

PLAC Test: Lp-PLA₂ – nový marker pro stanovení rizika kar- diovaskulárních one- mocnění (KVO).

M. Hrouda

Koronární choroby a cévní mozkové příhody jsou stále nejčastější příčinou úmrtí nejen v ČR ale ve všech vyspělých zemích světa. Daleko převyšují úmrtnost na všechny nádory, infekční choroby, nehody nebo diabetes mellitus¹. Významné pokroky v léčbě v posledních třiceti letech, změna životního stylu a omezení kouření v populaci vedlo postupně ke snižování incidence KVO. Přesto lze vzhledem ke stárnutí populace a zvyšující se prevalenci metabolického syndromu působeného epidemickým nárůstem obezity očekávat postupné snižování rychlosti tohoto poklesu.

KV zdravotní komplikace, následně manifestace onemocnění a snížená funkčnost a kvalita života jako důsledek kardiovaskulárních příhod neúměrně zatěžují zdravotní systém i populaci v ČR. Pokud nedojde k významnému zvýšení intenzity aplikace nyní již známé primární a sekundární preventivní léčby, stárnutím populace, prevalence KVO dále zhorší kvalitu života a enormně zatíží národní ekonomii.

Ve snaze zhodnotit riziko rozvoje KVO byly vypracovány různé multifaktoriální modely rizika. Pracovní skupina pověřená vytvořením Evropských doporučení pro prevenci kardiovaskulárních onemocnění v klinické praxi doporučuje používat nedávno vypracovaný model a tabulky rizika SCORE². Základním prvkem modelu je definování rizika z hlediska 10leté pravděpodobnosti vzniku fatální kardiovaskulární příhody. Významnou roli v něm hrají konvenční rizikové faktory, jako jsou věk, kouření, obezita, hypercholesterolemie a krevní tlak³.

Je ale zjevné, že prediktivní modely založené na tradičních rizikových faktorech, ačkoliv adekvátní na populační úrovni, mají relativně nízkou senzitivitu a specifitu pro individuální KVO. Problém v odhadu kardiovaskulárního rizika spočívá v tom, že 62,4 % jedinců diagnostikovaných již s KVO nemělo žádný nebo pouze jeden z konvenčních rizikových faktorů (hypertenze, kouření, hypercholesterolemie a diabetes)⁵.

Preventivní opatření jsou nejvíce účinná, pokud jsou zaměřena na jedince s nejvyšším rizikem. V ideálním případě by měly být adekvátním způ-

sobem kontrolovány všechny rizikové faktory KVO. Neustále přibývá důkazů o tom, že čím agresivněji je individuální rizikový faktor modifikován, tím vyšší je dosažený benefit⁴. Z toho vyplývá nezbytnost lepší a efektivnější identifikace vysoce rizikových osob.

Před lékaři tak stojí dvě významné výzvy: Odpovídající identifikace pacientů se zvýšeným rizikem, u kterých by měla být zahájena farmakologická terapie a po počáteční terapii stanovení úrovně managementu globálního rizika směřujícího k adekvátní redukci rizika KVO.

V současnosti je základem prevence KVO management cholesterolu. Ačkoliv je hladina cholesterolu široce využívána jako marker koronárního zdraví, její výpovědní hodnota pro předpověď kardiovaskulární příhody je velmi omezená. Pouze asi 50 % jedinců, u kterých došlo ke KVO, bylo identifikováno použitím pouze hladiny cholesterolu. 80 % jedinců s IM má podobnou úroveň hladiny cholesterolu jako jedinci bez IM⁷.

Výše zmíněnou problematiku dobře ilustruje následující studie. Při retrospektivní analýze 222 mladých dospělých jedinců s předčasným IM se ukázalo, že jejich hladiny LDL a HDL v krvi jsou relativně v pořádku. Pouze 12 % z nich by bylo při použití konvenčních rizikových faktorů správně zařazeno do skupiny vysoce rizikových osob a pouze polovina by byla doporučena farmakoterapie⁸.

