

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

CVETKA REZAR

**SPREMEMBE VREDNOSTI Z LIPOPROTEINI
POVEZANE FOSFOLIPAZE A₂ OB ZDRAVLJENJU
KORONARNIH BOLNIKOV Z LIPOLITIČNIMI
ZDRAVILI**

**BLOOD LEVELS OF PHOSPHOLIPASE A₂ IN
CORONARY PATIENTS TREATED WITH
LIPOLYTIC DRUGS**

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Kliničnega centra v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom doc. dr. Zlatka Frasa, dr. med. Analize so bile opravljene na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih označevalcev.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm. za mentorstvo pri diplomski nalogi ter za posredovanje strokovnega znanja in spodbude pri nastajanju tega dela.

Posebna zahvala velja somentorju doc. dr. Zlatku Frasu, dr. med., ki me je s svojim znanjem, izkušnjami in dragocenimi nasveti usmerjal med pisanjem diplomske naloge in jo temeljito pregledal.

Zahvaljujem se tudi staršem in prijateljem za moralno spodbudo, podporo, potrpljenje ter lepe trenutke v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom doc. dr. Zlatka Frasa, dr. med.

Cvetka Rezar

Ljubljana, marec 2009

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Član diplomske komisije:izr. prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Vsebina

1 Uvod	11
1.1 Ishemična bolezen srca	11
1.1.1 Stabilna angina pectoris	12
1.1.2 Akutni koronarni sindrom	12
1.1.3 Prezgodnja koronarna bolezen.....	12
1.2 Aterogeneza	13
1.3 Dejavniki tveganja za bolezn srca in žilja	15
1.3.1 Klasični dejavniki tveganja za bolezn srca in žilja.....	15
1.3.2 Fosfolipaza A ₂	18
1.3.3 Fibrinogen.....	19
1.4 Diagnostika ishemične bolezn srca	21
1.4.1 Kardiovaskularna funkcijska diagnostika.....	21
1.4.2 Laboratorijska diagnostika	22
1.5 Terapija ishemične bolezn srca	24
1.5.1 Terapija dislipidemije	25
1.5.2 Vpliv lipolitičnih zdravil na vrednosti fosfolipaze A ₂	27
2 Namen dela in cilji.....	30
2.1 Cilji	30
3 Materiali in metode.....	32
3.1 Biološki vzorci.....	32
3.2 Metoda za določanje aktivnosti sPLA ₂	32
3.3 Metode za določanje holesterola	38
3.4 Metoda za določanje fibrinogena (von Clauss)	40
4 Opis skupine	41
5 Uporabljena statistična metodologija	43
6 Rezultati.....	45

6.1 Porazdelitev nekaterih manifestnih oblik koronarne bolezni in klasičnih dejavnikov tveganja bolezni srca in žilja	45
6.2 Primerjava aktivnosti sPLA ₂ med študijsko in kontrolno skupino	48
6.3 Prezgodnja koronarna bolezen in aktivnost sPLA ₂ pri moških, mlajših in starejših od 55 let	48
6.4 Vpliv lipolitičnih zdravil na aktivnost sPLA ₂	49
7 Razprava	55
7.1 Ocena porazdelitve nekaterih manifestnih oblik koronarne bolezni in dejavnikov tveganja srčno-žilnih bolezni	55
7.2 Primerjava med skupinami moških, mlajših in starejših od 55 let, glede na pojav prezgodnje koronarne bolezni in aktivnosti sPLA ₂	57
7.3 Primerjava med pacienti v skupinah z manifestno obliko KB in kontrolno skupino	57
7.4 Vpliv lipolitičnih zdravil na vrednosti sPLA ₂	60
8 Sklep	65
9 Literatura	66

Povzetek

Izhodišče. Sekretorna fosfolipaza A₂ (sPLA₂) je nov potencialni (vnetni) označevalec tveganja za bolezni srca in žilja. Po do sedaj znanem mehanizmu naj bi bil glavni prispevek sPLA₂ k aterogenezi encimska modifikacija lipoproteinov v krvni plazmi in/ali steni arterij.

Namen. Namen raziskave je bil ugotoviti, ali obstaja povezava med različnimi manifestnimi oblikami koronarne bolezni, povezane z vnetnimi procesi, ter povišanimi vrednostmi sPLA₂, in ali učinek uporabljenih lipolitčnih zdravil (statinov in fibratov) ne vpliva le na lipidni profil bolnikov z ishemično boleznijo srca, temveč tudi, z ugodnimi pleiotrofnimi učinki, na spreminjanje aktivnosti sPLA₂ v krvni plazmi. Pri tem nas je zanimalo, kateri način zdravljenja z lipolitiki je pri tem najuspešnejši - v obliki monoterapije ali kombiniranega zdravljenja. Domnevali smo, da gre za potencialno povezanost med vnetnim procesom ateroskleroze, sPLA₂ in povišano koncentracijo lipoproteinov v krvi obravnavanih bolnikov.

Metode. Sto devet bolnikov, hospitaliziranih zaradi ishemične bolezni srca in zdravljenih z lipolitčnimi zdravili, smo naključno razporedili v dve skupini. Prve tri mesece zdravljenja so bolniki iz ene skupine prejeli fenofibrat (skupina F; n=52), v drugi skupini pa simvastatin (skupina S; n=57). Največ bolnikov je imelo v anamnezi akutni srčni infarkt (61,5 % F in 50,9 % S) ter hiperlipidemijo (76,9 % F in 89,5 % S). Po treh mesecih zdravljenja se je vsaka skupina razdelila še na dve novi, tako da so bila vpeljana štiri različna zdravljenja. V prvi skupini (skupina S), kjer so bolniki že prejeli statine, so z njimi tudi nadaljevali naslednjih devet mesecev. V drugi skupini je bilo podobno, le da so ves čas zdravljenja prejeli fibrate (skupina F). Pri tretji skupini so bili po treh mesecih zdravljenja s statini v terapevtsko shemo dodani še fibrati (skupina S+F), pri četrti skupini pa smo fibratom dodali še statine (skupina F+S). Aktivnost sPLA₂ v krvni plazmi bolnikov smo določili s kolorimetričnim testom. Pri tem smo uporabili 1,2 - ditio analog diheptanoil - fosfatidilholina, ki je substrat za sPLA₂. Ostale laboratorijske parametre smo določili s klasičnimi metodami.

Rezultati. Zdravljenje z lipolitčnimi zdravili je večinoma pričakovano spremenilo vrednosti lipidograma. Med pacienti v skupinah z manifestno obliko koronarne bolezni in

kontrolno skupino nismo ugotovili statistično značilnih razlik ($p < 0,05$) med povprečnimi vrednostmi sPLA₂ ob sprejemu. Statistično značilno ($p < 0,05$) so se razlikovale skupine s kombinirano terapijo: (F+S); med t=0 in t=3 mes ($6,84 \pm 1,09$ proti $7,84 \pm 1,19$) ($p < 0,05$), med t=0 in t=12 mes ($6,84 \pm 1,09$ proti $8,26 \pm 1,66$) ($p < 0,05$), v skupini (S+F); med t=0 in t=3 mes ($6,43 \pm 1,79$ proti $8,33 \pm 2,65$) ($p < 0,05$), med t=0 in t=12 mes ($6,43 \pm 1,79$ proti $8,64 \pm 1,36$), in v skupini z monoterapijo (F); med t=0 in t=12 mes ($p=0,035$). Pri tem so v omenjenih skupinah povprečne vrednosti sPLA₂ med zdravljenjem naraščale.

Zaključki. Zdravljenje koronarnih bolnikov z lipolitičnimi zdravili, statini in/ali fibrati povzroči spremembe vrednosti sPLA₂. V pričujoči raziskavi je prišlo do najpomembnejših razlik ob kombiniranem načinu zdravljenja s simvastatinom in fenofibratom. Med enoletnim lipolitičnim zdravljenjem se je nakazoval trend povečevanja aktivnosti encima, kar je bilo v nasprotju s pričakovanji na podlagi predhodnih raziskav. Tak rezultat lahko predstavlja izraz protiateroгене vloge sPLA₂, vendar pa ga bo potrebno podpreti z dodatnimi raziskavami.

Abstract

Background. Secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) is a new potential (inflammatory) marker for the risk of cardiovascular disease. According to currently known mechanism the main contribution of sPLA₂ to atherogenesis would be enzymatic modification of lipoproteins in blood plasma and/or arterial wall.

Aim. The purpose of our research was to find out possible correlation between different manifestations of coronary disease and levels of sPLA₂, and if the effect of lipolytic therapy (with statins and/or fibrates) influences not only lipid profile of patients with ischaemic heart disease but also, through its favourable pleiotropic effects, a change in the sPLA₂ activity in blood plasma. The main point of our interest was which method of lipolytic therapy is most efficient, either in the form of mono- or combined therapy. We presumed that this is a case of potential connection between inflammatory process of atherosclerosis, sPLA₂ and increased blood levels of lipoproteins in treated patients.

Methods. We randomly divided in two groups 109 patients hospitalized for ischaemic heart disease. In the course of first three months the patients of the first group were given fenofibrate (group F; n=52), while those in the second received simvastatin (group S; n=57). The majority of patients had the history of acute myocardial infarction (61.5 % in F and 50.9 % in S) and hyperlipidemia (76.9 % in F and 89.5 % in S). After three months of therapy each group was divided in two new groups. Thus four different therapeutic methods were introduced. The first group of patients which were up to that time given statins, continued to receive them for the next nine months. At the same time, the second group was given fibrates (group F). The therapeutic scheme of the third group was, after the third months of therapy with statins, supplemented with fibrates (group S+F). To the therapy of the fourth group we added statins (F+S). The activity of sPLA₂ was measured with colorimetric assay. For this assay we used 1,2-dithio analog diheptanoyl-phosphatidylcholine which serves as a substrate for sPLA₂. All other parameters were determined by classical methods.

Results. The lipolytic therapy mostly changed lipid profile as expected. There were no statistically significant differences established between average levels of sPLA₂ in groups of patients with acute manifestation of coronary disease and control group. Statistically significant differences were established in group of patients with combined therapy: (F+S); between t=0 and t=3 months ($6,84 \pm 1,09$ verses $7,84 \pm 1,19$) ($p < 0,05$), between t=0 and

t=12 months ($6,84 \pm 1,09$ verses $8,26 \pm 1,66$) ($p < 0,05$) in the group with (S+F); between t=0 and t=3 months ($6,43 \pm 1,79$ verses $8,33 \pm 2,65$) ($p < 0,05$), between t=0 and t=12 months ($6,43 \pm 1,79$ verses $8,64 \pm 1,36$) and in the group with monotherapy (F); between t=0 and t=12 months ($p=0,035$). In the aforementioned groups the average levels of sPLA₂ were increasing during therapy.

Conclusions. In patients with coronary disease lipolytic therapy (with statins and/or fibrates) causes change in levels of sPLA₂. In the present research the most significant differences occurred in groups of patients treated with combination of simvastatin and fenofibrate. During one year of lipolytic therapy the trend of increasing activity of the enzyme was noticed which was somehow contrary to expectations based on previous research. Such a result may signify a manifestation of antiatherogenic role of sPLA₂. Nevertheless, additional research is required to back up this supposition.

Seznam okrajšav

SZO - Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization, WHO)
CINDI - Countrywide Integrated Noncommunicable Disease Intervention Program
apo (B-100) - apolipoprotein (B-100)
SŽB - srčno-žilne bolezni
NCEP/ATP III - National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III
AHA - American Heart Association
NHLBI - National Heart, Lung and Blood Institute
ADA - American Diabetes Association
HM – hilomikroni
VLDL - lipoproteini zelo nizke gostote (angl. very low density lipoproteins)
LDL - lipoproteini majhne gostote (angl. low density lipoproteins)
IDL - lipoproteini srednje gostote (angl. intermediate density lipoproteins)
HDL - lipoproteini velike gostote (angl. high density lipoproteins)
PLA₂ - fosfolipaza A₂
sPLA₂ - sekretorna fosfolipaza A₂
cPLA₂ - citosolna fosfolipaza A₂
iPLA₂ - od Ca²⁺ neodvisna PLA₂
PAF-AH - PAF-acetilhidrolaza /na lipoproteine vezana fosfolipaza A₂
AA - arahidonska kislina
COX-1 - ciklooksigenaza-1
COX-2 - ciklooksigenaza-2
CRP - C-reaktivna beljakovina
t-PA - tkivni aktivator plazminogena (angl. tissue type plasminogen)
PAI - zaviralec aktivatorja plazminogena (angl. plasminogen activator inhibitor)
EKG - elektrokardiografija
CTA - računalniška tomografska arteriografija
MRA - angiografija s pomočjo magnetno resonančnega tomografa
EBCT - večrezinska računalniška tomografija z uporabo snopa elektronov (angl. electron beam computed tomography)
PET - pozitronska emisijska tomografija (angl. positron emission tomography)
KA - kateterska koronarna angiografija

HMG-CoA - reduktaza 3-hidroksi-3-metil glutaril koencima A

PPAR - α – transkripcijski faktor (angl. peroxisome proliferator-activated receptor alfa)

oxPL - oksidiran fosfolipid

lyso-PC - lizofosfatidilholin

KIKKB - Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

UKCL - Univerzitetni klinični center Ljubljana

IBL - Immuno - Biological Laboratories

DTNB - 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojska kislina)

DMSO - dimetilsulfoksid

HEPES - (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sulfonska kislina)

Tris - tris(hidroksimetil)aminometan

CHOD-PAP - Chol. Oxidase Phenol 4-aminoantipyrine Peroxidase

GPO-PAP - Glycerol-3-Phosphate oxidase Phenol 4-aminoantipyrine Peroxidase

NYHA- New York Heart Association

SPSS - The Statistical Package for the Social Sciences

SD - standardna deviacija

p - statistična značilnost

KB - koronarna bolezen

F - fenofibrat

S - simvastatin

ITM - indeks telesne mase

AMI - akutni miokardni infarkt

KT - krvni tlak

PAF - dejavnik, ki aktivira trombocite (angl. platelet activating factor-acyl hydrolase)

1 Uvod

Bolezni srca in žilja so v svetovnem merilu glavni vzrok smrti. Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO, angl. World Health Organization, WHO) za leto 2005 je bilo v povprečju kar 30 % vseh smrti posledica teh bolezni. Preko 80 % smrtnih izidov zaradi bolezni srca in žilja je izviralo iz gospodarsko nizko ali srednje razvitih držav, smrtnost in obolevnost med spoloma pa sta približno enaki (1). Kljub še vedno visoki obolevnosti, invalidnosti in smrtnosti je v zahodnem svetu opaziti trend zmanjševanja umrljivosti, k čemur pomembno prispeva preventivna kardiologija. Ta temelji zlasti na preprečevanju nastanka bolezni (primarna preventiva) in izboljšanju poteka ter preprečevanju ponovnih zapletov bolezni (sekundarna preventiva). V okviru SZO deluje med drugim tudi program CINDI (angl. Countrywide Integrated Noncommunicable Disease Intervention Program), ki je namenjen obvladovanju najpogostejših kroničnih bolezni, med katere uvrščamo tudi bolezni srca in žilja. V Sloveniji je s tem imenom voden in koordiniran Nacionalni program primarne preventive srčno-žilnih bolezni (2).

1.1 Ishemična bolezen srca

Med boleznimi srca in žilja je daleč najpomembnejša ishemična bolezen srca, ki je v večini primerov pozna manifestacija koronarne ateroskleroze, njeni zapleti v ožjem smislu pa so posledica tromboze, v zelo majhnem obsegu lahko tudi trombembolije. Proces ateroskleroze se lahko začne že v otroštvu, njen potek je običajno asimptomatski. Za napredovanje ateroskleroze so značilni degenerativni procesi v intimi arterije in spremembe v mediji ob postopnem kopičenju lipidov, kompleksnih ogljikovih hidratov, krvnih sestavin, fibroznega tkiva ter kalcijevih usedlin na mestu, kjer nastane aterosklerotična leha. Med manifestnimi oblikami koronarne ateroskleroze sta najpogostejši angina pectoris (stabilna, nestabilna) in srčni (miokardni) infarkt, slednji je lahko pogosto vzrok nenadne srčne smrti. Klinično se bolezen manifestira, ko je kritično zožen ali zaprt lumen venčnih (koronarnih) arterij, ter s tem nezadostno prekrvavljena srčna mišica (miokard), kar imenujemo ishemija miokarda. Ta lahko vodi v odmrtnje tkiva (ishemično nekrozo), katere obseg je odvisen od lokalizacije in števila zamašenih koronarnih arterij. Akutno poslabšanje koronarne bolezni imenujemo akutni koronarni sindrom (3, 4).

1.1.1 Stabilna angina pectoris

Stabilna aterosklerotična leha, ki oži lumen koronarne arterije, je značilna za stabilno angino pectoris, in lahko pomembno omejuje dotok krvi v miokard. Da postane bolezen manifestna, je običajno potrebna vsaj približno 70-odstotna zožitev koronarne arterije, lahko pa tudi več. Ob naporu ali stresu, ko so potrebe po dotoku krvi v srčno mišico večje, se stanje ishemijske izrazi kot ishemična srčna bolečina (stenokardija), ki je tipično lokalizirana za prsnico, in je običajno reverzibilne narave. Pojenja lahko ob mirovanju ali s pomočjo delovanja zdravil, zlasti tistih, ki povzročajo vazodilatacijo, npr. nitroglicerina (5, 6).

1.1.2 Akutni koronarni sindrom

Raztrganje (ruptura) aterosklerotične lehe, ki sproži nadaljnji niz bolezenskih dogajanj v smeri zamažitve ali kritične zožitve arterije z nastankom tromboze, vazospazmom ali s spremljajočo distalno embolijo, se lahko klinično kaže kot nestabilna angina pectoris, akutni miokardni infarkt ali nenadna srčna smrt. Ta stanja so značilna za akutni koronarni sindrom. Kadar pride do ishemične nekroze srčne mišice, govorimo o akutnem miokardnem infarktu, če pa do nekroze ne pride, stanje poimenujemo nestabilna angina pectoris.

Za nestabilno angino pectoris so značilni vse pogostejši in dalj časa trajajoči napadi prsne bolečine, ki nastanejo že ob manjših naporih ali celo v mirovanju. Prsna bolečina se širi v vrat, roke ali zgornji del trebuha. Stopnjevanje napadov pogosto nakazuje na možnost razvoja obsežnega miokardnega infarkta s kardiogenim šokom. Popolna ali delna zapora koronarne arterije s trombom lahko nenadoma zaustavi krvni obtok v koronarnih arterijah (ishemija miokarda), sočasno pa se lahko pojavijo tudi motnje srčnega ritma (nevarni sta predvsem prekatna tahikardija in/ali fibrilacija). Ob takem dogajanju je lahko izid za bolnika tudi usoden, nastopi nenadna srčna smrt (3, 7, 8).

1.1.3 Prezgodnja koronarna bolezen

Koronarno bolezen opredelimo za prezgodnjo, če se pojavi pri moških pred 55. letom, pri ženskah pa pred 65. letom starosti. Zelo pogosto je posledica motenj presnove krvnih maščob (lipoproteinov), ki so posledica genetskih napak in/ali prisotnosti zelo izraženih drugih dejavnikov tveganja za aterosklerotično žilno bolezen. Podrobno so poznane

nekatero genske bolezni presnove maščob, pri katerih se pogosteje pojavlja prezgodnja koronarna bolezen, npr. družinska hiperholesterolemija, družinsko okvarjen apo B-100, kombinirana hiperlipidemija, disbetalipoproteinemija (9, 10, 11).

