

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**



**MUDr. Martin Horváth**

Doktorský studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka

Biologický význam změn cévní stěny a aterosklerotického plátu pro rozvoj  
aterosklerotického postižení věnčitých tepen

The biological significance of changes in the vascular wall and atherosclerotic plaque for  
the development of atherosclerotic disease of the coronary arteries

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Petr Hájek, Ph.D.

Praha 2022

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 29. 12. 2022

MUDr. Martin Horváth

.....

Podpis autora

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych v první řadě rád poděkoval panu prof. MUDr. Josefu Veselkovi, CSc. a svému školiteli doc. MUDr. Petru Hájkovi, Ph.D. Mé poděkování patří i MUDr. Cyrilu Štěchovskému, se kterým jsem rovněž úzce spolupracoval na tomto vědeckém projektu. Za pomoc s provedením laboratorních úkonů při detekci mikroRNA mé vřelé díky patří i mé manželce Mgr. Veronice Horváthové a vedoucímu laboratoře panu prof. Ladislavu Šenoltovi, Ph.D. Dále bych rád poděkoval doc. MUDr. Jakubu Hoňkovi, PhD. za cenné metodické rady a konzultace. V neposlední řadě mé díky patří i mým ostatním spoluautorům.

## ABSTRAKT

Akutní komplikace aterosklerózy jsou typicky způsobené tepenným uzávěrem na podkladě akutní trombózy formující se v místě ruptury tzv. vulnerabilního aterosklerotického plátu (VP). Včasná identifikace VP by mohla napomoci těmto příhodám předcházet. Současné metody pro zhodnocení kardiovaskulárního rizika jsou zaměřeny na opatření na populační úrovni a pro zhodnocení rizika individuálního jedince nejsou dostatečně citlivé a specifické. Disertační práce se proto zabývala možnostmi *in vivo* detekce VP pomocí biomarkerů a zobrazovacích metod. V první části práce jsme se soustředili na detekci mikroRNA (miR), které jsou v posledních letech zkoumány jako slibné biomarkery celé řady onemocnění včetně aterosklerózy. Hladiny miR jsme určovali pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce ve vzorcích periferní žilní krve pacientů ve velmi časně fázi infarktu myokardu s elevací ST segmentů (STEMI), kteří sloužili jako nejbližší klinický model akutní ruptury VP. Výsledky vedly k identifikaci dvou miR (miR-331 a miR-151-3p), které byly deregulovány u STEMI a mohly by být biomarkery VP. V další části výzkumu jsme se zabývali možnostmi invazivního zobrazení VP pomocí intravaskulárního ultrazvuku a blízké infračervené spektroskopie (IVUS a NIRS). Potvrdili jsme možnost bezpečné detekce NIRS dat v karotických tepnách a zkoumali jsme jejich vztah ke konvenčním rizikovým faktorům aterosklerózy. Analyzovali jsme složení karotického plátu v závislosti na rozložení endoteliálního smykového tření (ESS). Vycházeli jsme z faktu, že k destabilizaci a následné ruptuře aterosklerotických plátů dochází typicky v jejich proximální části, kde zrychlený průtok krve způsobuje vysoké ESS. V observační studii jsme vyšetřovali pacienty podstupující na našem pracovišti elektivní karotický stenting. Získaná NIRS data byla analyzována ve vztahu k maximu karotické stenózy. Nejvíce lipidů bylo pozorováno bezprostředně před maximem stenózy a NIRS detekované lipidové jádro se ve shodě s naší hypotézou vyskytovalo častěji v proximální části plátu.

**Klíčová slova:** ateroskleróza, cévní stěna, prevence, vulnerabilní aterosklerotický plát, biomarkery, mikroRNA, zobrazovací metody, intravaskulární ultrazvuk, blízká infračervená spektroskopie

## ABSTRACT

Acute complications of atherosclerosis are typically caused by arterial occlusion due to acute thrombosis forming over a ruptured vulnerable atherosclerotic plaque (VP). Early identification of such VP prior to their rupture could help prevent these events. At the same time, methods for assessing cardiovascular risk are focused on measures at the population level and are not sensitive and specific enough to assess the risk of individual patients. We therefore focused on the possibilities of in vivo detection of VP using biomarkers and invasive imaging methods. First, we focused on the detection of microRNAs (miRs), which have been investigated in recent years as promising biomarkers for a number of diseases, including atherosclerosis. We determined miR levels using quantitative polymerase chain reaction in peripheral venous blood samples from patients in very early phase of ST-elevation myocardial infarction (STEMI), which served as the closest clinical model of acute VP rupture. The results led to the identification of two miRs (miR-331 and miR-151-3p) that were deregulated in STEMI and could be biomarkers of VP. In the next part of the research, we dealt with the possibilities of invasive imaging of VP using intravascular ultrasound and near-infrared spectroscopy (IVUS and NIRS). We confirmed the safety and feasibility of NIRS data collection in carotid arteries and investigated their relationship to conventional risk factors of atherosclerosis. We analysed carotid artery plaque composition as a function of endothelial shear stress (ESS) distribution. Our hypothesis was based on the fact that destabilization and subsequent rupture of atherosclerotic plaques typically occurs in their proximal part, where accelerated blood flow causes high ESS. In an observational study, we examined patients undergoing elective carotid stenting at our hospital. The obtained NIRS data were analysed in relation to the maximum of carotid stenosis. The most lipids were observed immediately before the maximum of the stenosis, and the NIRS-detected lipid core occurred more often in the proximal part of the plaque, in agreement with our hypothesis.

**Key words:** atherosclerosis, vascular wall, prevention, vulnerable atherosclerotic plaque, biomarkers, microRNA, imaging methods, intravascular ultrasound, near-infrared spectroscopy

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACD	pravá věnčitá tepna (z lat. arteria coronaria dextra)
AKS	akutní koronární syndrom
AUC	plocha pod křivkou (z angl. area under the curve)
AP	aterosklerotický plát
apo-B100	apolipoprotein B100
apo-E	apolipoprotein E
Bax	X protein asociovaný s proteinem b-buněčného lymfomu 2 (z angl. BCL-2 associated X protein)
BMP-4	kostní morfogenetický protein 4 (z angl. bone-morphogenic protein-4)
BVS	biodegradabilní stenty (z angl.. biodegradable vascular scaffolds)
CAS	karotický stenting (z angl. carotid artery stenting)
CD14	diferenční skupina 14, tj. povrchový glykoprotein (z angl. cluster of differentiation 14)
CD40 ligand	ligand glykoproteinu diferenční skupiny 40 (z angl. cluster of differentiation 40 ligand)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina (z angl. complementary deoxyribonucleic acid)
CFD	výpočetní dynamika tekutin (z angl. computed fluid dynamics)
CI	interval spolehlivosti (z angl.. confidence interval)
CT	počítačová tomografie (z angl. computed tomography)
CTCAG	CT koronarografie (z angl. computed tomography coronary angiography)
DAPK-1	proteinkináza asociovaná s buněčnou smrtí (z angl.. death-associated protein kinase 1)
DICOM	standardní formát pro zpracování medicínských dat (z angl. digital imaging and communications in medicine)
DNáza	deoxyribonukleáza
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EEM <sub>CSA</sub>	plocha ohraničená lamina elastica externa (z angl. external elastic membrane cross sectional area)
EKG	elektrokardiogram
ESS	endoteliální smykové tření (z angl.. endothelial shear stress)
EMM	lamina elastica externa (z angl. external elastic membrane)
hs-CRP	vysoce senzitivní komplement reaktivní protein (z angl. highly sensitive complement reactive protein)
hsTnI	vysoce senzitivní troponin I (z angl. high sensitivity troponin I)
HR	poměr rizik (z angl. hazard ratio)
ICAM-1	intercelulární adhezní molekula-1 (z angl. intercellular cell adhesion molecule 1)
IL-1 $\beta$	interleukin-1 $\beta$
IL-6	interleukin-6
IQR	mezikvartilové rozpětí (z angl. interquartile range)
IVUS	intravaskulární ultrazvuk (z angl.. intravascular ultrasound)
JAK	Janus kináza
LCBI	bezrozměrné číslo vyjadřující obsah lipidů (z angl. lipid-core burden index)
LCBI <sub>mx</sub> MLA	lipid core burden index ve 4mm úseku v místě minimální plochy lumen
LDL	lipoprotein s nízkou densitou (z angl. low-density lipoprotein)
LRP	aterosklerotický plát s vysokým obsahem lipidů (z angl. lipid-rich plaque)
LTB4	leukotrien B 4
LumenCSA <sub>ref</sub>	referenční plocha lumen
MAP-kináza	mitogenem aktivovaná proteinkináza (z angl. mitogen-activated protein kinases)
maxLCBI <sub>4mm</sub>	oblast 4mm dat s nejvyšší přítomností lipidů (z angl. maximal lipid core burden index per 4 mm)
MCP-1	monocytový chemoatraktant 1
miR	mikroRNA
MLA	minimální plocha lumen (z angl. minimal luminal area)
MMP	matrix metaloproteináza
MRI	magnetická rezonance (z angl. magnetic resonance imaging)
mRNA	informační nebo mediátorová RNA (z angl. messenger RNA)
mTOR	savčí cíl rapamycinu, tj serin/threonin kináza (z angl. mammalian target of rapamycin)
NCA	pacient s normálním koronárním angiogramem (z angl. normal coronary angiography)
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
NIR	záření blízké infračervenému spektru s vlnovou délkou 800–2 500nm (z angl. near-infrared)
NIRS	blízká infračervená spektroskopie (z angl. near-infrared spectroscopy)
NIRS-IVUS	katetrizační vyšetřovací metoda kombinující blízkou infračervenou spektroskopii a intravaskulární ultrazvuk (z angl. near-infrared spectroscopy and intravascular ultrasound)
NO	oxidu dusnatý
OCT	optická koherenční tomografie (z angl. optical coherence tomography)
p53	tumor supresorový protein 53

PB	velikost plátu (z angl. plaque burden)
PCI	perkutánní koronární intervence (z angl. percutaneous coronary intervention)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (z angl. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PI3K/AKT	dráha fosfatidylinositol 3-kinázy/proteinkinázy B
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl.. quantitative polymerase chain reaction)
RIA	ramus interventricularis anterior
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RNáza	ribonukleáza
ROC	operační charakteristika přijímače (z angl. receiver operating characteristic)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
RT	reverzní transkripce
SAA	sérový amyloid A
SD	standardní odchylka (z angl. standard deviation)
SICHS	pacienti se stabilní ischemickou chorobou srdeční
SKG	selektivní koronární angiografie
SOCS1	supresorem cytokinového signalizačního proteinu 1
STAT	převodník signálu a aktivátor transkripce (z angl. signal transducer and activator of transcription)
STEMI	infarkt myokardu s elevací ST segmentů (z angl. ST segment elevation myocardial infarction)
TCFA	fibroaterom s tenkou fibrózní čepičkou (z angl. thin-cap fibroatheroma)
TLR	Toll příbuzné receptory (z angl.. toll-like receptors)
TNF-1 $\alpha$	tumor nekrotizující faktor-1 $\alpha$
TnI	troponin I
VCAM-1	vaskulární buněčná adhezní molekula-1 (z angl. vascular cell adhesion molecule 1)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor)
VH-IVUS	virtuální histologie odvozená z intravaskulárního ultrazvuku (z angl. virtual histology intravascular ultrasound)
VP	vulnerabilní aterosklerotický plát
VSMC	cévní hladké svalové buňky (z angl. vascular smooth muscle cells)

## Obsah

ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
1 ÚVOD .....	11
1.2 Patofyziologie aterosklerózy .....	14
1.3 Vulnerabilní aterosklerotický plát.....	17
1.4 Biomarkery.....	22
1.5 Zobrazovací metody.....	24
1.5.2 Blízká infračervená spektroskopie .....	26
1.6 Endoteliální smykové tření jako marker vulnerabilního aterosklerotického plátu.....	30
2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE .....	34
2.1 Hypotéza 1 .....	34
2.2 Hypotéza 2 .....	34
2.3. Cíle práce .....	34
3 METODIKA .....	35
3.1 Obecné metodické přístupy a definice .....	35
3.1.1 Definice .....	35
3.1.2 Katetrizační metody .....	36
3.1.2.1 Selektivní koronární angiografie.....	36
3.1.2.2. Perkutánní koronární intervence .....	36
3.1.2.3. Karotický stenting .....	37
3.1.2.4 Zobrazení pomocí NIRS-IVUS .....	38
3.1.3 Statistická analýza.....	39
3.2 Experiment 1 - MikroRNA-331 a mikroRNA-151-3p jako biomarkery u pacientů s infarktem myokardu s elevací ST segmentů .....	39
3.2.1 Přehled designu studie.....	39
3.2.2 Skriningová fáze studie .....	40
3.2.3 Observační fáze studie .....	43
3.2.3.1 Charakteristika souboru.....	43
3.2.3.2 Nemocniční fáze zpracování vzorků .....	44
3.2.3.4 Laboratorní fáze zpracování vzorků.....	46
3.2.3.4.1 Izolace celkové RNA a její kvantifikace .....	46

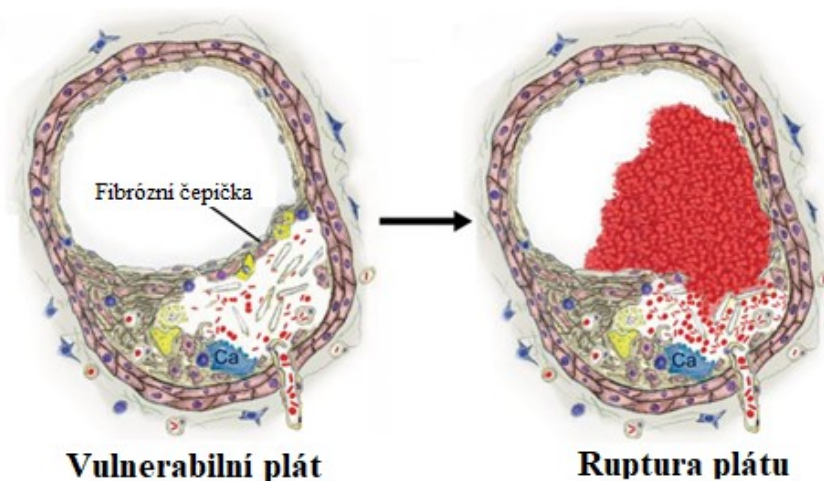


3.2.3.4.2 Analýza studijních miR .....	46
3.3 Experiment 2 - Blízká infračervená spektroskopie spojená s intravaskulárním ultrazvukem v karotických arteriích.....	48
3.4 Experiment 3 - Analýza složení karotického plátu pomocí intravaskulární spektroskopie v závislosti na vlivu endoteliálního smykového tření .....	49
3.4.1 Design studie a charakteristika souboru .....	49
3.4.2 Metodika zobrazení .....	50
3.4.3 Analýza NIRS-IVUS dat.....	51
4 VÝSLEDKY .....	52
4.1 Experiment 1 - MikroRNA-331 a mikroRNA-151-3p jako biomarkery u pacientů s infarktem myokardu s elevací ST segment .....	52
4.1.1 Charakteristika souboru.....	52
4.1.2 Bezpečnost a proveditelnost.....	53
4.1.3 Pozitivní kontroly - biomarkery akutních koronárních syndromů .....	54
4.1.4 Biomarkery aktivace krevních destiček .....	55
4.1.5 Biomarkery nekrózy myokardu.....	56
4.1.6 Výsledky studijních mikroRNA .....	57
4.1.6.1 MikroRNA-331 .....	57
4.1.6.2 MikroRNA-151-3p.....	58
4.2 Experiment 2 - Blízká infračervená spektroskopie spojená s intravaskulárním ultrazvukem v karotických arteriích.....	59
4.3 Experiment 3 - Analýza složení karotického plátu pomocí intravaskulární spektroskopie v závislosti na vlivu endoteliálního smykového tření .....	61
4.3.1 Charakteristika souboru.....	61
4.3.2 Bezpečnost a proveditelnost.....	62
4.3.3 Analýza dat z blízko-infračervené spektroskopie a intravaskulárního ultrazvuku.....	62
5 DISKUSE.....	64
5.1 Experiment 1 - MikroRNA-331 a mikroRNA-151-3p jako biomarkery u pacientů s infarktem myokardu s elevací ST segment.....	66
5.1.1 Pozitivní kontroly.....	67
5.1.2 Biomarkery myokardiální nekrózy.....	67
5.1.3 Biomarkery aktivace krevních destiček .....	68
5.1.4 MikroRNA-331 .....	68
5.1.5 MikroRNA-151-3p.....	73

5.1.6 Limitace studie .....	75
5.2 Experiment 2 - Blízká infračervená spektroskopie spojená s intravaskulárním ultrazvukem v karotických arteriích.....	76
5.3 Experiment 3 - Analýza složení karotického plátu pomocí intravaskulární spektroskopie v závislosti na vlivu endoteliálního smykového tření .....	77
6 ZÁVĚR .....	80
7 SOUHRN .....	81
7.1 MikroRNA-331 a mikroRNA-151-3p jako biomarkery u pacientů s infarktem myokardu s elevací ST segment .....	81
7.2 Blízká infračervená spektroskopie spojená s intravaskulárním ultrazvukem v karotických arteriích .....	81
7.3 Analýza složení karotického plátu pomocí intravaskulární spektroskopie v závislosti na vlivu endoteliálního smykového tření .....	81
8 SUMMARY .....	82
8.1 MicroRNA-331 and microRNA-151-3p as biomarkers in patients with ST-segment elevation myocardial infarction.....	82
8.2 Near-infrared spectroscopy combined with intravascular ultrasound in carotid arteries ...	82
8.3 Carotid artery plaque composition and distribution: near-infrared spectroscopy and intravascular ultrasound analysis .....	82
9 LITERATURA.....	83
10 SEZNAM PUBLIKACÍ A PREZENTOVANÝCH ABSTRAKTŮ.....	99

## 1 ÚVOD

Ateroskleróza je onemocnění, které sužuje lidstvo po tisíciletí a její známky můžeme nalézt již na Egyptských mumiiích (Melanie et al., 2006). Onemocnění, která způsobuje, jsou v dnešní době hlavní příčinou morbiditu a mortality na celém světě (Roth et al., 2017). Intenzivní výzkum změn cévní stěny začal již v první polovině 19. století, kdy francouzský chirurg a patolog německého původu Jean Lobstein ve své práci zavedl termín „arterioskleróza“ (Melanie et al., 2006). Akutní komplikace aterosklerózy (akutní koronární syndromy, náhlá koronární smrt, cévní mozkové příhody) jsou v dnešní době obecně považovány za důsledek aterotrombózy, neboli náhle vzniklé intraluminální trombózy vznikající na aterosklerotickém plátu (obr. 1) (Virmani et al., 2006).



Obr. 1 - Ruptura fibroatheromu s tenkou fibrózní čepičkou vede k aktivaci koagulační kaskády a tvorbě intrakoronárního trombu (upraveno podle Bentzon et al., 2014).

Základy tohoto paradigmatu byly nadneseny již na konci 19. století legendárním patologem Rudolfem Virchowem, který popsal princip vzniku žilní trombózy na základě nepoměru třech hlavních faktorů, dnes známých jako takzvaná Virchowova trias (Kushner et al., 2021). Zabýval se nicméně i aterosklerotickým postižením tepen (Kushner et al., 2021). Dá se říci, že byl prvním výzkumníkem, který se na problematiku aterosklerózy podíval na skutečně buněčné úrovni a správně rozpoznal, že důležitou roli v rozvoji aterosklerotického plátu hraje infiltrace zánětlivými buňkami (Kushner et al., 2021). Aterosklerotický plát připodobnil k dermální cystě a popsal, že obsahuje lipidové jádro a

vrstvy hladkých svalových buněk (Moguel-Ancheita a Samaniego, 2021). Nedlouho po jeho smrti bylo rozpoznáno, že lipidové jádro aterosklerotického plátu obsahuje cholesterol a je kryto vrstvou kalcifikované pojivové tkáně (Melanie et al., 2006). Následně byla na zvířecím modelu prokázána souvislost mezi dietou bohatou na cholesterol a rozvojem aterosklerotických plátů (Melanie et al., 2006). Další zásadní pokrok ve výzkumu paradoxně iniciovalo onemocnění samotné, když předčasné úmrtí oblíbeného prezidenta Spojených států amerických Franklina D. Roosevelta na cévní mozkovou příhodu, bylo stimulem k financování takzvané Framinghamské studie (Hajar, 2017). Tato rozsáhlá observační studie vedla v roce 1957 k popisu klasických rizikových faktorů rozvoje aterosklerózy (Dawber et al., 1951; Hajar, 2017). Rozlišujeme je na faktory ovlivnitelné (modifikovatelné) a neovlivnitelné (tab. 1) (Hajar, 2017). Mezi modifikovatelné rizikové faktory patří zejména – vysoký krevní tlak, vysoká hladina cholesterolu, diabetes mellitus, kouření, nadváha, nedostatek fyzické aktivity a stres (Hajar, 2017). Mezi neovlivnitelné faktory pak řadíme věk, pohlaví, rodinnou anamnézu a rasu (Hajar, 2017). Tyto jednoduché parametry nám zásadně pomáhají v hodnocení kardiovaskulárního rizika a jsou stále pilířem současného skriningového programu a prevence ischemické choroby srdeční (Horváth et al., 2014). Rozvoj moderních výzkumných metod pak v posledních dekádách vedl k mnohem detailnějšímu pochopení patofyziologie celého procesu na patologicko-anatomické, buněčné, ale i molekulárně biologické úrovni (Horváth et al., 2014). Tyto poznatky jsou zásadní nejen pro obecné porozumění celému procesu, ale zejména pro jejich klinické důsledky v primární i sekundární prevenci.

Tab. 1 - Klasické rizikové faktory aterosklerózy

Neovlivnitelné	Ovlivnitelné
Věk	Kouření
Mužské pohlaví	Dyslipidémie
Rodinná anamnéza	Arteriální hypertenze
	Diabetes mellitus
	Nízká fyzická aktivita

Termín vulnerabilní aterosklerotický plát (VP) byl definován v roce 1989 jako postižení s vysokým rizikem ruptury a tedy vzniku AKS (Muller et al., 1989). Od té doby byla odhalení podkladu VP věnována velká pozornost. Je zjevné, že včasná identifikace těchto vysoce rizikových plátů u stabilních pacientů a prevence jejich ruptury by mohla vést ke snížení incidence aterotrombotických příhod (Horváth et al., 2014). Z toho důvodu je vyvíjeno značné úsilí v detekci typických charakteristik VP in vivo. Teoreticky je mnoho možností jak tyto charakteristiky detekovat pomocí řady biomarkerů, neinvasivních a rovněž invazivních zobrazovacích metod (Sanon et al., 2013; Bruggink et al., 2010; Goldstein et al., 2011; Madder et al., 2013; Brugaletta et al., 2011; Stone et al., 2011; Motoyama et al., 2013; Calvert et al., 2011; Dohi et al., 2015; Kato et al., 2012; Suh et al., 2011; Schaar et al., 2003; de Korte et al., 2002). Zvláštní kapitolou je kvantifikace endoteliálního smykového tření pomocí různých metod, které je rovněž asociováno s vulnerabilitou plátu (Lee a Chiu, 2019; Brown et al., 2016; Samady et al., 2011). Vulnerabilní plát je nicméně dynamická struktura a ne všechny pláty, které se vyznačují patologickoanatomickými charakteristikami nestability plátu, způsobí aterotrombotickou příhodu (Stone et al., 2011). Anatomickým korelátem vulnerabilního plátu mohou navíc být tři druhy aterosklerotických lézí (fibroaterom s tenkou fibrózní čepičkou, eroze plátu a kalcifikovaný nodule), které mají do značné míry odlišné charakteristiky a biologickou aktivitu (Virmani et al., 2006). Z tohoto pohledu je zásadní detailní pochopení celého procesu destabilizace aterosklerotického plátu, přičemž pravděpodobnou odpovědí pro

jakýsi hypotetický skrínigový program bude kombinace anatomického a funkčního zobrazení plátů in vivo a určení hladin vhodných biomarkerů.

## 1.2 Patofyziologie aterosklerózy

Ateroskleróza je chronické, progresivní onemocnění cévní výstelky, které se vyskytuje v typických predilekčních oblastech tepen (Insull, 2009). Prvním krokem v rozvoji aterosklerotického plátu je patrně poranění endotelií dosud neznámou noxou (Bentzon et al., 2014). Toto umožňuje průnik lipoproteinů s nízkou denzitou (LDL) do intimy, kde dochází k jejich oxidaci a agregaci (Bentzon et al., 2014). Na procesu se podílí změněná genová exprese endotelií v místech turbulentního krevního toku (Wentzel et al., 2012). Tento proces iniciuje přirozenou (neadaptivní) zánětlivou reakci a vede k pohlcení oxidovaných LDL částic makrofágy (Mangge a Almer, 2019; Bentzon et al., 2014). Většina makrofágů se, pravděpodobně vlivem vazby modifikovaného LDL na receptory rozpoznávající vzory (např. Toll-like receptory [TLR]), diferencuje do prozánětlivého M1 fenotypu (Bentzon et al., 2014). Tyto pak produkují prozánětlivé cytokiny (např. interleukin-1 $\beta$  [IL-1 $\beta$ ], tumor nekrotizující faktor-1 $\alpha$  [TNF-1  $\alpha$ ], monocytový chemoatraktant 1 [MCP-1], či leukotrien B 4 [LTB4]) (Mangge a Almer, 2019; Bentzon et al., 2014). Dochází rovněž k nadměrné expresi proteolytických enzymů matrix metaloproteináz (MMP) a k dysbalanci jejich hladin s inhibitory (Mangge a Almer, 2019; Bentzon et al., 2014). Zvyšuje se tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS), které podporují další zadržování a modifikaci LDL, stejně jako mnoho dalších mediátorů, u kterých bylo prokázáno, že hrají roli v rozvoji aterosklerózy (např. aktivátory plazminogenu, katepsiny) (Bentzon et al., 2014). Pod vlivem tohoto procesu dochází k indukci endoteliálních buněk a buněk hladkého svalstva, která vede na epigenetické úrovni k modifikaci jejich genové exprese (Lee a Chiu, 2019). Dochází ke zvýšení exprese adhezních molekul (např. vaskulární buněčná adhezní molekula-1 [VCAM-1] a intercelulární adhezní molekula-1 [ICAM-1]), chemoatraktantů (např. MCP-1) a růstových faktorů (např. faktor stimulující kolonie makrofágů a faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů), které umožňují další infiltraci tvořícího se aterosklerotického plátu nejen buňkami monocyto/makrofágového systému, ale i buňkami účastnícími se adaptivní imunitní odpovědi (Mangge a Almer, 2019; Bentzon et al., 2014) Mezi tyto řadíme zejména Th1 a

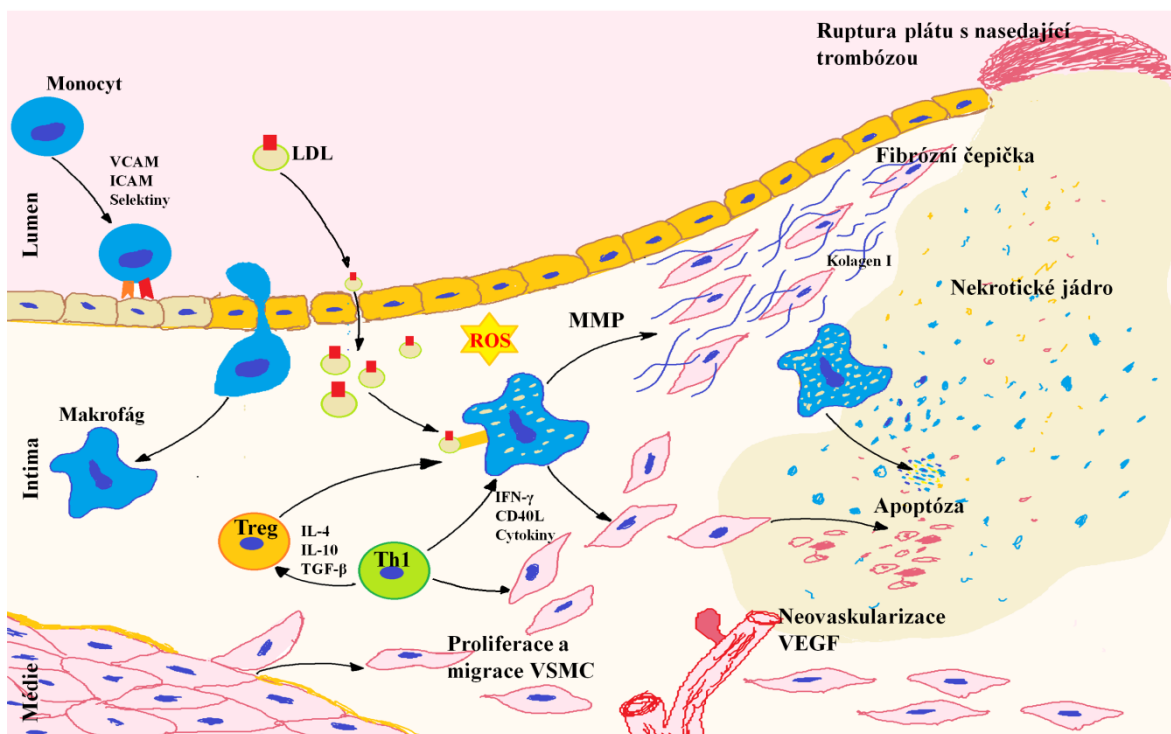
Th17 lymfocyty, ale v menší míře i B lymfocyty (Gisterå a Hansson, 2017). Tyto buňky spouští již získanou (adaptivní) imunitní odpověď zejména proti oxidovanému apo-B100 a dále tak potencují prozánětlivou reakci (Gisterå a Hansson, 2017). Současně dochází vlivem těchto změn k rozvoji endoteliální dysfunkce (Halcox, 2012). Ta je, kromě již uvedeného, charakterizována nerovnováhou mezi vazodilatací a vazokonstrikcí vyvolanou zejména nedostatkem biologické dostupnosti oxidu dusnatého (NO), zvýšením hladin ROS a prozánětlivých faktorů (Halcox, 2012). V pozdějších fázích se podílí na trombóze a ruptuře plátu (Halcox, 2012). Makrofágy a dendritické buňky postupně pomocí tzv. „scavenger“ receptorů pohlcují oxidované agregáty LDL a stávají se z nich pěnové buňky (Bentzon et al., 2014). Jejich akumulace vede k rozvoji již viditelných žlutavých proužků v cévách a v této fázi mluvíme o nejčasnějším stádiu aterosklerotického plátu, které nazýváme xanthom (Bentzon et al., 2014). Toto stádium je ještě plně reverzibilní (Bentzon et al., 2014). Rychlost progresu výše popsaného procesu je ovlivňována nejen samotnou hladinou LDL, ale i působením ostatních typických rizikových faktorů aterosklerózy (Bentzon et al., 2014). Jedná se samozřejmě o systémově působící parametry, jejichž vliv by měl být rozložen uniformně v celém krevním řečišti (Kwak et al., 2014). Z klinické praxe nicméně dobře víme, že k další progresi aterosklerotických plátů a k rozvoji klinicky významného aterosklerotického postižení dochází v typických predilekčních oblastech (Kwak et al., 2014). Ty zahrnují zejména ohyby tepen a jejich bifurkace (Hung et al., 2015). Tento na první pohled nelogický jev se běžně vysvětluje přímým hemodynamickým účinkem proudící krve na endoteliální buňky (Lee a Chiu, 2019). Poruchy v laminaritě krevního toku ovlivňují endoteliální smykové tření (ESS), které definujeme jako třecí sílu vyvíjenou krevním tokem na danou plochu endotelu (Fernandes et al., 2018; Makris et al., 2010). Výzkum v posledních desetiletích prokázal, že ESS je nezávislým rizikovým faktorem aterosklerózy (Cunningham a Gotlieb, 2005).

Právě v těchto predilekčních oblastech dochází k postupnému rozvoji pokročilejších stádií aterosklerotického plátu (Bentzon et al., 2014). Další akumulací acelulárního materiálu bohatého na lipidy v intimě dochází k jejímu patologickému ztluštění (Bentzon et al., 2014). Progrese akumulace lipidových hmot, spojená s apoptózou a nekrózou pěnových a hladkých svalových buněk, vede již k narušení struktury intimy a rozvoji tzv. nekrotického

jádra vyplněného kašovitou hmotou tvořenou lipidy a buněčným detritem (Bentzon et al., 2014). V této fázi již z histologického pohledu hovoříme o fibroateromu (Bentzon et al., 2014). Nárůst počtu buněk podstupujících apoptózu postupně vede k vyčerpání možností tyto efektivně odstraňovat (efferocytóza), což vede k akumulaci apoptotických zbytků a růstu nekrotického jádra (Bentzon et al., 2014). Pod vlivem růstových faktorů dochází v tomto pokročilém aterosklerotickém plátu k neovaskularizaci z vasa vasorum (Bentzon et al., 2014). Nově vznikající cévy jsou velmi fragilní a představují další cestu pro buněčnou infiltraci, akumulaci plasmatických proteinů a způsobují krvácení do nekrotického jádra, které dále potencuje jeho progresi a zánětlivou odpověď (Bentzon et al., 2014). Zejména vlivem proliferujících, fenotypicky modulovaných, aktivovaných hladkých svalových buněk dochází postupně k další změně struktury intimy spojené s akumulací na kolagen I bohaté pojivové tkáni mezi lumenem cévy a nekrotickým jádrem (Bentzon et al., 2014). Tuto tkáň nazýváme fibrózní čepičkou (Bentzon et al., 2014). Apoptotické buňky, extracelulární matrix a další obsah nekrotického jádra působí jako precipitační jádro pro mikroskopické kalcifikace, které jsou znakem pokročilého, nestabilního aterosklerotického plátu (Bentzon et al., 2014). Nerovnováha mezi proteolytickým působením MMP, produkovaných makrofágy, a produkcí extracelulární matrix (kolagen I a III) nakonec vede k postupnému ztenčení fibrózní čepičky a rozvoji tzv. fibroateromu s tenkou fibrózní čepičkou (Bentzon et al., 2014).

Po desetiletích pomalé progresi mohou takové pláty způsobit obtíže z důvodu postupného zúžení tepny, které podmiňuje ischemii a z ní plynoucí symptomy (Bentzon et al., 2014). V klinické praxi je však problémem fakt, že mnoho lézí podléhá tzv. Glagovovu jevu, tedy excentrické remodelaci cévy v místě plátu (Korshunov et al., 2007). Díky tomuto mechanismu řada pokročilých aterosklerotických plátů zůstává klinicky němá a mohou se projevit až svou rupturou resultující v život ohrožující arteriální trombózu (Bentzon et al., 2014). Právě tato postižení typicky popisujeme jako VP.





