SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Petra Radić

**LIPOPROTEIN POVEZANA FOSFOLIPAZA A2 U OMJERU PREMA MALIM, GUSTIM LDL ČESTICAMA (sLDL) U SERUMU BOLJI JE PREDIKTOR NEPOVOLJNIH KARDIOVASKULARNIH DOGAĐAJA U BOLESNIKA SA STABILNOM ANGINOM NAKON ELEKTIVNE PERKUTANE KORONARNE INTERVENCIJE**

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen je na Zavod za intenzivnu kardiološku skrb, aritmije i transplantacijsku kardiologiju, Klinike za bolesti srca i krvnih žila Medicinskog fakulteta i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, pod vodstvom doc.dr.sc. Boška Skorića. Navedeno istraživanje dio je projekta „Fosfolipaza A2 vezana za lipoprotein (Lp-PLA2), rizični čimbenik i mogući terapijski cilj u kardiovaskularnim bolestima“ čiji je voditelj prof.dr.sc. Jasna Lovrić. Financiran je od strane Jadranskog galenskog laboratorija i predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2014./2015.

**POPIS KORIŠTENIH KRATICA**

CAD- koronarna bolest srca (engl. coronary artery disease)

IHD- ishemijska bolest srca (engl. ishemic heart disease)

PCI- perkutana koronarna intervencija (engl. percutaneous coronary intervention)

LDL-C- lipoprotein male gustoće (engl. low density lipoprotein- cholesterol)

HDL-C- lipoprotein velike gustoće (engl. high desnsity lipoprotein- cholesterol)

sLDL- male guste LDL čestice (engl. small dense low desnity lipoprotein)

CRP- C reaktivna bjelančevina (engl. C reactive protein)

hs- CRP- C reaktivna bjelančevina visoke osjetljivosti (engl. high- sensitivity C reactive protein)

lp- PLA2- lipoprotein povezana fosfolipaza A2

ox-PL- oksidirani fosfolipidi

LAD- prednji silazni krak lijeve koronarne arterije (engl. left anterior descending coronary artery)

LCx- lijeva cirkumfleksna koronarna arterija (engl. left circumflex coronary artery)

QCA- kvantitativna koronarna angiografija (engl. quantitive coronary angiography)

BMS- običan metalni stent (engl. bare metal stent)

DES- stent koji luči lijek (engl. drug- eluting stent)

EDTA- etilendiamintetraoctena kiselina (engl. ethylenediaminetetraacetic acid)

MACE- nepovoljni kardiovaskularni događaj (engl. mager adverse cardiovascular events)

TIA- tranzitorna ishemijska ataka (engl. transitory ischemic attack)

BMI- indeks tjelesne mase (engl. body mass index)

SADRŽAJ RADA

UVOD 1

HIPOTEZA 5

OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA 5

MATERIJALI I METODE 6

Odabir ispitanika 6

Elektivna perkutana koronarna intervencija 6

Klinička i laboratorijska obrada bolesnika 6

Laboratorijska analiza vrijednosti enzima 7

Statistička analiza podataka 7

REZULTATI 8

RASPRAVA 10

ZAKLJUČCI 13

ZAHVALE 14

POPIS LITERATURE 15

SAŽETAK 19

SUMMARY 20

**UVOD**

Koronarna bolest srca (CAD) ili ishemijska bolest srca (IHD) naziv je za skupinu bolesti koja uključuje stabilnu anginu pektoris, nestabilnu anginu pektoris, infarkt miokarda i iznenadnu koronarnu smrt. Navedeni klinički sindromi nastaju zbog ishemije miokarda, koja je posljedica patoloških promjena na koronarnoj cirkulaciji i nesrazmjera potrebe i opskrbe miokarda kisikom. Najčešći uzrok ovih promjena jest ateroskleroza, pa se tako i dijagnoza „ishemijska bolest srca“ u svakodnevnoj praksi koristi kao sinonim za aterosklerotsku bolest koronarnih arterija.

Ishemijska bolest srca najčešći je uzrok smrti u razvijenim zemljama Zapada. Sukladno tome uzrokuje više smrti, invalidnosti i ekonomskih troškova u odnosu na bilo koju drugu bolest (Lloyd-Jones 2010, Heidenreich et al 2011). 2013. godine CAD je bio najčešći uzrok smrti u svijetu, što je rezultiralo s 8,14 milijuna smrtnih slučajeva (16,8%). Rizik od smrti od CAD za određenu dob je smanjen između 1980. i 2010. godine (Moran et al 2014), poglavito u razvijenom svijetu što je posljedica ranog prepoznavanja, ali i suvremenog liječenja ove bolesti koje uključuje perkutanu koronarnu intervenciju (PCI) (Deb et al 2013).

Aterosklerotska bolest koronarnih arterija, sa superponiranim trombom ili bez njega, najčešći je uzrok ishemijske bolesti srca. Aterosklerotski plak koji dovodi do suženja koronarne arterije može biti stabilan ili aktiviran, te dovesti do rupture endotelne unutrašnjosti krvne žile. Vrsta plaka, odnosno postojanje trombotske komponente i težina opstrukcije krvne žile odrediti će kliničku manifestaciju bolesti. Stabilni aterosklerotski plak, sa fiksnim suženjem promjera koronarne arterije za ≥ 50% uzrokovati će ishemiju miokarda u slučaju porasta potrebe srčanog mišića za kisikom, tj. u naporu ili uslijed koronarnog spazma. Nestabilni plak ima sklonost rupturi pri čemu dolazi do tromboze *in situ.* Tromb koji nastaje na mjestu rupturiranog plaka može dovesti do potpunog zatvaranja arterije. Takva opstrukcija protoka krvi može biti prolazna ako se tromb spontano otopi ili trajna ako dođe do organizacije tromba.

