

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Antropologie a genetika člověka



Mgr. Jana Šimová

**Genetické a proteomické analýzy vybraných poruch
kardiovaskulárního systému**

**Genetic and Proteomic Screening in Patients with Cardiovascular
Disease**

Disertační práce

Školitel: RNDr. Jiří Škvor, CSc

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18. 2. 2014

Podpis

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Škvorovi, CSc, za odborný dohled a předávání cenných znalostí a zkušeností, které mi věnoval v průběhu mého studia. Další moje poděkování patří již zesnulému prof. RNDr. Zbyňku Šmahelovi, CSc, který byl mým školitelem v průběhu prvních tří let studia a který mou práci plně podporoval. Ráda bych také poděkovala paní prof. RNDr. Janě Zvárové, DrSc, za cenné rady, podporu, vstřícnost a za zajištění projektů. Za pomoc při statistickém zpracování dat děkuji RNDr. Jindře Reissigové, Ph.D. a Mgr. Daliboru Slovákovi. Za konzultace a cenné rady děkuji RNDr. Pavlu Čapkovi, Ph.D. a Mgr. Ing. Petře Feglarové, Ph.D.

Poděkování také patří mé rodině a přátelům za pochopení, kterého se mi od nich dostávalo po celou dobu mého studia.

Tato práce vznikla za podpory projektů Evropského centra pro medicínskou informatiku, statistiku a epidemiologii (EuroMISE centrum – Kardio, LN00B107 MŠMT ČR) a Centra biomedicínské informatiky (CBI, 1M06014 MŠMT ČR).

Obsah

Obsah	4
Abstrakt	7
Abstract	8
Seznam zkratek	9
1 Úvod.....	13
2 Etiopatogeneze vybraných kardiovaskulárních onemocnění.....	15
2.1 Dilatace ascendentní aorty u pacientů s vadou aortální chlopně.....	15
2.1.1 Strukturální vady aortální chlopně	16
2.1.2 Ascendentní aorta – struktura a funkce	18
2.1.3 Elastická vlákna v extracelulární matrix (ECM) ascendentní aorty.....	19
2.1.4 Fibriliny a další složky ECM pojivové tkáně aorty	21
2.1.5 Vybrané geny související s pojivovou tkání aorty	24
2.2 Infarkt myokardu	27
2.2.1 Myokard - struktura a funkce	28
2.2.2 Molekulární pochody podílející se na infarktu myokardu	31
2.3 Matrix metaloproteinázy (MMP)	33
2.3.1 Klasifikace MMP	34
2.3.2 Struktura MMP.....	37
2.3.3 Funkční vlastnosti MMP	38
2.3.4 Syntéza a regulace MMP	38
2.3.5 Tkáňové inhibitory metaloproteináz - TIMP	40
2.3.6 MMP a kardiovaskulární poruchy.....	41
3 Cíle práce	44
3.1 Cíle u souborů pacientů s vadou aortální chlopně.....	44
3.2 Cíle u souboru pacientů s primárním infarktem myokardu.....	45

4	Materiál a metody	46
4.1	Soubory pacientů	46
4.1.1	Pacienti s vadou aortální chlopně a s dilatací ascendentní aorty	46
4.1.2	Pacienti s akutním infarktem myokardu	47
4.2	Immunoassay MMP-2, MMP-9.....	50
4.3	Metody u souborů pacientů s vadou aortální chlopně	51
4.3.1	Izolace celkové DNA z plné krve	51
4.3.2	PCR (polymerázová řetězová reakce).....	52
4.3.3	Sekvence a High Resolution Melting analýza.....	54
4.3.4	Statistické zpracování dat.....	55
4.4	Metody u souboru s infarktem myokardu	56
4.4.1	Izolace celkové RNA z plné krve smíchané s RNAlater [®]	56
4.4.2	Odstranění globinové frakce RNA.....	56
4.4.3	Čipová analýza	57
4.4.4	Statistické hodnocení	59
5	Výsledky	60
5.1	Výsledky u souborů pacientů s vadou aortální chlopně	60
5.1.1	Hodnocení serologických hladin MMP-2 a MMP-9.....	60
5.1.2	Zhodnocení souborů na základě naměřených parametrů	62
5.1.3	Molekulárně genetický screening <i>FBNI</i> genu	66
5.1.4	Molekulárně genetický screening <i>TGFBR2</i> genu	67
5.2	Výsledky u souboru pacientů s infarktem myokardu	68
5.2.1	Hodnocení serologických hladin MMP-2 a MMP-9 u pacientů s IM.....	68
5.2.2	Zhodnocení souboru na základě naměřených parametrů	71
5.2.3	Hodnocení genové exprese biomarkerů v periferní krvi.....	77

6	Diskuze	81
6.1	Imunologické a biochemické analýzy	81
6.1.1	Imunologické ukazatele	81
6.1.2	Klinické a biochemické ukazatele.....	90
6.2	Genetické analýzy	93
6.2.1	Dilatace ascendentní aorty – geny <i>FBN1</i> a <i>TGFBR2</i>	93
6.2.2	Infarkt myokardu - Expresní čipová analýza	96
7	Závěr	101
8	Seznam použité literatury	103
	Seznam publikací autorky se vztahem k tématu dizertace.....	122

Abstrakt

Práce se zabývá genetickými a proteomickými aspekty, které mohou hrát roli v rozvoji vybraných kardiovaskulárních onemocnění. Jednou ze skupin enzymů, která se podílí na destrukčních mechanismech u kardiovaskulárního postižení, jsou matrix metaloproteinázy. V této práci byly imunometricky měřeny a hodnoceny serologické hladiny MMP-2 a MMP-9 u pacientů s vadou aortální chlopně a u pacientů s infarktem myokardu. U obou výše zmíněných diagnóz byly zaznamenány signifikantně zvýšené hladiny těchto enzymů. Provedené analýzy neprokázaly souvislost koncentrací MMP-2 a MMP-9 v séru s rozvojem dilatace ascendentní aorty u pacientů s vadou aortální chlopně. Naměřené hodnoty metaloproteináz u souboru pacientů s infarktem myokardu umožnily charakterizovat koncentrace v séru v průběhu prvních 24 hodin a po 6 měsících od ataky.

U 10 % pacientů operovaných pro vadu aortální chlopně docházelo k rozvoji dilatace ascendentní aorty. Genetické analýzy u těchto pacientů neprokázaly jasnou souvislost patologie ascendentní aorty s genem *TGFBR2* a s vybranými úseky *FBNI* genu. Další genetické analýzy by mohly odhalit zatím blíže nespecifikovanou poruchu aortální stěny vedoucí k její dilataci. U souboru pacientů s infarktem myokardu byla dále sledována exprese genů, ze kterých jsou syntetizovány vybrané metaloproteinázy nebo které se podílejí na regulaci jejich aktivity. Expresní čipová analýza provedená u pacientů s infarktem myokardu se ukázala jako nevhodná pro hodnocení sledovaných markerů, jelikož neposkytla výsledky, které by mohly být prakticky využitelné pro diagnostiku destrukčních pochodů.

Klíčová slova: ascendentní aorta, infarkt myokardu, MMP-2, MMP-9, *TGFBR2*, *FBNI*, čipová analýza, ELISA

Abstract

The aim of this study is to analyse a genetic and proteomic aspects that could play an important role in development of chosen cardiovascular disease. Matrix metalloproteinases are enzymes that contribute strongly to the degradation of extracellular matrix components. In this study the serological levels of MMP-2 and MMP-9 were investigated using immunological testing in patients with aortic valve disease and in patients with myocardial infarction. Significantly higher levels of MMP-2 and MMP-9 were determined in both above mentioned groups of patients. Association of serum levels of MMP-2 and MMP-9 and development of concomitant aortic dilatation was not confirmed in patients with aortic valve disease. Changes in serum levels within 24 hours and after 6 months post myocardial infarction were characterized.

About 10 % of patients operated for aortic valve disease suffer simultaneously from ascending aortic dilatation. The current study did not reveal any significant genetic variation in *TGFBR2* gene and in chosen exons of *FBNI* gene in these patients. Further genetic research is needed to identify the cause of the pathology in aortic wall. Gene expression of selected genes was measured by microarray screening in patients with myocardial infarction. These genes were related to MMPs and did not show satisfactory results that could have a potential implication for diagnostics of tissue degeneration.

Keywords: ascending aorta, myocardial infarction, MMP-2, MMP-9, *TGFBR2*, *FBNI*, microarray, ELISA

Seznam zkratek

- AAD – dilatace ascendentní aorty (*ascending aortic dilatation*)
- ADAMs – *A disintegrin and metalloproteinases*
- AGN II – angiotenzin II
- AMK – aminokyselina
- AP1 – aktivátor protein 1
- Apo A – apolipoprotein A
- Apo B – apolipoprotein B
- ALT – alanin transamináza
- AST – aspartát aminotransferáza
- AVA – plocha ústí aortální chlopně (*aortic valve area*)
- BAV – bikuspidální aortální chlopeň (*bicuspid aortic valve*)
- BMI – Index tělesné hmotnosti (*body mass index*)
- cbEGF – kalcium vázající epidermální růstový faktor (*calcium binding epidermal growth factor*)
- cDNA – komplementární DNA (*complementary DNA*)
- cRNA – komplementární RNA (*complementary RNA*)
- CRP – C-reaktivní protein
- CTRL – kontrolní soubor
- DM – diabetes mellitus
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- DTK – diastolický krevní tlak
- EBP – elastin vázající protein (*elastin binding protein*)
- ECM – extracelulární matrix
- EDRF – *endothelium-derived relaxing factor*

- EGF – epidermální růstový faktor (*epidermal growth factor*)
- EKG – elektrokardiogram
- ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*
- EMMPRIN – *extracellular MMP inducer*
- FN1 – fibronektin 1
- ET-1 – endotelin-1
- *FBN1* – gen pro fibrilin-1
- FC – *fold change*
- EGFR – receptor pro růstový epidermální faktor (*epidermal growth factor receptor*)
- Gly – glykémie
- HBA1c – glykovaný hemoglobin
- HDL – vysokodenzitní lipoprotein (*high density lipoprotein*)
- HRM – vysokorozlišovací analýza křivek tání (*high resolution melting*)
- HRP – křenová peroxidáza (*horseradish peroxidase*)
- Chol – celkový cholesterol
- ICHS – ischemická choroba srdeční
- IL-1 β – interleukin-1 beta
- IL-1 α – interleukin-1 alfa
- IL-7 – interleukin-7
- IL-18 - interleukin-18
- IM – infarkt myokardu
- IMD6 – pacienti, kteří zemřeli do 6 měsíců od infarktu myokardu
- IMK6 – pacienti, kteří se dožili 6měsíční kontroly po infarktu myokardu

- IMO6 – pacienti, u nichž proběhl odběr krevního vzorku do 6 hodin po zaznamenání prvních příznaků IM
- IMO24 – pacienti, u nichž proběhl odběr krevního vzorku do 24 hodin po zaznamenání prvních příznaků IM
- kDa – kiloDalton
- LDL – nízkodenzitní lipoprotein (*low density lipoprotein*)
- LDS – Loeys-Dietz syndrom
- LTBPs – Latentní TGF β -vazebné proteiny (*latent TGF β -binding proteins*)
- MAGP-1 – glykoprotein 1 asociující s mikrofibrilami (*microfibril-associated glycoprotein 1*)
- MFAP-1 – protein 1 asociující s mikrofibrilami (*microfibril-associated protein 1*)
- MFS – Marfanův syndrom
- MMP – matrix metaloproteináza
- mRNA – mediátorová RNA (*messenger RNA*)
- NAAD – pacienti bez dilatace ascendentní aorty (*no ascending aortic dilatation*)
- NE – katecholamin norepinefrin
- NCBI – *The National Center for Biotechnology Information*
- NSTEMI – IM bez elevace ST úseku na EKG
- OPN – osteopontin
- PCR – polymerázová řetězová reakce (*polymerase chain reaction*)
- PTC – předčasné ukončení kodónu (*premature termination codon*)
- RECK - *reversion-inducing cystein-rich protein with kazal motifs*
- RGD motiv – pojmenování pro trojici aminokyselin arginin-glycin-aspartát
- RIN – číslo integrity RNA (*RNA integrity number*)
- RNA – ribonukleová kyselina
- SD – směrodatná odchylka (*standard deviation*)

- SMAD – *Small Mothers Against Decapentaplegic*
- SPARC – gen pro osteonektin
- SPP1 – gen pro osteopontin
- STEMI – IM s elevací úseku ST na EKG křivce
- STK – systolický krevní tlak
- TAAD – aneurysma a disekce hrudní aorty (*thoracic aortic aneurysm and dissection*)
- TAG – triacylglyceroly
- TAV – trikuspidální aortální chlopeč (*tricuspid aortic valve*)
- TGF α – transformující růstový faktor alfa (*transforming growth factor α*)
- TGF β – transformující růstový faktor beta (*transforming growth factor β*)
- TGF β R1 a TGF β R2 - receptor typu 1 a 2 pro TGF β (*transforming growth factor beta receptor 1 a 2*)
- TIMP – tkáňové inhibitory matrix metaloproteináz (*tissue inhibitors of metalloproteinases*)
- TMB – 3,3',5,5' - tetramethylbenzid
- TN-C – tenascin-C
- TN-X – tenascin-X
- TNF α – tumor nekrotizující faktor alfa (*tumor necrosis factor α*)
- TSP1 a 2 – trombospondin 1 a 2
- uPA – urokinázový aktivátor plazminogenu (*urokinase plasminogen activator*)

1 Úvod

Za nejčastější příčinu úmrtí na světě patří onemocnění kardiovaskulárního systému. Mortalita na kardiovaskulární choroby se v České republice pohybuje okolo 600 úmrtí ročně na 100 000 obyvatel, což tvoří více jak 50 % všech úmrtí. Kardiovaskulární morbidita je vyjádřena počtem hospitalizací pro kardiovaskulární choroby, který stále narůstá (www.ikem.cz). Většina kardiovaskulárních onemocnění patří mezi multigeně podmíněná onemocnění, což znamená, že na rozvoji onemocnění se podílí komplex genetických a environmentálních faktorů.

Mortalita zahrnuje jak vrozené, tak získané srdeční poruchy, mezi které patří získané chlopenní vady. U pacientů operovaných pro vadu aortální chlopně se v 10 % případů zároveň vyskytuje dilatace vzestupné části aorty. Progrese dilatace ohrožuje pacienty fatálními komplikacemi – disekcí nebo rupturou aorty. Zásadní otázkou je hledání příčiny této dilatace. Předpoklad lékařů je, že porucha zůstává klinicky němá v případě zdravé a funkčně nezměněné aortální chlopně. Rozvoj aortální vady vede ke změně hemodynamických poměrů na aortální chlopni a v ascendentní aortě a je možným spouštěcím faktorem pro vznik a progresi dilatace primárně postižené ascendentní aorty. Z molekulárně genetického hlediska se jako vysoce pravděpodobná jeví porucha některé ze složek elastických vláken zastoupených v aortální stěně, která by mohla vést k oslabení cévní stěny a k její následné dilataci.

Ve vyspělých zemích je nejběžnější příčinou úmrtí především ischemická choroba srdeční (ICHS) a jedním z projevů ICHS je infarkt myokardu (IM) (Špaček a Widimský, 2003b). Dle aktuálních údajů Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR bylo v roce 2011 v České republice hospitalizovaných 13 860 mužů a 7 440 žen s diagnózou akutní infarkt myokardu, přičemž průměrný věk pacientů byl 67,5 let (ÚZIS ČR, 2011). Nejčastější příčinou úmrtí v České republice jsou dlouhodobě nemoci oběhové soustavy, v roce 2012 činil podíl zemřelých v jejich důsledku 49 % (ÚZIS ČR, 2012). V roce 2012 zemřelo v souvislosti s infarktem myokardu 3 670 mužů a 2 844 žen (www.uzis.cz/katalog/rocenky/zdravotnicka-rocenka-ceske-republiky). Vznik a rozvoj tohoto onemocnění je hojně studován jak po klinické tak po genetické stránce a přináší nám stále nové poznatky.

Při rozvoji dilatace ascendentní aorty i při srdeční ischemii dochází k řadě metabolických dějů, které za fyziologických podmínek neprobíhají vůbec nebo jen ve velmi malé míře. Může také docházet ke zvýšené produkci látek, jejichž hladiny jsou za normálních podmínek nízké. Mezi tyto látky patří například matrix metaloproteinázy (MMP). MMP jsou předmětem zájmu od 90. let minulého století a tato problematika stále není dostatečně probádaná. Jsou zapojeny do mnoha patologicko-fyziologických dějů a funkce těchto enzymů je specifická podle jejich typu. Velkým přínosem by bylo, pokud by MMP mohly sloužit jako prognostické faktory, které by s určitou pravděpodobností pomohly předpovědět klinický průběh u vybraných kardiovaskulárních chorob. Umožnilo by to například detekovat rizikovou skupinu pacientů již předoperačně a indikovat pro dané pacienty adekvátní terapii.

V předkládané práci jsem se zaměřila na hodnocení specifických metaloproteináz (MMP-2 a MMP-9) u pacientů s onemocněním kardiovaskulárního systému. U souboru pacientů s vadou aortální chlopně se současnou dilatací ascendentní aorty byly provedeny primární genetické analýzy za účelem identifikace genů, které by mohly mít souvislost s rozvojem patologie v aortální stěně. U pacientů s infarktem myokardu byla hodnocena a porovnávána míra exprese genů, které kódují vybrané metaloproteinázy a jejich modulátory.

2 Etiopatogeneze vybraných kardiovaskulárních onemocnění

2.1 Dilatace ascendentní aorty u pacientů s vadou aortální chlopně

Prevalence strukturální vady aortální chlopně (stenózy či insuficience) v populaci je odhadována na 0,2 % a v České republice bylo v roce 2011 pro tuto poruchu operováno 2 085 pacientů (Šetina *et al.*, 2013). Dilatace ascendentní aorty (AAD – ascending aortic dilatation) se vyskytuje u přibližně 10 % pacientů operovaných pro vadu aortální chlopně. Dilatace ascendentní aorty v souvislosti se stenózou aortální chlopně je klinicky známý stav popsán již v roce 1955 Robickem. Za nejdůležitější patofyziologický faktor je považován turbulentní krevní tok ascendentní aortou, vznikající v důsledku stenózy aortální chlopně.

Dilatace ascendentní aorty je pozorována nejen u 10 % pacientů s aortální stenózou, ale také u 10 % pacientů s aortální insuficiencí dle ústního sdělení profesora Jaroslava Lindnera (II. chirurgická klinika kardiovaskulární chirurgie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze) ze dne 9. 2. 2013. U pacientů s aortální stenózou je turbulence přítomná v distálních úsecích ascendentní aorty, naopak u aortální insuficience je turbulence lokalizovaná více proximálně. V odborné literatuře nebyla doposud popsána souvislost mezi aortální insuficiencí a dilatací ascendentní aorty. Dilatace pravděpodobně vzniká v důsledku patologického postižení stěny ascendentní aorty. V důsledku rozvoje vady aortální chlopně dochází ke změně hemodynamických poměrů na aortální chlopni a v ascendentní aortě. Pravděpodobně následkem těchto změn u 10 % pacientů tato část aorty dilatuje. Porucha zůstává klinicky němá a aorta nedilatuje v případě zdravé a funkčně nezměněné aortální chlopně. Aortální vada je považována za spouštěcí faktor vzniku a progresu dilatace primárně nějak postižené ascendentní aorty. V etiopatogenezi onemocnění hraje pravděpodobně primární roli geneticky determinovaná porucha některé ze složek pojivové tkáně v aortální stěně.

Progrese dilatace ohrožuje pacienta fatálními komplikacemi, jakými může být disekce či ruptura aorty. Toto riziko roste přímo úměrně s nárůstem průměru dilatované aorty. Cílem chirurgické léčby je prevence těchto komplikací a pacient je proto indikován k náhradě postižené aortální chlopně a k výkonu na ascendentní aortě a to buď náhradou ascendentní aorty nebo její plastikou (aortoplastikou). Náhrada postižené aortální chlopně zásadně upravuje hemodynamiku na aortálním ústí a tak eliminuje spouštěcí faktor dilatace. Podkladem disekce hrudní aorty je rozštěpení aortální stěny v důsledku intramurálního průniku krve pod systolickým tlakem. Je to umožněno trhlinou vzniklou ve vrstvě tunica intima, která proniká až do tunica media. Trhlina se může nacházet kdekoliv v průběhu hrudní aorty, nejčastěji se však vyskytuje v oblasti kořene vzestupné aorty nebo v počátečním úseku aorty sestupné. Důsledkem rozpolcení aortální stěny je vznik druhého nepravého kanálu, který zužuje průsvit aorty. Velice často dochází ke vzniku další trhliny v periferní části aorty, kterou pak nepravý kanál zpětně komunikuje s pravým průsvitem aorty. Rozsah disekce může být různý, někdy se omezí jen na vzestupnou aortu, ale častěji se šíří periferně až na břišní aortu a pánevní tepny. V mladém věku se disekce vyskytuje především u syndromů spojených s poruchou elastické tkáně (syndromy Marfanův, Turnerův, Loeys-Dietz, Ehlersův-Danlosův). Predispozicí jsou rovněž patologické změny v oblasti aortální chlopně a rizikovými faktory jsou vysoký krevní tlak, ateroskleróza a vyšší věk. Aortální disekce postihuje především muže ve věku 40 – 70 let (Isselbacher, 2012). Disekce hrudní aorty se vyskytuje s četností 10 – 20 případů na 1 milion obyvatel za rok, a pokud není léčena, končí v 90 – 100 % smrtí do 12 měsíců. V České republice bylo v roce 2011 provedeno 140 operací pro disekci a 30denní mortalita odpovídala 25,7 % (Šetina *et al.*, 2013).

2.1.1 Strukturální vady aortální chlopně

Aortální stenóza

Nejčastější příčinou vzniku stenózy u dospělých je senilní kalcifikace aortální chlopně, která postihuje jak nemocné ve vyšším věku tak i vrozeně malformované chlopně.

Plocha ústí aortální chlopně (AVA) se pohybuje za normálních podmínek mezi 3 – 4 cm². Aby došlo k významným hemodynamickým změnám, musí se přibližně

3 – 5 násobně zmenšit. Arbitrárně se rozdělují aortální stenózy na lehké (AVA nad 1,2 cm²), středně těžké (AVA 0,75 – 1,2 cm²) a těžké (AVA pod 0,75 cm²).

Obstrukce aortálního ústí se zpravidla rozvíjí velmi pomalu a symptomy se dostavují někdy až desítky let po prvních změnách na chlopni. Levá komora se postupně adaptuje na tlakové přetížení zesílením svých stěn a dochází k rozvoji koncentrické hypertrofie, přičemž objem levé komory zůstává stejný. Zvýšené množství srdeční svaloviny dovoluje vypuzení dostatečného tepového objemu do aorty i přes zúžené aortální ústí.

Při vysokorychlostním proudění přes zúženou aortální chlopeň je proudění laminární a maximální rychlosti dosahuje těsně za chlopni v místě, kde je vysokorychlostní proud nejuzší (vena contracta). Poté se tento proud zpomaluje, expanduje a rozpadá se za vzniku turbulencí. Tento jev je doprovázen vzestupem tlaku v aortě – tzv. „pressure recovery“. Ascendentní aorta bývá poststenoticky dilatovaná a levá komora bývá většinou hypertrofická, v časném stádiu s dobrou systolickou funkcí (Aschermann *et al.*, 2004).

Aortální insuficience (regurgitace)

Nedomykavost aortální chlopně (aortální insuficience) často doprovází aortální stenózu. Na vzniku aortální insuficience se může podílet poškození vlastní aortální chlopně nebo dilatace celého aortálního kořene. Cípy chlopně bývají nejčastěji postiženy v důsledku zánětlivého procesu na chlopni (revmatická horečka, infekční endokarditida) nebo sklerotickými změnami, které postihují obvykle nejen chlopeň, ale i celý aortální kořen (senilní kalcifikovaná aortální vada). Dilatace kořene aorty způsobuje centrální regurgitaci. Nejčastější příčinou je hypertenze a aterosklerotické změny stěny aorty, které vedou k lehké dilataci kořene s aortální insuficiencí.

V patofyziologii chronické aortální insuficience se uplatňují kompenzační mechanismy levé komory, které často vedou k mnohaletému zastínění symptomatologie. Naopak akutní aortální insuficience může vést k rychle progredujícímu srdečnímu selhání. Plocha regurgitačního ústí se při těžké aortální insuficienci pohybuje v rozmezí 0,3 – 1,0 cm². V důsledku chronické insuficience vytváří levá komora kompenzační mechanismy, které vedou k jejímu přizpůsobení jak na objemové tak na tlakové přetížení (Aschermann *et al.*, 2004).

2.1.2 Ascendentní aorta – struktura a funkce

Aorta je největší tepnou v lidském těle. U dospělého člověka má na začátku vnitřní průměr asi 3 cm a na svém konci přes 2 cm. Vzestupná část aorty – aorta ascendens – je první, asi 5 cm dlouhý úsek, který vystupuje z levé komory. Rozšířený začátek aorty se podle svého cibulovitého tvaru nazývá bulbus aortae. Plynulým pokračováním ascendentní aorty je aortální oblouk – arcus aortae. V úrovni třetího až čtvrtého hrudního obratle arcus končí a bez ostré hranice přechází v descendentní část hrudní aorty – aorta descendens. Descendentní aorta má dva hlavní úseky - hrudní a břišní a končí ve výši čtvrtého bederního obratle rozdělením na dvě iliakální arterie (Dylevský *et al.*, 2000).

Aortu můžeme zařadit mezi arterie velkého kalibru a díky vysokému obsahu elastinu v cévní stěně ji označujeme také jako arterii elastického typu. Mimořádně dobrá elasticita umožňuje aortě už na jejím začátku měnit pulzní proudění na plynulé. Cévní stěna se v průběhu systoly rozpíná a kinetická energie krve se přemění na potenciální elastickou energii stěny aorty. Během pozdní systoly a diastoly se roztažené stěny aorty díky elastickým silám postupně vrací do původního stavu a vhání tak dočasně akumulovanou krev dál do oběhu. Potenciální elastická energie se přeměňuje zpět na kinetickou energii krve. Ve fyziologii cirkulačního systému se tento fenomén nazývá pružnickový efekt (Trojan *et al.*, 1999).

V cévní stěně aorty popisujeme tři vrstvy:

Tunica intima, vnitřní vrstva, je ve srovnání s ostatními typy arterií relativně tlustá. U člověka je silná 80-140 mikrometrů a skládá se z endotelu a ze subendotelové vazivové vrstvy, jejíž vazivová vlákna jsou uspořádána především longitudinálně. Dodává intimně dostatečnou pružnost při objemových změnách. Pod endotelem je tenká vrstva ze 2-3 řad plochých rozvětvených mesenchymálních buněk. Zevněji jsou ještě fibroblasty a hvězdicovité nebo vřetenovité tzv. Langerhansovy buňky. Subendotelová vrstva dále obsahuje hladké svalové buňky, jemné kolagenní fibrily, longitudinálně probíhající velmi jemná elastická vlákna a intersticiální amorfní hmotu.

Tunica media, střední vrstva, je cirkulárně uspořádaná vrstva s převahou hladké svaloviny a elastické složky vazivové tkáně a je široká až 500 mikrometrů. U elastických arterií se skládá z množství koncentricky uspořádaných a proděravěných elastických

membrán, které spolu navzájem anastomosují a mohou být silné 1,5 až 2,5 mikrometru (v dospělosti může být až 50 i více vrstev). Membrány mají mezi sebou mezery široké 6-18 mikrometrů. V těchto mezivrstvách se nalézají hladké svalové buňky, retikulární vlákna a amorfni substance bohatá na chondroitin sulfát. Vlákenné elementy přecházejí z jednotlivých mezivrstev do sousedních přes otvory v elastických membránách nebo komunikují s buňkami hladké svaloviny, do kterých se upínají. Za produkci a obnovu extracelulární hmoty, jak vláknité tak amorfni, jsou odpovědné buňky hladké svaloviny.

Tunica adventitia, zevní vrstva cévní stěny, je široká jen 200-300 mikrometrů. Adventicie je z kolagenního vaziva se silnými vlákny kolagenu typu I, ve vnitřní vrstvě má ještě longitudinální elastická vlákna a zevní vrstva obsahuje kromě kolagenu i cirkulárně uspořádaná elastická vlákna. Adventicie obsahuje vasa vasorum (cévy cév), které zásobují zevní část medie s adventicií, zatímco intima a vnitřní vrstvy medie jsou vyživovány přímo z lumen arterie (<http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education.html>).

2.1.3 Elastická vlákna v extracelulární matrix (ECM) ascendentní aorty

Elastická vlákna jsou hlavní součástí extracelulární matrix všech tkání, které jsou charakterizovány pružností a pevností. Skládají se ze dvou morfologicky odlišných složek – jádrem jsou elastinová vlákna a okolí tvoří mikrofibrily. Elastin je nerozpustný polymer složený z monomerů tropoelastinu o velikosti 70 kDa a mikrofibrily jsou tvořeny 10 nm velkými fibrilinovými vlákny. Elastinové jádro není amorfni hmotou, ale je tvořeno paralelně uspořádanými tenkými elastinovými vlákny (Pasquali-Ronchetti a Baccarani-Conti, 1997). Pod elektronovým mikroskopem vypadají mikrofibrily jako propletená vlákna připomínající šňůrku s korálky, kdy je ke každé globulární (elastinové) doméně vázáno 6 – 8 lineárních fibrilárních snopců, přičemž vzdálenost mezi jednotlivými globulárními doménami se pohybuje v rozmezí 30 až 100 nm. Všechna fibrilinová vlákna musí být přesně seřazena tak, aby většina jejich amino-konců byla zapuštěna do globulární domény.

Mikrofibrily a elastická vlákna jsou uspořádány dle požadavků dané tkáně tak, aby splňovaly mechanické požadavky dané orgánové soustavy. Liší se jednak svou délkou a tloušťkou, ale také svým trojrozměrným uspořádáním, které je závislé na směru

a velikosti sil působících na danou tkáň (Ramirez *et al.*, 2004). V aortální tkáni mikrofibrily asociují s elastinem v tunica media a tvoří zde koncentrické lamely, které oddělují jednotlivé vrstvy buněk hladké svaloviny a dodávají tak elasticitu aortální stěně. Navíc mikrofibrily postrádající elastin stabilizují tkáň tím, že spojují jednotlivé lamelární prstence k sobě, k buňkám hladké svaloviny a k subendoteliální membráně. Doposud bylo charakterizováno pouze několik komponent mikrofibril a to převážně z toho důvodu, že shluky v extracelulární matrix jsou vysoce nerozpustné. Obecně lze říci, že elastická vlákna jsou zde zodpovědná za dilataci a opětovné navrácení cévní stěny do původní polohy a mikrofibrily zde fungují jako flexibilní spojení, které tvoří z aortální stěny jeden funkční celek (Arteaga-Solis *et al.*, 2001).

Remodelace cévní stěny je řízena řadou vysoce regulovaných a vzájemně propojených procesů, mezi nejdůležitější patří: 1) proliferace a diferenciací buněk hladké svaloviny, 2) degradace elastických vláken a 3) kalcifikace a produkce mezibuněčné hmoty (Van Varik *et al.*, 2012). Klíčovými regulátory tonu a průměru cév jsou buňky hladké svaloviny, které přispívají k udržení hemodynamické rovnováhy (Alexander a Owens, 2012). Tyto buňky se nacházejí ve vrstvě tunica media cévní stěny a většina z nich má především kontraktilní funkci. Určitá část buněk hladké svaloviny má schopnost změnit svůj fenotyp na syntetizující, který lze dále rozdělit na migračně-proliferativní, sekreční a osteogenní (Gerthoffer, 2007). Tato schopnost buněk hladké svaloviny je klíčová při remodelaci cévní stěny, neboť umožňuje lepší adaptaci na měnící se podmínky v cévní tkáni. Ke změnám fenotypu dochází při poranění cévy nebo při zvýšeném tlaku, kdy se zároveň snižuje exprese genů, specifických pro kontraktilní buňky hladké svaloviny (Alexander a Owens, 2012). Syntetické buňky hladké svaloviny produkují elastolytické enzymy – matrix metaloproteinázy, které napomáhají migraci buněk v ECM. Příkladem onemocnění, u kterého dochází ke změně fenotypu buněk hladké svaloviny v cévní stěně, je Marfanův syndrom. U tohoto onemocnění dochází primárně k degradaci elastických vláken (fibrilinu-1) v pojivové tkáni. Následná změna fenotypu buněk hladké svaloviny vede ke zvýšené produkci MMP a tím k dalšímu oslabení této již postižené cévní stěny (Pratt a Curci, 2010).

Vztah elastinu a mikrofibril byl v posledních letech často studován. Elastin je secernován jako rozpustný prekurzor tropoelastinu, který se váže na EBP protein (elastin-binding protein). EBP protein zůstává navázán i k secernované molekule tropoelastinu

a díky tomu nedochází k předčasnému shlukování vláken a k jejich proteolýze během sekrece. Tento protein se podílí na shlukování elastických vláken v počáteční fázi elastogeneze a následně se sám do těchto vláken ukládá. Utváření a formování elastických vláken (elastogeneze) probíhá během embryogeneze a pokračuje i během časného dětství. Během tohoto období je vymezena přesná velikost a orientace jednotlivých vláken ve tkáních. V průběhu stárnutí dochází k výrazné destrukci fibrilárních elastických struktur a k úbytku hladké svaloviny v cévní vrstvě tunica media. To vede ke snížení nebo až ke ztrátě elastických a vazoaktivních funkcí cévního systému (Fritze *et al.*, 2012).

2.1.4 Fibriliny a další složky ECM pojivové tkáně aorty

Fibriliny plní několik funkcí. Tvoří kostru pro ukládání tropoelastinu a pro formace elastických vláken během elastogeneze, přispívají k elastickým vlastnostem elastických vláken a udržují homeostázu pojivových tkání (Robinson a Godfrey, 2000). Monomery fibrilinu se samy skládají do mikrofibril, které jsou začleněny nebo doplněny dalšími proteiny, asociujícími s elastinem v elastických vláknech.

Fibrilin-1 je hlavní součástí extracelulární matrix pojivové tkáně aorty. Poprvé byl izolován z lidských kultivovaných fibroblastů, pojmenován a popsán byl roku 1986 (Sakai *et al.*, 1986). Použitím monoklonálních protilátek byla prokázána jeho široká distribuce v pojivových tkáních různých orgánových soustav (pokožka, plíce, ledviny, cévní systém, chrupavka, šlachy, svaly, rohovka a řasnaté tělísko) (Sakai *et al.*, 1991).

Fibrilin-1 je velký (~350 kDa) multidoménový glykoprotein obsahující především tři druhy repetitivních motivů bohatých na cystein (Sakai *et al.*, 1991). Profibrilínové sekvence jsou kódovány 2 871 aminokyselinou (AMK) a jsou uspořádány do pěti strukturálně odlišných oblastí. Zhruba 75 % proteinu tvoří 47 tandemových repetitivních domén podobných EGF (epidermálnímu růstovému faktoru), 43 z nich splňuje požadavek vazby vápníku a ty jsou označovány jako cbEGF domény („calcium binding“ EGF). Vazba vápníku je důležitá především v intermolekulárních interakcích. Každá z tandemových repetitivních domén podobných EGF obsahuje 6 cysteinů, které mezi sebou vytváří disulfidové vazby. Většina domén podobných EGF (především cbEGF) obsahuje doplňkové souhlasné sekvence, díky kterým se jednotlivé motivy rozpoznávají navzájem. Dalším významným motivem je tzv. TB doména, zastoupená v proteinu 7 krát, je homologem TGFβ1-bp

(transforming growth factor beta-1-binding protein, transformující růstový faktor beta 1 vazebný protein) a obsahuje 8 cysteinů. Tato doména je charakteristická shlukem tří po sobě následujících cysteinových zbytků, které mohou potenciálně tvořit disulfidové můstky s dalšími cysteinovými zbytky a silněji tím stabilizovat nekovalentní interakce zprostředkované doménami cbEGF. Třetím typem domény bohaté na cysteiny je tzv. Fib-motiv, unikátní zřejmě pouze pro fibriliny. Skládá se ze dvou po sobě jdoucích cysteinů a může kovalentně reagovat s dalšími molekulami (Kielty a Shuttleworth, 1993).

Primární struktura fibrilinu dominují cbEGF domény. Pro udržení konformační stability proteinu je nezbytná vazba vápníku, která značně pomáhá při interakcích mezi jednotlivými proteiny (Kielty a Shuttleworth, 1993). Rentgenové studie a mechanické testování svazků mikrofibril ukázaly, že vazba vápníku ovlivňuje jejich deformační zátěž, ale není nutná pro jejich roztažnost a elasticitu (Eriksen *et al.*, 2001). Elasticita mikrofibril tudíž není závislá na vápníkem indukovaných periodických změnách svazků, ale je jimi modifikována (Kielty *et al.*, 2002).

