

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

**Vliv mastných kyselin membrán erytrocytů a fosfolipidů séra na dynamiku
zánětlivých markerů po implantaci koronárního stentu u nemocných
s ischemickou chorobou srdeční**

Bc. Andrea Jindrová

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Andrea Jindrová**
Osobní číslo: **C16447**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Vliv mastných kyselin membrán erytrocytů a fosfolipidů séra na dynamiku zánětlivých markerů po implantaci koronárního stentu u nemocných s ischemickou chorobou srdeční**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Teoretická část:
 - a) Léčba ischemické choroby srdeční (ICHS) pomocí perkutánní koronární intervence s implantací koronárního stentu
 - b) Koronární stenty, systémová zánětlivá reakce po implantaci koronárního stentu, význam pro následné komplikace, zánětlivé markery C-reaktivní protein, interleukin-6, sérový amyloid A, ceruloplasmin
 - c) Význam mastných kyselin a oxidačního stresu v systémové zánětlivé reakci
 - d) Princip stanovení mastných kyselin v membránách erytrocytů a sérových fosfolipidech pomocí plynové chromatografie
- 2) Praktická část:
 - a) Zavedení nového způsobu kvantifikace mastných kyselin v membránách erytrocytů a fosfolipidech séra s využitím vnitřních "response" faktorů pomocí plynové chromatografie
 - b) Po zvládnutí metodiky určení zastoupení mastných kyselin v membránách erytrocytů a fosfolipidech séra u pacientů, kterým byl implantován koronární stent
 - c) Provedení statistického zpracování dat, vyhodnocení vztahu mezi jednotlivými mastnými kyselinami, oxidačním stresem, zánětlivou reakcí (C-reaktivní protein, interleukin-6, sérový amyloid A, ceruloplasmin, malondialdehyd) doprovázející implantaci stentu, a rozvojem komplikací

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **MUDr. Vladimíra Nováková Mužáková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Radim Janeček**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 1. 5. 2018

Bc. Andrea Jindrová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu prof. RNDr. Milanu Melounovi, DrSc., který navrhl metodiku statistického vyhodnocení dat v této práci a přispěl ke statistické interpretaci získaných výsledků. Dále patří poděkování paní MUDr. Vladimíře Novákové Mužákové, Ph.D. za mnohé rady a informace, které mi pomohly při zpracovávání této práce. Za cenné rady k práci v laboratoři bych ráda poděkovala Mgr. Radimovi Janečkovi. V neposlední řadě bych velmi ráda poděkovala své rodině a příteli, kteří mě značně podporovali po celou dobu mého studia.

Anotace

Vícerozměrnou statistickou analýzou dat byl hodnocen vliv koncentrací dvaceti mastných kyselin stanovených v membránách erytrocytů a ve fosfolipidech séra na velikost zánětlivé reakce a oxidačního stresu buněk u pacientů s ischemickou chorobou srdeční podstupujících perkutánní koronární intervenci s následnou implantací stentu. Zánětlivá reakce byla indikována změnou koncentrace C-reaktivního proteinu, sérového amyloidu A a ceruloplasminu za 48 hodin po implantaci stentu a v případě interleukinu 6 za 24 hodin po zákroku. Markerem oxidačního poškození buněk bylo navýšení koncentrace malondialdehydu za 48 hodin po implantaci stentu.

Vícenásobná lineární regrese odhalila, že existují statisticky významné vztahy mezi koncentracemi mastných kyselin v membránách erytrocytů a velikostí zánětlivé reakce, resp. oxidačním stresem po implantaci koronárního stentu. Se změnou koncentrace C-reaktivního proteinu velmi silně pozitivně korelovala kyselina myristová a v menší míře kyselina olejová. Inverzní korelace s navýšením C-reaktivního proteinu byla prokázána u kyseliny elaidové, v menší míře u kyseliny palmitoolejové a nervonové. Se zvyšováním koncentrace interleukinu 6 byla v pozitivní korelaci kyselina myristová, méně pak kyselina gondová a ve velmi malé míře, téměř zanedbatelně, kyselina dokosaehaenová. V inverzní korelaci s navýšením interleukinu 6 byla koncentrace kyseliny pentadekanové, α -linolenové a méně pak kyseliny stearové. Na změnu koncentrace malondialdehydu měla vliv pouze kyselina γ -linolenová. Mezi hodnocenými indikátory zánětlivé reakce byly dále sérový amyloid A a ceruloplasmin. Bylo odhaleno, že tyto markery nejsou vhodné pro posouzení námi sledovaných vztahů.

Klíčová slova

Koronární stent, mastné kyseliny, membrány erytrocytů, zánět, C-reaktivní protein, sérový amyloid A, interleukin 6, ceruloplasmin, malondialdehyd, vícenásobná lineární regrese

Title

The effect of fatty acid profile of erythrocyte membranes and serum phospholipids on systemic inflammation after coronary stent implantation in patients with ischemic heart disease

Annotation

Multidimensional statistical data analysis was carried out to assess the effect of concentrations of twenty fatty acids determined in erythrocyte membranes and serum phospholipids on the extent of inflammatory response and oxidative stress in patients with ischemic heart disease undergoing percutaneous coronary intervention followed by implantation of the stent. The inflammatory response was indicated by a change in the concentration of C-reactive protein, serum amyloid A and ceruloplasmin at 48 hours after implantation of the stent, and in case of interleukin 6 in 24 hours after the procedure. An increase in malondialdehyde concentration at 48 hours after implantation of the stent marked the oxidative cell damage.

Multiple linear regression revealed that there are statistically significant relationships between fatty acid concentrations in erythrocyte membranes and inflammatory response rates, resp. oxidative stress after implantation of the coronary stent. Increase of C-reactive protein concentration strongly correlated with myristic acid and, to a lesser extent, with oleic acid. An inverse correlation with the increase in C-reactive protein was demonstrated in elaidic acid, to a lesser extent in palmitoleic acid and nervonic acids. With increasing interleukin 6 concentration, myristic acid was positively correlated, to a lesser extent gondoic acid, and docosahexaenoic acid correlated to a very low extent. In inverse correlation with the increase in interleukin 6, pentadecanoic acid, α -linolenic acid and, to a lesser extent stearic acid concentrations were found. Only γ -linolenic acid correlated positively with malondialdehyde concentration. Among assessed indicators of the inflammatory response there were also serum amyloid A and ceruloplasmin. It was revealed that these markers are inappropriate for assessing relationships which were analysed.

Keywords

Coronary stent, fatty acids, erythrocytes membranes, inflammation, C-reactive protein, serum amyloid A, interleukine 6, ceruloplasmine, malondialdehyde, multiple linear regression

Obsah

Úvod.....	16
1 Cíl práce.....	17
2 Teoretická část.....	18
2.1 Ischemická choroba srdeční	18
2.1.1 Formy ischemické choroby srdeční.....	19
2.2 Perkutánní koronární intervence s následnou implantací stentu	20
2.3 Vývoj balonexpandabilních stentů.....	20
2.3.1 Holé kovové stenty	20
2.3.2 Stenty uvolňující léčiva	21
2.3.3 Biologicky odbouratelné stenty.....	21
2.4 Zánětlivá reakce cévy po implantaci stentu	22
2.4.1 C-reaktivní protein	23
2.4.2 Sérový amyloid A.....	24
2.4.3 Interleukin 6	25
2.4.4 Ceruloplasmin	25
2.5 Mastné kyseliny a oxidační stres.....	27
2.6 Úloha mastných kyselin při kardiovaskulárních onemocněních a zánětu	28
2.6.1 Nasycené mastné kyseliny.....	28
2.6.2 <i>Cis</i> -mononenasycené mastné kyseliny	30
2.6.3 Polynenasycené mastné kyseliny	31
2.6.4 <i>Trans</i> -nenasycené mastné kyseliny	37
2.7 Vliv mastných kyselin na rozvoj in-stent restenózy	38
2.8 Stanovení mastných kyselin v membránách erytrocytů.....	38
3 Experimentální část	40
3.1 Charakteristika souboru pacientů.....	40
3.2 Získání dat pro statistickou analýzu	41

3.3	Statistická analýza dat	42
3.4	Stanovení mastných kyselin	42
3.4.1	Přístrojové vybavení, pomůcky, chemikálie	42
3.4.2	Odběr krve	47
3.4.3	Metoda stanovení mastných kyselin ve frakci sérových fosfolipidů	47
3.4.4	Metoda stanovení mastných kyselin v membránách erytrocytů	48
3.4.5	Kvantifikace mastných kyselin pomocí plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem	50
4	Výsledky	52
4.1	Přesnost měření	52
4.2	Stanovené koncentrace mastných kyselin ve vzorcích	52
4.3	Exploratorní průzkumová analýza mastných kyselin v membránách erytrocytů	55
4.3.1	Analýza hlavních komponent	63
4.3.2	Faktorová analýza	66
4.3.3	Shluková analýza	68
4.4	Exploratorní průzkumová analýza mastných kyselin ve frakci sérových fosfolipidů	70
4.5	Vícenásobná lineární regrese	76
4.5.1	Navržené regresní modely	77
5	Diskuze	92
6	Závěr	102
7	Literární zdroje	103
8	Přílohy	111
	112

Seznam obrázků

Obrázek 1 Vývoj aterosklerotické léze.....	18
Obrázek 2 Balónkový katetr se stentem	20
Obrázek 3 Metabolická konverze n-6 a n-3 PUFA	31
Obrázek 4 Některé lipidové mediátory vznikající z LA a AA	33
Obrázek 5 Vliv n-3 PUFA na zánět.....	35
Obrázek 6 Ukázka chromatogramu mastných kyselin ve fosfolipidech séra.....	51
Obrázek 7 Krabicový graf k vyšetření variability koncentrací MK v membránách erytrocytů	56
Obrázek 8 Krabicový graf k vyšetření variability změny koncentrace indikátorů zánětu, resp. oxidačního stresu.....	57
Obrázek 9 Ikonový graf znázorňující složení mastných kyselin membrán erytrocytů jednotlivých pacientů	58
Obrázek 10 Hodnocení složení MK v membránách erytrocytů pomocí metody PCA	65
Obrázek 11 Hodnocení složení MK v membránách erytrocytů pomocí metody FA	67
Obrázek 12 Hodnocení složení MK v membránách erytrocytů pomocí shlukové analýzy	69
Obrázek 13 Krabicový graf k vyšetření variability koncentrací MK ve fosfolipidech séra....	71

Seznam tabulek

Tabulka 1 Přehled vybraných nasycených MK.....	29
Tabulka 2 Přehled vybraných <i>cis</i> -mononenasycených MK	30
Tabulka 3 Přehled vybraných <i>trans</i> -nenasycených MK	37
Tabulka 4 Charakteristika pacientů zařazených do studie	40
Tabulka 5 Dynamika zánětlivých markerů a markeru oxidačního stresu	41
Tabulka 6 Zastoupení MK v externím standardu FAME.....	45
Tabulka 7 Parametry přesnosti stanovení MK v membránách erytrocytů, resp. ve fosfolipidech séra	53
Tabulka 8 Stanovené koncentrace MK v membránách erytrocytů a v sérových fosfolipidech u vyšetřovaného souboru pacientů	54

Tabulka 9 Znaky zdrojové matice (MK v membránách erytrocytů).....	55
Tabulka 10 Korelační matice MK v membránách erytrocytů a zánětlivých markerů: I. část.	59
Tabulka 11 Korelační matice MK v membránách erytrocytů a zánětlivých markerů: II. část	60
Tabulka 12 Korelační matice MK v membránách erytrocytů a zánětlivých markerů: III. část	61
Tabulka 13 Korelační matice MK v membránách erytrocytů a zánětlivých markerů: IV. část	62
Tabulka 14 Korelační matice MK ve fosfolipidech séra a zánětlivých markerů: I. část.....	72
Tabulka 15 Korelační matice MK ve fosfolipidech séra a zánětlivých markerů: II. část	73
Tabulka 16 Korelační matice MK ve fosfolipidech séra a zánětlivých markerů: III. část	74
Tabulka 17 Korelační matice MK ve fosfolipidech séra a zánětlivých markerů: IV. část.....	75
Tabulka 18 Regresní model závislosti Δ CRP48 na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů	81
Tabulka 19 Regresní model závislosti Δ CRP48 na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 18.....	82
Tabulka 20 Regresní model závislosti Δ CRP48 na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 19.....	82
Tabulka 21 Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti Δ CRP48 na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 19.....	83
Tabulka 22 Regresní model závislosti Δ SAA48 na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů	84
Tabulka 23 Regresní model závislosti Δ SAA48 na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 22.....	85
Tabulka 24 Regresní model závislosti Δ IL6-24 na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů	86
Tabulka 25 Regresní model závislosti Δ IL6-24 na koncentraci MK vybraných dle statistické významnosti v tab. 24	87
Tabulka 26 Regresní model závislosti Δ IL6-24 na koncentraci MK vybraných dle statistické významnosti v tab. 25 bez absolutního členu	87

Tabulka 27 Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta IL6-24$ na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 25 bez absolutního členu	88
Tabulka 28 Regresní model závislosti $\Delta MDA48$ na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů	89
Tabulka 29 Regresní model závislosti $\Delta MDA48$ na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 28.....	90
Tabulka 30 Regresní model závislosti $\Delta MDA48$ na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 29.....	90
Tabulka 31 Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta MDA48$ na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 29.....	91

Seznam příloh

Příloha A Souhlas Etické komise	111
Příloha B Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta CRP48$ na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů (MNČ)	113
Příloha C Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta CRP48$ na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů (Welsch)	114
Příloha D Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta SAA48$ na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů (MNČ)	115
Příloha E Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta SAA48$ na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů (Welsch)	116
Příloha F Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta IL6-24$ na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů (MNČ)	117
Příloha G Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta IL6-24$ na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů (Welsch)	118
Příloha H Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta MDA48$ na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů (MNČ)	119
Příloha I Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta MDA48$ na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů (Welsch)	120

Seznam použitých zkratek

AA	Kyselina arachidonová (z angl. Arachidonic acid)
AIC	Akaikovo informační kritérium (z angl. Akaike information criterion)
AKS	Akutní koronární syndrom
ALA	Kyselina α -linolenová (z angl. α -linolenic acid)
AP	<i>Angina pectoris</i>
BMS	Holé kovové stenty (z angl. Bare metal stents)
BVS	Biologicky odbouratelné stenty (z angl. Bioresorbable vascular scaffolds)
COX	Cyklooxygenáza
Cp	Ceruloplasmin
CRP	C-reaktivní protein
DES	Lékové stenty (z angl. Drug eluting stents)
DGLA	Dihomo- γ -linolenová kyselina (z angl. Dihomo- γ -linolenic acid)
DHA	Kyselina dokosaheptaenová (z angl. Docosaheptaenoic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina (z angl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
EPA	Kyselina eikosapentaenová (z angl. Eicosapentaenoic acid)
FA	Faktorová analýza
FAS	Graf faktorového skóre
FAW	Graf faktorových vah (z angl. Factor analysis weight)
GC-FID	Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (z angl. Gas chromatography – flame ionization detector)
GLA	γ -linolenová kyselina (z angl. γ -linolenic acid)
GPR	Receptor spřažený s G-proteiny
Hb	Hemoglobin
HDL	Lipoproteiny s vysokou hustotou (z angl. High density lipoproteins)
HDL-c	HDL-cholesterol
HNF-4	Jaterní jaderný faktor 4 (z angl. Hepatocyte nuclear factor 4)
HODE	Hydroxyoktadekadienové kyseliny
hsCRP	C-reaktivní protein stanovený s vysokou analytickou citlivostí (z angl. High sensitivity CRP)
ICHS	Ischemická choroba srdeční

IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
IRF	Vnitřní „ <i>response</i> “ faktory (z angl. Internal response factors)
ISR	Restenóza ve stentu (z angl. In-stent restenosis)
KVO	Kardiovaskulární onemocnění
LA	Kyselina linolová (z angl. Linoleic acid)
L _D	Dolní mez intervalového odhadu parametru β
LDL	Lipoproteiny s nízkou hustotou (z angl. Low density lipoproteins)
LDL-c	LDL-cholesterol
L _H	Horní mez intervalového odhadu parametru β
LOX	Lipoxygenáza
LT	Leukotrien
LXR	Jaterní X receptor (z angl. Liver X receptor)
MACE	Závažné nežádoucí srdeční příhody (z angl. Major adverse cardiac events)
MDA	Malondialdehyd
MEP	Střední kvadratická chyba predikce (z angl. Mean quadratic error of prediction)
MK	Mastná kyselina
MNČ	Metoda nejmenších čtverců
MPO	Myeloperoxidáza
MUFA	Mononenasyčené mastné kyseliny (z angl. Monounsaturated fatty acids)
NF- κ B	Jaderný faktor κ B (z angl. Nuclear factor- κ B)
NO	Oxid dusnatý
OA	Kyselina olejová (z angl. Oleic acid)
p	Spočtená hladina významnosti
PCA	Analýza hlavních komponent (z angl. Principal component analysis)
PCAS	Graf komponentního skóre (z angl. Principal component analysis score)
PCAW	Graf komponentních vah (z angl. Principal component analysis weight)
PCI	Perkutánní koronární intervence
PG	Prostaglandin
PPAR	Receptor aktivovaný proliferátorem peroxizomů (z angl. Peroxisome proliferator-activated receptor)
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny (z angl. Polyunsaturated fatty acids)

R	Korelační koeficient
RSC	Residuální suma čtverců (z angl. Residual sum of squares)
RXR	Retinový X receptor (z angl. Retinoic X receptor)
SAA	Sérový amyloid A
s	Směrodatná odchylka odhadu β
s(e)	Residuální směrodatná odchylka
SFA	Nasycené mastné kyseliny (z angl. Saturated fatty acids)
SREBP	Transkripční faktor SREBP (z angl. Sterol response element binding protein)
TAG	Triacylglyceroly
TFA	<i>Trans</i> -nenasycené mastné kyseliny (z angl. Trans-fatty acids)
TGF- β	Transformující růstový faktor (z angl. Transforming growth factor β)
TLR	Toll like receptor
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor- α
TX	Tromboxan
Δ Cp48	Změna koncentrace ceruloplasminu za 48 hodin po implantaci stentu
Δ CRP48	Změna koncentrace C-reaktivního proteinu za 48 hodin po implantaci stentu
Δ IL6-24	Změna koncentrace interleukinu 6 za 24 hodin po implantaci stentu
Δ MDA48	Změna koncentrace malondialdehydu za 48 hodin po implantaci stentu
Δ SAA48	Změna koncentrace sérového amyloidu A za 48 hodin po implantaci stentu

Úvod

Kardiovaskulární onemocnění jsou celosvětově nejčastější příčinou úmrtí, a to především závažná forma ischemické choroby srdeční. V současné době se za standardní léčbu zúžení koronárních tepen považuje perkutánní koronární intervence s následnou implantací stentu do poškozené tepny. Tato metoda byla představena v 80. letech minulého století a za tu dobu prodělala ohromný technologický pokrok. Na trhu je celá řada typů koronárních stentů, například holé kovové stenty, lékové stenty či biologicky vstřebatelné, a ačkoliv jejich užití bylo hodnoceno již stovkami klinických studií, stále neexistuje stent ideální pro všechny pacienty, který by zamezil rozvoji nadměrné zánětlivé reakce, způsobené implantací stentu, která je často příčinou následných klinických komplikací. Na zánětlivé reakci se přirozeně podílí celá řada mediátorů, mezi které patří i mediátory odvozené od mastných kyselin.

Předmětem této práce bylo studium vlivu koncentrace mastných kyselin v membránách erytrocytů a ve fosfolipidech séra v době před zákrokem, na rozvoj systémové zánětlivé reakce po implantaci koronárního stentu u pacientů podstupujících perkutánní koronární intervenci pro závažné zúžení koronárních tepen. Jako markery systémového zánětu byly použity změny koncentrace C-reaktivního proteinu, sérového amyloidu A, interleukinu 6, ceruloplasminu a malondialdehydu jako indikátoru oxidačního poškození buněk.

1 Cíl práce

Cílem práce bylo po zavedení nového způsobu kvantifikace mastných kyselin s využitím tzv. vnitřních „*response*“ faktorů pomocí plynové chromatografie stanovit koncentrace dvaceti mastných kyselin ve fosfolipidech séra a v membránách erytrocytů u pacientů podstupujících implantaci koronárního stentu. Dále provedením statistické analýzy dat vyhodnotit, zda existují vztahy mezi stanovenými koncentracemi mastných kyselin, oxidačním stresem a zánětlivou reakcí doprovázející implantaci stentu.

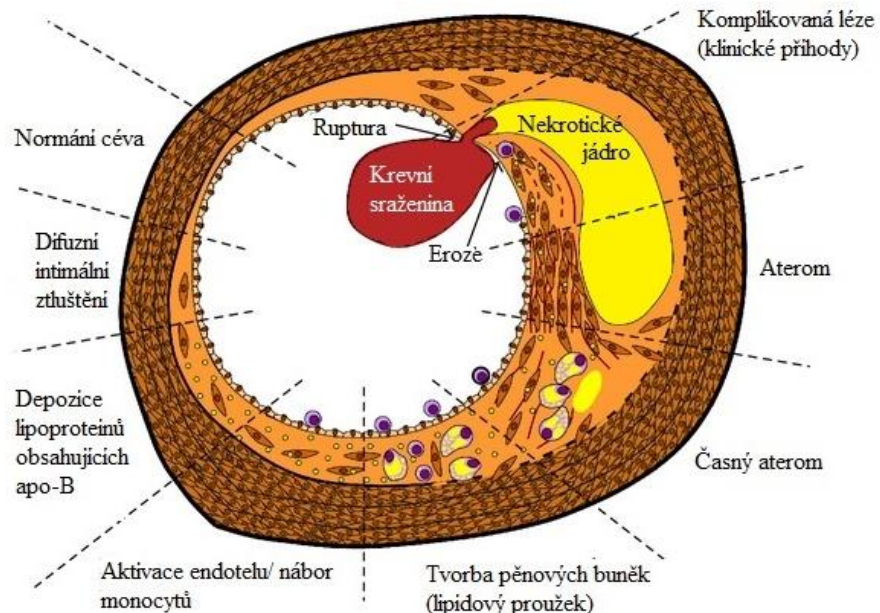
2 Teoretická část

2.1 Ischemická choroba srdeční

Kardiovaskulární choroby (KVO) jsou obecně celosvětově nejčastěji se vyskytující onemocnění a zároveň představují i nejčastější příčinu úmrtí. Potvrzuje to i Americká kardiologická společnost, která na začátku roku 2017 zveřejnila, že v dospělé americké populaci trpí více než 36 % osob některou z forem KVO a předpokládá, že toto číslo se bude nadále zvyšovat, nicméně úmrtnost klesá [1].

Ischemická choroba srdeční (ICHS) je akutní nebo chronické onemocnění srdečního svalu vzniklé na podkladě nedostatečného krevního zásobení srdeční svaloviny při poškození věnčitých tepen [2]. Nejčastější příčinou vzniku ICHS je ateroskleróza, méně pak spazmy tepen nebo embolizace [3].

Ateroskleróza se v současné době považuje za zánětlivé onemocnění velkých tepen, které se vyvíjí řadu let a je charakterizováno akumulací lipidů a zánětlivých buněk v intimě, přičemž iniciátorem celého patologického procesu je endoteliální dysfunkce [4]. Formace aterosklerotické léze je znázorněna na obrázku 1.



Obrázek 1 Vývoj aterosklerotické léze (převzato a upraveno dle [5])

Přesná příčina aterosklerózy není doposud známa, nicméně mezi ovlivnitelné nezávislé rizikové faktory spojené s rozvojem aterosklerózy patří zvýšená koncentrace celkového cholesterolu (především LDL-cholesterolu), zvýšená koncentrace triacylglycerolů a snížená

koncentrace HDL-cholesterolu v plazmě, hypertenze, kouření, *diabetes mellitus* či obezita. Ovlivněním těchto faktorů lze rozvoj aterosklerózy zpozdit či předcházet. Mezi neovlivnitelné rizikové faktory lze řadit vyšší věk, mužské pohlaví či genetickou predispozici [6].

2.1.1 Formy ischemické choroby srdeční

ICHS má široké spektrum klinických projevů od zcela asymptomatického onemocnění až po náhlou srdeční smrt. Můžeme je rozdělit na formy akutní a chronické, přičemž se zásadně liší v prognóze i terapeutickém přístupu [6].

Mezi chronické formy ICHS se řadí asymptomatická ICHS, stabilní *angina pectoris* (AP), stav po infarktu myokardu, dysrhythmická forma či chronické srdeční selhání. Tyto formy obvykle nepředstavují bezprostřední ohrožení života pacienta [6]. Léčí se převážně farmaky (nitráty, β -blokátory, blokátory vápníkových kanálů a antiagregancii), indikace k revaskularizaci přichází pouze při přetrvávání symptomů [3].

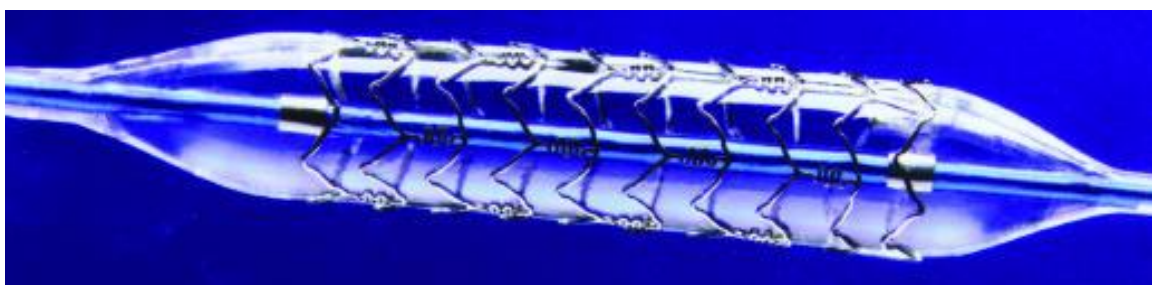
Velmi závažnými jsou akutní formy ICHS, protože představují bezprostřední ohrožení života. Mezi akutní koronární syndromy (AKS) se řadí nestabilní formy AP a akutní infarkt myokardu s nebo bez elevace úseku ST na elektrokardiografické křivce [6]. V některých případech se používá prosté dělení na AKS s elevací úseku ST a AKS bez elevace úseku ST [7]. Všechny tyto formy vznikají na podkladě ruptury nestabilní aterosklerotické léze, kdy v místě poškození věnčité tepny dojde ke vzniku trombu a zúžení až uzavření lumen věnčité tepny [6, 7]. Léčba AKS s elevací ST zahrnuje přednemocniční péči, konkrétně podávání léků proti bolesti, podání kyslíkové masky při hypoxii či v nutnosti podání sedativ. Klíčovou léčbou je téměř u všech pacientů primární perkutánní intervence, při níž se uzavřená tepna pomocí katetru rekanalizuje a dilatuje balonkem, na jehož konci je umístěn koronární stent. Významnou součástí léčby je podávání farmak. Antitrombotická léčba zahrnuje podání kyseliny acetylsalicylové v kombinaci s některým léčivem ze skupiny nových protideštičkových medikamentů. Dále se podávají nitráty, antikoagulační medikamenty a léky na snížení krevního tlaku, nejčastěji se jedná o inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu [7]. U pacientů s AKS bez elevace ST neexistuje paušální léčba. Je vždy nutno zhodnotit zdravotní stav konkrétního pacienta a případná rizika či výhody perkutánní koronární intervence. V řadě případů je dostačující farmakologická léčba [7].

Podstatnou roli při léčbě všech forem ICHS často taktéž hraje i podávání statinů pro dyslipidémii [7]. Samozřejmou a neméně důležitou součástí léčby ICHS je sekundární prevence, tedy eliminace či maximální omezení působení již zmíněných ovlivnitelných rizikových faktorů působících proaterogenně [6].

2.2 Perkutánní koronární intervence s následnou implantací stentu

Počátky intervenční kardiologie sahají do 80. let minulého století, kdy Švýcar A. R. Grüntzig provedl první perkutánní koronární intervenci. Za dobu uplynulých 40 let došlo k ohromnému technologickému pokroku této metody. Původním záměrem bylo prostřednictvím prostého balónkového katetru rozbít aterosklerotický plát. Nicméně tento postup byl často spjat s nežádoucím akutním uzávěrem dilatované arterie, s rozvojem restenózy či s konstriktivní remodelací cévy [8]. Ve snaze eliminovat nežádoucí účinky byla PCI doplněna o implantaci stentu [9]. Fotografie balónkového katetru se stentem je na obrázku 2.

Klasickým přístupem pro katetrizaci je femorální tepna, modernějším a stále častějším způsobem je transradiální přístup [10]. Stenty mohou být samoroztažitelné nebo častěji balonexpandabilní. Selfexpandabilní stenty představují spíše pouze alternativní řešení pro komplikované léze [11].



Obrázek 2 Balónkový katetr se stentem (převzato z [12])

2.3 Vývoj balonexpandabilních stentů

2.3.1 Holé kovové stenty

Vůbec prvním dostupným typem koronárních stentů byly holé kovové stenty (BMS, z angl. Bare metal stents). Původně byly vyráběny z nerezové oceli, nyní jsou z nejrůznějších modifikovaných slitin [13]. BMS účinně řeší akutní nežádoucí stažení cévy či konstriktivní remodelaci cévy. Limitací těchto stentů je ale skutečnost, že po implantaci dochází k poranění stěny cévy, které často vyúsťuje v neointimální hyperplazii. Neointimální hyperplázie je často podkladem pro rozvoj restenózy ve stentu (ISR, z angl. In-stent Restenosis). Pro řešení tohoto problému byla navržena řada alternativních strategií léčby, včetně systémového podávání antiproliferativních a protizánětlivých léků, použití alternativních povrchových povlaků stentu a stenty s elucí léků, viz dále [9].

2.3.2 Stenty uvolňující léčiva

Ve snaze snížit riziko rozvoje restenózy ve stentu byly vyvinuty stenty elující léčiva (DES, z angl. Drug eluting stents). Dnes již rozlišujeme několik generací DES. První dvě generace mají přítomnou polymerní vrstvu (trvalou či bioresorbovatelnou) na kovové vzpěře. Příkladem používaných léčiv navázaných na stentech je Sirolimus, Paclitaxel, Zotarolimus, Biolimus či Everolimus [13]. Obecně pro DES platí, že svým antiproliferativním účinkem na buňky hladké svaloviny cév snižují riziko rozvoje restenózy ve stentu. Nevýhodou těchto stentů je opožděná reendotelizace, která může vést k tvorbě trombu v místě stentu, proto se doporučuje prodloužená duální antiagregační terapie [9].

Systematické monitorování více než 10 000 pacientů s ICHS podstupujících PCI s následnou implantací stentu odhalilo, že implantace DES snížila výskyt restenózy na 12-15 %, přičemž pouze u přibližně 5 % případů došlo ke klinické manifestaci ve srovnání s pacienty, kterým byl implantován BMS, u kterých byla prokázána incidence restenózy ve stentu u 30 % pacientů [14]. Pro snížení rizika trombózy a zánětu způsobených polymerními povlaky se zdají být slibné non-polymerní DES. Je však nutné ještě testovat jejich účinnost a bezpečnost [15]. Zvláštním typem DES jsou stenty označované jako COMBO. Jedná se o stenty, které na svém povrchu kromě léčiva nesou protilátky anti-CD34. Po implantaci stentu pak protilátky přitahují cirkulující endoteliální progenitorové buňky, které se podílejí na urychlení reendotelizace. Po implantaci těchto stentů byla u pacientů zjištěna pozdní neointimální regrese, která nebyla zaznamenána u žádných stentů s elucí léků [16].

V roce 2013 provedl Tada a kolektiv studii výskytu trombózy ve stentu u pacientů podstupujících implantaci BMS nebo DES. Bylo prokázáno, že ve srovnání s BMS došlo po 3 letech sledování k významnému zvýšení rizika velmi pozdní trombózy ve stentu u pacientů s implantovaným DES první generace (2,2 %). DES druhé generace vykazovaly riziko trombózy 1 % a holé kovové stenty 1,5 % [17].

V porovnání BMS a DES, stentem první volby u pacientů se stabilní ICHS nebo AKS je prozatím DES, protože je prokázána nižší míra mortality a nižší výskyt závažných komplikací [18].

2.3.3 Biologicky odbouratelné stenty

Biologicky odbouratelné stenty (BVS, z angl. Bioresorbable vascular scaffolds) představují atraktivní přístup, protože poskytují cévě pouze dočasnou oporu. Mají totiž schopnost se po určité době rozložit a kompletně vstřebat [8]. Vstřebání stentu významně

sníží riziko pozdní trombózy. Po resorpci BVS je popisováno i tzv. pozdní rozšíření lumina oproti opačnému fenoménu pozorovanému u permanentních stentů. Nejčastějšími materiály pro výrobu BVS je polymer na bázi kyseliny poly-L-mléčné či bioabsorbovatelné slitiny kovu [19]. V retrospektivní studii 657 pacientů po implantaci BVS došlo k rozvoji restenózy ve stentu u 41 pacientů (6,2 %), tento výskyt je srovnatelný s incidencí restenózy ve stentu u novější generace DES [20].

2.4 Zánětlivá reakce cévy po implantaci stentu

Při implantaci stentu do cévy dochází nejenom k rozbití aterosklerotického plátu, ale i k poškození cévní stěny. Porušení integrity endotelu při implantaci stentu vede k celé kaskádě reakcí. Lze je rozdělit na ranou fázi, která zahrnuje aktivaci a agregaci krevních destiček doprovázenou zánětlivou infiltrací cirkulujících leukocytů, které uvolňují řadu růstových faktorů a cytokinů. Další fází je tvorba granulační tkáně, při které se endotelové buňky množí a migrují po poraněné stěně cévy, zatímco buňky hladké svaloviny a makrofágy nahrazují fibrinovou sraženinu za granulační tkáň. Konečnou fází hojení je remodelace tkáně. V této fázi dochází k fenotypové přeměně buněk hladké svaloviny. Modifikace je aktivována růstovými faktory či cytokiny produkovanými endotelem, vrstvou *medie*, krevními destičkami nebo infiltrovanými zánětlivými buňkami. Na modifikaci buněk hladké svaloviny se podílí i například tlaková síla vznikající ve stěně cévy implantací stentu nebo stentem způsobený pokles smykového napětí. Významnou roli zde hraje i extracelulární matrix, protože interaguje s buňkami a ovlivňuje jejich adhezi, migraci, proliferaci, čímž se podílí na remodelaci rány [21]. Svou roli při zánětu mají mimo jiné i kmenové buňky [22] či oxidační stres a ateroskleróza a její typické rizikové faktory. Předpokládá se, že i mastné kyseliny a od nich odvozené lipidové mediátory mají významnou úlohu při zánětu, viz dále.

Při hojení cévy je důležitá určitá rovnováha mezi prozánětlivými a protizánětlivými mediátory. Za normálních okolností buněčné a molekulární procesy, které řídí odpověď na poranění, iniciují opravu a zhojení cévy. Za patologických podmínek, kdy se poruší regulační mechanismy podílející se na reparaci cévy, je následkem trvalý zánět, který je často doprovázen komplikacemi [22]. Markery systémového zánětu jsou například reaktanty akutní fáze C-reaktivní protein, sérový amyloid A, interleukin 6 a ceruloplasmin, viz dále.

Závažnou a zároveň nejčastější zánětlivou komplikací implantace stentu je již zmíněná restenóza ve stentu, která je angiograficky definována jako > 50% zúžení cévy v místě stentu.

Hlavním mechanismem vzniku je neointimální hyperplázie. Podle velikosti ložiska lze dělit restenózu na fokální, difuzní, proliferativní a okluzní, u kterých je nutná opětovná revaskularizace v 19 %, 35 %, 50 % a 98 % případů, v uvedeném pořadí. Obecně jsou již známy rizikové faktory (prediktory) rozvoje restenózy ve stentu spojené s procesem implantace stentu, s vlastnostmi intervenované cévy (ložiska) či se zdravotním stavem pacienta [23]. V současné době je snahou určit biochemické markery, na základě kterých by bylo možné predikovat rozvoj restenózy již během implantace stentu.

