UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
FAKULTNÍ NEMOCNICE HRADEC KRÁLOVÉ

PROBLEMATIKA EXPERTNÍHO SYSTÉMU PRO OPTIMALIZACI LDL-AFERÉZ

MUDR. VLADIMÍR MAŠÍN

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

STUDIJNÍ PROGRAM: LÉKAŘSKÁ BIOFYZIKA

HRADEC KRÁLOVÉ, 2007

Práce byla zčásti podporována granty
IGA MZ ČR NB 7006-3, NR/8505-3, NR/9103-4, dále VZ MŠMT 111500004, MZO 00179906.

Disertační práce ve studijním programu Lékařská biofyzika byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu na Ústavu lékařské biofyziky Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové, v úzké spolupráci s aferetickým centrem 2. interní kliniky - Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové

Uchazeč : MUDr. Vladimír Mašín
Ústav lékařské biofyziky
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Školitel : Prof. MUDr. Pravoslav Stránský, CSc.
Ústav lékařské biofyziky
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Oponenti :

Prof. MUDr. RNDr. Jiří Beneš, CSc.
1. lékařská fakulta UK v Praze

Prof. MUDr. Adriena Sakalová, DrSc.
Slovenská zdravotnická univerzita, Bratislava

Stanovisko k disertaci vypracoval Ústav lékařské biofyziky Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové.

S disertací je možné se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty UK v Hradci Králové, Šimkova ul. 870.

Prof. MUDr. Pravoslav Stránský, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská biofyzika.

SLOVO ÚVODEM A PODĚKOVÁNÍ

Předkládaná práce se svým záběrem poněkud vymyká běžnému standardu disertačních prací – místo úzkého zaměření se na konkrétní problém zde spojujeme tři poměrně vzdálené oblasti: počítačové modelování kinetiky procesů v lidském organismu, biochemii a metabolismus lipidů a problematiku terapeutické aferézy. Tato různorodá kombinace si vynutila jisté kompromisy, zejména v rešeršní části práce. Ta si (vzhledem ke specializaci autora) klade za úkol uvést odborníky zabývající se převážně počítačovým modelováním do problematiky jim poměrně vzdálené. Tím je dán značný rozsah této části práce a též použití citací starších 5 let, které ilustrují historický vývoj v této oblasti. Kliničtí pracovníci zřejmě shledají některé části tohoto úvodu poněkud zjednodušenými – tato zjednodušení byla učiněna v zájmu srozumitelnosti práce.

V otázce jazykové úpravy jsme se snažili přidržet poslední verze Pravidel českého pravopisu (2003), s několika drobnými výjimkami vynucenými srozumitelností či souladem s literaturou v daném oboru (mL místo běžného ml; plasma, diskuse místo plazma, diskuze apod.).

Rád bych na tomto místě poděkoval všem svým učitelům a kolegům, kteří mi při její tvorbě byli nápomocni, v prvé řadě pak svému školiteli, Prof. MUDr. Pravoslavu Stránskému, CSc., za soustavnou metodickou a odbornou podporu, Prof. MUDr. Milanu Bláhovi, CSc., vedoucímu hemaferetického centra OKH FN HK, jehož snaha vůbec vznik této práce vyvolala a jenž zaštítil klinickou část problematiky, a Doc. MUDr. Aleně Stoklasové, CSc., za neocenitelnou pomoc při zpracování biochemické problematiky i drobnou mravenčí práci při korekturách. Dále bych rád poděkoval MUDr. Melanii Cermanové, PhD., MUDr. Martinu Blažkovi, PhD., kolektivu pracovníku Ústavu lékařské biofyziky v čele s Doc. Ing. Josefem Hanušem a všem přátelům za neochvějnou podporu při tvorbě této práce.

V Hradci Králové, dne 26. 4. 2007

Obhajoba se koná před komisí pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu
lékařská biofyzika
ve středu dne 27. června 2007 ve 13.00 hodin
Ústav lékařské biofyziky Lékařské fakulty,
Šimkova 870. Hradec Králové. místnost č. 3.

OBSAH

Slovo úvodem a poděkování ... 2
Obsah ... 3
Seznam použitých zkratek ... 4
Souhrn ... 6
Summary ... 7
1 Úvod – rozbor problematiky ... 8
1.1 Metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu ... 8
1.2 Historie a současnost LDL-aferéz v ČR ... 10
1.3 Matematické modelování LDL-aferéz ... 10
2 Pacienti a metody ... 12
2.1 Soubor pacientů ... 12
2.2 Použité metody ... 13
3 Cíle práce ... 16
3.1 Zavedení a ověření převzaté metodiky ... 16
3.2 Úprava metodiky a ověření upravené metodiky ... 16
3.3 Vyhodnocení přínosu práce ... 16
4 Výsledky ... 17
4.1 Popis a adaptace převzaté metodiky ... 17
4.2 Ověřování převzaté metodiky ... 19
4.3 Úprava metodiky podle získaných výsledků ... 20
4.4 Ověření nové metodiky ... 25
5 Diskuse ... 29
5.1 Rozbor provedených aproximací ... 29
5.2 Praktické přínosy ... 31
6 Závěr ... 35
6.1 Souhrn výsledků ... 35
6.2 Naplnění stanovených cílů ... 36
6.3 Náměty pro další práci ... 37
7 Použitá literatura ... 38
8 Vlastní publikace k tématu práce ... 42
8.1 Monografie ... 42
8.2 Původní články a statě ve sbornících ... 42
8.3 Vybrané přednášky a abstrakta ... 42

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACD-A	označení pro komerčně dostupný roztok citrátu používaný při LDL-aferéze (acid citrate dextrose)
ACEi	inhibitor enzymu konvertujícího angiotenzin II (angiotensin-converting enzyme inhibitor)
ACH	acetylcholin
ADA	adsorpčně-desorpční automat
ALT	alaninaminotransferáza
ALP	alkalická fosfatáza
Apo	apolipoprotein
AS	ateroskleróza
AST	aspartátaminotransferáza
AT II	angiotenzin II
AT	antitrombin
ATP	adenozintrifosfát
BMI	proporcionální index tělesné hmotnosti (body mass index)
Ca	vápník celkový, kalcium (calcium)
Cl	chloridy
CMP	cévní mozková příhoda
COX-1	cyklooxygenáza
CRP	C-reaktivní protein (C-reactive protein)
DALI	přímá selektivní LDL adsorpce (direct adsorption of lipids)
DD	D-dimery
EDRF	od endotelu odvozený relaxační faktor (endothelium derived relaxation factor, NO)
EKG	elektrokardiografie
FCH	familiární kombinovaná hyperlipidemie (familial combined hyperlipidaemia)
FH	familiární hypercholesterolemie (familial hypercholesterolaemia)
FN	fakultní nemocnice
FN HK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
f.II - f.XII	koagulační faktory II - XII
f.IIa - f.XIIa	aktivované formy koagulačních faktorů II - XII
FW	sedimentace erytrocytů
GAG	glykosaminoglykany
Gln	glutamin
Hb	hemoglobin
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
HELP	heparinem indukovaná extrakorporální LDL precipitace (heparin induced extracorporal LDL precipitation)
HMG-CoA	hydroxy-methyl-glutaryl-koenzym A reduktáza

HT	hematokrit erytrocytů (hematocrite)
HTML	hypertextový značkový jazyk (hypertext markup language)
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHS	ischemická choroba srdeční
IDL	lipoproteiny o střední hustotě (intermediate density lipoprotein)
I.U.	mezinárodní jednotka (international unit)
i.v.	nitrožilní, intravenózní
K	draslík (kalium)
LCAT	lecitin-cholesterol acyltransferáza
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (low density lipoprotein)
LF	Lékařská fakulta
LF UK	Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze
LMWH	frakcionovaný, nízkomolekulární heparin (low molecule weigth heparin)
Lp(a)	lipoprotein (a)
Na	sodík (natrium)
NaCl	chlorid sodný
NO	oxid dusnatý (nitrogen oxide); resp. EDRF
OKH	Oddělení klinické hematologie
PAF	aktivační faktor trombocytů (platelet activating factor)
PAI	inhibitor aktivátoru plazminogenu (plasminogen-activator inhibitor)
PAP	komplex plazminu s antiplazminem
PBS	označení pro komerčně dostupný roztok pufru používaný při LDL-aferéze
PDGF	od destiček odvozený růstový faktor (platelet derived growth factor)
PTA	perkutánní transluminární angioplastika (percutaneous transluminar angioplasty)
PTCA	perkutánní transluminární koronární angioplastika (percutaneous transluminar coronary artery angioplasty)
SD	statistické označení pro směrodatnou odchylku (standard deviation)
TAG	triacylglyceroly
UFH	nefrakcionovaný heparin (unfractionated heparin)
ÚHKT	Ústav hematologie a klinické transfuziologie Praha
UK	Univerzita Karlova v Praze
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein)
vWF	von Willebrandův faktor

SOUHRN

Předkládaná práce se zabývá problematikou optimalizace rozvrhu procedur imunoadsorpčních LDL-aferéz.

Po úvodní části vysvětlující teoretické pozadí práce se v první části vlastní práce autor zaměřil na zavedení a ověření metodiky optimalizace LDL-aferéz převzaté z literatury. Tato převzatá metodika vycházela z aproximace kinetiky LDL-cholesterolu v průběhu aferézy kinetikou kontinuální filtrace, tedy exponenciálním poklesem hladiny. Na základě tohoto předpokladu pak následně bylo určováno množství plasmy, které bylo třeba promývat jednotlivými adsorpčními kolonami, aby byla nasycena jejich udávaná adsorpční kapacita.

Výsledky 363 LDL-aferéz optimalizovaných pomocí této převzaté metodiky však nebyly uspokojivé – mediány skutečných a predikovaných hodnot hladin LDL-cholesterolu po ukončení celé procedury se poměrně výrazně lišily (0,910 mmol.L^{-1} resp. 0,300 mmol.L^{-1}; $p < 0,01$, vyhodnoceno Wilcoxonovým testem).

V další části práce proto autor prozkoumal průběh aferéz detailněji a zjistil, že množství LDL-cholesterolu skutečně adsorbované kolonami neodpovídalo výrobcem udávané adsorpční kapacitě, avšak bylo lineárně závislé na hladině LDL-cholesterolu v plasmě na začátku promývání dané kapsle. Na základě tohoto objevu pak následně vytvořil novou metodiku, kterou ověřil na souboru 47 LDL-aferéz. Výsledky LDL-aferéz optimalizovaných pomocí autorem vyvinuté metodiky byly výrazně lepší, třebaže ne zcela přesné. Rozdíl mediánů skutečných a předpovězených hodnot byl nepatrný (1,85 mmol.L^{-1} vs. 1,80 mmol.L^{-1}), i když Wilcoxonova testu byl statisticky významný ($p < 0,01$).

Srovnání celkových výsledků 462 procedur prováděných podle dříve používaného pevného rozpisu s výsledky 116 procedur plánovaných pomocí nově vyvinuté metodiky pak prokázalo přínos práce: Používání inovované metodiky přineslo významné snížení hladin LDL-cholesterolu po skončení procedury (mediány 0,845 mmol.L^{-1} vs. 0,770 mmol.L^{-1}; $p = 0,015$ – Mann-Whitney), třebaže jeho hodnoty na počátku procedury se lišily pouze nevýznamně (mediány 5,335 mmol.L^{-1} vs. 5,190 mmol.L^{-1}; $p = 0,619$ – Mann-Whitney). Toto zlepšení bylo dosaženo bez zvýšení objemu promývané plasmy (mediány 7000 mL vs. 7000 mL; $p = 1,00$ – Mann-Whitney) a bez zvýšení nežádoucí eliminace HDL-cholesterolu (mediány 1,110 mmol.L^{-1} vs. 1,065 mmol.L^{-1}; $p = 0,083$ – Mann-Whitney).

Diskusní část práce se zaměřila na rozbor možných příčin nepřesností předpovědí – nenulový přepad LDL-cholesterolu kolonou ještě před dosažením předpovězené kapacity, překračování naplánovaných objemů (vynucené technickými příčinami – fixní dobou regenerace kolon), nepřesné stanovení objemu plasmy pacientů podle tělesného povrchu a možný vliv transportu LDL-cholesterolu z intersticia. V jejím rámci byly rovněž probrány vedlejší přínosy práce – ověření životnosti kolon a možnost včasné detekce vadných kolon.

Závěrečné shrnutí konstatovalo úspěšné splnění cílů práce a nastínilo další možnosti pokračování výzkumu v této oblasti – zejména rozšíření metodiky na další příbuzné procedury (s možným použitím pro srovnání kolon různých výrobců) a otázku metody přesného stanovení objemu plasmy, která by bylo vhodná pro běžný provoz.

SUMMARY

The presented work deals with the problem of the procedure regimen optimization in immunoadsorption LDL-apheresis.

The author aimed (after an introduction describing theoretical background of the problem) at a set-up and verification of a LDL-apheresis optimization method adopted from literature at first. This adopted method was based on an approximation of a LDL-cholesterol kinetics during the LDL-apheresis to the kinetics of the continuous filtration, described as the exponential decrease of the plasma levels. Based on this assumption then we calculated the volume of plasma, that should be washed through the columns to saturate their indicated adsorption capacity.

The results of 363 LDL-apheresis procedures, optimized using the adopted method, were not satisfactory – the medians of the real and the predicted values of the plasma LDL-cholesterol levels after the procedure were significantly different (0.910 mmol.L^{-1} vs. 0.300 mmol.L^{-1}; $p < 0.01$, Wilcoxon test).

The author therefore studied the intra-apheresis kinetics of LDL-cholesterol in a closer detail in the second part of this work. He found the real amount of LDL-cholesterol adsorbed by the columns to be different from the indicated adsorption capacity, and derived a formula for its prediction. The real adsorption capacity was found to be dependent on the plasma level of LDL-cholesterol in the begining of the procedure. This finding became the cornerstone of the new method, which was later verified on the set of another 47 LDL-apheresis procedures. The new method provided better prediction of LDL-cholesterol levels after procedure, although not a perfect one. The difference of medians of the real and the predicted levels was small (1.85 mmol.L^{-1} vs. 1.80 mmol.L^{-1}), but statistically significant ($p < 0.01$; Wilcoxon test).

The final comparison of the summary results of 462 procedures planned with the old regimen of the fixed volumes to 116 procedures planned with the newly developed method clearly demonstrated benefits of this research: The new planning method resulted in a significant decrease of the LDL-cholesterol plasma levels after the procedures (medians 0.845 mmol.L^{-1} vs. 0.770 mmol.L^{-1}; $p = 0.015$ – Mann-Whitney test), although the plasma levels in the beginning of the procedures differed only insignificantly (medians 5.335 mmol.L^{-1} vs. 5.190 mmol.L^{-1}; $p = 0.619$ – Mann-Whitney test). This improvement was accomplished without any increase of the volume of plasma washed (medians 7000 mL vs. 7000 mL; $p = 1.00$ – Mann-Whitney test) and without any significant increase of undesirable HDL-cholesterol elimination (medians 1.110 mmol.L^{-1} vs. 1.065 mmol.L^{-1}; $p = 0.083$ – Mann-Whitney test).

The discussion part of this work analyzed possible causes of the observed imprecisions of the predictions of the new planning method – incomplete LDL-cholesterol elimination by the columns, surpassing of the planned volumes (forced by technical reason – fixed column regeneration time), imprecise plasma volume estimate, and a possible influx of LDL-cholesterol from extravascular compartments into circulation. Some additional outcomes of this research were also mentioned here – the verification of the column lifespan and the prediction of an imminent column failure.

The conclusion stated successful fulfillment of the goals of this project and sketched a further scope of the research in this area – the extension of the newly developed method to other types of adsorbers and the problem of an exact plasma volume measurement method suitable for daily use.

