (Nemocnice Pardubického kraje, a. s.). Dále se práce zaměřuje na stanovení koncentrace metaloproteináz-2 a -9 u skupiny vybraných pacientů s diabetem mellitus. Tyto vzorky séra a plazem pochází od pacientů z Interního oddělení – lůžková část a z Diabetologické ambulance se sídlem v Pardubicích (Nemocnice Pardubického kraje, a. s.).

## A. TEORETICKÁ ČÁST

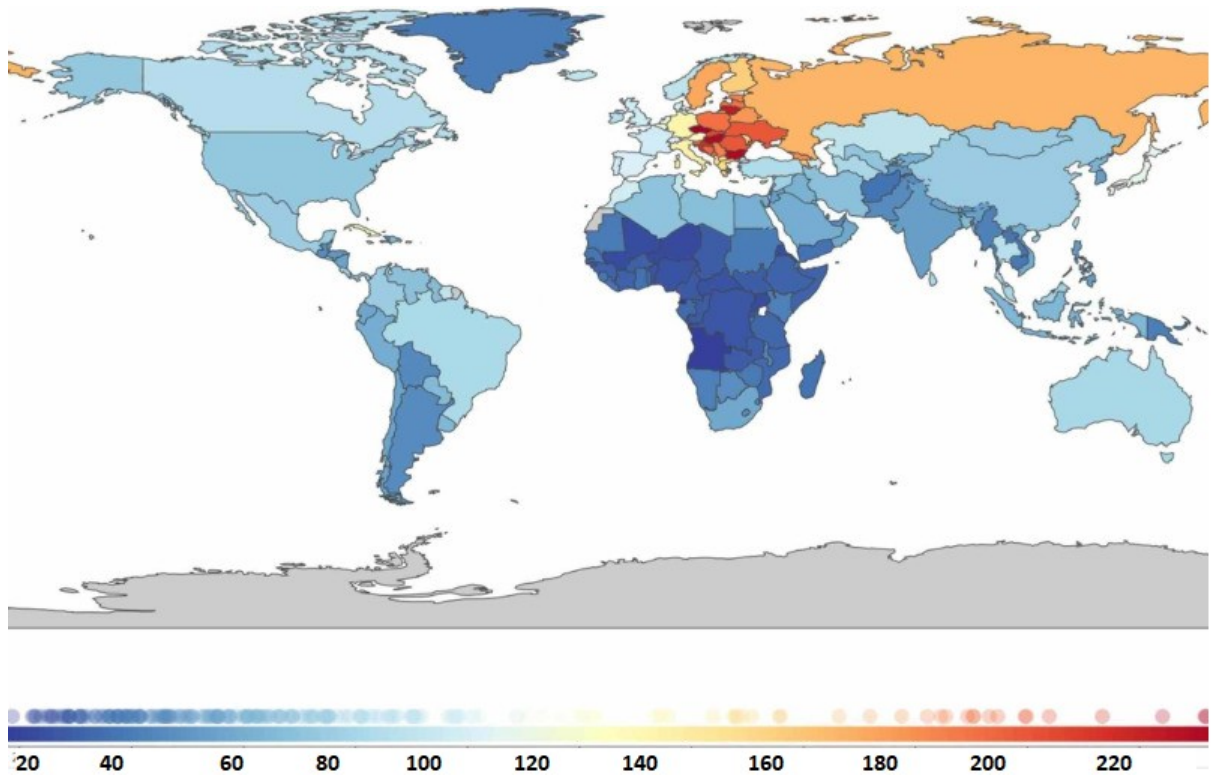
### 1. ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ

Srdeční selhání je komplexní syndrom zodpovědný za vysokou úmrtnost a hospitalizaci v běžné populaci na celém světě. Jednou z nejčastějších příčin tohoto selhání je ischemická choroba srdeční (ICHS) [1]. Nejčastěji se ICHS charakterizuje jako nedostatečné prokrvení srdečního svalu. Vzniká nepoměr mezi dodávkou živin a kyslíku krví a potřebami myokardu [2].

Mezi nejčastější příčinu ICHS obvykle patří onemocnění koronárních tepen. To je definováno přítomností jednoho či více obstrukčních plaků, které zapříčiní snížený průtok krve koronárními cévami. To způsobuje ischemii myokardu a následné srdeční selhání [1]. Příčinou těchto plaků je bezmála vždy ateroskleróza. Princip aterosklerózy spočívá v ukládání tukových látek do stěny tepen. Do věku 10 let po narození má člověk tepny hladké, elastické, a tudíž nekladou proudící krvi odpor. Ve věku 10 let jsou však v cévních stěnách prokazatelné lipidové proužky. Jedná se o počáteční stádium ukládání cholesterolu a lipoproteinů. Během života se do těchto proužků dále zabudovávají další tukové látky, což vede k poškození cévní stěny. Postupem času se vyvíjí aterosklerotický plát, který může mít různé velikosti. Dále se do tohoto plátu inkorporuje vápník. Postupné narůstání aterosklerotického plátu může zapříčinit úplnou obstrukci cévy. Některé aterosklerotické pláty mohou být na povrchu tvrdé s vnitřní částí obsahující měkké tuky. Pokud dojde k ruptuře plátu, tuky uvnitř se dostanou do kontaktu s krví. To zapříčiní vznik krevní sraženiny, která ještě více zúží či úplně uzavře cévu [3].

Odhaduje se, že v celosvětovém měřítku ICHS postihuje přibližně 126 milionů jedinců, což je zhruba 1,72 % světové populace. Toto onemocnění způsobilo devět milionů úmrtí, což z něj činí jednu z hlavních příčin úmrtnosti na celém světě. ICHS si toto postavení udržuje více jak dvě desetiletí. Muži jsou častěji postiženi než ženy a výskyt tohoto onemocnění obvykle začíná objeovat kolem 40. roku života a s věkem se postupně zvyšuje. Bohužel globální prevalence ICHS stále stoupá. Očekává se, že rostoucí výskyt ICHS bude dále pokračovat nejen kvůli zvýšené prevalenci obezity, diabetu a metabolického syndromu, ale také kvůli stárnutí populace. Odhaduje se, že současná míra prevalence 1 655 na 100 000 obyvatel by měla do roku 2030 přeskočit 1 845. Nejvyšší prevalenci si udržují země východní Evropy, jak ukazuje obrázek 1. Během posledních 20 let se několik zemí východní Evropy, jako je Litva, Bulharsko, Lotyšsko, Estonsko a Česká republika, posunulo na nejvyšší příčky

prevalence. V opačném případě země s vysokými příjmy, jako je Spojené království, Finsko, Dánsko, Německo a Itálie, se posunuly dolů. Západní Evropa stále vykazuje rostoucí prevalenci, a to vyšší než v jižní Asii a ve zbytku světa [4].



*Obrázek 1* Globální distribuce ICDS. Barvy označují míru prevalence na 100 000 obyvatel v roce 2017. Převzato z [4].

## 1.1 Rizikové faktory

Zdravotní péče o pacienty s ICDS stojí ročně v USA více než 200 miliard dolarů. ICDS je významnou příčinou úmrtí a invalidity, lze však tomuto onemocnění předcházet. Vzhledem k obrovské zdravotní zátěži způsobené ICDS byly definovány ovlivnitelné a neovlivnitelné rizikové faktory. Mezi neovlivnitelné rizikové faktory patří věk, pohlaví, etnický původ a rodinná anamnéza. Ovlivnitelnými rizikovými faktory jsou hypertenze, hyperlipidémie, diabetes, obezita, kouření, špatná životospráva, sedavý způsob života a stres. Díky definici těchto rizikových faktorů došlo ke zmírnění výsledné ekonomické zátěže. Kombinace rizikových faktorů s pokroky v lékařské technologii významně přispěla k snížení úmrtnosti v souvislosti s ICDS za posledních čtyřicet let v západních zemích [5].

### **1.1.1 Neovlivnitelné rizikové faktory**

Jak bylo zmíněno výše, mezi neovlivnitelné rizikové faktory patří věk, pohlaví, etnický původ a rodinná anamnéza. Bylo zjištěno, že věk, pohlaví a etnická příslušnost zachycují 63 % až 80 % rizika k vzniku kardiovaskulárního onemocnění [6].

Prevalence ICHS se zvyšuje po 35 letech věku života u mužů i žen. U lidí ve věku 40 let bylo celoživotní riziko vzniku ICHS u mužů 49 % a u žen 32 %. U osob dosahujících věku 70 let bylo celoživotní riziko 35 % u mužů a 24 % žen. Co se týče otázky pohlaví, je dokázáno, že muži jsou ve srovnání se ženami vystaveni zvýšenému riziku [7]. Do skupin etnické příslušnosti se zvýšeným rizikem morbidit a mortality na ICHS patří Černoši, Hispánci a jihovýchodní Asiaté [5]. Rodinná anamnéza ICHS je uznávaným rizikovým faktorem. Spojení mezi rodinou anamnézou a ICHS je tím větší, čím dříve se u člena rodiny rozvine ICHS. Rodinná anamnéza je spojena s 50% zvýšením celoživotního rizika kardiovaskulárních onemocnění a úmrtnosti na ICHS [8].

### **1.1.2 Ovlivnitelné rizikové faktory**

Mezi ovlivnitelné rizikové faktory řadíme hypertenzi, hyperlipidémii, diabetes, obezitu, kouření, špatnou stravu, sedavý způsob života a stres. Zdá se, že jednotlivé ovlivnitelné rizikové faktory přispívají pouze k mírnému poklesu ICHS. Avšak odstranění či kontrola těchto individuálních rizikových faktorů by vedly k podstatnému snížení celkového počtu případů ICHS v populaci [6].

Hypertenze je dlouho hlavním rizikovým faktorem srdečních chorob. Působí jak oxidačním, tak i mechanickým namáháním, které způsobuje větší nápor na arteriální stěnu [9]. Hypertenze zdvojnásobuje riziko kardiovaskulárních onemocnění a výrazně urychluje rozvoj aterosklerózy. Včasná prevence a léčba vysokého krevního tlaku a ICHS, tak může mít za následek zlepšení stavu pacienta [10]. Hyperlipidémie je považována za druhý nejčastější rizikový faktor ICHS. Podle Světové zdravotnické organizace způsobil zvýšený cholesterol přibližně 2,6 milionu úmrtí [5]. Diabetes mellitus (DM) je jedním z hlavních rizikových faktorů kardiovaskulárního onemocnění, a to především ICHS. Patofyziologie ischemie myokardu je u diabetických pacientů složitá a není zcela objasněna. Nejčastější příčina úmrtí u diabetiků je právě kardiovaskulární onemocnění a ICHS. Diabetičtí pacienti mají až dvojnásobné riziko kardiovaskulárních onemocnění [11]. Fyzická nečinnost a sedavé chování patří k hlavním ovlivnitelným rizikovým faktorům prevence kardiovaskulárních chorob. Riziko ICHS je velmi zvýšené u fyzicky neaktivní populace. Zvýšené cvičení od neaktivity po

150 minut středně intenzivní aerobní aktivity týdně může být účinné pro snížení výskytu a úmrtnosti na kardiovaskulární choroby o 17 %. Pro snížení rozvoje ICHS je to přibližně 25 %. Ženy mají větší pravděpodobnost vzniku ICHS související s fyzickou nečinností než muži. Riziko k vytvoření ICHS mají také výrazně vyšší starší osoby [12].

## 1.2 Formy ICHS

ICHS má velké spektrum klinických projevů od zcela asymptomatického onemocnění až po náhlou srdeční smrt. Tyto jednotlivé klinické formy se mohou navzájem kombinovat. ICHS se dělí na akutní a chronickou formu (tabulka 1). Tyto formy se podstatně liší svojí prognózou a léčebnými postupy.

Akutní formy ICHS představují bezprostřední ohrožení života. Nemocný proto musí být bez prodlení hospitalizován, vždy na koronární jednotce či na jednotce intenzivní péče. Léčba takovýchto pacientů je obtížná a musí být předána do rukou specialistů. Praktický lékař by v tomto případě měl získat podezření či rozpoznat, že se jedná o akutní formu ICHS a neprodleně zajistit co nejrychlejší převoz pacienta do nemocnice. V této fázi jde o čas a s každou minutou odumírá určité množství myokardu. O pacienty s chronickou formou ICHS pečuje praktický lékař, který dle potřeby spolupracuje s internistou nebo s kardiologem [13].

*Tabulka 1 Klinické formy ICHS. Upraveno dle [13]*

<b>Klinické formy ischemické choroby srdeční</b>	
<b>Formy akutní</b>	<b>Formy chronické</b>
Akutní koronární syndromy: Nestabilní angina pectoris Akutní infarkt myokardu Náhlá srdeční smrt	Asymptomatická ICHS Stabilní angina pectoris Stav po infarktu myokardu Dysrytmická forma ICHS Chronické srdeční selhání

### 1.2.1 Akutní forma ICHS

Mezi akutní formy ICHS patří nestabilní angina pectoris, akutní infarkt myokardu (AMI) a náhlá srdeční smrt [13].

Angina pectoris je pojem klinický, avšak diagnóza je založena na anamnestickém údaji o bolesti. Ta je charakteristická pro danou oblast, trváním, charakterem bolesti a vztahem k námaze. Typická stabilní angina pectoris má tři základní vlastnosti. Za prvé svíravou bolest na hrudi. Za druhé ji způsobuje námaha nebo stres a za třetí, odeznívá rychle v klidu nebo po podání rychle působících nitrátů [14]. Za nestabilní anginu pectoris se považuje nově vzniklá angina pectoris nebo v posledních 30 dnech jakkoliv zhoršená již existující angina [13]. Toto onemocnění má za následek více než 1 milion hospitalizací ročně [15]. Nestabilní angina pectoris se projevuje jako klidová angina, což znamená charakteristickou bolest vzniklou v klidu a trvající delší dobu (do 20 minut). Může se také projevit jako původně stabilní angina, která se však zhoršuje jak v četnosti záchvatů, tak i v jejich trvání. Posledním způsobem, jak se může projevit, je jako nově vzniklá angina pectoris, která významně omezuje nemocného v každodenní činnosti v období dvou měsíců od začátku obtíží. Nestabilní angina pectoris může být spojena s nestabilním aterosklerotickým plátem a jeho následnou rupturou. Ruptura zapříčiní vznik nasedajícího intrakoronárního trombu, který zvětší stupeň obstrukce věnčité tepny, a tím zhorší ischemii. Diagnóza je založena na správném zhodnocení údajů a na vyloučení akutního infarktu myokardu. Ten lze vyloučit v nemocnici pomocí biochemických markerů nekrózy myokardu, nejčastěji troponinů. U nestabilní anginy pectoris jsou tyto markery ve většině případů negativní [13, 14].

AMI je jednou z hlavních příčin nemocnosti a úmrtí na celém světě. Tato nemoc se tradičně rozděluje na infarkt myokardu (MI) s elevací ST a bez ST elevace [16]. Odhaduje se, že více než 3 miliony lidí ročně mají AMI s elevací ST, přičemž více než 4 miliony mají MI bez ST elevace. MI je nemocí, která se vyskytuje hlavně v rozvinutých zemích, v současné době je výskyt této nemoci stále častější [17]. AMI je ložisková ischemická nekróza srdečního svalu, která vzniká nenadálým uzávěrem věnčité tepny zásobující příslušnou oblast. Nekróza myokardu začíná už za 20–30 minut po uzávěru věnčité tepny od subendokardálních vrstev, které jsou na nedostatek kyslíku nejcitlivější. S postupem času se nekróza rozšiřuje směrem k subperikardu a přibližně do 6 hodin postihne celou tloušťku stěny komory [13]. Ve většině případů je MI důsledkem narušení zranitelného aterosklerotického plaku nebo eroze endotelu koronární tepny. Prasknutý plak uvolní svůj trombogenní obsah, což zapříčiní



aktivaci krevních destiček, iniciaci koagulační kaskády, tvorbu trombu a embolizaci. Tento hyperkoagulační stav by mohl přispět k prasknutí dalších plaků, a proto může být více než jedna vinná léze. Konečným výsledkem je tedy nekróza myokardu, která je detekovatelná zvýšenými hladinami srdečních biomarkerů v periferní krvi (především troponinu). K diagnóze infarktu myokardu se také používá elektrokardiografie (EKG) [16]. Hlavním příznakem akutního infarktu myokardu je bolest na hrudi, která je přítomna u více než 80 % pacientů. Bolest je téměř totožná jako u anginy pectoris. Taková bolest se jeví jako svíravá, palčivá nebo tlaková, šíří se do levého prekordia, vystřeluje do paží, typicky po ulnární straně levé horní končetiny, do ramen, krku, dolní čelisti, do zad mezi lopatky nebo do epigastra. Většinou je bolest intenzivnější než při angině. Bolest trvá déle než 20 minut a nereaguje ani na opakované podání nitroglycerinu. Bolest se však nemusí objevit u všech pacientů. Přibližně u 10 % nemocných může MI proběhnout asymptomaticky, který je diagnostikován později náhodně z elektrokardiogramu. Takový infarkt nazýváme němý infarkt [13].

Náhlá srdeční smrt je definována jako přirozená, nenásilná, neočekávaná a vyskytující se do 1 hodiny od nástupu akutních symptomů. Nejčastější příčinou náhlé srdeční smrti je ICHS. Náhlou srdeční smrt mohou předcházet příznaky jako je bolest na hrudi, dušnost a palpitace. Mnoho jedinců však nemají před touto událostí žádné příznaky. Podle definice pro náhlou srdeční smrt pacient nepřežije. Pokud pacient přežije, událost se nazývá přerušená náhlá srdeční smrt nebo náhlá srdeční zástava. Náhlá srdeční smrt se v USA každoročně vyskytuje u 300 000 – 400 000 jedinců. Výskyt náhlé srdeční smrti se zvyšuje s věkem. Incidence je vyšší u mužů než u žen. Ženy jsou relativně chráněny až do menopauzálních let, kdy se incidence zvyšuje a přibližuje k mužům. Incidence u mladších populací (<30let) je 100krát nižší než u starších jedinců [18, 19].

### **1.2.2 Chronická forma ICHS**

Do chronických forem ICHS patří asymptomatická ICHS, stabilní angina pectoris, stav po infarktu myokardu, dysrhythmická forma ICHS a chronické srdeční selhání [13].

Na asymptomatickou nebo též nazývanou němou ICHS se většinou přijde při ambulantním monitorování. Například při provedení EKG. Pro asymptomatické osoby je riziko akutních kardiovaskulárních příhod velmi nízké. Tento náález je rizikem pro pacienta a je tedy nutné, aby byla zavedena razantní preventivní opatření dle příslušných doporučení.

Pacienti po prodělání infarktu myokardu jsou ohroženi dalšími kardiovaskulárními příhodami. Před propuštěním z nemocnice by měly být pacientům provedeny neinvazivní testy. Ty nám odliší pacienty na nemocné s vysokým rizikem reinfarktu, chronického srdečního selhání a náhlé smrti. U takových to případů bývá jednoroční mortalita přes 25 %. Tuto nepříznivou prognózu lze změnit sekundární prevencí. Dále jsou to nemocní s nízkým rizikem, kdy roční mortalita je pouze 1-3 % [20].

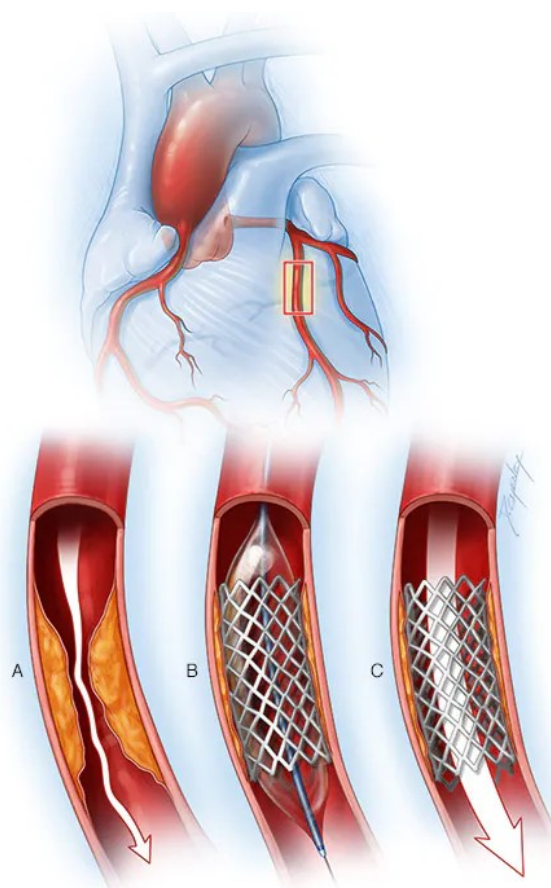
Stabilní angina pectoris je běžná a obtěžující nemoc. Je to klinický syndrom charakterizovaný bolestí na hrudi, čelisti, rameni, v zádech či v pažích. Ta je většinou vyvolána námahou nebo emočním stresem. Bolest, která je charakteristická, je popisována stejně jako u nestabilní anginy pectoris. Trvání nepohodlí je krátké, ve většině případů ne více jak 10 minut a častěji ještě méně. Příznaky se typicky zhoršují se zvýšenou úrovní námahy, jako je chůze do svahu. Bolest odezní, pokud je pacient v klidu či po podání nitroglycerinu [21]. Pacienti se často vyhýbají činnostem, které vyvolávají příznaky, a mají tak zhoršenou kvalitu života. U většiny pacientů se stabilní anginou pectoris lze předejít zhoršení nemoci změnou životního stylu. Pacient by měl především přestat kouřit a začít pravidelně cvičit. Situaci lze také zlepšit podáváním antiangiálních léků [22]. Příčinou stabilní anginy pectoris je převážně omezení průtoku některou z koronárních tepen aterosklerotickým plátem. Vnitřní průsvit tepny musí být zúžen o více jak 70 %. Klinicky němé jsou pak zpravidla méně významné stenózy věnčitých tepen [23]. Prevalence anginy pectoris značně stoupá s věkem u obou pohlaví. Od 0,1-1 % u žen ve věku 45-54 let a až 10-15 % u žen ve věku 65-74 let. U mužů pak 2-5 % ve věku 45-54 let a až 10-20 % u mužů ve věku 65-74 let. Lze tedy odhadnout, že ve většině evropských zemí trpí anginou pectoris 20 000 – 40 000 nemocných na milion obyvatel [21].

U většiny případů chronického srdečního selhání dochází k remodelaci levé komory. Prevalence toho onemocnění se zvyšuje s věkem. Prevence onemocnění koronárních tepen, rizikové faktory a kontrola krevního tlaku jsou zásadní v prevenci dysfunkce levé komory [24, 25].

## 2. PERKUTÁNNÍ KORONÁRNÍ INTERVENCE

Perkutánní koronární intervence (PCI) byla dříve nazývána jako angioplastika koronárních cév. Tento léčebný postup se používá u osob s ischemií či infarktem myokardu. PCI je nechirurgická náhrada za srdeční operaci nebo bypass. Tento zákrok je zcela bezpečný s minimem komplikací. Zpravidla navazuje na koronagrafii a angiografii. Cílem PCI je otevřít koronární tepnu pomocí malého balónkového katétru, a tak obnovit průtok krve. Obvykle po samotném roztažení cévy pomocí balónkového katétru dochází navíc k zavedení stentu, který pomáhá podpírat tepnu a snižuje její šanci na opětovné zúžení (obrázek 2) [26–28].

Ačkoli bypass koronární arterie byl uskutečněn v roce 1968, první PCI byla provedena až v září 1977. Zákrok byl proveden švýcarským radiologem Andreasem Gruentzigem v Curychu. Pacientem byl osmatřicetiletý Adolph Bachman, který podstoupil úspěšnou angioplastiku levé věnčité tepny, a ještě do roku 2003 byl zcela v pořádku [29].



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

**Obrázek 2** Perkutánní koronární intervence. A) Aterosklerotický plát B) Balónkový katétr C) Zprůchodnění tepny pomocí stentu. Převzato z [28]

PCI je invazivní zákrok, který probíhá v lokální anestezii na katetrizačním sále a pod rentgenovou kontrolou. Pacientovi je po celou dobu navíc monitorované EKG. Lékař zavede do koronárního řečiště balónkový katétr. Ten se nejčastěji zavádí v oblasti třísla, a to stehenní tepnou nebo na zápěstí přes radiální tepnu. Katétr se zavádí k ústí věnčité tepny. Do vnitřku katetru se zavádí tenký drátek až za zúžené místo tepny. Tento vodící drátek slouží jako kolejnice, po které se zavede balonek do místa zúžení. Poloha balónku je opakovaně kontrolována pomocí kontrastní látky. Pokud je balónek na správném místě (střed nejužšího místa), lékař katétr nafoukne a zúžení cévy se tímto odstraní. V této fázi se pečlivě sleduje celkový stav pacienta, včetně krevního tlaku a pulzu. Při nafouknutí balónku se může objevit charakteristická svíravá bolest za hrudní kostí. Nafouknutý balónek tlačí sklerotické pláty proti stěně věnčité tepny, a tím je zvětšován vnitřní průsvit cévy. Potom se balónek odsaje a vytáhne. Lékař použije ještě jednu kontrastní látku a ujistí se, zda se mu povedlo zúženou cévu rozšířit. V dnešní době se většinou po rozšíření tepny zavede stent. Jedná se o malou výztuž, jejíž úkolem je udržet tepnu roztaženou.

Po ukončení výkonu jsou z těla pacienta odstraněny všechny katetry. Zavaděč však zůstává zaveden ve stehenní tepně a lékař ho odstraní po 4-6 hodinách po zákroku. Pokud je zákrok realizován z ruky, katetr je vytažen neprodleně po výkonu. Po vytažení je přes místo vpichu obmotán kompresivní obvaz, který pomáhá stlačit cévu. V případě zápěstí po dobu 6 hodin, v tříslu na 18-24 hodin. V den provedení by měl pacient vypít více tekutin, než je zvyklý, aby se mohla kontrastní látka snadno vyplavit z těla ledvinami ven. Po 24 hodinách po vytažení katetru by měl pacient začít chodit. Do domácí péče je pacient propuštěn druhý až pátý den po zákroku a přibližně za týden se může vrátit k běžnému způsobu života. Po zákroku je však nutné delší dobu užívat antikoagulantia, která zabraňují vzniku krevní sraženiny [26, 30].

## **2.1 Komplikace PCI**

Každý zákrok s sebou nese určité riziko komplikací a není tomu výjimkou ani u PCI. Každý pacient, který postupuje zákrok, má právo na podrobné informování o možných komplikacích včetně procentuálního vyjádření jejich pravděpodobností. Pacient by též měl dostat informace o tom, jaké je předpokládané riziko přirozeného průběhu choroby v jeho konkrétním případě. Informace by měly být dostačující k tomu, aby se pacient mohl rozhodnout, zda riziko zákroku podstoupit či nikoliv. Pacientovi musí být informace sdělovány srozumitelně a tak, aby jim zcela rozuměl. PCI je spojena s malých rizikem závažných komplikací, jako je úmrtí, MI či cévní mozková příhoda. Vlivem pokroku v kvalitě

materiálu a farmakoterapie se riziko úmrtí v důsledku komplikace po PCI snížilo. Z dřívějších 1-2 % na nynějších 0,1-0,5 % [31].