2.4.1 C-reaktivní protein

C-reaktivní protein (CRP) je reaktant akutní fáze, je produkován majoritně hepatocyty jako odpověď na prozánětlivé cytokiny interleukin (IL)-1 a IL-6 nebo tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α), které jsou produkovány poškozenými endoteliálními buňkami a leukocyty v místě implantovaného stentu [24]. CRP je ale také lokálně uvolňován vulnérabilním plakem a cévní stěnou poškozenou implantací stentu [25].

CRP není specifickým markerem pro intravaskulární zánět a aby bylo možné měřit hodnoty v nízké oblasti (kolem 1 - 2 mg/l) používají se testy s upravenou analytickou přesností, tzv. hsCRP [26]. Lokálně produkováný CRP může působit jako promotor zánětlivého procesu. Inoue a kolektiv ve své studii sledovali lokální produkci CRP v místě aterosklerózy, během PCI u pacientů se stabilní nebo nestabilní AP. Bylo prokázáno, že koncentrace CRP ve vzorcích arteriální krve odebraných jak distálně od ložiska, tak i proximálně, je vyšší u pacientů s nestabilní AP v porovnání s pacienty se stabilní AP. Navíc při porovnání krve odebrané z koronárního sinu a z periferní krve před a po implantaci stentu u pacientů se stabilní AP bylo zjištěno, že změna koncentrace CRP je markantnější v krvi z koronárního sinu než v periferní krvi. Na základě stanovení CRP z koronárního sinusového vzorku nebo intrakoronárního vzorku by mohl být přesněji posouzen probíhající zánět, nicméně toto stanovení vzhledem k náročnosti nelze provádět rutinně [25].

Při hodnocení hladiny CRP v periferní krvi se doporučuje stanovení změny koncentrace před a po implantaci stentu, protože PCI spouští již zmíněnou zánětlivou reakci, která je přirozeně spojená se zvýšením sérové koncentrace CRP [27]. Udává se, že maximální koncentrace CRP dosahuje 48 hodin po zákroku [24, 25]. Studie z roku 2009 dokonce udává, že pacienti, u kterých po implantaci stentu následně došlo k srdeční příhodě, měli nejvyšší koncentrace CRP až po 72 hodinách [28]. Mincu a kolektiv provedli systematickou metaanalýzu k vyhodnocení prediktivní role sérového CRP u pacientů se STEMI, kteří podstoupili primární PCI. Pacienti byli rozdělení do dvou skupin, a to s nízkou a vysokou

hladinou CRP. Vysoké hodnoty CRP byly spojeny se zvýšenou mortalitou v nemocnici, později i zvýšenou celkovou úmrtností, s výskytem závažných nežádoucích srdečních příhod (MACE, z angl. Major adverse cardiac events) a recidivujícími infarkty myokardu. Zvýšená hladina CRP před PCI významně korelovala s potřebou revaskularizace cílové cévy již v nemocnici. Nicméně dle jejich studie není preprocedurální koncentrace CRP vhodná k posouzení rizika restenózy ve stentu vzhledem k nekonzistentním výsledkům zahrnutých studií. Například *M-H Risk Ratio* u akutní a subakutní ISR spojené s vysokou hladinou CRP se pohybovalo mezi hodnotami 1,2 až 5,31, zatímco u pozdní ISR *M-H Risk Ratio* nabývalo hodnot 0,63 až 5 [29]. Jinou metaanalýzu observačních studií provedl kolektiv čínských lékařů v roce 2010. Ti sledovali rozdíl koncentrace CRP u pacientů s restenózou a bez restenózy ve stentu, u kterých byla důvodem implantace stentu stabilní nebo nestabilní AP. Výsledky byly taktéž heterogenní, nicméně převažovala asociace vyšší krevní koncentrace CRP s výskytem restenózy ve stentu. Navíc se zdá, že u pacientů s nestabilní AP je ISR častější [30].

2.4.2 Sérový amyloid A

Dalším indikátorem zánětlivého procesu je sérový amyloidní protein A (SAA). Obecně se rozlišují 4 izoformy (SAA1-4), mezi reaktanty akutní fáze patří pouze izoformy 1 a 2, přičemž během zánětu se plazmatická koncentrace může zvýšit až tisíckrát [31]. Syntéza a sekrece SAA v hepatocytech je řízena cytokiny, především IL-1, IL-6 a TNF- α . Kromě jater byla prokázána produkce i v jiných tkáních, hlavně v tukové tkáni, endotelu cévní stěny, hladkých svalových buňkách, makrofázích či pěnových buňkách. SAA je považován nejen za marker zánětu cévní stěny, ale může hrát přímou roli v aterogenezi [26].

Z výsledků řady studií *in vitro* se předpokládá, že SAA má pleiotropní účinky. Je schopný působit chemotakticky na fagocyty pomocí formyl peptidového receptoru FPR2 a indukovat transkripci prozánětlivých proteinů (IL-1B a TNF receptoru-II) u monocytů. U neutrofilů je SAA schopný navodit produkci cytokinů TNF- α , IL-6 a IL-8. Kromě toho je však schopný iniciovat i produkci protizánětlivých cytokinů, mezi které patří například IL-10, IL-1RN nebo IL-33. SAA-1 je schopný ovlivňovat diferenciaci makrofágů směrem k fenotypu M2, včetně zvýšené schopnosti eferocytózy. Část těchto účinků je zprostředkována díky schopnosti SAA aktivovat Toll-like receptory (TLR)-2 a 4 [31].

Vztahem mezi sérovými koncentracemi SAA u pacientů, kteří podstoupili pro akutní koronární syndrom primární PCI a následným klinickým průběhem se zabývala japonská studie [32]. Tato retrospektivní studie naznačuje, že vysoká sérová hladina SAA by mohla sloužit jako

nezávislý prediktor šestiměsíčního úmrtí u pacientů s akutním infarktem myokardu podstupujících PCI.

2.4.3 Interleukin 6

IL-6 je prozánětlivý cytokin produkovaný řadou tkání, včetně aktivovaných leukocytů, endotelových buněk a adipocytů [28]. Je přechodně a téměř okamžitě produkován v reakci na infekci či poranění tkání a vykazuje pleiotropní účinek na zánět, imunitní odpověď a hematopoézu [33]. Odstraněním zdroje stresu se u zdravého jedince produkce IL-6 zastaví. Jeho významnou funkcí je schopnost navodit hepatální produkci reaktantů akutní fáze, kromě CRP a SAA také fibrinogenu, ceruloplasminu, haptoglobinu, alfa-1 anti-trypsinu či alfa-1 kyselého glykoproteinu [28]. Mimo jiné podporuje tvorbu trombocytů v kostní dřeni, snižuje hepatální produkci fibronektinu, albuminu a transferinu, ovlivňuje diferenciaci lymfocytů a rovněž indukuje nadměrnou produkci cévního endoteliálního růstového faktoru, což vede ke zvýšené angiogenezi a zvýšené vaskulární permeabilitě [33]. Při dlouhodobém sledování medikamentózně léčených pacientů se stabilní ischemickou chorobou srdeční bylo zjištěno, že zvýšená hladina IL-6 je nezávislým rizikovým faktorem pro závažné srdeční příhody, hospitalizaci pro srdeční selhání a stejně tak i pro celkovou mortalitu [34].

Krevní koncentrace IL-6 se nejvíce zvyšuje v prvních hodinách po implantaci stentu a maxima dosahuje po 24 hodinách, a to u všech pacientů bez ohledu na vznik následných komplikací [28].

2.4.4 Ceruloplasmin

Ceruloplasmin (Cp) je glykoprotein akutní fáze, jehož hlavní funkcí je transport mědi. Převážná většina sérového Cp je syntetizována a produkována hepatocyty po stimulaci IL-1, IL-6, TNF- α , lipopolysacharidy, INF- γ , dexamethazonem, estrogenem či jinými steroidními hormony. Mimo jaterní buňky jsou schopny produkovat Cp i buňky monocytárního původu [35]. Mimo jiné, Cp hraje roli při angiogenezi, koagulaci či v homeostáze železa - vykazuje ferroxidázovou aktivitu [35, 36]. Cp může působit jako oxidáza na oxid dusnatý, za vzniku oxidu dusičitého, který se podílí na iniciaci Cp-zprostředkované peroxidace lipidů a nitraci proteinů [37], což může nepříznivě ovlivnit endoteliální funkci [38]. Tímto způsobem může zvýšená hladina Cp podporovat aterosklerotické mechanismy [37].

Jak již bylo naznačeno, účinky Cp jsou rozmanité. Cp je významný antioxidant, ale často je diskutováno i jeho prooxidační působení. Působení Cp je významně závislé na konkrétním prostředí. Cp je schopný inhibovat peroxidaci lipidů. Jedním z antioxidantních

účinků Cp je schopnost vázat myeloperoxidázu (MPO). Tento enzym se hojně nachází v azurofilních granulích neutrofilů a při uvolnění je schopný působit antimikrobiálně, ale hlavně jako silný prooxidant. MPO je totiž schopná produkovat reaktivní HClO, která má potenciál poškozovat tkáň v místě zánětu a infekce. Pro vazbu Cp-MPO má Cp ve své struktuře dvě vazebná místa. Po navázání není ovlivněná ferroxidázová aktivita [39]. Většina studií však naznačuje, že hlavním mechanismem antioxidačního účinku je ferroxidázová aktivita, tedy schopnost oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+} , čímž dochází k významnému snížení množství substrátu (Fe^{2+}) pro nežádoucí Fentonovu reakci. Nicméně tato teorie není podložena žádnými důkazy [35, 36]. Ferroxidázová aktivita se zvyšuje během zánětu, infekcí a dalších stavů. Tato pozorování naznačují, že existuje možnost, že Cp působí jak jako antioxidant, tak i jako reakční činidlo akutní fáze [36].

Obecně ionty přechodných kovů, jako jsou ionty mědi a železa, jsou extrémně účinnými promotory oxidačních reakcí a mohou způsobit oxidační modifikaci lipoproteinů s nízkou hustotou *in vitro*. Jejich zapojení do oxidačních procesů *in vivo* je ale zpochybňováno, protože většina těchto iontů je spojena s prostetickými skupinami nebo je těsně izolována pomocí specifických vazebných proteinů, a tak je hladina volné mědi a železa v plazmě a intersticiálních tekutinách extrémně nízká [40]. Nicméně je prokázáno, že u pacientů s kritickou ischemií se vyskytuje zvýšená hladina Cp i mědi [36]. Uvádí se, že i samotný Cp má za určitých podmínek schopnost iniciovat *in vitro* oxidaci lipoproteinů [36, 40]. Schopnost Cp vyvolat lipoperoxidaci závisí na přítomnosti jediného chelatovatelného atomu mědi. Konkrétně se toto prooxidační místo nachází na histidinu v poloze 426 [40]. Pro prooxidační účinky je nutná strukturální integrita Cp [35, 36].

Po implantaci stentu dochází k maximálnímu zvýšení koncentrace Cp po 72 hodinách, bez ohledu na rozvoj případné restenózy, přičemž u pacientů s restenózou ve stentu byla zjištěna nevýznamně vyšší hladina než u pacientů bez restenózy ve stentu [28]. Již řada studií zdokumentovala korelaci mezi zvýšenou krevní koncentrací Cp a KVO, jako je například ateroskleróza, abdominální aortální aneurysma, nestabilní *angina pectoris* či vaskulitida [35, 36]. Zajímavé se jeví výsledky prospektivní kohortové studie z roku 2014, ve které zvýšená plazmatická koncentrace Cp figurovala jako nezávislý prediktor pětiletého úmrtí u pacientů s chronickým srdečním selháním [38]. K podobným závěrům dospěla i studie Kennedyho a kolektivu [37]. Na základě těchto studií by se zvýšená sérová koncentrace Cp (případně i mědi) mohla považovat za nezávislý rizikový faktor KVO. Částečně je však podezření, že příspěvek Cp ke KVO je závislý na profilu lipoproteinů [35].

2.5 Mastné kyseliny a oxidační stres

Oxidační stres je charakterizován nerovnováhou mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku a kapacitou vnitřního antioxidačního systému a je spojen s poškozením buněk, tkání a orgánů. Na rozvoji kardiovaskulárních onemocnění se oxidační stres podílí zejména schopností oxidační modifikace lipidů. Lipoperoxidace se popisuje jako proces, při kterém reaktivní formy kyslíku atakují lipidy obsahující dvojnou vazbu mezi uhlíky, zejména polynenasycené mastné kyseliny. Cílem oxidace mohou být lipoproteiny, fosfolipidy, glykolipidy či cholesterol. Při nadměrné oxidaci mastných kyselin fosfolipidů v membránách buněk dochází k poruše integrity a ztrátě fluidity membrán, což je často příčinou apoptózy či nekrózy těchto buněk. Pro stanovení míry oxidačního stresu lze využít malondialdehyd (MDA), který vzniká jako sekundární produkt enzymatických i neenzymatických oxidačních procesů kyseliny arachidonové a jiných polynenasycených mastných kyselin. MDA vzniklý enzymatickou cestou může v organismu působit jako signální posel, zatímco MDA, vzniklý při oxidačním stresu a jeho následné metabolické produkty mají schopnost modifikovat proteiny a přispívat k poškození DNA a mutacím nebo působit prozánětlivě [41].

2.6 Úloha mastných kyselin při kardiovaskulárních onemocněních a zánětu

Mastné kyseliny (MK) jsou významnou součástí buněk, tkání a krve člověka. Představují hlavní komponentu triacylglycerolů (TAG), fosfolipidů a dalších komplexních lipidů. Majoritně slouží jako důležitý zdroj energie a složka buněčných membrán, ale také jako významné imunomodulátory a signalizační molekuly. Různé buňky, membrány a fosfolipidy mají různé zastoupení MK. Profil MK je ovlivňován dietou, metabolismem, hormonálním prostředím, stavem aktivace buněk, genetickými predispozicemi a podobně. Konkrétní složení MK v buněčné membráně ovlivňuje fluiditu této membrány. Abnormální zastoupení mastných kyselin je spojeno s celou řadou onemocnění, jako je *diabetes mellitus* 2. typu, různé typy rakoviny nebo KVO [42].

MK jsou monokarboxylové, většinou nevětvené kyseliny s délkou řetězce nejčastěji mezi 2-26 uhlíky. V zásadě dělíme MK na nasycené (SFA, z angl. Saturated fatty acids) a nenasycené, které se dále dělí podle počtu dvojných vazeb na mononenasyčené (MUFA, z angl. Monounsaturated fatty acids), polynenasycené (PUFA, z angl. Polyunsaturated fatty acids). Nenasycené MK se navíc mohou vyskytovat v *cis* i v *trans* konfiguraci. MK lze také dělit z hlediska délky uhlíkatého řetězce (mastné kyseliny s krátkým, středně dlouhým, dlouhým nebo velmi dlouhým řetězcem) [43] nebo na esenciální, kam ve své podstatě patří pouze kyselina linolová a α -linolenová, pomocí nichž živočichové dokáží do určité míry syntetizovat všechny důležité ω -6 respektive ω -3 PUFA, ostatní důležité MK jsou neesenciální [44].

Syntéza MK je poměrně složitý proces, podílí se na něm ve zjednodušení multienzymový komplex zvaný syntáza MK. Syntéza probíhá v cytoplazmě hepatocytů, laktující mléčné žlázy nebo tukových buněk. Výchozím substrátem je pro ni acetyl-CoA. V cytoplazmě buněk lze syntetizovat MK do délky 16 uhlíků, další elongace je možná pouze na membráně endoplazmatického retikula nebo v mitochondriích. Vzniklé saturevané kyseliny mohou být pomocí desaturáz přeměněny na nenasycené MK. U živočichů jsou exprimovány pouze desaturázy Δ 5, Δ 6 a Δ 9, což je důvodem, proč lidské tělo nedokáže syntetizovat *de novo* ω -6 a ω -3 PUFA [45].

2.6.1 Nasycené mastné kyseliny

SFA se hojně vyskytují v celé řadě rostlinných olejů a živočišných tuků. Mají řadu prokázaných účinků na lidské zdraví a je zřejmé, že jednotlivé kyseliny se v účinku liší. SFA (C10-C18) jsou schopny pomocí regulace několika transkripčních faktorů jako je SREBP (z angl. Sterol response element binding protein) a HNF-4 (z angl. Hepatocyte nuclear factor

4) nebo aktivace jaderných receptorů LXR/RXR (z angl. Liver X receptor/ Retinoic X receptor) ovlivňovat lipidový metabolismus. SFA například přispívají ke zvyšování plazmatické koncentrace LDL-cholesterolu (LDL-c), liší se však v účinnosti: stearová kyselina < palmitová kyselina < laurová kyselina < myristová kyselina. Rozsáhlá studie Zhenga a kolektivu [46] hodnotící vztah nasycených mastných kyselin na různé metabolické indikátory u více než 15 000 zdravých dospělých z 8 států Evropy prokázala, že kyselina myristová pozitivně koreluje s krevní koncentrací TAG, apolipoproteinem A1 a alaninaminotrasferázou. Kyselina palmitová je inverzně asociována s koncentrací HDL-c a pozitivně asociována s TAG a CRP.

Kyselina laurová a palmitová jsou schopny indukovat aktivaci transkripčního faktoru NF-κB (z angl. Nuclear factor-κB) [42]. Tento transkripční faktor je přítomen ve většině buněk a má klíčovou roli v regulaci zánětu. Reguluje produkci cytokinů IL-1, 2, 6, 12, TNF-α, chemokinů IL-8 a monocytárního chemotaktického proteinu 1, adhezních molekul a inducibilních enzymů jako je syntáza NO nebo cyklooxygenáza 2 [47]. Efekt SFA na NF-κB je řízen aktivací TLR-4 [42]. Zvýšená koncentrace zejména kyseliny laurové, myristové a palmitové je spojena s vyšším rizikem KVO, ICHS, ale i *diabetes mellitus* 2. typu. [42]. Při studiu vlivu akumulace volných SFA v endotelu cév na jeho funkci a rozvoj aterosklerózy bylo zjištěno, že kyselina arachová při koncentraci 34 μmol/l je schopná úplně inhibovat růst endotelových buněk a lze tedy říci, že působí prozánětlivě, pro srovnání stejný účinek byl pozorován u kyseliny myristové až v desetinásobné koncentraci [48]. Přehled vybraných SFA je v tabulce 1.

Tabulka 1 Přehled vybraných nasycených MK (převzato a upraveno dle [43])

SFA se středně dlouhým řetězcem		SFA s dlouhým řetězcem	
Triviální název	Počet uhlíků: dvojně vazby	Triviální název	Počet uhlíků: dvojně vazby
Kapronová	C6:0	Myristová	C14:0
Kaprylová	C8:0	Pentadekanová	C15:0
Kaprinová	C10:0	Palmitová	C16:0
Laurová	C12:0	Marganová	C17:0
		Stearová	C18:0
		Arachová	C20:0
		Behenová	C22:0
		Lignocerová	C24:0
		Cerotová	C26:0

2.6.2 *Cis*-mononenasycené mastné kyseliny

Stejně jako u SFA se účinek konkrétních MUFA může lišit. Mezi hlavní MUFA přijímané stravou patří kyselina olejová (OA, z angl. Oleic acid) a palmitoolejová. Bohatými zdroji obou kyselin jsou rostlinné oleje, pro OA zejména olivový olej, nebo různé živočišné tuky [42]. Přehled zástupců MUFA je v tabulce. 2.

Tabulka 2 Přehled vybraných *cis*-mononenasycených MK (převzato a upraveno dle [43])

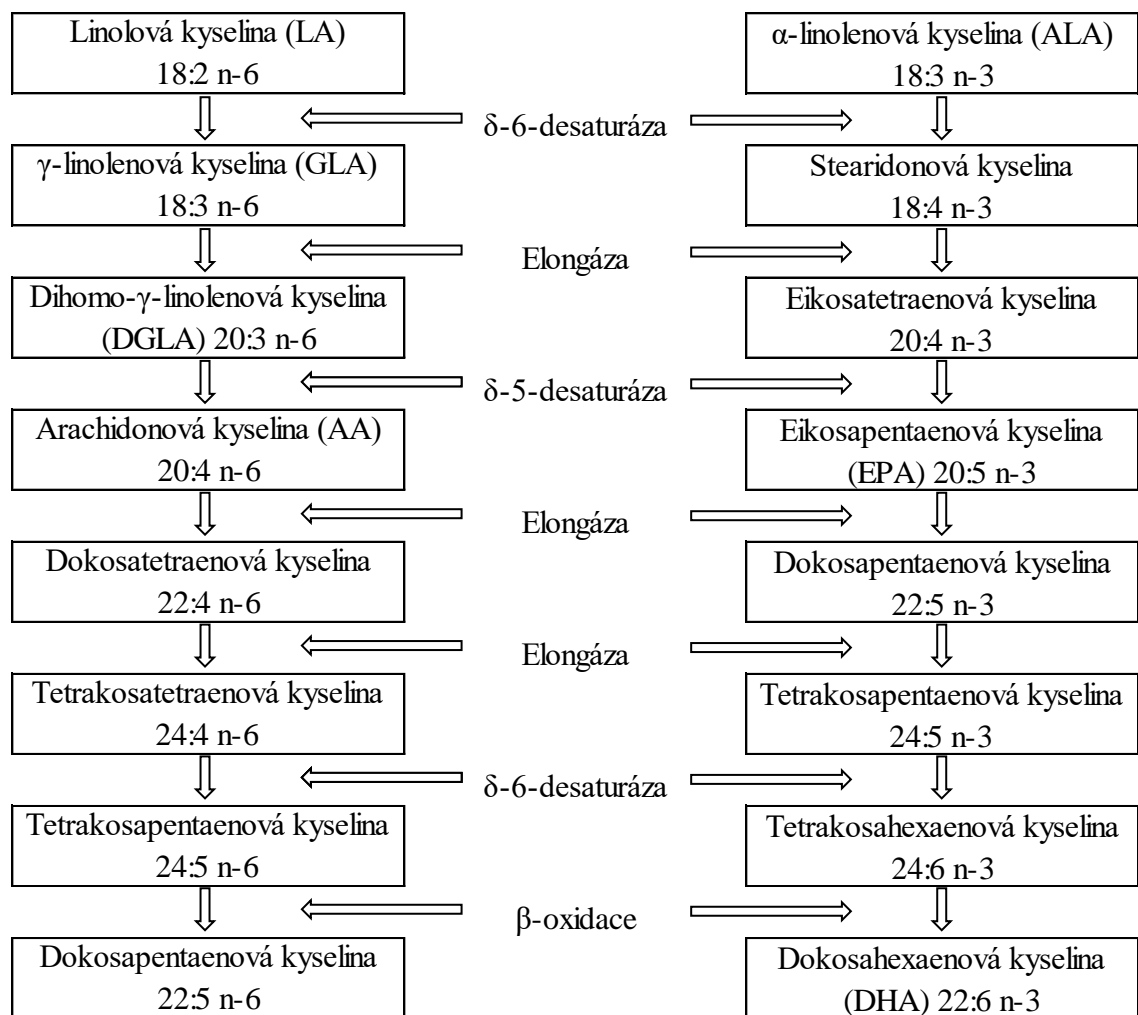
Triviální název	Počet uhlíků: dvojně vazby
Myristoolejová	C14:1 n-7
Palmitoolejová	C16:1 n-7
Petroselinová	C18:1 n-12
Olejová (OA)	C18:1 n-9
Gondová	C20:1 n-9
Cetoleová	C22:1 n-11
Brasidová	C22:1 n-9
Nervonová	C24:1 n-9

Kyselina olejová, ve srovnání s PUFA, činí LDL odolnější vůči oxidaci a lze říci, že působí tedy proti rozvoji zánětu a aterosklerózy. Strava, kde jsou SFA nahrazeny OA, prokazatelně snižuje koncentraci celkového a LDL-c v plazmě, čímž snižuje riziko rozvoje KVO. Snížené riziko KVO se přičítá ale spíše odstranění škodlivého účinku SFA než samotné OA [42]. Reakcí OA a NO vzniká nitroolejová kyselina, která je schopná potlačovat cévní zánět prostřednictvím inhibice exprese adhezních molekul, inhibice rolování monocytů a jejich adheze na cévní endotel [49]. Ve studii [50] publikované v loňském roce bylo zjištěno, že u pacientů podstupujících koronární angiografii, zvýšené procentuální zastoupení OA v erythrocytech inverzně koreluje nejenom s koncentrací LDL-c, ale také s koncentrací HDL cholesterolu (HDL-c). Překvapivě bylo prokázáno, že hladina OA pozitivně koreluje s koncentrací TAG. Dalším zástupcem je kyselina palmitoolejová, taktéž se podílí na metabolismu cholesterolu. Účinek palmitoolejové kyseliny na rozvoj KVO je však nejednoznačný, neboť tato kyselina je zapojena jednak do snižování krevní koncentrace LDL- c a zvyšování HDL-c, ale na druhou stranu je spojována se zvyšováním koncentrace krevních TAG. Mimo jiné se palmitoolejová kyselina podílí na hemostáze schopností snižovat koncentraci fibrinogenu. Nedávno byla palmitoolejová kyselina identifikována jako lipokin se schopností ovlivňovat funkci jater a svalů [51]. Mezi zástupce MUFA s velmi dlouhým řetězcem patří kyselina gondová a nervonová. Kyselina nervonová hraje významnou roli jako

meziprodukt při syntéze myelinu v nervových buňkách a často se používá jako doplněk stravy při chorobách spojených s demyelinizací jako je roztroušená skleróza nebo adrenoleukodystrofie [50].

2.6.3 Polynenasycené mastné kyseliny

Existují dvě skupiny významných PUFA, podle polohy dvojných vazeb označovaných jako ω -6 (n-6) a ω -3 (n-3) PUFA, které jsou zdrojem významných mediátorů podílejících se na regulaci řady fyziologických i patologických procesů [42, 47]. Jejich přehled a metabolická konverze je uvedena na schématu 3. Obecně se n-6 PUFA považují spíše za prozánětlivé, a to zejména díky kyselině arachidonové, zatímco u n-3 PUFA převažuje spíše protizánětlivý účinek. Poměr přijímaných PUFA ve stravě je významně posunut ve prospěch n-6 PUFA, což vede spíše k podpoře prozánětlivých procesů [42, 47].



Obrázek 3 Metabolická konverze n-6 a n-3 PUFA (převzato a upraveno dle [47])

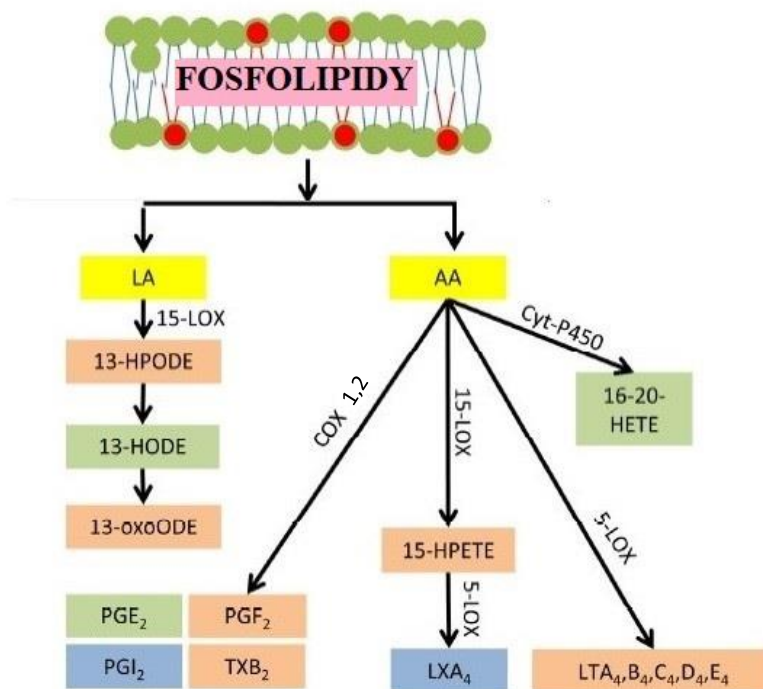
2.6.3.1 Omega-6 polynenasycené mastné kyseliny

Nejjednodušším a jediným esenciálním zástupcem skupiny n-6 PUFA je kyselina linolová (LA, z angl. Linoleic acid). Bohatým zdrojem LA jsou různé rostlinné oleje, ořechy a semena [42, 44]. LA je známá schopností snižovat plazmatickou koncentraci LDL-c prostřednictvím ovlivnění transkripčních faktorů SREBP a receptorů LXR, přičemž účinek na hladinu HDL-c je omezený. Na druhou stranu, nadměrné zastoupení LA v LDL zvyšuje náchylnost těchto částic k oxidaci, čímž působí proaterogenně [42]. LA může být metabolizována na hydroxyoktadekadienové kyseliny (HODE, z angl. hydroxyoctadecadienoic acid), 9-HODE se podílí na zánětlivém procesu a oxidačním poškození buněk, naopak u 13-HODE je prokázán spíše protizánětlivý účinek - jsou schopny inhibovat produkci superoxidu, podporují vasorelaxaci aorty či snižují schopnost migrace polymorfonukleárů po aktivovaném endotelu [52]. Reakcí LA s NO vzniká kyselina nitrolinolová, která je schopná potlačovat cévní zánět prostřednictvím inhibice exprese adhezních molekul, inhibice rolování monocytů a jejich adheze na cévní endotel [49]. Uvádí se, že LA je schopná potlačovat produkci IL-6 indukovanou kyselinou palmitovou. Přesný mechanismus není znám, ale předpokládá se zapojení NF- κ B a proteinkinázy C [53]. Desaturací LA vzniká γ -linolenová kyselina (GLA, z angl. γ -linolenic acid). Na jednoznačném účinku GLA na zánět se vědci prozatím nemohou shodnout, neboť konečný účinek GLA závisí na schopnosti buněk a tkání konvertovat tuto kyselinu na dihomogamma-linolenovou kyselinu, která má spíše protizánětlivé účinky, anebo dále na kyselinu arachidonovou, u které převažují účinky podporující rozvoj zánětlivého procesu [54].

Velmi významným zástupcem n-6 PUFA je kyselina arachidonová (AA, z angl. Arachidonic acid). Je prokázáno, že hladina LA v membránách erytrocytů negativně, a poměr AA/LA pozitivně, koreluje se závažností ischemické choroby srdeční [55].

AA a její oxidační produkty mohou regulovat transkripci buněčných (jaderných) receptorů NF- κ B, PPAR nebo SREBP-1c, čímž mohou následně ovlivňovat celou řadu buněčných aktivit [54]. AA v membránových fosfolipidech slouží jako substrát pro syntézu lipidových zánětlivých mediátorů – eikosanoidů [42, 44, 47, 56]. Eikosanoidy odvozené od AA zahrnují například hydroperoxyeikosatetraenové kyseliny, prostaglandiny (PG) a tromboxany (TX) 2. řady, leukotrieny (LT) 4. řady a lipoxiny. Prvním krokem biosyntézy eikosanoidů je uvolnění esterifikované formy AA z fosfolipidů buněčné membrány pomocí fosfolipáz. Dále jsou uvolněné MK metabolizovány konkrétními cyklooxygenázami (COX), lipoxygenázami (LOX) nebo epoxydázami (cytochrom p450). Výsledkem jsou již zmíněné různé třídy

eikosanoidů [56], jak je zobrazeno na obrázku 4. Prostaglandiny jsou hojně produkovány monocyty a makrofágy, tromboxany krevními destičkami a leukotrieny bílými krvinkami, konkrétně například LTB_4 je produkován monocyty, makrofágy a neutrofilny, nebo LTC_4 , LTD_4 a LTE_4 jsou produkovány hojně žírnými buňkami, eozinofily nebo bazofily [47].



Obrázek 4 Některé lipidové mediátory vznikající z LA a AA (převzato a upraveno dle [56])

Oranžově značené mediátory působí prozánětlivě, modrá pole znázorňují zánět-vstřebávající mediátory a zelené mediátory mají variabilní funkci. HPODE; hydroperoxyoktadekadienová kyselina, HODE; hydroxyoktadekadienová kyselina, oxoODE; oxooktadekadienová kyselina, HPETE; hydroperoxyeikosatetraenová kyselina, PG; prostaglandin, LX; lipoxin, LT; leukotrien, HETE; hydroxyeikosatetraenová kyselina.

Účinek eikosanoidů na různé buňky je zprostředkován pomocí receptorů spřažených s G-proteiny (GPR), tyto receptory se nachází obvykle na plazmatické membráně, ale mohou se vyskytovat i na jaderné membráně [47]. Eikosanoidy mají často navzájem protichůdné účinky, čímž se podílejí na zajištění řízené biologické odezvy [42]. Převažuje však již zmíněný prozánětlivý účinek. Například TXB_2 je účinný vazokonstriktor a aktivátor krevních destiček. LTB_4 působí jako důležitý aktivátor neutrofilů, chemoatraktant leukocytů, indukuje uvolňování lyzozomálních enzymů, zrychluje produkci reaktivních forem kyslíku a zvyšuje vaskulární propustnost. Také vede k tvorbě zánětlivých cytokinů, jako jsou $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ a $IL-6$ u makrofágů [47]. Výjimkou je například lipoxin A_4 , který působí pro rezoluci zánětu nebo PGI_2 a částečně i PGE_2 , který má jednak prozánětlivý, ale i zánět vstřebávající účinek [56].

Působením epoxygenáz na AA mohou mimo jiné vznikat i epoxyeikosatrienové kyseliny známé svým protizánětlivým účinkem, například down-regulují transkripční faktor NF- κ B nebo jsou schopny inhibovat účinek cyklooxygenázy 2. Nicméně jsou velmi nestabilní a jsou rychle hydrolyzovány na méně biologicky aktivní dihydroeikosatrienové kyseliny. Dle studie [57] je prokázáno, že pacienti s ICHS mají signifikantně vyšší hladiny dihydroeikosatrienových kyselin ve srovnání se zdravou populací a současně koncentrace dihydroeikosatrienových kyselin pozitivně koreluje s koncentrací CRP, což naznačuje, že pokles koncentrace epoxyeikosatrienových kyselin může mít roli v rozvoji zánětlivého procesu.

Syntéza eikosanoidů odvozených od AA se odvíjí i od koncentrace dihomog γ -linolenové kyseliny (DGLA, z angl. Dihomo- γ -linolenic acid). V buňce neesterifikovaná DGLA soutěží s AA o COX a LOX enzymy, výsledkem je produkce prostaglandinů 1. série, respektive hydroxyeikosatrienových kyselin. Vzniklé eikosanoidy odvozené od DGLA jsou známy svým protizánětlivým účinkem, podporou vasodilatace, schopností snižovat krevní tlak a schopností inhibovat proliferaci buněk hladké svaloviny [54]. Dle výsledků studie [58] vyplývá, že vyšší koncentrace DGLA je nezávislý prediktor sedmiletého přežití u pacientů hospitalizovaných pro AKS.

Mezi další prozánětlivé lipidové mediátory odvozené od AA se řadí i hepoxiliny, které mají například schopnost působit chemotakticky na neutrofile. Deriváty odvozené od AA, jako anandamid nebo 2-arachidonylglycerol, které se označují jako endokanabinoidy, jsou schopné působit protizánětlivě prostřednictvím down-regulace transkripčního faktoru NF- κ B [49].

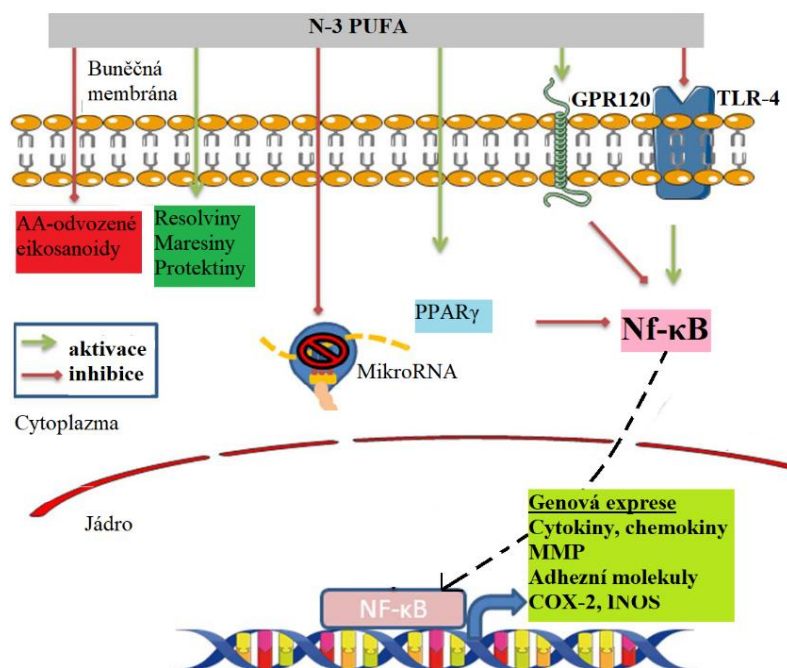
2.6.3.2 Omega-3 polynenasycené mastné kyseliny

Nejjednodušším členem skupiny n-3 PUFA je kyselina α -linolenová (ALA, z angl. α -Linolenic acid). ALA je jedinou skutečně esenciální n-3 PUFA a jejím hlavním zdrojem jsou například rostlinné oleje, ořechy či různá semena. ALA může být v lidském organismu metabolizována na významnou kyselinu eikosapentaenovou (EPA, z angl. Eicosapentaenoic acid) a dokosahexaenovou (DHA, z angl. Docosahexaenoic acid). Mezi potraviny s vysokým obsahem EPA a DHA patří různé mořské plody a výrobky z rybího oleje [44, 49].