1.2 Aterogeneza

Poznamo številne teorije nastanka in napredovanja aterosklerotičnega bolezenskega procesa oziroma aterogeneze. Med njimi so v zadnjih desetletjih najpogosteje citirane:

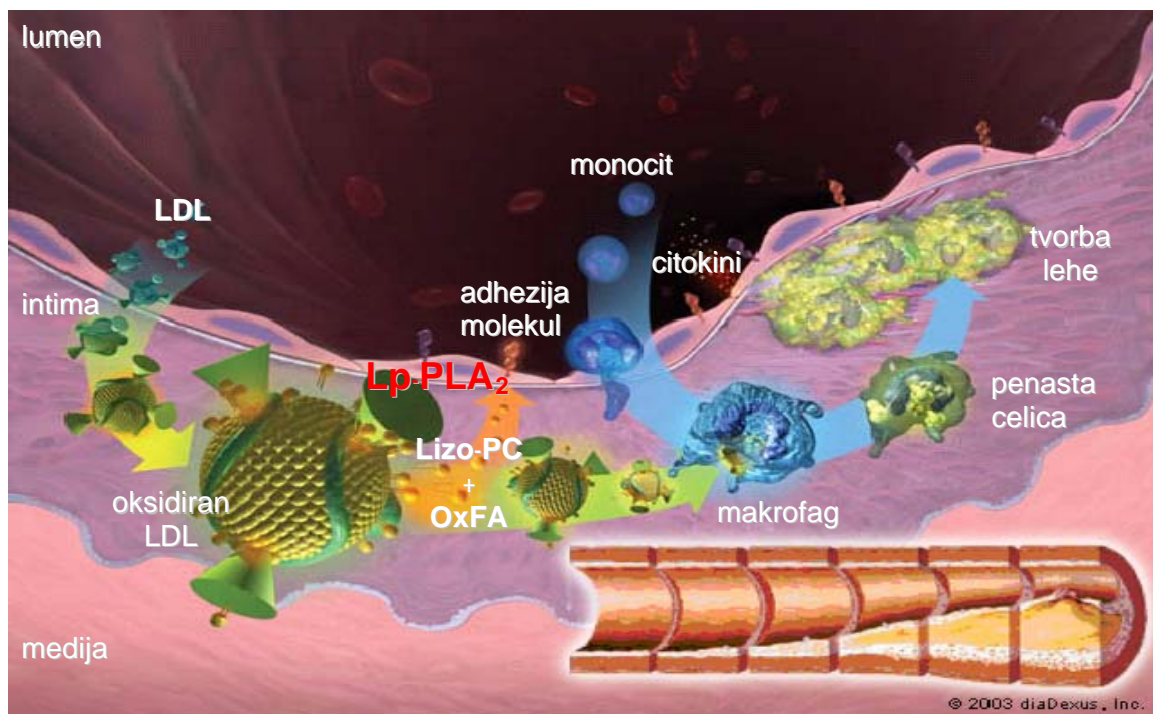
- teorija poškodbe žilnega endotelija (5), na katero se navezuje
- teorija vnetja oziroma vnetnega odgovora na poškodbo žilne stene; gre za moteno delovanje žilnega endotelija, saj poškodba le-tega povzroči žariščno aktivacijo prek različnih dejavnikov,
- teorija okužbe z nekaterimi virusi (Citomegalovirus, Herpes Simplex virus) oziroma bakterijami (*Helicobacter Pylori* in *Chlamidia Pneumoniae*), ki so jih izolirali iz aterosklerotičnih leh.

Po teoriji poškodbe žilnega endotelija predstavljajo v aterogenezi pomemben člen reakcije oksidacije. Produkti oksidacije lipoproteinov nizke gostote, LDL (angl. low density lipoproteins) v intimi arterij so biološko aktivne molekule. Peroksidaciji so najprej izpostavljene molekule fosfolipidov na površini lipoproteinov, iz njih nastanejo lizofosfatidilholinski delci. Še posebej je zaradi prisotnih dvojnih vezi v molekuli tovrstnim reakcijam izpostavljena linolenska kislina, ki je pogosto zastopana v LDL. Iz molekul holesterola, ki se nahajajo v notranjosti lipoproteinov, nastajajo oksisteroli, molekula apo B-100, ki je apolipoprotein, pa razpade na fragmente. Oksidirani delci LDL preko posebnih receptorskih sistemov vstopajo v različne tipe celic, kot so endotelijske celice, makrofagi, gladkomišične celice, monociti, nevtrofilci in fibroblasti (4, 12, 13, 14, 15, 16).

V odgovor na tak lokalni dražljaj (poškodba, vnetje) endotelijske celice preko drugih molekul-posrednikov na svoji površini izražajo adhezijske molekule. Sproščajo se tudi kemotaktične molekule, kot so monocitni kemoatraktantni protein 1, P-selektin, E-selektin in rastni dejavniki. Limfociti in monociti prepoznajo endotelijske celice preko ustreznih

receptorjev na mestu aktivacije. V intimi se sprostijo kemokini in sprožijo migracijo celic v subendotelijski prostor. V vnetno spremenjeni intimi nastanejo citokini, ki spodbudijo monocite k diferenciaciji v makrofage. Aktivirani makrofagi preko receptorskega sistema sprejemajo oksidirane delce LDL, jih razgradijo, sproščeni holesterol pa se kopiči v citosolu teh celic. Hkrati izločajo vnetne citokine, proteaze, citotoksične kisikove in dušikove radikale. Pravimo jim penaste celice, ki v procesu ateroskleroze odmrejo in se kopičijo v intimi, iz njih nastane t.im. maščobna leha. Zaradi delovanja sproščenih rastnih dejavnikov in citokinov začno gladkomišične celice, ki preidejo iz medije v intimo, izločati kolagen in elastin, kar omogoča nastanek fibroznega pokrova. Maščobna leha se spremeni v fibrozno leho, ta se veča in brazgotini. Razmeroma hiter zaplet na lehi je poapnitev oziroma odlaganje kalcija v fibrozno leho. Na tej stopnji jo lahko že poimenujemo aterosklerotična leha. Ta lahko oži lumen žile in ovira pretok krvi (slika 1).

Sledi druga faza razvoja ateroskleroze, nastanek nestabilne žilne lehe, ki je pogosto nagnjena k raztrganju. Slednje povzročijo proteolitični encimi, ki jih izločajo zlasti aktivirani limfociti ter aktivirani makrofagi. Kot najnevarnejši zaplet velja akutni trombotični dogodek, kjer pridejo trombociti iz krvnega obtoka v stik s kolagenom na žilni steni, kar sproži kaskado reakcij koagulacije. Proces ateroskleroze tako preide v aterotrombozo (4, 17, 18).



Slika 1: Aterogeneza

1.3 Dejavniki tveganja za bolezni srca in žilja

Dejavniki tveganja so značilnost (zdravega ali bolnega) posameznika in pospešujejo nastanek, napredovanje, nekateri pa tudi nestabilnost vezivnih leh. Pogojeni so lahko z dednostjo, biološkimi vplivi, načinom življenja, družbenimi vplivi, ali pa izhajajo iz določenih bolezenskih stanj.

1.3.1 Klasični dejavniki tveganja za bolezni srca in žilja

Med najpogostejše nespremenljive nevarnostne dejavnike za srčno-žilne bolezni (SŽB), na katere ne moremo vplivati, uvrščamo starost, spol, raso in dedni dejavnik.

Spremenljivi dejavniki, na katere lahko vplivamo, so:

- vedenjski dejavniki, kot so na primer kajenje, telesna neaktivnost, neustrezno prehranjevanje (ki vodi v prekomerno telesno težo, (trebušno) debelost in

izraženost nekaterih bioloških dejavnikov tveganja), tvegano pitje alkohola, izpostavljenost škodljivim stresnim dejavnikom, jemanje določenih zdravil, ter

- biološki (oz. biokemični) dejavniki, kamor sodijo arterijska hipertenzija, dislipidemija, motena toleranca za glukozo, sladkorna bolezen itd.

Nekatere od teh dejavnikov uvrščamo v okvir koncepta t.im. metaboličnega sindroma, ki zaradi sočasnega obstoja večih izmed naštetih dejavnikov tveganja predstavlja uporabno klinično orodje za zgodnje odkrivanje presnovnih motenj, ter intervencijo za zmanjšanje le-teh (19, 20).

Metabolični sindrom

Metabolični sindrom je skupek presnovnih motenj, ki se kažejo kot kompleksna klinična slika. Zelo uveljavljena in klinično uporabna je opredelitev metaboličnega sindroma, kot jo je sprejel nacionalni program za učenje o holesterolu v ZDA (angl. National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III (NCEP/ATP III). Diagnoza je potrjena, kadar so prisotni vsaj trije od naslednjih dejavnikov tveganja: trebušna (visceralna, centralna) debelost (obseg pasu pri moških > 102 cm, pri ženskah > 88 cm), neustrezno spremenjena koncentracija nekaterih maščobnih molekul v krvi (trigliceridi $\geq 1,7$ mmol/L, holesterol HDL pri moških < 1,0 mmol/L in pri ženskah < 1,3 mmol/L), zvišan krvni tlak ($\geq 130/85$ mmHg) in zvišana koncentracija glukoze na tešče ($\geq 6,1$ mmol/L) (21).

Stanja, ki pospešujejo (izražajo) A) vnetje (proinflatorno stanje), B) nagnjenost k trombozi (protrombotično stanje), in okrnjeno delovanje endotelija (endotelijska disfunkcija), so le nekatere izmed proaterogenih nenormalnosti, ki označujejo sindrom inzulinske rezistence, ki pa verjetno ni sinonim za metabolični sindrom, čeprav se pogosto pojavljata skupaj, npr. v opredelitvi metaboličnega sindroma iz leta 2004 konference treh ameriških strokovnih združenj (AHA-American Heart Association, NHLBI-National Heart, Lung and Blood Institute, ADA-American Diabetes Association) (22).

Dislipidemija

Hiperlipidemija je presnovna motnja, ki se kaže kot zvišana raven plazemskih koncentracij holesterola in/ali trigliceridov. Dislipidemija pomeni širši pojem, saj obsega še presnovne

motnje, kjer je lahko v serumu znižana tudi koncentracija holesterola HDL, ali pa je sestava lipoproteinov spremenjena.

Lipoproteini so makromolekularni kompleksi, sestavljeni iz apolipoproteinov, holesterola, holesterolnih estrov, trigliceridov in fosfolipidov. Njihova funkcija je prenos različnih oblik maščobnih delcev (lipidov) po krvi. Apolipoproteini so specifični prenašalni glikoproteini amfifilne narave, ki se nahajajo na površini lipoproteinov. Prispevajo k stabilnosti strukture lipoproteina, vplivajo na aktivnost nekaterih encimov, kot je lipoproteinska lipaza (LPL), odgovorni so za specifično vezavo lipoproteinov preko receptorjev na površino tarčnih celic in določajo presovno pot lipoproteinov. Poznamo vsaj devet različnih apolipoproteinov, ki v različnih kombinacijah z lipidi tvorijo plazemske lipoproteine. Lipoproteini se med seboj razlikujejo po gostoti, premeru (preglednica 1), po vsebnosti trigliceridov, holesterola in fosfolipidov, ter po zastopanosti apolipoproteinov. Ločimo hilomikrone (HM), lipoproteine zelo nizke gostote (angl. very low density lipoproteins, VLDL), lipoproteine majhne gostote (angl. low density lipoproteins, LDL), lipoproteine srednje gostote (angl. intermediate density lipoproteins, IDL), in lipoproteine velike gostote (angl. high density lipoproteins, HDL) (23, 24, 25).

Preglednica 1: Plazemski lipoproteini

Lipoproteini	Premer delca (nm)	Gostota (g/cm ³)
Hilomikroni	75 - 1200	0,93
VLDL	30 - 80	0,93-1,006
IDL	25 - 35	1,006-1,019
LDL	18 - 25	1,019-1,063
HDL	5 - 12	1,063 – 1,210

Na koncentracijo lipidov v plazmi vplivajo številni dejavniki, ki povzročajo primarne in sekundarne hiper- in hipolipidemije. Primarne motnje povzročajo genetski dejavniki, npr. družinsko hiperholesterolemijo, sekundarne pa številni dejavniki, kot so spol, starost, različna bolezenska stanja, nekatera zdravila, prehrana, debelost, telesna neaktivnost, tvegano uživanje alkohola, kajenje, hormonsko stanje, nosečnost, stradanje itd. Mnoge klinične študije kažejo na povečano tveganje za razvoj SŽB ob spremljajoči

hiperlipidemiji, kjer je zlasti pomemben zvišan holesterol LDL, in kjer so prisotni še drugi dejavniki tveganja. Ni pa hiperholesterolemija vselej povezana z aterosklerozo. Za natančnejšo določitev koncentracij posameznih lipoproteinov v krvi oziroma holesterola je smiselno izmeriti celoten lipoproteinski profil (25).

1.3.2 Fosfolipaza A₂

Fosfolipaze A₂ (PLA₂) so encimi različnih tipov, ki spadajo v večjo skupino fosfolipaz A. Poznamo še fosfolipaze skupin B, C, D, ter njihove podtipe. PLA₂ najdemo v vseh tkivih človeškega organizma, vključno s krvno plazmo. Humane celice lahko vsebujejo več različnih tipov PLA₂, vsaka od teh je neodvisno nadzorovana in po mestu ter načinu delovanja specifična. Večinoma katalizirajo hidrolizo estrskih vezi substratov, kot so fosfolipidi, fosfatidilholini, fosfatidilserini itd. Hidroliza poteče na drugem ogljikovem atomu (sn-2) glicerofosfolipida. Nekaterim encimom se vse bolj pripisuje tudi vloga liganda za specifične vezalne beljakovine znotraj celic. Pomen teh interakcij še ni povsem raziskan. Do sedaj je znanih pet skupin PLA₂; sekretorne PLA₂ (sPLA₂), citosolne PLA₂ (cPLA₂), od Ca²⁺- neodvisne PLA₂ (iPLA₂), PAF-acetilhidrolaze (PAF-AH) in lizosomske PLA₂.

Znotraj skupine sPLA₂ je znanih vsaj 11 encimov, ki za svojo encimsko aktivnost potrebujejo kofaktor Ca²⁺. Skupina sPLA₂ je razdeljena v več podskupin (I, II, III, V, X, XII), te pa v več podtipov encimov.

Pomemben encim, ki ima lastnost fosfolipaze, je trombocite aktivirajoči faktor acetilhidrolaza (angl. platelet activating factor-acyl hydrolase, PAF-AH), znana pod imenom na lipoproteine vezana fosfolipaza A₂ (Lp-PLA₂). Ta se veže na substrat, trombocite aktivirajoči faktor, in ga cepi. Poleg tega prepozna še oksidirane fosfolipide, ki jih sestavljajo oksidirane maščobne kisline, dolžine do 9 ogljikovih atomov (26, 27, 28).

Sekretorna fosfolipaza A₂

Različni tipi sekretorne fosfolipaze A₂ so vpleteni v številne patofiziološke procese, vse od presnove fosfolipidov, tvorbe eikozanoidov do vnetja, ne nazadnje te encime najdemo tudi v aterosklerotičnih arterijah. sPLA₂ so v primerjavi z ostalimi fosfolipazami nizke molekulske mase. K relativni stabilnosti (strukturni, termični, proteolitični itd.) prispevajo

zlasti disulfidne vezi. Izoelektrična točka teh encimov, npr. sPLA₂ tip IIA je 10,5, kar omogoča lažje interakcije z negativno nabitimi površinami lipidov, kot so fosfolipidi celičnih membran, lipoproteini in proteoglikani zunajceličnega matriksa. Pri encimsko katalizirani hidrolizi fosfolipidov se v celicah sprosti arahidonska kislina (AA). Ta je lahko substrat za ciklooksigenazo-1 (COX-1), ciklooksigenazo-2 (COX-2) in lipoksigenazo. Pretvorbeni produkti AA so eikozanoidi (levkotrieni, tromboksani), ki sodelujejo pri vnetju in strjevanju krvi. Sprostijo se tudi lizofosfolipidi, ki so prav tako bioaktivni mediatorji s proaterogeno vlogo (27, 28).

Ateroskleroza je poleg vnetja, nevrodegenerativnih in rakavih obolenj, ena glavnih patoloških stanj, za katera je znano, da so povezana s sPLA₂. Prispevek tega encima k procesu ateroskleroze se kaže preko aterogenih mediatorjev in encimske modifikacije cirkulirajočih lipoproteinov, ki se kot taki po vstopu v žilno steno lahko vključijo v proces aterogeneze. Vključeni so predvsem LDL delci, za katere je sicer znano, da njihova zvišana vrednost zelo povečuje ogroženost za nastanek, napredovanje in pojavljanje zapletov SŽB. Aktivnost cirkulirajoče sPLA₂ predstavlja nov potencialni neodvisni označevalec tveganja za SŽB. V nekaterih študijah so ugotovili statistično značilno povezavo med serumsko aktivnostjo sPLA₂ in nekaterimi že znanimi dejavniki tveganja za SŽB, medtem ko povezava pri zdravih osebah ni znana (26, 27, 28).

Kako se vrednosti fosfolipaze spreminjajo glede na stopnjo v razvoju aterosklerotične lehe, so proučevali na primeru Lp-PLA₂ (29). Izkazalo se je, da je bil ta označevalec zvišan ob nastanku nestabilne lehe, ki je bila nagnjena k raztrganju, oziroma ob nastanku vezivne aterosklerotične lehe (fibroateroma) s tanko vezivno kapo, ki je zelo nestabilna. Podobno je bilo pri raztrgani lehi. Tako so sklepali, da bi inhibicija tega encima, ki je potencialna terapevtska tarča, lahko pomenila pomembno (terapevtsko) možnost za stabilizacijo aterosklerotične lehe in tako posledično tudi zmanjšanje števila koronarnih dogodkov.

1.3.3 Fibrinogen

Fibrinogen je v vodi topen glikoprotein, ki se sintetizira v jetrih, in nato sprosti v krvni obtok. Je esencijska sestavina v kaskadi reakcij strjevanja (koagulacije) krvi. Pomembno vpliva tudi na viskoznost krvi. Minimalna plazemska koncentracija fibrinogena, ki je potrebna za hemostazo, znaša med 0,5 in 1 g/L. Fibrinogen je aktivno vključen v številne patofiziološke procese, npr. vnetje, aterogenezo, trombogenezno. Visoke koncentracije tega

koagulacijskega in provnetnega označevalca veljajo za neodvisni dejavnik koronarnega tveganja, tako pri navidezno zdravih posameznikih, kot pri bolnikih z že manifestno obliko ateroskleroze.

Fibrinogen je med drugim reaktant akutne faze vnetja, zato je značilno povišan pri akutnem srčnem infarktu in drugih vnetnih stanjih. V primerjavi s C-reaktivno beljakovino (angl. C-reactive protein, CRP) je bolj specifičen za vnetne spremembe na žilnih stenah, po mnenju nekaterih avtorjev pa tudi boljši napovednik tveganja za SŽB. Zvišano raven fibrinogena v plazmi pogosto izmerimo tudi ob prisotnosti večine klasičnih dejavnikov tveganja za SŽB, zato lahko raven plazemskih koncentracij delno modificiramo s spremenjenim načinom življenja. Obratno sorazmerje se kaže med vrednostjo fibrinogena in moškim spolom, pitjem alkohola in v povezavi s holesterolom HDL (30).

Vpetost fibrinogena v proces aterogeneze in trombogeneze je med drugim tesno povezana z lipidi in lipoproteini. Lipidni profil bolnika tako najverjetneje predstavlja enega ključnih dejavnikov, ki prispevajo k nestabilnosti aterosklerotične lehe. Znano je, da lahko lipidi in lipoproteini preko modulacije izraženosti (ekspresije) in/ali delovanja trombotičnih, fibrinolitičnih in reoloških dejavnikov vplivajo na hemostazo in potencialno tkivno okvaro na žilni steni. LDL delci pospešujejo aktivacijo trombocitov, ekspresijo tkivnega faktorja in so v korelaciji z vrednostmi od vitamina K odvisnih koagulacijskih faktorjev in fibrinogena. Na aktivnost fibrinolitičnega sistema vpliva tudi ravnotežje med tkivnimi aktivatorji plazminogena (angl. tissue type plasminogen activator, t-PA) in zaviralci aktivatorja plazminogena (angl. plasminogen activator inhibitors, PAI). Motenost tega ravovesja se lahko odraža v povečani nagnjenosti h krvavitvam ali v povečani nagnjenosti k strjevanju krvi. Povišane vrednosti PAI-1 se odražajo v motnjah fibrinolitičnega procesa, zmanjšani sintezi plazmina, akumulaciji fibrina, trombocitov, mineralov in maščob. PAI-1 se nahaja zlasti v visceralnem maščobnem tkivu, kar lahko med drugim povežemo tudi s hiperkoagulabilnostjo pri debelosti. Ne nazadnje je pojav krvnih strdkov eden pogostejših dejavnikov SŽB. Prav tako so povišane vrednosti PAI-1 in povečana viskoznost krvi v povezavi z lipoproteini, ki so bogati s trigliceridi (zlasti VLDL) (19, 31).

