

Detekce časných stadií aterosklerózy

doc. MUDr. Jan Piřha, CSc.

Laboratoř pro výzkum aterosklerózy, Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Jednou z hlavních snah preventivních kardiologů je zachytit většinu rizikových osob ještě před klinickou manifestací aterosklerózy, která může být často smrtelná. Jsou diskutovány tři okruhy postupů: 1) algoritmy výpočtu rizika vzniku kardiovaskulárních příhod založené na tradičních rizikových faktorech, 2) měření koncentrace cirkulujících biomarkerů včetně genetických parametrů souvisejících s cévním postižením a 3) morfologické a funkční metody zaměřené na přímé stanovení postižení cévní stěny či uzávěru tepen. Posledně uvedené jsou v užším smyslu chápány právě jako detekce preklinické aterosklerózy. Nejdůležitějším hlediskem je, zda na základě konkrétního vyšetření či jejich kombinace můžeme rozhodnout o agresivnější, tedy zejména farmakologické terapii především vyšší hladiny LDL cholesterolu, případně krevního tlaku. Základním postupem při určení rizika zůstávají již zavedené algoritmy založené na tradičních rizikových faktorech. Novější parametry přispívají k upřesnění rizika pouze mírně. U komplikovaných pacientů však novější metodiky mohou pomoci o léčbě rozhodnout. Z tohoto pohledu je diskutováno měření poměru krevních tlaků kotník/paže, ultrazvuková detekce preklinické aterosklerózy na karotických arteriích, rychlost šíření pulzní vlny a stanovení kalciového skóre koronárních tepen.

Klíčová slova: kardiovaskulární příhody, časná ateroskleróza, vaskulární parametry, metody detekce.

Detection of early stages of atherosclerosis

One of the main efforts of preventive cardiology is to detect persons at high cardiovascular risk yet before clinical manifestation of atherosclerosis, which could be fatal. In general, three approaches are discussed: 1) Algorithms calculating the risk of cardiovascular events based on traditional cardiovascular risk factors, 2) Measurements of the concentration of circulating biomarkers, including genetic parameters and 3) Morphological and functional methods assessing vascular wall or obstructive lesions; this group often labelled as detection of preclinical atherosclerosis. The contribution of these approaches could be viewed from several aspects. The most important aspect is whether particular method could help in decision to implement aggressive pharmacologic therapy focused mainly on higher levels of LDL cholesterol or *high* blood pressure. Historically accepted approaches are established algorithms based on traditional risk factors. More recent methods contribute to the better assessment of cardiovascular risk only moderately. In more complicated patients, however, these approaches/methods could help with treatment decisions. From this perspective the most reliable are measurement of ankle brachial index, detection of preclinical atherosclerosis at the carotid arteries by ultrasound, the pulse wave velocity and calcium score of coronary arteries.

Key words: cardiovascular events, early atherosclerosis, vascular biomarkers, methods of detection.

