

Využitie fluorescenčnej analýzy pri včasnej diagnostike akútneho koronárneho syndrómu

Bohó A¹, Tomečková V², Sedláková E³

Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, Slovenská republika

Boho A, Tomeckova V, Sedlakova E. **The application of fluorescence analysis in early acute coronary syndrome diagnostics.** Cardiology Lett. 2012;21(2):124–130

Abstract. Blood serum is considered to be a dynamic, under physiological conditions relatively constant, biomaterial which contains natural substances characterized by fluorescence capability. These endogenous fluorescent markers are regarded as a source of valuable information about physiological and also pathological processes, and research into them opens new opportunities of early acute coronary syndrome (ACS) diagnostics with the use of minimum sample amount. At the present time there is a constant effort to discover new, quick and available markers or diagnostic methods in the pursuit of improvement and acceleration of the cardiovascular diseases diagnostic process. In our work, we would like to contribute to the definition of a new possible principle in acute coronary syndrome diagnostics. The pilot group comprised 10 healthy individuals and 26 patients with diagnosed ACS. The results of blood serum fluorescence of healthy individuals and patients with ACS were mutually compared from the visual and mathematical point of view. The studied groups demonstrated the considerable differences in the fluorescence curve shape and the increase of fluorescence intensity in the individual characteristic studied areas. Fig. 5, Ref. 12, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: fluorescence – blood serum – acute coronary syndrome

Bohó A, Tomečková V, Sedláková E. **Využitie fluorescenčnej analýzy pri včasnej diagnostike akútneho koronárneho syndrómu.** Cardiology Lett. 2012;21(2):124–130

Abstrakt. Krvné sérum sa považuje za dynamický, pri fyziologických podmienkach relatívne stály biomateriál, v ktorom sa prirodzene nachádzajú látky vyznačujúce sa schopnosťou fluorescencie. Tieto endogénne fluorescenčné markery sú zdrojom cenných informácií o fyziologických, ako aj patologických procesoch a ich skúmanie otvára nové možnosti včasnej diagnostiky akútneho koronárneho syndrómu (AKS) s použitím minimálneho množstva vzorky. Aj v súčasnosti sa neustále vynakladá veľké úsilie na objavenie nových, rýchlych a dostupných markerov, či diagnostických postupov v snahe urýchliť a zlepšiť diagnostický proces kardiovaskulárnych ochorení. Našou prácou by sme aj my chceli prispieť k zadefinovaniu nového princípu diagnostiky akútneho koronárneho syndrómu. Pilotný súbor tvorilo 10 zdravých jedincov a 26 pacientov s diagnostikovaným AKS. Výsledky fluorescencie krvného séra zdravých jedincov a pacientov s AKS boli navzájom vizuálne aj matematicky porovnávané. Sledované skupiny preukázali významné rozdiely v tvare fluorescenčnej krivky a náraste intenzity fluorescencie v jednotlivých sledovaných charakteristických oblastiach. Obr. 5, Lit. 12 Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: fluorescencia – krvné sérum – akútny koronárny syndróm

Fluorescenčné metódy detegujú a matematicky spracúvajú fluorescenčný signál fluorofórov – látok schopných po excitácii emitovať žiarenie (1). Vďaka schopnosti citlivo monitorovať ne-

patrné odchýlky fluorescencie endogénnych látok a zachytávať zmeny na molekulovej úrovni sú vhodné na včasnú diagnostiku a skrining (2). Krvné sérum je zmesou viacerých fyziologicky

Z¹Lekárskej fakulty UPJŠ, Košice, ²Ústavu lekárskej chémie, biochémie, klinickej biochémie Univerzity P. J. Šafárika, Lekárska fakulta, Košice a ³Ústavu patologickej fyziológie Univerzity P. J. Šafárika, Lekárska fakulta, Košice, Slovenská republika

Do redakcie prišlo dňa 30. mája 2011; prijaté dňa 29. novembra 2011
Adresa pre korešpondenciu: Alexander Bohó, Žánovská 129, 979 01 Rimavská Sobota, Slovenská republika, e-mail: alexanderbohoh@gmail.com

sa vyskytujúcich fluorofórov: aromatických aminokyselín, proteínov, koenzýmov, vitamínov a metabolitov, ktoré sa podieľajú na látkovej premene. Tieto fluorofóry sa navzájom ovplyvňujú, môžu zosilňovať, znižovať alebo vzájomne zhášať svoju fluorescenciu, a preto sa niektoré z nich zúčastňujú na celkovej fluorescencii viac, iné menej (1). Krvné sérum teda predstavuje z kvalitatívnej aj kvantitatívnej stránky charakteristickú zmes prirodzene sa vyskytujúcich endogénnych fluorofórov.