EPA a DHA mají schopnost ovlivňovat řadu významných transkripčních faktorů (NF- κ B, PPAR- α a γ nebo SREBP), výsledkem je regulace exprese genů zapojených do metabolismu lipidů, diferenciaci adipocytů nebo řízení zánětu, viz dále. EPA a DHA jsou schopny snižovat koncentraci krevních TAG, mírně zvyšují krevní koncentraci LDL a HDL cholesterolu a navíc zvyšují velikost LDL částic, čímž je činí méně aterogenní. Na druhou stranu, LDL částice bohaté na EPA a DHA jsou náchylnější k oxidační modifikaci [42].

Je prokázáno, že pacienti trpící ICHS mají statisticky signifikantně snížené hladiny DHA a omega-3 index a zvýšený poměr n-6/n-3 v membránách erytrocytů ve srovnání se zdravými jedinci. Omega-3 index je označení pro procentuální zastoupení EPA + DHA z celkových MK v membránách erytrocytů, přičemž hodnoty nižší než 4 % se považují za významný rizikový faktor rozvoje KVO [59]. O EPA a DHA lze říci, že snižují riziko rozvoje KVO a udává se, že je možné je použít i k léčbě již probíhajících KVO [42].

Jak již bylo zmíněno, EPA a DHA mimo jiné své funkce, významně ovlivňují zánět, a to několika cestami, jak je znázorněno na obrázku 5.



Obrázek 5 Vliv n-3 PUFA na zánět (převzato a upraveno dle [49])

N-3 PUFA působí protizánětlivě prostřednictvím schopnosti kompetovat s n-6 PUFA o klíčový enzym Δ -6-desaturázu. Tento enzym je potřebný jednak na přeměnu ALA (na stearidonovou kyselinu, ze které následně v několika krocích vznikají EPA a DHA), ale také na přeměnu LA na γ -linolenovou kyselinu, ze které přes dihomog γ -linolenovou kyselinu vzniká již zmíněná AA [42, 44, 49]. Afinita Δ -6-desaturázy pro ALA a LA se však liší. Při poměru 1:1- 4 přijímaných n-3/n-6 PUFA ve stravě by byly přednostně metabolizovány n-3 PUFA, nicméně vzhledem k tomu, že v běžné stravě obvykle převažují n-6 PUFA (poměr až 1:20), jsou přednostně metabolizovány právě n-6 PUFA. Lze však říci, že zvýšeným příjmem n-3 PUFA s dlouhým řetězcem je možné potlačit tvorbu zánětlivých mediátorů odvozených od AA [47].

N-3 PUFA se dále podílejí na řízení zánětlivého procesu prostřednictvím schopnosti metabolizovat se na zánět vstřebávající mediátory. Působením 12-LOX nebo 15-LOX vznikají z DHA mediátory nazývané resolvinny řady D, maresiny a protektiny. Z EPA mohou vznikat resolvinny řady E působením COX-2, ale jen za současné léčby aspirinem nebo alternativně působením epoxygenázy [56]. Častým účinkem těchto zánět vstřebávajících mediátorů je down-regulace transkripčního faktoru NF- κ B [49]. EPA může sloužit i jako prekurzor pro tvorbu prozánětlivých prostanoidů (tromboxanů, prostacyklinů a prostaglandinů) 3. řady a leukotrienů 5. řady za katalýzy COX a LOX, v uvedeném pořadí. Tyto enzymy se účastní i produkce eikosanoidů odvozených od AA, avšak EPA představuje minoritní substrát pro tyto enzymy a navíc jejich účinek je mnohonásobně nižší ve srovnání s deriváty AA [44].

Dalším mechanismem ovlivnění zánětu je schopnost n-3 PUFA vázat TLR-4, čímž inhibují jeho aktivaci a následnou prozánětlivou signální kaskádu NF- κ B [49]. Jiným mechanismem je potlačení zánětu prostřednictvím vazby receptoru GPR120. Tento receptor je přítomný například na makrofázích a po vazbě neesterifikovaných n-3 PUFA down-reguluje transkripční faktor NF- κ B [42, 49]. Na podobném principu se mohou uplatňovat i receptory PPAR- γ [49].

Stejně tak bylo prokázáno, že n-3 PUFA mohou modulovat zánět prostřednictvím interference s microRNA [49]. Schopnost PUFA modulovat expresi microRNA je poměrně neprobádaná oblast jejich účinku. Touto problematikou se zabývala studie [60] publikovaná v loňském roce. V této studii byly myší buněčné linie monocytů/makrofágů a endotelových buněk kultivovány v prostředí bohatém na DHA nebo AA, a to v prostředí působícího zánětlivého stimulu (lipopolysacharid, cytokiny) nebo v prostředí bez zánětlivého stimulu. V těchto liniích se následně sledovala změna exprese různých microRNA. Byla nalezena významná změna exprese u celé řady různých microRNA v liniích kultivovaných v prostředí bohatém na n-3 PUFA (DHA), ale i buněk kultivovaných prostředí n-6 PUFA (AA), tedy u buněk s významným zabudováním těchto PUFA do membránových fosfolipidů, a to bez ohledu na přítomnost nebo absenci zánětlivého stimulu. Mezi microRNA se změněnou expresí byla i řada microRNA podílejících se na regulaci zánětu. Překvapivých výsledků bylo dosaženo například v linii buněk endotelu kultivovaných s AA bez zánětlivého stimulu, kde byla zjištěna zvýšená exprese microRNA-10a, 17-3p, 125a, 155 nebo microRNA-181b, u kterých byl již dříve prokázán protizánětlivý efekt díky schopnosti snižovat expresi adhezních molekul a zánětlivých cytokinů. Dále bylo prokázáno, že endotelové buňky v prostředí DHA a zánětlivého stimulu snižují expresi microRNA146-a, která je známá svým prozánětlivým účinkem. Ještě

signifikantnější protizánětlivý účinek byl prokázán u linie monocytů/makrofágů kultivovaných v DHA nebo v AA za současného zánětlivého stimulu. Byla totiž nalezena významně snížená exprese microRNA zapojených do TLR signalizace (microRNA-21, 125a, 146a, 146b nebo microRNA-155) a diferenciaci makrofágů.

2.6.4 *Trans*-nenasycené mastné kyseliny

Všechny již dříve zmíněné skupiny nenasycených mastných kyselin měly dvojné vazby vždy v konfiguraci *cis*. *Trans*-nenasycené mastné kyseliny (TFA, z angl. Trans-fatty acids) mohou vznikat z *cis*-izomerů během průmyslového zpracování, při vaření nebo v trávicím traktu přežvýkavců. Pravděpodobně nejznámějšími *trans*-nenasycenými mastnými kyselinami v kontextu lidského zdraví jsou kyselina elaidová, kyselina *trans*-vakcenová a konjugovaný *cis*-9, *trans*-11 nebo *trans*-10, *cis*-12 izomer konjugované kyseliny linolové [42]. Přehled vybraných TFA je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3 Přehled vybraných *trans*-nenasycených MK (převzato a upraveno dle [43])

Triviální název	Počet uhlíků: dvojné vazby
Petroselaidová	C18:1 n-12
Elaidová	C18:1 n-9
<i>Trans</i> -vakcenová	C18:1 n-7
<i>Trans</i> izomery konjugované LA	C18:2

Základní mechanismus účinku se vysvětluje pomocí satureovaných MK, vzhledem k jejich podobným fyzikálním vlastnostem. Nicméně TFA jsou známy jako silnější rizikové faktory pro KVO než SFA. Stejně jako SFA, TFA zvyšují plazmatickou koncentraci LDL-c, navíc však snižují koncentraci HDL-c [42, 61]. Kromě snížení krevní koncentrace HDL-c TFA mění antiaterogenní vlastnosti HDL. Bylo totiž prokázáno, že HDL částice bohaté na kyselinu elaidovou ztrácí svou antioxidační schopnost a indukují vyšší pohlcování oxidovaného LDL makrofágy. Mimo jiné je také prokázána schopnost TFA redukovat velikost LDL částic [61]. U konjugované kyseliny linolové jsou účinky na lipidový metabolismus nekonzistentní, důvodem mohou být různé směsi izomerů použité ve studiích. Stejně tak vliv na zánět není prozatím objasněn [42], ale existují důkazy, že konjugovaný *cis*-9, *trans*-11 izomer kyseliny linolové působí protizánětlivě prostřednictvím modulace a aktivace dendritických buněk [62].

Vztahem koncentrace TFA a CRP a fibrinogenu se zabývala americká studie publikovaná v loňském roce [63]. Dle výsledků této studie koncentrace sérových (esterifikovaných i neesterifikovaných) *trans*-nenasycených mastných kyselin (konkrétně

trans-9-hexadecenové kyseliny, kyseliny elaidové, kyseliny *trans*-vakcenové a kyseliny linolelaidové) pozitivně korelují s krevní hladinou CRP i fibrinogenu. Předpokládá se, že existuje více mechanismů, kterými TFA ovlivňují zánět. Jsou například schopny up-regulovat transkripční faktor NF-κB a zvyšují intracelulární produkci reaktivních forem kyslíku. Dále je prokázáno, že vyšší příjem TFA stravou koreluje s dysfunkcí cévního endotelu, která se projevuje zvýšenou expresí adhezních molekul nebo zvýšenou protrombotickou aktivitou. Proadhezivní fenotyp endotelu potencuje zánět a aterosklerózu. Předpokládá se, že účinek je zprostředkován přes TLR-4 [61].

2.7 Vliv mastných kyselin na rozvoj in-stent restenózy

Několik studií se zabývalo i vztahem MK a výskytem restenózy po perkutánní intervenci. Ve studii pacientů podstupujících implantaci stentu do karotidy bylo zjištěno, že podávání EPA a DHA před zákrokem a následné podávání po dobu 12 měsíců významně stabilizuje karotidový plak a významně snižuje incidenci restenózy ve stentu [64]. Protektivní vliv EPA potvrzuje i japonská studie pacientů s akutním infarktem myokardu, kteří podstoupili PCI. Polovina pacientů dostávala po dobu 1 měsíce 1800 mg EPA denně. U pacientů se primárně hodnotil výskyt smrti, mrtvice, reinfarktu, ventrikulární arytmie a paroxysmální atriální fibrilace a sekundárně hladina CRP. Při porovnávání primárních výstupů, došlo k významnému snížení výskytu závažných komplikací ve skupině užívající EPA v porovnání s kontrolou, konkrétně 10,5 vs 29,3 %. Při hodnocení CRP, byly hodnoty maximálního zvýšení nižší ve skupině užívající EPA [65]. Naproti tomu u pacientů, kterým bylo podáváno 5,1 g/den EPA+DHA 14 dní před PCI (bez implantace stentu) a následně po dobu 6 měsíců, nebyla nalezena snížená incidence restenózy ve srovnání s kontrolní skupinou [66]. Stejnou problematikou se zabývala i studie [67], kde však byla ve skupině léčené EPA+DHA prokázána mírně, ale významně, snížená incidence restenózy, na rozdíl od skupiny s placebem.

2.8 Stanovení mastných kyselin v membránách erytrocytů

Koncentraci mastných kyselin lze stanovit v nejrůznějších orgánech těla. V praxi však převažuje stanovení mastných kyselin v krvi, neboť se jedná o snadno dostupný biologický materiál.

V krvi je možné stanovit MK v plné plazmě (séru) nebo v jednotlivých lipidových frakcích, jako jsou fosfolipidy, estery cholesterolu, TAG či volné MK nebo v membránách

červených krvinek. Využití erytrocytů pro stanovení mastných kyselin se jeví výhodné z několika důvodů. Jedním z nich je skutečnost, že na rozdíl od mastných kyselin v plazmě (séru), jejichž koncentrace je významně ovlivňována stravou, je profil MK v membránách erytrocytů poměrně málo proměnlivý [68]. Navíc je prokázáno, že stanovení MK v membránách erytrocytů poměrně dobře odráží profil mastných kyselin membrán buněk důležitých tkání, jako je například srdeční, svalová, slezinná, plicní či tuková [69].

3 Experimentální část

3.1 Charakteristika souboru pacientů

Studie probíhala ve spolupráci s Kardiologickým oddělením Nemocnice Pardubického kraje po schválení protokolu studie Etickou komisí. Souhlas Etické komise je uveden v příloze A. Do studie byli zařazeni pacienti, kteří podstoupili implantaci jednoho nebo více koronárních stentů pro stabilní *anginu pectoris* nebo nestabilní formy ICHS s více než 50% zúžením koronární arterie. Pacientům byl implantován lékový stent nebo biologicky vstřebatelný, výjimečně holý kovový stent. Vylučujícími kritérii této studie bylo současné zánětlivé onemocnění (hsCRP > 10mg/l), STEMI, kardiogenní šok, významné chlopenní vady, srdeční selhání NYHA III.-IV., intervence na venózních štěpech, onkologické onemocnění, závažné onemocnění ledvin nebo jater, dysfunkce štítné žlázy, těhotenství a léčba kortikoidy.

Všichni zařazení pacienti vyplnili dotazník a podepsali informovaný souhlas se svou účastí ve studii. Studie se zúčastnilo celkem 77 pacientů označených jako P1 až P77. Ze studie byli vyloučeni pacienti, jejichž hladiny hsCRP přesahovaly hodnotu 10 mg/l již před vlastní implantací stentu. Konkrétně se jednalo o pacienty s kódy P5, P11, P14, P16, P34, P39, P48 a P62. Dále byl vyřazen pacient s kódem P22, neboť u něj se zavedení stentu nezdařilo. Při statistickém vyhodnocování byli dále vyřazeni ti pacienti, u kterých nebyly dostupné výsledky všech statisticky hodnocených parametrů. Konkrétně se jednalo o pacienty P27, P28, P35, P56, P59, P67, P74. Při zpracování vzorků červených krvinek došlo u 7 vzorků ke znehodnocení během analytické fáze. Celkem byl ve studii hodnocen profil MK ve fosfolipidech séra a v membránách erytrocytů u 54 pacientů. Základní charakteristiky souboru pacientů jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 Charakteristika pacientů zařazených do studie

	n = 54		n = 54
Muži (n)	40	BMI*	29,4 (6,89)
Ženy (n)	14	Glukóza [mmol/l]*	5,55 (1,48)
Hypertenze (n)	37	Celkový cholesterol [mmol/l]*	3,6 (1,5)
Diabetes mellitus (n)	15	HDL-c [mmol/l]*	1,04 (0,47)
Kouření (n)	9	LDL-c [mmol/l]*	2,1 (0,89)
Statiny (n)	39	TAG [mmol/l]*	1,05 (0,69)
Věk *	64 (14)		

BMI, Body mass index; HDL-c, HDL-cholesterol; LDL-c, LDL-cholesterol; * medián (interkvartilový rozptyl).

3.2 Získání dat pro statistickou analýzu

V nemocnici Pardubického kraje bylo u všech pacientů provedeno standardním způsobem základní biochemické vyšetření krve a vyšetření zánětlivých markerů hsCRP, IL-6, SAA a Cp. Každému pacientovi byla odebrána žilní krev celkem třikrát, a to před implantací stentu a následně 24 a 48 hodin po výkonu (viz tabulka 5). Stanovení hsCRP [mg/l] bylo provedeno analytickým systémem VISTA, stanovení IL-6 [ng/l] pomocí imunochemického analyzátoru Immulite, stanovení SAA [mg/l] pomocí laserového nefelometru BN ProSpec a stanovení Cp [g/l] pomocí imunochemického analyzátoru Integra 400. V laboratořích Univerzity Pardubice byl kvantifikován malondialdehyd [$\mu\text{mol/l}$], jako komplex malondialdehyd-kyselina thiobarbiturová pomocí HPLC s izokratickou elucí, dále profil mastných kyselin v sérových fosfolipidech [$\mu\text{mol/l}$] a profil mastných kyselin v membránách červených krvinek vztažený na obsah hemoglobinu v erytrocytech [$\mu\text{mol/g}$ hemoglobinu] pomocí plynového chromatografu.

Pro stanovení malondialdehydu a MK v membránách erytrocytů byla odebírána krev do zkumavek s antikoagulačním činidlem kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA). Pro stanovení zánětlivých markerů a mastných kyselin v séru byla odebírána krev bez antikoagulačního činidla.

Tabulka 5 Dynamika zánětlivých markerů a markeru oxidačního stresu

	0 hod.	24 hod.	48 hod.	$\Delta 24\text{hod.}$	$\Delta 48\text{hod.}$	Relativní max. změna
hsCRP [mg/l]*	2,71	3,90	4,17	1,08	1,61	0,88
IL-6 [ng/l]*	1,90	4,59	3,21	2,09	0,67	0,82
SAA [mg/l]*	4,25	5,44	6,18	1,45	2,71	0,82
MDA [$\mu\text{mol/l}$]*	1,12	1,40	1,50	0,20	0,27	0,27
Cp [g/l]*	0,20	0,22	0,23	0,02	0,03	0,17

* Medián, n = 54.

Nejvyšší nárůst koncentrace zánětlivých markerů byl pozorován v případě CRP, SAA, MDA a Cp po 48 hodinách od PCI, v případě IL-6 po 24 hodinách. Tyto rozdíly koncentrací byly následně vyděleny počáteční koncentrací, před implantací stentu. Byly tak získány relativní změny koncentrace, označované jako $\Delta\text{CRP}48$, $\Delta\text{SAA}48$, $\Delta\text{IL}6\text{-}24$, $\Delta\text{Cp}48$, $\Delta\text{MDA}48$.

3.3 Statistická analýza dat

Statistické zpracování dat v této práci bylo provedeno pomocí softwaru Statistica 12 (StatSoft s.r.o., Česká republika) a QC. Expert (TriloByte Statistical Software s.r.o, Česká republika). Získané zdrojové matice dat byly podrobeny nejprve exploratorní průzkumové analýze. Proměnlivost znaků byla šetřena krabicovými grafy a podobnost mezi objekty ikonovými grafy. Dále byla data statisticky hodnocena metodou hlavních komponent, faktorovou analýzou a shlukovou analýzou. Vliv MK na dynamiku zánětlivé reakce po implantaci stentu byl testován vícenásobnou lineární regresí.

3.4 Stanovení mastných kyselin

3.4.1 Přístrojové vybavení, pomůcky, chemikálie

Přístroje

- Plynový chromatograf: Agilent Technologies 7890A GC Systém, sériové číslo: CN 10361012
Výrobce: Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- Kolona: HP-88, 100 m x 0,250 mm x 0,20 µm, teplotní limit 50 °C - 250 °C, pro dělení methylesterů mastných kyselin, sériové číslo: USE1998813H
Výrobce: Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- Termoblok-odpařovací zařízení: Reacti-Therm I Heating/Stirring Module, sériové číslo: 0001100800010
Výrobce: Thermo Fischer Scientific Bellefonte, 28 Schenck Parkway, Asheville, Severní Karolína 28803 USA
- Centrifuga: MPW-340
Výrobce: Mechanyka Precyzna, Polsko
Distributor: Servis Unimed, Vestec 41, 252 42 Vestec u Prahy, Česká republika
- Třepačka: Vortex typ Reax top, sériové číslo: 100934934
Výrobce: Heidolph Instruments GMBH & CO. KG, Walpersdorfer Strasse 12, 911 26 Schwabach, Německo
- UV Lampa: 240 - 230 V, sériové číslo: 5224010904
Výrobce: A. Krüss Optronic GmbH, Alsterdorfer Strasse 276-278, 222 97 Hamburg, Německo

- Odstředivka MiniSpin Eppendorf AG: sériové číslo:5452ZG652858
Výrobce: Eppendorf, Německo
- Desaga spray gun: Dünnschicht-chromatographie, Thin-layer
Výrobce: Desaga GmbH D-690 Heidelberg 1, Německo
- Spektrofotometr LIBRA S6H, 80-5000-11, sériové číslo: 116375
Výrobce: Biochrom Ltd, Cambridge, CB 4 OFJ Anglie
- Počítač

Pomůcky

- TLC desky: TLC Silica gel 60, balení 25 kusů 20 x 20 cm, exp. 31. 8. 2018
Distributor: MERCK spol. s. r. o., Zdebradská 72, 251 01 Říčany, Česká republika
- Automatické pipety (rozsah 10-100 µl, 100-1000 µl)
- Skleněné pipety (1, 5, 10 ml), pipetovací balónek
- Krokovací pipeta pro opakované dávkování
- Kádinky, odměrné baňky, odměrné válce
- Nálevka
- Pasteurovy skleněné pipety
- Chromatografická vana
- Zkumavky a stojánky na zkumavky
- Pyrexové zkumavky
- Chromatografické vialky
- Inzerty do chromatografických vialek
- Víčka s pryžovým septem na chromatografické vialky
- Crimper kleště
- Špachtle
- Pravitko
- Magnetická míchadla
- Plastové zkumavky Eppendorf 2 ml

Chemikálie

Deproteinační roztok (2-propanol:n-heptan:kyselina fosforečná)

- Isopropylalkohol, p.a., balení 1000 ml, obsah 99,8 %, Mr = 60,1 g/mol, $\rho = 780 \text{ kg/m}^3$, číslo šarže: PP/2015/12107

Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, Česká republika

- n-heptan, čistý, balení 1000 ml, Mr = 100,21g/mol, $\rho = 680 \text{ kg/m}^3$, číslo šarže: PP/2010/14672

Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, Česká republika

- Kyselina fosforečná, p.a., balení 1000 ml, obsah 85 %, Mr = 98 g/mol, $\rho = 1700 \text{ kg/m}^3$, číslo šarže: 1801230113

Výrobce: Penta, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, Česká republika

Mobilní fáze pro TLC (hexan:diethylether:kyselina octová)

- n-hexan, p.a., balení 1000 ml, obsah 99 %, Mr = 86,18 g/mol, $\rho = 660 \text{ kg/m}^3$, číslo šarže: PP/2014/05928

Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, Česká republika

- Diethylether, p.a., nestabilizovaný, balení 1000 ml, obsah 99,7 %, Mr = 74,12 g/mol, $\rho = 714 \text{ kg/m}^3$, číslo šarže: 2203060317

Výrobce: Penta, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, Česká republika

- Kyselina octová, čistá, balení 1000 ml, obsah 99 %, Mr = 60,05 g/mol, $\rho = 1050 \text{ kg/m}^3$, číslo šarže: 1907280714

Výrobce: Penta, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, Česká republika

Detekční činidlo

- 2',7'-dichlorfluorescein, 90%, pro TLC, Mr = 401,2 g/mol, číslo šarže: 319108554

Výrobce: Carl Roth GmbH + Co.KG, 76185 Karlsruhe, Německo

Interní standard

- Kyselina heneikosanová (C21:0), Mr = 326,56 g/mol, obsah $\geq 99\%$

Výrobce: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Reidstrasse 2, 895 55 Steinheim, Německo

Externí standard

- Supelco 37 Component FAME mix (profil MK viz tabulka 6), balení 1 x 1 ml, rozpuštěný v dichlormetanu, exp. leden 2019, šarže XA18271V

Výrobce: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Reidstrasse 2, 895 55 Steinheim, Německo

Tabulka 6 Zastoupení MK v externím standardu FAME

Kyselina	Počet uhlíků: dvojně vazby	Kyselina	Počet uhlíků: dvojně vazby
Máselná	C4:0	Linolová	18:2 n-6
Kapronová	C6:0	γ-linolenová	18:3 n-6
Kaprylová	C8:0	Arachová	C20:0
Kaprinová	C10	α-linolenová	C18:3 n-3
Undekanová	C11	Gondová	C20:1 n-9
Laurová	C12	Heneikosanová (IS)	C21
Tridekanová	C13	Eikosadienová	C20:2 n-6
Myristová	C14:0	Dihomo-γ-linolenová	C20:3 n-6
Myristooolejová	C14:1	Behenová	C22:0
Pentadekanová	C15	Eruková	C22:1 n-9
Pentadecenová	C15:1 n-5	Arachidonová	C20:4 n-6
Palmitová	C16:0	Eikosatrienová	C20:3 n-3
Palmitoolejová	C16:1 n-7	Trikosanová	C23
Marganová	C17:0	Dokosadienová	C22:2 n-6
Heptadecenová	C17:1 n-7	Eikosapentaenová	C20:5 n-3
Stearová	C18:0	Lignocerová	C24:0
Elaidová	C18:1 (t) n-9	Nervonová	C24:1 n-9
Olejová	C18:1 n-9	Dokosahexaenová	C22:6 n-3
Linolelaidová	18:2 (t)		

Na základě meze stanovitelnosti a lékařské relevance bylo pro kvantifikaci MK ve vzorcích vybráno celkem dvacet MK (v tabulce označených tučným písmem), představujících zástupce nasycených mastných kyselin, mononenasycených mastných kyselin v *cis* i *trans* konfiguraci a polynenasycených mastných kyselin třídy n-3 a n-6.

Ostatní chemikálie

- Acetylchlorid, Reagent Plus > 99%, balení 500 ml, číslo šarže: STBD5754V
Výrobce: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Reidstrasse 2, 895 55 Steinheim,
Německo

- Methylalkohol, p.a., balení 1000 ml, obsah 99,8 %, $M_r = 32,04 \text{ g/mol}$,
 $\rho = 791 \text{ kg/m}^3$, číslo šarže: 2209270917
Výrobce: Penta, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, Česká republika
- Toluen, p.a., balení 1000 ml, obsah 99 %, $M_r = 138,21 \text{ g/mol}$, $\rho = 867 \text{ kg/m}^3$,
číslo šarže: PP/2017/09776
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, Česká republika
- Uhličitan draselný, bezvodý, balení 500g, $M_r = 138, 21 \text{ g/mol}$,
číslo šarže: PP/2013/12622
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, Česká republika
- Chloroform, p.a., balení 1000 ml, obsah 99,8 %, $M_r = 119,38 \text{ g/mol}$,
 $\rho = 1483 \text{ kg/m}^3$, číslo šarže: 1611101111
Výrobce: Penta, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, Česká republika
- Dichlormethan, p.a., balení 1000 ml, obsah 99,5 %, $M_r = 84,93 \text{ g/mol}$,
 $\rho = 1330 \text{ kg/m}^3$, číslo šarže: 2207100717
Výrobce: Penta, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, Česká republika
- Standard pro TLC: pool sérum
- Drabkinův roztok pro stanovení hemoglobinu: připraveno 1000 ml
- 0,2 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})$, 0,05 g KCN, 0,14 g KH_2PO_4 doplněno destilovanou H_2O na 1000 ml
- Výrobce použitých chemikálií: Erba Lachema s.r.o., Karásek 2219/1d, 621 00 Brno, Česká republika
- Standardní směs erytrocytů pro stanovení hemoglobinu

Tlakové lahve

- Dusík: N_2 4.0, UN 1066
Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, Česká republika
- Helium: He 5.0, UN 1046
Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, Česká republika
- Vodík: H_2 5.0 $\geq 99, 999$
Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, Česká republika
- Vzduch: O_2 20%, N_2 80%, UN 1956
Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, Česká republika

3.4.2 Odběr krve

Žilní krev byla pacientům odebrána v Nemocnici Pardubického kraje, a to před implantací stentu a následně po 24 a 48 hodin po zákroku. Krev pro získání plazmy byla odebírána do EDTA, centrifugována (10 minut při 3500 otáčkách/min, 4 °C) a následně byla oddělena plazma. Po odstranění vrstvy leukocytů a trombocytů bylo odebráno ze středu sloupce erytrocytů 500 µl erytrocytů do mikrozkušavek, které byly uskladněny při -80 °C. Sérum bylo získáno centrifugací srážlivé krve (10 minut při 3500 otáčkách/min, 4 °C), následně bylo taktéž přepipetováno do mikrozkušavek a uloženo při -80 °C.

3.4.3 Metoda stanovení mastných kyselin ve frakci sérových fosfolipidů

Stanovení vybraných mastných kyselin v sérových fosfolipidech na plynovém chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID, z angl. Gas chromatography-flame ionization detector) předcházela extrakce lipidů, získání frakce fosfolipidů pomocí tenkovrstvé chromatografie a derivatizace MK.

Do pyrexové zkumavky bylo napipetováno 400 µl rozmrzlého a řádně promíchaného séra, ke kterému se nadávkovalo 2,5 ml deproteinačního činidla (2-propanol, n-heptan, 2M H₃PO₄ v poměru 40 : 20 : 1). Zkumavka byla uzavřena víčkem s teflonovým těsněním. Následně byl obsah zkumavky promíchán pomocí třepačky Vortex a inkubován 10 min při laboratorní teplotě. Dále byl přidán 1 ml směsi toluenu s metanolem v poměru 4 : 1 a 1,5 ml destilované vody. Po promíchání na Vortexu proběhla desetiminutová inkubace opět při pokojové teplotě. Poté byla zkumavka centrifugována 10 minut při 3000 otáčkách za minutu. Centrifugací došlo k oddělení vodné a organické fáze. Pro další zpracování byla oddělena organická fáze do čisté zkumavky a odpařena do sucha pod dusíkem. Ke vzniklému odparu bylo napipetováno 75 µl směsi chloroformu s metanolem v poměru 2 : 1.

Takto připravený vzorek byl nanesen skleněnou pipetou na předem připravenou chromatografickou desku. Příprava chromatografické desky spočívala ve vyznačení jednotlivých drah. Na desku velikosti 20 x 20 cm byl obyčejnou tužkou vyznačen 2,5 cm od spodní hrany start, na ostatních stranách desky se vyznačily okraje 1cm. Ve vzniklém vnitřním prostoru se vyznačilo 6 drah o šířce 3 cm kolmo ke startu. Vzorek byl nanášen v 5-6 vrstvách na vyznačený start, a to vždy po zaschnutí vrstvy předešlé a velmi opatrně, aby nedošlo k poškrábání desky, což by mohlo negativně ovlivnit migraci vzorku. Po přenesení celého obsahu vzorku byla zkumavka ještě vypláchnuta 25 µl směsi chloroformu s metanolem v poměru 2 : 1 a obsah byl taktéž přenesen na chromatografickou desku. Na jednu

chromatografickou desku bylo možno nanést 5 vzorků. Zároveň se vždy do poslední, 6. dráhy desky nanášelo standardní sérum, které bylo zpracováno totožným způsobem jako séra pacientů.

Takto připravená chromatografická deska byla vložena do chromatografické vany, která byla již nasycena parami mobilní fáze. Mobilní fáze se skládala ze 160 ml hexanu, 40 ml diethyletheru a 6 ml 96% kyseliny octové.

Přibližně po hodině, kdy čelo mobilní fáze dosáhlo vyznačeného konce na chromatografické desce, byla deska vyjmuta. Po oschnutí následovala detekce jednotlivých lipidových frakcí ve dráze standardu pomocí detekčního činidla 2', 7'-dichlorfluoresceinu. Pod UV světlem byly jednotlivé frakce označeny tužkou, tak aby nad i pod skvrnami bylo přibližně 0,5 cm. Pořadí frakcí bylo následující: fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu. Podle standardu byly označena oblast fosfolipidů ve vzorku. Frakce fosfolipidů byla kovovou špachtlí vyškrábána a přenesena do čisté pyrexové zkumavky.

Aby bylo možné stanovit koncentrace přítomných mastných kyselin, bylo nutné je převést na jejich těkavější deriváty. Do pyrexové zkumavky byl napipetován 1 ml interního standardu (kyselina heneikosanová, C21:0, koncentrace 9 µg/ml, rozpuštěná ve směsi toluenu s metanolem v poměru 4 : 1), 1 ml směsi toluenu s metanolem v poměru 4 : 1, přidáno magnetické míchalo a 200 µl acetylchloridu, který slouží jako esterifikační činidlo. Zkumavka byla ihned uzavřena a umístěna do předem vyhřátého termobloku na 100 °C s magnetickým mícháním. Derivatizace probíhala 1 hodinu. Po vyjmutí zkumavky a ochlazení na pokojovou teplotu byl obsah neutralizován 5 ml 6% K₂CO₃. Zneutralizovaná směs byla intenzivně protřepávána po dobu dvou minut. Následovala centrifugace 10 minut při 3000 otáčkách za minutu. Došlo k rozdělení organické a vodné fáze. Organická fáze byla opět přenesena do čisté zkumavky a odpařena pod dusíkem do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve 100 µl dichlormetanu a převeden do chromatografické vialky opatřené inzertem. Vialka byla důkladně uzavřena víčkem s pryžovým septem, řádně označena a analyzována pomocí GC-FID, případně byla před analýzou uskladněna v mrazáku při -20 °C.

3.4.4 Metoda stanovení mastných kyselin v membránách erytrocytů

Příprava vzorku pro stanovení MK v membránách erytrocytů pomocí GC-FID zahrnovala separaci membrán, extrakci lipidů a derivatizaci.

Do plastové mikrozkušavky o objemu 2 ml bylo napipetováno 1800 μl destilované vody a 200 μl rozmrzlých a řádně promíchaných erytrocytů. Vzniklá suspenze byla promíchána pomocí třepačky Vortex a umístěna na 15 minut do mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozmrazení a promíchání byla mikrozkušavka centrifugována 10 minut při 13400 otáčkách za minutu. Tím došlo k separaci membrán erytrocytů na dno zkumavky. Velmi opatrně bylo odebráno 1600 μl supernatantu a napipetováno 1600 μl destilované vody. Po promíchání následovala opět centrifugace 10 minut při 13400 otáčkách za minutu. Tímto způsobem byly membrány erytrocytů promyty třikrát. Po posledním promytí se odebralo 1700 μl supernatantu. K sedimentu erytrocytu byl nadávkován 1 ml deproteinačního roztoku (2-propanol, n-heptan, 2M H_3PO_4 v poměru 40 : 20 : 1). Směs byla intenzivně promíchána pomocí Vortexu, tak aby peleta membrán erytrocytů nezůstala na stěně zkumavky. Po desetiminutové inkubaci při pokojové teplotě bylo přidáno 400 μl interního standardu (kyselina heneikosanová, C21:0, koncentrace 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, rozpuštěná ve směsi toluenu s metanolem v poměru 4 : 1) a 300 μl destilované vody. Suspenze byla opět promíchána na Vortexu a centrifugována 10 minut při 3000 otáčkách za minutu. Došlo k separaci organické a vodné fáze. Organická vrstva byla přepipetována do čisté pyrexové zkumavky a odpařena pod dusíkem do sucha.

Následovala derivatizace. Do zkumavky bylo přidáno 2 ml směsi toluenu s metanolem v poměru 4 : 1, magnetické míchadlo a 200 μl acetylchloridu. Pečlivě uzavřená zkumavka byla umístěna na 1 hodinu do vyhřátého termobloku na $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a za stálého magnetického míchání probíhala esterifikace MK na jejich těkavější metylestery. Další postup byl totožný jako při zpracování séra.

Stanovení hemoglobinu ve vzorcích erytrocytů

Vzhledem k tomu, že každý pacient může mít v krvi rozdílný počet červených krvinek, který by mohl do značné míry ovlivnit koncentrace mastných kyselin, výsledné koncentrace mastných kyselin byly vztaženy na 1 g hemoglobinu (Hb) stanoveného přímo ve vzorku separovaných erytrocytů.