Největší část KVO je spojena s aterosklerózou. Současný pohled na aterosklerózu se posunul od lokálního onemocnění se symptomy způsobenými závažnou stenózou k systémovému onemocnění charakterizovanému zánětem plátu s potenciálem k ruptuře a trombóze, který přeměňuje substenotickou aterosklerotickou lézi na plně okluzivní lézi. Je známo, že koronární ateroskleróza je přítomná u téměř všech dospělých středního věku. Současné studie ukazují, že měřitelná ateroskleróza je přítomná i u nediodagnostikovaných zdravých jedinců, a že ateroskleróza se začíná vyvíjet již v časných stadiích života⁹. Tyto nálezy reprezentují časná stadia dlouhodobého procesu maturace plátů, trvající i několik desetiletí, které kulminují v zánětu plátu, ztenčení fibrózního krytu a nakonec v ruptuře nestabilního plátu a trombóze, která způsobuje většinu KV případů.

Cílem preventivní kardiologie by tedy mělo být stanovení, zda se ateroskleróza vyvinula do stadia, kdy již probíhá zánět plátu a dochází k jeho destabilizaci. Vystává tak potřeba neinvazivního, reprodukovatelného a dostupného prostředku pro identifikaci jedinců s nestabilním plátem náchylným k ruptuře.

Kolodgie et al.¹⁰ prezentoval v roce 2006 studii, která ukázala, že uvnitř nekrotického jádra a v okolních makrofázích pokročilá aterosklerotická léze dochází k velmi výrazné expresii enzymu Lp-PLA₂ (lipoprotein asociovaná fosfolipáza A₂). Zatímco nestabilní pláty s tenkým fibrózním krytem nebo rupturované pláty mají vysokou expresi, méně pokročilá léze nemají žádnou nebo pouze nepatrnou expresi Lp-PLA₂. Tato studie potvrdila, že Lp-PLA₂ hraje významnou roli v ustavení nestability plátu a může být vhodným markerem pro identifikaci přítomnosti plátu náchylného k prasknutí (Obr. č. 1 a 2.).

Fosfolipázy A₂ představují rodinu vnitrobuněčných a sekretovaných enzymů. Zahrnují skupinu sekretovaných izoform PLA₂ (sPLA₂) a enzym Lp-PLA₂ známý také pod názvem „Trombocyty aktivující faktor (PAF)-acetylhydroláza (AH)“. Lp-PLA₂ je serinová lipáza, nezávislá na kalcium, o velikosti 45,4 kDa. Enzym katalyzuje přeměnu oxidovaného fosfatidylcholinu na volné, neesterifikované mastné kyseliny a lysofosfatidylcholin (lysoPC). Výsledné lipidové produkty jsou bioaktivní a zprostředkovávají zánětlivé procesy, které vedou k aterogenezi (viz. Tab. č. 1).

Tabulka č. 1. Působení LysoPC a oxidovaných volných mastných kyselin¹¹

Působení lysoPC
<ul style="list-style-type: none"> - chemoatraktant lidských monocytů a T lymfocytů - endoteliová dysfunkce - indukce exprese endoteliálních adhezivních molekul pro leukocyty - proliferace hladkého svalstva a makrofágů - zvýšená exprese PDGF (růstový faktor odvozený z trombocytů) a EGF-like proteiny vážící heparin - uvolňování kyseliny arachidonové - apoptóza - aktivace NADPH oxidázy - uvolňování myeloperoxidázy - zvýšená permeabilita membrán
Působení oxidovaných volných mastných kyselin
<ul style="list-style-type: none"> - chemoatraktant monocytů - zvyšuje expresi VCAM-1 - zvýšená permeabilita membrán - apoptóza

Molekuly Lp-PLA₂ jsou sekretovány do plazmy hematopoetickými buňkami, převážně makrofágy a do určité míry i T-lymfocyty, hepatickými Kupferovými buňkami a žírnými buňkami a následně asociovány s lipoproteiny. Jsou transportovány převážně na LDL (80-85 %, preferenčně na subfrakcích malých denzních partikulí) a v 15-20 % na HDL.

V aterosklerotických plátech se nalézá Lp-PLA₂ přinesená do intimy prostřednictvím LDL, a následně zejména ta, která je produkována výše zmíněnými inflamatorními buňkami. Zvýšená úroveň Lp-PLA₂ zvyšuje riziko infarktu myokardu nebo cévní mozkové příhody.