Fluorescenčné maximá jednotlivých aktívnych látok multi-fluorescenčného systému krvného séra sa navzájom prekrývajú, čo predstavuje problém pri detailnej analýze zložiek podieľajúcich sa na výslednom tvare fluorescenčnej krivky (3). Pre túto vlastnosť bolo krvné sérum odsúvané na okraj záujmu aplikácie fluorescenčných spektrálnych metód (2, 3). Vzhľadom na diagnostiku však detailný rozbor krivky nie je nevyhnutný a veľkú výpovednú hodnotu má komplexná kolektívna či už kvalitatívna alebo kvantitatívna zmena fluorescencie jednotlivých zložiek. Zjednodušene: „Nie je také dôležité zistiť identitu fluorofórov podieľajúcich sa tvare krivky, ak sa vyskytujú u zdravých i chorých, ale pozorovať ich spoločnú výslednú zmenu fluorescencie“. Vďaka tejto skutočnosti má zmena fluorescencie jednotlivých zložiek v charakteristicky určených fluorescenčných oblastiach značnú výpovednú hodnotu. Krvné sérum, schopné rýchlo prezentovať zmeny v organizme, sa preto stáva ideálnym objektom našej pilotnej experimentálnej štúdie.

Cieľom práce bolo porovnanie autofluorescencie krvného séra zdravých jedincov a pacientov s rôznymi formami akútneho koronárneho syndrómu (AKS). Z dostupnej literatúry sme zistili, že fluorescenčná analýza sa doposiaľ používala na štúdium niektorých telesných tekutín a tkanív, avšak chýbajú akékoľvek informácie o využití fluorescenčnej analýzy krvného séra pričasnej diagnostike akútneho koronárneho syndrómu. Naším zámerom bolo monitorovať autofluorescenciu vzoriek krvného séra zdravých jedincov a následne aj vzoriek krvného séra pacientov s rôznymi formami akútneho koronárneho syndrómu. Výsledkom meraní boli fluorescenčné krivky (FK). Fluorescenčné krivky zdravých jedincov sme považovali za štandard, s ktorým sme porovnávali experimentálne krivky pacientov s AKS. U zdravých jedincov sme sledovali aj vplyv ďalších faktorov, ako sú vek, pohlavie a denné rytmy (spánok, príjem potravy), na výslednú krivku autofluorescencie krvného séra so zámerom zadefinovať prípadné zmeny vo fluorescencii, vzniknuté vplyvom týchto faktorov. Fluorescenčná spektrálna analýza vzoriek krvného séra pacientov s rôznymi formami akútneho koronárneho syndrómu porovnávaná so vzorkami zdravých jedincov mala identifikovať rozdiely fluorescencie krvného séra medzi zdravými a chorými jedincami.

Materiál a metódy

Ako testovaný biologický materiál bolo použité krvné sérum 10 zdravých jedincov (päť mužov a päť žien) v rôznom

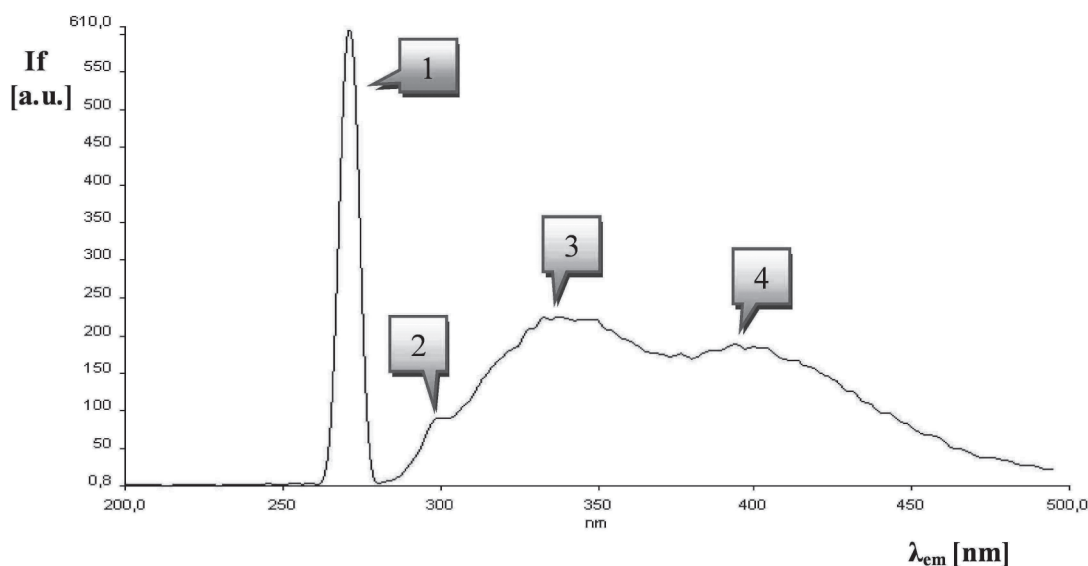
veku (vekové rozpätie 20 – 62 rokov, priemerný vek 31,5) a 26 pacientov s akútnym koronárnym syndrómom (vekové rozpätie 34 – 85 rokov, priemerný vek 58,9). Od každého vyšetřovaného boli testované dve až tri vzorky počas dvoch až troch dní na sledovanie dynamiky zmien fluorescenčnej krivky. Krv zdravých jedincov sa po odobratí do centrifugačnej skúmavky centrifugovala päť minút pri otáčkach 4 500g. Vzorky krvného séra pacientov zo štandardného biochemického vyšetřenia sme získavali z oddelenia klinickej biochémie spolu s informáciou o veku a pohlaví pacienta, o dni a hodine odberu vzorky, ale aj o hladine niektorých biochemických ukazovateľov akútnej ischémie myokardu: troponínu cTnT, myokardiálnej frakcie kreatínkinázy (CK-MB) a celkovej kreatínkinázy v jednotlivých vzorkách. Všetky získané vzorky krvného séra boli zmrazené a uskladnené pri teplote -20 °C.