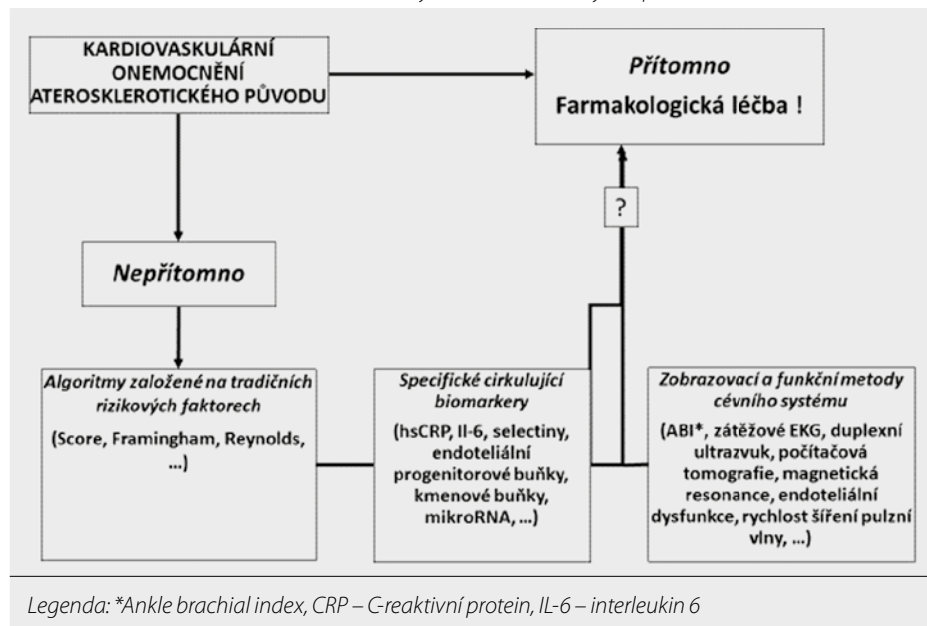
Úvod

Jeden z mých kolegů s nadsázkou tvrdil, že dostat infarkt myokardu v Praze je výhra, protože se o postiženého přetahuje několik kardiocenter. Nicméně srdeční infarkt s sebou nese jedno významné riziko; to je, že se již na žádné intervenční pracoviště nedostaneme. U velké části postižených se totiž jedná o smrtelnou

příhodu, které nepředcházejí žádné varovné příznaky. V nejvíce citované a již historické studii, která se touto problematikou zabývala, bylo zjištěno náhlé úmrtí na první kardiovaskulární příhodu bez předchozích varovných příznaků u 47 % mužů a dokonce u 68 % žen (1). Další údaje tato čísla v zásadě potvrzují (2). Jedním extrémem je tedy vyčkávat na doslova životní

loterii, až ateroskleróza udeří, a soustředit se pouze na 50–60 % přeživších, u kterých jsme si už vysokým rizikem zcela jisti. Druhým extrémem je dávat pro jistotu statiny všem od narození a těm, na které rodiče zapomněli, je rozdávat ve fast-fooddech, jak bylo zcela vážně navrhováno v jinak poměrně seriózní studii (3). Reálným řešením je zřejmě zachytit co nej-

Obr. 1. Postavení detekce časné aterosklerózy z hlediska intenzity terapie



Tab. 1. Srovnání různých přístupů k detekci preklinické aterosklerózy

	Senzitivita	Standardizace	Srozumitelnost, použitelnost pro lékaře z různých oborů	Finanční náročnost
Algoritmy	+	+++	+++	+++
Cirkulující biomarkery	++	++	++	+
Zobrazovací a funkční metody	+++	+	+	+++

Legenda: +++ vynikající, ++ průměrné, + spíše podprůměrné

spolehlivěji většinu rizikových osob ještě před klinickou manifestací aterosklerózy, a tedy získat údaj nebo číslo, který či které by nás oprávnily k nasazení farmakologické terapie. Tyto informace nám poskytují tři okruhy hodnocení (obrázek 1).

1. Algoritmy výpočtu rizika vzniku kardiovaskulárních příhod založené na tradičních rizikových faktorech.
2. Měření koncentrace cirkulujících biomarkerů včetně genetických parametrů souvisejících s cévním postižením.
3. Morfologické a funkční metody zaměřené na přímé stanovení postižení cévní stěny či uzávěru tepen. Tyto jsou v užším smyslu chápány jako detekce preklinické aterosklerózy.

Zásadní kritéria pro použití těchto parametrů jsou následující (upraveno dle 4):

1. Liší se daný parametr mezi osobami s onemocněním a zdravou populací?
2. Je daný parametr spojen s následným vyšším výskytem klinických příhod?
3. Přidává daný parametr významnou informaci k již známým rizikovým faktorům?

4. Je možné na základě tohoto parametru změnit/doplnit terapii tak, aby sledovaným osobám/pacientům přinesla prospěch?
5. Je použití tohoto parametru tak významné a prospěšné, aby ospravedlnilo případné vysoké náklady?
6. Je tento parametr snadno dostupný v běžné klinické praxi?
7. Je daný parametr dobře standardizovaný, tedy měřený ve všech zařízeních stejně?
8. Poskytne nám spolehlivý číselný údaj, na jehož základě můžeme dále konat? Shrnutí některých praktických aspektů všech tří okruhů vyšetření je v tabulce 1.