Latentní TGFβ-vazebné proteiny (LTBPs - Latent TGFβ-binding proteins) jsou menší než molekuly fibrilinů, ale také obsahují opakující se domény cbEGF a TB (Sinha *et al.*, 1998; Oklu a Hesketh, 2000). Specifické TB domény v LTBP1, LTBP3 a LTBP4 se mohou vázat vnitrobuněčně k TGFβ molekulám. Signální dráhy TGFβ rodiny cytokinů kontrolují celou řadu buněčných pochodů včetně proliferace, diferenciace a apoptózy. Tyto signální dráhy jsou uskutečňovány díky receptorům typu **TGFβR1** a **TGFβR2** (transforming growth factor beta receptor 1 a 2, receptor 1 a 2 transformujícího růstového faktoru beta). Ty jsou transmembránovými proteiny se serin/threonin kinázovou aktivitou a podílí se na aktivaci několika signálních drah. TGFβ1 (transformující růstový faktor beta 1) se nejprve váže k receptorům druhého typu (TGFβR2) a dochází k inkorporaci do ligand-receptor komplexu (TGFβ dimer plus 4 receptorové molekuly). Signál je poté veden do buňky fosforylací tzv. Smad (Small Mothers Against Decapentaplegic) proteinů. Smad označuje skupinu proteinů, které zprostředkovávají přenos signálu v buňce a regulují transkripci. Extracelulární signál TGFβ1 je přenesen do cytoplazmy a tak se může podílet ve spolupráci s kofaktory, které se vážou k DNA, na regulaci genové transkripce. Proto hrají LTBPs důležitou roli. LTBP1 se nachází v pokožce, v buněčných vrstvách osteoblastů a v embryonálních dlouhých kostech (Taipale *et al.*, 1996; Raghunath *et al.*,

1998; Dallas *et al.*, 2000). LTBP2 je součástí mikrofibril bohatých na fibrilin a elastin, nalézá se v arteriích a v trámčité kostní tkáni (Gibson *et al.*, 1995; Kitahama *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2002).

Imunobiochemické výsledky rozlišily přinejmenším 17 různých molekul schopných interakcí s fibriliny (Hubmacher *et al.*, 2006). Kromě fibrilinů se v elastické tkáni vyskytuje **MAGP-1** (microfibril-associated glykoprotein 1), někdy známý jako MFAP-2. Tento protein je velmi důležitý pro integritu mikrofibril. Je spojen prakticky se všemi mikrofibrilami a je bohatě přítomný v buňkách mezenchymu a v pojivových tkáních během vývoje (Henderson *et al.*, 1996; Kielty a Shuttleworth, 1997). **MAGP-2** je dalším členem rodiny malých mikrofibril. Obsahuje 170 – 173 aminokyselinových zbytků a je strukturálně podobný MAGP-1 proteinu (Gibson *et al.*, 1998). MAGP-2 je bohatý na serinové a threoninové zbytky a obsahuje RGD motiv (trojice aminokyselin arginin-glycin-aspartát), díky kterému se váže k integrinovému receptoru $\alpha_v\beta_3$ (Gibson *et al.*, 1999). Integriny jsou hlavními receptory v extracelulární matrix, mohou aktivovat vnitrobuněčné pochody a zároveň jsou místem pro ukotvení proteinů v extracelulární matrix. MAGP-2 se váže v mnoha tkáních k vláknům, která obsahují elastin i k těm, která elastin neobsahují a pravděpodobně se podílí na buněčné signalizaci během shromažďování mikrofibril a elastogeneze (Gibson *et al.*, 1998).

Imunohistochemicky byly prokázány některé další proteiny, které asociují s mikrofibrilami, ale doposud je známo jen velmi málo o jejich funkci a vlivu na mikrofibrily jako celek. Jsou to například **MFAP-1** (microfibril-associated protein 1), **MFAP-3** a **MFAP-4**, které asociují s elastickými vlákny. Během zrání mohou být k mikrofibrilám přidružené amyloidní částice a mohou akumulovat adhezní glykoproteiny jako je například vitronectin (Dahlback *et al.*, 1990). Na rozhraní elastin/mikrofibrily či elastická vlákna/buněčný povrch jsou lokalizovány některé další proteiny, které mohou regulovat zásoby tropoelastinu na mikrofibrilách a spojovat elastická vlákna s buněčným povrchem. Do této skupiny patří **emiliny** (elastin microfibril interface located protein) a v současné době jsou známy emilin-1, emilin-2, emilin-3 a multimerin (Bressan *et al.*, 1993; Doliana *et al.*, 2001). Ve spojení s povrchem elastických vláken je také **fibulin 1, 2 a 5** (Kielty *et al.*, 2002).

2.1.5 Vybrané geny související s pojivovou tkání aorty

Na důležitost elastických vláken poukazují dědičná onemocnění pojivového systému, způsobené mutacemi jednotlivých částí elastických vláken. Mutace v genu pro fibrilin-1 způsobují různorodé formy Marfanova syndromu (MFS) (Dietz *et al.*, 1991). V roce 1991 byla zavedena tzv. Ghent diagnostická kritéria pro stanovení MFS, která byla v roce 2010 aktualizována na základě nových poznatků (Loeys *et al.*, 2010). Podobné klinické příznaky jako u MFS vykazují i další onemocnění pojivového aparátu jako jsou Loeys-Dietz syndrom (LDS), Ehlers-Danlos syndrom nebo familiární výskyt hrudních aneurysmat a disekcí (TAAD) (tabulka č. 1). Nejen klinické příznaky ale i mutace genů se u těchto onemocnění překrývají (Von Kodolitsch *et al.*, 2010).

Tabulka č. 1: Patologie aorty - klinické příznaky a související geny

Onemocnění	Gen(y)	Fenotypový projev (kardiovaskulární systém)
Marfanův syndrom	<i>FBNI</i> <i>TGFBR2</i>	dilatace a aneurysma aortálního kořene, dilatace pulmonální arterie, dilatace nebo disekce descendentní a břišní aorty
Ehlers-Danlos syndrom	<i>COL3A1</i> <i>COL5A1</i> <i>COL5A2</i>	aneurysma a ruptury arterií středního kalibru, postihující zejména hrudní a břišní cévy, často descendentní a břišní aortu
Loeys-Dietz syndrom	<i>TGFBR1</i> <i>TGFBR2</i>	časné vznikající a progresivní aneurysma a disekce, aneurysma distálně od aortálního kořene, generalizovaná arteriální tortuozita
Familiární výskyt aneurysmat a disekcí hrudní aorty (fTAAD)	<i>TGFBR1</i> <i>TGFBR2</i> <i>ACTA2</i> <i>MYH11</i> <i>MYLK</i>	aneurysma a disekce hrudní aorty
Bikuspidální aortální chlopeč	neznámý	aortální dilatace zahrnující kořen aorty a její ascendentní část, bez postižení descendentní a břišní aorty
Autozomálně dominantní polycystická choroba ledvin	<i>PKD1</i> <i>PKD2</i>	dilatace kořene aorty a disekce hrudní aorty
Turnerův syndrom	45X	aneurysma a disekce hrudní aorty
Neurofibromatóza	<i>NF1</i>	aneurysmatické poškození arterií, postihující břišní aortu

Klinický obraz aortální dilatace, které jsme se ve studii věnovali, se nejvíce blížil fenotypovým projevům MFS a proto byly zvoleny geny *FBNI* a *TGFBR2*.

Gen pro fibrilin-1: *FBNI*

Gen pro fibrilin-1 *FBNI* se nachází na 15. chromozomu v oblasti q21.1 (15q21.1) (Magenis *et al.*, 1991) a skládá se z 65 exonů. Velikost genu je 237 kb genomické DNA a korespondující transkript je skoro 10 kb dlouhý (Biery *et al.*, 1999, Pereira *et al.*, 1993). Maslen *et al.* (1991) poprvé izoloval cDNA klony pro fibrilinový gen. Fibrilin-1 byl dále charakterizován a byla objasněna organizace intronů a exonů v genu. Byla rovněž odvozena fyzická mapa daného lokusu (Corson *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 1993). Skoro všechny domény podobné EGF jsou kódovány jednotlivými exony, důsledkem toho je fibrilinový gen poměrně velký a kódující sekvence jsou vysoce fragmentované.

Doposud bylo identifikováno přes 1 474 mutací. Aktualizovaný kompletní seznam mutací *FBNI* genu lze nalézt v online mutační databázi The Human Gene Mutation Database (www.hgmd.cf.ac.uk).

Studie mutací v *FBNI* genu a jejich souvislostí s Marfanovým syndromem a s ostatními fibrilinopatiemi našly především tři typy mutací (Robinson *et al.*, 2002). Missense mutace reprezentují zhruba dvě třetiny všech mutací v *FBNI* genu. Většina z těchto mutací ovlivňuje jednu ze 43 domén cbEGF oblastí fibrilinu-1 a obvykle dochází k substituci jedné báze v jednom ze šesti vysoce chráněných cysteinových zbytků. Mutace přerušuje jednu ze tří disulfidových vazeb a pravděpodobně způsobuje špatné složení domény, což má nepříznivý dopad na celkovou strukturu fibrilinu (Downing *et al.*, 1996). Substituce cysteinových zbytků v repetitivních cbEGF domén vedou k opoždění sekrece a ke sníženému ukládání fibrilinu do tkání. Další typ missense mutací ovlivňuje vazbu vápníku, která má také vliv na správnou finální strukturu proteinu. Při tomto typu poruchy dochází ke zhoršenému začleňování fibrilinu do extracelulární matrix. Obecně mohou všechny tyto typy mutací zapříčinit celou škálu klinických fenotypů od závažného neonatálního Marfanova syndromu po různé mírné manifestace dílčích symptomů Marfanova syndromu (Schrijver *et al.*, 1999; Palz *et al.*, 2000).

Přibližně 20 % všech mutací jsou „nonsense“ mutace, kdy dochází ke změně čtecího rámce předčasným ukončením kodónu (premature termination codon - PTC). Bylo

zaznamenáno několik případů těchto mutací ve spojitosti s mírnými klinickými příznaky, jako jsou například myopatie, prolaps mitrální chlopně, dilatace aorty bez disekce nebo skeletální a kožní abnormality (Dietz *et al.*, 1993). Zároveň fenotyp klasického Marfanova syndromu může být zapříčiněn „nonsense“ mutací, která pozměňuje čtecí rámec (Halliday *et al.*, 1999). Soubor mutací, které vznikají chybami při sestřihu (splicing) zahrnuje přeskočení celého exonu, retenci intronu, genomické delece a vytvoření pseudoexonu v rámci intronu. Většina mutací, kdy dochází k přeskočení celého exonu, zachovává čtecí rámec a produktem je kratší molekula fibrilinu, která se může dále účastnit formování mikrofibril. A protože kvalita normálních a mutantních (zkrácených) monomerů fibrilinu není nijak kontrolována, může být následná polymerizace (laterální spojování monomerů) narušena a vést k vážnému poškození formace mikrofibril během elastogeneze (Liu *et al.*, 1996). Mutace v *FBNI* genu mohou ovlivnit různé aspekty buněčného metabolismu fibrilinu, ale nejpodstatnějším důsledkem mutací je nepochybně to, že do extracelulární matrix je začleněno menší množství tohoto proteinu. Fibrilin je produkován normálním i mutovaným genem *FBNI* a shlukování do mikrofibril se účastní oba tyto proteiny. Fibrilin z mutovaného genu může silně narušit množství a integritu ostatních mikrofibril, mutace v *FBNI* genu mají tedy dominantně negativní efekt na formování mikrofibril (Herkowitz, 1987; Milewicz *et al.*, 1995).

Různé typy mutací mohou způsobit odlišné fenotypy. Mutace způsobující Marfanův syndrom a ostatní fibrilinopatie jsou rozptýleny po celém genu. Analýzy, které porovnávaly fenotypový a genotypový projev, zatím přinesly pouze několik zjištění. Zavedení nových genetických metodik, jako je například MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), pomohlo odhalit a popsat exonové nebo celogenové delece u několika pacientů. Zatímco delece jednoho nebo několika exonů *FBNI* genu často vedou k závažnému projevu onemocnění, delece celého genu jsou spojeny s mírným nebo s klasickým projevem MFS. (Furtado *et al.*, 2011; Hilhorst-Hofstee *et al.*, 2011).

Gen pro TGFβ-receptor druhého typu (TGFβR2): *TGFBR2*

TGFβR2 patří mezi transmembránové proteiny se serin/threonin kinázovou aktivitou a podílí se na aktivaci několika signálních drah. *TGFBR2* gen se nachází na chromozomu 3p22 a TGFβR2 protein je kódován 567 kodony rozdělených v 7 exonech (Takenoshita *et al.*, 1996). Receptor TGFβR2 je aktivován navázáním ligandu TGFβ1, který poté tvoří

ligand-receptor komplex aktivující TGF β R1 (Wrana *et al.*, 1994). Signál je poté veden do buňky fosforylací Smad proteinů, transkripčních faktorů. Extracelulární signál TGF β 1 je přenesen do cytoplazmy a tak se může podílet ve spolupráci s kofaktory, které se vážou k DNA, na regulaci genové transkripce.

TGF β R2 je součástí několika buněčných pochodů, jako jsou inhibice růstu, apoptóza, proliferace a produkce ECM (Chang *et al.*, 2002). TGF β signalizace může v cévní tkáni regulovat syntézu klíčových tkáňových proteinů a degradačních enzymů a změny v této signalizační dráze mohou mít negativní vliv na funkci a strukturu normální vaskulární tkáně (Jones *et al.*, 2009). TGF β signalizace může být regulována fibrilinem-1, který vzájemně reaguje s latentním TGF β vazebným proteinem (Massam-Wu *et al.*, 2010). Plnohodnotný fibrilin-1 pravděpodobně brání zvýšené signalizaci prostřednictvím zadržování zásob inaktivního TGF β 1. Tento mechanismus se zdá být porušený v případě MFS, kde vede k zvýšené tvorbě aneurysmat (Goumans *et al.*, 2009). Disregulace TGF β /Smad2 signalizace byla nalezena u aortálních aneurysmat, ať byl jejich výskyt součástí syndromu (např. MFS) nebo byl vlivem degenerativních změn (Gomez *et al.*, 2009; Gomez *et al.*, 2011).

Doposud byla prokázána souvislost mutací v *TGFBR2* genu s MFS, Loeys-Dietz syndromem (LDS) a u familiárních aneurysmat a disekcí hrudní aorty (TAAD – thoracic aortic aneurysm and dissection). Mutace a abnormální exprese *TGFBR2* genu jsou dále spojeny s aterosklerózou a některými typy rakoviny (Pannu *et al.*, 2005a; Disabella *et al.*, 2006, Jones *et al.*, 2009).

Doposud bylo identifikováno 95 mutací. Aktualizovaný kompletní seznam mutací *TGFBR2* genu lze nalézt v online mutační databázi The Human Gene Mutation Database (www.hgmd.cf.ac.uk).

2.2 Infarkt myokardu

Infarkt myokardu je definován jako ischemická ložisková nekróza srdečního svalu, která vzniká na základě náhlého uzávěru či výrazného zúžení v povodí levé nebo pravé koronární arterie. Ve většině případů se jedná o uzávěr způsobený krevní sraženinou právě

v místě zúžené koronární arterie. Zcela vzácně může být postižení způsobeno zánětem arterie, embolem nebo spasmem. Infarkt myokardu může postihovat levou i pravou srdeční komoru, velikost nekrotické tkáně je různá podle místa a velikosti uzavřené koronární tepny (www.ikem.cz).

Po uzavěru koronární arterie obvykle následuje ruptura, exulcerace či mikroskopická trhлина aterosklerotického plátu, agregace destiček, neúplně obturující trombus. Na uzavěru se podílí také doprovodný spasmus koronární arterie. Velmi důležitá je aktivace destiček (zvýšená agregace, zvýšená vazba fibrinu na glykoproteinový receptor GP IIb/IIIa na povrchu destiček, zvýšená produkce tromboxanu) a lokální dysfunkce endotelu (snížení tvorby prostacyklinu a relaxačního faktoru tvořeného endotelem – EDRF-endotelium-derived relaxing factor).

Po uzavěru koronární arterie jsou buňky myokardu schopny přežít přibližně 20 minut se schopností úplné regenerace při obnovení dávek kyslíku. Obvykle během této doby nedochází k žádným histologickým změnám, k poškození vláken myokardu, k uvolnění biochemických markerů nekrózy ani ke změnám na křivce EKG (elektrokardiogram). Pokud hypoxie trvá déle, začínají první buňky podléhat nekróze, tedy intravitálnímu odumírání buněk a tkání. V okolí nekrózy dochází na rozdíl od apoptózy k zánětlivé reakci.

Nekróza se obvykle rozšiřuje od endokardu k epikardu a od centra ke krajům ischemické oblasti. Postup nekrózy od endokardu k epikardu trvá v rozmezí 4-12 hodin (obvykle kolem 6 hodin, výjimečně až 24 hodin). Rychlost postupu nekrózy ovlivňuje úplnost přerušování koronárního průtoku, přítomnost kolaterálních větví, spotřeba kyslíku v myokardu (tj. výše systolického tlaku a srdeční frekvence) a trénovanost myokardu vůči ischemii (Davies, 2000). Již po několika vteřinách po uzavěru koronární arterie začínají mizet kontrakce ischemické části myokardu. Vzniká porucha kinetiky v povodí příslušné koronární arterie. Nejlehčí forma poruchy je označován jako hypokineze (snížení kontrakcí), těžší je akineze (vymizení kontrakcí), nejtěžší dyskineze (vymizení kontrakcí a pasivní systolické vyklenování postižené oblasti) (Špaček a Widimský, 2003a).

2.2.1 Myokard - struktura a funkce

Myokard představuje srdeční svalovinu tvořenou příčně pruhovanou svalovinou, jednotlivé buňky se nazývají kardiomyocyty a tvoří 30-40 % buněk myokardu.

Kardiomyocyty jsou protáhlé buňky válcovitého tvaru, jejich délka je 50–100 μm a průměr je 10–20 μm . Tyto buňky jsou zodpovědné za srdeční kontrakci (Štejfa *et al.*, 2007). Povrch kardiomyocytů je kryt semipermeabilní membránou - sarkolemou, která vystupuje do mimobuněčného prostoru buňky v místě označovaném jako Z linie, ve formě sítě kanálů a T tubulů (Aschermann, 2004). Funkcí T tubulů je přenos elektrického impulsu do myocytů, kterým se spustí uvolnění vápenatých iontů ze sarkoplazmatického retikula. Vápenaté ionty umožňují vznik můstků mezi aktinem a myozinem a navození kontrakce. Sarkoplazmatické retikulum tvoří systém kanálků omotávajících myofibrily jako síť. Na jeho povrchu se nacházejí ribozomy. Stěna sarkoplazmatického retikula je tvořena lipidovou dvouvrstvou (Štejfa *et al.*, 2007). Kardiomyocyty tvoří kolagen typu IV, který je součástí jejich bazální membrány. Většinu buněk v myokardu tvoří především fibroblasty, dále pak zde nalézáme endoteliální buňky, buňky hladké svaloviny cév a jiné.

Fibroblasty jsou buňky mezenchymálního původu, které produkují intersticiální kolagen typu I, III a VI. V normální srdeční tkáni jsou fibroblasty v kontaktu s kardiomyocyty. Množství fibroblastů v průběhu života a stárnutí narůstá až o dvě třetiny. Srdeční fibroblasty patří mezi hlavní regulátory ECM myokardu a jsou zodpovědné za jeho strukturální, biochemické, mechanické a elektrické vlastnosti. Udržují homeostázu ECM a produkují faktory (cytokiny, růstové faktory, MMP a jiné), které udržují rovnováhu mezi syntézou a degradací složek pojivové tkáně (Kanekar *et al.*, 1998).

Fibroblasty jsou také nazývány „sentinelovými“ buňkami, neboť fungují jako lokální imunomodulátory a modulátory srdeční elektrofyziologie. Za patologických stavů se srdeční fibroblasty mohou diferencovat v myofibroblasty, které mají lepší mobilní a kontraktální schopnosti a jsou schopny větší syntézy proteinů ECM. Aktivované srdeční myofibroblasty se podstatnou měrou podílí na odpovědi na IM (Porter a Turner, 2009; Van den Borne *et al.*, 2010). V akutní fázi vylučují proteolytické MMP, které degradují strukturální komponenty ECM, umožňují tím přísun zánětlivých buněk a myofibroblastů do oblasti zasažené infarktem a podporují revaskularizaci. Následně syntetizují nové proteiny ECM (především fibrilární kolagen typu I a III), které jsou nezbytné pro vytvoření jizvy a aktivně se podílejí i na stahování krajů rány. Dále také syntetizují a vylučují řadu cytokinů (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 a TNF α), které pomáhají udržet zánětlivou odpověď na poškození (Baum a Duffy, 2011). Myofibroblasty tedy hrají

klíčovou roli v procesu časné remodelace poškozené srdeční tkáně a svůj fenotyp mohou měnit z degradačního na syntetizující.

Srdeční remodelace je často spojená s fibrózou (excesivní proliferace fibroblastů a nárůst obsahu protienů ECM). Růst fibrózní tkáně je dán proliferativním potenciálem fibroblastů, který kupříkladu u kardiomyocytů chybí (Porter a Turner, 2009). Fibróza indukuje ztuhnutí myokardu a přispívá tím k jeho dysfunkci.

Extracelulární matrix vytváří prostředí mezi rozdílnými typy buněk myokardu a poskytuje podpůrnou strukturální síť, která udržuje srdeční geometrii během srdečního cyklu. ECM je vysoce adaptivní struktura, která je při mechanickém stresu, neurohormonální aktivaci, zánětu a oxidačním stresu schopna dynamické regulace (Kirk *et al.*, 2009). Myokardiální ECM se skládá ze sítě fibrilárního kolagenu, elastinu, nekolagenních glykoproteinů, proteoglykanů a z bioaktivních signálních molekul (Scott-Burden, 1994). Do skupiny *glykoproteinů* nekolagenního typu můžeme zařadit **fibronektiny** (tj. dimerické glykoproteiny přítomné v ECM a v krvi, mající vliv na morfologii buněk, na adhezi, migraci a diferenciaci buněk díky vazbě na integriny) a **laminin** (patřící mezi heterogenní glykoproteiny složené z α , β i γ řetězců, primárně lokalizovaný v bazální membráně). Jejich vliv na buněčné funkce se projevuje vazbou na integrinové a non-integrinové receptory (Egeblad a Werb, 2002). Dále do skupiny glykoproteinů patří **chondronektin**, **osteonektin** a **osteopontin** (Čech a Horký, 2011). *Proteoglykany* vznikají postranslační modifikací glykosaminoglykanových řetězců. Do této skupiny řadíme **perlekan**, který je nejčastějším heparan-sulfátem proteoglykanů na bazální membráně, dále **versikan** (hlavní chondroitin-sulfát proteoglykanu v nechrupavčitých tkáních), **syndekan**, **glypikan** a antigen **CD44**. Důležitou součástí ECM je bazální membrána (oddělující buňky epitelu od základního stromatu), která je tvořena kolagenem typu IV a lamininem (Egeblad a Werb, 2002).

Vlákná **kolagenu** vytvářejí síťovitou strukturu. Molekula kolagenu je tvořena třemi α řetězci, které tvoří trojitý helix (Egeblad a Werb, 2002). Tenkou vláknitou strukturou vlákna kolagenu je fibrila skládající se z ještě tenčích vláken označovaných jako mikrofibrily. Kolagen se dělí do několika skupin odlišujících se od sebe typem polypeptidových řetězců. **Myokardiální fibrilární kolagen typu I a III** zajišťuje strukturální integritu sousedících myocytů. Udržení rovnováhy mezi produkcí

a degradaci kolagenu typu I je rozhodující pro udržení tkáňové i orgánové integrity včetně procesu reparace tkáně v reakci na poškození. Tato rovnováha je regulována na transkripční úrovni různými cytokiny (TGF β , TNF α – tumor nekrotizující faktor alfa). Depozice kolagenu jsou ve zdravém dospělém srdci velmi malé. Během stárnutí se zvyšuje podíl tzv. „cross-linked“ kolagenu, což vede k tuhnutí tkáně. U patologických stavů, jako jsou hypertrofie, srdeční selhání a IM, bývá podíl kolagenu dramaticky zvýšený. Diskontinuita sítě fibrilárního kolagenu může podporovat remodelační mechanismy, které přispívají k dysfunkci levé komory a k její postupné dilataci (Spinale, 2007).

Proteiny ECM, které modulují interakce buňka-matrix, nazýváme **matricelulární proteiny**. Jejich exprese je vysoká během embryogeneze, postnatálně téměř chybí. Znovu se objevuje jako reakce na poškození tkáně. Mezi nejlépe popsané matricelulární proteiny patří osteopontin (OPN) a trombospondin 1 a 2 (TSP1, TSP2). Dalšími zástupci jsou například tenascin-C (TN-C), tenascin-X (TN-X) a osteonektin (Schellings *et al.*, 2004).

V ECM myokardu se také mohou nacházet matrix metaloproteinázy (**MMP**), které se zde podílí na regulaci buněčného růstu, migrace, buněčného přežití a na angiogenezi. MMP jsou syntetizovány především fibroblasty, ale také kardiomyocyty a endoteliálními a prozánětlivými buňkami. Aktivita MMP je inhibována skupinou endogenních proteinů, které nazýváme tkáňové inhibitory metaloproteináz (**TIMP**). **Angiotenzin II**, **TGF β** a **TNF α** se účastní regulace hypertrofie myocytů, proliferace fibroblastů a změn proteinů v ECM. Angiotenzin II dále stimuluje expresi genů pro kolagen a pro jeho syntézu, a redukuje degradaci kolagenu prostřednictvím snížení aktivity MMP v srdečních fibroblastech. **Endotelin-1** indukuje hypertrofii myocytů a stimulaci tvorby kolagenu (Spinale, 2007).

2.2.2 Molekulární pochody podílející se na infarktu myokardu

V souvislosti s infarktem myokardu dochází k výrazným změnám na molekulární a buněčné úrovni v ischemickém ložisku i v oblastech mimo něj. Během tohoto komplexního děje, na kterém se podílí řada různých mechanismů, dochází ke změnám velikosti, tvaru a funkce levé komory – k srdeční remodelaci (Lindsey, 2004; Lindsey a Zamilpa, 2012). Po infarktu myokardu se v postižené srdeční tkáni rozbíhají hojivé mechanismy a zároveň dochází k zánětlivým a remodelačním procesům.

Reparaci infarktem poškozené tkáně můžeme rozdělit do 3 fází, které se navzájem překrývají: zánětlivá, proliferační a dozrávací fáze (tabulka č. 2) (Dobaczewski *et al.*, 2010; Chen a Frangogiannis, 2013). V první fázi, hned po uzávěru koronární arterie a nekróze tkáně, dochází k degradaci ECM, k vyplavení zánětlivých buněk do oblasti primárního ložiska a k indukci bioaktivních molekul (peptidy a cytokiny). Degradace ECM během této akutní fáze je považována za nejdůležitější děj, neboť umožňuje přístup zánětlivých buněk, proliferaci a zrání makrofágů a fibroblastů, ale také připravuje vhodné vnitřní uspořádání pro následnou tvorbu jizvy. Řada studií, které zkoumaly nejčasnější děje v ECM po infarktu myokardu, potvrzuje úbytek formací kolagenu a zvýšený výskyt hydroxyprolinu (aminokyselina, která se primárně nachází v kolagenu) v ischemické tkáni a to ještě před vyplavením zánětlivých buněk do ložiska. Následný přísun zánětlivých buněk do ischemické oblasti je doprovázen další proteolýzou buněčných a ECM proteinů. Proliferace a diferenciací fibroblastů a dalších intersticiálních buněk je dále stimulována. Zánětlivá odpověď kulminuje v 1. a 2. týdnu po IM a v průběhu 3. a 4. týdne se pomalu snižuje.

Proliferační fáze je spojena s aktivací stop signálů, které tlumí zánětlivou odpověď (Frangogiannis, 2012). Inhibiční cytokiny, jako jsou IL-10 a TGF β , se pravděpodobně významně podílejí na potlačení syntézy prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Dobaczewski *et al.*, 2011). Dominantními buňkami této fáze jsou fibroblasty, které za přispění vnějších faktorů mění svůj fenotyp. Vzniklé myofibroblasty mají strukturu podobnou buňkám hladké svaloviny (obsahují kontraktlní vlákna) a funkčně se podobají synteticky aktivním fibroblastům (Hinz, 2010). V reakci na poškození srdeční tkáně se ve fibroblasty mohou transformovat také endoteliální a epitelové buňky nebo i hematopoetické buňky, které se cíleně pohybují do ložiska (Wynn a Ramalingam, 2012). Jejich potenciál je vysoce migrační (přesun buněk do oblasti ložiska) a proliferační (robustní syntéza proteinů ECM).

Ve fázi dozrávání (tvorba jizvy) se v myokardu postupně zvyšuje podíl kolagenu, zatímco leukocyty, vaskulární buňky a fibroblasty/myofibroblasty se vytrácejí, pravděpodobně díky apoptóze. Po dokončení reparativních procesů mohou být v reakci na zvýšené napětí chronicky aktivovány fibroblasty, které se nacházejí mimo ložisko. Tyto buňky se díky své produkci matrixových proteinů a proteáz mohou podílet na remodelaci srdeční komory a na její dysfunkci (Chen a Frangogiannis, 2013).

Tabulka č. 2: Změny funkce a fenotypu fibroblastů v průběhu hojení po IM (převzato z Chen a Frangogiannis, 2013)

	Fenotyp buňky	Aktivita	Genová exprese
Zánětlivá fáze	zánětlivé fibroblasty	aktivace inflamazómu	syntéza chemokinů a cytokinů, exprese proteáz
Proliferační fáze	aktivované myofibroblasty	migrace, proliferace, zvýšená schopnost kontrakce rány, přísun progenitorů fibroblastů	syntéza kolagenu, exprese matricelulárních proteinů, syntéza kontraktlních proteinů (α -SMA), exprese MMP a TIMP
Fáze dozrávání	„klidové“ fibroblasty	apoptóza, ztráta myofibroblastového fenotypu (?)	redukce syntézy (?), snížená exprese α -SMA (?), aktivace pro-apoptických genů (?)

(?) - dosud hypotetické předpoklady

Remodelace levé komory je proces, který se může vyvíjet několik měsíců nebo i let a je rozhodující pro další výkon a funkci myokardu. Může být považován za nezávislý ukazatel morbidity a mortality (Frangogiannis *et al.*, 2002).

2.3 Matrix metaloproteinázy (MMP)

Matrix metaloproteinázy tvoří skupinu 25 druhů zinek-dependentních proteáz, které se podílejí na remodelaci základních složek extracelulární matrix za současné podpory aktivace buněčné proliferace, migrace, diferenciaci, apoptózy a angiogeneze (Spinale, 2007). Tyto enzymy jsou zapojeny do mnoha fyziologicko-patologických procesů, jako je růst a remodelace kostí a dalších tkání, hojení, dále pak nádorové bujení, artritida a roztroušená skleróza (Sbardella *et al.*, 2011). Za fyziologických podmínek jsou MMP v dospělých tkáních téměř nedetekovatelné. Za patologických podmínek, při poranění, nemoci nebo těhotenství je jejich exprese zvýšená a můžeme je tedy detekovat (Bellayr *et al.*, 2009).

Sekretované enzymy jsou produkovány neutrofily, makrofágy, fibroblasty a dalšími buňkami v inaktivní podobě jako větší prekurzory proteinů zvané zymogeny. Pro plné působení musí být aktivovány. K aktivaci enzymů dochází odštěpením zymogenu vlivem vnějších signálů (cytokinů, růstových faktorů, hormonů, interakcí matrix-buňka nebo interakcí buňka-buňka). Jejich řízená aktivace je nezbytná, jinak by docházelo k nekontrolovanému štěpení vlastních bílkovin. Optimálně MMPs fungují za fyziologického pH (Grofová, 2006).

2.3.1 Klasifikace MMP

MMP enzymy jsou klasifikovány na základě různých rozdílů. Historicky jsou tyto enzymy členěny podle substrátové specifity. Lze je rozdělit do šesti následujících skupin:

1) Kolagenázy (MMP-1, MMP-8, MMP-13 a MMP-18). Jejich funkcí je degradace alfa šroubovic intersticiálního kolagenu. Kolagenázy se liší od ostatních MMP schopností štěpit šroubovice kolagenu v nativním stavu při neutrálním pH, mezi sebou se liší různou substrátovou specificitou.

2) Gelatinázy / želatinázy (MMP-2 a MMP-9). Jsou schopny enzymaticky zpracovat různé substráty ECM. Primárně štěpí denaturovaný kolagen (gelatin) a neporušený kolagen typu IV v bazálních membránách. Nacházejí se téměř ve všech typech buněk. Mohou také štěpit denaturovaný kolagen ostatních typů, fibronectin, elastin a agrekan (Zitka *et al.*, 2010). Kromě domény podobné hemopexinu (hemopexin-like domény) je pro gelatinázy charakteristická přítomnost domény vázající kolagen, která se vyskytuje na jejich katalytické doméně a je složena ze tří repetitivních podobných fibronectinu II (fibronectin II-like) a z domény preferující vazbu fibrilárního kolagenu typu I.

3) Stromelyziny (MMP-3, MMP-10 a MMP-11). Jsou schopny hydrolyzovat kolagen typu IV, ale nejsou schopny štěpit fibrilární kolagen typu I. Mají vesměs širokou substrátovou specificitu, kromě toho můžou štěpit další MMP (Zitka *et al.*, 2010).

4) Matrilýziny (MMP-7 a MMP-26). Nemají hemopexin-like doménu, jsou schopny zpracovat kolagen typu IV.

5) MMP membránového typu (MT-MMP) (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 a MMP-25). Asociují s plazmatickou membránou. Obsahují navíc C-koncovou doménu přítomnou v intermembránové oblasti, která je doplněna o cytoplasmatickou část.

6) Ostatní MMP nemohou být zahrnuty do žádné z výše uvedených tříd a proto jsou uváděny odděleně. Mezi více prozkoumané patří například makrofágová elastáza (MMP-12), která může štěpit elastin a další substráty a umožňuje makrofágům penetrovat bazální membránu a tím se podílí na přestavbě zánětlivé tkáně (Zitka *et al.*, 2010). Další MMP spolu s popisem specifických substrátů jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Klasifikace MMP (převzato ze Sekhon, 2010 a Zitka *et al.*, 2010)

Nomenklatura	Název	Substráty	Lokus
MMP-1	Kolagenáza-1 (intersticiální kolagenáza)	kolageny (I, II, III, VII, VIII a X), želatina, agrekan, L-selektin, IL-1 β , proteoglykany, entaktin, ovostatin, MMP-2, MMP-9	11q22-q23
MMP-2	Gelatináza A (gelatináza 72 kDa)	kolageny (I, IV, V, VII, X, XI a XIV), želatina, elastin, fibronektin, agrekan, MBP, osteonektin, laminin-1, MMP-1, MMP-9, MMP-13	16q13
MMP-3	Stromelyzin-1	kolageny (III, IV, V a IX), želatina, agrekan, perlekan, dekorin, laminin, elastin, kasein, osteonektin, ovostatin, entaktin, plasminogen, MBP, IL-1 β , MMP-2/TIMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13	11q23
MMP-7	Matrilysin-1	kolageny (IV a X), želatina, agrekan, dekorin, fibronektin, laminin, entaktin, elastin, kasein, transferin, plasminogen, MBP, β 4-integrin, MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-9/TIMP-1	11q21-q22
MMP-8	Kolagenáza-2 (neutrofilní kolagenáza)	kolageny (I, II, III, V, VII, VIII a X), želatina, agrekan, fibronektin	11q21-q22

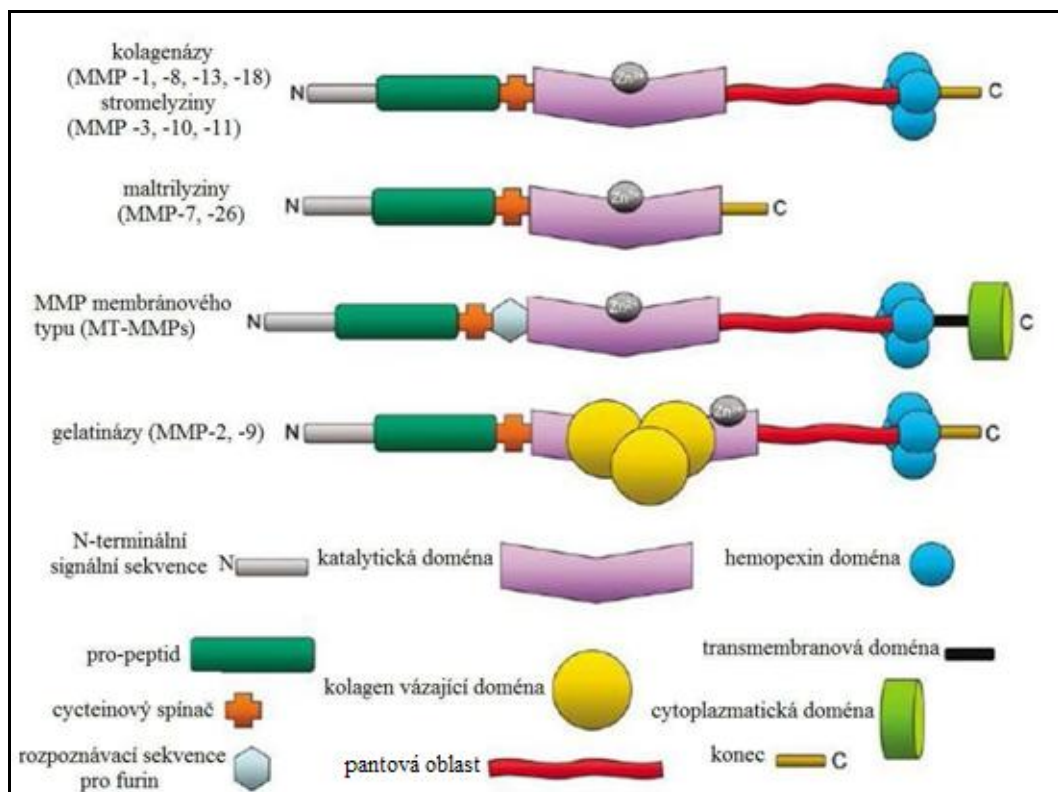
Tabulka č. 3: Klasifikace MMP (převzato ze Sekhon, 2010 a Zitka *et al.*, 2010) - pokračování

Nomenklatura	Název	Substráty	Lokus
MMP-9	Gelatináza B (gelatináza 92 kDa)	kolageny (IV, V, VII, X a XIV), želatina, entaktin, osteonektin, fibronektin, elastin, plasminogen, agrekan, MBP, IL-1 β	20q11.2- q13.1
MMP-10	Stromelyzin-2	Kolageny (III-V), želatina, kasein, agrekan, elastin, MMP-1, MMP-8	11q22.3-q23
MMP-11	Stromelyzin-3	neznámé (pravděpodobně kasein)	22q11.2
MMP-12	Metaloelastáza (makrofágová elastáza)	kolagen IV, želatina, fibronektin, vitronektin, laminin, entaktin, elastin, kasein, fibrinogen, fibrin, plasminogen, MBP	11q22.2- q22.3
MMP-13	Kolagenáza-3	kolageny (I, II, III, IV, IX, X a XIV), želatina, plazminogen, agrekan, perlekan, fibronektin, osteonektin, MMP-9	11q22.3
MMP-14	MT1-MMP	kolageny (I-III), želatina, kasein, fibronektin, laminin, vitronektin, entaktin, proteoglykany, MMP-2, MMP-13	14q11-q12
MMP-15	MT2-MMP	fibronektin, entaktin, laminin, agrekan, perlekan, MMP-2	16q12.2-q21
MMP-16	MT3-MMP	kolagen III, želatina, kasein, fibronektin, MMP-2	8q21
MMP-17	MT4-MMP	želatina, proMMP-2	12q24
MMP-18	Kolagenáza-4	kolagen I, II, III, VIII, X), želatina, agrekan	neznámý
MMP-19	RASI-1	kolagen I, želatina, agrekan, fibronektin	12q14
MMP-20	Enamelyzin	amelogenin, agrekan, COMP	11q22.3
MMP-21		neznámý	1q36.3
MMP-22		neznámý	1q36.3
MMP-23		neznámý	neznámý
MMP-24	MT5-MMP	fibronektin	20q11.2
MMP-25	MT6-MMP (leukolyzin)	pro-želatináza A, fibrin, fibronektin, kolagen IV, želatina	16p3.3
MMP-26	Matrilyzin-2 Endometáza	kolagen IV, želatina, fibrinogen, fibronektin, vitronektin	neznámý
MMP-28	Epilyzin	neznámý	17q11.2

S rostoucím seznamem substrátů pro MMP byl tento systém řazení upraven a často jsou MMP řazeny do skupin podle struktury. Nejpoužívanější řazení je na základě pre-syntetických oblastí na chromozomech a různé substrátové specifity. Pro tuto klasifikaci se používá číselné označení MMP-1 až MMP-29 (MMP-29 zatím nebyla pojmenována a MMP-4, MMP-5 a MMP-6 neexistují) (Sekhon, 2010).

