

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

**MUDr. Melanie Cermanová**

**Klinické konsekvence extrakorporální eliminace  
LDL-cholesterolu**

Doktorský studijní program vnitřní lékařství

**Disertační práce**

Školitel:

Prof. MUDr. Milan Bláha, CSc.

Oddělení klinické hematologie

II. interní kliniky Lékařské Fakulty a Fakultní nemocnice

Hradec Králové

Hradec Králové, 2005

## OBSAH

<b>1. OBSAH</b> .....	1
<b>2. ÚVOD – LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	5
<b>2.1. Poruchy metabolismu lipidů a LDL-aféze</b> .....	5
2.1.1. Familiární hypercholesterolemie .....	5
2.1.2. Familiární kombinovaná hyperlipidemie.....	6
2.1.3. Indikace k léčbě LDL-aféze a její další možné využití .....	6
<b>2.2. Metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu užívané v současnosti</b> .....	8
2.2.1. Názvosloví .....	8
2.2.2. Charakteristika metod extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu .....	8
2.2.3. Srovnání nejčastěji užívaných metod .....	11
2.2.4. Účinky léčby LDL-aféze .....	12
2.2.5. Vedlejší účinky LDL-aféze .....	12
2.2.6. Některé technické aspekty LDL-imunoadsorpcí .....	15
<b>2.3. Dynamika a vzájemné vztahy některých ukazatelů aktivity aterogeneze u nemocných léčených LDL-aféze</b> .....	16
2.3.1. Úloha cholesterolu v aterogenezi .....	17
2.3.2. Ateroskleróza jako zánětlivý proces .....	20
2.3.3. Selektinové adhezní molekuly a ateroskleróza .....	23
2.3.4. Monocytární chemotaktický protein-1 a ateroskleróza .....	26
2.3.5. Neopterin a ateroskleróza .....	26
2.3.6. Mikroalbuminurie a ateroskleróza .....	28
2.3.7. C-reaktivní protein a ateroskleróza .....	31
2.3.8. CD40 ligand a ateroskleróza.....	34
2.3.9. Endoglin a ateroskleróza.....	35
<b>3. VLASTNÍ PRÁCE</b> .....	37
<b>3.1. Cíle práce</b> .....	37
<b>3.2. Soubor nemocných léčených LDL-aféze</b> .....	38
3.2.1. Soubor nemocných léčených LDL-imunoadsorpcí .....	38

3.2.2. Soubor nemocných léčených LDL-imunoadsorpcí nebo filtrační metodou .....	39
<b>3.3. Kontrolní soubory .....</b>	<b>41</b>
3.3.1. Kontrolní soubor užitý v kapitole 3.3.2.1. <i>Selektivové adhezní molekuly a monocytární chemotaktický protein-1</i> .....	41
3.3.2. Kontrolní užitý v kapitole 3.3.2.2. <i>Močový neopterin a mikroalbuminurie</i> .....	41
3.3.3. Kontrolní soubor užitý v kapitole 3.3.2.3. <i>C-reaktivní protein, solubilní CD40 ligand, sérový neopterin a solubilní endoglin</i> .....	41
<b>3.4. Materiál a metody .....</b>	<b>42</b>
3.4.1. Metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu na našem pracovišti .....	42
3.4.1.1. Imunoadsorpce cholesterolu .....	42
3.4.1.2. Filtrační metoda .....	44
3.4.2. Klinické sledování nemocných během LDL-aférzy .....	44
3.4.3. Metody užitě k hodnocení eliminace vyšetřovaných substancí kolonami nebo filtry .....	44
3.4.4. Laboratorní vyšetření .....	45
3.4.4.1. Základní laboratorní ukazatele .....	45
3.4.4.2. Analýza solubilního P- a E-selektinu a monocytárního chemotaktického proteinu-1 v plazmě .....	46
3.4.4.3. Analýza neopterinu a albuminu v moči .....	46
3.4.4.4. Analýza některých ukazatelů stavu hemostázy a aktivity endotelu .....	46
3.4.4.5. Analýza CRP, solubilního CD40L, neopterinu a solubilního endoglinu v séru .....	47
3.4.5. Statistická analýza .....	47
3.4.6. Grafická zobrazení .....	47
<b>3.5. Výsledky .....</b>	<b>52</b>
<b>3.5.1. Technická část .....</b>	<b>52</b>
<b>3.5.1.1. Vyhodnocení 1000 provedených procedur LDL-aférzy .....</b>	<b>52</b>
3.5.1.1.1. Vyhodnocení základních technických parametrů .....	52
3.5.1.1.2. Vliv LDL-aférzy na hladiny lipidů, na parametry krevního obrazu a některé další biochemické ukazatele .....	52
3.5.1.1.3. Nežádoucí účinky LDL-aférzy .....	55