PCI má invazivní charakter výkonu a s použitím antitrombotické léčby je zde určité riziko periprocedurálního krvácení. Kterékoliv krvácení znamená vždy zhoršení prognózy pacienta. Incidence této komplikace se pohybuje mezi 3-6 %. Krvácení se může vyskytovat v místě vpichu, a to především pokud je přístup veden z oblasti třísla. Obvykle se vytvoří hematom. Někdy se však může objevit vážné krvácení, které může vyžadovat transfuzi krve či chirurgický zákrok. Incidence v tomto případě je 1-2 % [32].

Restenóza cévy je pozdější komplikace PCI. Znamená to, že opět dojde k významnému zúžení v léčené cévě. Tento problém postihuje 30-50 % léčených pacientů. Největší riziko restenózy je během prvních 6 měsíců po PCI. Opětovné zúžení cévy může vést k opětovnému výskytu bolesti na hrudi, což může znamenat další potřebu revaskulizace [33].

Ve výjimečných případech může u pacienta dojít ke kontrastní látkou indukované nefropatii. Příčinou je podání kontrastní látky při zákroku. Látka může způsobit reverzibilní akutní poškození funkce ledvin, které se objevuje zanedlouho po podání kontrastní látky. Tato nefropatie je definována jako zvýšení sérové koncentrace kreatinu o více než 44  $\mu\text{mol/l}$  nebo o 25 % za 48-72 h po podání kontrastní látky. Mezi rizikové pacienty pro vznik kontrastní látkou indukovanou nefropatii patří ti, kteří mají sníženou renální funkci [31].

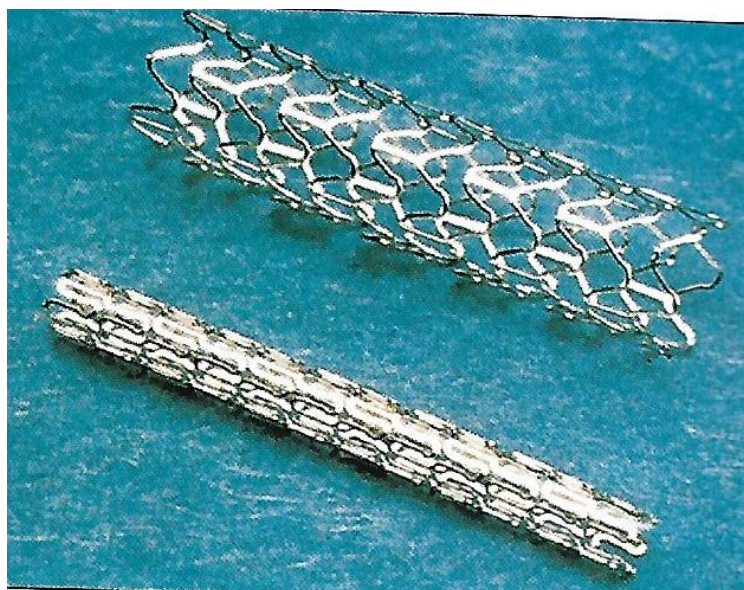
### 3. STENTY

V roce 1986 byla poprvé použita mechanická intravaskulární podpora koronární tepny stentem implantovaným přes cévu. Tento počín byl významným pokrokem v léčbě ICHS. Koronární stent je výztuž navržená primárně k prevenci elastického zpětného rázu a restenózy cévy. Obecně se jedná o tubulární implantát, který dodává tepnám nebo jiným nevaskulárním kanálům mechanickou pevnost, dokud není riziko úplného uzavření odstraněno. Koronární stenty byly vyvinuty v polovině 80. let minulého století. Od té doby došlo k zásadnímu zdokonalení designu a kompozice. Tento zákrok je od počátku zatížen komplikacemi, jako je trombóza koronárního stentu a in stent restenóza (ISR). Z počátku se používaly kovové stenty, které byly nahrazeny polymerem vylučujícím léčivo, aby se zabránilo již zmiňované ISR a trombóze. Zmírnit toto riziko je snahou do budoucna, a to nahrazením trvalého polymeru na biologicky resorbovatelný. V současné době tedy rozlišujeme stenty kovové (BMS – bare metal stent), lékové (DES – drug eluting stent) a na biodegradabilní stenty (BDS – biodegradable stent) [34–38].

#### 3.1 Kovové stenty

Počáteční stenty byly většinou vyrobeny z kovů a jsou označovány jako holé BMS. Tyto permanentní kovové konstrukce jsou vyrobeny z nerezové oceli, slitin kobaltu a chromu a ze slitin niklu a titanu [38]. Prvním koronární stent implantovaný do lidské koronární tepny byl WALLSTENT® (Schneider AG), a to Ulrichem Sigwartem v roce 1986. Jeho klinické omezení spočívalo v technických problémech při dodání stentu na místo určení, proto byl stažen z trhu v roce 1991. V roce 1987 vyvinuli Schatz a spolupracovníci Palmaz-Schatz® stent. Jednalo se o první zařízení s drážkovanou trubicí z nerezové oceli, které bylo roztažitelné, a stal se nejpoužívatelnějším stentem v 90. letech minulého století. Na začátku devadesátých let bylo následně vytvořeno mnoho dalších stentů, kdy se při jejich použití snížil elastický zpětný ráz a restenóza. Tato technologie s sebou nesla i řadu nevýhod. Tyto nové stenty měly vysokou hustotu kovů, což znamenalo, že se u pacientů často objevovala subakutní trombóza ve stentu. Dále byly tyto stenty objemné a technicky náročné na použití, proto často při zavádění docházelo k selhání a embolizaci [37]. Mimo to zde bylo stále velké riziko ISR, který je problémem u 20-30 % ošetřených pacientů. Ovlivnit restenózu se firmy snažily zmenšením tloušťky vzpěry stentů, geometrií a změnou použitého materiálu na povrchu stentů. Velmi se rozšířily chrom-kobaltové stenty, které jsou flexibilnější a endotelizují rychleji než ocelové [39]. Do roku 1999 byly stenty v téměř 85 % postupů PCI,

a tak byl nahrazen dřívější postup obyčejné staré balónkové angioplastiky [37]. Příklad kovového stentu je na obrázku 3.



**Obrázek 3** Příklad kovového stentu. Nahoře v rozvinutém, dole v nerozvinutém stavu. Převzato z [40]

### 3.2 Lékové stenty

Díky riziku, které BMS představovaly, byl v zájmu pacientů vývoj dalších nových stentů, a to takzvaných lékových stentů (DES). Novým mechanismem a cílem byla aplikace léčiva do místa intervence. Tento koncept vznikl už na počátku 90. let. Myšlenkou bylo dodat k poraněnému místu cévní stěny vyšší dávku farmaka dostatečnou k potlačení restenózy. Důležitým faktorem bylo, aby farmaka neměla závažné toxické účinky při systémovém podání. Na počátku stentové éry vznikla myšlenka spojit výhody mechanického působení stentu s lokální aplikací farmaka. Nejdříve vývoj začal hledáním látek, které by pokryly povrch stentu, aby se tak snížil negativní vliv kovu v tepně. Následně se však pozornost obrátila na krytí stentů jako nosiče lokálně působících farmak. Záměrem bylo vyvinout stabilní potah, který bude schopen uvolňovat účinná farmaka. Uvolňování musí být předvídatelné, v kontrolované koncentraci a rychlosti, rovnoměrně po celé ploše postižené tepny. Nosič by měl snést sterilizaci, umět měnit tvar a být odolný proti poškození během zavádění stentu. Povrch nosiče nesmí vyvolávat nežádoucí reakce cévní stěny jako je zánět [41]. Hlavním úkolem farmak je snížit ISR a k tomu se používají antiproliferativní léčiva. Poločas těchto léků je velmi krátký, ale délka účinku, která je nezbytná k prevenci ISR, je dlouhá. Proto musí být dlouhá kontrolovaná eluce antiproliferativního léčiva z kovové páteře, aby byla zabezpečena jeho přítomnost po delší časové období. To je zajištěno pomocí

nosného vehikula, jakým je polymer. Ideální polymer nesmí interagovat s aktivním restenotickým lékem a s prostředím cévy jako takovým. Naopak musí uvolňovat lék správnou rychlostí a být mechanicky stabilní po dlouhou dobu. Jako první byly použity trvanlivé a nerozložitelné polymery. V poslední době byly vyvinuty metody eluce bez polymerů a biologicky rozložitelné polymery [42].

Už v roce 2001 byly DES zavedeny do klinické praxe. Cílem bylo omezit rozsah restenózy a nutnost opakované intervence. Pilotní i následné klinické studie dokázaly, že ISR je při užití DES o řád nižší než u BMS. V jedné z prvních studií SIRIUS dosáhlo snížení výskytu restenózy 92 %. Mechanismus účinku DES je inhibice proliferace neointimy [43]. DES využívá různé léky s protizánětlivými, antitrombogenními, imunosupresivními a antiproliferativními mechanismy účinku [44].

Jako první byly vyvinuty DES první generace. Ty se skládají ze tří hlavních částí: permanentní kovová platforma (hlavně nerezová ocel), permanentní polymerní povlak a aktivní farmaceutická látka, která je zakomponována do polymerního povlaku. Ve své době překonaly techniku BMS, a to ve snížení neointimální proliferace a ISR [38]. U prvních DES byly použity antiproliferativní léky sirolimus a paklitaxel. Sirolimus, známý jako rapamycin, je imunosupresivní sloučenina odvozená z houby nalezené na Velikonočním ostrově, známý jako Rapa Nui. Látka zastavuje progresi buněčného cyklu v pozdní G1 až S fázi a následně inhibuje proliferaci buněk hladkého svalstva cév. Paklitaxel je známý jako lék proti rakovině. Stabilizuje delší mikrotubuly během mitózy, což způsobuje zástavu buněčného cyklu, a tudíž i zastavuje buněčnou proliferaci. Jak už bylo naznačeno výše, léčiva jsou zabudována do polymeru a potažena na povrch BMS, kde se pomalu uvolňují během několika týdnů po zavedení stentu [37, 45]. Později se však objevily komplikace jako pozdní trombóza a opožděné hojení. Dále byla spekulována jejich dlouhodobá účinnost. Potahový materiál nebyl biologicky rozložitelný a byly hlášeny případy přecitlivělosti na jejich implantaci. Tyto důvody vedly k dalšímu vývoji [38].

Modifikace v designu stentu, slitině, polymeru a léčivu vedly k vývoji DES druhé generace. U nich se prokázalo, že jsou spojeny s výrazně nižším výskytem trombózy ve stentu, než je tomu u DES první generace. To opět snížilo bezpečnostní obavy spojené s používáním technologie DES [46]. DES druhé generace využívá biologicky rozložitelný polymer. Ten má schopnost dodávat větší množství léčiva po delší dobu, připravit vhodné podmínky pro plnění různými léčivy či překonat nepříznivé účinky stentování [38].



K dalším vylepšením DES druhé generace patří snížení tloušťky vzpěry, zlepšená flexibilita a vynikající kinetika reendotelizace. Prvním příkladem DES druhé generace je stent vylučující zotarolimus, který je zobrazený na obrázku 4. Ten se skládá ze silnější kobalt-chromové platformy stentu se zlepšenou flexibilitou a zmenšenou velikostí vzpěry stentu. Také používá nový polymer, který maximalizuje biokompatibilitu a minimalizuje zánět spojený s předchozími polymery. Tento polymer zkrátí dobu eluce léčiva, kdy se léčivo vymývá v počáteční fázi poranění, přičemž poté na stentu zůstane minimální množství léčiva. To následně umožňuje normální arteriální opravu. Zotarolimus je analog sirolimu s podobnými imunosupresivními vlastnostmi, má však zvýšené lipofilní vlastnosti [45].



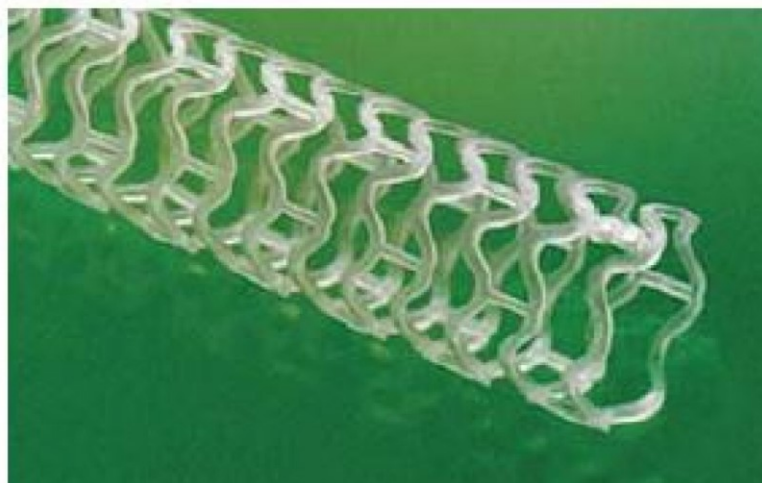
*Obrázek 4 Stent uvolňující zotarolimus. Upraveno dle [45]*

Dalším typem je DES bez polymeru. Možnost zcela se zbavit polymerů jako nosiče léčiva je vyvinout stent bez polymeru. Nepolymerní DES se vyhýbá dlouhodobým nežádoucím účinkům přítomnosti polymeru. Měla by být zachována schopnost funkce polymerních DES včetně přenášení molekul léčiva, vazby léčiva na stent, řízení rychlosti uvolňování léčiva vhodnou rychlostí. Přestože bezpolymerové stenty fungovaly dobře v preklinických a klinických studiích, zatím tyto stenty nepřekonávají druhou generaci DES. Léčivo se začleňuje do mikroporézního nebo nanoporézního povrchu kovového stentu [37, 38].

### 3.3 Biodegradabilní stenty

Implantace DES byla spojena s pozdní trombózou v stentu, opožděným hojením a prodlouženým vystavením vzpěr stentu průtoku krve. Základním důvodem těchto problémů je, že jsou cizí předměty dlouhodobě v cévě. Absence jakéhokoli zbytkového materiálu v cévě s obnovením vaskulární funkce byla považována za ideální cíl kterékoli platformy stentu. K řešení těchto problémů je slibným přístupem zavedení biodegradabilních stentů (BDS), také známých jako bioabsorbovatelné stenty nebo bioresorbovatelné scaffoldy. BDS je stavěn tak, aby po implantaci dočasně podpíral cévní stěnu po dobu asi 3-6 měsíců. Po této době bude stěna cévy zhojena a adekvátně reorganizována, zatímco zavedený BDS bude degradovat a bude absorbován. Jakmile BDS zcela degraduje (12 až 24 měsíců), zhojená céva zůstane bez přítomnosti cizího tělesa, což umožňuje obnovení vazoreaktivity s potenciálem remodelace cévy. Materiál stentu a jeho degradační produkty musí být biokompatibilní a netoxické, aby byla zajištěna bezpečnost pro pacienty. Mechanismus BDS je výhodný především pro starší lidi, děti nebo diabetiky, kteří mají problémy po opakovaných operacích. BDS jsou vyrobeny převážně z biologicky odbouratelných polymerních nebo kovových materiálů. Polymerní materiály používané pro BDS zahrnují polymery syntetizované z kyseliny mléčné, glykolové a kaprolaktonu. Polymerní BDS se liší od svých kovových protějšků tím, že jsou náchylné ke zlomení a jejich tloušťka vzpěry je větší. Pro BDS na bázi kovových materiálů se používá především železo, hořčík a zinek. Očekává se, že vývoj BDS přinese revoluční změnu v léčbě onemocnění koronárních tepen.

První komerčně dostupný BDS, schválený v roce 2016, byl Absorb BVS (obrázek 5). Je vyroben z polymerní struktury kyseliny L-mléčné. Konečným produktem stentu je kyselina mléčná, která je metabolizována na oxid uhličitý a vodu prostřednictvím Krebsova cyklu. Bohužel následné studie ukázaly, že použití tohoto BDS bylo spojeno s vyšším výskytem trombózy ve stentu než u DES [38, 42, 44, 46, 47].



*Obrázek 5 Vstřebatelný stent Absorb BVS. Převzato z [43]*

### **3.4 Komplikace po implantaci stentů**

#### **3.4.1 Restenóza ve stentu**

Restenóza je definována jako postupné opětovné zužování stentované léze koronární tepny v důsledku poškození tepny s následnou proliferací neointimální tkáně. ISR je v současnosti hlavním omezením pro použití PCI, kdy dochází k návratu námahové anginy pectoris nebo k akutním koronárním syndromům. Klinická incidence u použití BMS je zhruba 20-35 %. S vývojem nových stentů a při používání DES, se snížil výskyt ISR na 5-10 % [48, 49].

Během PCI může dojít k poranění cévy, což následně vede ke složitému zánětlivému a reparativnímu procesu, který se vyskytuje v relativně krátkém období (týdny až měsíce). Pokud je reakce na poranění cévy nadměrná, dochází k restenóze. K povrchu poraněné cévy se ukládají krevní destičky a fibrin a dochází k adhezi cirkulujících neutrofilů a monocytů. Během týdnů jsou akutní zánětlivé buňky nahrazeny chronickými zánětlivými buňkami, jako jsou například makrofágy. Uvolňované růstové faktory z buněk stimulují proliferaci a migraci buněk hladkého svalstva cév z médiu do vznikající neointimy, kde se následně tvoří extracelulární matrix. Dva týdny po implantaci stentu lze na jeho vzpěrách pozorovat kompletní neointimální vrstvu složenou z buněk hladkého svalstva cév a extracelulární matrice bohaté na proteoglykany. Tato vrstva může trpět opakujícími se aterosklerotickými změnami neboli neoaterosklerózou. Nejvýznamnějšími rizikovými faktory pro ISR se zdají být DM, délka léze a malý průměr cévy. Diabetes zvyšuje riziko ISR u použití BMS o 30-50 %. Podobné riziko je u použití DES. Délka implantovaného stentu nad 35 mm je

spojena s téměř dvojnásobným rizikem ISR ve srovnání se stentem, který je menší než 20 mm [48, 50].

### **3.4.2 Trombóza stentu**

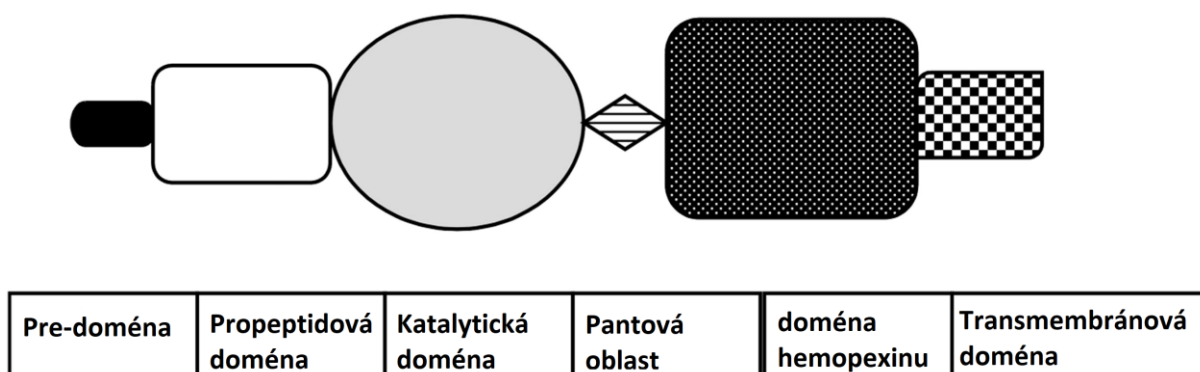
Trombóza stentu je další z nejdůležitějších komplikací PCI s nízkou incidencí od 0,5 % do 1 % ročně. Mortalita je však vysoká, a to od 5 % do 10 % do 30 dnů od implantace. Míra trombózy stentu odpovídá vývoji zlepšených stentů a protidestičkových činidel. Trombózu stentu dělíme podle načasování na akutní (do 24 hod. po implantaci), subakutní (od 2. do 30. dne), pozdní (od 1 měsíce do 1 roku) a velmi pozdní (po prvním roce). Akutní a subakutní trombóza stentu je souhrnně označována jako časná. K většině trombóz stentu dochází během prvních 30 dnů po PCI. Pozdní trombóza stentu může souviset s neúplným zhojením nebo nedostatečným pokrytím neointimou. Incidence pozdní trombózy stentu se zdá být podobná jak u použití DES, tak u BMS. Rozmezí výskytu se pohybuje od 0,6 % do 3,4 %. Velmi pozdní trombóza stentu má multifaktoriální etiologii a ve většině případů je spojena s abnormální vaskulární odpovědí, jako je hypersenzitivní reakce, nadměrné ukládání fibrinu nebo neoateroskleróza [34, 51–53].

## 4. MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY

Matrixové metaloproteinázy (MMP), také označovány jako matrixiny, jsou proteolytické enzymy závislé na zinku. Enzymy mají různé substráty, ale sdílejí podobné strukturální charakteristiky. Pro identifikaci první MMP byla milníkem studie Woessnera z roku 1962, která ukázala, že proteinový enzym v děloze savců může degradovat kolagen. Později téhož roku, Jerome Gross a Charles Lapierre byli první, kdo identifikovali MMP pomocí biochemických metod [54, 55]. V této rodině je více jak 25 druhů proteáz. Podílejí se na degradaci extracelulárního matrix (ECM) a bazálních membrán během morfogeneze. Dále při buněčné migraci, angiogenezi a proteolytické aktivaci růstových faktorů. Všechny tyto procesy jsou nezbytné pro normální remodelaci tkání v procesech, jako je růst kostí, hojení ran a reprodukce [56, 57]. Není tedy divu, že exprese genů MMP byla pozorována v buňkách pojivové tkáně, a to především ve fibroblastech. Exprese byla též pozorována v neutrofilech, monocytech, makrofázích a endoteliálních buňkách [58]. Za normální podmínek specifické tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMP) pečlivě regulují aktivitu MMP. Abnormální exprese přispívá k různým patologickým stavům, jako jsou zánětlivá a kardiovaskulární onemocnění, růst nádorů a jejich metastazování. MMP jsou produkovány jako latentní zymogeny neboli proMMP, které musí být v těle aktivovány, aby se vytvořil funkční enzym. Aktivace proMMP vyžaduje delokalizaci prodomény z katalytického místa. Na aktivaci MMP se podílejí dva hlavní mechanismy. Prvním je proteolytické štěpení a odstranění prodomény a druhým je alosterická aktivace, kdy je prodoména vytěsněna z katalytického místa enzymu, aniž by byla štěpena [56, 57, 59–61].

MMP se rozdělují do pěti podskupin na kolagenázy, želatinázy, matrilysiny, stromelysiny a MMP membránového typu. Tyto skupiny jsou založeny na sekvenční homologii a in vitro charakteristikách substrátu ECM. Aby byl enzym začleněn do rodiny MMP, měl by splňovat požadavky jako: 1. proteolýza alespoň jedné složky ECM; 2. katalýza závislá na zinku v aktivním místě; 3. aktivace proteinázami nebo organomerkuriáty; 4. inhibice kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA), 1,10-fenanthrolinem a jedním z TIMP a za 5. cDNA má sekvenční homologii s MMP-1 [54]. Typická MMP se skládá z několika domén, jak je zobrazeno na obrázku 6. Tyto domény jsou: pre-doména, propeptidová, katalytická a doména hemopexinu. Propeptidová doména se obvykle skládá z 80 aminokyselin. Katalytická doména většinou obsahuje 170 aminokyselin a také obsahuje sekvenci tří histidinů, která je důležitá pro chelataci zinku. Pro typickou MMP je charakteristický spojovací peptid, který se označuje jako pantová oblast. Dále obsahuje

doménu hemopexinu, která obsahuje přibližně 200 aminokyselin a je nezbytná pro interakci s jinými MMP a TIMP [62].



*Obrázek 6* Typická MMP struktura. Upraveno dle [63]

Existují čtyři známé TIMP, z nichž TIMP-1 a TIMP-2 byly nejvíce studovány. TIMP jsou proteiny, které mají nízkou molekulovou hmotnost. Mohou se nekovalentně vázat s aktivními MMP v molárním poměru 1:1. TIMP se vážou na katalytickou doménu aktivních MMP a tím brání přístupu k substrátům [59].

#### 4.1 Želatinázy

Do této podskupiny patří MMP-2 a MMP-9. Někdy se tyto MMP označují jako želatináza A a želatináza B. Oba tyto enzymy mají tři repetice fibronektinu typu II vložené do katalytické domény. Sdílejí podobnou proteolytickou aktivitu a degradují denaturované kolageny, želatiny a řadu molekul ECM včetně nativních kolagenů typu IV, V a XI a lamininu [64, 65]. Želatinázy hrají roli v široké škále fyziologických a patologických stavů. Tyto enzymy jsou potřeba u procesů, jako je reprodukce, růst a vývoj a také při mobilizaci leukocytů, zánětu a při hojení ran. Zvýšená produkce želatináz byla pozorována u patologických stavů, jako je rakovina, zánět, infekční nebo vaskulární onemocnění a degenerativní onemocnění mozku [66]. Želatinázy jsou vylučovány v latentní formě. Enzymy jsou směřovány přednostně do mezimembránového prostoru buněk a tkání, aby mohly štěpit proteiny v ECM [67]. Katalytická doména želatináz se od ostatních MMP liší tím, že obsahuje tři domény podobné fibrinektinu typu II, která tvoří oblast pro navázání kolagenu. Tato oblast umožňuje vazbu a následné štěpení kolagenu typu IV nebo denaturovaného kolagenu (želatiny) [68].

## 4.2 Matrixová metaloproteináza – 2

MMP-2 byla poprvé popsána a izolována z vysoce metastatických myších nádorů a z buněk lidského melanomu. MMP-2 je značně exprimován ve fibroblastech, endoteliálních a epiteliálních buňkách. Enzym je produkován jako proenzym, který je aktivován na buněčném povrchu. Aktivace je zprostředkována pomocí MMP-1 membránového typu. Při aktivaci je také potřeba TIMP-2, který slouží jako můstková molekula mezi MMP-1 membránového typu a proenzymem MMP-2 (proMMP-2). MMP-2 se účastní degradace ECM širokou škálou substrátů. Je schopna degradovat kolageny typu I, IV, V, VII a X, laminin, elastin, fibronectin a proteoglykany [69].