Ve zkumavce bylo smícháno 5 ml Drabkinova roztoku s 20 μl suspenze erytrocytů od pacienta (případně standardních). Obsah zkumavky byl řádně promíchán a inkubován 15 - 20 minut. Následně byla stanovena absorbance při vlnové délce 540 nm. Množství hemoglobinu ve vzorku pacienta bylo pak vypočítáno pomocí absorbance standardu a jeho známé koncentrace hemoglobinu.

3.4.5 Kvantifikace mastných kyselin pomocí plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem

Vzorky byly dávkovány do GC pomocí autosampleru. Objem nástřiku byl u vzorků 1 µl respektive 0,2 µl v případě externího standardu.

3.4.5.1 Teplotní programy na koloně

Teplotní program pro stanovení MK v sérových fosfolipidech

Počáteční teplota byla 130 °C po dobu 1 minuty, následoval teplotní gradient:

- o 2 °C za minutu na teplotu 176 °C po dobu dvou minut
- o 1 °C za minutu na teplotu 186 °C po dobu jedné minuty
- o 0,2 °C za minutu na teplotu 196 °C po dobu jedné minuty
- o 1 °C za minutu na teplotu 220 °C po dobu čtyř minut

Celková doba analýzy byla 92 minut. Analýza probíhala v modu split 10:1.

Teplotní program pro stanovení MK v membránách erytrocytů

Počáteční teplota byla 130 °C po dobu 1 minuty, následoval teplotní gradient:

- o 2 °C za minutu na teplotu 176 °C po dobu dvou minut
- o 1 °C za minutu na teplotu 186 °C po dobu jedné minuty
- o 0,2 °C za minutu na teplotu 190 °C po dobu jedné minuty
- o 1 °C za minutu na teplotu 220 °C po dobu jedné minuty
- 3 °C za minutu na teplotu 250 °C po dobu 21 minut

Celková doba analýzy byla 120 minut. Analýza probíhala v modu split 10:1.

3.4.5.2 Vyhodnocení chromatografických záznamů

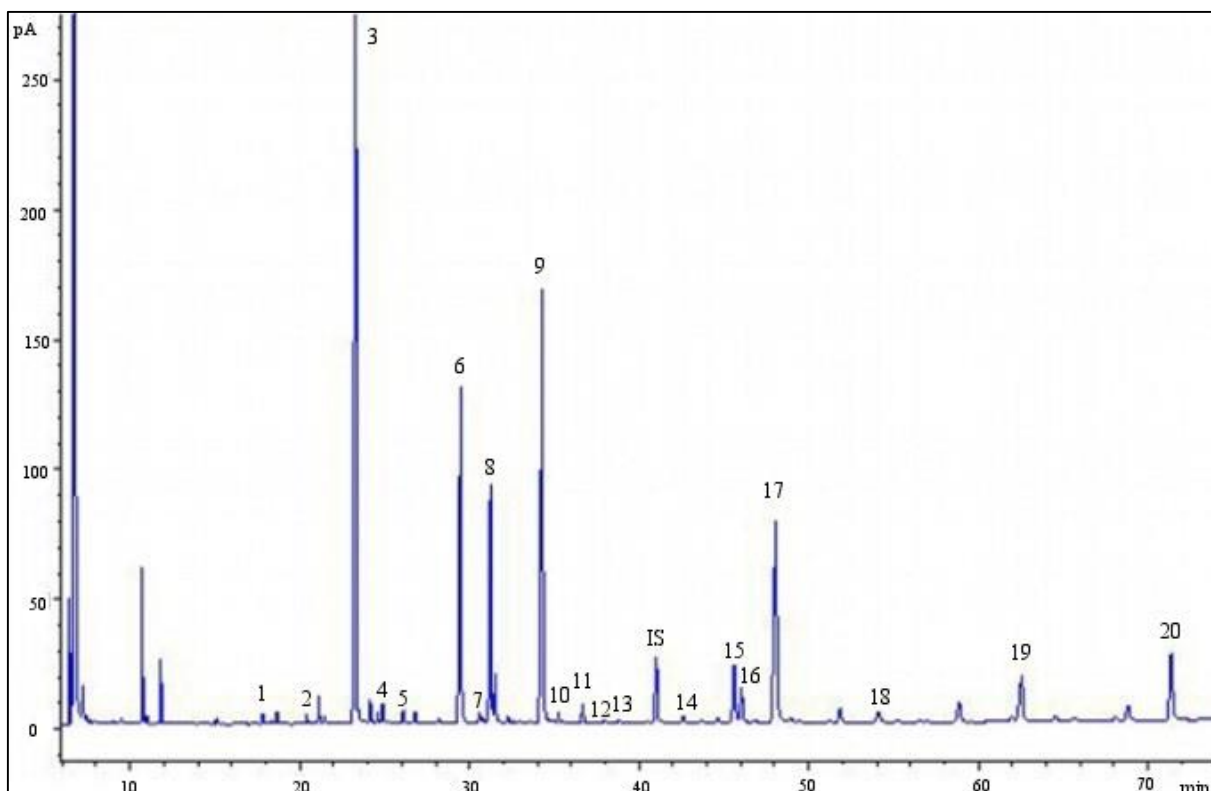
Pro stanovení koncentrace vybraných mastných kyselin ve vzorcích byl použit standardní roztok methyl esterů mastných kyselin (FAME, z angl. Fatty acids methyl esters). Standardní roztok byl analyzován pro každou sérii analyzovaných vzorků. Všechny chromatografické záznamy byly hodnoceny pomocí počítačového softwaru. Identifikace MK byla provedena na základě retenčních časů. Z chromatogramu FAME standardu byly získány plochy píků kyselin včetně interního standardu. Pomocí známých koncentrací kyselin a ploch píků byly vypočítány tzv. vnitřní „response“ faktory (IRF, z angl. Internal response factors).

$$\text{IRF} = \frac{\text{koncentrace MK} \times \text{plocha píku IS}}{\text{koncentrace IS} \times \text{plocha píku MK}}$$

Z chromatografických záznamů (obrázek 6) vzorků byly odečteny plochy píků mastných kyselin a jejich koncentrace následně vypočteny dle vztahu:

$$\text{Koncentrace MK} = \frac{\text{koncentrace IS} \times \text{plocha píku MK} \times \text{IRF}}{\text{plocha píku IS}}$$

Získaná koncentrace [$\mu\text{g/ml}$] byla následně přepočítaná na koncentraci v $\mu\text{mol/l}$ v případě fosfolipidů séra, respektive u vzorků erytrocytů na $\mu\text{mol/g}$ hemoglobinu.



Obrázek 6 Ukázka chromatogramu mastných kyselin ve fosfolipidech séra

1, kyselina myristová; 2, kyselina pentadekanová; 3, kyselina palmitová; 4 kyselina palmitolejová; 5 kyselina margarová; 6 kyselina stearová; 7 kyselina elaidová; 8 kyselina olejová; 9, kyselina linolová; 10, kyselina γ -linolenová; 11, kyselina arachová; 12, kyselina α -linolenová; 13 kyselina gondová; IS, interní standard (kyselina heneikosanová); 14, kyselina eikosadienová; 15, dihomu γ -linolenová; 16, kyselina behenová; 17, kyselina arachidonová; 18, kyselina eikosapentaenová; 19, kyselina nervonová; 20, kyselina dokosahexaenová.

4 Výsledky

4.1 Přesnost měření

Pro ověření přesnosti stanovení MK membrán erytrocytů, respektive fosfolipidů séra, bylo použito 10 vzorků suspenze erytrocytů a 10 vzorků séra odebraných od 1 dárce. Vzorky byly zpracovány totožným způsobem jako vzorky od pacientů. Výsledky vypovídající o přesnosti měření (průměr, medián, směrodatná odchylka, variační koeficient) jsou uvedeny v tabulce 7. Variační koeficienty koncentrací MK stanovených ve frakci fosfolipidů séra i v membránách erytrocytů se pohybují do 10 %, což lze považovat za uspokojivé.

4.2 Stanovené koncentrace mastných kyselin v souboru pacientů

Stanovené koncentrace (medián s interkvartilovým rozptylem, minimální a maximální hodnoty) mastných kyselin v membránách erytrocytů a ve fosfolipidech séra v 54 vzorcích pacientů jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 7 Parametry přesnosti stanovení MK v membránách erytrocytů, resp. ve fosfolipidech séra

Kyselina	Označení	MK v membránách erytrocytů [$\mu\text{mol/g Hb}$]				MK ve fosfolipidech séra [$\mu\text{mol/l}$]			
		Průměr	Medián	SD	CV [%]	Průměr	Medián	SD	CV [%]
Myristová	x1	0,0139	0,0140	0,0012	8,90	5,0688	4,9957	0,4711	9,29
Pentadekanová	x2	0,0034	0,0034	0,0003	9,90	2,5024	2,508	0,2275	9,09
Palmitová	x3	1,0294	1,0444	0,0767	7,45	480,7933	498,4868	40,7956	8,49
Palmitoolejová	x4	0,0179	0,0179	0,0011	6,34	11,5949	11,5686	0,8613	7,43
Marganová	x5	0,0100	0,0101	0,0007	7,29	5,0424	5,1238	0,3505	6,95
Stearová	x6	0,6827	0,6666	0,0520	7,61	144,5071	149,5497	11,8199	8,18
Elaidová	x7	0,0227	0,0237	0,0019	8,42	1,6554	1,6166	0,14	8,46
Olejová	x8	0,5314	0,5282	0,0390	7,34	138,6473	143,9766	11,3579	8,19
Linolová	x9	0,3797	0,3857	0,0303	7,97	276,4823	285,748	22,2939	8,06
γ -linolenová	x10	0,0076	0,0079	0,0007	8,54	5,9312	6,1677	0,5842	9,85
Arachová	x11	0,0063	0,0063	0,0006	8,77	0,3874	0,3932	0,0321	8,29
α -linolenová	x12	0,0138	0,0140	0,0009	6,86	1,7643	1,7613	0,1376	7,8
Gondová	x13	0,0179	0,0179	0,0018	9,83	2,0127	2,0304	0,1451	7,21
Eikosadienová	x14	0,0103	0,0103	0,0004	4,08	5,5103	5,5683	0,4145	7,52
Dihomo- γ -linolenová	x15	0,1192	0,1147	0,0088	7,36	67,404	70,098	5,7288	8,5
Behenová	x16	0,0201	0,0203	0,0016	7,81	1,5609	1,5697	0,116	7,43
Arachidonová	x17	0,7358	0,7371	0,0698	9,49	194,0821	199,8515	15,392	7,93
Eikosapentaenová	x18	0,0248	0,0244	0,0011	4,51	17,24	17,4615	1,404	8,14
Nervonová	x19	0,2500	0,2498	0,0183	7,31	33,5371	35,325	3,2265	9,62
Dokosahexaenová	x20	0,2726	0,2723	0,0172	6,32	68,2281	70,2362	5,4693	8,02

SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient.

Tabulka 8 Stanovené koncentrace MK v membránách erytrocytů a v sérových fosfolipidech u vyšetřovaného souboru pacientů

Kyselina	Označení	MK v membránách erytrocytů [$\mu\text{mol/g Hb}$]				MK ve fosfolipidech séra [$\mu\text{mol/l}$]			
		Medián	IQR	Minimum	Maximum	Medián	IQR	Minimum	Maximum
Myristová	x1	0,0167	0,0066	0,0068	0,0588	3,6402	1,3077	1,8223	6,4945
Pentadekanová	x2	0,0072	0,0036	0,0029	0,0157	1,7596	0,6779	1,0612	4,1612
Palmitová	x3	1,3439	0,5367	0,4637	2,1324	269,4804	80,5193	172,8818	440,7108
Palmitoolejová	x4	0,0151	0,0056	0,0060	0,0377	5,1356	2,8672	2,6265	18,6212
Marganová	x5	0,0243	0,0105	0,0080	0,0478	4,8531	1,7002	3,0398	10,6759
Stearová	x6	1,1141	0,3969	0,2934	1,8666	126,7664	34,0508	87,7070	201,6192
Elaidová	x7	0,0072	0,0038	0,0002	0,0173	1,9505	0,5565	1,0864	8,1801
Olejová	x8	0,7200	0,2888	0,2128	1,1326	83,9545	26,4443	45,7741	205,0434
Linolová	x9	0,4965	0,2661	0,0561	0,8310	152,0862	67,9177	80,9041	350,9670
γ -linolenová	x10	0,0021	0,0017	0,0001	0,0083	0,8363	0,5190	0,2054	3,1575
Arachová	x11	0,0156	0,0054	0,0050	0,0266	3,4317	1,0889	1,3824	6,7769
α -linolenová	x12	0,0060	0,0032	0,0009	0,0126	1,4603	0,8525	0,6018	4,8376
Gondová	x13	0,0125	0,0070	0,0026	0,0212	1,3312	0,3914	0,8730	2,6301
Eikosadienová	x14	0,0125	0,0051	0,0011	0,0210	2,9388	1,1113	1,1992	6,3609
Dihomo- γ -linolenová	x15	0,0954	0,0528	0,0033	0,1748	31,1784	17,0450	13,4213	60,6884
Behenová	x16	0,0555	0,0258	0,0165	0,1012	8,7779	2,4787	1,6457	17,0141
Arachidonová	x17	1,1871	0,6419	0,0157	1,9294	97,6707	25,0823	67,2738	175,3423
Eikosapentaenová	x18	0,0388	0,0312	0,0001	0,0833	8,8281	6,6477	2,6165	39,7604
Nervonová	x19	0,2165	0,0861	0,0705	0,3470	17,2103	4,9010	2,6608	30,7659
Dokosahexaenová	x20	0,3103	0,1916	0,0216	0,6620	27,5098	9,6405	16,2894	66,4986

IQR, Interkvartilový rozptyl.

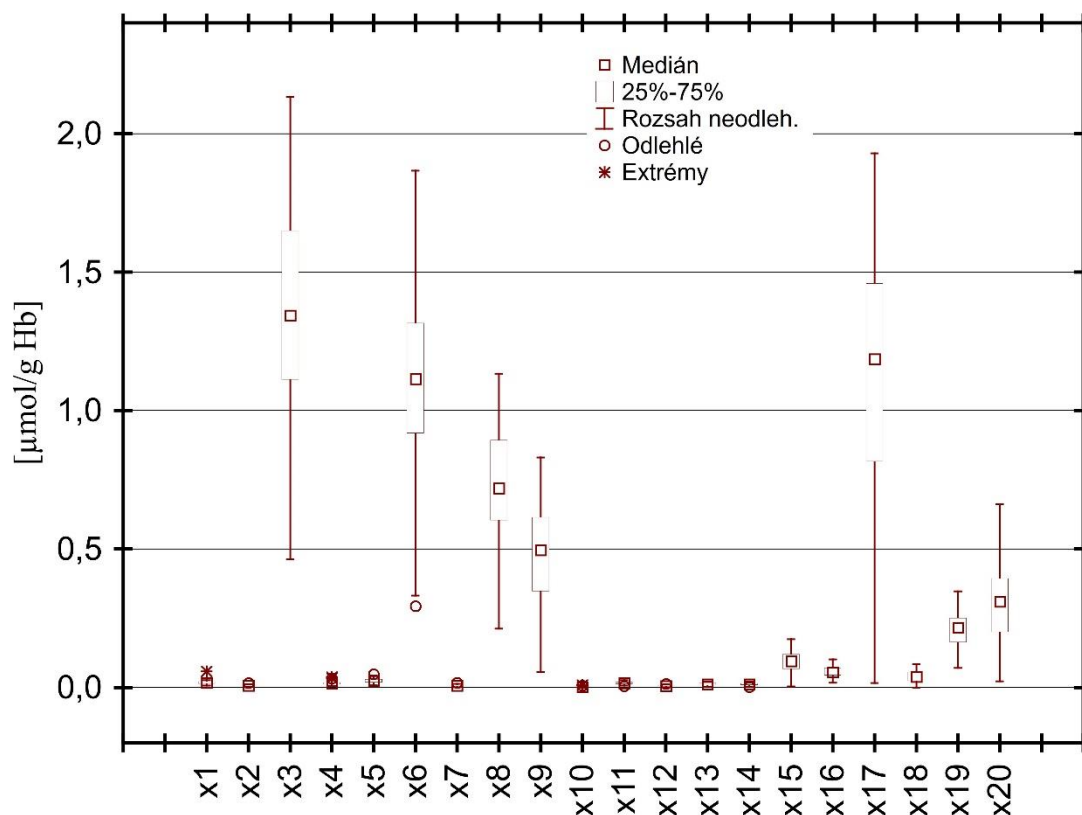
4.3 Exploratorní průzkumová analýza mastných kyselin v membránách erytrocytů

Cílem práce bylo vyšetřit, zda mastné kyseliny v membránách erytrocytů mají vliv na změnu zvolených zánětlivých markerů (CRP, IL-6, SAA a Cp) a indikátoru oxidačního stresu MDA u pacientů podstupujících perkutánní koronární intervenci s následnou implantací stentu. Před vyšetřením navrženého modelu bylo nutné ověřit předpoklady, kladené na zdrojovou matici dat. Výchozí zdrojová matice k vyšetření vztahu mastných kyselin (zde nezávisle proměnných) obsahovala 54 řádků (pacientů), označovaných jako P1 až P54 a 20 znaků (mastných kyselin) ve sloupcích označovaných x1 až x20, viz tabulka 9.

Tabulka 9 Znaky zdrojové matice (MK v membránách erytrocytů)

Označení	Počet uhlíků: dvojně vazby	Mastná kyselina
x1	C14:0	Myristová
x2	C15	Pentadekanová
x3	C16:0	Palmitová
x4	<i>cis</i> -C16:1 n-7	Palmitoolejová
x5	C17:0	Marganová
x6	C18:0	Stearová
x7	<i>trans</i> -C18:1 n-9	Elaidová
x8	<i>cis</i> -C18:1 n-9	Olejová
x9	<i>all cis</i> -18:2 n-6	Linolová
x10	<i>all cis</i> -18:3 n-6	γ -linolenová
x11	C20:0	Arachová
x12	<i>all cis</i> -C18:3 n-3	α -linolenová
x13	<i>cis</i> -20:1 n-9	Gondová
x14	<i>all cis</i> -C20:2 n-6	Eikosadienová
x15	<i>all cis</i> -C20:3 n-6	Dihomo- γ -linolenová
x16	C22:0	Behenová
x17	<i>all cis</i> -C20:4 n-6	Arachidonová
x18	<i>all cis</i> -C20:5 n-3	Eikosapentaenová
x19	<i>cis</i> -C24:1 n-9	Nervonová
x20	<i>all cis</i> -C22:6 n-3	Dokosahexaenová

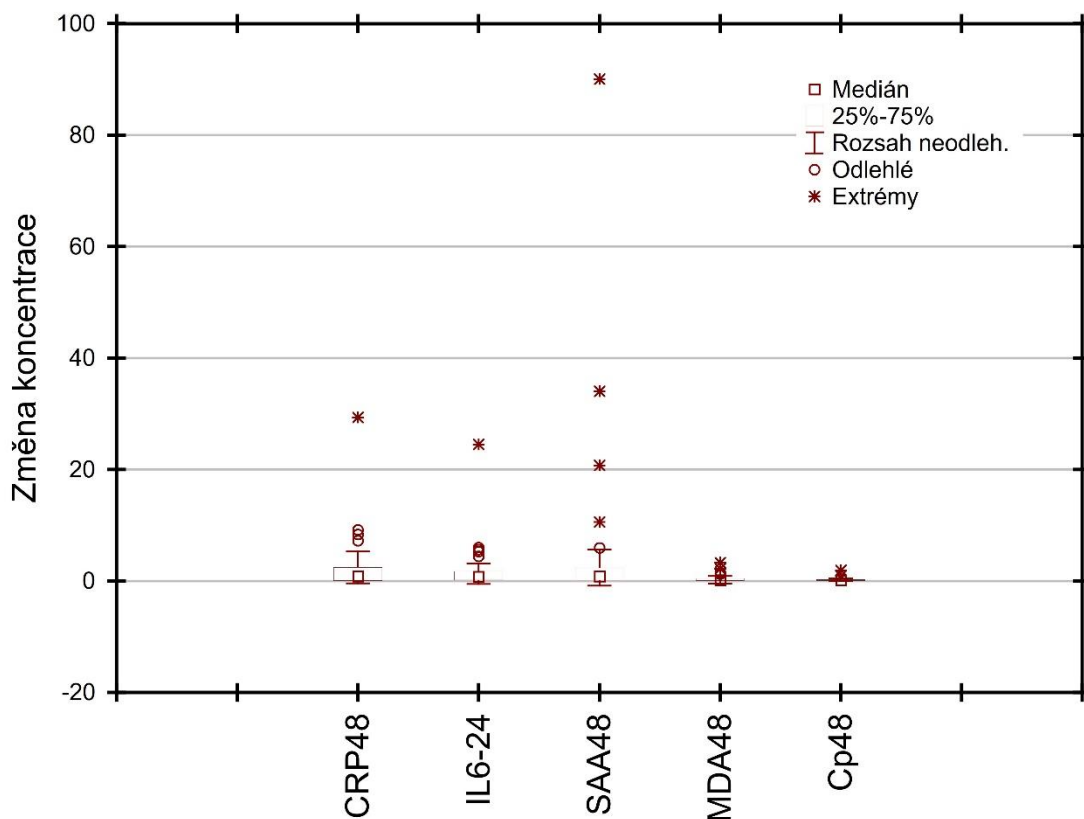
Krabicový graf (obrázek 7) vyjadřuje variability jednotlivých znaků zdrojové matice, zde mastných kyselin.



Obrázek 7 Krabicový graf k vyšetření variability koncentrací MK v membránách erytrocytů

Z krabicového grafu vyplývá, že mezi znaky s největší variabilitou koncentrace patří mastné kyseliny, jako jsou palmitová x3, stearová x6, olejová x8, linolová x9, arachidonová x17 a dokosahexaenová x20. Malou proměnlivost vykazují kyselina dihomo- γ -linolenová x15 a nervonová x19. U těchto kyselin lze zvažovat statisticky významný vliv na zánět indikovaný změnou koncentrací markerů. Mezi kyseliny s minimální či žádnou variabilitou koncentrace patří kyselina myristová x1, pentadekanová x2, palmitoolejová x4, margarová x5, elaidová x7, γ -linolenová x10, arachová x11, α -linolenová x12, gondová x13, eikosadienová x14, behenová x16 a eikosapentaenová x18. Tyto mastné kyseliny se chovají téměř jako konstanty, nemají proto pravděpodobně statisticky významný vliv na zánětlivé markery. Lze říci, že jsou redundantní a jsou kandidáty na vyřazení ze zdrojové matice dat. Nicméně ačkoliv se jeví jako málo proměnlivé, často je stanovení koncentrace některých z nich v lékařském zájmu, protože mohou mít i v nízkých koncentracích velký význam pokud působí například jako signální molekuly. Konkrétně se jedná o kyselinu palmitoolejovou x4, elaidovou x7, α -linolenovou x12

a eikosapentaenovou x18. Dále je z grafu zřejmé, že největší zastoupení v membránách erytrocytů mají kyselina palmitová, stearová, olejová, linolová a arachidonová.

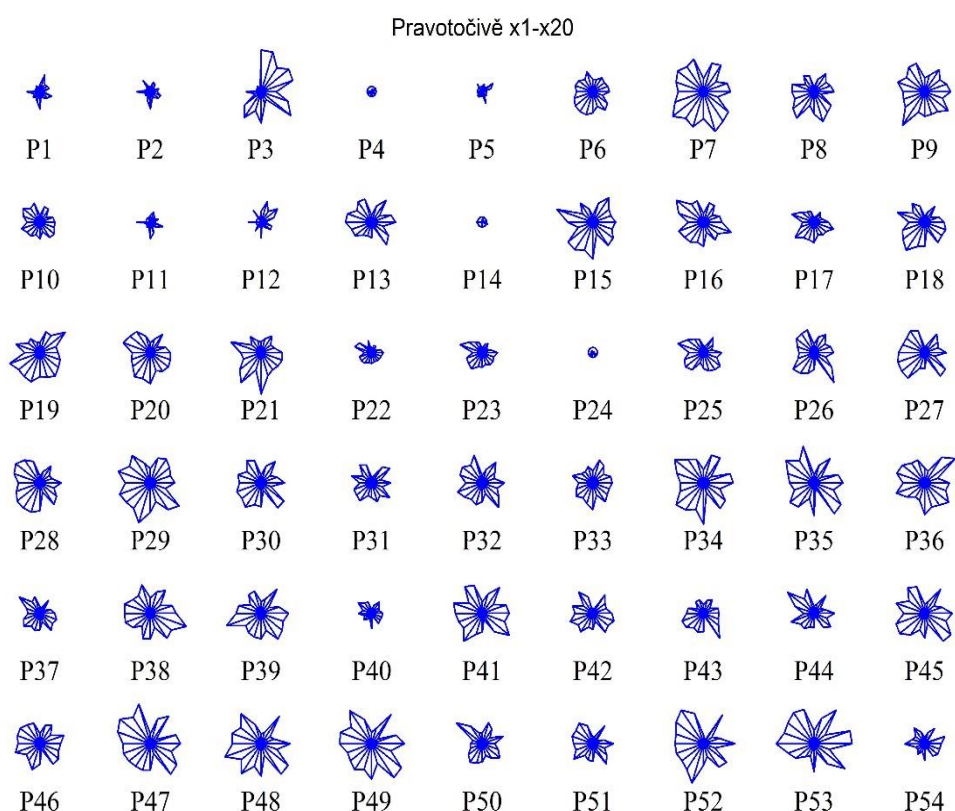


Obrázek 8 Krabicový graf k vyšetření variability změny koncentrace indikátorů zánětu, resp. oxidačního stresu

Z krabicového grafu markerů zánětu a oxidačního stresu na obrázku 8 je zřejmé, že koncentrace indikátorů zánětlivého procesu, resp. oxidačního stresu jsou poměrně málo proměnlivé, ale existují pacienti, u kterých došlo k abnormálnímu navýšení koncentrace CRP za 48 hodin, SAA za 48 hodin nebo u IL-6 za 24 hodin po implantaci stentu. Jednalo se o pacienta P14, u kterého došlo k devadesátinásobnému navýšení koncentrace SAA za 48 hodin a více než dvacetinásobnému navýšení koncentrace CRP za 48 hodin a IL-6 za 24 hodin po implantaci stentu. U tohoto pacienta byla implantace stentu komplikovaná fibrilací komor a byla stanovena přechodně zvýšená koncentrace troponinu I, která svědčí o poškození myokardu. Navíc ode dne před výkonem byl pacient subfebrilní až febrilní, nicméně zdroj zánětu nebyl zjištěn. Parenterálně mu byl aplikován aminopenicilin. Mezi pacienty, u kterých došlo k více než desetinásobnému navýšení SAA patří pacienti P12, P22 a P24. Pacient P12 trpěl respirační insuficiencí pro chronickou obstrukční chorobu plicní a užíval antibiotikum Augmentin (ve sputu *Haemophilus influenzae*, *Candida albicans*). Pacient P24 trpěl

městnavým srdečním selháním II.-III. stupně s dysfunkcí obou komor, v hrotu levé komory mu byl nalezen trombus a byla provedena dilatace všech oddílů srdce. Navíc pacient trpěl plicní hypertenzí a byl kuřák. U pacienta P22 nebyl nalezen žádný konkrétní zdroj navýšení sérové koncentrace SAA, nicméně jednalo se o diabetika 2. typu, trpícího dyslipidémií a hyperurikémií.

Proměnlivost a také podobnost 20 znaků u 54 pacientů lze vyšetřit i pomocí ikonových grafů, které představují zobrazení dvacetirozměrného prostoru do roviny. Každý pacient představuje bod ve vícerozměrném prostoru a dva pacienti jsou si podobní v případě, že je Mahalanobisova vzdálenost mezi nimi minimální [70].



Obrázek 9 Ikonový graf hvězdiček, znázorňující složení mastných kyselin membrán erytrocytů u 54 pacientů

Z ikonového grafu na obrázku 9 je zřejmé, že koncentrace jednotlivých mastných kyselin se mezi pacienty značně liší. Na základě podobnosti tvaru hvězdiček a délek jejich paprsků byli nalezeni pacienti s podobnými koncentracemi mastných kyselin v membránách červených krvinek. Velmi malé hvězdy vyznačují skupinu pacientů, jenž mají velmi nízké koncentrace mastných kyselin. Do této skupiny patří pacienti P1, P2, P4, P5, P11, P12, P14, P22, P24 a P40. Největší hvězdičky byly nalezeny u pacientů P7, P9, P29, P34, P35, P36, P38, P39, P41, P45, P47, P48, P49, P52 a P53. Tuto skupinu lze označit za pacienty s vysokými

koncentracemi MK v membránách erytrocytů. Určitou podobnost lze nalézt mezi pacienty 47, 48 a 49 nebo mezi skupinou pacientů 4, 14 a 24. Zvláštní postavení mezi ostatními má pacient označovaný jako P3, neboť jako jediný vykazuje vyšší koncentrace nasycených a mononenasycených mastných kyselin ve srovnání s koncentracemi polynenasycených mastných kyselin. Pacientka P3 při přijetí trpěla stabilní *anginou pectoris* (CSS II, NYHA klasifikace I), již dříve prodělala infarkt myokardu a implantaci lékového stentu s anamnézou plicní embolie. Dále byla tato pacientka medikamentózně léčena pro *diabetes mellitus* 2. typu a hypertenzi.

Tabulka 10 Korelační matice MK v membránách erytrocytů a zánětlivých markerů: I. část

	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7
x1	1,0000	0,7870	0,5157	0,6154	0,6820	0,3330	0,5294
x2	0,7870	1,0000	0,5493	0,4757	0,8203	0,3959	0,5052
x3	0,5157	0,5493	1,0000	0,4274	0,8022	0,9514	0,5695
x4	0,6154	0,4757	0,4274	1,0000	0,3576	0,2575	0,3125
x5	0,6820	0,8203	0,8022	0,3576	1,0000	0,7184	0,5571
x6	0,3330	0,3959	0,9514	0,2575	0,7184	1,0000	0,5289
x7	0,5294	0,5052	0,5695	0,3125	0,5571	0,5289	1,0000
x8	0,6069	0,6024	0,9507	0,4883	0,8160	0,8990	0,5797
x9	0,2186	0,3530	0,8274	0,2290	0,5783	0,8739	0,4704
x10	0,3108	0,2794	0,3765	0,4783	0,2538	0,3681	0,2427
x11	0,5360	0,5949	0,7416	0,3844	0,6398	0,7124	0,6403
x12	0,3857	0,4373	0,6891	0,3253	0,5224	0,6931	0,4903
x13	0,4092	0,4137	0,7212	0,3984	0,5608	0,7332	0,4705
x14	0,3219	0,4139	0,7736	0,3458	0,5668	0,8234	0,4766
x15	0,1953	0,2477	0,7882	0,3040	0,4751	0,8575	0,4970
x16	0,3416	0,4474	0,9004	0,2427	0,7471	0,8802	0,4589
x17	0,1238	0,2450	0,7850	0,2364	0,4938	0,8880	0,5157
x18	0,1627	0,2948	0,6814	0,0689	0,5119	0,7536	0,3720
x19	0,2050	0,2977	0,8863	0,2164	0,6293	0,9040	0,3874
x20	0,1802	0,3142	0,8203	0,1186	0,6167	0,8909	0,4304
Δ CRP48	-0,0952	-0,1128	-0,3868	-0,1895	-0,2385	-0,3946	-0,3252
Δ IL6-24	-0,0098	-0,0950	-0,3637	-0,1437	-0,2045	-0,3968	-0,2048
Δ SAA48	-0,2036	-0,2233	-0,4145	-0,2832	-0,3109	-0,3893	-0,2920
Δ MDA48	0,1074	0,2372	-0,0493	0,1189	0,0410	-0,1221	-0,0757
Δ Cp48	-0,0410	-0,0266	-0,1334	-0,1878	-0,0985	-0,1416	-0,1690

*Červená barva značí statisticky významné Pearsonovy párové korelačními koeficienty, které mají spočtenou hladinu významnosti vyšší než $\alpha = 0,05$.

Tabulka 11 Korelační matice MK v membránách erytrocytů a zánětlivých markerů: II. část

	x8	x9	x10	x11	x12	x13	x14
x1	0,6069	0,2186	0,3108	0,5360	0,3857	0,4092	0,3219
x2	0,6024	0,3530	0,2794	0,5949	0,4373	0,4137	0,4139
x3	0,9507	0,8274	0,3765	0,7416	0,6891	0,7212	0,7736
x4	0,4883	0,2290	0,4783	0,3844	0,3253	0,3984	0,3458
x5	0,8160	0,5783	0,2538	0,6398	0,5224	0,5608	0,5668
x6	0,8990	0,8739	0,3681	0,7124	0,6931	0,7332	0,8234
x7	0,5797	0,4704	0,2427	0,6403	0,4903	0,4705	0,4766
x8	1,0000	0,7994	0,4133	0,7412	0,6867	0,7813	0,7902
x9	0,7994	1,0000	0,3643	0,6601	0,7532	0,7224	0,8667
x10	0,4133	0,3643	1,0000	0,4743	0,4796	0,5210	0,5170
x11	0,7412	0,6601	0,4743	1,0000	0,6514	0,7359	0,7321
x12	0,6867	0,7532	0,4796	0,6514	1,0000	0,7459	0,7962
x13	0,7813	0,7224	0,5210	0,7359	0,7459	1,0000	0,8566
x14	0,7902	0,8667	0,5170	0,7321	0,7962	0,8566	1,0000
x15	0,7644	0,8640	0,4234	0,5612	0,7412	0,6890	0,7808
x16	0,8365	0,7725	0,3030	0,6949	0,5983	0,6150	0,6704
x17	0,7508	0,8287	0,4577	0,6935	0,7271	0,7649	0,8557
x18	0,6363	0,6999	0,2304	0,4971	0,6264	0,5241	0,6845
x19	0,8366	0,8224	0,3101	0,6093	0,6828	0,7055	0,7343
x20	0,7575	0,8185	0,2498	0,4850	0,6001	0,5684	0,7230
Δ CRP48	-0,3800	-0,3736	-0,0705	-0,3159	-0,2806	-0,3091	-0,3376
Δ IL6-24	-0,3396	-0,4344	-0,1876	-0,2345	-0,3424	-0,3089	-0,4165
Δ SAA48	-0,4250	-0,4111	-0,2318	-0,3743	-0,3579	-0,3830	-0,4207
Δ MDA48	-0,0493	-0,0313	0,3978	0,0326	0,1761	0,0271	0,0921
Δ Cp48	-0,1130	-0,1682	-0,1244	-0,0510	-0,0914	-0,2345	-0,1348

*Červená barva značí statisticky významné Pearsonovy párové korelačními koeficienty, které mají spočtenou hladinu významnosti vyšší než $\alpha = 0,05$.

Tabulka 12 Korelační matice MK v membránách erytrocytů a zánětlivých markerů: III. část

	x15	x16	x17	x18	x19	x20	Δ CRP48
x1	0,1953	0,3416	0,1238	0,1627	0,2050	0,1802	-0,0952
x2	0,2477	0,4474	0,2450	0,2948	0,2977	0,3142	-0,1128
x3	0,7882	0,9004	0,7850	0,6814	0,8863	0,8203	-0,3868
x4	0,3040	0,2427	0,2364	0,0689	0,2164	0,1186	-0,1895
x5	0,4751	0,7471	0,4938	0,5119	0,6293	0,6167	-0,2385
x6	0,8575	0,8802	0,8880	0,7536	0,9040	0,8909	-0,3946
x7	0,4970	0,4589	0,5157	0,3720	0,3874	0,4304	-0,3252
x8	0,7644	0,8365	0,7508	0,6363	0,8366	0,7575	-0,3800
x9	0,8640	0,7725	0,8287	0,6999	0,8224	0,8185	-0,3736
x10	0,4234	0,3030	0,4577	0,2304	0,3101	0,2498	-0,0705
x11	0,5612	0,6949	0,6935	0,4971	0,6093	0,4850	-0,3159
x12	0,7412	0,5983	0,7271	0,6264	0,6828	0,6001	-0,2806
x13	0,6890	0,6150	0,7649	0,5241	0,7055	0,5684	-0,3091
x14	0,7808	0,6704	0,8557	0,6845	0,7343	0,7230	-0,3376
x15	1,0000	0,7089	0,8459	0,6982	0,7913	0,7835	-0,3743
x16	0,7089	1,0000	0,7372	0,5607	0,8683	0,7473	-0,3234
x17	0,8459	0,7372	1,0000	0,6916	0,8089	0,7717	-0,3826
x18	0,6982	0,5607	0,6916	1,0000	0,7239	0,8224	-0,3177
x19	0,7913	0,8683	0,8089	0,7239	1,0000	0,8095	-0,4177
x20	0,7835	0,7473	0,7717	0,8224	0,8095	1,0000	-0,3046
Δ CRP48	-0,3743	-0,3234	-0,3826	-0,3177	-0,4177	-0,3046	1,0000
Δ IL6-24	-0,4101	-0,2965	-0,4052	-0,3621	-0,3877	-0,3777	0,7981
Δ SAA48	-0,3721	-0,3641	-0,3629	-0,3125	-0,4218	-0,3284	0,9040
Δ MDA48	-0,0393	-0,0311	-0,1236	0,0107	-0,0537	-0,0506	0,1064
Δ Cp48	-0,2087	-0,0369	-0,1982	-0,1527	-0,0837	-0,1403	-0,0337

*Červená barva značí statisticky významné Pearsonovy párové korelačními koeficienty, které mají spočtenou hladinu významnosti vyšší než $\alpha = 0,05$.