Spojení zvýšené hladiny Lp-PLA₂ v krvi se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem bylo prokázáno v řadě epidemiologických studií. Většina demonstrovala, že Lp-PLA₂ je silným a nezávislým prediktorem rizika. Síla vázanosti na KV riziko a nezávislost byly signifikantní i po adjustaci na tradiční kardiovaskulární rizikové faktory a další proměnné, včetně hsCRP, fibrinogenu, počtu bílých krvinek, sérový amyloid

A, proBNP, cystatinC, ApoB, faktor VII, D-dimer, troponin I a von Willebrandtův faktor (přehled Ali a Mahjid¹¹). Další studie prokázaly, že hladina Lp-PLA₂ je nezávislá na kouření, metabolickém syndromu, obezitě a diabetu. Test stanovující hladinu nebo aktivitu Lp-PLA₂ v mnoha studiích vykázal přínos jak v primární, tak i v sekundární prevenci KVO.

Meta analýza 32 prospektivních studií prokázala, že z hlediska KV rizika je výpovědní hodnota samotné hladiny Lp-PLA₂ na stejné úrovni jako vysoký krevní tlak nebo cholesterol a odhaluje tu část rizika, která byla klasickým rizikovým faktorům nedostupná¹⁶.

Panel odborníků American Heart Association/Center for Disease Control (AHA/CDC) zařadil nedávno testy na Lp-PLA₂ do doporučených postupů, „guidelines“, pro testování rizika kardiovaskulárního onemocnění v klinické praxi¹². V souladu s doporučeními pro používání inflamatorních markerů, doporučují používat test na Lp-PLA₂ jako doplňkové hodnocení pacientů tradičními rizikovými faktory, u pacientů se středním a vysokým rizikem. Cílový-

mi jedinci mohou být pacienti se dvěma nebo více rizikovými faktory, jako jsou např. genetická predispozice ke KVO nebo hypertenze, a to i v případě, že obecný lipidický profil těchto jedinců vypadá normálně. Zvýšená koncentrace Lp-PLA₂ v séru pacientů by měla být rychle následována přehodnocením rizika směrem k vyšší kategorii, ze střední na vysokou a z vysoké na velmi vysokou (Obr. č. 3). Je známo, že pacienti s vysokým rizikem profitují ze snížení LDL cholesterolu a z intenzivní změny životního stylu bez ohledu na počáteční hladinu LDL¹³. Proto by měla být zahájena adekvátní léčba odpovídající změněné rizikové kategorii, včetně změny cílové hodnoty LDL cholesterolu.

Lp-PLA₂ je tak doporučován jako diagnostický test pro vaskulární zánět k identifikaci pacientů s vysokým nebo velmi vysokým rizikem, kteří by měli profitovat z intenzifikace terapií zaměřených na modifikaci hladiny lipidů¹².

Jediným komerčně dostupným diagnostickým testem pro stanovení koncentrace Lp-PLA₂ v lidském séru nebo plasmě je PLAC Test firmy diaDexus (South San Francisco, USA). PLAC Test byl jako jediný krevní test schválen FDA k hodnocení rizika jak koronární nemoci, tak i ischemické cévní mozkové příhody spojených s aterosklerózou (87 % mozkových příhod je ischemických⁶). Jde o kvantitativní test, který vyžaduje použití tří nezávislých

sad reagensů: PLAC Test – reagenční kit, PLAC Test – kalibrační kit a PLAC Test – kontrolní kit¹⁵ (Obr. č. 4). O riziku Lp-PLA₂ vypovídá jak měření aktivity enzymu tak i jeho koncentrace ve vzorku. Studie prokázaly, že výpovědní hodnota z hlediska rizika kardiovaskulárních onemocnění je u obou měření přibližně stejná¹¹.

PLAC Test je založen na bázi imunoassay, která využívá dvou vysoce specifických monoklonálních protilátek (2C10 a 4B4), navázaných na polymerní mikročástice. Měření koncentrace Lp-PLA₂ v lidském séru nebo plasmě se provádí přímo, turbidimetricky. Lp-PLA₂ se ve vzorcích pacientů specificky váže k monoklonálním protilátkám. Při vazbě Lp-PLA₂ dochází v suspenzi ke změnám turbidity, jejímž důsledkem je měřitelná změna absorbance při 570 nm. Tato změna v absorbanci je úměrná koncentraci Lp-PLA₂ ve vzorku pacienta. Koncentrace Lp-PLA₂ ve vzorku se stanovuje interpolací ze standardní křivky absorbance a koncentrace Lp-PLA₂ vytvořené na základě souboru Lp-PLA₂ – kalibrátorů¹⁵. Test je k dispozici i ve formátu ELISA.