Fibrinogen in njegovi presnovki naj bi preko različnih mehanizmov prispevali k poškodbi in motenem delovanju (disfunkciji) žilnega endotelija. Destruktivna vloga fibrina, katerega prekursor na poti koagulacije je fibrinogen, se kaže vse od iniciacije procesa ateroskleroze,

preko nastanka in rasti aterosklerotične lehe. Tako sklepanje je mogoče na podlagi ugotovitev zvišanih plazemskih ravni fibrina v različnih stopnjah razvoja aterosklerotične lehe, zmanjšane fibrinolitične aktivnosti v intimi arterij in nižje koncentracije plazminogena pri SŽB. Predlagan je bil mehanizem, po katerem fibrin vzpodbuja proliferacijo, migracijo in adhezijo monocitov. Njegovi produkti v intimi pa naj bi vzpodbujali mitozo, sintezo kolagena, migracijo levkocitov, spremenili naj bi prepustnost (permeabilnost) endotelija in tonus žilne stene. V napreduvali aterosklerotični lehi naj bi fibrin pripomogel k vezavi LDL delcev in kopičenju (akumulaciji) lipidov (30).

1.4 Diagnostika ishemične bolezni srca

1.4.1 Kardiovaskularna funkcijska diagnostika

a.) ELEKTROKARDIOGRAFIJA (EKG)

- EKG v mirovanju

EKG v mirovanju je lahko pri kar 50 % bolnikov z obremenitveno angino pektoris normalen, lahko pa ugotavljamo najrazličnejše spremembe, zlasti v tistem obdobju prevajanja električnega impulza po miokardu, ki nastane v času depolarizacije (ST segment), lahko pa kaže tudi na morebiti predhodno preboleli srčni infarkt (zobci Q) (32).

- EKG med obremenitvenim testom (na kolesu ali tekočem traku)

Ko pride ob telesni obremenitvi zaradi zožitve koronarne arterije do pomanjkanja kisika v srčni mišici, se pojavijo simptomi bolečine in/ali dispneje, spremembe v EKG-ju in/ali hemodinamske spremembe (33).

b.) NEINVAZIVNE SLIKOVNE PREISKAVE

- EHOKARDIOGRAFIJA (ultrazvočna preiskava srca), SCINTIGRAFIJA (radioizotopsko slikanje srca), CTA (računalniška tomografska arteriografija) in MRA (angiografija s pomočjo magnetno resonančnega tomografa)

Z ehokardiografsko preiskavo lahko opredelimo mesto ishemije, njeno stopnjo, velikost tveganja ter prognostični pomen bolezni za bolnika. Tudi v tem primeru ishemijo izzovemo z določeno obremenitvijo (bodisi telesno ali z uporabo zdravila, npr. dobutamin). Podoben dražljaj uporabimo pri nuklearno medicinskih metodah, kjer uporabimo slikanje z gama kamero po vbrizganju določenega radioizotopskega označevalca. CTA omogoča poleg slikovnega prikaza prizadetosti koronarnih arterij tudi oceno njihove poapnelosti (z merjenjem vsebnosti kalcija v koronarnem žilju). Slikanje z magnetno resonanco zaenkrat še ni široko uporabljena metoda, saj je nekoliko manj zanesljiva metoda za prikaz koronarnih arterij. Vse širše uporabljane so tudi večrezinska računalniška tomografija z uporabo snopa elektronov (angl. electron beam computed tomography, EBCT), ter pozitronska emisijska tomografija (angl. pozitron emission tomography, PET) (34, 35).

c.) KATETERSKA KORONARNA ANGIOGRAFIJA (KA)

Predstavlja t.im. »zlati« standard v slikovni diagnostiki koronarne bolezni. Metoda omogoča natančen morfološki prikaz lumna koronarnih arterij, ima visoko prostorsko ločljivost in možnost takojšnjega nadaljevanja v interventni terapevtski poseg. Je invazivna tehnika, zato je odločitev zanjo pri stabilni angini pektoris odvisna od stopnje ogroženosti bolnika. Predstavlja metodo izbora v primerih akutnega koronarnega sindroma, kjer je potrebna predvsem čimprejšnja ponovna vzpostavitev zadostnega pretoka krvi po kritično zoženih ali zamašenih koronarnih arterijah (36).

1.4.2 Laboratorijska diagnostika

Laboratorijske preiskave pripomorejo k potrditvi diagnoze, oceni ogroženosti bolnika, usmerjajo k izbiri najustrežnejšega zdravljenja, ter služijo za ocenjevanje uspešnosti zdravljenja ali ugotavljanje morebitnih neželenih učinkov zdravljenja. Velik pomen imajo tudi v prepoznavanju drugih bolezenskih stanj, ki lahko povzročijo ali poslabšajo ishemično bolezen srca, oziroma vplivajo na dobavo in/ali porabo kisika v srčni mišici, npr. anemije, stanj s povečano viskoznostjo krvi (trombocitoza, levkemija, hipergamaglobulinemija), sladkorne bolezni, bolezni pljuč, sprememb v delovanju ščitnice, spremenjenega delovanja jeter itd. Obstajajo sheme laboratorijskih preiskav, ki se opravijo pred in po funkcijski diagnostiki in pred/med/po zdravljenju (19).

1.4.2.1 Diagnostika motene presnove maščob (hiperlipidemij)

Na osnovni ravni razpoznavanja določimo zgolj vsebnost celokupnega holesterola. Če je ta povišana, ali če je zaradi sočasno prisotnih drugih dejavnikov tveganja za aterosklerozo sicer povečana ogroženost za koronarno bolezen, določimo celotni lipidogram (37):

- vrednost celokupnega holesterola,
- koncentracijo holesterola HDL, ter
- celokupno koncentracijo trigliceridov.

Zaradi metodološke zahtevnosti in visoke cene neposrednega določanja vrednost holesterola LDL običajno v laboratorijih izračunajo s pomočjo Friedewaldove enačbe: $LDL = \text{cel. holesterol} - HDL - \text{trigliceridi}/2,2$. Se je pa potrebno zavedati, da je tovrstno izračunavanje zanesljivo le v območju vrednosti trigliceridov do 5,0 mmol/L.

1.4.2.2 Pomen zvišanih vrednosti koncentracij holesterola LDL oziroma znižanega holesterola HDL in priporočene (zaželjene) vrednosti lipidograma

Izmerjene vrednosti serumskih koncentracij holesterola in trigliceridov tako lahko kažejo na hiperholesterolemijo, hipertrigliceridemijo ali kombinirano hiperlipidemijo. Iz celotnega lipidograma pa je razvidna še (izračunana ali neposredno izmerjena) koncentracija holesterola LDL, ki ga v povezavi z nastankom in napredovanjem ateroskleroze poimenujemo »nevarni« holesterol. Holesterol LDL je namreč eden ključnih dejavnikov v procesu aterogeneze, katerega vrednosti so lahko povišane tudi pri številnih osebah brez simptomov te bolezni. Ugotovimo lahko znižano koncentracijo holesterola HDL, ki ga poimenujemo tudi »koristni« holesterol. V kolikor s spremenjenim načinom življenja ni mogoče doseči ciljnih vrednosti celokupnega holesterola ($\leq 5,0$ mmol/L) in holesterola LDL ($\leq 3,0$ mmol/L), je potrebno zdravljenje tudi pri posameznikih brez simptomov bolezni, saj smo zanje ugotovili, da jih zelo ogrožajo SŽB. Po priporočilih Evropskega kardiološkega združenja so ciljne vrednosti za zelo ogrožene bolnike z že znano (manifestno) koronarno boleznijo in bolnike s sladkorno boleznijo; $\leq 4,5$ mmol/L za celokupni holesterol, $\leq 2,5$ mmol/L za holesterol LDL, $\leq 1,7$ mmol/L za trigliceride, ≥ 1 mmol/L za holesterol HDL pri moških, ter $\geq 1,2$ mmol/L za holesterol HDL pri ženskah.

Tem ciljem se pridružujejo tudi Slovenske smernice za sekundarno preventivo po srčnem infarktu (38).

1.5 Terapija ishemične bolezni srca

V kolikor gre za kronično in stabilno stanje bolezni, na prvi stopnji terapevtskega pristopa bolnika seznanimo z zdravstvenim stanjem, sledijo navodila za spremembe življenjskega sloga, ter zdravljenje drugih dejavnikov tveganja in morebitne soobolevnosti, tj. sočasno prisotnih bolezni (tudi z zdravili). To velja tako za zdravljenje koronarne bolezni, kakor tudi za aterosklerotično prizadetost arterij na drugih lokalizacijah (vratne arterije, periferne arterije, zlasti spodnjih okončin). Če to ne zadostuje, preidemo na intervencijske kardiološke in/ali kirurške postopke.

Temeljna zdravila za zdravljenje ishemične bolezni srca so:

- protrombotična zdravila (acetilsalicilna kislina, klopidogrel, oralna antikoagulantna zdravila),
- zaviralci beta adrenergičnih receptorjev,
- zaviralci angiotenzinske konvertaze in/ali zaviralci angiotenzinskih receptorjev (zlasti v primeru okrnjenega delovanja levega prekata in/ali spremljajoče arterijske hipertenzije),
- statini in druga lipolitična zdravila,
- zaviralci kalcijevih kanalov,
- nitrati itd. (39, 40)

Osnovno intervencijsko kardiološko zdravljenje predstavlja dandanes perkutana balonska dilatacija koronarnih arterij (perkutana koronarna angioplastika), z ali brez sočasne vstavitve žilne opornice (stenta), ki jo uporabljamo zlasti v primerih akutnega koronarnega sindroma. Ekvivalent tovrstnega zdravljenja na perifernih arterijah je balonska dilatacija na teh mestih.

Med kirurška zdravljenja pri napredovali aterosklerozi različnih lokalizacij pa uvrščamo aortokoronarne obvodne operacije (angl. by-pass), operacije na zoženih (zamašenih)

vratnih (karotidnih) arterijah (endarterektomija), ter različne vrste obvodnih operacij zaradi zožitev oziroma zamašitev arterij spodnjih okončin (41).

1.5.1 Terapija dislipidemije

Za urejanje (zniževanje celokupnega holesterola LDL, oziroma zviševanje holesterola HDL) vrednosti lipidov v krvi se uporabljajo zdravila, ki jih uvrščamo v širšo skupino lipolitičnih zdravil. Namen tovrstnega zdravljenja je zlasti stabilizirati aterosklerotično leho. Izmed petih osnovnih vrst lipolitikov izberemo zdravilo glede na tip dislipidemije, stopnjo bolezni, spekter delovanja teh zdravil ter učinkov, ki jih izkazujejo poleg delovanja na lipidogram (pleiotropni učinki). V klinični praksi so najpogosteje zastopani statini in fibrati, vse bolj pa je v rabi tudi sodobno zdravilo za zaviranje absorpcije holesterola iz tankega črevesa, ezetimib, zlasti v primeru nezadostne učinkovitosti, odpornosti ali intolerance na statine.

- **Statini**

Statini zavirajo delovanje encima reduktaze 3-hidroksi-3-metil glutaril koencima A (HMG-CoA). Ta encim katalizira pretvorbo HMG-CoA v mevalonsko kislino. To je ena zgodnjih stopenj pretvorbe v sintezi holesterola, ki poteka v telesu. Ker je sinteza holesterola zmanjšana, se v jetrih in izvenjetrnih tkivih poveča število LDL receptorjev. Tako se zmanjša koncentracija holesterola LDL v krvi. Statini tudi zmanjšajo sintezo VLDL v jetrih, ter povečajo koncentracijo HDL, kar ima dodaten protiatrogeni učinek. Med pleiotropne učinke statinov sodi koristen učinek na obnavljanje motenega delovanja endotelijskih celic (zlasti prek spodbujanja sinteze dušikovega oksida in s tem izboljšanega delovanja endotelija), protivnetno delovanje (preko inhibicije izražanja adhezijskih molekul na površini endotelijskih celic zmanjšajo prisotnost vnetnih celic v intimi, in posredno zmanjšajo tudi koncentracijo CRP), zmanjšajo proliferacijo gladkomišičnih celic žilja, vplivajo na ravnovesje med protrombotičnimi in protitrombotičnimi dejavniki (antitrombotično delovanje), delujejo tudi imunomodulatorno. Statine je mogoče pri zdravljenju dislipidemij kombinirati z drugimi lipolitiki, danes najpogosteje z ezetimibom in fibrati, vendar pa je ob uporabi slednje kombinacije potrebna večja previdnost zaradi morebitnega pojavljanja neželenih stranskih učinkov (še posebej miopatij) (39).

- **Fibrati**

Fibrati so derivati fibrične kisline in delujejo preko aktivacije transkripcijskih faktorjev PPAR- α (angl. peroxisome proliferator-activated receptor alfa). Posledično povečajo aktivnost encima lipoproteinske lipaze. Zaradi pospešene encimske razgradnje trigliceridov, zmanjšane sinteze VLDL v jetrih in povečanega izločanja holesterola z žolčem se tudi v krvi zmanjša koncentracija lipoproteinov, ki so bogati s trigliceridi, poraste pa koncentracija holesterola HDL. Pleiotropni učinki fibratov so med drugim zaviranje sinteze fibrinogena in zmanjšanje agregacijske sposobnosti trombocitov, kar lahko dodatno vpliva na upočasnitev napredovanja ateroskleroze. Fibrati so indicirani, če so v krvi zvišani trigliceridi in/ali znižana frakcija holesterola HDL (25).

- **Niacin**

Niacin oziroma nikotinska kislina zmanjša privzem prostih maščobnih kislin in zavira sintezo trigliceridov preko selektivne inhibicije jetrnega encima, diacilglicerol acetyltransferaze-2. Nikotinska kislina uravnava zlasti vrednost holesterola HDL in trigliceridov, manj pa VLDL in LDL. V raziskavi HDL Atherosclerosis Treatment Study (40) se je kombinacija nikotinske kisline in simvastatina izkazala za zelo uporabno v smislu izboljšanja razmerja holesterola LDL/HDL, medtem ko je kombinacija nikotinske kisline in fibrata optimizirala zlasti koncentracijo holesterola HDL. Niacina trenutno v Sloveniji nimamo registriranega, slaba stran zdravljenja s tem zdravilom pa je pogosto pojavljanje neprijetnih, neželjenih stranskih učinkov zdravljenja (zlasti pogostega pojavljanja izrazite rdečice kože) (42, 43).

- **Izmenjevalci žolčnih kislin (smole)**

Polimerne smole oziroma izmenjevalci žolčnih kislin, npr. holestiramin, holestipol in holesevelam delujejo v prebavnem traktu, kjer vežejo nase žolčne kisline, oziroma jih izmenjajo s Cl^- ioni, in tako preprečujejo enterohepatično recirkulacijo žolčnih kislin. Povzročijo pomanjkanje holesterola v jetrih, kar skuša organizem kompenzirati s povečanim izražanjem LDL receptorjev na površini jetrnih celic. Slednje omogoča jetrom povečan privzem holesterola iz krvi z namenom povečane sinteze žolčnih kislin. Skupni učinek je znižanje koncentracije holesterola LDL, ne pa tudi znižanje trigliceridov in zvišanje HDL. Smole uporabimo predvsem v primeru hudih (predvsem dednih)

hiperholesterolemij, kjer zdravljenje s statini ne zadošča (v kombinaciji z njimi), ali pa jih bolnik ne prenaša, oziroma je nanje odporen. Slaba stran teh zdravil je sorazmerno pogosto pojavljanje neugodnih stranskih učinkov (zlasti simptomov s strani prebavil), kar omejuje sodelovanje bolnikov pri zdravljenju (40).

- **Ezetimib**

Ezetimib je predstavnik nove skupine lipolitičnih zdravil, ki selektivno zavirajo absorpcijo holesterola iz lumna tankega črevesa v enterocite. Poleg holesterola iz hrane (tudi rastlinskih fitosterolov) zmanjšuje še absorpcijo holesterola, ki je del enterohepatičnega ciklusa, in to v približno enakem deležu. Posledica zmanjšane absorpcije holesterola je znižanje koncentracije holesterola v krvi in večji privzem le-tega v jetra. Rezultati kliničnih raziskav kažejo na statistično značilno znižanje vrednosti celokupnega holesterola, holesterola LDL, apolipoproteina B, trigliceridov in malenkostno zvišanje vrednosti holesterola HDL. Učinki zdravljenja z ezetimibom, bodisi da ga uporabimo v obliki monoterapije ali kombiniranega zdravljenja s statini, se bistveno ne razlikujejo in pomembno izboljšajo lipidni profil bolnikov, ki so se predhodno, ne dovolj uspešno zdravili s statini. Zdravljenje z ezetimibom tako uporabljamo, če statini ne izkazujejo zadostnega učinka, ali pa so kontraindicirani (44).

1.5.2 Vpliv lipolitičnih zdravil na vrednosti fosfolipaze A₂

V skupino konvencionalnih zdravil, ki so se v mnogih študijah izkazala za modulatorje aktivnosti nekaterih fosfolipaz A₂, npr. Lp-PLA₂, sPLA₂, spadajo zlasti lipolitiki (fibrati, statini, ezetimib, omega-3 maščobne kisline, niacin) (45). To je eden od njihovih pleiotropnih učinkov, ki jih imajo poleg vpliva na lipidogram. Primerjava rezultatov različnih študij ne daje enotne slike o učinku teh zdravil na aktivnost fosfolipaze A₂. Statini in ezetimib običajno znižajo, fibrati pa zvišajo aktivnost fosfolipaze A₂ (46, 47). V skupini statinov je izjema pravastatin, ki praviloma zviša vrednosti encima. Ob zdravljenju s fibrati se zvišanje aktivnosti fosfolipaze A₂ nanaša na tisti delež encima, ki je vezan na HDL, medtem ko sta frakciji, vezani na VLDL in IDL, znižani.

Lp-PLA₂ in sPLA₂ sta encima, ki se vežeta na oksidirane lipoproteine in katalizirata hidrolizo estrske vezi glicerofosfolipidov. Njuna podobnost se kaže tudi v tem, da lipolitična zdravila podobno modulirajo njune plazemske vrednosti. V eni izmed študij, ki

je temeljila na ugotavljanju sprememb aktivnosti encima Lp-PLA₂ (46), so primerjali učinke pri bolnikih, zdravljenimi s statini in fibrati. Statini so statistično znižali celokupno vrednost Lp-PLA₂ za 25 %, fibrati pa zvišali vrednost Lp-PLA₂, povezano s HDL, za 26 %. To je v skladu z dejstvom, da fibrati običajno zvišajo vrednosti HDL in znižajo lipoproteine, bogate s trigliceridi, medtem ko znižajo ali zvišajo frakcijo LDL. V študiji so navedli še nekatere rezultate predhodnih študij, kjer so v času od enega do štirih mesecev zdravljenja s statini večinoma opazili znižanje vrednosti Lp-PLA₂, razen ob uporabi pravastatina (ene izmed učinkovin iz skupine statinov), kjer so se vrednosti encima po 30 dneh zdravljenja zvišale za 4 %.

Zmanjšanje plazemske aktivnosti Lp-PLA₂ so dosegli tudi z dajanjem ezetimiba (47). Ta je znižal vse LDL subfrakcije, podobno kot večina statinov (atorvastatin, lovastatin, simvastatin, fluvastatin). Ezetimib je bil uveden v terapijo zaradi intolerance na statine, saj ima podobne učinke na lipide. Kot se je v študiji pokazalo, so statini in ezetimib delovali na fosfolipazo podobno, čeprav ne gre za enako skupino lipolitičnih zdravil. Ob uporabi fibrata so opazili zmanjšanje aktivnosti fosfolipaze, ki je povezana z VLDL in IDL, ne pa tudi zmanjšanja tistih frakcij, ki so povezane s HDL in, ki predstavljajo 15 do 20 % Lp-PLA₂. Vrednosti teh so se povišale.