Vzorky sa odoberali na základe informovaného súhlasu pacientov i zdravých jedincov a celý proces získavania a analýzy vzoriek prebehol v súlade s právnymi predpismi etickej komisie.

Fluorescenčná analýza vzoriek krvného séra zdravých aj pacientov bola realizovaná so snahou zachovávať identické časové intervaly medzi odbermi a meraniami jednotlivých vzoriek (najneskôr do jedného týždňa od odberu). Analýza vzoriek sa uskutočnila pri izbovej teplote v kremennej kyvete na spektrálnom fluorimetri Perkin Elmer, model LS 55. Autofluorescencia vzoriek bola spracovaná do grafickej podoby pomocou softvéru FL WinLab. Výsledky boli štatisticky vyhodnotené pomocou štatistických metód One way analysis of variance a Tukey-Kramer multiple comparisons, kde za štatisticky významnú sme považovali hladinu významnosti $p < 0,05$.

Výsledky

Analýza a porovnanie fluorescencie endogénnych fluorofórov fluorescenčných kriviek vzoriek krvného séra prezentovali minimálne až zanedbateľné rozdiely medzi jednotlivými zdravými jedincami. Monitorovali sme štyri fluorescenčné maximá (komplex 1, 2, 3, 4) krivky, pričom komplex 1 zodpovedá fluorescencii proteínov krvného séra a zvyšné komplexy reprezentujú fluorescenciu viacerých endogénnych fluorofórov, ktorých fluorescenčné maximá navzájom splývajú. Na tvorbe fluorescenčnej krivky vo zvyšných komplexoch (2, 3, 4) by sa mohli podieľať kolagén, elastín, aminokyseliny (tryptofán, tyrozín, fenylalanín) a koenzýmy NADH a NADPH. Tvar FK je u zdravých jedincov konštantný, s maximami intenzity fluorescencie pri identických vlnových dĺžkach (271, 300, 340 a 400 nm) s presnosťou na 0,5 nm (v komplexe 1 a 2) a 1,5 nm (v komplexe 3 a 4) (**obrázok 1**). Tvar a celkový charakter krivky zdravých jedincov nezávisia od veku ani pohlavia. Dokonca ani ďalšie sledované faktory (príjem potravy, spánok) charakter FK významne neovplyvnili.