Algoritmy výpočtu rizika vzniku kardiovaskulárních příhod založené na tradičních rizikových faktorech

Jedná se o standardní postupy, které jsou realizovatelné prakticky v jakémkoliv ambulanci či jiném zdravotnickém zařízení. Jsou založeny na znalosti základních rizikových faktorů: věku, pohlaví, kouření, krevního tlaku, krevních lipidů, gly-

kemie. V Evropě jsou používány tabulky a algoritmy SCORE, které jsou navíc specifikovány i pro odlišné rizikové populace (5). Například Česká republika patří stále mezi vysoce rizikové země. Historicky nejstarší je pak Framinghamské skóre, které je vlastně základem všech následných algoritmů. Ty v zásadě doplňuje Reynoldsovo skóre, které je specifičtěji zaměřeno na ženy, obsahuje i rodinnou historii, vyžaduje však znalost hodnot C-reaktivního proteinu (6). Nejnovější a současně nejvíce kontroverzní jsou poslední doporučení ze Spojených států amerických, ze kterých je fakticky vynechán LDL cholesterol, a zejména proto nejsou tato doporučení příliš přijímána především v Evropě. Při použití nejčastěji uváděných algoritmů lze odhadnout osoby ve vyšším riziku, u kterých je třeba zvážit farmakoterapii. Toto riziko je číselně vyjádřeno. V případě SCORE je to 5% riziko úmrtí na kardiovaskulární onemocnění v následujících 10 letech, při použití Framinghamského skóre je to riziko jakékoliv kardiovaskulární příhody v následujících 10 letech větší než 20% (tabulka 2).

Jedná se o nejjednodušší, nejdostupnější a snadno použitelné metody. Nicméně, zda na nich výhradně postavit rozhodnutí o terapii farmaky, je stále sporné (7). Jsou ale například velice vhodné k edukaci pacientů. Například v případě tabulek SCORE se jedná o přehledná, jednoduchá a barevná schémata, kde lze okamžitě stanovit riziko a jeho změnu například při ukončení kouření, dle kontroly krevního tlaku a hladin cholesterolu. Na internetu jsou dostupné i počítačové algoritmy, dle kterých si mohou sami pacienti kontrolovat vývoj svého rizikového profilu.

Měření koncentrace cirkulujících biomarkerů včetně genetických parametrů souvisejících s cévním postižením

Pro lékaře v ambulanci je v zásadě nejjednodušší označit na žádance vybraný laboratorní parametr a vyčkat na výsledek laboratorní analýzy. Možná i proto je studována a doporučována celá řada laboratorních parametrů, které by pomohly dále zpřesnit odhad rizika/přítomnosti aterosklerotických změn (8). Ty neambicióznější projekty si kladou za cíl i laboratorní detekci difuzního zánětu stěny cévní, či dokonce stanovení přítomnosti aterosklerotického plátu náchylného k ruptuře a následně manifestaci klinické cévní příhody. Z tohoto hlediska jsou nejčastěji citovány (mikro)albuminurie a C-reaktivní protein;

Tab. 2. Rizikové hodnoty u vybraných parametrů detekce časné aterosklerózy

	Rizikové hodnoty	Poznámky
Algoritmy		
SCORE	5% riziko úmrtí v následujících 10 letech	
Framingham score	Větší než 20% riziko vzniku kardiovaskulární příhody v následujících 10 letech	
Reynolds	Relativní riziko kardiovaskulární příhody v následujících 10 letech	V zásadě variace na Framingham score určená pro ženy, zařazeny rodinná anamnéza a C-reaktivní protein
Cirkulující biomarkery		
(Mikro)albuminurie	Větší než 30 mg/24 hod	
C-reaktivní protein měřený senzitivní metodou	Vyšší než 1,8–2 mg/L	
Cirkulující mikropartikule	Vyšší než 10 nM PS*	
Genetické polymorfizmy	Přítomna/nepřítomna riziková varianta daného genu	
Zobrazovací a funkční metody		
Poměr systolických tlaků kotník/paže (ABI**)	Méně než 0,9, více než 1,3–1,4	
Tloušťka intimy/medie společných karotických tepen	Více než 0,9 mm, fokální zesílení více než 1,2–1,4 mm	Belcaro skóre větší než 2 subjektivní metoda (13)
Kalciové skóre koronárních tepen	Agatston skóre nad 200–300	Mírná zátěž – rentgenové vyšetření
Rychlost šíření pulzní vlny	Rychlejší než 10–12 m/s	
Endoteliální funkce	Dilatace tepny méně než 7–10 %, RHI*** pod 0,4 (log)	Výrazná variabilita, stále spíše výzkumná metoda
Magnetická rezonance kombinovaná s pozitronovou emisní tomografií	Semikvantitativní hodnocení	Možnost zachycení nestabilních aterosklerotických lézí