1 ÚVOD – ROZBOR PROBLEMATIKY

Ateroskleróza a její komplikace patří ve vyspělých zemích, včetně České republiky, [1, 2] mezi nejčastější příčiny úmrtí, a proto je výzkumu její patogeneze a léčby věnována velká pozornost už řadu desítek let. Při současném stavu poznání je ovlivnění těchto rizikových faktorů jedinou možností, jak zastavit, anebo alespoň zpomalit rozvoj aterosklerotických změn a následných komplikací. V předkládané práci se zaměřím na metabolismus lipoproteinů, z nichž pak věnuji největší pozornost LDL s vysokým obsahem cholesterolu – rizikového faktoru, který lze v řadě případů poměrně snadno ovlivnit. U většiny pacientů k jeho snížení postačí dietní opatření, případně farmakoterapie; jen v malém procentu případů je nutné uchýlit se k jeho extrakorporální eliminaci. [3]

1.1 METODY EXTRAKORPORÁLNÍ ELIMINACE LDL-CHOLESTEROLU

Snahy o extrakorporální eliminaci cholesterolu se objevily už v polovině 70. let minulého století. V té době ještě nebyl znám LDL receptor a jeho vztah k familiární hypercholesterolémii ani neexistovala moderní hypolipidemika, jako jsou statiny. Možnosti terapie byly u pacientů trpících výraznou hypercholesterolémií velmi omezené a jejich prognóza byla špatná. [4]

G. R. Thompson z londýnské Hammersmith Hospital přišel v roce 1975 s jednoduchou myšlenkou: Stav a prognózu pacientů by bylo možné zlepšit pouhým odstraněním hypercholesterolémie jako vyvolávající příčiny, k čemuž se rozhodl použít techniku výměny plasmy pacientů za plasmu zdravých dárců. [5]

Výměnná plasmaferéza je ovšem neselektivní terapie – spolu s cholesterolem, jehož odstranění je žádoucí, byly rovněž odstraňovány cenné složky plasmy; pacienti byli vystavování především riziku infekcí a krvácení. Opakované podávání dárcovské plasmy pak vyvolávalo také přecitlivělost na lidské bílkoviny a alergické reakce nejrůznějšího typu – od svědění, urtikaroidních vyrážek až po těžké šokové stavy, ohrožující možnost dalšího pokračování v léčbě. Z těchto důvodů bylo koncem osmdesátých let od používání této techniky postupně upouštěno a byla nahrazena moderními, selektivními technikami extrakorporální eliminace cholesterolu.

Nejstarší z dosud používaných technik specifické extrakorporální eliminace LDL je imunoadsorpce, poprvé popsaná Stöffelem [6] v Německu roku 1981. Během 80. let minulého století byla tato technika dále rozvíjena na mnoha pracovištích, nejenom jedním z původních autorů [7], ale i Saalem a Gordonem v USA [8] či Pokrovským [9] v tehdejším Sovětském svazu.

Stejně jako většina soudobých metod extrakorporální eliminace cholesterolu imunoadsorpce nepoužívá plné krve, ale samotné plasmy. K oddělení krevních tělísek od plasmy bývají používány separátory krevních tělísek, pracující na principu centrifugace [10] případně také filtrace přes membránové filtry, která však vede k vyššímu poklesu HDL. [10] V obou případech je třeba přidávat antikoagulační činidla, obvykle se používá heparin v kombinaci s citráty (např. ACD-A). Čistá plasma poté prochází adsorbéry, které obsahují protilátky proti apo B-100, obvykle navázané na sefarózový gel. Při průchodu plasmy jsou částice LDL, obsahující apo B-100, těmito protilátkami vychytávány, čímž postupně dochází k saturaci adsorbéru. Jeho následná regenerace se provádí promytím glycinovým pufrem s 25% HCL (pH = 2,4) a promytím fyziologickým roztokem pro úpravu pH. [11] Obvykle se během jedné procedury každý

adsorbér použije 2-5krát a je promyto 4000-7000 mL plasmy. [10-13] Výhodou imunoadsorpční LDL-aferézy je vysoká selektivita (dochází jen k nevelkému poklesu HDL) a velmi nízké procento vážných nežádoucích reakcí. [14] Na druhé straně je nutno přiznat, že jde o metodu náročnou na technické vybavení pracoviště, a tudíž i nákladnou.

Wieland a kol. využili precipitace plasmatického LDL za přítomnosti heparinu a snížení pH, proto svojí metodě dali název heparinem indukovaná extrakorporální precipitace LDL a fibrinogenu (Heparin-induced Extracorporeal LDL/fibrinogen Precipitation = HELP). [15, 16] Rovněž tato metoda vyžaduje v prvním kroku separaci plasmy a buněčných složek krve, u HELP je využívána v tomto kroku takřka výhradně filtrace přes filtry z dutých vláken. [17] Plasma je pak smíchávána s acetátovým pufrem (pH = 4,84) obsahujícím heparin v množství 100 $U.mL^{-1}$. Vzniklý precipitát je odfiltrován polykarbonátovým filtrem s průměrem pórů 0,45 μm a nadbytečný heparin je z filtrátu adsorbován filtrem na bázi diethylaminoethylcelulózy (DEAE). Posledním krokem před smícháním plasmy s krevními elementy a vrácením krve pacientovi je dialýza/ultrafiltrace proti bikarbonátovému pufru, která obnoví fyziologické pH plasmy a odstraní přebytečné tekutiny.

Další chemická metoda extrakorporální eliminace LDL byla uvedena do klinické praxe roku 1985 Yokoyamou a kol. [18] Využívá dextransulfátu kovalentně vázaného na celulózu, který selektivně váže VLDL a LDL, avšak nereaguje s HDL. V současném provedení tato technika využívá dvojice 150 mL kolon, které jsou střídavě promývány heparinizovanou plasmou a regenerovány hypertonickým roztokem chloridu sodného (4,1% NaCl). Celý proces je řízen automatickým aferézním monitorem, takže je možné jej cyklicky opakovat. Vzhledem k mechanismu účinku je tato metoda efektivní i u pacientů s vrozeným defektem apo B-100. [19] V posledních letech je dostupná rovněž varianta adsorbérů kompatibilní s plnou krví (Liposorber D), která přináší významné zjednodušení procedury při zachování selektivity a efektivity původních adsorbérů. [20] U většiny pacientů je LDL-aferéza s dextransulfátovými adsorbéry dobře snášena, pouze s minimálním výskytem komplikací. [21] V některých případech se však vyskytly závažné vedlejší účinky vedoucí až k anafylaktickému šoku. Příčinou těchto reakcí je masivní vzestup bradykininu u pacientů léčených inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu (ACE). Proto je před LDL aferézou s použitím dextransulfátových adsorbérů důrazně doporučováno vysazení ACE inhibitorů a jejich náhrada antagonisty angiotensinového receptoru, které jsou bezpečné i při použití heparinu. [22]

Počátkem 90. let minulého století byl firmou Fresenius (St. Wendel, Německo) uveden na trh první komerčně dostupný nehemolytický adsorbér pod názvem Direct Adsorption of Lipoproteins (DALI). První klinické použití tohoto nového adsorbéru pak popsali Bosch a kol. roku 1993. [23] DALI využívá adsorpce LDL a Lp(a) na polyakrylamid potažený polyakrylátem. Negativně nabité karboxylové skupiny polyakrylátu vytvářejí polyanionty, které selektivně reagují s apo B-100, a touto elektrochemickou reakcí imobilizují lipoproteiny obsahující apo B-100, aniž by docházelo k významným ztrátám HDL či fibrinogenu. DALI adsorbéry jsou jednorázové, jsou dostupné v objemech 500, 750 a 1000 mL, přičemž již 500 mL verze postačí k promytí 1,5-2násobku objemu krve pacienta, což ve většině případů je postačující. [24] Výhodami této techniky jsou dobrá selektivita, vysoká efektivita a relativně jednoduché použití, cena samotných adsorbérů je však poněkud vyšší.

Určitým protikladem výše uvedených specifických metod eliminace LDL jsou metody založené na filtraci plasmy. Jejich historie začíná již počátkem 80. let minulého

století kaskádovou filtrací, představenou Agishim a kol. již v roce 1980 [25], kdy byla vůbec první alternativou výměnné plasmaferézy. Kaskádová filtrace získala svůj název na základě použité techniky dvojí filtrace. Prvním membránovým filtrem byla plná krev rozdělována na krevní elementy a plasmu. Ta byla dále filtrována přes druhou membránu, která na základě velikosti a charakteru molekul zachycovala především LDL, Lp(a) a fibrinogen, méně pak triacylglyceroly, HDL a imunoglobuliny. [26] Postupem času byla kaskádová filtrace dále technicky zdokonalována, zejména ve směru snížení ztrát HDL v průběhu procedury. Pro tuto zdokonalenou variantu se již nepoužívá název kaskádová filtrace, pro odlišení od původní metody se hovoří o lipidfiltraci. [27]

Výrazná eliminace fibrinogenu při kaskádové filtraci či lipidfiltraci nemusí být vždy nežádoucí, neboť vede ke snížení viskozity plasmy a tím ke zlepšení zejména mikrocirkulace. To vedlo k cílenému vývoji další varianty kaskádové filtrace, která kromě LDL a fibrinogenu cíleně snižuje i hladiny dalších vysokomolekulárních složek plasmy (IgM, α-2-makroglobulinu), čímž je snížení viskozity plasmy dále zvýrazněno. Viskozita plasmy je klíčová pro rheologické vlastnosti krve, odsud tato metoda získala název rheoferéza. [28], Rheoferéza je používána ve specifických indikacích – v terapii suché formy věkem podmíněné makulární degenerace [29] náhlé ztráty sluchu [30] apod.

1.2 HISTORIE A SOUČASNOST LDL-AFERÉZ V ČR

V České republice se problematikou separačních technik zabývala od začátku 80. let Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK). [31] Oddělení klinické hematologie při II. interní klinice FN HK má jako akreditované separační centrum bohatou zkušenost s více než 1500 léčebnými výkony LDL-aferézy. Jak plasmaferéza, jako nespecifická metoda, tak od roku 1996 i selektivní LDL-aferéza byly v léčbě hyperlipidémií na tomto pracovišti uplatněny jako první v naší zemi. Předmětem našeho léčebného snažení je také komplexní přístup k ovlivnění komplikací vzniklých na podkladě aterosklerózy, opakovaně byla prokázána důležitost fluidokoagulační rovnováhy. Metabolická efektivita LDL-aferézy se váže na zpomalením postupu či dokonce na ústup koronární aterosklerózy. [32]

Od roku 1999 se léčebné LDL-aferéze věnuje také pracoviště při III. interní klinice 1. LF UK a VFN v Praze. Od roku 2000 provádí imunoaferézu u myastenie gravis II. interní klinika, OKH v Hradci Králové, v letech 2000-2005 FN v Ostravě a od r. 2004 metodou se staphylokokovým antitoxinem A skupina pracovníků v ÚHKT Praha.

1.3 MATEMATICKÉ MODELOVÁNÍ LDL-AFERÉZ

1.3.1 Modelování kinetiky LDL-cholesterolu mezi procedurami

Většina prací zkoumajících kinetiku LDL-cholesterolu v souvislosti s LDL-aferézami se zabývá kvantifikací poklesu LDL-cholesterolu po provedení aferézy a průběhu jeho následného vzestupu (což bývá běžně označováno jako rebound kinetika). Průkopnickou práci v tomto oboru uveřejnili Kochinke a kol. již v roce 1988 [33], novější práce pak jejich výsledky potvrdily [34-35] a soustředily se zejména na odvození metod výpočtu středních hladin LDL-cholesterolu a dalších lipoproteinů v průběhu intervalu mezi procedurami. [36]

Na základě těchto výsledků je v současnosti všeobecně akceptován týdenní interval provádění LDL-aferéz u homozygotních pacientů s FH, který je (za předpokladu současné terapie statiny v maximálních tolerovaných dávkách) postačující k udržení středních hladin LDL-cholesterolu v přijatelném rozmezí. Rovněž je považován

za akceptovatelný výpočet této střední hladiny pouze z hodnot na začátku a konci intervalu, tedy po ukončení procedury a před započetím další. V praxi však takto časté opakování aferéz nebývá vždy možné dodržet, neboť to nedovoluje stav žil pacientů.

1.3.2 Modelování kinetiky LDL-cholesterolu v průběhu procedury

Na rozdíl od modelování rebound kinetiky bývá tato oblast obvykle opomíjena, neboť pro určování správného rozvrhu procedur jsou používány postupy doporučované výrobci vybavení. U většiny používaných technik je tento přístup plně opodstatněný, avšak u některých technik (jmenovitě u námi studované imunoaferézy) není vhodný, neboť správná volba parametrů vyžaduje vysoce individuální přístup.

Teoretická stránka modelování kinetiky LDL-cholesterolu v průběhu aferéz byla detailně rozebrána Stefancem v práci, která se stala jedním z východisek naší studie. [37] Dospěl zde k závěru, že pro modelování kinetiky v průběhu aferetické procedury lze použít jednoduchý jednokompartmentový model a celý problém řešit jako kontinuální filtraci s exponenciálním poklesem hladiny LDL-cholesterolu v plasmě. Okrajově rovněž řeší otázku kapacity kolon, zde však setrvává spíše v obecné rovině a předpokládá, že adsorpční schopnosti kolon jsou závislé pouze na jejich typu a jen mírně se zhoršují stárnutím kolon. Praktické ověření pak provedl na dvou metodách – HELP a imunoaferéze, kdy však testoval jiný typ kolon, než je používán na našem pracovišti.

Optimalizaci procedur využívajících námi používaných kolon studovali Yarovaya a kol. [38] Jejich matematická metodika využívá regresní analýzy a predikuje správný rozpis procedury na základě historických údajů u daného pacienta. Na základě této práce v současné době poskytuje fa Pocard pracovištím využívajícím jejich kolony konzultace k optimalizaci procedur. Metodika však je velmi komplikovaná, a proto není veřejně dostupná. Výsledky konzultací jsou k dispozici v nejlepším případě s několikahodinovým zpožděním, což vylučuje možnost operativní úpravy režimu procedury podle aktuální situace (např. podle průběžných hodnot laboratorních výsledků). Velkou nevýhodou je také její čistě empirická povaha, která neumožňuje přenášet výsledky mezi pacienty, což brání jejímu využití na začátku léčby, kdy je právě správné určení parametrů procedury nejobtížnější. V neposlední řadě pak musíme uvést její diskutabilní přesnost v případě výrazné změny parametrů (např. po vysazení antilipidemik či odložení procedury, kdy může plasmatická hladina LDL-cholesterolu pacienta před započetím procedury dosahovat výrazně vyšších hodnot oproti dřívějším sezením).

2 PACIENTI A METODY

2.1 SOUBOR PACIENTŮ

Výzkum byl prováděn v rámci dlouhodobě léčených nemocných na separátorovém centru oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN Hradec Králové. Jde o jediné nemocné léčené imunoadsorbční LDL-aferézou v ČR. Větší sestava není možná jak z technických, tak ekonomických důvodů.

Soubor sestával ze dvou pacientek s homozygotní formou familiární hypercholesterolémie, čtyř pacientů a dvou pacientek s heterozygotní formou familiární hypercholesterolémie a jednoho pacienta s familiární kombinovanou hyperlipidémií.

Pacient č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pohlaví	M	M	M	M	Ž	Ž	Ž	Ž	M
Věk	61	56	61	38	19	58	60	26	57
Typ hyperlipidémie	FH	FH	FH	FH	HFH	FH	FH	HFH	FCH
Zvýšení TAG	0	++	0	+	0	±	0	0	++
BMI	22,8	29,8	31,1	28,4	23,4	32,0	18,3	19,3	32,4
Hypertenze	0	+	0	0	0	0	+	0	+
Diabetes mellitus	0	+	0	0	0	0	0	0	+
ICHS	0	+	0	+	0	+	0	0	0
CMP	0	0	+	0	0	0	0	0	0
ICHDK	0	0	+	0	0	0	+	0	0
AS	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 1: Soubor pacientů

Legenda: Ž = žena; M = muž; HFH = homozygotní familiární hypercholesterolémie; FH = familiární hypercholesterolémie; FCH = familiární kombinovaná hyperlipidémie; AS = prokázaná přítomnost aterosklerózy; ICHS = ischemická choroba srdeční; CMP = cévní mozková příhoda; ICHDK = ischemická choroba tepen dolních končetin.

Nemocní byli vybíráni dle kritérií uvedených v tabulce 2. V současné době jsou publikována další výběrová kritéria, a to jak v USA, tak v Evropě, která se liší v podrobnostech. Náš výzkum a výběr pacientů byl prováděn v době, kdy kritéria uvedená v tabulce 6 výše byla obecně uznávaná a platná. [**39**] Obecně je však tendence spíše k zpřísňování hlediska na normální hladinu lipoproteinů.