Po infarktu myokardu se hladiny MMP-2 v plazmě zvyšují. U pacientů s diagnózou srdečního selhání je čtyřnásobná stimulace exprese enzymu [70]. Bylo prokázáno, že MMP jsou spojeny s aterosklerózou. Jedním z možných mechanismů, který přispívá k tvorbě plaků, může být usnadnění, stimulace migrace a proliferace buněk hladké svaloviny v cévní stěně. Jednou z hlavních rolí MMP při destabilizaci plaku je přestavba ECM. V pozdějších stádiích aterosklerózy může tato přestavba vést k erozi plaku, změnám metabolismu kolagenu, zhoršené reparaci a udržení fibrózního plátu. To vše může přeměnit plak na nestabilní a dojít k jeho ruptuře [71]. MMP-2 je více vylučována a aktivována v aterosklerotických lézích, kde podporuje růst lézí a nestabilitu plaku. Podílí se zde na aterosklerotické kalcifikaci [72]. MMP-2 podporuje agregaci krevních destiček, čímž se účastní na protrombotickém účinku aterosklerotických plátů [73].

## 4.3 Matrixová metaloproteináza – 9

MMP-9 byla poprvé získána z lidských makrofágů [69]. Enzym je vylučován z endoteliálních buněk, leukocytů, fibroblastů, neutrofilů a makrofágů. V době, kdy se diferencují granulocyty, dochází k syntéze MMP-9 v kostní dřeni [74]. MMP-9 je regulována růstovými faktory, chemokiny a dalšími stimulačními signály. I tento enzym je vylučován jako neaktivní prekurzorová forma, tedy jako proenzym MMP-9 (proMMP-9). Proenzym tvoří pevný komplex s TIMP-1 a TIMP-3. Aktivátory pro proenzym jsou plazmin, komplex plazminogen/MMP-3 a komplex proMMP-9 a TIMP-1. MMP-9 degraduje extracelulární matrix, podněcuje a podporuje tvorbu nových cév. Enzym je schopen štěpit kolageny typu IV, V, VII, X a také elastin. Je také schopen štěpit produkty kolagenů I, II a III, ale až po předešlé proteolýze kolagenázami [69].

Nadměrná exprese MMP-9 je spojena s různými druhy rakoviny, jako je rakovina prsu, plic, prostaty, tlustého střeva, žaludku a slinivky břišní. Nadměrná produkce enzymu je též spjata s aterosklerózou [74]. Je prokázáno, že existuje vztah mezi MMP-9 a nestabilitou plaku, jelikož hladina a aktivita enzymu byla vyšší u nestabilních plaků než u stabilních. Jelikož nadměrná exprese MMP-9 se může podílet na nestabilitě plaku, mohl by tento enzym sloužit jako prediktor nestability. MMP-9 se tedy podílí na procesu rozvoje aterosklerózy. Primárním zdrojem enzymu v plaku jsou zánětlivé buňky. Zvýšená exprese enzymu podporuje degradaci ECM, která může zvýšit infiltraci zánětlivých buněk. MMP-9 může také podporovat migraci buněk hladkého svalstva cév [75].

MMP-2 a MMP-9 jsou nutné pro proliferaci a migraci buněk hladkého svalstva cév. Nejspíše mají svou důležitou roli ve vývoji a udržování vláknitého uzávěru. Nicméně zvýšené hladiny MMP-9 v pokročilých lézích, a to zejména aktivní formy ve spojení s hromaděním makrofágů, může podporovat narušení plaku. Zvýšené hladiny MMP-2 a MMP-9 v periferní krvi u akutního koronárního syndromu mohou být užitečné jako neinvazivní testy pro detekci zranitelnosti plaku. Využití biomarkerů k výběru pacientů pro individualizované terapie v sekundární prevenci pomůže dosáhnout cíle precizní medicíny [76, 77].

#### **4.4 Biologický materiál a jeho stabilita**

Želatinová zymografie je nejcitlivější a široce používaný test pro stanovení latentních i aktivních forem MMP-2 a MMP-9. Jako alternativní metoda se používá ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay), která však nedosahuje takové citlivosti a neumožňuje kvantitativní hodnocení aktivních a latentních forem bez potřeby drahých činidel [78].

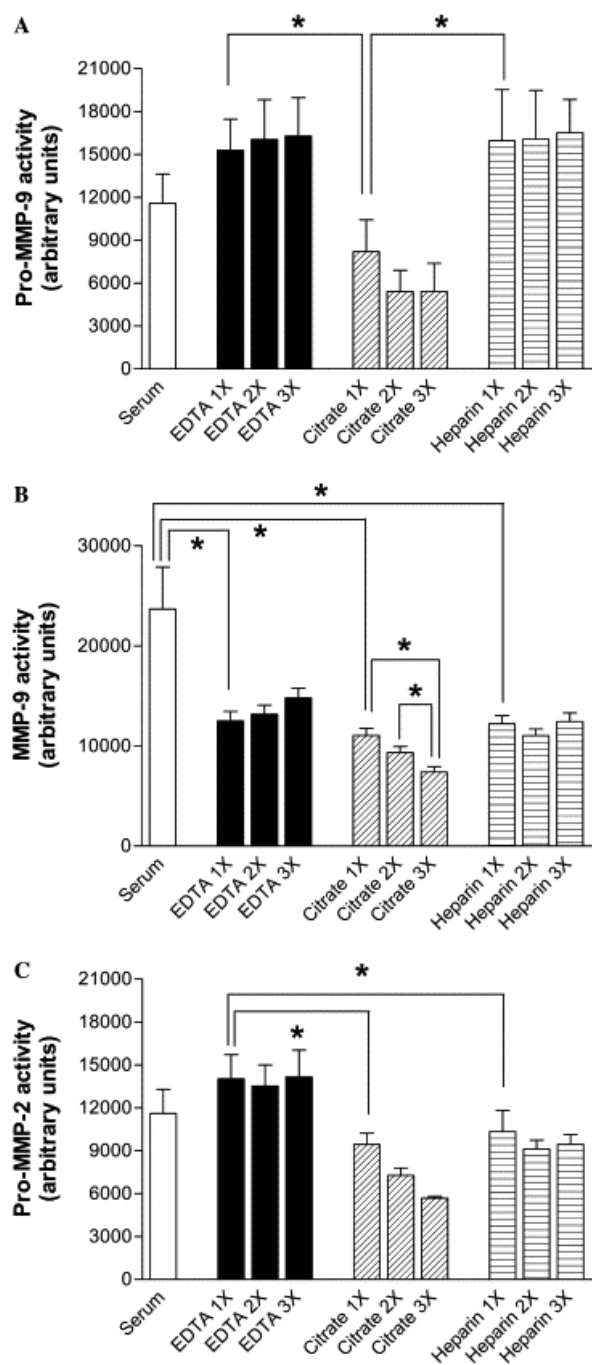
Bylo zjištěno, že až pět cyklů zmrazení a rozmrazení neovlivňuje aktivitu obou MMP. Stejně tak teplota skladování nemá na aktivitu vliv. Skladování vzorků plazmy při -20 °C nebo -70 °C po dobu jednoho měsíce významně neovlivnilo plazmatické aktivity. Dalším faktorem, který neovlivňuje aktivitu MMP, je příjem potravy. Zde se ukázalo, že nejsou žádné významné změny v plazmatických aktivitách získané krve po celonočním lačnění (>12h) a 2 hodiny po standardním jídle [78].

Vzorky jsou obvykle skladovány zmrazené po odlišnou dobu, to představuje riziko změn koncentrace a aktivity MMP. Tudíž vzorky, které jsou zamrazeny po různě dlouhou dobu, nemusí být srovnatelné. Může to být způsobeno tím, že dochází k určitému stupni degradace, protože většina enzymů si zachová aktivitu, i když minimální, dokonce i při -80 °C. Rouy a kol. popsali rychlý pokles jak proteinu MMP-9, tak i enzymatické aktivity ve



vzorcích citrátové plazmy skladovaných při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu pouhých 3 měsíců. Co se týče MMP-2, tak ta zůstává stejná nezávisle na době skladování [79]. Novější studie toto tvrzení však vyvrací. Jonsson a kol. ukázali, že hladiny MMP-9 ve zmrazené citrátové plazmě jsou stabilní, pokud jsou skladovány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu až 9 let [80]. Tarr a kol. také zkoumali vliv doby skladování ve zmrazeném stavu na aktivitu MMP-9. V tomto případě nedošlo k žádnému zjevnému poklesu ve vzorcích skladovaných mezi 1 a 3 lety při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na výsledek může mít vliv použitého antikoagulantu, protože zde byla použita plazma s heparinem [81]. V jedné studii pracovali se vzorky séra, které byly uchovávány i 16 let při  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jejich analýza 10 vzorků séra skladovaných po dobu 1 roku však ukazovala pokles o 28,5 %. Nicméně hladiny proMMP-9 v séru byly i po 16 letech vysoké [82].

Podstatné je si uvědomit i důležitost účinků různých antikoagulancií jako preanalytických determinantů aktivit plazmatických MMP. Souza-Tarla a kol. ve své studii uvádějí, že v plazmě s EDTA byla ve srovnání s plazmou s heparinem nebo sérem zjištěna nižší aktivita MMP-2. V jiné studii však naměřili zvýšenou plazmatickou aktivitu MMP-2 a sníženou aktivitu MMP-9 se zvyšujícím se množstvím EDTA během odběru krve. Použití citrátu jako antikoagulantu minimalizuje uvolňování MMP-9 během odběru. Proto je možné, že aktivita MMP-9 ve vzorcích plazmy s EDTA může být zvýšena v porovnání s citrátovou plazmou [78]. V dalším experimentu bylo prokázáno, že urychlovače koagulace měly vliv na sérové hladiny proMMP-9, přičemž poskytly až čtyřnásobné hladiny MMP-9 ve srovnání s nativním sérem. Rozhodujícím faktorem je zde zřejmě uvolňování MMP-9 krevními destičkami. V tomto experimentu bylo dále zjištěno, že nativní sérové koncentrace MMP-9 se podobají koncentracím naměřeným v plazmě s EDTA. Hladiny MMP-9 jsou ovlivněny aktivací koagulace a použitým antikoagulantem. Pro stanovení MMP-9 je lepší použít vzorky plazmy [83]. Z jiných zdrojů se zdá, že sérum, a to především s použitím urychlovačů koagulace, by se mělo k hodnocení MMP v krvi vyhnout. Je zde největší možnost variability výsledků v důsledku uvolňování MMP z krevních destiček a leukocytů [84]. Gerlach a kol. ve studii zmiňují, že zvýšení koncentrací tří antikoagulancií (citrát, heparin a EDTA) nevyvolalo žádné účinky na aktivity MMP, kromě významného snížení aktivity MMP-9, které bylo pozorováno u zvyšující se koncentrace citrátu [85]. To dokumentuje obrázek 7.



**Obrázek 7** Průměrné hodnoty aktivit proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2 ve vzorcích séra a plazmy oddělených od odebrané krve do zkumavek se zvyšujícími se koncentracemi antikoagulantů. Převzato z [85].

## 5. SOUVISLOST MEZI METALOPROTEINÁZAMI A PERKUTÁNNÍ KORONÁRNÍ INTERVENCÍ

Ruptura aterosklerotických plátů může být způsobena působením MMP na vazivový uzávěr. Tento stav může progredovat do akutních koronárních syndromů nebo k náhlé srdeční smrti. Bylo prokázáno, že MMP-9 je přítomna v nestabilních placích a je spojena s přítomností zánětlivých buněk. Expresí MMP je větší v oblasti nestability s rizikem ruptury plaku. MMP aktivity zvyšuje produkci růstových faktorů, změnu ECM, akumulaci pěnových buněk, expanzi nekrotického jádra s další zranitelností plaku [86]. Hladina MMP-9 je spojena s velikostí nekrotického jádra aterosklerotického plátu u stabilních pacientů s koronárním srdečním onemocněním, kteří mají zvýšené hladiny lipoproteinu(a) [87]. MMP hrají důležitou roli při restenóze po PCI a okluzi arteriálních bypassových štěpů prostřednictvím zvýšení proliferace a migrace endoteliálních buněk a buněk hladkého svalstva cév [88]. Plazmatické hladiny MMP-2 a MMP-9 před PCI u pacientů se stabilní anginou souvisí s pozdní restenózou. Obecně lze říci, že zvýšená hladina MMP-9 v séru je spojena se zvýšeným rizikem ISR po implantaci stentu [89].

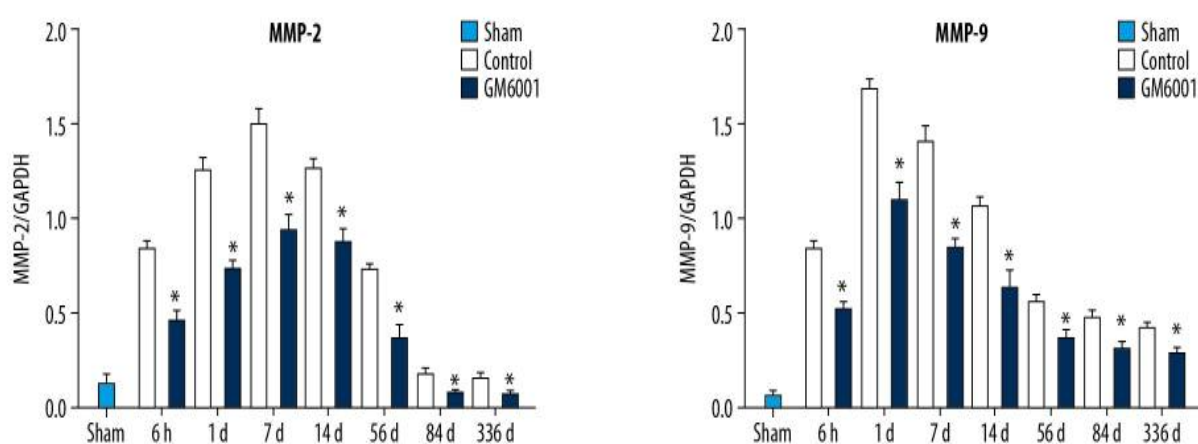
Zhu a kol. chtěli zjistit prediktivní hodnotu hladiny plazmatické MMP-9 pro hospitalizační mortalitu. Hodnota se vztahovala k pacientům, kteří byli přijati s akutním infarktem myokardu a podstoupili urgentní PCI. Do studie bylo zařazeno 155 pacientů, z nichž 24 zemřelo v nemocnici. Vzorek byl odebrán při příjmu pacienta. Ze studie lze usoudit, že pacienti, kteří zemřeli v nemocnici, měli při příjmu významně vyšší hladiny MMP-9. Za hraniční hodnotu lze uvažovat MMP-9 398,2 ng/ml. Tato hodnota byla nezávislým prediktorem pro úmrtnost v nemocnici [90].

Zhang a Wei zkoumali vliv intervence koronárního stentu na účinnost, bezpečnost a krátkodobou i dlouhodobou prognózu pacientů s ICHS. Do studie bylo zahrnuto 60 pacientů s ICHS, kteří podstoupili intervenční terapii koronárním stentem. Jako kontrolní skupina byli pacienti, kteří byli léčeni konvenční medikamentózní terapií. Ve srovnání s kontrolní skupinou, terapie koronárním stentem má lepší klinickou účinnost a pacientům přináší lepší kvalitu života. Sérové hladiny MMP-9 jsou však po léčbě koronárním stentem vyšší než u kontrolní skupiny. V důsledku poškození vaskulárního endotelu a stlačení plaku během operace je snadné vyvolat zánětlivou reakci. Proto je potřeba věnovat pozornost kontrole zánětu před a po léčbě koronárním stentem [91].

Ve studii vedenou Foroughiniem, se zabývali korelací mezi stavem sérové koncentrace vitamínu D a MMP-9. MMP-9 je právě častý biomarker srdeční remodelace u pacientů po PCI. Zdá se, že vitamin D by mohl pozitivně ovlivnit hladinu MMP-9 v séru a snížit tak jeho produkci. Ze studie vyplývá, že identifikace a léčba pacientů s nedostatkem vitamínu D před PCI by mohla zabránit nebo snížit riziko kardiovaskulárních nežádoucích účinků po PCI a restenózu ve stentu [88].

Kusnierova a Pleva chtěli demonstrovat použití MMP jako další možné biochemické markery pro restenózu ve stentu. Cílem bylo také určit jejich referenční intervaly s ohledem na pohlaví a věk pacientů. Do studie byla zahrnuto 111 pacientů. Bylo zjištěno, že zvýšené hladiny MMP-3 a MMP-9 jsou spojeny se významným nárůstem rizika ISR. Pro predikci rizika ISR byla stanovena koncentrace MMP-9  $\geq 64,8$  ng/ml. U MMP-2 nebyla zjištěna žádná závislost mezi koncentrací a případným rizikem restenózy. Autoři se domnívají, že screening těchto biochemických parametrů by mohl být využit k určení rizik pro pacienty po PCI [92].

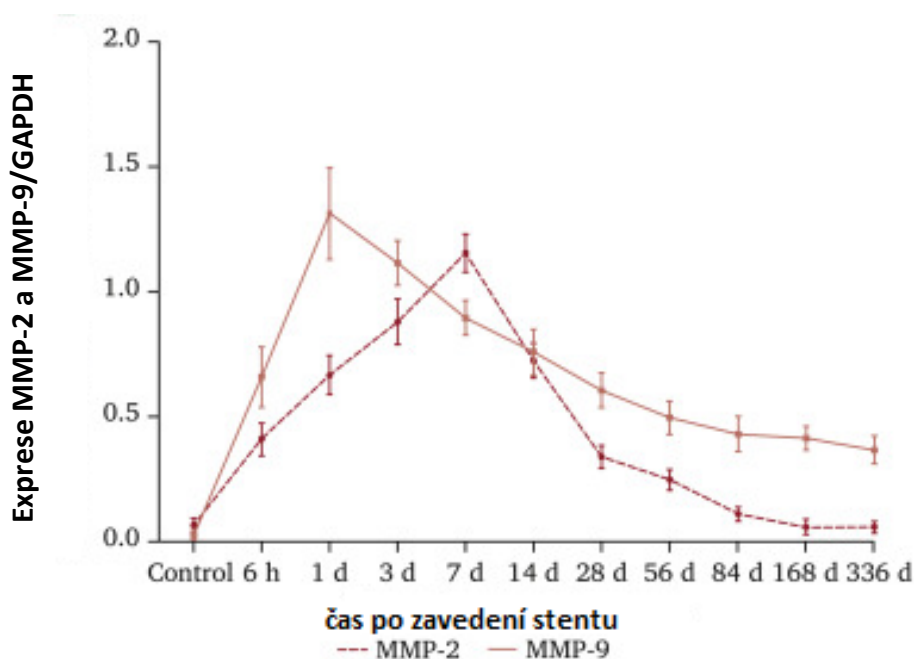
Song a kol. provedli studii, jejímž cílem bylo porovnat změny v ECM po implantaci stentu, který eluuje inhibitor MMP a určit jeho účinky na prevenci ISR. Eluující stent byl zaveden do ilické arterie a stent, který neeluoval, byl umístěn do kontralaterální ilické arterie. Tento stent sloužil jako kontrola. Tepny byly odstraněny po 6 hodinách a dále po 1, 7, 14, 56, a 336 dnech po umístění stentu. Experimentem bylo dokázáno, že exprese MMP-2 a MMP-9 významně poklesla po implantaci eluujících stentů. Tento trend je vidět na obrázku 8. Také nebyla zjištěna žádná zjevná trombóza [93].



**Obrázek 8** Exprese a trend změny MMP-2 a MMP-9 u stentu eluující inhibitor MMP (GM6001) a kontroly. Převzato z [93]

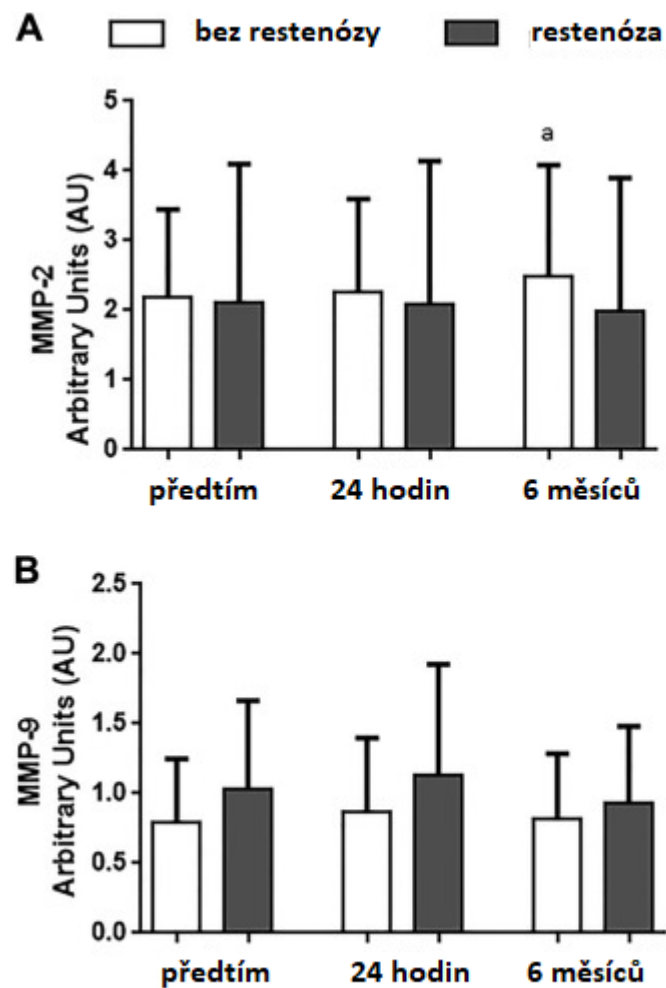
Somuncu a kol. chtěli posoudit klinický význam MMP-9 při predikci dvouletých nežádoucích kardiovaskulárních příhod u pacientů, kteří podstoupili PCI po infarktu myokardu s elevací ST. Výsledkem bylo, že vyšší kardiovaskulární mortalita po jednom roce byla pozorována ve skupině s vysokou hladinou MMP-9. Při prodloužení doby sledování na dva roky byl rozdíl v mortalitě mezi skupinami významnější. V souhrnu jsou vysoké hladiny MMP-9 silným prediktorem kardiovaskulárních příhod včetně mortality u pacientů s infarktem myokardu s elevací ST. Rutinní testování MMP-9 se v běžné populaci nepoužívá. U pacientů s infarktem myokardu s elevací ST by měření MMP-9 mělo být zvaženo k predikci prognózy a v případě vysokých hladin zvážit častější kontroly [94].

Další studie (Shen a kol.) zkoumala distribuci a změny MMP-2, MMP-9 a kolagenu při ISR a jejich vliv. K experimentu byly použity miniprasata. Vzorky byly odebrány po 6 hodinách a 1, 3, 7, 14, 28, 56, 84, 168 a 336 dnech. Když došlo k restenóze (56. den), exprese MMP-2 a MMP-9 byla významně snížena a obsah kolagenu dosáhl svého maxima. K analýze MMP byl použit western blotting a jako kontrola byl použit glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH). Exprese MMP-9 dosáhla vrcholu za jeden den po zavedení stentu a po 28 dnech se koncentrace snížila. Exprese MMP-2 dosáhla vrcholu po 7 dnech a na nízkou úroveň klesla po 84 dnech. To vše demonstruje obrázek 9. V klinické praxi může inhibice syntézy kolagenu po implantaci stentu a podpora degradace kolagenu přispět k prevenci ISR [95].



**Obrázek 9** Expresa MMP-2 a MMP-9 v časových intervalech po zavedení stentu. Upraveno dle [95]

Rocha a kol. chtěli objasnit vztah mezi MMP a restenózou. K analýze proteolytické aktivity MMP-2 a MMP-9 ve vzorcích plazmy byla použita zymografie. Vzorky byly odebrány před výkonem a 24 hodin a 6 měsíců po výkonu. Mezi pacienty s restenózou a bez ní nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v koncentracích v průběhu času. Jedinou výjimkou je MMP-2, kdy u pacientů bez restenózy došlo ke zvýšení hladiny MMP-2 mezi odběrem před výkonem a 6 měsíců po výkonu. To lze pozorovat na obrázku 10 [96].



**Obrázek 10** A) Koncentrace MMP-2 u pacientů s perkutánní transluminární angioplastikou B) Koncentrace MMP-9 u pacientů s perkutánní transluminární angioplastikou. Upraveno dle [96]

## 6. DIABETES MELLITUS

DM je chronické metabolické onemocnění charakterizované přetrvávající hyperglykemií. To může být zapříčiněno nedostatkem sekrece inzulínu, rezistencí vůči periferním účinkům inzulínu nebo obojím [97]. Příčinou může také být poškození beta buněk pankreatu [98]. V posledních desetiletích dochází k exponenciálnímu růstu počtu pacientů s DM po celém světě. Nárůst lze přičíst zvýšenému podílu stárnoucí populace, urbanizaci, socioekonomickému rozvoji a v neposlední řadě snížené fyzické aktivitě. Podle Světové zdravotnické organizace prevalence DM vzrostla ze 108 milionů v roce 1980 na 425 milionů v roce 2017. Odhaduje se, že do roku 2045 bude 629 milionů pacientů s DM [99]. Chronická hyperglykémie ve společném působení s dalšími metabolickými odchylkami může u pacientů s DM způsobovat poškození různých orgánových systémů. Vysoká hladina cukru v krvi poškozuje orgány a tkáně v celém těle. Komplikace DM mohou být mikrovaskulární, kam řadíme nefropatii a retinopatii. Mohou být také makrovaskulární, což zahrnuje srdeční choroby, IM, mrtvice, neuropatie a infekce, které se nehojí [97, 98]. Rozlišujeme tři typy DM a to DM 1. typu, 2. typu a gestační diabetes.

DM 1. typu se obvykle projevuje v brzkém věku a u adolescentů, může se však vyvinout v jakémkoli věku. Tvoří 5-10 % diagnóz DM [99]. Tento typ DM je vyznačován autoimunitní destrukcí beta buněk pankreatu produkujících inzulín. V důsledku toho dochází k absolutnímu nedostatku inzulínu. Riziko DM 1. typu zvyšuje genetická predispozice. U dětí se riziko diabetu zvyšuje, pokud je rodič nebo sourozenec diabetik. Další riziko představují enviromentální faktory, jako je virová infekce, toxiny a dietní faktory. To vše může být považováno za spouštěče autoimunity [97, 98].

DM 2. typu se nejčastěji vyskytuje u osob starších 45 let, bohužel je častěji pozorován i u dětí a dospívajících. Tento typ diabetu tvoří zhruba 90 % všech pacientů s DM. V případě 2. typu se jedná o nedostatečnou sekreci inzulínu, tkáňovou inzulínovou rezistenci a nepřiměřenou kompenzační odpověď sekrece inzulínu. V tomto případě je inzulín neúčinný. Zpočátku se organismus brání zvýšenou produkcí inzulínu, aby se udržela homeostáza glukózy, postupem času však produkce klesá, což vede k hyperglykémii [97, 100]. Na začátku onemocnění je příznaků málo a až polovina lidí netuší, že trpí DM 2. typu. Symptomům pacient nedává význam, a to pak vede ke komplikacím dlouho před stanovením diagnózy. Komplikace mohou vyústit v kardiovaskulární onemocnění. U DM 2. typu jsou rizikové faktory především nadváha, stravovací návyky, rodinná anamnéza, fyzická aktivita a vysoká hladina cholesterolu [98, 99].