Legenda: *nanomoly/litr vztaženo k fosfatidylserinu, **ankle/brachial index, ***reactive hyperemia index používaný při vyšetření EndoPat

k dalším patří například interleukin-6, některé selektiny, cirkulující mikropartikule a další. Nicméně k běžnému klinickému použití – rozhodnutí o farmakologické léčbě – tyto parametry zatím běžně používány nejsou a v zásadě nepřekročily hranice výzkumných projektů. Asi nejvíce diskutovaným je zmíněný C-reaktivní protein měřený vysoce senzitivní metodou (hs-CRP). Nejvíce v klinice ověřeným a používaným parametrem je (mikro)albuminurie, především u pacientů s diabetes mellitus a/nebo hypertenzí (9). Tento parametr by mohl mít i zcela konkrétní dopad na úpravu terapie – zvážení nasazení fibrátů, které by mohly mikrovaskulární komplikace významně pozitivně ovlivnit (10).

Další novou a rozsáhlou oblastí diagnostiky počínajících či probíhajících aterosklerotických změn jsou rozsáhlé genetické analýzy, případně kombinace různých přístupů nazývané genomika, metabolomika a další. Nicméně jejich specifitu je nutné teprve prověřit v rozsáhlejších prospektivních studiích zaměřených na klinické příhody a případně na možnost cílené terapie. Jejich výhodou je stanovení zahrnující velké množství genetických i biochemických parametrů či metabolitů v jednom měření – lipoproteinů, mastných kyselin, metabolitů metabolismu glukózy a dalších. Z hlediska genetických analýz a zjištění příčinné souvislosti vybraných parametrů s daným onemocněním jsou v současnosti používány i tak zvané Mendeliánské randomizační studie. Ty zahrnují geny, jejich produkty

a klinické příhody; všechny tři parametry musí být navzájem a významně asociovány, jinak nelze vyloučit náhodné asociace, nemající význam pro klinické použití (11, 12).

Výhodou laboratorních hodnot je jejich standardní stanovení. Jejich nevýhodou je často poměrně nízká specifita; většina uvedených parametrů se totiž může výrazně měnit s chorobami nesouvisejícími s aterosklerotickým procesem. Určitou brzdou je i poměrně vysoká finanční náročnost těchto metod.

Morfologické a funkční metody zaměřené na přímé stanovení postižení cévní stěny či uzávěru tepen

V užším slova smyslu jsou právě tyto metody označovány jako metody detekce časné aterosklerózy. Základní principy a význam těchto metodik jsou velmi dobře shrnuty v posledních doporučeních pracovní skupiny Evropské kardiologické společnosti (4).

Ultrazvukem stanovené změny cévní stěny

Zřejmě nejvíce publikací je zaměřeno na detekci změn na periferně probíhajících arteriích, především karotických arteriích, méně často na femorálních arteriích ultrazvukem s vysokou rozlišitelností. Na těchto tepenných řečištích je hodnocena zejména tloušťka části tepenné stěny zahrnující intimu a medii – intima media thickness (IMT); lepší rozlišitelnost

zatím ani velice kvalitní dostupné sonografické přístroje neumožňují. IMT by měla být vždy a u všech měřena v předem určených, standardních oblastech – 10 mm pod bifurkací, v bifurkaci a 10 mm na počátku vnitřní, vzácněji i vnější karotické arterie. Také jsou hodnoceny fokální změny, zesílení cévní stěny, tedy především aterosklerotické pláty, které jsou zřejmě specifitější, ale hůře standardizovatelné. Určitým kompromisem je Belcaro skóre (13), které je sice částečně zatíženo subjektivním hodnocením, ale i dle našich zkušeností má velice dobrou variabilitu (14). K detekci časných aterosklerotických změn je nejčastěji používána IMT ve společných karotických tepnách, kde je nejméně ovlivněna lokálními turbulencemi, je nejlépe zobrazitelná a je tedy nejlépe standardizovatelná. Měření IMT jsou prováděna na sonografických přístrojích s vysokou rozlišitelností, lineární sondou o frekvenci nejméně 7 MHz a následně většinou hodnocena speciálními čtecími zařízeními/software „off line“. Podobně jako při laboratorních měřeních používají často pracoviště zabývající se touto problematikou hodnotu 75. percentilu referenční „zdravé“ populace. Jako absolutní „riziková“ hodnota byla dle doporučení Evropské kardiologické společnosti stanovena hodnota 0,9 mm; nicméně velice záleží i na pohlaví, etnickém původu a věku sledovaných osob (15, 16). Nověji se zkoumají i možnosti zachytit v karotických arteriích i méně stabilní pláty s embolizačním potenciálem, a to posuzováním jejich struk-