Čimbenici koronarnog rizika uključuju: visoki krvni tlak, pušenje, šećernu bolest, nedostatak tjelovježbe, pretilost, visoki LDL-kolesterol (LDL-C) u krvi, niski HDL-kolesterol (HDL-C), loša prehrana i prekomjerno uzimanje alkohola (Mehta et al 2014). Jedan od markera su tzv. male, guste LDL čestice (sLDL), tj. sLDL kolesterol (sLDL-C), koji se pokazao kao vrlo snažan neovisan prediktor koronarne bolesti srca. Aterogenetski potencijal ove čestice objašnjava se njezinom pojačanom osjetljivošću na oksidaciju, slabijim odstranjivanjem iz cirkulacije u jetri, lakšim prodiranjem u stijenke arterija i povezanošću s endotelnom disfunkcijom.

Međutim, tradicionalni čimbenici kardiovaskularnog rizika objašnjavaju manje od 50% varijabilnosti ovog rizika. Nove znanstvene spoznaje ukazuju da LDL-C nije toliko snažan predskazatelj ateroskleroze, kako su upućivala ranija istraživanja. Usprkos poboljšanom postizanju ciljnih koncentracija LDL-C, još uvijek preostaje značajan ostatni rizik za komplikacije uzrokovane kardiovaskularnim bolestima. Zbog boljeg shvaćanja patofiziologije ateroklerotske bolesti i prepoznavanja uloge upale u disfunkciji endotela i pucanju kape aterosklerotskog plaka identificirani su novi biološki biljezi koji mogu pomoći kod predviđanja rizika kardiovaskularnih bolesti. Uz uporabu upalnog biljega hs-CRP (C-reaktivna bjelančevina visoke osjetljivosti) sve se više ističe drugi upalni biljeg - fosfolipaza A2 vezana za lipoprotein (Lp-PLA2) (Ballantyne et al 2004, Koenig et al 2004, May et al 2006).

Lp-PLA2 se pokazao visokospecifičnim za vaskularnu upalu, niske je biološke varijabilnosti i izravno je uključen u patogenezu napredovanja aterosklerotskog plaka (Weintraub 2008). Sama činjenica da Lp-PLA2 nastaje lokalno unutar aterosklerotske nakupine objašnjava njenu visoku specifičnost za vaskularnu upalu (Ikonamidis et al 2011, Cai et al 2013), koja ima bitnu ulogu u omogućavanju stvaranja plaka (Ross 1999, Madjid et al 2011). Primjenom monoklonskih antitijela dokazano je intenzivno bojenje Lp-PLA2 u aterosklerotskim nakupinama sklonim pucanju, dok je takvo bojenje bilo minimalno u „mlađim“ nakupinama, dakle masnim prugama ili pretežito vezivnim nakupinama (Kolodgie et al 2006). Bitno je napomenuti kako između stabilnih i nestabilnih aterosklerotskih nakupina može postojati razlika u koncentraciji aktviranih upalnih stanica, kao posljedično i povećanje koncentracije i aktivnosti Lp-PLA2 u nestabilnim plakovima (Virmani et al 2006).

Lp-PLA2 spada u skupinu unutarstaničnih i sekrecijskih fosfolipaznih enzima koji mogu hidrolizirati estersku vezu sn-2 fosfolipida staničnih membrana i lipoproteina. Lp-PLA2 proizvode makrofagi i pjenaste stanice u plaku, a u krvi je primarno povezan s LDL-česticama i jedini je enzim koji je odgovoran za hidrolizu oksidiranih fosfolipida na površinih ovih čestica (Anderson 2008). Većina s LDL-om povezane Lp-PLA2, nalazi se vezana u sLDL česticama plazme (Tellis et al 2014). Specifičnost Lp-PLA2 za polarne fosfolipide u oksidiranim LDL-česticama doprinosi nastanku daljnjih produkata, lizofosfatidilkolina i neesterificiranih masnih kiselina, koji omogućavaju procese povezane s osjetljivošću plaka *in situ* tj. proupalnim staničnim fenotipom i smrću makrofaga. Lp-PLA2 vezan za LDL je enzim koji je isključivo odgovoran za hidrolizu oksidiranih fosfolipida (ox-PL) na površini LDL-čestica i pokazuje slabu aktivnost protiv neoksidiranih fosfolipida. Ako je oksidirani LDL ili njegov ox-PL, supstrat za enzim Lp-PLA2 može se očekivati da će bolesnici s visokom koncentracijom oxPL i visokom aktivnosti Lp-PLA2 imati viši kardiovaskularni rizik (Seritć et al 2010). Manje od 20% Lp-PLA2 u krvi je povezano s HDL česticama u kojima ovaj enzim također hidrolizira oxPL, te može imati ulogu u antioksidacijskom učinku ovih lipoproteinskih čestica.

Ono što je zanimljivo jest činjenica kako je moguće kombinacijom antilipidne terapije učinkovito utjecati na sniženje serumske koncentracije i aktivnosti Lp- PLA2 (Kuvin et al 2006, Shalwitz et al 2007). Također je ustanovljeno da promjene u načinu žiovta, uključujući tjelovježbu, mogu sniziti Lp-PLA2 (Leon et al 2007). Poznato je da adipozno tkivo, osobito ono u visceralnoj masti, proizvodi upalne citokine koji se pak prenose do jetre i pokreću stvaranje CRP-a u jetri (Wellen et al 2003). Zanimljivo je da je Lp-PLA2 neovisan o pretilosti i inzulinskoj rezistenciji, iako je dokazano da mnogi bolesnici s abdominalnom pretilošću i rezistencijom na inzulin imaju povišen CRP (McLaughlin et al 2004).