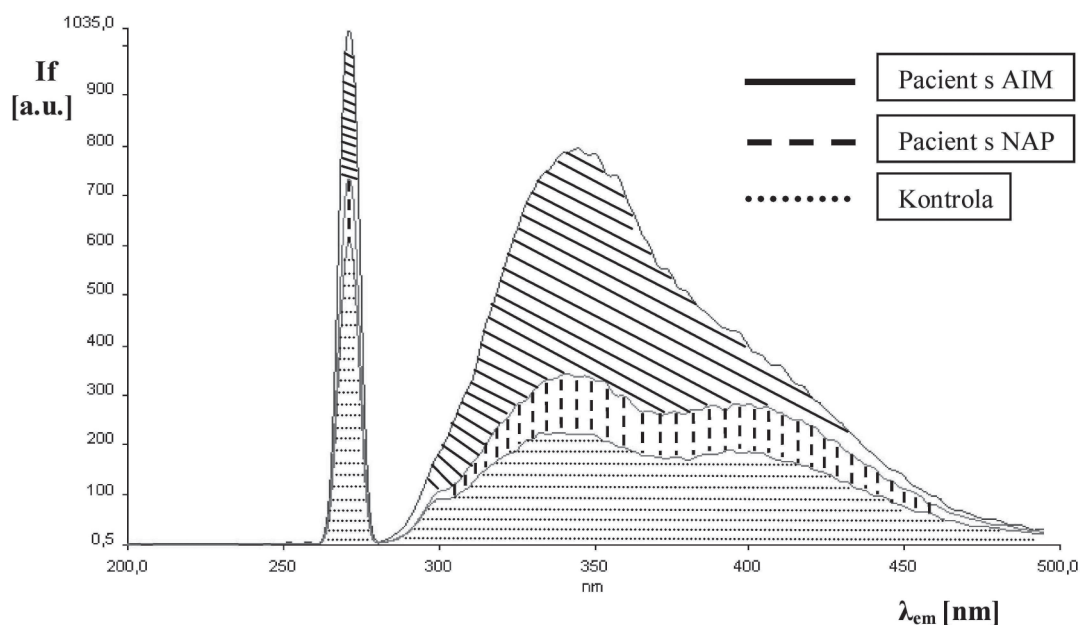


Obrázok 1 Priemerná fluorescenčná krivka zdravých jedincov

Figure 1 The average fluorescence curve of healthy individuals

Graf znázorňuje priemernú krivku zdravých jedincov. Os x vyjadruje emisnú vlnovú dĺžku (λ_{em}) v nanometroch a os y intenzitu fluorescencie (I_f). Popisky s číslami určujú komplexy 1, 2, 3, 4, ktoré zodpovedajú výslednej fluorescencii jednotlivých fluorofórov krvného séra.

The graph shows the average curve of healthy individuals. The x-axis indicates the emission wavelength (λ_{em}) in nanometers and the y-axis indicates the fluorescence intensity (I_f). Labels numbered 1, 2, 3, 4 define complexes that correspond to the resulting fluorescence of the fluorophores present in blood serum.



Obrázok 2 Priemerná fluorescenčná krivka zdravých jedincov a fluorescenčné krivky pacientov s rôznymi formami akútneho koronárneho syndrómu

Figure 2 The average fluorescence curve of healthy individuals and fluorescence curves of patients with various forms of acute coronary syndrome

Pacient s AIM (Patient with AMI), Pacient s NAP (Patient with NAP), Kontrola (Control), AIM – akútny infarkt myokardu (AMI – acute myocardial infarction), NAP – nestabilná angína pectoris (unstable angina pectoris)

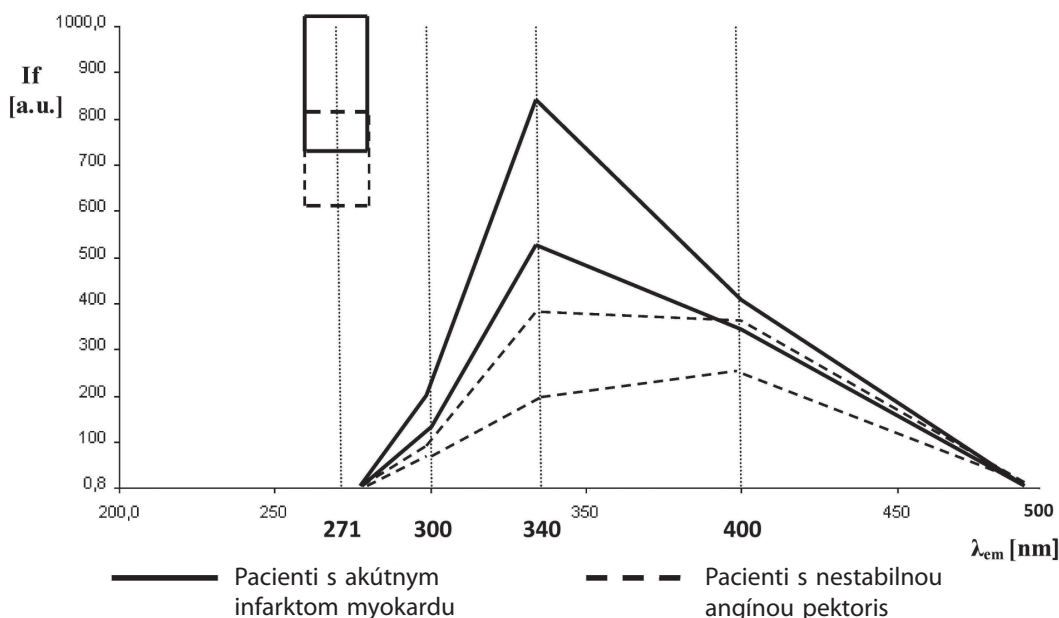
Pozorovali sme iba zmeny v intenzite fluorescencie komplexu 1, ktorá u zdravých jedincov tesne po prebudení prevažne klesala (maximálne o 7,1% intenzity priemernej FK zdravých) a po príjme jedla stúpala (maximálne o 12,2% nad priemer). Výpočtom celkovej plochy pod fluorescenčnými krivkami sme zistili, že jednotlivé vzorky zdravých sa vplyvom všetkých uvedených faktorov od seba odlišovali v rozmedzí 1 – 3 %.