2.3.2 Struktura MMP

Na základě srovnání sekvence MMP je struktura členěna do několika domén (obrázek č. 1), které obvykle tvoří: **Pro-doména/Pro-peptid** obsahující asi 80 aminokyselinových reziduí. Sahá od N-konce ke katalytické doméně a je nezbytná pro enzymovou latenci. Cysteinová sulfátová skupina obsažená v N- koncové pro-doméně interaguje se Zn^{2+} iontem a blokuje aktivní místo. Pro-domény některých MMP vykazují rozpoznávací sekvenci pro tzv. „furin-like proteázy“, které jsou nezbytné pro štěpení pro-domény a následnou aktivaci MMP.



Obrázek č. 1: Rozdělení metaloproteináz podle struktury (převzato z Chow *et al.*, 2007)

Katalytická doména obsahuje dva Zn^{2+} ionty, katalytický - interagující se třemi histidinovými zbytky je zodpovědný za proteolytickou funkci a strukturální Zn^{2+} iont - interagující se třemi histidinovými zbytky, jedním zbytkem kyseliny asparagové a nejméně se dvěma atomy strukturálního vápníku. Doména stabilizuje celou strukturu proteinu.

Hemopexin-like doména tato C-terminální doména byla nalezena u všech MMP, kromě MMP-7 a MMP-26, a je zodpovědná za rozpoznání a interakce se substrátem, s tkáňovými inhibitory MMP a molekulami buněčného povrchu (Sbardella *et al.*, 2011).

2.3.3 Funkční vlastnosti MMP

MMP štěpí převážně strukturální komplexy ECM a tím usnadňují pohyb buněk. Vzhledem k tomu, že buňky mají receptory pro jednotlivé struktury, které jsou součástí ECM (například integriny), dochází štěpením těchto proteinů k ovlivnění i jiných buněčných signalizací a funkcí. Kromě štěpení komponent ECM se MMP a související proteinázy, jako jsou například ADAMs (A disintegrin and metalloproteinases) podílí na uvolňování membránově vázaných prekurzorů řady růstových faktorů. Tím je například $TGF\alpha$. Mezi další substráty patří receptory pro růstové faktory. Štěpením dochází k uvolnění extracelulárních domén, jejichž funkcí je nalákat ligandy příslušných receptorů. Dále MMP štěpí molekuly buněčné adheze. Nemůžeme opomenout ani štěpení a aktivaci vlastních zymogenních forem a také štěpení jinými MMP a proteinovými inhibitory (Egeblad a Werb, 2002).

2.3.4 Syntéza a regulace MMP

MMP jsou syntetizovány ve formě inaktivních proenzymů, neboli zymogenů (pro-MMP). Jsou vylučovány do ECM, kde dochází k jejich vazbě na specifický protein. Pro plné působení musí být MMP aktivována (Grofová, 2006). Aktivace MMP je závislá na cysteinovém spínači, který je tvořen vazbou cysteinu v pro-peptidu se zinkem v katalytické doméně (Kähäri a Saarialho-Kere, 1997). Pokud se vytvoří vazba mezi cysteinem a Zn^{2+} dojde tím k zablokování aktivního místa enzymu a substrát nebude navázán a následně štěpen. Rozpojení této vazby vede k aktivaci enzymů. Molekula vody se poté naváže na Zn^{2+} a nahrazuje cysteinový zbytek po disociaci (Snoek-Van Beurden a Von Den Hoff,

2005). Za fyziologických podmínek (*in vivo*) je pro-peptid odštěpen pomocí proteáz (včetně serinové proteázy a některých členů MMP, nejčastěji plazminem) nebo přerušáním interakce mezi pro-peptidem a katalytickým místem řadou sloučenin (včetně reaktivních forem kyslíku, peroxynitritu, alkylačních látek, těžkých kovů a disulfidů) (Chow *et al.*, 2007; Bellayr *et al.*, 2009). Většina MMP je tedy aktivována vně buňky pomocí jiných, již aktivovaných MMP nebo pomocí serinových proteáz.

Proteolytická aktivita všech metaloproteináz může být regulována různými mechanismy (Moses, 1996): na úrovni genové exprese (transkripce), na úrovni inaktivních proenzymů (zymogenů) a pomocí inhibice jejich proteolytické aktivity (specifická a nespecifická).

Na transkripční úrovni se do procesu zapojuje řada stimulátorů, jako jsou (převzato z Kandasamy *et al.*, 2010):

- **cytokiny:** tumor nekrotizující faktor alfa (TNF α), interleukin 1 beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6)
- **bioaktivní molekuly:** angiotenzin II (ANG II), aldosteron, endotelin-1 (ET-1), katecholamin norepinefrin (NE)
- **matricelulární faktory:** osteopontin (OPN) a trombospondin (TSP)
- **růstové faktory:** transformující růstový faktor beta 1 (TGF β 1), epidermální růstový faktor (EGF)
- **hormony:** estrogen a melatonin
- **hypoxie**

Aktivitu MMP kontrolují různé endogenní inhobitory. V okamžiku, kdy se aktivované MMP objeví v extracelulárním prostoru, mohou být reverzibilně inhibovány. Hlavním inhibitorem MMP v tkáňových tekutinách a v plazmě je **α 2-makroglobulin**, který váže MMP a tvoří společně komplex, který je vázán na scavengerové receptory. Poté jsou nevratně odstaněny endocytózou. **Trombospondin-1** váže pro-MMP-2 a pro-MMP-9 a tak přímo inhibuje jejich aktivitu. **Trombospondin-2** inhibuje MMP podobnou cestou jako α 2-makroglobulin - usnadňuje zlikvidování MMP pomocí endocytózy po předchozím

navázání na scavengerové receptory (Egeblad a Werb, 2002). Mezi další patří regulátory EMMPRIN (extracellular MMP inducer), RECK (reversion-inducing cystein-rich protein with kazal motifs) a TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase, tkáňové inhibitory metaloproteináz).

2.3.5 Tkáňové inhibitory metaloproteináz - TIMP

Nejvíce studovanou skupinou endogenních inhibitorů MMP jsou **TIMP**. Jsou to nízkomolekulární proteiny (~190 aminokyselin), které se reverzibilně vážou na aktivované MMP v poměru 1:1 a inhibují jejich aktivitu. TIMP mají schopnost navázat se na katalytickou doménu aktivní MMP a tím zabrání navázání substrátu. Skupina TIMP je složena ze 4 zástupců TIMP-1, -2, -3 a TIMP-4. Jednotliví zástupci skupiny TIMP se od sebe liší biochemickými vlastnostmi, tkáňovou expresí a schopností inhibovat různé MMP (Gill a Parks, 2008).

TIMP-1 inhibuje aktivitu většiny MMP s výjimkou MMP-14. Preferenčně tvoří komplex s MMP-9 (Stamenkovic, 2003).

TIMP-2 inhibuje téměř všechny MMP až na MMP-9 a preferenčně se váže na MMP-2. TIMP-2 je sekretován spolu s MMP-14 a vytváří třídílný komplex s MMP-14 a latentní MMP-2 (Hemmann *et al.*, 2007). Tento komplex do jisté míry aktivuje či inhibuje aktivitu MMP-2, což závisí na množství navázaného TIMP-2 (Lu, 2004).

TIMP-3 má podobnou strukturu jako TIMP-1 a TIMP-2. Zatímco TIMP-1, TIMP-2 a TIMP-4 jsou volně secernované proteiny, TIMP-3 je zakotvena v ECM. TIMP-3 inhibuje aktivitu pouze u MMP-1, -2, -3, -9 a -13 (Kähäri a Saarialho-Kere, 1997).

TIMP-4 se váže na MMP-1, -2, -3, -7 a -9. Možný prognostický potenciál tohoto inhibitoru byl popsán v souvislosti se srdečním selháním. Koskivirta *et al.* (2006) zaznamenali zvýšenou expresi TIMP-4 u poruch kardiovaskulárního systému, které byly spojeny se zánětlivou reakcí.

2.3.6 MMP a kardiovaskulární poruchy

V souvislosti s IM bylo popsáno několik druhů MMP a všechny čtyři známé TIMP, jejich producenty uvádí tabulka č. 4. Za fyziologických podmínek je poměr MMP a TIMP striktně regulován a proteolytická aktivita v myokardu je pod kontrolou. Předpokládá se, že nerovnováha mezi hladinami MMP a TIMP je faktorem, který se podílí na poškození myokardu po ischemické příhodě (Schulz, 2007).

Tabulka č. 4: Expresí MMP a TIMP v buňkách, které se podílejí na odpovědi na IM (Lindsey a Zamilpa, 2012)

Typ buňky	Exprimované MMP a TIMP
Srdeční myocyty	MMP-1, -2, -3, -7, -9, -14, TIMP-1, -4
Srdeční fibroblasty	MMP-1, -2, -3, -9, -13, -14, TIMP-1, -2
Myofibroblasty	MMP-2, -14
Neutrofilly	MMP-8, -9
Makrofágy	MMP-1, -3, -7, -8, -9, -12
Endoteliální buňky	MMP-2, -9
Buňky cévní hladké svaloviny	MMP-2, -9

Předmětem zájmu této práce bylo porovnávání metaloproteináz ze skupiny gelatináz – MMP-2 a MMP-9.

MMP-2 (gelatináza-A, 72-kDa gelatináza) se nachází téměř ve všech typech buněk a degraduje denaturovaný kolagen (gelatin). MMP-2 štěpí nativní kolagen typu I a hraje důležitou úlohu v remodelaci kolagenů ECM (Kähäri a Saarialho-Kere, 1997). Je jednou z nejvíce studovaných proteináz v souvislosti s kardiovaskulárním onemocněním. Byly popsány tři mechanismy aktivace pro-MMP-2: autokatalytická aktivace, aktivace závislá na TIMP-2 a aktivace závislá na systému (uPA)/plasmin (uPA – urokinázový aktivátor plazminogenu), který je aktivován na povrchu buňky (Cao *et al.*, 1996; Will *et al.*, 1996; Kinoshita *et al.*, 1998; Overall *et al.*, 2000).

Zvýšení hladin MMP-2 bylo například popsáno v souvislosti se závažností systolické dysfunkce levé komory u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií (Noji *et al.*, 2004).

U akutního infarktu myokardu bylo prezentováno postupné zvyšování plazmatických hladin MMP-2 od nástupu ataky s maximy 21. den (Hojo *et al.*, 2001). Pasterkamp *et al.* (2000) prokázali vyšší hladiny MMP-2 přímo v aterosklerotickém plaku koronárních arterií. Hladiny MMP-2 byly podrobně studovány také ve vztahu k srdečnímu selhání. Yamazaki *et al.* (2004) uvádějí, že plazmatické hladiny MMP-2 jsou signifikantně vyšší u pacientů s těžkým kongestivním srdečním selháním oproti skupině se středním stupněm, a to bez vazby na podklad tohoto onemocnění - dilatační kardiomyopatii, ischemickou chorobu srdeční anebo chlopenní onemocnění. Zvýšená exprese MMP-2 a TIMP-2 byla popsána u stenotických aortálních chlopní ve srovnání s kontrolními chlopněmi u laboratorních potkanů. Výsledky z *in situ* zymografie dokládají, že MMP-2 je přítomna v normálních chlopních jako inaktivní proenzym, který je aktivován právě ve stenotických chlopních (Kaden *et al.*, 2004). MMP-2 je také aktivována u modelu srdečního selhání, a to jak se systolickou, tak s diastolickou dysfunkcí (Nishikawa *et al.*, 2003). Aktivovaná MMP-2 může tedy být částečně zodpovědná za ztenčení komory u obou typů srdečního selhání, což má za následek zvýšení plnicího tlaku v levé komoře, plicní kongesci a rozvoj srdečního selhání.

Gen pro gelatinázu A se nazývá *MMP2* a je umístěn na chromozomu 16q13. Gen je 17 kb dlouhý a je tvořen 13 exony (o délce v rozmezí 110 - 901 bp) a 12 introny (o délce v rozmezí 175 - 4 350 bp). Gen kódující MMP-2 se liší od ostatních MMP nepřítomností TATA boxu a vazebných míst pro transkripční faktor AP1 (aktivátor protein 1) v rámci oblasti promotoru (Huhtala *et al.*, 1995).

MMP-9 (gelatináza-B, 92-kDa gelatináza) hraje důležitou roli v remodelaci tkání spolu s MMP-2. Degraduje podobné substráty jako gelatináza-A a navíc štěpí kolagen typu II a V (Kähäri a Saarialho-Kere, 1997). Zároveň se podílí na migraci leukocytů. Prostředí s vysokou expresí MMP-9 v ráně může svědčit o zánětu a špatném hojení ran (Liu, 2009). Během akutní fáze infarktu myokardu se v postižené srdeční tkáni akumuluje velké množství zánětlivých buněk a to je doprovázeno markantním zvýšením hladiny MMP-9. V této časně fázi jsou hlavním zdrojem MMP-9 neutrofilů, v pozdějších fázích po IM jsou to makrofágy, lymfocyty a fibroblasty. V neutrofilech je MMP-9 syntetizována v průběhu diferenciací granulocytů v kostní dřeni a k jeho uvolnění dochází po aktivaci neutrofilů (Jonsson *et al.*, 2011). V ischemickém ložisku byl pozorován v souvislosti se zvýšenou infiltrací neutrofilů a makrofágů nápadný nárůst MMP-9 aktivity ve dnech 1-4 po IM (Tao

et al., 2004; Mukherjee *et al.*, 2010). MMP-9 hraje klíčovou roli v remodelaci levé komory a byla popsána také pozitivní korelace mezi remodelací levé komory a časnou vysokou koncentrací MMP-9 v plazmě (Kaden *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2007). O MMP-9 se mimo jiné také často hovoří jako o možném predikčním faktoru fatálních komplikací u pacientů s onemocněním koronárních tepen (Blankenberg *et al.*, 2003). Enzym je kódován genem *MMP9*, který se nalézá na chromozomu 20q11.2-q13.1.

3 Cíle práce

3.1 Cíle u souborů pacientů s vadou aortální chlopně

- 1) Zvolit a analyzovat geny, které mají vliv na elastické vlastnosti ascendentní aorty u studovaných souborů
 - i. Analyzovat vybrané úseky *FBNI* genu
 - ii. Analyzovat *TGFBR2* gen
- 2) Stanovit hladiny MMP-2 a MMP-9 v séru a porovnat naměřené hodnoty u souboru pacientů s vadou aortální chlopně doprovázenou dilatací ascendentní aorty (AAD), u pacientů s vadou aortální chlopně bez dilatace (NAAD) a u kontrolního souboru.
- 3) Korelovat naměřené koncentrace MMP a věk, pohlaví a míru postižení ascendentní aorty u pacientů AAD a NAAD.
- 4) Nalézt možné rozdíly v klinických a biochemických parametrech zaznamenaných u pacientů AAD a NAAD a zhodnotit jejich vztah k projevu onemocnění.

V současnosti nejsou k dispozici studie, které by popisovaly vliv genů nebo tkáňových faktorů na rozvoj dilatace u pacientů operovaných pro vadu aortální chlopně a které by umožňovaly jejich prostřednictvím monitorovat míru aortálního postižení. Z molekulárně genetického hlediska se jako pravděpodobná příčina aortální dilatace jeví mutace některé ze složek elastických vláken hojně zastoupených v aortální stěně. Pomocí genetické analýzy chceme posoudit potenciální podíl genů, které ovlivňují elastické vlastnosti aortální tkáně, na patologii dilatace ascendentní aorty u úzce specifikovaného souboru pacientů.

Jestliže v aortální tkáni probíhají nějaké patologické pochody, je také vysoce pravděpodobné, že zde v určité míře dochází i k destrukci a remodelaci tkáně. Těchto procesů se může účastnit řada proteáz, speciálně různé typy matrix metaloproteináz. Cílem bylo stanovit hodnoty MMP-2 a MMP-9 v séru pomocí imunometrických analýz u sledovaných souborů pacientů a nalézt možný vztah hladin MMP-2, MMP-9 a dalších parametrů ke klinickému projevu aortálního onemocnění.

3.2 Cíle u souboru pacientů s primárním infarktem myokardu

- 1) Stanovit hladiny MMP-2 a MMP-9 v séru a porovnat naměřené hodnoty zjištěné v akutní fázi (do 24 hodin od prvních příznaků IM) s hodnotami naměřenými při kontrole po 6 měsících od události.
- 2) Nalézt možné rozdíly v klinických a biochemických parametrech a koncentracích MMP-2 a MMP-9 v séru u souboru pacientů, kteří se nedožili kontroly po 6 měsících, oproti pacientům, kteří se dožili kontroly po 6 měsících.
- 3) Stanovit a posoudit koncentrace MMP-2 a MMP-9 v časovém období 0 - 24 hodin po zaznamenání prvních příznaků IM.
- 4) Stanovit a posoudit míru exprese u vybraných metaloproteináz a jejich modulátorů v časně fázi po IM u pacientů s primárním výskytem akutního IM za použití vzorku periferní krve smíchané s RNeasy[®].
- 5) Posoudit vhodnost metodik čipové analýzy a imunologické analýzy pro typování a sledování markerů souvisejících s IM.

Pomocí proteomických analýz chceme stanovit serologické hladiny MMP-2 a MMP-9 v časně fázi po IM (do 24 hodin po zaznamenání prvních příznaků) a po 6 měsících po IM. Předpokládáme, že u pacientů s primárním výskytem IM a s fatální prognózou (úmrtí do 6 měsíců po IM) je možné nalézt statisticky signifikantní rozdíly v naměřených biochemických a imunologických parametrech.

Chceme zjistit, jaké výsledky nám mohou přinést vyšetření provedená z periferní krve. Z etického hlediska jsou vhodné co nejméně invazivně dostupné materiály, jejichž odběr znamená minimální zátěž pro pacienta v akutním stavu. Cílem bylo nalézt metodiky stabilizace odebíraného vzorku (periferní krve) a následné purifikace testovaného agens tak, aby mohl být použit pro čipovou analýzu. Čipová analýza by mohla přinést cenné informace ohledně míry exprese vybraných metaloproteináz a jejich modulátorů. Na základě výsledků dosažených z čipové analýzy a z proteomických analýz posoudit vhodnost těchto metodik pro detekci markerů z periferní krve u pacientů s akutním IM.

4 Materiál a metody

4.1 Soubory pacientů

4.1.1 Pacienti s vadou aortální chlopně

Na II. chirurgické klinice kardiovaskulární chirurgie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze bylo v období od ledna 1996 do prosince 2004 operováno 695 pacientů s vadou aortální chlopně. Dominantní aortální stenóza byla přítomna u 407 pacientů a dominantní aortální insuficience byla zaznamenána u 288 pacientů. Dilatace ascendentní aorty se projevila u 38 pacientů s aortální stenózou a u 28 pacientů s aortální insuficiencí. Těchto 66 pacientů s konkomitantní dilatací ascendentní aorty bylo kontaktováno a z toho 28 souhlasilo s účastí ve studii a podepsalo informovaný souhlas.

Dilatace ascendentní aorty u námi zkoumaných pacientů anatomicky zasahovala od junction sinotubularis až k truncus brachiocephalicus, Valsavovy síně rozšířeny nebyly. Klíčovým kritériem pro hodnocení dilatace ascendentní aorty byl její maximální průměr, který byl u všech pacientů měřen preoperativně pomocí transtorakální echokardiografie. Za dilatovanou aortu byl považován průměr ≥ 40 mm. Maximální průměr ascendentní aorty u pacientů ve sledované skupině odpovídal $54,4 \pm 6,9$ mm (\pm SD). Dominantní aortální stenóza byla zaznamenána u 19 pacientů a insuficience u 9 pacientů. U 7 pacientů z 28 byla klasifikována bikuspidální aortální chlopeň (u 6 aortálních stenóz a u 1 aortální insuficience). U všech pacientů byla provedena lineární aortoplastika. Skupina těchto 28 pacientů je v analýzách označena jako soubor AAD (Ascending Aortic Dilatation). Průměrný věk pacientů z tohoto souboru byl $60,6 \pm 11,0$ let (\pm SD).

Do další skupiny, pojmenované jako NAAD (No Ascending Aortic Dilatation), bylo od března do dubna 2006 zařazeno celkem 29 pacientů, kteří souhlasili s účastí ve studii. Vybírání byli pacienti, kteří byli na stejné klinice operováni pro vadu aortální chlopně, ale jejichž ascendentní aorta nebyla dilatovaná. Maximální průměr ascendentní aorty u pacientů v této skupině nesměl přesáhnout 40 mm, v průměru odpovídal $35,3 \pm 4,1$ mm (\pm SD). Dominantní aortální stenóza byla zaznamenána u 17 pacientů a insuficience

u 12 pacientů. U 3 pacientů z 29 byla klasifikována bikuspidální aortální chlopeč (u 1 aortální stenózy a u 2 aortálních insuficiencí). U všech pacientů byla provedena náhrada aortální chlopeč. Průměrný věk pacientů z tohoto souboru byl $68,9 \pm 8,1$ let (\pm SD).

Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 30 zdravých jedinců. Zdravý jedinec byl definován na základě anamnestických údajů – bez manifestních projevů akutního či chronického zánětlivého onemocnění, s negativní anamnézou roztroušené sklerózy nebo nádorového onemocnění. Z těchto důvodů byla vybraná kontrolní skupina výrazně mladší a průměrný věk byl $45,3 \pm 4,9$ let (\pm SD).

Zastoupení mužů a žen v jednotlivých sledovaných skupinách se významně nelišilo (tabulka č. 5).

Tabulka č. 5: Procentuální vyjádření zastoupení pohlaví (podíl žen)

	Soubor AAD (n=28)	Soubor NAAD (n=29)	Kontroly (n=30)	p-hodnota
Pohlaví (ženy)	21,4 %	37,9 %	20 %	0,227

AAD (ascending aortic dilatation) – dilatace ascendentní aorty

NAAD (no ascending aortic dilatation) – bez dilatace ascendentní aorty

U všech pacientů byla hodnocena genetická zátěž, žádná forma poruch kolagenu a fibrilinu (např. Marfanův syndrom, Ehlers-Danlosův syndrom a různé marfanoidní poruchy) nebyla klinicky vyjádřena. Diagnóza Marfanova syndromu byla vyloučena na základě „Ghent“ kritérií. Krevní vzorky byly odebírány u pacientů preoperativně. Každému pacientovi byly odebrány dle přesných instrukcí vzorky periferní krve pro následná imunologická a genetická vyšetření. Odebraná plná krev byla ihned zchlazena při $2-8$ °C, krevní séra byla separována do 1 hodiny po odběru a ihned zamražena při -20 °C.

4.1.2 Pacienti s akutním infarktem myokardu

Do studie byli zařazováni pacienti s diagnózou primárního výskytu akutního infarktu myokardu, na základě splnění všech vstupních kritérií, která jsou popsána níže, a po podepsání informovaného souhlasu. Infarkt myokardu byl diagnostikován na základě anamnestických údajů, EKG křivky a laboratorního průkazu nekrózy myokardu. Akutní

IM byl definován jako bolest na hrudi nebo její ekvivalent trvající alespoň 10 minut v posledních 24 hodinách s elevací úseku ST na EKG křivce (STEMI), či bez elevace ST úseku (NSTEMI). Nekróza myokardu byla stanovena laboratorním vyšetřením troponinu I, který byl hodnocen okamžitě při přijetí a dále ve 4 - 6 hodinových intervalech v prvních 24 hodinách. Za pozitivní hodnotu bylo považováno překročení horního limitu fyziologické hodnoty troponinu I ($\geq 0,03 \mu\text{g/l}$). Současně bylo provedeno fyzikální vyšetření a měření (výška, váha, krevní tlak) a byly hodnoceny výsledky standardního panelu laboratorních testů, prováděných u pacientů s podezřením na IM (ALT - alanin transamináza, AST - aspartát aminotransferáza, krevní obraz, koagulace, glykémie, urea, kyselina močová, lipidogram, C-reaktivní protein a u diabetiků HBA1c - glykovaný hemoglobin). Jako pomocná diagnostická metoda byla používána echokardiografie k průkazu regionální poruchy kinetiky levé komory v povodí „infarktové“ arterie.

Dalším vstupním kritériem pro zařazení do studie byl věk do 80 let. Ze studie byli vyloučeni pacienti se známou diagnózou nádorového onemocnění či pacienti aktivně léčeni pro tuto diagnózu. Pacienti nevykazovali žádné manifestní projevy chronického nebo akutního zánětlivého onemocnění (jako např. revmatoidní artritidu, gastritis), roztroušenou sklerózu, Alzheimerovu chorobu nebo podezření na nějaké z těchto onemocnění.

Do kontrolní skupiny byli zařazeni jedinci bez evidence kardiovaskulárního onemocnění: bez známého předchozího postižení koronárních arterií a periferních cév a s fyziologickým nálezem EKG. Nevykazovali ani žádné manifestní projevy chronického nebo akutního zánětlivého onemocnění (jako např. revmatoidní artritidu, gastritis), roztroušenou sklerózu, Alzheimerovu chorobu nebo podezření na nějaké z těchto onemocnění.

Do studie bylo zařazeno 34 pacientů s primárním výskytem akutního infarktu myokardu (IM). Pacienti byli sledováni hned po přijetí k hospitalizaci a podle času odběru krevního vzorku byli rozděleni do dvou skupin. U 21 pacientů byl krevní vzorek odebrán do 6 hodin po zaznamenání prvních příznaků IM (IMO6) a u 13 pacientů proběhl odběr do 24 hodin (IMO24). Charakteristika těchto souborů je uvedena v tabulce č. 6. Kontrolní vyšetření proběhlo po 6 měsících od iniciální epizody. Této kontroly se nedožili 4 pacienti (IMD6) a kompletní následné hodnocení bylo provedeno u 30 pacientů (IMK6). Charakteristika těchto souborů je uvedena v tabulce č. 7. Kromě dat ze souboru pacientů byla hodnocena také všechna data od 34 jedinců z odpovídajícího kontrolního souboru

(CTRL). Pro účely čipové analýzy byla vybrána ke každému pacientovi s IM adekvátní kontrola na základě následujících kritérií: pohlaví, věk (věk kontroly vyšší než u pacienta maximálně o 5 let), status diabetes mellitus a kouření.

Tabulka č. 6: Charakteristika skupin pacientů podle času odběru krevního vzorku

Proměnná	n	IMO6 (%)	n	IMO24 (%)
Pohlaví (muž)	21	13 (62%)	13	9 (69%)
Aktivní kouření	21	4 (19%)	13	2 (15%)
DM II. typu	21	4 (19%)	13	6 (46%)
Dyslipidémie	21	6 (28%)	13	7 (54%)
Hypertenze	21	13 (62%)	13	11 (85%)
STEMI	21	14 (67%)	13	6 (46%)
NSTEMI	21	5 (24%)	13	6 (46%)
Mikroinfarkt	21	1 (5%)	13	3 (23%)
STEMI přední	14	2 (14%)	6	3 (50%)
STEMI spodní	14	9 (64%)	6	2 (33%)
STEMI boční	14	3 (21%)	6	1 (17%)

IMO6 – odběr vzorku do 6 hodin od příhody, IMO24 – odběr vzorku do 24 hodin od příhody, STEMI – infarkt myokardu s elevací ST úseku, NSTEMI – infarktu myokardu bez elevace ST úseku, DM – diabetes mellitus

Tabulka č. 7: Charakteristika skupin pacientů, kteří se dožili versus nedožili kontroly po 6 měsících od IM

Proměnná	n	IMK6 (%)	n	IMD6 (%)	n	CTRL
Pohlaví (muž)	30	20 (67%)	4	2 (50%)	34	22 (65%)
Aktivní kouření	30	6 (20%)	4	0 (0%)	34	6 (18%)
DM II. typu	30	8 (27%)	4	2 (50%)	34	11 (32%)
Dyslipidémie	30	11 (37%)	4	2 (50%)	34	13 (38%)
Hypertenze	30	22 (73%)	4	2 (50%)	34	22 (65%)
STEMI	30	17 (57%)	4	3 (75%)	-	-
NSTEMI	30	10 (33%)	4	1 (25%)	-	-
Mikroinfarkt	30	17 (57%)	4	3 (75%)	-	-
STEMI přední	30	10 (33%)	4	1 (25%)	-	-
STEMI spodní	30	17 (57%)	4	3 (75%)	-	-
STEMI boční	30	10 (33%)	4	1 (25%)	-	-

IMK6 – pacienti, kteří se dožili 6měsíční kontroly po infarktu myokardu, IMD6 – pacienti, kteří zemřeli na kardiovaskulární příčinu do 6 měsíců od infarktu myokardu, CTRL – kontrolní soubor, DM – Diabetes mellitus, STEMI – infarkt myokardu s elevací ST úseku, NSTEMI – infarktu myokardu bez elevace ST úseku

Věkové rozložení pacientů na základě rozdělení do výše uvedených skupin je uvedeno v tabulce č. 8.

Tabulka č. 8: Průměrný věk pacientů v jednotlivých hodnocených skupinách

Skupina	Věk pacienta	
	n	Průměr ± SD
IMK6	30	64,93 ± 9,14
IMD6	4	72,03 ± 4,72
IMO6	21	63,55 ± 9,51
IMO24	13	69,34 ± 7,03
CTRL	34	66,89 ± 9,07

IMK6 – pacienti, kteří se dožili 6měsíční kontroly po IM, IMD6 – pacienti, kteří zemřeli na kardiovaskulární příčinu do 6 měsíců od IM, IMO6 – odběr vzorku do 6 hodin od příhody, IMO24 – odběr vzorku do 24 hodin od příhody, CTRL – kontrolní soubor

Pacienti byli do studie zařazováni v Městské nemocnici Čáslav a na kardiologické klinice v Pardubicích od září 2006 do ledna 2011. Tato pracoviště zaštitila odborné medicínské posouzení pacientů a odběr krevních vzorků. Přesný čas odběru krevních vzorků u pacientů s IM v akutní fázi onemocnění (po zařazení do studie) byl zaznamenáván a další náběr se uskutečnil v rámci kontroly prováděné po 6 měsících od příhody. Každému pacientovi byly odebrány vzorky periferní krve pro následná proteomická a genetická vyšetření. Krevní séra byla separována do 1 hodiny po odběru a ihned zamražena při -70 °C. Nesrážlivá krev (2,4 ml) byla nejpozději do 15 minut po odběru smíchána s *RNAlater® Tissue Collection: RNA Stabilization Solution* (Ambion, Applied Biosystems, USA) (7,6 ml) a zamražena při -70 °C.

4.2 Immunoassay MMP-2, MMP-9

Hladiny MMP-2 a MMP-9 v séru byly stanoveny metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) pomocí komerčně dostupných kitů specifických pro detekci MMP-2 a MMP-9 u lidí. Tato metoda je založena na vysoce specifické reakci primární protilátky, předem navázané na stěně polystyrénové mikrotitrační destičky, s antigenem (MMP-2 resp. MMP-9) obsaženým v séru. Po následné vazbě sekundární protilátky konjugované

s křenovou peroxidázou (HRP) byla výsledně reakce amplifikována a vizualizována substrátovou reakcí s TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidinem). Po zastavení reakce byla míra barviva měřena při 450 nm a pomocí kalibrační křivky byla vyjádřena koncentrace MMP v ng/ml.

U souboru pacientů s vadou aortální chlopně byly vzorky sér separovány do 1 hodiny od odběru krve a poté byly zamraženy při teplotě -20 °C. Pro stanovení hladin MMP-2 a MMP-9 byl použit komerčně dostupný kit od firmy *Biotrak GE Healthcare (Amersham Bioscience, UK)*. ELISA (sendvičový test) byla provedena dle instrukcí výrobce. Všechny vzorky byly měřeny v duplikátech. Pro zjištění hladiny MMP-2 byla séra naředěna 50krát a pro zjištění hladiny MMP-9 byla séra naředěna 10krát.

U souboru pacientů s infarktem myokardu byly vzorky sér také separovány do 1 hodiny od odběru krve a poté byly zamraženy při teplotě -70 °C. Pro stanovení hladin MMP-2 a MMP-9 byl použit komerčně dostupný kit od firmy *Usen (Life Science Inc., USA)*. ELISA byla provedena dle instrukcí výrobce. Pro zjištění hladiny MMP-2 byla séra naředěna 300krát a pro zjištění hladiny MMP-9 byla séra naředěna 20krát. U použitých *Usen* kitů (*Life Science Inc., USA*) se jedná rovněž o sendvičový test s amplifikací využívající biotin-avidinový systém a HRP.

4.3 Metody u souborů pacientů s vadou aortální chlopně

4.3.1 Izolace celkové DNA z plné krve

Pro izolaci DNA z plné krve byla použita vysolovací metoda dle Millera (Miller *et al.*, 1988). Odebrané krevní vzorky byly upraveny protisrážlivým činidlem a zamraženy při -20 °C. Postup izolace DNA probíhal dle protokolu metody v několika základních krocích: 1) homogenizace biologického materiálu, 2) lyze buněčných stěn, cytoplazmatických a jaderných membrán a denaturace proteinů pomocí lyzačního pufru, 3) degradace proteinů pomocí proteinázy K, 4) odstranění proteinů a polysacharidů, 5) vysrážení DNA 96 % ethanolem a její promytí, 6) rozpuštění DNA v TE pufru. Čistota izolované DNA byla

hodnocena spektrofotometricky. Izoláty byly rozpuštěny v TE pufru (40 %) a rozděleny do několika alikvotů, které byly zamrazeny při -20 °C.

4.3.2 PCR (polymerázová řetězová reakce)

Metodika PCR (polymerase chain reaction) byla použita za účelem zmnožení zkoumaných kódujících úseků DNA *in vitro*. PCR byla provedena na gradientovém thermocycleru *Thermalcycler PTC-220 DNA Engine Dyad® Cycler (MJ Research Inc., USA)*. Pro každý zkoumaný exon byly navrženy specifické primery, které byly dodány firmou *Generi-Biotech, s.r.o., ČR*. Celkový objem reakční směsi (Master mix) pro amplifikaci jednoho vzorku byl 25 µl. Vstupní množství DNA do reakce bylo 10 ng u všech vzorků. Primery byly naředěny na koncentraci 0,2 µM. Reakční podmínky a Master mix byly optimalizovány pro každý ze zkoumaných úseků. Koncentrace MgCl₂ se pohybovala v rozmezí 1,5 – 3,5 mM a do reakce byla použita DNA polymeráza *TaKaRa TaqTM (Takara, Japan)* o koncentraci 5U/µl.