V drugi raziskavi so na podlagi vrednotenja parametrov imunskega odziva skušali ugotoviti vpliv lipolitičnega zdravljenja na vrednosti oksidiranih in encimsko moduliranih lipoproteinov pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom (48). Titre protiteles proti oksidiranim fosfolipidom (oxPL) in lizofosfatidilholinu (lyso-PC) so spremljali šest mesecev. Največji imunski odziv so ugotovili v prvem mesecu opazovanja, in to ne glede na to, ali so bili bolniki aktivno zdravljeni (z atorvastatinom-študijska skupina), ali pa so prejeli placebo (kontrolna skupina). Do podobnega imunskega odziva je prišlo tudi, če so na LDL delce vezali neaktivno fosfolipazo (in vitro). LDL delci, povezani z neaktivno Lp-PLA₂, so bili obogateni z oxPL, tisti, ki so bili povezani z aktivno Lp-PLA₂, pa z lyso-PC. Imunski odziv je bil v prvem mesecu intenzivnejši v kontrolni skupini. Mehanizem, po katerem statin zmanjša imunski odziv ni znan, nedvomno pa sta tako lyso-PC kot ox-PL pomembna označevalca pri stanjih akutnega koronarnega sindroma. Od prvega meseca naprej je bil imunski odziv pri študijski skupini enakomeren in šibak, v kontrolni skupini pa tudi bistveno manjši kot ob koncu prvega meseca. Krivulji titra protiteles sta v študijski in kontrolni skupini z neaktivno obliko Lp-PLA₂ po prvem mesecu ponovno naraščali,

vendar z manjšim naklonom, v skupinah z aktivno obliko vezane fosfolipaze pa sta rahlo upadali. Zakasneli imunski odziv je tako verjetno bolj povezan z oxLP, takojšnji pa z lyso-PL. Profil titra protiteles z aktivno obliko Lp-PLA₂ v kontrolni skupini verjetno kaže na izrazito manjšo aktivnost Lp-PLA₂ po treh mesecih in padeč te aktivnosti na raven, ki ga ima v tem času študijska skupina. Slednji se profil aktivnosti med prvim in šestim mesecem skoraj ne spremeni. Na tem mestu se kaže verjetna modifikacija fosfolipaze s statini.

2 Namen dela in cilji

Encimska modifikacija lipoproteinov v krvni plazmi in/ali v steni arterij lahko pomembno prispeva k aterogenezi. V ta proces je poleg drugih encimov vključena tudi sPLA₂. Produkti encimske hidrolize, ki jo katalizira sPLA₂, aktivirajo nadaljnje imunske in vnetne procese, ki so sestavni del patogeneze. Mnoge študije kažejo na povišane plazemske koncentracije in povečano aktivnost različnih tipov fosfolipaz A₂ (sPLA₂ tip IIA, V, X, Lp-PLA₂) pri bolnikih s SŽB, kot tudi pri navidezno še zdravih ljudeh, ki jih te bolezni že zelo ogrožajo. sPLA₂ je v teh raziskavah najpogosteje omenjena kot nov neodvisni potencialni vnetni označevalec v procesu ateroskleroze. Študije tudi nakazujejo, da lahko modifikacija tega dejavnika morda zmanjša ogroženost za SŽB in tako izboljša prognozo. Ker so se pri uporabi konvencionalnih lipolitičnih zdravil, kot so statini in fibrati, pokazali nekateri pleiotropni učinki, ki vplivajo tudi na vnetne označevalce, npr. fibrinogen, nas je zanimal še njihov vpliv na aktivnost sPLA₂, kar je tudi glavni namen diplomske naloge.

2.1 Cilji

1. Na vzorcu bolnikov z različnimi manifestnimi oblikami koronarne bolezni opredeliti vpliv klasičnih dejavnikov tveganja za SŽB ter vrednosti sPLA₂ v plazmi ob sprejemu. Za doseganje tega cilja smo opredelili naslednje metode:

- ugotavljanje porazdelitve nekaterih oblik koronarne bolezni in dejavnikov tveganja za SŽB na vzorcu 109 pacientov ob sprejemu, ter prikaz vrednosti naslednjih spremenljivk: celokupni holesterol, holesterol LDL, holesterol HDL, trigliceridi, fibrinogen, sPLA₂;
- ugotavljati vpliv dejavnikov tveganja na pojav koronarnih bolezni;
- primerjava aktivnosti sPLA₂ med študijskimi skupinami (z akutnim srčnim infarktom, stabilno angino pektoris, nestabilno angino pektoris in prezgodnjo koronarno boleznijo) in kontrolnimi skupinami;
- analiza skupine moških bolnikov glede na pojav prezgodnje koronarne bolezni in aktivnost sPLA₂ pred in po 55. letom starosti;

2. Ugotoviti vpliv lipolitičnega zdravljenja na aktivnost sPLA₂

- s primerjavo aktivnosti sPLA₂ znotraj posamezne skupine bolnikov glede na eksperimentalni načrt zdravljenja: pred in po trimesečni (0-3), devetmesečni (3-12) in dvanajstmesečni terapiji (0-12) s statini, fibrati in/ali kombinacijo obeh vrst lipolitičnega zdravljenja.

Glede na rezultate preliminarnih študij in na do sedaj znani mehanizem vnetnega procesa ateroskleroze, v katerega so med drugim vključeni lipoproteini in sPLA₂, je bil naš namen ugotoviti, ali tudi v obravnavani populaciji obstaja povezava med pojavom nekaterih oblik koronarne bolezni in povišanimi vrednostmi sPLA₂, in ali učinek uporabljenih lipolitičnih zdravil ne vpliva le na lipidni profil bolnikov, temveč tudi na spreminjanje vrednosti sPLA₂.

3 Materiali in metode

3.1 Biološki vzorci

V sodelovanju s Kliničnim oddelkom za žilne bolezni, Kliničnim oddelkom za kardiologijo ter Kliničnim inštitutom za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB) Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (UKCL), smo zbrali biološke vzorce 109 bolnikov s koronarno boleznijo, ki so se zdravili z lipolitičnimi zdravili. Vsakemu bolniku, ki je bil sprejet na oddelek, so poleg običajnih laboratorijskih preiskav (hemogram, diferencialna krvna slika, sedimentacija eritrocitov, hsCRP, elektroliti, krvni sladkor, urati, sečnina, kreatinin, lipidogram, fibrinogen) odvzeli še dve epruveti krvi, biološki material pa dostavili v Hormonski laboratorij KIKKB v Ljubljani. Vzorce plazme iz drugih centrov so scentrifugirali in jih začasno shranili pri temperaturi od -70 do največ -30 °C. Vsem bolnikom so odvzeli vzorce v roku 48 ur od sprejema.

Merjenja različnih parametrov so potekala ob sprejemu, po treh mesecih in po dvanajstih mesecih zdravljenja. Ob sprejemu smo pridobili še informacije o pojavnosti dejavnikov tveganja za bolezni srca in žilja pri pacientih, npr. kajenje, debelost, arterijska hipertenzija, hiperlipidemija, telesna neaktivnost, sladkorna bolezen, ter o drugih bolezenskih stanjih, npr. akutni miokardni infarkt, prezgodnja koronarna bolezen, stabilna/nestabilna angina pectoris. Pacientom so bile izmerjene vrednosti sistoličnega in diastoličnega krvnega tlaka, v krvi pa so nas zanimale plazemske koncentracije celokupnega holesterola, holesterola HDL, holesterola LDL, trigliceridov, fibrinogena in plazemska aktivnost sekretorne fosfolipaze A₂.

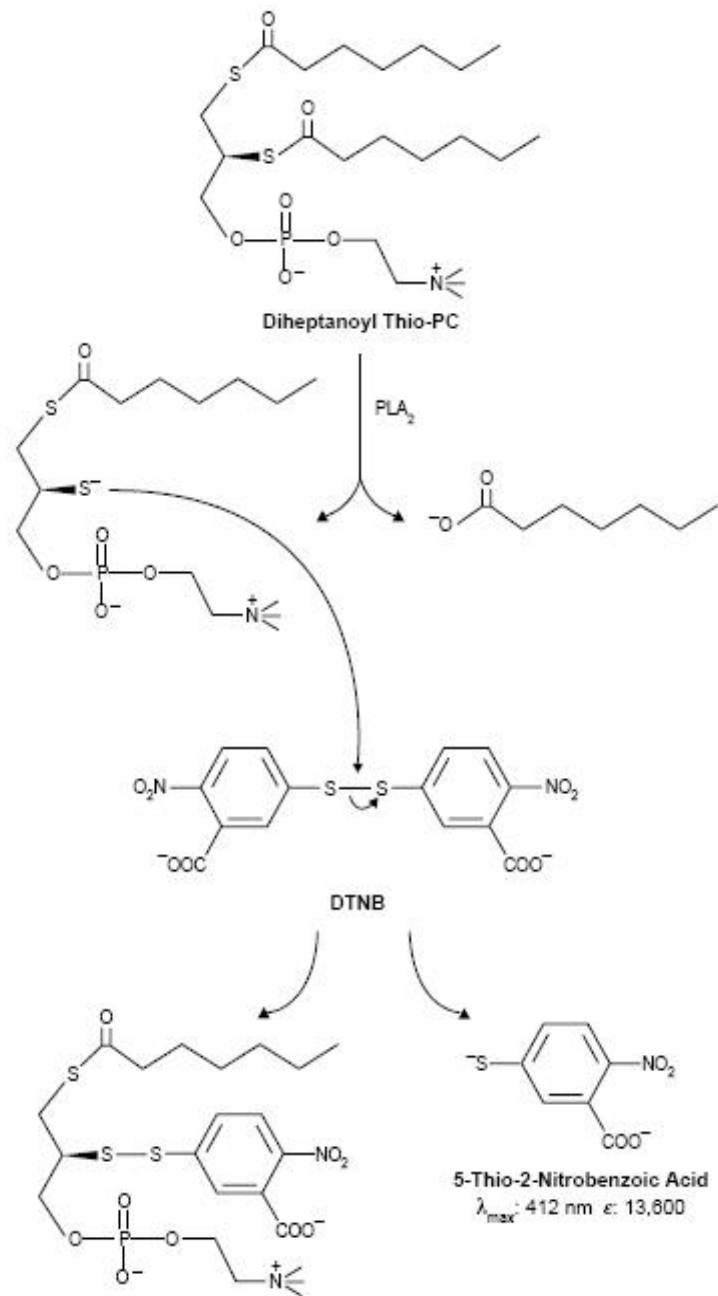
3.2 Metoda za določanje aktivnosti sPLA₂

Opisan je kolorimetrični test. Z njim lahko merimo aktivnost sekretorne fosfolipaze A₂ v plazmi, v sinovialni tekočini in v ostalem biološkem materialu. Test je po specifikacijah proizvajalca (IBL, Immuno - Biological Laboratories, Hamburg, Nemčija) ustrezna in natančna metoda za določanje aktivnosti sPLA₂ (49).

Shranjevanje in stabilnost: testni komplet ustreza specifikacijam, če je shranjen pri T= -20 °C, in ga uporabimo pred iztekom roka uporabnosti

- **Test**

Fosfolipaza A₂ (PLA₂) katalizira hidrolizo estrske vezi fosfolipidov v celični membrani. Hidroliza poteče na mestu dva (sn-2) v molekuli glicerofosfolipida, pri čemer se sprosti prosta maščobna kislina (arahidonska kislina) in lizofosfolipid. Sproščena arahidonska kislina je prekurzor za nadaljnjo sintezo eikozanoidov znotraj celice. Testni komplet omogoča natančno in praktično merjenje aktivnosti sekretorne fosfolipaze A₂ (sPLA₂). Pri testu uporabljamo 1, 2 - ditio analog diheptanoil - fosfatidilholina, ki je substrat za večino PLA₂, npr. v strupu čebele in kobre, pankreatična PLA₂, z izjemo citosolne PLA₂. Ob hidrolizi tioestrskve vezi na mestu dva (sn-2) se sprostijo tioli, ki jih detektiramo z uporabo DTNB (5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojska kislina)) (slika 2).



Slika 2. Hidroliza tioestrne vezi in detekcija z DTNB

- **Občutljivost metode**

Merilno območje je omejeno z natančnostjo merjenja absorbance. Večina čitalcev daje linearen odziv do absorbance 1,2. Območje detekcije pri tem testu je od 0,02 do 0,2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ aktivnosti sPLA₂, kar je ekvivalentno povišanju absorbance iz 0,01 na 0,1 v eni minuti.

- **Priprava reagentov**

Nekateri reagenti v testnem kompletu so v liofilizirani obliki, zato jih je potrebno pred uporabo rekonstituirati z uporabo predpisanih količin prečiščene vode in testnega pufra.

- **Predpis za pripravo reagentov**

1. Testni pufer - (steklenička #1): 3 ml koncentriranega testnega pufra raztopimo v 27 ml prečiščene vode.

2. DTNB – (steklenička # 2): eno od stekleničk rekonstituiramo z 1,0 ml prečiščene vode. Rekonstituiran reagent skladiščimo v ledu, zaščitena pred svetlobo, potrebno ga je uporabiti v osmih urah.

3. Substrat – (steklenička # 3): vsako stekleničko rekonstituiramo z 12 ml testnega pufra, da dobimo koncentracijo 1,66 mM. Raztopino substrata previdno stresamo, da postane bistra, kar je pomembno za merjenje absorbance. Če raztopina ni dovolj bistra, dobimo visoko absorbanco ozadja. Tsko pripravljen substrat, ki je shranjen pri 25 °C v testnem pufri, je stabilen najmanj dva dni.

4. PLA₂ čebeljega strupa (pozitivna kontrola) - (steklenička # 4): testni komplet vsebuje 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ raztopine PLA₂ čebeljega strupa. Da se izognemo večkratnemu zamrzovanju, lahko pripravimo alikvote te raztopine PLA₂ v nekaj stekleničkah. PLA₂ čebeljega strupa, ki je tako shranjena pri temperaturi -20°C, je stabilna nekaj mesecev. 10 μl encima pred uporabo prenesemo v drugo stekleničko in ga raztopimo z 990 μl testnega pufra. Uporabiti ga moramo v eni uri. 10 μl alikvot raztopine tega encima povzroči zvišanje absorbance za približno 0,1 enote/min pod standardnimi pogoji testiranja. Če želimo zmanjšati hitrost reakcije, lahko raztopino encima še naprej redčimo s testnim pufrom.

- **Priporočila k testiranju**

Test nima specifičnih predpisov o uporabi vzorcev, priporoča najmanj dva vzorca za neencimsko kontrolo. Absorbanco (v časovni enoti) teh dveh vzorcev moramo odšteti od absorbance (v časovni enoti) testnega vzorca. Priporočeno je tudi uporabiti najmanj dva vzorca za pozitivno kontrolo.

- **Priprava vzorca**

Praviloma lahko s tem testom določamo aktivnost vsakega vzorca sPLA₂, le da ne sme imeti primesi (nečistot), ki bi motile merjenje absorbance. Tirole, vezalce tiolov in inhibitorje PLA₂ moramo pred pričetkom izvedbe testa odstraniti, lahko z dializno metodo, ki odstrani večino motečih substanc majhne velikosti. Če so vzorci preveč razredčeni, jih lahko koncentriramo tako, da jih centrifugiramo preko ustreznega filtra (MM do 3000).

- **Izvedba testa**

- a.) **Slepi vzorec** (neencimska kontrola): dodamo 10 µl DTNB in 15 µl testnega pufra v najmanj dve vdolbinici na mikrotitrski ploščici (* če izvajamo študijo inhibicije, dodamo 5 µl DMSO in 10 µl testnega pufra namesto 15 µl testnega pufra)
- b.) **Pozitivna kontrola** (PLA₂ čebeljega strupa): dodamo 10 µl DTNB, 10 µl PLA₂ čebeljega strupa in 5 µl testnega pufra v najmanj dve vdolbinici mikrotitrške ploščice (* če izvajamo študijo inhibicije, dodamo 5 µl DMSO namesto 5 µl testnega pufra)
- c.) **Testni vzorec** : dodamo 10 µl DTNB, 10 µl vzorca in 5 µl testnega pufra v najmanj tri vdolbinice mikrotitrške ploščice (* če izvajamo študijo inhibicije, dodamo 5 µl inhibitorja, raztopljenega v DMSO , namesto 5 µl testnega pufra). Da bi dobili ponovljive rezultate, mora količina dodane PLA₂ povzročiti povišanje absorbance med 0,01 in 0,1/min. Da pride encimska aktivnost do te stopnje, lahko vzorec redčimo s testnim pufrom.

Iniciacija encimske reakcije: v vse vdolbinice na mikrotitrski ploščici dodamo 200 µl raztopine substrata. Pomembno je, da substrat nanašamo čim hitreje, in da čas nanosa tudi natančno zabeležimo. Nato ploščico previdno stresamo.

Po določenem času odčitamo absorbanco pri 414 (ali 405) nm, in to v petih časovnih točkah. Najmanj dve časovni točki sta potrebni za določitev encimske aktivnosti. Reakcija je linearna pri najmanj 1,2 enote absorbance.

* inhibitorji so lahko raztopljeni v dimetil-sulfoksidu (DMSO) in jih je potrebno dodati h končnemu volumnu (5 μ l)

▪ Izračuni

1. Določitev hitrosti reakcije:

a) Spremljamo absorbanco, kot funkcijo časa in merimo naklon linearnega dela krivulje.

b) Ali, če je bila absorbanca določena le pri dveh časovnih točkah, določimo spremembo absorbance med tema dvema časoma, z uporabo enačbe I:

Enačba I:

$$\Delta A_{414} = \frac{A_{414}(t2) - A_{414}(t1)}{t2(\text{min}) - t1(\text{min})}$$

2.) Določitev hitrosti reakcije ($\Delta A_{414} / \text{min}$) za neencimsko kontrolo (slepi vzorec): odštejemo hitrost slepega vzorca od hitrosti za testne vzorce

3.) Enačbo II uporabimo za izračun aktivnosti sPLA₂. Hitrost reakcije pri 414 nm lahko določimo z uporabo DTNB ekstinkcijskega koeficienta 10,66 mM⁻¹.** Ena enota encima hidrolizira en μ mol diheptanoil Tio-PC na minuto pri 25 °C.

Enačba II:

$$sPLA_2 \text{ aktivnost} = \frac{A_{414} / \text{min}}{10,66 \text{ mM}^{-1}} \times \frac{0,225 \text{ ml}}{0,01 \text{ ml}} \times (\text{redč. vzorca}) = (\mu\text{mol} / \text{min} / \text{ml})$$

** Ekstinkcijski koeficient za DTNB pri $\lambda = 414 \text{ nm}$ je $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ta vrednost je bila določena pri dolžini poti žarka ($0,784 \text{ cm}$). Ekstinkcijski koeficient za DTNB pri $\lambda = 405 \text{ nm}$ je $12,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Navadno je določena vrednost $10,0 \text{ mM}^{-1}$.

- **Interference**

Topila:

Na izrazito znižanje encimske aktivnosti ima vpliv dodatek etanola k vzorcu, nekoliko manjši vpliv ima metanol. Tudi DMSO (dimetilsulfoksid) vpliva na aktivnost.

Pufri in ostali medij:

Vsem pufrom in ostalemu mediju je potrebno pred začetkom testiranja izmeriti absorbanco ozadja. Če je začetna absorbanca ozadja večja od 0,2 enote absorbance, vzorce redčimo s testnim pufrom ali z vodo (pred začetkom izvajanja testa). Tris, HEPES in fosfatni pufer (25 mM) se lahko uporabljajo v testu, imidazolni pufer pa ima visoko absorbanco ozadja.

Tioli in vezalci tiolov:

Vzorci, ki vsebujejo tirole (npr. glutation, cistein, ditioneitol, 2-merkaptometanol itd.) imajo visoko absorbanco ozadja in vplivajo na aktivnost PLA₂. N-etil-maleimid (vezalec tiolov) prepreči obarvanje. Z dializo lahko eliminiramo večino motečih substanc majhne molekulske mase.