Proveden je znatan broj istraživanja kojima je nađena povezanost Lp-PLA2 s koronarnom bolesti. Nekoliko epidemioloških studija pokazale su da povišena aktivnost Lp-PLA2 predviđa nepovoljnije kardiovaskularne događaje, tj. kardiovaskularnu smrt, nefatalni infarkt miokarda, potrebu za revaskularizacijskim postupcima i moždani udar (Vittos et al 2012). Tako je primjerice u studiji THROMBO, aktivnost Lp-PLA2 bila je najsnažniji predskazatelj rizika za ponavljanje infarkta miokarda (Corsetti et al 2007). Aktivnost ovog enzima pokazala se kao neovisni predskazatelj težine koronarografijom dokazane koronarne bolesti, u vidu korelacije s Gensini bodovnim sustavom (Tsimikas et al 2008). Gensinijev zbroj se izračunava prema stupnju suženja: 1 bod za 1%-25% stenozu, 2 boda za 26-50% stenozu, 4 boda za 51%-75%, 8 bodova za 76-90% stenozu, 16 bodova za 91-99% stenozu i 32 boda za potpunu okluziju. Bodovi se potom multipliciraju s koeficijentom koji predstavlja važnost položaja lezije u koronarnom sustavu. Npr. koeficijent za glavno stablo lijeve koronarne arterije iznosi 5, za proksimalni dio lijeve prednje silazne arterije (engl. left anterior descending, LAD) ili proksimalni dio lijeve cirkumfleksne arterije (engl. left circumflex, LCx) iznosi 2.5 boda, 1.5 boda za srednje segmente i 1 za distalne segmente LAD te srednji ili distalni segment LCx (Gensini). Potvrđena je i povezanost Lp-PLA2 i rizika od nastanka restenoze nakon PCI (Zheng et al 2014).

U većini ovih studija, ispitanike su u cijelosti ili većim dijelom činili bolesnici s akutnim koronarnim zbivanjem, tj. ispitanici s visokim rizikom od nepovoljnih kardiovaskularnih događaja u budućnosti.

**HIPOTEZA**

Obzirom da je aterogeni učinak Lp-PLA2 posljedica njegove interakcije s česticama LDL-a, sLDL-a i HDL-a, omjer aktivnosti Lp-PLA2 prema koncentracijama ovih lipoproteinskih čestica u krvi bolesnika je osjetljiviji prediktor rizika nastanka nepovoljnih kardiovaskularnih događaja kod bolesnika sa stabilnom anginom pektoris nakon elektivne PCI, u odnosu na apsolutnu aktivnost navedenog enzima.

**OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

Opći cilj istraživanja jest odrediti je li omjer aktivnosti Lp-PLA2 i koncentracije lipoproteinskih čestica (LDL-C, sLDL-C i HDL-C) u krvi bolji prediktor kliničkog ishoda nego apsolutna aktivnost enzima u populaciji bolesnika sa stabilnom anginom pektoris liječenih elektivnom perkutanom koronarnom intervencijom. Ovi bolesnici imaju značajno manji rizik od nastanka nepovoljnih kardiovaskularnih događaja u odnosu na bolesnike s akutnim koronarnim sindromom i hitnom perkutanom koronarnom intervencijom u kojih je dosadašnjim studijama pokazana klinička važnost Lp-PLA2.

Specifični ciljevi rada:

1. Usporediti povezanost dugoročnog kliničkog ishoda bolesnika sa stabilnom koronarnom bolešću nakon elektivne PCI s apsolutnom aktivnošću Lp-PLA2, konvencionalnim lipidnim markerima, te omjerom aktivnosti Lp-PLA2 prema LDL-C, sLDL-C i HDL-C u krvi ispitanika.

2. Ispitati povezanost aktivnosti Lp-PLA2 i angiografske težine koronarne ateroskleroze izražene tzv. Gensinijevim zbrojem.

**MATERIJALI I METODE**

1. Odabir ispitanika

Studija je započeta u listopadu 2011.g. a završena u svibnju 2013.g. Nakon potpisivanja informiranog pristanka, u ispitivanje smo uključili 60 bolesnika s angiografski dokazanom stabilnom koronarnom bolesti srca kod kojih je planirana elektivna PCI. Kriteriji neuključivanja su bili akutni koronarni sindrom u zadnjih 6 mjeseci, trudnoća i bolesnici mlađi od 18 ili stariji od 80 godina.

1. Elektivna perkutana koronarna intervencija

Svi bolesnici podvrgnuti su postupku perkutane koronarne intervencije (PCI) sa umetanjem jednog ili više koronarnih stentova ili izvođenjem obične balonske angioplastike koronarne krvne žile. Bolesnicima je koronarografija i PCI učinjen transfemoralnim ili transradijalnim putem. Na temelju kvantitativne koronarne angiografije (QCA, engl. quantitative coronary angiography) za svakog je bolesnika kvantificirana težina koronarne ateroskleroze izražena Gensinijevim bodovnim sustavom. Umetnuti stentovi bili su obični metalni stentovi (BMS- eng. bare metal stents) ili lijekom obloženi stentovi (DES, engl. drug eluting stents) prema odluci interventnoga kardiologa, te postavljeni uz primjenu heparina uz prethodnu dvostruku antiagregacijsku terapiju acetilsalicilnom kiselinom i klopidogrelom.

1. Klinička i laboratorijska obrada bolesnika

Bolesnici su nakon PCI praćeni u smislu pojave nepovoljnih kardioloških događaja: ponavljani nefatalni infarkt miokarda, kardiovaskularna smrt i ponavljanje revaskularizacijskog liječenja. Prikupljani su podatci o dobi, spolu, tjelesnoj visini, tjelesnoj masi, kardioprotektivnoj terapiji kojom su bolesnici liječeni, te o faktorima rizika (pušenje, arterijska hipertenzija, pozitivna obiteljska anamneza na koronarnu bolest, fizička neaktivnost, šećerna bolest). U krvi su određivani: glukoza u krvi natašte, CRP, ukupni kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, sLDL-kolesterol, trigliceridi, kreatinin, urati i aktivnost Lp-PLA2.