Geny a exony, které byly v práci analyzovány, byly vybrány na základě literární rešerše molekulárních pochodů v pojivové tkáni ve stěně aorty a dle mezinárodní mutační databáze The Human Gene Mutation Database (www.hgmd.cf.ac.uk). Pro primární analýzy byly zvoleny geny *TGFBR2* a *FBNI*.

Podmínky reakce byly tyto: po iniciační 5minutové aktivaci DNA polymerázy při 94 °C následovalo 34 – 45 cyklů, při kterých se střídala denaturace DNA po dobu 30 sekund při 95 °C, annealing po dobu 30 sekund a extenze po dobu 1 minuty při 72 °C. Annealingová teplota a počet cyklů byly experimentálně stanoveny pro každý pár primerů zvlášť (tabulky č. 9 a 10). Finální extenze probíhala 1 minutu při 72 °C a na závěr byly vzorky zchlazeny a inkubovány při 12 °C. Kontrola amplifikátů probíhala na gelové elektroforéze (dělicím médiem byla 2 % DNAase-free agaróza). Koncentrace a čistota amplifikované DNA (1 µl) byla přeměřena na *Nanodropu ND 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)*.

Tabulka č. 9: Údaje k amplifikaci *FBNI* genu

Oblast genu (velikost)	Primery (velikost)	Koncentrace MgCl ₂ (mM)	Annealing teplota (°C)	Počet cyklů
Exon 4 (196 bp)	Sense: AO4R - AAC TCC TGT GAG CTG TTGC (18) Antisense: AO4L - CTA GAA TAC TTA TAA CTA CAG TG (23)	1,5	56	45
Exon 24 (418 bp)	Sense: AO24R - CAG CAA ATT ATT ATG TGT GCAG (22) Antisense: AO24L - ATC AAG TAG AGT GCT GAG ATC (21)	2,0	61	45
Exon 25 (273 bp)	Sense: AO25R - CAA GAA CTT CCA ACC TTC ATG (21) Antisense: AO25L - TTA AAG GAC GTC CCC TCTC (19)	2,0	54	45
Exon26 (227 bp)	Sense: AO4R - AAT TAA GGC TGT CCT GAG AC (20) Antisense: AO4L - CAT GGA ATC CTT CTC TTT CTG (21)	3,5	56	34
Exon 27 (181 bp)	Sense: AO4R - GGC CCC CAC CTT TAA CAT G (19) Antisense: AO4L - CTG AAA GTG TGG TAA ATG A (19)	1,5	51	34
Exon 28 (225 bp)	Sense: AO28R - TGC CAA AGT TGG AAG CTT ATG (21) Antisense: AO28L - TAA CAT AAC ATA ACA TAA AAT AAAG (25)	2,5	49	45
Exon 29 (213 bp)	Sense: AO29R - CAG ACA TCC AAA CCA TAT CAG (21) Antisense: AO29L - GAA CCT ACT GAG AGA TTC AAC (21)	2,0	50	45
Exon 30 (292 bp)	Sense: AO30R - AAT AGT CTT ATG CTA GTA GGC (21) Antisense: AO30L - ACA GTG CTT ATG ACT AAC AAG (21)	3,0	52	45

Tabulka č. 10: Údaje k amplifikaci *TGFBR2* genu

Oblast genu (velikost)	Primery (velikost)	Koncentrace MgCl ₂ (mM)	Annealing teplota (°C)	Počet cyklů
Exon 1 (178 bp)	Sense: T2-1S: TCG GTC TAT GAC GAG CAG (18) Antisense: T2-1A: GGG ACC CCA GGA AGA CCC (18)	2,0	61	45
Exon 2 (365 bp)	Sense: T2-2S: GGG CTG GTA TCA AGT TCA TTT G (22) Antisense: T2-2A: GGA GAC AGA GAT ACA CTG ACT GTG (24)	3,0	64	45
Exon 3 (241 bp)	Sense: T2-3S: TGC AAT GAA TCT CTT CAC TC (20) Antisense: T3-3A: CCC ACA CCC TTA AGA GAA GA (20)	2,0	58	45
Exon 4a (444 bp)	Sense: T2-4S1: CCA ACT CCT TCT CTC CTT GTT TTG (24) Antisense: T2-4A1: TCC AAG AGG CAT ACT CCT CAT AGG (24)	1,5	62	34
Exon 4b (540 bp)	Sense: T2-4S2: GTC GCT TTG CTG AGG TCT ATA AGG (24) Antisense: T2-4A2: CCA GGC TCA AGG TAA AGG GGA TCT AGC A (28)	2,0	60	34
Exon 5 (261 bp)	Sense: T2-5S: GGC AGC TGG AAT TAA ATG ATG GGC (24) Antisense: T2-5A: TGC TCG AAG CAA CAC ATG (18)	3,0	58	45
Exon 6 (243 bp)	Sense: T2-6S: TTT CCT TTG GGC TGC ACA TG (20) Antisense: T2-6A: CCT AAG AGG CAA CTT GGT TGA ATC (24)	3,0	56	45
Exon 7 (252 bp)	Sense: T2-7S: CCA ACT CAT GGT GTC CCT TTG (21) Antisense: T2-7A: TCT TTG GAC ATG CCC AGC CTG (21)	1,5	61	45

4.3.3 Sekvence a High Resolution Melting analýza

Jako pilotní část výzkumu byly amplifikovány a následně sekvenovány exony 26 a 27 *FBNI* genu (včetně přilehlých intronových sekvencí) za použití přístroje *ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)*. Pro sekvenační analýzu byl

použit 1 μ l vzorku DNA o minimální koncentraci 20ng/ μ l. Výsledné nukleotidové sekvence jednotlivých AAD vzorků byly poté porovnávány v programu Genomic BLAST-HUMAN se sekvencemi vzorků z NAAD souboru, s referenční sekvencí AC_022467 dostupnou v roce 2008 a se sekvencí *FBNI* genu NG_008805.2 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Pro primární mutační screening dalších exonů *FBNI* genu (4, 24, 25, 28, 29 a 30) a *TGFBR2* genu (exony 1-7) byla zvolena High Resolution Melting (HRM) analýza (vysokorozlišovací analýza křivek tání). HRM analýza provedena byla na přístroji *LightCycler*[®] 480 (*Roche, Švýcarsko*). Vstupní množství genomické DNA odpovídalo 10 ng na 20 μ l reakčního objemu u všech vzorků a primery (uvedené v tabulkách č. 9 a 10) byly naředěny na koncentraci 0,2 μ M. Koncentrace MgCl₂ se shodovala s koncentracemi optimalizovanými během PCR. Do reakce byla použita *FastStart Taq DNA polymeráza* a fluorescenční barva *LightCycler*[®] 480 *High Resolution Melting Dye* (obojí dodávané výrobcem *Roche, Švýcarsko*). Prvním krokem pro všechny reakce byla iniciální inkubace 10 minut při 95 °C. Následovala amplifikace cílové DNA, kdy annealingová teplota a počet cyklů byly experimentálně stanoveny pro každý pár primerů zvlášť. Dalším krokem byla vlastní HRM – 1 cyklus zahrnující 1 minutu při 95 °C, 1 minutu při 40 °C a 1 sekundu při 65 °C. Na závěr postupné zchlazení a inkubace 10 minut při 40 °C. Hodnocení výsledné křivky tání jednotlivých aplikonů bylo provedeno za použití *LightCycler*[®] 480 Gene Scanning Software.

4.3.4 Statistické zpracování dat

Normální rozdělení spojitých veličin (věku, hladiny cholesterolu apod.) bylo testováno Shapirovým-Wilkovým testem a analyzováno prostřednictvím kvantil-kvantilového (Q-Q) grafu. Homogenita rozptylů daných veličin u skupin pacientů a kontrol byla ověřena Leveneovým testem. Vzhledem k nízkým četnostem ve skupinách, časté heteroskedasticitě a nenormalitě dat jsme použili Kruskalův-Wallisův test k ověření, zda proměnné ve skupinách pocházejí ze stejného rozdělení. Mannův-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí *p*-hodnoty jsme použili k identifikování významných rozdílů mezi veličinami při párových porovnávání skupin. Závislost mezi spojitými proměnnými byla vyhodnocována Spearmanovým korelačním koeficientem (r_s). Shoda rozdělení kategorizovaných veličin

(pohlaví, rodinná anamnéza apod.) u případů a kontrol byla prověřována chí-kvadrát testem (pokud byly všechny očekávané četnosti ≥ 5), anebo Fisherovým exaktním testem (pokud alespoň jedna očekávaná četnost byla < 5). Statistická analýza byla provedena pomocí programů R (verze 2.15.2) (R Development Core Team, 2010).

4.4 Metody u souboru s infarktem myokardu

4.4.1 Izolace celkové RNA z plné krve smíchané s RNAlater[®]

Pro izolaci celkové RNA ze vzorků plné krve smíchané s *RNAlater*[®] (Ambion, Inc., USA) byl použit *RiboPure*[™]-Blood Kit (Ambion, Inc., USA). Po odběru a po smíchání krve s *RNAlater*[®] byly vzorky hluboce zmrazeny při -70 °C, aby nedocházelo k degradaci. Izolace RNA probíhala dle instrukcí výrobce a lze ji rozdělit do dvou částí. V úvodní části došlo k lýze buněčných membrán pomocí roztoku na bázi guanidium thiokyanátu a iniciální extrakce RNA fenol-chloroformem. V druhé části docházelo k finálnímu přečištění RNA promytím a k odstranění kontaminující DNA. Izolovaná RNA byla rozpuštěna v elučním pufu, který byl součástí kitu.

4.4.2 Odstranění globinové frakce RNA

Po izolaci celkové RNA byla změřena koncentrace RNA na přístroji *Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific Scientific Inc., USA) (1 μ l), případně byl ponechán alikvot pro analýzu na přístroji *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, USA). První výsledky z čipů ukázaly, že se preferenčně amplifikuje globinová RNA a intenzita signálu u ostatních genů je tudíž nedostatečná. Z tohoto důvodu byly vzorky RNA přečištěny pomocí *GLOBINclear*[™] Whole Blood Kitu (Ambion Inc., USA). Vstupní množství celkové RNA bylo 1-10 μ g (v max. 14 μ l izolátu) a koncentrace celkové RNA musela být ≥ 70 ng/ μ l. Metoda spočívá v precipitaci RNA, hybridizaci globinové mRNA, v následném odstranění globinové frakce a přečištění GLOBINclear RNA.

Kritickým parametrem pro úspěšnost následných analýz se stal poměr absorbancí 260 nm/230 nm. Pro čipovou analýzu musel být vyšší než 1,5. Pro zajištění dostatečné

kvality byla prováděna finální etanolová precipitace. Poté byla peleta obsahující čistou RNA rozpuštěna minimálně ve 14 μ l vody bez nukleáz.

Koncentrace přečištěné a přesrážené RNA byla změřena na *Nanodropu ND 1000 Spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific Inc., USA*) (1 μ l), a kvalita RNA byla stanovena pomocí *Bioanalyzeru 2100* (*Agilent Technologies, USA*) (1 μ l) – pomocí souprav *Agilent RNA 6000 Nano/Pico Kit* (*Agilent Technologies, USA*).

4.4.3 Čipová analýza

Princip čipové technologie je založen na hybridizaci značených nukleových kyselin, získaných z analyzovaného vzorku, se sondami na povrchu čipu, které reprezentují zkoumané geny. Pro naše analýzy byly použity expresní čipy, které dokáží zhodnotit hladinu exprese u určitého genu. Míra exprese genů byla porovnávána mezi zkoumanými vzorky od pacientů v časně fázi po IM a proti kontrolnímu souboru. Síla signálu je úměrná množství navázaného transkriptu daného genu ve vzorku. Tedy čím je ve vzorku více transkriptu, tím se ho více naváže na sondy a zvýší se signál. Díky tomu můžeme zjistit, zda dochází při určité nemoci k „up“ či „down“ regulaci exprese daného genu. Ve studii byly použity expresní čipy firmy *Illumina Inc. (USA)*, které jsou určeny pro přímou hybridizaci a patří do kategorie lidských celogenomových čipů. Každý čip obsahuje 48 804 prób pro 25 440 genů (próby pocházejí z The National Center for Biotechnology Information Reference Sequence - NCBI). Na jednom čipu se nachází pozice pro šest samostatných vzorků, při našich analýzách bylo dbáno na to, aby na jednom čipu byly zastoupeny vždy trojice (kontrola, případ a následný nábor po 6 měsících) či dvojice (kontrola a případ) souvisejících vzorků.

Výchozím materiálem pro expresní čipovou analýzu byl vzorek celkové RNA (11 μ l, 150 ng), který byl pomocí reverzních transkriptáz a značených nukleotidů přepsán do jednořetězcové a následně komplementární DNA. Získaná cDNA byla přečištěna a použita pro *in vitro* transkripci (syntézu cRNA). Amplifikovaná cRNA byla přečištěna (došlo k odstranění enzymů, solí a neinkorporovaných nukleotidů) a byla změřena její koncentrace na *Nanodropu* (1 μ l). Pokud byla nižší než 150 ng/ μ l či byl nízký poměr absorbancí 260/230, tak musely být vzorky precipitovány. Finálně byly sráženy všechny amplifikované cRNA vzorky, aby bylo se všemi vzorky nakládáno stejně. Vzorky

amplifikované cRNA byly naneseny na *Human WG6-v2 (3,4) Expression BeadChip* (Illumina Inc., USA) a poté došlo k hybridizaci s komplementárními DNA řetězci sond jednotlivých genů na čipu. Vzorky byly připraveny tak, aby vstupní množství cRNA do hybridizace bylo 1,5 µg. Po odmytí nenavázaných sond byl měřen fluorescenční signál, který byl snímán skenerem s vysokým rozlišením. Čipy byly ihned skenovány pomocí *Illumina® BeadArray Readeru* na skenovací faktor 1,0 a 1,5. V rámci práce byly porovnávány exprese genů, které jsou uvedeny v tabulce č. 11.

Tabulka č. 11: Seznam hodnocených genů

Symbol genu	Název genu	Referenční sekvence
<i>MMP1</i>	Homo sapiens matrix metaloproteináza 1 (intersticiální kolagenáza) (MMP-1), mRNA	NM_004530.2
<i>MMP2</i>	Homo sapiens matrix metaloproteináza 2 (gelatináza A, 72kDa gelatináza) (MMP-2), mRNA	NM_004530.2
<i>MMP3</i>	Homo sapiens matrix metaloproteináza 3 (stromelyzin 1, progelatináza) (MMP-3), mRNA	NM_002422.3
<i>MMP7</i>	Homo sapiens matrix metaloproteináza 7 (matrilysin) (MMP-7), mRNA	NM_002423.3
<i>MMP8</i>	Homo sapiens matrix metaloproteináza 8 (neutrofilní kolagenáza) (MMP-8), mRNA	NM_002424.1
<i>MMP9</i>	Homo sapiens matrix metaloproteináza 9 (gelatináza B, 92kDa gelatináza) (MMP-9), mRNA	NM_004994.2
<i>MMP13</i>	Homo sapiens matrix metaloproteináza 13 (kolagenáza 3) (MMP-13), mRNA	NM_002427.2
<i>MMP14</i>	Homo sapiens matrix metaloproteináza 14 (MMP-14), mRNA	NM_004995.2
<i>TIMP1</i>	Homo sapiens TIMP metaloproteináza inhibitor 1 (TIMP-1), mRNA	NM_003254.2
<i>TIMP2</i>	Homo sapiens TIMP metaloproteináza inhibitor 2 (TIMP-2), mRNA	NM_003255.4
<i>TIMP3</i>	Homo sapiens TIMP metaloproteináza inhibitor 3 (TIMP-3), mRNA	NM_000362.4
<i>TIMP4</i>	Homo sapiens TIMP metaloproteináza inhibitor 4 (TIMP-4), mRNA	NM_003256.2
<i>FNI</i>	Homo sapiens fibronectin 1 (FN1_a), transkripční varianta 7, mRNA	NM_054034.2

Tabulka č. 11: Seznam hodnocených genů - pokračování

Symbol genu	Název genu	Referenční sekvence
<i>FNI</i>	Homo sapiens fibronektin 1 (FN1_b), transkripční varianta 3, mRNA	NM_002026.2
<i>SPARC</i>	Homo sapiens secernovaný protein, (osteonektin) (SPARC), mRNA	NM_003118.2
<i>SPP1</i>	Homo sapiens secernovaný fosfoprotein 1 (osteopontin, kostní sialoprotein I) (SPP1), mRNA	NM_000582.2
<i>IL1A</i>	Homo sapiens interleukin 1, alfa (IL1A), mRNA	NM_000575.3
<i>IL1B</i>	Homo sapiens interleukin 1, beta (IL1B), mRNA	NM_000576.2
<i>IL7</i>	Homo sapiens interleukin 7 (IL7), mRNA	NM_000880.2
<i>IL18</i>	Homo sapiens interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor) (IL18), mRNA	NM_001562.2
<i>TNF</i>	Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2), mRNA	NM_000594.2

4.4.4 Statistické hodnocení

Výsledky jsou uváděny ve tvaru průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Významnost koncentrace MMP mezi výběry byla hodnocena dvouvýběrovým t-testem, jehož předpoklady jsou normální rozdělení obou výběrů a shoda rozptylů. Normalita rozdělení byla ověřována histogramy a Shapirovým-Wilkovým testem, homogenita rozptylů u obou skupin byla testována F-testem. Pokud nebyly tyto předpoklady splněny, aplikovali jsme logaritmickou transformaci dat a Mannův-Whitneyův test. Oba tyto postupy nám při párovém porovnávání pomohly vybrat proměnné, které nejvíce svědčí proti hypotéze o shodě skupinových průměrů. Z dalších statistických metod jsme pro vyjádření závislosti hladiny MMP na čase mezi událostí a odběrem v minutách použili model lineární regrese, hodnoty genových expresí potom byly porovnávány pomocí mnohorozměrné analýzy rozptylu. Statistická analýza byla provedena pomocí programů R (verze 2.15.2) a Statistica (verze 10).

5 Výsledky

5.1 Výsledky u souborů pacientů s vadou aortální chlopně

5.1.1 Hodnocení serologických hladin MMP-2 a MMP-9

Serologické hladiny MMP-2 a MMP-9 byly stanoveny u 27 pacientů ze souboru AAD, u 29 pacientů ze souboru NAAD a u 30 zdravých jedinců kontrolního souboru. Jeden vzorek ze souboru AAD byl vyřazen z důvodu skladování vzorku při nedostatečných teplotních podmínkách.

Pro imunologické analýzy byly vybrány metaloproteinázy ze třídy gelatináz: MMP-2 a MMP-9. Pojivová tkáň ascendentní aorty pravděpodobně ztrácí své elastické vlastnosti v důsledku snížené koncentrace nějaké ze složek elastických vláken. Úbytek těchto vláken a doprovázející degenerativní změny v cévní stěně mohou odrážet zvýšenou produkci gelatináz. Zvýšená aktivita MMP-2 a MMP-9 v tkáni se v určité míře odráží i na koncentraci těchto enzymů v krvi, kde jsou snadno detekovatelné. Porovnávány proto byly koncentrace těchto dvou MMP v séru u pacientů s AAD a u pacientů ze souboru NAAD. Referenční hodnoty pro tyto MMP nejsou zatím stanoveny a proto jsme za referenční hodnoty považovali koncentrace naměřené u kontrolního souboru.

Mezi třemi zkoumanými soubory jsme zaznamenali významné rozdíly v naměřených hladinách MMP-2 a MMP-9 v séru (tabulka č. 12). Při párovém porovnání souboru pacientů s AAD a kontrolního souboru byly také signifikantní rozdíly v naměřených hodnotách MMP-2 ($p < 0,001$) a MMP-9 ($p < 0,001$). Rovněž při srovnání koncentrací MMP-2 a MMP-9 u souboru pacientů NAAD s kontrolním souborem byly zaznamenány významné rozdíly ($p < 0,001$ pro MMP-2 i MMP-9). Signifikantní rozdíly byly pozorovány i poté co byla věková hranice omezena na věk 35 – 65 let, a to z důvodu zajištění srovnatelnosti skupin co do věku. Domníváme se, že tyto výsledky ukazují na přítomnost degenerativního nebo zánětlivého procesu v těle u pacientů ze souboru AAD a NAAD. Primárním cílem provedených analýz bylo především porovnat hodnoty obou

metaloproteináz mezi soubory AAD a NAAD a na základě získaných výsledků stanovit, zda dochází ke zvýšení hladin MMP-2 nebo MMP-9 v séru při výskytu konkomitantní dilatace. Statistická hodnocení naměřených hodnot MMP-2 a MMP-9 u souboru AAD a u souboru NAAD nepotvrdila významné rozdíly mezi těmito dvěma skupinami. U souboru AAD byly hladiny MMP-2 v průměru mírně vyšší, hladiny MMP-9 byly téměř shodné. Výsledky imunologických analýz ukazují, že ačkoli jsou hladiny MMP-2 a MMP-9 v séru významně zvýšené u obou kardiologických diagnóz, měření koncentrací těchto MMP v séru se neprokázalo být vhodné pro posouzení vyššího rizika u pacientů s AAD.

Tabulka č. 12: Hladiny MMP-2 (ng/ml) a MMP-9 (ng/ml) v séru

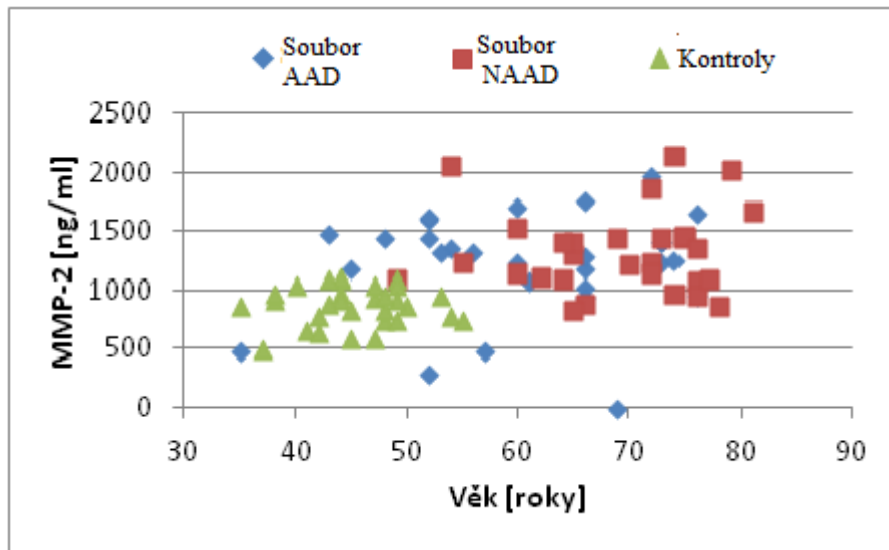
Marker	Soubor AAD			Soubor NAAD			Kontroly (zdraví jedinci)			p-hodnota
	Medián	Průměr ±SD	(n)	Medián	Průměr ±SD	(n)	Medián	Průměr ±SD	(n)	
MMP-2	1315,0	1265,2 ±391,3	(27)	1240,0	1327,8 ±352,5	(29)	902,5	872,3 ±166,2	(30)	<0,001
MMP-9	107,0	202,3 ±313,0	(27)	107,0	185,8 ±264,3	(29)	14,5	21,2 ±24,8	(30)	<0,001

AAD (ascending aortic dilatation) – dilatace ascendentní aorty, NAAD (no ascending aortic dilatation) – bez dilatace ascendentní aorty, MMP-2 (-9) – matrix metaloproteináza 2 (9)

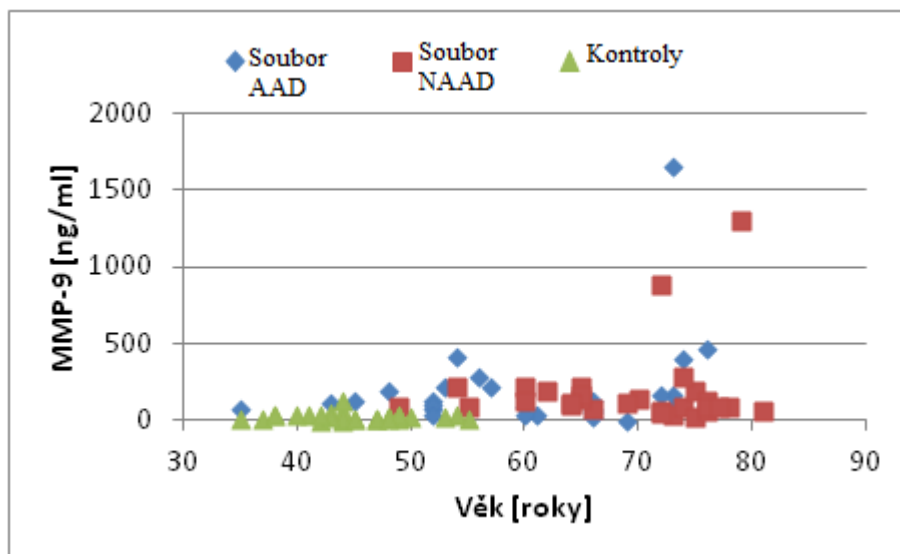
Vícerozměrnou analýzou jsme hodnotili, zda mohou koncentrace MMP v séru souviset s věkem, s pohlavím, s indexem tělesné hmotnosti BMI (body mass index), s typem vady aortální chlopně nebo s maximálním průměrem ascendentní aorty. Serologické hladiny MMP-2 se významně zvyšovaly s věkem ($r_s = 0,50$, $p < 0,001$), který byl asociován se zdravotním stavem osob (graf č. 1). Ke stejnému závěru jsme dospěli i u serologických hladin MMP-9 ($r_s = 0,54$, $p < 0,001$) (graf č. 2). Na základě statistických analýz nebyl zjištěn významný vzájemný vztah MMP-2/MMP-9 při srovnávání souborů pacientů oproti kontrolám.

Při srovnání naměřených hodnot MMP-2 a MMP-9 nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly mezi ženami a muži napříč všemi skupinami. Ty nebyly zřejmé ani při porovnání obou pohlaví v rámci jednotlivých skupin. U pacientů nebyla potvrzena ani významná závislost MMP-2 a MMP-9 na BMI, na maximálním průměru ascendentní aorty a na výskytu stenózy či insuficience. Neprokázali jsme, že stanovení koncentrací MMP-2

a MMP-9 v séru u pacientů s vadou aortální chlopně je možné využít k predikci závažnosti onemocnění.



Graf č. 1: Souvislost mezi hladinou MMP-2 a věkem



Graf č. 2: Souvislost mezi hladinou MMP-9 a věkem

5.1.2 Zhodnocení souborů na základě naměřených parametrů

Pro plánované analýzy bylo potřeba zařadit do studie adekvátní počet pacientů. Velmi limitující byl výběr pacientů s vadou aortální chlopně a se současnou dilatací ascendentní aorty (AAD), jejich počet se odvíjel od počtu provedených operací.

U studovaných souborů byly zaznamenávány a hodnoceny různé parametry, které jsou ukazateli kardiovaskulárního onemocnění a mohou mít vliv na kvalitu cévní stěny. V souvislosti s rozvojem dilatace ascendentní aorty jsme sledovali BMI, lipidový profil (celkový cholesterol, HDL, LDL, triacylglyceroly) a hladinu cukru v krvi (glykémii). U obou souborů pacientů s vadou aortální chlopně jsme zaznamenali zvýšené hladiny celkového cholesterolu, LDL a glykémie v porovnání s kontrolním souborem. Výsledky porovnávaných parametrů jsou uvedeny v tabulce č. 13.

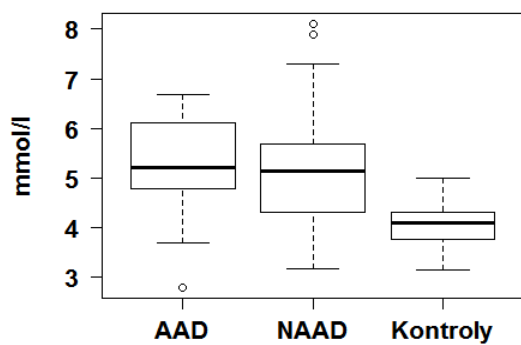
Tabulka č. 13: Výsledky statistického porovnání sledovaných parametrů

Para- metr	Soubor AAD			Soubor NAAD			Kontroly (zdraví jedinci)			p- hodnota
	Medián	Průměr ±SD	(n)	Medián	Průměr ±SD	(n)	Medián	Průměr ±SD	(n)	
BMI	26,5	26,9 ± 4,0	(26)	27,8	27,5 ± 4,6	(29)	23,2	23,3 ± 2,2	(30)	<0,001
HDL*	1,3	1,2 ± 0,4	(17)	1,4	1,4 ± 0,4	(29)	1,5	1,6 ± 0,3	(30)	0,011
LDL*	3,4	3,5 ± 0,7	(16)	2,8	2,9 ± 0,9	(25)	2,2	2,2 ± 0,4	(30)	<0,001
Chol*	5,2	5,3 ± 1,0	(26)	5,1	5,2 ± 1,3	(29)	4,1	4,0 ± 0,5	(30)	<0,001
TAG*	1,3	1,4 ± 0,8	(23)	1,4	1,7 ± 1,2	(29)	1,0	1,1 ± 0,3	(30)	0,055
Gly*	5,6	5,9 ± 1,3	(28)	5,7	6,0 ± 1,6	(29)	5,0	4,8 ± 0,6	(30)	<0,001

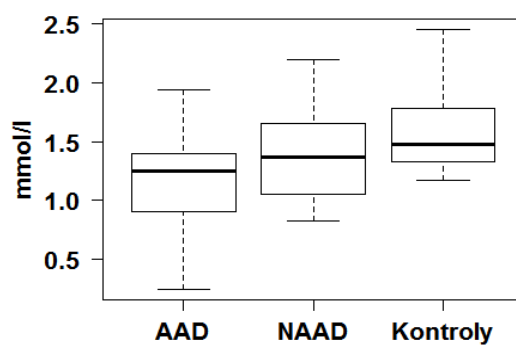
AAD (ascending aortic dilatation) – dilatace ascendentní aorty, NAAD (no ascending aortic dilatation) – bez dilatace ascendentní aorty, BMI (body mass index) – index tělesné hmotnosti, HDL – vysokodenzitní lipoprotein, LDL – nízkodenzitní lipoprotein, Chol – celkový cholesterol, TAG – triacylglyceroly, Gly – glykémie

*) hodnoty v mmol/l

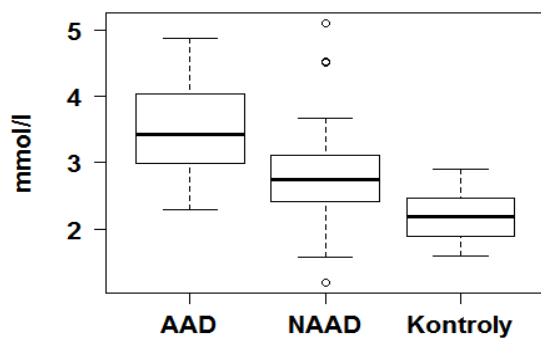
Krabicové grafy (též nazývané boxploty) znázorňují rozložení hladin lipidů a cukru u sledovaných skupin (grafy č. 3 až 7). Čára uvnitř krabičky označuje medián. Délka krabičky vymezuje dolní a horní kvartil, a v krabičce tedy leží 50 % hodnot sledované proměnné. Rozdíl mezi hodnotou horního a dolního kvartilu se nazývá kvartilové rozpětí. Hodnoty, které jsou vzdáleny od horního/dolního kvartilu více než o 1,5násobek kvartilového rozpětí, se nazývají odlehlé a jsou v grafu označeny kroužkem. Konce svislých čar, které vycházejí z krabičky, vyznačují minimum a maximum. Pokud jsou v grafu odlehlé anebo extrémní hodnoty, konce těchto čar určují rozsah hodnot (minimum-maximum) bez těchto hodnot.



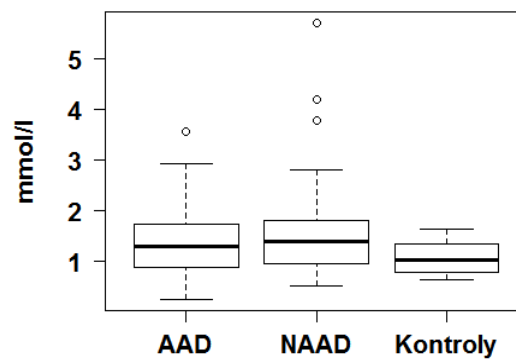
Graf č. 3: Cholesterol



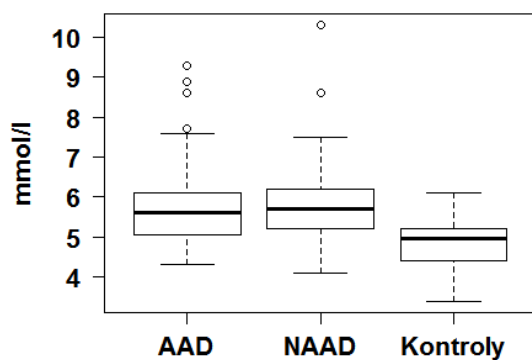
Graf č. 4: HDL-cholesterol



Graf č. 5: LDL-cholesterol

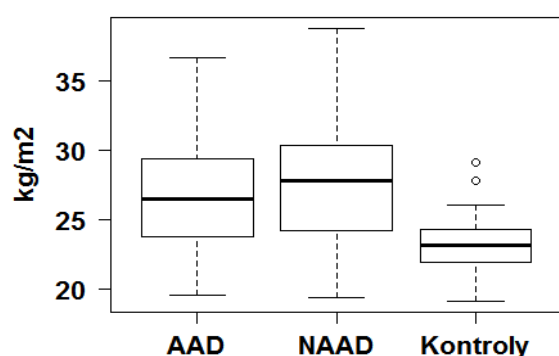


Graf č. 6: Triacylglyceroly

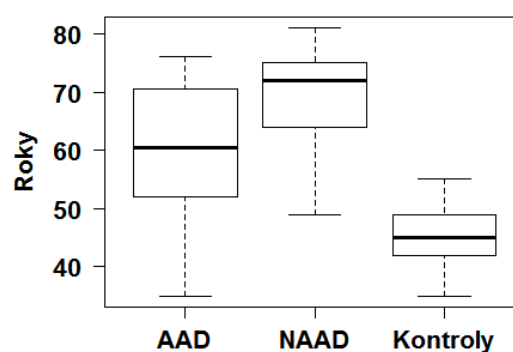


Graf č. 7: Glykémie

V souvislosti s posouzením obezity byl u pacientů hodnocen index tělesné hmotnosti BMI (tabulka č. 13, graf č. 8). BMI je nejčastěji používaným ukazatelem tělesné hmotnosti lidí s různou výškou a lze jej jednoduše spočítat jako podíl hmotnosti v kilogramech a výšky v metrech na druhou. Za optimální tělesnou váhu jsou považovány hodnoty BMI v rozmezí 18,5 – 24,9. Průměrná hodnota BMI u souboru AAD odpovídala $26,9 \pm 4,0$ (\pm SD) a u souboru NAAD byl průměr indexu $27,8 \pm 4,6$ (\pm SD). U obou skupin pacientů s kardiovaskulárním onemocněním (vada aortální chlopně) jsou to hodnoty odpovídající nadváze. Graf č. 9 znázorňuje věkové rozložení zkoumaných souborů.



Graf č. 8: BMI



Graf č. 9: Věk při odběru vzorku

Pokud zohledníme všechny porovnávané rizikové faktory, můžeme potvrdit, že u pacientů ze souboru AAD a NAAD jsou tyto parametry, svědčící o klinicky vyšším riziku vzniku kardiovaskulárních chorob, přítomné. Kvalita cévní stěny u zkoumaných pacientů by mohla být těmito faktory ovlivněna. Mezi skupinami pacientů AAD a NAAD nebyly zjištěny významné rozdíly.

5.1.3 Molekulárně genetický screening *FBNI* genu

Genomická DNA byla izolovaná celkem od 28 pacientů operovaných pro vadu aortální chlopně se současnou dilatací ascendentní aorty (AAD) a od 29 pacientů operovaných pro vadu aortální chlopně bez konkomitující dilatace (NAAD). Spektrofotometricky naměřené hodnoty u vzorků izolované DNA se při poměru absorbancí A260/A280 pohybovaly v rozmezí 1,71 – 1,88.

Předběžný screening byl zaměřen na exony 26 a 27 *FBNI* genu, u kterých byla zaznamenána nejčastější souvislost s patologiemi aorty u různých onemocnění. Vybrané kódující sekvence byly amplifikovány za použití primerů pro každý z testovaných exonů včetně přilehlých intronových oblastí. Sekvence exonů 26 a 27 probíhala ve směrech 3' → 5' a 5' → 3'. Výsledné nukleotidové sekvence od souboru AAD byly porovnávány se sekvencemi od skupiny NAAD a s referenční DNA sekvencí *FBNI* genu dostupnou na serveru NCBI (v roce 2008: AC_022467 a poté: NG_008805.2).