PLAC Test se provádí na řadě běžných automatických analyzátorů pro klinickou biochemii. Jde o jednoduchý test a odběr vzorků nevyžaduje hladovění pacienta. Pro každý typ přístroje je vypracován aplikační list, který specifikuje použití jednotlivých reagensů a optimální postup kalibrace¹⁵ (Tab. č. 2).

Tabulka č. 2. Seznam přístrojů použitelných pro PLAC Test*

Výrobce	Typ přístroje
Abbott	ARCHITECT
Beckman	Synchron CX-7
Beckman	Synchron DxC
Beckman	Synchron LX-20
BioLis (Prestige)	24i
Olympus	AU-400, AU-640 a AU-2700
Roche	Cobas C501
Roche	P Module
Roche / Hitachi	917
Siemens	ADVIA 1650, 1800 a 2400

*Seznam přístrojů se průběžně doplňuje

Lp-PLA₂ je cévně specifický marker, který není tak jako jiné markery (např. hsCRP) ovlivněn systémovým zánětem (infekcí, obezitou, kouřením). U zdravých jedinců hladina Lp-PLA₂ není obvykle zvýšena

a má nízkou biovariabilitu srovnatelnou s LDL a HDL a výrazně nižší než hsCRP¹⁴ (Obr.č. 5). PLAC Test má velmi dobrou opakovatelnost a reprodukovatelnost¹⁵ (Tab. č. 3).

Tabulka č. 3. PLAC Test - Přesnost měření

Vzorek	Průměrná koncentrace Lp-PLA ₂ (ng/ml)	Intra-assay %CV N=80	Inter-assay %CV N=20	Celkem %CV N=80
Sérum	68,5	2,4	2,1	3,2
Kontrola 1	143,9	2,0	1,6	2,5
Kontrola 2	448,8	1,6	0,8	1,8

Pro důkladné posouzení rizika infarktu myokardu nebo cévní mozkové příhody doporučují odborníci integrovat test na Lp-PLA₂ do komplexní nabídky

vyšetření kardiologických markerů. Příklad takovéto nabídky je uveden v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4. Integrace Lp-PLA₂ do nabídky kardiologických vyšetření pro stanovení rizika infarktu myokardu nebo cévní mozkové příhody

NABÍDKA VYŠETŘENÍ	PANEL TESTŮ
Základní panel	Lipidový panel + Lp-PLA ₂ (pokud kterýkoliv z testů poskytne nenormální výsledky, proveďte rozšířený panel vyšetření)
Rozšířený panel	Lipidový panel + ApoB nebo LDL-P + Lp-PLA ₂ + hs-CRP + Lp(a)
Komplexní panel	Lipidový panel + ApoB nebo LDL-P + Lp-PLA ₂ + hs-CRP + Lp(a) + NTproBNP + fibrinogen

Závěrem lze říci, že PLAC Test pro stanovení hladiny Lp-PLA₂ má potenciál stát se významným nástrojem v prevenci kardiovaskulárního rizika a snížit tak velmi vysoké náklady spojené s KVO.