1. Laboratorijska analiza vrijednosti enzima (Colorimetric Activity Method assay, DiaDexus, San Francisco, CA, USA)

Uzorci krvi za određivanje aktivnosti Lp-PLA2 uzeti su u epruvete sa EDTA dan nakon izvođenja elektivne PCI. Otprilike 0.5 mL seruma bilo je podijeljeno u četiri epruvete za mikrocentrifugiranje, te su centrifugirane na sobnoj temperaturi (1.500 x g) kroz 15 minuta i zaleđene na -80⁰C za kasniju analizu Lp-PLA2 i sLDL-a. PLAC test za Lp- PLA2 (DiaDexus, San Francisco, CA, USA) napravljen je pomoću enzimskog testa za kvantitatvino određivanje aktivnosti Lp-PLA2 na automatskom analizatoru Roche Cobas 6000. Najveća mjerljiva vrijednost aktivnosti Lp-PLA2 jest 400 nm/min/mL. Klinička osjetljivost testa jest ≤ 10 nmol/min/mL, a to je određeno granicom kvantete (najmanja koncentracija s prihvatljivom preciznošću).

Vrijednosti sLDL- kolesterola kvantificirane su enzimsko- kolorimetrijskom metodom (Randox, UK), također na analizatoru Roche Cobas 6000. Test za sLDL sastoji se od dva koraka, te se temelji na činjenici da postoje surfaktanti i enzimi koji selektivno reagiraju sa pojedinim grupama lipoproteina. Test ima veliki raspon mjerenja između 4.0 – 100 mg/dL.

1. Statistička analiza podataka

Svi podaci su prikupljani i pohranjivani u adekvatnom formatu (Excel bazi podataka), pritom poštivajući etičke principe. Statistička analiza je rađena koristeći IBM SPSS v21 software. Metodama deskriptivne statistike su prikazani rezultati: aritmetičkim sredinama sa standardnim devijacijama za numeričke varijable, odnosno frekvencijama za kategoričke varijable. Usporedbe varijabli između dviju skupina su učinjene koristeći adekvatne testove ovisno o raspodjeli (t-test, odnosno chi-kvadrat test, Mann Whitney U test). Korelacijska analiza će se učiniti ovisno o distribuciji podataka (Pearson/Kendall tau b), dok će se međuodnos varijabli određivati korištenjem logističkog regresijskog modela. Statistički značajna razina će se smatrati p<0,05.

**REZULTATI**

U istraživanje je uključeno 60 bolesnika s dokazanom stabilnom anginom (starosti 63± 9,63 godina), a koji su podvrgnuti elektivnoj perkutanoj koronarnoj intervenciji (PCI) u Klinici za bolesti srca i krvni žila, KBC-a Zagreb. Bolesnici su praćeni do 3 godine nakon PCI. Iz praćenja je izgubljen jedan bolesnik. Od bolesnika koji su završili kliničko praćenje 14 ih je bilo ženskog, a 45 muškog spola.

U Tablici 1. prikazana je povezanost nepovoljnih kardiovaskularnih događaja (MACE) u odnosu na konvencionalne čimbenike rizika (dob, tjelesna masa, tjelesna visina, BMI, Gensinijev zbroj, ukupni kolesterol,LDL-C, CRP, kretinin, urati, trigliceridi, HDL-C, glukoza u krvi natašte, sLDL).

Između grupe bolesnika s nepovoljnim kardiovaskularninm događajima i onih bez njih, postoji statistički signifikantna razlika u vrijednostima HDL-a, gdje su više vrijednosti bile u bolesnika bez MACE-a (p=0,031).

Obe skupine su uspoređivane prema svim čimbenicima kardiogenoga rizika kako bi se provjerilo postoji li između njih signifikantna razlika. Nije nađena značajna razlika ni za jedno od sljedećih svojstava: pušenje (p=1,000), hipertenzija (p=0,710), pozitivna obiteljska anamneza (p=0,762), fizička neaktivnost (p=0,671), šećerna bolest (p=0,080).

Utvrđeno je također kako nema ni razlike između navedenih grupa prilikom uzimanja kardioprotektivne terapije: aspirin (p=0,670), ACE inhibitor (p=0,194), omega-3 masne kiseline (p=1,000), betablokator (p=0,663), inzulin (p=0,074), klopidogrel (p=0,178), kalcijev antagonist (p= 0,759). No postoji razlika u uzimanju statina (p=0,028).

Među navedenim čimbenicima rizika nije nađena korelacija s Gensinijevim zbrojem. Nema statistički značajne razlike između grupa s ili bez sljedećih rizičnih čimbenika u vrijednosti Gensinijevog zbroja: pušenje (p=0,912), hipertenzija (p=0,388), obiteljska anamneza (p=0,854), tjelesna inaktivnost (p=0,254), šećerna bolest (p=0,534). Također nema statistički značajne interkvartilne razlike između bolesnika u Gensini skoru u ovisnosti od aktivnosti Lp-PLA2.

U Tablici 2. prikazana je povezanost serumske aktivnosti Lp-PLA2 i njenog omjera prema lipoproteinskim česticama. Nađena je signifikantna razlika omjera Lp-PLA2 i sLDL (niže vrijednosti u bolesnika bez MACE-a), te omjera PLAK i HDL (niže vrijednosti u bolesnika bez MACE-a). Utvrđeno je da je povišeni Lp-PLA2/HDL povezan s MACE, ali se ta povezanost ipak pokazala ovisinom o povezanosti HDL i MACE. Dok se omjer Lp-PLA2/sLDL pokazao kao neovisan predskazatelj rizika za kardiovaskularne incidente.