V exonech 26 a 27 souboru AAD nebyla zaznamenána žádná odchylka v porovnání se sekvencemi souboru NAAD. V intronu 27 byla detekována inserce cytozinu *IVS37682_37683insC* u 27 pacientů ze souboru AAD. U pacientů souboru NAAD tato inserce nebyla nalezena. Je důležité zmínit, že se jedná o předběžný výsledek. Další analýzy, které jsou nezbytné pro potvrzení mutace, nebylo možné v rámci tohoto projektu uskutečnit. Tento výsledek nelze interpretovat jako mutaci, dokud nebude potvrzen další nezávislou analýzou. Žádoucí by byla například sekvenace celého intronu 27. Teprve poté bude možné odpovědět na otázku, zda se u většiny pacientů z našeho úzce specifikovaného souboru AAD vyskytuje inserce cytozinu. Navržení postupu pro ověření mutace je součástí diskuze.

Pro screening dalších exonů *FBNI* genu (4, 24, 25, 26, 28, 29 a 30) byla zvolena HRM analýza, která byla provedena u 57 DNA vzorků (28 ze souboru AAD a 29 ze souboru NAAD). U žádného z analyzovaných vzorků nebyla zaznamenána významně odlišná výsledná HRM křivka a software tak nevyhodnotil žádnou podezřelou sekvenci. Nepotvrdili jsme souvislost těchto exonů s dilatací ascendentní aorty u pacientů s vadou aortální chlopně.

5.1.4 Molekulárně genetický screening *TGFBR2* genu

Screening všech exonů *TGFBR2* genu (1 – 7) byl prováděn u 57 DNA vzorků (28 ze souboru AAD a 29 ze souboru NAAD) prostřednictvím HRM. U žádného z analyzovaných vzorků nebyla zaznamenána významně odlišná výsledná HRM křivka a software tak nevyhodnotil žádnou podezřelou sekvenci. Můžeme se domnívat, že nezměněná genetická informace u *TGFBR2* genu dává za vznik plnohodnotnému transmembránovému TGFβ receptoru. TGFβ receptor druhého typu se podílí na TGFβ signalizaci v cévní tkáni. Náš předpoklad, že pokud by tato signalizační dráha porušena tak by to mohlo vést k rozvoji dilatace, se nepotvrdil. Možnou souvislost mutace v *TGFBR2* genu s dilatací ascendentní aorty u souboru AAD tak můžeme vyloučit.

Kompletní anonymizovaná data, získaná z analýz u souboru pacientů s vadou aortální chlopně, v práci nelze zveřejnit, jelikož v jejich kontextu by byla možná identifikace pacienta. Anonymizovaná data jsou jako výstup jednoho z řešených projektů společného pracoviště Evropského centra pro medicínskou informatiku, statistiku a epidemiologii uchována na paměťovém médiu na Univerzitě Karlově v Praze a jsou dostupná s laskavým svolením ředitelky EuroMISE centra prof. RNDr. Jany Zvárové, DrSc (zvarova@euromise.cz).

5.2 Výsledky u souboru pacientů s infarktem myokardu

5.2.1 Hodnocení serologických hladin MMP-2 a MMP-9 u pacientů s IM

Serologické hladiny MMP-2 a MMP-9 byly stanoveny u 34 pacientů s akutním infarktem myokardu (IM). 21 vzorků bylo odebráno do 6 hodin od prvního projevu příhody (IMO6) a 13 vzorků po 6 hodinách od příhody, nejpozději však do 24 hodin (IMO24). Analyzováno bylo také 30 vzorků odebraných v rámci kontroly po 6 měsících (IMK6). Výsledné hladiny byly porovnávány se 34 vzorky kontrolního souboru (CTRL).

V prvních analýzách byly porovnávány naměřené koncentrace MMP-2 a MMP-9 ve vzorcích odebraných po diagnostice IM a po šesti měsících od prvního odběru s koncentracemi zjištěnými ve vzorcích kontrolního souboru (tabulka č. 14). Koncentrace obou metaloproteináz byly u pacientů s infarktem myokardu významně vyšší než u kontrolní skupiny, a to jak při iniciální hospitalizaci ($p < 0,001$), tak po šesti měsících ($p < 0,001$). Rozdíl mezi hladinou metaloproteinázy za hospitalizace a po šesti měsících byl signifikantní pouze u MMP-9, hladina MMP-2 poklesla za toto období jen nevýznamně (z $299,47 \pm 117,61$ ng/ml na $263,20 \pm 167,08$ ng/ml). Koncentrace MMP-9 po 6 měsících byla významně snižená oproti hladinám naměřeným při hospitalizaci (z $93,56 \pm 53,74$ ng/ml na $49,87 \pm 27,77$ ng/ml) (tabulka č. 14).

Tabulka č. 14: Hladiny MMP-2 (ng/ml) a MMP-9 (ng/ml) v séru naměřené v prvních 24 hodinách po IM a po 6 měsících

Marker	IM		IMK6		CTRL		<i>p</i> -hodnota		
	Průměr ±SD	(n)	Průměr ±SD	(n)	Průměr ±SD	(n)	IM vs. IMK6	IM vs. CTRL	IMK6 vs. CTRL
MMP-2	299,47 ±117,61	(34)	263,20 ±167,08	(30)	70,50 ±39,58	(34)	0,317084	< 0,001	< 0,001
MMP-9	93,56 ±53,74	(34)	49,87 ±27,77	(30)	29,91 ±20,45	(34)	0,001507	< 0,001	< 0,001

IM – pacienti hospitalizovaní s infarktem myokardu, IMK6 – pacienti s IM při 6měsíční kontrole, CTRL – kontrolní soubor

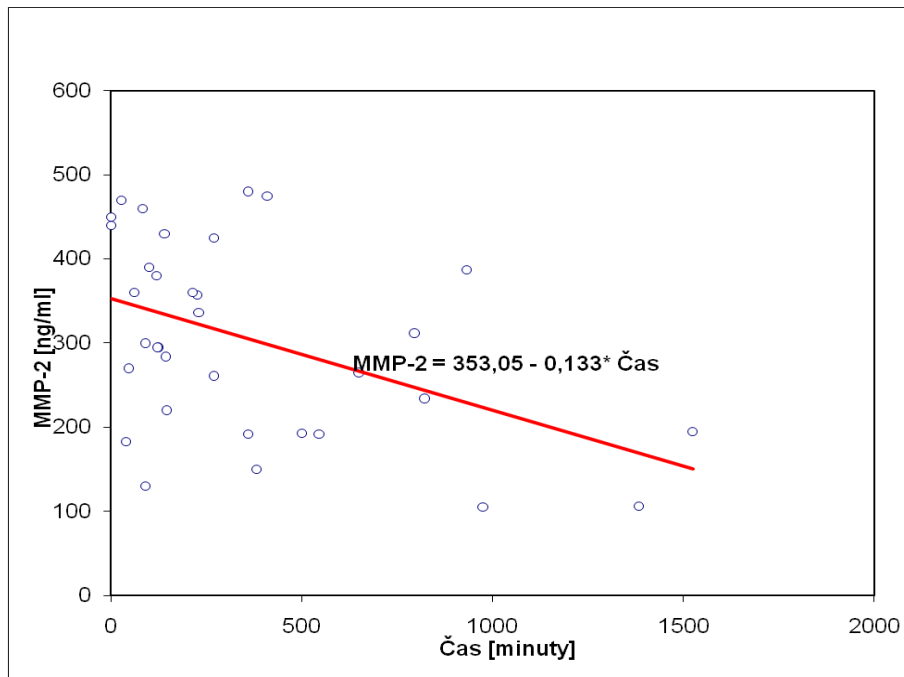
Čtyři pacienti, kteří byli zařazeni do studie, se nedožili kontroly po 6 měsících (IMD6). V tabulce č. 15 jsou uvedeny koncentrace MMP-2 a MMP-9 naměřené u těchto pacientů při hospitalizaci. Průměrné koncentrace jak MMP-2 tak MMP-9 jsou u pacientů s fatální prognózou (IMD6) v porovnání s pacienty, kteří přežívají déle, výrazně vyšší.

Tabulka č. 15: Porovnání hladin MMP-2 (ng/ml) a MMP-9 (ng/ml) v séru u pacientů, kteří se dožili vs. nedožili kontroly po 6 měsících – měřeno při přijetí s IM

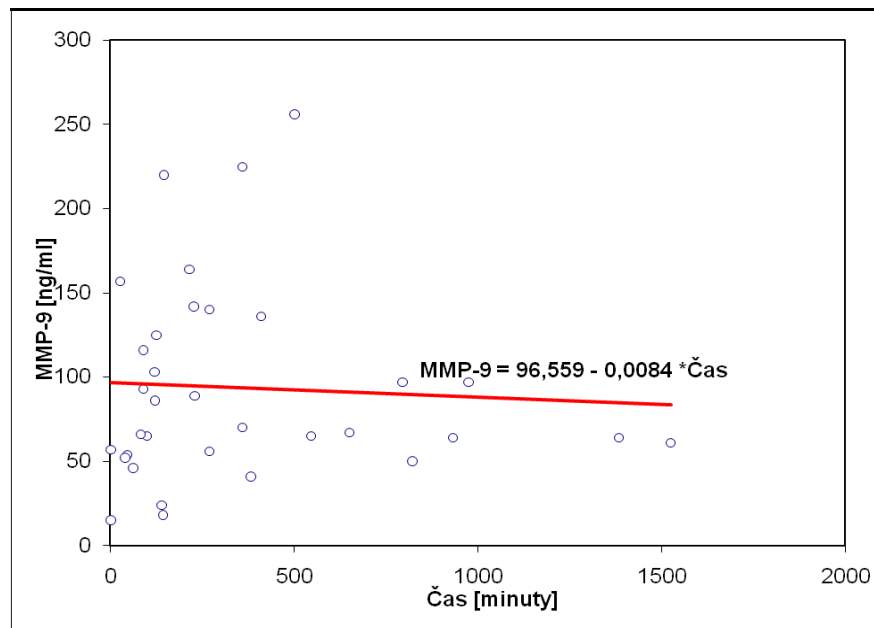
Marker	IMK6		IMD6		p-hodnota	CTRL	
	Průměr ±SD	(n)	Průměr ±SD	(n)		Průměr ±SD	(n)
MMP-2	281,40 ±117,61	(30)	435,00 ±55,83	(4)	0,00296	70,50 ±39,58	(34)
MMP-9	83,87 ± 53,74	(30)	166,25 ±41,07	(4)	0,01826	29,91 ±20,45	(34)

IMK6 – pacienti, kteří se dožili 6měsíční kontroly po infarktu myokardu, IMD6 – pacienti, kteří zemřeli do 6 měsíců od infarktu myokardu, CTRL – kontrolní soubor

Krevní vzorek byl pacientům s IM odebírán co možná nejdříve po události. K odběrům vzorků docházelo v různých časových intervalech od zaznamenání prvních příznaků IM, vždy do 24 hodin. Hodnocena byla závislost koncentrace MMP-2 a MMP-9 na čase odběru (graf č. 10). Byla formulována hypotéza, že hladina MMP se mění s rostoucí dobou mezi odběrem a událostí. K jejímu ověření byl použit model lineární regrese, který vyjádřil závislost hladiny MMP na čase mezi událostí a odběrem v minutách. Pro MMP-2 je výsledkem rovnice ve tvaru $MMP-2 = 353,053 - 0,133 \cdot \text{odběr}$, přičemž oba koeficienty jsou na hladině pěti procent významné. Pro MMP-9 vyšel model ve tvaru $MMP-9 = 96,553 - 0,008 \cdot \text{odběr}$, regresní koeficient u odběru ovšem není statisticky významně odlišný od nuly (graf č. 11).



Graf č. 10: Závislost hladiny MMP-2 na čase odběru vzorku



Graf č. 11: Závislost hladiny MMP-9 na čase odběru vzorku

Z regresních modelů tedy můžeme učinit závěr, že v prvních 24 hodinách hladina MMP-2 více kolísá a klesá s časem, kdežto hladina MMP-9 se jeví jako přibližně stabilní.

Na základě předchozích výsledků byla skupina IM rozdělena do dvou podskupin podle času odběru – IMO6 a IMO24. Pro srovnání hladin MMP v obou skupinách byl zvolen dvouvýběrový t-test. Jeho předpoklady jsou normální rozdělení obou výběrů a shoda rozptylů. Normální rozdělení bylo ověřováno histogramy a Shapirovým-Wilkovým testem, homogenita rozptylů u obou skupin byla testována F-testem. Tyto předpoklady byly splněny a na základě t-testu byly získány výsledky uvedené v tabulce č. 16. Skupiny s odběrem do 6 hodin a nad 6 hodin se významně liší v hladině MMP-2, ale nikoli v hladině MMP-9, což souhlasí s výsledky z předchozí části.

Tabulka č. 16: Hladiny vybraných MMP (ng/ml) u vzorků odebraných do 6 hodin po IM (IMO6) vs. odběry po 6 hodinách, maximálně do 24 hodin (IMO24)

Marker	IMO6 (průměr ± SD)	IMO24 (průměr ± SD)	p-hodnota	
			t-test	F-test
MMP-2	337,9048 ± 94,05153	252,7692 ± 126,2545	0,031527	0,235761
MMP-9	89,9048 ± 53,59655	99,4615 ± 67,4409	0,650277	0,351172

IMO6 – odběr vzorku do 6 hodin od příhody, IMO24 – odběr vzorku do 24 hodin od příhody, MMP – matrix metaloproteináza

5.2.2 Zhodnocení souboru na základě naměřených parametrů

Pro každého pacienta byly vedeny záznamy o signifikantních klinických údajích, které zahrnovaly: výšku, váhu, BMI, obvod pasu, systolický tlak krve (STK), diastolický tlak krve (DTK), glykémii, lipidový profil (celkový cholesterol, HDL, LDL, TAG, apolipoprotein A, apolipoprotein B), kreatinin a kyselinu močovou. V tabulce č. 17 jsou shrnuty a statisticky porovnány výsledky těchto parametrů, které byly naměřeny u pacientů při přijetí s IM (IM) a u kontrolního souboru (CTRL). Pro porovnání skupin IM a CTRL byl použit dvouvýběrový t-test.

Tabulka č. 17: Výsledky sledovaných parametrů a jejich statistické porovnání u pacientů s IM při přijetí vs. u kontrolního souboru

Parametr	IM (max. n=30)		CTRL (max. n=34)		t-statistika	p-hodnota
	(n)	Průměr ± SD	(n)	Průměr ± SD		
Výška (cm)	(28)	166,50 ± 11,47	(33)	164,21 ± 10,43	0,8091	0,4219
Váha (kg)	(27)	84,26 ± 18,54	(33)	79,47 ± 13,44	1,1223	0,2675
BMI	(27)	30,04 ± 5,15	(33)	29,55 ± 4,75	0,3788	0,7063
Pas (cm)	(20)	95,80 ± 11,41	(30)	99,47 ± 9,60	-1,1842	0,2441
STK (mmHg)	(29)	135,31 ± 24,42	(34)	137,94 ± 10,65	-0,5381	0,5937
DTK (mmHg)	(29)	79,21 ± 12,57	(34)	82,43 ± 5,95	-1,2637	0,2139
Gly*	(30)	6,69 ± 2,12	(34)	6,84 ± 2,31	-0,2697	0,7883
Chol*	(28)	5,35 ± 1,31	(34)	5,23 ± 1,48	0,3339	0,7396
LDL*	(28)	3,39 ± 1,05	(34)	3,29 ± 1,21	0,3365	0,7377
HDL*	(28)	1,28 ± 0,32	(34)	1,44 ± 0,44	-1,6126	0,1121
TAG*	(28)	1,54 ± 0,97	(34)	1,32 ± 0,56	1,0616	0,2946
Apo A (g/l)	(9)	1,30 ± 0,34	(31)	1,40 ± 0,29	-0,7902	0,4452
Apo B (g/l)	(9)	1,04 ± 0,33	(31)	0,94 ± 0,27	0,8367	0,4200
Kreatinin (μmol/l)	(30)	81,67 ± 15,51	(34)	80,68 ± 14,48	0,2629	0,7935
K. močová (μmol/l)	(28)	330,46 ± 93,26	(34)	299,26 ± 99,08	1,2744	0,2075

IM – pacienti hospitalizovaní s infarktem myokardu, CTRL – kontrolní soubor, BMI – index tělesné hmotnosti, STK – systolický tlak krve, DTK – diastolický tlak krve, Chol – celkový cholesterol, LDL – nízkodenzitní lipoprotein, HDL – vysokodenzitní lipoprotein, TAG – triacylglyceroly,

Apo A – apolipoprotein A, Apo B – apolipoprotein B, Gly – glykémie

*) hodnoty v mmol/l

V tabulce č. 18 jsou shrnuty a statisticky porovnány výsledky výše zmíněných parametrů u pacientů při přijetí s IM (IM) a při jejich kontrole po 6 měsících (IMK6). Jelikož jsou data v každém páru spolu korelovaná (jde o dvě měření na té samé osobě), byl

použit pro porovnání párový t-test. Z porovnání byly vyřazeny dvojice dat, kde chyběl údaj pro IM nebo IMK6, proto se mohou lišit průměry zde uvedené od průměrů v tabulce 17. Sloupec df udává počet stupňů volnosti, což zde znamená počet pozorování minus 1, tj. např. u výšky je 28 párových pozorování, u obvodu pasu pouze 16.

Tabulka č. 18: Porovnání výsledků sledovaných parametrů u pacientů s IM při přijetí a při jejich kontrole po 6 měsících

Parametr	IM (max. n=30) (průměr ± SD)	IMK6 (max. n=30) (průměr ± SD)	t-statistika	df	p-hodnota
Výška (cm)	166,50 ± 11,47	166,57 ± 11,20	-0,1325	27	0,8956
Váha (kg)	85,54 ± 17,65	84,37 ± 17,42	1,5001	25	0,1461
BMI	30,30 ± 5,07	29,83 ± 4,58	1,2972	25	0,2064
Pas (cm)	96,19 ± 10,77	98,31 ± 12,25	-1,0739	15	0,2998
STK (mmHg)	135,31 ± 24,42	126,29 ± 16,58	1,5888	28	0,1233
DTK (mmHg)	79,21 ± 12,57	76,55 ± 10,21	1,1302	28	0,268
Gly*	6,6 ± 2,10	6,66 ± 2,01	-0,1617	28	0,8727
Chol*	5,38 ± 1,32	4,25 ± 0,75	5,1913	26	0,0000203
LDL*	3,37 ± 1,07	2,59 ± 0,68	4,3609	25	0,0001953
HDL*	1,29 ± 0,32	1,29 ± 0,37	-0,1431	26	0,8873
TAG*	1,54 ± 0,99	1,47 ± 1,04	0,4307	26	0,6703
Apo A (g/l)	1,25 ± 0,35	1,48 ± 0,11	-2,0872	6	0,08191
Apo B (g/l)	1,11 ± 0,34	0,91 ± 0,12	1,8394	6	0,1155
Kreatinin (μmol/l)	81,82 ± 16,01	85,39 ± 15,92	-0,9896	27	0,3312
K. močová (μmol/l)	331,57 ± 85,31	369,35 ± 95,60	-1,7776	22	0,08929

IM – pacienti hospitalizovaní s infarktem myokardu, IMK6 – pacienti s IM po 6měsíční kontrole, BMI – index tělesné hmotnosti, STK – systolický tlak krve, DTK – diastolický tlak krve, Chol – celkový cholesterol, LDL – nízkodenzitní lipoprotein, HDL – vysokodenzitní lipoprotein, TAG – triacylglyceroly, Apo A – apolipoprotein A, Apo B – apolipoprotein B, Gly – glykémie

*) hodnoty v mmol/l

U pacientů při kontrole po 6 měsících byly zaznamenány významné rozdíly v lipidovém profilu. Hodnoty celkového cholesterolu a LDL byly při kontrole po 6 měsících signifikantně sniženy oproti hodnotám naměřeným při přijetí. Mezi skupinami IM vs. CTRL a IMK6 vs. CTRL nebyly potvrzeny v lipidovém profilu významné rozdíly. U dalších biochemických ukazatelů nebyly zjištěny při kontrole po 6 měsících od události statisticky významné rozdíly, významně se nelišily ani při porovnání s kontrolním souborem. Průměrná hodnota BMI u souboru IM odpovídá $30,30 \pm 5,07$ a při kontrole po 6 měsících se výrazně nezměnila ($29,83 \pm 4,58$). Průměrná hodnota BMI u kontrolního souboru je srovnatelná ($29,55 \pm 4,75$). U všech hodnocených skupin jsou to hodnoty odpovídající nadváze.

V průběhu studie se jako zajímavé pro srovnání profilovaly skupiny pacientů, kteří se dožili versus nedožili kontroly po 6 měsících. Porovnání relevantních klinických údajů u těchto skupin pacientů je uvedeno v tabulce č. 19. Mezi srovnávanými skupinami nebyl nalezen průkazný rozdíl ve sledovaných parametrech. Odlišné hodnoty jsou patrné u hodnot pro obvod pasu (vyšší hodnoty u pacientů ze souboru IMD6 oproti souboru IMK6), kde je *p*-hodnota mírně nad 5procentní hranicí.

Ve studii byli hodnoceni pacienti, kteří byli přijati do 24 hodin od zaznamenání prvních příznaků IM. Vzhledem k tomu, že hodnocení serologických markerů a genové exprese byla porovnávána také na základě času odběru vzorku, analyzovali jsme fyzikální a biochemické údaje u takto definovaných skupin pacientů (IMO6 a IMO24) (tabulka č. 20). Mezi porovnávanými skupinami nebyl nalezen průkazný rozdíl ve sledovaných parametrech. Odlišné hodnoty jsou patrné u hodnot celkového cholesterolu a LDL (vyšší hodnoty u pacientů ze souboru IMO6 oproti souboru IMO24), kde je *p*-hodnota kousek nad 5procentní hranicí významnosti.

Tabulka č. 19: Výsledky porovnání sledovaných klinických údajů u pacientů, kteří se dožili vs. nedožili kontroly po 6 měsících – hodnoty měřeny při přijetí

Parametr	IMK6 (max. n=30)		IMD6 (max. n=4)		t-statistika	p-hodnota
	(n)	Průměr ± SD	(n)	Průměr ± SD		
Výška (cm)	(28)	166,50 ± 11,47	(3)	163,33 ± 10,41	0,4957	0,6596
Váha (kg)	(27)	84,26 ± 18,54	(2)	81,00 ± 16,97	0,2603	0,8325
BMI	(27)	30,04 ± 5,15	(2)	29,55 ± 1,17	0,3868	0,7134
Pas (cm)	(20)	95,80 ± 11,41	(2)	103,00 ± 2,83	-2,2205	0,06769
STK (mmHg)	(29)	135,31 ± 24,42	(4)	139,00 ± 9,87	-0,5506	0,5946
DTK (mmHg)	(29)	79,21 ± 12,57	(4)	84,38 ± 16,36	-0,6076	0,5806
Gly*	(30)	6,69 ± 2,12	(2)	10,45 ± 6,43	-0,8241	0,5596
Chol*	(28)	5,35 ± 1,31	(1)	4,70 ± 0,00	NA	NA
LDL*	(28)	3,39 ± 1,05	(1)	2,59 ± 0,00	NA	NA
HDL*	(28)	1,28 ± 0,32	(1)	1,91 ± 0,00	NA	NA
TAG*	(28)	1,54 ± 0,97	(1)	0,80 ± 0,00	NA	NA
ApoA (g/l)	(9)	1,30 ± 0,34	(1)	1,09 ± 0,00	NA	NA
Apo B (g/l)	(9)	1,04 ± 0,33	(1)	0,69 ± 0,00	NA	NA
Kreatinin (μmol/l)	(30)	81,67 ± 15,51	(3)	184,33 ± 178,55	-0,9956	0,4242
K.močová (μmol/l)	(28)	330,46 ± 93,26	(3)	339,33 ± 141,61	-0,106	0,9245

IMK6 – pacienti, kteří se dožili 6měsíční kontroly po infarktu myokardu, IMD6 – pacienti, kteří zemřeli na kardiovaskulární příčinu do 6 měsíců od infarktu myokardu, BMI – index tělesné hmotnosti, STK – systolický tlak krve, DTK – diastolický tlak krve, Chol – celkový cholesterol, LDL – nízkodenzitní lipoprotein, HDL – vysokodenzitní lipoprotein, TAG – triacylglyceroly, Apo A – apolipoprotein A, Apo B – apolipoprotein B, Gly – glykémie, NA - nehodnoceno

*) hodnoty v mmol/l

Tabulka č. 20: Výsledky klinických údajů u skupin pacientů rozdělených dle času odběru krevního vzorku při přijetí

Parametr	IMO6 (max. n=21)		IMO24 (max. n=13)		t-statistika	p-hodnota
	(n)	Průměr ± SD	(n)	Průměr ± SD		
Výška (cm)	(19)	165,79 ± 11,88	(12)	166,83 ± 10,64	-0,2542	0,8014
Váha (kg)	(18)	86,06 ± 18,21	(11)	80,73 ± 18,48	0,7575	0,4572
BMI	(18)	30,88 ± 5,06	(11)	28,58 ± 4,68	1,2451	0,2258
Pas (cm)	(11)	95,00 ± 11,41	(11)	97,91 ± 11,09	-0,6065	0,551
STK (mmHg)	(20)	136,70 ± 27,53	(13)	134,31 ± 14,72	0,3239	0,7483
DTK (mmHg)	(20)	81,58 ± 14,83	(13)	77,15 ± 9,09	1,0616	0,2966
Gly*	(19)	6,47 ± 2,00	(13)	7,58 ± 3,11	-1,1406	0,2684
Chol*	(17)	5,67 ± 1,35	(12)	4,83 ± 1,07	1,8794	0,0712
LDL*	(17)	3,65 ± 1,05	(12)	2,96 ± 0,94	1,8685	0,07327
HDL*	(17)	1,29 ± 0,25	(12)	1,32 ± 0,44	-0,2329	0,8188
TAG*	(17)	1,64 ± 1,14	(12)	1,33 ± 0,63	0,9456	0,3532
ApoA (g/l)	(8)	1,30 ± 0,37	(2)	1,21 ± 0,16	0,5629	0,6023
Apo B (g/l)	(8)	1,04 ± 0,35	(2)	0,85 ± 0,23	0,9464	0,4285
Kreatinin (μmol/l)	(20)	83,05 ± 15,70	(13)	103,23 ± 87,36	-0,8243	0,4252
K. močová (μmol/l)	(18)	332,17 ± 91,46	(13)	330,15 ± 105,24	0,0555	0,9562

IMO6 – odběr vzorku do 6 hodin od příhody, IMO24 – odběr vzorku do 24 hodin od příhody, BMI – index tělesné hmotnosti, STK – systolický tlak krve, DTK – diastolický tlak krve, Chol – celkový cholesterol, LDL – nízkodenzitní lipoprotein, HDL – vysokodenzitní lipoprotein, TAG – triacylglyceroly, Apo A – apolipoprotein A, Apo B – apolipoprotein B, Gly – glykémie

*) hodnoty v mmol/l

5.2.3 Hodnocení genové exprese biomarkerů v periferní krvi

Izolace pro jednotlivé vzorky byly často opakovány, aby bylo dosaženo co nejlepší kvality vstupního materiálu pro následnou čipovou analýzu. Všechny analyzované vzorky RNA splnily tato rozhodující kritéria:

- Poměr absorbancí 260nm/280nm > 1,8 (měřeno na Nanodropu).
- RNA Integrity Number (RIN) > 7,0 (měřeno na Bioanalyzeru 2100, Agilent Technologies)
- Poměr ribozomálních podjednotek 28S/18S > 0,7 (měřeno na Bioanalyzeru 2100, Agilent Technologies)

V rámci expresní analýzy byla hodnocena exprese vybraných genů u souboru 34 pacientů s infarktem myokardu ve dvou časových bodech. A to v období 0 – 6 hodin a 6 – 24 hodin od vzniku a bezprostředního rozvoje infarktu myokardu.

Hodnocen byl expresní profil genů:

- pro vybrané metaloproteinázy: *MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP7*, *MMP8*, *MMP9*, *MMP13* a *MMP14*
- pro tkáňové inhibitory TIMP: *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3*, *TIMP4*
- pro vybrané proteiny: *FNI* (Homo sapiens fibronectin 1), *SPARC* (osteonectin), *SPP1* (osteopontin)
- pro vybrané cytokiny: *IL1A* (interleukin-1-alfa), *IL1B* (interleukin-1-beta), *IL7* (interleukin-7), *IL18* (interleukin-18) a *TNF* (tumor necrosis factor)

Samotnému vyhodnocení dat předcházelo několik kroků předzpracování. Prvním z nich byla kontrola kvality, která byla provedena klasickou explorativní analýzou. Šum signálu na pozadí čipu, u kterého se předpokládá normální rozdělení, byl odstraněn pomocí konvolučního modelu. Tento model předpokládá, že signál z čipů čtený pomocí skeneru je směsí normálně rozděleného šumu a exponenciálně rozděleného signálu intenzit genové exprese (Ritchie *et al.*, 2007). Dalším krokem byla nespecifická filtrace, která byla určena k vyloučení neinformativních sond, tedy takových, které měly malou intenzitu a malou změnu v expresi. Nakonec byla provedena transformace, která usnadňuje vizuální prošetření dat. Existuje několik transformací, které mohou značně zredukovat nesouměrnosti, pro výhodnou interpretaci dat byla použita \log_2 transformace.

Data byla normalizována pomocí kvantilové normalizace (Smyth a Speed, 2003). Kvantilová normalizace je založena na pořadí pozorování, takže neexistují žádné předpoklady na rozložení dat. Nejprve byla normalizace provedena na podskupině invariantních genů, a pak byly lineární interpolací odhadovány zbývající intenzity spotů. Dalším krokem byla nespecifická filtrace, která je určena k eliminaci neinformativních sond, tedy takových, které mají nízkou intenzitu a malou změnu v expresi. Data genové exprese byla analyzována pomocí lineárních modelů pro analýzu dat z *microarray* experimentů „limma“ (Smyth *et al.*, 2004), navržených pro statistický systém R v rámci projektu Bioconductor.

Za diferenciálně exprimované jsme považovali geny, které splnily jak podmínku statistické významnosti na hladině 5 %, tak též klinické významnosti, která předpokládá hodnotu fold-change (FC) alespoň 2 v absolutní hodnotě. FC je poměr naměřených hodnot experimentálních vzorků ku hodnotám kontrolních vzorků.

Expresní intenzity sledovaných 21 genů, souvisejících s MMP, byly porovnávány u souboru pacientů s IM s kontrolním souborem. Z vybrané skupiny genů vykazovala většina genů velmi nízkou intenzitu a malou změnu v expresi a proto musely být z dalšího porovnání vyloučeny. V tabulce č. 21 jsou uvedeny 2 geny, jejichž intenzita signálu umožňovala statistické porovnání. Expresní intenzity u těchto dvou genů se statisticky ani klinicky významně nelišily.

Tabulka č. 21: Výsledky analýzy genové exprese u souboru IM vs. CTRL

Symbol genu	Průměrná exprese	BH adjust. <i>p</i> -hodnota (<i>q</i> -hodnota)	Log-FC	Pravděpodobnost diferenciální exprese
<i>MMP8</i>	5,89	-0,523	0,5374	0,1125
<i>SPP1</i>	5,86	0,313	0,7132	0,0405

Průměrná exprese – průměrná hodnota intenzit genové exprese ve spojeném souboru

BH adjust. *p*-hodnota – Benjamini-Hochbergova adjustace dosažené hladiny významnosti pro mnohonásobná porovnání

Log-FC – dvojkový logaritmus podílu intenzit ve skupinách IM a CTRL

Pravděpodobnost diferenciální exprese - pravděpodobnost, že sledovaný gen je skutečně diferenciálně exprimován

Hodnoty genových expresí byly porovnávány také pro dvě skupiny s rozdílnou dobou odběru (IMO6 a IMO24) (tabulka č. 22). Porovnání dvou mnohorozměrných průměrů pomocí mnohorozměrné analýzy rozptylu nevyloučilo jejich shodnost. Pokusili jsme se přesto identifikovat geny, jejichž exprese by se mohla v obou skupinách nejvíce lišit. Protože data genových expresí nebyla normálně rozdělena, bylo nutné provést logaritmickou transformaci. Pro porovnání byl použit dvouvýběrový t-test, jenž předpokládá, že máme dva výběry z normálního rozdělení se stejným rozptylem a rozdílnou střední hodnotou. Shodnost rozptylů byla testována F-testem, normalita byla ověřována pomocí histogramů a Shapiro-Wilkova testu. Nulová hypotéza hovoří o rovnosti středních hodnot v obou výběrech, zamítáme ji, pokud je p -hodnota pod 5 procenty.

Porovnání průměrných expresí vybraných genů mezi skupinami IMO6 a IMO24 ukazují statisticky výrazně odlišné hodnoty u genu *IL18*. K rozdílu mezi skupinami IMO6 a IMO24 dále přispívají i geny *TIMP2* a *MMP9*. V tabulce č. 22 jsou seřazeny výsledky pro jednotlivé genové exprese podle p -hodnoty. Výsledky ukazují, že zatímco obě porovnávané skupiny mají výrazně odlišné hladiny obou metaloproteináz, v jejich genových expresích není znatelný rozdíl.

Tabulka č. 22: Porovnání hodnot genových expresí mezi skupinami s odběrem do 6 hodin (IMO6) a nad 6 hodin (IMO24)

Název genu	Průměrná exprese		t-statistika	p-hodnota	
	IMO6	IMO24		t-test	F-test
<i>IL18</i>	8,9809	8,6855	2,13849	0,040211	0,176260
<i>TIMP2</i>	6,9906	6,6312	1,46181	0,153545	0,255567
<i>MMP9</i>	7,9300	7,5665	1,42951	0,162547	0,043735
<i>IL1B</i>	7,0595	7,2268	-1,20761	0,236048	0,652115
<i>MMP8</i>	4,3112	4,1692	1,18138	0,246158	0,543866
<i>MMP3</i>	3,8596	3,9243	-0,90679	0,371298	0,735486
<i>TNF</i>	5,3203	5,4542	-0,87669	0,387189	0,974696
<i>SPARC</i>	4,7804	4,6837	0,52378	0,604037	0,399902
<i>TIMP4</i>	4,0030	4,0498	-0,51661	0,608983	0,509484
<i>FNI_b</i>	3,8371	3,8788	-0,46001	0,648623	0,930166

Tabulka č. 22: Porovnání hodnot genových expresí mezi skupinami s odběrem do 6 hodin (IMO6) a nad 6 hodin (IMO24) - pokračování

Název genu	Průměrná exprese		t-statistika	p-hodnota	
	IMO6	IMO24		t-test	F-test
<i>MMP1</i>	3,8599	3,8965	-0,44516	0,659201	0,677802
<i>MMP13</i>	3,9379	3,9073	0,36431	0,718023	0,941179
<i>MPP2</i>	3,9232	3,8956	0,35891	0,722018	1,000000
<i>TIMP3</i>	4,2220	4,2518	-0,35566	0,724427	0,488524
<i>MMP7</i>	3,8189	3,7985	0,23165	0,818284	0,989766
<i>MMP14</i>	3,8736	3,8895	-0,21184	0,833572	0,899659
<i>SPP1</i>	4,3892	4,4231	-0,19764	0,844577	1,000000
<i>TIMP1</i>	7,9989	8,0168	-0,13953	0,889905	0,821356
<i>FNI_a</i>	3,7836	3,7910	-0,09558	0,924447	1,000000
<i>IL7</i>	4,0045	4,0134	-0,09410	0,925619	0,821175
<i>IL1A</i>	3,9323	3,9376	-0,06422	0,949198	0,517686

IMO6 – odběr vzorku do 6 hodin od příhody, IMO24 – odběr vzorku do 24 hodin od příhody

Kompletní anonymizovaná data, získaná z analýz u souboru pacientů s infarktem myokardu, v práci nelze zveřejnit, jelikož v jejich kontextu by byla možná identifikace pacienta. Anonymizovaná data jsou jako výstup jednoho z řešených projektů společného pracoviště Evropského centra pro medicínskou informatiku, statistiku a epidemiologii uchována na paměťovém médiu na Univerzitě Karlově v Praze a jsou dostupná s laskavým svolením ředitelky EuroMISE centra prof. RNDr. Jany Zvárové, DrSc (zvarova@euromise.cz).

6 Diskuze

V předkládané práci byly hodnoceny dvě skupiny pacientů s odlišnou kardiologickou diagnózou. Vzhledem k podobnosti problematiky imunologických a biochemických ukazatelů diskutuji výsledky získané z proteomických analýz u vybraných kardiovaskulárních chorob společně.

6.1 Imunologické a biochemické analýzy

6.1.1 Imunologické ukazatele

Významnou roli v patofyziologii kardiovaskulárních onemocnění hrají matrix metaloproteinázy, především MMP-2 a MMP-9. Rovnováha mezi MMP a jejich tkáňovými inhibitory kontroluje a řídí metabolismus v extracelulární matrix. Některé z těchto enzymů je možné detekovat a měřit v krevním séru. V této souvislosti se nabízí velmi lákavá otázka, zda by bylo možné monitorovat změny v tkáních prostřednictvím jednoduchých laboratorních testů z krve.

Předpokládali jsme, že pokud se kromě patologie aortální chlopně vyskytuje také postižení ascendentní aorty, bude v tkáních probíhat více degradačních pochodů, což bude spojeno s nárůstem koncentrací metaloproteináz. Zvýšení koncentrace MMP-2 nebo MMP-9 u pacientů s AAD by mohlo být indikátorem většího postižení v souvislosti s aortálním onemocněním. Velice přínosné by bylo, pokud by bylo možné identifikovat jedince s konkomitantní dilatací na základě testování vybraných biomarkerů z periferní krve.