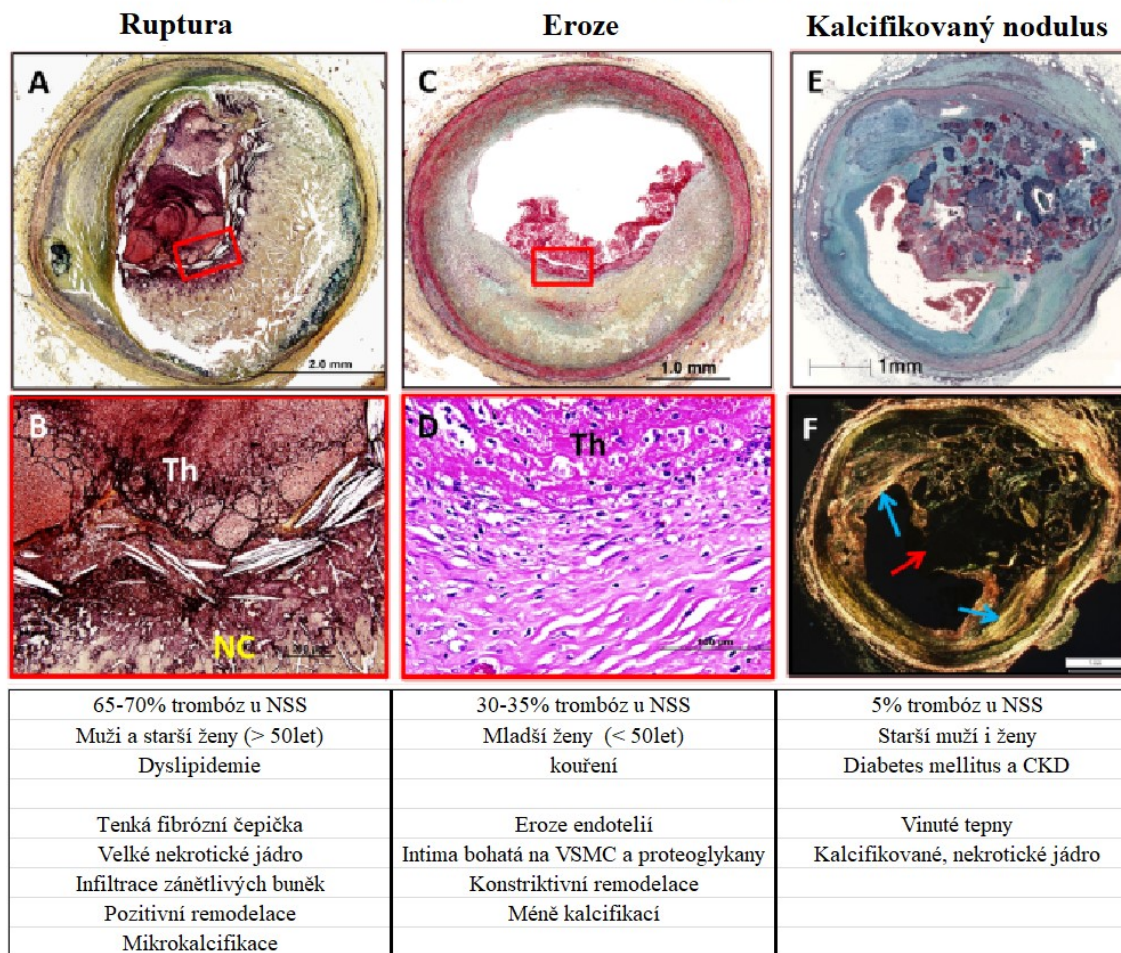
Obr. 2 - Poranění endotelií jejich dysfunkce vede k atrahování buněk monocyto-makrofágového systému a umožňuje průnik LDL do intimy. Dochází k rozvoji neadaptivní zánětlivé reakce a k pohlcení oxidovaných LDL částic makrofágy, které produkují prozánětlivé cytokiny a dále potencují zánětlivou odpověď včetně stimulace adaptivní imunitní odpovědi především cestou Th1 lymfocytů. Dochází k indukci endoteliálních buněk a buněk hladkého svalstva, která vede ke změně genové exprese. Současně dochází k rozvoji endoteliální dysfunkce. Makrofágy a dendritické buňky postupně pomocí „scavenger“ receptorů pohlcují oxidované agregáty LDL a stávají se z nich pěnové buňky. Progrese akumulace lipidových hmot, spojená s apoptózou a nekrotizací pěnových a hladkých svalových buněk, vede již k narušení struktury intimy a rozvoji a postupné progresi tzv. nekrotického jádra. Pod vlivem růstových faktorů dochází v tomto pokročilém aterosklerotickém plátu k neovaskularizaci z vasa vasorum, která vede ke krvácení do nekrotického jádra a dále potencuje jeho progresi a zánětlivou odpověď. Vlivem migrujících syntetických hladkých svalových buněk dochází k akumulaci na kolagen I bohaté tkáň tvořící fibrózní čepičku. Nerovnováha mezi proteolytickým působením MMP, produkovaných makrofágy, a produkcí extracelulární matrix nakonec vede k postupnému ztenčení fibrózní čepičky a k ruptuře (upraveno podle Wilck a Ludwig, 2014).

### 1.3 Vulnerabilní aterosklerotický plát

Cévní mozkové příhody a AKS, jsou způsobeny nerovnováhou mezi spotřebou kyslíku a průtokem krve (Birnbbaum et al., 2014). Z patofyziologického pohledu jsou nejčastěji důsledkem akutní okluze tepny na podkladě trombózy vznikající na rupturovaném aterosklerotickém plátu, která vede k oblenění toku krve do příslušného povodí (Birnbbaum et al., 2014). To má za následek akutní ischemii, která vede k nekróze postižené tkáně, pokud nedojde k rychlé reperfúzi (Birnbbaum et al., 2014).

Termín VP byl zaveden před více než třemi dekádami pro popis takových aterosklerotických lézí, které s vysokou pravděpodobností způsobí AKS (Goldstein et al., 2011; Muller et al., 1989). Jeho koncept lze jistě přenést i do ostatních tepenných povodí (Goldstein et al., 2011; Muller et al., 1989). Jedná se o funkčně definované postižení, což vhodně nastiňuje i naši strastiplnou cestu v pátrání po jejím klinickém, laboratorním a anatomickém korelátu. Z pitevních studií je známo, že mezi obrazy nejčastěji nalezené v terénu akutní koronární trombózy patří kalcifikovaný nodulus, eroze plátu a zejména fibroaterom s tenkou fibrózní čepičkou (thin-cap fibroatheroma: TCFA) (obr. 3) (Virmani et al., 2006).

## Typy vulnerabilních plátů



Obr. 3 - Příklady různých typů vulnerabilního aterosklerotického plátu. Panel A - ruptura TCFA. Panel B - zvětšení oblasti ruptury tenké fibrózní čepičky vyznačené v panelu A červeným obdélníkem. Panel C - obraz eroze plátu s výrazným patologickým intimálním ztluštěním. Panel D - zvětšení oblasti eroze plátu s nasedající intraluminální trombózou vyznačené v panelu C červeným obdélníkem. Panel E - kalcifikovaný nodulus. Panel F - Stejný preparát jako v panelu E barvený pomocí pikrosiriové červeně zvýrazňující přítomnost kolagenu. V oblasti ruptury kalcifikovaného nekrotického jádra není patrný kolagen (červená šipka), zatímco v místě obou ramének plátu je kolagen přítomen (modré šipky) (upraveno podle Sato et al., 2022). NSS- náhlá srdeční smrt, VSMC- hladké svalové buňky, CKD- chronické renální sehlání

První dvě postižení se poněkud vyjímají z obecně přijímaného paradigmatu aterotrombózy na podkladě ruptury aterosklerotického plátu (Virmani et al., 2000). Kalcifikovaný nodulus je ze všech tří nálezů nejméně častý a způsobuje cca 5% případů aterotrombózy u pacientů s náhlou koronární smrtí (Virmani et al., 2006; Virmani et al., 2000; Yahagi et al. 2015). Jedná se o aterosklerotický plát, kterému dominují silně kalcifikované vrstvy intimy

nasedající na oblast zesílené a silně fibrotické tepny (Virmani et al., 2000). Může v něm být přítomno nekrotické jádro (Virmani et al., 2000). Typicky je kalcifikované nekrotické jádro velmi chudé na kolagenní vlákna (Sato et al., 2022). Naopak oblasti v proximální a distální části léze jsou bohaté na výše popsaná tuhá, výrazně kalcifikovaná, kolagenní vlákna (Sato et al., 2022). Vzhledem k vzácnosti tohoto nálezu není jeho patofyziologie dobře popsána (Virmani et al., 2000; Sakamoto et al., 2018). Z dosud nepříliš detailně pochopeného důvodu dochází k polámání kalcifikovaných vrstev a rozvoji destičkového trombu (Sakamoto et al., 2018). Podkladem může být zánětlivá aktivita, ale možná i prosté mechanické poškození kalcifikované intimy (Sakamoto et al., 2018). Torzní síly v mechanicky namáhaných tepnách by mohly vést k disrupci na kolagen chudého nekrotického jádra (Sato et al., 2022). Tuto domněnku podporuje fakt, že je trombóza nasedající na tento druh postižení pozorována častěji v mechanicky, torzně namáhaných tepnách, mezi které patří vnitřní karotidy, střední segment pravé věnčité tepny a ramus interventricularis anterior (Virmani et al., 2006; Virmani et al., 2000). Kalcifikovaný nodulus je typickým nálezem ve vinutých tepnách starších pacientů (Sakamoto et al., 2018).

Eroze plátu je histologický popis nálezu, který vede k aterotrombóze bez průkazu ruptury plátu (Virmani et al., 2006; Virmani et al., 2000). Pro tento druh postižení tepny je typická absence endotelií v místě eroze, která vede ke kontaktu intimy s krví. To způsobuje aktivaci koagulační kaskády a následnou aterotrombózu (Virmani et al., 2006; Virmani et al., 2000). Podkladem jsou typicky časnější stádia vývoje aterosklerotického plátu, zejména patologické intimální ztlustění, či fibroaterom s vyvinutou fibrózní čepičkou (Virmani et al., 2006; Virmani et al., 2000). Ve shodě s tímto je i pozorování, že je v afekci většinou pouze nevýrazná zánětlivá infiltrace (Virmani et al., 2006; Virmani et al., 2000). Někteří autoři spekulují, že by se na patofyziologii AKS, vznikající v terénu eroze plátu mohl podílet i koronární vasospasmus, neboť eroze je charakterizována rovněž zesílením svaloviny medie (Virmani et al., 2006; Virmani et al., 2000). Eroze plátu byly popsány až u 30 % případů náhlého koronárního úmrtí a vyskytují se typicky u kuřáků mladšího věku (Virmani et al., 2000; Yahagi et al., 2015). Nejčastěji se jedná o ženy před menopauzou (Virmani et al., 2000).

Nejvíce pozornosti je ve výzkumu věnováno TCFA. Tento poslední typ aterosklerotického postižení je v kontextu AKS zdaleka nejčastější (způsobuje cca 70% všech AKS u pacientů s náhlou srdeční smrtí) a je podkladem klasického paradigmatu, ve kterém akutní ruptura aterosklerotického plátu vede k následné intrakoronární trombóze (Horváth et al., 2014; Virmani et al., 2000).

Právě tyto pláty se typicky vyskytují v proximálních oblastech věnčitých tepen, v místě narušeného ESS (Pedrigi et al., 2014). Z histologie víme, že se tento typ aterosklerotického plátu vyznačuje objemným nekrotickým jádrem z lipidových a buněčných depozit, které je kryté tenkou fibrózní čepičkou o šířce < 65  $\mu\text{m}$  (Virmani et al., 2006). Plát typicky obsahuje pouze malé množství buněk hladkého svalstva, ale naopak se vyznačuje vysokou zánětlivou aktivitou a histologicky v něm nalezneme četné leukocyty a makrofágy (Virmani et al., 2006). Mezi další typické rysy těchto rizikových aterosklerotických plátů patří neovaskularizace a s ní asociované krvácení, adventiciální zánět a mikrokalciifikace (Pedrigi et al., 2014). Pro TCFA je typická excentrická remodelace, díky které i objemné aterosklerotické pláty nezpůsobují významné zúžení lumen a zůstávají klinicky němé (Pedrigi et al., 2014). Vlivem zánětlivé aktivity a proteolytického účinku MMP pak u některých dojde k ruptuře, která nejčastěji proběhne jako klinicky němá příhoda, ale může způsobit život ohrožující stav (Bentzon et al., 2014). Předpokládá se, že pokročilý aterosklerotický plát podléhá opakovaným subklinickým rupturám s epizodami nástěnné trombózy (Badimon a Vilahur, 2014). Její organizace a hojení vedou ke skokovému nárůstu objemu plátu. Vývoj TCFA stále do značené míry neumíme predikovat a ze studií víme, že výskyt nežádoucích kardiovaskulárních příhod je během sledování v místech TCFA poměrně nízký (roční incidence v řádu jednotek procent) (Pedrigi et al., 2014; Stone et al., 2011). Pozitivní prediktivní hodnota metod, které se soustředí pouze na anatomické charakteristiky TCFA je tedy stále poměrně nízká (Stone et al., 2011). Pravděpodobně je pro rozvoj okluzivní trombózy nasedající na rupturovaný plát nutná souhra mnoha nežádoucích okolností, včetně prokoagulačního stavu, aktivace zánětu a působení mnoha dalších vlivů. Je zjevné, že bude nutné patofyziologii ruptury TCFA a nasedající trombózy detailněji pochopit, abychom byli schopni lépe predikovat jejich vývoj. To je nezbytnou

podmínkou účinné primární prevence, která by vedla ke snížení incidence akutního infarktu myokardu a náhlé srdeční smrti (Horváth et al., 2014).

#### **1.4 Biomarkery**

Konvenční rizikové faktory jsou jednoduché biomarkery, které nám zásadně pomáhají v hodnocení kardiovaskulárního rizika a jsou pilířem současného skrínigového programu pro prevenci aterosklerózy a jejích komplikací (Visseren et al., 2021). Staví především na výsledku rozsáhlých, observačních, populačních studií (Hajar, 2017; Visseren et al., 2021). Pomocí tabulek SCORE v Evropě běžně odhadujeme kardiovaskulární riziko v následujících letech a na základě této informace rozhodujeme o preventivních opatřeních (Visseren et al., 2021). Faktem však zůstává, že riziko jednoho individuálního pacienta nejsme na základě tohoto postupu schopni dobře odhadnout a preventivní opatření selhávají zejména u pacientů s mírně zvýšeným rizikem (Visseren et al., 2021). Zdá se, že individuální riziko je ovlivněno mnoha dalšími faktory.

Pomyslným motorem v rozvoji aterosklerotického plátu, vedoucím k jeho postupné progresi, destabilizaci a ruptuře, je zánětlivá aktivita (Koenig a Khuseyinova, 2007). Tento proces je souhrou mnoha buněčných pochodů a transformací, které vedou k odlišné produkci různých cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a enzymů (Koenig a Khuseyinova, 2007). Tyto způsobují aktivaci endotelií, proliferaci hladkých svalových buněk, progresi lézí a nakonec degradaci fibrózní čepičky a destabilizaci plátu (Koenig a Khuseyinova, 2007). Dnes lze mnoho z těchto molekul měřit citlivými testy (Koenig a Khuseyinova, 2007). V mnoha případech se ukázalo, že zvýšené koncentrace v oběhu jsou spojeny s budoucími kardiovaskulárními příhodami (Koenig a Khuseyinova, 2007).

Moderní poznatky navíc potvrdily, že vztah mezi zánětlivou odpovědí a rozvojem aterosklerózy není pouhou asociací, ale jedná se do značné míry o kauzalitu (Ridker et al., 2008; Tibaut et al., 2019). Rozsáhlá prospektivní studie JUPITER prokázala, že u zdravých pacientů, bez klinicky manifestované aterosklerózy a bez elevace cholesterolu podle konvenčních norem, nicméně s elevací hs-CRP, vede léčba pomocí vysoké dávky 20mg rosuvastatinu denně k významné redukci kardiovaskulárních příhod během dvouletého sledování (Ridker et al., 2008). Ještě přesvědčivější důkaz o významu zánětu v

patofyziologii aterosklerózy přinesla v roce 2017 studie CANTOS (Ridker et al., 2017). Do této, randomizované, dvojité zaslepené, prospektivní studie bylo zařazeno více než deset tisíc pacientů, kteří již prodělali infarkt myokardu a měli reziduální zánět definovaný pomocí mírné elevace hs-CRP. Pacienti byli randomizováni do čtyř skupin a léčeni pomocí placeba (a veškeré konvenční léčby užívané u pacientů po infarktu myokardu), nebo tři různých dávek monoklonální protilátky proti IL-1 $\beta$  canakinumabu (Ridker et al., 2017). Terapie nejvyšší dávkou léku vedla během čtyřletého sledování k mírnému snížení rekurence kardiovaskulárních příhod, i přestože pacienti dostávali optimální konvenční terapii. Je nutno zmínit, že léčba vedla ke zvýšení incidence infekčních komplikací a nebyl pozorován vliv na celkovou mortalitu (Ridker et al., 2017).

Výzkum biomarkerů se nejprve soustředil na takové, které jsme schopni jednoduše stanovit relativně běžnými sérologickými metodami. Takto jsou stanovovány například reaktanty akutní fáze, mezi které patří sérový amyloid A (SAA) a zejména vysoce senzitivním testem stanovená hladina komplement reaktivního proteinu (hs-CRP) (Tibaut et al., 2019). Další možností, která byla zkoumána, je stanovování hladin jednotlivých cytokinů (inteleukiny, TNF- $\alpha$ , MCP-1) (Tibaut et al., 2019). Někteří autoři se soustředili i na jiné vlastnosti nestabilního plátu jako jsou subklinické epizody nástěnné trombózy (Tibaut et al., 2019). Bylo prokázáno, že zvýšená hladina fibrinogenu je rovněž asociována s kardiovaskulárními příhodami (Tibaut et al., 2019). Nevýhodou těchto metod je nicméně jejich nízká specificita (Tibaut et al., 2019). Právě z tohoto důvodu se výzkumné úsilí dále zaměřilo na molekuly konkrétněji asociované s aterosklerotickým plátem. Ze sérologicky stanovených testů lze v tomto ohledu zmínit stanovení hladin adhezivních molekul (VCAM-1, ICAM-1), hladin proteolytických enzymů (MMP), hladin oxidovaného LDL, nebo molekul souvisejících s aktivací monocyto/makrofágového systému (solubilní CD40 ligand, myeloperoxidáza) (Tibaut et al., 2019).

V posledních letech se výzkum biomarkerů aterosklerózy zaměřil rovněž na její patofyziologii na úrovni genomu (Leistner et al., 2016; Kaudewitz et al., 2015; Fichtlscherer et al., 2011). Je zjevné, že právě deregulace na této úrovni vede ke změně genové exprese ve specifických buňkách a v konečném důsledku ke změně hladin všech výše uvedených proteinů. Velmi zajímavá je zejména observace působků, kterými je

genová exprese ovlivňována na epigenetické úrovni. Mezi těmito se v posledních letech zdají být velmi slibné tzv. mikroRNA (miR). Jedná se o malé nekódující molekuly RNA, které působí jako modifikátory genové exprese (Feinberg a Moore, 2016; Economou et al., 2015; Kaudewitz et al., 2015). Jakmile se navážou na cílovou mRNA, mohou způsobit její degradaci nebo potlačení jejich translace (Feinberg a Moore, 2016; Economou et al., 2015; Kaudewitz et al., 2015). MikroRNA tedy řídí mnoho buněčných procesů a hrají roli v patogenezi různých onemocnění, která zahrnují aterosklerózu (Feinberg a Moore, 2016; Economou et al., 2015; Kaudewitz et al., 2015). Molekuly jsou velmi stabilní, snadno detekovatelné pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) a jsou relativně tkáňově specifické (Leistner et al., 2016; Kaudewitz et al., 2015; Fichtlscherer et al., 2011). Díky těmto vlastnostem se miR jeví jako velmi vhodné biomarkery (Leistner et al., 2016; Kaudewitz et al., 2015; Fichtlscherer et al., 2011). Hladiny některých specifických miR byly asociovány s aterosklerózou, resp. vulnerabilním aterosklerotickým plátem (Leistner et al., 2016; Kaudewitz et al., 2015; Fichtlscherer et al., 2011). Pilotní data z preklinického výzkumu naznačují, že by miR mohly být do budoucna využity i v rámci farmakoterapie (Ulrich et al., 2016).

### **1.5 Zobrazovací metody**

Nejlépe prozkoumanou vlastností VP je, díky celé řadě studií na kadaverózních vzorcích pacientů s AKS a jinými komplikacemi aterosklerózy, jednoznačně jejich patologicko-anatomické složení. Jako korelát VP, který je v tomto kontextu nejvíce zkoumán, je nejčastěji považován TCFA (Virmani et al., 2006). S rozvojem moderních zobrazovacích metod jsme schopni mnoho jeho charakteristik pozorovat in vivo. Nejdostupnější a do značné míry nejlépe prozkoumanou metodou invazivního zobrazení věnčitých tepen je jednoznačně koronární angiografie. Nevýhodou této metody je, že zobrazuje pouze kontrastní látkou naplněné lumen cévy. Nedostaneme tedy mnoho informací o patologii probíhající ve stěně cévy. Prospektivní multicentrická studie PROSPECT prokázala, že aterosklerotické pláty zodpovědné za vznik akutní koronární příhody jsou většinou angiograficky málo významné (Stone et al., 2011). Z těchto důvodů byla pro detailnější zobrazení aterosklerotických plátů vyvinuta celá řada neinvazivních a invazivních



zobrazovacích metod, které jsou schopny nabídnout detailnější informaci o jejich struktuře (Horváth et al., 2014).

Některé z těchto zobrazovacích metod se zaměřují na mikroanatomii (Sanon et al., 2013; Bruggink et al., 2010). Pokud jde o neinvazivní zobrazovací metody, zdá se, že největší možnosti nabízí CT-koronarografie (computed tomography coronary angiography; CTCAG). Některé znaky aterosklerotických plátů detekované pomocí CTCAG (pozitivní remodelace, plát s nízkou atenuací, mikro-kalcifikace) jsou asociovány s lézí zodpovědnou za vznik AKS (Motoyama et al., 2013). Důležitou vyšetřovací metodou je rovněž duplexní ultrasonografie, která umožňuje díky vysoké frekvenci ultrazvuku velmi detailní, neinvazivní zobrazení cévní stěny. Díky této metodě jsme schopni časně detekovat subklinické aterosklerotické změny a zhodnocení tloušťky intimy a vyloučení karotických plátů je součástí běžného, dobře provedeného skríningu (Visseren et al., 2021). Mezi invazivní metody užívané k detekci VP patří intravaskulární ultrazvuk (IVUS), virtuální histologie odvozená z intravaskulárního ultrazvuku (VH-IVUS) a intravaskulární optická koherentní tomografie (OCT). Nejzavedenější metodou v detekci VP je IVUS. Prospektivní studie v minulosti prokázaly schopnost IVUS identifikovat pláty způsobující budoucí koronární příhodu (Calvert et al., 2011; Stone et al., 2011). Pozoruhodné je, že šlo o objemné, pozitivně remodelované aterosklerotické pláty, které obsahovaly TCFA, avšak angiograficky šlo často o málo významné stenózy (Stone et al., 2011). V nedávné době byl prokázán vztah velikosti plátu a přítomnosti lipidového jádra (Dohi et al., 2015; Brugaletta et al., 2011; De Boer et al., 2014). Novou, slibnou metodou je OCT. Díky desetinásobně většímu rozlišení ve srovnání s IVUS jde o ideální nástroj pro studium mikroanatomie (Toutouzas et al., 2016). V současné době je potenciálu OCT při identifikaci VP věnována velká pozornost (Kato et al., 2012; Kubo et al., 2021). Některé diagnostické metody využívají k určení rizikovitosti aterosklerotického plátu měření jeho metabolické aktivity či určení jeho mechanických vlastností (např. intravaskulární termografie, palpografie a elastografie). Žádná z těchto metod dosud nenaplnila vložena očekávání (Sanon et al., 2013; Bruggink et al., 2010; Suh et al., 2011; Schaar et al., 2003; de Korte et al., 2002).

### 1.5.2 Blízká infračervená spektroskopie

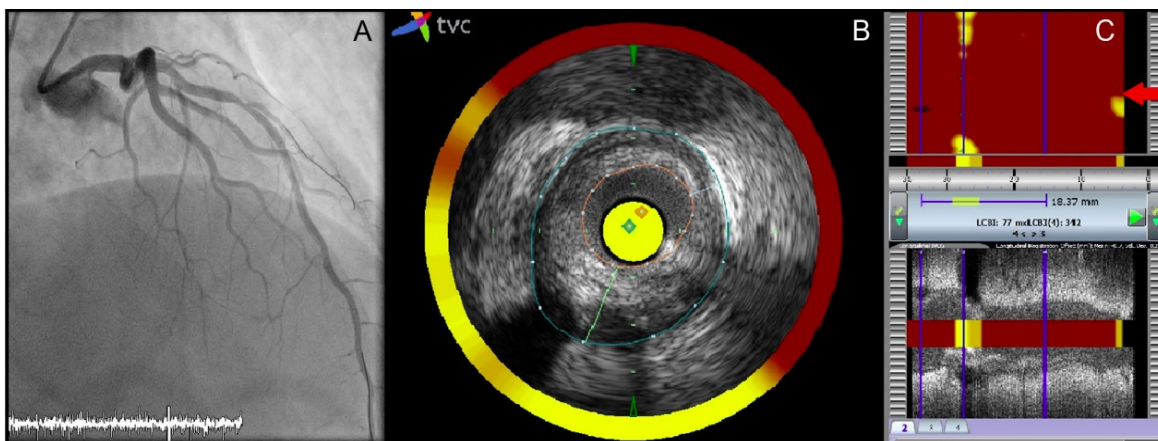
Pro stanovení chemického složení aterosklerotického plátu byla vyvinuta metoda intrakoronární blízké infračervené spektroskopie (NIRS). Cílem metody je identifikace lipidových jader v aterosklerotických plátech (Sanon et al., 2013; Bruggink et al., 2010). Předpokládá se, že pláty s velkým lipidovým jádrem jsou koreláty VP (Fleg et al., 2012).

Blízká infračervená spektroskopie je technologie, která se po desetiletí používá ke stanovení chemického složení látek (Caplan et al., 2006). Tato metoda je založena na principu odlišné absorpce světla o vlnové délce blízké infračervenému záření (NIR; vlnová délka od 800 do 2 500 nm) různými látkami. Každá látka má charakteristický vzor absorpce NIR vyjádřený specifickým NIR obrazem (Caplan et al., 2006).

Přirozeně se tedy nabízela možnost využít tuto metodu k identifikaci potenciálně vulnerabilních aterosklerotických plátů bohatých na cholesterol. Výzkum v této oblasti začal počátkem 90. let, ale trvalo dlouho, než byl vyvinut použitelný NIRS katétra (Cassis a Lodder, 1993). V současné době je k dispozici hybridní katétra, který umožňuje současnou detekci NIRS i IVUS signálu (TVC Imaging System, Infraredx a Nipro company, Bedford, MA, USA). Výhoda kombinace NIRS a IVUS v jednom systému spočívá ve faktu, že během jednoho vyšetření získáme informaci jak o složení aterosklerotického plátu pomocí NIRS, tak i o jeho mikroanatomické struktuře pomocí IVUS. Jak již bylo uvedeno výše, možnosti detekce jistých charakteristik VP pomocí IVUS byly demonstrovány v prospektivních studiích (Stone et al., 2011).

Výsledky NIRS jsou prezentovány jako tzv. „chemogram“, což je obraz, jehož barvy vyjadřují pravděpodobnost přítomnosti lipidů. Každý pixel představuje pravděpodobnost přítomnosti lipidů v daném místě. Nízká pravděpodobnost je znázorněna červeně, vysoká pravděpodobnost žlutě. Osa X chemogramu označuje polohu v milimetrech, osa Y udává obvodovou polohu ve stupních. Chemogram tedy znázorňuje podélný řez cévou (obr. 4) (Caplan et al., 2006; Horváth et al., 2014). Pro kvantifikaci přítomnosti lipidů v zobrazené oblasti bylo zavedeno několik parametrů. Lipid-core burden index (LCBI) je definován jako podíl žlutých pixelů na chemogramu vynásobený 1000. Maximal lipid core burden index per 4 mm ( $\text{maxLCBI}_{4\text{mm}}$ ) popisuje oblast s nejvyšší přítomností lipidů. Dále lze

měřit průměrný a maximální úhel lipidového jádra v oblasti zájmu pro lepší charakteristiku obvodového rozsahu léze (obr. 4) (Gardner et al., 2008; Horváth et al., 2016; Horváth et al., 2014).



Obr. 4 - Koronarografie a odpovídající záznam blízké infračervené spektroskopie a intravaskulárního ultrazvuku (NIRS-IVUS) stenózy ramus interventricularis anterior (RIA) u pacienta, který v nedávné době prodělal perkutánní koronární intervenci (PCI) pravé věnčité tepny (ACD) pro infarkt myokardu s elevacemi úseku ST (STEMI). Angiograficky významná stenóza RIA je patrná v panelu A. Obraz konvenčního IVUS z místa stenózy (panel B) je doplněn o informaci poskytnutou NIRS (barevný prstenec okolo obrazu z IVUS). Žlutá barva označuje přítomnost a lokalizaci lipidů v rámci léze. V NIRS chemogramu z místa léze žlutá barva označuje lipidové jádro lokalizované přímo v oblasti nejtěsnější stenózy (panel C, červená šipka). Délka chemogramu reprezentuje vzdálenost posunu katétru, zatímco jeho šířka představuje rotaci zobrazovací sondy od 0 do 360 stupňů. Rozsah lipidového jádra je kvantifikován pomocí parametru lipid-core burden index (LCBI), který je frakcí žlutých pixelů a celkového počtu pixelů ve vyšetřené oblasti vynásobenou tisícem. Oblast s nejvyšší lipidovou zátěží je charakterizována pomocí maximálního lipid-core burden index (maxLCBI<sub>4mm</sub>) (panel C). (převzato z Horváth et al., 2014)

V roce 2008 Gardner a kol. (Gardner et al., 2008). publikovali prospektivní studii pitevnických vzorků, v níž prokázali, že systém NIRS-IVUS je, v kadaverózních vzorcích, schopen přesně detekovat pláty s velkým lipidovým jádrem při srovnání s histologickými preparáty (Stone et al., 2011; Gardner et al., 2008). Následně byla potvrzena možnost koronární detekce plátů s velkým lipidovým jádrem pomocí NIRS-IVUS in vivo (Waxman et al., 2009). Tato zjištění zahájila rozsáhlý výzkum v oblasti NIRS-IVUS.

I když byl NIRS speciálně vyvinut pro identifikaci VP, zdá se, že má mnoho dalších aplikací v klinické praxi (Horváth et al., 2014). Informace o obsahu lipidů v plátu a rozsah lipidového jádra v kombinaci se strukturální informací z IVUS umožňují tzv. skutečnou charakteristiku cévy (true vessel characterization) (Horváth et al., 2014). Skutečná

charakteristika cévy napomáhá k rizikové stratifikaci pacientů před léčbou koronární nemoci, k optimalizaci výsledku perkutánní koronární intervence (PCI), uložení stentu, ke snížení rizika periprocedurálního infarktu myokardu (Brugaletta et al., 2012). Informace o složení plátu mohou pomoci při úpravě farmakoterapie (Kini et al., 2013). Vysoký obsah lipidů v aterosklerotickém plátu rovněž zvyšuje riziko komplikací na podkladě distální embolizace jeho obsahu (Berezikov et al., 2007). Ta má za následek obstrukci distálního povodí tepny s rizikem vzniku periprocedurálního infarktu myokardu. Vztah mezi hodnotou LCBI před zavedením stentu a zvýšením srdečních biomarkerů nad prahovou hodnotu pro periprocedurální infarkt myokardu, byl pozorován po jeho uložení v několika studiích a kazuistikách (Goldstein et al., 2009; Goldstein et al., 2011; Schultz et al., 2010; Raghunathan et al., 2011).

Ačkoliv je koronární angiografie stále považována za zlatý standard zobrazení morfologie koronárních tepen, je třeba mít na zřeteli, že neposkytuje podrobné informace o cévní stěně nebo o struktuře aterosklerotického plátu určeného k PCI (Horváth et al., 2014). Ke zlepšení předintervenční charakterizace lézí byly proto testovány různé zobrazovací modalitty s cílem minimalizovat riziko procedurálních a postprocedurálních komplikací, např. časně a pozdní trombózy ve stentu, disekce nebo restenózy (Waxman et al., 2009; Oemrawsingh et al., 2014; Jang et al., 2014; Sakhuja et al., 2010; Guagliumi et al., 2012; Kaudewitz et al., 2013; Lee et al., 2010). Dixon a kolegové prokázali možnosti systému NIRS-IVUS pro určení optimální délky stentu k pokrytí celého plátu s velkým obsahem lipidů (Dixon et al., 2012). Blízká infračervená spektroskopie tedy může napomoci k optimální implantaci stentu přesným určením rozsahu aterosklerotické léze a tím i k prevenci závažných komplikací (např. akutní trombóza nebo disekce)(Horváth et al., 2014).

Hlavním cílem NIRS je nicméně identifikace aterosklerotických plátů spojených s rizikem budoucích koronárních příhod. Skutečnost, že léze asociované s AKS častěji obsahují lipidová jádra, byla prokázána ve studii, která porovnávala nálezy AKS s NIRS obrazem typickým pro stabilní ischemickou chorobu srdeční (Madder et al., 2012). Stejní autoři následně publikovali studii představující charakteristické NIRS nálezy, které byly podkladem infarktu myokardu s elevací ST segmentů (STEMI) (Madder et al., 2013). Tyto

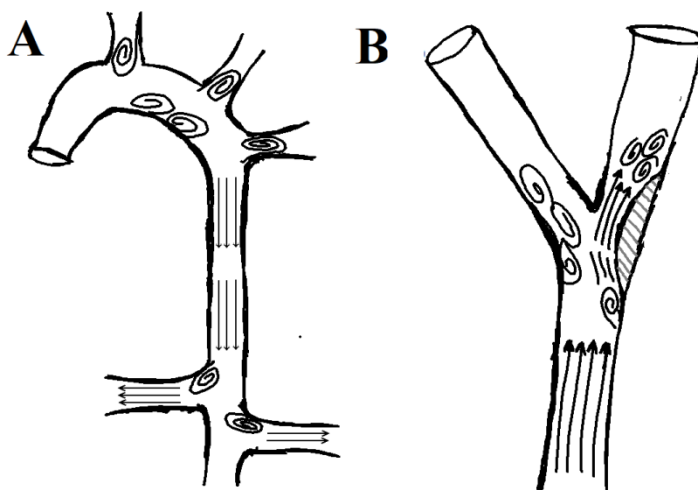
obrazy jsou charakteristické vysokým obsahem lipidů a  $\text{maxLCBI}_{4\text{mm}}$  nad určitou prahovou hodnotu (Madder et al., 2013). První prospektivní studie Oemrawsingha a kolegů hodnotila prognostický význam NIRS (Oemrawsingh et al., 2014). V této prospektivní observační studii bylo zařazeno 203 pacientů se stabilní ischemickou chorobou srdeční, nebo AKS. Tepny, na nichž nebyla lokalizovaná léze určená k intervenci, byly vyšetřeny pomocí NIRS. Primární cíl studie (tj. kombinace celkové mortality, nefatálního AKS, cévní mozkové příhody a neplánované koronární revaskularizace) se, během ročního sledování, vyskytoval čtyřikrát častěji u pacientů s hodnotou LCBI přesahující medián 43 (Oemrawsingh et al., 2014). Dnes již známe data z dvou větších randomizovaných studií. Do studie PROSPECT II bylo zařazeno 898 pacientů s recentně proběhlým infarktem myokardu, kterým bylo po revaskularizaci provedeno vyšetření všech tří magistrálních věnčitých tepen pomocí NIRS-IVUS katétru (Erlinge et al., 2021). Primárním cílem byl výskyt závažných kardiovaskulárních příhod (úmrtí z kardiálních příčin, infarkt myokardu, nestabilní angina pectoris, progresivní angina pectoris) v souvislosti s charakteristikami aterosklerotických plátů během sledování s mediánem 3,7 let. Detekce vysokého obsahu lipidů pomocí NIRS a objemného, excentricky remodelovaného plátu pomocí IVUS byly silnými rizikovými faktory pro výskyt primárního cíle (Erlinge et al., 2021). V další, rozsáhlejší prospektivní randomizované, studii bylo sledováno 1563 pacientů, kterým bylo provedeno NIRS-IVUS zobrazení v rámci srdeční katetrizace z důvodu stabilní, či nestabilní ischemické choroby srdeční (Waksman et al., 2019). Cílem studie bylo stanovení vztahu mezi pláty bohatými na lipidy (lipid-rich plaque - LRP) detekovanými pomocí NIRS-IVUS mimo oblasti ošetřované koronární intervencí a následnými koronárními příhodami (Waksman et al., 2019). Jmenovitě byl testován vztah mezi  $\text{maxLCBI}_{4\text{mm}}$  a výskytem primárního cíle studie na úrovni pacienta i konkrétního plátu (Waksman et al., 2019). Studie prokázala, že toto vyšetření je schopné odhalit zvýšené riziko kardiovaskulárních příhod během dvouletého sledování (Waksman et al., 2019). Přítomnost  $\text{maxLCBI}_{4\text{mm}} > 400$  kdekoliv v řečišti znamenalo navýšení rizika s HR 1,89 (1,26-2,83;  $p=0,0021$ ) (Waksman et al., 2019). Ještě silnější asociace byla na úrovni plátu, kde detekce plátu s  $\text{maxLCBI}_{4\text{mm}} > 400$  znamenala HR 4,22 (2,39–7,45;  $p<0,0001$ ) (Waksman et al., 2019). Tato přelomová studie tedy potvrzuje domněnku, že spektroskopická data pomáhají v detekci vulnerabilních plátů.