3.5.1.1.4. Diskuse .....	56
3.5.1.1.5. Závěr.....	58
<b>3.5.1.2. Vývoj zařízení k odstraňování vzduchu z adsorpční kolony - - patentové řízení .....</b>	<b>58</b>
<b>3.5.1.3. Vyhodnocení životnosti imunoadsorpčních kolon LDL-Lipopak.....</b>	<b>60</b>
3.5.1.3.1. Cíle práce .....	60
3.5.1.3.2. Soubor vyhodnocených LDL-aferéz, materiál a metody .....	60
3.5.1.3.3. Výsledky .....	62
3.5.1.3.4. Diskuse .....	65
3.5.1.3.5. Závěr .....	66
<b>3.5.2. Dynamika a vzájemné vztahy některých ukazatelů aktivity aterogeneze u nemocných léčených LDL-aferézou .....</b>	<b>68</b>
<b>3.5.2.1. Selektinové adhezní molekuly a monocytární chemotaktický protein-1 u nemocných léčených LDL-aferézou .....</b>	<b>68</b>
3.5.2.1.1. Cíle práce .....	68
3.5.2.1.2. Soubor nemocných, kontrolní soubor, materiál a metody .....	68
3.5.2.1.3. Výsledky .....	68
3.5.2.1.4. Diskuse .....	74
3.5.2.1.5. Závěr .....	77
<b>3.5.2.2. Močový neopterin a mikroalbuminurie u nemocných léčených LDL-aferézou .....</b>	<b>78</b>
3.5.2.2.1. Cíle práce.....	78
3.5.2.2.2. Soubor nemocných, kontrolní soubor, materiál a metody .....	78
3.5.2.2.3. Výsledky .....	79
3.5.2.2.4. Diskuse .....	92
3.5.2.2.5. Závěr .....	94
<b>3.5.2.3. C-reaktivní protein, CD40 ligand, sérový neopterin a endoglin u nemocných léčených LDL-aferézou .....</b>	<b>95</b>
3.5.2.3.1. Cíle práce .....	95
3.5.2.3.2. Soubor nemocných, kontrolní soubor, materiál a metody .....	95
3.5.2.3.3. Výsledky .....	95
3.5.2.3.4. Diskuse .....	104

3.5.2.3.5. Závěr.....	108
<b>3.6. Splnění cílů a závěr .....</b>	<b>109</b>
<b>3.7. Seznam použité literatury .....</b>	<b>111</b>
<b>Seznam tabulek.....</b>	<b>136</b>
<b>Seznam grafů .....</b>	<b>137</b>
<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>139</b>
<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>140</b>
<b>Poděkování .....</b>	<b>142</b>

## **2. ÚVOD – Literární přehled**

LDL-aféze je metoda sloužící k extrakorporální eliminaci lipoproteinů o nízké hustotě (low-density lipoproteins, LDL) u pacientů se závažnou hypercholesterolemií, která je rezistentní na farmakoterapii a dietní opatření. Jedná se zpravidla o nemocné s geneticky podmíněnými defekty metabolismu lipidů, jako je familiární hypercholesterolemie (FH) a familiární kombinovaná hyperlipidemie (FCH).