Zatímco výzkumu ohledně MMP a jejich souvislostí s různými patologiemi ascendentní aorty nebo s poruchami aortální chlopně se věnovalo v posledních letech několik studijních týmů, údajů o serologických hladinách metaloproteináz u pacientů s dilatací ascendentní aorty dosud není mnoho. Podíl MMP a jejich inhibitorů TIMP byl prokázán u aneurysmat hrudní aorty a rozdílné hodnoty MMP byly zaznamenány u pacientů s trikuspidální (TAV) a bikuspidální (BAV) aortální chlopní (Fedak *et al.*, 2003;

LeMaire *et al.*, 2005; Ikonomidis *et al.*, 2006; Ikonomidis *et al.*, 2007). Ikonomidis *et al.* (2013) se pokusili nalézt kombinaci MMP a TIMP, která by umožnila rozeznat etiologii vedoucí ke vzniku aneurysmat ascendentní aorty na základě posouzení hladin těchto potenciálních biomarkerů z krve. Výsledky analýz, provedených ze vzorků tkáně ascendentní aorty a z krevní plazmy, ukázaly odlišné profily plazmatických koncentrací MMP a TIMP u pacientů s bikuspidální a s trikuspidální aortální chlopní (Ikonomidis *et al.*, 2013). V naší studii jsme porovnávali, zda je možné u pacientů s poruchou aortální chlopně popsat odlišné koncentrace MMP-2 a MMP-9 pro skupinu s dilatací ascendentní aorty a bez této přidružené dilatace. Výsledky imunologických analýz ukázaly, že naměřené hodnoty MMP-2 a MMP-9 se při porovnání těchto dvou skupin navzájem statisticky významně neliší. K podobným výsledkům dospěli také autoři v recentní studii provedené u pacientů s bikuspidální aortální chlopní: plazmatické hladiny MMP-2 a MMP-9 u pacientů s a bez přidružené dilatace aorty nebyly signifikantně odlišné (Kilickesmez *et al.*, 2012; Abaci *et al.*, 2013). Zdá se, že patologie ascendentní aorty, ať už u našich pacientů nebo u pacientů z výše zmíněných studií, kde pacienti měli vrozenou vadu aortální chlopně, není detekovatelná prostřednictvím měření MMP ze séra.

Hladiny MMP-2 i MMP-9 v séru byly u obou skupin pacientů s vadou aortální chlopně (ať již byla doprovázena dilatací aorty či ne) významně zvýšené oproti kontrolnímu souboru. Domníváme se, že naměřené hladiny těchto dvou MMP odrážejí míru degradačních a remodelačních procesů v extracelulární matrix aortální chlopně. V tkáni pravděpodobně dochází k rozpadu kolagenních vláken a k fragmentaci a následnému odlišnému rozvrstvení elastických vláken, tkáň přestává plnit své funkce a dochází ke změně jejích kontraktilních a mechanických vlastností. Následná porovnání serologických hodnot MMP-2 a MMP-9 u pacientů s aortální stenózou a s aortální insuficiencí nevykazovala statisticky významné rozdíly. To je ve shodě s histologickým a biochemickým pozorováním, které provedli u aortálních chlopní Fondard *et al.* (2005). Přestože aortální stenóza a insuficience vykazují odlišný vzorec histologických změn, sdílely dle autorů obě poruchy některé společné ECM charakteristiky (Fondard *et al.*, 2005). Zvýšené koncentrace obou gelatináz mohou také signalizovat přítomnost zánětlivého procesu v organismu, například aterosklerózy, jak je diskutováno dále. V souvislosti s tvorbou aterosklerotických aneurysmat popsal zvýšenou aktivitu MMP-9 již Segura *et al.* (1998).

Z dalších předkládaných výsledků vyplývá, že zvýšené serologické hladiny MMP-2 a MMP-9 by mohly být ovlivněny věkem. Výběr pacientů byl značně limitován úzce definovanou a méně frekventovanou diagnózou, důraz byl dbán na posouzení každého pacienta zejména po klinické stránce a věk pacientů nebyl při vstupu do studie omezen. Studovaný soubor pacientů s AAD a NAAD byl ve věku 35 až 81 let. Pravděpodobnost, že se u starších osob vyskytuje více degenerativních nebo zánětlivých procesů, které nemusí být klinicky zaznamatelné, je mnohem větší než u mladších jedinců. Naměřené serologické hladiny MMP-2 se významně zvyšovaly s věkem ($r_s = 0,50$, $p < 0,001$) v souvislosti se zdravotním stavem, iniciální diagnózou. Ke stejnému závěru jsme dospěli také u serologických hladin MMP-9 ($r_s = 0,54$, $p < 0,001$). Předpokládáme, že v postižené tkáni neustále dochází k remodelaci v reakci na hemodynamické podmínky a na stav onemocnění. S věkem související degenerativní změny, doprovázené nárůstem MMP u pacientů s postižením aortální chlopně, doposud nebyly reportovány. Abaci *et al.* (2013) uvádějí pozitivní korelaci mezi věkem a průměrem ascendentní aorty u pacientů s BAV. Fritze *et al.* (2012) také hodnotili vliv věku na elastickou tkáň lidské aorty. Ve svých analýzách sledovali mimo jiné i koncentrace MMP-2 a MMP-9 v aortální tkáni (odebrané pacientům při koronárním bypassu) u tří věkových skupin (<60 let, 60-70 let a >70 let), statisticky významnou souvislost mezi segregovanými MMP-2 a MMP-9 a věkem nenalezli. Na základě analýz ze vzorků ascendentní aorty popsali, že s narůstajícím věkem dochází k výrazné destrukci interlaminárních fibrilárních elastických struktur a k úbytku buněk hladké svaloviny v tunica media, což vede k omezení nebo ztrátě elastické a vasoaktivní funkce cévy (Fritze *et al.*, 2012). Přestože věk může mít svůj podíl na kvalitě elastických vláken, primární příčinou zvýšených hladin MMP-2 a MMP-9 u zkoumaných souborů není. To povrzuje naše analýzy u zdravých jedinců kontrolního souboru, kteří byli ve věku 35 až 55 let, a u kterých nebyla prokázána žádná významná souvislost mezi věkem a hladinou metaloproteináz v séru. Navíc, pokud jsme vyloučili ze statistické analýzy nejstarší pacienty a omezili věkovou hranici na věk 35 - 65 let, abychom zaručili alespoň částečnou srovnatelnost skupin co do věku, zůstávaly rozdíly v koncentracích mezi třemi popsanými skupinami stejně signifikantní.

V předkládané práci byla také hodnocena možná souvislost mezi naměřenými hodnotami vybraných metaloproteináz a maximálním průměrem dilatované ascendentní aorty. Žádná významná závislost hodnot MMP-2 a MMP-9 na rozsahu dilatace ani na

výskytu aortální stenózy nebo insuficience nebyla v našich analýzách potvrzena. Tyto výsledky jsou ve shodě s nálezy ze studie, kterou provedli Abaci *et al.* (2013) u pacientů s bikuspidální aortální chlopní, a ve které nebyla též zaznamenána korelace mezi průměrem ascendentní aorty a hodnotami MMP-2 a MMP-9 (Abaci *et al.*, 2013). Podobně pohlaví, BMI a biochemické markery neukázaly jakoukoli souvislost s detekovanými hladinami MMP-2 a MMP-9 v séru.

To nás vede k závěru, že na etiologii dilatace ascendentní aorty se pravděpodobně velkou mírou podílejí genetické faktory, které ovlivňují kvalitu a kvantitu elastických složek zastoupených v tkáni. Svůj podíl zde mohou mít i změněné hemodynamické poměry na poškozené aortální chlopní, které vedou k turbulentnímu toku krve. Při turbulentním proudění krev proudí v cévě ve směrech, které s dlouhou osou cévy svírají různý úhel, včetně pravého úhlu. V krevním proudu vznikají víry a to zhoršuje tokové vlastnosti krve. Průtok krve za těchto podmínek není přímo úměrný tlakovému gradientu, ale přibližně jeho druhé mocnině. Turbulentní proudění navíc může vést k mechanickému poškození stěny tepen nebo k projevu dysfunkce (ve smyslu dilatace) v případě abnormální elastické složky pojivové tkáně ascendentní aorty. Dilatace ascendentní aorty byla u našeho souboru pacientů pozorovaná jen u 10 % pacientů s poruchou aortální chlopně ať již ve smyslu stenózy či insuficience. Souvislost aortální stenózy a dilatace ascendentní aorty je klinicky známý jev. Mezi aortální insuficiencí a dilatací ascendentní aorty nebyla v odborné literatuře popsána jednoznačná souvislost. Náhrada poškozené aortální chlopně zásadně upravuje hemodynamiku na aortálním ústí a tak eliminuje spouštěcí faktor dilatace. Aortoplastika obnovením původního průměru vzestupné aorty pak snižuje riziko disekce a ruptury vzestupné aorty.

U souboru pacientů s primárním výskytem infarktu myokardu jsme prokázali výrazně zvýšené hladiny MMP-2 i MMP-9 v séru v časně fázi po IM (do 24 hodin od prvních příznaků IM) v porovnání s kontrolním souborem. Domníváme se, že k nárůstu MMP-9 v krvi dochází v souvislosti s časnou zánětlivou reakcí, kdy jsou hlavním zdrojem MMP-9 především neutrofilů. Neutrofilů jsou první buňky zánětlivé odpovědi, které se dostávají do ložiska a jejich přísun vrcholí přibližně po 24 hodinách po IM. V pozdějších fázích je MMP-9 produkována především makrofágy, lymfocyty a fibroblasty (Jonsson *et al.*, 2011). V důsledku nárůstu MMP-9 dochází k proteolýze a k degradaci strukturálních komponent

ECM, což vede k další infiltraci zánětlivých buněk do ložiska. Zvýšené hladiny MMP-9 jsou tak často doprovázeny nárůstem počtu bílých krvinek v krvi. MMP-2 může být v období 1-6 dní po IM produkována myocyty, fibroblasty, endotelovými buňkami, buňkami hladké svaloviny a zánětlivými buňkami v myokardu (Chow *et al.*, 2007; Lindsey *et al.*, 2005; Porter *et al.*, 2009; Van den Borne *et al.*, 2009), tedy především lokálně v myokardu. Důsledkem degradace tkáně pravděpodobně může docházet k vyplavení MMP-2 z intersticiálních prostor do krevního oběhu, kde jsme detekovali zvýšené hladiny této metaloproteinázy.

Je důležité zmínit, že MMP se nepodílí pouze na zánětlivých a reparačních procesech v souvislosti s IM, ale doprovázejí také aterogenezi a destabilizaci aterosklerotických plátů. Aterosklerotický plát může být hlavním zdrojem MMP-9 uvolněných do oběhu. Ve více než 95 % případů je příčinou infarktu myokardu koronární ateroskleróza s rupturou intimy a trombózou v místě plátu. Histologická vyšetření nestabilních plátů potvrzují zánětlivé změny v jejich fibrózním krytu. Především v místech, kde kryt plátu přechází v endotel, je přítomna výrazná infiltrace aktivovanými makrofágy a T-lymfocyty (Libby, 1995; Gidron *et al.*, 2002). Hlavní příčina ruptury nestabilního plátu není zcela jasná. Jedním z faktorů, který přispívá ke ztenčování fibrózního krytu plátu a k jeho destabilizaci, je působení právě metaloproteináz, které jsou uvolňovány z makrofágů. Především MMP-9 je zvýšeně exprimovaná v pokročilých aterosklerotických lézích (Brown *et al.*, 1995) a již několik studií potvrdilo, že MMP-9 může v akutní fázi IM pocházet z prasklých koronárních plátů (Chen *et al.*, 2005; Fiotti *et al.*, 2008). K destabilizaci plátu přispívá také zánětlivá reakce, oxidativní stres či stříhové napětí (Rajavashisth *et al.*, 1999). Naměřené zvýšené hladiny MMP-9 u zkoumaného souboru mohou být také odrazem aterosklerotických změn.

Výrazně zvýšené hladiny MMP-2 a MMP-9 v porovnání s kontrolním souborem odpovídají výsledkům ze studie, kterou provedli Kelly *et al.* (2007). Ve studii hodnotili hladiny MMP-2 a MMP-9 v plazmě u 91 pacientů s akutním IM a zaznamenali významně zvýšené koncentrace obou MMP v období 0-12 hodin po přijetí s IM k hospitalizaci v porovnání s kontrolním souborem (Kelly *et al.*, 2007). Podobně Kuliczowski *et al.* (2013) popsali zvýšenou aktivitu MMP-2 a MMP-9 v akutní fázi u pacientů s IM (STEMI). Dle jejich pozorování nebyla aktivita MMP-2 výrazně odlišná u kontrolního souboru, který tvořili pacienti se stabilním koronárním onemocněním, naopak u MMP-9 byla aktivita

v porovnání s kontrolním souborem zvýšená i při měření po 12 hodinách. Předpokládáme, že zvýšené hladiny obou MMP u našich pacientů v časné fázi po IM odrážejí změny spojené se vznikem a rozvojem tohoto onemocnění. Pokud by se podařilo definovat referenční serologické hladiny pro MMP-2 a MMP-9 pro zdravou populaci, mohlo by mít sledování hladin MMP u pacientů v akutní fázi po IM velký význam. Data získaná ze stanovení hladin vybraných metaloproteináz u preinfarktových stavů by mohla mít diagnostický potenciál při monitoringu osob s nespecifickými příznaky (bolest nebo tlak, pálení v oblasti hrudníku apod.).

V průběhu let 1996 až 2011 se řada autorů věnovala hledání potenciálních biomarkerů, které by predikovaly míru remodelace levé komory (LK) a srdečního selhání po infarktu myokardu. Za toto období bylo nalezeno 112 souvislostí mezi 52 různými biomarkery a nežádoucí remodelací levé komory. Pozitivní korelace mezi hladinou biomarkeru a remodelací LK byla zaznamenána v 63 % případů, negativní ve 4 % a žádná korelace ve 33 % (Fertin *et al.*, 2012).

Výsledky u pacientů, kteří zemřeli na kardiovaskulární příhodu do 6 měsíců po IM (IMD6), ukazují zvýšené průměrné hladiny jak MMP-2 tak MMP-9 v porovnání s pacienty, kteří se 6měsíční kontroly dožili. Některé dosavadní práce považují změny v hladinách gelatináz v časné fázi po IM za možný a nezávislý ukazatel vzniku a rozvoje nežádoucí remodelace LK a srdečního selhání (Matsunaga *et al.*, 2005). Remodelace LK je rozhodující pro další výkon a funkci myokardu a může být považován za nezávislý ukazatel morbidit a mortality (Frangogiannis *et al.*, 2002; Fertin *et al.*, 2012). Kandidátním biomarkerem pro predikci negativní remodelace LK se zdá být především MMP-9, souvislost jeho hladin s následnou remodelací LK po IM byla opakovaně zaznamenána v několika studiích (Squire *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2006; Webb *et al.*, 2006; Orn *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2008; Weir *et al.*, 2010; Miyazaki *et al.*, 2010). Také naše pozorování ukazují vyšší hladiny MMP-9 (měřeno při přijetí ze séra) u pacientů s nepříznivou prognózou. Souvislost s následnými změnami LK popisují také Cogni *et al.* (2013), kteří ve své studii uvádějí, že zvýšené serologické hladiny MMP-9 (inaktivní MMP-9) naměřené v období 12-72 hodin po IM mohou predikovat zachování objemů LK po 6 měsících od uzávěru koronární arterie.

V řadě studií nebyla popsána žádná korelace mezi hladinami MMP-2 a remodelací LK (Squire *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2006; Orn *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2007; Weir *et al.*,

2010). Naproti tomu naše výsledky ukazují vyšší průměrné hladiny MMP-2 u pacientů s fatální prognózou. Podobné závěry udádějí Nilsson *et al.* (2012), kteří popsali souvislost mezi hladinami MMP-2 u pacientů při přijetí se STEMI a po 12 hodinách a mezi rozsahem myokardiálního postižení a následné dysfunkce LK. V recentní studii také Cogni *et al.* (2013) popisují souvislost mezi zvýšenými hladinami aktivní formy MMP-2 v séru a negativní srdeční remodelací po IM. Pro vyhodnocení výsledků z provedených analýz byl limitující počet pacientů s fatální diagnózou, což je faktor, který nelze ovlivnit. Rozšíření souboru by mohlo přinést statisticky zajímavé výsledky.

Hladina MMP-9 v séru u pacientů za období 6 měsíců výrazně klesla, zatímco hladina MMP-2 poklesla jen nepatrně. Tan a Hua (2012) hodnotili serologické hladiny MMP-9 u pacientů s akutním STEMI a srovnávali hodnoty při přijetí s hodnotami po 3 letech. Hladiny MMP-9 v séru byly po 3 letech od příhody výrazně nižší, přesto nadále stabilně zvýšené (Tan a Hua, 2012). To znamená, že MMP-9 není spojena pouze s procesem ruptury aterosklerotického plátu vedoucí k projevu IM, ale podílí se také na remodelačních procesech v myokardu po IM. Remodelace LK je plynulý a časově náročný proces a bylo prokázáno, že se může vyvíjet několik měsíců nebo i let po IM a může vést až k srdečnímu selhání. Jak MMP-2 tak MMP-9 jsou důležité pro hojivé procesy a pro podporu revaskularizace po IM a jejich přítomnost v séru dokazují i naše měření, provedená po 6 měsících. Zvýšená koncentrace těchto MMP v tkáni a poměr jejich inhibitorů je klíčový pro myokardiální remodelaci. MMP tak mohou velkou mírou přispívat ke stabilizaci a ke kompenzatorním mechanismům pro udržení srdečního výdeje po IM. Webb *et al.* (2006) sledovali koncentrace MMP-2 a MMP-9 a jejich inhibitorů v plazmě v průběhu šesti měsíců po IM a zaznamenali snižování koncentrace MMP-2, zatímco hladiny MMP-9 se zvyšovaly. Časné zvýšení hladin MMP-9 v plazmě, spojené s navýšením počtu neutrofilů, má negativní vliv na rozsah remodelace LK po IM. Na druhou stranu zvýšené hodnoty MMP-9 v plazmě v pozdní fázi, tj. po zahájení tvorby jizvy, jsou spojené se zachováním funkce LK a mají tedy příznivé účinky (Halade *et al.*, 2013). Naopak MMP-2 je aktivována u modelu srdečního selhání, a to jak se systolickou, tak s diastolickou dysfunkcí (Nishikawa *et al.*, 2003). Aktivovaná MMP-2 může tedy být částečně zodpovědná za ztenčení komory u obou typů srdečního selhání. Domníváme se, že není možné obecně definovat vývoj serologických hladin MMP-2 a MMP-9 v období 6 měsíců po IM. Sledované markery a jejich hladiny mohou být ovlivněny typem, závažností a stádiem onemocnění, což by mělo být bráno v potaz při porovnávání výsledků z různých

studii. Pacienti mohou být premedikováni od lékaře první linie, rovněž indikovaná intervenční terapie a chronická léčba mohou mít významný vliv na vyplavování sledovaných analytů a jejich metabolitů do periferní krve.

V naší studii jsme se pokusili z naměřených koncentrací MMP-2 a MMP-9 v rozmezí 0 - 24 hodin od nástupu prvních příznaků IM stanovit závislost hladin obou MMP na čase odběru. Výsledné hodnoty ukazují, že v průběhu prvních 24 hodin po infarktu myokardu zaznamenaly primárně zvýšené hladiny MMP-2 mírný pokles. Koncentrace MMP-9 zůstávaly po tuto dobu zkoumání na přibližně stejné hladině. K podobným výsledkům dospěli také Guzel *et al.* (2013) u NSTEMI pacientů: serologické hladiny (pro- a aktivní forma) MMP-9 naměřené při přijetí a po 12 hodinách byly významně vyšší, poté po 24 a 48 hodinách od příhody vykazovaly pokles. Nilsson *et al.* (2012) popsali snižování plazmatických hladin MMP-2 (proMMP a MMP) v období 12 - 24 hodin po IM, poté docházelo opět k zvýšení hladin MMP-2. Hladiny MMP-9 dle jejich pozorování v období 0 – 48 hodin postupně klesaly (pacienti byli hospitalizováni a léčeni do 6 hodin od prvních příznaků IM) (Nilsson *et al.*, 2012). Podobně Webb *et al.* (2006) zaznamenali, že plazmatické hladiny MMP-9 dosahovaly svého maxima po 12 hodinách po IM a poté klesly do plató fáze. Mírný rozpor v době trvání časného nárůstu MMP-9 v naší práci a ve výše uvedených studiích můžeme vysvětlit odlišným stanovením časových údajů. Zatímco Guzel *et al.* (2013) a Webb *et al.* (2006) popisovali stav při přijetí jako 0 hodin, Nilsson *et al.* (2012) doplňují tento údaj ještě o informaci, že pacienti byli hospitalizováni do 6 hodin od prvních příznaků IM. Pro účely naší studie byl jako údaj 0 hodin stanoven nástup prvních příznaků IM. Ve většině případů jsou pacienti s IM dopraveni do nemocničního zařízení právě do 24 hodin po zaznamenání prvních příznaků IM. Vzhledem k tomu, že jsme zaznamenali stabilně zvýšené serologické hladiny v tomto období, domníváme se, že MMP-9 by mohla být vhodným markerem pro sledování a stanovení její hladiny v séru v časovém období 0-24 hodin po zaznamenání prvních příznaků IM.

Matrixové metaloproteinázy, stejně jako jakékoli jiné markery vyšetřované z krve, slouží pouze jako zprostředkované ukazatele degenerativního procesu, který probíhá v rámci remodelace tkáně. Množství MMP, uvolněných z intersticiálního prostoru do krve, nemusí vždy odpovídat koncentracím v místě remodelace. Přesto u řady patologií, dochází k nárůstu jejich koncentrací i v séru bez ohledu na lokalizaci dané patologie. Navíc v krvi často nenalzáme MMP v aktivní formě, ale spíše v komplexech s proteiny jako jsou

albumin a α -makroglobulin nebo TIMP. Metodika ImmunoassayTM umožňuje měřit hladiny MMP v aktivní i neaktivní formě v séru nebo v plazmě a tím udává celkové množství MMP. Na základě námi naměřených zvýšených serologických hladin MMP-2 a MMP-9 nemůžeme posuzovat míru jejich proteolytické aktivity v cévní stěně ascendentní aorty nebo v myokardu. U hladin MMP, které byly naměřeny v séru, dochází ke značnému rozptylu hodnot. Domníváme se, že k tomu zřejmě dochází v důsledku časově nepravidelného vyplavování matrixového obsahu buněk. Jejich hladina v periferní krvi je jen obrazem lokální destrukce buněk v tkáni a je tak časově oddáleným odrazem degradačních změn, ke kterým dochází v relativně malé mase tkáně. Oproti statistickému hodnocení skupin lze konstatovat, že pozitivní odlehle hodnoty mohou být potvrzením degradačních procesů, neboť u kontrolních souborů nepřekračují koncentrace určitou mezní hodnotu.

To, co může limitovat interpretaci výsledků získaných touto metodikou je specifická a senzitivita imunologických složek, použitých k detekci MMP, jelikož v séru se může objevovat více typů struktur jedné MMP. Z tohoto důvodu není lehké srovnávat mezi sebou absolutní hodnoty MMP naměřené v různých studiích a standardizovat referenční hodnoty. Hladiny MMP mohou být ovlivněné také řadou dalších faktorů. Tayebjee *et al.* (2005) ve své studii hodnotili vliv věku, pohlaví, etnického původu a životního stylu na hladiny MMP-2, MMP-9 a jejich inhibitorů. Souvislost s etnickým původem zaznamenali u hladin MMP-9. Na koncentrace MMP-2 a MMP-9 neměl vliv věk, pohlaví ani denní doba, kdy k odběru došlo. MMP mohou mít velký prognostický a diagnostický potenciál. Abychom mohli v klinickém výzkumu pokročit dále, je v souvislosti s hladinami MMP nezbytná především standardizace analytických metod a ustanovení fyziologických referenčních mezí pro různé subpopulace pacientů.

Dalším limitujícím faktorem, pravděpodobně tím nejdůležitějším, může být určení skutečného zdroje vybraných metaloproteináz. MMP jsou syntetizovány v širokém spektru tkání a tak je možné, že nemusejí odrážet pouze změny, ke kterým dochází v ascendentní aortě nebo v myokardu. Například u pacientů s diagnózou chronického zánětlivého onemocnění (např. revmatoidní artritida) nebo u nádorového onemocnění dochází také ke zvyšování hladin MMP v krvi. Z tohoto důvodu byly pro naše soubory pacientů stanoveny odpovídající kritéria pro vstup do studie. Pacienti s onemocněním, které by mohlo mít potenciální vliv na hladinu MMP, byli ze studie vyloučeni. Přesto je pravděpodobné, že

hladina MMP-9 může být u pacientů zvýšená v souvislosti s aterosklerózou, jak bylo diskutováno výše. V této souvislosti jsou zajímavé výsledky ze studií, ve kterých nebyla předem stanovena přísná vylučovací kritéria. Sundström *et al.* (2004) ve své rozsáhlé studii nelimitovali předem výběr pacientů s IM. Přesto autoři objevili určité změny v hladinách MMP, které mohou být prediktivní pro nežádoucí rozvoj remodelace myokardu a pro srdeční selhání. Je tedy pravděpodobné, že určitý soubor změřených hladin MMP a TIMP může mít více specifický a senzitivní vztah k procesu remodelace ECM u každého jedince. Velký klinický význam by přineslo sestavení komplexu hodnot serologických MMP nebo TIMP, které by byly vhodné pro identifikaci procesu remodelace i u pacientů s chronickými a zánětlivými chorobami.

Měření hladiny metaloproteináz ze séra je jednoduchou a relativně rychlou laboratorní metodou, kterou by bylo možné provádět i v nemocničních zařízeních. Představa diagnostiky různých kardiovaskulárních onemocnění na základě imunologických a biochemických ukazatelů z krve je velice lákavá. Ideální biomarker, který by byl snadno detekovatelný z krve, prokazoval by silnou souvislost s patofyziologickými procesy a usnadnil by klinické rozhodování při volbě adekvátní terapie, doposud nebyl identifikován. Domníváme se, že hladiny jedné matrixové metaloproteinázy nejsou dostatečně specifické pro daná onemocnění. Pro diagnostiku by mohly být použity v kombinaci s dalšími vyšetřovacími technikami nebo jako součást většího setu markerů. V rámci této oblasti je však nezbytný další výzkum, který by monitoroval a upřesnil klinický význam hladin MMP v krvi u různých kardiologických diagnóz.

6.1.2 Klinické a biochemické ukazatele

V souvislosti s možnou predikcí různých kardiovaskulárních onemocnění byla doposud studována řada molekul a faktorů, které je možné sledovat za použití metod s minimální zátěží pro pacienta. Zaměřili jsme se na sledování markerů, které jsou dostupné z rutinně prováděných vyšetření při příjmu s IM nebo v rámci předoperačních vyšetření před operací aortální vady.

V našich analýzách byly při porovnávání biochemických ukazatelů u souborů pacientů s vadou aortální chlopně (AAD a NAAD) a kontrol zaznamenány vyšší hladiny celkového cholesterolu, vyšší hladiny LDL a vyšší glykémie. Domníváme se, že odlišné hladiny

lipidů souvisejí s přítomností kardiovaskulárního onemocnění. Několik autorů se věnovalo posouzení souvislosti mezi patologií v aortální stěně a různými markery. Hellenthal *et al.* (2012) popsali, že s velikostí aneurysmatu břišní aorty korelují hodnoty HDL, CRP (C-reaktivní protein) a imunoglobulinu G. Pro predikci akutní aortální disekce se zdají slibné hodnoty molekul, jako jsou například již zmíněné metaloproteinázy, CRP a D-dimery (Wen *et al.*, 2011). U poruch hrudní aorty nebyla souvislost s hladinami lipidů ani biochemickými ukazateli v literatuře prokázána. Hodnocené soubory AAD a NAAD se vzájemně významně nelišily a hodnoty lipidů nekorelovaly s mírou postižení (velikostí dilatace) ascendentní aorty. Neprokázali jsme, že by porucha ascendentní části hrudní aorty ve smyslu dilatace byla spojena s výraznými změnami v lipidovém profilu pacientů.

Podobně u souboru pacientů s primárním IM neukázaly výsledky laboratorního vyšetření lipidů naměřené při přijetí významné odchylky v porovnání s kontrolním souborem. V souvislosti s hodnocením lipidového profilu u pacientů s IM zaznamenali Bueno *et al.* (2011) pozitivní korelaci mezi hladinou LDL při přijetí a pozdější remodelací levé komory. V naší studii jsme zaznamenali statisticky významně snížené hodnoty celkového cholesterolu a LDL při kontrole po 6 měsících oproti hodnotám naměřeným při přijetí, což může svědčit o úpravě životosprávy pacientů po příhodě IM. U pacientů s fatální prognózou jsme nepotvrdili statisticky významné výsledky lipidového profilu.

Při hodnocení lipidového profilu je nutné vzít v úvahu fakt, že výsledky u pacientů s kardiologickou diagnózou mohou být zhoršené v důsledku omezení, které s sebou tato diagnóza nese. Výsledky nejsou neočekávané, ale významnost výsledků je poměrně malá, a není samostatně využitelná pro diagnostickou prognózu.

V souvislosti s posouzením obezity byl u všech pacientů hodnocen index tělesné hmotnosti (BMI). Průměrná hodnota BMI u souboru AAD odpovídala $26,9 \pm 4,0$ (\pm SD) a u souboru NAAD byl průměr indexu $27,5 \pm 4,6$ (\pm SD). Zvýšené hodnoty BMI byly také zaznamenány u souboru pacientů s primárním výskytem IM, u nichž byl průměrný BMI $30,04 \pm 5,15$ (\pm SD) a u kontrolního souboru, kde byl tento index $29,55 \pm 4,75$ (\pm SD). U obou skupin pacientů s kardiovaskulárním onemocněním byly zjištěny hodnoty odpovídající nadváze až obezitě. Zajímavou studii, která hodnotila souvislost BMI a různých příčin úmrtí u téměř 1,5 miliónů jedinců prezentovali Berrington de Gonzalez *et al.* (2010). Podle autorů je riziko úmrtí na kardiovaskulární onemocnění nejvyšší v souvislosti s $BMI \geq 25,0$. Pro BMI v rozmezí 25,0 – 27,4 je riziko úmrtí (hazard ratio)

na kardiovaskulární onemocnění stanoveno na 1,25 (1,16 – 1,34) a pro hodnoty BMI 27,5 – 29,9 je to 1,52 (1,40 - 1,64). Naopak autoři rozsáhlé britské studie, do které bylo zahrnuto téměř 230 tisíc jedinců ze 17 zemí světa, uvedli, že po zohlednění konvenčních rizikových parametrů (systolický krevní tlak, anamnéza diabetu, celkový cholesterol a HDL) nepřinesly údaje o BMI a obvodech pasu žádné zpřesnění v určení kardiovaskulárního rizika jednotlivých osob (Emerging Risk Factors Collaboration *et al.*, 2011). Hodnoty BMI u pacientů s AAD byly srovnatelné s hodnotami u souboru NAAD a nemohou být tedy dávány do souvislosti se závažnější diagnózou tohoto souboru pacientů. Podobně ani hodnoty BMI u souboru pacientů s IM a u kontrolního souboru se vzájemně nelišily. Tyto výsledky svědčí o vzrůstajícím trendu nadváhy v naší populaci. Nejen u pacientů s kardiologickou diagnózou, ale také u kontrolního souboru (reprezentujícího zdravou populaci) se hodnota BMI pohybuje v rozmezí nadváhy. Nadváha u pacientů s vadou aortální chlopně je pravděpodobně důsledkem jejich životního stylu, do kterého se promítají omezení funkčnosti kardiovaskulárního systému související s touto poruchou.

Hladiny glykémie u pacientů s primárním výskytem IM byly v porovnání s kontrolním souborem srovnatelné. Některé studie se zaměřily na hledání souvislostí s hladinou glukózy při příjmu, která dle jejich výsledků pozitivně korelovala s remodelací levé komory (Bauters *et al.*, 2007; Nicolau *et al.*, 2007; Piestrzeniewicz *et al.*, 2010; Mather *et al.*, 2010; Aoki *et al.*, 2011). U pacientů s fatální prognózou (ti, kteří se nedožili kontroly po 6 měsících) jsme neprokázali zvýšené hladiny glykémie při příjmu. Pro hodnoty glykémie jsme v této skupině získali jen malý počet údajů a souvislost s rozvojem pozdějších komplikací nebylo možné stanovit.

Další výsledky klinických a biochemických parametrů byly srovnatelné mezi skupinami pacientů a kontrol a nelze z nich vyvozovat jakoukoli souvislost s výskytem nebo se závažností IM. Podobně pacienti s výskytem konkomitantní dilatace nemají statisticky významně odlišné výsledky klinických a biochemických parametrů v porovnání s pacienty bez této dilatace.

6.2 Genetické analýzy

6.2.1 Dilatace ascendentní aorty – geny *FBNI* a *TGFBR2*

Souvislost mezi geny, které mají vliv na aortální pojivovou tkáň u pacientů s vadou aortální chlopně doprovázenou dilatací ascendentní aorty, dosud nebyla v literatuře popsána. Domníváme se, že na rozvoji aortální dilatace se podílí patologické procesy v aortální tkáni doprovázené změnou mechanických vlastností této tkáně. Studium biomechanických vlastností elastických vláken a mikrofibril není jednoduché, neboť tato vlákna zahrnují mnoho složek, které jsou navzájem bohatě propojeny a nebyly doposud plně prouzkoumány. Většina studií se v souvislosti s postižením pojivového aparátu aorty věnuje genu pro fibrilin-1 (*FBNI*) a jeho nejznámější patologii - Marfanovu syndromu (MFS). MFS je dominantně dědičné onemocnění, klinicky charakterizováno především různými poruchami skeletu, okulárními a kardiovaskulárními poruchami, v menší míře doprovázené postižením plic a pokožky (Cañadas *et al.*, 2010). Nejčastější kardiovaskulární komplikací je progresivní rozšíření aortálního kořene a tvorba aneurysmat v ascendentní aortě. Klinický obraz aortální dilatace u zkoumaného souboru pacientů se nejvíce blížil fenotypovým projevům MFS.

Vliv mutací v *FBNI* genu u pacientů s kardiologickými příznaky bez manifestace MFS popsala již roku 1996 Milewicz jako autozomálně dominantní TAAD a nadále se výzkumu této choroby věnuje (Milewicz, 2012). V recentní studii provedli Wang *et al.* (2013) screening genů *FBNI*, *TGFBR1* a *TGFBR2* u pacientů s familiární TAAD a zaznamenali 19 mutací v *FBNI* genu (z toho 11 nových) a 2 mutace u *TGFBR2* genu. Z těchto a z podobných studií vyplývá souvislost mezi postižením aortální stěny a mutacemi v uvedených genech. Hodnocení *FBNI*, *TGFBR1* a *TGFBR2* genů u pacientů s dilatací ascendentní aorty doposud provedeno nebylo. Pro soubor námi zkoumaných pacientů bylo podstatné, že dilatace ascendentní aorty nebyla považována za primární onemocnění. Předpokládáme, že spouštěcím faktorem pro rozvoj dilatace ascendentní aorty je vada aortální chlopně. Z toho usuzujeme, že v aortální stěně je skrytá porucha některé ze složek elastických vláken, která se projeví až při změně hemodynamických poměrů na chlopni.

V předkládané práci jsme se primárně zaměřili na *FBNI* gen a pro předběžnou analýzu byly zvoleny nejčastěji postižené exony tohoto genu, dané do souvislosti s kardiologickým fenotypem. Vybrány byly exony 4 a 24 – 32. Oblast 24 – 32 kóduje centrální část proteinu fibrilinu-1, která je složena z velkého počtu cbEGF domén, které jsou klíčové pro správné složení proteinu. Molekulárně genetický screening v exonech 4 a 24 – 30 neprokázal žádnou mutaci. Překvapujícím výsledkem bylo zaznamenání inzerce cytozinu v přilehlé intronové sekveci za exonem 27 u 27 z 28 pacientů s AAD. U pacientů z NAAD souboru tato varianta nebyla detekována. Je důležité podotknout, že se jedná o předběžný výsledek, na který je nezbytné podívat se z kritického pohledu a to předeším proto, že neproběhla další analýza, která by tuto inzerci potvrdila. V rámci pilotního projektu nebylo možné provést další analýzy u *FBNI* genu. Jelikož inzerce cytozinu je v této práci uvedena jen jako předběžný výsledek, uvádíme zde návrh dalšího postupu. Pro potvrzení této varianty by bylo vhodné provést ještě jednu sekvenaci, tentokrát zaměřenou na oblast celého intronu 27. Dalším možným postupem by byla izolace RNA z periferní krve, přepis celkové RNA do cDNA, následná amplifikace pomocí PCR a sekvenace. To by ovšem znamenalo odebrat pacientům další vzorek krve, ze kterého by bylo možné RNA izolovat. K zajímavým výsledkům by mohly vést i analýzy ze vzorku dilatované aortální tkáně, které by mohly být dostupné pouze od nově zařazených pacientů.