Intervaly mezi léčebnými procedurami byly řízeny podle pravidel uznávaných většinou současné literatury [**40**] zásadní význam má podstatné snížení hodnot celkového cholesterolu, a to pod 2 $mmol.L^{-1}$ po proceduře s tím, že do další procedury má jeho hodnota stoupnout tak, aby se průměrná hodnota (mean cholesterol level) u heterozygotů rovnala horní hodnotě normy. V našem souboru 9 nemocných byl medián intervalu mezi dvěma léčebnými LDL-aferézami 19 dnů, rozsah 5-91 dnů.

Diagnóza	Věk [roky]	LDL-cholesterol [mmol.L^{-1}] *	Jiné rizikové faktory
HFH	Nad 5 nebo dle individuální tolerance	Není určeno	Není nutno splňovat
ICHS	Bez omezení u dospělých	Nad 4,9 **	Není nutno splňovat
Asymptomatická ICHS	Nad 30 (muži) Nad 40 (ženy)	Nad 6,4 ***	Pozitivní rodinná anamnéza s 1 nebo více rizikových faktorů AS

Tab. 2: Indikační kritéria pro výběr pacientů
** Při maximální tolerované farmakoterapii a dietním režimu*
*** Cílové terapeutické kritérium: LDL-C < 3,4 mmol.L^{-1}*
**** Cílové terapeutické kritérium: LDL-C < 5,2 mmol.L^{-1}*

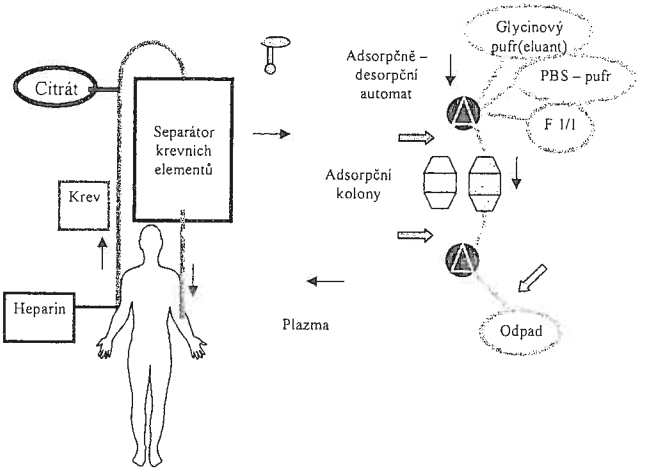
2.2 POUŽITÉ METODY

2.2.1 Metodika LDL-aferézy

Používáme metodu imunoabsorpční LDL-aferézy, kde léčebná procedura sestává ze dvou hlavních kroků:

1) Plasma je získána z plné krve, z níž je oddělena centrifugou za použití separátoru krevních elementů Cobe Spectra (Denver, USA). Plná krev protéká separátorem rychlostí 50-70 mL.min^{-1}. Jako antikoagulant je používán nefrakcionovaný heparin (UFH) v úvodní nitrožilní dávce 2500 I.U. jako bolus, poté dávkovací pumpou, zpočátku v množství 50 I.U.min^{-1} i.v. V dalším průběhu je heparinem saturována absorpční plocha aferetických kolon a podávané množství UFH tak může být sníženo na 25 I.U.min^{-1} i.v. Zároveň je v systému separátoru automaticky k plné krvi přidáván roztok citrátu, resp. ACD-A (Baxter, Německo) v poměru 1:22.

2) Plasma dále protéká adsorpčními kapslemi. Adsorbery Lipopak 400 (Pocard, Moskva, Rusko), obsahující ovčí protilátky proti apoproteinu B vázané na sepharosu 4B, jsou zde uchyceny ve speciálním adsorpčně-desorpčním zařízení ADA (Medicap, Ullrichstein, Německo), které je automaticky kontrolováno počítačem. Ve chvíli, kdy je kapsle nasycena LDL-cholesterolem, přístroj automaticky zapojí do funkčního systému další kapsli a první vymyje a připraví k opětovnému použití. K promytí používáme roztoky Serag-Wiessner (Naila, Německo). Vše probíhá kontinuálně, dokud není dosaženo podstatného poklesu sérové hladiny cholesterolu pod spodní mez fyziologických hodnot, cílem byl pokles pod 2 mmol.L^{-1}.



Obr. 1: Schéma provedení LDL-aferézy

Cílem je stabilizovat pacienty s homozygotní FH na průměrné hladině cholesterolu (mean cholesterol level) jen mírně přesahující normální hodnoty a zajistit průměrné normální hodnoty u heterozygotů FH.

2.2.2 Biochemické metody

Před započetím promývání každé adsorpční kolony a ihned po ukončení promývání bylo provedeno vyšetření sérových hladin celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu, HDL-cholesterolu a triacylglycerolů. Hladina LDL-cholesterolu v případě nízkých hodnot nemůže být spolehlivě kalkulována podle Friedwaldovy rovnice **[41]**, proto byla ve všech případech stanovována přímou fotometrickou enzymovou metodou. Ke stanovení biochemických ukazatelů byly užity sety a analyzátor firmy Roche Diagnostics GmbH – původně Boehringer (Mannheim, Německo). Pro stanovení LDL-cholesterolu byl použit set *LDL-C plus* s detekčním rozsahem 0,077-14,2 mmol.L^{-1}. HDL-cholesterol byl stanovován pomocí setu *HDL-C plus* s detekčním rozsahem 0,08-3,90 mmol.L^{-1} , celkový cholesterol pak setem CHOL s detekčním rozsahem 0,08-20,7 mmol.L^{-1}. Triacylglyceroly pak byly stanovovány s použitím setu TG, jehož detekční rozsah je 0,05-11,4 mmol.L^{-1}. Hemoglobin byl měřen fotometrickou metodou, počet leukocytů pomocí průtokové cytometrie a počet trombocytů impedanční metodou přístrojem Sysmex SE-210 (Sysmex, Kobe, Osaka, Japonsko). Vyšetření byla provedena akreditovanými laboratořemi Ústavu klinické biochemie a diagnostiky a Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Hradec Králové.

2.2.3 Statistické a matematické metody

Data byla sbírána do formulářů v Microsoft® Excel™, v tomto programu byly také zpracovány grafy časových trendů a trvanlivosti kolon. Rovněž program pro optimalizaci LDL-aferéz byl vytvořen Microsoft® Excel™, postupně byly použity verze Excel 97, Excel 2000, Excel 2002 a Excel 2003.

Statistické zpracování bylo v úvodu prováděno pomocí programu NCSS 6.0 (NCSS Inc., Kaysville, Utah, USA), později v programech STATISTICA 6 a STATISTICA 7 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA). V těchto programech byly použity metody popisné statistiky, korelační analýzy, lineární a nelineární regrese, metody stanovení normality dat a parametrické resp. neparametrické statistické testy. Tyto statistické metody jsou exaktně matematicky popsány, jejich implementace je ve všech použitých verzích programů stejná, použití různých programů v různých časových obdobích bylo dáno licenčními podmínkami.

Matematická odvození rovnic a integrální počty byly prováděny ručně, dodatečně byly ověřeny pomocí programu Derive 6 (MathWare, Ltd., Urbana, USA).

3 CÍLE PRÁCE

3.1 ZAVEDENÍ A OVĚŘENÍ PŘEVZATÉ METODIKY

Prvotním cílem naší práce bylo metodiku optimalizace LDL-aferéz popsanou v literatuře zavést v našich podmínkách.

Metodika popsaná Stefancem [37] je sice teoreticky správná, ale není vhodná pro běžné použití, neboť v kalkulaci průběhu procedury pracuje s některými veličinami, které nejsou v klinické praxi dostupné, zejm.:

- hladina LDL-cholesterolu na výstupu kolony
- závislost kapacity kolon na počtu použití.

Pro zavedení metodiky do praktického používání na našem pracovišti bylo třeba metodiku změnit, aby byla použitelná i bez znalosti těchto veličin.

Pro nasazení modelování LDL-aferéz v klinické praxi bylo třeba vytvořit jednoduchý počítačový program, použitelný na běžných počítačích pracovišť FN, který by umožnil lékaři u nemocného připravit a event. operativně upravovat průběh procedury bez nutnosti konzultace s teoretickým pracovištěm.

Součástí zavedení metodiky rovněž bylo ověření přesnosti predikce průběhu procedury na reálných datech.

3.2 ÚPRAVA METODIKY A OVĚŘENÍ UPRAVENÉ METODIKY

V průběhu ověřování výsledků adaptované metodiky se ukázalo, že převzatá metodika nedává prakticky použitelné výsledky. Proto jsme doplnili cíle práce o její zdokonalení; lze konstatovat, že prakticky šlo o novou metodiku.

Nejprve jsme si stanovili za cíl na základě analýzy dat získaných při ověřování převzaté metodiky odhalit a popsat vlivy způsobující pozorované odchylky.

Dalším plánovaným krokem pak byla úprava matematického modelu procedury a její implementace do používaného počítačového programu.

Předposledním stanoveným cílem byla verifikace námi upraveného modelu na novém souboru reálných dat.

3.3 VYHODNOCENÍ PŘÍNOSU PRÁCE

Konečně posledním cílem práce bylo vyhodnotit přínos jejich výsledků pro naše pacienty porovnáním účinnosti procedur naplánovaných s pomocí naší metodiky s kontrolní skupinou starších procedur realizovaných bez individuálního plánování.

4 VÝSLEDKY

4.1 POPIS A ADAPTACE PŘEVZATÉ METODIKY

Stefanec ve své práci [37] vyhodnotil dynamiku transportu cholesterolu mezi jednotlivými kompartmenty a dospěl k závěru, že pro účely modelování eliminačních procedur není nutno počítat s multifaktoriálním, multikompartmentovým metabolismem, protože během doby léčebné procedury se vliv extravazálních kompartmentů téměř neprojeví.

Na základě tohoto zjištění navrhl Stefanec modelování kinetiky cholesterolu jako kontinuální filtrace:

$$CH_1 = CH_b + \left(CH_0 - CH_b\right) \cdot e^{-\frac{Jt}{PV}}$$

Rovnice 1: Matematický popis kinetiky kontinuální filtrace.
Legenda v textu.

Podle tohoto modelu bude výsledná plasmatická hladina cholesterolu po provedení procedury CH_1 záviset na jeho počáteční hladině CH_0, rychlosti průtoku plasmy kapslí J, délce procedury t, objemu plasmy pacienta PV a množství cholesterolu, které kolonou projde nezachyceno CH_b. Stefanova práce byla publikována v době, kdy přímé stanovení hladiny LDL-cholesterolu nebylo zcela rutinní metodou, proto uvádí hladiny celkového cholesterolu. Nezachycený cholesterol CH_b by pak podle jeho interpretace měl odpovídat HDL-cholesterolu.

V době zahájení našeho výzkumu již přímé určení hladiny LDL-cholesterolu na našem pracovišti bylo standardně prováděno, proto jsme mohli přistoupit k nahrazení hladin celkového cholesterolu ve výpočtu klinicky podstatně důležitější proměnnou – hladinami LDL-cholesterolu. Hladinu LDL-cholesterolu na výstupu kolony (odpovídající CH_b) jsme se na základě konzultace se zástupcem dodavatele kolon Dr. Frankem rozhodli zanedbávat ($CH_b = 0$). Naše vybavení používá pro stanovení trvání procedury měření objemu promyté plasmy, proto jsme použili objem promyté plasmy V_p místo Stefancem používaného součinu průtoku a času $J.t$. Poslední námi provedenou úpravou bylo aproximování exponenciálního průběhu hladin. Výsledný tvar upravené rovnice průběhu hladiny LDL-cholesterolu v průběhu procedury tedy byl:

$$LDL_1 = LDL_0 \cdot \left(1 - \frac{1}{PV}\right)^{Vp}$$

Rovnice 2: Upravený popis kinetiky kontinuální filtrace.
Legenda v textu.

Reálná hladina LDL-cholesterolu pacienta v průběhu procedury ovšem odpovídá této rovnici pouze do doby, než dojde k nasycení adsorpční kapacity kolony. V tomto okamžiku je třeba přepnout na druhou kolonu a zahájit regeneraci nasycené kolony. Při výpočtu objemu plasmy potřebného k nasycení adsorpční kapacity kolony jsme v této fázi práce vyšli z výrobcem udávané kapacity 3000 mg LDL-cholesterolu. Z počáteční hladiny LDL_0, objemu plasmy pacienta PV a této vazebné kapacity B (přepočítané na látkové množství pomocí molekulová hmotnosti cholesterolu $M_{CH} = 386{,}67\ \mathrm{g.mol^{-1}}$) jsme pak spočítali hladinu cholesterolu v okamžiku nasycení kapsle LDL_1:

$$LDL_1 = \frac{LDL_0 \cdot PV - \frac{B}{M_{CH}}}{PV}$$

Rovnice 3: Hladina LDL-cholesterolu v okamžiku nasycení kapsle.
Legenda v textu.

Objem plasmy V_p, který je nutno promýt k dosažení hladiny LDL_1 a tedy k nasycení kapsle, lze pak jednoduše odvodit z rovnice 2:

$$V_p = \log_{\left(1-\frac{1}{PV}\right)} \frac{LDL_1}{LDL_0}$$

Rovnice 4: Promytý objem pro dosažení vypočtené hladiny LDL-cholesterolu.
Legenda v textu.

Objem plasmy pacienta PV [mL] jsme odhadovali pomocí výpočtu povrchu těla (BSA) **[42]** na základě hmotnosti m [kg], výšky h [m] a pohlaví:

$$PV_{muži} = 1560 \cdot \left(0{,}20247 \cdot h^{0{,}725} \cdot m^{0{,}425}\right)$$
$$PV_{ženy} = 1410 \cdot \left(0{,}20247 \cdot h^{0{,}725} \cdot m^{0{,}425}\right)$$

Rovnice 5 a 6: Odhad objemu plasmy pro muže a ženy.
Legenda v textu.

Na základě rovnic 3 – 6 jsme připravili jednoduchý program v prostředí Microsoft Excel™, pomocí kterého jsme byli schopni propočítat optimální průběh procedury, při kterém by nedocházelo ke zbytečnému promývání už nasycených kapslí.

Hmotnost [kg]	**86**
Výška [cm]	**168**
LDL_0 [mmol.L^{-1}]	**10**
Vazebná kapacita [mg]	**3000**
Objem plasmy [mL]	3055

	LDL [mmol.L^{-1}]	V [mL]	V´ [mL]	LDL´ [mmol.L^{-1}]
T=0	10,0			
Cyklus 1	7,5	895	850	7,6
Cyklus 2	5,0	1248	1200	5,0
Cyklus 3	2,5	2143	2100	2,5
Cyklus 4	0,0	14066	14050	0,0
Cyklus 5	0,0	14066	14050	0,0

Obr. 2: Ukázka výsledků první verze programu (varianta pro mužské pacienty)
Legenda: LDL – hodnota LDL v plasmě pacienta na konci cyklu při úplném využití kapacity kapsle; LDL' – hodnota LDL v plasmě pacienta po promytí V' mL plasmy; V – objem plasmy, který obsahuje množství LDL odpovídající kapacitě kapsle; V' – objem skutečně promyté plasmy

4.2 OVĚŘOVÁNÍ PŘEVZATÉ METODIKY

4.2.1 Naměřené výsledky

Pro úvodní ověření výsledků upravené metodiky jsme (vzhledem k malému souboru pacientů) využili retrospektivní analýzy údajů z procedur provedených od zavedení přímého měření LDL-cholesterolu na začátku roku 2000 do 1. 6. 2003. Celkem bylo vyhodnoceno 363 procedur.