U pacientov s laboratórne zistenými pozitívnymi markermi akútnej ischémie myokardu sú zmeny vo fluorescencii podstatne výraznejšie a závisia od závažnosti ischémie. U pacientov s potvrdeným akútnym infarktom myokardu (AIM) možno pozorovať signifikantný nárast intenzity fluorescencie všetkých komplexov (nárast predstavoval aj vyše 200%) oproti priemeru zdravých jedincov. Celkový charakter FK podmieňuje zmeny, ktoré vedú k splynutiu komplexov 2, 3, 4 do jedného celku (v rozmedzí od 290 po 490 nm). Pacienti, ktorí mali mierne zvýšené biochemické markery ischémie myokardu, ale nebol u nich potvrdený akútny infarkt myokardu (pacienti s nestabilnou angínou pectoris – NAP), nemali zmeny v intenzite fluorescencie také výrazné ako pacienti s AIM a ich FK vykazovala vysokú podobnosť s krivkami zdravých jedincov. Pomer komplexov 3:4 sa v niektorých prípadoch u pacientov s NAP menil, prevažoval komplex 4, kým u zdravých mal vyššie hodnoty komplex 3.

Pre názornú ilustráciu a pochopenie uvedených skutočností uvádzame fluorescenčnú analýzu vzoriek krvného séra dvoch pacientov s rôznymi formami AKS a porovnanie ich fluorescenčných kriviek s priemernou FK zdravých jedincov (obrázok 2).

Výsledky fluorescencie krvného séra všetkých jedincov sme matematicky a graficky vyhodnotili a určili tak charakteristické body, ktoré svojou polohou v úrovni sledovaných vlnových dĺžok (271, 300, 340 a 400 nm) vymedzili tri oblasti. Každá oblasť ohraničuje zaznamenanú minimálnu a maximálnu intenzitu fluorescencie pri charakteristických vlnových dĺžkach u jednotlivých jedincov danej vyšetrovanej skupiny. Takýmto spôsobom sme vymedzili oblasti výskytu maxima intenzity fluorescencie u zdravých jedincov, pacientov s AIM a pacientov s NAP a ich porovnanie uvádzame na **obrázkoch 3 a 4**.

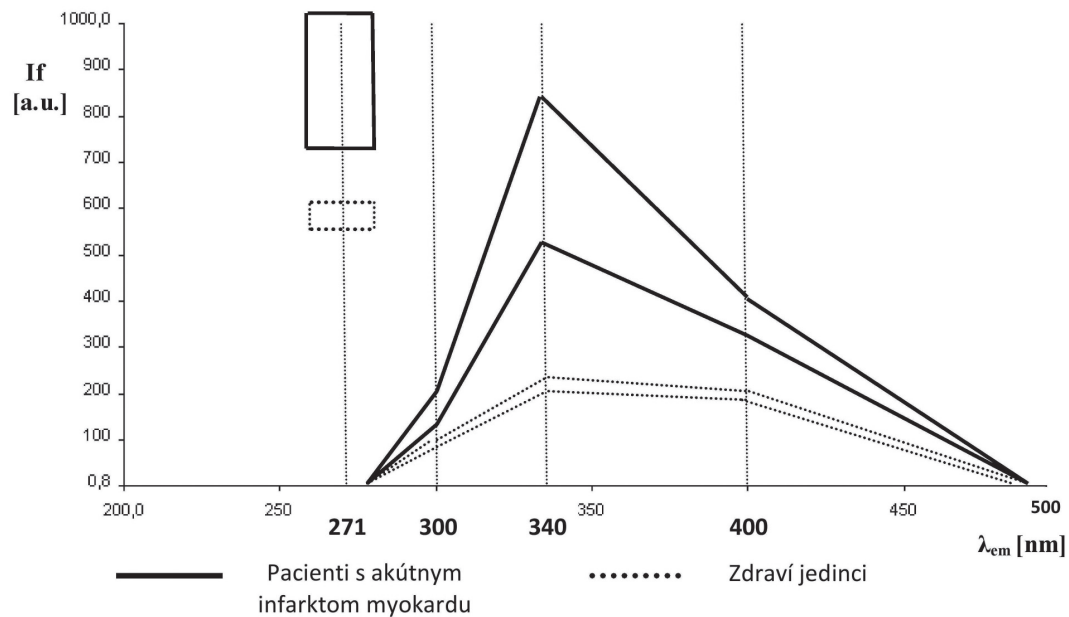
Plochy pod fluorescenčnou krivkou jedincov z jednotlivých vyšetrovaných skupín sme analyzovali a navzájom štatisticky porovnali. Jednotlivé štatistické metódy potvrdili rozdiely, ktoré boli zrejme aj vizuálne. Plocha pod krivkami bola u kontrolných zdravých jedincov signifikantne nižšia oproti pacientom s potvrdeným AIM, $p < 0,001$; a tiež oproti pacientom s NAP, $p < 0,05$. Štatistické testovanie medzi skupinami pacientov s NAP a AIM ukázalo signifikantný rozdiel na hladine významnosti $p < 0,001$ (obrázok 5).