3.3 Metode za določanje holesterola

a.) Celokupni holesterol

- Encimska CHOD-PAP (angl. Chol. Oxidase Phenol 4-aminoantipyrine Peroxidase) metoda

Pod vplivom holesterolne esteraze holesterolni estri hidrolizirajo do prostega holesterola. Sledi oksidacija holesterola do holest-4-en-3-ona z encimom holesterol oksidazo. Nastane vodikov peroksid, ki reagira pod vplivom peroksidaze z 4-aminoantipirinom in fenolom, da nastane kinoniminsko barvilo. Absorbanco končnega produkta reakcije merimo pri valovni dolžini 505 nm . Intenziteta barve je premosorazmerna koncentraciji holesterola v vzorcu.

b.) HDL

- Homogeni encimski kolorimetrični test

Reagent 1, magnezijev sulfat, dekstran sulfat tvorita vodotopne komplekse z LDL, VLDL in hilomikroni, ki so odporni na PEG (polietilenglikol) modificirane encime.

Ob dodatku reagenta 2 (PEG-modificirani encimi, PAP, HSDA (barvilo), pufer) poteče reakcija med holesterolom HDL in komponentami v reagentu.

Absorbanco končnega produkta reakcije merimo pri valovni dolžini 600 nm, intenziteta barve je premosorazmerna koncentraciji holesterola HDL v vzorcu.

c.) LDL

- Indirektna (računska) metoda

Uporabljamo jo v primeru, ko je koncentracija trigliceridov pod 4,5 mmol/L, vzorec ni moten. Holesterol LDL izračunamo po Friedewaldovi formuli.

- Direktna metoda (homogeni encimski kolorimetrični test)

Z detergentom (reagent 1) solubiliziramo vse lipoproteine, razen LDL. Holesterol, ki se sprosti iz HDL, VLDL in hilomikronov, se pod vplivom holesterol esteraze in holesterol oksidaze spremeni v neaktiven, brezbarven produkt.

Po dodatku reagenta 2, ki vsebuje drug detergent, se raztopijo LDL lipoproteini, sprosti se delež holesterola LDL. Sledi reakcija holesterola z encimoma holesterol esteraza in holesterol oksidaza v prisotnosti kromogena. Absorbanco končnega produkta reakcije merimo pri valovni dolžini 600 nm, intenziteta barve je premosorazmerna koncentraciji holesterola v vzorcu.

d.) Trigliceridi

- Encimska GPO-PAP (angl. Glycerol-3-Phosphate oxidase) metoda

Encim lipaza razgradi trigliceride do glicerola in maščobnih kislin. Glicerol nato reagira z ATP do glicerol-3-fosfata, reakcijo katalizira encim glicerol kinaza. Glicerol-3-fosfat se

oksidira pod vplivom glicerol fosfat oksidaze do dihidroksiacetonfosfata. Pri tej oksidaciji nastane tudi vodikov peroksid, ki s 4-aminoantipirinom in 4-klorofenolom reagira do kinonimina, reakcijo katalizira peroksidaza. Absorbanco končnega produkta reakcije merimo pri valovni dolžini 520 nm, intenziteta barve je premosorazmerna koncentraciji trigliceridov v vzorcu.

3.4 Metoda za določanje fibrinogena (von Clauss)

Koncentracija fibrinogena v krvni plazmi je bila določena z modificirano Claussovo metodo (50). Po dodatku trombina v vzorec razredčene citrirane plazme prisoten fibrinogen pretvorimo v fibrin, ta pa polimerizira v fibrinsko mrežo. Po določenem času nastane vidni strdek, ki ga zaznamo z absorpcijsko metodo. Čas (v sekundah), ki je potreben od dodatka trombina do tvorbe vidnega strdka, je obratno sorazmeren koncentraciji fibrinogena. Z uporabo standarda (z znano koncentracijo fibrinogena) naredimo umeritveno premico, s pomočjo katere določimo koncentracijo fibrinogena v vzorcu.

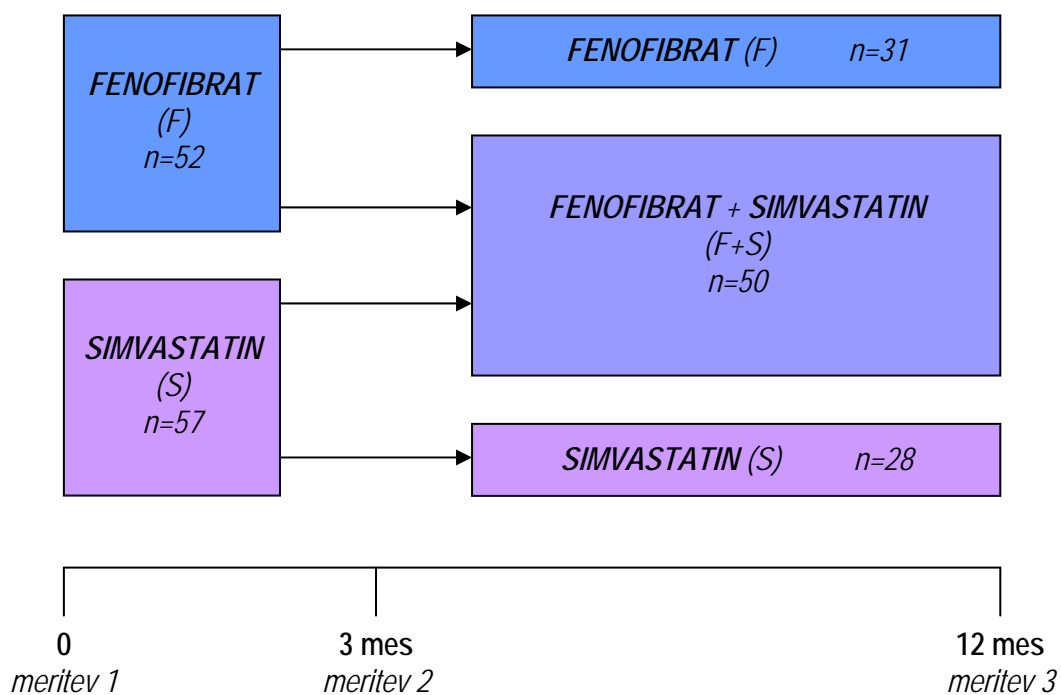
4 Opis skupine

Z dovoljenjem Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko in pisnim soglasjem vključenih bolnikov so bili zbrani vzorci krvi v celoti 146 bolnikov, hospitaliziranih zaradi ishemične bolezni srca in zdravljenih z lipolitičnimi zdravili. Na bolniške oddelke sodelujočih ustanov so bili sprejeti med letoma 2001 in 2004, ter vključeni v raziskavo o ugotavljanju učinka lipolitičnega zdravljenja na vrednosti fibrinogena pri bolnikih z ishemično boleznijo srca (študija FILIPO). Od teh je imelo nepopolne podatke 6 bolnikov. Upoštevajoč izključitvene kriterije smo v skupino zajeli 109 bolnikov, starih med 37 in 80 let in so obravnavani v diplomski nalogi. Med njimi je bilo 19 žensk in 90 moških. Ne glede na vrednosti krvnih lipidov so bili pacienti ob vključitvi razporejeni v dve skupini. Prve tri mesece terapije so bolniki iz ene skupine prejeli fibrat (fenofibrat, preparat Katalip®), teh je bilo 52, od tega 44 moških in 8 žensk. V drugi skupini pa so prejeli statin (simvastatin, preparat Sinvacor®), bilo jih je 57; 46 moških in 11 žensk. Povprečna starost bolnikov je bila v obeh skupinah približno enaka; $59,35 \pm 9,98$ let v skupini s fibrati in $59,82 \pm 10,73$ let v skupini s statini. Poleg vključitvene obravnave so bili pregledani še dvakrat; po treh mesecih in po dvanajstih mesecih zdravljenja (slika 3). Po treh mesecih se je vsaka skupina razdelila še na dve novi, tako da so bila vpeljana štiri različna zdravljenja. V prvi skupini, kjer so pacienti že prejeli statine, so z njimi tudi nadaljevali naslednjih devet mesecev. V drugi skupini je bilo podobno, le da so ves čas zdravljenja prejeli fibrate. Pri tretji skupini so bili po treh mesecih zdravljenja s statini v terapevtsko shemo dodani še fibrati, pri četrti skupini pa smo fibratom dodali še statine. Povprečna starost v posameznih skupinah je bila od 56,17 do 63,61 let.

IZKLJUČITVENI KRITERIJI:

1. jemanje antilipemikov v enem mesecu pred sprejemom v bolnišnico
2. znane absolutne kontraindikacije za zdravljenje s statini ali fibrati
3. preobčutljivost na statine ali fibrate
4. klinično in laboratorijsko izraženi znaki sistemskega vnetja
5. srčno popuščanje – funkcijski razred III-IV po NYHA klasifikaciji

6. skupni holesterol > 8.0 mmol/L ali < 3.5 mmol/L; trigliceridi > 4.6 mmol/L
7. klinično manifesten hipotiroidizem
8. znana mišična oziroma živčnomišična bolezen
9. bolezen prebavil, ki bi lahko imela za posledico zmanjšano absorpcijo zdravila
10. zdravila: kortikosteroidi, eritromicin, androgeni, imunosupresivi
11. serumski kreatinin > 170 $\mu\text{mol/L}$, CK $> 3x$ nad zgornjo mejo normalnega območja, AST in ALT $> 1,5x$ nad zgornjo mejo normalnega območja



Slika 3. Eksperimentalni načrt zdravljenja

5 Uporabljena statistična metodologija

Statistični testi

Po predprocesiranju podatkov smo za izračun statističnih testov uporabili statistični programski paket SPSS (angl. The Statistical Package for the Social Sciences) (51, 52). Posamezni test smo izbrali glede na vrsto spremenljivke (numerična ali diskretna), velikost vzorca oziroma frekvenco vrednosti in glede na porazdelitev numerične spremenljivke.

- ***Kolmogorov - Smirnov test normalnosti porazdelitve***

Za ugotavljanje porazdelitve numerične spremenljivke v vzorcu smo uporabili Kolmogorov-Smirnov test normalnosti porazdelitve v SPSS. Izračun tega testa z vrednostjo (p), ki je statistična značilnost testa, nam pove, ali se vrednosti porazdeljujejo normalno. Normalno porazdelitev vrednosti imamo, če se največ vrednosti nahaja v bližini povprečne vrednosti. Grafični prikaz normalne (Gaussove) porazdelitve je v obliki simetrične, zvonaste krivulje. Obstaja območje oziroma simetrični interval ($\pm \sigma$), znotraj katerega je prisoten določen delež populacije. Kadar je vrednost $p > 0,05$ pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$, je porazdelitev normalna. Na osnovi tega smo se odločali o uporabi nadaljnjih testov (52, 53).

- ***T-test za primerjanje neodvisnih vzorcev in Mann-Whitney test***

Če ima numerična spremenljivka normalno porazdelitev in če so podatki med seboj neodvisni, potem lahko za statistični izračun izberemo t-test za neodvisna vzorca. Ta test primerja aritmetični sredini vrednosti med dvema vzorcema. Statistično značilnost dobimo, če je razlika aritmetičnih sredin dovolj velika. K opisnima spremenljivkama izberemo poljubno numerično spremenljivko.

Mann-Whitney test je neparametrični test, ki ima manjšo znanstveno veljavo, zaradi manjših vzorcev, katerih vrednosti se ne porazdeljujejo normalno. Ta test uredi posamezne vrednosti po vrstnem redu, od najmanjše do največje. Če vrstni red ni simetričen, dobimo statistično značilnost. Tudi ta test je uporaben je za primerjavo neodvisnih vzorcev (51, 54).

- ***T-test za primerjanje odvisnih vzorcev in Wilcoxonov test predznačenih rangov***

Kadar imamo odvisne vzorce, uporabimo t-test za dva odvisna vzorca (če so se vrednosti numeričnih spremenljivk porazdeljevale normalno), oziroma Wilcoxonov test predznačenih rangov (za primerjavo odvisnih vzorcev, katerih vrednosti se niso porazdeljevale normalno) (52, 53).

Podajanje rezultatov

V različnih študijah različno podajajo rezultate. Rezultati v diplomskem delu so podani s povprečno vrednostjo in standardno deviacijo (\pm SD), frekvence vrednosti diskretnih spremenljivk pa v odstotkih. V vseh razporednicah pomeni oznaka N število sodelujočih v raziskavi.

6 Rezultati

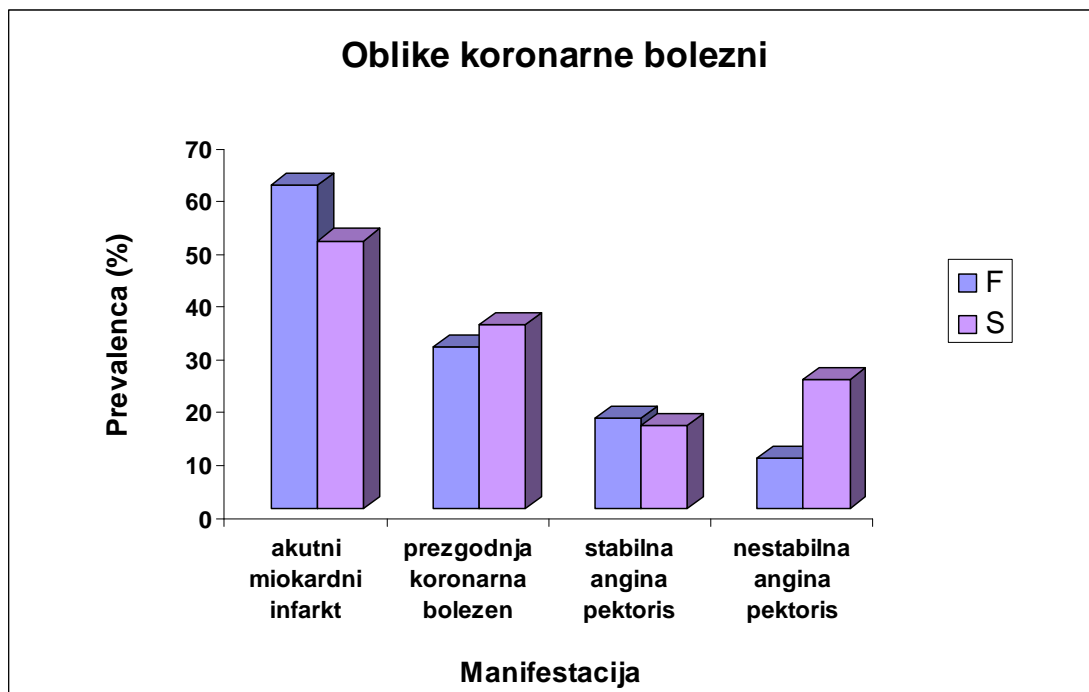
6.1 Porazdelitev nekaterih manifestnih oblik koronarne bolezni in klasičnih dejavnikov tveganja bolezni srca in žilja

V diplomski nalogi smo na vzorcu 109 bolnikov najprej ugotavljali porazdelitev posameznih oblik koronarne bolezni in klasičnih dejavnikov tveganja SŽB. Glede na eksperimentalni načrt zdravljenja (slika 3) smo pri tem obravnavali dve skupini bolnikov. Prva skupina je prve tri mesece prejela statin (simvastatin/S), v njej je bilo 57 bolnikov (11 žensk in 46 moških). Bolniki iz druge skupine pa so v prvem trimesečju prejeli fibrat (fenofibrat/F), bilo jih je 52 (8 žensk in 44 moških). Bolniki so bili v skupini porazdeljeni naključno. Skupini smo predstavili s pomočjo opisne statistike.

Z opisno statistiko (deskriptivno statistiko) in ustrezno statistično funkcijo smo pridobili osnovni spekter statistike. Pri diskretnih spremenljivkah smo navajali frekvenco (število posameznih vrednosti in deleže v vzorcu), pri numeričnih spremenljivkah pa povprečno vrednost in standardno deviacijo (\pm SD). V preglednici 2 so podane frekvence (n/število) diskretnih spremenljivk in deleži (%) le-teh znotraj skupin, ki sta se v prvem trimesečju zdravili s simvastatinom oziroma fenofibratom. Slika 4 prikazuje porazdelitev nekaterih oblik koronarne bolezni (KB), slika 5 pa porazdelitev nekaterih klasičnih dejavnikov tveganja za bolezni srca in žilja v omenjenih skupinah pacientov.

Preglednica 2 : Nekatero oblike koronarne bolezni in dejavniki tveganja za bolezni srca in žilja

t=0	F	S
n (skupno število preiskovancev)	52	57
Moški, n	44	46
Ženske, n	8	11
Starost (povpr. starost ± SD)	59,35 ± 9,98	59,82 ± 10,73
Akutni miokardni infarkt, n (%)	32 (61,5)	29 (50,9)
Stabilna angina pektoris, n (%)	9 (17,3)	9 (15,8)
Nestabilna angina pektoris, n (%)	5 (9,6)	14 (24,6)
Prezgodnja koronarna bolezen, n (%)	16 (30,8)	20 (35,1)
Hiperlipidemija, n (%)	40 (76,9)	51 (89,5)
Sladkorna bolezen, n (%)	9 (17,3)	7 (12,3)
Kadilci, n (%)	20 (38,5)	16 (28,1)
Nekdanji kadilci, n (%)	12 (23,1)	14 (24,6)
Hipertenzija, n (%)	25 (48,1)	23 (40,4)
Telesna neaktivnost, n (%)	12 (23,1)	9 (15,8)
Debelost, n (%)	6 (11,5)	4 (7,0)



Slika 4: Prevalenca posameznih oblik koronarne bolezni v skupinah, v katerih so bolniki prejeli bodisi fenofibrat (F) bodisi simvastatin (S).

Glede na pojavnost oblik koronarne bolezni je imelo največ bolnikov akutni miokardni infarkt (61,5% F in 50,9% S), manj jih je imelo prezgodnjo koronarno bolezen (30,8% F in 35,1% S). Približno enaka sta bila deleža bolnikov s stabilno angino pektoris in sladkorno boleznijo, ki je pomemben dejavnik tveganja za koronarno bolezen. Do večjih razlik med skupinama je prišlo v primeru nestabilne angine pektoris (9,6% F in 24,6% S), kar je lahko posledica naključno izbranega vzorca. Pri sorazmerno velikem deležu vključenih bolnikov smo ugotovili prezgodnjo koronarno bolezen (30,8% F in 35,1% S).



Slika 5: Prevalenca klasičnih dejavnikov tveganja bolezni srca in žilja pri bolnikih, ki so na začetku zdravljenja prejeli bodisi fenofibrat (F) bodisi simvastatin (S)

Izmed klasičnih dejavnikov tveganja je imel ob sprejemu na bolnišnični oddelek največji delež bolnikov v obeh skupinah izraženo hiperlipidemijo (76,9% F in 89,5% S).

Pri sorazmerno velikem deležu v raziskavo vključenih bolnikov je bila izražena arterijska hipertenzija (48,1% F in 40,4% S). Manj pogosto so bili izmed dejavnikov tveganja prisotni kajenje, telesna neaktivnost in sladkorna bolezen. V obeh skupinah je bilo izmed

vseh dejavnikov tveganja najmanj izražene debelosti (opredeljena kot ITM > 30 kg/m²) (11,5% F in 7,0% S).

6.2 Primerjava aktivnosti sPLA₂ med študijsko in kontrolno skupino

Preglednica 3 prikazuje vrednosti (p) statističnih testov za neodvisne vzorce, kjer smo primerjali študijsko in kontrolno skupino. Uporabili smo t-test za primerjanje neodvisnih vzorcev in Mann-Whitneyev test. Študijska skupina so bolniki, ki so imeli ob sprejemu v anamnezi eno izmed manifestnih oblik KB: akutni miokardni infarkt (AMI), stabilno angino pektoris (stab. AP), ali nestabilno angino pektoris (nestab. AP). Kontrolno skupino predstavljajo bolniki, ki v anamnezi niso imeli manifestne oblike koronarne bolezni. Vsi bolniki, iz študijske in kontrolne skupine, pa so imeli napredovalo koronarno bolezen. Rezultati testov so pokazali, da med študijsko in kontrolno skupino ob sprejemu ni bilo statistično značilnih razlik ($p > 0,05$).