### **2.1. Poruchy metabolismu lipidů a LDL-aféze**

#### **2.1.1. Familiární hypercholesterolemie**

Podstatou FH je postižení genu pro LDL-receptor. LDL-částice nejsou vychytávány LDL-receptory cílových buněk, ale hromadí se v krvi a jsou odstraňovány cestou tzv. „scavenger“ receptorů makrofágů a jiných fagocytujících buněk, které formují základ aterosklerotických plátů. Chybí inhibiční vliv internalizace LDL-receptoru po navázání LDL-částice na syntézu cholesterolu v buňkách, které tak produkují cholesterol i přes jeho zvýšenou nabídku v krvi. Heterozygotní jedinci mají cca 50 % normálního počtu funkčních LDL-receptorů, hladina cholesterolu je velmi variabilní a pohybuje se kolem 7 - 14 mmol/l. Výskyt heterozygotní formy FH v naší populaci je 1:500. Nemocní mívají předčasně aterosklerotické změny cév a mohou mít šlachové xantomy, xantelasmata na víčkách a arcus corneae senilis. Terapie zahrnuje dietní a režimová opatření a medikamentózní léčbu, především statiny. Pouze cca u 5 % nemocných konzervativní terapie selhává (Borberg, 1997). Výskyt homozygotních forem je 1:1.000.000. Míra zvýšení hladiny LDL-cholesterolu v plazmě odpovídá aktivitě reziduálních LDL-receptorů. Hladina cholesterolu se pohybuje v rozmezí 16-30 mmol/l. Ischemická choroba srdeční (ICHS) se u těchto jedinců vyskytuje již v dětství a často vede ke smrti do 20. roku života. Diagnóza je založena na vyšetření lipidového profilu, rodinné anamnéze, přítomnosti šlachových a kožních xantomů, klinických známkách ICHS nebo aterosklerotického postižení kořene aorty, které působí její supravulární stenózu a přechází na koronární ústí. Hypercholesterolemie u homozygotů nereaguje na konzervativní léčbu a dlouhodobá pravidelná extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu je pro tyto pacienty život zachraňujícím postupem (Rader, 2003). Transplantace zdravých jater, které nesou funkční LDL-receptory, vede ke snížení koncentrace LDL-cholesterolu, ale nese s sebou určité riziko morbidity a mortality (Lees, 1999). Fenotypově podobný, ale s klinicky lehčím průběhem, je familiární defekt apolipoproteinu B (apoB<sub>100</sub>), podmíněný mutací té části apoB<sub>100</sub>, která se váže na LDL-receptor (Myant, 1993).

### 2.1.2. Familiární kombinovaná hyperlipidemie

FCH je nejčastější geneticky podmíněnou poruchou metabolismu lipoproteinů. Její frekvence v populaci je odhadována na 1:50 až 1:100. U nemocných s infarktem myokardu dosahuje výskyt cca 10 %, v rodinách s předčasným infarktem myokardu až 30%. Molekulární základ FCH je neznámý, choroba má podklad v geneticky determinované zvýšené produkci apoB<sub>100</sub> a lipoproteinů o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins, VLDL). Někteří pacienti jsou heterozygoty pro deficit lipoproteinové lipázy. Typická je přítomnost různých lipoproteinových fenotypů v rámci jedné rodiny, pacient i jeho pokrevní příbuzní mívají zvýšené hodnoty VLDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu nebo obojího. Zvýšení apoB<sub>100</sub> je pravidlem. Porucha bývá součástí metabolického Reavenova syndromu, běžným nálezem je nadváha či obezita. Nejsou přítomny kožní ani šlachové xantomy, mohou se vyskytnout xantelasmata očních víček. Dietní a režimová opatření zaměřená na snížení hmotnosti jsou základem léčby, u mnohých je však potřebná kombinovaná medikamentózní léčba (Goldstein, 1977, Goldstein, 2001). Extrakorporální eliminace je nutná jen zřídka (Borberg, 1997).