Obrázok 3 Grafické zobrazenie oblastí ohraničujúcich maximá intenzity fluorescencie v sledovaných vlnových dĺžkach u pacientov s akútnym infarktom myokardu (AIM) a pacientov s nestabilnou angínou pectoris (NAP)

Figure 3 Graphic representation of areas limiting fluorescence intensity maxima in monitored wavelengths of patients with acute myocardial infarction (AMI) and patients with unstable angina pectoris (NAP)

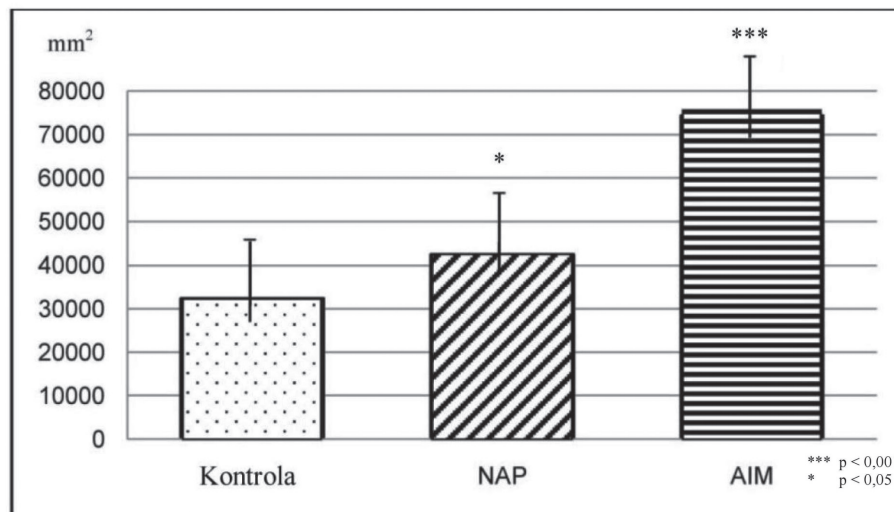
Pacienti s akútnym infarktom myokardu (Patients with acute myocardial infarction), Pacienti s nestabilnou angínou pectoris (Patients with unstable angina pectoris)



Obrázok 4 Grafické zobrazenie oblastí ohraničujúcich maximá intenzity fluorescence v sledovaných vlnových dĺžkach u pacientov s akútnym infarktom myokardu (AIM) a zdravých jedincov

Figure 4 Graphical representation of areas limiting fluorescence intensity maxima in monitored wavelengths of patients with acute myocardial infarction (AMI) and healthy individuals

Pacienti s akútnym infarktom myokardu (Patients with acute myocardial infarction), zdraví jedinci (healthy individuals)



Obrázok 5 Porovnanie plochy pod fluorescenčnou krivkou kontrolných zdravých jedincov (kontrola, $n = 10$) s pacientami s nestabilnou angínou pectoris (NAP, $n = 12$, $*p < 0,05$) a pacientami s akútnym infarktom myokardu (AIM, $n = 14$, $***p < 0,001$)

Figure 5 The comparison of area under the fluorescence curve of controlled healthy individuals (control, $n = 10$) of patients with unstable angina pectoris (NAP, $n = 12$, $*p < 0,05$) and patients with acute myocardial infarction (AMI, $n = 14$, $***p < 0,001$)

Kontrola (Control), NAP – nestabilná angína pectoris (unstable angina pectoris), AIM – akútny infarkt myokardu (AMI – acute myocardial infarction)

Výsledkom nášho sledovania bolo aj zaujímavé zistenie, že pomocou fluorescenčnej spektrofotometrie sme dokázali oddiferencovať nestabilnú angínu pectoris od infarktu myokardu bez elevácie ST segmentu ihneď pri príchode pacientov do zdravotníckeho zariadenia a stanoviť tak predpokladanú diagnózu, ktorá bola o niekoľko hodín potvrdená laboratórne aj klinicky.