Preglednica 3: Primerjava aktivnosti sPLA₂ med študijsko in kontrolno skupino

t-test, * Mann-Whitney test	št. bolnikov	povpr. vrednost sPLA ₂	SD	p
kontrolna skupina	7	7,75	2,28	
stab.AP	10	7,99	3,11	0,860
nestab.AP	10	/	/	*0,732
AMI	41	6,72	1,45	0,121

6.3 Prezgodnja koronarna bolezen in aktivnost sPLA₂ pri moških, mlajših in starejših od 55 let

Primerjali smo skupine moških glede na pojav prezgodnje koronarne bolezni (KB) in aktivnost sPLA₂ pred in po 55. letu starosti. Vrednosti sPLA₂ znotraj posameznih obravnavanih skupin so se povsod porazdeljevale normalno, zato smo izbrali t-test za primerjavo neodvisnih vzorcev (preglednica 4).

Preglednica 4: Primerjava skupin moških s prezgodnjo KB ali brez nje, mlajših in starejših od 55 let, glede na aktivnost sPLA₂

Starost / prezg. KB	N	Povpr. vrednost sPLA ₂	SD	p
>55 let/z	7	5,45	1,49	0,004
<55 let/z	13	7,88	1,64	
Prezgodnja KB				
>55 let/brez	25	7,59	2,02	0,014
>55 let/z	7	5,45	1,49	
Prezgodnja KB in brez KB				
>55 let/z	7	5,45	1,49	0,044
<55 let/brez	13	7,15	1,77	
Prezgodnja KB in brez KB, brez zdravil				
<55let/ brez	13	7,15	1,77	0,285
<55 let/z	13	7,88	1,64	
Prezgodnja KB in brez KB, s zdravili				
>55 let/ brez	25	7,59	2,02	0,512
<55 let/brez	13	7,15	1,77	
Prezgodnja KB in brez KB, brez zdravil in s zdravili				
>55 let/brez	25	7,59	2,02	0,657
<55 let/z	13	7,88	1,64	

6.4 Vpliv lipolitičnih zdravil na aktivnost sPLA₂

Najprej smo ugotavljali statistično značilne razlike med vsemi štirimi skupinami pacientov znotraj eksperimentalnega načrta terapije (zdravljenje s simvastatinom oziroma fenofibratom ter s kombinacijo obeh, bodisi tako da smo v zdravljenje po prvih treh mesecih k fenofibratu dodali simvastatin bodisi obratno), glede na vrednost sPLA₂. Primerjali smo izmerjene vrednosti ob treh različnih časih (pregledica 5):

A. ob vključitvi v raziskavo, pred zdravljenjem (t=0),

B. po treh mesecih zdravljenja, bodisi s fenofibratom ali simvastatinom (t=3 meseci),

C. po skupno 12 mesecih zdravljenja ($t=12$ mesecev), ko so bili bolniki zdravljeni bodisi ves čas trajanja raziskave z monoterapijo (s fenofibratom ali simvastatinom), ali pa v obdobju devetih mesecev (med drugim in tretjim obiskom) s kombinacijo fenofibrata in simvastatina.

Preglednica 5: Primerjava med skupinami pacientov (p), ki so se 12 mesecev zdravili po eksperimentalnem načrtu

Mesec	F+S/S+F	S/S+F	S/F+S	F/S+F	F/F+S	S/F
0	0,423	* 0,103	* 0,160	* 0,202	* 0,304	* 0,862
3	0,49	0,832	0,283	* 0,627	* 0,691	* 0,835
12	0,469	0,329	0,795	0,682	0,336	0,257

Ugotovili smo, da med vrednostmi $sPLA_2$ ni bilo statistično značilnih razlik, tako smo izhajali iz podobnih vzorcev. Uporabili smo t-test za primerjanje neodvisnih vzorcev in Mann-Whitneyev test (*).

V preglednicah 6 in 7 so podane povprečne vrednosti in standardna deviacija ($\pm SD$) numeričnih spremenljivk v različnih skupinah v raziskavo vključenih bolnikov.

Preglednica 6: Povprečna vrednost in standardna deviacija (\pm SD) vrednosti spremenljivk ob treh meritvah v skupinah, v katerih so bolniki prejeli lipolitično zdravilo v obliki monoterapije (F - fenofibrat, S - simvastatin)

Zdravilo	F	F	F	S	S	S
Čas (mesec)	t=0	t=3	t=12	t=0	t=3	t=12
n (skupno št.)	31	31	31	28	28	28
Moški, n	26	26	26	23	23	23
Ženske, n	5	5	5	5	5	5
Starost, leta	61,19 \pm 10,18			63,61 \pm 10,39		
KT sist., mmHg	125,00 \pm 22,14	131,91 \pm 18,63	130,91 \pm 14,95	135,00 \pm 24,96	141,50 \pm 24,39	140,55 \pm 15,63
KT diast., mmHg	78,18 \pm 15,21	82,64 \pm 11,33	77,36 \pm 11,31	83,75 \pm 16,11	83,33 \pm 10,52	83,09 \pm 8,57
Fibrinogen	5,23 \pm 1,51	3,40 \pm 0,93	3,15 \pm 0,84	4,63 \pm 1,29	3,52 \pm 1,17	3,36 \pm 0,79
ITM, kg/m ²	27,44 \pm 3,10	26,94 \pm 2,75	27,16 \pm 2,85	26,84 \pm 3,81	26,29 \pm 3,02	26,26 \pm 2,71
sk. hol. mmol/l	5,75 \pm 1,04	5,45 \pm 1,07	5,28 \pm 0,78	5,81 \pm 0,95	4,79 \pm 0,85	4,70 \pm 0,71
LDL mmol/l	3,81 \pm 0,89	3,50 \pm 0,85	3,45 \pm 0,72	3,85 \pm 0,82	2,78 \pm 0,64	2,81 \pm 0,50
HDL mmol/l	1,16 \pm 0,28	1,28 \pm 0,35	1,26 \pm 0,27	1,20 \pm 0,27	1,28 \pm 0,27	1,23 \pm 0,30
Trigliceridi, mmol/l	1,78 \pm 0,84	1,53 \pm 0,95	1,30 \pm 0,66	1,61 \pm 0,92	1,59 \pm 0,82	1,53 \pm 0,68
sPLA ₂ , nmol/min/ml	7,92 \pm 2,48	10,33 \pm 7,45	8,96 \pm 2,40	8,14 \pm 3,33	8,50 \pm 2,03	8,10 \pm 1,77

Preglednica 7: Povprečna vrednost in standardna deviacija (\pm SD) vrednosti spremenljivk ob treh meritvah v skupinah, v katerih so bolniki prejeli lipolitična zdravila v kombinaciji (F – fenofibrat, S – simvastatin)

zdravilo	S+F	S+F	S+F	F+S	F+S	F+S
čas (mesec)	t=0	t=3	t=12	t=0	t=3	t=12
n (skupno št.)	29	29	29	21	21	21
Moški, n	23	23	23	18	18	18
Ženske, n	6	6	6	3	3	3
Starost, leta	56,17 \pm 9,90			56,62 \pm 9,26		
KT sist., mmHg	137,07 \pm 21,93	139,64 \pm 18,43	132,50 \pm 13,40	131,25 \pm 11,70	131,92 \pm 16,05	132,08 \pm 11,77
KT diast., mmHg	85,71 \pm 13,99	86,71 \pm 10,10	80,29 \pm 10,86	81,25 \pm 8,29	84,33 \pm 14,91	78,33 \pm 9,20
Fibrinogen, g/l	4,03 \pm 1,08	3,36 \pm 1,06	2,97 \pm 0,82	5,39 \pm 1,10	3,73 \pm 0,93	3,62 \pm 0,69
ITM, kg/m ²	26,95 \pm 2,88	26,73 \pm 3,10	26,50 \pm 2,81	27,76 \pm 2,82	27,66 \pm 2,52	28,22 \pm 2,80
sk. hol. mmol/l	6,12 \pm 1,09	3,36 \pm 1,06	2,97 \pm 0,82	5,86 \pm 1,04	5,38 \pm 0,83	4,76 \pm 0,70
LDL mmol/l	3,99 \pm 1,15	2,82 \pm 0,72	3,78 \pm 4,02	4,00 \pm 0,82	3,53 \pm 0,71	3,05 \pm 0,51
HDL mmol/l	1,37 \pm 0,64	1,27 \pm 0,35	1,29 \pm 0,33	1,11 \pm 0,27	1,17 \pm 0,18	1,20 \pm 0,22
Trigliceridi, mmol/l	1,84 \pm 0,94	1,61 \pm 0,76	1,38 \pm 0,75	1,69 \pm 0,94	1,74 \pm 0,72	1,26 \pm 0,73
sPLA ₂ , nmol/min/ml	6,43 \pm 1,79	8,33 \pm 2,65	8,64 \pm 1,36	6,84 \pm 1,09	7,84 \pm 1,19	8,26 \pm 1,66

* S: pacienti so se 12 mesecev zdravili s statini (simvastatinom)

* F: pacienti so se 12 mesecev zdravili s fibrati (fenofibratom)

* S+F: pacienti so se prve tri mesece zdravili s statini, nato pa so prejeli kombinacijo statina in fibrata

* F+S: pacienti so se prve tri mesece zdravili s fibrati, nato pa so prejeli kombinacijo statina in fibrata

Nato smo med seboj primerjali odvisne vzorce v vsaki izmed štirih terapevtsko obravnavanih skupin pacientov (S, F, S+F, F+S): pred in po trimesečni terapiji, pred in po dvanajstmesečni terapiji ter med tretjim in dvanajstim mesecem terapije, čeprav sta se skupini S in F šele po treh mesecih razdelili, vsaka na dve novi. S tem smo mogli bolje opazovati dvanajstmesečno dogajanje znotraj vsake skupine.

V skupini, ki se je 12 mesecev zdravila s simvastatinom, smo primerjali aktivnost sPLA₂ med posameznimi meritvami. Ob primerjavi vrednosti sPLA₂ pred začetkom terapije in po treh, oziroma po dvanajstih mesecih zdravljenja, nismo ugotovili statistično značilnih razlik znotraj te skupine. Pokazalo se je, da sta imeli dve tretjini bolnikov po treh mesecih višjo vrednost sPLA₂ kakor pred začetkom zdravljenja. Tudi v obdobju med 3. in 12. mesecem zdravljenja se skupini nista statistično značilno razlikovali. V tej skupini smo po treh mesecih v celoti opazili višjo povprečno vrednost sPLA₂ (za 4,4%) v primerjavi s tisto po dvanajstih mesecih (t-test).

V skupini, ki se je 12 mesecev zdravila s fibrati (preglednica 8) smo ugotovili statistično značilno razliko v aktivnosti sPLA₂ le med odvisnima vzorcema, pred in po dvanajstmesečni terapiji (p=0,035). Wilcoxonov test predznačenih rangov je pokazal, podobno kot pri statinih, da so bile vrednosti sPLA₂ pred začetkom terapije večinoma nižje od tistih, po 3. oziroma po 12. mesecu zdravljenja. Obratno je bilo le med tretjim in dvanajstim mesecem, le da pri tem ni šlo za statistično značilno razliko.

Preglednica 8: Primerjava aktivnosti s PLA₂ v skupini, ki se je 12 mesecev zdravila s fenofibratom; rezultat Wilcoxonovega testa predznačenih rangov

Zdravljenje mes.		Št. bolnikov	Vsota rangov	p
0-3	Negativna razlika	5	53,50	0,095
	Pozitivna razlika	14	136,50	
0-12	Negativna razlika	4	42,50	0,035
	Pozitivna razlika	15	147,50	
3-12	Negativna razlika	10	81,50	0,813
	Pozitivna razlika	7	71,50	

Primerjali smo še odvisne vzorce v skupini s kombinirano terapijo (preglednici 9 in 10). Ti skupini (S+F, F+S) sta v času terapevtske obravnave, od 3. do 12. meseca, prejeli kombinirano terapijo dveh lipolitikov.

Preglednica 9: Primerjava aktivnosti sPLA₂ v skupini, ki se je prve tri mesece zdravila s fenofibratom, nato pa je prejela kombinirano terapijo s fenofibratom in simvastatinom

<i>T - test odvisnih vzorcev – (normalna porazdelitev) F+S</i>					
Območje/meseci	Čas/meseci	N	Povprečna vrednost sPLA ₂ (nmol/min/ml)	SD	p
0-3	0	16	6,84	1,09	0,007
	3	16	7,84	1,19	
0-12	0	16	6,84	1,09	0,004
	12	16	8,26	1,66	
3-12	3	16	7,84	1,19	0,295
	12	16	8,26	1,66	

Preglednica 10: Primerjava aktivnosti sPLA₂ v skupini, ki se je prve tri mesece zdravila s simvastatinom, nato pa je prejela kombinirano terapijo s simvastatinom in fenofibratom

<i>T - test odvisnih vzorcev – (normalna porazdelitev) S+F</i>					
Območje/meseci	Čas/meseci	N	Povprečna vrednost sPLA ₂ (nmol/min/ml)	SD	p
0-3	0	18	6,43	1,79	0,017
	3	18	8,33	2,65	
0-12	0	18	6,43	1,79	0,000
	12	18	8,64	1,36	
3-12	3	18	8,33	2,65	0,517
	12	18	8,64	1,36	

V obeh skupinah bolnikov, ki so prejeli kombinirano terapijo, smo ugotovili statistično značilno razliko med povprečno vrednostjo aktivnosti sPLA₂ v času t=0 (pred začetkom zdravljenja) in po treh oziroma po dvanajstih mesecih zdravljenja ($p < 0,05$).

7 Razprava

Za uspešno zdravljenje koronarne bolezni je med drugim pomembno njeno zgodnje odkrivanje in poznavanje dejavnikov tveganja, s čimer pripomoremo k upočasnitvi razvoja ateroskleroze. V zadnjih letih postaja ateroskleroza kot vnetna bolezen vse bolj proučevana, natančneje opredeljena in obvladljiva tarča, med drugim tudi s pomočjo novih spoznanj o številnih novih biooznačevalcih (biomarkerjih) in poizkusov apliciranja le-teh v laboratorijski diagnostiki ter klinični praksi. Sekretorna fosfolipaza A₂ (sPLA₂) je tako potencialni označevalec, po mnenju nekaterih tudi neodvisni dejavnik tveganja bolezni srca in žilja. Vzporedno z raziskavami, ki ugotavljajo povezanost tega encima z boleznimi srca in žilja, pa se tudi klinično preizkušajo zdravila, ki so dokaj učinkoviti in specifični inhibitorji tako sPLA₂ kot tudi Lp-PLA₂. Tako zmanjšajo encimsko aktivnost ter s tem posredno zavirajo napredovanje ateroskleroze. Nekatera od teh zdravil so že v drugi in tretji fazi kliničnega preizkušanja (28, 45, 46).

Obvladovanje napredovale ateroskleroze in manifestnih oblik koronarne bolezni je prioriteta naloga primarne in sekundarne preventivne kardiologije. Ta omogoča aktivno nadzorovanje zdravja ljudi, zgodnje odkrivanje potencialno ogroženih in ustrezno ukrepanje, vključno s svetovanjem o dejavnikih tveganja in spremembi življenjskega sloga. Preventivna kardiologija uporablja le konvencionalne (klasične) dejavnike tveganja, čeprav so se v zadnjih letih kot potencialni dejavniki tveganja nastanka in razvoja ateroskleroze izkazali številni novi dejavniki, vendar je rutinska klinična aplikacija teh stanj še vprašljiva (20). Prav tako se v klinični praksi uporabljajo že uveljavljena lipolitična zdravila za sistematično zdravljenje dislipidemij, katerih pleiotropni učinki ugodno delujejo na potencialne dejavnike tveganja SŽB, kot npr. fibrinogen, fosfolipaza A₂.

7.1 Ocena porazdelitve nekaterih manifestnih oblik koronarne bolezni in dejavnikov tveganja srčno-žilnih bolezni

V vzorcu 109 bolnikov, ki so bili hospitalizirani zaradi ishemične bolezni srca, smo na začetku zdravljenja ugotovili, da je imelo izmed manifestnih oblik koronarne bolezni največ bolnikov v anamnezi akutni miokardni infarkt. 61,5 odstotka teh bolnikov se je prve tri mesece zdravilo s fenofibratom (skupina F), 50,9 odstotka s simvastatinom (skupina S) (preglednica 2, slika 4). Skupini sta bili naključno izbrani. Manj bolnikov je obolelo za

prezgodnjo koronarno boleznijo (30,8 % F in 35,1 % S), le devet bolnikov iz vsake skupine je imelo v anamnezi stabilno angino pektoris, zelo neenakomerno pa je bila med bolniki porazdeljena nestabilna angina pektoris (9,6 % F in 24,6 % S). Glede na to da sta akutni miokardni infarkt in nestabilna angina pektoris t.im. nestabilni stanji aterosklerotičnega procesa, oziroma sta značilni za akutni koronarni sindrom, smo kljub temu v obeh skupinah (F in S) v primerjavi z nestabilno angino pektoris opazili precej večji delež bolnikov z akutnim miokardnim infarktom.

Med klasičnimi dejavniki tveganja je bilo v skupini bolnikov, ki smo jo obravnavali v diplomskem delu, največ hiperlipidemije (76,9 % F in 89,5 % S). Slika 5 prikazuje porazdelitev drugih dejavnikov tveganja SŽB. Do podobnih rezultatov glede prevalence hiperlipidemije so prišli tudi v raziskavi Nacionalnega programa primarne preventive SŽB, v katero je bilo vključenih in preventivno pregledanih 486.764 oseb, od teh je imelo približno 5 % oseb v anamnezi že manifestno obliko bolezni srca in žilja (2). Moški so bili stari od 35 do vključno 65 let, ženske pa od 45 do vključno 70 let. Poleg velike razširjenosti klasičnih dejavnikov tveganja, npr. kajenja, telesne neaktivnosti, prekomerne telesne teže, tveganega pitja alkohola, debelosti, zvišanega krvnega tlaka, motene presnove glukoze, so pri približno 70 % populacije ugotovili povišane vrednosti holesterola. Čeprav smo v diplomsko delo vključili le bolnike z ishemično boleznijo srca, v nasprotju z omenjenim programom, kjer so obravnavali vse preventivno pregledane osebe, smo v obeh primerih opazili poleg hiperlipidemije tudi precej razširjeno arterijsko hipertenzijo. V celotni slovenski populaciji je imelo približno 35 % pregledanih oseb zvišan krvni tlak, v našem vzorcu pa je bilo teh 48,1 % (F) in 40,45 % (S). Za ta dejavnik tveganja je znano, da pospeši proces aterogeneze. Krvne žile, ki so dalj časa izpostavljene povišanemu krvnemu tlaku, postopoma spremenijo svoj ustroj, zmanjša se podajnost žilne stene. Posledica tega so lahko deformacije na žilni steni, ki lahko vodijo do nastanka krvnih strdkov, ti pa so pogosto del aterosklerotičnih zapletov. Različna zdravila za zniževanje krvnega tlaka so v kliničnih študijah pokazala zmanjšanje tveganja koronarne bolezni. To pa najverjetneje ni posledica intrinzičnih lastnosti teh zdravil, ampak znižanje krvnega tlaka (59).

7.2 Primerjava med skupinami moških, mlajših in starejših od 55 let, glede na pojav prezgodnje koronarne bolezni in aktivnosti sPLA₂

Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) smo opazili v naslednjih skupinah bolnikov: A) starejši in mlajši od 55 let, ki so imeli v anamnezi med drugim prezgodnjo koronarno bolezen, B) starejši od 55 let s prezgodnjo KB in mlajši od 55 let brez prezgodnje KB, ter C) starejši od 55 let, s prezgodnjo KB in brez te bolezni (preglednica V).