### 2.1.3. Indikace k léčbě LDL-aféze a její další možné využití

V posledních letech je stále více kladen důraz na primární i sekundární prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Zvýšený LDL-cholesterol je jedním z nejvýznamnějších rizikových faktorů aterosklerózy a jeho snížení se stalo základním opatřením k zamezení progresu a navození regrese postižení cév. U nemocných s těžkou familiární hypercholesterolemií může být dosažení cílových hladin LDL-cholesterolu obtížné až nemožné a LDL-aféze může být jediným život zachraňujícím postupem. Je to však metoda technicky, časově a finančně náročná. Procedury LDL-afézy je možné provádět pouze ve specializovaných centrech a je nutné je zpravidla celoživotně a pravidelně opakovat. Přístup k nemocným je multidisciplinární. Indikace k léčbě LDL-aféze vycházejí z výše nastíněných specifik a vyvíjí se s úrovní znalostí o rizicích a možnostech prevence aterosklerózy. V některých státech byla indikační kritéria formulována specialisty a odbornými společnostmi, jako například v USA (Gordon, 1994, Vella, 2001, Moriarty, 2001 A), Německu (Bosch, 1996, Schettler, 2002, Keller, 2003), Velké Británii (Maher, 1996) a Japonsku (Kajinami, 1999). Pro ilustraci, v USA jsou podle *Food and Drug Administration* (FDA) indikováni k léčbě LDL-aféze homozygoti FH s hladinou LDL-cholesterolu >13 mmol/l, což v praxi splňují zpravidla všichni tito nemocní, dále heterozygoti FH s LDL-cholesterolem > 7,8 mmol/l bez ICHS nebo nad 5,2 mmol/l s ICHS. Kritéria jsou hodnocena

až po šesti měsících přísné diety a maximální medikamentózní léčby (Vella, 2001). Za alternativní kritérium pro léčbu LDL-aférou je někdy považováno selhání maximální tolerované medikamentózní léčby s cílem snížit cholesterol o více než 40%. V současné době jsou tendence ke snižování hranice cílového LDL-cholesterolu v primární i sekundární prevenci, které se odráží i na indikacích k LDL-aféze. Německá doporučení považují v současné době za indikaci k LDL-aféze u nemocných s dokumentovanou ICHS a s maximální konzervativní léčbou hladinu LDL-cholesterolu nad 3,3 mmol/l a u nemocných s progredující ICHS také hladinu Lp(a) > 60 mg/dl (Schettler, 2002). Podle nových doporučení amerického Národního cholesterolového edukačního programu (National Cholesterol Education Program, NCEP) a Evropské společnosti pro aterosklerózu (European Atherosclerotic Society, EAS) byly rozšířeny indikace k intenzivní cholesterol-snižující terapii u nemocných s ICHS s cílem dosáhnout hladiny LDL-cholesterolu pod 2,6 mmol/l. To je ve shodě i s dalšími odborníky, kteří též doporučují léčbu LDL-aférou u pacientů s FH a s klinicky vyjádřeným koronárním syndromem, pokud maximální konzervativní léčba nevede ke snížení LDL-cholesterolu pod 2,6 mmol/l (100 mg/dl) (Keller, 2003). Při zvažování indikace léčby LDL-aférou je nutný individuální přístup k nemocným.

LDL-aféza metodou heparinem indukované LDL-precipitace vede kromě eliminace LDL-cholesterolu také ke snížení hladiny fibrinogenu a následně ke zlepšení rheologických vlastností krve, které může být využito u akutních koronárních syndromů. Tato metoda měla též pozitivní vliv na postižení cév transplantovaného srdce (graft vessel disease), které je jedním nejvýznamnějších faktorů limitujících jeho dlouhodobou životnost (Jaeger, 1997). Metody založené na filtraci makromolekul z plazmy (viz níže) mohou prostřednictvím zlepšení mikrocirkulace vést ke klinickému zlepšení u četných poruch sítnice, například při okluzi centrální žíly sítnice (Brunner 1996), u makulární degenerace (Klingel, 2003 A) a diabetické retinopatie (Luke, 2001), dále u náhlé senzoneurální ztráty sluchu (Suckfull, 2002, Valbonesi, 2004) a u akutních ischemických cévních mozkových příhod (Berrouschot 1999, Rossler, 2000). Byl také popsán příznivý vliv na hojení chronických ran. U syndromu diabetické nohy mohou tyto metody přispět k zachování funkce končetiny, oddálit amputaci nebo zmenšit její rozsah (Klingel, 2003 B). LDL-aféza byla úspěšná také při léčbě diabetického skleroderma (Koga, 2001) a při léčbě embolie cholesterolovými krystaly (Tsunoda, 1999).