tury, zvýšené vaskularizace a dalších známek nestability.

Poměr tlaků kotníků paže

U zdravých jedinců je systolický krevní tlak vyšší na dolních končetinách než na pažích. Změny na tepnách dolních končetin lze jednoduše kvantifikovat stanovením poměru systolických krevních tlaků kotník/paže, nazývaný ankle brachial index (ABI). Pokles ABI je většinou již známkou obliterujících aterosklerotických změn. Nejedná se tedy doslovně o parametr časných aterosklerotických změn, tento parametr ale významně předpovídá závažné kardiovaskulární příhody i u zcela asymptomatických osob. Měření se provádí Dopplerovským přístrojem a běžným tonometrem s manžetou. Je jedním z nejlevnějších a nejvíce dostupných vyšetření. ABI je vypočten na každém kotníku tak, že nejvyšší systolický tlak na arteria tibialis posterior a dorsalis pedis je dělen vyšším systolickým tlakem z obou paží. Riziková hodnota ABI je menší než 0,9. Z hlediska známek skutečně časného poškození cévní stěny pak může být velice významným faktorem naopak hodnota ABI nad 1,3–1,40, především u pacientů s diabetes mellitus a/nebo s renálním onemocněním, kde se může jednat o difúzní poškození cévní stěny mediokalcinózou, tedy s kalcifikací tunica media bez vlivu na arteriální lumen. I tento faktor je významným prediktorem budoucích kardiovaskulárních příhod.

Kalciové skóre koronárních tepen

Kalciové skóre koronárních tepen významně koreluje s následnými koronárními příhodami a ve zcela recentní práci bylo dobrým indikátorem právě pro nasazení léčby statiny (17). Jedná o téměř nejlépe standardizovanou metodu stanovení preklinických aterosklerotických změn. Nicméně některými odborníky je tato metoda v současnosti zpochybňována. Není zcela neinvazivní; jedná se o rentgenové vyšetření. Kalcifikace v koronárních tepnách jsou již známkou převážně stabilizovaných lézí a jejich vyhledávání nemá takový význam jako pátrání po méně stabilních plátech. Nicméně, rentgenová zátěž je minimální a kalcifikace sice mohou být známkou určité stability zobrazených lézí, nicméně jejich přítomnost s velkou pravděpodobností upozorňuje i na přítomnost nestabilních plátů, které ještě nezkalcifikovaly, a proto nejsou vidět. Kalcifikace koronárních tepen tedy samy o sobě nemusí být nebezpečné, ale upozorňují na přítomnost skutečně

nebezpečných plátů v koronárních tepnách. Ale zřejmě ani kalcifikace nemusí být zcela stabilní. Kalcifikace na povrchu, v „čepici“ plátu mohou naopak plát destabilizovat, vést k trombóze, a jsou-li tyto pláty v kritických místech koronárních či mozkových tepen, způsobí závažnou klinickou příhodu. Záleží na tom, jak kalcifikace vypadají v detailu. Rozsáhlejší homogenní kalcifikace jsou převážně stabilní, existují ale i mikrokalcifikace, které, jsou-li nevhodně umístěny v čepičce či jiné zranitelné oblasti plátu, mohou při rychlých změnách smykového napětí v oblasti stěny tepen vést k nevyváženému zatížení povrchu plátu, k (mikro)trhlinám a k následné destabilizaci plátu s klinickými následky – trombóze a koronární či mozkové příhodě. Modelové studie využívající biomechanických analýz vlastností plátů naznačují, že hlavním faktorem je velikost kalcifikace, její morfologie a lokalizace v plátu (18).