Gestační DM je hyperglykémie, která je poprvé zjištěna během těhotenství. Zpravidla se vyskytuje během druhého a třetího trimestru. Gestační DM komplikuje přibližně 7 % všech těhotenství. Pokud žena během těhotenství trpí tímto typem diabetu, je její potomek vystaven riziku rozvoje DM 2. typu a obezity. Riziko gestačního diabetu se zvyšuje, pokud má pacientka nadváhu, vyšší věk, nadměrné přibírání v graviditě, v rodinné anamnéze DM 2. typu nebo v předchozím těhotenství měla gestační diabetes [97, 99, 101].

## 6.1 Souvislost metaloproteináz s diabetem mellitus

MMP se podílejí na vzniku DM 1. a 2. typu [102]. Právě DM je považován za rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění. Abnormální exprese MMP a TIMP modifikuje ECM během vaskulární remodelace, což u pacientů s DM způsobuje dysregulovanou angiogenezi. Tato abnormální regulace byla spojena s rozvojem diabetických mikrovaskulárních komplikací [103].

Dlouhodobá hyperglykémie způsobuje oxidativní stres v organismu. Právě syntéza MMP-9 je indukována trvalou hyperglykemií. Exprese a aktivita MMP-9 se zvyšuje jako důsledek oxidačního stresu. MMP-9 zprostředkovává diabetem indukovanou retinální neuropatii a vaskulopatii [103].

Hyperglykémie též zvyšuje expresi a aktivitu MMP-2 v endoteliálních buňkách [102]. Též je hojně produkována v tukové tkáni obézních pacientů [103]. MMP-2 je jednou ze základů patogeneze diabetické kardiomyopatie. Dvě izoformy MMP-2 jsou silně exprimovány v srdečních buňkách u diabetiků. Tyto izoformy pak mohou souviset s funkčními a strukturálními změnami u diabetu [104].

V studii Kuliczowski a kol. bylo potvrzeno, že hladina MMP-2 je zvýšená u pacientů s DM, avšak u hladin MMP-9 k významnému zvýšení nedošlo [102]. Nicméně u jiné studie (Derosa a kol.) bylo prokázáno, že hladiny MMP-2 a MMP-9 byly významně zvýšené vůči zdravé kontrolní skupině [105]. Podobné výsledky byly získány i v další studii. Signorelli a kol. také uvádějí, že hladiny MMP-2 a MMP-9 jsou zvýšeny u pacientů s DM ve srovnání se zdravou kontrolní skupinou [106]. Studie zaměřená na MMP u diabetického onemocnění ledvin (Garcia-Fernandez a kol.) ukazuje, že koncentrace a aktivita MMP-2 a MMP-9 je zvýšena v moči pacientů s DM 1. i 2. typu [107].

Ačkoliv se různé studie neshodují na stejných závěrech, je jisté, že nějakým způsobem se hladina MMP u DM liší od zdravých jedinců. Otázkou zní, jaké hodnoty tyto zdraví jedinci mají. I tato otázka není zcela objasněna. Každá studie většinou obsahuje svou kontrolní



skupinu. Kuliczkowski a kol. měli jako kontrolu 15 zdravých jedinců. Byla zkoumána plazma s citrátem pomocí ELISA. Hodnoty MMP-2 u zdravých lidí byla  $165,7 \pm 19,1$  ng/ml a pro MMP-9  $47,2 \pm 22,3$  ng/ml [102]. S těmito hodnotami se shodují i Kusnierova a Pleva. Ty ve své studii používali plazmu s heparinem od 180 zdravých dárců. Hladiny MMP měřili pomocí ELISA. Naměřili hodnoty  $163,58$  ng/ml pro MMP-2 a  $47,9$  ng/ml pro MMP-9 [92]. V jiné studii, kde používali plazmu s EDTA od 165 zdravých jedinců, naměřili odlišné hodnoty. V této studii opět měřili pomocí ELISA. Pro hodnoty MMP-2 to bylo  $628,1 \pm 267,4$  ng/ml, což se velmi liší od předchozích studií. V hodnotě pro MMP-9, která byla  $53,7 \pm 16$  ng/ml, už se tolik neliší [105]. O vyšších hodnotách MMP-2 se zmiňuje i studie Signorelli a kol. Zde bylo použito 23 vzorků od zdravých dárců. Pro měření byla použita plazma s heparinem. Opět zde pro měření byla použita ELISA. Výsledky pro MMP-2 byly  $701 \pm 362$  ng/ml a  $25 \pm 17$  ng/ml pro MMP-9 [106].

## 7. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo navázat na předchozí diplomové práce a dokončit stanovení koncentrace MMP-2 a MMP-9 ve vzorcích pacientů, kteří podstoupili implantaci stentů pomocí PCI. Vzhledem k dlouhodobému uchování vzorků bylo dalším cílem otestovat jejich stabilitu. Získané výsledky porovnat s aktuální dostupnou literaturou.

Dalším cílem této diplomové práce bylo stanovit koncentrace MMP-2 a MMP-9 pro skupinu vybraných pacientů s DM. Dále bylo naším cílem porovnat hladiny enzymů v séru a v plazmě s EDTA. Získané výsledky porovnat s aktuální dostupnou literaturou

Pro stanovení enzymů použít metodu želatinové zymografie. Pro práci použít vzorky séra pacientů z Kardiologického centra Pardubické krajské nemocnice a séra a plazmy pacientů z Interního oddělení – lůžková část a z Diabetologické ambulance Pardubické krajské nemocnice.

## B. PRAKTICKÁ ČÁST

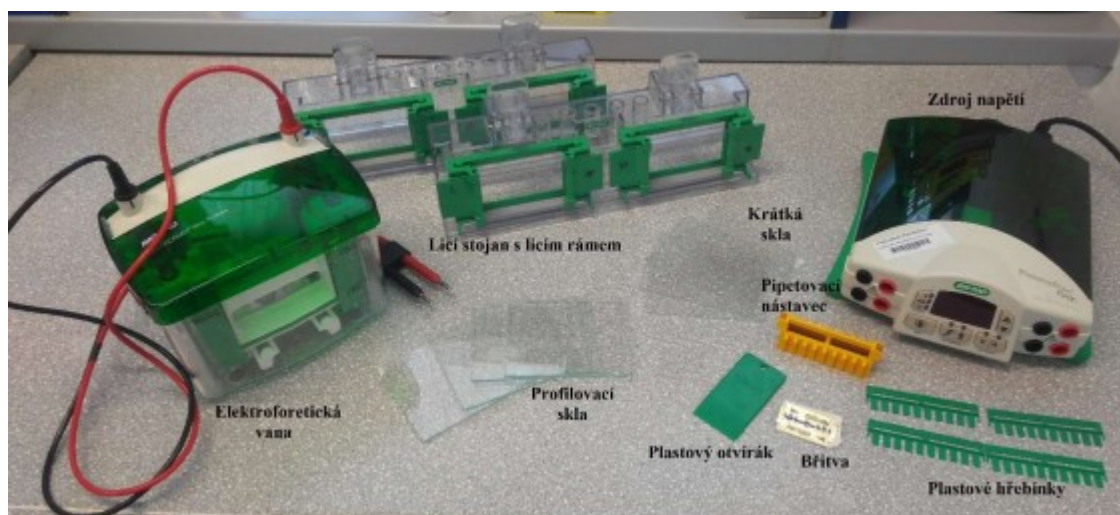
### 8. MATERIÁL, PACIENTI A METODA

#### 8.1 Použité přístroje a pomůcky

##### 1) Pomůcky pro elektroforézu

- Zdroj Power Pac Basic Power Supply (Bio-Rad, USA)
- Elektroforetická vana Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Lící rám Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Lící stojan Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Těsnící pásky Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Profilovaná skla System Glass Plates (Bio-Rad, USA)
- Krátká skla System Glass Plates (Bio-Rad, USA)
- Pipetovací nástavec Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Plastové hřebeny na tvorbu jamek Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad, USA)
- Otvírák gelů Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad, USA)

Celá aparatura pro přípravu gelů a elektroforézu je znázorněna na obrázku 11.



*Obrázek 11 Aparatura pro elektroforézu a přípravu gelů. Převzato z [108]*

## 2) Ostatní pomůcky

- Analytické váhy LB-1050/2 (Laberte, Maďarsko)
- Digitální váhy 440-21N, 440-35A (KERN, Německo)
- Chladnička (Liebherr LH KTS 1414, Německo)
- Hlubokomrazicí box MDF – U3386S (Panasonic, Japonsko)
- Laboratorní třepačka Kavalier LT 2 (Votice, ČR)
- Třepačka REAX TOP s nástavcem (Heidolph, Německo)
- Inkubátor (Memmert, Německo)
- Blokový termostat ISOTEMP 145 D (Fisher Scientific, ČR)
- Portable analog pH metr HI 8314 (Hanna Instruments, Rumunsko)
- Ultrazvuková vana K2 (Kraintek, Slovensko)
- Pumpa vakuová (Merck, Německo)
- Sada reagenčních lahví 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml, 2000ml (Simax, ČR)
- Automatické pipety: 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l, 5 ml (BioHit, Finsko)
- Mikrozkušavky Eppendorf: 2 000  $\mu$ l, 1 500  $\mu$ l, 600  $\mu$ l
- Skleněné a plastové zkumavky: 10 ml, 15 ml
- Petriho misky o průměru 17 cm
- Skleněné odměrné válce, kádinky
- Celofánová fólie

## 8.2 Použité chemikálie

<b>Želatina, typ A pro elektroforézu</b>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<b>Persíran amonný (APS)</b>	(SIGMA-ALDRICH, Japonsko)
<b>Dodecylsíran sodný (SDS)</b>	(LACH-NER, ČR)
<b>Standard MMP-2</b>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<b>Standard MMP-9</b>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<b>30 % akrylamid/bis-akrylamid (polyakrylamid)</b>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<b>N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)</b>	(SIGMA-ALDRICH, Čína)
<b>Chlorid sodný</b>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<b>Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Base)</b>	(PENTA, ČR)
<b>Acetoxymerkurioanilin (APMA)</b>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<b>Dimethylsulfoxid</b>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<b>Hydroxid sodný</b>	(SIGMA-ALDRICH, Švédsko)
<b>Chlorid vápenatý (bezvodý)</b>	(PENTA, ČR)
<b>Chlorid sodný</b>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<b>Glycin</b>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<b>Kyselina octová 99 %</b>	(LACH-NER, ČR)
<b>Methanol</b>	(LACH-NER, ČR)
<b>Ethanol 96 %</b>	(LACH-NER, ČR)
<b>Glycerol (bezvodý)</b>	(LACH-NER, ČR)
<b>Kyselina chlorovodíková 37 %</b>	(SIGMA-ALDRICH, Německo)
<b>Triton®X-100</b>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<b>Brij® L23</b>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<b>Coomassie Brilliant Blue R</b>	(SIGMA-ALDRICH, Velká Británie)
<b>Bromfenolová modř</b>	(Lachema N. P. Brno, ČR)
<b>Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát</b>	(SIGMA-ALDRICH, USA)
<b>Hydrogenfosforečnan sodný</b>	(SIGMA-ALDRICH, USA)

### 8.3 Pacienti

Biologické vzorky, použité pro tuto diplomovou práci, byly sbírány od pacientů s kardiovaskulárním onemocněním, kteří jsou začleněni do dvou na sebe navazujících studií. První byla zaměřená na zánětlivé a další biochemické parametry u pacientů s ICHS a druhá sledovala zánětlivou odpověď po implantaci absorbovatelných koronárních stentů. Studie probíhaly ve spolupráci s Interní klinikou – Kardiologického oddělení se sídlem v Pardubicích (Nemocnice Pardubického kraje, a.s.). V souladu s těmito studii byly také vydány souhlasy Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, které jsou uvedeny v příloze A. Všichni pacienti, kteří jsou do studie začleněni, podepsali informovaný souhlas a vyplnili dotazník. Příklad informovaného souhlasu pro účastníky studie je uveden v příloze B. Obě studie probíhaly také v rámci diplomových prací z roku 2014 [109] a 2019 [108].

V rámci této diplomové práce byly doměřeny všechny chybějící vzorky z obou studií a následovalo celkové zhodnocení. Do celkového vyhodnocení byli zahrnuti pacienti z obou studií a rozdělení do 4 skupin. První skupinou byli pacienti, kteří podstoupili PCI v důsledku dokončení revaskulizace po akutní ICHS (DR po akutní ICHS). Druhá skupina byli pacienti, kteří podstoupili PCI v rámci dokončení revaskulizace po chronické ICHS (DR po chronické ICHS). Třetí skupinou byli pacienti, u kterých došlo ke zhoršení chronické ICHS, ale nejedná se o revaskulizaci (Chronická ICHS). Poslední skupinou byli pacienti, u kterých došlo k akutnímu zhoršení zdravotního stavu (Akutní stav). Rozdělení všech pacientů do těchto skupin je uvedeno v příloze C.

Další biologické vzorky použity v této diplomové práci, byly sbírány od pacientů s DM. Sběr probíhal během roku 2012 ve spolupráci s lékaři z Interního oddělení – lůžková část a z Diabetologické poradny v Pardubicích (Nemocnice Pardubického kraje, a.s.). Všichni začlenění pacienti měli v době odběru špatně kompenzovaný diabetes provázený onemocněním ledvin různé závažnosti bez diagnostikovaného kardiologického onemocnění. Začlenění byli muži (8) i ženy (3) ve věkovém rozmezí 41–86 let.

### 8.4 Vzorky

Pro stanovení MMP-2 a MMP-9 byly použity vzorky séra od pacientů s kardiovaskulárním onemocněním. Pacientům byla krev odebírána před zákrokem, 24 a 48 hodin po PCI. Pacientům s číslem větší než 40 byl proveden ještě čtvrtý odběr D, a to v rozmezí 3, 6 až 12 měsíců po výkonu PCI (většinou 3 měsíce po zákroku). Během transportu byly vzorky uchovávány u ledu a následně zpracovány. Po transportu se

zkumavky nechaly stát zhruba půl hodiny při laboratorní teplotě. Následně byla provedena centrifugace pro získání séra, 10 minut při 3500 otáčkách za minutu, při teplotě 4 °C. Získané sérum bylo rozpipetováno a alikvoty byly zamrazeny při teplotě – 80 °C.

Pro stanovení MMP-2 a MMP-9 u pacientů s DM byly použity vzorky sér a plazmy. Plazma byla sbírána do zkumavky s EDTA. V tomto případě byla krev odebrána pouze jednou. Vzorky séra byly během transportu uchovávány u ledu a následně zpracovány. Po transportu se zkumavky nechaly stát zhruba půl hodiny při laboratorní teplotě. V případě séra byla provedena centrifugace, 10 minut při 3500 otáčkách za minutu, při teplotě 4 °C. Získané sérum bylo rozpipetováno a alikvoty byly zamrazeny při teplotě – 80 °C. V případě plazmy byl postup zpracování stejný s jediným rozdílem, že vzorky po transportu byly ihned centrifugovány.

## **8.5 Příprava potřebných roztoků**

### a) 10 % Dodecylsírán sodný

V 50 ml destilované vody rozpustíme 10 g SDS. Poté doplníme destilovanou vodou na celkový objem 100 ml. Roztok uchováváme v chladničce přibližně 3 měsíce. Při nižší teplotě tento roztok krystalizuje, proto je nutné ho před použitím zahřát v teplé vodní lázni a promíchat.

### b) 12 % Dodecylsírán sodný

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

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

V 50 ml destilované vody rozpustíme 18,5 g Tris-Base. Poté pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové upravíme pH na výslednou hodnotu 8,8. Následně doplníme 50 ml destilované vody na celkový objem 100 ml. Tento roztok uchováváme v chladu, kde je stabilní přibližně 3 měsíce.

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

V 50 ml destilované vody rozpustíme 6 g Tris-Base. Poté pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové upravíme pH na výslednou hodnotu 6,8. Následně doplníme 50 ml destilované vody na celkový objem 100 ml. Tento roztok uchováváme v chladu, kde je stabilní přibližně 3 měsíce.

e) Elektrodový pufr

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

f) Inkubační pufr

V 500 ml destilované vody rozpustíme 6,04 g Tris-Base, 0,6 g chloridu sodného a 1,112 g chloridu vápenatého. Poté doplníme 500 ml destilované vody na celkový objem 1000 ml. Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové upravíme pH roztoku na výslednou hodnotu 7,8. Tento roztok uchováváme v chladu, kde je stabilní zhruba měsíc.

g) Standardový pufr pro MMP-2

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

h) Standardový pufr pro MMP-9

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



i) 2 % Bromfenolová modř

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

j) Vzorkový pufr

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

k) 1 % Dodecylsírán sodný

Pro přípravu čtyř gelů do plastové zkumavky napipetujeme 1800  $\mu$ l destilované vody a poté 200  $\mu$ l 10 % SDS. Tento roztok připravujeme vždy v den použití. Roztok zahřejeme v horké vodní lázni před pipetováním k navážené želatině. Zahřátí 1 % SDS provádíme z toho důvodu, aby se želatina po smíchání s roztokem rychle a důkladně rozpustila.

l) 10 % Persíran amonný

Pro přípravu čtyř gelů na analytických vahách navážíme 0,2 g APS. Následně k navážce napipetujeme 2 ml destilované vody. Roztok APS připravujeme vždy v den použití.

m) Roztok želatiny v 1 % Dodecylsíránu sodném

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

n) 2,5 % Triton X-100

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

o) Odbarvovací roztok

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

p) Barvicí roztok

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

q) 0,1 M Hydroxid sodný

Ve 100 ml destilované vody rozpustíme 0,4 g hydroxidu sodného. Tento roztok uchováváme v chladu. Roztok se používá pro úpravy pH.

r) Fosfátem pufovaný fyziologický roztok o pH 7,4

Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) o pH 7,4 a celkovém objemu 100 ml obsahoval fosfátový pufr o koncentraci 10 mM a NaCl o koncentraci 140 mM. Ve 100 ml destilované vody rozpustíme 2,84 g hydrogenfosforečnanu sodného (zásobní roztok A). V jiné nádobě si ve 100 ml destilované vody rozpustíme 3,12 g dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu (zásobní roztok B). Následně si připravíme zásobní roztok fosfátového pufru o pH 7,4. Smícháme 40,5 ml zásobního roztoku A s 9,5 ml zásobního roztoku B. Doplníme destilovanou vodou na výsledný objem 100 ml. Následně 10 ml zásobního roztoku fosfátového pufru o pH 7,4 smícháme s 90 ml destilované vody. Takto získáme fosfátový pufr o pH 7,4 a koncentraci 10 mM. K tomuto roztoku následně přidáme 0,82 g NaCl a důkladně rozpustíme.

s) 1 M APMA

Na analytických vahách navážíme 0,35175 g APMA. K navážce přidáme 1000  $\mu$ l dimethylsulfoxidu, a to z toho důvodu, že APMA je špatně rozpustná v destilované vodě. Takto připravený roztok zvortexujeme. Zásobní roztok uchováváme při laboratorní teplotě zhruba měsíc.

t) 5 mM APMA

K 955  $\mu$ l 0,1 M NaOH přidáme 5  $\mu$ l 1 M APMA, Roztok dobře promícháme na vortexu, protože dochází k malému zakalení. Tento roztok připravujeme vždy čerstvý, protože není stálý.

## **8.6 Postup želatinové zymografie**

a) Příprava standardů

Jako standard jsme použili kontrolní vzorek od pacientů. Použili jsme dva vzorky séra, které jsme rozpipetovali po 10  $\mu$ l do malých mikrozkušavek. Takto připravené sérum jsme uchovávali při -80 °C. Před každým měřením je nutné připravit vždy nový kontrolní vzorek. Kontrolní vzorek se při laboratorní teplotě rozmrazí. Poté se k 10  $\mu$ l kontrolního vzorku přidá 170  $\mu$ l vzorkového pufru. Takto připravený kontrolní vzorek důkladně promícháme na vortexu a následně inkubujeme 2 hodiny při 25 °C.

Standard proMMP-2 přišel jako lyofilizovaný prášek. Standard jsme rozmrazili při laboratorní teplotě a po doporučení výrobce prášek rozpustili pomocí PBS o pH 7,4 tak, aby koncentrace odpovídala 50  $\mu$ g/ml. Tudíž jsme k 10  $\mu$ g lyofilizovanému prášku napipetovali 200  $\mu$ l PBS. Takto rozpuštěný standard jsme rozpipetovali do mikrozkušavek po 10  $\mu$ l a poté zamrazili na teplotu -20 °C dle doporučení výrobcem. V případě použití standard vyndáme z mrazáku a necháme rozmrazit při laboratorní teplotě. Dále ho naředíme standardovým pufrem tak, že k 10  $\mu$ l koncertovaného standardu přidáme 490  $\mu$ l standardového pufru a zvortexujeme. Výsledná koncentrace je nyní 1000 ng/ml. Potom tento naředěný standard dále ředíme, abychom měli výslednou koncentraci 500 ng/ml. Toho dosáhneme tak, že do nové mikrozkušavky napipetujeme 50  $\mu$ l naředěného standardu o koncentraci 1000 ng/ml a přidáme 50  $\mu$ l standardového pufru (1:1). Následně zvortexujeme. Oba naředěné standardy (jeden o koncentraci 1000 ng/ml a druhý o koncentraci 500 ng/ml) proMMP-2 naředíme 18x vzorkovým pufrem. Tudíž ke 170  $\mu$ l vzorkového pufru

napipetujeme 10  $\mu$ l naředěného standardu a následně promícháme na vortexu. Toto ředění provádíme z toho důvodu, že vzorek je také 18x naředěný a v konečných výpočtech nemusíme brát zřetel na ředění.

Standard proMMP-9 přišel také jako lyofilizovaný prášek. Postup je tedy stejný jako u proMMP-2. Standard jsme rozmrazili při laboratorní teplotě a po doporučení výrobce prášek rozpustili pomocí PBS o pH 7,4 tak, aby koncentrace odpovídala 50  $\mu$ g/ml. Tudiž jsme k 10  $\mu$ g lyofilizovanému prášku napipetovali 200  $\mu$ l PBS. Takto rozpuštěný standard jsme rozpipetovali do mikrozkušavek po 10  $\mu$ l a poté zamrazili na teplotu -20 °C dle doporučení výrobcem. V případě použití standard vyndáme z mrazáku a necháme rozmrazit při laboratorní teplotě. Dále ho naředíme standardovým pufrům tak, že k 10  $\mu$ l koncertovaného standardu přidáme 490  $\mu$ l standardového pufru a zvortexujeme. Výsledná koncentrace je nyní 1000 ng/ml. Potom tento naředěný standard dále ředíme, abychom měli výslednou koncentraci 500 ng/ml. Toho dosáhneme tak, že do nové mikrozkušavky napipetujeme 50  $\mu$ l naředěného standardu o koncentraci 1000 ng/ml a přidáme 50  $\mu$ l standardového pufru (1:1). Následně zvortexujeme. Oba naředěné standardy (jeden o koncentraci 1000 ng/ml a druhý o koncentraci 500 ng/ml) proMMP-9 naředíme 18x vzorkovým pufrům. Tudiž ke 170  $\mu$ l vzorkového pufru napipetujeme 10  $\mu$ l naředěného standardu a následně promícháme na vortexu.

Pakliže je nutné standard aktivovat, vyndáme ho z mrazáku a necháme rozmrazit při laboratorní teplotě. Dále ho naředíme standardovým pufrům tak, že k 10  $\mu$ l koncertovaného standardu přidáme 490  $\mu$ l standardového pufru a zvortexujeme. Výsledná koncentrace je tedy 1000 ng/ml. Tento roztok si rozdělíme na dvě části a pouze jednu aktivujeme. Pro aktivaci MMP ke 200  $\mu$ l naředěného standardu (1000 ng/ml) přidáme 20  $\mu$ l 5 mM APMA. Tento roztok inkubujeme v termostatu při 37 °C 4 hodiny. Ke druhé části naředěného standardu místo APMA napipetujeme 20  $\mu$ l standardového pufru a také inkubujeme při 37 °C 4 hodiny. Po inkubaci aktivaci zastavíme přidávkem vzorkového pufru v poměru 1:1 (MMP:vzorkový pufr). Tudiž ke 200  $\mu$ l aktivovanému i neaktivovanému standardu přidáme 200  $\mu$ l vzorkového pufru. Promícháme na vortexu a umístíme na 5 minut do horké lázně, která má teplotu 95 °C. Poté necháme roztoky ještě 2 hodiny inkubovat v termostatu při 25 °C. Postup je stejný pro oba standardy.

#### b) Příprava vzorků

Vzorky séra naředíme připraveným vzorkovým pufrem. Pro stanovení MMP-2 a MMP-9 používáme 18x ředění. Do mikro zkumavky napipetujeme 170  $\mu$ l vzorkového pufru a 10  $\mu$ l vzorku. Takto naředěné vzorky důkladně promícháme na vortexu a necháme 2 hodiny inkubovat při 25 °C. Dodržení doby inkubace je důležité z toho důvodu, že během ní obsadí SDS aktivní místa na MMP, a tím zabrání jejímu předčasnému navázání na želatinu před elektroforézou.

#### c) Příprava aparatury pro výrobu gelů

Nejdříve opláchneme profilovací a krátká skla destilovanou vodou a pomocí papírového ručníku očistíme. Poté skla důkladně vyčistíme buničinou namočenou v ethanolu. Skla musí být dokonale čistá, zbavená všech nečistot a odmaštěná, jinak by mohlo dojít k propouštění skel. Následně přiložíme k profilovacímu sklu krátké sklo a vložíme je takto do licího rámu. Licí rám spolu se skly vložíme do licího stojanu s těsníci pásky a následně mezi skla napipetujeme zhruba 1 ml destilované vody. Tímto se ujistíme, že skla skutečně neprotékají. Tuto vodu potom odstraníme tak, že uchopíme licí stojan a vodu vylijeme do buničiny přiložené ke sklům. Prostor mezi skly případně dosušíme filtračním papírem.