Dalším možným užitím LDL-afézy je léčba nefrotického syndromu, kdy LDL-aféza vede k rychlé normalizaci hyperlipidemie, významnému ústupu proteinurie a vzestupu sérového albuminu (Muso, 2001). Zajímavý je významný pokles kvantity viru



hepatitidy C v krvi během heparinem indukované LDL-precipitace (Schettler, 2001). LDL-aféze účinně snižuje hladiny tetrachlorodibenzodioxinu (TCDD), v tučích rozpustné látky, která může působit intoxikaci především při průmyslových nehodách (Geusau, 2002). Raritní indikací je autosomálně recesivně dědičný Refsumův syndrom (heredopathia atactica polyneuritiformis), způsobený kumulací kyseliny fytanové, která je součástí molekuly chlorofylu a do organismu se dostává potravou. V plazmě se váže na lipoproteiny a následně včleňuje se do buněčných membrán, což vede k poruše jejich funkce. LDL-afézou může být kyselina fytanová spolu s lipidy účinně odstraňována (Straube, 2003).

## **2.2. Metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu užívané v současnosti**

### **2.2.1. Názvosloví**

Slovo aféze pochází z řečtiny a znamená odstranění. LDL-aféze je tedy odstranění LDL-cholesterolu. Tento název byl poprvé užit profesorem Borbergem jako pojmenování pro selektivní eliminaci LDL-cholesterolu na podkladě imunoadsorpce, reakce specifické protilátky s odpovídající strukturou LDL-částice. V tomto smyslu je název stále užíván některými autory (Borberg, 1997, Bláha, 2003). V literatuře se však můžeme čím dál více setkávat s tímto názvem ve smyslu označujícím všechny metody odstraňující LDL-cholesterol, a to i v případě těch, které nejsou v eliminaci LDL-částic zdaleka tak selektivní, jako je „původní“ LDL-aféze na principu imunoadsorpce. Ve prospěch rozšíření tohoto názvu i na ostatní metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu hovoří podstatné zjednodušení v komunikaci, které umožňuje. Selektivní metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu jsou v České republice v současnosti prováděny pouze na našem pracovišti, spektrum nemocných je velmi omezené a detaily této problematiky se týkají relativně úzkého okruhu odborníků. Proto některé metody extrakorporální eliminace a jejich modifikace nemají zavedený český název.

### **2.2.2. Charakteristika metod extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu**

**Plazmaferéza** byla první metodou užitou k extrakorporální eliminaci cholesterolu. Obecným principem plazmaferézy je odstranění plazmy obsahující nežádoucí součásti. Její oddělení z plné krve probíhá buď pomocí centrifugace, pracující na podkladě rozdělení jednotlivých složek krve podle jejich specifické hmotnosti, nebo s pomocí membránové separace, spočívající v použití membrán o definované velikosti pórů, zadržujících krevní tělíska. Odstraněná plazma může být nahrazena roztoky krystaloidů nebo koloidů, albuminem nebo plazmou. Nevýhodou metody je neselektivita eliminace nežádoucí látky, v tomto případě LDL-cholesterolu, a možná zátěž cizorodou bílkovinou při užití plazmy jako