Pokud by se inzerce potvrdila, mohla by mít vliv na správný sestřih, poněvadž by mohla zasahovat do oblasti sestřihu. Sestřih (splicing) je závislý na nukleotidových sekvencích lokalizovaných na rozhraní intron/exon (akceptorové místo) a exon/intron (donorové místo). Mutace v intronu může vytvořit alternativní donorové či akceptorové místo pro sestřih a tak k sobě mohou být spojeny nukleotidová vlákna v nově vzniklých místech sestřihu. Vznikala by pak abnormální zralá mRNA, která by obsahovala špatně vystřižené intronové oblasti, a docházelo by k syntéze defektního proteinu. Mutace v *FBNI* genu mohou ovlivnit různé aspekty buněčného metabolismu fibrilinu-1, ale nejpodstatnějším důsledkem je nepochybně to, že v extracelulární matrix je narušena integrita a množství fibrilinu a ostatních mikrofibril. V současné době ovšem není tato inzerce potvrzena a je nutné ověřit její přítomnost jinou alternativní metodou. Pro posouzení možné spojitosti mezi dilatací ascendentní aorty a *FBNI* genem by bylo vhodné provést mutační screening všech 65 exonů tohoto genu. Tuto oblast u našeho specifického souboru dilatovaných ascendentních aort považujeme za velmi zajímavou. Budoucí

analýzy by mohly vést k získání důležitých dat, které by pomohly objasnit etiopatogenezi tohoto onemocnění.

Při studiu genů, které kódují specifické proteiny ovlivňující procesy v extracelulární matrix cévní tkáně aorty, byly předmětem zájmu transmembránové TGF β receptory, konkrétně TGF β R2. TGF β R2 se podílí na aktivaci několika signálních drah a je součástí buněčných pochodů, jako jsou inhibice růstu, apoptóza, proliferace a syntéza ECM (Chang *et al.*, 2002). V cévní tkáni může TGF-beta signalizace regulovat tvorbu klíčových tkáňových proteinů a degradačních enzymů. Změny v TGF-beta signalizační dráze mohou mít negativní vliv na funkci a strukturu normální vaskulární tkáně (Jones *et al.*, 2009). Doposud byla prokázána souvislost mutací v *TGFBR2* genu s MFS, LDS a s familiární TAAD (Pannu *et al.*, 2005b). U všech těchto fenotypů může být závažným způsobem postižená aorta. U LDS se ve více jak 95 % případů onemocnění objevuje dilatce aorty (Loeys *et al.*, 2005). Diagnózu LDS lze stanovit na základě klinických charakteristik nebo prostřednictvím genetického testování *TGFBR2* a *TGFBR1* genu.

U souboru našich pacientů byl proveden genetický screening celého *TGFBR2* genu a u žádného pacienta nebyla nalezena jakákoliv alternativní sekvenční variace. Genetická informace pro TGF β receptor druhého typu na úrovni DNA nebyla u souborů pacientů změněna. Souvislost tohoto genu s patologií ve stěně ascendentní aorty můžeme vyloučit.

Pro posouzení možné spojitosti mezi dilatací ascendentní aorty a genetickou etiologií je nezbytné provést mutační screening genů, které se podílejí na postižení pojivové tkáně aorty. Analýzy většího počtu genů jsou časově a finančně velmi náročné. Samotný *FBNI* gen se skládá z 65 exonů. Pro naše genetické analýzy jsme vybírali geny na základě klinického posouzení fenotypu. Pro mutační analýzy a molekulární diagnostiku jsou v současné době hojně používané metody, jako jsou HRM nebo Sangerova sekvenační analýza. Nové molekulárně genetické technologie se neustále vyvíjejí, dovolují analýzu několika genů najednou a stávají se finančně a časově efektivnější. Například pro detekci mutací v genech *FBNI*, *TGFBR1* a *TGFBR2* u pacientů s MFS a LDS byla zavedena metoda „Massive parallel sequencing“, ve které se využívá multiplex PCR následovaná metodou „Next-generation sequencing“ (Baetens *et al.*, 2011). Náklady také redukuje nedávno prezentovaná strategie „Duplicate resequencing assay“ (Affymetrix) a „Long-range PCR“ protokol (Kathiravel *et al.*, 2013), která zahrnuje analýzu 8 genů

spojených s MFS a se souvisejícími poruchami (*FBNI*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *COL3A1*, *MYH11*, *ACTA2*, *SLC2A10* a *NOTCH1*). Jak pro diagnostické testování tak pro celogenomové analýzy mutací, které jsou podkladem neobjasněných chorob/poruch, je zapojováno také „Exome sequencing“ (neboli sekvenování celého genomu). Tato strategie by mohla být též aplikována u dědičných chorob pojivového aparátu, kde by pomohla identifikovat další genetické varianty. V souvislosti s celogenomovým sekvenováním je však nutno brát v potaz etické hledisko.

Budoucí analýzy u zkoumaných souborů AAD a NAAD by mohly vést k získání důležitých dat, které by pomohly objasnit etiopatogenezi dilatace ascendentní aorty. Toto se netýká pouze výzkumu genů. O elastických vláknech a o jejich funkci v extracelulární matrix pojivové tkáně je toho stále málo známo. V průběhu poslední dekády bylo objasněno mnohé ohledně organizace a funkce mikrofibril. Nicméně stále zbývá vyřešit několik otázek. Jaká je strukturální a instruktivní úloha jednotlivých proteinů elastických vláken v extracelulární matrix a jak moc přispívají k progresi onemocnění u dědičných a získaných poruch pojivového systému. Vzhledem k dosavadnímu rychlému tempu výzkumu lze očekávat, že v budoucnu budou objasněny i zásadní principy vývoje a formace mikrofibril, stejně tak jako vznik a vývoj patologií dané pojivové tkáně a jejich terapeutické možnosti.

6.2.2 Infarkt myokardu - Expresní čipová analýza

Mikročipy (Microarray) představují jednu z nejrychleji se rozvíjejících metod pro studium exprese genů. Expresní analýzy identifikují geny, které jsou v daném okamžiku nebo za daných experimentálních podmínek aktivní a podávají informace o míře jejich exprese v porovnání s kontrolními (neovlivněnými) vzorky. Tímto způsobem je možné porovnat například odpovědi buněk na stres (Wu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008) nebo studovat imunitní odpověď organismu poté, co byl vystaven určitému stimulu (Abbas *et al.*, 2005).

V předkládané práci jsme se zaměřili na hodnocení míry exprese 21 genů u 34 pacientů s IM za použití krevního vzorku periferní krve. Při akutním IM dochází k zánětlivé reakci, která s sebou nese zvýšenou infiltraci leukocytů do postižené části myokardu. Zánětlivé buňky jsou považovány za jeden z hlavních zdrojů MMP. Přisun

mononukleárních buněk do infarktem zasažené oblasti je klíčový pro zánětlivou odpověď na IM. Přesto nebyla doposud objasněna role, kterou hrají mononukleární buňky v myokardu v akutní a v pozdní fázi po IM, a to především z důvodu, že není jednoduché tyto buňky izolovat a studovat jejich lokální funkci. Jako zajímavá alternativa se jeví studium periferních mononukleárních buněk, které také mohou infiltrovat do oblasti zasažené ischemií. Proto jsme sledovali expresní profil genů, které se podílejí na aktivitě MMP, z buněk periferní krve. Hodnoty genových expresí byly porovnávány u pacientů s IM a u kontrolního souboru. U žádného z vybraných genů jsme nepotvrdili statisticky ani klinicky významně odlišnou expresi. Z vybrané skupiny genů vykazovala většina genů velmi nízkou intenzitu signálu a malou změnu v expresi a proto musely být z dalšího porovnání vyloučeny. U genů *MMP8* a *SPP1* umožňovala intenzita signálu statistické porovnání, přesto nebyly zaznamenány statisticky ani klinicky významné expresní intenzity.

Zajímalo nás porovnání výsledků MMP-2 a MMP-9, které poskytne expresní čipová analýza a které získáme z imunologických analýz. Zvýšená exprese *MMP2* genu nebyla u našich pacientů zaznamenána. Tao *et al.* (2004) studovali MMP-2 v srdeční tkáni u myši a popsali rapidní nárůst exprese MMP-2 po čtyřech dnech od příhody, maxima dosáhla sedmý den a poté se její hladina mírně snižovala. Exprese MMP-2 v tkáni zůstala nadále celkově zvýšená po 7 – 14 dní. Naše serologické analýzy ukázaly zvýšenou hladinu MMP-2 již v časné fázi po IM. V průběhu prvního týdne po IM mohou být zdrojem MMP-2 nejen fibroblasty, ale také aktivované makrofágy a monocyty. Periferní mononukleární buňky pravděpodobně nejsou zdrojem MMP-2 v časné fázi po IM. Domníváme se, že MMP-2 může být v prvních 24 hodinách po IM produkována především lokálně v myokardu a do periferního krevního oběhu se uvolňuje z intersticiálních prostor díky poškození, ke kterému dochází v místě ložiska. Naše výsledky jsou ve shodě s pozorováním, které provedli Fang *et al.* (2010), kteří použili metodu Real-time PCR, a nezaznamenali MMP-2 na úrovni mRNA a ani na proteinové úrovni v periferních mononukleárních buňkách u pacientů s IM a u kontrolního souboru.

Expresní intenzity *MMP9* genu byly natolik nízké, že nebylo možné jejich statistické porovnání. MMP-9 je exprimována ve všech hlavních mononukleárních buňkách periferní krve. Důležitým zdrojem MMP-9 jsou zánětlivé buňky, především neutrofilů. Během 1. - 4. dne po IM dochází k infiltraci velkého množství zánětlivých buněk do postižené

srdeční tkáň a to je doprovázeno markantním zvýšením aktivity MMP-9 (Ducharme *et al.*, 2000; Ramani *et al.*, 2004; Tao *et al.*, 2004; Hudson *et al.*, 2006). V časně fázi po IM secernují MMP-9 především neutrofilů, v pozdějších fázích jsou to makrofágy, lymfocyty a fibroblasty (Jonsson *et al.*, 2011). Lindsey *et al.* (2001 a 2002) sledovali expresi MMP-9 v myokardu u myši a popsali, že k nárůstu MMP-9 docházelo do 24 hodin po IM. Třetí den po IM se zvyšovala aktivita MMP-9 v oblastech ohraničujících zasaženou část myokardu a mimo ložisko. Po dosažení maxima sedmý den po IM se hladina této MMP mírně snižovala a zůstala nadále celkově zvýšená po 7 – 14 dní. V imunologických analýzách jsme prokázali v prvních 24 hodinách po IM signifikantně stabilně zvýšené koncentrace MMP-9 v séru. To je v rozporu s výsledky z microarray analýzy, ve které jsme zaznamenali nízké expresní intenzity *MMP9* genu. Ukazuje to spíše na fakt, že MMP jsou do periferní plasmy vyplavovány z extracelulárních prostor zánětu a nejsou produktem cirkulujících buněk periferního oběhu. V období jeden den po IM může být časný nárůst hladiny MMP-9 proteinu způsoben také uvolněním pre-MMP-9 z neutrofilů, kde je uložen v gelatinázových granulech (Mukherjee *et al.*, 2010).

Expresí dalších metaloproteináz, které jsme hodnotili, byla doposud studována především u zvířecích modelů. Stejně tak jako v případě hodnocených MMP ani expresní profily genů pro tkáňové inhibitory TIMP neprokázaly dostatečnou intenzitu signálu a proto nemohly být dále statisticky porovnány. TIMP se vážají na MMP, vzniklé komplexy do jisté míry aktivují či inhibují aktivitu dané MMP a ovlivňují tak degradační pochody v tkáni. Periferní krevní buňky mohou také exprimovat řadu genů, které kódují matrixové proteiny. Tyto matrixové proteiny slouží jako adhezivní molekuly nebo jako zdroje adhezivních molekul, které zprostředkovávají infiltraci zánětlivých buněk do ložiska. Fibronectin 1 je složkou buněčné bazální membrány, funguje jako adhezivní protein a díky své vazbě na integriny se také velkou měrou podílí na interakcích mezi buňkou a ECM. Orem *et al.* (2002) popsali u pacientů s akutním IM zvýšenou hladinu fibronektinu v plazmě. Intenzita signálu u genu pro fibronectin 1 (*FNI*) byla nízká a pro další statistické porovnání nevhodná stejně tak jako u genů pro osteonektin - *SPARC* a pro osteopontin - *SPPI*. Některé studie předpokládají, že tyto proteiny mohou regulovat funkci a fenotyp ostatních buněk, které se podílejí na remodelaci levé komory a na hojení (Schellings *et al.*, 2004). Rovněž exprese genů pro interleukin-1-alfa (*IL1A*), interleukin-1-beta (*IL1B*), interleukin-7 (*IL7*) a pro interleukin-18 (*IL18*) nevykazovaly významné rozdíly.

Na základě celogenomové analýzy genové exprese vzorků venózní krve byly navrženy geny a genové lokusy, které se z hlediska genové exprese jeví jako prognostické ve smyslu očekávané doby přežití pacientů s primárním výskytem akutního IM (Ústav informatiky AV ČR, v.v.i. Centrum biomedicínské informatiky, 2011). Mnoho genů, u kterých byla nalezena spojitost s IM je zapojena v obranných mechanismech organismu, v alergických reakcích nebo mají nějakou souvislost s cytokiny, konkrétně velmi často s chemokiny. Je otázkou, zda je vůbec možné identifikovat samotné geny spojené s IM. Domníváme se, že prostřednictvím microarray analýzy se daří identifikovat spíše odpověď organismu na stresovou a zánětlivou reakci doprovázející IM než samotné geny spojené s MMP.

Ve studii jsme dále porovnávali průměrnou expresi u skupin s rozdílnou dobou odběru krevního vzorku (IMO6 a IMO24) v časně fázi po IM. K rozdílu mezi oběma skupinami nejvíce přispívá gen pro interleukin-18 (*IL18*), v menší míře též gen pro TIMP-2 (*TIMP2*) a pro MMP-9 (*MMP9*). Interleukin-18 (IL-18) je prozánětlivý cytokin, který patří do interleukin1 cytokinové rodiny. Hraje významnou roli v Th1 zprostředkované imunitní odpovědi. IL-18 je produkován především makrofágy a dalšími buňkami a velkou měrou se účastní na imunitní odpovědi organismu. Periferní krevní mononukleární buňky mohou secernovat za normálních podmínek pro-IL-18, který je pak štěpen extracelulárně do biologicky aktivní formy IL-18 (Puren *et al.*, 1999). Přítomnost IL-18 mRNA byla zjištěna v mnoha orgánech, mezi které patří slezina, thymus, játra, plíce, srdce, střevo, prostata, placenta, kosterní svaly, ledviny, pankreas a mozek. Předpokládá se, že IL-18 je asociován s vývojem diabetu mellitu I. typu, s aterosklerózou, s roztroušenou sklerózou, revmatoidní artritidou, se zánětlivými poruchami gastrointestinálního traktu a s nádorovým onemocněním. Jeho zvýšenou expresi a podíl na zánětlivé odpovědi v souvislosti s aterosklerózou prokázali Mallat *et al.* (2001) a Gerdes *et al.* (2002). Koch *et al.* (2011) prokázali souvislost mezi polymorfizmy v IL18 genu a akutním IM. Je zajímavé, že zvýšená produkce IL-18 byla zjištěna také u lidí s depresemi, a předpokládá se, že rostoucí koncentrace IL-18 v krevní plazmě může odrážet zvýšenou produkci a uvolňování IL-18 v centrálním nervovém systému v důsledku stresového stavu (Kokai *et al.*, 2002). Otázkou tedy je, zda námi popisovaná výraznější exprese IL18 neukazuje spíše na stresovou odpověď organismu, která doprovází časnou fázi IM.

Vzhledem k tomu, že jsme porovnávali expresi genů ve dvou různých časových bodech, je velmi složité interpretovat biologický význam uváděných výsledků. Zaměřili

jsme se na aktivitu genů v prvních 24 hodinách po IM a to především proto, že většina pacientů se v tomto časovém horizontu dostane do nemocničního zařízení, kde jim je odebrán vzorek krve.

Identifikace genů pomocí molekulárně biologických metod zaznamenala v posledních letech výrazný posun nejen v odhalení příčin některých onemocnění, ale v neposlední řadě také významně rozšířila naše znalosti o vzniku a rozvoji akutního IM. Detailnějším pochopením jednotlivých stádií IM se dostává do popředí i otázka možnosti prevence a účinnější léčby onemocnění. Nárůst četnosti vědeckých prací zabývajících se akutním IM ukazuje nejen narůstající zájem o tuto problematiku, ale také závažnost studovaného tématu. Změny nalézané v ECM jsou určující pro myokardiální remodelaci po IM, mohou být významným faktorem pro zánětlivou odpověď a mohou přispívat ke stabilizaci a kompenzačním mechanismům pro udržení srdečního výdeje. Ovlivňují též angiogenezi, proliferaci a diferenciaci buněk. Snaha včas predikovat nastupující příznaky IM je dnes řešena klinickou diferencíální diagnostikou, funkčními testy, resp. statimovým měřením základních biochemických markerů pro akutní IM. Využitím mononukleárních buněk periferní krve jako zkoumaného materiálu se naskýtá možnost získat potřebné výsledky ze snadno a rutinně dostupného biologického materiálu. Přestože hodnocení aktivity MMP prostřednictvím čipové analýzy považujeme za nepřínosné, může toto naše zjištění v budoucnu vést k usnadnění výběru efektivní diagnostiky markerů z periferní krve.

7 Závěr

V předkládané práci byly hodnoceny z proteomického a z genetického hlediska možné vlivy, které se podílí na molekulárních pochodech v extracelulární matrix u vybraných kardiovaskulárních chorob. V průběhu studie se podařilo uskutečnit všechna plánovaná vyšetření, analýzy a následná statistická hodnocení.

Z předložených výsledků analýz u souboru pacientů s vadou aortální chlopně a souboru pacientů, u nichž vadu aortální chlopně doprovázela dilatace ascendentní aorty lze učinit následující závěry:

- 1) Pro genetické analýzy byly zvoleny geny *FBNI* a *TGFBR2*. Genetické analýzy u studovaných souborů neprokázaly souvislost *TGFBR2* genu a vybraných úseků *FBNI* genu s dilatací ascendentní aorty. V návaznosti na předběžné výsledky z *FBNI* genu by bylo vhodné pokračovat u tohoto genu v dalších analýzách.
- 2) Proteomické analýzy prokázaly zvýšené hladiny MMP-2 a MMP-9 v séru u obou hodnocených souborů oproti kontrolnímu souboru. U pacientů s dilatací ascendentní aorty (AAD) nedochází k významnému zvýšení hladin MMP-2 nebo MMP-9 v séru v porovnání s pacienty bez této dilatace (NAAD). Na základě měření serologických hladin MMP-2 a MMP-9 nelze usuzovat na vyšší riziko rozvoje dilatace ascendentní aorty u pacientů s vadou aortální chlopně.
- 3) Serologické hladiny MMP-2 a MMP-9 se významně zvyšovaly v souvislosti s věkem a s diagnózou. Souvislost naměřených hodnot MMP-2 a MMP-9 s pohlavím, průměrem ascendentní aorty a typem aortální vady u souborů AAD a NAAD nebyla prokázána.
- 4) Na základě výsledků klinických a biochemických parametrů se soubory pacientů AAD a NAAD výrazně nelišily. Oba soubory měly vyšší výskyt nadnormativních hodnot některých sledovaných parametrů. Souvislost hodnocených ukazatelů s klinickým projevem onemocnění nebyla prokázána.

Výsledky analýz u souboru pacientů s primárním infarktem myokardu můžeme shrnout do následujících bodů:

- 1) Proteomické analýzy ukázaly signifikantně zvýšené hladiny MMP-2 a MMP-9 v séru v akutní fázi po IM (do 24 hodin po IM). Při porovnání hodnot MMP-2 a MMP-9 za hospitalizace a po šesti měsících jsme zaznamenali signifikantní pokles hladin MMP-9, zatímco hladiny MMP-2 poklesly jen nevýznamně.
- 2) U souboru pacientů s IM s fatální prognózou (nedožili se kontroly po 6 měsících) ani u pacientů, kteří se 6měsíční kontroly dožili, nebyl nalezen průkazný rozdíl ve sledovaných klinických a biochemických parametrech. Koncentrace MMP-2 a MMP-9 byly u souboru s fatální prognózou v porovnání s pacienty, kteří přežívají déle, zvýšené.
- 3) Hladina MMP-9 v prvních 24 hodinách po zaznamenání prvních příznaků infarktu je stabilně zvýšená, narozdíl od hladiny MMP-2, která v průběhu těchto 24 hodin kolísá.
- 4) Ze vzorků periferní krve smíchané s RNeasy[®] je možné připravit dostatečné množství RNA v potřebné kvalitě pro čipovou analýzu. U žádného ze sledovaných genů, které mají vztah k matrixovým metaloproteinázám, nebyla zaznamenána statisticky a klinicky významná exprese v časně fázi po IM oproti kontrolnímu souboru. Nízká intenzita signálu neumožnila statisticky porovnat expresi u většiny sledovaných genů. Zjištěná kolísající exprese *IL18* ve velmi časně fázi akutní příhody se zdá být spíše důsledkem stresového stavu v počáteční fázi IM.
- 5) Na základě výsledků z expresní čipové analýzy se zvolená metoda nejeví jako vhodná pro detekci aktivity matrixových metaloproteináz a dalších faktorů z periferní krve. Použitý multičip neobsahuje takové kvalitativní složení spotů, které by při zvolené metodice umožňovalo získání validních hodnot pro kvantifikaci aktivity metaloproteináz a dalších vybraných faktorů z periferní krve. Oproti serologickému testování je navíc tato metoda zdlouhavá a závislá na vysoce pokročilém a finančně nákladném vybavení.

8 Seznam použité literatury

ABACI, O., KOCAS, C., KILICKESMEZ, K.O., UNER, S. a KUCUKOGLU, S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in patients with dilated ascending aorta and bicuspid aortic valve. *Echocardiography*. 2013. 30(2), 121-126.

ABBAS, A.R., BALDWIN, D., M.A, Y., OUYANG, W., GURNEY, A., MARTIN, F., FONG, S., VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M., GODOWSKI, P., WILLIAMS, P.M., CHAN, A.C. a CLARK, H.F. Immune response in silico (IRIS): immune-specific genes identified from a compendium of microarray expression data. *Genes Immun*. 2005. 6, 319-331.

ALEXANDER, M.R. a OWENS, G.K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol*. 2012. 74, 13-40.

AOKI, S., NAKAGOMI, A., ASAI, K., TAKANO, H., YASUTAKE, H., SEINO, Y. a MIZUNO K. Elevated peripheral blood mononuclear cell count is an independent predictor of left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *J Cardiol*. 2011. 57, 202-207.

ARTEAGA-SOLIS, E., GAYRAUD, B., LEE, S.Y., SHUM, L., SAKAI, L.Y. a RAMIREZ, F. Regulation of limb patterning by extracellular microfibrils. *J. Cell Biol*. 2001. 154, 275-281.

ASCHERMANN, M. *Kardiologie* 1. díl. 1. vydání. Praha. Galén. 2004.

BAETENS, M., VAN LAER, L., DE LEERNEER, K., HELLEMANS, J., DE SCHRIJVER, J., VAN DE VOORDE, H., RENARD, M., DIETZ, H., LARCO, R.V., MENTEN, B., VAN CRIEKINGE, W., DE BACKER, J., DE PAEPE, A., LOEYS, B. a COUCKE, P.J. Applying massive parallel sequencing to molecular diagnosis of Marfan and Loeys-Dietz syndromes. *Hum Mutat*. 2011. 32(9), 1053-1062.

BAUM, J. a DUFFY, H.S. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011. 57, 376-379.

BAUTERS, C., ENNEZAT, P.V., TRICOT, O., LAUWERIER, B., LALLEMANT, R., SAADOUNI, H., QUANDALLE, P., JABOURECK, O., LAMBLIN, N. a LE TOURNEAU, T. Stress hyperglycaemia is an independent predictor of left ventricular remodelling after first anterior myocardial infarction in non-diabetic patients. *Eur Heart*. 2007. 28, 546-552.

BELLAYR, I.H., MU, X., a LI, Y. Biochemical insights into the role of matrix metalloproteinases in regeneration: challenges and recent developments. *Future Med Chem.* 2009. 1(6), 1095-1111.

BERRINGTON DE GONZALES, A., HARTGE, P., CERHAN, J.R., FLINT, A.J., HANNAN, L., MACINNIS, R.J., MOORE, S.C., TOBIAS, G.S., ANTON-CULVER, H., FREEMAN, L.B., BEESON, W.L., CLIPP, S.L., ENGLISH, D.R., FOLSOM, A.R., FREEDMAN, D.M., GILES, G., HAKANSSON, N., HENDERSON, K.D., HOFFMAN-BOLTON, J., HOPPIN, J.A., KOENIG, K.L., LINET, M.S., PARK, Y., POCOBELLI, G., SCHATZKIN, A., SESSO, H.D., WEIDERPASS, E., WILLCOX, B.J., WOLK, A., ZELENIUCH-JACQUOTTE, A., WILLETT, W.C. a THUN, M.J. Body-Mass Index and Mortality among 1.46 Million White Adults. *N Engl J Med.* 2010, December. 2, 363(23), 2211-2219.

BIERY, N.J., ELDADAH, Z.A., MOORE, C.S., STETTEN, G., SPENCER, F. a DIETZ, H.C. Revised genomic organization of FBN1 and significance for regulated gene expression. *Genomics.* 1999. 56, 70-77.

BLANKENBERG, S., RUPPRECHT, H. J., POIRIER, O., BICKEL, C., SMIEJA, M., HAFNER, G., MEYER, J., CAMBIEN, F. a TIRET, L. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation.* 2003. 107, 1579-1585.

BRESSAN, G.M., DAGA, G., COLOMBATTI, A., CASTELLANI, I., MARIGO, V. a VOLPIN, D. Emilin a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibril interface. *J Cell Biol.* 1993. 121, 201-213.

BROWN, D.L., HIBBS, M.S., KEARNEY, M., LOUSHIN, C. a ISNER, J.M. Identification of 92-kDa gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation.* 1995. 91, 2125-2131.

BUONO, F., SPINELLI, L., GIALLAURIA, F., ASSANTE DI PANZILLO, E., DI MARINO, S., FERRARA, F., VIGORITO, C., TRIMARCO, B. a MORISCO, C. Usefulness of satisfactory control of low-density lipoprotein cholesterol to predict left ventricular remodeling after a first ST-elevation myocardial infarction successfully reperfused. *Am J Cardiol.* 2011. 107, 1772-1778.

CAÑADAS, V., VILACOSTA, I., BRUNA, I. a FUSTER, V. Marfan syndrome. Part 1: pathophysiology and diagnosis. *Nat Rev Cardiol.* 2010. 7, 256-265.

CAO, J., REHEMTULLA, A., BAHOU, W. a ZUCKER, S. Membrane type matrix metalloproteinase 1 activates pro-gelatinase A without furin cleavage of the N-terminal domain. *J Biol Chem.* 1996. 271, 30174-30180.

COGNI, A.L., FARAH, E., MINICUCCI, M.F., AZEVEDO, P.S., OKOSHI, K., MATSUBARA, B.B., ZANATI, S., HAGGEMAN, R., PAIVA, S.A.R. a ZORNOFF,

L.A.M. Metalloproteinases-2 and -9 predict left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol.* 2013, 100(4), 315-321.

CORSON, G.M., CHALBERG, S.C., DIETZ, H., CHARBONNEAU, N.L. a SAKAY, L.Y. Fibrillin binds calcium and is coded by cDNAs that reveal a multidomain structure and alternatively spliced exons at the 5-prime. *Genomics.* 1993. 17, 476-484.

ČECH, S. a HORKÝ, D. *Histologie a mikroskopická anatomie pro bakaláře.* 2011. Brno. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta.

DAHLBACK, K., LJUNGQUIST, K.A., LOFBERG, H., DAHLBACK, B., EGGWALL, E.L., a SAKAI, Y. Fibrillin immunoreactive fibers constitute a unique network in the human dermis, immunohistochemical comparison of the distributions of fibrillin, vitronectin, amyloid P component, and orcein stainable structures in normal skin and elastosis. *J Invest Dermatol.* 1990. 94, 284-291.

DALLAS, S.L., KEENE, D.R., SAHARINEN, J., SAKAI, L.Y., MUNDY, G.R. a BONEWALD, L.F. Role of the latent transforming growth factor beta binding protein family in fibrillin-containing microfibrils in bone cells *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Mineral Res.* 2000. 15, 68-81.

DAVIES, M. J. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart.* 2000. 83, 361-366.

DIETZ, H.C., CUTTING, G.R., PYERITZ, R.E., MASLEN, C.L., SAKAI, L.Y., CORSON, G.M., PUFFENBERGER, E.G., HAMOSH, A., NANTHAKUMAR, E.J. a CURRISTIN, S.M. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature.* 1991. 352(6333), 337-339.

DIETZ, H.C., CINTOSH, I.M., SAKAI, L.Y., CORSON, G.M., CHALBERG, S.C., PYERITZ, R.E. a FRANCOMANO, C.A. Four novel FBN1 mutations, significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics.* 1993. 17, 468-475.

DISABELLA, E., GRASSO, M., MARZILIANO, N., ANSALDI, S., LUCCHELLI, C., PORCU, E., TAGLIANI, M., PILOTTO, A., DIEGOLI, M., LANZARINI, L., MALATTIA, C., PELLICCIA, A., FICCADENTI, A., GABRIELLI, O. a ARBUSTINI, E. Two novel and one known mutation of TGFBR2 gene in Marfan syndrome not associated with FBN1 gene defects. *Eur J Hum Genet.* 2006. 14, 34-38.

DOBACZEWSKI, M., GONZALES-QUESADA N.G. a FRANGOGIANNIS, N.G. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2010. 48, 504-511.

DOBACZEWSKI, M., CHEN, W. a FRANGOGIANNIS, N.G. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 2011. 51, 600-606.

DOLIANA, R., BOT, S., MUNGIGUERRA, G., CANTON, A., CILLI, S.P. a COLOMBATTI, A. Isolation and characterization of EMILIN-2, a new member of the growing EMILINs family and member of the EMI domain-containing superfamily. *J Biol Chem.* 2001. 276, 12003-12011.

DOWNING, A.K., KNOTT, V., WERNER, J.M., CARDY, C.M., CAMPBELL, I.D. a HANDFORD, P.A. Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains, implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. *Cell.* 1996. 85, 597-605.

DUCHARME, A., FRANTZ, S., AIKAWA, M., RABKIN, E., LINDSEY, M., RHODE, L.E., SCHOEN, F.J., KELLY, R.A., WERB, Z., LIBBY, P. a LEE, R.T. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2000. 106, 55-62.

DYLEVSKÝ, I., DRUGA, R. a MRÁZKOVÁ, O. *Funkční anatomie člověka*. Grada Publishing, Praha. 2000.

EGEBLAD, M. a WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002. 2(3), 161-174.

EMERGING RISK FACTORS COLLABORATION, WORMSER, D., KAPTOGE, S., DI ANGELANTONIO, E., WOOD, A.M., PENNELLS, L., THOMPSON, A., SARWAR, N., KIZER, J.R., LAWLOR, D.A., NORDESTQAARD, B.G., RIDKER, P., SALOMAA, V., STEVENS, J., WOODWARD, M., SATTI, N., COLLINS, R., THOMPSON, S.G., WHITLOCK, G., DANESH, J. A a spolupracovníci. Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet.* 2011. 377, 1085-1095.

ERIKSEN, T.A., WRIGHT, D.M., PURSLOW, P.P. a DUANCE, V.C. Role of Ca²⁺ for the mechanical properties of fibrillin. *Proteins. Struct Funct Genet.* 2001. 45, 90-95.

FANG, L., DU, X.J., GAO, X.M. a DART, A.M. Activation of peripheral blood mononuclear cells and extracellular matrix and inflammatory gene profile in acute myocardial infarction. *Clin Sci.* 2010. 119(4), 175-183.

FEDAK, P.W.M., DE SA, M.P.L., VERMA, S., NILI, N., KAZEMIAN, P., BUTANY, J., STRAUSS, B.H., WEISEL, R.D. a DAVID, T.E. Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations, implications for aortic dilatation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003. 126(3), 797-805.

FERTIN, M., DUBOIS, E., BELLARD, A., AMOUYEL, P., PINET, F. a BAUTERS, C. Usefulness of circulating biomarkers for the prediction of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2012. 110(2), 277-283.

FIOTTI, N., ALTAMURA, N., ORLANDO, C., SIMI, L., REIMERS, B., PASCOTTO, P., ZINGONE, B., PASCOTTO, A., SERIO, M., GUARNIERI, G. a GIAN SANTE, C. Metalloproteinases-2, -9 and TIMP-1 expression in stable and unstable coronary plaques undergoing PCI. *Int J Cardiol*, 2008. 127, 350-357.

FONDARD, O., DETAINT, D., IUNG, B., CHOQUEUX, C., ADLE-BIASSETTE, H., JARRAYA, M., HVASS, U., COUETIL, J.P., HENIN, D., MICHEL, E.B., VAHANIAN, A. a JACOB, M.P. Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J*. 2005. 26, 1333-1341.

FRANGOIANNIS, N.G., SHIMONI, S., CHANG, S.M., REN, G., DEWALD, O. a GERSCH, C. Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2002. 39(9), 1468– 1474.

FRANGOIANNIS, N.G. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*. 2012. 110, 159-173.

FRITZE, O., ROMERO, B., SCHLEICHER, M., JACOB, M.P., OH, D., STARCHER, B., SCHENKE-LAYLAND, K., BUJAN, J. a STOCK, U.J. Age related changes in the elastic tissue of the human aorta. *J Vasc Res*. 2012. 49, 77-86.

FURTADO, L.V., WOODERCHAK-DONAHUE, W., ROPE, A.F., YETMAN, A.T., LEWIS, T., PLANT, P. a BAYRAK-TOYDEMIR, P. Characterization of large genomic deletions in the FBN1 gene using multiplex ligation-dependent probe amplification. *BMC Med Genet*. 2011. 12,119.

GERDES, N., SUKHOVA, G.K., LIBBY, P., REYNOLDS, R.S., YOUNG, J.L. a SCHONBECK, U. Expression of intrleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implication for atherogenesis. *J Exp Med*. 2002. 195(2), 245-257.

GERTHOFFER, W.T. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*. 2007. 100, 607-621.

GIBSON, M.A., HATZINIKOLAS, G., DAVIS, E., BAKER, E., SUTHERLAND, G.R. a MECHAM, R.P. Bovine latent transforming growth factor beta1-binding protein-2, molecular cloning identification of tissue isoforms, and immunolocalization to elastin.associated microfibrils. *Mol Cell Biol*. 1995. 15, 6932-6942.

GIBSON, M.A., FINNIS, M.L., KUMARATILAKE, J.L. a CLEARY, E.G. Microfibril-associated glycoprotein-2 (MAGP-2) is specifically associated with fobrillin-containing microfibrils and exhibits more restricted patterns of tissue localization and developmental expression than its structural relative MAGP-1. *J Histochem Cytochem*. 1998. 46, 871-885.

GIBSON, M.A., LEAVESLEY, D.I. a ASHMAN, L.K., Micrifibrill-associated glycoprotein-2 specifically interacts with range of bovine and human cell types via alpha vbeta3 integrin. *J Biol Chem.* 1999. 274, 13060-13065.

GIDRON, Y., GILUTZ, H., BERGER, R. a HULEIHEL, M. Molecular and cellular interface between behavior and acute coronary syndromes. *Cardiovasc Res.* 2002. 56, 15-21.

GILL, S.E. a PARKS, W.C. Metalloproteinases and Their Inhibitors, Regulators of Wound Healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008. 40, 1334–1347.

GOMEZ, D., AL HAJ ZEN, A., BORGES, L.F., PHILIPPE, M., GUTIERREZ, P.S., JONDEAU, G., MICHEL, J.B. a VRANCKX, R. Syndromic and non-syndromic aneurysms of the human ascending aorta share activation of the Smad2 pathway. *J Pathol.* 2009. 218, 131-142.

GOMEZ, D., COYET, A., OLLIVIER, V., JEUNEMAITRE, X., JONDEAU, G., MICHEL, J.B. a VRANCKX, R. Epigenetic control of vascular smooth muscle cell in Marfan and non-Marfan thoracic aortic aneurysms. *Cardiovasc Res.* 2011. 89, 446-456.

GOUMANS, M.J., LIU, Z. a TEN DIJKE, P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* 2009. 19, 116-127.

GROFOVÁ, Z. Biologie rány. *Česká geriatrická revue.* 2006. 4, 157-162.

GUZEL, S., SERIN, O., GUZEL, E.C., BUYUK, B., YILMAZ, G. a GUVENEN, G. Interleukin-33, matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in myocardial infarction. *Korean J Intern Med.* 2013. 28, 165-173.

HALADE, G.V., JIN, Y.F. a LINDSEY, M.L. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: A proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol Ther.* 2013. 139, 32-40.

HALLIDAY, D., HUTCHINSON, S., KETTLE, S., FIRTH, H., WORDSWORTH, P. a HANDFORD, P.A. Molecular analysis of eight mutations in FBN1. *Hum Genet.* 1999. 105, 587-597.

HELLENTHAL, F.A., PULINX, B., WELTEN, R.J., TEIJINK, J.A., VAN DIEIJEN-VISSER, M.P., WODZIG, W.K. a SCHURINK, G.W. Circulating biomarkers and abdominal aortic aneurysm size. *J Surg Res.* 2012. 176(2), 672-678.

HEMMANN, S. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis – a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol.* 2007. 46, 955-975.