Pokud se nám podaří identifikovat VP in vivo, bude nezbytné určit léčebné postupy k prevenci závažných klinických příhod spojených s rupturou plátu (Horváth et al., 2014). Kromě farmakoterapie budou možná nutné i preventivní intervenční zákroky (Horváth et al., 2014). Řada výzkumných prací již studovala vliv farmak na dílčí charakteristiky VP. Byly to studie s využitím IVUS, angiografie, OCT a dokonce i NIRS (Brugaletta et al., 2012; Nissen et al., 2006; Serruys et al., 2008; Takarada et al., 2009). Ve studii ASTEROID bylo prokázáno statisticky významné (i když v absolutních číslech malé) snížení rozsahu plátu dle IVUS po 2 letech užívání vysoké dávky rosuvastatinu (40 mg denně) (Nissen et al., 2006). Jiná studie s OCT ukázala, že terapie statiny významně zvýšila tloušťku fibrózní čepičky aterosklerotického plátu během 9 měsíců sledování u pacientů po AKS ve srovnání s pacienty, kteří léčbu statiny přerušili (Takarada et al., 2009). V prospektivní studii YELLOW bylo 87 diabetiků s koronární nemocí více tepen, s jednou tepnou určenou k intervenci a významnou stenózou v povodí druhé, randomizováno k agresivní (rosuvastatin 40 mg denně) nebo standardní hypolipidemické léčbě (Kini et al., 2013). Neintervenovaná léze byla vyšetřena pomocí NIRS během iniciální PCI a pak znovu po 7 týdnech. Ve skupině s vysokými dávkami statinů byly zjištěny významné změny v NIRS i IVUS parametrech. Tyto výsledky naznačují, že léčba statiny snižuje obsah lipidů v plátu a potenciálně snižuje i vulnerabilitu těchto lézí (Kini et al., 2013).

### **1.6 Endoteliální smykové tření jako marker vulnerabilního aterosklerotického plátu**

Endoteliální smykové tření můžeme definovat jako třecí sílu, kterou vyvíjí tekoucí krev na stěnu cévy (Wentzel et al., 2012). Je závislá na prostorovém gradientu rychlosti toku krve (ovlivněný rychlostí toku a průsvitem tepny) a její viskozitě (Wentzel et al., 2012). Ke změnám v hodnotách ESS dochází především v oblastech tepenných ohybů, bifurkací a v pozdějších fázích i distálně od stenotického postižení, kde dochází k narušení laminárního toku krve a tvorbě vortexů s odlišnou rychlostí, směrem a stabilitou toku krve (Wentzel et al., 2012) (obr. 5). Z experimentálních modelů víme, že ESS jako síla nepůsobí pouze pasivně na stěnu endotelií, ale je endoteliálními buňkami aktivně snímáno pomocí různých typů mechanoreceptorů lokalizovaných nejen na jejich luminální straně, ale pomocí integrinů i na úrovni mezibuněčných spojů a vazby k bazální membráně (Chatzizisis et al., 2007). Aktivace těchto receptorů vede k chemické transdukcii pomocí mnoha signálních

kaskád, které v konečném důsledku vedou k aktivaci různých transkripčních faktorů, ovlivnění genové exprese a následně ke změně buněčného fenotypu (obr. 5) (Wentzel et al., 2012).



Obr. 5 - K časnému rozvoji aterosklerotických plátů dochází v místech sníženého ESS - tj. především v oblastech tepenných ohybů, bifurkací a v pozdějších fázích i distálně od stenotického postižení, kde dochází k narušení laminárního toku krve a tvorbě vortexů s odlišnou rychlostí, směrem a stabilitou toku krve (panel A). V pozdějších fázích rozvoje aterosklerotického plátu vede jeho protruze do arteriálního lumen k akceleraci krevního toku směrem k maximu stenózy a v proximální části plátu ESS narůstá na supra-normální hodnoty (Panel B). Právě v této oblasti dochází k destabilizaci aterosklerotických plátů a k jejich ruptuře (upraveno podle Lee a Chiu, 2019 a Wentzel et al., 2012).

Z výzkumu *in vitro* jsme zjistili, že vystavení endotelií narušenému, turbulentnímu toku a tedy nízkému ESS vede ke změně jejich fenotypu, který odpovídá změnám známým při rozvoji endoteliální dysfunkce (Meng et al., 2022). Byla pozorována změna tvaru a velikosti endoteliálních buněk z důvodu odlišné produkce různých adhezivních molekul, snížení produkce NO-syntázy, změna produkce některých miR, nebo i transkripčních faktorů důležitých v rozvoji zánětlivé reakce (Meng et al., 2022). Účinky sníženého ESS na rozvoj a progresi aterosklerotických plátů byly popsány na modelu uměle vytvořené stenózy karotidy u hypercholesterolemických myší (Souilhol et al., 2019). Snížení ESS vedlo k rozvoji aterosklerotických plátů a při porovnání se zdravou, kontralaterální karotidou byla prokázána odlišná genová exprese v endoteliálních buňkách, včetně aktivace některých genů důležitých v embryogenezi (Souilhol et al., 2019). Snížení ESS vede k snížení produkce NO a naopak k nadprodukcí endotelinu-1 (Wang et al., 2016).

Dále především cestou aktivace MAP-kináz podporuje apoptózu endotelií (Chatzizisis et al., 2007). Dochází k nadprodukci kyslíkových radikálů (Chatzizisis et al., 2007). Zvýšený oxidativní stres spolu se sníženou produkcí NO a transdukcí signálů některých drah vede k nadprodukci transkripčních faktorů (zejména NF- $\kappa$ B), která dále podporuje kaskádu dějů vedoucích k rozvoji zánětlivé odpovědi (Chatzizisis et al., 2007). Nízké ESS navíc vede cestou aktivace specifických transkripčních faktorů v endoplasmatickém retikulu k zvýšení exprese genů pro LDL receptory, zvýšení produkce cholesterolu a mastných kyselin, což v konečném důsledku podporuje akumulaci oxidovaného LDL, rozvoj lipidového jádra a další stimulaci zánětlivé odpovědi (Chatzizisis et al., 2007). V další kaskádě dějů ESS podporuje obecnou patofyziologii rozvoje aterosklerotického plátu (Chatzizisis et al., 2007). Vlivem nadprodukce některých cytokinů dochází k migraci, dediferenciaci a nakonec k apoptóze hladkých svalových buněk (Chatzizisis et al., 2007). Nadprodukce MMP vede k postupnému rozvoji fibrózní čepičky a cestou aktivace BMP-1 (bone-morphogenic protein-1) podporuje tvorbu kalcifikací (Chatzizisis et al., 2007). Tato pozorování odpovídají zkušenostem z in vivo vyšetření pomocí různých invazivních vyšetřovacích metod u lidí, kde aterosklerotické pláty pozorujeme zejména v oblastech sníženého ESS, kde dochází k jejich progresi a rozvoji nekrotického jádra (Candrea et al., 2022; Thondapu et al., 2021; Costopoulos et al., 2019).

V pozdějších fázích rozvoje aterosklerotického plátu vede jeho protruze do arteriálního lumen k akceleraci krevního toku směrem k maximu stenózy a v proximální části plátu ESS narůstá na supranormální hodnoty (Wang et al., 2016). Zdá se, že právě v této oblasti vystavené zvýšenému ESS, resp. vysokému gradientu ESS, dochází k destabilizaci aterosklerotických plátů a k jejich ruptuře (Obr. 5) (Wang et al., 2016). Zvýšené ESS vede k lokální nadprodukci NO, který podporuje produkci MMP a plasminu (Wang et al., 2016). Pod tímto vlivem je poté facilitována expansivní remodelace cév (Glagovův efekt) a plát roste, přestože způsobuje relativně méně významnou stenózu (Wang et al., 2016). Cestou signální transdukce přes BMP-4 dochází ke zvýšení produkce TGF- $\beta$ , který v proximální části plátu podporuje apoptózu VSMC a progresi nekrotického jádra (Wang et al., 2016). Zvýšené ESS způsobuje nadprodukci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který podporuje angiogenezi a neovaskularizaci nekrotického jádra (Wang et al.,



2016). Ta mimo jiné vede ke krvácení uvnitř plátu, které dále podporuje jeho růst, zánětlivou odpověď a v konečném důsledku vede k jeho destabilizaci. Vlivem působení MMP navíc dochází k postupné degradaci fibrózní čepičky, což v konečném důsledku způsobí rupturu aterosklerotického plátu (Wang et al., 2016).

## **2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE**

### **2.1 Hypotéza 1**

Pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce je možné ve vzorcích periferní žilní krve detekovat plasmatické hladiny mikroRNA, které jsou deregulované u pacientů s rupturou vulnerabilního aterosklerotického plátu.

### **2.2 Hypotéza 2**

Lipidové jádro detekované pomocí blízké infračervené spektroskopie v karotické stenóze je známkou vulnerability aterosklerotického plátu. Lipidový signál se bude vyskytovat častěji v proximální části plátu kde, vlivem působení zvýšeného endoteliálního smykového tření, dochází k jeho destabilizaci.

### **2.3. Cíle práce**

Cílem naší práce je blíže porozumět patofyziologii destabilizace vulnerabilního aterosklerotického plátu a pomocí popisu některých jeho charakteristik přispět k jeho multimodální detekci.

Jednotlivé cíle práce jsou následující:

1. Identifikovat plasmatické miR ze vzorků periferní žilní krve pacientů se STEMI, které by mohly pomoci při diagnostice v časných stádiích STEMI a mohou tak být použity jako biomarkery nestabilního vulnerabilního aterosklerotického plátu.
2. Prokázat proveditelnost a bezpečnost NIRS-IVUS v detekci lipidového jádra ve stenóze arteria carotis interna.
3. Analyzovat složení karotického plátu a distribuci lipidového jádra pomocí NIRS-IVUS s ohledem na předpokládaný vliv ESS.
4. Korelovat data získaná z NIRS-IVUS vyšetření karotické stenózy s výskytem konvenčních kardiovaskulárních rizikových faktorů.

## **3 METODIKA**

### **3.1 Obecné metodické postupy a definice**

#### **3.1.1 Definice**

Mikro RNA- malé nekódující molekuly RNA o délce 22-26 nukleotidů, které ovlivňují genovou expresi na úrovni translace díky inhibici, nebo navození degradace mRNA.

Stabilní ischemická choroba srdeční - pro potřeby naší studie byli pacienti se stabilní ischemickou chorobou srdeční definováni jako pacienti s klinickým průkazem námahové ischemie a alespoň jednou angiograficky významnou stenózou epikardiální věnčité tepny.

Akutní koronární syndrom – v rámci práce chápán jako průkaz akutního uzávěru, nebo stenózy věnčité tepny na koronární angiografii v kontextu klinických a/nebo elektrokardiografických známek ischemie.

Symptomatická stenóza karotidy - zúžení karotidy u pacientů s anamnézou cévní mozkové příhody v předchozích 6 měsících.

Významná stenóza karotidy – zúžení arteria carotis interna o 50% vůči referenčnímu úseku pokud je stenóza symptomatická a o 70% u asymptomatické stenózy.

Endoteliální smykové tření - třecí síla, kterou vyvíjí tekoucí krev na stěnu cévy.

### **3.1.2 Katetrizační metody**

#### **3.1.2.1 Selektivní koronární angiografie**

Selektivní koronární angiografie je zlatým standardem v zobrazení věnčitých tepen (Veselka et al., 2015). Výkon jsme prováděli perkutánním přístupem cestou arteria femoralis, či arteria radialis. Tepenný přístup jsme zajistili tzv. Seldingerovou technikou, kdy byla nejprve provedena přesná punkce tepny pomocí specializované jehly, touto cestou jsme pak do lumina cévy zavedli atraumatický vodič. Následně byl tepenný vstup dilatován pomocí dilatátoru a do tepny byl po vodiči zaveden vyšetřovací katétr. Pomocí specializovaných katétrů byla poté selektivně sondována obě koronární ústí a byla do nich aplikována jódová kontrastní látka. Naplnění lumen cévy jsme snímali pomocí rentgenky a bylo zobrazeno v digitální podobě. Pro přesné zhodnocení významnosti tepenného zúžení byly tepny zobrazovány minimálně ve dvou na sebe kolmých rovinách.

#### **3.1.2.2. Perkutánní koronární intervence**

V indikovaných případech na SKG navazovala perkutánní koronární intervence. Výkon jsme v takovém případě provedli ze stejného perkutánního přístupu. Cestou vodícího (guiding) katétru jsme do příslušné věnčité tepny, distálně od ošetřované stenózy indikované k intervenci, umístili koronární vodič o průměru 0,014" (Veselka et al., 2015). V případě potřeby jsme použili podobné vodiče i k zajištění přístupu do bočních větví. Touto cestou jsme následně zavedli instrumentárium potřebné k vlastní koronární intervenci. Lézi jsme obvykle dilatovali pomocí specializovaného balónkového katétru, který po naplnění směsí kontrastní látky a fyziologického roztoku lézi roztáhl vysokým tlakem. Následně jsme do ošetřovaného postižení umístili stent. Z důvodu prevence pozdějšího opětovného zúžení tepny na podkladě neointimální hyperplázie jsme používali moderní lékové stenty potažené cytostatiky. Po uložení stentu byla jako prevence trombózy pacientům podána tzv. duální antiagregační terapie v podobě kombinace kyseliny acetylsalicylové a clopidogrelu, či ticagreloru. Pokud měl pacient z klinických důvodů indikovanou antikoagulační léčbu, tak jsme postupovali s kombinovanou terapií dle doporučených postupu Evropské kardiologické společnosti (Valgimigli et al., 2018).

### 3.1.2.3. Karotický stenting

Karotický stenting (CAS) je v indikovaných případech alternativou chirurgické endarterektomie u pacientů s významnou stenózou a. carotis interna. Významnost stenózy jsme před výkonem vždy ověřili pomocí duplexní ultrasonografie. Samotný výkon byl proveden z femorálního přístupu zajištěného pomocí Seldingerovy metody. Nejprve jsme zabezpečili přístup do postižené karotidy pomocí 7 nebo 8 French silného guiding katétru, nebo 6 French silného vodícího zavaděče (sheathu). Poté bylo provedeno důkladné angiografické zobrazení podobné jako při SKG k ověření významnosti stenózy. K zobrazení karotických tepen jsme vždy použili metodu tzv. digitální subtrakční angiografie, která umožňuje přesnější určení významnosti stenózy v okolí kostních struktur. Skiaskopický obraz byl digitálně zpracován před a po podání kontrastní látky. Pro zvýraznění angiograficky naplněného lumen tepny byly poté ve výsledném angiografickém zobrazení digitálně potlačeny (subtrahovány) struktury, které byly přítomny na iniciálním snímku. Obraz karotické stenózy byl vždy hodnocen v minimálně dvou na sebe kolmých rovinách.

Pokud bylo, na základě angiografického zhodnocení rozhodnuto o intervenci, následovalo zavedení tzv. protekčního systému, jehož smyslem je zabránění distální embolizace aterosklerotických hmot do mozku. K tomuto jsme užívali buď tzv. distální ochranu pomocí specializovaného filtru [Emboshield NAV6 (Abbott Vascular, Redwood City, CA, USA)] nebo systém tzv. proximální protekce pomocí specializovaného balónkového katétru, který po inflaci balónků v arteria carotis communis a arteria carotis externa vede k přechodnému oblenění toku v ošetřované tepně [Mo.Ma (Invatec, Roncadelle, Itálie)]. O typu použitého protekčního zařízení rozhodoval zkušený operatér na základě angiografického nálezu a zhodnocení dalších klinických faktorů včetně obrazu kontralaterálního a intrakraniálního řečiště. Ve výjimečných případech jsme oba mechanismy kombinovali. Po zavedení protekčního zařízení následovalo zobrazení pomocí NIRS-IVUS (viz níže), které nám poskytlo další informace o povaze stenózy. Po tomto detailním zobrazení karotické stenózy jsme přistoupili k samotnému ošetření. Dle rozhodnutí operatéra mohla být léze nejprve připravena k umístění stentu pomocí predilatace balónkovým katétre. Následovalo umístění specializovaného stentu určeného

k ošetření karotid. Léze byla následně postdilatována, tak aby byla zajištěna optimální apozice stentu. Mezi jednotlivými kroky intervence jsme vždy provedli další zobrazení pomocí NIRS-IVUS, tak abychom mohli pozorovat jejich vliv na složení karotického plátu. Na konci výkonu jsme opět angiograficky verifikovali výsledek. Vzhledem k rizikovosti výkonu bylo za přijatelný výsledek považováno zbytkové zúžení do 30%. Pokud byl výsledek akceptovatelný, přistoupili jsme k odstranění protekčních pomůcek. Filtr byl kolabován a opatrně odstraněn. Před opětovnou deflací balónků proximální protekce, byla krev obsahující aterosklerotické hmoty z karotidy nejprve odstraněna. Pacientovi byla po výkonu rovněž podána duální antiagregační léčba a byl transportován na kardiologické oddělení, kde mu byly pravidelně monitorovány životní funkce a neurologický stav.

#### **3.1.2.4 Zobrazení pomocí NIRS-IVUS**

Vyšetření pomocí NIRS-IVUS je obecně doplňujícím zobrazením, které se provádí pro zpřesnění nálezu z SKG, může napomáhat v optimalizaci výše popsaných intervenčních zákroků a v naší studii poskytl cenná vědecká data. Samotný systém je složený z 3,2 French silného vyšetřovacího katétru, který umožňuje simultánní zobrazení pomocí obou modalit. Dále se skládá ze zařízení, které umožňuje zpětný posun a rotaci katétru vyšetřovanou tepnou konstantní rychlostí. Obraz je možno v reálném čase zobrazit a analyzovat na speciální vyšetřovací konzoli. Katétru jsme zaváděli z přístupu zvoleného pro angiografické zobrazení pomocí 0.014" zaváděcího drátu. Pomocí rentgen kontrastní značky byl katétru umístěn na přesně určenou pozici distálně od oblasti zájmu. Následovalo automatizované skenování cévy s postupným posunem katétru zpět proximálním směrem konstantní rychlostí 0,5mm/s. Konec sondy při tomto zobrazování rotuje automaticky rychlostí 240 otáček za minutu, tak aby bylo možné pomocí jak ultrazvukové sondy, tak laserové NIRS sondy zobrazit celé lumen cévy ve vyšetřovaném rozsahu. Zobrazovaná data z IVUS byla dostupná v reálném čase na monitoru ovládací konzole. Data z NIRS jsme měli k dispozici na konci vyšetření. Pro další off-line analýzu jsme veškerá data ukládali v digitální podobě ve formátu DICOM. Intravaskulární ultrazvuk nám poskytl detailní anatomickou informaci o cévní stěně a velikosti lumen. Pomáhal nám přesněji určit míru zúžení cévy, odhadnout co je důvodem tohoto zúžení, zhodnotit velikost

aterosklerotického plátu a míru pozitivní remodelace. Intravaskulární ultrazvuk rovněž velmi spolehlivě zhodnotí míru kalcifikace aterosklerotického plátu. Data získaná z NIRS byla prezentována pomocí chemogramu a kvantifikována pomocí LCBI.

### **3.1.3 Statistická analýza**

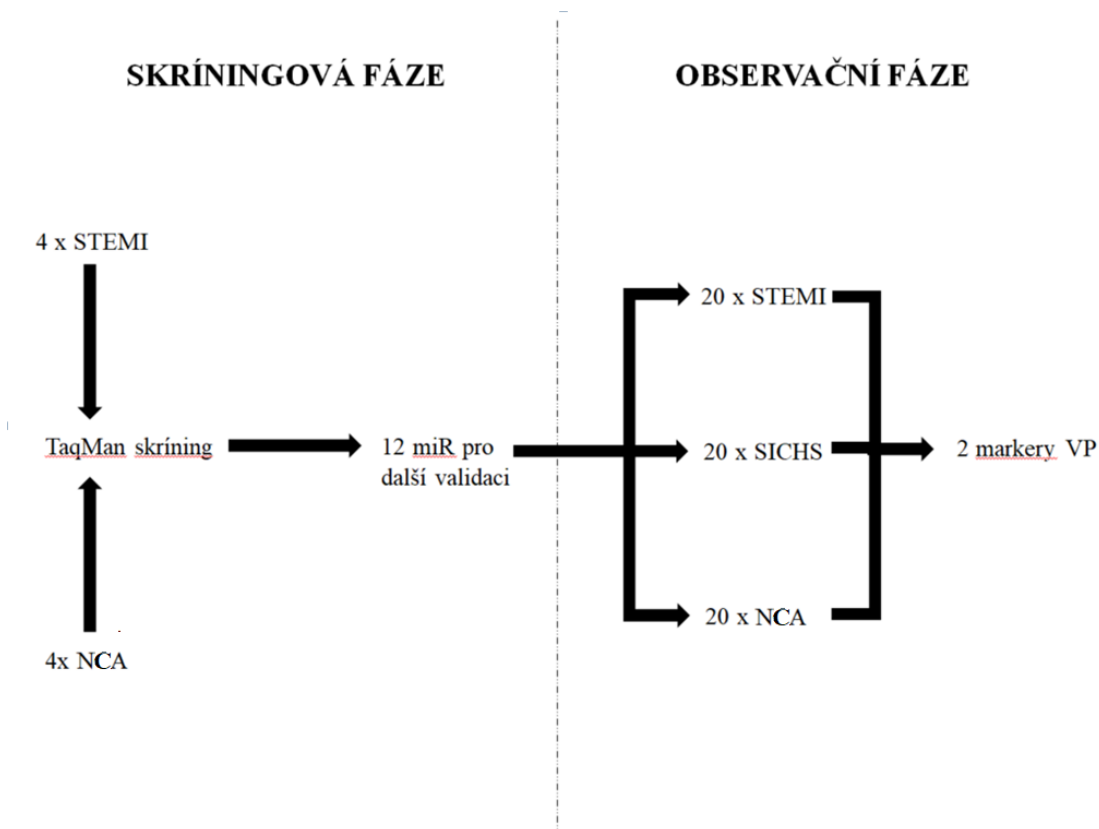
Normálně rozložená data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  standardní odchylka ( $\pm$ SD) a data s nenormálním rozložením jako mediány s mezikvartilovým rozpětím (IQR). Diskrétní data jsou prezentována jako absolutní čísla (%). Distribuce dat byla hodnocena pomocí D'Agostinova a Pearsonova testu normality, Shapiro-Wilkova testu normality a Kolmogorova-Smirnovova testu normality. Rozdíly v základních klinických datech mezi studovanými skupinami byly hodnoceny pomocí Studentova t-testu. V prvním experimentu byla pro účely srovnání mezi relativními expresemi miR mezi třemi studijními skupinami použita Kruskal-Wallisova jednocestná analýza rozptylu. Síla studijních miR předpovídat STEMI byla analyzována pomocí ROC křivky; plocha pod křivkou (AUC) byla vypočtena s 95 % intervalem spolehlivosti (CI). Rozdíl byl považován za statisticky významný, pokud hodnota P nepřesáhla 0,05. Veškerá data byla analyzována pomocí programu GraphPad prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## **3.2 Experiment 1 - MikroRNA-331 a mikroRNA-151-3p jako biomarkery u pacientů s infarktem myokardu s elevací ST segmentů**

### **3.2.1 Přehled designu studie**

V této studii jsme se rozhodli určovat hladiny miR pomocí qPCR ve vzorcích periferní žilní krve v modelové situaci akutní ruptury TCFA. Cílem studie bylo určit nové, dosud nepopsané biomarkery nestabilního VP. Z toho důvodu byl v úvodu studie proveden skríníng pomocí sondy TaqMan. Výsledkem byl seznam deregulovaných hladin miR, které měly výrazně odlišnou expresi u pacientů se STEMI. Tato data jsme porovnali s literaturou a pro další studium jsme vybrali tři výrazně deregulované miR, u kterých dosud nebyla známa asociace s aterosklerózou, ale měli potenciální vztah k patofyziologii aterosklerózy, resp. k zánětlivé odpovědi. Dále jsme vybrali devět dalších miR jako tři druhy kontrol, které budou popsány níže. Těchto dvanáct miR bylo poté validováno v observační fázi

studie na celé patientské populaci (obr. 6). Studie byla schválena místní etickou komisí FN Motol pod číslem jednacím EK-1158/18. Všechny metody byly provedeny v souladu s příslušnými směrnicemi a předpisy.



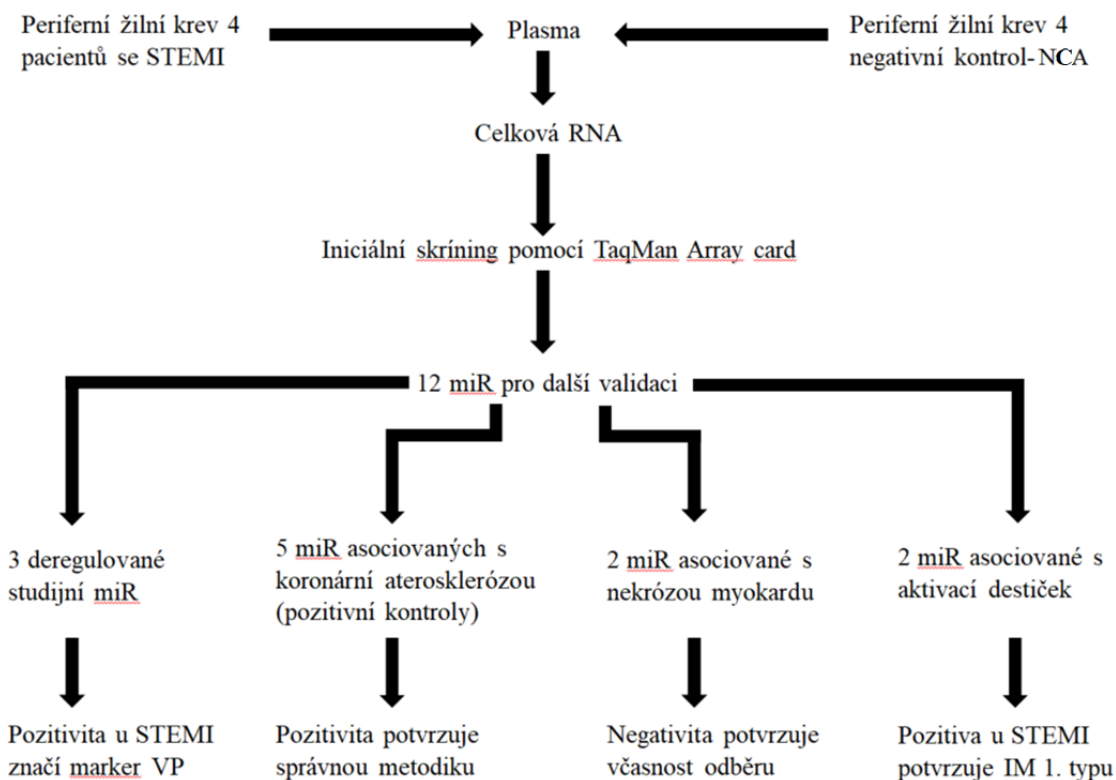
Obr. 6 - schématické zobrazení základního designu studie. V iniciální skrínigové fázi studie jsme použili specializovaný komerčně dostupný čip k rychlému porovnání relativních expresí velkého množství miR, mezi pacienty se STEMI a NCA. Na základě výsledků skrínigování a literárních poznatků jsme zvolili 12 miR, které byly dále validovány v observační části studie na celé populaci 60 pacientů. Výsledkem bylo získání dvou nových potenciálních markerů VP.

### 3.2.2 Skrínigová fáze studie

V úvodu naší studie jsme nejprve provedli skrínigové vyšetření 164 miR pomocí specializovaného čipu. V této skrínigové fázi jsme vyšetřili vzorky periferní žilní krve čtyř pacientů se STEMI a jejich profil exprese miR jsme porovnali se vzorky periferní žilní krve u čtyř negativních kontrol (NCA). Za tyto byli zvoleni pacienti s klinicky indikovanou SKG, u kterých jsme angiograficky nedetekovali aterosklerotické změny na věnčitých tepnách. Ze vzorků byla nejprve izolována plasma, ve které jsme následně získali celkovou



RNA podle postupu shodného s observační fází studie, který bude detailně popsán níže. Z celkové RNA jsme provedli skríníng miR pomocí komerčně dostupných microRNA karet TaqMan Array (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (obr. 7). Postupovali jsme podle doporučení výrobce.



Obr. 7 - schematické znázornění průběhu iniciální skríníngové fáze studie. V této fázi byly srovnány profily exprese miR ve vzorcích periferní žilní krve pacientů se STEMI a NCA. Zkumavky s periferní žilní krví byly nejprve centrifugovány za účelem získání vzorků plasmy. Z této byla následně izolována celková RNA. Po její reverzní transkripci jsme pomocí speciálního komerčně dostupného čipu (TaqMan Array card) provedli analýzu exprese celkem 164 miR. Na základě výsledků byly vybrány 3 studijní miR a dále celkem 9 miR, které sloužily jako kontroly. Pět pozitivních kontrol bylo zvoleno na základě odlišné exprese a známé asociace s aterosklerózou. Jejich pozitivita měla potvrdit správně provedenou metodiku v observační fázi studie. Dále jsme na základě literárních dat zvolili dvě miR asociované s nekrózou myokardu. Tyto sloužily jako kontroly včasnosti odběru a jejich negativita měla potvrdit, že studijní miR jsou v krvi detekovány velmi časně a jejich původ by mohl být v samotném rupturovaném VP. Další dvě miR byly zvoleny na základě literárních dat jako biomarkery aktivace krevních destiček. Tyto nám pomohly potvrdit, že patofyziologickým podkladem STEMI u zařazených pacientů byl tzv. infarkt myokardu 1. typu na podkladě akutní koronární trombózy v terénu rupturovaného aterosklerotického plátu.

Začali jsme reverzní transkripcí (RT) pomocí Megaplex™ RT Primerů, Human Pool A+B v2.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a komerčně dostupné soupravy TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Pro všechny reakce RT byl použit termocykler Lab Cycler (Sensoquest, Göttingen, Německo). Následovala preamplifikační reakce pomocí MegaplexPreAmp Primerů (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a TaqMan® PreAmp Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Nakonec jsme provedli qPCR pomocí karet TaqMan Array Human MicroRNA A+B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s TaqMan Universal PCR Master Mix, bez AmpErase UNG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) podle protokolu poskytnutého výrobcem. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce byla prováděna pomocí přístroje QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Pro normalizaci miR byl použit průměr všech expesí v TaqMan Array Human MicroRNA A+B Cards.

Na základě výsledků skrínungu jsme vybrali celkem 12 miR pro validaci v celé studované populaci (tab. 2). Nejprve jsme zvolili tři studijní miR, které byly ve skrínungu významně deregulovány (miR-331, miR-151-3p a miR-518d) a dosud nebyl popsán jejich přímý vztah k ateroskleróze. Dále jsme jako pozitivní kontroly vybrali miR-146a, miR-145, miR-155, miR-24 a miR-323p, které jsou dle literatury spojovány s AKS (Bao et al., 2015; Wang et al., 2016; Raitoharju et al., 2011; Di Gregoli et al., 2014; Zhu et al., 2012; Pilbrow et al., 2014). Jako kontroly včasnosti odebírání vzorků jsme vybrali miR-208 a miR-499, které jsou dle předchozích studií asociovány s nekrózou myokardu (Li et al., 2015). Nakonec jsme vybrali miR-191 a miR-223, které jsou spojeny s aktivací krevních destiček, abychom potvrdili tvorbu koronárního trombu v důsledku infarktu myokardu prvního typu (Pordzik et al., 2018).

Tab. 2 - Přehled miR vybraných na základě výsledků skriningové fáze studie k další validaci v celé populaci 60 pacientů zařazených do studijní, observační fáze studie.

<b>Studijní miR</b>	<b>Pozitivní kontroly</b>	<b>Biomarkery aktivace destiček</b>	<b>Biomarkery myokardiální nekrózy</b>
miR-331	miR-146a	miR-191	miR-208
miR-151-3p	miR-145	miR-223	miR-499
miR-518d	miR-155		
	miR-24		
	miR-323p		

### 3.2.3 Observační fáze studie

#### 3.2.3.1 Charakteristika souboru

Do této observační studie případů a kontrol bylo zařazeno celkem 60 pacientů, kteří podstoupili SKG na Kardiologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol. Soubor pacientů se skládal z kohorty 20 pacientů se STEMI a dvou shodně početných kontrolních skupin. Všichni pacienti, kteří byli do studie zařazeni, byli starší 18 let a poskytli podepsaný informovaný souhlas.

Studijní skupina byla zvolena jako modelová situace, která je nejbližším klinickým korelátem akutní ruptury TCFA a je nejlépe definovatelná pomocí běžných vyšetřovacích metod. Všichni vybraní pacienti splňovali definici STEMI podle doporučení Evropské kardiologické společnosti (tj. pacienti s přetrvávajícím hrudním dyskomfortem nebo jinými symptomy naznačujícími ischemii a významnou elevací ST segmentu alespoň ve dvou sousedících svodech) (Ibanez et al., 2018; Thygesen et al., 2018). Po odběru vzorků krve měli všichni pacienti prokázanou trombotickou okluzi věnčité tepny jako patofyziologický podklad infarktu myokardu, která byla léčena pomocí PCI. Ze studie byli vyloučeni ti pacienti, u kterých byl infarkt myokardu považován již za subakutní, tj. pokud v době příjezdu do nemocnice uplynulo více než 12h od začátku obtíží, pokud byly na EKG již patrné Q kmity, nebo pokud nebylo možno na základě symptomů rozhodnout o délce

trvání koronární okluze. Dále jsme vyřadili pacienty s aktivním zánětlivým, či onkologickým onemocněním, anémií, renálním (odhadovaná glomerulární filtrace nižší než 30 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) a jaterním selháním.