	Normalita	Medián	Min	Max	Průměr	Sm. odch.
Ošetřený objem plazmy [mL]	0,000	7000	800	8000		
LDL před [mmol.L^{-1}]	0,136	5,31	1,63	12,41	5,407	2,037
LDL po [mmol.L^{-1}]	0,000	0,910	0,02	6,95		
LDL po teor. [mmol.L^{-1}]	0,000	0,300	0,07	5,31		
Proteklo 1 [mg]	0,185	1899	598	4438	1957	737
Proteklo 2 [mg]	0,331	1490	0	3419	1507	657
Proteklo 3 [mg]	0,201	682	0	1509	682	340
Proteklo 4 [mg]	0,997	357	0	866	341	218

Tab. 3: Výsledky retrospektivní analýzy provedených procedur (statistika)
Legenda: Ošetřený objem plasmy = objem plasmy celkem promytý adsorpčními kolonami za celou proceduru; LDL před = hladina LDL-cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením procedury; LDL po = hladina LDL-cholesterolu v plasmě pacienta po dokončení procedury; LDL po teor. = teoretická hladina LDL-cholesterolu v plasmě pacienta po dokončení procedury za předpokladu jeho úplné eliminace kolonami – vypočítáno podle Rovnice 2; Proteklo 1 až 4 = množství LDL-cholesterolu obsažené v plasmě promyté kapslemi v každém ze 4 cyklů (vypočítáno dle Rovnice 7).

4.2.2 Vyhodnocení

Ukázalo se, že reálné a teoreticky předpovězené hodnoty hladiny LDL-cholesterolu po proceduře se výrazně lišily – mediány skutečných a predikovaných hodnot byly 0,910 mmol.L^{-1} resp. 0,300 mmol.L^{-1} ($p < 0,01$, vyhodnoceno Wilcoxonovým testem). Nebyly tedy splněny předpoklady, ze kterých jsme vycházeli.

Množství LDL-cholesterolu obsažené v plasmě promyté jednotlivými kolonami jsme spočítali jako plochu pod křivkou závislosti hladiny LDL-cholesterolu na promytém objemu:

$$m_{LDL} = M_{mLDL} \cdot LDL_0 \cdot PV \cdot \left(1 - e^{-\frac{Vp}{PV}}\right)$$

Rovnice 7: Hmotnost LDL-cholesterolu obsaženého v plasmě protékající kolonami.
Legenda: m_{LDL} – hmotnost obsaženého cholesterolu v mg; M_{mLDL} – molární hmotnost cholesterolu v g.mol^{-1}; LDL_0 – hladina LDL-cholesterolu na začátku promývání kapsle v mmol.L^{-1}; PV – objem plasmy pacienta v L; V_p – promývaný objem plasmy pro danou kapsli v L

Tyto výsledky jsme pak doplnili do Tabulky 3 jako položky „Proteklo 1 – 4". Ukázalo se, že v některých případech (u první a druhé kolony) byla skutečně překročena adsorpční kapacita kolon 3000 mg.

Po vyloučení procedur, kde docházelo k překročení udávané adsorpční kapacity kolon, zbylo 330 procedur, jejichž statistické zpracování uvádíme v Tabulce 4.

	Normalita	Medián	Min	Max	Průměr	Sm. odch.
Ošetřený objem plazmy [mL]	0,0000	7000	800	8000		
LDL před [mmol.L^{-1}]	0,1357	5,110	1,630	8,390	5,046	1,754
LDL po [mmol.L^{-1}]	0,0000	0,840	0,020	6,030		
LDL po teor. [mmol.L^{-1}]	0,0000	0,281	0,071	4,516		
Proteklo 1 [mg]	0,6202	1842	598	2998	1828	636
Proteklo 2 [mg]	0,0189	1437	0	2513	1407	584
Proteklo 3 [mg]	0,0440	644	0	1250	635	312
Proteklo 4 [mg]	0,9761	331	0	719	314	204

Tab. 4: Výsledky retrospektivní analýzy provedených procedur po vyřazení procedur, u nichž byla překročena udávaná adsorpční kapacita kolon.
Legenda je shodná s Tab. 7a

Ovšem ani u těchto vybraných procedur nebyla shoda skutečné a předpovězené hladiny LDL-cholesterolu lepší – mediány skutečných a predikovaných hodnot byly 0,840 mmol.L^{-1} resp. 0,281 mmol.L^{-1} ($p < 0,01$, vyhodnoceno Wilcoxonovým testem).

Vyhodnocení výsledků převzaté metodiky tedy skončilo neuspokojivě. Rozhodli jsme se podrobněji prozkoumat chování námi používaných adsorpčních kolon a od června 2003 jsme začali provádět podrobnější biochemická vyšetření. Začali jsme vyšetřovat také hodnoty v plasmě pacienta a v plasmě na výstupu kolony v okamžiku ukončení každého promývání kolony. Z jedné procedury se čtyřmi cykly jsme tak získávali celkem pět vzorků, přičemž hodnoty z konce 1. – 3. cyklu byly zároveň hodnotami pro počátek 2. – 4. cyklu resp.

4.3 ÚPRAVA METODIKY PODLE ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ

4.3.1 Odvození a principy nové metodiky

Koncem roku 2003 jsme již měli k dispozici výsledky z 26 procedur, sestávajících celkem ze 101 terapeutických cyklů. Pro neúplnost dat (vyvolanou laboratorními chybami) jsme však museli 6 cyklů vyřadit.

	Normalita	Medián	Min	Max	Průměr	Sm. odch.
Ošetřený objem plazmy [mL]	0,1042	1800	1000	2330	1733	360
TC před [mmol.L^{-1}]	0,0000	4,610	2,170	12,990		
LDL před [mmol.L^{-1}]	0,0001	2,910	0,390	10,280		
HDL před [mmol.L^{-1}]	0,8428	1,330	0,130	2,620	1,274	0,467
TAG před [mmol.L^{-1}]	0,0001	0,980	0,120	5,660		
TC přepad [mmol.L^{-1}]	0,0000	1,665	0,910	5,140		
LDL přepad [mmol.L^{-1}]	0,0000	0,325	0,020	3,470		
HDL přepad [mmol.L^{-1}]	0,6477	1,150	0,580	1,700	1,094	0,289
TAG přepad [mmol.L^{-1}]	0,0000	0,540	0,030	4,370		

Tab. 5: Výsledky vyšetření lipidů v rámci prospektivní analýzy 95 terapeutických cyklů použitých při odvození nové metodiky (statistika)
Legenda: Ošetřený objem plasmy – objem plasmy celkem promytý adsorpční kolonou v daném cyklu; TC před – hladina celkového cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením cyklu; TC

přepad – hladina celkového cholesterolu v plasmě na výstupu kolony; LDL před – hladina LDL-cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením cyklu; LDL přepad – hladina LDL-cholesterolu v plasmě na výstupu kolony na konci cyklu; HDL před – hladina HDL-cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením cyklu; HDL přepad – hladina HDL-cholesterolu v plasmě na výstupu kolony; TAG před – hladina TAG v plasmě pacienta před zahájením cyklu; TAG přepad – hladina TAG v plasmě na výstupu kolony

Ukázalo se, že hodnoty LDL-cholesterolu na výstupu kolony nebyly nulové. Zatímco ve většině případů tyto hodnoty byly relativně nízké (medián 0,325 mmol.L^{-1}), v některých případech dosahovaly hodnot, které zcela jistě signalizovaly překročení adsorpční kapacity kolon (maximum 3,47 mmol.L^{-1}).

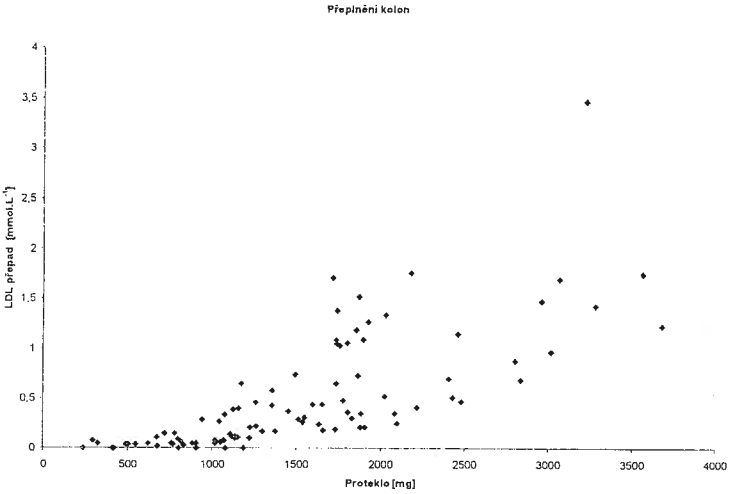
	Normalita	Medián	Min	Max	Průměr	Sm. odch.
Ošetřený objem plazmy [mL]	0,1042	1800	1000	2330	1733	360
LDL před [mmol.L^{-1}]	0,0001	2,910	0,390	10,280		
LDL po [mmol.L^{-1}]	0,0000	1,840	0,200	7,490		
LDL po teor. [mmol.L^{-1}]	0,0000	1,542	0,190	5,964		
LDL přepad [mmol.L^{-1}]	0,0000	0,325	0,020	3,470		
PV [mL]	0,4060	2871	2015	3201	2706	427
Δ LDL [mg]	0,0000	1052	12	3562		
Proteklo [mg]	0,0032	1378	236	3678		
V teor [mL]	0,0541	1274	79	2638	1344	484

Tab. 6: Výsledky prospektivní analýzy 95 terapeutických cyklů použitých při odvození nové metodiky (analýza eliminace LDL-cholesterolu – statistika)
Legenda: Ošetřený objem plasmy – objem plasmy celkem promytý adsorpční kolonou v daném cyklu; LDL před – hladina LDL-cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením cyklu; LDL po – hladina LDL-cholesterolu v plasmě pacienta po dokončení cyklu; LDL po teor. – teoretická hladina LDL-cholesterolu v plasmě pacienta po dokončení cyklu za předpokladu jeho úplné eliminace kolonou – vypočítáno podle Rovnice 2; LDL přepad - hladina LDL-cholesterolu v plasmě na výstupu kolony; PV – objem plasmy pacienta, vypočítaný podle Rovnice 5 resp. 6; Δ LDL – množství LDL-cholesterolu odebraného v daném cyklu; Proteklo - množství LDL-cholesterolu obsažené v plasmě promyté kapslí v každém z cyklů; V teor – objem plasmy, který obsahuje množství LDL odpovídající Δ LDL

Následně jsme vynesli proti sobě do grafu hladinu LDL-cholesterolu na výstupu kolony při ukončení cyklu a jeho množství proteklé kolonou během cyklu. Hladiny LDL-cholesterolu na výstupu kolony již kolem 1000 mg promytého LDL-cholesterolu přesáhly 0,5 mmol.L^{-1} a kolem 1700 mg se skokem přiblížily 2 mmol.L^{-1}.

Z toho jsme učinili jednoznačný závěr: Udávaná adsorpční kapacita kolon 3000 mg LDL-cholesterolu je pouze teoretická a v praxi kolona začíná propouštět výrazně dříve. Tato hodnota (kterou jsme nazvali efektivní kapacitou kolony) má zásadní význam pro optimální plánování průběhu procedury, ale jak je patrné z Grafu 1, není konstantní.

Zaměřili jsme se proto na možnosti predikce hodnoty efektivní kapacity kolony. V prvním kroku jsme dopočítali skutečné množství LDL-cholesterolu odebraného z plasmy pacientů v jednotlivých cyklech. Pro některé cykly bylo toto množství větší než množství, které (podle Rovnice 7) během daného cyklu kolonou proteklo; některá z hodnot pro daný cyklus musela tedy být nesprávná. Těchto 12 cyklů jsme proto z dalšího zpracování vyřadili a pokračovali s 83 cykly.



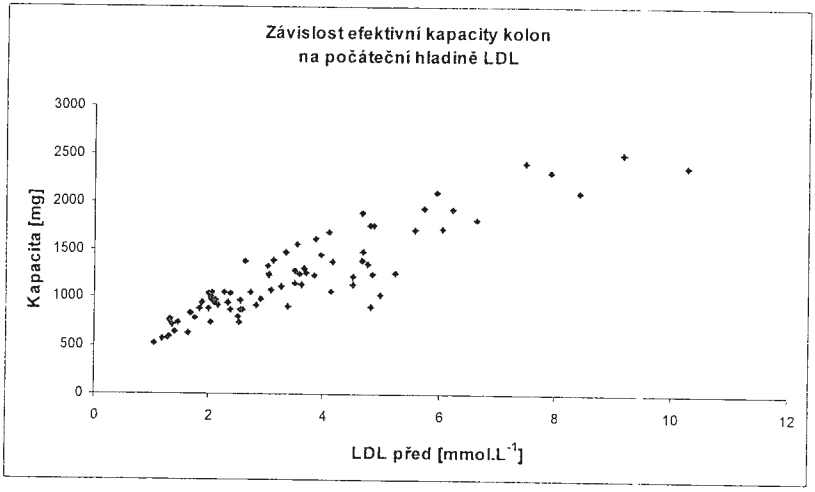
Graf 1: Vztah hladiny LDL-cholesterolu na výstupu kolony na konci cyklu ku množství LDL-cholesterolu promytého kolonou během cyklu

Pro tyto cykly jsme vypočítali korelace zjištěného množství eliminovaného cholesterolu s hladinami všech stanovovaných lipidů na počátku cyklu, s dopočítanou hodnotou nonHDL-cholesterolu na počátku cyklu a s parametry procedury (absolutním objemem promyté plasmy a poměrem promytého objemu plasmy k celkovému objemu plasmy pacienta). Přitom jsme předpokládali, že množství eliminovaného cholesterolu by mělo odpovídat efektivní kapacitě kolon, neboť množství LDL-cholesterolu v promyté plasmě v těchto případech bylo větší a tudíž nebylo limitujícím faktorem. Vzhledem k charakteru dat, nesplňujících podmínku normálního rozložení, jsme použili Spearmanův koeficient pořadové korelace – viz. Tab. 7.

	LDL před	TC před	HDL před	non HDL před	TAG před	VP	VP/PV	Kapacita
LDL před	1,000	0,977	0,196	0,959	0,309	-0,706	-0,502	0,881
TC před	0,977	1,000	0,266	0,956	0,346	-0,769	-0,546	0,832
HDL před	0,196	0,266	1,000	0,020	-0,283	-0,272	0,009	0,123
non HDL před	0,959	0,956	0,020	1,000	0,404	-0,718	-0,577	0,840
TAG před	0,309	0,346	-0,283	0,404	1,000	-0,416	-0,717	0,249
VP	-0,706	-0,769	-0,272	-0,718	-0,416	1,000	0,765	-0,434
VP/PV	-0,502	-0,546	0,009	-0,577	-0,717	0,765	1,000	-0,294
Kapacita	0,881	0,832	0,123	0,840	0,249	-0,434	-0,294	1,000

Tab. 7: Korelace jednotlivých stanovovaných parametrů

Legenda: LDL před – hladina LDL-cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením cyklu; TC před – hladina celkového cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením cyklu; HDL před – hladina HDL-cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením cyklu; nonHDL před – hladina nonHDL-cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením cyklu; TAG před – hladina TAG v plasmě pacienta před zahájením cyklu; VP – objem plasmy celkem promytý adsorpční kolonou v daném cyklu; VP/PV – poměr objemu plasmy promytého v daném cyklu ku objemu plasmy pacienta; Kapacita – efektivní kapacita kolony stanovená jako množství LDL-cholesterolu skutečně odebraného v daném cyklu



Graf 2: Závislost efektivní kapacity kolon na hladině LDL-cholesterolu na začátku cyklu.