HENDERSON, M., POLEWSKI, R., FANNING, J.C. a GIBSON, M.A. Microfibrill-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) is specifically located on the beads of the beaded-

filament structure for fibrillin-containing microfibril as visualised by rotary shadowing technique. *J Histochem Cytochem.* 1996. 44, 1389-1397.

HERKOWITZ, I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature.* 1987. 329, 219-222.

HILHORST-HOFSTEE, Y., HAMEL, B.C., VERHEIJ, J.B., RIJLAARSDAM, M.E., MANCINI, G.M., COBBEN, J.M., GIROTH, C., RUIVENKAMP, C.A., HANSSON, K.B., TIMMERMANS, J., MOLL, H.A. BREUNING, M.H. a PALS, G. The clinical spectrum of complete *FBNI* allele deletions. *Eur J Hum Genet.* 2011. 19, 247-252.

HINZ, B. The myofibroblast: paradigm for mechanically active cell. *J Biochem.* 2010. 43, 146-155.

HOJO, Y., IKEDA, U., UENO, S., ARAKAWA, H. a SHOIMADA, K. Expression of matrix metalloproteinases in patients with acute myocardial infarction. *Jpn Circ J.* 2001. 65, 71-75.

HUBMACHER, D., TIEDEMANN, K. a REINHARDT, D.P. Fibrillins, From biogenesis of microfibrils to signaling functions. *Curr Top Dev Biol.* 2006. 75, 93-122.

HUDSON, M.P., ARMSTRONG, P.W., RUZYLLLO, W., BRUM, J., CUSMANO, L., KRZESKI, P., LYON, R., QUINONES, M., THEROUX, P., SYDLOWSKI, D., KIM, H.E., GARCIA, M.J., JABER, W.A. a WEAVER, W.D. Effects of selective matrix metalloproteinase inhibitor (PG-116800) to prevent ventricular remodeling after myocardial infarction: results of PREMIER (Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006. 48, 15-20.

HUHTALA, P., HUMPHRIES, M.J., MCCARTHY, J.B., TREMBLE, P.M., WERB, Z. a DAMSKY, C.H. Cooperative signalling by alpha5 beta1 and alpha4 beta1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *J Cell Biol.* 1995. 129, 867-879.

CHANG, H., BROWN, C.W. a MATZUK, M.M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev.* 2002. 23(6), 787-823.

CHEN, F., ERIKSSON, P., HANSSON, G.K., HERZFELD, I., KLEIN, M., HANSSON, L.O. a VALEN, G. Expression of matrix metalloproteinase 9 and its regulators in the unstable coronary atherosclerotic plaque. *Int J Mol Med.* 2005. 15, 57-65.

CHEN, W. a FRANGOIANNIS, N.G. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta.* 2013. 1833(4), 945-53.

CHOW, A.K., CENA, J. a SCHULZ, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br Journal of Pharmacol.* 2007. 152, 189-205.

IKONOMIDIS, J.S., JONES, J.A., BARBOUR, J.R., STROUD, R.E., CLARK, L.L., KAPLAN, B.S., ZEESHAN, A., BAVARIA, J.E., GORMAN, J.H., SPINALE, F.G. a GORMAN, R.C. Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with Marfan syndrome. *Circulation*. 2006. 114, 1365-370.

IKONOMIDIS, J.S., JONES, J.A., BARBOUR, J.R., STROUD, R.E., CLARK, L.L. a KAPLAN, B.S. Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with bicuspid and tricuspid aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007. 133, 1020-1036.

IKONOMIDIS, J.S., IVEY, C.R., WHEELER, J.B., AKERMAN, A.W., RICE, A., PATEL, R.K., STROUD, R.E., SHAH, A.A., HUGHES, C.G., FERRARI, G., MUKHERJEE, R. a JONES, J.A. Plasma biomarkers for distinguishing etiologic subtypes of thoracic aortic aneurysm disease. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013. 145(5), 1326-1333.

ISSELBACHER, E.M. *Diseases of the aorta*. In: GOLDMAN, L., SCHAFER, A.I. a spol. *Cecil Medicine*. 24. Vydání. Philadelphia, Saunders Elsevier. 2012. Kap. 78

JONES, J.A., SPINALE, F.G. a IKONOMIDIS, J.S. Transforming growth factor-beta signaling in thoracic aortic aneurysm development, a paradox in pathogenesis. *J Vasc Res*. 2009. 46(2), 119-137.

JONSSON, S., LUNDBERG, A., KALVEGREN, H., BERGSTROM, I., SZYMANOWSKI, A. a JONASSON, L. Increased levels of leukocyte-derived MMP-9 in patients with stable angina pectoris. *PLoS One*. 2011. 6, e19340.

KADEN, J.J., DEMPFLER, C.E., SUESELBECK, T., BRUECKMANN, M., POERNER, T. C., HAGHI, D., HAASE, K.K. a BORGGREFE, M. Time-dependent changes in the plasma concentration of matrix metalloproteinase 9 after acute myocardial infarction. *Cardiology*. 2003. 99, 140-144.

KADEN, J.J., VOCKE, D.C., FISCHER, C.S., GROBHOLZ, R., BRUECKMANN, M., VAHL, C.F., HAGL, S., HAASE, K.K., DEMPFLER, C.E. a BORGGREFE, M. Expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in calcific aortic stenosis. *J Kardiol*. 2004. 93, 124-130.

KÄHÄRI, V.M. a SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol*. 1997. 6(5), 199-213.

KANDASAMY, A.D., CHOW, A.K., ALI, M.A. a SCHULZ, R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res*. 2010. 85(3), 413-423.

KANEKAR, S., HIROZANNE, T., TERRACIO, L. a BORG, T. Cardiac fibroblasts: form and function. *Cardiovasc Pathol* 1998. 7(3), 127-133.

KATHIRAVEL, U., KEYSER, B., HOFFJAN, S., KOTTING, J., MULLER, M., SIVALINGAM, S., BININ, M., ARSLAN-KIRCHNER, M., VON KODOLITSCH, Y., BINNER, P., SCHEFFOLD, T., STUHRMANN, M. a WALDMULLER, S. High-density oligonucleotide-based resequencing assay for mutations causing syndromic and non-syndromic forms of thoracic aneurysms and dissections. *Mol Cell Probes*. 2013. 27(2), 103-108.

KELLY, D., COCKERILL, G., NG, L.L., THOMPSON, M., KHAN, S., SAMANI, N. J. a SQUIRE, I.B. Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *Eur Heart J*. 2007. 28, 711-718.

KELLY, D., KHAN, S., THOMPSON, M., COCKERILL, G., NG, L.L., SAMANI, N. J. a SQUIRE, I.B. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9: novel indicators of left ventricular remodelling and prognosis after acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008. 29, 2116-2124.

KIELTY, C.M. a SHUTTLEWORTH, C.A. The role of calcium in the organization of fibrillin microfibrils. *FEBS Lett*. 1993. 336, 323-326.

KIELTY, C.M. a SHUTTLEWORTH, C.A. Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microsc Res Tech*. 1997. 38, 407-427.

KIELTY, C.M., SHERRATT, M.J. a SHUTTLEWORTH, C.A., Elastic fibros. *J Cell Sci*. 2002. 115, 2817-2828.

KILICKESMEZ, K.O., ABACI, O., KOCAS, C., YILDIZ, A., KAYA, A., OKCUN, B. a KUCUKOGLU, S. Dilatation of ascending aorta and serum alpha 1-antitrypsin level in patients with bicuspid aortic valve. *Heart Vessels*. 2012. 27(4), 391-397.

KINOSHITA, T., SATO, H., OKADA, A., OHUCHI, E., IMAI, K., OKADA, Y. a SEIKI, M. TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J Biol Chem*. 1998. 273, 16098-16103.

KIRK, J.A., MACGOWAN, G.A., EVANS, C., SMITH, S.H., WARREN, C.M., MAMIDI, R., CHANDRA, M., STEWART, A.F., SOLARO, R.J. a SHROFF, S.G. Left ventricular and myocardial function in mice expressing constitutively pseudophosphorylated cardiac troponin I. *Circ Res*. 2009. 105(12), 1232-1239.

KITAHAMA, S., GIBSON, M.A., HATZINIKOLAS, G., HAY, S., KULIWABA, J.L., EVDOKIOU, A., ATKINS, G.J. a FINDLAY, D.M. Expression of fibrillins and other microfibril-associated proteins in human bone and osteoblast-like cells. *Bone*. 2000. 27, 61-67.

KOCH, W., WOLFERSTETTER, H., SCHATKE, A., SCHORMIG, A. a KASTRATI, A. Interleukin 18 gene variation and risk of acute myocardial infarction. *Cytokine*. 2011. 56(3), 786-791.

KOKAI, M., KASHIWAMURA, S., OKAMURA, H., OHARA, K. a MORITA, Y. Plasma interleukin-18 levels in patients with psychiatric disorders. *J Immunother*. 2002. 25 Suppl 1, S68-71.

KOSKIVIRTA, I., RAHKONEN, O. a MAYRANPAA, M. Tissue inhibitor of metalloproteinases 4 (TIMP4) is involved in inflammatory processes of human cardiovascular pathology. *Histochem Cell Biol*. 2006. 126, 335-342.

KULICZKOWSKI, W., URBANIAK, J., HALLEN, J., WOZNIAK, M., POLONSKI, L., MYSIAK, A., ATAR, D., ZEMBALA, M. a SEREBRUANY, V. Matrix metalloproteinases and the activity of their tissue inhibitors in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty. *Kardiologia Polska*. 2013. 71(5), 453-463.

LE MAIRE, S.A., WANG, X., WILKS, J.A., CARTER, S.A., WEN, S., WON, T., LEONARDELLI, D., ANAND, D., CONKLIN, L.D., WANG, X.L., THOMPSON, R.W. a COSELLI, J.S. Matrix metalloproteinases in ascending aortic aneurysms: bicuspid versus trileaflet aortic valves. *J Surg Res*. 2005. 123, 40-48.

LIBBY, P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995. 91, 2844-2850.

LINDSEY, M., WEDIN, K., BROWN, M.D., KELLER, C., EVANS, A.J. a SMOLEN, J. Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*. 2001. 103(17), 2181-2187.

LINDSEY, M.L., GANNON, J., AIKAWA, M., SCHOEN, F.J., RABKIN, E. a LOPRESTI-MORROW, L. Selective matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction. *Circulation*. 2002. 105(6), 753-758.

LINDSEY, M.L. MMP induction and inhibition in myocardial infarction. *Heart Fail Rev*. 2004. 9, 7-19.

LINDSEY, M.L., GOSHORN, D.K., SQUIRES, C.E., ESCOBAR, G.P., HENDRICK, J.W., MINGOIA, J.T., SWETERLITSCH, S.E. a SPINALE, F.G. Age-dependent changes in myocardial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase profiles and fibroblast function. *Cardiovasc Res*. 2005. 66(2), 410-419.

LINDSEY, M.L. a ZAMILPA, R. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases following myocardial infarction. *Cardiovasc Ther.* 2012. 30(1), 31-41.

LIU, H.H., TIAN, X., LI, Y.J., WU, C.A. a ZHENG, C.C. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA.* 2008. 14, 836-843.

LIU, W., QIAN, C., COMEAU, K., BRENN, T., FURTHMAYR, H. a FRANCKE, U. Mutant fibrillin-1 monomers lacking EGF-like domain disrupt microfibril assembly and cause severe Marfan syndrome. *Hum Mol Genet.* 1996. 5, 1581-1587.

LIU, Y. Increased Matrix Metalloproteinase-9 Predicts Poor Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Care.* 2009. 32, 117-119.

LOEYS, B.L., CHEN, J., NEPTUNE, E.R., JUDGE, D.P., PODOWSKI, M., HOLM, T., MEYERS, J., LEITCH, C.C., KATSANIS, N., SHARIFI, N., XU, F.L., MYERS, L.A., SPEVAK, P.J., CAMERON, D.E., DE BACKER, J., HELLEMANS, J., CHEN, Y., DAVIS, E.C., WEBB, C.L., KRESS, W., COUCKE, P., RIFKIN, D.B., DE PAEPE, A.M. a DIETZ, H.C. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet.* 2005. 37, 275-281.

LOEYS, B.L., DIETZ, H.C., BRAVERMAN, A.C., CALLEWAERT, B.L., DE BACKER, J., DEVEREUX, R.B., HILHORST-HOFSTEE, Y., JONDEAU, G., FAIVRE, L., MILEWICZ, D.M., PYERITZ, R.E., SPONSELLER, P.D., WORDSWORTH, P. a DE PAEPE, A.M. The revised Ghent nosology for Marfan syndrome. *J Med Genet.* 2010. 47, 476-485.

LU, K.V. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. *Laboratory Investigation.* 2004. 84, 8-20.

MAGENIS, R.E., MASLEN, C.L., SMITH, L., ALLEN, L. a SAKAI, L.Y. Localization of the fibrillin (FBN) gene to chromosome 15, band q21.1. *Genomics.* 1991. 11, 346-351.

MALLAT, Z., CORBAZ, A., SCOAZEC, A., BESNARD, S., LESECHE, G., CHVATCHKO, Y. a TEDGUI, A. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation.* 2001. 104(14), 1598-1603.

MASLEN, C.L., CORSON, G.M., MADDOX, B.K., GLANVILLE, R.W. a SAKAY, L.Y. Partial sequence of a candidate gene for the Marfan syndrome. *Nature.* 1991. 352, 334-337.

MASSAM-WU, T., CHIU, M., CHOUDHURY, R., CHAUDHRY, S.S., BALDWIN, A.K., MCGOVERN, A., BALDOCK, C., SHUTTLEWORTH, C.A. a KIELTY, C.M.

Assembly of fibrillin microfibrils governs extracellular deposition of latent TGF beta. *J Cell Sci.* 2010. 123, 3006-3018.

MATHER, A.N., CREAN, A., ABIDIN, N., WORTHY, G., BALL, S.G., PLEIN, S. a GREENWOOD, J.P. Relationship of dysglycemia to acute myocardial infarct size and cardiovascular outcome as determined by cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2010. 12, 61-61.

MATSUNAGA, T., ABE, N., KAMEDA, K., HAGII, J., FUJITA, N., ONODERA, H., KAMATA, T., ISHIZAKA, H., HANADA, H., OSANAI, T. a OKUMURA, K. Circulating level of gelatinase activity predicts ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2005. 105, 203–208.

MILEWICZ, D., GROSSFIELD, J., CAO, S.N., KIELTY, C., COVITZ, W. a JEWETT, T. A mutation in FBN1 disrupts profibrillin processing and results in isolated skeletal features of the Marfan syndrome. *J Clin Invest.* 1995. 95, 2373-2378.

MILEWICZ, D., MICHAEL, K., FISCHER, N., COSINELLI, J., MARKELLO, T. a BIDDINGER, A. Fibrillin 1 (FBN1) Mutations in Patients with Thoracic Aortic Aneurysms. *Circulation.* 1996. 94, 2708-2711.

MILEWICZ, D. *Thoracic Aortic Aneurysms and Aortic Dissections.* GeneReviews™. Seattle, University of Washington. 2012.

MILLER, S.A., DYKES, D.D. a POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988. 16(3), 12-15.

MIYAZAKI, S., KASAI, T., MIYAUCHI, K, MIYAZAKI, T., AKIMOTO, I., TAKAGI, A., AIHARA, K., KAWAMURA, M., SUWA, S., KOJIMA, S., SUMIYOSHI, M. a DAIDA, H. Changes in matrix metalloproteinase-9 level is associated with left ventricular remodeling following myocardial infarction among patients treated with trandolapril, valsartan or both. *Circ J.* 2010. 74, 1158-1164.

MOSES, M.A. Temporal Study of the Activity of Matrix Metalloproteinases and Their Endogenous Inhibitors During Wound Healing. *Journal of Cellular Biochemistry.* 1996. 60, 379-386.

MUKHERJEE, R., COLBATH, G.P., JUSTUS, C.D., BRUCE, J.A., ALLEN, C.M., HEWETT, K.W., SAUL, J.P., GOURDIE, R.G. a SPINALE, F.G. Spatiotemporal induction of matrix metalloproteinase-9 transcription after discrete myocardial injury. *FASEB.* 2010. 24, 3819-3828.

NICOLAU, J.C., MAIA, L.N., VITOLA, J.V., MAHAFFEY, K.W., MACHADO, M.N. a MIZUNO, K. Baseline glucose and left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Diabetes Complications.* 2007. 21, 294-299.

NILSSON, L., HALLEN, J., ATAR, D., JONASSON, L. a SWAHN, E. Early measurements of plasma matrix metalloproteinase-2 predict infarct size and ventricular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction. *Heart*. 2012. 98, 31-36.

NISHIKAWA, N., YAMAMOTO, K., SAKATA, Y., MANO, T., YOSHIDA, J., MIWA, T., TAKEDA, H., HORI, M. a MASUYAMA, T. Differential activation of matrix metalloproteinases in heart failure with and without ventricular dilatation. *Cardiovasc Res*. 2003. 57(3), 766-774.

NOJI, Y., SHIMIZU, M., INO, H., HIGASHIKATA, T., YAMAGUCHI, M., NOHARA, A., HORITA, T., SHIMIZU, K., ITO, Y., MATSUDA, T., NAMURA, M. a MABUCHI, H. Increased Circulating Matrix Metalloproteinase-2 in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy With Systolic Dysfunction. *Circ J*. 2004. 68, 355-360.

OKLU, R. a HESKETH, R. The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J*. 2000. 352, 601-610.

OREM, C., CELIK, S., OREM, A., CALAPOGLU, M. a ERDOL, C. Increased plasma fibronectin levels in patients with acute myocardial infarction complicated with left ventricular thrombus. *Thromb. Res*. 2002. 105, 37-41.

ORN, S., MANHENKE, C., SQUIRE, I.B., NG, L., ANAND, I. a DICKSTEIN, K. Plasma MMP-2, MMP-9 and N-BNP in long-term survivors following complicated myocardial infarction: relation to magnetic resonance imaging measures of left ventricular structure and function. *J Card Fail*. 2007. 13, 843-849.

OVERALL, C.M., TAM, E., MCQUIBBAN, G.A., MORRISON, C., WALLON, U.M., BIGG, H.F., KING, A.E. a ROBERTS, C.R. Domain interactions in the gelatinase A TIMP-2 MT1-MMP activation complex. *J Biol Chem*. 2000. 275, 39497-39506.

PALZ, M., TIECKE, F., BOOMS, P., GOLDNER, B., ROSENBERG, T., FUCHS, J., SKOVBY, F., SCHUMACHER, H., KAUFMANN, U.C., VON KODOLITSCH, Y., NIENABER, C.A., LEITNER, C., KATZKE, S., VETTER, B., HAGEMEIERS, C.A. a ROBINSON, P.N. Clustering of mutations associated with mild Marfan-like phenotypes in the 3-prime region of FBN1 suggests a potential genotype-phenotype correlation. *Am. J. Med. Genet*. 2000. 91, 212-221.

PANNU, H., FADULU, V.T., CHANG, J., LAFONT, A., HASHAM, S.N., SPARKS, E., GIAMPIETRO, P.F., ZALESKI, C., ESTRERA, A.L., SAFI, H.J., SHETE, S., WILLING, M.C., RAMAN, C.S. a MILEWICZ, D.M. Mutations in transforming growth factor-beta receptor type II cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circulation*. 2005a. 112, 513-520.

PANNU, H., TRAN-FADULU, V. a MILEWICZ, D.M. Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and aortis dissections. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet*. 2005b. 139(1), 10-16.

PASQUALI-RONCHETTI, I. a BACCARANI-CONTRI, M. Elastic fiber during development and aging. *J Biol Chem.* 1997. 276, 1253-1261.

PASTERKAMP, G., SCHONEVELD, A.H., HIJNEN, D.J., DE KLEIJN, D.P., TEEPEN, H., VAN DER WAL, A.C. a BORST, C. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases-1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis.* 2000. 150, 245-253.

PEREIRA, L., D'ALESSIO, M., RAMIREZ, F., LYNCH, J.R., SYKES, B., PANGILINAN, J. a BONADIO, J. Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum Mol Genet.* 1993. 2, 961-968..

PIESTRZENIEWICZ, K., LUCZAK, K., MACIEJEWSKI, M. a DROZDZ, J. Low adiponectin blood concentration predicts left ventricular remodeling in ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Cardiol J.* 2010. 17, 49-56.

PORTER, K.E. a TURNER, N.A. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther.* 2009. 123(2), 255-278.

PRATT, B. a CURCI, J. Arterial elastic fiber structure. Function and potential roles in acute aortic dissection. *J Cardiovasc Surg.* 2010. 51, 647-656.

PUREN, A.J., FANTUZZI, G. a DINARELLO, C.A. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1999. 96(5), 2256-2261.

R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing, reference index version 2.15.2.* Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing. 2010.

RAGHUNATH, M., UNSOLD, C., KUBITSCHECK, U., BRUCKNER-TUDERMAN, L., PETERS, R. a MEULI, M. The cutaneous microfibrillar apparatus contains latent transforming growth factor-beta binding protein-1 (LTBP-1) and is a repository for latent TGF-beta1. *J Invest Dermatol.* 1998. 111, 559-564.

RAJAVASHISTH, T.B., XU, X.P., JOVINGE, S., MEISEL, S., XU, X.O., CHAI, N.N. FISHBEIN, M.C.C, KAUL, S., CERCEK, B., SHARIFI, B. a SHAH P. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation.* 1999. 99,3103-3109.

RAMANI, R., MATHIER, M., WANG, P. GIBSON, G., TOGEL, S., DAWSON, J., BAUER, A., ALBER, S., WATKINS, S.C., MCTIERNAN, C.F. a FELDMAN, A.M. Inhibition of tumor necrosis factor receptor-1-mediated pathways has beneficial effects in

a murine model of postischemic remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004. 287, H1369-H1377.

RAMIREZ, F., SAKAI, L.Y., DIETZ, H.C. a RIFKIN, D.B. Fibrillin microfibrils: multipurpose extracellular networks in organismal physiology. *Physiol Genomics*. 2004. 19(2), 151-154.

RITCHIE, M.E., SILVER, J., OSHLACK, A., HOLMES, M., DIYAGAMA, D., HOLLOWAY, A. a SMYTH, G.K. A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics*. 2007. 23(20), 2700-2707.

ROBINSON, P.N. a GODFREY, M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies. *J. Med. Genet*. 2000. 37(1), 9-25.

ROBINSON, P.N., BOOMS, P., KATZKE, S., LADEWIG, M., NEUMANN, L., PALZ, M., PREGLA, R., TIECKE, F. a ROSENBERG, T. Mutations of FBN1 and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies. *Human Mutation*. 2002. 20, 153-161.

SAKAI, L.Y., KEENE, D.R. a ENGVALL, E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J. Cell Biol*. 1986. 103, 2499-2509.

SAKAI, L.Y., KEENE, D.R., GLANVILLE, R.W. a BÄCHINGER, H.P. Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. *J Biol Chem*. 1991. 266(22), 14763-14770.

SBARDELLA, D., FASCIGLIONE, G.F., GIOIA, M., CIACCIO, C., TUNDO, G.R., MARINI, S. a COLETTA, M. Human matrix metalloproteinases, An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Mol Aspects Med*. 2011. 33, 119-208.

SCOTT-BURDEN, T. Extracellular matrix: the cellular environment. *NiPS*. 1994. 9, 110-115.

SEGURA, A.M., LUNA, R.E., HORIBA, K., STETLER-STEVENSON, W.G., MCALLISTER, H.A., WILLERSON, J.T. a FERRANS, V.J. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation*. 1998. 98, II-331-II-338.

SEKHON, S.S. Matrix metalloproteinases – an overview. *Research and Reports in Biology*. 2010. I, 1-20.

SCHELLINGS, M.W., PINTO, Y.M. a HEYMANS, S. Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res*. 2004. 64, 24–31.

SCHRIJVER, I., LIU, W., BRENN, T., FURTHMAYR, H. a FRANCKE, U. Cysteine substitutions in epidermal growth factor-like domains of fibrillin-1, distinct effects on biochemical and clinical phenotypes. *Am J Hum Genet*. 1999. 65, 1007-1020.

SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease, rationale and therapeutic approaches. *Anno Rev Pharmacol Tox.* 2007. 47, 211-242.

SINHA, S., NEVETT, C., SHUTTLEWORTH, C.A. a KIELTY, C.M. Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-beta binding proteins. *Matrix Biol.* 1998. 17, 529-545.

SINHA, S., SHUTTLEWORTH, C.A., HEAGERTY, A.M. a KIELTY, C.M. Expression of the latent TGFbeta binding proteins and association with TGFbeta-1 and fibrillin-1 in the response to arterial injury. *Cardiovasc Res.* 2002. 53, 971-983.

SMYTH, G.K. a SPEED, T. Normalization of cDNA microarray data. *Methods.* 2003. 31, 265-273.

SMYTH, G.K., HALL, W. a HALL, E. Linear models and empiric Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology.* 2004. 3, 1-26.

SNOEK-VAN BEURDEN, P., VON DEN HOFF, A.M. a JOHANNES, W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques.* 2005. 38(1), 73-83.

SPINALE, F.G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases, influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007. 87, 1285-1342.

SQUIRE, I.B., EVANS, J., NG, L.L., LOFTUS, I.M., a THOMPSON, M.M. Plasma MMP-9 a MMP-2 following myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction. *J Card Fail.* 2004. 10, 328-333.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling, the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 2003. 200, 448-464.

SUNDSTRÖM, J., EVANS, J.C., BENJAMIN, E.J., LEVY, D., LARSON, M.G., SAWYER, D.B., SIWIK, D.A., COLUCCI, W.S., SUTHERLAND, P., WILSON, P.W. a VASAN, R.S. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2004. 109, 2850-2856.

ŠETINA, M., PIRK, J., HOLUB, J., FIALKA, R., BRANNY, P., BRÁT, R., ČERNÝ, Š., DRAŠNAR, A., HÁJEK, T., LINDNER, J., LONSKÝ, V., MOKRÁČEK, A., NĚMEC, P. a STRAKA, Z. *Přehled vybraných kardiochirurgických operací v České republice 2011.* ÚZIS ČR, NKCHR. Praha, Česká republika. 2013

ŠPAČEK, R. a WIDIMSKÝ, P. *Infarkt myokardu, Definice infarktu myokardu.* Praha, Galén. 2003a. 13.

ŠPAČEK, R. a WIDIMSKÝ, P. *Infarkt myokardu*, Rizikové faktory aterosklerózy. Praha. Galén. 2003b. 28-29.

ŠTEJFA, M. a spol. *Kardiologie*. 3. Vydání. Praha, Grada Publishing, a.s. 2007. 776.

TAIPALE, J., SAHARINEN, J., HEDMAN, K. a KESKI-OJA, J. Latent transforming growth factor-beta1 and its binding-protein are components of extracellular-matrix microfibrils. *J Histochem Cytochem*. 1996. 44, 875-889.

TAKENOSHITA, S., HAGIWARA, K., NAGASHIMA, M., GEMMA, A., BENNETT, W.P. a HARRIS, C.C. The genomic structure of the gene encoding the human transforming growth factor beta type II receptor (TGF-beta RII). *Genomics*. 1996. 36(2), 341-344.

TAN, J. a HUA, Q. Correlations between serum inflammation factors and left ventricular remodeling in acute ST segment elevation myocardial infarction. *Yonsei Med J*. 2012. 53(3), 501-507.

TAO, Z.Y., CAVASIN, M.A., YANG, F., LIU, Y.H. a YANG, X.P. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sci*. 2004. 74(12), 1561–1572.

TAYEBJEE, M.H., LIP, G.Y., BLANN, A.D. a MACFADYEN, R.J. Effects of age, gender, ethnicity, diurnal variation and exercise on circulating levels of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -9, and their inhibitors, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2. *Thromb Res*. 2005. 115, 205–210.

TROJAN, S. a spol. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing. Praha. 1999.

Ústav informatiky AV ČR, v.v.i. Centrum biomedicínské informatiky. *Způsob stanovení prognózy pacientů s primárním infarktem myokardu a oligonukleotidový čip pro toto stanovení*. Česká republika. Patentový spis CZ 302379 B6. 20.4.2011.

ÚZIS ČR. *Zdravotnická statistika ČR - Hospitalizovaní v nemocnicích ČR 2011 – zdravotnická statistika ČR*. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Praha. 2011.

ÚZIS ČR. *Zdravotnická statistika ČR - Zemřelí 2012*. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Praha. 2012.

VAN DEN BORNE, S.W., CLEUTJENS, J.P., HANEMAAIJER, R., CREEMERS, E.E., SMITS, J.F., DAEMEN, M.J. a BLANKESTEIJN, W.M. Increased matrix metalloproteinase-8 and -9 activity in patients with infarct rupture after myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol*. 2009. 18(1), 37-43.

VAN DEN BORNE, S.W., DIEZ, J., BLANKESTEIJN, W.M., VERJANS, J., HOFSTRA, L. a NARULA, J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol*. 2010. 7(1), 30-37.

VAN VARIK, B.J., RENNENBERG, R.J., REUTELINGSPERGER, C.P., KROON, A.A., DE LEEUW, P.W. a SCHURGERS, L.J. Mechanism of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front Genet.* 2012. 3(290).

VON KODOLITISCH, Y., RYBCZYNSKI, M., BERNHARDT, A., MIR, T.S. a TREEDE, H. Marfan syndrome and the evolving spectrum of heritable thoracic aortic disease: do we need genetics for clinical decisions? *Vasa.* 2010. 39, 17-32.

WAGNER, D.R., DELAGARDELLE, C., ERNENS, I., ROUY, D., VAILLANT, M. a BEISSEL, J. Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction. *J Card Fail.* 2006. 12, 66-72.

WANG, W.J., HAN, P., ZHENG, J., HU, F.Y., ZHU, Y., XIE, J.S., GUO, J., ZHANG, G.Y., CAO, H., LIU, T.S., FU, Q., SUN, L., YANG, B.B. a TIAN, X.L. Exon 47 skipping of fibrillin-1 leads preferentially to cardiovascular defects in patients with thoracic aortic aneurysms and dissection. *J mol Med (Berl).* 2013. 91(1), 37-47.

WEBB, C.S., BONNEMA, D.D., AHMED, S.H., LEONARDI, A.H., MCCLURE, C.D., CLARK, L.L., STROUD, R.E., CORN, W.C., FINKLEA, L. a ZILE, M.R. Specific temporal profile of matrix metalloproteinase release occurs in patients after myocardial infarction: relation to left ventricular remodeling. *Circulation.* 2006. 114, 1020-1027.

WEIR, R.A., BALMAIN, S., STEEDMAN, T., NG, L.L., SQUIRE, I.B., RUMLEY, A., DARGIE, H.J. a LOWE, G.D. Tissue plasminogen activator antigen predicts medium-term left ventricular end-systolic volume after acute myocardial infarction. *J Thromb Thrombolysis.* 2010. 29, 421-428.

WEN, D., ZHOUX, L., LI, J.J., a HUI, R.T. Biomarkers in aortic dissection. *Clin Chim Acta.* 2011. 412, 688-695.

WILL, H., ATKINSON, S.J., BUTLER, G.S., SMITH, B. a MURPHY, G. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. *J Biol Chem.* 1996. 271, 17119-17123.

WRANA, J.L., ATTISANO, L., WIESER, R., VENTURA, F. a MASSAGUÉ, J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature.* 1994. 370(6488), 341-347.

WU, C.W., SCHMOLLER, S.K., SHIN, S.J. a TALAAT, A.M. Defining the stressome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* *in vitro* and in naturally infected cows. *J Bacteriol.* 2007. 189, 7877-7886.

WYNN, T.A. a RAMALINGAM, T.R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012. 18, 1028-1040.

YAMAZAKI, T., LEE, J.D., SHIMIZU, H., UZUI, H. a UEDA, T. Circulating matrix metalloproteinase-2 is elevated in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2004. 6(1), 41-45.

ZITKA, O., KUKACKA, S., KRIZKOVA S., HRUSKA, D., ADAM, V., MASARIK. M., PRUSA, R. a KIZEK. R. Matrix Metalloproteinases. *Current Medicinal Chemistry*, 2010. 17(31), 3751-3768.

Internetové zdroje:

K datumu odevzdání práce byly níže uvedené internetové odkazy funkční.

IKEM - Institut klinické a experimentální medicíny [cit. 2014-01-17] dostupné z:

<http://www.ikem.cz/www?docid>

The Human Gene Mutation Database at the Institute Genetics in Cardiff [cit. 2014-01-17]

dostupné z: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>

Standart nukleotide BLAST [cit. 2014-01-17] dostupné z:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni [cit. 2014-01-17] dostupné z:

<http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education.html>

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Zdravotnická ročenka České Republiky 2012 [cit. 2014-01-17] dostupné z:

<http://www.uzis.cz/katalog/rocenky/zdravotnicka-rocenka-ceske-republiky>

Seznam publikací autorky se vztahem k tématu dizertace

Publikace v časopisech s uváděným IF

ŠÍMOVÁ, J., ŠKVOR, J., REISSIGOVÁ, J., DUDRA, J., LINDNER, J., ČAPEK, P. a ZVÁROVÁ, J. Serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 and TGFBR2 gene screening in patients with ascending aortic dilatation. *Folia Biologica*, 2013. 59 (4): 154-161. ISSN 0015-5500 (IF: 1,219)

ŠÍMOVÁ, J., ŠKVOR, J., SLOVÁK, D., MAZURA, I. a ZVÁROVÁ, J. Serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 in patients with acute myocardial infarction. *Folia Biologica*, 2013. 59 (5): 181-187. ISSN 0015-5500 (IF: 1,219)

Ostatní publikace se vztahem k disertaci

ŠÍMOVÁ, J., ČAPEK, P., DUDRA, J., LINDNER, J., MAZURA, I. a ZVÁROVÁ, J. Mutation screening of the FBN-1 gene in patients with aortic dilatation. *Acta Universitatis Carolinae, Biologica*, 2005. 49: 259-263. ISSN 0001-7124

ŠÍMOVÁ, J., MAZURA, I., ČAPEK, P. a ZVÁROVÁ, J. Elastická vlákna – rozdělení a funkce mikrofibril. Elastic fibres – Organisation and Function of Microfibrils. *Pohybové ústrojí 15*, 2008. 3+4: 195-202. ISSN 1212-4575

DUDRA, J., LINDNER, J., VANĚK, I., ŠÍMOVÁ, J., MAZURA, I., MILER, I., ČIHÁKOVÁ, J., ČAPEK, P. a BELÁK, J. New Fibrillin Gene Mutation – Possible Cause of Ascending Aortic Dilatation in Patients with Aortic Valve Disease: Preliminary results. *International Journal of Angiology*, 2009. 18 (2).

Přednášky týkající se tématu disertace

DUDRA, J., LINDNER, J., MILER, I., ČIHÁKOVÁ, J., ŠÍMOVÁ, J., ČAPEK, J., ŠKVOR, J., MAZURA, I., ZVÁROVÁ, J., a VÍTKOVÁ, I. Ascending Aortic Dilatation: Etiopatogenesis-Hemodynamic and Genetic Factors, Surgical and Consequences. *Towards the Next Stage*. Osaka, 2006. s. 93-93.

ŠÍMOVÁ, J., ČAPEK, P., DUDRA, J., LINDNER, J. a MAZURA, I. Mutační analýza v FBN-1 genu u osob s poruchou cévní stěny. *3. memoriál prof. J. Matiegky a prof. J. Malého*. Praha: Hrdličkovo muzeum člověka UK, 2006. ISBN 80-239-7230-8.

ŠÍMOVÁ, J., MAZURA, I., ČAPEK, P. a ZVÁROVÁ, J. Elastická vlákna – rozdělení a funkce mikrofibril. Elastic fibres – Organisation and Function of Microfibrils. The 10th Prague-Sydney-Lublin Symposium, 24. – 25. 10. 2007, Lékařský dům, Praha.

ŠÍMOVÁ, J., MAZURA, I., ČAPEK, P., DUDRA, J., LINDNER, J. a ZVÁROVÁ, J. Mutation Analysis of the FBN1 Gene in Czech Patients with Aortic Dilatation. *Human Genome Meeting. Programme and Abstract Book*. London: HUGO, 2007. S. 32-32.

Vybraná abstrakta a příspěvky na konferencích se vztahem k disertaci

ŠÍMOVÁ, J., ČAPEK, P., DUDRA, J., LINDNER, J., MAZURA, I. a ZVÁROVÁ, J. Mutation Analysis of the FBN1 Gene in Czech Patients with Aortic Dilatation. *Human Genome Meeting. Montreal, Canada. Programme and Abstract Book*. London: HUGO, 2007. S. 32-32.

ŠÍMOVÁ, J., ČAPEK, P., DUDRA, J., LINDNER, J., MAZURA, I. a ZVÁROVÁ, J. FBN-1 Gene – Mutation Analysis in Czech Patients with Aortic Dilatation. *Forensica 2008*. Prague 25. - 26. 4. 2008.

ŠÍMOVÁ, J., ČAPEK, P., DUDRA, J., LINDNER, J., MAZURA, I. a ZVÁROVÁ, J. Genetics Analysis of FBN1 Genes in Patients with Ascendant Aortic Dilatation. *The 16th Congress of the European Anthropological Association. Odensee*. 28.- 31.8.2008.

ŠÍMOVÁ, J., MAZURA, I., ČAPEK, P., DUDRA, J., LINDNER, J. a ZVÁROVÁ, J. Mutation Screening of FBN1 Gene in Patients with Ascending Aortic Dilatation. *58th Annual Meeting, The American Society of Human Genetics*. Philadelphia, Pennsylvania. 11. -15. 11. 2008.