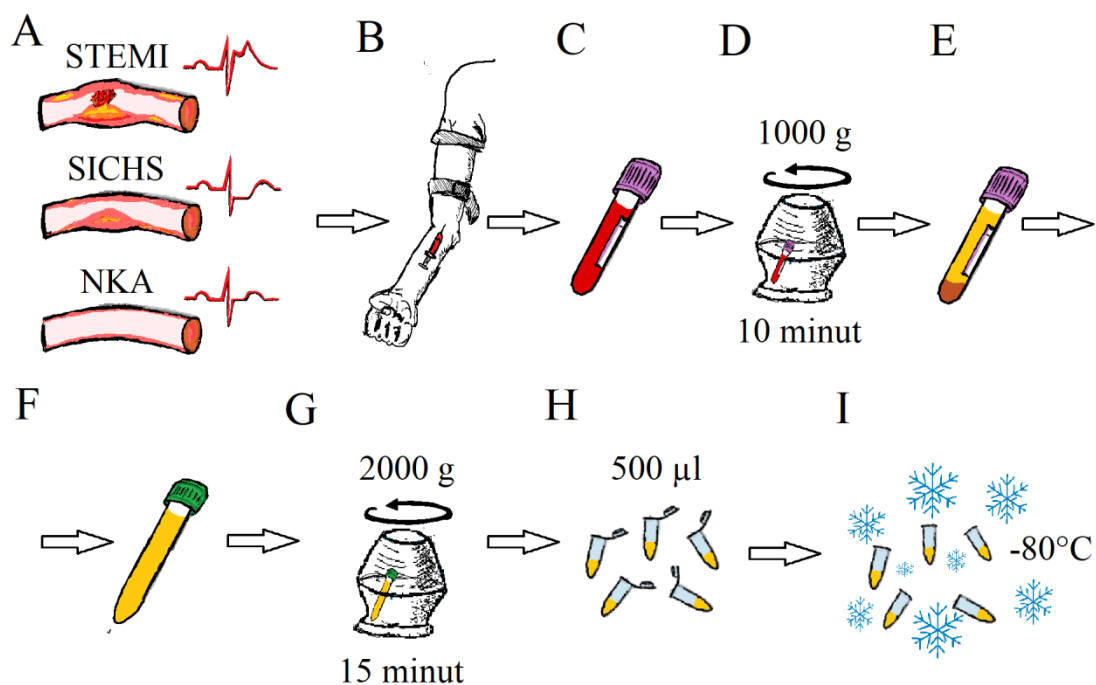
Jako první kontrola byla zvolena skupina 20 pacientů bez anginy pectoris, kteří podstoupili na Kardiologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol klinicky indikovanou SKG, která neprokázala žádné aterosklerotické postižení věnčitých tepen (NCA). Ve většině případů se jednalo o pacienty s onemocněním srdečních chlopní, kteří SKG podstoupili v rámci předoperačního vyšetření. Tato skupina sloužila k potvrzení, že studované miR jsou elevovány obecně u pacientů s koronární aterosklerózou. Podmínkou zařazení byl podepsaný informovaný souhlas a průkaz normálního koronárního angiogramu. Pro potvrzení, že jsou studované miR deregulovány pouze v kontextu AKS, a nejsou ukazatelem aterosklerózy obecně, jsme do studie zařadili druhou kontrolní skupinu 20 pacientů se stabilní anginou pectoris a alespoň jednou angiograficky verifikovanou, významnou stenózou věnčité tepny (více než 50% stenóza)(SICHS). Do obou kontrolních skupin nebyli zařazováni pacienti s aktivním zánětlivým, či onkologickým onemocněním, anémií, renálním (odhadovaná glomerulární filtrace nižší než 30 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>), či jaterním selháním.

### **3.2.3.2 Nemocniční fáze zpracování vzorků**

Vzorky periferní žilní krve byly odebírány do 9ml EDTA zkumavek. U pacientů se STEMI byla krev odebrána ihned po přijetí pacienta do nemocnice. Důvodem byla snaha o detekci co nejčasněji vyplavených miR, které by neměly mít původ v nekrotickém myokardu. Vzorky krve pacientům s SICHS byly odebrány po angiografické verifikaci významné koronární stenózy, ale vždy před provedením PCI a podáním heparinu. Toto mělo zabránit zkreslení pozorovaného nálezu provedenou PCI. Vzorky krve pacientů s NCA byly odebrány poté, co diagnostická angiografie neprokázala postižení věnčitých tepen aterosklerózou.

Ihned po odběru byly vzorky plné krve centrifugovány při 1000 g po dobu 10 minut, aby se oddělila plazma od červených krvinek. Vzorky byly následně pipetovány do zkumavek bez DNázy a RNázy a znovu centrifugovány při 2000 g po dobu 15 minut, aby se ze

vzorku odstranily i krevní destičky. Nakonec byla výsledná plazma rozdělena na alikvoty po 500  $\mu$ l do Eppendorfových zkumavek bez DNázy a RNázy, které byly hluboce zmrazeny při  $-80^{\circ}\text{C}$  (obr. 8). V této podobě byly vzorky transportovány na suchém ledu k dalšímu zpracování do výzkumné laboratoře Oddělení experimentální revmatologie, Revmatologické kliniky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Revmatologického ústavu.



Obr. 8 - schématické znázornění nemocniční fáze zpracování vzorků. Pacientům se STEMI byly v době příjezdu do nemocnice odebrány vzorky periferní žilní krve do 9ml EDTA zkumavek. U kontrolních skupin byly podobně vzorky periferní žilní krve odebírány v katetizační laboratoři po určení diagnózy a vždy před provedením PCI. Následovala centrifugace vzorků při 1000g po dobu 10 minut k oddělení plasmy. Tato byla přenesena do specializovaných zkumavek bez Dnázy a Rnázy a následně byla provedena další centrifugace při 2000g po dobu 15 minut s účelem oddělení krevních destiček. Výsledná plazma byla pipetována po do Eppendorfových zkumavek s objemem 500  $\mu$ l a byla pro další zpracování hluboce zmrazena při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

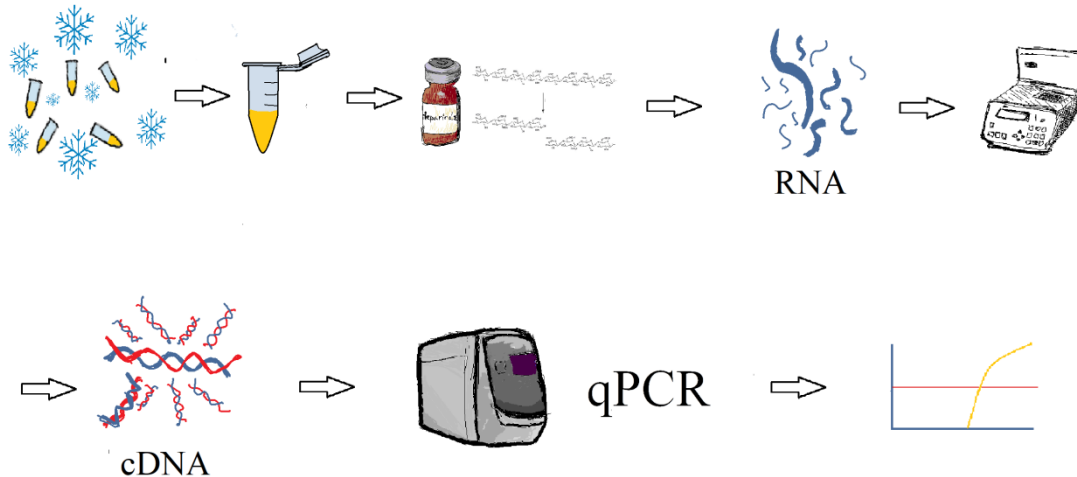
### **3.2.3.4 Laboratorní fáze zpracování vzorků**

#### **3.2.3.4.1 Izolace celkové RNA a její kvantifikace**

Pro potřeby dalšího laboratorního zpracování a kvantifikace miR bylo nejprve třeba izolovat z odebrané plasmy veškerou dostupnou ribonukleovou kyselinu, tedy tzv. celkovou RNA. Toto jsme prováděli vždy ze 100 µl vzorků plazmy pomocí komerčně dostupné soupravy miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen, Hilden, Německo). Ve všech případech bylo postupováno podle protokolu výrobce. Izolovaná celková RNA splňovala podmínky dobré kvantity i čistoty. Výsledné vzorky byly skladovány při -80°C.

#### **3.2.3.4.2 Analýza studijních miR**

Vybrané miR byly nejprve podle návodu výrobce reverzně transkribovány specifickými testy TaqMan microRNA Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pomocí komerčně dostupné sady TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Následovala reakce qPCR pomocí specifických testů TaqMan microRNA Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s TaqMan Universal PCR Master Mix, bez AmpErase UNG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Pro všechny reakce reverzní transkripce byl použit termocykler Lab Cycler (Sensoquest, Göttingen, Německo) a všechny kvantifikační reakce byly prováděny pomocí systému QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (obr. 9). Pro normalizaci bezbuněčných miR byla použita spike-in kontrola cel-miR-39 (IDT, San Jose, CA, USA), pocházející z *Caenorhabditis elegans*.



Obr 9 - schématické znázornění laboratorní fáze zpracování vzorků. Zmražené vzorky byly na suchém ledu transportovány do laboratoře Oddělení experimentální revmatologie, Revmatologické kliniky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Revmatologického ústavu. Zde byly rozmrazeny a v případě vzorků pacientů se STEMI následovala inkubace s heparinázou dle níže uvedeného protokolu. Dále jsme provedli izolaci celkové RNA, která byla poté reverzně transkribována. Výslednou komplementární DNA (cDNA) jsme pomocí komerčně dostupného kitu kvantifikovali pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce, jejímž výstupem byla amplifikační křivka.

### 3.2.3.4.3 Ošetření heparinázou I

Pacienti se STEMI byli, před přijetím do nemocnice a tedy před odběrem vzorků krve, léčeni heparinem. Heparin je dobře známým inhibítoem reverzní transkripce a qPCR (Kaudewitz et al., 2013; Boeckel et al., 2013; Li et al., 2016). Z toho důvodu jsme nejprve všechny vzorky STEMI inkubovali s 0,3 U heparinázy I z *Flavobacterium heparinum* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na 10 ng celkové RNA při 26 °C po dobu 1 hodiny před zahájením reverzní transkripce, podle protokolu publikovaného Li a kolegy (Li et al., 2016).

### **3.3 Experiment 2 - Blízká infračervená spektroskopie spojená s intravaskulárním ultrazvukem v karotických arteriích**

Cílem našeho týmu bylo porozumět lépe procesu progresu karotického plátu, který je v běžné klinické praxi nejlépe dostupný pro neinvazivní vyšetření pomocí duplexní ultrasonografie a je tak vhodnou lézí pro detekci subklinické aterosklerózy v rámci skriningového programu kardiovaskulárních onemocnění včetně AKS. Bifurkace společné karotidy je navíc zcela typickým predilekčním místem, kde vlivem sníženého ESS dochází k rozvoji aterosklerotických plátů v časně fázi aterosklerózy (Wentzel et al., 2012).

Nevýhodou bylo, že výše zmiňovaný TVC katétr umožňující vyšetření pomocí NIRS-IVUS byl validován oproti kadaverózním vzorkům věnčitých tepen a rovněž jeho in vivo validace proběhla se zaměřením na toto povodí (Gardner et al., 2008; Waxman et al., 2009). Prvním krokem v našem výzkumu tedy logicky byla tato studie, ve které jsme si kladli za cíl zejména průkaz bezpečnosti vyšetření a možnosti akvizice NIRS-IVUS dat v karotidách, které mají větší kalibr než věnčité tepny (Štěchovský et al., 2016). Na výzkumu jsem se podílel jako spoluautor a pomáhal jsem především s analýzou NIRS-IVUS dat. Data jsou hlavním tématem disertační práce kolegy dr. Štěchovského, a proto se o nich zmiňuji jen stručněji a přikládám originální publikaci (Štěchovský et al., 2016).

Studie byla koncipována jako prospektivní registr pacientů léčených na Kardiologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol pomocí karotického stentingu z důvodu významné symptomatické i asymptomatické stenózy karotidy. Všichni pacienti byli starší 18 let a podepsali informovaný souhlas. Studie byla primárně cílena na ověření bezpečnosti a proveditelnosti NIRS-IVUS v karotickém povodí. Bezpečnostními cíli byl výskyt následujících periprocedurálních příhod: trombóza na katétru, disekce karotické stěny, cévní mozková příhoda a smrt (Štěchovský et al., 2016).

Vyřazovacími kritérii studie bylo těžké srdeční selhání, aktivní krvácení, intrakraniální krvácení, renální selhání, nález kritické stenózy karotidy zobrazený jako angiografický fenomén tzv. string sign, nebo pokud byla anatomie karotidy považována za vysoce rizikovou pro zobrazení pomocí speciálního katétru pro NIRS-IVUS (např. těžká tortuozita společné nebo vnitřní karotidy, aortální oblouk třetího typu) (Štěchovský et al., 2016).



Karotický stenting byl proveden podle protokolu popsaného výše a rovněž v publikaci (Štěchovský et al., 2016). Data z TVC katétru byla akvírována vždy před predilatací, před uložením stentu a po následné eventuální postdilataci. V rámci této studie jsme u každého pacienta hodnotili 40mm dlouhý úsek tepny z dat získaných při iniciálním zobrazení před provedením predilatace léze (Štěchovský et al., 2016). Data byla v této studii hodnocena off-line přímo ve vyšetřovací konzoli pomocí dedikovaného TVC software (Infraredx a Nipro company, Bedford, MA, USA) (Štěchovský et al., 2016). Nejprve byla hodnocena data z IVUS. Vždy jsme se snažili identifikovat kontury lumen a lamina elastica externa (EEM - z angl. external elastic membrane) a z nich odvozené plochy - tj. minimální plochu lumen (MLA) a ploch ohraničenou lamina elastica extrarna ( $EEM_{CSA}$ ) (Štěchovský et al., 2016). Dále jsme určili referenční plochu lumen ( $Lumen_{CSAref}$ ) jako nejdistančnější snímek, ve kterém bylo možno ještě hodnotit obě kontury a tvz. plaque burden (viz níže) byla nižší než 35% (Štěchovský et al., 2016). Od těchto jsme poté odvodili všechny ostatní hodnoty – tj. plochu plátu ( $EEM_{CSA} - MLA$ ), plaque burden ( $EEM_{CSA} - MLA / EEM_{CSA}$ ), míru stenózy ( $Lumen_{CSAref} - MLA / Lumen_{CSAref}$ ) (Štěchovský et al., 2016). Po zhodnocení IVUS dat jsme přistoupili k analýze dat z NIRS, která byla rovněž prováděna pomocí výše zmíněného software dodaného výrobcem. Hodnotili jsme celkové LCBI v celé 40mm dlouhé oblasti, dále  $mxLCBI_{4mm}$  a nakonec LCBI 4mm úseku v místě MLA ( $LCBI_{mxMLA}$ ).

### **3.4 Experiment 3 - Analýza složení karotického plátu pomocí intravaskulární spektroskopie v závislosti na vlivu endoteliálního smykového tření**

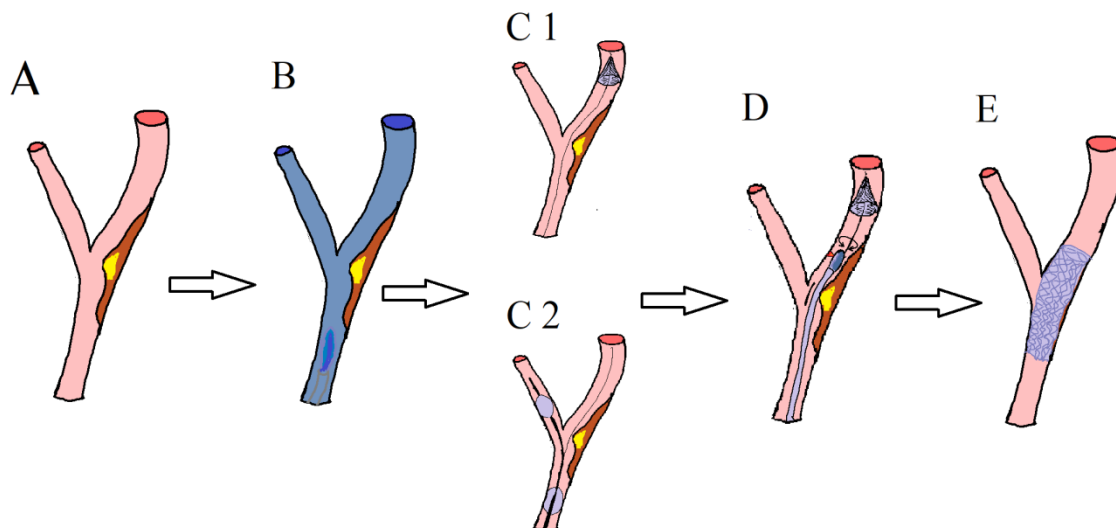
#### **3.4.1 Design studie a charakteristika souboru**

V této observační studii jsme použili data z dříve publikovaného institucionálního registru pacientů, kteří plánovaně podstoupili CAS navigovaný pomocí NIRS-IVUS na Kardiologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol (Štěchovský et al., 2016). Do registru byli zařazováni konsektivní pacienti, kteří byli indikováni k CAS z důvodu sonograficky verifikované, významné stenózy a. carotis interna. Všichni pacienti zařazení do studie byli starší 18 let. Pacienti byli ze studie vyloučeni, pokud měli renální insuficienci (odhadovaná glomerulární filtrace nižší než 30

ml/min/1,73 m<sup>2</sup>), těžké srdeční selhání, aktivní krvácení, intrakraniální krvácení, nebo pokud měli angiograficky, případně pomocí CT, prokázaný intraluminální trombus. Mezi angiografická vylučovací kritéria patřil nález kritické stenózy karotidy zobrazený jako angiografický fenomén tzv. string sign, nebo pokud byla anatomie karotidy považována za vysoce rizikovou pro zobrazení pomocí speciálního katétru pro NIRS-IVUS (např. těžká tortuozita společné nebo vnitřní karotidy, aortální oblouk třetího typu) (Štěchovský et al., 2016). Protokol studie byl schválen etickou komisí Fakultní nemocnice v Motole (EK-755/14). Všichni pacienti poskytli písemný informovaný souhlas se zařazením do registru.

### **3.4.2 Metodika zobrazení**

Všechny zákroky byly prováděny na našem pracovišti podle výše popsaného postupu. Nejprve byla angiograficky verifikována významnost karotické stenózy. V případě potvrzení významného postižení a po vyloučení angiografických vylučovacích kritérií jsme přistoupili k samotné intervenci. V úvodu byla u všech pacientů zavedena protekce proti distální embolizaci aterosklerotických hmot. K tomuto sloužila buď tzv. distální ochrana pomocí filtru [Emboshield NAV6 (Abbott Vascular, Redwood City, CA, USA)] nebo u menšího počtu pacientů proximální protekce pomocí specializovaného balónkového katétru [Mo.Ma (Invatec, Roncadelle, Itálie)]. Protekce mozku byla ve studii podmínkou před provedením NIRS-IVUS zobrazení. Volba typu ochranného zařízení byla na rozhodnutí zkušeného operátéra. K samotnému intravaskulárnímu zobrazení jsme použili výše popsaný TVC-katétr (TVC Imaging System, Infraredx a Nipro company, Bedford, MA, USA). Všechny ve studii hodnocené snímky z NIRS-IVUS byly získány před samotným CAS, který by mohl ovlivnit distribuci lipidových jader v plátu (Obr. 10). Katétr pro NIRS IVUS byl následně zaváděn vždy 30 mm distálně od angiograficky verifikovaného maxima stenózy. Z této pozice následovalo automatizované zobrazení (obr. 11). Získaná data byla pro další zpracování uložena ve formátu DICOM. Po získání dat byl proveden samotný CAS podle výše popsaného protokolu. Z důvodu získání dat pro ostatní projekty jsme prováděli další zobrazení pomocí NIRS-IVUS po predilataci léze a po samotném uložení stentu.



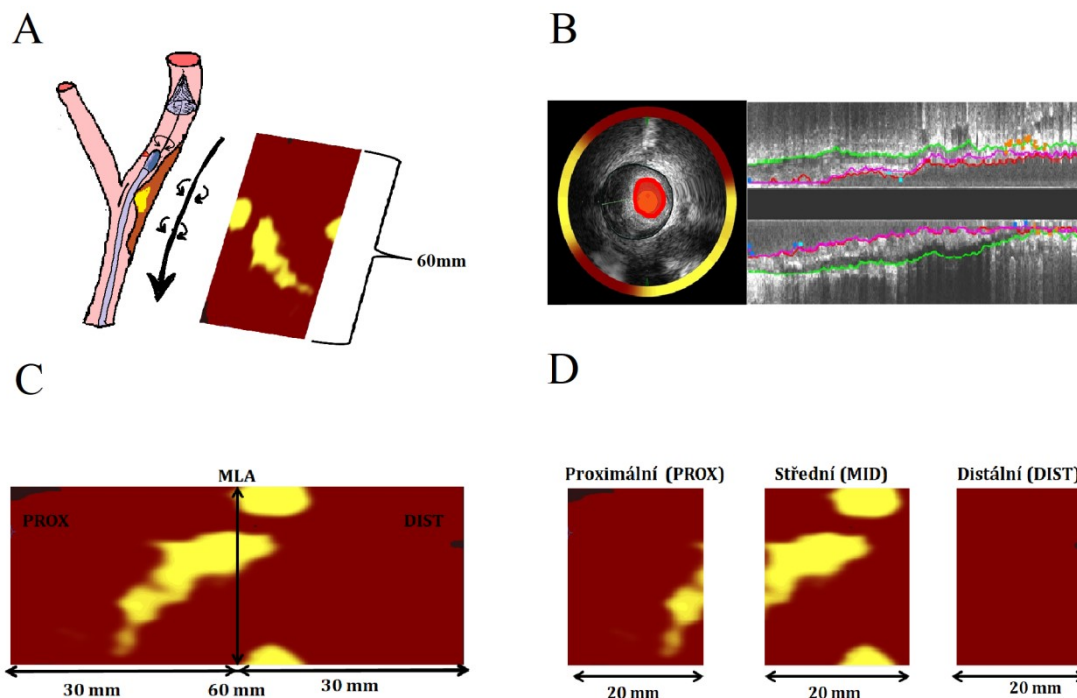
Obr. 10 - Do studie byli zařazováni elektivní pacienti se sonograficky určenou významnou stenózou a. carotis interna (panel A). Nejprve byla provedena angiografie (panel B) k potvrzení významnosti stenózy a vyloučení angiografických vylučovacích kritérií (string sign, přílišná tortuozita tepen znemožňující NIRS-IVUS zobrazení). Následně byla zavedena distální protekce proti embolizaci aterosklerotických hmot do mozku pomocí filtru (panel C1), nebo proximální protekce pomocí specializovaného balónkového katétru, který zajistí dočasné oblenění průtoku krve ošetřovanou tepnou (panel C2). Následně byla provedena akvizice NIRS-IVUS dat pomocí 60mm dlouhého automatizovaného, retrográdního posunu katétru (panel D). Po zobrazení následoval samotný karotický stenting (panel E).

### 3.4.3 Analýza NIRS-IVUS dat

Všechna data z NIRS-IVUS, uložená ve formátu DICOM, byla dále analyzována off-line pomocí specializovaného software QIvus (Medis, Leiden, NL). Tento program nám umožnil zejména poloautomatickou analýzu ultrazvukových dat. U každého pacienta byly poměrně jednoduše identifikovány obrysy lumen a vnější elastická membrána (EEM). To nám umožnilo provést základní IVUS měření, která zahrnovala velikost plátu (plaque burden), a určení maxima stenózy definovaného jako oblast MLA. Výsledky NIRS byly prezentovány současně s daty IVUS v podobě chemogramu. Množství lipidů bylo kvantifikováno jako LCBI.

Během vlastní analýzy jsme nejprve identifikovali místo MLA, které sloužilo jako referenční bod, ze kterého byla v obou směrech prováděna postupná analýza NIRS dat. Hodnota LCBI byla stanovena v rámci segmentů o šířce 2 mm. Analyzovaná céva byla

poté rozdělena na tři 20 mm dlouhé třetiny (proximální, střední a distální) pro další analýzu (obr 11). Důvodem byl fakt, že proximální a střední část plátu je vystavena vyššímu ESS (Wang et al., 2016; Cho et al., 2014). Ve studii nebyla provedena žádná přímá kvantifikace ESS.



Obr. 11 - Po zavedení protekce mozku byl 30mm distálně od maxima stenózy umístěn NIRS-IVUS katétr. Z této pozice následovalo automatizované zobrazení (panel A). Získaná IVUS data byla analyzována pomocí semiautomatického programu a byla ověřena pozice maxima stenózy definovaná jako minimální plocha lumen – MLA (panel B, MLA vyznačena červenou čarou). Následovala analýza NIRS dat v délce 30mm proximálně i distálně od MLA (panel C). Získaný chemogram byl rozdělen na 2mm dlouhé úseky a pro každý byla určena hodnota LCBI. Pro potřeby dalšího porovnání ve vztahu k ESS jsme chemogram rozdělili na tři stejně dlouhé úseky – proximální, střední a distální (panel D).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Experiment 1 - MikroRNA-331 a mikroRNA-151-3p jako biomarkery u pacientů s infarktem myokardu s elevací ST segment

#### 4.1.1 Charakteristika souboru

Do studie bylo zařazeno celkem 60 pacientů, kteří byli ve stejném poměru rozdělení mezi pacienty se STEMI (20 pacientů,  $66,1 \pm 9,5$  let, 85 % mužů) a kontrolní skupiny pacientů s

SICHS (20 pacientů,  $65,2 \pm 12,5$  let, 65 % mužů) a NCA (20 pacientů,  $56,5 \pm 12,9$  let, 55 % mužů). Základní charakteristika souboru je přehledně shrnuta v tabulce 3.

Tab. 3 - Základní charakteristiky všech tří studijních skupin. Údaje, které se významně liší mezi skupinami, jsou označeny hvězdičkou (\*) (převzato z Horváth et al., 2020). STEMI - skupina pacientů s infarktem myokardu s elevací ST-úseků; SICHS – kontrolní skupina pacientů se stabilní ischemickou chorobou srdeční; NCA – kontrolní skupina pacientů s normálním koronárním angiogramem; BMI - body mass index; AH - arteriální hypertenze; DM - diabetes mellitus; CMP - cévní mozková příhoda; ASA - kyselina acetylsalicylová; n - počet pacientů; SD - standardní odchylka.

	STEMI N =	SICHS N =	NCA N =	STEMI vs. SICHS p-hodnota	STEMI vs. NCA p-hodnota	SICHS vs. NCA p-hodnota
<b>Pohlaví (mužské) - n (%)</b>	17 (85)	13 (65)	8 (40)	0,273	0,008*	0,122
<b>Věk - průměr ± SD</b>	66.1 ± 9,5	65.2 ± 5,0	57,9 ± 12,9	0,789	0,027*	0,077
<b>BMI - průměr ± SD</b>	29.6 ± 6,8	30.1 ± 4,7	29,3 ± 4,6	0,779	0,897	0,606
<b>AH - n (%)</b>	12 (60)	17 (85)	12 (60)	0,155	1,000	0,155
<b>Dyslipidemie - n (%)</b>	6 (30)	15 (75)	11 (55)	0,010*	0,200	0,320
<b>DM - n (%)</b>	8 (40)	9 (45)	3 (15)	1,000	0,155	0,082
<b>Kuřáci - n (%)</b>	13 (65)	11 (55)	4 (20)	0,748	0,010*	0,048*
<b>CMP - n (%)</b>	1 (5)	2 (10)	1 (5)	1,000	1,000	1,000
<b>Statin - n (%)</b>	2 (10)	14 (70)	11 (55)	0,0002*	0,006*	0,515
<b>ASA - n (%)</b>	11 (55)	17 (85)	12 (60)	0,082	1,000	0,155
<b>Clopidogrel - n (%)</b>	0 (0)	10 (50)	1 (5)	0,0001*	1,000	0,003*

#### 4.1.2 Bezpečnost a proveditelnost

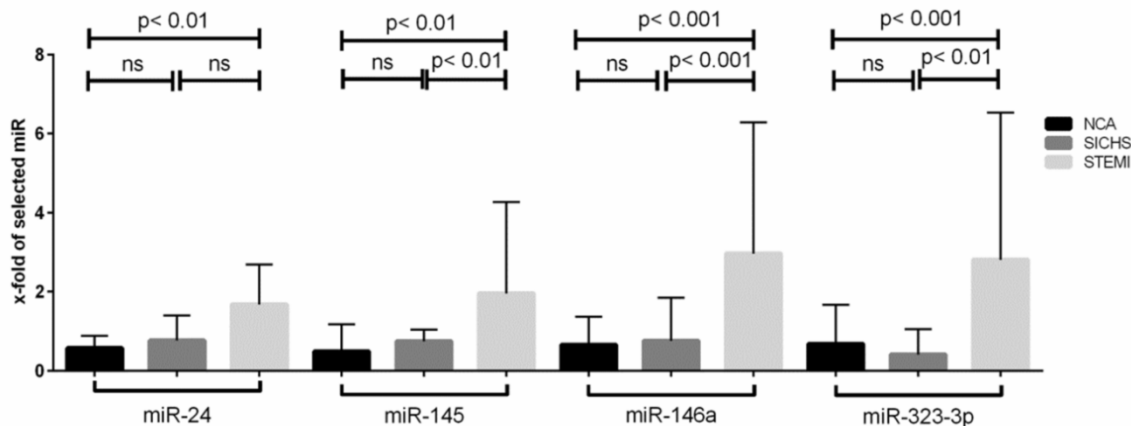
Při odběru a vyhodnocení vzorků krve nebyly zaznamenány žádné komplikace. Všichni pacienti se STEMI i všichni pacienti s SICHS byli úspěšně léčeni pomocí PCI. Nebyly pozorovány žádné komplikace diagnostické angiografie ani PCI. Všechny odebrané vzorky

byly úspěšně zpracovány a bylo z nich získáno dostatečné množství celkové RNA pro analýzu expresí miR.

#### **4.1.3 Pozitivní kontroly - biomarkery akutních koronárních syndromů**

Z pěti biomarkerů AKS, které byly do studie vybrány jako pozitivní kontroly, byly hladiny čtyř (miR-146a, miR-145, miR-24 and miR-323p) statisticky signifikantně zvýšené ve skupině pacientů se STEMI při srovnání s hladinami u pacientů s SICHS i NCA. Jedinou výjimkou byla mezi touto čtveřicí miR-24, kde byla zaznamenána statisticky významně zvýšená hladina při srovnání s pacienty s NCA. Při srovnání s SICHS byl patrný trend ke zvýšené hladině u pacientů se STEMI, ale výsledek nebyl statisticky signifikantně odlišný.

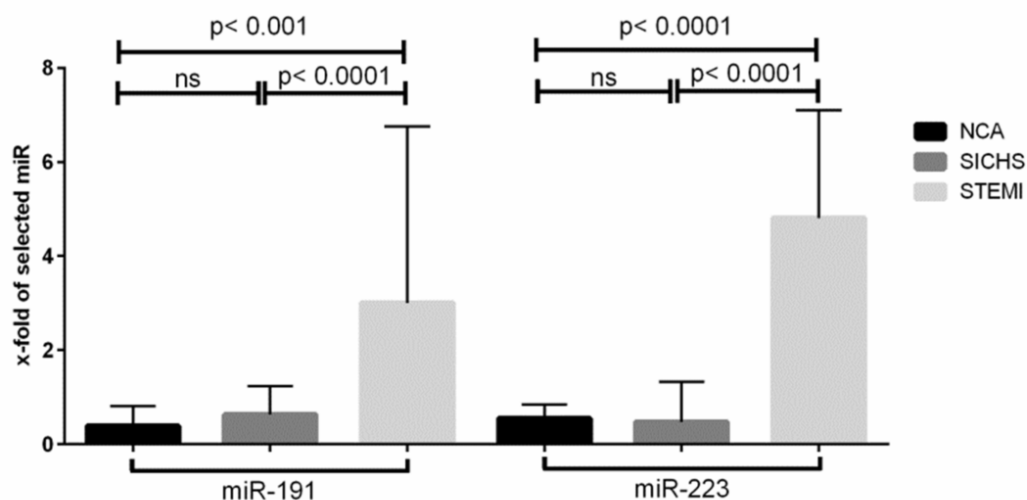
Jednotlivé výsledky je možno shrnout takto: miR-146a [STEMI: 2,970 (1,405-6,280) vs. SICHS: 0,760 (0,153-1,845),  $p < 0,001$ , STEMI: 2,970 (1,405-6,280) vs. NCA: 0,660 (0,175-1,370),  $p < 0,001$ ]; miR-145 [STEMI: 1,955 (1,025-4,270) vs. SICHS: 0,750 (0,223-1,038),  $p < 0,01$ , STEMI: 1,955 (1,025-4,270) vs. NCA: 0,490 (0,193-1,178),  $p < 0,01$ ]; miR-24 [STEMI: 1,675 (0,750-2,693) vs. SICHS: 0,765 (0,185-1,405),  $p = \text{ns}$ ; STEMI: 1,675 (0,750-2,693) vs. NCA: 0,575 (0,105-0,883),  $p < 0,01$ ] a miR-323p [STEMI: 2,805 (1,268-6,533) vs. SICHS: 0,405 (0,353-1,058),  $p < 0,01$ ; STEMI: 2,805 (1,268-6,533) vs. NCA: 0,675 (0,300-1,670),  $p < 0,001$ ]. Výsledky jsou přehledně graficky znázorněné v obr. 12. MikroRNA-155 nebyla výrazně deregulovaná v žádné ze studijních skupin.



Obr. 12 - Ve studii jsme sledovali hladinu pěti miR, které sloužily jako pozitivní kontroly. Tyto miR byly vybrány na základě jejich deregulace v iničiálním TaqMan skríníngu a literární znalosti jejich asociace s AKS (miR-146a, miR-145, miR-24, miR-155 a miR-323p). Jejich relativní exprese byly porovnány mezi třemi studijními skupinami o dvaceti pacientech pomocí Kruskal-Wallisovy jednocestné analýzy rozptylu. Zvýšená exprese čtyř z nich (miR-146a, miR-145, miR-24 and miR-323p) u pacientů se STEMI potvrdila správně provedenou metodiku odběru a zpracování krevních vzorků (převzato z Horváth et al., 2020b).

#### 4.1.4 Biomarkery aktivace krevních destiček

Další skupinou kontrolních miR byly biomarkery aktivace krevních destiček, které měly pomoci potvrdit, že patofyziologickým podkladem STEMI byla akutní trombóza. Podle očekávání jsme u pacientů se STEMI pozorovali statisticky významné zvýšení exprese obou vybraných miR (miR-191 a miR-223) při srovnání s oběma kontrolními skupinami. Výsledky je možno shrnout takto: miR-223 [STEMI: 4,810 (1,560-7,100) vs. SICHs: 0,475 (0,165-1,328);  $p < 0,0001$ ; STEMI: 4,810 (1,560-7,100) vs. NCA: 0,550 (0,270-0,850);  $p < 0,0001$ ] a pro miR-191 [STEMI: 3,000 (1,473-6,758) vs. SICHs: 0,630 (0,218-1,238);  $p < 0,001$ ; STEMI: 3,000 (1,473-6,758) vs. NCA: 0,390 (0,163-0,808);  $p < 0,0001$ ]. Výsledky jsou přehledně graficky znázorněny v obr. 13.

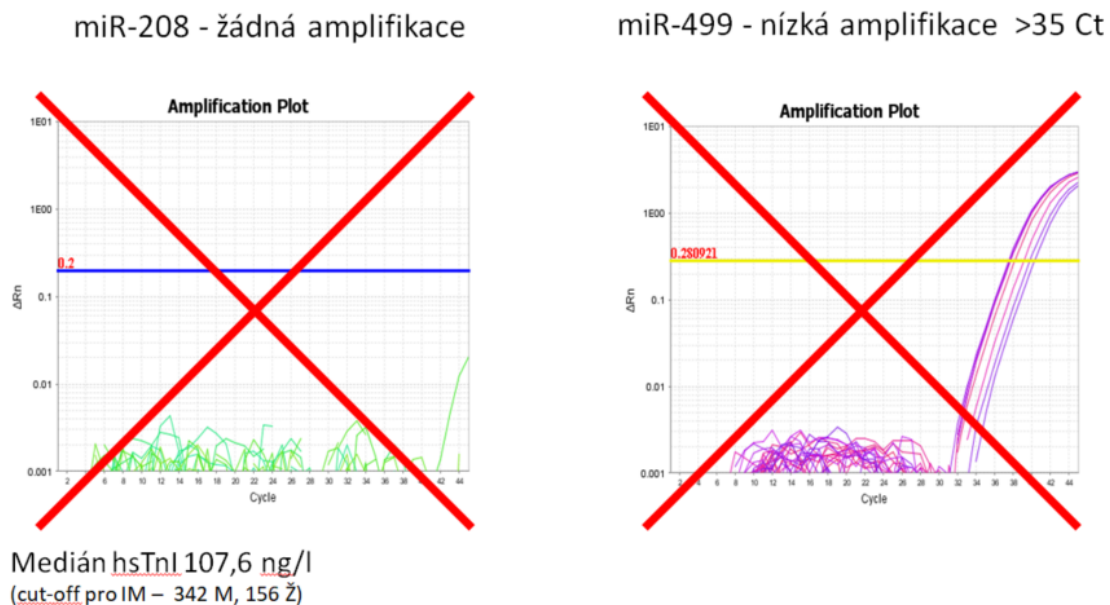


Obr. 13 - Cílem naší studie bylo nalézt miR, které se do krve vyplavují v časně fázi infarktu myokardu 1. typu, jehož patofyziologickým podkladem je ruptura nestabilního aterosklerotického plátu způsobující akutní koronární trombózu. Na základě výsledků TaqMan skríníngu a dostupných literárních dat jsme vybrali dvě miR asociované s aktivací krevních destiček (miR-223 a miR-191). Jejich zvýšená exprese u STEMI při srovnání s oběma kontrolními skupinami pomohla potvrdit tuto předpokládanou patofyziologii STEMI. Pozorování bylo ve shodě s angiografickým nálezem intrakoronárních trombů (převzato z Horváth et al., 2020).