Model	a	b	R^2
y = a + b.x	498	208	0,819
$y = a.x^b$	562	0,626	0,815
y = a + b.ln(x)	339	777	0,773
$y = a.e^{bx}$	638	0,164	0,759

Tab. 8: Výsledky regresní analýzy závislosti efektivní kapacity kolony na počáteční hladině LDL-cholesterolu
Legenda: y – efektivní kapacita kolony[mg]; x – počáteční hladina LDL-cholesterolu [mmol.L^{-1}]; a, b – regresní koeficienty pro daný model; R^2 – koeficient determinace pro daný model

Nejlepší shody s naměřenými daty (určené pomocí koeficientu determinace) jsme dosáhli u lineárního modelu s koeficienty a = 498 mg a b = 208 mg.mmol^{-1}.L, tedy

$$m_{adsLDL}[mg] = 498 + 208 \cdot LDL_0[mmol.L^{-1}]$$

Rovnice 8: Predikce efektivní kapacity kolon
Legenda: m_{adsLDL} – efektivní adsorpční kapacita kolony v mg; LDL_0 – hladina LDL-cholesterolu na začátku promývání kapsle v mmol.L^{-1}

Podle těchto výsledků jsme upravili náš program pro výpočet optimálního režimu LDL-aferéz: Vývoj hladiny zůstal modelován pomocí exponenciály, avšak kapacita kolony byla nahrazena námi predikovanou efektivní kapacitou kolony (počítanou zvlášť pro každý cyklus). Odstranili jsme dříve používané matematické aproximace:

$$LDL_1 = LDL_0 \cdot e^{-\frac{Vp}{PV}}$$

Rovnice 2a: Upravený popis kinetiky kontinuální filtrace.
Legenda shodná s původní Rovnicí 2

$$V_p = PV \cdot \ln\frac{LDL_0}{LDL_1}$$

Rovnice 4a: Promytý objem pro dosažení vypočtené hladiny LDL-cholesterolu po odstranění výpočetních aproximací.
Legenda shodná s původní Rovnicí 4

Jako poslední úpravu jsme provedli sjednocení obou dosavadních verzí (pro muže a ženy) do jedné.

Tento program je od roku 2004 používán k plánování procedur LDL-aferéz na hemaferetickém pracovišti FN v Hradci Králové.

Hmotnost [kg]	90
Výška [cm]	178
LDL_0 [mmol.L^{-1}]	3,54
Pohlaví	m
Objem plasmy [mL]	3248

	LDL [mmol.L^{-1}]	V [mL]	V´ [mL]	LDL´ [mmol.L^{-1}]	Teoretická kapacita [mg]
T=0	3,54			3,54	
Cyklus 1	2,56	1057	1050	2,56	1235
Cyklus 2	1,74	1255	1250	1,74	1031
Cyklus 3	1,06	1622	1600	1,07	861
Cyklus 4	0,49	2507	2500	0,49	720
Cyklus 5	0,02	11290	0	0,49	600
Cyklus 6	0,02	11290	0	0,49	600
Celkem			6400		

Obr. 3: Ukázka výsledků finální verze programu
Legenda: LDL – hodnota LDL v plasmě pacienta na konci cyklu při úplném využití kapacity kolony; V – objem plasmy, který by měly být v daném cyklu promývány; V' – objem skutečně promyté plasmy; LDL' – hodnota LDL v plasmě pacienta po promytí V' mL plasmy; Teoretická kapacita – efektivní kapacita kolony podle Rovnice 8

4.4 OVĚŘENÍ NOVÉ METODIKY

4.4.1 Naměřené výsledky

V rámci ověřování inovované metodiky plánování průběhu LDL-aferéz jsme provedli detailní vyšetření lipidů v 47 procedurách, ze kterých jsme mohli vyhodnotit celkem 202 cyklů, pro které jsme zpracovali analýzu eliminace LDL-cholesterolu.

	Normalita	*Medián*	*Min*	*Max*	*Průměr*	*Sm. odch.*
LDL před [mmol.L^{-1}]	*0,000*	*2,84*	*0,15*	*10,33*		
LDL po [mmol.L^{-1}]	*0,000*	*1,85*	*0,00*	*8,13*		
LDL přepad [mmol.L^{-1}]	*0,000*	*0,17*	*0,00*	*4,90*		
Ošetřený objem plazmy [mL]	*0,000*	*1367*	*700*	*3400*		
V teor [mL]	*0,000*	*1245*	*783*	*7606*		
LDL po teor. [mmol.L^{-1}]	*0,000*	*1,80*	*0,00*	*8,13*		
Teoretická kapacita [mg]	*0,000*	*1088*	*529*	*2649*		
Proteklo kolonou [mg]	*0,002*	*1183*	*99*	*2935*		
Reálně adsorbováno [mg]	*0,000*	*1036*	*122*	*3502*		

Tab. 9: Výsledky prospektivní analýzy 202 terapeutických cyklů použitých při ověření nové metodiky (analýza eliminace LDL-cholesterolu – statistika)
Legenda: LDL před – hladina LDL-cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením cyklu; LDL po – hladina LDL-cholesterolu v plasmě pacienta po dokončení cyklu; LDL přepad – hladina LDL-cholesterolu v plasmě na výstupu kolony; Ošetřený objem plasmy – objem plasmy celkem promytý adsorpční kolonou v daném cyklu; V teor – objem plasmy, jež by měl být ošetřen pro optimální využití efektivní adsorpční kapacity kolony dle Rovnice 4a; LDL po teor. – teoretická hladina LDL-cholesterolu v plasmě pacienta po dokončení cyklu za předpokladu jeho úplné eliminace kolonou – vypočítáno podle Rovnice 2a s použitím skutečného ošetřeného objemu

plasmy; Teoretická kapacita - vypočítaná efektivní adsorpční kapacita kolony dle Rovnice 8; Proteklo kolonou – množství LDL-cholesterolu obsažené v plasmě promyté kolonou dle Rovnice 7; Reálně adsorbováno množství LDL-cholesterolu skutečně odebraného v daném cyklu

U dalších 69 procedur jsme z ekonomických důvodů stanovovali pouze hladiny lipidů na začátku a na konci procedury. Spolu s výše uvedenými 47 procedurami jsme tak získali výsledky 116 procedur plánovaných podle inovované metodiky, které jsme porovnali s archivními výsledky 462 procedur z let 2000 – 2003, ve kterých byla používána dřívější metodika pevného rozpisu procedur.

	Normalita	*Medián*	*Min*	*Max*	*Průměr*	*Sm. odch.*
TC před [mmol.L^{-1}]	*0,0179*	*7,695*	*3,860*	*13,81*		
TC po [mmol.L^{-1}]	*0,0000*	*2,270*	*1,090*	*8,49*		
LDL před [mmol.L^{-1}]	*0,8389*	*5,335*	*0,000*	*12,41*	*5,331*	*1,950*
LDL po [mmol.L^{-1}]	*0,0000*	*0,845*	*0,000*	*6,95*		
HDL před [mmol.L^{-1}]	*0,0000*	*1,460*	*0,650*	*3,78*		
HDL po [mmol.L^{-1}]	*0,0000*	*1,100*	*0,160*	*3,67*		
TAG před [mmol.L^{-1}]	*0,0000*	*1,535*	*0,370*	*198*		
TAG po [mmol.L^{-1}]	*0,0000*	*0,500*	*0,040*	*7,30*		
Ošetřený objem plazmy [mL]	*0,0000*	*7000*	*800*	*8000*		

Tab. 10: Vyhodnocení – výsledky 462 procedur plánovaných původní metodikou (statistické vyhodnocení).

Legenda: TC před - hladina celkového cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením procedury; TC po – hladina celkového cholesterolu v plasmě po ukončení procedury; LDL před – hladina LDL-cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením procedury; LDL po – hladina LDL-cholesterolu v plasmě po ukončení procedury; HDL před – hladina HDL-cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením procedury; HDL po – hladina HDL-cholesterolu v plasmě po ukončení procedury; TAG před - hladina TAG v plasmě pacienta před zahájením procedury; TAG po - hladina TAG v plasmě po ukončení procedury; Ošetřený objem plasmy – objem plasmy celkem promytý adsorpční kolonou v dané proceduře

	Normalita	*Medián*	*Min*	*Max*	*Průměr*	*Sm. odch.*
TC před [mmol.L^{-1}]	*0,0004*	*7,250*	*4,920*	*12,61*		
TC po [mmol.L^{-1}]	*0,0000*	*2,020*	*1,410*	*8,91*		
LDL před [mmol.L^{-1}]	*0,0623*	*5,190*	*0,000*	*10,33*	*5,239*	*1,747*
LDL po [mmol.L^{-1}]	*0,0000*	*0,770*	*0,030*	*7,75*		
HDL před [mmol.L^{-1}]	*0,1065*	*1,470*	*0,740*	*2,69*	*1,515*	*0,476*
HDL po [mmol.L^{-1}]	*0,2871*	*1,065*	*0,240*	*1,66*	*1,060*	*0,318*
TAG před [mmol.L^{-1}]	*0,0000*	*1,530*	*0,330*	*6,95*		
TAG po [mmol.L^{-1}]	*0,0001*	*0,535*	*0,140*	*4,50*		
Ošetřený objem plazmy [mL]	*0,0000*	*7000*	*1200*	*8734*		

Tab. 11: Vyhodnocení – výsledky 116 procedur plánovaných inovovanou metodikou (statistické vyhodnocení). Legenda je shodná s Tab. 10

4.4.2 Vyhodnocení

V závěrečném vyhodnocování jsme se zaměřili na dva základní pohledy:

1) Vyhodnotili jsme shodu predikovaných výsledků s reálnými výsledky plánovaných procedur.

2) Vyhodnotili jsme rozdíl ve výsledcích procedur plánovaných pomocí naší inovované metodiky oproti kontrolní skupině archivních výsledků procedur prováděných pomocí dříve používaného pevného rozpisu.

Testování přesnosti predikce průběhu procedur jsme zahájili porovnáním skutečné hodnoty LDL-cholesterolu na konci každého cyklu s teoreticky předpovězenou hodnotou vypočítanou pro objem plasmy promytý v daném cyklu. Ačkoliv rozdíl mediánů těchto hodnot byl nepatrný (1,85 $mmol.L^{-1}$ pro skutečně naměřené oproti 1,80 $mmol.L^{-1}$ pro predikované hodnoty), podle Wilcoxonova testu byl statisticky významný ($p < 0,01$). V klinické praxi ovšem nepřesnost tohoto řádu nemá reálný význam, zajímavá byla pouze pro teoretický rozbor, popsaný ve vyhodnocení dalších výsledků níže a rovněž dále v diskusi.

Prvním vysvětlením, které se nabízelo, bylo překračování naplánovaných objemů promyté plasmy v jednotlivých cyklech, které by znamenalo překračování adsorpční kapacity kolon a zvýšený přepad LDL-cholesterolu (hladinu na výstupu kolony). Skutečně, v praxi realizované promyté objemy (medián 1367 mL) byly významně větší ($p < 0,01$, Wilcoxonův test) než naplánované objemy (medián 1245 mL). Příčiny tohoto stavu blíže rozebereme v diskusi.

Ačkoliv tedy naše predikce průběhu procedur nebyla absolutně přesná, tak srovnání s původní metodikou (Tab. 10 vs. Tab. 11) ukázalo její nesporný přínos:

	Medián procedur plánovaných původní metodikou	**Medián procedur plánovaných inovovanou metodikou**	**Statistická významnost (Mann-Whitney p)**
LDL před [$mmol.L^{-1}$]	*5,335*	*5,190*	*0,619*
LDL po [$mmol.L^{-1}$]	*0,845*	*0,770*	*0,015*
HDL před [$mmol.L^{-1}$]	*1,460*	*1,470*	*0,111*
HDL po [$mmol.L^{-1}$]	*1,100*	*1,065*	*0,083*
Ošetřený objem plazmy [mL]	*7000*	*7000*	*1,00*

Tab. 12: Vyhodnocení – statistické srovnání výsledků původní a inovované metodiky Mann-Whitneyovým testem.

Legenda: LDL před – hladina LDL-cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením procedury; LDL po – hladina LDL-cholesterolu v plasmě po ukončení procedury; HDL před – hladina HDL-cholesterolu v plasmě pacienta před zahájením procedury; HDL po – hladina HDL-cholesterolu v plasmě po ukončení procedury; Ošetřený objem plasmy – objem plasmy celkem promytý adsorpční kolonou v dané proceduře

Při statisticky nevýznamném rozdílu hodnot LDL-cholesterolu na počátku procedury se podařilo významně snížit hodnoty LDL-cholesterolu po jejím ukončení. Délka trvání procedur (měřená objemem promyté plasmy) přitom zůstala stejná. V neposlední řadě jsme rovněž prokázali, že naše úprava metodiky LDL-aferéz nenarušila jejich selektivitu: Hladiny HDL-cholesterolu před začátkem a po dokončení procedury se u obou metodik lišily pouze statisticky nevýznamně.

5 DISKUSE

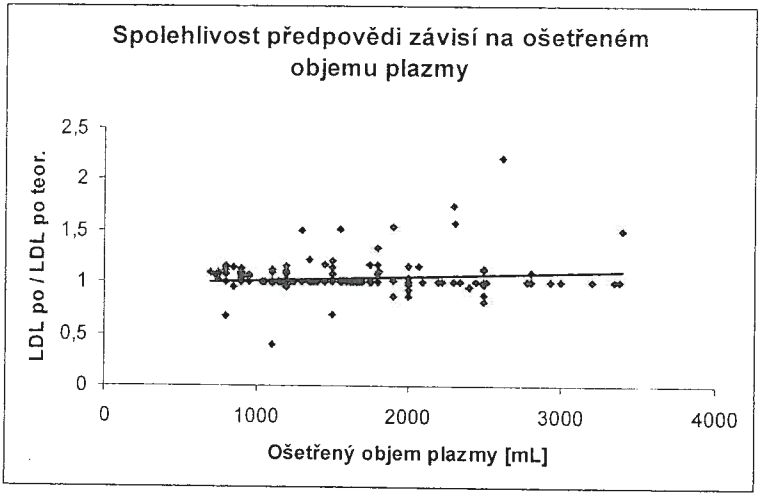
5.1 ROZBOR PROVEDENÝCH APROXIMACÍ

5.1.1 Aproximace kinetiky procedur

Reálná kinetika LDL-aferetické procedury sestává z částečné eliminace LDL-cholesterolu kolonou a jeho přirozené kinetiky – vychytávání v tkáních a jeho doplňování.

V našem modelování jsme aproximovali eliminaci LDL-cholesterolu kolonou kontinuální filtrací, zanedbali jsme tedy přepad LDL-cholesterolu na výstupu kolony. Teoreticky správný výpočet by měl vyčíslovat množství adsorbovaného LDL-cholesterolu jako rozdíl plochy pod křivkou jeho plasmatické hladiny (v závislosti na promytém objemu) a plochy pod křivkou jeho hladiny na výstupu kolony. Reálně pak ovšem známe pouze hodnoty LDL-cholesterolu na výstupu kolony při ukončení jejího promývání, ne již jejich vývoj. Předpokládáme, že hodnoty naměřené ke konci promývání budou hodnotami maximálními, neboť v tomto okamžiku se blížíme naplnění efektivní adsorpční kapacity kolony. Při správném naplánování procedury ani tyto maximální hodnoty nejsou příliš vzdáleny od detekčního limitu používané metody stanovování LDL-cholesterolu. Můžeme tedy shrnout, že aproximace eliminace LDL-cholesterolu kontinuální filtrací sice vnáší do předpovědi procedury jisté systematické chyby, ale jejich velikost je pro reálný provoz bezvýznamná.

Další použitou aproximací je zanedbání přirozeného transportu LDL-cholesterolu mezi tkáněmi a intravazálním prostorem. Za předpokladu konstantní rychlosti tohoto transportu by přesnost předpovědi hladin LDL-cholesterolu měla být lepší u krátkých procedur (s menším objemem promyté plasmy). U delších procedur by pak měla být reálná hladina LDL-cholesterolu pacienta na konci procedury mírně vyšší než predikovaná hladina.



Graf 3: Závislost spolehlivosti předpovědi na ošetřeném objemu plasmy.
Legenda v textu.

Ukázalo se, že skutečně u větších objemů promyté plasmy jsou hodnoty LDL-cholesterolu na konci procedury systematicky podceňovány. Regresní analýza určila lineární závislost poměru skutečné a predikované hladiny na promytém objemu s koeficientem $3{,}67.10^{-5}$ mL^{-1} ($p = 0{,}038$) a absolutním členem 0,979 ($p < 0{,}01$).

Tento výsledek je v souladu s teoretickým předpokladem vlivu transportu LDL-cholesterolu mezi tkáněmi a intravaskulárním prostorem. Můžeme tedy říci, že třebaže je vliv přirozené kinetiky LDL-cholesterolu na průběh procedury relativně malý, tak se ho podařilo ve výsledcích měření zachytit. Pro praktické využití našeho programu je však tato odchylka nevýznamná.