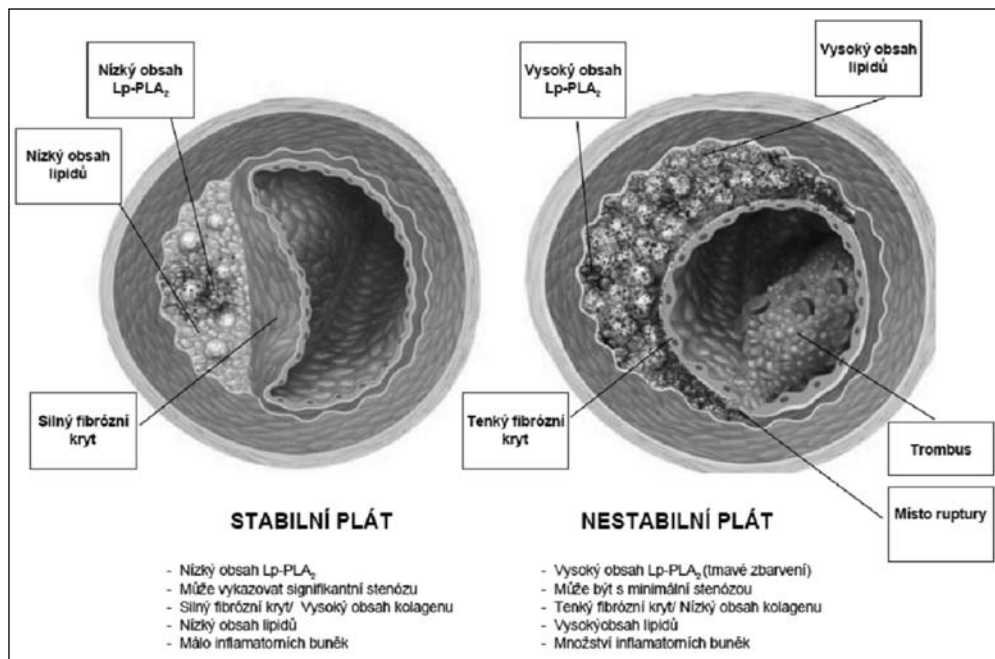
1. Zdravotnictví v ČR 2008 ve statistických údajích, UZIS 2009.
2. Conroy R. M. et al.: Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE Project. *Eur Heart J* 2003;11: 987–1003.
3. Cífková R. a spol. Prevence kardiovaskulárních onemocnění v dospělém věku. *Supplementum Cor Vasa* 2005;47(9):3–14.
4. Davidson M. H. Advances in the detection of rupture-prone plaque: The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in cardiovascular risk assessment. *Am. J. Cardiol. Supplement* 2008; 101,
5. Khot U. M. et al.: Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *JAMA* 2003;290: 898-904.
6. CDC. AHA Statistical Update 2007.
7. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. *JAMA* 2001;285: 2486-2497.
8. Akosah et al.: Preventing myocardial infarction in the young adult in the first place: how do the national cholesterol education panel III guidelines perform? *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 41: 1475-1479.

9. Tuzcu et al.: High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular intrasound. *Circulation* 2001; 103:2705-2710.
10. Kolodgie F. D. et al.: Lipoprotein associated phospholipase A2 protein expression in the natural progression of human coronary atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006; 26: 2523-2529.
11. Ali M. a Madjid M.: Lipoprotein-associated phospholipase A2: a cardiovascular risk predictor and potential therapeutic target. *Future Cardiol.*, 2009; 5(2): 159-173.
12. Davidson M. H. et al.: Consensus Panel Recommendation for Incorporating Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Testing into Cardiovascular Disease Risk Assessment Guidelines. *Am. J. Cardiol.* 2008; 101(12) Supplement: S51-57.
13. Reddy J. K. et al.: The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 on cardiovascular disease risk assessment and plaque rupture: a clinical review. *J. Clin. Lipidology* 2009; 3: 85-93.
14. Lerman A, McConnell JP.: Lipoprotein-Associated Phospholipase A2: A Risk Marker or a Risk Factor? *Am. J. Cardiol.* 2008; 101(12) Supplement: S11-S22.
15. PLAC Test Reagent Kit: Příbalové informace. DiaDexus Inc., 2009.