#### 4.1.5 Biomarkery nekrózy myokardu

Na základě literárních dat jsme vybrali rovněž dva biomarkery nekrózy kardiomyocytů (miR-208 a miR-499) jako negativní kontroly. Jejich exprese nebyla, ve shodě s naším očekáváním, zvýšena u žádné ze skupin pacientů (obr. 14). Toto pozorování bylo konzistentní s detekovanými hladinami konvenčních biomarkerů myokardiální nekrózy. Medián hladiny vysoce citlivého troponinu I (hsTnI) v době odběru krve nepřekročil u pacientů se STEMI mezní hodnotu odlišující v klinické praxi pacienty s infarktem myokardu (medián hsTnI u STEMI byl 107,6 ng/l). Medián doby od začátku bolesti na hrudi do odběru vzorku krve byl u STEMI 2,25 hodiny.





Obr. 14 - Na obrázku je zobrazen ilustrační snímek amplifikačních křivek biomarkerů myokardiální nekrózy u jednoho z pacientů se STEMI (miR-208 a miR-499). Jejich účelem bylo potvrzení včasnosti odběru krevních vzorků. Cílem studie byla detekce miR vyplavených z rupturovaného aterosklerotického plátu ještě dříve, než se do krve v detekovatelném množství vyplaví působky z nekrotického myokardu. Ve shodě s naším očekáváním se tyto miR neexprimovaly v žádné ze skupin a předpokládáme tedy, že vzorky byly odebírány dostatečně časně. Toto pozorování bylo konzistentní s faktem, že medián vysoce senzitivního troponinu I byl, u pacientů se STEMI, v době odběru, ještě negativní.

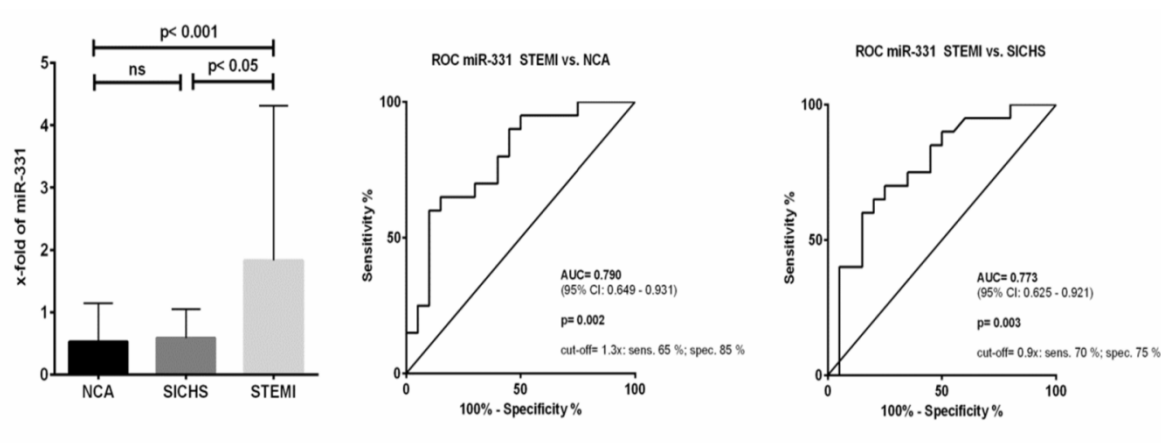
#### 4.1.6 Výsledky studijních mikroRNA

Ze tří miR, které byly na základě výsledků skriningové fáze studie vybrány jako potenciální biomarkery VP byly hladiny dvou (miR-331 a miR-151-3p) významně zvýšené u pacientů se STEMI. Třetí sledovaná miR-518d nebyla deregulována v žádné ze studijních skupin.

##### 4.1.6.1 MikroRNA-331

Exprese studijní miR-331 byla v periferní žilní krvi pacientů se STEMI statisticky významně zvýšená při srovnání s hladinami u obou kontrolních skupin [STEMI: 1,830 (0,775-4,313) vs. SICHs: 0,585 (0,243-1,050);  $p < 0,05$ ; STEMI: 1,830 (0,775-4,313) vs. NCA: 0,525 (0,176-1,140);  $p < 0,01$ ] (obr. 15). Provedli jsme ROC analýzu, která ukázala, že by miR-331 mohla být potentním biomarkerem časně fáze STEMI a potažmo ruptury aterosklerotického plátu (STEMI vs. NCA: AUC = 0,790 [95% CI; 0,649-0,931],  $p =$

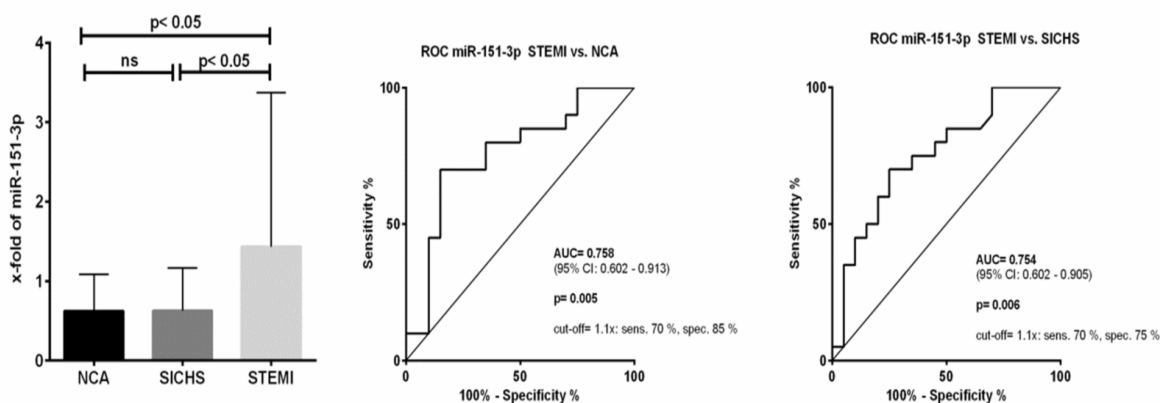
0,002; STEMI vs. SICHS: AUC = 0,773 [95% CI; 0,625 -0,921], p = 0,003) (obr. 15). Pozitivita miR-331 odlišovala STEMI od NCA se senzitivitou 65 % a specificitou 85 %. Podobně tomu bylo při odlišení od SICHS (senzitivita 65 % a specificita 80 %).



Obr.15 - Při analýze u všech šedesáti pacientů jsme pozorovali výraznou deregulaci miR-331 u pacientů se STEMI. ROC analýza potvrdila vhodnost miR-331 jako biomarkeru STEMI, a in extenso vulnerabilního aterosklerotického plátu, s dobrou senzitivitou a specificitou (převzato z Horváth et al., 2020).

#### 4.1.6.2 MikroRNA-151-3p

U miR-151-3p jsme pozorovali podobné výsledky jako u miR-331. Její plasmatické hladiny byly významně zvýšené u pacientů se STEMI ve srovnání s oběma kontrolními skupinami [STEMI: 1,430 (0,770-3,370) vs. SICHS: 0,625 (0,223-1,163); p < 0,05; STEMI: 1,430 (0,770-3,370) vs. NCA: 0,620 (0,243-1,083); p < 0,05]. ROC analýza také potvrdila dobrou schopnost odlišit STEMI od kontrolních skupin (STEMI vs. NCA: AUC = 0,758 [95% CI; 0,602-0,931], p = 0,005; STEMI vs. SICHS: AUC = 0,754 [95% CI 0,602-0,905], p = 0,006) (obr. 16). Senzitivita a specificita pro detekci pacientů se STEMI ve srovnání s NCA byla 70 %, resp. 85 %. Při použití miR-151-3p k odlišení STEMI od SICHS byla senzitivita 70 %, specificita 75 %.



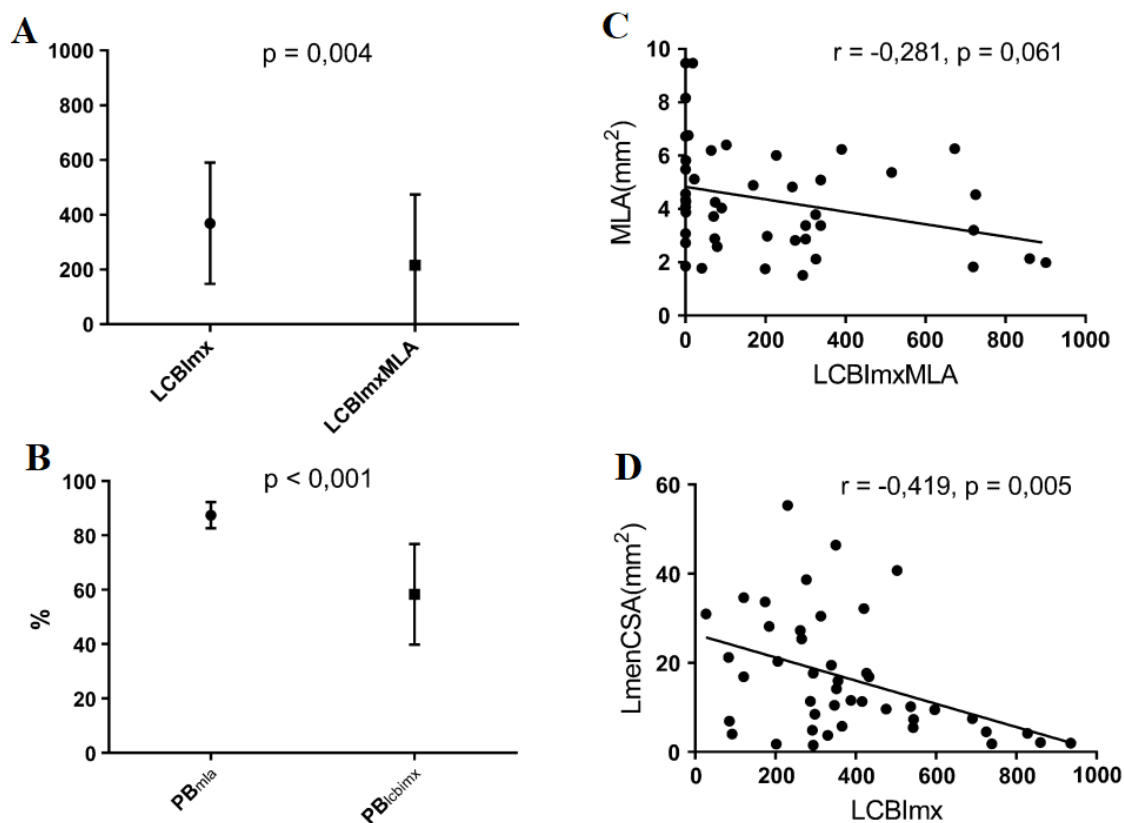
Obr. 16 - Relativní exprese miR-151-3p byly významně zvýšené u pacientů se STEMI ve srovnání s kontrolními skupinami. ROC analýza potvrdila dobrou senzitivitu a specifitu biomarkeru, pro odlišení STEMI od obou kontrolních skupin (převzato z Horváth et al., 2020).

## 4.2 Experiment 2 - Blízká infračervená spektroskopie spojená s intravaskulárním ultrazvukem v karotických arteriích

Do studie bylo zařazeno celkem 45 konsektivních pacientů (Štěchovský et al., 2016). Průměrný věk pacientů byl  $66,2 \pm 7,5$  let, muži byli léčeni častěji (28 mužů - tj. 62%) (Štěchovský et al., 2016). Osm pacientů (18%) mělo symptomatickou stenózu (Štěchovský et al., 2016). Jednalo se o typické pacienty s generalizovanou aterosklerózou, u kterých byl odpovídajícím způsobem vysoký výskyt kardiovaskulárních rizikových faktorů. Polovina pacientů měla manifestní ischemickou chorobu srdeční (22 pacientů - tj. 49%), 39 pacientů (87%) se léčilo pro arteriální hypertenzi, 18 pacientů (40%) mělo diabetes mellitus, 34 pacientů (76%) užívalo statin (Štěchovský et al., 2016). Ve studii bylo poněkud překvapivě nízké zastoupení kuřáků - 8 pacientů (18%) (Štěchovský et al., 2016).

Ve studii jsme nezaznamenali žádný prespecifikovaný bezpečnostní cíl. Vyšetření bylo v karotidách bezpečné a nebyla zaznamenána žádná závažná komplikace (Štěchovský et al., 2016). Nedošlo zejména k obávané disekci karotidy, nebo trombóze katétru (Štěchovský et al., 2016). Během krátkodobého sledování jsme nezaznamenali žádnou cévní mozkovou příhodu, či úmrtí. Vyšetření nám poskytlo v této pilotní studii několik zajímavých informací o složení karotického plátu a distribuci lipidového jádra v korelaci s jeho velikostí a závažností stenózy (obr. 17) (Štěchovský et al., 2016). Nejvíce lipidů bylo detekováno mimo oblast maxima stenózy (LCBImx  $369,1 \pm 221,1$  vs. LCBImxMLA

215,7 ± 258,9;  $p = 0,004$ ; Obr. 17 A). Naopak velikost plátu byla významně větší v místě MLA (PB<sub>mLa</sub> 87,4 ± 4,8 % vs. PBLCBImx 58,3 ± 18,2 %;  $p < 0,001$ ; Obr. 17 B). Průměrná vzdálenost NIRS-IVUS snímku s nejvyšší hodnotou LCBI od MLA byla 6,5 ± 7,7 mm. Třicet šest (80 %) snímků s maximálním LCBI bylo lokalizováno do 10 mm od MLA a 30 (67 %) snímků s maximálním LCBI bylo lokalizováno proximálně k, nebo v místě MLA. Mezi LCBI v místě MLA byla nevýznamná korelace s MLA (obr. 17 C). Maximální LCBI významně negativně korelovalo s plochou průřezu lumen v místě maximálního LCBI (obr. 17 D), ale ne s plaque burden.



Obr. 17 - Maximální LCBI v jakémkoli 4 mm segmentu ve srovnání s LCBI v segment 4 mm v místě MLA (panel A). Plaque burden v místě MLA ve srovnání s plaque burden v místě mxLCBI<sub>4mm</sub> (panel B). Korelace mezi mírou stenózy vyjádřenou jako MLA a množstvím detekovaných lipidů kvantifikovaných jako LCBI v 4 mm v místě MLA (panel C). Negativní korelace mezi průřezem tepny a maximálním LCBI v libovolném 4 mm segmentu (panel D) (upraveno podle Štěchovský et al., 2016).

### 4.3 Experiment 3 - Analýza složení karotického plátu pomocí intravaskulární spektroskopie v závislosti na vlivu endoteliálního smykového tření

#### 4.3.1 Charakteristika souboru

Do této observační studie bylo zařazeno celkem 117 pacientů ( $67,1 \pm 8,3$  let, 68 % mužů) z našeho institucionálního registru pacientů podstupujících elektivní CAS. Prevalence konvenčních rizikových faktorů aterosklerózy byla ve studii vysoká (tab. 4). Osmnáct pacientů (15,4 %) mělo symptomtomatickou stenózu, všichni ostatní pacienti byli asymptomatictí (84,6 %). Distální embolizační protekce byla použita u 104 (88,9 %) pacientů, zatímco proximální protekce byla použita u 23 (20,5 %) pacientů. Kombinace obou postupů bylo využito u 11 pacientů (9,4 %). Základní charakteristiky souboru jsou shrnuty v tabulce 4.

Tab. 4 - Zde uvádíme základní charakteristiky naší studované populace (upraveno podle Horváth et al., 2020a). N - celkový počet zapsaných pacientů; n - počet pacientů; SD - standardní odchylka; BMI - body mass index; hsCRP- C-reaktivní protein; LDL - lipoprotein s nízkou hustotou.

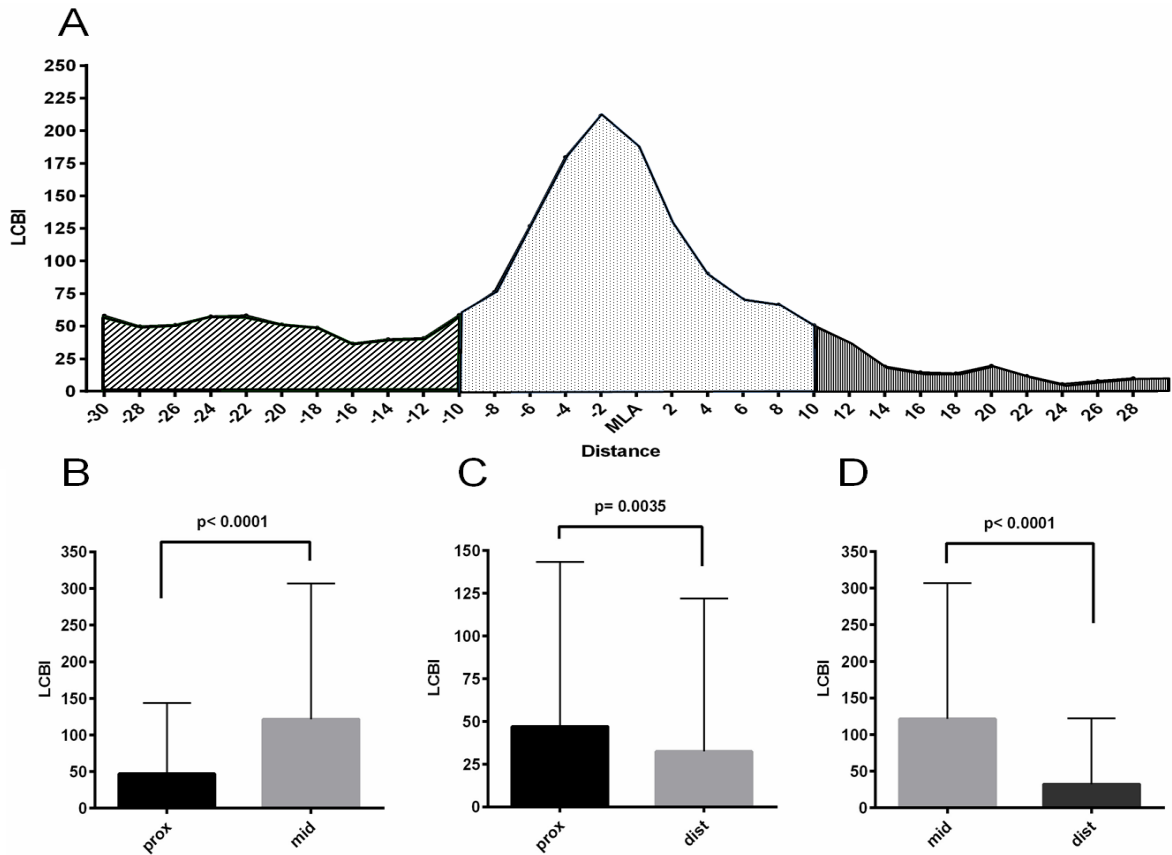
	<b>Sledovaná skupina N = 117</b>
<b>Pohlaví (mužské) - n (%)</b>	78 (68)
<b>Věk - průměr <math>\pm</math> SD (roky)</b>	$67,1 \pm 8,3$
<b>BMI - průměr <math>\pm</math> SD</b>	$28,1 \pm 4,1$
<b>Počet symptomatických stenóz - n (%)</b>	18 (15)
<b>Arteriální hypertenze - n (%)</b>	103 (88)
<b>Ischemická choroba srdeční - n (%)</b>	56 (43)
<b>Kouření - n (%)</b>	43 (37)
<b>Diabetes mellitus - n (%)</b>	40 (34)
<b>hsCRP - průměr <math>\pm</math> SD (mg/l)</b>	$2,89 \pm 2,29$
<b>Kreatinin - průměr <math>\pm</math> SD (<math>\mu</math>mol/l)</b>	$85,5 \pm 26,0$
<b>Celkový cholesterol - průměr <math>\pm</math> SD (mmol/l)</b>	$4,36 \pm 0,93$
<b>LDL cholesterol - průměr <math>\pm</math> SD (mmol/l)</b>	$2,47 \pm 0,85$

### **4.3.2 Bezpečnost a proveditelnost**

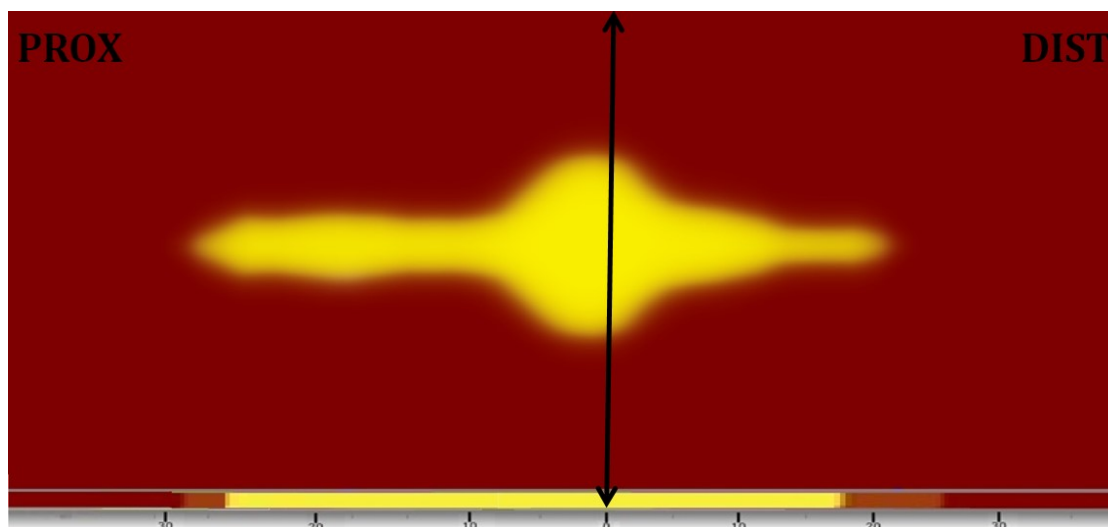
U všech pacientů byla úspěšně akvírována data z NIRS-IVUS a jejich digitální podoba umožnila analýzu pomocí QIvus. Oblast MLA byla detekovatelná u všech pacientů. Data ze spektroskopie, resp. NIRS chemogramy byly hodnotitelné u všech 117 vyšetření. Během výkonu jsme zaznamenali jednu (0,9 %) transientní ischemickou ataku. Jiné komplikace nebyly při výkonech zaznamenány.

### **4.3.3 Analýza dat z blízko-infračervené spektroskopie a intravaskulárního ultrazvuku**

Nejvyšší průměrná hodnota LCBI ( $231,96 \pm 245,7$ ) byla zaznamenán v segmentu lokalizovaném 2 mm proximálně od MLA (viz obr. 16 a 17). Průměrné LCBI v prostředním tercilu bylo statisticky významně vyšší ve srovnání jak s proximálním (průměr LCBI  $121,4 \pm 185,6$  vs.  $47,0 \pm 96,5$ ,  $P < 0,01$ ), tak s distálním tercilem (průměr LCBI  $121,4 \pm 185,6$  vs.  $32,4 \pm 89,6$ ,  $P < 0,01$ ). Spektroskopický signál lipidového jádra byl četnější v proximální části než v distální (průměr LCBI  $47,0 \pm 96,5$  vs.  $32,4 \pm 89,6$ ,  $P < 0,01$ ).



Obr. 18 - Maximální hodnota LCBI ( $231,9 \pm 245,7$ ) byla zaznamenána v segmentu lokalizovaném pouze 2 mm proximálně od maxima stenózy (panel A). Průměrné LCBI ve středním tercilu vyšetřovaného segmentu karotid byl významně vyšší (průměr LCBI  $121,4 \pm 185,6$  vs.  $46,97 \pm 96,52$ ,  $p < 0,01$ ) ve srovnání s proximální oblastí (panel B). Podobně při srovnání LCBI v distální a střední třetině (průměr LCBI  $32,44 \pm 89,61$  vs.  $121,4 \pm 185,6$ ,  $p < 0,01$ ) jsme zjistili statisticky významný rozdíl (panel D). Panel C ilustruje statisticky významný rozdíl mezi množstvím detekovaného lipidového jádra ve vysokém ESS vystaveném proximálním tercilu ve srovnání s distálním (průměr LCBI  $46,97 \pm 96,52$  vs.  $32,44 \pm 89,61$ ,  $p < 0,01$ ) (převzato z Horváth et al., 2020).



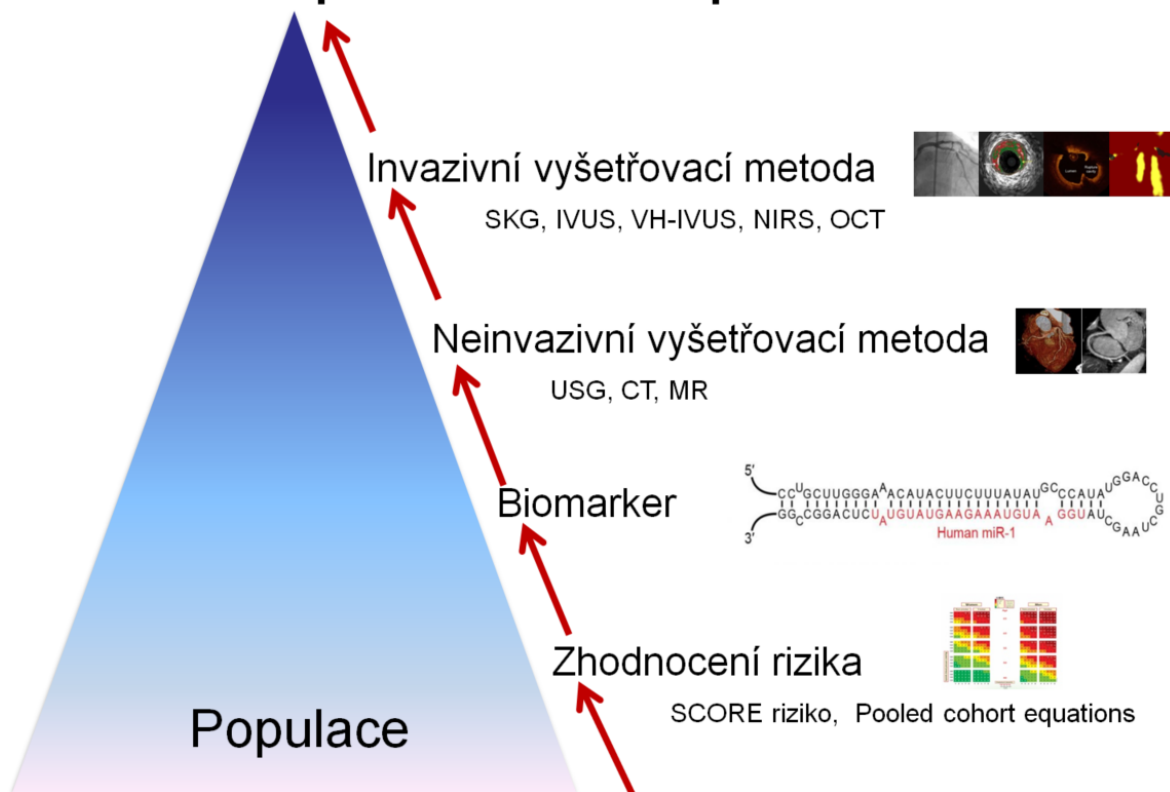
Obr. 19 - Pro lepší ilustraci našich výsledků poskytujeme čtenáři uměle vytvořený chemogram, který zobrazuje střední hodnotu LCBI v jednotlivých arteriálních segmentech. Chemogram je základním výstupem blízké infračervené spektroskopie. Žlutá barva indikuje přítomnost a umístění lipidů v lézi. Osa x představuje vzdálenost zpětného tahu v tepně, zatímco osa y znamená rotaci zobrazovací sondy od 0 do 360 stupňů (převzato z Horváth et al., 2020).

## 5 DISKUSE

Včasná in vivo detekce VP je jistě jedním z nejpálčivějších problémů moderní medicíny. Pokud bychom dokázali lépe stratifikovat pacienty v riziku budoucích aterosklerotických příhod a zároveň vyvinuli program vhodných a účinných preventivních opatření založených na nefarmakologických, ale i farmakologických intervencích, mohli bychom výrazně snížit celosvětovou morbiditu i mortalitu. Je zjevné, že tento cíl daleko přesahuje ambice této disertační práce a jedná se o problematiku, na kterou je nutno zaměřit výzkumné úsilí v celosvětovém měřítku. V této práci jsme se nicméně pokusili o doplnění důležitých informací, které by mohly napomoci pochopení patofyziologických procesů, které stojí za destabilizací VP. Toto je nejen zajímavé z vědeckého hlediska, ale můžeme doufat, že bychom našich poznatků mohli rovněž využít ve skríningu tzv. vulnerabilních pacientů, tedy pacientů s vysokým rizikem budoucích koronárních příhod. Právě z tohoto důvodu jsme se v našem výzkumu snažili držet schématu jakéhosi teoretického skrínigového programu (obr. 18) a snažili jsme se VP popsat multimodálně jednak pomocí biomarkerů, tak pomocí invazivních zobrazovacích metod.



## Vulnerabilní plát / Vulnerabilní pacient



Obr. 20 – návrh hypotetického skriningového programu. Na základě zhodnocení konvenčních kardiovaskulárních rizikových faktorů (tabulky SCORE) je selektována populace se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem, u které je stanovena hladina senzitivního a relativně specifického biomarkeru (např. miR). U pacientů s pozitivním výsledkem doplňujeme neinvazivní zobrazení tepenného povodí ke zhodnocení přítomnosti subklinických aterosklerotických změn (např. ultrazvuk karotid a CTCAG). Takto selektovaným pacientům ve vysokém riziku je nakonec provedeno vyšetření pomocí invazivních zobrazovacích metod (např. NIRS, IVUS, nebo OCT), které pomůžou definitivně odhalit tzv. vulnerabilní pacienty. Tuto nejrizikovější populaci poté budeme v primární prevenci léčit pomocí nejagresivnější možné farmakoterapie a případně i pomocí preventivní koronární intervence. USG- sonografie, CT- výpočetní tomografie, MR- magnetická rezonance, SKG- selektivní koronární angiografie, IVUS- intravaskulární ultrazvuk, VH-IVUS- virtuální histologie, NIRS- blízká infračervená spektroskopie, OCT- optická koherenční tomografie

Nejdůležitější zjištění v této práci lze shrnout následovně: 1) Identifikovali jsme dvě miR, jejichž plasmatické hladiny jsou časně zvýšené u pacientů s akutním STEMI a mohly by být biomarkery ruptury TCFA; 2) prokázali jsme bezpečnost a proveditelnost NIRS-IVUS vyšetření u pacientů s významnou stenózou arteria carotis interna; 3) Pomocí NIRS-IVUS jsme analyzovali složení karotického plátu a prokázali jsme zvýšenou detekci NIRS

signálu lipidového jádra v jeho proximální části vystavené zvýšenému ESS; 4) Data z NIRS-IVUS v karotidách jsme korelovali s výskytem konvenčních kardiovaskulárních rizikových faktorů.

### **5.1 Experiment 1 - MikroRNA-331 a mikroRNA-151-3p jako biomarkery u pacientů s infarktem myokardu s elevací ST segment**

V naší první studii jsme zvolili jako studijní skupinu model, o kterém si jsme co možná nejvíce jisti, že se jedná o klinickou jednotku způsobenou rupturou TCFA. Je nutné říci, že volbou pacientů se STEMI jsme rovněž akceptovali některá omezení, kterým jsme se snažili částečně čelit komplikovaným designem naší studie. Limitací, kterou jsme nebyli schopni obejít je fakt, že jsme vyšetřovali pacienty s již klinicky manifestní aterosklerózou ve fázi, které by zmiňovaná preventivní opatření měla a priori předcházet. To s sebou zároveň přináší rizika zkreslení našich výsledků odpovídajících patofyziologii infarktu myokardu. Působky detekované v tomto terénu nemusí mít původ jen v samotném rupturovaném VP, ale i v tvořícím se intrakoronárním trombu a nekrotickém myokardu. Bez kontrolních skupin bychom rovněž nebyli schopni říci, zda je detekovaná miR elevována pouze v kontextu přítomného VP, nebo zda se jedná o obecný biomarker aterosklerózy jako takové. Z toho důvodu jsme ve studii zavedli dvě kontrolní skupiny pacientů a tři kontrolní skupiny miR podle schématu popsaného výše v metodice.

Závěry studie lze shrnout následovně: 1) výsledky pozitivních kontrol ukazují, že metodika v této pilotní studii byla provedena správně; 2) výsledky naznačují, že zdrojem miR-331 a miR-151-3p nejsou u pacientů s infarktem myokardu nekrotické kardiomyocyty, protože biomarkery myokardiální nekrózy byly v době odběru vzorků stále negativní; 3) miR asociované s aktivací krevních destiček byly zvýšeny u STEMI, což potvrzuje, že patofyziologickým podkladem STEMI byla ruptura VP s nasedající koronární trombózou; 4) nejdůležitějším zjištěním je nově popsaná souvislost mezi plazmatickými hladinami miR-331 a miR-151-3p a STEMI.

Přestože miR nesporně mají regulační úlohu v celé řadě chorob, rozluštění mechanismů jejich účinku je mnohdy dosti obtížné. Jednak je historie výzkumu těchto molekul ještě relativně krátká, a jednak je problematika nesmírně komplikovaná. MikroRNA běžně

regulují celé genové sítě a ne pouze jednu kontrétní molekulární dráhu. Působení jednotlivých miR se navíc navzájem ovlivňuje. Z toho důvodu často i zdánlivě nelogické závěry a asociace mohou být ve skutečnosti správné.

### **5.1.1 Pozitivní kontroly**

Ve studii jsme potvrdili již dříve popsanou asociaci mezi hladinami čtyř miR (miR-146a, miR-145, miR-24 a miR-323p) a AKS. Zvýšené hladiny těchto předem zvolených pozitivních kontrol potvrdily správně provedenou metodiku odběru, zpracování a vyhodnocení vzorků periferní žilní krve v naší studii. Naše data jsou navíc do jisté míry unikátní, protože jsme měli ve srovnání s dříve publikovanými studiemi lépe definované skupiny pacientů. V dříve publikovaném výzkumu byla často používána obecnější definice AKS, aby se zjednodušil nábor pacientů (Leistner et al., 2016; Soeki et al., 2015). Často byli zahrnuti pacienti s nestabilní anginou pectoris, či infarktem myokardu bez elevací ST úseků. Takto definované skupiny s AKS jistě zahrnují i pacienty, u kterých není patofyziologickým podkladem AKS ruptura nestabilního TCFA (Leistner et al., 2016; Soeki et al., 2015). Všichni pacienti zařazení do této studie, včetně negativních kontrol, měli navíc dobře definovanou koronární anatomii pomocí SKG a dobře definovaná základní klinická data. Dalším faktem, který odlišuje současná data od předchozího výzkumu, je to, že hladiny miR byly stanoveny ze vzorků periferní žilní krve spíše než ze vzorků získaných přímo z koronárních tepen nebo koronárního sinu (Leistner et al., 2016; Soeki et al., 2015). To může jistě vést k neschopnosti detekovat malé rozdíly v hladinách miR. Domníváme se však, že tento přístup by se dal mnohem lépe převést do běžné klinické praxe.