Tabulka 13 Korelační matice MK v membránách erytrocytů a zánětlivých markerů: IV. část

	Δ IL6-24	Δ SAA48	Δ MDA48	Δ Cp48
x1	-0,0098	-0,2036	0,1074	-0,0410
x2	-0,0950	-0,2233	0,2372	-0,0266
x3	-0,3637	-0,4145	-0,0493	-0,1334
x4	-0,1437	-0,2832	0,1189	-0,1878
x5	-0,2045	-0,3109	0,0410	-0,0985
x6	-0,3968	-0,3893	-0,1221	-0,1416
x7	-0,2048	-0,2920	-0,0757	-0,1690
x8	-0,3396	-0,4250	-0,0493	-0,1130
x9	-0,4344	-0,4111	-0,0313	-0,1682
x10	-0,1876	-0,2318	0,3978	-0,1244
x11	-0,2345	-0,3743	0,0326	-0,0510
x12	-0,3424	-0,3579	0,1761	-0,0914
x13	-0,3089	-0,3830	0,0271	-0,2345
x14	-0,4165	-0,4207	0,0921	-0,1348
x15	-0,4101	-0,3721	-0,0393	-0,2087
x16	-0,2965	-0,3641	-0,0311	-0,0369
x17	-0,4052	-0,3629	-0,1236	-0,1982
x18	-0,3621	-0,3125	0,0107	-0,1527
x19	-0,3877	-0,4218	-0,0537	-0,0837
x20	-0,3777	-0,3284	-0,0506	-0,1403
Δ CRP48	0,7981	0,9040	0,1064	-0,0337
Δ IL6-24	1,0000	0,8109	-0,0051	0,0821
Δ SAA48	0,8109	1,0000	-0,1033	-0,0253
Δ MDA48	-0,0051	-0,1033	1,0000	0,0156
Δ Cp48	0,0821	-0,0253	0,0156	1,0000

*Červená barva značí statisticky významné Pearsonovy párové korelačními koeficienty, které mají spočtenou hladinu významnosti vyšší než $\alpha = 0,05$.

Z korelační matice (tabulka 10 až 13) vyplývá, že mezi koncentracemi mastných kyselin (nezávisle proměnnými) existuje řada statisticky významných vztahů, korelací. Například nejvíce pozitivních korelací ($R > 0,8$) bylo nalezeno u kyseliny stearové, která pozitivně korelovala s kyselinou olejovou, linolovou, eikosadienovou, behenovou, arachidonovou, nervonovou a dokosahexaenovou. Podobně kyselina palmitová korelovala ($R > 0,8$) s koncentrací kyseliny marganové, olejové, linolové, behenové, nervonové a dokosahexaenové. Kyselina linolová kromě výše zmíněných korelovala ($R > 0,8$) s kyselinou eikosadienovou, dihomo- γ -linolenovou, arachidonovou, nervonovou a dokosahexaenovou. Důležitým předpokladem matice nezávisle proměnných pro následnou lineární regresi je ale požadavek na nezávislost, originálnost a jedinečnost užívaných nezávisle proměnných, zde mastných kyselin

x1 až x20. Vyskytne-li se v matici znaků statisticky významná korelace, znamená to, že znaky jsou svázány skrytým vnitřním vztahem vyjádřeným korelací a hrozí proto nebezpečí, že metoda nejmenších čtverců vyhodnotí neznámé parametry jako vychýlené, což znamená zatížené systematickou chybou nevhodné matematické metody. Data vykazující multikolinearitu je třeba vyhodnotit metodou racionálních hodnotí nebo metodou robustního M-odhadu (Welsch), která vyčíslí nevychýlené odhady parametrů.

Při zaměření se na markery, relativní změna koncentrace CRP za 48 hodin po implantaci koronárního stentu (ΔCRP48), IL-6 za 24 hodin po PCI ($\Delta\text{IL6-24}$) a SAA za 48 hodin (ΔSAA48) byly ve vzájemné, silně pozitivní korelaci a zároveň u nich byly nalezeny četné statisticky významné korelace s koncentracemi MK v membránách erytrocytů. Změna koncentrace ceruloplasminu za 48 hodin po implantaci stentu (ΔCp48) nekorelovala s žádnou ze sledovaných proměnných. Tento nález podporuje myšlenku, že role ceruloplasminu v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění a zánětu není zcela jednoznačná. Na základě výše zmíněných skutečností jsme se rozhodli, že ceruloplasmin není vhodný pro hodnocení zánětlivé reakce po implantaci stentu. Malondialdehyd, ukazatel lipoperoxidace, ze všech statisticky hodnocených znaků, významně koreloval pouze s kyselinou γ -linolenovou, což naznačuje, že zánětlivý proces a oxidační stres jsou dva odlišné procesy do značné míry na sobě nezávislé.

4.3.1 Analýza hlavních komponent

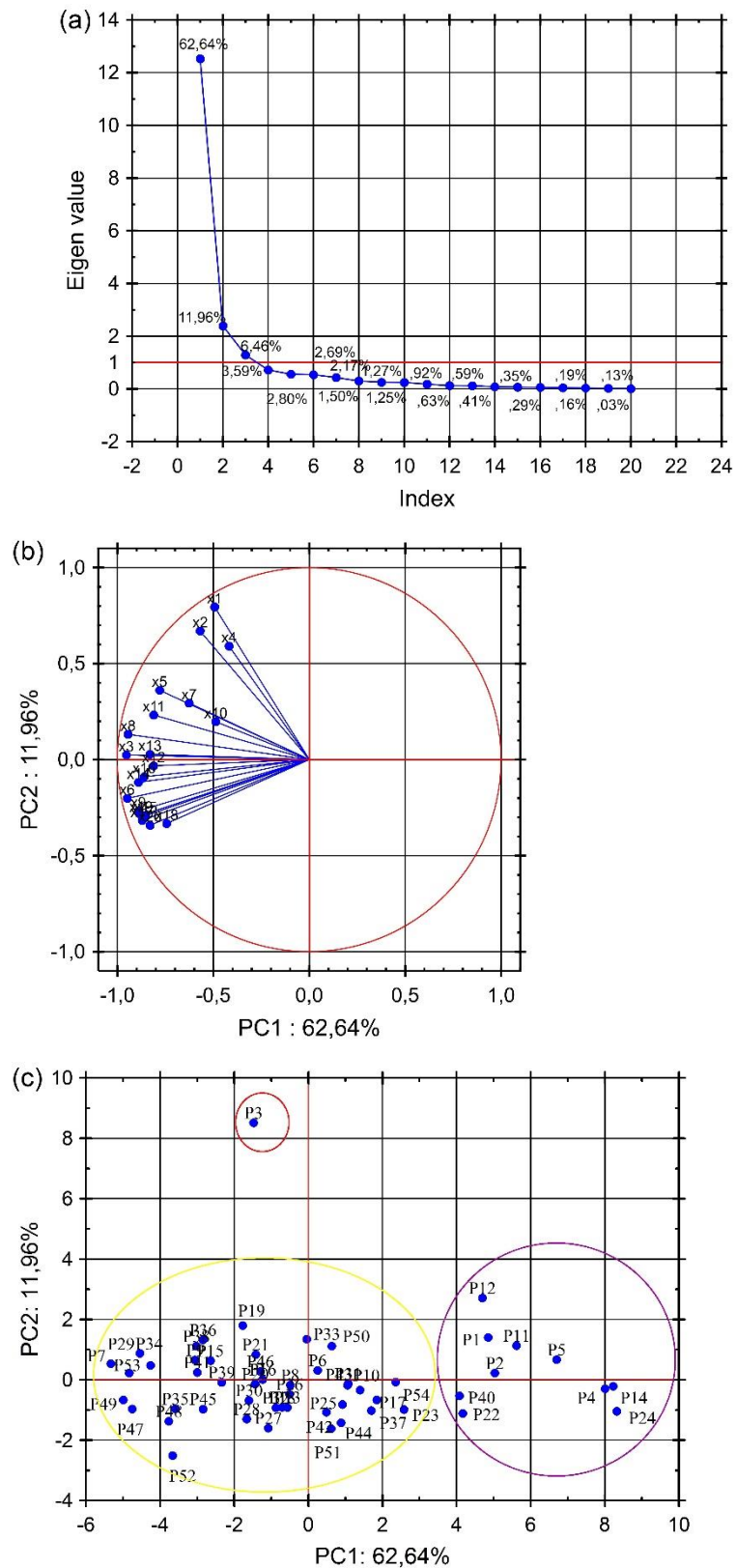
Analýza hlavních komponent (PCA, z angl. Principal component analysis) slouží především ke zjednodušení popisu skupiny vzájemně lineárně závislých neboli korelovaných znaků, a tím slouží k rozkladu zdrojové matice na matici strukturní a matici šumovou. Jde o transformaci původních proměnných (znaků) $x_i, j = 1, \dots, m$, do menšího počtu latentních proměnných y_j , nazývaných hlavní komponenty. Hlavní komponenty vystihují téměř celou proměnlivost původních dat a jsou vzájemně nekorelované.

Grafickými pomůckami PCA je *Cattelův indexový graf úpatí vlastních čísel*, který slouží k určení užitečných hlavních komponent. *Grafy komponentních vah* (PCAW, z angl. Principal component analysis weight) informují o vztahu původních znaků a nově vytvořených nekorelovaných latentních proměnných nazývaných hlavní komponenty. Jednotlivé body zde vystihují znaky, přičemž se mezi znaky posuzuje poloha a délka průvodičů. Krátká vzdálenost mezi dvěma znaky znamená silnou korelaci. Čím leží bod dál od počátku, tím je důležitější. Určením důležitosti dojde současně k určení variability znaku. Znaky s úhlem mezi průvodiči 0° jsou spolu silně pozitivně korelované, znaky s úhlem 90° jsou zcela nekorelované, zatímco znaky s úhlem 180° korelují negativně. *Grafy komponentního skóre* (PCAS, z angl. Principal

component analysis score) představují souřadnice každého objektu na osách hlavních komponent a slouží k posuzování případů, v našem případě pacientů. V případě, že je pacient zobrazen v grafu daleko od počátku, jedná se o extrém. Pacienti nacházející se blízko sebe jsou si podobní, daleko od sebe jsou si nepodobní [70].

Výsledky PCA jsou uvedeny na obrázku 10. Graf *PCAWI-2* na obrátku 10b vyjadřuje nejvíce informace (74,6% rozptylu původních dat). Z tohoto grafu je zřejmé, že mezi mastnými kyselinami jsou významné korelace. Za účelem redukce proměnných by bylo na základě polohy a délky průvodičů dostačující ponechat ve zdrojové matici pouze kyselinu myristovou x1, pentadekanovou x2, palmitovou x3, marganovou x5, olejovou x8, arachovou x11 a kyselinu arachidonovou x17 a vypustit kyselinu palmitolejovou x4, elaidovou x7, linolovou x9, γ -linolenovou x10, α -linolenovou x12, gondovou x13, eikosadienovou x14, dihomog γ -linolenovou x15, behenovou x16, eikosapentaenovou x 18, nervonovou x19 a dokosaheptaenovou x 20.

V grafu *PCASI-2* na obrázku 10c jsou viditelné dva shluky pacientů. Shluk tvořený pacienty P1, P2, P4, P5, P11, P12, P14, P22, P24 a P40 odpovídá skupině pacientů identifikované již v ikonovém grafu na obrázku 9, u které byla nalezena nízká koncentrace mastných kyselin. Domníváme se, že podobnost těchto pacientů by mohla být způsobena skutečností, že tito pacienti mají významné metabolické poruchy, jako je hyperlipoproteinémie léčená statiny a fibráty, které značně ovlivňují lipidový metabolismus, *diabetes mellitus* 2. typu léčený perorálními antidiabetiky nebo hyperurikémií léčenou podáváním allopurinolu. Významně odlišně se opět jevila již zmíněná pacientka P3.



Obrázek 10 Hodnocení složení MK v membránách erytrocytů pomocí metody PCA: (a) *Catellův indexový graf vlastních čísel*, (b) *graf komponentních vah PCAW1-2*, (c) *graf komponentního skóre PCAS 1-2*

4.3.2 Faktorová analýza

Faktorová analýza (FA) slouží k vyšetření vnitřních souvislostí a odhalení struktur datové matice zavedením několika latentních proměnných čili faktorů, kterým je však přidělen obsahový význam, pomocí kterého je každý znak názorně obsahově vysvětlen.

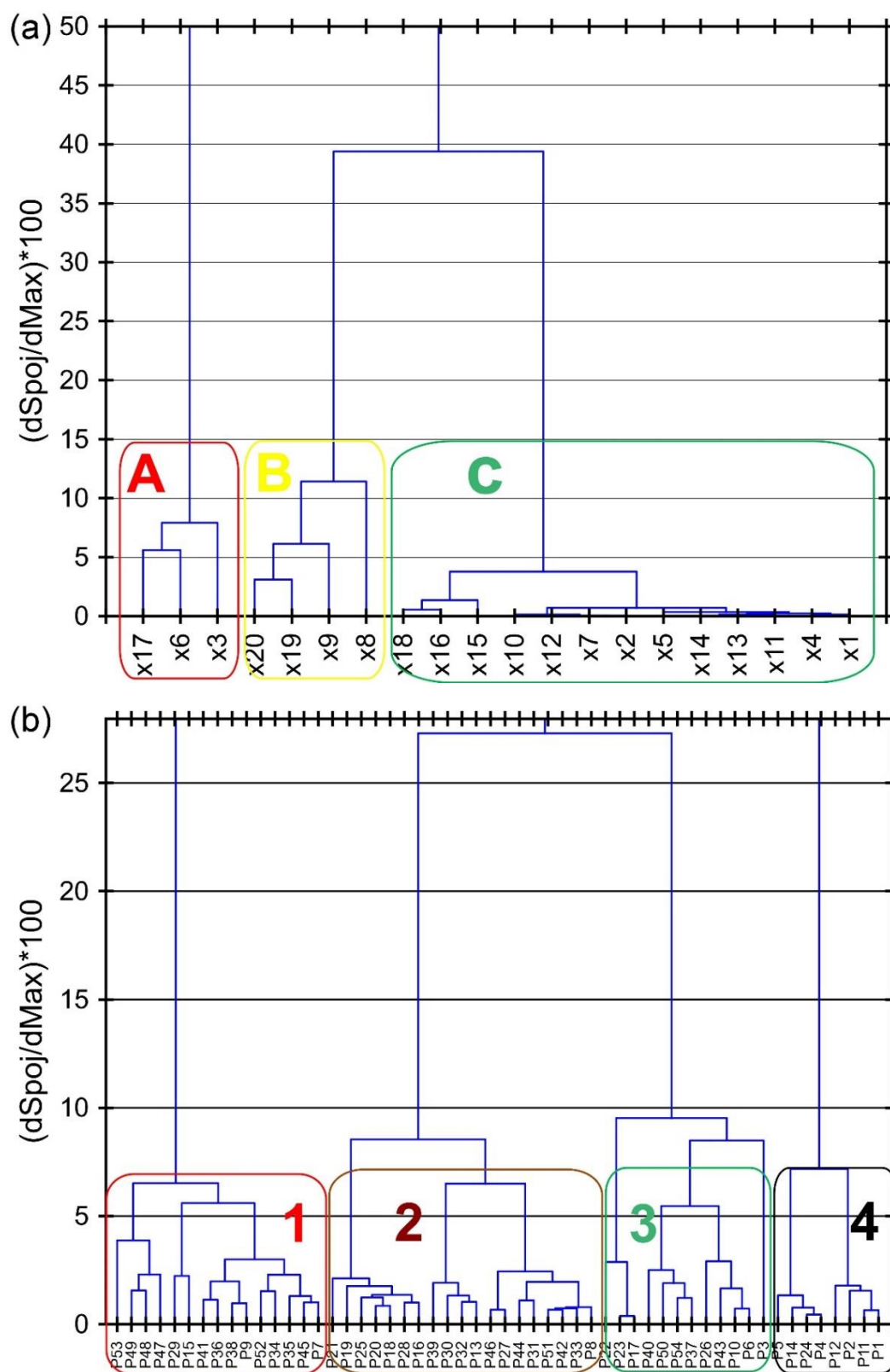
Mezi základní grafické pomůcky faktorové analýzy patří *graf faktorových zátěží* (FAW, z angl. Factor analysis weight), na jehož osách jsou jednotlivé faktory. Po pootočení os se obvykle v grafu objeví shluky znaků. Znaky, které se nacházejí při konci souřadnicové osy, mají vysokou faktorovou zátěž na přiřazené ose a lze je označit za *faktorově čisté znaky*. Znaky, které se nachází blízko počátku (0, 0) mají malé zátěže obou faktorů. Poslední skupinou jsou znaky, které nejsou blízké ani jedné ze souřadnic, ty jsou označovány jako *znaky faktorově nečisté*. Pomocí znaků s vysokou faktorovou zátěží lze přiřadit faktorům jejich obsahový význam. Další pomůckou jsou *grafy faktorového skóre* (FAS, z angl. Factor analysis score), které se využívají k nalezení výjimečných hodnot objektů a především pak k odhalení odlehlých pozorování [70].

Ve faktorové analýze při otočení os metodou *normovaný Varimax* v grafu *FAWI-2* na obrázku 11a vykazuje vysokou faktorovou zátěž u faktoru 1 kyselina stearová x6, linolová x9, α -linolenová x12, eikosadienová x14, dihomogamma-linolenová x15, behenová x16, arachidonová x17, eikosapentaenová x18, nervonová x19 a dokosahexaenová x20. Všechny tyto kyseliny, kromě kyseliny behenové a stearové, jsou zástupci nenasycených mastných kyselin, a je zde viditelný trend zvyšování faktorové zátěže s rostoucí délkou uhlíkatého řetězce a počtem dvojných vazeb. Proto jsme se rozhodli pojmenovat tento faktor jako „*Délka uhlíkatého řetězce MK a počet dvojných vazeb*“. Nejvyšší faktorovou zátěž pro faktor 2 vykazuje kyselina myristová x1 a pentadekanová x2. Tyto kyseliny patří mezi nasycené mastné kyseliny, proto jsme faktor 2 pojmenovali „*Koncentrace SFA*“. Mezi faktorově nečisté kyseliny patří kyselina palmitoolejová x4, marganová x5, elaidová x7, arachová x11, olejová x8, gondová x13 a palmitová x3. Tyto kyseliny jsou mononenasycené mastné kyseliny nebo nasycené mastné kyseliny s dlouhým uhlíkatým řetězcem, což je v souladu s pojmenovanými faktory 1 a 2. Největší faktorovou zátěž pro faktor 3 vykazuje kyselina γ -linolenová x10, tento faktor se nepodařilo pojmenovat.

Pojmenované faktory byly přeneseny do grafů *FASI-2* na obrázku 11b, které jsou vyvrcholením průzkumové analýzy. Velkým úspěchem bylo nalezení shody mezi ikonovými grafy, výsledky analýzy hlavních komponent a faktorové analýzy. Graf *FASI-2* potvrdil, že pacient P3 se významně liší od ostatních, stejně tak shluk pacientů označovaných P1, P2, P4, P5, P11, P12, P14, 24, v ikonovém grafu a grafu *PCASI-2* zde byli navíc zařazeni i pacienti označovaní jako P22 a P40. Zároveň bylo potvrzeno, že pojmenování faktorů je správné, neboť z ikonového grafu je zřejmé, že pacientka P3 je jedinečná svou vysokou koncentrací nasycených mastných kyselin a velmi nízkou koncentrací nenasycených mastných kyselin, což také platí i pro shluk pacientů, který leží v grafu faktorového skóre blízko počátku (0,0). To je v souladu s faktem, že tito pacienti jsou v ikonovém grafu vyobrazeni velmi malými hvězdičkami, které jasně vypovídají o nízké koncentraci všech MK v membránách erytrocytů.

4.3.3 Shluková analýza

Analýza shluků (CLU, z angl. Cluster analysis) patří mezi metody, které vyšetřují podobnost vícerozměrných objektů a provádí jejich klasifikaci do shluků. *Dendrogram podobnosti znaků*, zde mastných kyselin a *dendrogram objektů*, zde pacientů, odhaluje, vzájemnou podobnost a tím i silnou korelaci. Znaky, resp. objekty, ležící blízko u sebe jsou si velmi podobné a lze proto říci, že jsou i vzájemně nahraditelné. Existuje několik shlukovacích postupů, v našem případě byla upřednostněna *Wardova metoda* [70].



Obrázek 12 Hodnocení složení MK v membránách erytrocytů pomocí shlukové analýzy: (a) *Dendrogram znaků (MK)*, (b) *Dendrogram objektů (pacientů)*

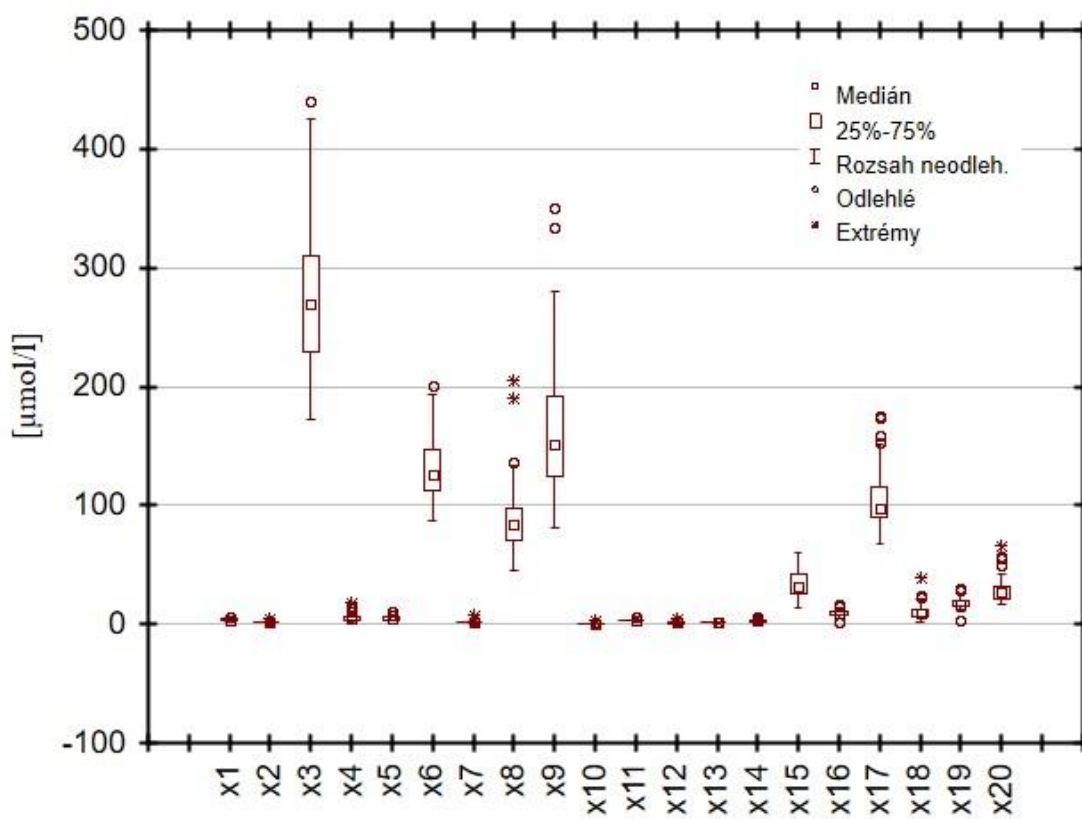
Posledním krokem průzkumné analýzy bylo srovnání získaných výsledků s dendrogramy mastných kyselin a pacientů ve shlukové analýze. Dendrogram shluků mastných

kyselin na obrázku 12a odhaluje 3 shluky značené písmeny A, B, C, resp. barvami červeně, žlutě a zeleně. Skupina A zahrnuje kyselinu arachidonovou x17, stearovou x6 a palmitovou x3. Vysoké koncentrace těchto kyselin jsou velmi často spojovány s podporou zánětlivých procesů a progresí kardiovaskulárních onemocnění. Ve skupině B jsou kyseliny dokosaheptaenová x20, nervonová x19, linolová x9 a olejová x8, u kterých lze říci, že převažuje spíše protizánětlivý a kardioprotektivní účinek. Shluk mastných kyselin C nevykazuje žádné konkrétní funkční podobnosti mezi kyselinami. Stejnými barvami byly následně vyznačeny mastné kyseliny v grafu faktorových vah u znaků (*FAWI-2*). Při porovnání poloh znaků v grafu *FAWI-2* a dendrogramu mastných kyselin, bylo zjištěno, že kyseliny ze skupiny A mají vysokou faktorovou zátěž pro faktor 1. Mastné kyseliny ve skupině B odpovídají *FAWI-2*, tedy pojmenování os. Ve vytvořeném dendrogramu pacientů na obrázku 12b došlo k vytvoření shluků označovaných 1 až 4, odlišených opět barevně. Stejnými barvami byli následně označeni i pacienti v grafech faktorového skóre. Při porovnání grafů faktorového skóre a dendrogramu pacientů byla nalezena významná shoda. Stejně jako ve faktorové analýze, došlo i zde ke shluknutí pacientů P1, P2, P4, P5, P11, P12, P14 a P24, označených černě. Jak již bylo zmíněno, tito pacienti se od ostatních významně liší velmi nízkými koncentracemi všech stanovovaných mastných kyselin. Dále byl nalezen shluk pacientů P7, P35, P34, P52, P9, P38, P36, P41, P15, P29, P47, P48, P49 a P53, u kterých v membránách erytrocytů převažují polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, což je v souladu s ikonovým grafem a tento shluk je označen červeně. Dále byly vytvořeny v dendrogramu pacientů shluky 2 a 3, označené zeleně a žlutě. Tito pacienti se v grafu faktorového skóre významně prolínají. Nebylo proto možné přesně určit, co je hlavní příčinou rozmístění pacientů a jejich zařazení do shluků v dendrogramu objektů.

4.4 Exploratorní průzkumová analýza mastných kyselin ve frakci sérových fosfolipidů

Kromě vyšetření, zda mastné kyseliny v membránách erytrocytů mají vliv na změnu zvolených zánětlivých markerů (CRP, IL-6, SAA a Cp) a markeru oxidačního stresu MDA u pacientů podstupujících perkutánní koronární intervenci s následnou implantací stentu, bylo třeba ověřit, zda stejnou vypovídací schopnost mají i mastné kyseliny ve frakci fosfolipidů séra. Jak již bylo zmíněno, membrány erytrocytů se jeví jako vhodnější materiál, neboť MK v membránách erytrocytů reflektují dlouhodobý profil MK v těle, zatímco složení MK v séru je významně ovlivňováno aktuálním stavem organismu a příjmem mastných kyselin v potravě.

Před přistoupením k sofistikovaným statistickým metodám bylo nutné opět ověřit předpoklady, kladené na zdrojovou matici dat. Výchozí zdrojová matice k vyšetření vztahu mastných kyselin, zde nezávislých proměnných, obsahovala 54 řádků (pacientů), označovaných P1 až P54 a 20 znaků čili mastných kyselin ve sloupcích označovaných x1 až x20.



Obrázek 13 Krabicový graf k vyšetření variability koncentrací MK ve fosfolipidech séra

Variabilita koncentrací MK ve fosfolipidech séra na obrázku 13 je obdobná, ale méně významná v porovnání s koncentracemi MK v membránách erytrocytů.

Tabulka 14 Korelační matice MK ve fosfolipidech séra a zánětlivých markerů: I. část

	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7
x1	1,0000	0,6608	0,5950	0,6133	0,6478	0,6096	0,2547
x2	0,6608	1,0000	0,4380	0,3864	0,8491	0,2043	0,0600
x3	0,5950	0,4380	1,0000	0,7218	0,5631	0,7867	0,5397
x4	0,6133	0,3864	0,7218	1,0000	0,4605	0,5493	0,3386
x5	0,6478	0,8491	0,5631	0,4605	1,0000	0,4571	0,1603
x6	0,6096	0,2043	0,7867	0,5493	0,4571	1,0000	0,5120
x7	0,2547	0,0600	0,5397	0,3386	0,1603	0,5120	1,0000
x8	0,6718	0,3705	0,8088	0,8708	0,5318	0,6952	0,5053
x9	0,4836	0,3120	0,8242	0,5645	0,5044	0,7536	0,5548
x10	0,5696	0,1570	0,5464	0,7911	0,2728	0,5371	0,3416
x11	0,4976	0,4717	0,7404	0,4962	0,5718	0,5745	0,2766
x12	0,5148	0,4308	0,6451	0,5426	0,6111	0,5305	0,4881
x13	0,2941	0,1693	0,3745	0,1519	0,3836	0,5080	0,2539
x14	0,5923	0,3823	0,7929	0,6541	0,5605	0,6949	0,4797
x15	0,5517	0,3153	0,6471	0,5705	0,3656	0,6193	0,3843
x16	0,5138	0,4767	0,6903	0,4272	0,5110	0,5586	0,2054
x17	0,2536	0,0027	0,4578	0,2279	0,1403	0,5899	0,2266
x18	0,2859	0,2015	0,1599	0,0403	0,3025	0,2128	-0,0741
x19	0,2436	0,3161	0,5697	0,3642	0,3772	0,4082	0,1020
x20	0,0102	0,1066	0,2653	-0,0929	0,1929	0,3051	0,0455
Δ CRP48	0,1313	0,0257	0,0015	0,0502	0,1012	0,0577	0,0936
Δ IL6-24	0,0987	0,0536	-0,0556	0,0416	0,0472	-0,0589	0,1500
Δ SAA48	0,0812	-0,0522	-0,0780	0,0468	0,0086	-0,0028	0,0899
Δ MDA48	-0,1053	0,1309	0,0687	-0,0265	0,0548	-0,1650	-0,0163
Δ Cp48	0,0707	0,2162	0,1537	-0,0770	0,1412	0,0257	0,0401

*Červená barva značí statisticky významné Pearsonovy párové korelačními koeficienty, které mají spočtenou hladinu významnosti vyšší než $\alpha = 0,05$.

Tabulka 15 Korelační matice MK ve fosfolipidech séra a zánětlivých markerů: II. část

	x8	x9	x10	x11	x12	x13	x14
x1	0,6718	0,4836	0,5696	0,4976	0,5148	0,2941	0,5923
x2	0,3705	0,3120	0,1570	0,4717	0,4308	0,1693	0,3823
x3	0,8088	0,8242	0,5464	0,7404	0,6451	0,3745	0,7929
x4	0,8708	0,5645	0,7911	0,4962	0,5426	0,1519	0,6541
x5	0,5318	0,5044	0,2728	0,5718	0,6111	0,3836	0,5605
x6	0,6952	0,7536	0,5371	0,5745	0,5305	0,5080	0,6949
x7	0,5053	0,5548	0,3416	0,2766	0,4881	0,2539	0,4797
x8	1,0000	0,7693	0,7559	0,5688	0,7526	0,4021	0,8063
x9	0,7693	1,0000	0,3835	0,6114	0,7145	0,4862	0,8732
x10	0,7559	0,3835	1,0000	0,2997	0,4190	0,0050	0,4154
x11	0,5688	0,6114	0,2997	1,0000	0,5456	0,3269	0,5671
x12	0,7526	0,7145	0,4190	0,5456	1,0000	0,5251	0,7475
x13	0,4021	0,4862	0,0050	0,3269	0,5251	1,0000	0,5500
x14	0,8063	0,8732	0,4154	0,5671	0,7475	0,5500	1,0000
x15	0,5684	0,5814	0,4192	0,4344	0,3386	0,2885	0,6352
x16	0,4618	0,5943	0,2291	0,8954	0,3771	0,2125	0,5076
x17	0,2268	0,1917	0,3652	0,3865	-0,0191	0,1619	0,0815
x18	0,0877	-0,0847	0,0629	0,2529	0,2509	0,2879	0,0382
x19	0,3961	0,5091	0,0757	0,7754	0,4097	0,4776	0,4506
x20	-0,0434	0,0886	-0,2036	0,2854	0,0834	0,2491	0,0849
Δ CRP48	0,0783	-0,0285	0,1435	0,0279	0,1055	-0,1038	0,0950
Δ IL6-24	0,0270	-0,0847	0,1807	0,0246	0,1462	-0,1264	-0,0173
Δ SAA48	0,0568	-0,0813	0,1802	0,0272	0,0803	-0,1158	0,0024
Δ MDA48	-0,0640	-0,0275	-0,1187	-0,1304	0,0177	-0,1382	0,0464
Δ Cp48	0,0041	0,2126	-0,1136	0,0854	0,1370	0,1270	0,1381

*Červená barva značí statisticky významné Pearsonovy párové korelačními koeficienty, které mají spočtenou hladinu významnosti vyšší než $\alpha = 0,05$.

Tabulka 16 Korelační matice MK ve fosfolipidech séra a zánětlivých markerů: III. část

	x15	x16	x17	x18	x19	x20	Δ CRP48
x1	0,5517	0,5138	0,2536	0,2859	0,2436	0,0102	0,1313
x2	0,3153	0,4767	0,0027	0,2015	0,3161	0,1066	0,0257
x3	0,6471	0,6903	0,4578	0,1599	0,5697	0,2653	0,0015
x4	0,5705	0,4272	0,2279	0,0403	0,3642	-0,0929	0,0502
x5	0,3656	0,5110	0,1403	0,3025	0,3772	0,1929	0,1012
x6	0,6193	0,5586	0,5899	0,2128	0,4082	0,3051	0,0577
x7	0,3843	0,2054	0,2266	-0,0741	0,1020	0,0455	0,0936
x8	0,5684	0,4618	0,2268	0,0877	0,3961	-0,0434	0,0783
x9	0,5814	0,5943	0,1917	-0,0847	0,5091	0,0886	-0,0285
x10	0,4192	0,2291	0,3652	0,0629	0,0757	-0,2036	0,1435
x11	0,4344	0,8954	0,3865	0,2529	0,7754	0,2854	0,0279
x12	0,3386	0,3771	-0,0191	0,2509	0,4097	0,0834	0,1055
x13	0,2885	0,2125	0,1619	0,2879	0,4776	0,2491	-0,1038
x14	0,6352	0,5076	0,0815	0,0382	0,4506	0,0849	0,0950
x15	1,0000	0,4984	0,2996	-0,0632	0,3321	0,0707	-0,0809
x16	0,4984	1,0000	0,4711	0,1160	0,7606	0,2347	-0,0093
x17	0,2996	0,4711	1,0000	0,1716	0,2897	0,2598	-0,0710
x18	-0,0632	0,1160	0,1716	1,0000	0,1623	0,6396	-0,0081
x19	0,3321	0,7606	0,2897	0,1623	1,0000	0,3368	-0,0733
x20	0,0707	0,2347	0,2598	0,6396	0,3368	1,0000	-0,0344
Δ CRP48	-0,0809	-0,0093	-0,0710	-0,0081	-0,0733	-0,0344	1,0000
Δ IL6-24	-0,0122	-0,0301	-0,1389	-0,0271	0,0156	-0,1087	0,7850
Δ SAA48	-0,0911	-0,0434	-0,1107	-0,0314	-0,0275	-0,0852	0,9023
Δ MDA48	0,0721	-0,1551	-0,2139	-0,0195	-0,2014	0,0519	0,1059
Δ Cp48	0,2535	0,2113	0,0528	-0,0670	0,1571	0,1227	-0,0140

*Červená barva značí statisticky významné Pearsonovy párové korelačními koeficienty, které mají spočtenou hladinu významnosti vyšší než $\alpha = 0,05$.