5.1.2 Změny objemu plasmy v průběhu procedury

V průběhu LDL-aferézy dochází k naředění plasmy pacienta vlivem podávaných náhradních roztoků (v našem případě převážně ACD-A). Náš program byl připraven na základě reálně naměřených hodnot a predikuje tudíž hodnoty, které již zahrnují vliv tohoto naředění. Proto nás míra naředění plasmy pacientů zpočátku nezajímala, neboť množství podávaných roztoků nemohlo mít negativní vliv na klinický stav pacientů. Při bližším vyhodnocení výsledků získaných při ověřování programu (viz Tab. 9 a Graf 3) jsme však zjistili, že v některých případech vycházela reálně naměřená hladina LDL-cholesterolu pacientů na konci cyklu nižší než předpovězená. To by znamenalo, že došlo k eliminaci většího množství LDL-cholesterolu, než bylo obsaženo v plasmě promyté kolonou. Některé případy jsou zřejmě způsobeny laboratorními chybami či chybami personálu (vzorek nebyl odebrán přesně v okamžiku výměny kolon), dalším možným vysvětlením je však také vliv naředění plasmy. Pokud by míra naředění kolísala, docházelo by k snížení přesnosti předpovědí programu, které jsou založeny na konstantním naředění.

Proto jsme se pokusili vyhodnotit skutečnou míru naředění plasmy pacientů a rovněž její proměnlivost. Míru naředění plasmy jsme určovali na základě hodnot hemoglobinu a hematokritu. Za předpokladu konstantního objemu erytrocytů můžeme vypočítat míru naředění plasmy z hodnot hematokritu a hladin hemoglobinu před, resp. po proceduře:

$$\frac{PV_1}{PV_0} = \frac{Hb_0}{Hb_1} \cdot \frac{1 - HT_1}{1 - HT_0}$$

Rovnice 9: Výpočet míry naředění plasmy pacientů
Legenda: PV_0, PV_1 – objem plasmy před resp. po provedení procedury; Hb_0, Hb_1 – hladina hemoglobinu před resp. po provedení procedury; HT_0, HT_1 – hematokrit před resp. po provedení procedury

Hodnoty hemoglobinu a hematokritu byly u našich pacientů stanovovány pravidelně, byť ne při každé proceduře. Mohli jsme proto využít 98 archivních procedur, ke kterým jsme tyto údaje měli k dispozici a určit míru naředění pro tyto procedury.

Z těchto výsledků vyplývá průměrná míra naředění plasmy pacientů o 13,1 % a relativně vysoká míra variability naředění (zejména směrem k vyššímu naředění – maximální naředění o 39 % !). I když nebudeme uvažovat extrémní vypočtené hodnoty, které jsou téměř jistě ovlivněny hrubými chybami při odběru vzorků a jejich laboratorním stanovení, můžeme tedy občasné paradoxně nižší reálné než predikované hladiny LDL-cholesterolu po provedení cyklu přičítat vyššímu než obvyklému naředění plasmy.

	Normalita	Medián	Min	Max	Průměr	Sm. odch.
Hb před [g.L^{-1}]	0,4641	130	92	157	130	13
Hb po [g.L^{-1}]	0,6730	121	90	153	121	14
HT před	0,4604	0,388	0,291	0,468	0,388	0,035
HT po	0,8402	0,357	0,274	0,439	0,361	0,039
Naředění	0,0886	1,118	0,945	1,390	1,131	0,086

Tab. 13: Naředění plasmy pacientů – statistické zpracování
Legenda: Hb před – hodnota hemogloginu v krvi pacienta před zahájením procedury; Hb po – hladina hemogloginu v krvi pacienta po ukončení procedury; HT před – hodnota hematokritu pacienta před zahájením procedury; HT po – hladina hematokritu pacienta po ukončení procedury; Naředění – vypočtený koeficient naředění plasmy pacinta pro danou proceduru

Námětem k úvahám je ovšem i samotný výpočet objemu plasmy pacienta pouze na základě výšky, hmotnosti a pohlaví. Nesporně by přesnosti našich výpočtů prospělo přímé měření objemu plasmy, bohužel ve FN Hradec Králové není v současnosti dostupná metoda měření objemu plasmy, použitelná pro náš rutinní provoz.

5.2 PRAKTICKÉ PŘÍNOSY

5.2.1 Použitelnost programu v rutinním provozu

Náš program vyžaduje pouze minimum vstupních hodnot: výšku, hmotnost a pohlaví pacienta a hladinu LDL-cholesterolu před započetím procedury. Z toho pouze hladina LDL-cholesterolu musí být laboratorně stanovována, což při statim stanovení v laboratoři znamená zpoždění obvykle kolem 15 minut, výjimečně do 30 minut. Množství plazmy pro průtok první kolonou nastavuje sice ošetřující lékař zprvu odhadem, ale kvalifikovaným – podle zkušenosti s programem u téhož pacienta z minulých ošetření. U našich pacientů to zpravidla bývá kolem 1000 mL plazmy. Průtok plazmy nebývá větší než 30 mL.min^{-1}, takže lékař má k disposici více nežli 30 minut času, nežli proteče prvních 1000 mL. Podle výsledku laboratorního vyšetření se průtok upraví. Program samotný je pak (rovněž díky využití všeobecně rozšířeného prostředí Microsoft Excel™) instalován na všech PC na oddělení. V praxi uživatelé zejména kladně hodnotí jeho přehlednost a jednoduchost, díky které ho mohou běžně používat bez dalších konzultací.

Praktické používání programu v rutinním provozu však odhalilo i jeden negativní faktor, který však nesouvisí se samotným programem. Jak jsme uvedli v popisu používané metodiky LDL-aferéz, kolona je po nasycení regenerována glycinovým pufrem. Doba regenerace je dána pevně stanoveným objemem glycinového pufru a maximální rychlostí promývání kolony. Druhá kolona musí být v praxi promývána nejméně 1200-1250 mL plasmy, protože promytí první, zaplněné kolony, prováděné ve stejnou dobu, není možné dříve, nežli po průtoku tohoto množství pracující druhou kolonou. Relativně často se přitom stává, že doba regenerace první kolony (která je znovu použita v třetím cyklu) je delší než doba potřebná k promytí objemu plasmy vypočteného pro druhý cyklus. Dochází tak k opakovanému překračování kapacity kolon v druhém cyklu, což se projevilo i na naměřených výsledcích – reálný promytý objem je větší než vypočtený optimální (viz Tab. 9). Tento fakt samozřejmě negativně ovlivňuje přesnost predikce, naštěstí však nárůst hladiny LDL-cholesterolu v plasmě na výstupu kapsle po překročení její efektivní kapacity není okamžitý, nýbrž postupný (viz. Graf 1). Toto chování kolon je dáno principem skrývajícím se pod našim pojmem efektivní adsorpční kapacity – nedochází k nasycení vazebných míst pro apo B-100, ale

pouze ke zpomalení difúze LDL-cholesterolu gelovou matrix kolony k těmto vazebným místům.

5.2.2 Zlepšené výsledky LDL-aferéz

Díky používání nově vyvinuté metodiky individuálního plánování procedur se podařilo zlepšit účinnost procedur LDL-aferéz prováděných v aferetickém centru FN Hradec Králové (viz Tab. 12). Nyní se daří snižovat hladiny LDL-cholesterolu na nižší hodnoty, než tomu bylo dříve. Pro kliniku má dosažená hladina větší význam, než absolutní hodnota poklesu LDL-cholesterolu, protože udávaná regrese aterosklerotických změn probíhá po dobu, kdy hladina LDL-cholesterolu zůstává pod prahovou hladinou. Doba, za kterou jeho hladina opět k této prahové hodnotě vystoupí, pak významně závisí na dosažené minimální hladině po proceduře.

Lékaři separátorového centra velmi oceňují i jistotu, se kterou mohou pracovat. Odpadlo úvodní období nejistoty a dohadů, kolik asi má protéci jednotlivými kolonami – dříve prováděné obtížně, jen podle zkušenosti pracovníků a minulých výsledků.

Z klinického hlediska je rovněž velmi významné, že úprava metodiky plánování LDL-aferéz nevedla ke zhoršení jejich selektivity. Hladiny HDL-cholesterolu po proceduře jsou u procedur plánovaných původní a inovovanou metodikou shodné.

V současné době nemáme k dispozici výsledky, které by potvrzovaly vliv změny metodiky plánování LDL-aferéz na klinický stav pacientů. Velikost našeho souboru je pro tento druh studií nedostatečná, bylo by nutné zavést naši inovovanou metodiku i na další pracoviště a zvětšit tak soubor pacientů na desítky až stovky jedinců.

5.2.3 Ověření životnosti kolon

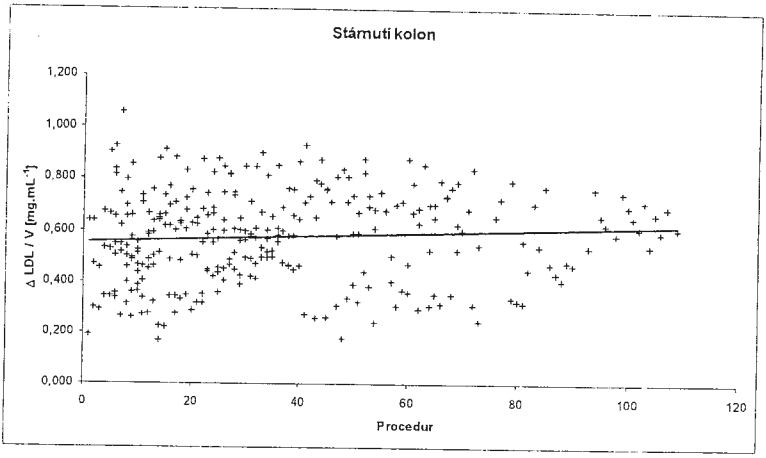
Stefanec ve svojí práci [**37**] uvádí postupné snižování adsorpční kapacity imunoadsorpčních kolon s rostoucím počtem použití. Teoreticky jej zdůvodňuje postupnými ztrátami protilátek z kolony a stárnutím gelové matrix.

V naší práci jsme ukázali, že v praktickém používání není (alespoň u námi používaných kolon) jejich využitelná kapacita omezena vyčerpáním vazebných míst protilátek proti apo B-100. Omezení je spíše dáno difúzí LDL částic gelovou matrix kolony. To by ovšem mohlo znamenat, že stárnutí kolon se neprojeví poklesem jejich efektivní kapacity. Efektivní kapacita by tak mohla zůstávat stejná až do okamžiku, kdy ztráty protilátek budou již tak výrazné, že se jejich množství stane rozhodujícím faktorem.

Otázkou zůstává, zda k tomuto dojde ještě před vypršením bezpečné životnosti kolon, která je s ohledem na riziko uvolňování mikropartikulí matrix ze starých kolon nyní stanovena na cca 50 procedur.

Abychom toto ověřili, vyhodnotili jsme výsledky retrospektivní analýzy z Tab. 3 rovněž z tohoto pohledu. Jedná se o procedury realizované před zjištěním možnosti uvolňování mikropartikulí, proto jsme tehdy používali kolony i více než 100krát. Velký rozsah tohoto souboru (největší z námi vyhodnocovaných) a jeho homogenita (po celou dobu byl používán stejný rozpis procedur) dovolují předpokládat velkou výpovědní hodnotu těchto výsledků.

Pro vyhodnocení efektivity kolon v průběhu používání jsme použili standardní index efektivity kolon, vypočítaný jako množství eliminovaného LDL-cholesterolu na 1 mL promyté plasmy. [**43**] Z hodnocení jsme vyřadili procedury s nestandardně nízkým objemem promyté plasmy (< 3000 mL), které by výsledky zkreslily. Hodnota používaného ukazatele je totiž závislá na délce procedury.



Graf 4: Vliv stárnutí kolon na jejich efektivitu.
Legenda v textu.

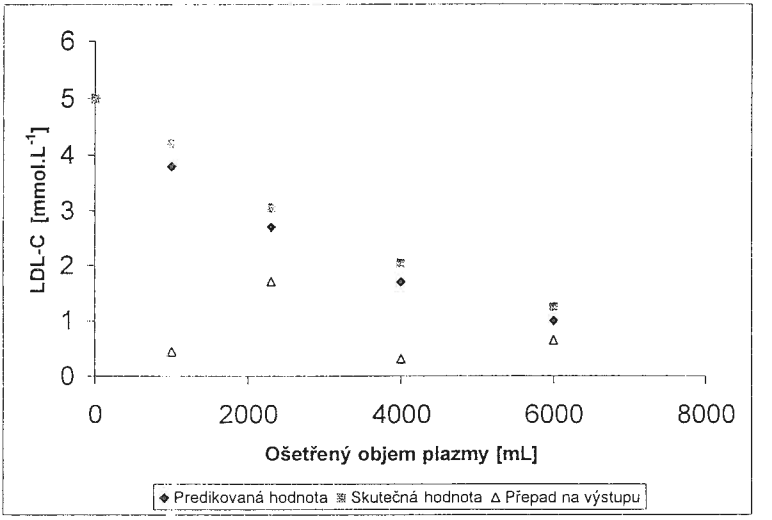
Výsledky vypočítané ze zbylých 305 procedur jsme zpracovali regresní analýzou a zjistili, že neexistuje statisticky prokazatelná závislost efektivity kolon na počtu provedených procedur (regresní koeficient nebyl významně odlišný od nuly, $p = 0{,}123$).

Otázku stárnutí kolon jsme proto uzavřeli konstatováním, že jejich životnost není omezena poklesem adsorpční kapacity, nýbrž stárnutím jejich gelové matrix a potenciálním rizikem uvolňování mikropartikulí z této matrix.

5.2.4 Detekce vadných kolon

V průběhu používání programu jsme zcela nečekaně objevili jeho vedlejší použití jako účinného detekčního mechanismu pro odhalování vadných kolon. V Grafu 5 jsou vyneseny naměřené hladiny LDL-cholesterolu v plasmě pacienta a na výstupu kolony spolu s hodnotami předpovězenými naším programem pro jednu rutinně provedenou proceduru sestávající ze 4 cyklů. Je zde dobře patrné, že v tomto případě je hodnota LDL-cholesterolu na výstupu kolony nápadně zvýšená na konci 2. a 4. cyklu, kdy byla používána tatáž kolona. Tato kolona záhy po provedení této procedury vykázala makroskopické trhliny v gelové matrix a musela být nahrazena.

Vzestup hodnot LDL-cholesterolu na výstupu kolony si proto vysvětlujeme jako projev existence mikroskopických trhlin v matrix kolony, které dovolovaly plasmě obejít vlastní aktivní objem kolony „zkratkou". Jinak nevysvětlitelný vzestup hladiny LDL-cholesterolu na výstupu kolony tudíž můžeme považovat za indikátor hrozícího selhání kolony a v případě jeho výskytu můžeme nyní včas zareagovat a kolonu nahradit dříve než ke skutečnému selhání dojde. To má nesporný klinický význam, neboť selhání – popraskání kolony v průběhu procedury by znamenalo riziko embolizacemi mikročásticemi gelové matrix kolony.



Graf 5: Detekce vadné kolony.
Legenda: LDL-C – hladina LDL-cholesterolu v daném vzorku; Ošetřený objem plasmy – objem promyté plasmy za celou proceduru

6 ZÁVĚR

6.1 SOUHRN VÝSLEDKŮ

I. Výsledky naší práce ukázaly, že prosté převzetí metodiky optimalizace LDL-aferéz navržené Stefancem není pro získání klinicky použitelných předpovědí průběhu procedury dostačující. Mediány skutečných a predikovaných hodnot LDL-cholesterolu po proceduře plánované touto metodikou byly 0,910 mmol.L^{-1}, resp. 0,300 mmol.L^{-1} ($p < 0,01$, vyhodnoceno Wilcoxonovým testem pro soubor 363 procedur).

II. Dalším rozborem jsme ukázali, že výchozí myšlenka modelování průběhu LDL-aferéz pomocí kontinuální filtrace je použitelná. Příčinou problematických výsledků se ukázala být adsorpční kapacita kolon, která neodpovídá výrobcem udávané hodnotě. Na základě tohoto zjištění jsme odvodili efektivní adsorpční kapacitu kolon, která je lineárně závislá na hladině LDL-cholesterolu na počátku promývání dané kapsle. Koeficient této lineární závislosti má hodnotu 208 mg.$mmol^{-1}$.L a absolutní člen je 498 mg.