### **5.1.2 Biomarkery myokardiální nekrózy**

Dalším důležitým pozorováním v naší studii byl fakt, že v době odběru vzorků u pacientů se STEMI nedošlo k elevaci hladin miR-208 a miR-499, které byly v předchozím výzkumu asociovány s kardiomyocyty a myokardiální nekróza vede ke zvýšení jejich plasmatické hladiny. Medián hladiny hsTnI u kohorty STEMI pacientů byl navíc v době odběru rovněž ještě pod hraniční hodnotou odlišující infarkt myokardu. Tato fakta naznačují, že jsme vzorky krve u pacientů se STEMI odebírali dostatečně včas, dříve než by naše výsledky

byly příliš zkráceny působky vyplavenými z nekrotického myokardu při reperfúzi. Původ elevovaných biomarkerů by tak mohl být přímo v rupturovaném VP. Všichni pacienti se STEMI měli akutní arteriální okluzi v důsledku akutní koronární trombózy potvrzenou pomocí SKG. Vzhledem k tomu, že ruptura TCFA je nejčastější příčinou trombózy věnčitých tepen související s VP, předpokládáme, že elevace miR-331 a miR-151-3p může být přímo spojena s přítomností takových aterosklerotických lézí (Virmani et al., 2006; Bentzon et al., 2014).

### **5.1.3 Biomarkery aktivace krevních destiček**

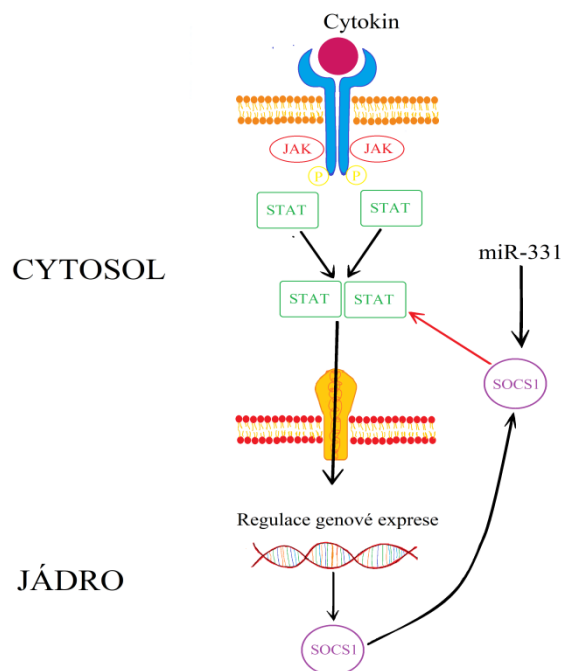
Plazmatické hladiny miR-223 a miR-191 asociovaných s aktivací krevních destiček byly u STEMI dle našeho očekávání zvýšeny (Willeit et al., 2013; Sunderland et al., 2017). To pomohlo potvrdit, že mechanismem akutní arteriální okluze byla tvorba intrakoronárního trombu při infarktu myokardu 1. typu. Je zároveň patrné, že alternativním vysvětlením pro zvýšení plazmatických hladin studijních miR-331 a miR-151-3p, by mohla rovněž být asociace s aktivací krevních destiček. Tento fakt nicméně nevylučuje potenciál využít tyto miR jako biomarkery VP. Z dřívějších pozorování víme, že VP jsou asociovány s celou řadou subklinických ruptur, které vedou k tvorbě nástěnných intrakoronárních trombů a postupné progresi stenózy (Bentzon et al., 2014). Dřívější pozorování navíc ukázala, že miR pocházející z krevních destiček mohou přímo ovlivnit genovou expresi v sousedních buňkách včetně endotelií (Laffont et al., 2013; Pordzik et al., 2018). Myslíme si tedy, že i takovéto biomarkery by mohly být vhodnými ukazateli prognózy u pacientů s aterosklerózou.

### **5.1.4 MikroRNA-331**

O molekulární biologii miR-331 máme dosud poměrně málo poznatků. Její deregulace byla u lidí spojena s patogenezí různých onkologických onemocnění včetně hepatocelulárního karcinomu, rakoviny prostaty a zejména hematologických malignit (Zanette et al., 2007; Epis et al., 2009; Zhao et al., 2016; Butrym et al., 2015). V malé studii kadaverózních preparátů získaných z aneuryzmat břišní aorty bylo pozorováno snížení její hladiny (Pahl et al., 2012). Několik observačních studií zjistilo expresi miR-331 v makrofázích (Luers et al., 2010; Naqvi et al., 2016). Zajímavým pozorováním je

fakt, že je její exprese zvýšená u mnoha typů leukémie, včetně akutních myeloidních leukémií (Zhao et al., 2016; Butrym et al., 2015). To naznačuje možnou souvislost s monocyto-makrofágovým systémem (Zhao et al., 2016; Butrym et al., 2015). Studie provedená na pacientech s chronickou lymfocytární leukémií rovněž zjistila zvýšení hladin miR-331 (Zhao et al., 2016). Autoři popsali možnou asociaci mezi touto molekulou a supresorem cytokinového signalizačního proteinu 1 (SOCS1), tedy inhibitorem dráhy Janus kinázy/převodníku signálu s aktivátorem transkripce (JAK/STAT) (Zhao et al., 2016).

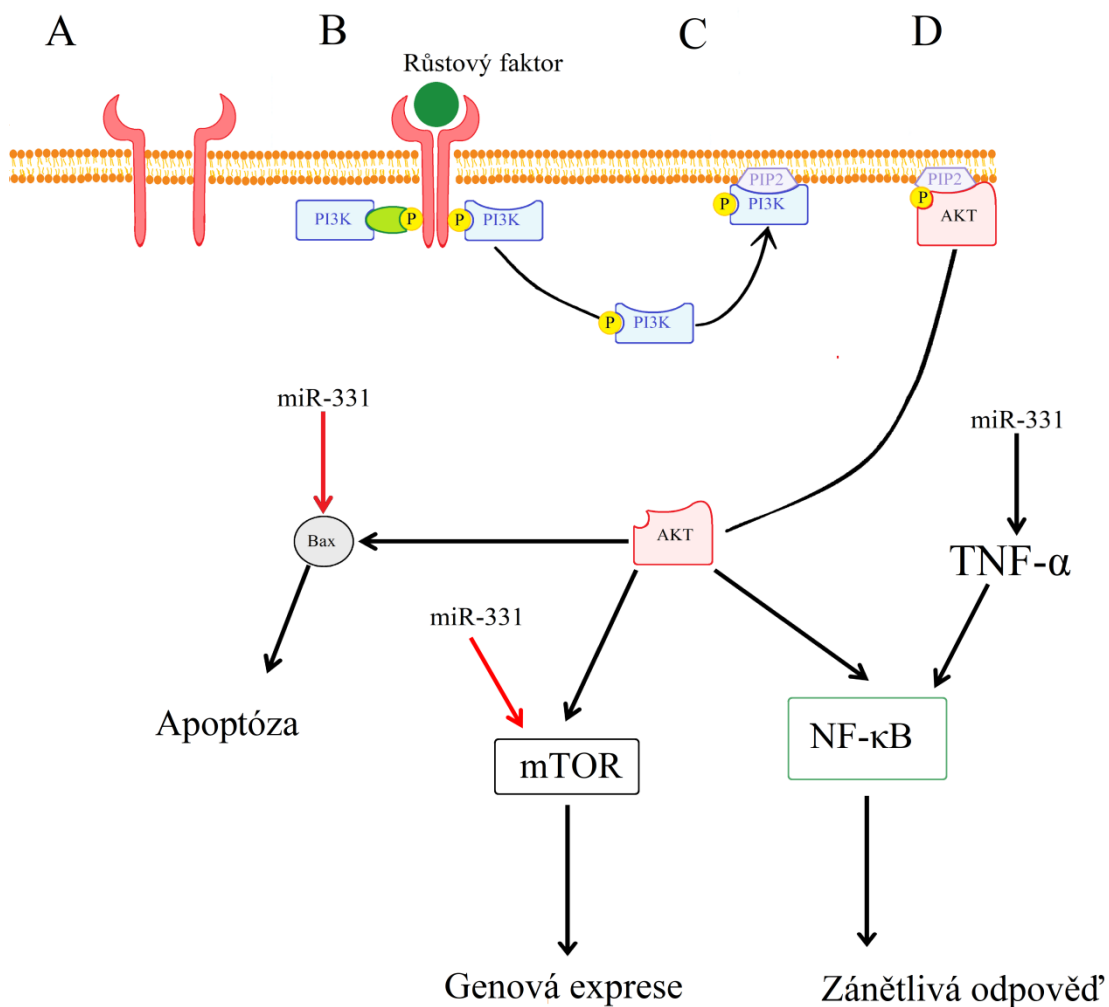
Signální dráha JAK/STAT je jednou z hlavních drah zprostředkující mezibuněčné interakce pomocí různých signálních molekul, zejména mnoha cytokinů (Feng et al., 2022). Systém se skládá z receptoru, jehož intracelulární doména po navázání cílového působku dimerizuje a váže JAK kinázu (Feng et al., 2022). Aktivita JAK poté vede k fosforylaci tyrosinových zbytků a tvorbě vazebných míst pro STAT, který je aktivován. Transkripční faktor STAT v aktivovaném stavu dimerizuje a je transportován do jádra, kde váže cílové geny a ovlivňuje jejich transkripci (Feng et al., 2022). Tímto mechanismem je cytokiny ovlivňována exprese mnoha různých genů, a tak se JAK/STAT dráha účastní na regulaci zánětlivé odpovědi, buněčné infiltrace, proliferace, maturace i apoptózy některých buněk (Feng et al., 2022). Víme, že v kontextu tvorby aterosklerotického plátu tato dráha hraje roli v patofyziologii endoteliální dysfunkce, zánětlivé infiltrace, tvorbě scavengerových receptorů, podporuje proliferaci a migraci hladkých svalových buněk a dále například neovaskularizaci pokročilého aterosklerotického plátu (Feng et al., 2022). Ovlivnění signalizační dráhy JAK/STAT na úrovni jejího inhibitoru by mohlo být jedním z vysvětlení pozorované nadměrné exprese miR-331 u STEMI. Zvýšení exprese SOCS1, a jeho inhibiční účinek na cytokinové signály zprostředkované pomocí JAK/STAT, bylo identifikováno jako protizánětlivý mechanismus bránící progresi aterosklerózy (Xiao et al., 2011). MikroRNA mají schopnost blokovat SOCS1, což naopak vede k prozánětlivé odpovědi během vývoje aterosklerotických plátů. Právě toto by mohl být potenciální mechanismus vlivu miR-331 na destabilizaci VP (obr. 21) (Xiao et al., 2011).



Obr. 21 - Navrhované vysvětlení působení miR-331 na destabilizaci aterosklerotického plátu. V tomto schématu miR-331 snižuje účinek proteinu SOCS1, který negativní zpětnou vazbou ovlivňuje transdukcii signálu pomocí transkripčního faktoru STAT. Efektem by tedy mohlo být zvýšení účinku transdukční dráhy JAK/STAT, která má proaterogenní účinky (Zhao et al., 2016).

Dalším možným spojením mezi miR-331 a rupturou VP by mohl být jeho předpokládaný vliv na signální transdukční dráhu fosfatidylinositol 3-kinázy/proteinkinázy B (PI3K/AKT), která hraje roli ve stabilizaci VP (Zhao et al., 2016; Auge et al., 2002; Zhai et al., 2014). Signální dráha PI3K/Akt je velmi komplexní (Zhao et al., 2021). Má mnoho účinků a její patofyziologie byla zkoumána zejména v kontextu nádorových onemocnění (Zhao et al., 2021). Dráha zprostředkovává zejména transdukcii signálů mnoha růstových faktorů včetně fibroblastového růstového faktoru, vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, angiotensinu 1 a insulinu (Zhao et al., 2021). Receptor je po navázání příslušného růstového faktoru aktivován a dochází k jeho fosforylaci. Ta poté buď přímo, nebo pomocí dalších působků umožní navázání a aktivaci PI3K. V další fázi se aktivovaná kináza váže na membránový fosfolipid fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP<sub>2</sub>). Další fosforylace PIP<sub>2</sub> pomocí PI3K umožňuje aktivaci proteinkinázy B, neboli Akt. Tento protoonkogen slouží jako tzv. druhý posel a má v buňkách pleiotropní účinky. Kromě jiného ovlivňuje cestou

vazby s proteinem Bax apoptózu (Zhao et al., 2021). Dále cestou proteinkinázy mTOR (z angl. mammalian target of rapamycin) ovlivňuje genovou expresi na úrovni translace s účinky na zvýšení buněčného přežití (Zhao et al., 2021). V kardiologii známe účinek této dráhy z každodenní praxe. Cytostatika potahující lékové stenty, která mají za cíl snížení proliferace endotelií v rámci procesu tzv. neointimální hyperplázie, jsou odvozená od rapamycinu (sirolimu) a ovlivňují tedy právě účinek mTOR (Daniel et al., 2017). Dráha reguluje celou řadu buněčných pochodů, včetně proliferace, diferenciací, migrace, buněčného metabolismu a působí proti programované smrti (Zhao et al., 2021). V kontextu aterosklerotického plátu byl popsán její vliv na rozvoj endoteliální dysfunkce, na proliferaci a tvorbu pěnových buněk a na patologickou diferenciaci hladkých svalových buněk do jejich syntetické formy (Zhao et al., 2021). Recentně byl popsán vliv aktivace této signální dráhy na excesivní apoptózu pěnových buněk v pozdějších fázích vývoje VP (Zhao et al., 2021). Toto vede k rapidní progresi a destabilizaci aterosklerotického plátu (Zhao et al., 2021). Vliv samotné miR-331 na míru apoptózy právě cestou signální dráhy PI3K/Akt byl popsán u kolorektálního a nasofaryngeálního karcinomu (Zhao et al., 2016; Zhang et al., 2021). V obou pracích byla pozorována negativní vazba mezi miR-331 a expresí proteinu Bax, který je ústřední molekulou v PI3K/Akt zprostředkované apoptóze (Zhao et al., 2016; Zhang et al., 2021). Ovlivnění této signální dráhy bylo již dříve popsáno i u miR-155, což je však jediná pozitivní kontrola, která nebyla v této studii deregulována (Zhai et al., 2014). Snížení miR-155 a miR-135b ve studii Zhai a kolegů vedlo cestou inhibice signální dráhy PI3K/Akt/mTOR k posílení autofagie makrofágů a snížení infiltrace aterosklerotických plátů makrofágy (Zhai et al., 2014). Ovlivnění genové exprese pomocí mTOR a z toho plynoucí vliv na buněčné pochody by tedy potenciálně mohl být dalším mechanismem, kterým miR-331 hraje roli v patofyziologii VP (Obr. 22).



Obr. 22 - Dalším možným vysvětlením úlohy miR-331 v patofyziologii destabilizace aterosklerotického plátu by mohl být její vliv na signální dráhu PI3/Akt/mTOR. V minulosti byla popsána negativní zpětná vazba mezi hladinou miR-331 a expresí proteinu Bax důležitého v proapoptotické signalizaci. Zdá se, že miR-331 může rovněž ovlivňovat hladinu serin/threonin kinázy mTOR, čímž ovlivňuje celou řadu buněčných pochodů včetně diferenciacie, proliferace, migrace a buněčného metabolismu. Posledním mechanismem by mohlo být ovlivnění zánětlivé odpovědi v monocyto-makrofágovém systému cestou ovlivnění NF-κB nejen cestou této signální transdukční dráhy, ale i cestou ovlivnění hladiny TNF-α.

Fan a kolegové pospali na vzorcích intrakraniálních aneurysmat vztah miR-331-3p k regulaci hladkých svalových buněk (Fan et al., 2020). V patofyziologii intrakraniálních aneurysmat je důležitý proces dediferenciacie hladkých svalových buněk a jejich přeměna v



syntetickou formu a zvýšení frekvence jejich apoptózy (Fan et al., 2020). Proces je urychlován vlivem TNF- $\alpha$  a CD14 (Fan et al., 2020). Tento proces připomíná změny, které pozorujeme při formování TCFA během procesu destabilizace aterosklerotických plátů. Autoři popsali protektivní účinek miR-331-3p cestou negativní zpětné vazby vedoucí ke snížení exprese TNF- $\alpha$  a CD14 (Fan et al., 2020). Podobný mechanismus účinku byl popsán u známé proaterogenní miR-146a (Pereira-Da-silva et al., 2021). V jedné menší preklinické studii Rowley a kolegové identifikovali čtyři miR (miR-326, miR-128, miR-500 a právě miR-331) jako možné regulátory genové exprese v krevních destičkách získaných z laboratorních myší (Rowley et al., 2016). Snížení hladiny miR-331 by dle autorů mělo vést k zvýšené afinitě integrinů IIbIIIa k fibrinogenu a tedy k protrombogennímu účinku (Rowley et al., 2016). Autoři v diskusi článku dále popisují, že podobné změny pozorovali i u miR-223, která byla v naší studii zvolena jako kontrolní miR sledující aktivaci krevních destiček (Rowley et al., 2016). Zvýšení hladin miR-331 bylo pozorováno u lidí vystavených znečištěnému ovzduší, které může působit aterogenně cestou zvýšeného oxidativního stresu (Pergoli et al., 2017).

### **5.1.5 MikroRNA-151-3p**

MikroRNA 151-3p je malá nekódující molekula RNA o délce 21 nukleotidů, která společně s 5' koncem (miR-151-5p) dohromady tvoří hsa-mir-151 a je kódována sekvencí lokalizovanou na chromozómu 8. Patří do společné genové rodiny s další lidskou miR-28. O biologickém významu miR-151-3p máme rovněž dosud poměrně malé množství poznatků. Několik studií pozorovalo souvislost s nádorovými onemocněními (McNally et al., 2013; Yeh et al., 2016). Její přímá souvislost s patofyziologií aterosklerózy nebyla dosud popsána. Podobně jako u miR-331 by vysvětlením mohla být asociace se systémem JAK/STAT. Liu a kolektiv publikovali velmi zajímavou práci, ve které pozorovali interakci mezi miR-151-3p a STAT3 (Liu et al., 2018). Autoři využili jako model buněčnou kulturu myších makrofágů a pomocí metody tzv. mikroRNA in vivo precipitace popsali silnou asociaci mezi expresí miR-151-3p a STAT3 (Liu et al., 2018). V další části výzkumu poté stimulovali makrofágy pomocí lipopolysacharidu a pozorovali nepřímou úměru mezi expresí miR-151-3p a STAT3 (Liu et al., 2018). Zvýšení hladiny miR vedlo k potlačení exprese STAT3 a následně snížení produkce interleukinu-6 (IL-6) (Liu et al.,

2018). Interleukin-6 je důležitý prozánětlivý cytokin, který ovlivňuje produkci proteinů akutní fáze a rovněž specifickou imunitní odpověď na úrovni B-lymfocytů i T-buněk. V dřívějších pozorováních byl popsán jeho silný proaterogenní vliv (Liu et al., 2018). Působí jako důležitý chemoatraktant pro neutrofile a makrofágy a zároveň způsobuje aktivaci endoteliálních buněk a tím ovlivňuje produkci adhezivních molekul a dalších cytokinů (Liu et al., 2018). Jeho hladina je výrazně elevována v aterosklerotických plátech (Reiss et al., 2017). V prospektivní studii pacientů, kteří recentně prodělali AKS bylo zvýšení hladiny IL-6 nezávislým rizikovým faktorem budoucích kardiovaskulárních příhod (Fanola et al., 2017). Z tohoto pohledu by tedy snížení hladiny IL-6 v důsledku zvýšené exprese miR-151-3p mohlo mít pozitivní vliv na stabilizaci aterosklerotického plátu. Účinky IL-6 jsou nicméně komplexnější a na jisté úrovni působí i protizánětlivě (Reiss et al., 2017). Asociace mezi miR-151-3p a expresí IL-6 by tedy mohla být možným vysvětlením deregulace u STEMI. V jedné studii byl popsán neuroprotektivní účinek zvýšené exprese miR-151-3p u pacientů s Alzheimerovou chorobou na podkladě ovlivnění míry oxidativního stresu a ovlivnění apoptózy cestou aktivace dráhy Death-associated protein kinase 1 (DAPK-1) a tumor supresorového genu p53 (Guo et al., 2021). V jiné menší preklinické studii byl popsán vliv DAPK-1, cestou ovlivnění exprese miR-590-3p, na zvýšení aktivity lipoproteinové lipázy (Zhen et al., 2019). Toto mělo negativní účinek na hladiny lipoproteinů a potažmo na indukci prozánětlivé reakce v aterosklerotickém plátu doprovázené elevací cytokinů (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  a IL-6) (Zhen et al., 2019). Gen p53 může rovněž hrát roli v destabilizaci aterosklerotického plátu. Kromě jiného bylo popsáno, že zvýšení jeho exprese vlivem oxidativního stresu vede k rozvoji endoteliální dysfunkce. Zdá se, že rovněž ovlivňuje míru apoptózy makrofágů v aterosklerotickém plátu (Chan et al., 2022). Právě zvýšená míra apoptózy a nedostatečná efferocytóza je zásadním faktorem v progresi nekrotického jádra a rozvoji TCFA (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Von der Thüsen a kolegové popsali na modelu apo-E knock-out myši vliv nadměrné exprese p53 na destabilizaci plátu (Chan et al., 2022; Von Der Thüsen et al., 2002). U příbuzné miR-28 byl popsán vliv na expresi genu ABCA1, který hraje roli v metabolismu lipidů a u heterozygotů s defektem v tomto genu může docházet k předčasnému rozvoji aterosklerózy (Westerterp et al., 2014; Liu et al., 2015). Zvýšení hladin miR-28-5p bylo pozorováno u pacientů s nestabilní anginou pectoris (Liu et al., 2015). V několika pracích byla popsána

souvislost mezi expresí miR-151-3p a ovlivněním translace vysoce konzervovaného genu pro TWIST1 (Yeh et al., 2016; Nairismägi et al., 2013). Tento transkripční faktor hraje důležitou roli v embryogenezi, ale byl rovněž popsán jeho vliv na patofyziologii mnoha nádorů (Yeh et al., 2016; Nairismägi et al., 2013). Nejdůležitější je nicméně fakt, že je jeho exprese ovlivňována vlivem ESS a právě v oblastech cév se sníženým ESS (vnitřní část cévních kurvatur, bifurkace cév) dochází k jeho zvýšené produkci (Mahmoud et al., 2016). Zdá se, že dosud nepřiliš dobře pochopenými mechanismy má důležitý vliv na endoteliální funkci, proliferaci endotelií a angiogenezi (Mahmoud et al., 2016). V jiné práci byl popsán vliv TWIST1 na dediferenciaci hladkých svalových buněk, což je důležitý mechanismus v progresi aterosklerotického plátu a rozvoji jeho nestability (Nurnberg et al., 2020).

### **5.1.6 Limitace studie**

Studie má jisté limitace, které je nutné zmínit. Největší limitací je jistě její observační design a limitovaný počet pacientů. To nám neumožnilo spolehlivě ověřit, zda hladiny studijních miR nemůžou být ovlivněny některými možnými zavádějícími (confounding) faktory, které nebyly mezi skupinami pacientů rovnoměrně vyváženy. Rozdíly ve výchozích klinických datech jsou uvedeny výše v tabulce 3. Jejich důvodem byla především odlišná distribuce rizikových faktorů u pacientů s NCA, která měla svůj původ v samotné indikaci koronarografie u těchto pacientů. Vztah mezi hladinami miR v periferní krvi a věkem byl již dříve dobře popsán a rozdíly mezi pohlavími by výsledky neměly významně ovlivnit (Meder et al., 2014). Prevalence diabetes mellitus byla nižší u NCA, což mohlo ovlivnit hladiny obou studijních miR (Rome, 2013). Pokud by byl původ studijních miR v krevních destičkách, tak by jejich hladiny mohly být rovněž ovlivněny antiagregační terapií, která byla nerovnoměrně užívána mezi studijními skupinami (Willeit et al., 2017; Sunderland et al., 2017). Studie byla příliš malá na to, abychom otestovali, zda elevace studijních miR není závislá na rozsahu nekrózy, resp. na vrcholové hladině TnI. Toto by bylo jistě velmi zajímavé zjištění, protože si na základě výsledků nemůžeme být jistí, že pozorované elevace miR nejsou jen důsledkem velmi citlivého biomarkeru myokardiálního poškození. Tento by nicméně musel být citlivější než hsTnI a obě zvolené kontrolní miR asociované s nekrózou myokardu. Je otázkou, zda by takto citlivý biomarker

nebyl sám o sobě dostatečným prognostickým ukazatelem, který by pomohl zachytit pacienty ve vysokém riziku fatální příhody.

## **5.2 Experiment 2 - Blízká infračervená spektroskopie spojená s intravaskulárním ultrazvukem v karotických arteriích**

Hlavní zjištění této studie lze shrnout takto: 1) Nejcennější informací pro nás byl fakt, že je možné bezpečně provést NIRS-IVUS vyšetření u pacientů během karotického stentingu, kde tato metoda nebyla doposud nikdy in vivo použita. Získaná data byla navíc dobře hodnotitelná; 2) Lipidová jádra byla častěji detekována v oblastech s mírnější stenózou a menší mírou pozitivní remodelace vyjádřenou jako plaque burden; 3) Většina lipidů byla nicméně detekována v blízkosti MLA s tendencí většího výskytu v proximálních oblastech plátu; 4) Hodnota LCBI negativně korelovala s plochou průřezu tepny.

Tato data byla dosud první publikací zabývající se možností použití NIRS-IVUS ke studiu složení karotického plátu (Štěchovský et al., 2016). Ve studii jsme nezaznamenali žádné bezpečnostní cíle a usuzujeme tedy, že je metoda při použití protekce distální embolizace aterosklerotických hmot bezpečná (Štěchovský et al., 2016). Metoda byla předtím validována k využití v koronárních tepnách, které mají nicméně menší kalibr a vzdálenost sondy od stěny tepny je u nich tedy menší. Důležitou otázkou tedy byla spolehlivost IVUS zobrazení a především detekce lipidových jader pomocí NIRS i na tuto větší vzdálenost. Naše data naznačují, že je toto vyšetření pro karotidy dostatečně citlivé. Je na druhou stranu nutné zmínit, že jsme u třetiny (36%) pacientů měli problémy s detekcí kontur EEM z důvodu velkého kalibru tepny a především akustického stínu způsobeného kalcifikacemi plátů. Asi u čtvrtiny pacientů (27%) jsme z podobných důvodů našli částečné výpadky NIRS signálu na chemogramu. Tato fakta je důležité zohlednit při interpretaci našich dalších NIRS-IVUS výsledků.

### **5.3 Experiment 3 - Analýza složení karotického plátu pomocí intravaskulární spektroskopie v závislosti na vlivu endoteliálního smykového tření**

Základní zjištění studie lze shrnout takto: 1) NIRS signál lipidového jádra byl nejčastěji v blízkosti maxima stenózy vnitřní karotidy; 2) lipidový signál byl pomocí NIRS detekován častěji v proximálních částech karotického plátu.

Tato pozorování mohou být potenciálně vysvětlena vlivem ESS. Výzkum v minulých desetiletích prokázal, že ESS je nezávislým rizikovým faktorem aterosklerózy (Cunningham a Gotlieb, 2005). Vystavení endoteliálních buněk nízkému ESS vede k řadě epigenetických modifikací, které působí proaterogenně, tak jak bylo popsáno v úvodu práce.

Působení nízkého ESS na endotelie má ve zvířecích modelech vliv na expresi odlišných povrchových molekul, což vede ke změně tvaru endotelií, změně jejich permeability a schopnosti vázat různé molekuly včetně molekul LDL cholesterolu a povrchových molekul zánětlivých buněk (Wang et al., 2016; Hung et al., 2015). Výsledkem je zvýšení depozice lipidů, oxidativní stres a aktivace prozánětlivých drah (Wang et al., 2016; Hung et al., 2015). Tyto nežádoucí změny mají v časných stádiích aterosklerózy důležitý proaterogenní účinek a jsou vysvětlením proč aterosklerotické pláty vznikají v typických predilekčních oblastech (Hung et al., 2015). Vysoké ESS je spojováno s destabilizací AP v pozdějších fázích aterosklerózy (Hung et al., 2015; Makris et al., 2010; Cheng et al., 2006). Na zvířecím modelu simulujícím vysoké ESS pomocí částečné ligace karotidy byl popsán nárůst exprese genů pro NO syntetázu (Wang et al., 2016). Dalším popsáním důsledkem vysokého ESS je nárůst exprese MMP (Wang et al., 2016). V další studii byl popsán vliv vysokého ESS na produkci plasminu a TGF- $\beta$  (Wang et al., 2016). Všechny tyto jevy se podílí na nežádoucích změnách ve složení extracelulární matrix a její postupné degradaci (Wang et al., 2016). Další důsledek zvýšené produkce oxidu dusnatého je makrofágy zprostředkovaná apoptóza hladkých svalových buněk v cévní stěně (Wang et al., 2016). Ta se podílí na tvorbě nekrotického jádra a změnách, které mohou v konečném důsledku vést k ruptuře AP (Wang et al., 2016; Wentzel et al., 2013). Klinická data pak potvrzují tyto principy faktem, že ruptury AP se vyskytují nejčastěji v oblastech vysokého ESS (Groen et

al., 2007; Costopoulos et al., 2017). In vivo zobrazovací studie s IVUS a optickou koherenční tomografií potvrdily přítomnost různých známek vulnerability AP v proximálních částech koronárních stenóz (Candrea et al., 2022; Thondapu et al., 2021; Costopoulos et al., 2019; Wentzel et al., 2013). Při využití trojrozměrné arteriální rekonstrukce umožňující modelování vlivu ESS pomocí tzv. výpočetní dynamicky tekutin (CFD) jsou tyto známky vulnerability pozorovány právě v oblastech exponovaných vysokému ESS (Candrea et al., 2022; Thondapu et al., 2021; Costopoulos et al., 2019; Wentzel et al., 2013). Recentně publikovaná prospektivní studie popsala podobný výsledek při vyšetření pomocí NIRS-IVUS v koronárních tepnách (Shishikura et al., 2018). Zde autoři našli souvislost mezi velikostí ESS při iniciálním vyšetření a progresí LCBI při kontrolním vyšetření vedoucí rozvoji NIRS definovaného AP bohatého na lipidy (Shishikura et al., 2018). Na základě těchto poznatků tedy předpokládáme, že i naše pozorování mohou být vysvětleny vlivem vysokého ESS na destabilizaci karotického AP.

Pokud je nám známo, tato studie je první, která zkoumala prostorové rozložení lipidového jádra pomocí NIRS v karotických tepnách. Většina dříve publikovaného výzkumu s NIRS byla zaměřena na věnčité tepny, kde byl katétr validován proti pitevním vzorkům (Gardner et al., 2008; Waxman et al., 2009). Bylo prokázáno, že vysoké LCBI dobře predikuje léze, které způsobí AKS (Madder et al. 2015; Madder et al., 2016; Karlsson et al., 2019). Různé studie našly souvislost mezi výchozí hodnotou LCBI a budoucími koronárními příhodami (Danek et al., 2017; Schuurman et al., 2018; Waksman et al., 2019; Erlinge et al., 2021)

Ve světle těchto zjištění věříme, že detekce lipidových jader pomocí NIRS v proximálních částech karotického plátu může do budoucna ovlivnit naše klinické rozhodování. Odhad ESS pomocí neinvazivní metody by mohl podat informace, které by následně ovlivnily volbu mezi farmakoterapií a invazivní léčbou. Informace o lokalizaci lipidového jádra může pomoci s optimalizací karotického stentingu tak, aby stent pokryl celou lézi a předešlo se distální embolizaci ateromových hmot (Dixon et al., 2012; Horváth et al., 2016).

To jsou však pouze hypotézy, které v současnosti nejsou podpořeny žádnými vědeckými důkazy. Nebyla publikována žádná prospektivní studie využívající zobrazování NIRS v karotidách, kde tato metoda není dosud dostatečně validována.

V předchozí sekci jsme popsali studii, ve které jsme dokumentovali bezpečnost a proveditelnost zobrazení NIRS v karotických tepnách (Štěchovský et al., 2016). Popsali jsme pozorování, že LCBI během CAS klesá. Toto přisuzujeme distální embolizaci LCP tak, jak jsme popsali v publikované kazuistice (Horváth et al., 2016). Tato pozorování nás ujišťují, že metoda NIRS je schopna detekce LCP v karotických tepnách, přestože mají větší průměr než věnčité tepny. Nicméně absence validační studie NIRS v karotidách je jistě důležitou limitací, která musí být brána v úvahu při interpretaci našich výsledků. Alternativním vysvětlením vyšší detekce lipidů v oblasti maxima stenózy by tak mohla být zlepšená detekce daná menší vzdáleností mezi stěnou tepny a katétrem. Proti tomuto vysvětlení nicméně hovoří fakt, že jsme měřili vyšší LCBI v proximální části karotického plátu, kde je průměr tepny největší.

Naše studie má několik důležitých limitací. Zjevnou limitací je zejména fakt, že vliv ESS byl pouze odhadován a nebyl nijak kvantifikován. Naše data pocházela z retrospektivního registru a neměli jsme dostupné zobrazení, které by nám dovolilo provedení CFD. Samotný vztah mezi naším pozorováním a působením ESS je nutné lépe ověřit. Jednalo se o poměrně malou observační studii, která nám neumožnila ověřit, zda má naše pozorování nějaký klinický význam. Měla by proto být považována za pilotní projekt, jehož cílem je vytvářet hypotézy pro další výzkum.

## 6 ZÁVĚR

- 1) Identifikovali jsme dvě miR, jejichž plasmatické hladiny určené ze vzorků periferní žilní krve jsou zvýšené u pacientů v časné fázi infarktu myokardu s elevací ST úseků a mohly by být biomarkery ruptury vulnerabilního aterosklerotického plátu.
- 2) Prokázali jsme bezpečnost a proveditelnost NIRS-IVUS vyšetření u pacientů s významnou stenózou arteria carotis interna.
- 3) Pomocí NIRS-IVUS jsme analyzovali složení karotického plátu a prokázali jsme zvýšenou detekci NIRS signálu lipidového jádra v jeho proximální části vystavené zvýšenému ESS.
- 4) Množství lipidů v karotickém plátu detekované pomocí metody NIRS-IVUS je asociováno s konvenčními rizikovými faktory aterosklerózy.



## **7 SOUHRN**

### **7.1 MikroRNA-331 a mikroRNA-151-3p jako biomarkery u pacientů s infarktem myokardu s elevací ST segment**

V této studii jsme porovnali hladiny miR ve vzorcích periferní žilní krve mezi skupinou pacientů s akutní rupturou aterosklerotického plátu (pacienti se STEMI) a kontrolními skupinami pacientů se stabilní ischemickou chorobou srdeční a normálním koronárním angiogramem. Studie vedla k identifikaci miR-331 a miR-151-3p, které byly zvýšeně exprimovány u pacientů se STEMI a mohly by sloužit jako biomarkery vulnerabilního aterosklerotického plátu.

### **7.2 Blízká infračervená spektroskopie spojená s intravaskulárním ultrazvukem v karotických arteriích**

V tomto prospektivním registru pacientů, kteří podstoupili elektivní CAS, jsme se pokusili ověřit bezpečnost a proveditelnost NIRS-IVUS vyšetření v karotidách. Ve studii jsme nezaznamenali žádné bezpečnostní cíle (trombóza na katétru, disekce karotické stěny, cévní mozková příhoda a smrt) a usuzujeme tedy, že je metoda při použití protekce distální embolizace aterosklerotických hmot bezpečná.

### **7.3 Analýza složení karotického plátu pomocí intravaskulární spektroskopie v závislosti na vlivu endoteliálního smykového tření**

V této observační studii jsme analyzovali složení karotického plátu v závislosti na předpokládaném rozložení ESS. Hodnotili jsme 60mm dlouhý úsek tepny v okolí maxima karotické stenózy určeného pomocí IVUS jako minimální plochu lumen (MLA). Tento úsek byl pro další porovnání předpokládaného vlivu ESS rozdělen na tři tercily-proximální, střední a distální. NIRS detekované lipidové jádro se ve shodě s naší hypotézou vyskytovalo častěji v proximální části karotického plátu.