**RASPRAVA**

Lipoprotein povezana fosfolipaza A2 je enzim koji je u brojnim radovima naveden kao čimbenik rizika za razvoj budućih koronarnih incidenata. No treba imati na umu kako se u tim studijama većinom radilo o vrlo heterogenoj skupini bolesnika, s velikim razlikama u težini koronarne bolesti i pratećim bolestima u kojih od početka postoji puno veći rizik za buduće kardiovaskularne komplikacije (MACE), nego u bolesnika sa stabilnom koronarnom bolesti. Do sada nije provedena studija koja bi uključivala samo takve bolesnike koji su bili podvrgnuti elektivnoj PCI.

Proveden je niz istraživanja koja povezuju Lp-PLA2 s koronarnom bolesti. Preko 25 prospektivnih epidemioloških studija je dosljedno ukazalo da povišene koncentracije, pa posljedično i aktivnosti Lp-PLA2 predviđaju kardiovaskularne događaje, a to je potvrđeno i ovom studijom.

 U usporedbi s tradicionalnim čimbenicima rizika, aktivnost Lp-PLA2 i koncentracija hs-CRP su promijenile klasifikaciju rizika u pojedinaca. Primjenom hs-CRP i Lp-PLA2 u jednom je istraživanju reklasificirano približno 39% osoba koje su prema klasičnim čimbenicima rizika bile u kategoriji srednjevelikog rizika, i to 28% u kategoriju nižeg rizika, te 11% u kategoriju višeg rizika (Nambi et al 2009). U istraživanju koje je uključivalo ispitanike u dobi od 45 do 84 godine utvrđeno je da su osobe s povišenim razinama aktivnosti Lp-PLA2 uglavnom bile starije, s brojnim tradicionalnim čimbenicima kardiovaskularnog rizika kao što su povišena glukoza u krvi natašte, povećani sistolički krvni tlak, fizička neaktivnost, inzulinska rezistencija, mikroalbuminurija itd. (Tsimikas et al 2008). U multivarijatnoj analizi nađena je pozitivna povezanost između LDL-C, Apo B-100 i koncentracija feritina te koncentracija Lp-PLA2. Autori su zaključili da je aktivnost Lp-PLA2 snažan neovisan predskazatelj budućeg ishemijskog moždanog udara, prolaznog ishemijskog napadaja (engl. Transitory Ischemic Attack, TIA) i infarkta miokarda. U drugom je istraživanju (Persson et al 2008) utvrđeno da povišena koncentracija i aktivnost Lp-PLA2 značajno predviđa kombinirane kardiovaskularne događaje, uz metabolički sindrom kao kardiovaskularni čimbenik rizika. Taj rezultat podupire preporuke da se Lp-PLA2 može koristiti za daljnju stratifikaciju kardiovaskularnog rizika u bolesnika s umjerenim rizikom i metaboličkim sindromom.

U ispitivanju (O'Donoghue et al 2006) koje je obuhvatilo bolesnike s akutnim koronarnim sindromom podvrgnute agresivnoj terapiji sniženja LDL-kolesterola pokazalo se da je i aktivnost Lp-PLA2 bila značajno snižena primjenom visokih doza statina. Također je potvrđeno da je Lp-PLA2 predskazatelj kardiovaskularnih događaja neovisan o CRP i koncentracijama LDL-kolesterola. Autori ističu da Lp-PLA2 pomaže u identificiranju bolesnika s koronarnom aterosklerozom i vrlo niskim LDL-om.

Ispitivanja bolesnika s akutnim koronarnim sindromom pokazala su da mjerenja Lp-PLA2 i LDL nisu korisna za procjenu dugoročnoga kardiovaskularnog rizika ubrzo nakon akutnog događaja, najvjerojatnije zbog akutnog smanjenja vrijednosti LDL-a koje se inače zapaža u akutnom koronarnom sindromu. Kad se, međutim, mjeri kasnije, Lp-PLA2 je prema multivarijatnoj analizi neovisan predskazatelj dugoročnoga kardiovaskularnog rizika (Zalewski et al 2006).

Na temelju najnovije znanstvene literature glavne američke kardiološke udruge (American Heart Association i American College of Cardiology) načinile su preporuke za procjenu rizika za kardiovaskularnu bolest (Smith et al 2006). Oni preporučuju Lp-PLA2 kao dodatni biljeg u tradicionalnoj procjeni rizika u bolesnika s umjerenim i visokim rizikom. Ipak, vrijednosti Lp-PLA2 još uvijek ne predstavljaju cilj liječenja (Davidson et al 2008). Zadnje europske preporuke iz 2007. godine još nisu uvrstile Lp-PLA2 ni kao čimbenik rizika, a niti kao cilj liječenja što ne znači da se to neće dogoditi već u sljedećem izdanju europskih smjernica (Graham et al 2007).

Smatra se da je proaterogenost Lp-PLA2 posljedica njezine interakcije s lipoproteinskim česticama omogućujući hidrolizu oksidiranih fosfolipida na njihovoj površini, a osobito sa sLDL koji je naročito sklon oksidaciji i snažnije je povezan s aterosklerozom u odnosu na LDL. Prema rezultatima ove studije viši omjer Lp-PLA2 prema sLDL (Lp-PLA2/sLDL-C) bio je povezan s češćom pojavom nepovoljnih kardiovaskularnih događaja za razliku od apsolutne aktivnosti Lp-PLA2, pa i omjera Lp-PLA2 prema LDL. Moguće je da veća aktivnost Lp-PLA2 na određenu količinu sLDL povećava proaterogeni učinak ovog enzima u koronarnim krvnih žilama.

Izražavanjem aktivnosti Lp-PLA2 prema sLDL-C u serumu bolesnika dobili smo osjetljiviji marker u predviđanju nepovoljnog kliničkog ishoda u bolesnika s relativno nižim rizikom od takvih događaja.

Za razliku od ranijih studija, u našoj studiji nismo uspjeli naći povezanost aktivnosti Lp-PLA2 s Gensinijevim zbrojem kao pokazateljem angiografske težine koronarne bolesti. Za pretpostaviti je kako je u ovome slučaju mogući ograničavajući faktor bio mali broj ispitanika.