Diskusia

Z dostupných literárnych zdrojov poznáme niekoľko možností experimentálneho využitia fluorescenčnej analýzy v medicíne pri štúdiu autofluorescencie moča (4), krvi, krvnej plazmy (5), krvného séra (3) a ďalších telových tekutín a tkanív (6). Vo všetkých týchto experimentálnych prácach (3 – 6) autori popísali zaujímavé výsledky, ktoré ukázali, že fluorescenčná spektrofotometria môže v súčasnosti aj budúcnosti poskytnúť nové aplikácie a diagnostické možnosti v rôznych oblastiach medicíny. Jednu z nových možností aplikácie fluorescenčnej spektrofotometrie popisuje táto pilotná experimentálna práca, ktorá monitoruje možnosti diagnostiky akútneho koronárneho syndrómu pomocou analýzy autofluorescencie krvného séra pacientov a zdravých jedincov. Do nášho experimentu bolo zapojených 26 pacientov, naše výsledky poukazujú na určitý trendový výstup tejto metódy, ktorý charakteristicky a presne prezentuje rozdiel medzi zdravými a chorými. Keďže naše pozorovania nevieme porovnať s výsledkami iných autorov, chceli by sme aplikáciu fluorescenčnej spektrofotometrie v rámci diagnostiky AKS ďalej detailnejšie skúmať na väčšom súbore pacientov.

Diagnostika AKS predstavuje problém aj v súčasnosti. Infarkt myokardu s eleváciou ST segmentu (STEMI) zvyčajne nespôsobuje ťažkosti a má svoj komplexný diagnostický a terapeutický manažment (7, 8). Infarkt myokardu bez elevácie ST (NSTEMI) je náročné odlišiť od nestabilnej formy angíny pectoris (NAP). Obe patria do skupiny akútnych koronárnych syndrómov bez elevácií ST – segmentu (NSTE-AKS), pričom práve NSTE-AKS je najčastejším prejavom AKS (8). EKG zmeny sú nešpecifické, s depresiami ST, inverziami vlny T, EKG nález je často normálny. Na biochemické markery sa možno spoľahnúť až po niekoľkých hodinách, keď už nastala nekróza ischemickej svaloviny a následná apoptóza okolitej časti. NSTE-AKS je neraz diferencovaný len podľa rizikovej stratifikácie pacientov pomocou skórovacích systémov (7). Problémy v diagnostike sa často manifestujú neistotou v terapii. V liečbe STEMI sa bežne uplatňujú intervenčné metódy, ktoré majú vynikajúce výsledky (8). Pri terapii NSTE-AKS sa využíva viacero postupov. Najčastejšie je to medikamentózna liečba, ktorá často zlyháva, fibrinolytická terapia dokonca u pacientov s NSTE-AKS zvyšuje úmrtnosť

(8). Najideálnejšími by opäť mohli byť invazívne postupy. Štúdie v minulosti ukázali, že včasná invazívna stratégia znižuje koncové ukazovatele ischemie najmä redukciou závažnej rekurentnej ischemie a klinickej potreby rehospitalizácie a revaskularizácie (9, 10). Tieto štúdie poukazujú na zjavný pokles mortality či IM strednodobo (10) aj dlhodobo (11). Množstvo literárnych zdrojov podporuje včasnú primárnu invazívnu stratégiu pred konzervatívnou stratégiou. Neexistujú dôkazy, že odklad intervencie s cieľným podaním vhodnej medikamentózne liečby (napríklad silné antitrombotické látky) je lepším postupom ako včasná realizácia koronarografie s vhodnou farmakologickou terapiou (12). Invazívne postupy však nemožno realizovať alebo vykonať u každého pacienta s NSTE-AKS z viacerých, najmä diagnostických, ale aj technických dôvodov. Okrem toho u pacientov s nízkym rizikom kardiovaskulárnych príhod a úmrtia je riskantná a nákladná invazívna terapia málo prospešná alebo v skutočnosti môže pacientom poškodiť (9). Preto je veľmi dôležité odlišovať pacientov s nízkym rizikom od pacientov s vysokým rizikom úmrtia. Vzhľadom na úspešnosť terapie kladie sa dôraz práve na spoľahlivosť skórovacieho systému zaručiť úspešnosť správne zvoleného terapeutického postupu u každého pacienta. Aj pri neustálom zdokonaľovaní nie je táto úspešnosť stopercentná. Napriek pokrokom v lekárskej a intervenčnej liečbe zostáva mortalita a morbidita na NSTE-AKS vysoká a ekvivalentná mortalite a morbidite u pacientov so STEMI po prvom mesiaci (9). S pribúdajúcim časom úmrtnosť na NSTE-AKS prevažuje (7).