#### d) Příprava dělicího gelu

Reagencie potřebné k přípravě dvou dělicích gelů (většinou byly připravovány čtyři gely najednou) jsou uvedeny v tabulce 2. Nejdříve si v plastové zkumavce postupně smícháme reagencie kroku 1, jak je uvedeno v tabulce 2. Roztok důkladně promícháme na vortexu a následně odvzdušníme pomocí vývěvy, a to za současného poklepu tužkou. Poté zchladíme v ledové vodní lázni přibližně 5 minut, aby gel mezi skly lépe tuhnul, kam zhruba na 2 minuty můžeme vložit i roztok APS a TEMED. K zchlazenému roztoku napipetujeme nejdříve APS a následně TEMED (reagencie kroku 2). Celý roztok důkladně a krátce promícháme na vortexu a poté co nejrychleji pipetujeme mezi skla tak, aby hladina gelu sahala pod zelený okraj licího rámu. Nakonec gel rychle a velmi opatrně převrstvíme zhruba 1 ml destilované vody, aby nedošlo k zavzdušení gelu a vytvořila se rovná linie. Gel necháme tuhnout zhruba 10–20 minut. Pozorujeme zbylý gel ve zkumavce a dle něj se orientujeme. Pokud je gel ve zkumavce ztuhlý, pak je ztuhlý i gel mezi skly.

*Tabulka 2 Reagencie pro přípravu dělicího gelu*

<b>Pořadí</b>	<b>Reagencie</b>	<b>Množství [μl]</b>	
<b>1.</b>	30 % Polyakrylamid	2 500	<b>Krok 1</b>
<b>2.</b>	Destilovaná voda	3 600	
<b>3.</b>	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	935	
<b>4.</b>	12 % SDS	75	
<b>5.</b>	Želatina v 1 % SDS	750	
<b>1.</b>	10 % APS	375	<b>Krok 2</b>
<b>2.</b>	TEMED	3,75	

e) Příprava zaostřovacího gelu

Reagencie potřebné k přípravě dvou zaostřovacích gelů (většinou byly připravovány čtyři gely najednou) jsou uvedeny v tabulce 3. Během doby tuhnutí dělicího gelu si v plastové zkumavce postupně smícháme reagencie kroku 1, jak je uvedeno v tabulce č. 3. Roztok důkladně promícháme na vortexu a následně odvzdušníme pomocí vývěvy, a to za současného poklepu tužkou. Odvzdušněný roztok následně zchladíme v ledové vodní lázni. Po uplynutí doby potřebné k tuhnutí dělicího gelu slijeme vodu do buničiny. Následně ke zchlazenému roztoku přidáme nejdříve APS a poté TEMED (reagencie kroku 2). Poté jednou a krátce promícháme na vortexu a co nejrychleji napipetujeme mezi skla nad dělicí gel až po okraj. Nakonec mezi skla zasuneme plastový hřebínek, který jsme si předem očistili ethanolem. Gel necháme 30 minut tuhnout. V případě že čas tuhnutí nedodržíme, nebude gel dostatečně ztuhlý a nevytvoří se nám jamky pro pipetování vzorků.

*Tabulka 3 Reagencie pro přípravu zaostřovacího gelu*

<i><b>Pořadí</b></i>	<i><b>Reagencie</b></i>	<i><b>Množství [μl]</b></i>	
<i><b>1.</b></i>	30 % Polyakrylamid	625	<i><b>Krok 1</b></i>
<i><b>2.</b></i>	Destilovaná voda	2 800	
<i><b>3.</b></i>	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1 250	
<i><b>4.</b></i>	12 % SDS	50	
<i><b>1.</b></i>	10 % APS	250	<i><b>Krok 2</b></i>
<i><b>2.</b></i>	TEMED	3,75	

f) Příprava elektrodového pufru

Elektrodový pufr, který jsme si připravili dopředu podle návodu, naředíme destilovanou vodou před elektroforézou v poměru 1:5. Na 2 gely potřebujeme objem přibližně 900 ml. Smísíme 150 ml elektrodového pufru a 950 ml destilované vody. Na 4 gely potřebujeme objem přibližně 1200 ml, smícháme tedy 200 ml elektrodového pufru a 1000 ml destilované vody.

g) Umístění vzorků a standardů na gel

Po uplynutí doby, potřebné ke ztuhnutí gelů, vyjmeme z licího stojanu licí rám. Skla s gely vyndáme z rámu a po dvojicích umístíme do rámu pro elektroforézu tak, aby směřovaly krátkými skly k sobě. Poté je umístíme do elektroforetické vany dle barevné příslušnosti, která je označená červenou a černou barvou (červená elektroda na červenou značku) a opatrně a rovnoměrně vytáhneme plastové hřebínky. Připraveným naředěným elektrodovým pufrem nejdříve opatrně propláchneme jamky v gelu, následovně naplníme pufrem prostor mezi gely. Pipetovací nástavec opláchneme destilovanou vodou a umístíme mezi skla. Následně do příslušných jamek pomocí malé (10 μl) pipety dávkujeme opatrně a plynule 10 μl vzorku či 10 μl standardu. Po naplnění všech jamek vyjmeme pipetovací nástavec. Do elektroforetické vany nalijeme naředěný elektrodový pufr po příslušnou rysku. Následně nasadíme na elektroforetickou vanu víko tak, aby souhlasila barevná příslušnost elektrod a vše bylo důkladně propojeno. Připojíme zdroj napětí.

#### h) Vlastní elektroforéza

Na zdroji napětí nastavíme příslušné parametry elektroforézy. Hodnotu napětí nastavíme na 180 V a čas na 70 minut. Během elektroforézy je udržováno konstantní napětí, a proto proud nestavujeme. Zdroj si ho vypočítá sám na základě Ohmova zákona. Hodnota proudu záleží na počtech umístěných gelů v elektroforetické vaně. Pro čtyři gely je na začátku průměrně 208 mA a na konci elektroforézy klesne na průměrnou hodnotu 63 mA. Jakmile bromfenolová modř opustí gely, což je přibližně po 45 minutách, stopujeme dalších 15 minut, během kterých dojde k lepšímu rozdělení metaloproteináz. Po uplynutí této doby elektroforézu ukončíme. V průběhu elektroforézy si připravíme Petriho misky, které důkladně vyčistíme buničinou namočenou v ethanolu. Misky následně popíšeme pro přehlednější práci s gely.

#### i) Postup před inkubací gelů

Po spuštění elektroforézy si připravíme dle návodu 2,5 % Triton X-100, který důkladně rozpustíme v ultrazvukové vaně. Po ukončení elektroforézy sejmeme z elektroforetické vany víko a slijeme elektroodový pufr do odpadu. Poté vyjmeme skla z nástavců. Pro získání gelů skla pomocí plastového otvíráku opatrně oddělíme od sebe a pomocí plastového otvíráku odřízneme jamky, které odstraníme. Opatrně sloupneme jednotlivé gely ze skla do podepsaných Petriho misek. Každý gel zalijeme zhruba 60 ml Tritonu X-100. Poté misky umístíme na třepačku a necháme 1 hodinu třepat. Následně slijeme Triton X-100 do odpadu. Při slívání se snažíme na gely nesahat. Nakonec na každý gel nalijeme 100 ml inkubačního pufru a necháme gely v termostatu inkubovat 19 hodin při 37 °C.

#### j) Barvení a odbarvování gelů

Těsně před ukončením inkubace si připravíme odbarvovací a barvicí roztok podle návodu. Z gelů slijeme inkubační pufr do odpadu a poté na každý gel nalijeme 80 ml odbarvovacího roztoku. Umístíme misky na třepačku a necháme 30 minut třepat. Během třepání si nastříháme celofánové fólie na obdélníky o trochu větší, než je velikost gelu a ponoříme je do Petriho misky s odbarvovacím roztokem (zhruba 100 ml). Na celofánové obdélníky nalijeme 10 ml glycerolu a dobře promícháme. Takto připravené celofánové fólie necháme inkubovat 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po uplynutí 30 minut slijeme odbarvovací roztok do speciálního odpadu a následně na všechny gely nalijeme 80 ml barvicího roztoku a necháme třepat 1 hodinu. Po třepání barvicí roztok slijeme do speciálního odpadu a každý gel v Petriho misce důkladně promícháme s malým množstvím



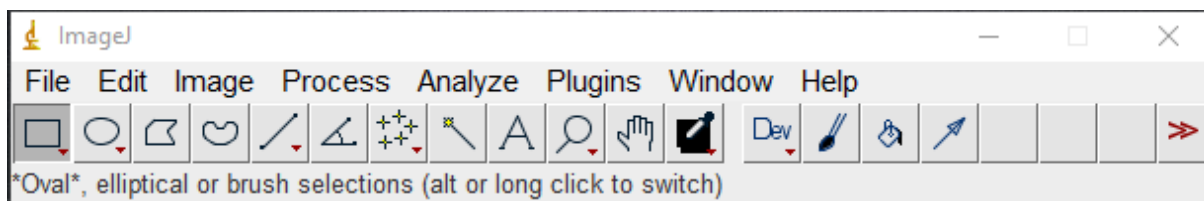
odbarvovacího roztoku. Ten následně slijeme do speciálního odpadu a na jednotlivé gely nalijeme 100 ml čistého odbarvovacího roztoku a necháme gely 45 minut třepat. Po uběhnutí daného času přidáme ke každému gelu s odbarvovacím roztokem 5 ml glycerolu a dobře promícháme. Odbarvujeme dalších 15 minut na třepáče. Nakonec slijeme roztok do speciálního odpadu a gely opatrně přesuneme mezi připravené celofánové fólie. Gely osušíme pomocí papírových utěrek a necháme uschnout na čistých papírových utěrkách a gely popíšeme.

#### k) Skenování gelů

Skenování gelů provádíme co nejdříve po jejich obarvení. Můžeme však skenovat i týden po obarvení. Nejdříve odstraníme bílou desku ze skeneru a poté ho zapneme. V příslušném programu pro skener si nastavíme několik parametrů. Jako nejvhodnější se jeví následující parametry. Zvolíme si Home mode, protože tato varianta nabízí více možností pro skenování. Dále zvolíme Positive film. Následně v nabídce zaškrtneme možnosti 400 dpi, Color Restoration, Digital ICE a Backlight Correction. Poté klikneme na tlačítko Preview, kdy provedeme náhled gelu. Nastavíme gel na správnou orientaci a odstraníme přebytečné pozadí (oříznutím). Pokud gel v náhledu vypadá v pořádku, klikneme na tlačítko Scan. Poté naskenovaný gel exportujeme do námi zvolené složky a uložíme. Může se stát, že jsou gely světlejší, a to nejčastěji, když je skenujeme déle po obarvení. V tomto případě je potřeba na tuto skutečnost reagovat úpravou předešlých parametrů a různě je zkombinovat. Nejčastěji jsme skenovali bez Backlight Correction a Color Restoration. Je také možnost měnit kontrast a jas. Vždy se snažíme, aby proužky na gelu byly co nejzářivější a nejostřejší, aby bylo možné gel vyhodnotit.

## 8.7 Vyhodnocování gelů

Naskenované gely jsme vyhodnocovali pomocí programu ImageJ. Hlavní panel tohoto programu znázorňuje obrázek 12.

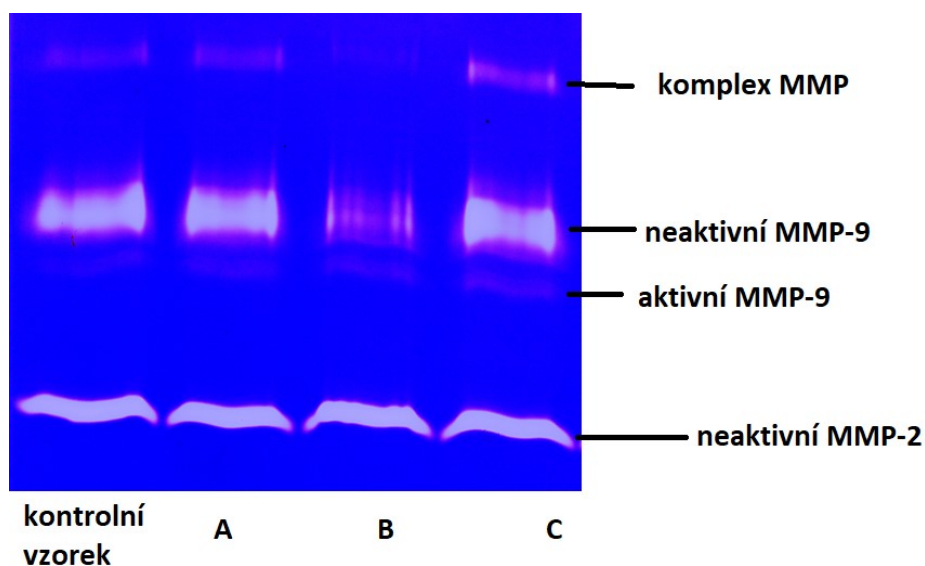


*Obrázek 12* Základní vyhodnocovací panel programu ImageJ

Nejdříve si pomocí nabídky File a módu Open otevřeme námi zvolený scan gelu. V dalším kroku je důležité převést barevnou fotografii na negativ, což provedeme pomocí nabídky Image a módu Type na 8 bit. Dále si označíme sloupek, který chceme vyhodnocovat. Následně si uvedeným postupem vyznačíme první linii, která obsahuje daný proužek na gelu: Analyze → Gels → Select first lane. Takto označený obdélníček vždy přesouváme na ostatní s požadovanými proužky a nastavíme: Analyze → Gels → Select next lane. Zde je důležité, aby byla zachována stejná plocha obdélníčku pro všechny označené linie. V případě nezachování stejné plochy by došlo k ovlivnění výsledných vygenerovaných hodnot programem. Pomocí módu Analyze → Gels → Plot lanes získáme křivky, u kterých si vyznačíme počáteční linie (začátek a konec píku). Poté klikneme na ikonku ve tvaru hůlky (8 ikona zleva na obrázku 12) a pomocí ní klikneme na daný pík, objeví se příslušné plochy, jejichž hodnoty odečteme. Následně pomocí standardu o známé koncentraci a ploch vzorků dopočítáme koncentrace metaloproteináz u jednotlivých vzorků. Nesmíme však zapomenout zohlednit případné ředění vzorků a standardů. V našem případě bylo použito stejné ředění 18x u vzorků i kontrolního vzorku, tudíž nemusíme výsledné hodnoty dále přepočítávat. Naměřená data byla dále zpracována pomocí tabulkového procesoru Microsoft Excel [108, 109].

## 9. VÝSLEDKY

K vyhodnocení jsme použili metodu jednoho standardu. Standard byl kontrolní vzorek o známé koncentraci. K vyhodnocování jsme vybrali dva kontrolní vzorky s různou hladinou enzymů. Pacientům byl proveden odběr před zavedením stentu (odběr A), 24 hodin po zákroku (odběr B) a 48 hodin po zákroku (odběr C). U pacientů s číslem vyšším než 40 byl proveden i čtvrtý odběr, a to v rozmezí 3, 6 a 12 měsíců po implantaci stentu (odběr D). Odlišné rozmezí je způsobeno tím, že pacienti byli z nemocnice propuštěni 48 hodin po zákroku a odběr D jim byl odebrat při kontrole, na kterou se nemuseli dostavit. Nejčastěji však byl prováděn odběr po 3 měsících. Pacientům s DM byl proveden jeden odběr, kdy bylo odebíráno sérum a plazma do zkumavky s EDTA. Na obrázku 13 je příklad zymogramu. Další příklady zymogramů jsou uvedeny v Příloze F.



*Obrázek 13 Příklad zymogramu*

Tabulky 4 a 5 uvádějí naměřené hodnoty aktivní a neaktivní formy MMP-9 a neaktivní formu MMP-2. Vzorky jsou od pacientů, kteří podstoupili implantaci stentů pomocí PCI. V tabulkách jsou zaznamenány také průměry koncentrací jednotlivých enzymů včetně směrodatných odchylek.

*Tabulka 4 Hodnoty proMMP-9 a MMP-9 pacientů po PCI*

<b>Enzym</b>	<b>proMMP-9 [ng/ml]</b>				<b>MMP-9 [ng/ml]</b>			
<b>Odběr</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>Pacient 24</b>	185,82	1773,50	1428,98	-	12,18	45,53	14,98	-
<b>Pacient 38</b>	1235,44	1558,45	1571,25	-	43,31	79,19	17,26	-
<b>Pacient 41</b>	618,39	1731,06	1531,10	1127,14	-	-	-	-
<b>Pacient 45</b>	665,19	1586,19	1473,63	1139,63	-	-	-	-
<b>Pacient 46</b>	961,61	1372,25	1197,39	1108,97	-	-	-	-
<b>Pacient 48</b>	763,44	495,46	409,56	-	26,31	23,27		-
<b>Pacient 49</b>	282,11	533,57	753,92	-	-	16,69	18,35	-
<b>Průměr</b>	673,14	1292,93	1195,12	1125,25	27,27	41,17	16,86	-
<b>Směrodatná odchylka</b>	365,37	547,46	446,91	15,41	15,58	28,19	1,71	-

*Tabulka 5 Hodnoty proMMP-2 pacientů po PCI*

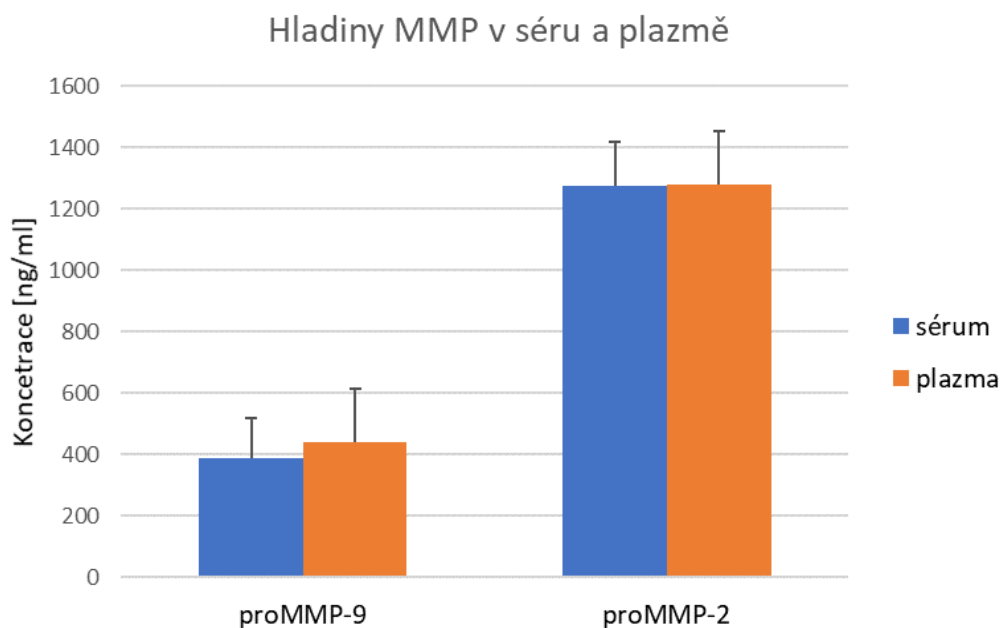
<b>Enzym</b>	<b>proMMP-2 [ng/ml]</b>			
<b>Odběr</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>Pacient 24</b>	1547,69	1811,97	1733,90	-
<b>Pacient 38</b>	1473,31	1220,47	1398,93	-
<b>Pacient 41</b>	1032,28	1621,43	2013,09	2080,20
<b>Pacient 45</b>	1749,93	1447,37	1322,75	1362,76
<b>Pacient 46</b>	927,59	1108,04	918,84	1045,87
<b>Pacient 48</b>	1257,67	1256,45	1135,14	-
<b>Pacient 49</b>	1133,32	1044,16	1127,73	-
<b>Průměr</b>	1303,11	1358,56	1378,63	1496,28
<b>Směrodatná odchylka</b>	298,24	280,97	379,90	529,94

Tabulka 6 uvádí naměřené hodnoty neaktivní formy MMP-9 a MMP-2. Měření bylo provedeno ze séra a plazmy s EDTA. Vzorky jsou od pacientů s DM. V tabulce jsou zaznamenány také průměry koncentrací jednotlivých enzymů včetně směrodatných odchylek.

*Tabulka 6 Hodnoty proMMP-9 a proMMP-2 pacientů s DM*

<b>Odběr</b>	<b>Sérum</b>		<b>Plazma</b>	
<b>Enzym</b>	<b>proMMP-9 [ng/ml]</b>	<b>proMMP-2 [ng/ml]</b>	<b>proMMP-9 [ng/ml]</b>	<b>proMMP-2 [ng/ml]</b>
<b>Pacient DM 1</b>	331,62	1095,80	360,83	1121,27
<b>Pacient DM 3</b>	525,38	1330,08	663,63	1397,65
<b>Pacient DM 4</b>	337,37	1229,43	560,45	1495,43
<b>Pacient DM 5</b>	209,91	1393,38	219,81	1371,08
<b>Pacient DM 6</b>	268,54	1232,77	256,70	1237,85
<b>Pacient DM 7</b>	368,60	1042,53	485,95	1022,50
<b>Pacient DM 8</b>	591,12	1102,26	750,52	1014,12
<b>Pacient DM 9</b>	474,69	1405,20	366,79	1325,85
<b>Pacient DM 10</b>	303,92	1462,95	488,66	1452,03
<b>Pacient DM 11</b>	341,33	1293,81	251,50	1185,71
<b>Pacient DM 12</b>	349,19	1412,65	445,85	1440,50
<b>Průměr</b>	386,52	1272,81	440,97	1278,54
<b>Směrodatná odchylka</b>	132,36	144,37	171,66	172,87

Na obrázku 14 jsou zobrazeny průměrné hodnoty koncentrací enzymů proMMP-9 a proMMP-2 pacientů s DM. Měření bylo provedeno ze séra a plazmy.



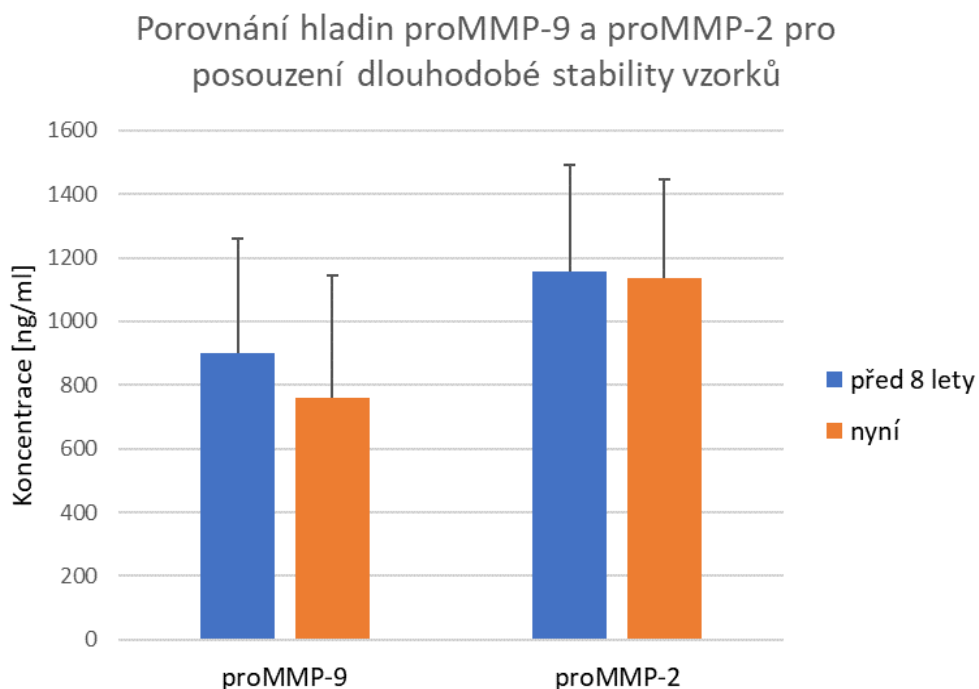
**Obrázek 14** Průměrné hodnoty koncentrace proMMP-9 a proMMP-2 v séru a plazmě.

Dále jsme porovnávali naměřené hodnoty proMMP-9 a proMMP-2 mezi sérem a plazmou. Tabulka 7 udává výsledky Studentova t-testu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Rozdíly v dynamice hladin nebyly statisticky významné.

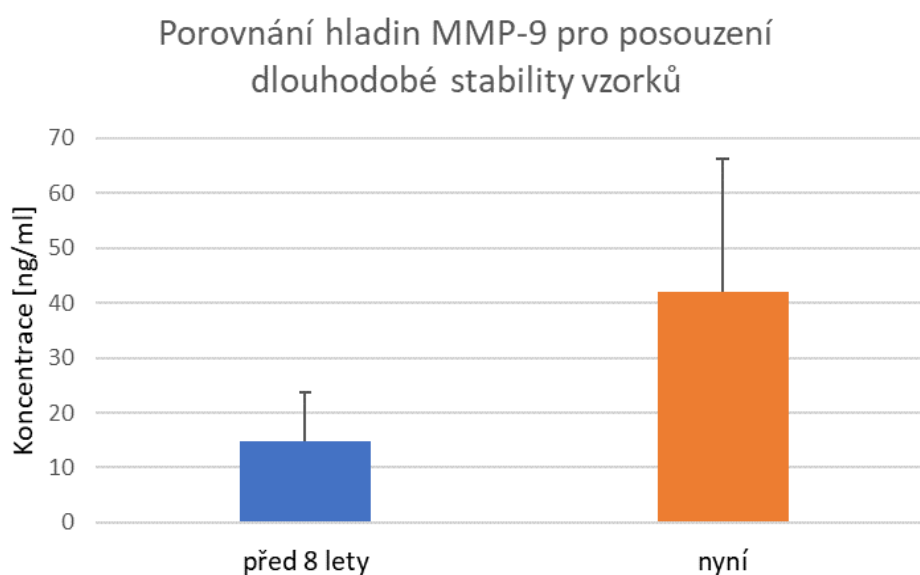
**Tabulka 7** T-test významnosti či nevýznamnosti hladin proMMP-9 a proMMP-2 mezi sérem a plazmou.

	Sérum X Plazma
<b>proMMP-9</b>	0,1038
<b>proMMP-2</b>	0,8551

Obrázky 15 a 16 uvádějí porovnání hladin enzymů proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2 pro porovnání dlouhodobé stability vzorků. Vzorky byly od 9 pacientů a byly změřeny odběry A, B a C.



**Obrázek 15** Porovnání hladin enzymů proMMP-9 a proMMP-2 pro posouzení dlouhodobé stability vzorků



**Obrázek 16** Porovnání hladin enzymu MMP-9 pro posouzení dlouhodobé stability vzorků

## 10. DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo navázat na předchozí diplomové práce a doměřit vzorky od pacientů, kteří podstoupili implantaci stentů technikou PCI. K vyhodnocení jsme využili metodu želatinové zymografie. Pacienti byli zahrnuti do dlouhotrvající studie, která probíhala ve spolupráci s Interní klinikou – Kardiologické oddělení se sídlem v Pardubicích (Nemocnice Pardubického kraje, a.s.). Studie se v první řadě věnovala krátkodobým sledováním dynamiky hladin MMP-2 a MMP-9 u pacientů po implantaci koronárních stentů. Tímto se zabývala jedna z předchozích diplomových prací z roku 2014 [109]. V druhé řadě se věnovala na dynamiku hladin MMP-2 a MMP-9 i v delším časovém odstupu od zavedení stentu. Dále se pak věnovala porovnání lékových a vstřebatelných stentů [108]. V této diplomové práci jsme především doměřili vzorky od pacientů a snažili jsme se studii sjednotit a dokončit.