Tabulka 17 Korelační matice MK ve fosfolipidech séra a zánětlivých markerů: IV. část

	Δ IL6-24	Δ SAA48	Δ MDA48	Δ Cp48
x1	0,0987	0,0812	-0,1053	0,0707
x2	0,0536	-0,0522	0,1309	0,2162
x3	-0,0556	-0,0780	0,0687	0,1537
x4	0,0416	0,0468	-0,0265	-0,0770
x5	0,0472	0,0086	0,0548	0,1412
x6	-0,0589	-0,0028	-0,1650	0,0257
x7	0,1500	0,0899	-0,0163	0,0401
x8	0,0270	0,0568	-0,0640	0,0041
x9	-0,0847	-0,0813	-0,0275	0,2126
x10	0,1807	0,1802	-0,1187	-0,1136
x11	0,0246	0,0272	-0,1304	0,0854
x12	0,1462	0,0803	0,0177	0,1370
x13	-0,1264	-0,1158	-0,1382	0,1270
x14	-0,0173	0,0024	0,0464	0,1381
x15	-0,0122	-0,0911	0,0721	0,2535
x16	-0,0301	-0,0434	-0,1551	0,2113
x17	-0,1389	-0,1107	-0,2139	0,0528
x18	-0,0271	-0,0314	-0,0195	-0,0670
x19	0,0156	-0,0275	-0,2014	0,1571
x20	-0,1087	-0,0852	0,0519	0,1227
Δ CRP48	0,7850	0,9023	0,1059	-0,0140
Δ IL6-24	1,0000	0,8041	0,0015	0,0789
Δ SAA48	0,8041	1,0000	-0,0977	-0,0146
Δ MDA48	0,0015	-0,0977	1,0000	0,0168
Δ Cp48	0,0789	-0,0146	0,0168	1,0000

*Červená barva značí statisticky významné Pearsonovy párové korelačními koeficienty, které mají spočtenou hladinu významnosti vyšší než $\alpha = 0,05$.

Korelační matice (tabulka 14 až 17) vypovídá o tom, že naprostá většina koncentrací mastných kyselin ve fosfolipidech séra mezi sebou statisticky významně korelovala. Nicméně při zaměření se na posledních pět řádků (sloupců), kde se nacházejí zánětlivé indikátory, je překvapivě vidět, že mezi koncentracemi mastných kyselin a změnou koncentrace zánětlivých markerů nebyly nalezeny téměř žádné statisticky významné korelace. Výjimkou je pouze kyselina dihomo- γ -linolenová, která pozitivně korelovala s navýšením koncentrace ceruloplasminu za 48 hodin po implantaci stentu. Tyto uvedené vztahy svědčí o tom, že pro hodnocení vztahu mastných kyselin a zánětlivého procesu po implantaci koronárního stentu jsou vhodné pouze MK v membránách erytrocytů, nikoliv MK fosfolipidů séra.

4.5 Vícenásobná lineární regrese

Dále byl studován vliv koncentrace mastných kyselin stanovených v membránách erytrocytů na zvolené markery pomocí vícenásobné lineární regrese. Hodnocenými zánětlivými markery byla relativní změna koncentrace CRP značená jako ΔCRP48 , změna koncentrace sérového amyloidu A značená jako ΔSAA48 v séru 48 hodin po implantaci koronárního stentu a relativní změna sérové koncentrace IL-6 za 24 hodin po zákroku značená jako $\Delta\text{IL6-24}$. Vliv mastných kyselin na dynamiku oxidačního stresu buněk byl posuzován prostřednictvím relativní změny MDA za 48 hodin. Navržené regresní modely byly hodnoceny s využitím techniky regresního tripletu – kritiky dat, kritiky modelu a kritiky užití matematické metody. Tato technika je popsána v [71]. Biologické markery zde byly závisle proměnné a mastné kyseliny nezávisle proměnné. Intenzita vlivu každé mastné kyseliny na vybraný indikátor čili zvolenou závislou proměnnou je definována odhadem její směrnice β_i , $i = 1, \dots, 20$. Nejvyšší kladná hodnota odhadu β mastné kyseliny při porovnání s ostatními odhady β mastných kyselin znamená, že daná mastná kyselina působí nejsilněji na zvolený marker. Lze proto říci, že daná mastná kyselina se intenzivněji podílí na růstu plazmatické koncentrace daného markeru u pacientů a má proto nejsilnější vztah k procesu, který daný marker indikuje čili na intenzitu zánětlivé reakce nebo na míru oxidačního poškození buněk. Nejméně záporný odhad β naopak vyjadřuje, v porovnání s ostatními, nejsilnější inverzní korelaci

Prvotně byl hodnocen vliv všech dvaceti zvolených mastných kyselin na zvolené závislé proměnné v navrženém regresním modelu. V kritice dat byly v regresní analýze vlivných bodů nejprve povinně indikovány odlehlé body, zde pacienti, které bylo třeba z další regresní analýzy vyřadit. Williamsův graf a ostatní grafické diagnostiky vedly u regresního modelu ΔCRP48 k odstranění pacientů P3, P5, P6, P7, P11, P12, P14, P16, P22, P24, P26, P28, P32, P42, P44. U regresního modelu ΔSAA48 grafické diagnostiky odstranily pacienty P3, P4, P7, P11, P12, P14, P22, P24, P25, P30, P34, P42, P43 a P46 a u regresního modelu $\Delta\text{IL6-24}$ pak pacienty P2, P3, P4, P9, P11, P14, a P46. Regresní model pro ΔMDA48 využil všech 54 původních pacientů.

Odhady směrnic mastných kyselin včetně úseku β_0 testovaných hypotéz navržených regresních modelů společně s rozhodčími kritérii modelu, jako jsou korelační koeficient R , střední kvadratická chyba predikce MEP (z angl. Mean quadratic error of prediction), Akaikovo informační kritérium AIC (z angl. Akaike information criterion), přičemž za optimální se považuje model, pro který dosahuje MEP a AIC minimální hodnotu, jsou uvedeny ve výsledcích vyšetřovaných všech hypotéz. Tabulky dále obsahují extenzivní veličiny, jako jsou reziduální suma čtverců RSC (z angl. Residual sum of squares), směrodatná odchylka reziduí

$s(e)$, směrodatná odchylka odhadu β označená s a spočtená hladina významnosti p . Platí totiž, že statisticky významný odhad β je pro $p < 0,05$. Dále je také uvedena dolní mez L_D a horní mez L_H intervalového odhadu parametru β , vystihující přesnost odhadu.

4.5.1 Navržené regresní modely

Ve všech navržených regresních modelech, vyšetřujících vliv všech dvaceti zvolených mastných kyselin MK na změnu koncentrace markeru zánětu, resp. oxidačního stresu byla použita především metoda nejmenších čtverců (MNČ) a následně Welschova metoda robustních M-odhadů vzhledem k prokázané korelaci mezi nezávisle proměnnými (mastnými kyselinami) v průzkumové analýze. Na základě kritiky modelu a matematické metody se ve všech případech navržených modelů prokazatelně jevila vhodnější metoda klasických nejmenších čtverců. Takto postavené regresní modely zahrnují pouze statisticky významné MK a byly spočteny pouze metodou MNČ.

V regresním modelu, vyšetřujícím vliv dvaceti zadaných mastných kyselin na navýšení koncentrace CRP za 48 hodin po implantaci stentu (tabulka 18) bylo zjištěno, že pouze 7 mastných kyselin má statisticky významný vliv. Kladná hodnota odhadu β byl prokázána u kyseliny myristové x1, marganové x5 a olejové x8. Záporná hodnota statisticky významného odhadu β byla nalezena u kyseliny pentadekanové x2, palmitoolejové x4, elaidové x7 a nervonové x19. V příloze B jsou uvedeny výsledky metody klasických MNČ a v příloze C výsledky metody robustních M-odhadů.

V dalším kroku bylo přistoupeno k vytvoření regresního modelu zahrnujícího pouze statisticky významné mastné kyseliny (tabulka 19). Model byl zproštěn šumu ve formě statisticky nevýznamně vlivných mastných kyselin a lze proto konstatovat, že je vůči předchozímu modelu správnější. V tomto modelu bylo prokázáno, že vliv kyseliny pentadekanové a marganové na změnu koncentrace CRP je ve skutečnosti velmi slabý, protože odhady β byly již statisticky nevýznamné.

V posledním kroku byl regresní výpočet zopakován pouze se zbývajících statisticky významnými MK, tedy s kyselinou myristovou, palmitoolejovou, elaidovou, olejovou a nervonovou. V tomto modelu (tabulka 20) bylo prokázáno, že kyselina myristová je velmi silně pozitivně asociována se změnou koncentrace CRP. Kladná hodnota odhadu β byla nalezena i u kyseliny olejové, ale ve srovnání s kyselinou myristovou asi v 15 krát menší míře. Záporná korelace a také záporné odhady směrnic β s navýšením CRP byly prokázány u kyseliny palmitoolejové, elaidové a nervonové. Výsledky použité matematické metody jsou uvedeny v tabulce 21.

V dalším regresním modelu SAA, testujícím vliv dvaceti zvolených mastných kyselin na navýšení koncentrace SAA za 48 hodin po implantaci stentu (tabulka 22) bylo zjištěno, že pouze tři mastné kyseliny nabývají statisticky významné hodnoty. Přitom kyselina pentadekanová x2 má záporný odhad směrnice β a kyselina marganová x5 s dihomog-linolenovou x15 kladný odhad směrnice β . Výsledky dvou použitých matematických metod jsou uvedeny v příloze D (MNČ) a v příloze E (Welsch). Tento model bylo nutno v následujícím kroku vyčistit od statisticky nevýznamných proměnných. Při výstavbě regresního modelu, zahrnujícího pouze kyselinu pentadekanovou, marganovou a dihomog-linolenovou (tabulka 23) bylo zjištěno, že již žádná mastná kyselina nemá statisticky významný vliv na navýšení koncentrace SAA po implantaci koronárního stentu. Vzhledem k tomu, že tento regresní model je zpřesněním přecházejícího modelu, lze zkonstatovat, že koncentrace námi hodnocených MK v membránách erytrocytů nemá žádný vliv na navýšení koncentrace SAA.

V regresním modelu, testujícím vliv dvaceti zvolených mastných kyselin na navýšení koncentrace IL-6 za 24 hodin po implantaci stentu (tabulka 24) bylo zjištěno, že 7 mastných kyselin má statisticky významný vliv. Konkrétně byl spočten kladný odhad β u kyseliny myristové x1, marganové x5, gondové x13 a dokosahexaenové x20, přičemž síla vlivu kyseliny dokosahexaenové byla v porovnání s ostatními však téměř zanedbatelná. U kyseliny pentadekanové x2 a α -linolenové byl spočten značně záporný odhad β , u kyseliny stearové byl taktéž vypočten záporný odhad směrnice β , nicméně ve srovnání s předešlými je značně nižší. Výsledky matematické metody jsou uvedeny v případě MNČ v příloze F a v případě Welschovy metody v příloze G. Dále bylo přistoupeno k sestrojení regresního modelu (tabulka 25), ve kterém byly nezávisle proměnnými pouze mastné kyseliny, vybrané dle statistické významnosti v předcházejícím regresním modelu. V tomto modelu bylo prokázáno, že koncentrace 7 zvolených mastných kyselin má vliv na navýšení koncentrace IL-6. V tomto modelu však bylo zjištěno, že absolutní člen (úsek) regresní rovnice je statisticky nevýznamný, proto byla výstavba regresního modelu opakována bez absolutního členu a výsledek je uveden v tabulce 26. Bylo odhaleno, že silně pozitivní vliv na navýšení koncentrace IL-6 za 24 hodin po implantaci stentu měla kyselina myristová a gondová, méně pak kyselina dokosahexaenová, značná inverzní závislost byla nalezena mezi navýšením koncentrace IL-6 a kyselinou pentadekanovou a α -linolenovou a ve výrazně menší míře u kyseliny stearové. Výsledky matematické metody (MNČ) použité v tomto modelu jsou uvedeny v tabulce 27.

Poslední regresní model testované závisle proměnné byla změna koncentrace MDA za 48 po implantaci stentu. Již v průzkumové analýze bylo prokázáno, že oxidační stres je do

značné míry odlišný a nezávislý na zánětlivém procesu. V korelační matici bylo odhaleno, že se změnou koncentrace MDA koreluje pouze kyselina γ -linolenová. V regresním modelu všech 20 zvolených MK (tabulka 28) bylo odhaleno, že statisticky významný vliv na změnu na Δ MDA48 vykazovaly pouze kyselina γ -linolenová x10 a eikosadienová x14. U obou těchto kyselin byl nalezen značně kladný odhad směrnice β . Výsledky metody MNČ jsou uvedeny v příloze H a výsledky M-odhadů pak v příloze I. Dále bylo opět přistoupeno k vyřazení statisticky nevýznamných MK a opakování výstavby regresního modelu. Postavený regresní model je uveden v tabulce 29. Bylo prokázáno, že vliv eikosadienové kyseliny na změnu koncentrace malondialdehydu je slabý, neboť v tomto modelu již nebyl její vliv statisticky významný. V posledním kroku byl vypočten regresní model závislosti Δ MDA48 na kyselině γ -linolenové (tabulka 30). Výsledky použité regresní metody jsou uvedeny v tabulce 31.

Následně byl hodnocen vztah mastných kyselin vybraných na základě krabicového grafu z obrázku 7 a analýzy hlavních komponent z obrázku 10b. Regresní model zahrnující pouze mastné kyseliny, jejichž koncentrace v krvi mají největší rozptyl, stejně tak model zahrnující pouze mastné kyseliny dle charakteru průvodičů v grafu komponentních vah se ukázaly jako nevhodné, neboť došlo k vypuštění MK s prokázaným statisticky významným vlivem na zadané závislé proměnné a stejně tak došlo k významnému zhoršení rozhodčích kritérií jako je *MEP* nebo *AIC*.

S ohledem na skutečnost, že každý pacient je jedinečný a složky jeho krve mohou být ovlivňovány řadou skrytých faktorů nebo přidruženými onemocněními, nelze očekávat, že všichni pacienti budou jednoznačně odpovídat nalezeným regresním modelům. Metabolismus každého člověka je do určité míry jedinečný a nelze s jistotou určit příčinu odlišnosti v koncentracích vysvětlovaných proměnných. Domníváme se proto, že vyřazení pacientů bylo ovlivněno výše zmíněnými skutečnostmi. Z navržených modelů, kde za závislou proměnnou byla dosazena Δ CRP48, Δ SAA48 a Δ IL6-24 byli shodně vyřazeni pacienti, jevící se odlišně a značení P3, P11 a P14. Dle lékařských záznamů bylo zjištěno, že pacientka v minulosti prodělala infarkt myokardu léčený implantací koronárního stentu s anamnézou plicní embolie. Dále pacientka byla medikamentózně léčena pro *diabetes mellitus* 2. typu a hypertenzi. Pacient P11 trpěl dnou, léčenou allopurinolem. Pacient P14 se od ostatních lišil již zmíněným abnormálním navýšením koncentrace indikátorů zánětu. U tohoto pacienta byla implantace stentu komplikovaná fibrilací komor a byla stanovena přechodně zvýšená koncentrace troponinu I, která svědčí o poškození myokardu. Navíc ode dne před výkonem byl pacient

subfebrilní až febrilní, nicméně zdroj zánětu nebyl zjištěn. Parenterálně mu byl aplikován aminopenicilin. Dále byli shodně v regresním modelu ΔCRP_{48} a ΔSAA_{48} vyřazeni pacienti P7, P12, P22, P24 a P42. Pacient P7 trpěl dyslipidémií léčenou statiny, hypertenzí a dnou, navíc v minulosti byl pacientovi proveden aortokoronární bypass. Pacient P12 trpěl respirační insuficiencí pro chronickou obstrukční chorobu plicní a užíval antibiotikum Augmentin (ve sputu byl prokázán *Haemophilus influenzae*, *Candida albicans*). Pacient P24 trpěl městnavým srdečním selháním II.-III. stupně s dysfunkcí obou komor, v hrotu levé komory mu byl nalezen trombus a byla provedena dilatace všech oddílů srdce. Navíc pacient trpěl plicní hypertenzí a byl kuřák. U pacienta 22 byla stanovena vyšší koncentrace SAA bez zjevné příčiny, nicméně jednalo se o diabetika 2. typu, trpícího dyslipidémií, hyperurikémií a nephrolithiázou. V regresním modelu ΔSAA_{48} a $\Delta\text{IL6-24}$ byli shodně odstraněni pacienti P4 a P46. Oba tito pacienti byli léčeni pro *diabetes mellitus* 2. typu, hypertenzi a dyslipidémií.

V modelu, kde byla za závisle proměnnou zvolena změna koncentrace CRP za 48 hodin byli dále vyřazeni pacienti P5, P6, P16, P26, P28, P32 a P44. U pacienta s označením P5 došlo k téměř devítinásobnému navýšení CRP bez zjevné příčiny, nicméně je tento pacient byl obézní a trpěl hypertenzí, dyslipidémií a dnou. Pacient P6 byl hypertonik, trpící dyslipidémií a ischemickou chorobou dolních končetin. Pravděpodobnou příčinou abnormálního navýšení koncentrace CRP je skutečnost, že pacient trpěl stenózou koronárních tepen ve všech koronárních tepnách a bylo mu implantováno současně 5 stentů. Pacientka P16 byla hypertonička, která v nedávné době podstoupila cholecystektomii. Pacient P26 trpěl významnou dysfunkcí levé srdeční komory (ejekční frakce 20-25 %), navíc se jednalo o hypertonika trpícího obstrukční chorobou plicní. Pacient P8 byl hypertonik a dyslipidemik, pravděpodobnou příčinou odlišnosti hladiny CRP je současná implantace několik stentů. Pacient P44 byl léčen pro dyslipidémií a trpěl chronickou obstrukční nemocí plicní. U pacienta P32 je příčina odlišnosti a následného vyloučení nejasná.

V modelu, kde za závisle proměnnou byla zvolena změna koncentrace SAA za 48 hodin po implantaci stentu, byli dále odstraněni pacienti P25, P30, P34 a P43. Všichni tito pacienti byli shodně hypertonici a dyslipidemici. Pacientovi P25 byl navíc v minulosti diagnostikován papilární cystadenolymfom. Pacient P30 trpěl steatózou jater a pacient P43 prodělal thyreodektomii pro thyreotoxikózu.

V regresním modelu, ve kterém vystupovala změna IL-6 za 24 hodin jako závisle proměnná byli navíc vyřazeni pacienti P9, P21, a P2. Pacient P2 trpěl kromě dyslipidémie, hypertenze a *diabetes mellitus* navíc psoriázou. Pacient P9 byl taktéž diabetik trpící dyslipidémií, navíc byl léčen pro dnu a ischemickou chorobou dolních končetin. Odlišnost pacienta P21 byla nejasného původu.

Tabulka 18 Regresní model závislosti Δ CRP48 na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů

$n = 39$; $R = 0,9237$; $MEP = 1,2073$; $AIC = -20,2956$; $RSC = 7,8951$; $s(e) = 0,66228$; $\alpha = 0,05$; MNCČ; $y_{\Delta CRP48} = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_{20}x_{20}$

Kyselina	Označení	Odhad (β)	s	Závěr	p	L_D	L_H
	Abs	3,7188	0,7772	Významná	0,0001	2,3712	5,0665
Myristová	x1	323,7004	69,1930	Významná	0,0002	203,7154	443,6855
Pentadekanová	x2	-617,7678	155,7994	Významná	0,0009	-887,9338	-347,6019
Palmitová	x3	1,0470	2,3003	Nevýznamná	0,6545	-2,9419	5,0359
Palmitoolejová	x4	-100,9050	37,7506	Významná	0,0155	-166,3669	-35,4431
Marganová	x5	207,7070	62,3266	Významná	0,0037	99,6287	315,7853
Stearová	x6	-4,5912	3,2886	Nevýznamná	0,1797	-10,2939	1,1114
Elaidová	x7	-496,8200	79,9585	Významná	0,0000	-635,4730	-358,1669
Olejová	x8	9,6656	2,8309	Významná	0,0031	4,7567	14,5746
Linolová	x9	2,6616	2,1099	Nevýznamná	0,2232	-0,9971	6,3203
γ -linolenová	x10	-71,7873	116,4053	Nevýznamná	0,5452	-273,6415	130,0669
Arachová	x11	-27,9238	69,7474	Nevýznamná	0,6936	-148,8702	93,0226
α -linolenová	x12	87,3253	97,5874	Nevýznamná	0,3827	-81,8975	256,5480
Gondová	x13	-4,1035	61,3835	Nevýznamná	0,9474	-110,5464	102,3395
Eikosadienová	x14	118,0691	86,9372	Nevýznamná	0,1912	-32,6855	268,8238
Dihomo- γ -linolenová	x15	-10,7363	9,9807	Nevýznamná	0,2963	-28,0434	6,5708
Behenová	x16	-31,0080	24,5266	Nevýznamná	0,2223	-73,5386	11,5227
Arachidonová	x17	1,7513	0,8950	Nevýznamná	0,0661	0,1992	3,3034
Eikosapentaenová	x18	-12,8135	10,8515	Nevýznamná	0,2531	-31,6308	6,0038
Nervonová	x19	-37,0282	9,0414	Významná	0,0007	-52,7066	-21,3498
Dokosahexaenová	x20	-0,8824	2,6383	Nevýznamná	0,7419	-5,4574	3,6926

Tabulka 19 Regresní model závislosti Δ CRP48 na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 18
 $n = 39$; $R = 0,7528$; $MEP = 0,9590$; $AIC = -4,0554$; $RSC = 23,3202$; $s(e) = 0,8673$; $\alpha = 0,05$; MNČ

Kyselina	Označení	Odhad (β)	s	Závěr	p	L_D	L_H
	Abs	3,2562	0,7185	Významný	0,0001	1,7909	4,7215
Myristová	x1	178,0368	68,4381	Významná	0,0141	38,4564	317,6172
Pentadekanová	x2	-243,3731	141,3501	Nevýznamná	0,0951	-531,6585	44,9124
Palmitoolejová	x4	-71,8101	32,7456	Významná	0,0359	-138,5952	-5,0251
Marganová	x5	69,6567	46,7993	Nevýznamná	0,1467	-25,7910	165,1045
Elaidová	x7	-366,1981	76,1462	Významná	0,0000	-521,4994	-210,8968
Olejová	x8	8,9871	2,5183	Významná	0,0012	3,8509	14,1233
Nervonová	x19	-37,2857	7,2864	Významná	0,0000	-52,1464	-22,4251

Tabulka 20 Regresní model závislosti Δ CRP48 na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 19
 $n = 39$; $R = 0,723$; $MEP = 0,9021$; $AIC = -4,2871$; $RSC = 25686$; $s(e) = 0,8822$; $\alpha = 0,05$; MNČ

Kyselina	Označení	Odhad (β)	s	Závěr	p	L_D	L_H
	Abs	2,9155	0,6798	Významný	0,0001	1,5325	4,2985
Myristová	x1	141,8874	56,9153	Významná	0,0179	26,0923	257,6825
Palmitoolejová	x4	-78,4072	30,1533	Významná	0,0138	-139,7546	-17,0598
Elaidová	x7	-347,1262	75,7928	Významná	0,0001	-501,3279	-192,9245
Olejová	x8	8,7618	2,3542	Významná	0,0007	3,9720	13,5515
Nervonová	x19	-32,4214	6,7138	Významná	0,0000	-46,0807	-18,7620

Závěr: Nalezená regresní rovnice ($y_{\Delta\text{CRP48}} = \beta_0(s) + \beta_1(s) x_1 + \beta_4(s) x_4 + \beta_7(s) x_7 + \beta_8(s) x_8 + \beta_{19}(s) x_{19}$):

$$y_{\Delta\text{CRP48}} = 2,9155 (0,6798) + 141,8874 (56,9153) x_1 + -78,4072 (30,1533) x_4 + -347,1262 (75,7928) x_7 + 8,7618 (2,3542) x_8 + -32,4214 (6,7138) x_{19}$$

Tabulka 21 Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti ΔCRP_{48} na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 19

$n = 39$; $R = 0,723$; $MEP = 0,9021$; $AIC = -4,2871$; $RSC = 25686$; $s(e) = 0,8822$; $\alpha = 0,05$; MNČ; $y_{\Delta\text{CRP}_{48}} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_4 X_4 + \beta_7 X_7 + \beta_8 X_8 + \beta_{19} X_{19}$

Fisher-Snedecorův test	
Hodnota kritéria F :	7,2281
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) :	2,5026
Pravděpodobnost :	0,0001
Závěr :	Model je významný.

Waldův test autokorelace	
Hodnota kritéria WA :	0,2697
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 1)$:	3,8415
Pravděpodobnost :	0,3949
Závěr :	Autokorelace je nevýznamná.

Scottovo kritérium multikolinearity	
Hodnota kritéria SC :	-0,3473
Závěr :	Model je korektní.

Durbin-Watsonův test autokorelace	
Hodnota kritéria DW :	1,7149
Závěr :	Residua nejsou autokorelována.

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity	
Hodnota kritéria CW :	0,7238
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 1)$:	3,8415
Pravděpodobnost :	0,3949
Závěr :	Residua vykazují homoskedasticitu.

Znaménkový test reziduí	
Hodnota kritéria Sg :	0,0042
Kvantil $N(1-\text{alfa}/2)$:	1,9600
Pravděpodobnost :	0,9967
Závěr :	V reziduích není trend.

Jarque-Berrův test normality	
Hodnota kritéria JB :	0,8589
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 2)$:	5,9915
Pravděpodobnost :	0,6509
Závěr :	Residua mají normální rozdělení.

Tabulka 22 Regresní model závislosti $\Delta SAA48$ na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů

$n = 40$; $R = 0,8596$; $MEP = 0,5231$; $AIC = -46,1967$; $RSC = 4,410$; $s(e) = 0,4818$; $\alpha = 0,05$; MNCČ; $y_{\Delta SAA48} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_{20} x_{20}$

Proměnná		Odhad (β)	s	Závěr	p	L_D	L_H
	Abs	-0,0519	0,6721	Nevýznamná	0,9393	-1,2140	1,1103
Myristová	x1	56,4183	41,8230	Nevýznamná	0,1932	-15,8992	128,7358
Pentadekanová	x2	-242,7275	110,8827	Významná	0,0413	-434,4585	-50,9966
Palmitová	x3	-2,4658	1,5092	Nevýznamná	0,1188	-5,0755	0,1439
Palmitoolejová	x4	7,5519	26,0900	Nevýznamná	0,7754	-37,5612	52,6650
Marganová	x5	104,4018	47,4470	Významná	0,0403	22,3596	186,4439
Stearová	x6	0,9502	2,1168	Nevýznamná	0,6586	-2,7100	4,6105
Elaidová	x7	-15,1051	46,0342	Nevýznamná	0,7464	-94,7044	64,4942
Olejová	x8	-1,5057	1,7620	Nevýznamná	0,4034	-4,5524	1,5409
Linolová	x9	-1,5910	1,2923	Nevýznamná	0,2333	-3,8256	0,6435
γ -linolenová	x10	-56,9298	92,0999	Nevýznamná	0,5438	-216,1828	102,3232
Arachová	x11	91,6777	55,3542	Nevýznamná	0,1141	-4,0370	187,3924
α -linolenová	x12	113,5376	64,6455	Nevýznamná	0,0951	1,7570	225,3182
Gondová	x13	-46,7986	42,8050	Nevýznamná	0,2879	-120,8142	27,2169
Eikosadienová	x14	99,0119	72,3304	Nevýznamná	0,1870	-26,0569	224,0808
Dihomo- γ -linolenová	x15	16,1165	6,3091	Významná	0,0194	5,2073	27,0257
Behenová	x16	1,8006	16,4803	Nevýznamná	0,9141	-26,6961	30,2973
Arachidonová	x17	-0,7850	0,6724	Nevýznamná	0,2574	-1,9477	0,3776
Eikosapentaenová	x18	4,4897	8,1658	Nevýznamná	0,5888	-9,6300	18,6094
Nervonová	x19	-5,9889	5,3001	Nevýznamná	0,2726	-15,1535	3,1757
Dokosahexaenová	x20	1,7350	1,7906	Nevýznamná	0,3447	-1,3612	4,8312

Tabulka 23 Regresní model závislosti ΔSAA_{48} na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 22
 $n = 40$; $R = 0,3887$; $MEP = 0,4386$; $AIC = -31,3611$; $RSC = 14,9521$; $s(e) = 0,6444$; $\alpha = 0,05$; MNČ; $y_{\Delta SAA_{48}} = \beta_0 + \beta_2 X_2 + \beta_5 X_5 + \beta_{15} X_{15}$

Kyselina	Označení	Odhad (β)	s	Závěr	p	L_D	L_H
	Abs	-0,0733	0,4649	Nevýznamný	0,8756	-1,0163	0,8696
Pentadekanová	x2	-1,0267	80,8928	Nevýznamná	0,9899	-165,0850	163,0316
Marganová	x5	-0,9763	24,4834	Nevýznamná	0,9684	-50,6309	48,6782
Dihomo- γ -linolenová	x15	6,0541	3,0188	Nevýznamná	0,0524	-0,0684	12,1765

Závěr:

Žádná mastná kyselina z námi zvolených nemá vliv na změnu koncentrace SAA

Tabulka 24 Regresní model závislosti Δ IL6-24 na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů

n = 46; R = 0,8595; MEP = 0,7329; AIC = -28,6823; RSC = 9,8954; $s(e) = 0,6291$; $\alpha = 0,05$; MNČ; $y_{\Delta IL6-24} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_{20} x_{20}$

Proměnná	Označení	Odhad (β)	s	Závěr	p	L_D	L_H
	Abs	0,8661	0,5708	Nevýznamná	0,1417	-0,1089	1,8411
Myristová	x1	212,3131	51,7986	Významná	0,0004	123,8338	300,7924
Pentadekanová	x2	-371,0851	118,8944	Významná	0,0045	-574,1735	-167,9967
Palmitová	x3	2,4707	1,9136	Nevýznamná	0,2085	-0,7980	5,7395
Palmitoolejová	x4	-21,1547	28,7456	Nevýznamná	0,4686	-70,2562	27,9468
Marganová	x5	103,5916	50,1065	Významná	0,0492	18,0025	189,1806
Stearová	x6	-7,8614	2,5217	Významná	0,0045	-12,1687	-3,5540
Elaidová	x7	-101,0011	54,6919	Nevýznamná	0,0767	-194,4226	-7,5796
Olejová	x8	-0,5634	2,0231	Nevýznamná	0,7829	-4,0192	2,8924
Linolová	x9	-2,4570	1,5671	Nevýznamná	0,1295	-5,1339	0,2198
γ -linolenová	x10	-61,7155	80,7429	Nevýznamná	0,4518	-199,6358	76,2047
Arachová	x11	92,5725	64,3240	Nevýznamná	0,1625	-17,3020	202,4470
α -linolenová	x12	-277,7235	83,1167	Významná	0,0026	-419,6985	-135,7486
Gondová	x13	221,6253	64,7695	Významná	0,0021	110,9899	332,2606
Eikosadienová	x14	13,6260	75,6190	Nevýznamná	0,8585	-115,5419	142,7940
Dihomo- γ -linolenová	x15	7,0289	7,3195	Nevýznamná	0,3461	-5,4739	19,5317
Behenová	x16	-16,8345	19,3609	Nevýznamná	0,3928	-49,9057	16,2366
Arachidonová	x17	0,6990	0,7629	Nevýznamná	0,3683	-0,6042	2,0023
Eikosapentaenová	x18	-8,5282	9,3602	Nevýznamná	0,3709	-24,5167	7,4603
Nervonová	x19	-0,8880	5,7829	Nevýznamná	0,8792	-10,7660	8,9900
Dokosahexaenová	x20	7,0992	2,1494	Významná	0,0029	3,4276	10,7707

Tabulka 25 Regresní model závislosti $\Delta IL6-24$ na koncentraci MK vybraných dle statistické významnosti v tab. 24
 $n = 46$; $R = 0,7875$; $MEP = 0,4177$; $AIC = -39,4711$; $RSC = 14,3856$; $s(e) = 0,6073$; $\alpha = 0,05$; MNČ

Kyselina	Označení	Odhad (β)	s	Závěr	p	L_D	L_H
	Abs	0,5716	0,4368	Nevýznamný	0,1983	-0,3118	1,4551
Myristová	x1	199,9809	36,0461	Významná	0,0000	127,0708	272,8910
Pentadekanová	x2	-144,6680	63,0417	Významná	0,0272	-272,1820	-17,1542
Stearová	x6	-3,8269	0,7046	Významná	0,0000	-5,2522	-2,4017
α -linolenová	x12	-326,4730	60,9803	Významná	0,0000	-449,8170	-203,1290
Gondová	x13	232,4130	41,5972	Významná	0,0000	148,2747	316,5513
Dokosahexaenová	x20	4,4349	1,3772	Významná	0,0026	1,6491	7,2207

Tabulka 26 Regresní model závislosti $\Delta IL6-24$ na koncentraci MK vybraných dle statistické významnosti v tab. 25 bez absolutního členu
 $n = 46$; $R = 0,7768$; $MEP = 0,4179$; $AIC = -39,4938$; $RSC = 15,0174$; $s(e) = 0,6127$; $\alpha = 0,05$; MNČ

Kyselina	Označení	Odhad (β)	s	Závěr	p	L_D	L_H
Myristová	x1	215,0134	34,4703	Významná	0,0000	145,3464	284,6805
Pentadekanová	x2	-133,8560	63,0526	Významná	0,0400	-261,2901	-6,4219
Stearová	x6	-3,5961	0,6883	Významná	0,0000	-4,9872	-2,2051
α -linolenová	x12	-345,8796	59,6749	Významná	0,0000	-466,4869	-225,2722
Gondová	x13	249,4020	39,8706	Významná	0,0000	168,8205	329,9835
Dokosahexaenová	x20	4,0091	1,3502	Významná	0,0050	1,2803	6,7379

Závěr: Nalezená regresní rovnice ($y_{\Delta IL6-24} = \beta_1(s) x_1 + \beta_2(s) x_2 + \beta_6(s) x_6 + \beta_{12}(s) x_{12} + \beta_{13}(s) x_{13} + \beta_{20}(s) x_{20}$):

$$y_{\Delta IL6-24} = 215,0134 (34,4703) x_1 + -133,8560 (63,0526) x_2 + -3,5961 (0,6883) x_6 + -345,8796 (59,6749) x_{12} + 249,4020 (39,8706) x_{13} + 4,0091 (1,3502) x_{20}$$

Tabulka 27 Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta IL6-24$ na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 25 bez absolutního členu

$n = 46$; $R = 0,7768$; $MEP = 0,4179$; $AIC = -39,4938$; $RSC = 15,0174$; $s(e) = 0,6127$; $\alpha = 0,05$; MNČ;

$$y_{\Delta IL6-24} = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_6 X_6 + \beta_{12} X_{12} + \beta_{13} X_{13} + \beta_{20} X_{20}$$

Fisher-Snedecorův test	
Hodnota kritéria F :	12,1739
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) :	2,4495
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Model je významný.

Waldův test autokorelace	
Hodnota kritéria WA :	0,1530
Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 1)$:	3,8415
Pravděpodobnost :	0,5669
Závěr :	Autokorelace je nevýznamná.

Scottovo kritérium multikolinearity	
Hodnota kritéria SC :	-0,3012
Závěr :	Model je korektní.

Durbin-Watsonův test autokorelace	
Hodnota kritéria DW :	1,8541
Závěr :	Rezidua nejsou autokorelována

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity	
Hodnota kritéria CW :	0,3280
Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 1)$:	3,8415
Pravděpodobnost :	0,5669
Závěr :	Rezidua vykazují homoskedasticitu.

Znaménkový test reziduí	
Hodnota kritéria Sg :	0,1364
Kvantil $N(1-\alpha/2)$:	1,9600
Pravděpodobnost :	0,8915
Závěr :	V reziduích není trend.