Ukupni rezultati pokazali su da postoji signifikantna ralika u ispitivanim skupinama u odnosu na omjer aktivnost Lp-PLA2 i malih gustih LDL lipoproteinskih čestica u bolesnika nakon elektivne PCI. Navedeni rezultati govore u korist potrebe za daljnim istraživanjem i potvrdom ovoga omjera kao osjetljivijeg biomarkera za buduće kardiovaskularne incidente.

Preporučena buduća istraživanja uključuju: 1) ispitivanje primjene inhibitora male molekularne težine enzima Lp-PLA2; 2) daljnju evaluaciju aktivnosti Lp-PLA2 u kombinaciji s drugim biljezima, npr. niskim HDL-om, visokim lipoproteina (a) –Lp(a), visokim oksidiranim fosfolipidima itd.; 3) analize isplativosti, točnije stratifikacije rizika pomoću određivanja aktivnosti Lp-PLA2. Važno je naći i odgovor na pitanje da li liječenje bolesnika s povišenom aktivnošću Lp-PLA2 a bez povećanog LDL-kolesterola pruža kliničku korist. **ZAKLJUČCI**

Ovim istraživanjem dokazali smo kako je omjer aktivnost Lp-PLA2 i malih gustih LDL lipoproteinskih čestica u bolesnika nakon elektivne PCI, osjetljiviji prediktori za buduće kardiovaskularne komplikacije od apsolutne aktivnosti ovog enzima u serumu. Za očekivati je da se korištenjem ovakvog markera ostatnog kardiovaskularnog rizika može olakšati prepoznavanje rizičnih bolesnika u populaciji koronarnih bolesnika s manjom učestalosti pojave budućih nepovoljnih kardiovaskularnih događaja, kakvi su bolesnici sa stabilnom anginom pektoris.

Određivanje Lp-PLA2/sLDL-C bi ubuduće moglo pomoći u ranom prepoznavanju i time, agresivnijem liječenju bolesnika s aterosklerotski promijenjenim koronarnim krvnim žilama. Kako bi se dobila konačna potvrda vrijednosti Lp-PLA2/sLDL-C kao novog i boljeg kliničkog biomarkera u bolesnika s aterosklerotskom bolesti, biti će potrebne daljnje studije na većem broju ispitanika.

**ZAHVALE**

Zahvaljujem doc.dr.sc. Bošku Skoriću koji mi je omogućio izradu ovoga rada.

Također se zahvaljujem Jadranskom galenskom laboratoriju na donaciji materijala, kojim je učinjen laboratorijski dio ovoga istraživanja.