Druhým cílem diplomové práce bylo stanovit hladiny MMP-2 a -9 u vybrané skupiny pacientů s DM. Právě v předešlé diplomové práci bylo naznačeno, že vlivem DM mohou být hladiny MMP-2 a MMP-9 zvýšeny [109]. Vzorky pacientů byli získané z Interního oddělení – lůžková část a z Diabetologické ambulance se sídlem v Pardubicích (Nemocnice Pardubického kraje, a.s.).

Jako další cíle jsme si dali zhodnotit dlouhodobou stabilitu vzorků, s ohledem na dobu jejich uskladnění. A dále porovnat hladiny proMMP-9 a proMMP-2 v séru a v plazmě s EDTA.

### STANDARD

V předchozích diplomových pracích z roku 2014 a 2019 [108, 109] se poukázalo na to že, pro metodu želatinové zymografie je důležité použít vhodný standard proMMP-2 a proMMP-9. Standardy byly v minulosti dodány v různé kvalitě od různých dodavatelů. Dříve dodané standardy přišly v různých formách a obsahovaly rozdílné hladiny aktivovaných forem a dimerů. Pro metodu želatinové zymografie je tedy stěžejní, aby standard byl vhodný pro tuto metodu. V předchozí diplomové práci [108] byly použity standardy od dodavatele Merck, které se osvědčily a ukázaly se jako vhodné. V této diplomové práci jsme chtěli použít také standardy o firmy Merck, bohužel dodavatel měl aktuální dlouhodobý nedostatek tohoto produktu. Objednali jsme tedy jiný standard, který byl určen pro metodu želatinové zymografie. Tento standard jsme neznali a nevěděli, zda bude vyhovující. Použili jsme standardy proMMP-2 a MMP-9 od dodavatele Sigma-Aldrich.



Standardy přišly jako lyofilizovaný prášek. Standardy jsme rozmrazili při laboratorní teplotě a po doporučení výrobce prášek rozpustili pomocí PBS o pH 7,4 tak, aby koncentrace odpovídala 50 µg/ml. Rozpuštěný standard jsme rozpipetovali do mikrozkušavek po 10 µl a poté zamrazili na teplotu -20 °C dle doporučení výrobce. Po vyzkoušení standardu jsme však zjistili, že jeho aktivita není dostačující tak, aby byly výsledky porovnatelné s literaturou a předchozími pracemi [108, 109]. Dle molekulové hmotnosti jsme ověřili, že se jedná o proMMP-2 a aktivní MMP-9. Na zymogramu se neobjevily žádné nečistoty. Příklad kalibrace je uveden v příloze E.

Jelikož aktivita standardu nebyla dostačující, rozhodli jsme se vyzkoušet standardy aktivovat. Postup byl stejný pro obě matrixové metaloproteinázy. Standard jsme vyndali z mrazáku a nechali rozmrazit při laboratorní teplotě. Následně jsme ho naředili standardovým pufrům na výslednou koncentraci 1000 ng/ml. Zaktivovali jsme vždy polovinu roztoku pomocí APMA. Druhou polovinu jsme neaktivovali a sloužila jako kontrola. [109]. Po vyhodnocení gelů jsme zjistili, že standard proMMP-2 se opravdu zaktivoval, ale aktivita enzymu pro vyhodnocování i tak nebyla dostačující. U standardu MMP-9 neproběhla žádná změna, tudíž se potvrdilo, že standard MMP-9 byl opravdu již aktivovaný. Z výsledků jsme tedy usoudili, že standard pro vyhodnocování naměřených hodnot proMMP-2 a proMMP-9 není použitelný a přistoupili jsme k variantě kontrolního vzorku. Kontrolní vzorek je sérum od pacienta o známé koncentraci. K vyhodnocování jsme vybrali dva kontrolní vzorky s různou hladinou enzymů, a to konkrétně 54 C a 59 D. Vzorky byly proměřeny v roce 2019 [108] a byly vybrány tak, aby splňovaly podmínky pro stabilitu dle literatury. Tak jako v předchozích pracích [108, 109] jsme používali ředění 18x, jak u kontrolních vzorků, tak u vzorků od pacientů.

### **HLADINY MMP PO PODSTOUPENÍ PCI**

Do celkového vyhodnocení byli zahrnuti pacienti z obou studií a rozdělení do 4 skupin. Celkově bylo zahrnuto 74 pacientů. První skupinou byli pacienti, kteří podstoupili PCI v důsledku dokončení revaskulizace po akutní ICBS. Druhá skupina byli pacienti, kteří podstoupili PCI v rámci dokončení revaskulizace po chronické ICBS. Třetí skupinou byli pacienti, u kterých došlo ke zhoršení chronické ICBS. Tito pacienti neměli žádné implantované stenty. Poslední skupinou byli pacienti s akutním zhoršením zdravotního stavu. Základní informace o těchto pacientech jsou uvedeny v příloze C. V tabulce je věk a BMI pacienta vyjádřen jako průměr se směrodatnou odchylkou. V ostatních případech je počet

pacientů vyjádřen jednak číslem, jednak procentuálním zastoupením, které je uvedeno v závorce. Jednotlivé skupiny pacientů se mezi sebou významně neliší. Skupina DR po chronické ICHS a akutní stav se však statisticky významně lišily, po provedení Studentova T testu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ , v body mass indexu (0,00179), v hyperlipoproteinémii a dyslipoproteinémii (0,0056) a v léčbě statiny před zákrokem (0,0056). Dále se v příloze C nacházejí tabulky s hodnotami proMMP-9 a proMMP-2 pacientů po podstoupení PCI dle rozdělení skupin.

Při porovnání dynamiky proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2 mezi jednotlivými časy odběru je statisticky významné porovnání hladin proMMP-9 v odběru A a B a také mezi odběrem A a C. Statistická významnost je u všech pozorovaných skupin. Tabulka T testu významnosti či nevýznamnosti je uvedena v příloze D. Porovnání hladin MMP-9 a proMMP-2 nejsou statisticky významné v žádných pozorovaných skupinách, a proto hodnoty neuvádíme. Z výsledků je patrné, že po zavedení stentu dochází k významnému zvýšení hladin proMMP-9. Ve většině případů dochází i ke zvýšení proMMP-2 v porovnání s počátečními hodnotami. Zde není zvýšení hladin enzymů tak výrazné. Výsledky jsou v souladu s dostupnou literaturou a také s diplomovými pracemi z roku 2014 [109] a 2019 [108]. Shen a kol. ve své studii z roku 2021 zmiňují, že vrchol exprese proMMP-9 je jeden den po zavedení stentu. Vrchol exprese pro proMMP-2 je až po 7 dnech od zavedení stentu [95].

Při rozdělení pacientů na jednotlivé skupiny a porovnání hladin proMMP-9 a proMMP-2 v jednotlivých odběrech napříč skupinami, nám vyšly tyto statisticky významné rozdíly. V odběru A u proMMP-9 v porovnání skupiny pacientů DR po akutní ICHS s akutním stavem a také v porovnání skupiny DR po chronické ICHS s akutním stavem. Pro proMMP-2 byly statisticky významné rozdíly také v odběru A a to u skupiny pacientů DR po chronické ICHS a chronické ICHS a u skupiny DR po chronické ICHS a akutním stavem. Statistické významnosti se také blížil odběr B u skupin DR po akutní ICHS a DR po chronické ICHS. Tabulky s T testy významnosti či nevýznamnosti jsou uvedeny v příloze D. Skupina DR po chronické ICHS je velmi malá a tak nelze těmto rozdílům přikládat velký význam, nicméně je zřejmé, že předchozí zavedení stentu signifikantně zvyšuje hladiny obou enzymů u pacientů, kteří přicházejí na dokončení revaskulizace.

## **DIABETES MELLTIUS**

Již v předchozí diplomové práci bylo poukázáno na to, že hladiny proMMP-2 a -9 jsou u pacientů s DM vyšší [109]. Proto jsme se na tuto skupinu v této diplomové práci zaměřili. Zajímalo nás, jaké hladiny enzymů proMMP-9 a proMMP2 mají diabetici bez kardiovaskulárního onemocnění. K dispozici jsme měli sérum i plazmu pacientů s DM. K hodnocení závislosti hladin MMP s DM jsme použili sérum. Dostupná literatura se shoduje, že hladiny MMP jsou u pacientů s DM zvýšeny, neshoduje se však na konkrétním enzymu [102, 105–107]. Porovnat hladiny enzymů pacientů s DM s fyziologickými hodnotami enzymů MMP-2 a -9 také není jednoznačné, protože fyziologická hodnota enzymů není jasně dána. V dostupné literatuře se hladina proMMP -9 zdravých jedinců pohybuje přibližně okolo 50 ng/ml [92, 102, 105]. Větší problém je pak u hladiny proMMP-2, kdy se dostupná literatura neshoduje. V studii z roku 2017 zmiňují že hodnota proMMP-2 pro zdravé jedince je 163,58 ng/ml [92]. V druhé studii z roku 2007 určili hodnotu proMMP-2 na  $628,1 \pm 267,4$  ng/ml [105]. V obou studiích měřili koncentraci MMP pomocí ELISA metody. Pokud máme porovnat naše výsledky od pacientů s DM s literárními hodnotami zdravých jedinců, musíme konstatovat, že hladiny MMP jsou ve skupině s DM mnohem vyšší než u zdravých jedinců. Hodnoty proMMP-9 jsou u diabetiků zvýšeny 7,5x s porovnáním se zdravými jedinci. V případě proMMP-2 jsou hladiny dvojnásobně zvýšeny i v porovnání se studií, která uvádí vyšší hladiny enzymu u zdravých jedinců [105]. V našem případě jsou u pacientů s DM zvýšeny koncentrace enzymů proMMP-9 i proMMP-2. Výsledky lze interpretovat i tak, že tato skupina pacientů by tedy do budoucna mohla mít kardiovaskulární potíže. Naše výsledky jsou i v souladu se studií z roku 2020, kdy byly prokázány zvýšené koncentrace i aktivity MMP-9 a MMP-2 u pacientů s DM. Vyšetřovaným materiálem byla však moč [107]. Nicméně se shodujeme i s dalšími publikacemi, kde vyšetřovaným materiálem byla plazma. I v těchto studiích pozorovali zvýšené hladiny obou enzymů u diabetických pacientů [105, 106].

## **POROVNÁNÍ SÉRUM/PLAZMA**

V diplomové práci jsme se rozhodli zabývat i otázkou, jaký je rozdíl v hladinách enzymů s ohledem na odebíraném materiálu od pacientů. Jedním z důvodů byla i literární nerovnost výsledků [78, 83, 84]. K dispozici jsme měli sérum i plazmu od pacientů s DM. Plazma byla odebírána do zkumavek s EDTA. Dostupná literatura uvádí, že je rozdíl v hladinách MMP s použitím různých antikoagulancií. Rozdíl v hodnotách koncentrace MMP

mezi sérem a plazmou literatura také zmiňuje. Odlišnosti v sérových hladinách jsou především díky použití urychlovačů koagulace [78, 83]. V našem případě urychlovače koagulace nebyly použity. Kuvaja a kol. ve své studii zmiňují, že nativní sérové koncentrace proMMP-9 se podobají koncentracím naměřeným v plazmě s EDTA [83]. Toto tvrzení potvrzuje i naše měření. Rozdíl v hladinách proMMP-9 a proMMP-2 nebyly statisticky významné.

## STABILITA

Vzorky jsou obvykle skladovány zmrazené po odlišně dlouhou dobu. To by mohlo představovat riziko změny v koncentracích MMP. Tedy vzorky, které jsou zamrazeny po různě dlouhou dobu, nemusí být srovnatelné [79]. S ohledem na dobu trvání studie a odebírání vzorků nám přišlo vhodné se zabývat tedy i dlouhodobou stabilitou vzorku. Pokud chceme porovnávat výsledky z diplomových prací z roku 2014 [109] a 2019 [108], musíme se soustředit i na stabilitu. Dále je důležité zohlednit, jaký vliv má dlouhodobé uskladnění na aktivitu enzymů. Porovnávali jsme hladinu proMMP-2, proMMP-9 a MMP-9 naměřených vzorků před 8 lety s hladinami naměřených nyní. Dle našich výsledků vychází, že změna v koncentracích proMMP-2 je minimální. V hladinách proMMP-9 je změna výraznější a zdá se, že jsou náchylnější na skladování. Nicméně na rozdíl od prvních měření, v našem měření jsou vyšší hladiny aktivních MMP-9. Zdá se tedy, že se část neaktivní MMP-9 zaktivovala i během skladování při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rouy a kol. ve své práci uvádějí, že zaznamenali rychlý pokles u proMMP-9 po dobu pouhých 3 měsíců. Koncentrace proMMP-2 zůstala stejná, a to nezávisle na době skladování. Tyto vzorky byly však skladovány v plazmě [79]. Novější studie z roku 2018 (Jonsson a kol.) uvádí, že hladiny proMMP-9 jsou stabilní i po dobu 9 let. Opět ale zde byla skladována plazma při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  [80]. Studie z roku 2008 skladovala vzorky séra po dobu 16 let při  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zde uvádějí, že došlo k poklesu o 28,5 % u hladin proMMP-9 [82]. Naše vzorky byly uchovávány po dobu 8 let při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . U našich vzorků klesla koncentrace u proMMP-9 o 15,5 %. Jak bylo zmíněno výše, hladina aktivní MMP-9 se ale zvýšila a to o 182,6 %. To může být zapříčiněno tím, že se část proenzymu aktivovala. Dalším vysvětlením může být, že ne vždy se aktivní formy na gelu zachytí. U proMMP-2 se shodujeme se studií [79], kdy koncentrace se vlivem skladování nemění. V našem případě klesla hladina proMMP-2 o 1,6 %. Zdá se, že proMMP-2 je více stabilní, než proMMP-9.

## ZÁVĚR

V této práci jsme se snažili dokončit a sjednotit dvě studie, které probíhaly v předchozích letech. V souladu s dostupnou literaturou a s výsledky předchozích diplomových prací je dle celkových výsledků zřejmé, že hladiny proMMP-9 se signifikantně zvyšují již první den po zavedení stentu. Hodnoty proMMP-9 jsou statisticky významné, jestliže porovnááme hladinu enzymu v odběru před zákrokem s hladinou odběru 24 hodin a 48 hodin po zákroku. Hladiny proMMP-2 nebyly statisticky významné, zdá se však, že jejich hladina stoupá pomaleji. Dle dostupné literatury je vrchol exprese proMMP-2 sedmý den po zavedení stentu.

V souladu s dostupnou literaturou a s předchozími pracemi je z našich výsledků patrné, že hladiny enzymů proMMP-9 a proMMP-2 jsou u pacientů s diabetem mellitus bez kardiovaskulárního onemocnění zvýšené. To může pro tento typ pacientů představovat do budoucna zvýšené riziko vzniku kardiovaskulárního onemocnění. Zkoumaný soubor pacientů byl však malý.

S ohledem na dlouhodobé uskladnění vzorků je důležitá jejich stabilita. Z našich výsledků vyplývá, že pro dlouhodobé uskladnění je stabilnější proMMP-2. Hladiny proMMP-9 klesly za 8 let o 15,5 %. Zdá se však, že určitá část enzymu se i při -80 °C aktivuje. Hladiny proMMP-2 klesly pouze o 1,6 %.

Dostupná literatura se neshodovala, zda je rozdíl v hladinách enzymů proMMP-9 a proMMP-2 v případě odlišného biologického materiálu. Dle našeho zjištění není statisticky významný rozdíl v hladinách koncentrací pro sérum a plazmu s EDTA.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] SEVERINO, Paolo, Andrea D'AMATO, Mariateresa PUCCI, Fabio INFUSINO, Lucia Ilaria BIRTOLO, et al. Ischemic Heart Disease and Heart Failure: Role of Coronary Ion Channels. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(9), 3167 [vid. 2021-09-23]. Dostupné z: doi:10.3390/IJMS21093167
- [2] HRDINA, Radomír, Přemysl MLADĚNKA, Zuzana BOBROVOVÁ a Mojmír HÜBL. Farmakoterapie ischemické choroby srdeční. *Medicína pro praxi*. 2008, **5**(11), 426–431.
- [3] *Ischemická choroba srdeční - ICHS | IKEM* [online]. © Institut klinické a experimentální medicíny 2015-2022 [vid. 2021-09-23]. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/cs/ischemicka-choroba-srdecni-ichs/a-420/>
- [4] KHAN, Moien AB, Muhammad Jawad HASHIM, Halla MUSTAFA, May Yousif BANIYAS, Shaikha Khalid Buti Mohamad Al SUWAIDI, et. al. Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus* [online]. 2020, **12**(7) [vid. 2021-09-24]. Dostupné z: doi:10.7759/CUREUS.9349
- [5] BROWN, Jonathan C., Thomas E. GERHARDT a Edward KWON. Risk Factors For Coronary Artery Disease. In: *Risk Factors in Coronary Artery Disease* [online]. StatPearls Publishing, 2020 [vid. 2021-09-30], s. 1–219. Dostupné z: <http://europepmc.org/books/NBK554410>
- [6] PENCINA, Michael J., Ann Marie NAVAR, Daniel WOJDYLA, Robert J. SANCHEZ, Irfan KHAN, et. al. Quantifying Importance of Major Risk Factors for Coronary Heart Disease. *Circulation* [online]. 2019, **139**(13), 1603–1611 [vid. 2021-09-30]. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031855
- [7] SANCHIS-GOMAR, Fabian, Carme PEREZ-QUILIS, Roman LEISCHIK a Alejandro LUCIA. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Annals of Translational Medicine* [online]. 2016, **4**(13), 256–256 [vid. 2021-09-30]. ISSN 2305-5839. Dostupné z: doi:10.21037/ATM.2016.06.33
- [8] BACHMANN, Justin M, Benjamin L WILLIS, Colby R AYERS, Amit KHERA a Jarrt D BERRY. Association between family history and coronary heart disease death across long-term follow-up in men: the Cooper Center Longitudinal Study. *Circulation* [online]. 2012, **125**(25), 3092–3098 [vid. 2021-09-30]. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.065490
- [9] MALAKAR, Arup Kr., Debashree CHOUDHURY, Binata HALDER, Prosenjit PAUL, Arif UDDIN a Supriyo CHAKRABORTY. A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2019, **234**(10), 16812–16823 [vid. 2021-10-04]. ISSN 0021-9541. Dostupné z: doi:10.1002/JCP.28350
- [10] ŠPINAR, Jindřich. Hypertension and ischemic heart disease. *Cor et Vasa* [online]. 2012, **54**(6), 433–438 [vid. 2021-10-04]. ISSN 0010-8650. Dostupné z: doi:10.1016/J.CRVASA.2012.11.002
- [11] SEVERINO, Paolo, Andrea D'AMATO, Lucrezia NETTI, Mariateresa PUCCI, Marialaura De MARCHIS, et. al. Diabetes Mellitus and Ischemic Heart Disease: The Role of Ion Channels. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(3), 802 [vid. 2021-10-04]. Dostupné z: doi:10.3390/IJMS19030802

- [12] LIPPI, Giuseppe a Fabian SANCHIS-GOMAR. An Estimation of the Worldwide Epidemiologic Burden of Physical Inactivity-Related Ischemic Heart Disease. *Cardiovascular Drugs and Therapy* [online]. 2020, **34**(1), 133–137 [vid. 2021-10-04]. ISSN 1573-7241. Dostupné z: doi:10.1007/S10557-019-06926-5
- [13] HRADEC, Jaromír a Svatopluk BÝMA. *Ischemická choroba srdeční: doporučený diagnostický a terapeutický postup pro všeobecné praktické lékaře*. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, 2007. ISBN 80-86998-14-2.
- [14] CHALOUPKA, Václav. Angina Pectoris - diagnostika a léčba. *Cor et Vasa* [online]. 2007, **49**(9), 334–340 [vid. 2021-10-04]. Dostupné z: doi:10.33678/cor.2007.116
- [15] YEGHIAZARIANS, Yerem, Joel B. BRAUNSTEIN, Arman ASKARI a Peter H. STONE. Unstable Angina Pectoris. *The New England Journal of Medicine* [online]. 2009, **342**(2), 101–114 [vid. 2021-10-05]. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM200001133420207
- [16] REED, Grant W., Jeffrey E. ROSSI a Christopher P. CANNON. Acute myocardial infarction. *The Lancet* [online]. 2017, **389**(10065), 197–210 [vid. 2021-10-05]. ISSN 0140-6736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(16)30677-8
- [17] WHITE, Harvey D. a Derek P. CHEW. Acute myocardial infarction. *The Lancet* [online]. 2008, **372**(9638), 570–584 [vid. 2021-10-05]. ISSN 0140-6736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(08)61237-4
- [18] KURIACHAN, Vikas P., Glen L. SUMNER a L. Brent MITCHELL. Sudden Cardiac Death. *Current Problems in Cardiology* [online]. 2015, **40**(4), 133–200 [vid. 2021-10-05]. ISSN 0146-2806. Dostupné z: doi:10.1016/J.CPCARDIOL.2015.01.002
- [19] VIRMANI, Renu, Allen P. BURKE a Andrew FARB. Sudden cardiac death. *Cardiovascular Pathology* [online]. 2001, **10**(5), 211–218 [vid. 2021-10-05]. ISSN 1054-8807. Dostupné z: doi:10.1016/S1054-8807(01)00091-6
- [20] HRADEC, Jaromír a Svatopluk BÝMA. *Ischemická choroba srdeční: doporučený diagnostický a terapeutický postup pro všeobecné praktické lékaře. Novelizace 2018*. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, 2018. ISBN 978-80-86998-94-7.
- [21] FOX, Kim, Maria Angeles Alonso GARCIA, Diego ARDISSINO, Pawel BUSZMAN, Paolo G. CAMICI, et. al. Guidelines on the management of stable angina pectoris: executive summary The Task Force on the Management of Stable Angina Pectoris of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* [online]. 2006, **27**(11), 1341–1381 [vid. 2021-10-07]. ISSN 0195-668X. Dostupné z: doi:10.1093/EURHEARTJ/EHL001
- [22] ROUSAN, Talla A., Sunil T. MATHEW a Udho THADANI. Drug Therapy for Stable Angina Pectoris. *Drugs* [online]. 2017, **77**(3), 265–284 [vid. 2021-10-07]. ISSN 1179-1950. Dostupné z: doi:10.1007/S40265-017-0691-7
- [23] HRADEC, Jaromír, Jan BULTAS a Michael ŽELÍZKO. Stabilní angina pectoris Doporučený diagnostický a léčebný postup České kardiologické společnosti. *Cor et Vasa* [online]. 2010, **52**(9), 543–561 [vid. 2021-10-07]. Dostupné z: doi:10.33678/cor.2010.144

- [24] FRANCIS, Gary S. Pathophysiology of chronic heart failure. *The American Journal of Medicine* [online]. 2001, **110**(7), 37–46 [vid. 2021-10-07]. ISSN 0002-9343. Dostupné z: doi:10.1016/S0002-9343(98)00385-4
- [25] RAMANI, Gautam V., Patricia A. UBER a Mandeep R. MEHRA. Chronic Heart Failure: Contemporary Diagnosis and Management. *Mayo Clinic Proceedings* [online]. 2010, **85**(2), 180–195. ISSN 0025-6196. Dostupné z: doi:10.4065/MCP.2009.0494
- [26] *Koronární intervence (PCI) | I. interní kardiologická klinika* [online]. ©2022 FN HK [vid. 2021-10-13]. Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/int-1/oddeleni-intervencni-kardiologie/provadene-vykony/koronarni-intervence-pci>
- [27] TORPY, Janet M., Cassio LYNM a Richard M. GLASS. Percutaneous Coronary Intervention. *JAMA* [online]. 2004, **291**(6), 778–778 [vid. 2021-10-13]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/JAMA.291.6.778
- [28] Coronary angioplasty and stents - Mayo Clinic [online]. © 1998-2022 Mayo Foundation for Medical Education and Research [vid. 2021-10-13]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/coronary-angioplasty/about/pac-20384761>
- [29] GRECH, Ever D. ABC of interventional cardiology: Percutaneous coronary intervention. History and development. *British Medical Journal* [online]. 2003, **326**(7398), 1080 [vid. 2021-10-13]. Dostupné z: doi:10.1136/BMJ.326.7398.1080
- [30] *PCI – Perkutánní koronární intervence | Kardiologie na Bulovce s.r.o.* [online]. © 2022 Kardiologie na Bulovce s.r.o. [vid. 2021-10-13]. Dostupné z: <http://www.kardiologie-sro.cz/vysetreni/pci-perkutanni-koronarni-intervence/>
- [31] KALA, Petr, Petr NĚMEC, Michael ŽELÍZKO, Jan PIRK a Petr WIDIMSKÝ. Revaskularizace myokardu. Perkutánní koronární intervence a aortokoronární bypass. *Cor et Vasa* [online]. 2011, **53**(88), 3–24 [vid. 2021-10-18]. ISSN 00108650. Dostupné z: doi:10.33678/COR.2011.192
- [32] NOVÁK, Martin. Krvácivé komplikace perkutánní koronární intervence. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2011, **10**(5–6), 226–230.
- [33] ODELL, Annika, Lars GRIP a Lillemor R-M HALLBERG. Restenosis after Percutaneous Coronary Intervention (PCI): Experiences from the Patients' Perspective. *European Journal of Cardiovascular Nursing* [online]. 2006, **5**(2), 150–157 [vid. 2021-10-18]. ISSN 1474-5151. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJCNURSE.2005.10.004
- [34] HOLM, František. Trombóza koronárního stentu: problém stále trvá. *Intervenční a akutní kardiologie* [online]. 2020, **19**(2), 117–121 [vid. 2021-10-19]. Dostupné z: doi:10.36290/kar.2020.028
- [35] MCMAHON, Sean, Nicky BERTOLLO, Eoin D.O' CEARBHAILL, Jochen SALBER, Luca PIERUCCI, et. al. Bio-resorbable polymer stents: a review of material progress and prospects. *Progress in Polymer Science* [online]. 2018, **83**, 79–96 [vid. 2021-10-19]. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2018.05.002
- [36] OMAR, Wally A. a Dharam J. KUMBHANI. The Current Literature on Bioabsorbable Stents: a Review. *Current Atherosclerosis Reports* [online]. 2019, **21**(12), 1–9 [vid. 2021-10-19]. ISSN 1534-6242. Dostupné z: doi:10.1007/S11883-019-0816-4