Jarque-Berrův test normality	
Hodnota kritéria JB :	2,1504
Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 2)$:	5,9915
Pravděpodobnost :	0,3412
Závěr :	Rezidua mají normální rozdělení.

Tabulka 28 Regresní model závislosti Δ MDA48 na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů

$n = 54$; $R = 0,7523$; $MEP = 0,4939$; $AIC = -55,6152$; $RSC = 8,8578$; $s(e) = 0,5181$; $\alpha = 0,05$; MNČ; $y_{\Delta MDA48} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_{20} x_{20}$

Kyselina	Označení	Odhad (β)	s	Závěr	p	L_D	L_H
	Abs	-0,0421	0,3841	Nevýznamná	0,9133	-0,6921	0,6079
Myristová	x1	-25,3097	32,0715	Nevýznamná	0,4356	-79,5863	28,9669
Pentadekanová	x2	96,4555	93,4396	Nevýznamná	0,3094	-61,6779	254,5889
Palmitová	x3	1,1355	1,4259	Nevýznamná	0,4315	-1,2777	3,5487
Palmitoolejová	x4	-17,5239	22,3346	Nevýznamná	0,4383	-55,3221	20,2742
Marganová	x5	-3,6422	37,4495	Nevýznamná	0,9231	-67,0202	59,7358
Stearová	x6	-2,2130	2,0150	Nevýznamná	0,2800	-5,6231	1,1971
Elaidová	x7	-2,3184	43,8150	Nevýznamná	0,9581	-76,4693	71,8324
Olejová	x8	-1,0124	1,5133	Nevýznamná	0,5081	-3,5734	1,5486
Linolová	x9	-1,8406	1,2118	Nevýznamná	0,1383	-3,8913	0,2102
γ -linolenová	x10	204,2809	60,6980	Významná	0,0020	101,5580	307,0039
Arachová	x11	9,6150	46,1737	Nevýznamná	0,8363	-68,5274	87,7575
α -linolenová	x12	52,2879	61,6820	Nevýznamná	0,4027	-52,1003	156,6761
Gondová	x13	-25,4075	41,3406	Nevýznamná	0,5430	-95,3706	44,5556
Eikosadienová	x14	119,4608	54,9171	Významná	0,0369	26,5213	212,4003
Dihomo- γ -linolenová	x15	5,1393	5,6868	Nevýznamná	0,3727	-4,4849	14,7635
Behenová	x16	8,8327	14,9613	Nevýznamná	0,5590	-16,4872	34,1527
Arachidonová	x17	-0,9657	0,5872	Nevýznamná	0,1095	-1,9594	0,0280
Eikosapentaenová	x18	-1,1214	7,4370	Nevýznamná	0,8811	-13,7075	11,4646
Nervonová	x19	2,8263	4,0858	Nevýznamná	0,4939	-4,0884	9,7410
Dokosaehaenová	x20	1,6137	1,6049	Nevýznamná	0,3220	-1,1024	4,3297

Tabulka 29 Regresní model závislosti Δ MDA48 na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 28
 $n = 54$; $R = 0,4193$; $MEP = 0,4106$; $AIC = -56,98186152$; $RSC = 168215$; $s(e) = 0,5743$; $\alpha = 0,05$; MNČ

Kyselina	Označení	Odhad (β)	s	Závěr	p	L_D	L_H
	Abs	0,1845	0,2197	Nevýznamný	0,4050	-0,2566	0,6255
γ -linolenová	x10	183,3281	56,9690	Významná	0,0022	68,9581	297,6982
Eikosadienová	x14	-21,5041	20,6092	Nevýznamná	0,3017	-62,8788	19,8706

Tabulka 30 Regresní model závislosti Δ MDA48 na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 29
 $n = 54$; $R = 0,3978$; $MEP = 0,4066$; $AIC = -57,8411$; $RSC = 17,1806$; $s(e) = 0,5748$; $\alpha = 0,05$; MNČ

Kyselina	Označení	Odhad (β)	s	Závěr	p	L_D	L_H
	Abs	0,0074	0,1396	Nevýznamný	0,9579	-0,2728	0,28757
γ -linolenová	x10	152,5972	48,8068	Významná	0,0029	54,6592	250,5352

Závěr: Nalezená regresní rovnice ($y_{\Delta\text{MDA48}} = \beta_0(s) + \beta_{10}(s) x_{10}$):

$$y_{\Delta\text{MDA48}} = 0,0074 (0,1396) + 152,5972 (48,8068) x_{10}$$

Tabulka 31 Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti Δ MDA48 na koncentraci MK v membránách erytrocytů vybraných dle statistické významnosti v tab. 29

$n = 54$; $R = 0,3978$; $MEP = 0,4066$; $AIC = -57,8411$; $RSC = 17,1806$; $s(e) = 0,5748$; $\alpha = 0,05$; MNČ

Fisher-Snedecorův test	
Hodnota kritéria F :	-0,2898
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) :	4,0343
Pravděpodobnost :	1,0000
Závěr :	Model je významný.

Waldův test autokorelace	
Hodnota kritéria WA :	0,0851
Kvantil $\chi^2(1-\alpha,1)$:	3,8415
Pravděpodobnost :	0,9734
Závěr :	Autokorelace je nevýznamná.

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity	
Hodnota kritéria CW :	0,0011
Kvantil $\chi^2(1-\alpha,1)$:	3,8415
Pravděpodobnost :	0,9734
Závěr :	Rezidua vykazují homoskedasticitu.

Durbin-Watsonův test autokorelace	
Hodnota kritéria DW :	1,8479
Závěr :	Rezidua nejsou autokorelována

Jarque-Berrův test normality	
Hodnota kritéria JB :	7,6625
Kvantil $\chi^2(1-\alpha,2)$:	5,9915
Pravděpodobnost :	0,0217
Závěr :	Rezidua nemají normální rozdělení!

Znaménkový test reziduí	
Hodnota kritéria Sg :	0,8463
Kvantil $N(1-\alpha/2)$:	1,9600
Pravděpodobnost :	0,3974
Závěr :	V reziduích není trend.

5 Diskuze

Závažné zúžení koronárních tepen, které ohrožuje nemocného vznikem infarktu myokardu, je v současné době léčeno nejčastěji perkutánní koronární intervencí s následnou implantací stentu. Tento výkon spouští zánětlivou reakci organismu, avšak nadměrná aktivace imunitního systému je nežádoucí, neboť může přispívat k rozvoji zánětlivých komplikací, jako je restenóza ve stentu. Ve snaze snížení zánětlivé reakce jsou v současné době vyvíjeny stenty potažené různými protizánětlivými léčivy.

Cílem naší studie bylo zjistit, zda existuje vztah mezi zastoupením MK v membránách erytrocytů, resp. ve fosfolipidech séra a změnou koncentrace zánětlivých markerů (CRP, SAA, IL-6 a Cp) a markeru oxidačního stresu (MDA) po implantaci koronárního stentu.

Studie se zúčastnilo celkem 77 pacientů. Ze studie bylo vyloučeno 8 pacientů, jejichž hladiny hsCRP přesahovaly hodnotu 10 mg/l již před vlastní implantací stentu. Již probíhající zánětlivý proces by totiž překryl zánětlivou reakci způsobenu implantací stentu. Dále byl vyřazen 1 pacient, neboť u něj se zavedení stentu nezdařilo. Před statistickým vyhodnocením bylo vyřazeno 7 pacientů, u kterých nebyly dostupné výsledky všech statisticky hodnocených parametrů. Dále u 7 vzorů erytrocytů došlo ke znehodnocení během analytické fáze. V konečném výsledku bylo hodnoceno 54 pacientů. Při hodnocení námi vybraných vztahů bylo nutno brát zřetel na skutečnost, že každý pacient je jedinečný a na složky jeho krev může působit řada skrytých faktorů. Navíc řada pacientů trpěla přidruženými metabolickými chorobami, jako je dyslipidémie či *diabetes mellitus*, které by mohly do značné míry ovlivňovat zánětlivý proces či zastoupení mastných kyselin.

Koncentrace mastných kyselin byla stanovena v krvi pacientů před perkutánní koronární intervencí. Konkrétně bylo kvantifikováno dvacet mastných kyselin, které byly vybrány tak, aby vystihovaly zástupce nasycených, *cis*-mononenasycených, *trans*-mononenasycených, n-6 a n-3 polynenasycených mastných kyselin nejvíce diskutovaných v souvislosti s rozvojem kardiovaskulárních onemocnění. Stanovení vybraných mastných kyselin bylo provedeno ve frakci fosfolipidů séra a v membránách erytrocytů. Zastoupení mastných kyselin ve fosfolipidech je významně ovlivňováno tuky přijímanými stravou, zatímco profil mastných kyselin v membránách erytrocytů je poměrně málo proměnlivý a je považován za indikátor dlouhodobého příjmu mastných kyselin [68]. Navíc bylo prokázáno, že membrány erytrocytů poměrně dobře odrážejí zastoupení mastných kyselin v membránách buněk řady tkání, jako jsou například kardiomyocyty [72]. Obvykle se hodnotí pouze procentuální zastoupení MK v membránách erytrocytů, nicméně objektivnějším vyjádřením množství je koncentrace, v naší

práci vyjadřujeme množství mastných kyselin v μmol na g hemoglobinu. Tyto jednotky považujeme za vhodnější než $\mu\text{mol/l}$ krve, protože počet červených krvinek může být u různých jedinců odlišný, a to by mohlo do značné míry i ovlivňovat stanovené množství mastných kyselin.

Koncentrace markerů byla stanovena před implantací stentu a následně po 24 a 48 hodinách. Ze získaných koncentrací byla pro sledování dynamiky zánětlivé reakce vybrána nejvyšší změna koncentrace. V případě CRP, SAA, Cp a MDA došlo k nejvyššímu navýšení koncentrace po 48 hodinách po výkonu, což je v souladu s literaturou [24], v případě IL-6 byla stanovena nejvyšší koncentrace po 24 hodinách, stejně jako se uvádí v práci [28]. Tyto změny byly následně vyděleny počátečními koncentracemi v čase 0 a označeny jako ΔCRP48 , ΔSAA48 , ΔCp48 , ΔMDA48 a $\Delta\text{IL6-24}$.

Před vyšetřením vztahu mezi koncentracemi mastných kyselin a rozvojem zánětlivé reakce po implantaci koronárního stentu předcházela exploratorní průzkumová analýza dat-koncentrací mastných kyselin. Exploratorní průzkumovou analýzou MK v membránách erytrocytů bylo prokázáno, že mezi mastnými kyselinami jsou silné pozitivní korelace. Například nejvíce pozitivních korelací ($R > 0,8$) bylo nalezeno u kyseliny stearové, která pozitivně korelovala s kyselinou olejovou, linolovou, eikosadienovou, behenovou, arachidonovou, nervonovou a dokosahexaenovou. Podobně kyselina palmitová korelovala ($R > 0,8$) s koncentrací kyseliny marganové, olejové, linolové, behenové, nervonové a dokosahexaenové. Kyselina linolová kromě výše zmíněných korelovala ($R > 0,8$) s eikosadienovou, dihomog γ -linolenovou, arachidonovou, nervonovou a dokosahexaenovou kyselinou.

Při sledování vztahu koncentrace MK a dynamiky zánětlivé reakce bylo prokázáno, že existuje řada statisticky významných vztahů mezi koncentracemi MK a zánětlivými markery. Všechny hodnocené zánětlivé markery (CRP, SAA, Cp, IL-6) jsou považovány za rizikové faktory pro rozvoj ischemické choroby srdeční [35, 73]. V korelační matici bylo prokázáno, že ΔCRP48 , ΔSAA48 a $\Delta\text{IL6-24}$ spolu navzájem silně pozitivně korelují. Při hodnocení korelační matice nebyl nalezen žádný statisticky významný vztah mezi změnou koncentrace ceruloplasminu a koncentrací mastných kyselin ani s ostatními zánětlivými markery. Tento nález podporuje myšlenku, že role ceruloplasminu v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění a zánětu není zcela jednoznačná. Potvrzuje to například proteomická studie publikovaná v loňském roce, která uvádí, že pacienti s koronární aterosklerózou mají sníženou krevní koncentraci ceruloplasminu v porovnání se zdravou populací [74], což vyvrací tvrzení již

zmíněných publikací [37, 38], ve kterých je Cp spojován se závažností KVO. Diverzita těchto studií podporuje myšlenku, že Cp může působit jako antioxidant, například schopností potlačovat Fentonovu reakci, ale i jako prooxidant, neboť se uvádí, že při infarktu myokardu dochází k uvolnění iontů mědi vázané na ceruloplasmin. Volná měď má schopnost působit oxidační poškození buněk [36]. Na základě výše zmíněných skutečností ceruloplasmin není vhodný pro hodnocení zánětlivé reakce po implantaci stentu. Při hodnocení vlivu koncentrace MK na dynamiku oxidačního stresu, měřenou jako relativní změnu MDA za 48 hodin, byla zjištěna statisticky významná korelace pouze s kyselinou γ -linolenovou a žádnými zmíněnými zánětlivými markery. Tyto výsledky naznačují, že ačkoliv je tvorba reaktivních forem kyslíku spojována s rozvojem KVO [41], zánětlivý proces a oxidační stres jsou do značné míry dva odlišné na sobě nezávislé procesy.

Při hodnocení variability koncentrací MK v membránách erytrocytů krabicovým grafem bylo zjištěno, že největší rozptyl koncentrací má kyselina palmitová, stearová, olejová, linolová, arachidonová a dokosahexaenová. Současně je zjevné, že kyseliny palmitová, stearová, arachidonová, linolová a γ -linolenová představují majoritní mastné kyseliny v membránách erytrocytů, jedná se o mastné kyseliny vystykující se v celé řadě běžně dostupných potravin [42]. Při hodnocení koncentrací indikátorů zánětu a oxidačního stresu v krabicovém grafu, byla zjištěna podobná variabilita, ale existují pacienti, u kterých došlo k extrémnímu nárůstu koncentrace. Jednalo se o pacienta P14, u kterého došlo k devadesátinásobnému navýšení koncentrace SAA za 48 hodin a více než dvacetinásobnému navýšení koncentrace CRP za 48 hodin a IL-6 za 24 hodin po implantaci stentu. U tohoto pacienta byla implantace stentu komplikovaná fibrilací komor a byla stanovena přechodně zvýšená koncentrace troponinu I, která svědčí o poškození myokardu. Navíc ode dne před výkonem byl pacient subfebrilní až febrilní, nicméně zdroj zánětu nebyl zjištěn. Parenterálně mu byl aplikován aminopenicilin. K více než desetinásobnému navýšení SAA došlo i u pacienta P12, P22 a P24. Pacient P12 trpěl respirační insuficiencí pro chronickou obstrukční chorobu plicní a užíval antibiotikum Augmentin (ve sputu byl prokázán *Haemophilus influenzae*, *Candida albicans*). Pacient P24 trpěl městnavým srdečním selháním II.-III. stupně s dysfunkcí obou komor, v hrotu levé komory mu byl nalezen trombus, byla provedena dilatace všech oddílů srdce. Navíc pacient trpí plicní hypertenzí a je kuřák. U pacienta P22 nebyl nalezen žádný konkrétní zdroj navýšení sérové koncentrace SAA, nicméně jedná se o diabetika 2. typu, trpícího dyslipidémií a hyperurikémií. Nález extrémního navýšení SAA je v souladu

s literaturou [31], která uvádí, že během zánětlivého procesu může dojít k navýšení SAA až tisíckrát.

Z porovnání profilů MK v membránách erytrocytů v ikonovém grafu hvězdiček bylo zjištěno, že mezi pacienty je značná variabilita. Existují pacienti, kteří mají nízké, ale i vysoké koncentrace všech mastných kyselin v membránách erytrocytů. Značně odlišnou od ostatních se jevila pacientka P3, protože u ní byly v membránách erytrocytů stanoveny vyšší koncentrace nasycených mastných kyselin a velmi nízké koncentrace nenasycených mastných kyselin. Dle lékařských záznamů bylo zjištěno, že pacientka v minulosti prodělala infarkt myokardu léčený implantací koronárního stentu s anamnézou plicní embolie. Dále tato pacientka byla medikamentózně léčena pro *diabetes mellitus* 2. typu a hypertenzi.

Vzájemný vztah MK (znaků) a pacientů (objektů) byl šetřen analýzou hlavních komponent, faktorovou analýzou a shlukovou analýzou. V analýze hlavních komponent se pacienti rozdělili do dvou zřetelných shluků, přičemž silně odlišnou, od obou zmíněných, se jevila již zmíněná pacientka P3. Ve faktorové analýze se grafem faktorových vah s rotací Varimax podařilo rozčlenit MK do skupin s podobnými vlastnostmi. Faktor 1 byl nazván „Délka uhlíkatého řetězce a počet dvojných vazeb“ a faktor 2 „Koncentrace SFA“. Takto pojmenované faktory byly použity v grafu faktorového skóre. V tomto grafu došlo opět k vytvoření dvou zřetelných shluků, které byly téměř shodné se shluky nalezenými v analýze hlavních komponent. Tímto grafem byla ověřena správnost pojmenovaných faktorů, neboť z ikonového grafu bylo zřejmé, že pacientka P3 se významně lišila od ostatních vyšší koncentrací nasycených mastných kyselin a velmi nízkou koncentrací nenasycených mastných kyselin. Stejně tak pacienti ležící ve shluku vyskytující se v grafu faktorového skóre blízko počátku (0,0), byli v ikonových grafech znázorněni velmi malými hvězdičkami, které zřetelně vypovídaly o nízké koncentraci všech MK v membránách erytrocytů. Dále byly získané výsledky porovnány s výsledky shlukové analýzy. V dendrogramu znaků došlo k rozdělení MK do tří shluků. V dendrogramu objektů (pacientů) byly nalezeny čtyři shluky pacientů, shluk označený černě byl shodný se shlukem popsáným již v analýze hlavních komponent a faktorové analýze, jednalo se o pacienty s nízkými koncentracemi MK v membránách erytrocytů, u ostatních skupin pacientů se nepodařilo odhalit důvod jejich shluknutí, neboť při přenesení shluků do grafu faktorového skóre bylo nalezeno značné překrytí. Určení důvodu odlišnosti či podobnosti pacientů je velmi náročné, neboť je zřejmé, že každý člověk je jedinečný a působí na něj řada skrytých faktorů.

Při exploratorní analýze zdrojové matice dat koncentrací mastných kyselin ve frakci fosfolipidů séra a relativních změn koncentrací zánětlivých markerů, bylo zjištěno, že mezi koncentracemi MK a zánětlivými markery neexistují statisticky významné korelace. Jedním z důvodů může být již zmíněná skutečnost, že sérová koncentrace MK, na rozdíl od MK v membránách erytrocytů, je do značné míry ovlivňována složením přijímané potravy [68], proto byly dále hodnoceny pouze MK stanovené v membránách erytrocytů.

Vztah mezi mastnými kyselinami v membránách erytrocytů a markery vybranými na základě exploratorní analýzy byl následně šetřen pomocí vícenásobné lineární regrese. Mastné kyseliny zde vystupovaly jako nezávisle proměnné a indikátory Δ CRP48, Δ SAA48, Δ IL6-24 a Δ MDA48 jako závisle proměnné. V kritice dat byly v analýze vlivných bodů detekovány odlehlé body, zde pacienti, které bylo nutno z další regresní analýzy odstranit. Vytvořený regresní model, ve kterém byla za y dosazena Δ CRP48 zahrnoval 39 pacientů, regresní model, ve kterém byla za y dosazena Δ SAA48 zahrnoval 40 pacientů a regresní model, ve kterém byla za y dosazena Δ IL6-24 zahrnoval 46 pacientů. Regresní model, ve kterém byla za y dosazena Δ MDA48 nevyžadoval odstranění žádného pacienta. Nelze s jistotou říci skutečný důvod odlišnosti vyřazených pacientů, nicméně řada z nich trpěla přidruženými onemocněními, jako je hyperlipidémie, hypertenze, *diabetes mellitus* 2. typu nebo dna. Někteří pacienti v době implantace stentu užívali antibiotika pro bakteriální infekci nebo jim bylo implantováno současně několik stentů, které pravděpodobně vyvolaly nadměrnou aktivaci imunitního systému a následné zvýšení koncentrace indikátorů zánětu.

Podobné problematice se věnovala i skupina islandských vědců [72]. Ti sledovali dynamiku zánětlivé reakce indikovanou změnou plazmatické koncentrace TNF- α , TNF- β , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ , makrofágového zánětlivého proteinu α a TGF- β v závislosti na profilu polynenasycených mastných kyselin ve fosfolipidech séra, resp. membránách erytrocytů u pacientů podstupujících operaci srdce. V této studii byly nalezeny statisticky významné vztahy mezi koncentracemi n-3 a n-6 PUFA a změnou koncentrace TNF- β , IL-1 β , INF- γ nebo TGF- β 72 hodin po operaci. Dle této studie je role eikosapentaenové a arachidonové kyseliny v zánětlivém procesu velmi komplexní, neboť jejich koncentrace korelovaly s prozánětlivými i protizánětlivými mediátory.

Nejprve byl vypočten regresní model pro každý zánětlivý marker zahrnující 20 zvolených mastných kyselin. Tyto modely byly podrobeny kritice modelu a matematické metody. Na základě testačních kritérií bylo rozhodnuto, že ve všech případech je vhodnější užití klasické metody nejmenších čtverců. V dalších krocích bylo přistoupeno k několikanásobnému

opakování výpočtů regresních modelů a to pouze s mastnými kyselinami vybranými na základě statistické významnosti v modelech předešlých. Závěrem vícenásobné lineární regrese bylo zjištěno se spočtenou hladinou významnosti vyšší než $\alpha = 0,05$:

1. Na změnu koncentrace CRP za 48 hodin po implantaci koronárního stentu má vliv 5 mastných kyselin z původních dvaceti zvolených. Velmi silná pozitivní asociace s navýšením CRP byla odhalena u kyseliny myristové a přibližně 15 krát nižší pozitivní asociace kyseliny olejové. Inverzní korelace s navýšením CRP byly prokázány u kyseliny elaidové, palmitoolejové a nervonové, přičemž kyselina elaidová měla přibližně 5 krát silnější inverzní asociaci se závislou proměnnou v porovnání s kyselinou palmitoolejovou a v případě kyseliny nervonové dokonce více než 10 krát vyšší.
2. V případě sérového amyloidu A bylo zjištěno, že hodnocené mastné kyseliny nemají statisticky významný vliv na jeho navýšení.
3. Na změnu koncentrace interleukinu 6 za 24 hodin po implantaci stentu má vliv 6 z 20 zvolených MK. Pozitivní vliv na navýšení koncentrace IL-6 byl prokázán u kyseliny myristové, gondové a ve výrazně menší míře u dokosahexaenové. Nejvyšší odhad směrnice byl nalezen u kyseliny gondové. Značná inverzní závislost byla nalezena mezi navýšením koncentrace IL-6 a kyselinou pentadekanovou a α -linolenovou a ve výrazně menší míře u kyseliny stearové.
4. Na změnu koncentrace malondialdehydu za 48 hodin po implantaci stentu má vliv ze všech zvolených mastných kyselin pouze kyselina γ -linolenová. Bylo prokázáno, že tato kyselina je pozitivně asociována s nárůstem oxidačního poškození buněk.

Kyselina myristová byla statisticky významně pozitivně asociována s navýšením koncentrace CRP za 48 hodin a IL-6 za 24 hodin. Již dříve bylo uvedeno, že SFA se sudým počtem uhlíků (C12-C18) se podílí na regulaci lipidového metabolismu prostřednictvím vazby na transkripčních faktorů SREBP a LXR [42], tyto transkripční faktory jsou mimo jiné vysoce exprimovány v makrofázích a bylo prokázáno, že aktivace SREBP je spojována s prozánětlivým fenotypem M1 makrofágů, který je známý schopností produkovat zánětlivé cytokiny, jako jsou interferon γ , IL-1 β , IL-6 nebo TNF- α . Dále je prokázáno, že nadbytek SFA může vést v makrofázích k mitochondriální dysfunkci, která opět podporuje jejich diferenciaci v M1 fenotyp, částečně to souvisí s funkcí transkripčního faktoru LXR, neboť reguluje transport lipidů z makrofágů. Na druhou stranu je ale zvýšená regulace LXR spojována s down-regulací NF- κ B [62]. Asociaci kyseliny myristové se zánětlivým procesem potvrzuje i kanadská studie [75], ve které je uvedeno, že u mladých mužů a žen do 29 let koncentrace kyseliny myristové

pozitivně koreluje s koncentrací CRP. V této práci bylo navrženo, že prozánětlivý účinek kyseliny myristové spočívá ve schopnosti up-regulovat transkripční faktor NF- κ B prostřednictvím TLR 2 a 4.

Inverzní vztah k navýšení IL-6 za 24 hodin po výkonu, byl nalezen u koncentrace pentadekanové kyseliny. Kyselina pentadekanová je zástupcem minoritních lichých MK v lidské stravě. Je považována za indikátor příjmu mléčných tuků. V literatuře se uvádí, že kyselina pentadekanová je asociována s nižším rizikem KVO, ICHS a *diabetes mellitus* 2. typu [76]. Studie Zhenga a kolektivu [46] hodnotící vztah nasycených mastných kyselin k různým metabolickým indikátorům prokázala, že kyselina pentadekanová je inverzně asociována s koncentrací CRP, celkového cholesterolu, TAG, apolipoproteinu A1 a B a jaterních enzymů, jako je například alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza.

Poslední saturevanou mastnou kyselinou, u které byl prokázán statisticky významný vliv na zánětlivý proces, byla kyselina stearová. Tato kyselina byla poměrně slabě inverzně asociována s navýšením koncentrace IL-6, její účinek byl asi 100 krát nižší než u kyseliny α -linolenové. Různé literární zdroje se liší v tom, zda kyselina stearová působí spíše prozánětlivě nebo protizánětlivě. Uvádí se, že kyselina stearová je spojována nižším rizikem KVO než kyselina myristová či palmitová [42]. Shodných výsledků dosáhli v již zmíněné kanadské studii [75] nebo v publikaci [53], kde bylo prokázáno, že kyselina stearová inverzně koreluje s koncentrací CRP. Vědci z Kanady [77] zjistili, že plazmatická koncentrace stearové kyseliny je inverzně asociována s plazmatickou koncentrací CRP a zároveň i s aktivitou enzymu stearoyl-CoA desaturázy-1 (SCD-1). Z výsledků jejich práce vyplývá, že při snížené aktivitě SCD-1, která například katalyzuje vznik olejové kyseliny právě ze stearové kyseliny, je potlačován zánětlivý stav, neboť plazmatická koncentrace olejové kyseliny pozitivně korelovala s koncentrací CRP. V rozporu s uvedeným se uvádí se, že kyselina stearová je, stejně jako palmitová či myristová, schopna up-regulovat NF- κ B prostřednictvím TLR, stejně tak se podílí na již zmíněné regulaci SREBP a LXR, čímž se zapojuje do zánětu [62].

Mezi MUFA bylo prokázáno, že s navýšením koncentrace CRP je inverzně asociována kyselina palmitoolejová a nervonová, naopak pozitivně kyselina olejová. Kyselina palmitoolejová má pozitivní vliv na lidské zdraví, neboť ve studii, kde bylo pacientům s dyslipidemií a systémovým zánětem podáváno 220,5 mg/den kyseliny palmitoolejové po dobu 30 dní bylo zjištěno významné snížení hladiny CRP, TAG a LDL a naopak zvýšení HDL cholesterolu ve srovnání s placebem [51]. Mechanismus účinku kyseliny palmitoolejové na makrofágy studoval kolektiv vědců z Brazílie a Anglie [78]. Autoři kultivovali dvě linie myších

makrofágů (WT nebo s inaktivovaným genem pro receptor PPAR- α) v prostředí účinku lipopolysacharidu s nebo bez kyseliny palmitoolejové. Kultivace WT makrofágů prokázala, že kyselina palmitoolejová působí protizánětlivě schopností up-regulovat PPAR- α , který je schopný inhibovat transkripční faktor NF- κ B. Dále je dle jejich práce zřejmé, že kyselina palmitoolejová je schopná tlumit zánětlivý proces nezávisle na inaktivaci genu pro PPAR- α , neboť bylo například v obou liniích prokázáno, že kyselina palmitoolejová při současném účinku zánětlivého stimulu snižuje produkci IL-6, IL-1 β nebo expresi NF- κ B makrofágy v porovnání s makrofágy kultivovanými pouze s lipopolysacharidem. Nicméně autoři již zmíněných publikací [53] a [75] naopak uvádějí, že koncentrace kyseliny palmitoolejové pozitivně koreluje s plazmatickou koncentrací CRP. Vzhledem k tomu, že Petersson a kolektiv [53] našli pozitivní korelaci nejenom mezi koncentrací palmitoolejové kyseliny, ale i pozitivní korelaci indexu SCD-1 (poměr palmitoolejové/palmitové kyseliny) s koncentrací CRP je podezření, že nalezené vztahy jsou způsobeny vysokým příjmem SFA stravou, nadměrnou aktivitou SCD-1, která by mohla sama o sobě podporovat zánět nebo metabolickou poruchou, která by vedla ke zvýšené aktivitě SCD-1.

Dále pozitivní vztah k navýšení koncentrace IL-6 vykazovala kyselina gondová. Při hodnocení vlivu na CRP tato závislost nebyla prokázána. Nicméně asociaci kyseliny gondové se zánětlivým procesem potvrzuje studie německých výzkumníků publikovaná v loňském roce [50], ve které bylo prokázáno u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním i u zdravých, že koncentrace gondové kyseliny inverzně koreluje s plazmatickou koncentrací LDL a HDL-cholesterolu a TAG a pozitivně s koncentrací CRP a aktivací endotelu. Mimo jiné bylo prokázáno, že vyšší koncentrace kyseliny gondové představuje vyšší riziko úmrtí všech příčin a zvyšuje riziko úmrtí z kardiovaskulárních příčin u žen. Kyselinu gondovou lze řadit mezi minoritně vyskytující se MK a v současné době nejsou dostupné žádné informace o mechanismu zapojení kyseliny gondové do zánětlivého procesu a rozvoje kardiovaskulárních onemocnění.

Kyselina nervonová je ve formě sfingomyelinu významnou součástí myelinu a je prokázáno, že při stavech jako jsou závažně depresivní poruchy, které jsou spojeny s dysfunkcí bílé hmoty mozkové, je její plazmatická koncentrace značně zvýšená ve srovnání se zdravými jedinci. Autoři nedávno publikované pilotní studie [79] navrhli koncentraci kyseliny nervonové jako diagnostický indikátor závažných depresivních poruch. Při hodnocení sérových lipidů u pacientů s metabolickým syndromem v porovnání se zdravými jedinci v japonské studii [80] bylo zjištěno, že koncentrace kyseliny nervonové je u zdravých jedinců prokazatelně vyšší a

současně pozitivně koreluje s koncentrací HDL-c a inverzně s koncentrací TAG a sdLDL-c (malý denzní LDL-c). Kyselinu nervonou lze označit za zdraví prospěšnou, neboť metabolický syndrom je spojován se systémovým zánětem a je považován za rizikový faktor řady nemocí včetně ICHS. Nicméně mechanismus účinku této kyseliny na lidský organismus není znám.

Nález pozitivní asociace koncentrace kyseliny olejové s navýšením koncentrace CRP je v souladu s výsledky již zmíněné publikace [50]. V literatuře doposud převažovaly názory, že kyselina olejová je zdraví prospěšná, neboť v řadě intervenčních studií, kdy účastníci užívali preparáty s olivovým olejem, byla prokázána řada protektivních účinků, skutečný přínos je však nejistý, protože olivový olej obsahuje další prospěšné složky, jako je skvalen, antioxidační hydrofilní fenolové alkoholy, polyfenoly nebo vitamín E, které by mohly být zodpovědné za zjevné zdravotní přínosy. Delgado a kolektiv ve zmíněné studii [50] odhalili, že prospěšnost kyseliny olejové na lidské zdraví nemá lineární závislost. Autoři uvádí, že závislost úmrtí všech příčin na procentuálním zastoupení olejové kyseliny v membránách erytrocytů je nelineární, ve tvaru U, přičemž za optimální se jevílo 14 %, hodnoty pod 13 a nad 15 % byly spojovány s vyšší mírou úmrtnosti. V našem souboru pacientů při přepočtu na relativní zastoupení MK v membránách erytrocytů bylo prokázáno, že pacienti mají ve většině případů zastoupení této kyseliny právě pod 13 %. Současně shodně s našimi výsledky autoři prokázali pozitivní asociaci procentuálního zastoupením kyseliny olejové v membránách erytrocytů s koncentrací CRP. Významná inverzní závislost kyseliny elaidové s navýšením koncentrace CRP, jakožto jediného zástupce *trans*-MUFA, na rozvoj zánětlivého procesu je zcela překvapivá.

Úloha PUFA v rozvoji zánětlivé reakce není zcela jednoznačná. Jak již bylo zmíněno, obecně se n-6 PUFA označují spíše za prozánětlivé a n-3 protizánětlivé [42, 47], ale toto tvrzení je částečně zavádějící, neboť je zřejmé, že zástupci obou skupin PUFA jsou schopné tvořit jak prozánětlivé tak i protizánětlivé mediátory. Ačkoliv jsou PUFA nejvíce diskutovanými MK v souvislosti se zapojením se do zánětlivého procesu, v naší studii bylo zapojení těchto MK značně omezené. Byla prokázána velmi silná inverzní asociace koncentrace kyseliny α -linolenové a velmi nízká, téměř zanedbatelná, pozitivní asociace kyseliny dokosahexaenové se změnou koncentrace IL-6. Kyselina α -linolenová je zástupcem n-3 PUFA a je prekurzorem významné EPA a DHA, u kterých byla prokázána řada zdraví prospěšných účinků a jsou poměrně dobře popsány i mechanismy účinku, viz teoretická část. Z n-6 PUFA bylo v naší studii prokázáno, že pouze kyselina γ -linolenová má vliv na navýšení koncentrace malondialdehydu, který slouží jako indikátor oxidačního stresu buněk. Obecně se předpokládá,

že lipoperoxidaci mohou podléhat mastné kyseliny, které mají ve své struktuře dvojnou vazbu [41].

Překvapivým výsledkem této studie je skutečnost, že kyselina arachidonová, zástupce n-6 PUFA a kyselina eikosapentaenová, zástupce n-3 PUFA, které jsou v literatuře hojně diskutovány pro své zapojení v zánětlivém procesu, neukázaly v naší studii žádný vliv na změnu koncentrace zvolených zánětlivých indikátorů, resp. markeru oxidačního stresu.

6 Závěr

Po provedení perkutánní koronární intervence s následnou implantací stentu dochází k rozvoji zánětlivé reakce, což vyplývá z navýšení koncentrace sledovaných indikátorů zánětu, kdy maximální koncentrace byly zaznamenány pro interleukin 6 po 24 hodinách, pro C-reaktivní protein a sérový amyloid A po 48 hodinách a v případě markeru lipoperoxidace, malondialdehydu po 48 hodinách. Dalším hodnoceným markerem byla změna koncentrace ceruloplasminu po 48 hodinách, nicméně exploratorní analýzou dat bylo odhaleno, že ceruloplasmin není vhodným indikátorem zánětlivé reakce.

Pro sledování vztahu mezi mastnými kyselinami a zánětlivou reakcí, resp. oxidačním poškozením buněk byly stanoveny koncentrace mastných kyselin ve frakci sérových fosfolipidů a v membránách erytrocytů. Exploratorní analýza dat prokázala, že pouze koncentrace mastných kyselin stanovené v membránách erytrocytů jsou vhodné pro hodnocení námi vybraných vztahů.

Vícenásobnou lineární regresí se podařilo jednoznačně kvantitativně vyšetřit, které mastné kyseliny v membránách erytrocytů a jakou silou se podílejí na zvyšování či snižování plazmatických koncentrací zvolených indikátorů. Se změnou koncentrace C-reaktivního proteinu za 48 hodin po implantaci koronárního stentu velmi silně korelovala kyselina myristová a v menší míře kyselina olejová. Nejsilnější negativní korelace byla odhalena u kyseliny elaidové a dále u kyseliny palmitoolejové a nervonové. Navýšení koncentrace interleukinu 6 za 24 hodin po implantaci stentu nejvíce podporovala kyselina gondová a myristová, významně méně pak kyselina dokosahexaenová. Inverzní asociaci se změnou koncentrace interleukinu 6 za 24 hodin vykazovala kyselina α -linolenová a pentadekanová. Stejná závislost byla nalezena i u kyseliny stearové nicméně ve značně menší míře. V případě šetření vlivu koncentrace mastných kyselin na navýšení malondialdehydu za 48 hodin po implantaci stentu bylo prokázáno, že s oxidačním poškozením buněk je pozitivně asociována pouze kyselina γ -linolenová.