Pulzní vlna

Jednou z nepříznivých změn cévního systému je zvýšená arteriální tuhost, způsobená nikoli aterosklerózou, ale degenerativními změnami další vrstvy arteriální stěny – medie. Rychlost šíření pulzní vlny je tedy důsledkem arteriosklerózy, ne aterosklerózy, tedy konkrétně ztrátou poddajnosti cévní stěny. Ztrátu poddajnosti cévní/tepenné stěny lze poměrně spolehlivě a standardně stanovit zachycením vyšší rychlosti šíření pulzní vlny v tepenném systému. Tento parametr spolehlivě koreluje s následnými kardiovaskulárními příhodami. Mezi nejrozšířenější a ověřené techniky patří měření rychlosti šíření pulzní vlny mezi karotickými a femorálními tepnami. Tato technika je považována za „zlatý standard“. Jedná se o určitou analogii povrchové tonometrie s přiložením sondy na pravou karotickou arterii krkavice a pravou stehenní tepnu a měřením času putování vlny mezi oběma body. Odčítá se standardně z planimetrické křivky (4).

Endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkce je nejčasnější manifestací poruchy integrity cévní stěny. Pro posouzení funkce endotelu bylo popsáno velké množství technik včetně velice invazivních typu aplikace acetylcholinu do koronárních, případně brachiálních tepen a měřením jejich dilatace. Nejčastěji používaná neinvazivní metoda je sledování dilatace brachiální tepny zprostředkované zvýšeným krevním průtokem – reaktivní hyperemií. Princip je detekce reakce endotelu na zvýšený průtok,

kteřá by za fyziologických okolností měla vést k vyšší produkci oxidu dusnatého a jím zprostředkované dilataci. Novější metodiky jsou založeny na hodnocení endoteliální funkce i v oblasti prstu. Zřejmě nejrozšířenější je hodnocení endoteliální funkce na základě arteriální tonometrie (EndoPAT), což je technika, používající v zásadě teplotu/její změny jako zástupný ukazatel průtoku krve. Přináší slibné výsledky, nicméně stále spíše na výzkumném poli a její klinické použití zatím není doporučeno. Tyto metody sice velice citlivě zachycují endoteliální dysfunkci, nicméně trpí vysokým stupněm variability. Základní principy a význam těchto metodik jsou velmi dobře shrnuty v posledních doporučeních pracovní skupiny Evropské kardiologické společnosti (4).

Pozitronová emisní tomografie kombinovaná se zobrazovacími metodami – magnetickou rezonancí, počítačovou tomografií

Možná metoda budoucnosti, zatím výhradně používaná pro výzkumné účely i vzhledem k finanční a logistické náročnosti. Měla by být schopna zachytit i strukturu a metabolickou aktivitu aterosklerotických lézí a pomoci rozhodnout nejen o léčbě farmaky, ale v případě hraničních stenóz karotických arterií i o případných revascularizačních zákrocích. Vybrané a zřejmě méně početné skupiny pacientů by tedy mohly z těchto diagnostických postupů profitovat (19–20).

Závěr

Všechny zmíněné metody jsou jistě velice vhodné ke studiu kardiovaskulárních onemocnění a k výzkumu možností jejich prevence. Naprostá většina diskutovaných parametrů však není v současnosti ověřena například z hlediska reklasifikace rizika určeného na základě tradičních rizikových faktorů: pohlaví, věku, rodinné anamnézy, kouření, krevního tlaku, LDL cholesterolu a diabetes mellitus. U pacientů s hraničními nálezy však tyto postupy mohou pomoci rozhodnout o léčbě. Mezi nejnadařnější v současnosti patří následující: měření poměru krevních tlaků kotník/paže, ultrazvuková detekce preklinické aterosklerózy na karotických arteriích, rychlost šíření pulzní vlny a stanovení kalciového skóre koronárních tepen. Užitečnost těchto ukazatelů podporují i výsledky sofistikovaných statistických metod, (netto index reklasifikace), které u vybraných skupin pacientů mohou vést k upřesnění jejich rizika i při znalosti

všech jmenovaných tradičních faktorů. Nicméně stále chybí studie, ve kterých by byly, ideálně paralelně, sledovány všechny diskutované parametry a na jejichž základě by bylo možné určit,

kteřé (kombinace) z těchto parametrů mohou mít skutečný význam pro klinickou praxi. Přehled rizikových hodnot nejčastěji používaných metod je v tabulce 2.