- [37] IQBAL, Javaid, Julian GUNN a Patrick W. SERRUYS. Coronary stents: historical development, current status and future directions. *British Medical Bulletin* [online]. 2013, **106**(1), 193–211 [vid. 2021-10-19]. ISSN 0007-1420. Dostupné z: doi:10.1093/BMB/LDT009
- [38] BORHANI, Setareh, Shadi HASSANAJILI, Seyed Hossein AHMADI TAFTI a Shahram RABBANI. Cardiovascular stents: overview, evolution, and next generation. *Progress in Biomaterials* [online]. 2018, **7**(3), 175–205 [vid. 2021-10-25]. ISSN 2194-0517. Dostupné z: doi:10.1007/S40204-018-0097-Y
- [39] BRTKO, Miroslav. Titanový stent - nová éra v intervenční kardiologii? *Intervenční a akutní kardiologie*. 2011, **10**(1), 14–16.
- [40] VOJÁČEK, Jan. *Koronární stenty*. Praha: Grada Publishing, 1997. ISBN 80-7169-457-6.
- [41] ŠIMEK, Stanislav, Michael ASCHERMANN, Jan HORÁK, Tomáš KOVÁRNÍK, Vít ŘEZNÍČEK, et al. Koronární stenty uvolňující farmaka (DES – Drug Eluting Stents) – revoluce v léčbě ischemické choroby srdeční. *Remedia*. 2004, **14**(2), 153–157
- [42] SCHMIDT, Torrey a J. Dawn ABBOTT. Coronary Stents: History, Design, and Construction. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 2018, **7**(6), 126 [vid. 2021-10-25]. Dostupné z: doi:10.3390/JCM7060126
- [43] ASCHERMANN, O., M. MATES a K. KOPŘIVA. Novinky v koronárních intervencích. *Kardiologická revue - Interní medicína*. 2015, **17**(3), 207–213.
- [44] BESHCHASNA, Natalia, Muhammad SAQIB, Honorata KRASKIEWICZ, Łukasz WASYLUK, Oleg KUZMIN, et al. Recent Advances in Manufacturing Innovative Stents. *Pharmaceutics* [online]. 2020, **12**(4), 349 [vid. 2021-10-25]. Dostupné z: doi:10.3390/PHARMACEUTICS12040349
- [45] SIMARD, Trevor, Benjamin HIBBERT, F. Daniel RAMIREZ, Michael FROESCHL, Yong Xiang CHEN a Edward R. O'BRIEN. The Evolution of Coronary Stents: A Brief Review. *Canadian Journal of Cardiology* [online]. 2014, **30**(1), 35–45 [vid. 2021-10-25]. ISSN 0828-282X. Dostupné z: doi:10.1016/J.CJCA.2013.09.012
- [46] MOON, Jae Youn, Francesco FRANCHI, Fabiana ROLLINI a Dominick J. ANGIOLILLO. Evolution of Coronary Stent Technology and Implications for Duration of Dual Antiplatelet Therapy. *Progress in Cardiovascular Diseases* [online]. 2018, **60**(4–5), 478–490. ISSN 0033-0620. Dostupné z: doi:10.1016/J.PCAD.2017.12.004
- [47] HU, Tingzhang, Chun YANG, Song LIN, Qingsong YU a Guixue WANG. Biodegradable stents for coronary artery disease treatment: Recent advances and future perspectives. *Materials Science and Engineering* [online]. 2018, **91**, 163–178 [vid. 2021-10-25]. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/J.MSEC.2018.04.100
- [48] PLEVA, Leos, Pavel KUKLA a Ota HLINOMAZ. Treatment of coronary in-stent restenosis: a systematic review. *Journal of Geriatric Cardiology* [online]. 2018, **15**(2), 173 [vid. 2021-11-01]. Dostupné z: doi:10.11909/J.ISSN.1671-5411.2018.02.007
- [49] HER, Ae-Young a Eun-Seok SHIN. Current Management of In-Stent Restenosis. *Korean Circulation Journal* [online]. 2018, **48**(5), 337–349 [vid. 2021-11-01]. Dostupné z: doi:10.4070/KCJ.2018.0103

- [50] KIM, Michael S. a Larry S. DEAN. In-Stent Restenosis. *Cardiovascular Therapeutics* [online]. 2011, **29**(3), 190–198 [vid. 2021-11-01]. ISSN 1755-5922. Dostupné z: doi:10.1111/J.1755-5922.2010.00155.X
- [51] REEJHSINGHANI, Risheen a Amir S LOTFI. Prevention of stent thrombosis: challenges and solutions. *Vascular Health and Risk Management* [online]. 2015, **11**, 93 [vid. 2021-11-01]. Dostupné z: doi:10.2147/VHRM.S43357
- [52] CLAESSEN, Bimmer E., José P.S. HENRIQUES, Farouc A. JAFFER, Roxana MEHRAN, Jan J. PIEK a George D. DANGAS. Stent thrombosis: A clinical perspective. *JACC: Cardiovascular Interventions* [online]. 2014, **7**(10), 1081–1092 [vid. 2021-11-01]. Dostupné z: doi:10.1016/J.JCIN.2014.05.016
- [53] HOLMES, David R., Dean J. KEREIAKES, Scot GARG, Patrick W. SERRUYS, Gregory J. DEHMER, et al. Stent Thrombosis. *Journal of the American College of Cardiology* [online]. 2010, **56**(17), 1357–1365 [vid. 2021-11-01]. Dostupné z: doi:10.1016/J.JACC.2010.07.016
- [54] IYER, Rugmani Padmanabhan, Nicolle L. PATTERSON, Gregg B. FIELDS a Merry L. LINDSEY. The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* [online]. 2012, **303**(8), 919–930 [vid. 2021-11-08]. ISSN 03636135. Dostupné z: doi:10.1152/AJPHEART.00577.2012
- [55] LARONHA, Helena a Jorge CALDEIRA. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells* [online]. 2020, **9**(5), 1076 [vid. 2021-11-16]. ISSN 20734409. Dostupné z: doi:10.3390/CELLS9051076
- [56] HIJOVA E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl Lek Listy*. 2005, **106**(3), 127–132.
- [57] VARTAK, Deepali a Richard GEMEINHART. Matrix metalloproteases: Underutilized targets for drug delivery. *Journal of drug targeting* [online]. 2007, **15**(1), 1–20 [vid. 2021-11-08]. ISSN 1061186X. Dostupné z: doi:10.1080/10611860600968967
- [58] HRABEC, Elzbieta, Julia NADUK, Małgorzata STREK a Zbigniew HRABEC. Type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) and their substrates--intracellular proteins, hormones, cytokines, chemokines and their receptors. *Postepy Biochemii* [online]. 2007, **53**(1), 37–45 [vid. 2021-11-15]. ISSN 0032-5422. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/med/17718386>
- [59] SPINALE, Francis G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: Influence on cardiac form and function. *Physiological Reviews* [online]. 2007, **87**(4), 1285–1342 [vid. 2021-11-08]. ISSN 00319333. Dostupné z: doi:10.1152/PHYSREV.00012.2007/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0040724480037.JPEG
- [60] HADLER-OLSEN, Elin, Bodil FADNES, Ingebrigt SYLTE, Lars UHLIN-HANSEN a Jan Olof WINBERG. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *The FEBS Journal* [online]. 2011, **278**(1), 28–45 [vid. 2021-11-08]. ISSN 1742-4658. Dostupné z: doi:10.1111/J.1742-4658.2010.07920.X

- [61] RAMOS-FERNANDEZ, Maria, M. Fernanda BELLOLIO a Latha G. STEAD. Matrix Metalloproteinase-9 as a Marker for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* [online]. 2011, **20**(1), 47–54 [vid. 2021-11-08]. ISSN 1052-3057. Dostupné z: doi:10.1016/J.JSTROKECEREBROVASDIS.2009.10.008
- [62] YADAV, Lalita, Naveen PURI, Varun RASTOGI, Pranali SATPUTE, Riyaz AHMAD a Geetpriya KAUR. Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* [online]. 2014, **15**(3), 1085–1091 [vid. 2021-11-15]. ISSN 2476-762X. Dostupné z: doi:10.7314/APJCP.2014.15.3.1085
- [63] JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, Agata, Marzena MATEJCZYK a Stanisław ROSOCHACKI. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2016, **31**(1), 177–183 [vid. 2021-11-15]. ISSN 14756374. Dostupné z: doi:10.3109/14756366.2016.1161620
- [64] AIMES, Ronald T. a James P. QUIGLEY. Matrix Metalloproteinase-2 Is an Interstitial Collagenase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1995, **270**(11), 5872–5876 [vid. 2021-11-15]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.11.5872
- [65] PATTERSON, Margaret L., Susan J. ATKINSON, Vera KNÄUPER a Gillian MURPHY. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Letters* [online]. 2001, **503**(2–3), 158–162 [vid. 2021-11-15]. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-5793(01)02723-5
- [66] VAN DEN STEEN, Philippe E., Bénédicte DUBOIS, Inge NELISSEN, Pauline M. RUDD, Raymond A. DWEK a Ghislain OPDENAKKER. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2002, **37**(6), 375–536 [vid. 2021-11-15]. ISSN 10409238. Dostupné z: doi:10.1080/10409230290771546
- [67] CUI, Ning, Min HU a Raouf A. KHALIL. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [online]. 2017, **147**, 1–73 [vid. 2021-11-15]. ISSN 1877-1173. Dostupné z: doi:10.1016/BS.PMBTS.2017.02.005
- [68] BUSTI, Chiara, Emanuela FALCINELLI, Stefania MOMI a Paolo GRESELE. Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease. *Internal and Emergency Medicine* [online]. 2010, **5**(1), 13–25 [vid. 2021-11-15]. ISSN 19709366. Dostupné z: doi:10.1007/S11739-009-0283-Y/TABLES/2
- [69] GALASSO, Olimpio, Filippo FAMILIARI, Marco DE GORI a Giorgio GASPARINI. Recent Findings on the Role of Gelatinases (Matrix Metalloproteinase-2 and -9) in Osteoarthritis. *Advances in Orthopedics* [online]. 2012, **2012**, 1–7 [vid. 2021-11-16]. ISSN 2090-3464. Dostupné z: doi:10.1155/2012/834208
- [70] DELEON-PENNELL, Kristine Y., Cesar A. MESCHIARI, Mira JUNG a Merry L. LINDSEY. Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure. *Progress in molecular biology and translational science* [online]. 2017, **147**, 75 [vid. 2021-11-16]. ISSN 18780814. Dostupné z: doi:10.1016/BS.PMBTS.2017.02.001

- [71] KETELHUTH, Daniel F.J. a Magnus BÄCK. The role of matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Current Atherosclerosis Reports* [online]. 2011, **13**(2), 162–169 [vid. 2021-11-16]. ISSN 15233804. Dostupné z: doi:10.1007/S11883-010-0159-7/TABLES/2
- [72] SASAKI, Takeshi, Kae NAKAMURA, Kumiko SASADA, Satoshi OKADA, Xian Wu CHENG, et al. Matrix metalloproteinase-2 deficiency impairs aortic atherosclerotic calcification in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* [online]. 2013, **227**(1), 43–50 [vid. 2021-11-16]. ISSN 0021-9150. Dostupné z: doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2012.12.008
- [73] SEBASTIANO, Manuela, Stefania MOMI, Emanuela FALCINELLI, Loredana BURY, Marc F. HOYLAERTS a Paolo GRESELE. A novel mechanism regulating human platelet activation by MMP-2–mediated PAR1 biased signaling. *Blood* [online]. 2017, **129**(7), 883–895 [vid. 2021-11-18]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/BLOOD-2016-06-724245
- [74] MONDAL, Subha, Nilanjan ADHIKARI, Suvankar BANERJEE, Sk Abdul AMIN a Tarun JHA. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2020, **194**, [vid. 2021-11-18]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJMECH.2020.112260
- [75] LI, Tiewei, Xiaojuan LI, Yichuan FENG, Geng DONG, Yuewu WANG a Junmei YANG. The Role of Matrix Metalloproteinase-9 in Atherosclerotic Plaque Instability. *Mediators of Inflammation* [online]. 2020, **2020** [vid. 2021-11-18]. ISSN 14661861. Dostupné z: doi:10.1155/2020/3872367
- [76] OLEJARZ, Wioletta, Dominika ŁACHETA a Grażyna KUBIAK-TOMASZEWSKA. Matrix Metalloproteinases as Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(11), 3946 [vid. 2021-11-18]. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/IJMS21113946
- [77] JOHNSON, Jason L. Metalloproteinases in atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2017, **816**, 93–106 [vid. 2021-11-18]. ISSN 0014-2999. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJPHAR.2017.09.007
- [78] SOUZA-TARLA, Caroline D., Juliana A. UZUELLI, Alcyone A. MACHADO, Raquel F. GERLACH a Jose E. TANUS-SANTOS. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clinical Biochemistry* [online]. 2005, **38**(5), 410–414 [vid. 2021-11-18]. ISSN 0009-9120. Dostupné z: doi:10.1016/J.CLINBIOCHEM.2005.02.010
- [79] ROUY, Didier, Isabelle ERNENS, Céline JEANTY a Daniel R. WAGNER. Plasma storage at –80 °C does not protect matrix metalloproteinase-9 from degradation. *Analytical Biochemistry* [online]. 2005, **338**(2), 294–298 [vid. 2022-03-01]. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/J.AB.2004.10.052
- [80] JONSSON, Andreas, Claes HJALMARSSON, Peter FALK a Marie Lois IVARSSON. Stability of matrix metalloproteinase-9 as biological marker in colorectal cancer. *Medical Oncology* [online]. 2018, **35**(4), 1–6 [vid. 2022-03-01]. ISSN 1559131X. Dostupné z: doi:10.1007/S12032-018-1109-4/TABLES/1

- [81] TARR, G. P., M. J.A. WILLIAMS, L. V. PHILLIPS, A. M. VAN RIJ a G. T. JONES. Seasonal variation and stability of matrix metalloproteinase-9 activity and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 with storage at – 80 °C. *Clinical Biochemistry* [online]. 2011, **44**(16), 1346–1348 [vid. 2022-03-01]. ISSN 0009-9120. Dostupné z: doi:10.1016/J.CLINBIOCHEM.2011.08.1139
- [82] WELSH, P., P. H. WHINCUP, O. PAPACOSTA, S. G. WANNAMETHEE, L. LENNON, et al. Serum matrix metalloproteinase-9 and coronary heart disease: a prospective study in middle-aged men. *QJM: An International Journal of Medicine* [online]. 2008, **101**(10), 785–791 [vid. 2022-03-01]. ISSN 1460-2725. Dostupné z: doi:10.1093/QJMED/HCN088
- [83] KUVAJA, Paula, Anne TALVENSAARI-MATTILA a Taine TURPEENNIEMI-HUJANEN. The Sample Type used Affects the Levels of Gelatinases (MMP-2 and -9) and their Inhibitors (TIMP-1 and -2) in Circulating Blood of Healthy Controls and Breast Cancer Patients: *Biomarker Insights* [online]. 2007, **2** [vid. 2022-02-28]. Dostupné z: doi:10.1177/117727190700200038
- [84] JONES, Gregory T. Matrix Metalloproteinases in Biologic Samples. *Advances in Clinical Chemistry* [online]. 2014, **65**, 199–219 [vid. 2022-02-28]. ISSN 0065-2423. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800141-7.00007-3
- [85] GERLACH, Raquel F., Juliana A. UZUELLI, Caroline D. SOUZA-TARLA a Jose E. TANUS-SANTOS. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Analytical Biochemistry* [online]. 2005, **344**(1), 147–149 [vid. 2022-02-28]. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/J.AB.2005.04.038
- [86] OPINCARIU, Diana, Nora RAT a Imre BENEDEK. The Role of Matrix Metalloproteinases in the Progression and Vulnerabilization of Coronary Atherosclerotic Plaques. *Journal of Cardiovascular Emergencies* [online]. 2021, **7**(1), 9–16 [vid. 2022-12-04]. Dostupné z: doi:10.2478/jce-2021-0001
- [87] EZHOV, Marat, Maya SAFAROVA, Olga AFANASIEVA, Maksim MITROSHKIN, Yuri MATCHIN a Sergei POKROVSKY. Matrix Metalloproteinase 9 as a Predictor of Coronary Atherosclerotic Plaque Instability in Stable Coronary Heart Disease Patients with Elevated Lipoprotein(a) Levels. *Biomolecules* [online]. 2019, **9**(4), 129 [vid. 2021-12-09]. ISSN 2218273X. Dostupné z: doi:10.3390/BIOM9040129
- [88] FOROUGHINIA, Farzaneh a Mahtabalsadat MIRJALILI. Association between Serum Vitamin D Concentration Status and Matrix Metalloproteinase-9 in Patients Undergoing Elective Percutaneous Coronary Intervention. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR* [online]. 2020, **19**(4), 135 [vid. 2021-12-04]. ISSN 17266890. Dostupné z: doi:10.22037/IJPR.2020.112292.13670
- [89] GE, Junbo, Chengxing SHEN, Chun LIANG, Lianglong CHEN, Juying QIAN a Haozhu CHEN. Elevated matrix metalloproteinase expression after stent implantation is associated with restenosis. *International Journal of Cardiology* [online]. 2006, **112**(1), 85–90 [vid. 2021-12-04]. ISSN 0167-5273. Dostupné z: doi:10.1016/J.IJCARD.2005.10.016

- [90] ZHU, Jia Jun, Qian ZHAO, Hui Juan QU, Xiao Mei LI, Qing Jie CHEN, et al. Usefulness of plasma matrix metalloproteinase-9 levels in prediction of in-hospital mortality in patients who received emergent percutaneous coronary artery intervention following myocardial infarction. *Oncotarget* [online]. 2017, **8**(62), 105809 [vid. 2021-12-11]. ISSN 19492553. Dostupné z: doi:10.18632/ONCOTARGET.22401
- [91] ZHANG, Ning a Duhui WEI. Efficacy and safety of coronary stent intervention for coronary heart disease and its impact on short-term and long-term prognosis. *American Journal of Translational Research* [online]. 2021, **13**(9), 10729 [vid. 2021-12-11]. ISSN 1943-8141. Dostupné z: /pmc/articles/PMC8507088/
- [92] KUSNIEROVA, Pavlina a Leos PLEVA. Matrix Metalloproteinases MMP-3 and MMP-9 as Predictors of In-Stent Restenosis. In: Francesco TRAVASCIO, ed. *The Role of Matrix Metalloproteinase in Human Body Pathologies* [online]. InTech, 2017 [vid. 2021-12-09]. ISBN 978-953-51-3718-4. Dostupné z: doi:10.5772/INTECHOPEN.69589
- [93] SONG, Jian Bo, Jing SHEN, Jun FAN, Zhe ZHANG, Zheng Jia YI, et al. Effects of a Matrix Metalloproteinase Inhibitor-Eluting Stent on In-Stent Restenosis. *International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* [online]. 2020, **26** [vid. 2021-12-04]. ISSN 16433750. Dostupné z: doi:10.12659/MSM.922556
- [94] SOMUNCU, Mustafa Umut, Hamdi PUSUROGLU, Huseyin KARAKURT, İsmail BOLAT, Seda Tukenmez KARAKURT, et al. The prognostic value of elevated matrix metalloproteinase-9 in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction: A two-year prospective study. *Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition)* [online]. 2020, **39**(5), 267–276 [vid. 2021-12-09]. ISSN 2174-2049. Dostupné z: doi:10.1016/J.REPCE.2020.10.008
- [95] SHEN, Jing, Jian bo SONG, Jun FAN, Zhe ZHANG, Zheng jia YI, et. al. Distribution and Dynamic Changes in Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and Collagen in an In Stent Restenosis Process. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* [online]. 2021, **61**(4), 648–655 [vid. 2021-12-09]. ISSN 1078-5884. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJVS.2020.11.035
- [96] ROCHA, Laura Andrade, Carlos Eli PICCINATO, Mauricio Serra RIBIERO, Christiane BECARI, Renata Dellalibera JOVILIANO et al. The role of the kallikrein-kinin system, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases in the early restenosis of covered stents in the femoropopliteal arterial segment. *Journal of Vascular Surgery* [online]. 2017, **65**(1), 119–127 [vid. 2021-12-09]. ISSN 0741-5214. Dostupné z: doi:10.1016/J.JVS.2016.06.106
- [97] GOYAL, Rajeev a Ishwarlal JIALAL. *Diabetes Mellitus Type 2* [online]. StatPearls Publishing, 2021 [vid. 2022-02-08]. Dostupné z: <http://europepmc.org/books/NBK513253>
- [98] PADHI, Santwana, Amit Kumar NAYAK a Anindita BEHERA. Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2020, **131**, 110708 [vid. 2022-02-08]. ISSN 0753-3322. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOPHA.2020.110708

- [99] GLOVACI, Diana, Wenjun FAN a Nathan D. WONG. Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Current Cardiology Reports* [online]. 2019, **21**(4), 1–8 [vid. 2022-02-08]. ISSN 15343170. Dostupné z: doi:10.1007/S11886-019-1107-Y/FIGURES/3
- [100] GALICIA-GARCIA, Unai, Asier BENITO-VICENTE, Shifa JEBARI, Asier LARREA-SEBAL, Haziq SIDDIQI, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(17) [vid. 2022-02-08]. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/IJMS21176275
- [101] JOHNS, Emma C., Fiona C. DENISON, Jane E. NORMAN a Rebecca M. REYNOLDS. Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends in Endocrinology & Metabolism* [online]. 2018, **29**(11), 743–754 [vid. 2022-02-08]. ISSN 1043-2760. Dostupné z: doi:10.1016/J.TEM.2018.09.004
- [102] KULICZKOWSKI, Wiktor, Marta BANASZKIEWICZ, Andrzej MYŚIAK, Grzegorz MAKAS a Iwona BIL-LULA. Does Arterial Hypertension Affect Plasma Levels of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Patients with Stable Coronary Artery Disease? A Preliminary Study. *Cardiology Research and Practice* [online]. 2019, **2019** [vid. 2022-02-08]. ISSN 20900597. Dostupné z: doi:10.1155/2019/6921315
- [103] CABRAL-PACHECO, Griselda A., Idalia GARZA-VELOZ, Claudia Castruita De La ROSA, Jesus M. RAMIREZ-ACUÑA, Braulio A. PEREZ-ROMERO et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(24) [vid. 2022-02-10]. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/IJMS21249739
- [104] LEE, Hye Won, Sun Ju LEE, Min Young LEE, Mi Wha PARK, Sang Sik KIM, et al. Enhanced cardiac expression of two isoforms of matrix metalloproteinase-2 in experimental diabetes mellitus. *PLOS ONE* [online]. 2019, **14**(8) [vid. 2022-02-10]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0221798
- [105] DEROSA, G., A. D'ANGELO, C. TINELLI, E. DEVANGELIO, A. CONSOLI, et al. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes and Metabolism* [online]. 2007, **33**(2), 129–134 [vid. 2022-02-10]. ISSN 12623636. Dostupné z: doi:10.1016/J.DIABET.2006.11.008
- [106] SIGNORELLI, Salvatore Santo, Grazia MALAPONTE, Massimo LIBRA, Luigi DI PINO, Gabriella CELOTTA, et al. Plasma levels and zymographic activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in type II diabetics with peripheral arterial disease. *Vascular Medicine* [online]. 2005, **10**(1), 1–6 [vid. 2022-02-10]. ISSN 1358863X. Dostupné z: doi:10.1191/1358863X05VM582OA
- [107] GARCIA-FERNANDEZ, Nuria, Conxita JACOBS-CACHÁ, José María MORA-GUTIÉRREZ, Ander VERGARA, Josune ORBE a María José SOLER. Matrix metalloproteinases in diabetic kidney disease. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 2020, **9**(2) [vid. 2022-02-10]. ISSN 20770383. Dostupné z: doi:10.3390/JCM9020472
- [108] RYŠAVÁ, Lenka. *Hladiny metaloproteináz -2 a -9 u pacientů po perkutánní koronární intervenci*. Pardubice, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [109] REGULOVÁ, Jitka. *Dynamika vybraných metaloproteináz po zavedení stentu do koronárního řečiště*. Pardubice, 2014. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.

## PŘÍLOHY

<b>Příloha A/ I. část</b> – Souhlas etické komise.....	81
<b>Příloha A/ II. část</b> – Souhlas etické komise .....	82
<b>Příloha A/ III. část</b> – Souhlas etické komise.....	83
<b>Příloha B/ I. část</b> – Informovaný souhlas pro pacienty .....	84
<b>Příloha B/ II. část</b> – Informovaný souhlas pro pacienty .....	85
<b>Příloha C/ I. část</b> – Základní rozdělení pacientů a jejich hodnoty proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2 .....	86
<b>Příloha C/ II. část</b> – Základní rozdělení pacientů a jejich hodnoty proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2 .....	87
<b>Příloha C/ III. část</b> – Základní rozdělení pacientů a jejich hodnoty proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2 .....	88
<b>Příloha C/ IV. část</b> – Základní rozdělení pacientů a jejich hodnoty proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2 .....	89
<b>Příloha C/ V. část</b> – Základní rozdělení pacientů a jejich hodnoty proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2 .....	90
<b>Příloha D</b> – T-testy významnosti či nevýznamnosti pro vyhodnocení výsledků.....	91
<b>Příloha E</b> – Zymogramy kalibrace standardu v porovnání se vzorkem.....	92
<b>Příloha F/ I. část</b> – Příklady zymogramů .....	93
<b>Příloha F/ II. část</b> – Příklady zymogramů.....	94



## Příloha A/ I. část – Souhlas etické komise

Ethics Committee (EC)  
Regional Hospital Pardubice  
Chairman: MUDr. Josef Hájek, CSc.  
Kyjevská 44  
532 03 Pardubice  
Czech Republic

Members:

---

MUDr. Petr Vojtíšek, CSc., head of the Cardiology Dept. submitted in cooperation with University of Pardubice the application for EC approval of the study focused on inflammation, oxidative stress and other biochemical parameters in patients with ischemic heart disease. Involvement of the patient into this study will not influence the patient therapy. The patients will be submitted only to 3 blood sample collections (à 19 ml) within 2 days and filling the questionnaire. Patients will be informed about the purpose of this study by attending physician. Only in the case of their agreement to participate in this study, blood sampling will be done.

EC approve protocol of the study „The dynamic of inflammatory markers after PCI in patients with ischemic heart disease“.

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

16. 3. 2010



**Zápis ze schůze Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.**  
**ze dne 11. 5. 2012 (15.00 h)**

Přítomni: MUDr. Josef Hájek, CSc., MUDr. Marek Sychra, doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc.,  
MUDr. Jan Mejzlík, Ph.D., MUDr. David Stuchlík, Mgr. Jaroslav Procházka,  
JUDr. Josef Rokos,

Omluveni: Mgr. Jana Škvrňáková, Ph.D., MUDr. Petr Formánek, MUDr. Zuzana Kala Grofová,  
Anna Němcová

Schůzi zahájil a řídil MUDr. Josef Hájek, CSc.