III. Na základě těchto zjištění jsme metodiku optimalizace LDL-aferéz změnili. Následně jsme novou metodiku detailně ověřili na souboru 47 procedur, u kterých jsme stanovovali hodnoty lipidů pro každý z celkem 202 terapeutických cyklů. Třebaže ani inovovaná metodika nepředpovídá průběh konkrétního cyklu zcela přesně (medián skutečně naměřených hodnot LDL-cholesterolu po ukončení cyklu byl 1,85 mmol.L^{-1} oproti 1,80 mmol.L^{-1} pro predikované hodnoty, podle Wilcoxonova testu $p < 0,01$), rozdíl je v běžné praxi klinicky nevýznamný. Přičítáme ho zčásti vlivu přepadu LDL-cholesterolu kolonou při cyklech, které byly z technických důvodů delší než by bylo optimální. V praxi realizované promyté objemy (medián 1367 mL) byly významně větší ($p < 0,01$, Wilcoxonův test) než naplánované objemy (medián 1245 mL). Druhým faktorem, který způsobil zjištěný rozdíl skutečných a predikovaných hladin LDL-cholesterolu, je podle našeho názoru jeho přesun z intersticia do intravaskulárního prostoru.

IV. Po rozšíření ověření o další, již méně detailně vyšetřované procedury jsme získali soubor 116 procedur plánovaných inovovanou metodikou, který jsme porovnali s kontrolním souborem 462 dříve provedených procedur. Zjistili jsme, že používání inovované metodiky přineslo významné snížení hladin LDL-cholesterolu po skončení procedury (mediány 0,845 mmol.L^{-1} vs. 0,770 mmol.L^{-1}; $p = 0,015$ – Mann-Whitney), třebaže jeho hodnoty na počátku procedury se lišily pouze nevýznamně (mediány 5,335 mmol.L^{-1} vs. 5,190 mmol.L^{-1}; $p = 0,619$ – Mann-Whitney). Toto zlepšení bylo dosaženo bez zvýšení objemu promývané plasmy (mediány 7000 mL vs. 7000 mL; $p = 1,00$ – Mann-Whitney) a bez zvýšení nežádoucí eliminace HDL-cholesterolu (mediány 1,110 mmol.L^{-1} vs. 1,065 mmol.L^{-1}; $p = 0,083$ – Mann-Whitney).

V. Kromě zlepšení dosahovaných výsledků procedur jsme dosáhli rovněž dvou dalších významných zjištění:

- Ověřili jsme, že efektivní kapacita kolon během jejich životnosti nevykazuje významných pokles (regresní koeficient se neliší od nuly, $p = 0,123$).
- Odhalili jsme, že zvýšený přepad LDL-cholesterolu kolonou může signalizovat její hrozící selhání popraskáním gelové matrix.

6.2 NAPLNĚNÍ STANOVENÝCH CÍLŮ

6.2.1 Převzetí metodiky dle literatury

Metodiku optimalizace LDL-aferéz popsanou Stefancem se nám podařilo s pomocí Dr. Franka, zástupce dodavatele našich kolon (fy Pocard), adaptovat na naše podmínky:

- výpočet vývoje hladin celkového cholesterolu jsme nahradili odpovídajícím výpočtem pro LDL-cholesterol,
- dosadili jsme do výpočtu adsorpční kapacitu našich kolon udávanou výrobcem,
- upravili jsme výpočet pro naše vybavení – udávání délky procedury uběhlým časem jsme nahradili výpočtem na základě promytého objemu plasmy.

Adaptovanou metodiku jsme implementovali do reálného nasazení v podobě jednoduchého programu v prostředí Microsoft Excel™ a ověřili její přesnost pomocí retrospektivní analýzy dříve provedených procedur. Ukázalo se, že její výsledky nebyly uspokojivé, proto jsme přistoupili k bližšímu rozboru příčin zjištěných nepřesností a na jejich základě metodiku inovovali.

6.2.2 Inovace metodiky na základě vlastních zjištění

Detailní analýza průběhu používání kolon ukázala, že hlavní příčinou nepřesnosti adaptované metodiky bylo přecenění jejich adsorpční kapacity. Podařilo se nám odvodit vztah pro výpočet efektivní hodnoty adsorpční kapacity a tento jsme implementovali do inovované metodiky optimalizace LDL-aferéz. Rovněž tento inovovaný výpočet jsme naprogramovali do Microsoft Excelu™.

Ověření výsledků optimalizované metodiky sice prokázalo přetrvávání jistých nepřesností v předpovídání hodnot LDL-cholesterolu, avšak tyto nepřesnosti se v klinickém nasazení ukázaly být bezvýznamnými. Celkové výsledky procedur plánovaných pomocí naší metodiky jsme porovnali s výsledky procedur plánovaných dřívější metodikou pevných rozpisů (případně ad hoc upravovaných podle zkušeností ošetřujících lékařů). Potvrdilo se, že individuální plánování procedur zlepšuje výsledky eliminace LDL-cholesterolu bez toho, aby došlo k negativnímu ovlivnění ať už délky procedur, nebo jejich selektivity.

Několikaleté praktické používání našeho programu rovněž přineslo mnohé kladné ohlasy uživatelů, kteří jej využívají ve svojí každodenní práci. Oceňována je zejména jednoduchost programu, který vyžaduje pouze minimální množství vstupních údajů, ze kterých je schopen vypočítat s velmi dobrou přesností průběh procedury. Nejvýznamnější příčinou nepřesností se v reálném provozu ukázala být technická limitace samotné LDL-aferézy, která vyžaduje dobu regenerace první kolony často delší, než je doba potřebná k promytí vypočítaného objemu druhou kolonou. Tento fakt vede k překračování kapacity zejm. druhé kolony, a tím způsobeným odchylkám od predikovaných výsledků.

Můžeme tedy konstatovat, že se nám podařilo splnit veškeré stanovené cíle. Nad jejich rámec jsme rovněž ověřili stálost adsorpční kapacity kolon po celou dobu jejich životnosti a objevili možné využití našeho programu jako včasného varování při hrozícím selhání kolony.

Naše výsledky jsme publikovali v několika článcích v impaktovaných časopisech a prezentovali na řadě tuzemských i zahraničních odborných konferencí – viz seznam publikací.

Problematika byla natolik zajímavá a prakticky významná, že ji kliničtí pracovníci spolu s řešitelem podali jako grant, který byl řešen a úspěšně vyřešen. Název grantu a jeho zařazení: Predikce, optimalizace a individualizace výsledku léčebné procedury při

LDL-aferéze – multivariantní model v prospektivní studii. Číslo úkolu: IGA MH CR NB 7006-3. Ukončeno 2005. Závěrečná zpráva byla vyhodnocena ve skupině A.

Při řešení problému vzniklo několik technických zlepšení, na jejichž vývoji se autor podílel. Tato zlepšení znamenala zdokonalení metodiky a nová metodika byla podána jako vynález se žádostí o patentování. Název: Zařízení pro extrakorporální eliminace cholesterolu. Přijato Úřadem pro průmyslové vlastnictví, A. Čermáka 2a, 160 68 Praha. Po připomínkovém řízení byla metodika patentována (číslo patentu: 293227, název vynálezu: Systém pro extrakorporální odstraňování cholesterolu).

Autor této práce nebyl sice autorem vynálezu, ale byl členem řešitelského týmu grantu a na práci kolektivu a modifikacích procedury se prokazatelně podílel.

6.2.3 Shrnutí naplnění cílů práce

Stanovené cíle tedy byly zcela splněny. Byly získány výsledky, uvedené výše, které jsou unikátní. Byly získány i výsledky, které nebyly původně plánovány a jsou využitelné v klinické praxi (ověření stálosti adsorpční kapacity kolon po celou dobu jejich životnosti a využití našeho programu jako včasného varování při hrozícím selhání kolony). Při řešení problému vznikl výše uvedený patent.

6.3 NÁMĚTY PRO DALŠÍ PRÁCI

Přes všechny naše úspěchy stále zůstávají některé otázky, které bychom rádi v budoucnu dořešili.

Největší výzvou z tohoto pohledu je zavedení metodiky přesného měření objemu plasmy pacienta, jehož potřeba vyplynula z výsledků výpočtů míry naředění plasmy v průběhu procedury.

Pro naše účely nevyhovují běžně používané způsoby měření objemu krve resp. plasmy **[44]** pomocí diluce **[45]** nebo radiofarmak – albuminu značeného např. ^{125}I **[46]**, či erytrocytů značených ^{51}Cr **[47]**. Obě tyto metody pacienta poměrně výrazně zatěžují, což při potřebě měření objemu při každé proceduře, tedy 1-2krát měsíčně není akceptovatelné. Pro naše účely potřebujeme takovou metodu měření objemu plasmy, která bude minimálně invazivní a jejíž výsledky budou k dispozici nejlépe okamžitě. Relativní zdlouhavost rovněž vylučuje metody využívající diluce barviv. **[47-49]** Nadějným kandidátem zůstává měření objemu krve a plasmy pomocí vyšetření elektrické impedance, které splňuje jak požadavek minimální invazivity, tak i rychlosti měření. **[50]** Otázkou pro další výzkum však zůstává jeho přesnost, zejména u pacientů ošetřovaných LDL-aferézou, resp. aferetickými procedurami obecně.

Dobré výsledky naší metodiky rovněž nabízejí lákavou možnost adaptace na LDL-aferézy využívající obdobné typy kolon (zejména imunoadsorpčních kolon jiných výrobců), event. i imunoadsorpčních kolon určených pro eliminaci dalších látek – např. Lp(a). Můžeme předpokládat, že všechny kolony využívající principu vychytávání látek z plasmy pomocí protilátek navázaných na gelovou matrix se budou chovat obdobně jako námi používané kolony. Můžeme tedy očekávat, že i další obdobné kolony vykáží disproporci mezi teoretickou a reálnou efektivní adsorpční kapacitou – ovšem velikost této efektivní adsorpční kapacity či její závislost na počáteční hladině eliminované látky se mohou lišit. To by se do budoucna mohlo stát vhodnou metodou porovnávání kolon různých výrobců.

7 POUŽITÁ LITERATURA

[1] WIDIMSKÝ, J. *Léčba dyslipidémií a ICHS.* Praha : Triton, 1998. 202 p.

[2] KARLSON, P., et al. *Pathobiochemie.* Praha: Academia, 1987. 480 p.

[3] ASSMANN, G., et al.: *Lipid Metabolism Disorders and Coronary Heart Disease.* Munich: MMV-Medizin Verl., 1993. 281 p.

[4] YOKOYAMA, S. *Brief history of low-density lipoprotein apheresis.* Therapeutic Apheresis and Dialysis, 2003, vol. 7, (no. 4), p. 378-381.

[5] THOMPSON, G. R., LOWENTHAL, R., MYANT, R. *Plasma exchange in the management of homozygous familial hypercholesterolaemia.* Lancet, 1975, vol. 1, p. 1208-1211.

[6] STOFFEL, W., BORBERG, H., GREWE, V. *Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterolemia.* Lancet, 1981, vol. 2, p. 1005.

[7] BORBERG, H., STOFFEL, W., OETTE, K. *The development of specific plasma immunoabsorption.* Plasma Therapy and Transfusion Technology, 1983, vol. 4, p. 459.

[8] SAAL, S. D, PARKER, T. S, GORDON, B. R. et al. *Removal of low-density lipoproteins in patients by extracorporeal immunoadsorption.* American Journal of Medicine, 1986, vol. 80, p. 583-589.

[9] POKROVSKY, S. N., ADAMOVA, I. YU., and BENEVOLENSKAYA, G. F. *Immunosorbents for LDL-apheresis.* Biomaterials, Artificial Cells and Artificial Organs, 1990, vol. 18, (no. 5), p. 623-628.

[10] NAKAJIMA, T., NAKAMURA, T., FUNAHASHI, T., et al. *A novel system of LDL apheresis combining a centrifugal plasma separator with a specific LDL adsorption column.* Atherosclerosis, 1988, vol. 73, (no. 2-3), p. 143-148.Clinica Chimica Acta, 1999, vol. 288, (no. 1-2), p. 21-30.

[11] BLÁHA, M. *Extracorporeal LDL-cholesterol elimination in the treatment of severe familial hypercholesterolemia.* Acta Medica (Hradec Králové) 46, 2003, vol. 1, p. 3-7.

[12] RITTER, M. M., and PARHOFER, K. G. *Extracorporal low-density lipoprotein elimination by immunoadsorption.* Therapeutic Apheresis and Dialysis, 2003, vol. 7, (no. 3), p. 370-372.

[13] CERMANOVÁ, M. *LDL-aferéza - zhodnocení výsledků 1000 provedených procedur.* Transfuze a hematologie dnes, 2005, vol. 11, (no. 3), p. 116-121.

[14] BLAHA, M., CERMANOVA, M., BLAHA, V., et al. *Safety and tolerability of long lasting LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinemia.* Therapeutic Apheresis and Dialysis, 2007, vol. 11, (no. 1), p. 9-15.

[15] WIELAND, H., SEIDEL, D. *A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins.* Journal of Lipid Research, 1983, vol. 24, p. 904.

[16] ARMSTRONG, V. W., WINDISCH, M., WIELAND, H., et al. *Selective continuous extracorporeal elimination of low-density lipoproteins with heparin at acidic pH.* Transactions - American Society for Artificial Internal Organs, 1983, vol. 29, p. 323-328.

[17] BAMBAUER, R., SCHIEL, R., and LATZA, R. *Low-density lipoprotein apheresis: an overview.* Therapeutic Apheresis and Dialysis, 2003, vol. 7, (no. 4), p. 382-390.

[18] YOKOYAMA, S., HAYASHI, R., SATANI, M., YAMAMOTO, A. *Selective removal of low density lipoprotein by plasmapheresis in familial hypercholesterolemia.* Arteriosclerosis, 1985, vol. 5, p. 613-622.

[19] MAHER, V. M. G., KITANO, Y., NEUWIRTH, C., GALLAGHER, J. J., THOMPSON, G. R., MYANT, N. B. *Effective reduction of plasma LDL levels by LDL apheresis in familial defective apolipoprotein B-100.* Atherosclerosis, 1992, vol. 95, p. 231-234.

[20] OTTO, C., KERN, P., BAMBAUER, R., et al. *Efficacy and safety of a new whole-blood low-density lipoprotein apheresis system (Liposorber D) in severe hypercholesterolemia.* Artificial Organs, 2003, vol. 27, (no. 12), p. 1116-1122.

[21] GORDON, B. R., KELSEY, S. F., DAU, P. C., et al. *Long-term effects of low-density lipoprotein apheresis using an automated dextran sulfate cellulose adsorption system.* American Journal of Cardiology, 1998, vol. 81, (no. 4), p. 407-411.

[22] ELICIO, N., BERTOLINI, S., GARBARINI, R., et al. *LDL apheresis with dextran sulfate and angiotension receptor antagonist (Losartan).* Artificial Organs, 1997, vol. 21, (no. 4), p. 334-335.

[23] BOSCH, T., SCHMIDT, B., BLUMENSTEIN, M., GURLAND, H. J. *Lipid apheresis by hemoperfusion: in vitro efficacy and ex vivo biocompatibility of a new low-density lipoprotein adsorber com-patible with human whole blood.* Artificial Organs, 1993, vol. 17, p. 640–642.

[24] BOSCH, T., SCHMIDT, B., KLEOPHAS, W., et al. *LDL hemoperfusion--a new procedure for LDL apheresis: biocompatibility results from a first pilot study in hypercholesterolemic atherosclerosis patients.* Artificial Organs, 1997, vol. 21, (no. 10), p. 1060-1065.

[25] AGISHI, T., KANEKO, J., HASUO, Y., HASASAKA, Y., SANAKA, T., OTA, K., ANEMIYA, H., SUGINO, N. *Double filtration plasmapheresis with no or minimal amount of blood derivative for substitution.* In: Sieberth H.G., ed. Plasma exchange. Schattauer: Stuttgart, New York, 1980, p. 53-57.

[26] BARBAGALLO, C. M., AVERNA, M. R., DIMARCO, T., et al. *Effectiveness of cascade filtration plasmapheresis in two patients affected by familial hypercholesterolemia.* Journal of Clinical Apheresis, 1995, vol. 10, (no. 2), p. 96-100.