Veľmi zaujímavé je, že pomocou endogénnej fluorescencie krvného séra monitorovaného pomocou spektrofotometrie; a EKG obrazu, sa nám podarilo odlišiť NSTEMI od NAP, a to už z prvej vzorky krvného séra pacienta s príznakmi AKS, bez potreby znalosti laboratórnych výsledkov. Naša pilotná aplikácia spektrofotometrie pri diagnostike AKS by mohla prispieť k jej zlepšeniu a v konečnom dôsledku k vyššej terapeutickú úspešnosti tohto ochorenia.

Záver

Aj v súčasnosti prevládza kardiovaskulárne ochorenia vysoká morbidita a mortalita. Táto skutočnosť vedie k hľadaniu ďalších možností včasnej diagnostiky a správnej terapie. Fluorescenčná spektrofotometria sa v tejto oblasti doposiaľ nevyužívala. Má však perspektívny diagnostický potenciál využitia v praxi, lebo sa vyznačuje vysokou presnosťou, rýchlosťou a nízkymi nákladmi. Myslíme si, že je metódou schopnou priniesť nové diagnostické a terapeutické úspechy. V prípade potvrdenia našich záverov na väčšom počte pacientov, by aplikácia tejto diagnostickej metódy do praxe vhodne doplnila metódy klinicko-biochemických vyšetrení.

Podakovanie:

Autori ďakujú za všestrannú pomoc, podporu, za odborné rady a pochopenie Doc. MUDr. Branislavovi Stančákovi, CSc., Mgr. Miroslave Meriačovej a MUDr. Ľubici Uhrínovej.

Literatúra

1. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy, Third Edition. New York: Springer; 2006:954.
2. Wolfbeiss OS, Leiner MI. Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization. *Anal Chim* 1985;16(7):203-215.
3. Weihua Z, Zhimin Z, Xiu G, Xiaoquin H. et al. Study on serum fluorescence spectra based on wavelet transform. *Afr J Biotechnol* 2010;9(6):892-899.
4. Anwer AG, Sandeep PM, Goldys EM, Vemulapad S. Distinctive autofluorescence of urine samples from individuals with bacteriuria compared with normals. *Clin Chim Acta* 2009;401(1-2):73-75.
5. Madhuri S, Venkatesan N, et al. Native fluorescence spectroscopy of blood plasma in the characterization of oral malignancy. *Photochem Photobiol* 2003;78(2):197-204.
6. Raiyan T, Zaman MSE, et al. Variation of fluorescence in tissue with temperature. *Lasers Surg Med* 2011;43(1):36-42.
7. Kovar F, Studencan M, Hricak V, et al. Manažment pacientov s akútnym koronárnym syndrómom bez elevácií segmentov ST. Analýza údajov registra SLOVAKS z roku 2008. *Cardiology sk* 2010;19(3):181-191.
8. Studencan M. Akútní koronární syndrom. Bratislava: Media Group; 2007:192.
9. Wijns W, Kolh P, Danchin N, et al. Odporúčania pre revaskularizáciu myokardu. *Cardiology Lett.* 2011;20(2):126-165.
10. Mehta SR, Cannon CP, Fox KA, Wallentin L, Boden WE, Spacek R, Widimsky P, McCullough PA, Hunt D, Braunwald E, Yusuf S. Routine vs selective invasive strategies in patients with acute coronary syndromes: a collaborative meta-analysis of randomized trials. *JAMA* 2005;293(23):2908-2917.
11. Fox KA, Clayton TC, Damman P, Pocock SJ, de Winter RJ, Tijssen JG, Lagerqvist B, Wallentin L. Long-term outcome of a routine versus selective invasive strategy in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: a meta-analysis of individual patient data. *J Am Coll Cardiol* 2010;55(22):2435-2445.
12. Giugliano RP, White JA, Bode C, Armstrong PW, Montalescot G, Lewis BS, van't Hof A, Berdan LG, Lee KL, Strony JT, Hildemann S, Veltri E, Van De Werf F, Braunwald E, Harrington RA, Califf RM, Newby LK. Early versus delayed, provisional eptifibatide in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009;360(21):2176-2190.