náhradního roztoku. Při déletrvající léčbě dochází k závažným ztrátám imunoglobulinů, hormonů, transportních proteinů a stopových prvků. Nežádoucí je i odstranění lipoproteinů o vysoké hustotě (high density lipoproteins, HDL). Přesto, že se jedná o relativně jednoduchou a dostupnou metodu, vedoucí k rychlé eliminaci patologické substance, je pro své nežádoucí účinky nahrazována metodami selektivnějšími. Ty pracují na podkladě imunitní nebo fyzikálně–chemické interakce mezi aktivním povrchem eliminačního média a hlavní substancí LDL-částic – apoB<sub>100</sub>, nebo na principu filtrace podle velikosti částic. Fyzikálně-chemické interakce spočívají ve vazbě kladně nabitě molekuly apoB<sub>100</sub> se záporně nabitými řetězci organických látek (dextransulfát, heparin, polyakrylát). Tato elektrostatická interakce je obdobou vazby LDL-částice na LDL-receptor, který je též polyaniontem. Plazmaferéza se stala východiskem pro vývoj těchto metod, které jsou až na výjimky založeny na dalším zpracování separátorem oddělené plazmy (Thompson, 2003).

**Imunoadsorpce LDL-cholesterolu (IA, LDL-imunoadsorpce)** je nejstarší ze selektivních metod. Využívá specifickou interakci polyklonálních protilátek namířených proti antigenním strukturám apoB<sub>100</sub>. Tento princip zajišťuje vysokou selektivitu eliminace. Pístrojový systém se skládá ze separátoru krevních tělísek, pracujícího na principu buď centrifugace nebo filtrace, a adsorpčně-desorpčního automatu, který řídí střídavou adsorpci a regeneraci (desorpci) dvou kolon, obsahujících protilátky proti lidskému apoB<sub>100</sub>. Kolony jsou určeny k opakovanému použití. (Borberg, 1988). K dispozici jsou například kolony Therasorb firmy Baxter (Unterschleissheim, Německo) nebo LDL-Lipopak, Pocard Ltd. (Moskva, Rusko).

**Adsorpce na dextransulfát (DSA, firma Kaneka, Osaka, Japonsko)** pracuje na principu elektrostatické interakce mezi kladným nábojem apoB<sub>100</sub> a záporným nábojem řetězců dextransulfátu (Yokoyama, 1985). Kolona váže VLDL, LDL a lipoprotein (a) [(Lp(a)]. I zde je užívána dvojice kolon (Liposorber LA), které se střídají v pracovním a regeneračním cyklu. Tato metoda byla modifikována také jako přímá hemoperfuze užívající dextransulfát (kolony Liposorber DL, viz níže). Pacienti s familiárním defektem apoB<sub>100</sub> vykazují podobný pokles LDL-cholesterolu jako nemocní s normálním apoB<sub>100</sub>, kteří jsou léčeni stejnou metodou (Maher, 1996).

**Heparinem navozená extrakorporální precipitace LDL-cholesterolu (Heparin Induced Extracorporeal LDL Precipitation; HELP, firma B. Braun, Melsungen, Německo)** je založena na elektrostatické interakci mezi heparinem a apoB<sub>100</sub> při sníženém pH, které zvyšuje počet kladných nábojů v molekule apoB<sub>100</sub> a usnadňuje precipitaci s heparinem

(Wieland, 1983). Precipitát je následně odstraněn filtrací. Fibrinogen, který též precipituje, klesá asi na polovinu. Systém byl zkombinován s hemodialýzou (Eisenhauer, 1991).

**Metody založené na filtraci částic z plazmy**, nazývané v anglosaské literatuře souhrnně „*secondary membrane plasma fractionation*“ odstraňují z plazmy vysokomolekulární proteiny pomocí sekundárního filtru. Selektivita filtrace závisí na fyzikálních vlastnostech použitého filtru, především na velikosti jeho pórů. Kromě odstranění patologické substance, v našem případě LDL-částic, jsou eliminovány i další makromolekuly, jako je fibrinogen,  $\alpha$ 2-makroglobulin, imunoglobuliny, fibronektin atd. Výsledkem je zlepšení rheologických vlastností krve, dané především snížením viskozity plazmy, ale i snížením agregace a adhezivitu trombocytů a erytrocytů a zlepšením jejich flexibility. Následkem je relativně setrvalé zlepšení mikrocirkulace a tím i tkáňové oxygenace. Tyto metody lze užít nejen u nemocných s hypercholesterolemií, ale i u pacientů s různými poruchami mikrocirkulace (viz kapitola 2.1.3. *Indikace k léčbě LDL-aféze a její další možné využití*) (Klingel, 2000, Siami, 2001).