**POPIS LITERATURE**

1. Anderson JL. Lipoprotein-associated phospholipase A2: and independent predictor of coronary arteryndisease events in primary and secondary prevention. AmnJ Cardiol 2008; 101(Suppl.12A): 23F-33F.
2. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H et al. Lipoprotein- associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Circulation 2004;109: 837-42.
3. Corsetti JP, Rainwater DL, Moss AJ, Zareba W, Sparks CE. High lipoprotein-associated phospholipase A2 is a risk factor for recurrent coronary events in postinfa Deb, S; Wijeysundera, HC; Ko, DT; Tsubota, H; Hill, S; Fremes, SE. Coronary artery bypass graft surgery vs percutaneous interventions in coronary revascularization: a systematic review. JAMA 2013; 310 (19): 2086–95rction patients. Clin Chem 2006; 52: 1331-8.
4. Cai A, Zheng D, Qiu R, Mai W, Zhou Y: Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA(2)): a novel and promising biomarker for cardiovascular risks assessment. Dis Markers 2013, 34:323–331.
5. Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ et al. Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein- associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. Am J Cardiol 2008; 101(Suppl.12A): 51F-57F.
6. Deb, S; Wijeysundera, HC; Ko, DT; Tsubota, H; Hill, S; Fremes, SE. Coronary artery bypass graft surgery vs percutaneous interventions in coronary revascularization: a systematic review. JAMA 2013; 310 (19): 2086–95
7. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. Eur Heart J 2007; 28: 2375-2414.
8. Heidenreich PA, Trogdon JG, Khavjou OA, Butler J, Dracup K, Ezekowitz MD, Finkelstein EA, Hong Y, Johnston SC, Khera A, Lloyd-Jones DM, Nelson SA, Nichol G, Orenstein D, Wilson PW, Woo YJ: Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. Circulation 2011, 123:933–944.
9. Ikonomidis I, Michalakeas CA, Lekakis J, Parissis J, Anastasiou-Nana M: The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA(2)) in cardiovascular disease. Rev Recent Clin Trials 2011, 6:108–113.
10. Koenig W, Khuseyinova N, Löwel H, Trischler G, Meisinger C. Lipoprotein-associated phospolipase A2 adds to risk prediction of incident coronary events by Creactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: results from the 14-year follow- up of a large cohort from souther Germany (MONICA- Augsburg). Circulation 2004; 110: 1903-08.
11. Kolodgie FD, Burek AP, Skorija KS et al. Lipoprotein- associated phospholipase A2 protein expression in the natural progression of human coronary atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26: 2523-9.
12. Kuvin JT, Dave DM, Sliney KA et al. Effects of extended-release niacin on lipoprotein particle size, distribution, and infl ammatory markers in patients with coronary artery disease. Am J Cardiol 2006; 98: 743-5.
13. Leon AS, Wilmore JH, Ewy GA et al. Endurance exercise training reduces lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) in young white adults: the HERITAGE family study. Med Sci Sports Exerc 2007; 39(suppl): S312.
14. Lloyd-Jones DM: Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions. Circulation 2010, 121:1768–1777.
15. Madjid M, Willerson JT: Inflammatory markers in coronary heart disease. Br Med Bull 2011, 100:23–38.
16. May HT, Horne BD, Anderson JL et al. Lipoprotein- associated phospholipase A2 independently predicts the angiographic diagnosis of coronary artery disease and coronary death. Am Heart J 2006; 152: 997-1003.
17. McLaughlin TM, Abbasi F, Wolfert R, Lamendola C, Reaven G, Reaven P. Lipoprotein-associated phospholipase A2 is not increased in association with insulin resistance [abstract]. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: E-67.
18. Mehta PK, Wei J, Wenger NK. Ischemic heart disease in women: A focus on risk factors. Trends in Cardiovascular Medicine 2014; 25: 140–151.
19. Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, Murray, CJ, Naghavi M. Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. Circulation 2014; 129 (14): 1483–92
20. Nambi V, Hoogeveen RC, Chambliss L et al. Lipoprotein- associated phospholipase A2 and high-sensitivity C-reactive protein improve the stratifi cation of ischemic stroke risk in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Stroke 2009;40:376-81.
21. O’Donoghue M, Morrow DA, Sabatine MS 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.
22. Persson M, Berglund G, Nelson JJ, Hedblad B. Lp-PLA2 activity and mass are associated with increased incidence of ischemic stroke. A population-based cohort study from Malmo, Sweden. Atherosclerosis 2008; 200: 191-8.
23. Ross R: Atherosclerosis–an inflammatory disease. N Engl J Med 1999, 340:115–126.
24. Sertić J, Skorić B, Lovrić J, Božina T, Reiner Ž. Može li određivanje Lp-PLA2 pomoći u predviđanju ateroskleroze i kardiocerebrovaskularnih bolesti? Acta Med Croatica, 64 (2010) Br. 4, str. 237-245 244
25. Shalwitz RA, Maki KC, Doyle RT, Ballantyne CM. Lipoprotein subfraction responses differentially predict changes in lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) during prescription omega-3 therapy. Program and abstracts of the Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2007; April 19-21, 2007; Chicago, Illinois. Abstract P383.
26. Smith SC, Allen J, Blair SN et al. AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update. Circulation 2006; 113: 2362-72.
27. Tellis CC, Tselepis AD. Pathophysiological role and clinical significance ofn lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) bound to LDL and HDL. Curr Pharm Des 2014; 20(40): 6256-69.
28. Tsimikas S, Willeit J, Knofl ach M i sur. Lipoprotein- associated phospholipase A2 activity, ferritin levels, metabolic syndrome, and 10-year cardiovascular and non-cardiovascular mortality: results from the Bruneck study. Europ Heart J 2008;30:107-1
29. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. J Am Coll Cardiol 2006; 47: C13-C18.
30. Vittos O, Toana B, Vittos A, Moldoveanu E, Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2): a review of its role and significance as a cardiovascular biomarker, Biomarkers, vol. 17, no. 4, pp. 289–302, 2012.
31. Weintraub HS. Identifying the vulnerablebpatient with rupture-prone plaque. Am J Cardioln2008;101(Suppl.12A): 3F-10F.
32. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced infl ammatory changes in adipose tissue. J Clin Invest 2003; 112: 1785-8.
33. Zalewski A, Nelson JJ, Hegg L, MacPhee C. Lp-PLA2: a new kid on the block. Clin Chem 2006; 52: 1645-50.27.
34. Zheng D, Zeng F, Cai A, et al. Baseline elevated Lp-PLA2 is associated with increased risk for re-stenosis after stent placement. Lipids Health Dis. 2014;13:41.

**SAŽETAK**

**Lipoprotein povezana fospolipaza A2 u omjeru prema mali, gustim LDL česticama (sLDL) u serumu bolji je prediktor nepovoljniih kardiovaskularnih događaja u bolesnika sa stabilnom anginom nakon elektivne perkutane koronarne intervencije**

**Petra Radić**

Lipoprotein povezana fosfolipaza A2 (Lp-PLA2) je visokospecifična za vaskularnu upalu te igra bitnu ulogu u upali aterosklerotskoga plaka. Lp-PLA2 je sekretorna fosfolipaza koju proizvode makrofagi i pjenušave stanice u aterosklerotskome plaku. Enzim hidrolizira oksidirane fosfolipide na površini lipoproteina, te je vezan u krvi većinom na LDL čestice. Ovaj enzim hidrolizira i oksidirane fosfolipide na HDL česticama.

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi je li omjer Lp-PLA2 i lipoproteinskih čestica povezanih s funkcijom ovoga enzima, bolji prediktor kliničkog ishoda u bolesnika nakon perkutane koronarne intervencije nego apsolutna serumska aktivnost enzima Lp-PLA2. Za razliku od prethodnih studija koje su većinom ispitivale bolesnike s akutnim koronarnim sindromom, ovo je bila prospektivna studija koja je uključila 59 bolesnika sa stabilnom anginom pektoris kojima je učinjena elektivna perkutana koronarna intervencija (PCI). Bolesnici su praćeni u smislu pojave nepovoljnih kardioloških događaja: ponavljani nefatalni infarkt miokarda, kardiovaskularna smrt i ponavljanje revaskularizacije. Aktivnost Lp-PLA2 u serumu nije bila prediktor za budući nepovoljni ishod, no viši omjer Lp-PLA2/sLDL bio je signifikantno povezan s neželjenim ishodom u dugoročnom praćenju.

Iako ova studija zahtjeva daljnje potvrde, sugerira novi pristup boljoj predikciji kardiovaskularnoga rizika koja se temelji na kombiniranom mjerenju biomarkera koji su uključeni u interakcije Lp-PLA2 i stijenke krvnih žila.

Ključne riječi: lipoprotein povezana fosfolipaza A2, koronarna arterijska bolest, elektivna PCI

**SUMMARY**

**The ratio of lipoprotein-associated phosholipase A2 and small, dense LDL (sLDL) in serum is better predictor of adverse cardiovascular events in patients with stable angina after elective percutaneous coronary intervention**

**Petra Radić**

Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) is highly specific for vascular inflammation and plays a causative role in atherosclerotic plaque inflammation. Lp-PLA2 is secretory phospholipase, formed by macrophages and foam cells in atherosclerotic plaque. It hydrolyzes oxidized phospholipids at the surface of lipoproteins and is associated primarily with LDL particles in blood. Lp-PLA2 also hydrolyzes oxidized phospholipids on HDL particles.