[27] KLINGEL, R., MAUSFELD, P., FASSBENDER, C., et al. *Lipidfiltration - Safe and effective methodology to perform lipid-apheresis.* Transfusion and Apheresis Science, 2004, vol. 30, (no. 3), p. 245-254.

[28] KLINGEL, R., FASSBENDER, C., FASSBENDER, T., et al. *Rheopheresis: rheologic, functional, and structural aspects.* Therapeutic Apheresis, 2000, vol. 4, (no. 5), p. 348-357.

[29] KLINGEL, R., FASSBENDER, C., FASSBENDER, T., et al. *Clinical studies to implement Rheopheresis for age-related macular degeneration guided by evidence-based-medicine.* Transfusion and Apheresis Science, 2003, vol. 29, (no. 1), p. 71-84.

[30] VALBONESI, M., MORA, F., MORA, R., et al. *Rheopheresis for sudden hearing loss (SHL).* International Journal of Artificial Organs, 2004, vol. 27, (no. 9), p. 806-809.

[31] BLÁHA V., et al.: *LDL-aferéza: Historie a současná praxe v České republice.* Kapitoly z kardiologie, 2001, vol. 3, (no. 2), p. 72-76.

[32] BLÁHA V., et al.: *Vliv agresívní hypolipidemické intervence na vývoj aterosklerotických změn a endoteliální dysfunkce.* In Intenzivní a metabolická péče ve vnitřním lékařství. Hradec Králové : Nucleus HK, 2004, p. 60.

[33] KOCHINKE, F., VON BAEYER, H., SCHWANER, I., et al. Modelling of *LDL-apheresis: System efficacy and rebound kinetics.* Plasma Therapy and Transfusion Technology, 1988, vol. 9, (no. 1), p. 35-44.

[34] PARHOFER, K. G., BARRETT, P.H.R., DEMANT, T., et al. *Acute effects of low density lipoprotein apheresis on metabolic parameters of apolipoprotein B.* Journal of Lipid Research, 2000, vol. 41, (no. 10), p. 1596-1603.

[35] MAUGEAIS, C., OUGUERRAM, K., FRENAIS, R., et al. *Effect of low-density lipoprotein apheresis on kinetics of apolipoprotein B in heterozygous familial hypercholesterolemia.* Journal of Clinical Endocrinology And Metabolism, 2001, vol. 86, (no. 4), p. 1679-1686.

[36] GEISS, H. C., BREMER, S., BARRETT, P. H. R., et al. *In vivo metabolism of LDL subfractions in patients with heterozygous FH on statin therapy: rebound analysis of LDL subfractions after LDL apheresis.* Journal of Lipid Research, 2004, vol. 45, (no. 8), p. 1459-1467.

[37] STEFANEC, G. M. *Prädiktionsparameter extrakorporaler Eliminationstherapien an Modell der LDL-Apherese.* Disertationsarbeit, Eds.: Copy Team, Köln, Germany 1999, 118 p. ISBN 80-7262-147-5.

[38] YAROVAYA, E. B., ROSTAPSHOVA, T. V., SUSEKOV, A. V., et al. *Choice of the optimum regimen of low density lipoprotein apheresis in patients with familial hypercholesterolemia using mathematical modelling.* Kardiologiia, 1993, vol. 33, (no. 10), p. 50-54.

[39] GORDON, BR., STEIN, E., JONES, P., et al. *Indications for low-density-lipoprotein apheresis.* American Journal of Cardiology, 1994, vol. 74, (no. 11), p. 1109-1112.

[40] BORBERG, H., KADAR, J., and OETTE, K. *The current status of low-density lipoprotein apheresis.* Current Studies in Hematology and Blood Transfusion, 1990, (no. 57), p. 239-48.

[41] SCHARNAGL, H., NAUCK, M., WIELAND, H., et al. *The Friedewald formula underestimates LDL cholesterol at low concentrations.* Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2001, vol. 39, (no. 5), p. 426-431.

[42] HURLEY, P. J. *Red cell and plasma volumes in normal adults.* Journal of Nuclear Medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine,1995, vol. 16, (no. 1), p. 46-52.

[43] JOVIN, I. S., TABORSKI, U., and MULLER-BERGHAUS, G. *Analysis of the long-term efficacy and selectivity of immunoadsorption columns for low density lipoprotein apheresis.* ASAIO Journal, 2000, vol. 46, (no. 3), p. 298-300.

[44] ORTH, V. H., REHM, M., HALLER, M., et al. *Blood volume measurement - state-of-the-art.* Anaesthesist, 2001, vol. 50, (no. 8), p. 562-568.

[45] JONES, J. G., and WARDROP, C. A. J. *Measurement of blood volume in surgical and intensive care practice.* British Journal of Anaesthesia, 2000, vol. 84, (no. 2), p. 226-235.

[46] CARON, A., MAYER, J. C., MENU, P., et al. *Measurement of blood volume after haemodilution with haemoglobin-based oxygen carriers by a radiolabelled-albumin method.* Transfusion Medicine, 2001, vol. 11, (no. 6), p. 433-442.

[47] IMAI, T., MITAKA, C., NOSAKA, T., et al. *Accuracy and repeatability of blood volume measurement by pulse dye densitometry compared to the conventional method using Cr-51-labeled red blood cells.* Intensive Care Medicine, 2000, vol. 26, (no. 9), p. 1343-1349.

[48] MENTH-MEIER, S. E., IMOBERDORF, R., REGLI, B., et al. *Determination of plasma volume by indocyanine green - validation of the method and use in patients after cardiopulmonary bypass.* Intensive Care Medicine, 2001, vol. 27, (no. 5), p. 925-929.

[49] POULSEN, T. D., KLAUSEN, T., RICHALET, J. P., et al. *Plasma volume in acute hypoxia: comparison of a carbon monoxide rebreathing method and dye dilution with Evans' blue.* European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology, 1998, vol. 77, (no. 5), p. 457-461.

[50] LIBRATY, D. H., ENDY, T. P., KALAYANAROOJ, S., et al. *Assessment of body fluid compartment volumes by multifrequency bioelectrical impedance spectroscopy in children with dengue.* Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2002, vol. 96, (no. 3), p. 295-299.

8 VLASTNÍ PUBLIKACE K TÉMATU PRÁCE

8.1 MONOGRAFIE

1. BLAŽEK, M., BLÁHA, M., MALÝ, J., PECKA, M., BLÁHA, V., **MAŠÍN, V.** *Změny parametrů metabolizmu a hemostázy u familiární hypercholesterolemie v léčbě LDL-aferézou.* Nukleus HK, Hradec Králové, 2007, 136 s., ISBN 978-80-87009-16-1

8.2 PŮVODNÍ ČLÁNKY A STATĚ VE SBORNÍCÍCH

1. BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, BLÁHA, V., CERMANOVÁ, M., BLAŽEK, M, SOLICHOVÁ, D., MALÝ, J. *Tolerability and side effects of extracorporeal LDL-lowering immunoapheresis in familial hyperlipoproteinaemia* In: Atherosklerosa 2004, Společnost patologické a klinické fyziologie ČLS JEP, Praha, 2004, s. 12-16
2. BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, SOLICHOVÁ, D., MALÝ, J. *Strategie léčby rezistentní hyperlipidémie: standardizace a optimalizace léčby LDL-aferézou.* In: Intenzivní a metabolická péče ve vnitřním lékařství, Nucleus, Hradec Králové, 2004, s. 58-59
3. BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, STRÁNSKÝ, P., BLÁHA, V., MALÝ, J., BELADA, D. *Laboratory assessment of adsorber efficacy during LDL-apheresis.* Laboratorní hematologie 2004, HK Credit, Hradec Králové, 2004, s. 77-80
4. CERMANOVÁ, M., MELICHAR, B., SOLICHOVÁ, D., BLÁHA, M., BLÁHA, V., BLAŽEK, M., **MAŠÍN, V.**, CERMAN, J., ZADÁK, Z. *Urinary Neopterin and Microalbumiuria in Patients Treated by Low-density Lipoprotein Apheresis.* Pteridines, roč. 16, č. 4, 2005, s. 174-183, **IF 0.538**
5. BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, STRÁNSKÝ, P., BLÁHA, V., CERMANOVÁ, M., MALÝ, J., BELADA, D. *Optimization of the therapeutic procedure during LDL-apheresis - a computerized model.* In: Transfusion and Apheresis Science, roč. 32, č. Suppl. 2, 2005, s. 149-156, **IF 0.984**
6. CERMANOVÁ, M., BLÁHA, M., BLÁHA, V., Havel, E., Vyroubal, P., ZADÁK, Z., BLAŽEK, M., MALÝ, J., **MAŠÍN, V.** *LDL-aferéza - zhodnocení výsledků 1000 provedených procedur. In: Transfuze a hematologie dnes, roč. 11, č. 3, 2005, s. 116-121*
7. **MAŠÍN, V.**, BLÁHA, M., STRÁNSKÝ, P., BLÁHA, V., CERMANOVÁ, M., MALY, R., ZAJIC, J. *Optimization Of Therapeutic Procedure During LDL-Apheresis – Verification Of The Computerized Model In The Clinical Praktice* Transfusion and Apheresis Science, 2007, vol. 36, p. 39-45. **IF 0.984**

8.3 VYBRANÉ PŘEDNÁŠKY A ABSTRAKTA

1. BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, STRÁNSKÝ, P., BLÁHA, V., MALÝ, J. *The results of the therapeutic procedure optimization during LDL-apheresis – a multivariate computerized model.* In: Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa, roč. 6, č. Suppl. 3, 2003, s. 36-36

2. BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, STRÁNSKÝ, P., MALÝ, J. *Optimization of therapeutic procedure during LDL-apheresis: a multivariate computerized model.* In: E.S.F.H. 14th Congress; 9. pracovní dny Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP a Slovenskej hematologickej a transfuziologickej spoločnosti SLS, HK Credit, Hradec Králové, 2003, s. 56-56
3. BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, STRÁNSKÝ, P., MALÝ, J. *Optimization of therapeutic procedure during LDL-apheresis: a multivariate computerized model.* In: Transfusion Medicine and Hemotherapy, roč. 30, č. 6, 2003, s. 306-306
4. BLÁHA, M., ZADÁK, Z., BLÁHA, V., MALÝ, J. CERMANOVÁ, M., **MAŠÍN, V.** *The computerized model of prediction, optimation and individualization of LDL-apheresis.* In: Acta Medica (Hradec Králové), roč. 46, č. 2, 2003, s. 40-40
5. **MAŠÍN, V.**, BLÁHA, M. *Zkušenosti z vývoje expertního systému pro optimalizaci LDL-aferéz.* In: Sborník abstrakt XXVI. dnů lékařské biofyziky, 1. LF, Praha, 2003, s. 59-59,
6. BLÁHA, M., CERMANOVÁ, M., BLÁHA, V., **MAŠÍN, V.**, BLAŽEK, M, SOLICHOVÁ, D., MALÝ, J. *Adverse events during long lasting LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinemia.* In: Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa, roč. 7, č. Suppl. 3, 2004, s. 40-40
7. CERMANOVÁ, M., BLÁHA, M., BLAŽEK, M, BLÁHA, V., **MAŠÍN, V.**, MALÝ, J. *Vedlejší účinky a komplikace extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu.* In: XVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí), Rubico, Olomouc, 2004, s. 28-29
8. CERMANOVÁ, M., BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, BLAŽEK, M, MALÝ, J. *Zhodnocení vedlejších účinků a tolerability dlouhodobé léčby LDL-aferézou* Laboratorní hematologie 2004, HK Credit, Hradec Králové, 2004, s. 83-83
9. **MAŠÍN, V.**, BLÁHA, M., CERMANOVÁ, M. *Lipid lowering immunotherapy: computer aided optimization and standardisation of the procedures.* Laboratorní hematologie 2004, HK Credit, Hradec Králové, 2004, s. 98-100
10. BLÁHA, M., CERMANOVÁ, M., **MAŠÍN, V.**, BLAŽEK, M, JEBAVÝ, L., ŠIROKÝ, O., MALÝ, J., BELADA, D. *Performance of LDL-apheresis and its relation to the quality of the adsorbers.* In: Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa, roč. 8, č. Suppl. 3, 2005, s. 20-20
11. BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, STRÁNSKÝ, P., BLÁHA, V., CERMANOVÁ, M., MALÝ, J., BLAŽEK, M., FILIP, S. *Computer controlled prediction of the optimal therapeutic procedure during LDL apheresis suitable for routine clinical praktice* In: XIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Rubico, Olomouc, 2005, s. 35-35
12. BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, STRÁNSKÝ, P., BLÁHA, V., CERMANOVÁ, M., MALÝ, J., BLAŽEK, M. *Assesment of adsorber efficacy during LDL-apheresis.* In: Atheroscleroris (Supplementum), roč. 6, č. 1, 2005, s. 102-102, **IF 4.140**
13. CERMANOVÁ, M., BLÁHA, M., BLAŽEK, M., BLÁHA, V., **MAŠÍN, V.** *Mikroalbuminurie a další ukazatele aktivity ateroskleróza u nemocných léčených LDL-aferézou* In:XIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Rubico, Olomouc, 2005, s. 82-82
14. **MAŠÍN, V.**, BLÁHA, M., CERMANOVÁ, M., BLÁHA, V., STRÁNSKÝ, P. *Computer aided optimization and standardization of the procedures in lipid*

lowering immunotherapy. In:Atheroscleroris (Supplementum), roč. 6, č. 1, 2005, s. 114-114, **IF 4.140**

15. **MAŠÍN, V.**, BLÁHA, M. *Praktické přínosy expertního systému pro optimalizaci LDL aferéz.* In: XXVIII. dny lékařské biofyziky, Vydavatelství MU, Brno, 2005, s. 62-62
16. BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, BLÁHA, V., CERMANOVÁ, M., MALÝ, J., BLAŽEK, M., Filip, S., Zajíc, J., Řeháček, V. *Predikce optimální léčebné procedury při extrakorporální eliminaci LDL-cholesterolu vhodná pro klinickou praxi.* In: Sobotka L., Novák, F., Vaňková, D.: Klinická výživa a metabolická péče v gastroenterologii a gerontologii. Nucleus, Hradec Králové 2006, *s.* 146.
17. BLÁHA, M., CERMANOVÁ, M., BLÁHA, V., **MAŠÍN, V.**, MALÝ, J., BLAŽEK, M., MELICHAR, B. *Assessment of absorber Quality during LDL-apheresis.* In: Kubicz, p., Staško, J., Hudeček, J., Holý, P.: XIII. Slovensko-česká konferencia o trombóze a hemostáze s mezinárodní účastí, s. 61-62. ISBN 80-223-2182-6.
18. BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, STRÁNSKÝ P., BLÁHA, V., CERMANOVÁ, M., MALÝ, R., ZAJÍC, J. *Modification of the therapeutic procedure during LDL-apheresis – verification of the computerized model in the clinical practice.* In: Editors: OHD XX. Olomoucké hematologické dny. s. 114 ISBN 80-7346-065-3.
19. BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, BLÁHA, V., CERMANOVÁ, M., MALÝ, J., BLAŽEK, M., FILIP, S., ŘEHÁČEK, V., ZAJÍC, J. *Optimization of the therapeutic procedure during extracorporeal lipoprotein elimination – a computerized model.* Cor et vasa Supplementum 2006;48(4):10. ISSN 0010-8650.
20. BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, BLÁHA, V., MALÝ, J., BLAŽEK, M., FILIP, S., ZIMOVÁ, R., ZAJÍC, J. *Predikce optimální léčebné procedury při extrakorporální eleminaci LDL-cholesterolu vhodná pro klinickou praxi.* Vnitřní Lékařství 52, 2006, č. 11, s. 1102.
21. BLAŽEK, M., BLÁHA, M., **MAŠÍN, V.**, MALÝ, J., BLÁHA, V., PECKA, M. *Racionalizace léčby LDL-aferézou pomocí sledování funkčních změn primární hemostázy – možnosti využití analyzátoru PF-100 a modifikovaných vyšetření agregace trombocytů.* Laboratorní hematologie 2006, HK Credit, Hradec Králové 2006, s. 94-97. ISBN 80-86780-29-5.