V skupini A je med bolniki, mlajšimi od 55 let s prezgodnjo KB, povprečna vrednost aktivnosti sPLA₂ statistično značilno višja kot v skupini bolnikov, starejših od 55 let s prezgodnjo KB. Podobno je v skupini B, v kateri imajo bolniki, mlajši od 55 let, vendar brez prezgodnje KB, prav tako statistično značilno višjo povprečno vrednost aktivnosti sPLA₂ v primerjavi z bolniki, starejšimi od 55 let s prezgodnjo KB. Take vrednosti bi pričakovali glede na to, da bi pri starejših od 55 let s prezgodnjo KB tako bolezensko stanje predhodno že zahtevalo terapevtsko obravnavo, ki bi znižala vrednosti vnetnega označevalca sPLA₂. Drugače je pri tistih bolnikih s prezgodnjo koronarno boleznijo, ki so bili ob sprejemu mlajši od 55 let, pri teh je povprečna vrednost aktivnosti sPLA₂ podobna kot pri tistih (mlajših od 55 let), ki niso zboleli za prezgodnjo koronarno boleznijo. Glede na majhne velikosti vseh vzorcev težko ovrednotimo rezultate t-testa za primerjanje neodvisnih vzorcev, dejstvo pa je, da sta imeli obe skupini (mlajši od 55 let) napredovalo ateroskleroza, kar morda opraviči njune približno enake in sorazmerno visoke povprečne vrednosti sPLA₂. Domnevamo, da so se učinki zdravljenja prezgodnje koronarne bolezni pokazali tudi v skupini moških (C), starejših od 55 let, s prezgodnjo KB, katerih povprečna vrednost aktivnosti sPLA₂ je bila ob sprejemu statistično značilno nižja v primerjavi z moškimi, starejšimi od 55 let brez prezgodnje KB.

7.3 Primerjava med pacienti v skupinah z manifestno obliko KB in kontrolno skupino

Primerjali smo skupine pacientov, ki so imeli v anamnezi eno od manifestnih oblik KB (stabilno angino pektoris, nestabilno angino pektoris, akutni srčni infarkt), s kontrolno skupino, ki teh bolezni ni imela v anamnezi (preglednica 3). Med skupinami nismo ugotovili statistično značilnih razlik ($p < 0,05$) med povprečnimi vrednostmi sPLA₂ ob sprejemu. Povprečna vrednost aktivnosti sPLA₂ je bila v skupini 41 pacientov z akutnim srčnim infarktom (AMI) nižja v primerjavi s kontrolno skupino, v skupini 10 bolnikov s stabilno angino pektoris (stab. AP) pa zelo blizu vrednosti kontrolne skupine. Zaradi

majhnega števila bolnikov znotraj večine obravnavanih skupin težko ovrednotimo rezultate t-testa in Mann-Whitneyevega testa, ki je pri nestabilni angini pektoris (nestab. AP) pokazal, da ima študijska skupina glede na povprečni vrstni red višjo vrednost sPLA₂ (9,35) kot kontrolna skupina (8,50). Treba je poudariti, da je bila v diplomskem delu sPLA₂ merjena v krvni plazmi. Novejše študije pa kažejo na presenetljive rezultate, če so pri zgoraj omenjenih manifestnih oblikah koronarne bolezni določale sPLA₂ imunohistološko. Zlasti za proučevanje akutnih ishemičnih dogodkov se je ugotavljanje histopatoloških značilnosti na aterosklerotični lehi izkazalo za boljše metodo kot določanje števila aterosklerotičnih leh ali stopnje stenoze na koronarni arteriji (55). Na slednji dve značilnosti koronarne bolezni so se med drugim omejili v študiji (6). Ta študija je ena od tovrstnih v zadnjih letih, ki skušajo pojasniti, ali gre pri obeh stanjih (stabilnem in nestabilnem) ateroskleroze sploh za isto bolezen. Čeprav imata podobno anatomsko ozadje, študija omenja kot prvo razliko bistveno boljše prognozo stabilne angine pektoris v primerjavi z akutnim srčnim infarktom. V aterosklerotični lehi bolnikov s stabilnim stanjem so ugotovili več kolagena, ki ji daje večjo trdnost, medtem ko je bila leha pri nestabilnem stanju prekrita s tanko fibrozno kapo, v notranjosti pa zapolnjena z večjim deležem lipidov in vnetnih celic ter tako bolj nagnjena k raztrganju. Pri bolnikih z ACS so ugotovili manj obolelih žil, manj stenoz in okluzij ter nižji indeks obsega ateroskleroze v primerjavi s tistimi, ki so oboleli za stabilno angino pektoris. Razlika v nestabilnosti aterosklerotične lehe in obsegu ateroskleroze med bolniki z ACS in tistimi s stabilno angino pektoris kaže, da gre morda za dve obliki SŽB, ki se vsaj deloma lahko razvijata na različna načina. Nestabilna aterosklerotična leha je, v nasprotju z obsegom ateroskleroze, pomembnejša determinanta ACS. Stopnja napredovale ateroskleroze je spremenljiva in jo je težko napovedati. S pomočjo angiografije so ugotovili, da pri bolnikih z ACS ni prišlo do raztrganja aterosklerotične lehe, ampak le do erozije na površini lehe. Prav tako naj bi šlo tudi za različen profil dejavnikov tveganja stabilne angine pektoris in ACS.

V študiji (55) pa so imunohistološko pregledali aterosklerotične lehe pri 41 bolnikih s stabilno angino pektoris, nestabilno angino pektoris ali akutnim srčnim infarktom. Biološke vzorce so pridobili z neposredno koronarno aterektomijo (angl. directed coronary atherectomy, DCA) in opazovali navzočnost sPLA₂ tip II, makrofagov in gladkomišičnih celic. Znotrajcelično sPLA₂ tip II so našli v aterosklerotični intimi v gladkomišičnih celicah in makrofagih, navzoča pa je bila tudi zunajcelična sPLA₂ tip II. Na nekaj vzorcih

so ugotovili na sPLA₂ tip II pozitivne gladkomišične celice v mediji. Ugotovili so primerljive vsebnosti sPLA₂ tip II v intimi aterosklerotične lehe med stabilno in nestabilno angino pektoris ter akutnim srčnim infarktom. Delež sPLA₂ tip II v zunajceličnem matriksu aterosklerotične lehe je bil pri bolnikih z akutnim srčnim infarktom značilno višji kot pri tistih z angino pektoris. Povezava med sPLA₂ tip II in zapleti ateroskleroze ni znana, znano pa je, da zvišana raven cirkulirajoče sPLA₂ tip II poveča tveganje klinične manifestacije koronarne bolezni. sPLA₂ tip II so našli tako v zgodnji obliki kot v napredovali aterosklerotični lehi, nekatere druge študije omenjajo njeno pojavnost tudi v nekrotičnem tkivu, ujeto v holesterolne kristale, pa v lipidnih jedrih, kolagenskih vlaknih, zunajceličnih lipidnih kapljicah itd. Vir za sPLA₂ tip II, ki se nahaja v zunajceličnem matriksu, naj bi bile nekatere lokalno ležeče celice, ali pa naj bi encim difundiral v leho iz krvi. Ta domneva se navezuje na dejstvo, da je pri akutnem srčnem infarktu, pri katerem so ugotovili zvišano raven sPLA₂ tip II, tudi v aterosklerotični lehi tega encima (zunajcelično) zelo veliko, čeprav je hkrati v lehi malo celic, ki bi bile pozitivne na sPLA₂ tip II. Sposobnost sintetiziranja sPLA₂ tip II imajo namreč tudi gladkomišične celice, makrofagi in endotelijske celice. Poleg tega so ugotovili tudi značilno manj gladkomišičnih celic pri bolnikih z akutnim srčnim infarktom, kar povezujejo z morebitno citotoksičnostjo sPLA₂ tip II. Posledično zmanjšanje števila teh celic destabilizira aterosklerotično leho. Tudi značilno zvišane vrednosti CRP, oksidiranih LDL in komplementa na mestu aterosklerotične lehe, pa vnetni odziv, povečana agregacija trombocitov ter morebitna tromboembolija so zapleti na aterosklerotični lehi, katerih iniciator naj bi bila tudi sPLA₂ tip II. Glede na to da so bili vzorci vzeti v času treh do osemnajstih ur po akutnem srčnem infarktu in da v šestih urah ni prišlo do povišanja vrednosti sPLA₂ tip II, težko primerjamo te vrednosti s povprečno vrednostjo sPLA₂ v skupini bolnikov z AMI v našem diplomskem delu, saj ne vemo, koliko časa je minilo od te manifestacije KB. Vsekakor se rezultati študije precej razlikujejo med posameznimi manifestacijami KB. Zanimivo je, da ni opaziti podobnosti med nestabilno angino pektoris in akutnim srčnim infarktom glede na posamezne parametre, pa vendar veljata za nestabilni stanji in označujeta akutni koronarni sindrom. Morda se ta študija še bolj približuje domnevi, da so omenjena stanja lahko različne bolezni, kajti ne vemo zakaj napredovala ateroskleroza pri nekaterih posameznikih privede do nestabilnega stanja, oziroma se klinično izrazi kot akutni koronarni sindrom, pri drugih pa je aterosklerotična leha dalj časa stabilna, ali sploh ne pride do akutnega poslabšanja dogodkov na žilni steni (npr. stabilna angina pektoris).

Zanimivo je ugotoviti kdaj je smiselno, oziroma uporabno merjenje aktivnosti fosfolipaze glede na stanje aterosklerotične lehe. Študija (56) govori o tem, da se je merjenje aktivnosti Lp-PLA₂ takoj po akutnem koronarnem sindromu in ob že uvedeni terapiji z visokimi odmerki statinov izkazalo za neuporabno, medtem ko je po 30 dneh nastopilo pričakovano in statistično značilno znižanje vrednosti Lp-PLA₂. Ugotovili so tudi, da ta encim poveča tveganje srčnožilnih dogodkov neodvisno od CRP in LDL. Pred začetkom zdravljenja je bilo v vseh kvintilih aktivnosti Lp-PLA₂ povečano tveganje ponovnega pojava KB, medtem ko je imela skupina iz najvišjega kvintila po 30-dnevnem zdravljenju več možnosti, da ponovno zboli za KB kot pa tista iz najnižjega kvintila. Terapija s statini je večinoma zmanjšala aktivnost Lp-PLA₂. Izjema je pravastatin, ki je aktivnost povečal za 3,6%.

7.4 Vpliv lipolitičnih zdravil na vrednosti sPLA₂

Natančnega mehanizma, ki bi razložil vpletenost fosfolipaze in lipolitičnih zdravil v proces ateroskleroze še ne poznamo. Predmet raziskav je tudi vloga različnih tipov sPLA₂ pri vnetju. Pri tem je še najbolj proučevana sPLA₂-IIA, za katero so ugotovili, da je pri nekaterih vnetnih boleznih njena koncentracija povišana tako v serumu kot v tkivih. Znano je, da sPLA₂ sodeluje v sintezi eikozanoidov pri vnetju. Prisotnost osnovnih provnetnih dejavnikov povzroči povečano tvorbo fosfolipaze - temu lahko sledi tudi povečana tvorba lipidnih provnetnih mediatorjev, ter s tem povezano vzdrževanje vnetja (28, 45, 46, 55, 60).

Za proces ateroskleroze predpostavljajo različne mehanizme vpletenosti različnih tipov fosfolipaz A₂. Najpogosteje je omenjen vpliv sPLA₂ na plazemske lipoproteine in na nastanek lipidnih mediatorjev. Kot zelo primeren substrat za sPLA₂-IIA se je izkazal oksidirani LDL, iz katerega nastane po encimski modifikaciji bioaktivni mediator s proaterogeno vlogo na mestu aterosklerotične lehe. Ugotovili so tudi, da je k povečani encimski aktivnosti pripomogla vezava sPLA₂-IIA na proteoglikane (npr. dekorin). Vendar bo potrebno vlogo sPLA₂ (posameznih izoencimov) pri razvoju ateroskleroze še natančneje proučiti (28, 60).

Mehanizma, ki bi razložil neposredno povezavo med lipolitičnimi zdravili (statini in fibrati) in sPLA₂, ne poznamo. Glede na znano dejstvo, da je sPLA₂ med drugim vključena v metabolizem fosfolipidov oziroma modifikacijo lipoproteinov, je zelo verjeten posreden

vpliv statinov in fibratov na ta encim preko uravnavanja vrednosti lipoproteinov. Na ta način moduliramo količino substrata za sPLA₂ in posledično izražanje tega encima. Znanih je še nekaj mehanizmov moduliranja vnetnih procesov in imunskega sistema, ki jih prištevamo med pleiotropne učinke omenjenih lipolitičnih zdravil. Tako imajo naprimer statini poleg vpliva na koncentracijo holesterola v serumu tudi protivnetno delovanje, ki je neodvisno od znižanja koncentracije holesterola v serumu. Zavirajo izražanje receptorjev na površini monocitov, izražanje adhezijskih molekul na površini endotelijskih celic, ter na ta način zmanjšajo prisotnost vnetnih celic v intimi (npr. adhezijo od integrina odvisnih levkocitov), kar zavira vnetno dogajanje. Medtem ko so za fibrate znani učinki na izražanje nekaterih genov, vpletenih v vnetni proces. Tako so fibrati aktivatorji transkripcijskega faktorja PPAR- α , preko katerega vplivajo na sintezo apolipoproteinov, na sintezo encimov, lahko so del metabolizma lipoproteinov, in na izražanje nekaterih genov, vključenih v fibrinolizo in vnetni proces (61, 62, 63).

Različna mnenja so glede opredelitve fosfolipaze kot označevalca ali kot dejavnika tveganja SŽB. Označevalec pomeni zgolj vrednost biokemijskega ali celičnega produkta, ki jo izmerimo v biološkem vzorcu ob prisotnem bolezenskem stanju, medtem ko ima dejavnik tveganja vzročno povezavo s to boleznijo, oziroma je vpleten v njeno patogenezo. To pomeni, da nam označevalec služi le kot pokazatelj bolezenskega stanja, oziroma poteka bolezni, dejavnik tveganja pa lahko predstavlja tudi tarčo, ki jo lahko terapevtsko moduliramo in tako vplivamo na nadaljnji razvoj patofiziološkega procesa (46). Na primeru Lp-PLA₂ in sPLA₂ so tako ugotovili, da napovedujeta srčno-žilne dogodke neodvisno od drugih dejavnikov tveganja (28, 46).

Vrednosti sPLA₂ (preglednica 6), dobljene v naši raziskavi in izražene kot aktivnost (nmol/min/ml) encima v skupini bolnikov, ki se je 12 mesecev zdravila s fenofibratom (F), in skupini bolnikov, ki se je 12 mesecev zdravila s simvastatinom (S), kažejo, da je bila povprečna vrednost tega encima v obeh skupinah bolnikov najvišja ob drugem merjenju, oziroma po treh mesecih zdravljenja v skladu z eksperimentalnim načrtom zdravljenja (slika 2). Statistično značilno razliko smo opazili le v skupini (F) med časom $t=0$ in $t=12$ mesecev zdravljenja, kjer je bilo več tistih bolnikov, katerih vrednosti sPLA₂ so bile po 12 mesecih višje v primerjavi s tistimi pred začetkom zdravljenja. V tej skupini bi povišanje vrednosti sPLA₂ pričakovali le za frakcijo fosfolipaze, ki je vezana na HDL, saj je znano, da fibrati običajno povišajo HDL (46). Pri določanju aktivnosti fosfolipaze v plazmi je

pomembno dejstvo, da je določen delež le-te vezan na cirkulirajoče lipoproteine, kot so LDL, HDL in njihovi podtipi (subfrakcije). Delež fosfolipaze, vezane na lipoproteine, je odvisen od stopnje glikozilacije encima. Obstajajo signifikantne razlike v delovanju različnih lipolitičnih zdravil na celokupno plazemsko vrednost Lp-PLA₂, ali na posamezne frakcije lipoproteinov, s katerimi je encim povezan. Fosfolipaza, ki je povezana s HDL, ima verjetno protiterogen učinek, v nasprotju z večjim deležem ostale fosfolipaze, ki je vezana na LDL, in ki je skoraj enaka celotni količini fosfolipaze v plazmi. Po nekaterih ocenah je tako vezane Lp-PLA₂ okoli 80 % (29, 47).

V skupinah s kombinirano terapijo (S+F ali F+S) so bile povprečne vrednosti sPLA₂ ob vsakem merjenju višje (preglednica 7). Med časom t=0 in t=3, ter t=0 in t=12 mesecev so bile povprečne vrednosti v obeh skupinah statistično značilno višje, ne pa med tretjim in dvanajstim mesecem. Morda bi lahko povišanje vrednosti sPLA₂ razlagali kot posledico zvišanja HDL frakcije, ni pa nujno, saj smo do podobnih rezultatov prišli tudi pri statinih.

Rezultati v diplomskem delu so tako drugačni od rezultatov številnih študij, s katerimi so ugotovili, da statini, z izjemo pravastatina, običajno statistično značilno znižajo vrednosti sPLA₂ (46, 47, 56, 58). V študijah (56, 64) so aktivnost Lp-PLA₂ v krvni plazmi določili z radiometrično metodo. Pri tem so uporabili substrat [³H]-PAF (angl. platelet activating factor) v pufru s pH 7,4. Encimska aktivnost je izražena kot nmol hidroliziranega PAF v minuti (min) v 1 mL (nmol/min/mL). Enak substrat so uporabili tudi v študiji (47) in določili aktivnost v nmol/ml/min. V študiji (57), kjer so sicer ugotavljali vpliv fibrata, so določali aktivnost Lp-PLA₂ s pomočjo kolorimetrične metode. Pri tem so uporabili substrat (1-miristol-2-(4-nitrofenilsukcinifosfatidilholin), ki ga hidrolizira fosfolipaza, sprosti se p-nitrofenol. Vrednosti encimske aktivnosti v vzorcu so določili s pomočjo umeritvene premice standarda (p-nitrofenola) in jih podali kot nmol/min/ml. Princip opisane metode je zelo podoben našemu, kjer smo izbrali ustrezen substrat (molekula glicerofosfolipida) za fosfolipazo. Po encimski hidrolizi smo s kolorimetrično metodo detektirali produkt in s pomočjo umeritvene premice določili aktivnost encima. Ne glede na podobnost metod smo prišli v naši raziskavi do drugačnih rezultatov.

Glede na rezultate vseh obravnavanih skupin tako lahko rečemo, da je terapija z lipolitičnimi zdravili v nekaterih primerih pokazala statistično značilen vpliv na vrednosti sPLA₂, vendar v glavnem ne na način, kot bi pričakovali glede na rezultate nekaterih

drugih raziskav. Naši rezultati so tako nekoliko kontroverzni, če bi upoštevali mnenja tistih, ki se sklicujejo na tezo, da je fosfolipaza proaterogen označevalec ali dejavnik tveganja. V tem primeru deluje provnetno. Provnetni učinek sPLA₂ dajejo produkti encimsko katalizirane hidrolize fosfolipidov in fosfatidilholina, kot so arahidonska kislina, lizofosfolipidi, lizofosfatidilholin in njihovi metaboliti, npr. PAF. Sproščena arahidonska kislina generira eikozanoide in levkotriene, potencialno vpletene v aterogenezo. Podobno velja za Lp-PLA₂, kjer naj bi provnetni učinek izkazovali produkti encimske hidrolize, kot so lizofosfatidilholin in bioaktivne oksidirane proste maščobne kisline (28, 26). Glede na to bi pričakovali, da se koncentracije potencialnega vnetnega označevalca zvišajo v času, ko je aterosklerotična leha nestabilna, po ustrezni terapevtski stabilizaciji bolezenskega procesa v žilni steni pa se ustrezno znižajo. Za nestabilno obdobje procesa ateroskleroze je znano, da je povezano z znaki vnetja. Znano je tudi, da lipolitična zdravila uspešno stabilizirajo aterosklerotično leho in tako preprečujejo nadaljnje degenerativne procese na žilni steni. Ta zdravila modulirajo frakcije lipoproteinov tako, da zmanjšajo njihov prispevek k nestabilnosti aterosklerotične lehe. Gre predvsem za zmanjšanje koncentracije holesterola LDL, ki je v oksidirani obliki pomemben substrat za fosfolipazo A₂. S tem se zmanjša tudi delež fosfolipaze, vezane na ta lipoprotein, in poveča delež encima, vezanega na HDL, ki mu pripisujejo varovalno vlogo za srce in žilje. Glede na tak domnevni mehanizem vpletenosti fosfolipaze in lipoproteinov v aterogenezo bi v času zdravljenja z lipolitiki pričakovali ustrezno zmanjšanje aktivnosti tega encima.