Naše výsledky mohou mít praktický význam pro zlepšení klinických výsledků pacientů podstupujících perkutánní koronární intervenci a implantaci stentu, neboť profil mastných kyselin lze ovlivnit příjmem potravy či různých doplňků.

7 Literární zdroje

- [1] Benjamin, E. J., Blaha, M. J., Chiuve, S. E., Cushman, M., Das, S. R., Deo, R., De Ferranti, S. D., Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C. R., Jim'nez, M. C., Jordan, L. C., Judd, S. E., Lackland, D., Lichtman, J. H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C. T., MacKey, R. H., Matsushita, K., Mozaffarian, D., Mussolino, M. E., Nasir, K., Neumar, R. W., Palaniappan, L., Pandey, D. K., Thiagarajan, R. R., Reeves, M. J., Ritchey, M., Rodriguez, C. J., Roth, G. A., Rosamond, W. D., Sasson, C., Towfghi, A., Tsao, C. W., Turner, M. B., Virani, S. S., Voeks, J. H., Willey, J. Z., Wilkins, J. T., Wu, J. H. Y., Alger, H. M., Wong, S. S., a Muntner, P., 2017, „Heart Disease and Stroke Statistics'2017 Update: A Report from the American Heart Association", *Circulation*, **135**(10), s. 146–603.
- [2] Aschermann, M., a Kolektiv, 2004, *Kardiologie*, Galén, Praha.
- [3] Hrdina, R., Mladěnka, P., Bobrovská, Z., a Hübl, M., 2008, „Farmakochemie ischemické choroby srdeční", *Medicína pro Praxi*, **5**(11), s. 426–431.
- [4] Torres, N., Guevara-Cruz, M., Velázquez-Villegas, L. A., a Tovar, A. R., 2015, „Nutrition and Atherosclerosis", *Archives of Medical Research*, **46**(5), s. 408–426.
- [5] Funk, S. D., Yurdagul Jr, A., a Orr, A. W., 2012, „Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: Lessons from type 1 diabetes", *International Journal of Vascular Medicine*, **2012**, s. 1–19.
- [6] Hradec, J., a Býma, S., 2013, *Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře: Ischemická choroba srdeční, Novelizace 2013*, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, Praha.
- [7] Zemánek, D., a Kovárník, T., 2016, „Management akutních koronárních syndromů v roce 2016", *Postgraduální Medicína*, **18**(3), s. 237–244.
- [8] Tenekecioglu, E., Farooq, V., Bourantas, C. V., Silva, R. C., Onuma, Y., Yılmaz, M., a Serruys, P. W., 2016, „Bioresorbable scaffolds: a new paradigm in percutaneous coronary intervention", *BMC Cardiovascular Disorders*, **16**(38), s. 1–11.
- [9] Stefanini, G. G., Byrne, R. A., a Windecker, S., 2017, „State of the art : coronary artery stents – past , present and future", *EuroIntervention*, **13**, s. 706–716.
- [10] Anjum, I., Khan, M. A., Aadil, M., Faraz, A., Farooqui, M., a Hashmi, A., 2017, „Transradial vs. Transfemoral Approach in Cardiac Catheterization: A Literature Review", *Cureus*, **9**(6), s. 1–11.
- [11] Horák, D., Hraboš, V., Šembera, Z., a Jaworski, L., 2014, „Selfexpandibilní koronární stenty", *Intervenční akutní Kardiologie*, **13**(3), s. 127–130.
- [12] Grech, E. D., 2003, „ABC of interventional cardiology: percutaneous coronary intervention. I: history and development", *BMJ (Clinical Research ed.)*, **326**(7398), s.

1080–1082.

- [13] Simsekylmaz, S., Liehn, E. A., Militaru, C., a Vogt, F., 2015, „Progress in interventional cardiology: Challenges for the future", *Thrombosis and Haemostasis*, **113**(3), s. 464–472.
- [14] Byrne, R. A., Joner, M., a Kastrati, A., 2015, „Stent thrombosis and restenosis: What have we learned and where are we going? the Andreas Grüntzig Lecture ESC 2014", *European Heart Journal*, **36**(47), s. 3320–3331.
- [15] Kommineni, N., Saka, R., Khan, W., a Domb, A. J., 2018, „Non-polymer drug-eluting coronary stents", *Drug Delivery and Translational Research*, s. EPUB před tiskem.
- [16] Lee, S. W. L., Lam, S. C. C., Tam, F. C. C., Chan, K. K. W., Shea, C. P., Kong, S. L., Wong, A. Y. T., Yung, A., Zhang, L. W., Tse, H. F., Wu, K. K. Y., Chan, R., Haude, M., Mehran, R., Mintz, G. S., a Maehara, A., 2016, „Evaluation of Early Healing Profile and Neointimal Transformation Over 24 Months Using Longitudinal Sequential Optical Coherence Tomography Assessments and 3-Year Clinical Results of the New Dual-Therapy Endothelial Progenitor Cell Capturing Sirolimus-Elu", *Circulation: Cardiovascular Interventions*, **9**(7), s. 1–16.
- [17] Tada, T., Byrne, R. A., Simunovic, I., King, L. A., Cassese, S., Joner, M., Fusaro, M., Schneider, S., Schulz, S., Ibrahim, T., Ott, I., Massberg, S., Laugwitz, K. L., a Kastrati, A., 2013, „Risk of stent thrombosis among bare-metal stents, first-generation drug-eluting stents, and second-generation drug-eluting stents: Results from a registry of 18,334 patients", *JACC: Cardiovascular Interventions*, **6**(12), s. 1267–1274.
- [18] Sung, S., Chen, T., Cheng, H., a Lee, J., 2017, „Comparison of Clinical Outcomes in Patients Undergoing Coronary Intervention with Drug-Eluting Stents or Bare-Metal Stents : A Nationwide Population Study", *Acta Cardiologica Sinica*, **33**, s. 10–19.
- [19] Novotný, V., Varvařovský, I., Matějka, J., Rozsival, V., a Lazarák, T., 2016, „Biodegradabilní stenty – kouzlo pomíjivého ?", *Intervenční Akutní Kardiologie*, **15**(3), s. 127–134.
- [20] Polimeni, A., Weissner, M., Schochlow, K., Ullrich, H., Indolfi, C., Dijkstra, J., Anadol, R., Münzel, T., a Gori, T., 2017, „Incidence, Clinical Presentation, and Predictors of Clinical Restenosis in Coronary Bioresorbable Scaffolds", *JACC: Cardiovascular Interventions*, **10**(18), s. 1819–1827.
- [21] Chaabane, C., Otsuka, F., Virmani, R., a Bochaton-Piallat, M. L., 2013, „Biological responses in stented arteries", *Cardiovascular Research*, **99**(2), s. 353–363.
- [22] Inoue, T., Croce, K., Morooka, T., Sakuma, M., Node, K., a Simon, D., 2011, „Vascular Inflammation and Repair: Implication for Reendothelization, Restenosis, and Stent Thrombosis", *JACC: Cardiovascular Interventions*, **4**(10), s. 1057–1066.
- [23] Alraies, M. C., Darmoch, F., Tummala, R., a Waksman, R., 2017, „Diagnosis and

- management challenges of in-stent restenosis in coronary arteries", *World Journal of Cardiology*, **9**(8), s. 640–651.
- [24] Gaspardone, A., a Versaci, F., 2005, „Coronary stenting and inflammation", *The American Journal of Cardiology*, **96**(12), s. 65–70.
- [25] Inoue, T., Kato, T., Uchida, T., Sakuma, M., Nakajima, A., Shibazaki, M., Imoto, Y., Saito, M., Hashimoto, S., Hikichi, Y., a Node, K., 2005, „Local release of C-reactive protein from vulnerable plaque or coronary arterial wall injured by stenting", *Journal of the American College of Cardiology*, **46**(2), s. 239–245.
- [26] Franeková, J., 2012, *Příspěvek k hodnocení stability ateromatózního plátu ve vztahu k rozvoji kardiovaskulárního rizika*, Brno; Doktorská disertační práce.
- [27] Yun, K. H., Jeong, M. H., Oh, S. K., Rhee, S. J., Park, E. M., Lee, E. M., Yoo, N. J., Kim, N. H., Ahn, Y. K., a Jeong, J. W., 2009, „Response of high-sensitivity C-reactive protein to percutaneous coronary intervention in patients with acute coronary syndrome", *Heart and Vessels*, **24**(3), s. 175–180.
- [28] Ziakas, A., Gavriliadis, S., Giannoglou, G., Souliou, E., Koskinas, K., Gemitzis, K., Hatzimiltiadis, S., Efthimiadis, G., Paraskevaidis, S., Hatzitoliosadf, A., Savopoulos, C., a Parharidis, G., 2009, „Kinetics and prognostic value of inflammatory- -sensitive protein, IL-6, and white blood cell levels in patients undergoing coronary stent implantation", *Medical Science Monitor*, **15**(4), s. 177–184.
- [29] Mincu, R.-I., Jánosi, R. A., Vinereanu, D., Rassaf, T., a Totzeck, M., 2017, „Preprocedural C-Reactive Protein Predicts Outcomes after Primary Percutaneous Coronary Intervention in Patients with ST-elevation Myocardial Infarction a systematic meta-analysis.", *Scientific Reports*, **7**(41530), s. 1–10.
- [30] Li, J., Ren, Y., Chen, K., Yeung, A. C., Xu, B., Ruan, X., Yang, Y., a Gao, R., 2010, „Impact of C-Reactive Protein on In-Stent Restenosis", *Heart Institute Journal*, **37**(1), s. 49–57.
- [31] Ye, R. D., a Sun, L., 2015, „Emerging functions of serum amyloid A in inflammation", *Journal of Leukocyte Biology*, **98**(6), s. 923–929.
- [32] Katayama, T., Nakashima, H., Takagi, C., Honda, Y., Suzuki, S., Iwasaki, Y., a Yano, K., 2005, „Prognostic value of serum amyloid A protein in patients with acute myocardial infarction", *Circulation Journal*, **69**(10), s. 1186–1191.
- [33] Tanaka, T., Narazaki, M., a Kishimoto, T., 2014, „IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **6**, s. 1–16.
- [34] Held, C., White, H. D., Stewart, R. A. H., Budaj, A., Cannon, C. P., Hochman, J. S., Koenig, W., Siegbahn, A., Steg, P. G., Soffer, J., Weaver, W. D., Östlund, O., a Wallentin, L., 2017, „Inflammatory biomarkers interleukin-6 and c-reactive protein and outcomes in stable coronary heart disease: Experiences from the STABILITY

- (stabilization of atherosclerotic plaque by initiation of darapladib therapy) trial", *Journal of the American Heart Association*, **6**(10), s. 1–36.
- [35] Fox, P. L., Mazumder, B., Ehrenwald, E., a Mukhopadhyay, C. K., 2000, „Ceruloplasmin and cardiovascular disease", *Free Radical Biology and Medicine*, **28**(12), s. 1735–1744.
- [36] Giurgea, N., Constantinescu, M. I., Stanciu, R., Suciu, S., a Muresan, A., 2005, „Ceruloplasmin - acute-phase reactant or endogenous antioxidant? The case of cardiovascular disease", *Medical Science monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, **11**(2), s. 48–51.
- [37] Kennedy, D., Fan, Y., Wu, Y., Pepoy, M., Hazen, S., a Tang, W., 2014, „Plasma Ceruloplasmin, a Regulator of Nitric Oxide Activity, and Incident Cardiovascular Risk in Patients with CKD", *Clinical Journal of the American Society Nephrology*, **9**(3), s. 462–467.
- [38] Hammadah, M., Fan, Y., Wu, Y., Hazen, S. L., a Tang, W. H. W., 2014, „Prognostic value of elevated serum ceruloplasmin levels in patients with heart failure", *Journal of Cardiac Failure*, **20**(12), s. 946–952.
- [39] Bakhautdin, B., Goksoy, E., a Fox, P., 2014, „Ceruloplasmin has two nearly identical sites that bind myeloperoxidase", *Biochem Biophys Res Commun*, **453**(4), s. 722–727.
- [40] Mukhopadhyay, C. K., Mazumder, B., Lindley, P. F., a Fox, P. L., 1997, „Identification of the prooxidant site of human ceruloplasmin: a model for oxidative damage by copper bound to protein surfaces.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**(21), s. 11546–51.
- [41] Ayala, A., Muñoz, M. F., a Argüelles, S., 2014, „Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2014**, s. 1–31.
- [42] Calder, P., 2015, „Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health", *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, **39**(1), s. 18–32.
- [43] Kohlmeier, M., 2015, „Fatty Acids", *Nutrient Metabolism: Structures, Functions, and Genes*, Academic Press, s. 111–186.
- [44] Russo, G. L., 2009, „Dietary n - 6 and n - 3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention", *Biochemical Pharmacology*, **77**(6), s. 937–946.
- [45] Kand'ár, R., 2015, *Vybrané kapitoly z obecné biochemie, klinické biochemie a pathobiochemie*, Univerzita Pardubice, Pardubice.
- [46] Zheng, J. S., Sharp, S. J., Imamura, F., Koulman, A., Schulze, M. B., Ye, Z., Griffin, J., Guevara, M., Huerta, J. M., Kröger, J., Sluijs, I., Agudo, A., Barricarte, A., Boeing, H., Colorado-Yohar, S., Dow, C., Dorronsoro, M., Dinesen, P. T., Fagherazzi, G., Franks, P. W., Feskens, E. J. M., Kühn, T., Katzke, V. A., Key, T. J., Khaw, K. T., de Magistris,

- M. S., Mancini, F. R., Molina-Portillo, E., Nilsson, P. M., Olsen, A., Overvad, K., Palli, D., Quirós, J. R., Rolandsson, O., Ricceri, F., Spijkerman, A. M. W., Slimani, N., Tagliabue, G., Tjønneland, A., Tumino, R., van der Schouw, Y. T., Langenberg, C., Riboli, E., Forouhi, N. G., a Wareham, N. J., 2017, „Association between plasma phospholipid saturated fatty acids and metabolic markers of lipid, hepatic, inflammation and glycaemic pathways in eight European countries: A cross-sectional analysis in the EPIC-InterAct study", *BMC Medicine*, **15**(1), s. 1–12.
- [47] Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G., Ross, R., a Stanton, C., 2012, „Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids", *Journal of Nutrition and Metabolism*, **2012**, s. 1–16.
- [48] Harvey, K. A., Walker, C. L., Pavlina, T. M., Xu, Z., Zaloga, G. P., a Siddiqui, R. A., 2010, „Long-chain saturated fatty acids induce pro-inflammatory responses and impact endothelial cell growth", *Clinical Nutrition*, **29**(4), s. 492–500.
- [49] Marion-Letellier, R., Savoye, G., a Ghosh, S., 2015, „Polyunsaturated fatty acids and inflammation", *IUBMB Life*, **67**(9), s. 659–667.
- [50] Delgado, G. E., Krämer, B. K., Lorkowski, S., März, W., von Schacky, C., a Kleber, M. E., 2017, „Individual omega-9 monounsaturated fatty acids and mortality—The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study", *Journal of Clinical Lipidology*, **11**(1), s. 126–135.
- [51] Bernstein, A. M., Roizen, M. F., a Martinez, L., 2014, „Purified palmitoleic acid for the reduction of high-sensitivity C-reactive protein and serum lipids: A double-blinded, randomized, placebo controlled study", *Journal of Clinical Lipidology*, **8**(6), s. 612–617.
- [52] Fritsche, K. L., 2008, „Too much linoleic acid promotes inflammation-doesn't it?", *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **79**(3–5), s. 173–175.
- [53] Petersson, H., Lind, L., Hulthe, J., Elmgren, A., Cederholm, T., a Risérus, U., 2009, „Relationships between serum fatty acid composition and multiple markers of inflammation and endothelial function in an elderly population", *Atherosclerosis*, **203**(1), s. 298–303.
- [54] Sergeant, S., Rahbar, E., a Chilton, F., 2016, „Gamma-linolenic acid, Dihommo-gamma linolenic, Eicosanoids and Inflammatory Processes", *European Journal of Pharmacology*, **785**, s. 77–86.
- [55] Namazi, G., Asa, P., Movahedian, A., Sarrafzadegan, N., Sadeghi, M., a Pourfarzam, M., 2016, „Investigation of membrane fatty acid profiles in erythrocytes of patients with stable coronary artery disease", *Journal of Clinical Lipidology*, **10**(4), s. 930–936.
- [56] Raphael, W., a Sordillo, L. M., 2013, „Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammation: The role of phospholipid biosynthesis", *International Journal of Molecular Sciences*, **14**(10), s. 21167–21188.

- [57] Yang, T., Peng, R., Guo, Y., Shen, L., Zhao, S., a Xu, D., 2013, „The role of 14,15-dihydroxyecosatrienoic acid levels in inflammation and its relationship to lipoproteins.", *Lipids in Health and Disease*, **12**(151), s. 1–7.
- [58] Nilsen, D. W. T., Aarsetoey, H., Pönitz, V., Brugger-Andersen, T., Staines, H., Harris, W. S., a Grundt, H., 2017, „The prognostic utility of dihomo-gamma-linolenic acid (DGLA) in patients with acute coronary heart disease", *International Journal of Cardiology*, **249**, s. 12–17.
- [59] Freije, A., 2009, „Fatty acid profile of the erythrocyte membranes of healthy Bahraini citizens in comparison with coronary heart disease patients.", *Journal of Oleo Science*, **58**(7), s. 379–88.
- [60] Roessler, C., Kuhlmann, K., Hellwing, C., Leimert, A., a Schumann, J., 2017, „Impact of polyunsaturated fatty acids on miRNA profiles of monocytes/macrophages and endothelial cells—a pilot study", *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(2), s. 1–24.
- [61] Zapolska, D. D., Bryk, D., a Olejarz, W., 2015, „Trans Fatty Acids and Atherosclerosis-effects on Inflammation and Endothelial Function", *Journal of Nutrition & Food Sciences*, **5**(6), s. 1–6.
- [62] Hubler, M., a AJ, K., 2016, „Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells", *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **34**, s. 1–7.
- [63] Mazidi, M., Gao, H., a Kengne, A. P., 2017, „Inflammatory Markers Are Positively Associated with Serum trans -Fatty Acids in an Adult American Population", *Journal of Nutrition and Metabolism*, **2017**, s. 1–6.
- [64] Nagawa, I., Park, H., Yokoma, S., Wada, T., Yamada, S., Motoyama, Y., Kichikawa, K., a Nakase, H., 2017, „Pretreatment with and ongoing use of omega-3 fatty acid ethyl esters reduce the slow-flow phenomenon and prevent in-stent restenosis in patients undergoing carotid artery stenting", *Journal of Vascular Surgery*, **66**(1), s. 122–129.
- [65] Doi, M., Nosaka, K., Miyoshi, T., Iwamoto, M., Kajiya, M., Okawa, K., Nakayama, R., Takagi, W., Takeda, K., Hirohata, S., a Ito, H., 2014, „Early eicosapentaenoic acid treatment after percutaneous coronary intervention reduces acute inflammatory responses and ventricular arrhythmias in patients with acute myocardial infarction: A randomized, controlled study", *International Journal of Cardiology*, **176**(3), s. 577–582.
- [66] Johansen, O., Brekke, M., Seljeflot, I., Abdelnoor, M., a Arnesen, H., 1999, „n-3 Fatty acids do not prevent restenosis after coronary angioplasty: Results from the CART study", *Journal of the American College of Cardiology*, **33**(6), s. 1619–1626.
- [67] Maresta, A., Balducci, M., Varani, E., Marzilli, M., Galli, C., Heiman, F., Lavezzari, M., Stragliotto, E., a De Caterina, R., 2002, „Prevention of postcoronary angioplasty restenosis by omega-3 fatty acids: main results of the Esapent for Prevention of Restenosis ITalian Study (ESPRIT)", *American Heart Journal*, **143**(6), s. 1–10.

- [68] Harris, W. S., a Thomas, R. M., 2010, „Biological variability of blood omega-3 biomarkers", *Clinical Biochemistry*, **43**(3), s. 338–340.
- [69] Fenton, J. I., Gurzell, E. A., Davidson, E. A., a Harris, W. S., 2016, „Red blood cell PUFAs reflect the phospholipid PUFA composition of major organs", *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **112**, s. 12–23.
- [70] Meloun, M., Militký, J., a Hill, M., 2012, *Statistická analýza vícerozměrných dat v příkladech*, Academia, Praha.
- [71] Meloun, M., a Militký, J., 2006, *Kompendium statistického zpracování dat*, Academia, Praha.
- [72] Bjorgvinsdottir, L., Indridason, O. S., Heidarsdottir, R., Skogstrand, K., Arnar, D. O., Torfason, B., Hougaard, D. M., Palsson, R., a Skuladottir, G. V., 2013, „Inflammatory response following heart surgery and association with n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids in plasma and red blood cell membrane lipids", *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **89**(4), s. 189–194.
- [73] Zakynthinos, E., a Pappa, N., 2009, „Inflammatory biomarkers in coronary artery disease", *Journal of Cardiology*, **53**(3), s. 317–333.
- [74] Stakhneva, E. M., Meshcheryakova, I. A., Demidov, E. A., Starostin, K. V., Ragino, Y. I., Peltek, S. E., a Voevoda, M. I., 2017, „Proteomic Study of Blood Serum in Coronary Atherosclerosis", *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **162**(3), s. 343–345.
- [75] Perreault, M., Roke, K., Badawi, A., Nielsen, D. E., Abdelmagid, S. A., El-Sohemy, A., Ma, D. W. L., a Mutch, D. M., 2014, „Plasma levels of 14:0, 16:0, 16:1n-7, and 20:3n-6 are positively associated, but 18:0 and 18:2n-6 are inversely associated with markers of inflammation in young healthy adults", *Lipids*, **49**(3), s. 255–263.
- [76] Jenkins, B., West, J. A., a Koulman, A., 2015, „A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic acid (C15:0) and heptadecanoic acid (C17:0) in health and disease", *Molecules*, **20**(2), s. 2425–2444.
- [77] Stryjecki, C., Roke, K., Clarke, S., Nielsen, D., Badawi, A., El-Sohemy, A., Ma, D. W. L., a Mutch, D. M., 2012, „Enzymatic activity and genetic variation in SCD1 modulate the relationship between fatty acids and inflammation", *Molecular Genetics and Metabolism*, **105**(3), s. 421–427.
- [78] Souza, C. O., Teixeira, A. A. S., Biondo, L. A., Silveira, L. S., Calder, P. C., a Rosa Neto, J. C., 2017, „Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS-stimulated macrophages by inhibition of NFκB, independently of PPARs", *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **44**(5), s. 566–575.
- [79] Kageyama, Y., Kasahara, T., Nakamura, T., Hattori, K., Deguchi, Y., Tani, M., Kuroda, K., Yoshida, S., Goto, Y., Inoue, K., a Kato, T., 2017, „Plasma Nervonic Acid Is a Potential Biomarker for Major Depressive Disorder: A Pilot Study", *International*

Journal of Neuropsychopharmacology, **21**(3), s. 207–215.

- [80] Yamazaki, Y., Kondo, K., Maeba, R., Nishimukai, M., Nezu, T., a Hara, H., 2014, „Proportion of nervonic acid in serum lipids is associated with serum plasmalogen levels and metabolic syndrome.", Journal of Oleo Science, **63**(5), s. 527–37.

8 Přílohy

Příloha A Souhlas Etické komise

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. Kand'ár, 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**



MUDr. Josef Hájek, CSc.



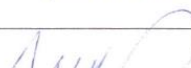

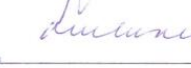

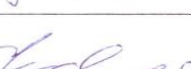


předseda Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.

Etická komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.

- její složení na schůzi konané

dne11/5 2012.....

podpis

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

Příloha B Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti ΔCRP_{48} na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů
 $n = 39$; $R = 0,9237$; $MEP = 1,2073$; $AIC = -20,2956$; $RSC = 7,8951$; $s(e) = 0,66228$; $\alpha = 0,05$; MNČ; $y_{\Delta\text{CRP}_{48}} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_{20} X_{20}$

Fisher-Snedecorův test významnosti modelu	
Hodnota kritéria F :	5,2348
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) :	1,8777
Pravděpodobnost :	0,0005
Závěr :	Model je významný.

Waldův test autokorelace	
Hodnota kritéria WA :	0,8306
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 1)$:	2,7055
Pravděpodobnost :	0,8228
Závěr :	Autokorelace je nevýznamná.

Scottovo kritérium multikolinearity	
Hodnota kritéria SC :	-0,1880
Závěr :	Model je korektní.

Durbin-Watsonův test autokorelace	
Hodnota kritéria DW :	2,5574
Závěr :	Negativní autokorelace reziduí je prokázána!

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity	
Hodnota kritéria CW :	0,0501
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 1)$:	2,7055
Pravděpodobnost :	0,8228
Závěr :	Rezidua vykazují homoskedasticitu.

Znaménkový test reziduí	
Hodnota kritéria Sg :	1,9969
Kvantil $N(1-\text{alfa}/2)$:	1,6449
Pravděpodobnost :	0,0458
Závěr :	V reziduích je trend!

Jarque-Berrův test normality	
Hodnota kritéria JB :	1,7710
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 2)$:	4,6052
Pravděpodobnost :	0,4125
Závěr :	Rezidua mají normální rozdělení.

Příloha C Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti ΔCRP48 na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů
 $n = 39$; $R = 0,9812$; $MEP = 21,5457$; $AIC = -73,7107$; $RSC = 2,0070$; $s(e) = 0,3339$; $\alpha = 0,05$; Metoda robustních M-odhadů (Welsch);

$$y_{\Delta\text{CRP48}} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_{20} X_{20};$$

Fisher-Snedecorův test významnosti modelu	
Hodnota kritéria F :	23,2334
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) :	1,8777
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Model je významný.

Waldův test autokorelace	
Hodnota kritéria WA :	18,8026
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 1)$:	2,7055
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Autokorelace je významná!

Scottovo kritérium multikolinearity	
Hodnota kritéria SC :	-0,3139
Závěr :	Model je korektní.

Durbin-Watsonův test autokorelace	
Hodnota kritéria DW :	33,8186
Závěr :	Residua jsou negativně autokorelována!

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity	
Hodnota kritéria CW :	7705,4903
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 1)$:	2,7055
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Residua vykazují heteroskedasticitu!

Znaménkový test reziduí	
Hodnota kritéria Sg :	0,4359
Kvantil $N(1-\text{alfa}/2)$:	1,6449
Pravděpodobnost :	0,6629
Závěr :	V reziduích není trend.

Jarque-Berrův test normality	
Hodnota kritéria JB :	438,4081
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 2)$:	4,6052
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Residua nemají normální rozdělení!

Příloha D Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta SAA48$ na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů
 $n = 40$; $R = 0,8596$; $MEP = 0,5231$; $AIC = -46,1967$; $RSC = 4,410$; $s(e) = 0,4818$; $\alpha = 0,05$; MNČ, $y_{\Delta SAA48} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_{20} x_{20}$

Fisher-Snedecorův test významnosti modelu	
Hodnota kritéria F :	2,6880
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) :	1,8537
Pravděpodobnost :	0,0193
Závěr :	Model je významný.

Waldův test autokorelace	
Hodnota kritéria WA :	0,1995
Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 1)$:	2,7055
Pravděpodobnost :	0,8427
Závěr :	Autokorelace je nevýznamná.

Scottovo kritérium multikolinearity	
Hodnota kritéria SC :	0,2151
Závěr :	Model je korektní.

Durbin-Watsonův test autokorelace	
Hodnota kritéria DW :	1,6991
Závěr :	Negativní autokorelace reziduí není prokázána.

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity	
Hodnota kritéria CW :	0,0394
Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 1)$:	2,7055
Pravděpodobnost :	0,8427
Závěr :	Rezidua vykazují homoskedasticitu.

Znaménkový test reziduí	
Hodnota kritéria Sg :	0,1445
Kvantil $N(1-\alpha/2)$:	1,6449
Pravděpodobnost :	0,8851
Závěr :	V reziduích není trend.

Jarque-Berrův test normality	
Hodnota kritéria JB :	1,7720
Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 2)$:	4,6052
Pravděpodobnost :	0,4123
Závěr :	Rezidua mají normální rozdělení.

Příloha E Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta SAA48$ na koncentraci 20 MK v membránách eryocytů
 $n = 40$; $R = 0,9759$; $MEP = 37,3049$; $AIC = -114,3146$; $RSC = 0,8033$; $s(e) = 0,2056$; $\alpha = 0,05$; Metoda robustních M-odhadů (Welsch);

$$y_{\Delta SAA48} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_{20} X_{20}$$

Fisher-Snedecorův test významnosti modelu	
Hodnota kritéria F :	19,0232
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) :	2,1961
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Model je významný.

Waldův test autokorelace	
Hodnota kritéria WA :	1,3821
Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 1)$:	3,8415
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Autokorelace je nevýznamná.

Scottovo kritérium multikolinearity	
Hodnota kritéria SC :	0,4473
Závěr :	Model vykazuje multikolinearitu!

Durbin-Watsonův test autokorelace	
Hodnota kritéria DW :	22,9812
Závěr :	Residua jsou negativně autokorelována!

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity	
Hodnota kritéria CW :	536,9611
Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 1)$:	3,8415
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Residua vykazují heteroskedasticitu!

Znaménkový test reziduí	
Hodnota kritéria Sg :	3,1069
Kvantil $N(1-\alpha/2)$:	1,9600
Pravděpodobnost :	0,0019
Závěr :	V reziduích je trend!

Jarque-Berrův test normality	
Hodnota kritéria JB :	50,0067
Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 2)$:	5,9915
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Residua nemají normální rozdělení!

Příloha F Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta\text{IL6-24}$ na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů
 $n = 46$; $R = 0,8595$; $MEP = 0,7329$; $AIC = -28,6823$; $RSC = 9,8954$; $s(e) = 0,6291$; $\alpha = 0,05$; MNČ; $y_{\Delta\text{IL6-24}} = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_{20}x_{20}$

Fisher-Snedecorův test významnosti modelu	
Hodnota kritéria F :	3,5338
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) :	1,7175
Pravděpodobnost :	0,0017
Závěr :	Model je významný.

Waldův test autokorelace	
Hodnota kritéria WA :	0,3553
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 1)$:	2,7055
Pravděpodobnost :	0,9964
Závěr :	Autokorelace je nevýznamná.

Scottovo kritérium multikolinearity	
Hodnota kritéria SC :	-0,1007
Závěr :	Model je korektní.

Durbin-Watsonův test autokorelace	
Hodnota kritéria DW :	2,3151
Závěr :	Negativní autokorelace reziduí není prokázána.

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity	
Hodnota kritéria CW :	0,0000
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 1)$:	2,7055
Pravděpodobnost :	0,9964
Závěr :	Rezidua vykazují homoskedasticitu.

Znaménkový test reziduí	
Hodnota kritéria Sg :	0,1491
Kvantil $N(1-\text{alfa}/2)$:	1,6449
Pravděpodobnost :	0,8815
Závěr :	V reziduích není trend.

Jarque-Berrův test normality	
Hodnota kritéria JB :	0,5573
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 2)$:	4,6052
Pravděpodobnost :	0,7568
Závěr :	Rezidua mají normální rozdělení.

Příloha G Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti $\Delta IL6-24$ na koncentraci 20 MK v membránách eryocytů
 $n = 46$; $R = 0,9556$; $MEP = 1803,5935$; $AIC = 3,1331$; $RSC = 19,761$; $s(e) = 0,8891$; $\alpha = 0,05$; Metoda robustních M-odhadů (Welsch);

$$y_{\Delta IL6-24} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_{20} x_{20}$$

Fisher-Snedecorův test významnosti modelu	
Hodnota kritéria F :	13,1418
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) :	2,0075
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Model je významný.

Waldův test autokorelace	
Hodnota kritéria WA :	0,0403
Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 1)$:	3,8415
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Autokorelace je nevýznamná.

Scottovo kritérium multikolinearity	
Hodnota kritéria SC :	-0,0772
Závěr :	Model je korektní.

Durbin-Watsonův test autokorelace	
Hodnota kritéria DW :	19,1106
Závěr :	Residua jsou negativně autokorelována!

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity	
Hodnota kritéria CW :	521,7775
Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 1)$:	3,8415
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Residua vykazují heteroskedasticitu!

Znaménkový test reziduí	
Hodnota kritéria Sg :	2,2366
Kvantil $N(1-\alpha/2)$:	1,9600
Pravděpodobnost :	0,0253
Závěr :	V reziduích je trend!

Jarque-Berrův test normality	
Hodnota kritéria JB :	37,3490
Kvantil $\chi^2(1-\alpha, 2)$:	5,9915
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Residua nemají normální rozdělení!

Příloha H Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti ΔMDA48 na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů
 $n = 54$; $R = 0,7523$; $MEP = 0,4939$; $AIC = -55,6152$; $RSC = 8,8578$; $s(e) = 0,5181$; $\alpha = 0,05$; MNČ; $y_{\Delta\text{MDA48}} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_{20} X_{20}$

Fisher-Snedecorův test významnosti modelu	
Hodnota kritéria F :	2,1520
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) :	1,6446
Pravděpodobnost :	0,0247
Závěr :	Model je významný.

Waldův test autokorelace	
Hodnota kritéria WA :	0,4273
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 1)$:	2,7055
Pravděpodobnost :	0,0193
Závěr :	Autokorelace je nevýznamná.

Scottovo kritérium multikolinearity	
Hodnota kritéria SC :	0,2100
Závěr :	Model je korektní.

Durbin-Watsonův test autokorelace	
Hodnota kritéria DW :	1,5719
Závěr :	Negativní autokorelace reziduí není prokázána.

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity	
Hodnota kritéria CW :	5,4770
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 1)$:	2,7055
Pravděpodobnost :	0,0193
Závěr :	Rezidua vykazují heteroskedasticitu!

Znaménkový test reziduí	
Hodnota kritéria Sg :	0,1274
Kvantil $N(1-\text{alfa}/2)$:	1,6449
Pravděpodobnost :	0,8986
Závěr :	V reziduích není trend.

Jarque-Berrův test normality	
Hodnota kritéria JB :	0,4770
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 2)$:	4,6052
Pravděpodobnost :	0,7878
Závěr :	Rezidua mají normální rozdělení.

Příloha I Testování regresního tripletu regresního modelu závislosti ΔMDA48 na koncentraci 20 MK v membránách erytrocytů
 $n = 54$; $R = 0,9599$; $MEP = 35,3899$; $AIC = -147,9496$; $RSC = 1,6022$; $s(e) = 0,2203$, $\alpha = 0,05$; Metoda robustních M-odhadů (Welsch);

$$y_{\Delta\text{MDA48}} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_{20} X_{20}$$

Fisher-Snedecorův test významnosti modelu	
Hodnota kritéria F :	19,3687
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) :	1,6446
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Model je významný.

Waldův test autokorelace	
Hodnota kritéria WA :	-59,2678
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 1)$:	2,7055
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Autokorelace je nevýznamná.

Scottovo kritérium multikolinearity	
Hodnota kritéria SC :	0,6271
Závěr :	Model vykazuje multikolinearitu!

Durbin-Watsonův test autokorelace	
Hodnota kritéria DW :	11,3073
Závěr :	Residua jsou negativně autokorelována!

Cook-Weisbergův test heteroskedasticity	
Hodnota kritéria CW :	69,1899
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 1)$:	2,7055
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Residua vykazují heteroskedasticitu!

Znaménkový test reziduí	
Hodnota kritéria Sg :	0,4025
Kvantil $N(1-\text{alfa}/2)$:	1,6449
Pravděpodobnost :	0,6873
Závěr :	V reziduích není trend.

Jarque-Berrův test normality	
Hodnota kritéria JB :	177,8708
Kvantil $\text{Chi}^2(1-\text{alfa}, 2)$:	4,6052
Pravděpodobnost :	0,0000
Závěr :	Residua nemají normální rozdělení!