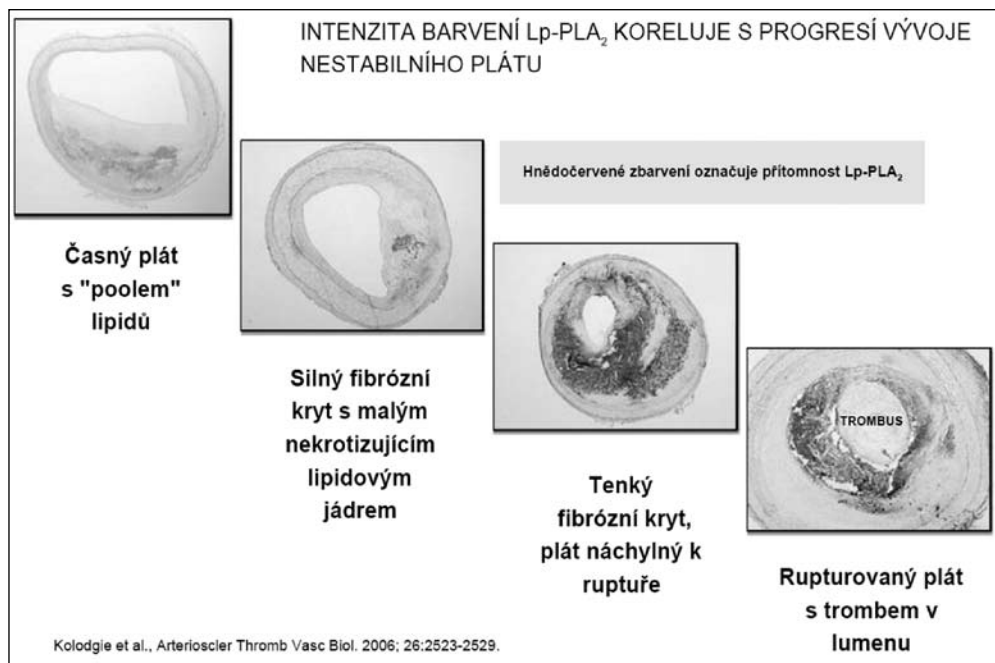
16. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. Lancet 2010; 375: 1536–44.

PLAC je registrovanou známkou diaDexus, Inc.

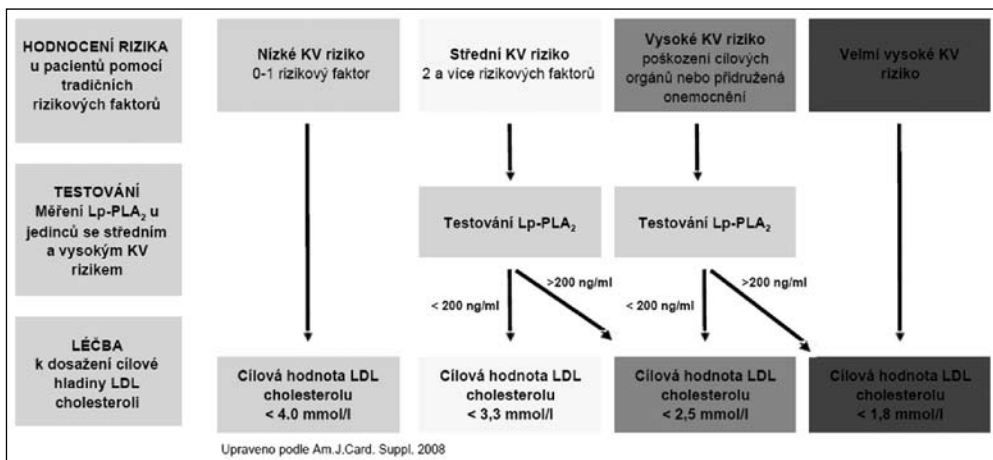
Obrázek č. 1. Stabilní a nestabilní plát



Obrázek č. 2. Vzrůst obsahu Lp-PLA₂ v korelaci s progresí vývoje nestabilního plátu




Obrázek č. 3. Doporučení pro použití PLAC Testu



Obrázek č. 4. PLAC Test

PLAC Test



<p>Kontrolní kit</p> <ul style="list-style-type: none"> - Low < 200 ng/ml (2 ml) - High > 300 ng/ml (2 ml) 	<p>Kontrolní kit</p> <ul style="list-style-type: none"> - Reagencie 1 (24 ml) - Reagencie 2 (8,4 ml) 	<p>Kalibrační kit</p> <ul style="list-style-type: none"> - 0 ng/ml (2 ml) - 50 ng/ml (2 ml) - 100 ng/ml (2 ml) - 250 ng/ml (2 ml) - 500 ng/ml (2 ml)
---	---	--

Obrázek č. 5. Zvýšená hladina Lp-PLA₂ u zdravých osob a biovariabilita Lp-PLA₂