## **8 SUMMARY**

### **8.1 MicroRNA-331 and microRNA-151-3p as biomarkers in patients with ST-segment elevation myocardial infarction**

In this study, we compared miR levels in peripheral venous blood samples between a group of patients with acute atherosclerotic plaque rupture (STEMI patients) and control groups of patients with stable ischemic heart disease and with normal coronary angiogram. The study led to the identification of miR-331 and miR-151-3p, which were overexpressed in STEMI patients and could serve as biomarkers of vulnerable atherosclerotic plaque.

### **8.2 Near-infrared spectroscopy combined with intravascular ultrasound in carotid arteries**

In this prospective registry of patients who underwent elective CAS, we attempted to verify the safety and feasibility of NIRS-IVUS examination in carotids. We did not observe any safety end-points in the study (catheter thrombosis, carotid wall dissection, stroke, and death), and we therefore conclude that the method is safe.

### **8.3 Carotid artery plaque composition and distribution: near-infrared spectroscopy and intravascular ultrasound analysis**

In this observational study, we analysed carotid plaque composition as a function of presumed ESS distribution. We evaluated a 60 mm long segment of the artery around the maximum carotid stenosis determined by IVUS as the minimum lumen area (MLA). This section was divided into three tertiles - proximal, middle and distal - for further comparison of the predicted influence of ESS. In agreement with our hypothesis, the lipid core detected by NIRS occurred more frequently in the proximal part of the carotid plaque.

## 9 LITERATURA

- AUGE, Nathalie, Virginie GARCIA, Françoise MAUPAS-SCHWALM, Thierry LEVADE, Robert SALVAYRE a Anne NEGRE-SALVAYRE, 2002. Oxidized LDL-Induced Smooth Muscle Cell Proliferation Involves the EGF Receptor/PI-3 Kinase/Akt and the Sphingolipid Signaling Pathways. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. **22**(12), 1990–1995 [vid. 2018-10-14]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/01.ATV.0000043453.21629.3B
- BADIMON, L. a G. VILAHUR, 2014. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *Journal of Internal Medicine* [online]. **276**(6), 618–632 [vid. 2022-09-17]. ISSN 1365-2796. Dostupné z: doi:10.1111/JOIM.12296
- BAO, Mei-Hua, Yan XIAO, Qing-Song ZHANG, et al., 2015. Meta-Analysis of miR-146a Polymorphisms Association with Coronary Artery Diseases and Ischemic Stroke. *Int. J. Mol. Sci* [online]. **16**, 14305–14317 [vid. 2018-09-30]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms160714305
- BENTZON, Jacob Fog, Fumiyuki OTSUKA, Renu VIRMANI a Erling FALK, 2014. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation Research* [online]. **114**(12), 1852–1866 [vid. 2022-09-10]. ISSN 15244571. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302721/FORMAT/EPUB
- BEREZIKOV, Eugene, Wei-Jen CHUNG, Jason WILLIS, Edwin CUPPEN a Eric C. LAI, 2007. Mammalian Mirtron Genes. *Molecular Cell* [online]. **28**(2), 328–336 [vid. 2018-10-06]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2007.09.028
- BIRNBAUM, Yochai, James Michael WILSON, Miquel FIOL, Antonio Bayés DE LUNA, Markku ESKOLA a Kjell NIKUS, 2014. ECG diagnosis and classification of acute coronary syndromes. *Annals of noninvasive electrocardiology: the official journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc* [online]. **19**(1), 4–14. ISSN 1542-474X (Electronic). Dostupné z: doi:10.1111/anec.12130
- BOECKEL, Jes-Niels, Claudia E THOMÉ, David LEISTNER, Andreas M ZEIHNER, Stephan FICHTLSCHERER a Stefanie DIMMELER, 2013. Heparin Selectively Affects the Quantification of MicroRNAs in Human Blood Samples. *Clinical Chemistry* [online]. **59**(7), 1125–1127 [vid. 2018-10-14]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2012.199505
- BROWN, Adam J., Zhongzhao TENG, Paul C. EVANS, Jonathan H. GILLARD, Habib SAMADY a Martin R. BENNETT, 2016. Role of biomechanical forces in the natural history of coronary atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* [online]. **13**(4), 210–220 [vid. 2018-10-14]. ISSN 1759-5002. Dostupné z: doi:10.1038/nrcardio.2015.203
- BRUGALETTA, Salvatore, Hector M. GARCIA-GARCIA a Patrick W. SERRUYS, 2012. Perspective on the use of true vessel characterization imaging in interventional cardiology clinical practice. *Interventional Cardiology: Reviews, Research, Resources* [online]. **7**(1), 17–20. ISSN 17561485. Dostupné z: doi:10.15420/ICR.2012.7.1.17

- BRUGALETTA, Salvatore, Hector M GARCIA-GARCIA, Patrick W SERRUYS, et al., 2011. NIRS and IVUS for characterization of atherosclerosis in patients undergoing coronary angiography. *JACC. Cardiovascular imaging* [online]. **4**(6), 647–55 [vid. 2013-03-31]. ISSN 1876-7591. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcmg.2011.03.013
- BRUGGINK, Janneke L M, Robbert MEERWALDT, Gooitzen M VAN DAM, et al., 2010. Spectroscopy to improve identification of vulnerable plaques in cardiovascular disease. *The international journal of cardiovascular imaging* [online]. **26**(1), 111–9 [vid. 2013-03-31]. ISSN 1875-8312. Dostupné z: doi:10.1007/s10554-009-9500-z
- BUTRYM, Aleksandra, Justyna RYBKA, Dagmara BACZYŃSKA, Andrzej TUKIENDORF, Kazimierz KULICZKOWSKI a Grzegorz MAZUR, 2015. Expression of microRNA-331 can be used as a predictor for response to therapy and survival in acute myeloid leukemia patients. <http://dx.doi.org/10.2217/bmm.14.112> [online]. **9**(5), 453–460 [vid. 2022-10-23]. ISSN 17520371. Dostupné z: doi:10.2217/BMM.14.112
- CALVERT, Patrick A, Daniel R OBAID, Michael O’SULLIVAN, et al., 2011. Association between IVUS findings and adverse outcomes in patients with coronary artery disease: the VIVA (VH-IVUS in Vulnerable Atherosclerosis) Study. *JACC. Cardiovascular imaging* [online]. **4**(8), 894–901. ISSN 1876-7591 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1016/j.jcmg.2011.05.005
- CANDREVA, Alessandro, Mattia PAGNONI, Maurizio Lodi RIZZINI, et al., 2022. Risk of myocardial infarction based on endothelial shear stress analysis using coronary angiography. *Atherosclerosis* [online]. **342**, 28–35 [vid. 2022-10-23]. ISSN 18791484. Dostupné z: doi:10.1016/j.atherosclerosis.2021.11.010
- CAPLAN, Jay D, Sergio WAXMAN, Richard W NESTO a James E MULLER, 2006. Near-infrared spectroscopy for the detection of vulnerable coronary artery plaques. *Journal of the American College of Cardiology* [online]. **47**(8 Suppl), C92-6 [vid. 2013-03-31]. ISSN 1558-3597. Dostupné z: doi:10.1016/j.jacc.2005.12.045
- CASSIS, Lisa A. a Robert A. LODDER, 1993. Near-IR imaging of atheromas in living arterial tissue. *Analytical chemistry* [online]. **65**(9), 1247–1256 [vid. 2022-09-10]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/AC00057A023
- COSTOPOULOS, Charis, Yuan HUANG, Adam J. BROWN, et al., 2017. Plaque Rupture in Coronary Atherosclerosis Is Associated With Increased Plaque Structural Stress. *Jacc. Cardiovascular Imaging* [online]. **10**(12), 1472 [vid. 2020-01-26]. Dostupné z: doi:10.1016/J.JCMG.2017.04.017
- COSTOPOULOS, Charis, Lucas H. TIMMINS, Yuan HUANG, et al., 2019. Impact of combined plaque structural stress and wall shear stress on coronary plaque progression, regression, and changes in composition. *European heart journal* [online]. **40**(18), 1411–1422 [vid. 2022-10-23]. ISSN 1522-9645. Dostupné z: doi:10.1093/EURHEARTJ/EHZ132
- CUNNINGHAM, Kristopher S a Avrum I GOTLIEB, 2005. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Laboratory Investigation* [online]. **85**(1), 9–23 [vid. 2020-01-26]. ISSN 0023-6837. Dostupné z: doi:10.1038/labinvest.3700215

- DANEK, Barbara Anna, Aris KARATASAKIS, Judit KARACSONYI, et al., 2017. Long-term follow-up after near-infrared spectroscopy coronary imaging: Insights from the lipid cORe plaque association with CLinical events (ORACLE-NIRS) registry. *Cardiovascular Revascularization Medicine* [online]. **18**(3), 177–181 [vid. 2020-01-29]. ISSN 15538389. Dostupné z: doi:10.1016/j.carrev.2016.12.006
- DANIEL, Jan Marcus, Jochen DUTZMANN, Hannes BRUNSCH, et al., 2017. Systemic application of sirolimus prevents neointima formation not via a direct anti-proliferative effect but via its anti-inflammatory properties. *International Journal of Cardiology* [online]. **238**, 79–91. ISSN 0167-5273. Dostupné z: doi:10.1016/J.IJCARD.2017.03.052
- DAWBBER, T. R., G. F. MEADORS a F. E. MOORE, 1951. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *American journal of public health and the nation's health* [online]. **41**(3), 279–281 [vid. 2022-09-10]. ISSN 0002-9572. Dostupné z: doi:10.2105/AJPH.41.3.279
- DE BOER, Sanneke P.M., Salvatore BRUGALETTA, Hector M. GARCIA-GARCIA, et al., 2014. Determinants of high cardiovascular risk in relation to plaque-composition of a non-culprit coronary segment visualized by near-infrared spectroscopy in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *European heart journal* [online]. **35**(5) [vid. 2022-09-10]. ISSN 1522-9645. Dostupné z: doi:10.1093/EURHEARTJ/EHT378
- DE KORTE, Chris L, Stephanie G CARLIER, Frits MASTIK, et al., 2002. Morphological and mechanical information of coronary arteries obtained with intravascular elastography; feasibility study in vivo. *European heart journal* [online]. **23**(5), 405–413. ISSN 0195-668X (Print). Dostupné z: doi:10.1053/ehj.2001.2806
- DI GREGOLI, Karina, Nicholas JENKINS, Rebecca SALTER, Stephen WHITE, Andrew C. NEWBY a Jason L. JOHNSON, 2014. MicroRNA-24 Regulates Macrophage Behavior and Retards Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. **34**(9), 1990–2000 [vid. 2018-09-30]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.114.304088
- DIXON, Simon R., Cindy L. GRINES, Ahmad MUNIR, et al., 2012. Analysis of Target Lesion Length Before Coronary Artery Stenting Using Angiography and Near-Infrared Spectroscopy Versus Angiography Alone. *The American Journal of Cardiology* [online]. **109**(1), 60–66 [vid. 2020-02-27]. ISSN 00029149. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjcard.2011.07.068
- DOHI, Tomotaka, Akiko MAEHARA, Pedro R MORENO, et al., 2015. The relationship among extent of lipid-rich plaque, lesion characteristics, and plaque progression/regression in patients with coronary artery disease: a serial near-infrared spectroscopy and intravascular ultrasound study. *European heart journal. Cardiovascular Imaging* [online]. **16**(1), 81–87. ISSN 2047-2412 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1093/ehjci/jeu169
- ECONOMOU, Evangelos K., Evangelos OIKONOMOU, Gerasimos SIASOS, et al., 2015. The role of microRNAs in coronary artery disease: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Atherosclerosis* [online]. **241**(2), 624–633 [vid. 2018-09-30]. ISSN 00219150. Dostupné z: doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.06.037

- EPIS, Michael R, Keith M GILES, Andrew BARKER, Tulene S KENDRICK a Peter J LEEDMAN, 2009. miR-331-3p regulates ERBB-2 expression and androgen receptor signaling in prostate cancer. *The Journal of biological chemistry* [online]. **284**(37), 24696–704 [vid. 2018-10-14]. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M109.030098
- ERLINGE, David, Akiko MAEHARA, Ori BEN-YEHUDA, et al., 2021. Identification of vulnerable plaques and patients by intracoronary near-infrared spectroscopy and ultrasound (PROSPECT II): a prospective natural history study. *The Lancet* [online]. **397**(10278), 985–995 [vid. 2022-09-13]. ISSN 1474547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(21)00249-X
- FAN, Weijian, Yizhi LIU, Chuanyong LI, Xiaofeng QU, et al., 2020. microRNA-331-3p maintains the contractile type of vascular smooth muscle cells by regulating TNF- $\alpha$  and CD14 in intracranial aneurysm. *Neuropharmacology* [online]. **164** [vid. 2022-10-16]. ISSN 1873-7064. Dostupné z: doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2019.107858
- FANOLA, Christina L., David A. MORROW, Christopher P. CANNON, et al., 2017. Interleukin-6 and the Risk of Adverse Outcomes in Patients After an Acute Coronary Syndrome: Observations From the SOLID-TIMI 52 (Stabilization of Plaque Using Darapladib-Thrombolysis in Myocardial Infarction 52) Trial. *Journal of the American Heart Association* [online]. **6**(10) [vid. 2022-10-15]. ISSN 2047-9980. Dostupné z: doi:10.1161/JAHA.117.005637
- FEINBERG, Mark W. a Kathryn J. MOORE, 2016. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circulation Research* [online]. **118**(4), 703–720 [vid. 2018-09-30]. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306300
- FERNANDES, Denise C., Thaís L.S. ARAUJO a Leonardo Y. TANAKA, 2018. Hemodynamic Forces in the Endothelium: From Mechanotransduction to Implications on Development of Atherosclerosis. *Endothelium and Cardiovascular Diseases* [online]. 85–95 [vid. 2020-01-26]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-812348-5.00007-6
- FICHTLSCHERER, Stephan, Andreas M. ZEIHNER a Stefanie DIMMELER, 2011. Circulating MicroRNAs. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. **31**(11), 2383–2390 [vid. 2018-10-06]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.111.226696
- FLEG, Jerome L, Gregg W STONE, Zahi A FAYAD, et al., 2012. Detection of high-risk atherosclerotic plaque: report of the NHLBI Working Group on current status and future directions. *JACC. Cardiovascular imaging* [online]. **5**(9), 941–955. ISSN 1876-7591 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1016/j.jcmg.2012.07.007
- GARDNER, Craig M., Huwei TAN, Edward L. HULL, et al., 2008. Detection of Lipid Core Coronary Plaques in Autopsy Specimens With a Novel Catheter-Based Near-Infrared Spectroscopy System. *JACC: Cardiovascular Imaging* [online]. **1**(5), 638–648 [vid. 2020-01-26]. ISSN 1936878X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcmg.2008.06.001
- GISTERÅ, Anton a Göran K. HANSSON, 2017. The immunology of atherosclerosis. *Nature Reviews Nephrology* 2017 13:6 [online]. **13**(6), 368–380 [vid. 2022-09-10]. ISSN 1759-507X. Dostupné z: doi:10.1038/nrneph.2017.51
- GOLDSTEIN, James a, Cindy GRINES, Tim FISHELL, et al., 2009. Coronary embolization following balloon dilation of lipid-core plaques. *JACC. Cardiovascular imaging* [online]. **2**(12), 1420–4 [vid. 2013-03-31]. ISSN 1876-7591. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcmg.2009.10.003

- GOLDSTEIN, James a, Brijeshwar MAINI, Simon R DIXON, et al., 2011. Detection of lipid-core plaques by intracoronary near-infrared spectroscopy identifies high risk of periprocedural myocardial infarction. *Circulation. Cardiovascular interventions* [online]. **4**(5), 429–37 [vid. 2013-03-31]. ISSN 1941-7632. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.111.963264
- GROEN, Harald C, Frank J H GIJSEN, Aad VAN DER LUGT, et al., 2007. Plaque rupture in the carotid artery is localized at the high shear stress region: a case report. *Stroke* [online]. **38**(8), 2379–81 [vid. 2020-01-28]. ISSN 1524-4628. Dostupné z: doi:10.1161/STROKEAHA.107.484766
- GUAGLIUMI, Giulio, Vasile SIRBU, Giuseppe MUSUMECI, et al., 2012. Examination of the in vivo mechanisms of late drug-eluting stent thrombosis: findings from optical coherence tomography and intravascular ultrasound imaging. *JACC. Cardiovascular interventions* [online]. **5**(1), 12–20 [vid. 2022-09-13]. ISSN 1876-7605. Dostupné z: doi:10.1016/J.JCIN.2011.09.018
- GUO, Yan, Yipeng WU, Na LI a Zehua WANG, 2021. Up-regulation of miRNA-151-3p enhanced the neuroprotective effect of dexmedetomidine against  $\beta$ -amyloid by targeting DAPK-1 and TP53. *Experimental and Molecular Pathology* [online]. **118**, 104587. ISSN 0014-4800. Dostupné z: doi:10.1016/J.YEXMP.2020.104587
- HAJAR, Rachel, 2017. Risk Factors for Coronary Artery Disease: Historical Perspectives. *Heart Views : The Official Journal of the Gulf Heart Association* [online]. **18**(3), 109 [vid. 2022-09-10]. ISSN 1995-705X. Dostupné z: doi:10.4103/HEARTVIEWS.HEARTVIEWS\_106\_17
- HALCOX, Julian P.J. Endothelial Dysfunction. In: *Primer on the Autonomic Nervous System* [online]. Elsevier, 2012, 2012, s. 319-324 [cit. 2022-12-13]. ISBN 9780123865250. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386525-0.00066-4
- HORVÁTH, Martin, Petr HÁJEK, James E MULLER, et al., 2016. First-in-man near-infrared spectroscopy proof of lipidcore embolization during carotid artery stenting. *Archives of Medical Science* [online]. **12**(4). ISSN 18969151. Dostupné z: doi:10.5114/aoms.2016.60974
- HORVÁTH, Martin, Petr HÁJEK, Cyril ŠTĚCHOVSKÝ, Jakub HONĚK, Miloslav ŠPAČEK a Josef VESELKA, 2016. The role of near-infrared spectroscopy in the detection of vulnerable atherosclerotic plaques. *Archives of Medical Science* [online]. **12**(6). ISSN 18969151. Dostupné z: doi:10.5114/aoms.2016.62904
- HORVÁTH, Martin, Petr HÁJEK, Cyril ŠĚCHOVSKÝ a Josef VESELKA, 2014. Vulnerable plaque imaging and acute coronary syndrome. *Cor et Vasa* [online]. **56**(4). ISSN 18037712. Dostupné z: doi:10.1016/j.crvasa.2014.05.002
- HORVÁTH, Martin, Petr HÁJEK, Cyril ŠĚCHOVSKÝ, Jakub HONĚK a Josef VESELKA, 2020a. Carotid artery plaque composition and distribution: near-infrared spectroscopy and intravascular ultrasound analysis. *European Heart Journal Supplements : Journal of the European Society of Cardiology* [online]. **22**(Suppl F), F38 [vid. 2022-09-15]. ISSN 15542815. Dostupné z: doi:10.1093/EURHEARTJ/SUAA097

- HORVÁTH, Martin, Veronika HORVÁTHOVÁ, Petr HÁJEK, et al., 2020b. MicroRNA-331 and microRNA-151-3p as biomarkers in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Scientific Reports 2020 10:1* [online]. **10**(1), 1–8 [vid. 2022-09-15]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-62835-w
- HUNG, Olivia Y., Adam J. BROWN, Sung Gyun AHN, Alessandro VENEZIANI, Don P. GIDDENS a Habib SAMADY, 2015. Association of Wall Shear Stress with Coronary Plaque Progression and Transformation. *Interventional Cardiology Clinics* [online]. **4**(4), 491–502 [vid. 2020-01-26]. ISSN 22117458. Dostupné z: doi:10.1016/j.iccl.2015.06.009
- CHAN, Gabriel Hoi Huen, Enoch CHAN, Carsten Tsun Ka KWOK, George Pak Heng LEUNG, Simon Ming Yuen LEE a Sai Wang SETO, 2022. The role of p53 in the alternation of vascular functions. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **13**, 3667. ISSN 16639812. Dostupné z: doi:10.3389/FPHAR.2022.981152/BIBTEX
- CHATZIZISIS, Yiannis S., Ahmet Umit COSKUN, Michael JONAS, Elazer R. EDELMAN, Charles L. FELDMAN a Peter H. STONE, 2007. Role of Endothelial Shear Stress in the Natural History of Coronary Atherosclerosis and Vascular Remodeling: Molecular, Cellular, and Vascular Behavior. *Journal of the American College of Cardiology* [online]. **49**(25), 2379–2393. ISSN 0735-1097. Dostupné z: doi:10.1016/J.JACC.2007.02.059
- CHENG, Caroline, Dennie TEMPEL, Rien VAN HAPEREN, et al., 2006. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation* [online]. **113**(23), 2744–53 [vid. 2020-01-26]. ISSN 1524-4539. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.590018
- CHO, Young I., Daniel J. CHO a Robert S. ROSENSON, 2014. Endothelial Shear Stress and Blood Viscosity in Peripheral Arterial Disease. *Current Atherosclerosis Reports* [online]. **16**(4), 404 [vid. 2020-01-26]. ISSN 1523-3804. Dostupné z: doi:10.1007/s11883-014-0404-6
- IBANEZ, Borja, Stefan JAMES, Stefan AGEWALL, et al., 2018. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal* [online]. **39**(2), 119–177 [vid. 2018-10-14]. ISSN 0195-668X. Dostupné z: doi:10.1093/eurheartj/ehx393
- INSULL, William, 2009. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *AJM* [online]. **122**, S3–S14. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjmed.2008.10.013
- JANG, Jae Sik, Yeo Jeong SONG, Wook KANG, et al., 2014. Intravascular ultrasound-guided implantation of drug-eluting stents to improve outcome: A meta-analysis. *JACC: Cardiovascular Interventions* [online]. **7**(3), 233–243. ISSN 18767605. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcin.2013.09.013
- JEBARI-BENSLAIMAN, Shifa, Unai GALICIA-GARCÍA, Asier LARREA-SEBAL, et al., 2022. Pathophysiology of Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **23**(6) [vid. 2022-10-15]. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/IJMS23063346



- KARLSSON, Sofia, Erik ANESÄTER, Klara FRANSSON, Pontus ANDELL, Jonas PERSSON a David ERLINGE, 2019. Intracoronary near-infrared spectroscopy and the risk of future cardiovascular events. *Open Heart* [online]. **6**(1), e000917 [vid. 2020-01-29]. ISSN 2053-3624. Dostupné z: doi:10.1136/openhrt-2018-000917
- KATO, Koji, Taishi YONETSU, Soo-Joong KIM, et al., 2012. Nonculprit plaques in patients with acute coronary syndromes have more vulnerable features compared with those with non-acute coronary syndromes: a 3-vessel optical coherence tomography study. *Circulation. Cardiovascular imaging* [online]. **5**(4), 433–440. ISSN 1942-0080 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1161/CIRCIMAGING.112.973701
- KAUDEWITZ, Dorothee, Regent LEE, Peter WILLEIT, et al., 2013. Impact of intravenous heparin on quantification of circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Thrombosis and Haemostasis* [online]. **110**(09), 609–615 [vid. 2018-10-14]. ISSN 0340-6245. Dostupné z: doi:10.1160/TH13-05-0368
- KAUDEWITZ, Dorothee, Anna ZAMPETAKI a Manuel MAYR, 2015. MicroRNA Biomarkers for Coronary Artery Disease? *Current atherosclerosis reports* [online]. **17**(12), 70 [vid. 2018-09-30]. ISSN 1534-6242. Dostupné z: doi:10.1007/s11883-015-0548-z
- KINI, Annapoorna S., Usman BABER, Jason C. KOVACIC, et al., 2013. Changes in plaque lipid content after short-term intensive versus standard statin therapy: the YELLOW trial (reduction in yellow plaque by aggressive lipid-lowering therapy). *Journal of the American College of Cardiology* [online]. **62**(1), 21–29 [vid. 2022-09-13]. ISSN 1558-3597. Dostupné z: doi:10.1016/J.JACC.2013.03.058
- KOENIG, Wolfgang a Natalie KHUSEYINOVA, 2007. Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability and Rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. **27**(1), 15–26 [vid. 2022-09-11]. ISSN 10795642. Dostupné z: doi:10.1161/01.ATV.0000251503.35795.4F
- KORSHUNOV, Vyacheslav A., Stephen M. SCHWARTZ a Bradford C. BERK, 2007. Vascular Remodeling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. **27**(8), 1722–1728 [vid. 2022-09-17]. ISSN 10795642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.106.129254
- KUBO, Takashi, Yasushi INO, Gary S MINTZ, et al., 2021. Optical coherence tomography detection of vulnerable plaques at high risk of developing acute coronary syndrome. *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging* [online]. **22**(12), 1376–1384 [vid. 2022-11-15]. ISSN 2047-2404. Dostupné z: doi:10.1093/EHJCI/JEAB028
- KUSHNER, Abigail, William P. WEST a Leela Sharath PILLARISSETTY, 2021. Virchow Triad. *Radiopaedia.org* [online]. [vid. 2022-09-10]. Dostupné z: doi:10.53347/rid-7113
- KWAK, Brenda R, Magnus BÄCK, Marie-Luce BOCHATON-PIALLAT, et al., 2014. Biomechanical factors in atherosclerosis: mechanisms and clinical implications. *European heart journal* [online]. **35**(43), 3013–20, 3020a-3020d [vid. 2020-01-26]. ISSN 1522-9645. Dostupné z: doi:10.1093/eurheartj/ehu353
- LAFFONT, Benoit, Aurélie CORDUAN, Hélène PLÉ, et al., 2013. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood* [online]. 2013, **122**(2), 253-261 [cit. 2022-12-13]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2013-03-492801

- LEE, Cheol Whan, Su Jin KANG, Duk Woo PARK, et al., 2010. Intravascular ultrasound findings in patients with very late stent thrombosis after either drug-eluting or bare-metal stent implantation. *Journal of the American College of Cardiology* [online]. **55**(18), 1936–1942. ISSN 15583597. Dostupné z: doi:10.1016/j.jacc.2009.10.077
- LEE, Ding-Yu a Jeng-Jiann CHIU, 2019. Atherosclerosis and flow: roles of epigenetic modulation in vascular endothelium. *Journal of Biomedical Science* [online]. **26**(1), 56 [vid. 2020-01-26]. ISSN 1423-0127. Dostupné z: doi:10.1186/s12929-019-0551-8
- LEISTNER, David M., Jes-Niels BOECKEL, Sophia M. REIS, et al., 2016. Transcoronary gradients of vascular miRNAs and coronary atherosclerotic plaque characteristics. *European Heart Journal* [online]. **37**(22), 1738–1749 [vid. 2018-09-30]. ISSN 0195-668X. Dostupné z: doi:10.1093/eurheartj/ehw047
- LI, Chencheng, Xiaonan CHEN, Junwen HUANG, Qianqian SUN a Lei WANG, 2015. Clinical impact of circulating miR-26a, miR-191, and miR-208b in plasma of patients with acute myocardial infarction. *European Journal of Medical Research* [online]. **20**(1), 58 [vid. 2018-09-30]. ISSN 2047-783X. Dostupné z: doi:10.1186/s40001-015-0148-y
- LI, Sufang, Hong CHEN, Junxian SONG, Chongyou LEE a Qiang GENG, 2016. Avoiding heparin inhibition in circulating MicroRNAs amplification. *International Journal of Cardiology* [online]. **207**, 92–93 [vid. 2018-09-30]. ISSN 01675273. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijcard.2016.01.129
- LIU, Jia, Ying LIU, Ya Nan SUN, et al., 2015. miR-28-5p Involved in LXR-ABCA1 Pathway is Increased in the Plasma of Unstable Angina Patients. *Heart, Lung and Circulation* [online]. **24**(7), 724–730. ISSN 1443-9506. Dostupné z: doi:10.1016/J.HLC.2014.12.160
- LIU, Xiang, Xiaoping SU, Sheng XU, et al., 2018. MicroRNA in vivo precipitation identifies miR-151-3p as a computational unpredictable miRNA to target Stat3 and inhibits innate IL-6 production. *Cellular & Molecular Immunology* [online]. **15**(2), 99–110 [vid. 2018-10-14]. ISSN 1672-7681. Dostupné z: doi:10.1038/cmi.2017.82
- LUERS, Aimée J., Olivier D. LOUDIG a Joan W. BERMAN, 2010. MicroRNAs are expressed and processed by human primary macrophages. *Cellular Immunology* [online]. **263**(1), 1–8 [vid. 2018-10-14]. ISSN 0008-8749. Dostupné z: doi:10.1016/J.CELLIMM.2010.03.011
- MADDER, Ryan D, James L SMITH, Simon R DIXON a James a GOLDSTEIN, 2012. Composition of target lesions by near-infrared spectroscopy in patients with acute coronary syndrome versus stable angina. *Circulation. Cardiovascular interventions* [online]. **5**(1), 55–61 [vid. 2013-03-31]. ISSN 1941-7632. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.111.963934
- MADDER, Ryan D., James A. GOLDSTEIN, Sean P. MADDEN, et al., 2013. Detection by Near-Infrared Spectroscopy of Large Lipid Core Plaques at Culprit Sites in Patients With Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *JACC: Cardiovascular Interventions* [online]. **6**(8), 838–846 [vid. 2020-01-29]. ISSN 19368798. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcin.2013.04.012

- MADDER, Ryan D., Mustafa HUSAINI, Alan T. DAVIS, et al., 2015. Detection by near-infrared spectroscopy of large lipid cores at culprit sites in patients with non-ST-segment elevation myocardial infarction and unstable angina. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* [online]. **86**(6), 1014–1021 [vid. 2020-01-29]. ISSN 1522-1946. Dostupné z: doi:10.1002/ccd.25754
- MADDER, Ryan D., Rishi PURI, James E. MULLER, et al., 2016. Confirmation of the Intracoronary Near-Infrared Spectroscopy Threshold of Lipid-Rich Plaques That Underlie ST-Segment–Elevation Myocardial Infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. **36**(5), 1010–1015 [vid. 2020-01-29]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.115.306849
- MAHMOUD, Marwa M., Hyejeong Rosemary KIM, Rouyu XING, et al., 2016. TWIST1 Integrates Endothelial Responses to Flow in Vascular Dysfunction and Atherosclerosis. *Circulation research* [online]. **119**(3), 450–462 [vid. 2022-10-23]. ISSN 1524-4571. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308870
- MAKRIS, Gregory C., Andrew N. NICOLAIDES, Xiao Y. XU a George GEROULAKOS, 2010. Introduction to the biomechanics of carotid plaque pathogenesis and rupture: review of the clinical evidence. *The British Journal of Radiology* [online]. **83**(993), 729–735 [vid. 2020-01-26]. ISSN 0007-1285. Dostupné z: doi:10.1259/bjr/49957752
- MANGGE, Harald a Gunter ALMER, 2019. Immune-Mediated Inflammation in Vulnerable Atherosclerotic Plaques. *Molecules 2019, Vol. 24, Page 3072* [online]. **24**(17), 3072 [vid. 2022-09-10]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/MOLECULES24173072
- MCNALLY, Megan E., Amy COLLINS, Sylwia E. WOJCIK, et al., 2013. Concomitant dysregulation of microRNAs miR-151-3p and miR-126 correlates with improved survival in resected cholangiocarcinoma. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* [online]. **15**(4), 260–264 [vid. 2022-10-23]. ISSN 1477-2574. Dostupné z: doi:10.1111/J.1477-2574.2012.00523.X
- MEDER, Benjamin, Christina BACKES, Jan HAAS, et al., 2014. Influence of the confounding factors age and sex on microRNA profiles from peripheral blood. *Clinical chemistry* [online]. **60**(9), 1200–8 [vid. 2018-11-25]. ISSN 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2014.224238
- MELANIE, Christina Mayerl, Lukasser ROLAND, Sedivy HARALD, Niederegger RUEDIGER a Seiler Georg WICK, 2006. Atherosclerosis research from past to present-on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch* [online]. **449**, 96–103. Dostupné z: doi:10.1007/s00428-006-0176-7
- MENG, Fanzhe, Hong CHENG, Jiayi QIAN, Xinyuan DAI, Yan HUANG a Yubo FAN, 2022. In vitro fluidic systems: Applying shear stress on endothelial cells. *Medicine in Novel Technology and Devices* [online]. **15**, 100143. ISSN 2590-0935. Dostupné z: doi:10.1016/J.MEDNTD.2022.100143
- MOGUEL-ANCHEITA Rafael a SAMANIEGO, Virginia, 2021. Infarto de miocardio como consecuencia de aterosclerosis. *Cardiovascular and Metabolic Science* [online]. **32**(S3), 247-252 [cit. 2022-12-29]. Dostupné z: doi:10.35366/100806

- MOTOYAMA, Sadako, Masayoshi SARAI, Jagat NARULA a Yukio OZAKI, 2013. Coronary CT angiography and high-risk plaque morphology. *Cardiovascular intervention and therapeutics* [online]. **28**(1), 1–8. ISSN 1868-4297 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1007/s12928-012-0140-1
- MULLER, J. E., G. H. TOFLER a P. H. STONE, 1989. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation* [online]. **79**(4), 733–743 [vid. 2022-09-10]. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/01.CIR.79.4.733
- NAIRISMÄGI, Maarja Liisa, Annette FÜCHTBAUER, Rodrigo LABOURIAU, Jesper Bertram BRAMSEN a Ernst Martin FÜCHTBAUER, 2013. The Proto-Oncogene TWIST1 Is Regulated by MicroRNAs. *PLOS ONE* [online]. **8**(5), e66070 [vid. 2022-10-23]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0066070
- NAQVI, Afsar Raza, Sheng ZHONG, Hong DANG, Jezrom B FORDHAM, Salvador NARES a Asma KHAN, 2016. Expression Profiling of LPS Responsive miRNA in Primary Human Macrophages. *Journal of microbial & biochemical technology* [online]. **8**(2), 136–143 [vid. 2018-10-14]. ISSN 1948-5948. Dostupné z: doi:10.4172/1948-5948.1000276
- NISSEN, Steven E., Stephen J. NICHOLLS, Ilke SIPAHI, et al., 2006. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* [online]. **295**(13), 1556–1565 [vid. 2022-09-13]. ISSN 1538-3598. Dostupné z: doi:10.1001/JAMA.295.13.JPC60002
- NURNBERG, Sylvia T., Marie A. GUERRATY, Robert C. WIRKA, et al., 2020. Genomic profiling of human vascular cells identifies TWIST1 as a causal gene for common vascular diseases. *PLOS Genetics* [online]. **16**(1), e1008538 [vid. 2022-10-23]. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1008538
- OEMRAWSINGH, Rohit M., Jin M. CHENG, Héctor M. GARCÍA-GARCÍA, et al., 2014. Near-Infrared Spectroscopy Predicts Cardiovascular Outcome in Patients With Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology* [online]. **64**(23), 2510–2518 [vid. 2020-01-29]. ISSN 07351097. Dostupné z: doi:10.1016/j.jacc.2014.07.998
- PAHL, Matthew C, Kimberly DERR, Gabor GÄBEL, et al., 2012. MicroRNA expression signature in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Medical Genomics* [online]. **5**(1), 25 [vid. 2018-10-14]. ISSN 1755-8794. Dostupné z: doi:10.1186/1755-8794-5-25
- PEDRIGI, Ryan M., Ranil DE SILVA, Sandra M. BOVENS, Vikram V. MEHTA, Enrico PETRETTO a Rob KRAMS, 2014. Thin-cap fibroatheroma rupture is associated with a fine interplay of shear and wall stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. **34**(10), 2224–2231 [vid. 2022-09-11]. ISSN 15244636. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.114.303426
- PEREIRA-DA-SILVA, Tiago, Patrícia NAPOLEÃO, Marina C. COSTA, et al., 2021. Association between miR-146a and Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Stable Coronary Artery Disease. *Medicina 2021, Vol. 57, Page 575* [online]. **57**(6), 575 [vid. 2022-10-16]. ISSN 1648-9144. Dostupné z: doi:10.3390/MEDICINA57060575