LITERATURA

1. Kannel WB, Schatzkin A. Sudden death: lessons from subsets in population studies. *J Am Coll Cardiol.* 1985; 5(6 Suppl): 141B–149B.
2. Shaw LJ, Bugiardini R, Merz CN. Women and ischemic heart disease: evolving knowledge. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54(17): 1561–1575.
3. Ferenczi EA, Asaria P, Hughes AD, et al. Can a Statin Neutralize the Cardiovascular Risk of Unhealthy Dietary Choices? *Am J Cardiol.* 2010; 106(4): 587–592.
4. Vlachopoulos C, Xaplanteris P, Aboyans V, et al. The role of vascular biomarkers for primary and secondary prevention. A position paper from the European Society of Cardiology Working Group on peripheral circulation: Endorsed by the Association for Research into Arterial Structure and Physiology (ARTERY) Society. *Atherosclerosis.* 2015; 241(2): 507–532.
5. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J.* 2003; 24(10): 987–1003.
6. Cook NR, Paynter NP, Eaton CB, et al. Comparison of the Framingham and Reynolds Risk scores for global cardiovascular risk prediction in the multiethnic Women's Health Initiative. *Circulation.* 2012; 125(14): 1748–1756.
7. Siontis GC, Tzoulaki I, Siontis KC, et al. Comparisons of established risk prediction models for cardiovascular disease: systematic review. *BMJ.* 2012; 344: e3318.
8. Hoefer IE, Steffens S, Ala-Korpela M, et al. ESC Working Group Atherosclerosis and Vascular Biology. Novel methodologies for biomarker discovery in atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2015; 36(39): 2635–2642.
9. Abdelhafiz AH, Ahmed S, El Nahas M. Microalbuminuria: marker or maker of cardiovascular disease. *Nephron Exp Nephrol.* 2011; 119(Suppl 1): e6–10.
10. Hermans MP. Non-invited review: prevention of microvascular diabetic complications by fenofibrate: lessons from FIELD and ACCORD. *Diab Vasc Dis Res.* 2011; 8(3): 180–189.
11. Smith JA, Ware EB, Middha P, et al. Current Applications of Genetic Risk Scores to Cardiovascular Outcomes and Sub-clinical Phenotypes. *Curr Epidemiol Rep.* 2015; 2(3): 180–190.
12. Davey Smith G, Hemani G. Mendelian randomization: genetic anchors for causal inference in epidemiological studies. *Hum Mol Genet.* 2014; 23(R1): R89–98.
13. Griffin M, Nicolaides AN, Belcaro G, et al. Cardiovascular risk assessment using ultrasound: the value of arterial wall changes including the presence, severity and character of plaques. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002; 32(5–6): 367–370.
14. Auzký O, Dembovská R, Mrázková J, et al. Relation between preclinical atherosclerosis and venous thromboembolism in patients with thrombophilias – longitudinal study. *Physiol Res.* 2014; 63(Suppl 3): S403–409.
15. Perk J, De Backer G, Gohlke H, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur. Heart J.* 2012; 33: 1635e1701.
16. Homma S, Hirose N, Ishida H, et al. Carotid plaque and intima media thickness assessed by b-mode ultrasonography in subjects ranging from young adults to centenarians. *Stroke.* 2001; 32: 830e835.
17. Nasir K, Bittencourt MS, Blaha MJ, et al. Implications of Coronary Artery Calcium Testing Among Statin Candidates According to American College of Cardiology/American Heart Association Cholesterol Management Guidelines: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol.* 2015; 66(15): 1657–1668.
18. Hutcheson JD, Maldonado N, Aikawa E. Small entities with large impact: microcalcifications and atherosclerotic plaque vulnerability. *Curr Opin Lipidol.* 2014; 25(5): 327–332.
19. Ripa RS, Kjær A. Imaging atherosclerosis with hybrid positron emission tomography/magnetic resonance imaging. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 914516.
20. Alie N, Eldib M, Fayad ZA, et al. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease: PET/CT for the Evaluation of Atherosclerosis and Inflammation. *Clin Med Insights Cardiol.* 2015; 8(Suppl 3): 13–21.