Sekretářka EK seznámila členy s korespondencí se SÚKL a multicentrickými etickými komisemi za období  
16. 4. 2012 – 11. 5. 2012.

398/11.5.2012

MUDr. Petr Vojtíšek, CSc., primář kardiologického odd. Interní kliniky PKN, a.s., požádal o schválení studie zaměřené na sledování zánětlivé reakce, nových markerů oxidačního stresu a dalších biochemických parametrů u pacientů s ischemickou chorobou srdeční. Tato studie nemá komerční charakter a uskuteční se v rámci spolupráce Pardubické krajské nemocnice, a.s. s Univerzitou Pardubice na Kardiologickém oddělení. Zátěž pacienta vyplývající ze zařazení do studie spočívá ve třech odběrech 19 ml krve a ve vyplnění dotazníku, zařazení do studie nemá vliv na léčbu pacienta. Konkrétní výběr pacientů bude v kompetenci lékařů Kardiologického oddělení.

Na studii se budou podílet:

Kardiologické odd.. prim. MUDr. P. Vojtíšek CSc., MUDr. J. Matějka, Ph.D.

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

Univerzita Pardubice: MUDr. V. Mužáková, Ph.D. Mgr. P. Žáková, Ph.D., Doc. Mgr. R. Kandár, Ph.D.

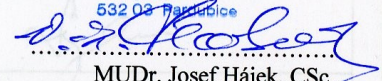
Členové EK studii po prostudování předložených dokumentů – v souladu s ICH GCP – schválili.

V Pardubicích 11. května 2012

Zapsala: Ivana Faiklová

Předběžný termín příští schůze etické komise: **6. 6. 2012**

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



MUDr. Josef Hájek, CSc.  
předseda Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.

## Příloha A/ III. část – Souhlas etické komise

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

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

---

Schůzi zahájil a řídil MUDr. Josef Hájek, CSc.

Sekretářka EK seznámila členy s korespondencí se SÚKL a multicentrickými etickými komisemi za období 25.11.2013 – 13.12.2013.

434/13.12.2013

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

Na studii se budou podílet:

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

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

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

Univerzita Pardubice: MUDr. V. Mužáková, Ph.D., Mgr. P. Žáková, Ph.D., Doc. Mgr. R. Kandár, Ph.D.

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

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

V Pardubicích 13. 12. 2013

Zapsala: Ivana Faiklová

Předběžný termin příští schůze etické komise: **24. 1. 2014**

**Etická komise**  
při Pardubické krajské nemocnici, a.s.  
Příjezdová 44  
602 00 Pardubice



MUDr. Josef Hájek, CSc.

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

## **Příloha B/ I. část – Informovaný souhlas pro pacienty**

### **INFORMACE PRO ÚČASTNÍKY STUDIE**

Vážená paní, vážený pane,

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

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

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

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

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

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

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

Vaše účast na této studii je zcela dobrovolná.

## **Příloha B/ II. část – Informovaný souhlas pro pacienty**

Jméno:

Pořadové číslo:

### **PÍSEMNÉ PROHLÁŠENÍ O SOUHLASU S ÚČASTÍ VE STUDII**

Byl(a) jsem seznámen(a) s povahou studie a souhlasím se zařazením do tohoto výzkumného projektu.

Dále souhlasím s tím, že údaje o mé osobě, které byly získány během studie, budou předávány třetím osobám pouze v anonymní formě, tzn. bez uvedení mého jména a identifikačních údajů.

V Pardubicích dne .....

Podpis (účastníka studie):

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

V Pardubicích dne .....

Jméno a podpis (řešitele- studie):

**Příloha C/ I. část – Základní rozdělení pacientů a jejich hodnoty proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2**

Základní informace o pacientech (skupiny).

	<b>DR po akutní ICHS n = 31</b>	<b>DR po chronické ICHS n = 8</b>	<b>Chronická ICHS n = 19</b>	<b>Akutní stav n = 16</b>
<b>Ženy</b>	7 (22,6 %)	3 (37,5 %)	4 (21,1 %)	6 (37,5 %)
<b>Muži</b>	24 (77,4 %)	5 (62,5 %)	15 (78,9 %)	10 (62,5 %)
<b>Věk</b>	65,2 ± 10,4	66,8 ± 5,8	65,5 ± 9,3	66,4 ± 12,4
<b>BMI</b>	29,7 ± 5	32,8 ± 5,2	28,4 ± 3,6	25,3 ± 4,2
<b>Kouření</b>	7 (22,6 %)	1 (12,5 %)	1 (5,3 %)	2 (12,5 %)
<b>Exkuřáci</b>	10 (32,3 %)	4 (50 %)	12 (63,2 %)	5 (31,3 %)
<b>Diabetes mellitus</b>	7 (22,6 %)	1 (12,5 %)	9 (47,4 %)	3 (18,8 %)
<b>Léčba hypertenze</b>	26 (83,9 %)	7 (87,5 %)	15 (78,9 %)	12 (75 %)
<b>Statiny před PCI</b>	28 (90,3 %)	8 (100 %)	13 (68,4 %)	7 (43,8 %)
<b>AIM v minulosti</b>	7 (22,6 %)	1 (12,5 %)	6 (31,6 %)	3 (18,8 %)
<b>CMP v minulosti</b>	3 (9,7 %)	1 (12,5 %)	1 (5,3 %)	0 (0 %)
<b>ICHDK v minulosti</b>	4 (12,9 %)	0 (0 %)	4 (21,1 %)	1 (6,3 %)
<b>HLP, DLP</b>	26 (83,9 %)	8 (100 %)	18 (94,7 %)	7 (43,8 %)

*DR – dokončení revaskulizace, BMI – body mass index, AIM – akutní infarkt myokardu, CMP – cévní mozková příhoda, ICHDK – ischemická choroba dolních končetin, HLP – hyperlipoproteinémie DLP – dyslipoproteinémie*

**Příloha C/ II. část – Základní rozdělení pacientů a jejich hodnoty proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2**

Hodnoty proMMP-9 a proMMP-2 skupiny pacientů – dokončení revaskulizace po akutní ICHS

Skupina	DR po akutní ICHS						
	Enzym	proMMP-9 [ng/ml]			proMMP-2 [ng/ml]		
	Odběr	A	B	C	A	B	C
Pacient 12	543,71	1492,98	1251,43	1209,27	736,51	1320,28	
Pacient 17	854,47	1412,26	1350,12	1055,05	1090,37	1148,82	
Pacient 26	600,22	623,03	906,76	1307,44	910,56	1115,70	
Pacient 27	681,17	697,19	587,61	1163,92	1109,43	1203,72	
Pacient 28	1127,67	1549,26	1217,55	1162,29	1237,98	1198,21	
Pacient 29	1367,85	1266,38	1447,67	3117,07	3428,95	3402,04	
Pacient 30	418,84	1303,77	1391,97	876,76	921,47	851,20	
Pacient 33	1675,25	2128,21	2020,64	2462,69	836,98	953,56	
Pacient 34	1330,10	1090,79	1295,56	2326,04	1772,98	1851,77	
Pacient 35	1152,72	1321,90	1110,79	1022,49	1135,41	1090,33	
Pacient 36	1479,34	1762,52	1496,11	734,72	815,21	808,94	
Pacient 37	1797,53	1820,87	1876,17	649,01	849,19	995,92	
Pacient 38	1235,44	1558,45	1571,25	1473,31	1220,47	1398,93	
Pacient 39	1150,83	1189,56	1410,43	923,63	794,60	853,74	
Pacient 41	618,39	1731,06	1531,10	1032,28	1621,43	2013,09	
Pacient 43	454,49	1369,09	1060,64	1724,8	1773,32	1606,61	
Pacient 46	961,61	1372,25	1197,39	927,59	1108,04	918,84	
Pacient 48	763,44	495,46	409,56	1257,67	1256,45	1135,14	
Pacient 49	282,11	533,57	753,92	1133,32	1044,16	1127,73	
Pacient 51	692,01	1195,27	1074,53	1911,51	2002,54	2102,23	
Pacient 52	435,79	854,43	1050,36	836,35	862,55	1073,29	
Pacient 56	143,06	548,01	586,75	1608,16	1325,54	1411,88	
Pacient 59	735,09	1407,27	1322,87	2171,34	2464,21	2402,5	
Pacient 60	1311,63	1676,55	1791,76	870,19	887,61	931,54	
Pacient 61	573,03	1061,8	979,32	1100,54	1289,4	1425,66	
Pacient 63	1047,39	1263,45	1792,65	1242,92	898,1	1147,53	
Pacient 65	250,83	487,16	221,95	951,01	1438,01	1415,65	
Pacient 66	1085,23	1435,89	1615,54	1322,96	1492,71	1563,16	
Pacient 69	241,44	805,04	903,57	1270,24	1213,53	1305,09	
Pacient 71	1318,86	1407,79	1461,79	1644,12	1782,86	1746,28	
Pacient 72	946,57	1579,53	1548,18	1176,64	1422,73	1401,88	
<b>Průměr</b>	879,87	1240,03	1233,42	1344,04	1314,30	1384,56	
<b>Směrodatná odchylka</b>	440,79	430,05	428,43	555,91	562,84	537,92	

**Příloha C/ III. část** – Základní rozdělení pacientů a jejich hodnoty proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2

Hodnoty proMMP-9 a proMMP-2 u skupiny pacientů – dokončení revaskularizace po chronické ICHS

<b>Skupina</b>	<b>DR po chronické ICHS</b>					
<b>Enzym</b>	<b>proMMP-9 [ng/ml]</b>			<b>proMMP-2 [ng/ml]</b>		
<b>Odběr</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Pacient 9</b>	504,63	1063,95	1149,83	1089,41	1238,48	1151,04
<b>Pacient 40</b>	1059,26	1001,80	1271,98	1958,46	1656,62	1426,41
<b>Pacient 44</b>	821,47	1258,54	1275,2	2602,78	3195,99	2915,92
<b>Pacient 45</b>	665,19	1586,19	1473,63	1749,93	1447,37	1322,75
<b>Pacient 58</b>	1008	1463,62	1175,15	2436,9	2548,71	2354,3
<b>Pacient 67</b>	891,04	-	-	1421,73	-	-
<b>Pacient 75</b>	1747,01	1617,51	1789,97	1325,85	1346,82	1294,41
<b>Pacient 77</b>	936,71	1693,67	1891,62	1264,85	1297,37	1246,99
<b>Průměr</b>	954,16	1383,61	1432,48	1731,24	1818,77	1673,12
<b>Směrodatná odchylka</b>	368,39	277,45	299,14	560,50	755,54	681,87



**Příloha C/ IV. část – Základní rozdělení pacientů a jejich hodnoty proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2**

Hodnoty proMMP-9 a proMMP-2 u skupiny pacientů s chronickou ICHS

<b>Skupina</b>	<b>Chronická ICHS</b>					
<b>Enzym</b>	<b>proMMP-9 [ng/ml]</b>			<b>proMMP-2 [ng/ml]</b>		
<b>Odběr</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Pacient 1</b>	485,49	1695,08	1740,58	1018,56	1186,95	1167,07
<b>Pacient 2</b>	1605,29	2041,78	1749,64	1038,74	1034,22	1235,41
<b>Pacient 3</b>	996,91	1594,74	1733,85	900,70	982,48	1009,24
<b>Pacient 4</b>	317,00	951,19	658,54	1070,57	1057,38	1246,40
<b>Pacient 5</b>	637,23	1285,87	1246,00	1102,15	1182,61	1297,62
<b>Pacient 6</b>	998,46	1301,37	1258,79	1024,56	1000,96	984,63
<b>Pacient 7</b>	376,33	1134,68	908,98	971,02	961,74	972,93
<b>Pacient 8</b>	152,59	921,88	1003,42	897,80	1010,90	1066,52
<b>Pacient 10</b>	737,76	971,38	1005,78	1381,47	1368,83	1400,27
<b>Pacient 32</b>	1434,18	1892,51	1774,32	800,46	617,11	556,87
<b>Pacient 50</b>	765,19	1024,77	1326,21	1501,28	1529,91	1446,50
<b>Pacient 53</b>	787,84	1197,61	1018,26	1669,54	1732,33	1383,35
<b>Pacient 54</b>	1032,59	899,04	906,30	1537,20	1151,65	1204,71
<b>Pacient 55</b>	209,88	948,23	862,92	1153,92	1003,49	1106,31
<b>Pacient 62</b>	571,32	1445,72	1292,79	1173,31	1227,48	1127,77
<b>Pacient 68</b>	478,4	1495,16	1017,81	1287,42	1532,77	1409,16
<b>Pacient 70</b>	135,04	917,8	1181,26	2082,97	2116,29	1370,03
<b>Pacient 73</b>	1426,12	1325,98	747,03	2082,97	2116,29	1370,03
<b>Pacient 74</b>	562,95	1279,6	1154,37	1553,59	1400,94	1456,46
<b>Průměr</b>	721,61	1280,23	1188,78	1276,22	1274,44	1200,59
<b>Směrodatná odchylka</b>	436,08	342,72	346,79	376,47	391,21	223,06

**Příloha C/ V. část – Základní rozdělení pacientů a jejich hodnoty proMMP-9, MMP-9 a proMMP-2**

Hodnoty proMMP-9 a proMMP-2 u pacientů s akutním stavem

<b>Skupina</b>	<b>Akutní stav</b>					
<b>Enzym</b>	<b>proMMP-9 [ng/ml]</b>			<b>proMMP-2 [ng/ml]</b>		
<b>Odběr</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Pacient 11</b>	1446,60	1925,70	1883,54	984,90	1003,12	1041,03
<b>Pacient 13</b>	447,08	1599,41	1216,26	951,90	1006,03	932,17
<b>Pacient 14</b>	209,86	680,76	568,09	950,79	953,95	1027,11
<b>Pacient 15</b>	507,35	1110,27	1189,82	970,93	973,23	1040,58
<b>Pacient 16</b>	669,91	1207,15	1170,25	2081,77	1995,67	1916,94
<b>Pacient 18</b>	214,29	979,36	222,48	757,22	788,55	847,23
<b>Pacient 19</b>	435,73	1238,98	1204,95	952,94	1060,39	948,19
<b>Pacient 20</b>	513,01	1312,73	1326,77	1338,30	1279,66	1312,59
<b>Pacient 21</b>	209,00	2381,63	1769,60	1393,20	1295,85	1216,02
<b>Pacient 22</b>	323,86	1429,91	1042,65	969,40	1090,77	1382,81
<b>Pacient 23</b>	494,88	1080,10	984,52	948,38	1068,74	1262,98
<b>Pacient 24</b>	185,82	1773,50	1428,98	1547,69	1811,97	1733,90
<b>Pacient 25</b>	1206,33	700,83	773,19	1520,83	1457,38	1414,53
<b>Pacient 31</b>	835,52	1646,57	1417,58	799,98	1010,24	716,66
<b>Pacient 64</b>	384,47	948,25	819,89	1216,25	1457,84	1575,28
<b>Pacient 76</b>	366,94	1879,33	1622,52	1867,73	1924,35	1323,88
<b>Průměr</b>	528,17	1368,40	1165,07	1203,26	1261,11	1230,74
<b>Směrodatná odchylka</b>	359,83	471,79	433,62	388,13	370,86	327,64

**Příloha D** – T-testy významnosti či nevýznamnosti pro vyhodnocení výsledků

T-test významnosti či nevýznamnosti ( $\alpha = 0,05$ ) hladin proMMP-9 v různých časech odběru.

Odběry	AxB	AxC	BxC
<b>DR po akutní ICHS</b>	0,001859	0,002183	0,951872
<b>DR po chronické ICHS</b>	0,025710	0,017094	0,756754
<b>Chronická ICHS</b>	0,000095	0,000814	0,418985
<b>Akutní stav</b>	0,000004	0,000090	0,214102

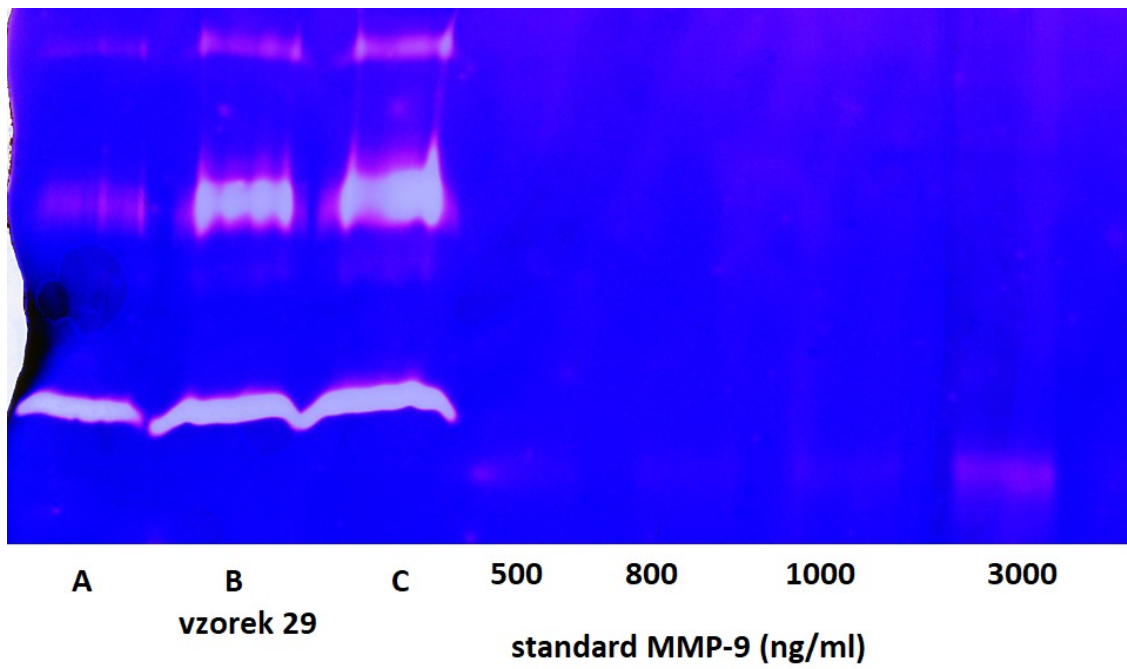
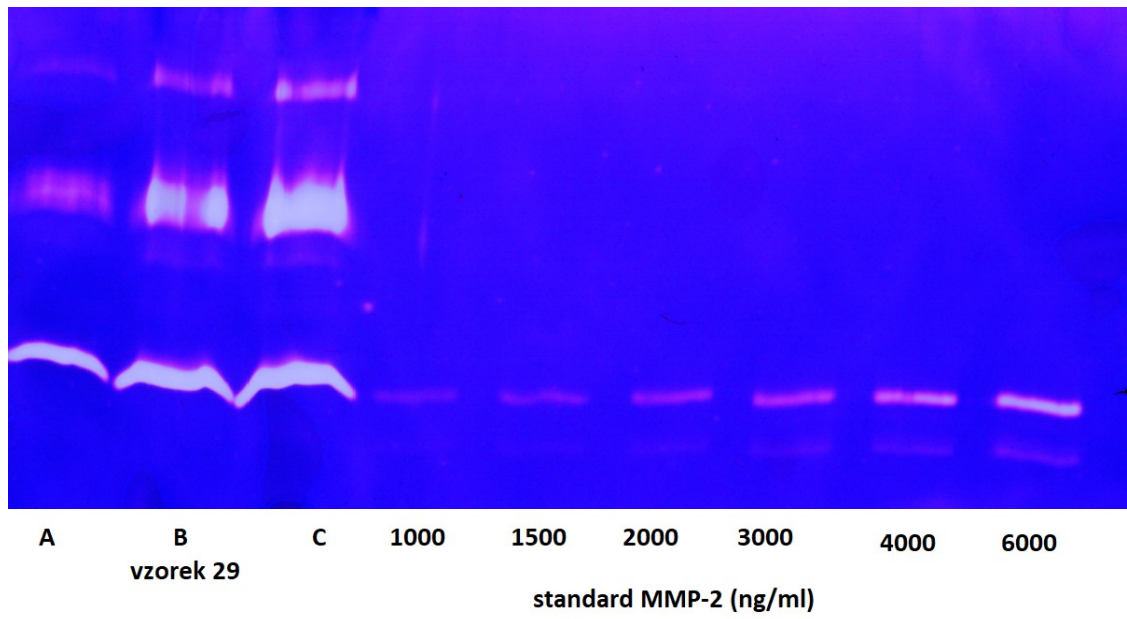
T-test významnosti či nevýznamnosti ( $\alpha = 0,05$ ) hladin proMMP-9 u jednotlivých skupin pacientů.

	DR po akutní ICHS X DR po chronické	DR po akutní ICHS X Chronická ICHS	DR po chronické ICHS X Chronická ICHS	DR po akutní ICHS X Akutní stav	DR po chronické ICHS X Akutní stav	Chronická ICHS X Akutní stav
<b>odběr A</b>	0,66417	0,22200	0,19902	0,00856	0,01269	0,16675
<b>odběr B</b>	0,40659	0,73132	0,48231	0,35302	0,9378	0,52706
<b>odběr C</b>	0,25328	0,70325	0,11346	0,60826	0,15482	0,85840

T-test významnosti či nevýznamnosti ( $\alpha = 0,05$ ) hladin proMMP-2 u jednotlivých skupin pacientů.

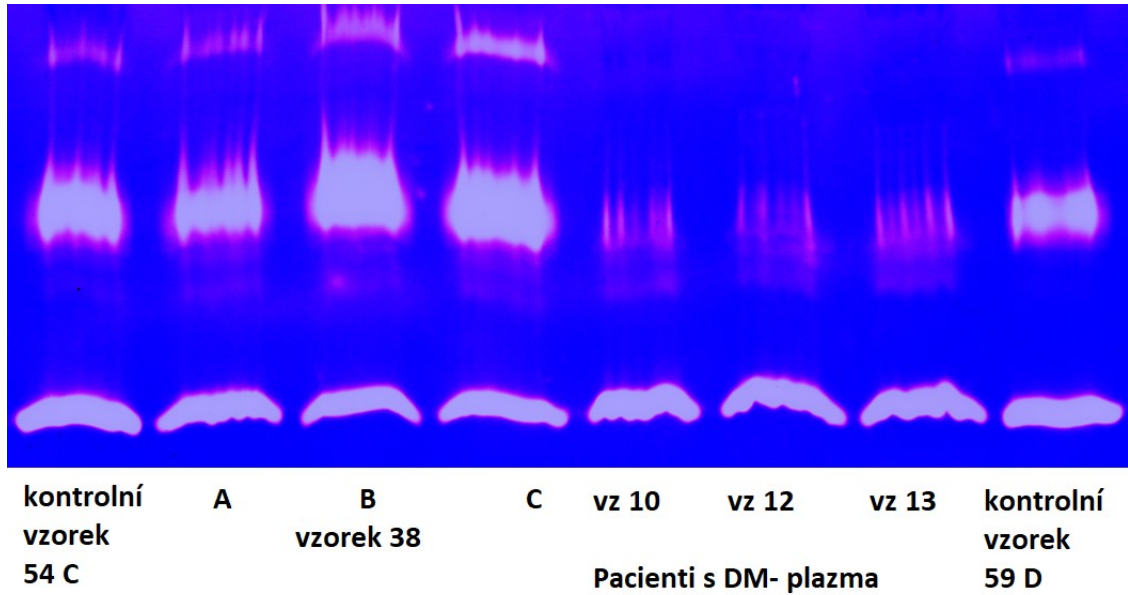
	DR po akutní ICHS X DR po chronické	DR po akutní ICHS X Chronická ICHS	DR po chronické ICHS X Chronická ICHS	DR po akutní ICHS X Akutní stav	DR po chronické ICHS X Akutní stav	Chronická ICHS X Akutní stav
<b>odběr A</b>	0,08778	0,64118	0,02038	0,37110	0,01283	0,57713
<b>odběr B</b>	0,05180	0,78777	0,11053	0,73483	0,10389	0,91873
<b>odběr C</b>	0,22979	0,09961	0,11858	0,23115	0,14445	0,74914

**Příloha E**– Zymogramy kalibrace standardu v porovnání se vzorkem

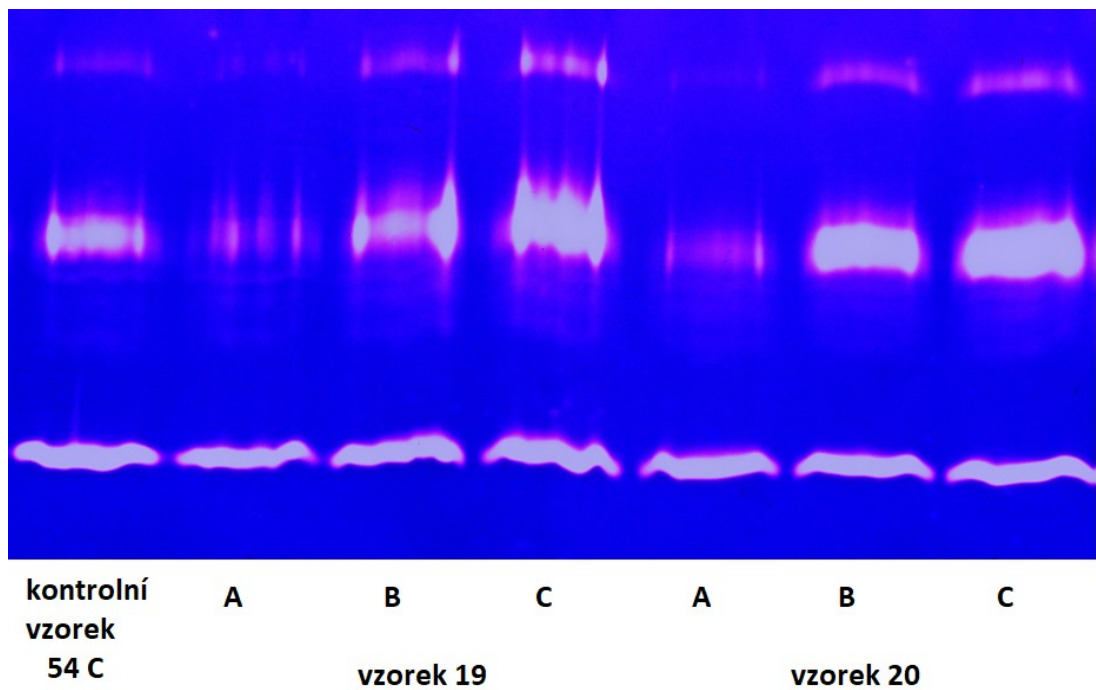


## Příloha F/ I. část – Příklady zymogramů

Na zymogramu jsou znázorněny vzorky pacienta po PCI a vzorky pacientů s DM



Na zymogramu jsou znázorněny vzorky naměřené pro porovnání stability



**Příloha F/ II. část – Příklady zymogramů**

Zymogram s pacienty po PCI