Obstaja pa tudi nasprotna teza o morebitnem protiatrogenem delovanju fosfolipaze A₂. Na primeru Lp-PLA₂ so ugotovili, da bi lahko protivnetni učinek Lp-PLA₂ ob specifični inaktivaciji dejavnika, ki aktivira trombocite PAF, pomenil protiatrogeno delovanje. PAF je namreč produkt vnetnih celic (nevtrofilcev, makrofagov, trombocitov) in pospešuje agregacijo trombocitov, zato je pomemben dejavnik v patofizioloških procesih nestabilne angine pectoris (47, 48).

Ob primerjavi drugih parametrov med posameznimi meritvami so njihove vrednosti v času terapije večinoma ustrezno upadale (LDL, celokupni holesterol, trigliceridi, fibrinogen, CRP), oziroma pričakovano naraščale (HDL). Vsekakor je lipolitično zdravljenje prek uravnavanja vrednosti lipidograma pripomoglo k stabilizaciji aterosklerotičnega procesa. Vzporedno povečevanje aktivnosti fosfolipaze morda kaže na določen protiatrogen mehanizem, ki je lahko povezan z lipolitičnim zdravljenjem, ni pa nujno.

Nekateri tudi domnevajo, da naj bi imel HDL pomembno kardioprotektivno vlogo, ker naj bi zaviral zgodnje vnetne spremembe v žilni steni. Fosfatidilholin, aktivna komponenta HDL, ki zavira tvorbo adhezijskih molekul na endotelijskih celicah žilne stene, onemogoča vstop vnetnih celic v intimo in zavira proces vnetja. Zato domnevajo, da bi lahko zvišana vrednost fosfolipaze, vezane na HDL, deformirala lipoproteine v tolikšni meri, da bi le-ti izgubili svojo protivnetno vlogo. Tako so v študiji (57) v vzorcu 1451 moških (od tega je prejelo 725 moških placebo, 726 pa fibrat, gemfibrozil) v obdobju 5 let ugotovili visoko stopnjo koronarnih dogodkov pri moških s povišanimi vrednostmi Lp-PLA₂ in znižanimi vrednostmi holesterola HDL (57).

Ob koncu zdravljenja smo tako ugotavljali, ali lipolitična zdravila vplivajo na zaželeno znižanje vrednosti sPLA₂, in kateri od štirih načinov zdravljenja je pri tem najuspešnejši. Rezultati so pokazali največ statistično značilnih razlik pri kombinirani terapiji s statini in fibrati. Do pričakovanega znižanja sPLA₂ ni prišlo. Najvišja povprečna vrednost encima (v skupini S in F) po tretjem mesecu zdravljenja morda na nek način kaže na podobnost s študijo (48), v kateri so 6 mesecev spremljali nekatere parametre po akutnem koronarnem sindromu na vzorcu 55 bolnikov, 34 jih je prejelo atorvastatin, ostali pa se niso zdravili z lipolitičnimi zdravili. V študiji so merili titer protiteles (IgG, IgM) proti produktom encimsko katalizirane hidrolize fosfolipidov. Z metodo ELISA (angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) so določili stopnjo vezave protiteles na oksidirani LDL, na katerega je bila predhodno vezana aktivna oziroma neaktivna Lp-PLA₂, ter na nativno obliko LDL z vezano aktivno oziroma neaktivno Lp-PLA₂. Profil titra protiteles, tako po uvedbi terapije, kot brez nje, kaže največji imunski odziv v prvem mesecu opazovanja. Nato se odziv zmanjša ali stabilizira, kar najverjetneje pomeni, da je manj produktov encimske hidrolize, oziroma da je aktivnost fosfolipaze manjša. Padec krivulje (titra protiteles) pri bolnikih, ki se niso zdravili z lipolitiki, je bistveno večji kot pri tistih, ki so se zdravili. Če so glede na časovno spremljanje titra protiteles sklepali na plazemske vrednosti oziroma aktivnost encima Lp-PLA₂, zdravljenje vpliva le v tolikšni meri, da čez nekaj časa (npr. po treh mesecih) ohrani encim na nekoliko nižji ravni, kot če bolnika ne bi zdravili. V patofiziološkem smislu pa najverjetneje prav to pomeni stabilizacijo aterosklerotičnega procesa z uporabo lipolitičnih zdravil, katerega natančen mehanizem ne poznamo.

8 Sklep

Z raziskavo nismo potrdili naše hipoteze, s katero smo predvidevali, da bo zdravljenje z lipolitičnimi zdravili (statini in/ali fibrati) po načrtovani terapijski shemi pomembno znižalo vrednosti sPLA₂ v krvi bolnikov, ki so bili hospitalizirani zaradi ishemične bolezni srca. Še največji vpliv na spremembo vrednosti sPLA₂ je imelo kombinirano zdravljenje s statini in fibrati, čeprav je tudi to, v nasprotju s pričakovanji, zvišalo vrednosti sPLA₂ med zdravljenjem, podobno kot v večini primerov tudi monoterapija s statini ali fibrati. Prav tako naši rezultati ne potrjujejo domneve, da bi nekatere manifestne oblike koronarne bolezni, ki so jih imeli bolniki v anamnezi, izkazovale višje vrednosti sPLA₂ v krvi ob prvem merjenju, v primerjavi s kontrolno skupino, ki te bolezni ni imela. S svojim delom tako nismo potrdili, da je sPLA₂ potencialno pomemben vnetni označevalec, ki naj bi kazal na spremljajoče vnetno dogajanje ob akutnih zapletih in nestabilnih stanjih koronarne bolezni, niti dokazali, da bi lahko zaradi ugodnih pleiotropnih učinkov lipolitičnih zdravil ta označevalec ustrezno moduliral in tako pokazali na hipotetično zmanjšanje tveganja za ponovitve manifestnih zapletov koronarne bolezni. Naši rezultati so tako vsaj posredno v nasprotju s tistimi študijami, ki domnevajo, da sPLA₂ v procesu aterogeneze deluje proaterogeno. Nekatere druge študije sicer v prid rezultatom naše raziskave dopuščajo možnost, da ima lahko sPLA₂ tudi protiaaterogeno vlogo (46, 47). V tem primeru domnevamo, da je sPLA₂ vpletena v nekatere druge mehanizme nastanka nestabilnega stanja koronarne bolezni, ki morda niso povezani z lipoproteini in so tako z lipolitičnimi zdravili neobvladljivi. Za potrditev te hipoteze bodo potrebne dodatne raziskave. V teh že poskušajo na eni strani najti nove metode določanja sPLA₂, eden bolj obetavnih je imunohistološko določanje vrednosti tega označevalca, na drugi strani pa odgovoriti na vprašanja, ali gre pri različnih manifestnih oblikah koronarne bolezni sploh za isto bolezen. Pri tem ostajajo neodgovorjena nekatera temeljna patofiziološka vprašanja, kot na primer ali je proces ateroskleroze večplasten, zakaj se sicer dokazano prisotna aterosklerotična bolezen žilne stene klinično izrazi le pri nekaterih posameznikih, oziroma pride le pri nekaterih do akutnih zapletov koronarne bolezni, nenazadnje pa tudi, kateri način moduliranja sPLA₂ bi bil najbolj optimalen.

9 Literatura

1. Dosegljivo 17.01.2009 na URL:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.
2. Fras Z. Nacionalni program primarne preventive bolezni srca in žilja - kaj smo opravili v prvem petletnem obdobju? In: IV. Strokovno srečanje izvajalcev nacionalnega programa primarne preventive srčnožilnih bolezni. Šmarješke Toplice, februar 2008.
3. Noč M. Akutni koronarni sindromi v letu 2000 In: 5. Regijski seminar o urgentni medicini za zdravnike. Moravske Toplice, november 2000.
4. Lunder M, Kuhar P, Drevenšek G. Preprečevanje in zdravljenje ateroskleroze. Medicinski mesečnik 2007;235-40,293-99.
5. Resman J. Klinična slika in telesni pregled bolnika s stabilno angino pectoris In: Prvi posvet o kronični koronarni bolezni. Zdravniško društvo Novo mesto v sodelovanju z Združenjem kardiologov Slovenije, Novo mesto, april 2006.
6. Agewall S. Acute and stable coronary heart disease: different risk factors. Eur Heart J 2008;29:1927-29.
7. Pust B. Novosti k priporočilom za obravnavo nestabilne angine pectoris. Zdrav Vestn 2002; 71:181.
8. Lobnik A, Kanič V, Kotnik M, Vokač D: Akutni koronarni sindrom V: Iz prakse za prakso z mednarodno udeležbo, 13. Srečanje internistov in zdravnikov splošne medicine , Zbornik predavanj in praktikum, Maribor maj 2002.
9. Yuan G, Wang J, Hegele RA. Heterozygous familial hypercholesterolemia: an underrecognized cause of early cardiovascular disease. CMAJ 2006;174.
10. Watts GF, Lewis B, Sullivan DR. Familial Hypercholesterolemia. A Missed Opportunity in Preventive Medicine. Nat Clin Pract Cardiovascular Med 2007;4:404-5.

11. Završnik M. Motnje v presnovi maščob Dyslipidemia In: 17. srečanje internistov in zdravnikov splošne medicine. Maribor, maj 2006.
12. Müller BT, Huber R, Henrich B, Adams O, Berns G, Siebler M, et al. Chlamydia pneumoniae herpes simplex virus and cytomegalovirus in symptomatic and asymptomatic high-grade internal carotid artery stenosis. Does infection influence plaque stability. 2005;34:163-9.
13. Stassen F, Vega-Cardova X, Vliegen I, Bruggeman C. Immune activation following cytomegalovirus infection: more important than direct viral effects in cardiovascular disease. Clin Virol 2006;35:349-53.
14. Viles-Gonzales JF, Fuster V, Badimon JJ. Links between inflammation and thrombogenicity in atherosclerosis. Curr Mol Med 2006;6:489-99.
15. Elkind MSV, Brown D, Worrall BB. Genetic and Inflammatory Mechanisms in Stroke. Dosegljivo 17.01.2009 na URL: <http://emedicine.medscape.com/article/1163331-overview>.
16. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. Biochemical Society Transactions 2001;29:358-62.
17. Vozelj M. Temelji imunologije. Državna založba Slovenije Ljubljana; 1996
18. Murtagh BM, Anderson HV. Inflammation and Atherosclerosis in Acute Coronary Syndromes. J Invasive Cardiol 2004;16:377-84.
19. Osredkar J. Kardiovaskularna obolenja-laboratorijska diagnostika. Farm Vestn 2002;53:325-30.
20. Accetto R. Visok krvni tlak in tveganje za kardiovaskularne bolezni In: IX. Strokovni sestanek sekcije za arterijsko hipertenzijo. Šmarješke toplice, september 2000.
21. Medvešek M. Metabolični sindrom In: XIII. Strokovni sestanek sekcije za arterijsko hipertenzijo. Portorož, november 2004.
22. Grundy SM, Hansen B, Smith SC, Cleeman JI, Kahn RA. Clinical Management of Metabolic Syndrome AHA/NHLBI/ADA Conference Proceeding. 2004;109:551-56.

23. Kwiterovich PO Jr. The Metabolic Pathways of High-Density Lipoprotein, Low-Density Lipoprotein, and Triglycerides. A Current Review. *Am J Cardiol* 2000;86:5-10.
24. Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 29th ed. Philadelphia. W.B. Saunders Co.;1017-18.
25. Vodopivec-Jamšek. Pristop k bolniku s hiperlipidemijo In: 7. Fajdigovi dnevi. Kranjska Gora, oktober 2005.
26. Mallat Z, Benessiano J, Simon T, Ederhy S, Sebella-Arguelles C, Cohen A, et al. Circulating Secretory Phospholipase A2 Activity Events in Healthy Men and Women. *ATVB's* 2007;27:1177-83.
27. Hurt-Camejo E, Camejo G, Peilot H, Öörni K, Kovanen P. Phospholipase A2 in Vascular Disease. *Circulation Research* 2001;89-298.
28. Jerman B, Pungertar J. Sekretorne fosfolipaze A2 in njihova (pato)fiziološka vloga. *Farm Vestn* 2008;59:9-15.
29. Virani SS, Nambi V. The Role of Lipoprotein-associated Phospholipase A2 As a Marker for Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports* 2007;9:97-103.
30. Kamath S. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *Q J Med* 2003; 96:711-29.
31. Rosenson RS, Lowe GD. Effects of lipids and lipoproteins on thrombosis and rheology. *Atherosclerosis* 1998;14:271-80.
32. Tretjak M. Elektrokardiogram in dinamična (HOLTER) elektrokardiografija pri bolniku s stabilno angino pectoris In: Kronična koronarna bolezen. Zdravniško društvo Novo mesto v sodelovanju z Združenjem kardiologov Slovenije, Novo mesto, april 2006.
33. Bombek M, Golob-Gulič T. Obremenitveno testiranje pri bolniku/bolnici s stabilno angino pectoris In: Prvi posvet o kronični koronarni bolezni. Zdravniško društvo Novo mesto v sodelovanju z Združenjem kardiologov Slovenije, Novo mesto, april 2006.

34. Gradecki I. Ehokardiografija pri stabilni angini pektoris In: Prvi posvet o kronični koronarni bolezni. Zdravniško društvo Novo mesto v sodelovanju z Združenjem kardiologov Slovenije, Novo mesto, april 2006.
35. Berden P. Slikovne preiskave–CT in MR pri bolniku s stabilno angino pektoris In: Prvi posvet o kronični koronarni bolezni. Zdravniško društvo Novo mesto v sodelovanju z Združenjem kardiologov Slovenije, Novo mesto, april 2006.
36. Lobnik A, Kanič V. Koronarografska preiskava pri bolniku s stabilno angino pektoris In: Kronična koronarna bolezen. Zdravniško društvo Novo mesto v sodelovanju z Združenjem kardiologov Slovenije, Novo mesto, april 2006.
37. Elektroforeza lipoproteinov. Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo. Klinični center Ljubljana. Dosegljivo 17.01.2009 na URL:
http://www.kclj.si/kikkb/preiskave/tabele_e/elektroforeza_lipoproteinov.htm.
38. Keber I, Fras Z, Gužič-Salobir B, Jug B, Šabovič M, Vodopivec-Jamšek. Rehabilitacija in sekundarna preventiva po srčnem infarktu. Nacionalna klinična smernica. Ministrstvo za zdravje, Ljubljana, marec 2004.
39. Dosegljivo 17.01.2009 na URL: <http://www.zdravila.net>.
40. Atherosclerosis and lipoprotein metabolism. In: Rang H.P, Dale M.M, Ritter J.M, Moore P.K. Pharmacology. Edinburgh, London, NewYork, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto; 2003.p.306-13.
41. Kneževič I. Kirurško zdravljenje bolnika s stabilno angino pektoris In: Prvi posvet o kronični koronarni bolezni. Zdravniško društvo Novo mesto v sodelovanju z Združenjem kardiologov Slovenije, Novo mesto, april 2006.
42. Chapman M, Assmann G, Fruchart JC, Shepherd J, Sirtori C. Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid-a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. Curr Med Res Opin 2004;20:1253-68.
43. Brewer HB. Raising HDL-Cholesterol and Reducing Cardiovascular Risk. Dosegljivo 17.01.2009 na URL: <http://www.medscape.com/viewarticle/520393>.

44. Fras Z, Mikhailidis DP. Statin plus ezetimibe treatment in clinical practice: the SI-SPECT (Slovenia (SI) Statin Plus Ezetimibe in Cholesterol Treatment) monitoring of clinical practice study. *Curr Med Res Opin.* 2008;24:2467-76.
45. Corson MA, Jones PH, Davidson MH. Review of the Evidence for the Clinical Utility of Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ as a Cardiovascular Risk Marker. *Am J Cardiol* 2008;101:41-50.
46. Nambi V, Ballantyne MC. Lipoprotein-associated Phospholipase A₂: Pathogenic Mechanisms and Clinical Utility for Predicting Cardiovascular Events. *Current Atherosclerosis Reports* 2006;8:374-81.
47. Saougos VG, Tambaki AP, Kalogirou M, Kostapanos M, Gazi IF, Wolfert RL, et al. Differential Effect of Hypolipidemic Drugs on Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2236-43.
48. Papathanasiou AI, Lourida ES, Tsironis LD, Goudevenos JA, Tselepis AD. Short- and long-term elevation of autoantibody titers against oxidized LDL in patients with acute coronary syndromes. Role of lipoprotein-associated phospholipase A₂ and the effect of atorvastatin treatment. *Atherosclerosis.* 2008;196:289-97.
49. Instructions for Use Secretary Phospholipase A₂ (sPLA₂) Colorimetric Assay. IBL-IMMUNO-BIOLOGICAL LABORATORIES, Hamburg. Dosegljivo 17.01.2009 na URL: <http://www.IBL-HAMBURG.COM>.
50. Dosegljivo 17.01.2009 na URL: <http://www.b58cgene.sgul.ac.uk/fib1958sop.pdf>.
51. Tapajner A, Kokol P, Povalej P, Križmarič M. Osnove statistične analize in obdelave podatkov. Maribor, 2005.
52. Dostopno 17.01.2009 na URL: http://miha.ef.uni-lj.si/_dokumenti3plus2/192138/vaje1_uvod_in_preizkusanje_domnev_2008.pdf.
53. Adamič Š. Temelji biostatistike. Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana 1995.

54. Kos M, Grabnar I, Primožič S, Mrhar A, Kmetec V. Vaje iz farmacevtske informatike (skripta za interno uporabo). Fakulteta za farmacijo, Katedra za socialno farmacijo. Ljubljana, 2002.
55. Nijmeijer R, Meuwissen M, Krijnen PAJ, van der Wal A, Piek JJ, Visser CA, et al. Secretory type II phospholipase A₂ in culprit coronary lesions is associated with myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 2008;38: 205-10.
56. O'Donoghue M, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, McCabe CH, Cannon CP, et al. Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ and Its Association With Cardiovascular Outcomes in Patients With Acute Coronary Syndromes in the PROVE IT-TIMI 22 (PRavastatin Or atorVastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction) Trial. *Circulation* 2006;113:1745-52.
57. Robins SJ, Collins D, Nelson JJ, Bloomfield HE, Asztalos BF. Cardiovascular Events With Increased Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ and Low High-Density Lipoprotein-Cholesterol. The Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:1172-78.
58. Anderson JL. Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂: An Independent Predictor of Coronary Artery Disease Events in Primary and Secondary Prevention. *Am J Cardiol* 2008;101:23-33.
59. Tedgui A, Mallat Z. Hypertension: A novel Regulator of Adaptive Immunity in Atherosclerosis? *Hypertension*. 2004;44:257-58.
60. Divchev D, Schieffer B. The secretory phospholipase A₂ group IIA: a missing link between inflammation, activated renin-angiotensin system, and atherogenesis? *Vasc Health Risk Manag* 2008;4:597-604.
61. Crisby M. Modulation of the inflammatory process by statins. *Drugs Today* 2003;39:137-43.
62. Despres JP, Lemieux I, Robins SJ. Role of fibric acid derivatives in the management of risk factors for coronary heart disease. *Drugs* 2004;64:2177-98.

63. Bocher V, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) in the regulation of lipids and inflammation control. *J Soc Biol* 2002;196:47-52.

64. Mohler ER, Ballantyne CM, Davidson MH, Hanefeld M, Ruilope LM, Johnson JL, et al. The Effect of Darapladib on Plasma Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity and Cardiovascular Biomarkers in Patients With Stable Coronary Heart Disease or Coronary Heart Disease Risk Equivalent. *JACC* 2008; 1632-41.