We have tested whether the ratios of Lp-PLA2 and lipoproteins (Lp-PLA2/LDL-C, Lp-PLA2/sLDL-C and Lp-PLA2/HDL-C) are better predictors of clinical outcomes than the Lp-PLA2 activity alone. Unlike the previous studies that have mostly included patients with acute coronary syndrome, this was a prospective study that included 59 patients with stabile angina pectoris that have undergone elective percutaneous coronary intervention (PCI). Primary end-point was a composite of cardiovascular death, non-fatal myocardial infarction and the need for repeat revascularization.

In our study population, the sole Lp-PLA2 activity was not predictive for future outcome. However, high Lp-PLA2/sLDL ratio was strongly associated with adverse events.

Although this study requires further confirmation, it suggests a new approach to better prediction of cardiovascular risk based on combined measurement of biomarkers involved in the interaction of Lp - PLA2 and vascular wall.

Keywords: lipoprotein-associated phospholipase A2, coronary artery disease, elective PCI

Tablica 1. Rizični faktori za aterosklerotsku bolest

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Skupina premaMACE | N | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | p |
| Dob [godine] | NE | 43 | 65,12 | 9,336 | 0,069 |
| DA | 16 | 60,00 | 9,723 |  |
| Tjelesna masa [kg]  | NE | 41 | 83,83 | 14,687 | 0,569 |
| DA | 16 | 81,38 | 14,099 |  |
| Tjelesna visina [m] | NE | 41 | 1,7293 | ,08454 | 0,772 |
| DA | 16 | 1,7219 | ,09005 |  |
| BMI [kg/m2] | NE | 41 | 27,8954 | 3,59085 | 0,620 |
| DA | 16 | 27,3659 | 3,64666 |  |
| Gensini score | NE | 43 | 38,465 | 28,6837 | 0,890 |
| DA | 16 | 37,406 | 16,8654 |  |
| Ukupni kolesterol [mmol/L] | NE | 40 | 4,5395 | 1,02699 | 0,838 |
|  | DA | 15 | 4,4667 | 1,50222 |  |
| LDL-kolesterol [mmol/L] | NE | 43 | 2,3395 | 1,12969 | 0,414 |
|  | DA | 16 | 2,0606 | 1,23420 |  |
| CRP [mg/L] | NE | 40 | 5,0288 | 8,62583 | 0,925 |
|  | DA | 16 | 4,8019 | 6,66650 |  |
| Kreatinin [mg/dL] | NE | 40 | 100,8000 | 21,17473 | 0,113 |
|  | DA | 16 | 142,9375 | 164,13469 |  |
| Urati [mg/dL] | NE | 40 | 343,7250 | 64,98481 | 0,519 |
|  | DA | 16 | 330,8750 | 71,91094 |  |
| Trigliceridi [mmol/L] | NE | 40 | 1,5380 | ,65083 | 0,835 |
|  | DA | 16 | 1,7875 | 1,08376 |  |
| HDL- kolesterol [mmol/L] | NE | 40 | 1,2368 | ,30191 | 0,031\* |
|  | DA | 16 | 1,0519 | ,22412 |  |
| Omjer trigliceridi/HDL | NE | 40 | 1,2549 | ,77898 | 0,223 |
|  | DA | 16 | 1,8950 | 1,45447 |  |
| Glukoza u krvi [mmol/L] | NE | 40 | 5,8550 | 1,57512 | 0,128 |
|  | DA | 16 | 6,8813 | 2,39116 |  |
| sLDL [mg/dL] | NE | 43 | ,6565 | ,30660 | 0,334 |

Tablica 2. Povezanost aktivnosti Lp-PLA2 i njezinom omjera prema koncentracijama sLDL-C, LDL-C i HDL-C

|  |
| --- |
|  |
|  | Skupina premaMACE | N | Aritmetička sredina | Standardna devijacija | P |
| Lp-PLA2 [nm/min/mL] | NE | 43 | 168,479 | 37,8449 | 0,148 |
| DA | 16 | 186,294 | 50,2862 |  |
| Lp-PLA2/sLDL | NE | 43 | 293,2914 | 103,65765 | 0,022\* |
| DA | 16 | 407,8430 | 273,53245 |  |
| Lp-PLA2/HDL | NE | 40 | 148,2895 | 52,84034 | 0,033\* |
| DA | 16 | 183,1833 | 56,17960 |  |
| Lp-PLA2/LDL | NE | 40 | 79,3987 | 42,67386 | 0,108 |
| DA | 15 | 99,8304 | 37,05414 |  |

Životopis autora rada:

Petra Radić studentica je 5. godine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Studij za doktora medicine upisala je 2010. godine. Također je demonstrator na katedri za Internu medicinu, na hrvatskom i engleskom programu, te je bila demonstrator na katedrama za Anatomiju i Medicinsku kemiju i biokemije. Član je vodstva Kardiološke sekcije Medicinskoga fakulteta u Zagrebu, a jednako tako i urednik rubrike Studentski život u studentskom časopisu Medicinar. Aktivni je član udruge EMSA, gdje sudjeluje na različitim projektima koji se održavaju na nacionalnoj i internacinalnoj razini, te je aktivno sudjelovala u nizu kongresa sa međunarodnim sudjelovanjem. 2014. godine sudjelovala je na jednomjesečnoj praksina odjelu kardiologije u Katholisches Karl-Leisner-Klinikum, Kleve, u Njemačkoj. Od 2014. godine uključena je i u istraživanje na Klinici za onkolgiju KBC-a Zagreb, na temu karcinoma dojke.