- PERGOLI, Laura, Laura CANTONE, Chiara FAVERO, et al., 2017. Extracellular vesicle-packaged miRNA release after short-term exposure to particulate matter is associated with increased coagulation. *Particle and Fibre Toxicology* [online]. **14**(1), 1–13 [vid. 2022-10-23]. ISSN 17438977. Dostupné z: doi:10.1186/S12989-017-0214-4/FIGURES/4
- PILBROW, Anna P., Lina CORDEDDU, Vicky A. CAMERON, et al., 2014. Circulating miR-323-3p and miR-652: Candidate markers for the presence and progression of acute coronary syndromes. *International Journal of Cardiology* [online]. **176**(2), 375–385 [vid. 2018-09-30]. ISSN 0167-5273. Dostupné z: doi:10.1016/J.IJCARD.2014.07.068
- PORDZIK, Justyna, Katarzyna PISARZ, Salvatore DE ROSA, et al., 2018. The Potential Role of Platelet-Related microRNAs in the Development of Cardiovascular Events in High-Risk Populations, Including Diabetic Patients: A Review. *Frontiers in Endocrinology* [online]. **9**, 74 [vid. 2018-09-30]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2018.00074
- RAGHUNATHAN, Deepa, Abdul-Rahman Riyad ABDEL-KARIM, Aristotelis C PAPAYANNIS, et al., 2011. Relation between the presence and extent of coronary lipid core plaques detected by near-infrared spectroscopy with postpercutaneous coronary intervention myocardial infarction. *The American journal of cardiology* [online]. **107**(11), 1613–8 [vid. 2013-03-31]. ISSN 1879-1913. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjcard.2011.01.044
- RAITOHARJU, Emma, Leo-Pekka LYYTIKÄINEN, Mari LEVULA, et al., 2011. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis* [online]. **219**(1), 211–217 [vid. 2018-10-06]. ISSN 00219150. Dostupné z: doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.020
- REISS, Allison B, Nicolle M SIEGART a Joshua DE LEON, 2017. Clinical Lipidology Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective? Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective? [online]. **12**(1):14-23 [vid. 2022-10-23]. ISSN 1758-4302. Dostupné z: doi:10.1080/17584299.2017.1319787
- RIDKER, Paul M, Eleanor DANIELSON, Francisco A.H. FONSECA, et al., 2008. Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0807646> [online]. **359**(21), 2195–2207 [vid. 2022-10-16]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa0807646
- RIDKER, Paul M, Brendan M. EVERETT, Tom THUREN, et al., 2017. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine* [online]. **377**(12), 1119–1131 [vid. 2022-10-23]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1707914/SUPPL\_FILE/NEJMoa1707914\_DISCLOSURES.PDF
- ROME, Sophie, 2013. Are extracellular microRNAs involved in type 2 diabetes and related pathologies? *Clinical Biochemistry* [online]. **46**(10–11), 937–945 [vid. 2018-10-14]. ISSN 0009-9120. Dostupné z: doi:10.1016/J.CLINBIOCHEM.2013.02.018
- ROTH, Gregory A, Catherine JOHNSON, Amanuel ABAJOBIR, et al., 2017. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *Journal of the American College of Cardiology* [online]. **70**(1), 1–25. ISSN 1558-3597 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1016/j.jacc.2017.04.052

- ROWLEY, Jesse W., Stéphane CHAPPAZ, Aurélie CORDUAN, et al., 2016. Dicer1-mediated miRNA processing shapes the mRNA profile and function of murine platelets. *Blood* [online]. **127**(14), 1743–1751 [vid. 2022-10-23]. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/BLOOD-2015-07-661371
- SAKAMOTO, Atsushi, Renu VIRMANI, Alope V. FINN a Anuj GUPTA, 2018. Calcified Nodule as the Cause of Acute Coronary Syndrome: Connecting Bench Observations to the Bedside. *Cardiology* [online]. **139**(2), 101–104 [vid. 2022-09-10]. ISSN 0008-6312. Dostupné z: doi:10.1159/000485119
- SAKHUJA, Rahul, William M. SUH, Farouc A. JAFFER a Ik Kyung JANG, 2010. Residual thrombogenic substrate after rupture of a lipid-rich plaque: possible mechanism of acute stent thrombosis? *Circulation* [online]. **122**(22), 2349–2350 [vid. 2022-09-13]. ISSN 1524-4539. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.970079
- SAMADY, Habib, Parham ESHTEHARDI, Michael C. MCDANIEL, et al., 2011. Coronary Artery Wall Shear Stress Is Associated With Progression and Transformation of Atherosclerotic Plaque and Arterial Remodeling in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation* [online]. **124**(7), 779–788 [vid. 2020-01-28]. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.021824
- SANON, Saurabh, Tim DAO, Vani P SANON a Robert CHILTON, 2013. Imaging of vulnerable plaques using near-infrared spectroscopy for risk stratification of atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports* [online]. **15**(2), 304. ISSN 1534-6242 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1007/s11883-012-0304-6
- SATO, Yu, Rika KAWAKAMI, Atsushi SAKAMOTO, et al., 2022. Sex Differences in Coronary Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports* [online]. **24**(1), 23–32 [vid. 2022-11-06]. ISSN 15346242. Dostupné z: doi:10.1007/S11883-022-00980-5/TABLES/1
- SCHAAR, Johannes A, Chris L DE KORTE, Frits MASTIK, et al., 2003. Intravascular palpography for high-risk vulnerable plaque assessment. *Herz* [online]. **28**(6), 488–495. ISSN 0340-9937 (Print). Dostupné z: doi:10.1007/s00059-003-2488-6
- SCHULTZ, Carl J, Patrick W SERRUYS, Martin VAN DER ENT, et al., 2010. First-in-man clinical use of combined near-infrared spectroscopy and intravascular ultrasound: a potential key to predict distal embolization and no-reflow? *Journal of the American College of Cardiology* [online]. **56**(4), 314 [vid. 2013-03-31]. ISSN 1558-3597. Dostupné z: doi:10.1016/j.jacc.2009.10.090
- SCHUURMAN, Anne-Sophie, Maxime VROEGINDEWEY, Isabella KARDYS, et al., 2018. Near-infrared spectroscopy-derived lipid core burden index predicts adverse cardiovascular outcome in patients with coronary artery disease during long-term follow-up. *European Heart Journal* [online]. **39**(4), 295–302 [vid. 2020-01-29]. ISSN 0195-668X. Dostupné z: doi:10.1093/eurheartj/ehx247
- SERRUYS, Patrick W., Héctor M. GARCÍA-GARCÍA, Pawel BUSZMAN, et al., 2008. Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A(2) inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation* [online]. **118**(11), 1172–1182 [vid. 2022-09-13]. ISSN 1524-4539. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.771899

- SHISHIKURA, Daisuke, Samuel L SIDHARTA, Satoshi HONDA, et al., 2018. The relationship between segmental wall shear stress and lipid core plaque derived from near-infrared spectroscopy. *Atherosclerosis* [online]. **275**, 68–73 [vid. 2020-01-29]. ISSN 1879-1484. Dostupné z: doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.022
- SOEKI, Takeshi, Koji YAMAGUCHI, Toshiyuki NIKI, et al., 2015. Plasma MicroRNA-100 Is Associated With Coronary Plaque Vulnerability. *Circulation Journal* [online]. **79**(2), 413–418 [vid. 2018-10-06]. ISSN 1346-9843. Dostupné z: doi:10.1253/circj.CJ-14-0958
- SOUILHOL, Celine, Jovana SERBANOVIC-CANIC, Maria FRAGIADAKI, et al., 2019. Endothelial responses to shear stress in atherosclerosis: a novel role for developmental genes. *Nature Reviews Cardiology* 2019 17:1 [online]. **17**(1), 52–63 [vid. 2022-10-23]. ISSN 1759-5010. Dostupné z: doi:10.1038/s41569-019-0239-5
- ŠTĚCHOVSKÝ, Cyril, Petr HÁJEK, Martin HORVÁTH, Miloslav ŠPAČEK a Josef VESELKA, 2016. Near-infrared spectroscopy combined with intravascular ultrasound in carotid arteries. *International Journal of Cardiovascular Imaging* [online]. **32**(1), 181–188. ISSN 15730743. Dostupné z: doi:10.1007/s10554-015-0687-x
- STONE, Gregg W, Akiko MAEHARA, Alexandra J LANSKY, et al., 2011. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. *The New England journal of medicine* [online]. **364**(3), 226–235. ISSN 1533-4406 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1002358
- SUH, William M, Arnold H SETO, Ronan J P MARGEY, Ignacio CRUZ-GONZALEZ a Ik-Kyung JANG, 2011. Intravascular detection of the vulnerable plaque. *Circulation. Cardiovascular imaging* [online]. **4**(2), 169–178. ISSN 1942-0080 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1161/CIRCIMAGING.110.958777
- SUNDERLAND, Nicholas, Philipp SKROBLIN, Temo BARWARI, et al., 2017. MicroRNA Biomarkers and Platelet Reactivity. *Circulation Research* [online]. **120**(2), 418–435 [vid. 2018-10-14]. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309303
- TAKARADA, Shigeho, Toshio IMANISHI, Takashi KUBO, et al., 2009. Effect of statin therapy on coronary fibrous-cap thickness in patients with acute coronary syndrome: assessment by optical coherence tomography study. *Atherosclerosis* [online]. **202**(2), 491–497 [vid. 2022-09-13]. ISSN 1879-1484. Dostupné z: doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2008.05.014
- THONDAPU, Vikas, Chris MAMON, Eric K W POON, et al., 2021. High spatial endothelial shear stress gradient independently predicts site of acute coronary plaque rupture and erosion. *Cardiovascular Research* [online]., **117**(8), 1974-1985 [cit. 2022-12-13]. ISSN 0008-6363. Dostupné z: doi:10.1093/cvr/cvaa251
- THYGESEN, Kristian, Joseph S ALPERT, Allan S JAFFE, et al., 2019. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *European Heart Journal* [online]. 2019, **40**(3), 237-269 [cit. 2022-12-29]. ISSN 0195-668X. Dostupné z: doi:10.1093/eurheartj/ehy462
- TIBAUT, Miha, Martin CAPRNDA, Peter KUBATKA, et al., 2019. Markers of Atherosclerosis: Part 1 – Serological Markers. *Heart, Lung and Circulation* [online]. **28**(5), 667–677. ISSN 1443-9506. Dostupné z: doi:10.1016/J.HLC.2018.06.1057

- TOUTOUZAS, Konstantinos, Antonios KARANASOS a Dimitris TOUSOULIS, 2016. Optical Coherence Tomography For the Detection of the Vulnerable Plaque. *European Cardiology Review* [online]. **11**(2), 90 [vid. 2022-09-11]. ISSN 17583764. Dostupné z: doi:10.15420/ECR.2016:29:2
- VALGIMIGLI, Marco, Héctor BUENO, Robert A. BYRNE, et al., 2018. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS. *European Heart Journal* [online]. **39**(3), 213–254. ISSN 15229645. Dostupné z: doi:10.1093/EURHEARTJ/EHX419
- VESELKA, Josef, Rohn VILÉM, et al., 2015. *Kardiovaskulární medicína*. Brno: FAMA. ISBN 978-80-88056-00-3.
- VIRMANI, Renu, Frank D. KOLODGIE, Allen P. BURKE, Andrew FARB a Stephen M. SCHWARTZ, 2000. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [online]. **20**(5), 1262–1275. ISSN 1079-5642 (Print). Dostupné z: doi:10.1161/01.atv.20.5.1262
- VIRMANI, Renu, Allen P. BURKE, Andrew FARB a Frank D. KOLODGIE, 2006. Pathology of the Vulnerable Plaque. *Journal of the American College of Cardiology* [online]. **47**(8), C13–C18 [vid. 2018-10-06]. ISSN 07351097. Dostupné z: doi:10.1016/j.jacc.2005.10.065
- VISSEREN, Frank L.J., François MACH, Yvo M. SMULDERS, et al., 2021. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Heart Journal* [online]. **42**(34), 3227–3337. ISSN 15229645. Dostupné z: doi:10.1093/EURHEARTJ/EHAB484
- VON DER THÜSEN, Jan H., Bart J.M. VAN VLIJMEN, Rob C. HOEBEN, et al., 2002. Induction of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotein E-/- mice after adenovirus-mediated transfer of p53. *Circulation* [online]. **105**(17), 2064–2070 [vid. 2022-10-15]. ISSN 1524-4539. Dostupné z: doi:10.1161/01.CIR.0000015502.97828.93
- WAKSMAN, Ron, Carlo DI MARIO, Rebecca TORGUSON, et al., 2019. Identification of patients and plaques vulnerable to future coronary events with near-infrared spectroscopy intravascular ultrasound imaging: a prospective, cohort study. *The Lancet* [online]. **394**(10209), 1629–1637 [vid. 2020-01-29]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(19)31794-5
- WANG, Junnan, Youyou YAN, Dandan SONG a Bin LIU, 2016. Reduced Plasma miR-146a Is a Predictor of Poor Coronary Collateral Circulation in Patients with Coronary Artery Disease. *BioMed research international* [online]. **2016**, 4285942 [vid. 2018-09-30]. ISSN 2314-6141. Dostupné z: doi:10.1155/2016/4285942
- WANG, Yi, Juhui QIU, Shisui LUO, et al., 2016. High shear stress induces atherosclerotic vulnerable plaque formation through angiogenesis. *Regenerative biomaterials* [online]. **3**(4), 257–67 [vid. 2020-01-26]. ISSN 2056-3418. Dostupné z: doi:10.1093/rb/rbw021
- WAXMAN, Sergio, Simon R DIXON, Philippe L'ALLIER, et al., 2009. In vivo validation of a catheter-based near-infrared spectroscopy system for detection of lipid core coronary plaques: initial results of the SPECTACL study. *JACC. Cardiovascular imaging* [online]. **2**(7), 858–68 [vid. 2013-03-31]. ISSN 1876-7591. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcmg.2009.05.001



- WENTZEL, Jolanda J., Yiannis S. CHATZIZISIS, Frank J.H. GIJSEN, George D. GIANNOGLOU, Charles L. FELDMAN a Peter H. STONE, 2012. Endothelial shear stress in the evolution of coronary atherosclerotic plaque and vascular remodelling: current understanding and remaining questions. *Cardiovascular research* [online]. **96**(2), 234–243 [vid. 2022-10-23]. ISSN 1755-3245. Dostupné z: doi:10.1093/CVR/CVS217
- WENTZEL, Jolanda J., Johan C.H. SCHUURBIERS, Nieves GONZALO LOPEZ, et al., 2013. In vivo assessment of the relationship between shear stress and necrotic core in early and advanced coronary artery disease. *EuroIntervention* [online]. **9**(8), 989–995 [vid. 2020-01-26]. ISSN 1774-024X. Dostupné z: doi:10.4244/EIJV9I8A165
- WESTERTERP, Marit, Andrea E. BOCHEM, Laurent YVAN-CHARVET, Andrew J. MURPHY, Nan WANG a Alan R. TALL, 2014. ATP-Binding Cassette Transporters, Atherosclerosis, and Inflammation. *Circulation Research* [online]. **114**(1), 157–170 [vid. 2022-10-15]. ISSN 00097330. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.300738
- WILLEIT, Peter, Philipp SKROBLIN, Alexander R. MOSCHEN, et al., 2017. Circulating MicroRNA-122 Is Associated With the Risk of New-Onset Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes* [online]. **66**(2), 347–357 [vid. 2018-10-14]. ISSN 0012-1797. Dostupné z: doi:10.2337/db16-0731
- WILLEIT, Peter, Anna ZAMPETAKI, Katarzyna DUDEK, et al., 2013. Circulating MicroRNAs as Novel Biomarkers for Platelet Activation. *Circulation Research* [online]. **112**(4), 595–600 [vid. 2018-10-14]. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.300539
- XIAO, L., H. MING, C. TAO a W. YULIANG, 2011. The expression of SOCS is altered in atherosclerosis. *Heart* [online]. **97**(Suppl 3), A51–A51 [vid. 2018-10-14]. ISSN 1355-6037. Dostupné z: doi:10.1136/heartjnl-2011-300867.146
- YAHAGI, Kazuyuki, Harry R. DAVIS, Eloisa ARBUSTINI a Renu VIRMANI, 2015. Sex differences in coronary artery disease: pathological observations. *Atherosclerosis* [online]. **239**(1), 260–267 [vid. 2022-09-10]. ISSN 1879-1484. Dostupné z: doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2015.01.017
- YEH, Ting-Chih, Tzu-Ting HUANG, Tien-Shun YEH, et al., 2016. miR-151-3p Targets TWIST1 to Repress Migration of Human Breast Cancer Cells. *PloS one* [online]. **11**(12), e0168171 [vid. 2018-10-14]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0168171
- ZANETTE, D.L., F. RIVADAVIA, G.A. MOLFETTA, et al.. MiRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [online]. 2007, **40**(11), 1435-1440 [cit. 2022-12-13]. ISSN 1414-431X. Dostupné z: doi:10.1590/S0100-879X2007001100003
- ZHAI, Chungang, Jing CHENG, Haroon MUJAHID, et al., 2014. Selective Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway Regulates Autophagy of Macrophage and Vulnerability of Atherosclerotic Plaque. *PLoS ONE* [online]. **9**(3), e90563 [vid. 2018-10-14]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0090563

- ZHAO, DONGLI, YANXIA SUI a XIAOQIANG ZHENG, 2016. miR-331-3p inhibits proliferation and promotes apoptosis by targeting HER2 through the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways in colorectal cancer. *Oncology Reports* [online]. **35**(2), 1075–1082 [vid. 2018-10-14]. ISSN 1021-335X. Dostupné z: doi:10.3892/or.2015.4450
- ZHAO, Yunyun, Yongjiang QIAN, Zhen SUN, et al., 2021. Role of PI3K in the Progression and Regression of Atherosclerosis. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **12** [vid. 2022-10-16]. ISSN 16639812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2021.632378
- ZHEN, Zigang, Shaohua REN, Hongming JI, Xinmin DING, Peng ZOU a Jian LU, 2019. The lncRNA DAPK-IT1 regulates cholesterol metabolism and inflammatory response in macrophages and promotes atherogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **516**(4), 1234–1241. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/J.BBRC.2019.06.113
- ZHU, Jianhua, Ting CHEN, Lin YANG, et al., 2012. Regulation of MicroRNA-155 in Atherosclerotic Inflammatory Responses by Targeting MAP3K10. *PLoS ONE* [online]. **7**(11), e46551 [vid. 2018-10-06]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0046551

## 10 SEZNAM PUBLIKACÍ A PREZENTOVANÝCH ABSTRAKTŮ

### 10.1. Původní vědecké práce in extenso, které jsou podkladem disertace

**HORVÁTH, Martin**, Veronika HORVÁTHOVÁ, Petr HÁJEK, Cyril ŠTĚCHOVSKÝ, Jakub HONĚK, Ladislav ŠENOLT a Josef VESELKA, 2020. MicroRNA-331 and microRNA-151-3p as biomarkers in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Scientific Reports* [online]., **10**(1) [cit. 2022-12-11]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-62835-w. **IF 4,996**

**HORVÁTH, Martin**, Petr HÁJEK, Cyril ŠTĚCHOVSKÝ, Jakub HONĚK a Josef VESELKA, 2020. Carotid artery plaque composition and distribution: near-infrared spectroscopy and intravascular ultrasound analysis. *European Heart Journal Supplements* [online]. **22**(Supplement\_F), F38-F43 [cit. 2022-12-11]. ISSN 1520-765X. Dostupné z: doi:10.1093/eurheartj/suaa097 **IF 1,803**

ŠTĚCHOVSKÝ, Cyril, Petr HÁJEK, Robert ROLAND, **Martin HORVÁTH** a Josef VESELKA, 2021. Long-term changes after carotid stenting assessed by intravascular ultrasound and near-infrared spectroscopy. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy* [online]. **11**(6), 1180-1189 [cit. 2022-12-12]. ISSN 22233652. Dostupné z: doi:10.21037/cdt-21-160 **IF 2,552**

ŠTĚCHOVSKÝ, Cyril, Petr HÁJEK, **Martin HORVÁTH**, Miloslav ŠPAČEK a Josef VESELKA, 2016. Near-infrared spectroscopy combined with intravascular ultrasound in carotid arteries. *The International Journal of Cardiovascular Imaging* [online]. **32**(1), 181-188 [cit. 2022-12-12]. ISSN 1569-5794. Dostupné z: doi:10.1007/s10554-015-0687-x **IF 2,375**

### 10. 2. Vědecké práce in extenso bez vztahu k tématu disertace

#### 10.2.1 Publikace jako první autor s impact faktorem

**HORVÁTH, Martin**, Petr HÁJEK, Cyril ŠTĚCHOVSKÝ, Jakub HONĚK, Miloslav ŠPAČEK a Josef VESELKA, 2016. The role of near-infrared spectroscopy in the detection of vulnerable atherosclerotic plaques. *Archives of Medical Science* [online]. **6**, 1308-1316 [cit. 2022-12-12]. ISSN 1734-1922. Dostupné z: doi:10.5114/aoms.2016.62904 **IF 3,318**

**HORVÁTH, Martin**, Petr HÁJEK, James E. MULLER, Jakub HONĚK, Cyril ŠTĚCHOVSKÝ, Miloslav ŠPAČEK a Josef VESELKA, 2016. First-in-man near-infrared spectroscopy proof of lipid-core embolization during carotid artery stenting. *Archives of Medical Science* [online]. **4**, 915-918 [cit. 2022-12-12]. ISSN 1734-1922. Dostupné z: doi:10.5114/aoms.2016.60974 **IF 3,318**

## 10.2.2 Publikace jako první autor bez impact faktoru

**HORVÁTH, Martin**, Petr HÁJEK, Cyril ŠTĚCHOVSKÝ, Jakub HONĚK a Josef VESELKA, 2015. Intravascular Near-Infrared Spectroscopy: A Possible Tool for Optimizing the Management of Carotid Artery Disease. *International Journal of Angiology* [online]. **4**(03), 198-204 [cit. 2022-12-12]. ISSN 1061-1711. Dostupné z: doi:10.1055/s-0035-1558644

**HORVÁTH, Martin**, Petr HÁJEK, Cyril ŠTĚCHOVSKÝ a Josef VESELKA. Vulnerable plaque imaging and acute coronary syndrome, 2014. *Cor et Vasa* [online]. **56**(4), e362-e368 [cit. 2022-12-12]. ISSN 00108650. Dostupné z: doi:10.1016/j.crvasa.2014.05.002

## 10.2.1 Spoluautorské publikace s impakt faktorem

ŠTĚCHOVSKÝ, Cyril., Klára. HULÍKOVÁ TESÁRKOVÁ, Petr. HÁJEK, **Martin HORVÁTH**, Eva. HANŠVENCLOVÁ a Josef. VESELKA, 2022. Comparison of 30-Day Outcomes after Carotid Artery Stenting in Patients with Near-Occlusion and Severe Stenosis: A Propensity Score Matching Analysis. *American Journal of Neuroradiology* [online]. **43**(9), 1311-1317 [cit. 2022-12-12]. ISSN 0195-6108. Dostupné z: doi:10.3174/ajnr.A7598 **IF 3,835**

HÁJEK, Petr, Eva POLAKOVÁ, Radka ADLOVÁ, **Martin HORVÁTH**, Eva HANŠVENCLOVÁ, Monika PECKOVÁ a Josef VESELKA, 2022. Mid-term outcomes of patients with Lotus and Evolut transcatheter valves. *Advances in Interventional Cardiology* [online]. **18**(2), 146-153 [cit. 2022-12-12]. ISSN 1734-9338. Dostupné z: doi:10.5114/aic.2022.118531 **IF 1,426**

HONĚK, Jakub, Martin ŠRÁMEK, Tomáš HONĚK, Aleš TOMEK, Luděk ŠEFC, Jaroslav JANUŠKA, Jiří FIEDLER, **Martin HORVÁTH**, Štěpán NOVOTNÝ, Marek BRABEC a Josef VESELKA, 2022. Screening and Risk Stratification Strategy Reduced Decompression Sickness Occurrence in Divers With Patent Foramen Ovale. *JACC: Cardiovascular Imaging* [online]. **15**(2), 181-189 [cit. 2022-12-12]. ISSN 1936878X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcmg.2021.06.019 **IF 16,051**

VESELKA, Josef, Petr HÁJEK, Cyril ŠTĚCHOVSKÝ, **Martin HORVÁTH**, Radka ADLOVÁ, Robert ROLAND, Ingrid HOMOLOVÁ, Eva HANŠVENCLOVÁ a Petra ZIMOLOVÁ, 2021. Long-term survival of carotid stenting patients with regard to single- or double-vessel carotid artery disease: a propensity score matching analysis. *Archives of Medical Science* [online]. **17**(4), 849-855 [cit. 2022-12-12]. ISSN 1734-1922. Dostupné z: doi:10.5114/aoms.2020.98167 **IF 3,318**

HONĚK, Jakub, Martin ŠRÁMEK, Tomáš HONĚK, Aleš TOMEK, Luděk ŠEFC, Jaroslav JANUŠKA, Jiří FIEDLER, **Martin HORVÁTH**, Štěpán NOVOTNÝ a Josef VESELKA, 2020. Patent Foramen Ovale Closure Is Effective in Divers. *Journal of the American College of Cardiology* [online]. **76**(9), 1149-1150 [cit. 2022-12-12]. ISSN 07351097. Dostupné z: doi:10.1016/j.jacc.2020.06.072 **IF 24,094**

HONĚK, Jakub, Martin ŠRÁMEK, Luděk ŠEFC, Jaroslav JANUŠKA, Jiří FIEDLER, **Martin HORVÁTH**, Aleš TOMEK, Štěpán NOVOTNÝ, Tomáš HONĚK a Josef VESELKA, 2019. High-

grade patent foramen ovale is a risk factor of unprovoked decompression sickness in recreational divers. *Journal of Cardiology* [online]. **74(6)**, 519-523 [cit. 2022-12-12]. ISSN 09145087. Dostupné z: doi:10.1016/j.jjcc.2019.04.014 **IF 2,974**

HÁJEK, Petr, Jana PÁLENÍČKOVÁ, Jiří FIEDLER, **Martin HORVÁTH**, Vojtěch SUCHÁNEK a Josef VESELKA, 2017. Inferior sinus venosus and two ostium secundum atrial septal defects is possible to treat with three occludersth three occluders. *Archives of Medical Science* [online]. **1**, 260-262 [cit. 2022-12-12]. ISSN 1734-1922. Dostupné z: doi:10.5114/aoms.2016.64041 **IF 3,318**

VESELKA, Josef, Miloslav ŠPAČEK, **Martin HORVÁTH**, Cyril ŠTĚCHOVSKÝ, Ingrid HOMOLOVÁ, Petra ZIMOLOVÁ a Petr HÁJEK, 2016. Impact of coexisting multivessel coronary artery disease on short-term outcomes and long-term survival of patients treated with carotid stenting. *Archives of Medical Science* [online]. **4**, 760-765 [cit. 2022-12-12]. ISSN 1734-1922. Dostupné z: doi:10.5114/aoms.2016.60964 **IF 3,318**

ŠTĚCHOVSKÝ, Cyril, Petr HÁJEK, **Martin HORVÁTH**, Miloslav ŠPAČEK a Josef VESELKA, 2016. Composition of carotid artery stenosis and restenosis: A series of patients assessed with intravascular ultrasound and near-infrared spectroscopy. *International Journal of Cardiology* [online]. **207**, 64-66 [cit. 2022-12-12]. ISSN 01675273. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijcard.2016.01.104 **IF 4,164**

ŠPAČEK, Miloslav., Cyril ŠTĚCHOVSKÝ, **Martin HORVÁTH**, Petr HÁJEK, Petra ZIMOLOVÁ a Josef VESELKA, 2016. Evaluation of Cerebrovascular Reserve in Patients Undergoing Carotid Artery Stenting and Its Usefulness in Predicting Significant Hemodynamic Changes During Temporary Carotid Occlusion. *Physiological Research* [online]. **65(1)**, 71-79 [cit. 2022-12-12]. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.933077 **IF 1,881**

HONĚK, Jakub, Luděk ŠEFC, Tomáš HONĚK, Martin ŠRÁMEK, **Martin HORVÁTH** a Josef VESELKA, 2015. Patent Foramen Ovale in Recreational and Professional Divers: An Important and Largely Unrecognized Problem. *Canadian Journal of Cardiology* [online]. **31(8)**, 1061-1066 [cit. 2022-12-12]. ISSN 0828282X. Dostupné z: doi:10.1016/j.cjca.2015.03.010 **IF 5,223**

VESELKA, Josef, Miloslav ŠPAČEK, Petr HÁJEK, **Martin HORVÁTH**, Cyril ŠTĚCHOVSKÝ a Petra ZIMOLOVÁ, 2014. Impact of single versus double vessel carotid disease on long-term survival in patients treated with carotid stenting. *International Journal of Cardiology* [online]. **176(3)**, 1299-1300 [cit. 2022-12-12]. ISSN 01675273. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijcard.2014.07.165 **IF 4,164**

HONĚK, Jakub, Martin ŠRÁMEK, Luděk ŠEFC, Jaroslav JANUŠKA, Jiří FIEDLER, **Martin HORVÁTH**, Aleš TOMEK, Štěpán NOVOTNÝ, Tomáš HONĚK a Josef VESELKA, 2014. Effect of conservative dive profiles on the occurrence of venous and arterial bubbles in divers with a patent foramen ovale: A pilot study. *International Journal of Cardiology* [online]. **176(3)**, 1001-1002 [cit. 2022-12-12]. ISSN 01675273. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijcard.2014.04.218 **IF 4,164**

### 10.2.2 Spoluautorké publikace bez impact faktoru

HONĚK Tomáš, **Martin HORVÁTH**, Vojtěch HORVÁTH, Marek ŠLAIS, Tomáš KNEIFL, Jakub HONĚK, Andrea HAVLÍNOVÁ, Miroslav VÍTOVEC, Vratislav FABIÁN a P ŠEBESTA, 2019. Catheter laser ablation of superficial veins of the lower extremities in the symptomatic treatment of venous reflux comparison of the immediate results of two types of laser. *Rozhledy v Chirurgii* [online]. **98**, 248-251. ISSN (On-line) 1805-4579. Dostupné z: doi.org/10.33699/PIS.2019.98.6

HONĚK, Tomáš, **Martin HORVÁTH**, Vojtěch HORVÁTH, Marek ŠLAIS, Tomáš KNEIFL, Jakub HONĚK, Andrea HAVLÍNOVÁ, Miroslav VÍTOVEC, Vratislav FABIÁN a Petr SLOVÁK, 2017. Catheter-based endovenous laser ablation of saphenous veins in the treatment of symptomatic venous reflux: Early results. *Cor et Vasa* [online]. **59**(6), e525-e529 [cit. 2022-12-12]. ISSN 00108650. Dostupné z: doi:10.1016/j.crvasa.2016.11.002

ŠPAČEK, Miloslav, Cyril ŠTĚCHOVSKÝ, **Martin HORVÁTH**, Petr HÁJEK a Josef VESELKA, 2015. Predicting Hemodynamic Changes of Cerebral Blood Flow during Temporal Carotid Occlusion: A Review of Current Knowledge with Implication for Carotid Artery Stenting. *International Journal of Angiology* [online]. **24**(03), 210-214 [cit. 2022-12-12]. ISSN 1061-1711. Dostupné z: doi:10.1055/s-0035-1555132

ŠTĚCHOVSKÝ, Cyril, Petr HÁJEK, **Martin HORVÁTH** a Josef VESELKA, 2014. Detection of vulnerable atherosclerotic plaque with near-infrared spectroscopy: a systematic review. *Vnitřní Lékařství*. **60**(4) 375-379.

NOVOTNÝ Štěpán, Jakub HONĚK, Jaroslav JANUŠKA, Luděk ŠEFC, **Martin HORVÁTH**, Jiří FIEDLER, Martin ŠRÁMEK, Josef VESELKA, Tomáš HONĚK a Miloš TATÁR, 2014. Patent foramen ovale: transcatheter closure or conservative dive profile in decompression sickness prevention in divers? *Cardiology Letters*. **23**, 223-227.

HONĚK Jakub, Tomáš HONĚK, Jaroslav JANUŠKA, Pavel ŠEBESTA, Štěpán NOVOTNÝ, Luděk ŠEFC, Jiří FIEDLER, Martin ŠRÁMEK, **Martin HORVÁTH** a M PAROBKOVÁ, 2012. Patent foramen ovale and the risk of paradoxical embolization of venous bubbles in divers - cave for foam sclerotization of varicose veins. *Rozhledy v Chirurgii*. **91**(7), 378-438

### 10.3 Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních.

**Analýza složení karotického plátu pomocí intravaskulární spektroskopie**  
*XXII. VÝROČNÍ SJEZD ČKS, 2014 Brno*

**Renal Denervation In A Patient With Type B Aortic Dissection And Resistant Hypertension**  
*TCT Asia Pacific 2014, Seoul*

**Blízko-infračervená spektroskopie u karotického stentingu**  
*40. České angiologické dny 2015, Praha*

**Different types of internal carotid artery restenosis: assessment by intravascular ultrasound and near-infrared spectroscopy**

*EuroPCR 2015, Paris*

**Využití blízké infračervené spektroskopie v detekci vulnerabilního aterosklerotického plátu- pilotní studie**

*XXV. VÝROČNÍ SJEZD ČKS, 2015 Brno*

**Intracoronary near infrared spectroscopy and intravascular ultrasound a novel method for the assesment of a vulnerable atherosclerotic plaque**

*7th International Student Medical Congress in Košice 2015, Košice*

**Near-infrared spectroscopy. A new tool for optimization of carotid artery stenting?**

*21. Československé angiologické symposium 2015, Lednice*

**Intravascular Near-Infrared Spectroscopy—A Novel Approach in Carotid Artery Stenting**

*57 th Annual World Congress 2015 - International College of Angiology, Jakarta*

**Understanding New International Lipid Guidelines to Tackle CV Risk—A Practical Model**

*57 th Annual World Congress 2015 - International College of Angiology, Jakarta*

**Spectroscopic analysis of atherosclerotic plaque after bioresorption of the bioresorbable vascular scaffold**

*8th International Student Medical Congress in Košice 2015, Košice*

**Spektroskopická analýza aterosklerotického plátu po bioresorpci stentu**

*XXVI. VÝROČNÍ SJEZD ČKS, 2016 Brno*

**Endovascular diagnostics**

*58th Annual World Congress 2016- International College of Angiology, Prague*

**Biodegradable Vascular Scaffolds—A 2-Year Clinical and Imaging Follow-up**

*58th Annual World Congress 2016- International College of Angiology, Prague*

**Spectroscopic analysis of atherosclerotic plaque after bioresorption of the bioresorbable vascular scaffold**

*European Society of Cardiology Annual Congress 2016, Rome*

**Spektroskopická analýza aterosklerotického plátu po bioresorpci stentu**

*XXVII. VÝROČNÍ SJEZD ČKS, 2016 Brno*

**Spectroscopic analysis of atherosclerotic plaque after bioresorption of the bioresorbable vascular scaffold**

*European Society of Cardiology Annual Congress 2017, Barcelona*

**Spectroscopic analysis of atherosclerotic plaque after bioresorption of the bioresorbable vascular scaffold**

*59th Annual World Congress 2017- International College of Angiology, Vienna*

**Detection of Coronary Vulnerable Atherosclerotic Plaque—The Role of Biomarkers and Advanced Imaging. Is it time for a paradigm shift in the prevention of atherosclerosis?**

*61st Annual World Congress 2019- International College of Angiology, Columbus*

**Je čas na změnu paradigmatu v prevenci aterosklerózy?**

*Prague Intervention XIV 2020- Prague*

**MicroRNA-331 and microRNA-151-3p as biomarkers in patients with ST-segment elevation myocardial infarction**

*XXIX. VÝROČNÍ SJEZD ČKS, 2020 Brno*

**Chlopenní vady**

*XXX. VÝROČNÍ SJEZD ČKS, 2021 Brno*