V případě užití primárního přístroje, který pracuje na principu filtrace, jsou modifikace této metody nazývány **dvojitá filtrační plazmaferéza (*double filtration plasmapheresis, DFPP*)**, **kaskádová filtrace**, **rheoferéza**, **nebo membránová diferenciální filtrace (*membrane differential filtration, MDF*)** (Agishi, 2000, Klingel, 2000). Za účelem zvýšení selektivity eliminace LDL-cholesterolu a prevence tvorby kryogelu může být plazma před vstupem do sekundárního filtru ohřata na teplotu 38-40°C. Metoda se nazývá **termofiltrace** (Nosé, 1985). Anglický termín *lipidfiltration* je názvem pro nový systém vzniklý na základě pokroku v technologii výroby filtrů a optimalizace funkce celého zařízení, zvláště ohřívací jednotky. Výsledkem je zlepšení specifity filtrace a kapacity filtru (Klingel, 2004). Narozdíl od výše popsané mnohem selektivnější imunoadsorpce, dochází u těchto metod k významné eliminaci imunoglobulinů – IgG 15%, IgA 24%, IgM 63% (Matic, 2002). V případě užití primárního přístroje, který odděluje plazmu na principu centrifugace, je metoda ve světové literatuře někdy nazývána „*plasma fractionation*“, tedy frakcionace plazmy (Siami, 2001). Z pohledu eliminace LDL-cholesterolu platí, že čím více je metoda selektivní, tím má menší účinky na rheologické vlastnosti krve.

**Přímá adsorpce lipoproteinů z plné krve (LDL-hemoperfuze)** užívá nehemolytického adsorbentu, akrylátu vázaného na polyakrylamid, který umožňuje perfuzi kolony plnou krví. Vynechání úvodní separace plazmy zjednodušuje technické vybavení na jeden pracovní okruh a urychluje celý proces. Prvním systémem přímé adsorpce LDL-

cholesterolu byl systém zvaný **DALI** (*Direct Adsorption of Lipids* firmy Fresenius, St. Wendel, Německo) (Bosch, 1993, Bosch, 2000).

V nedávné době byl vynalezen další systém pro přímou hemoperfuzi, který užívá vazby LDL na dextranulfát (kolony Liposorber DL, Kaneka Co., Osaka, Japonsko, viz výše). Předběžné výsledky ukazují, že efektivita a bezpečnost je srovnatelná s DALI (Mabuchi, 2004).

Firma Medicollect (Rimbach, Německo) uvedla na trh v roce 2004 další typ adsorbentů označený Lipocollect (Mehrweg- LDL-Adsorbers Lipocollect). Princip adsorpce je podobný DALI. Jde o adsorbenty užívající vazby LDL-cholesterolu na polyaniont, který není biologického původu a je vázán na porózní gel. Narozdíl od DALI systém zpracovává předem oddělenou plazmu. První zkušenosti s tímto typem adsorpce LDL-částic byly zveřejněny v přednášce dr. Recha na sjezdu Mezinárodní společnosti pro aferézu (*International society for apheresis*) roku 2005 v německém Rostocku (Rech, 2005).

### 2.2.3. Srovnání nejčastěji užívaných metod

Některá data ukazují, že IA, DSA a HELP jsou metody srovnatelně účinné ve snižování LDL-cholesterolu s průměrnou redukcí o 62 %, 65 %, resp. 59 % při jedné proceduře (Richter, 1999). Podle jiné studie jsou IA a DSA stejně účinné a obě mírně účinnější než DALI – snižují LDL-cholesterol o 82 % resp. 84 % oproti 77 % u DALI (Schmaldienst, 2000). Další studie neshledala signifikantní rozdíly mezi IA a DALI ve změnách LDL, HDL a triacylglyceridů (Baumbauer, 2002). DSA a DALI mohou snižovat HDL-cholesterol méně než IA (Schmaldienst, 2000). Redukce Lp(a) při jednom sezení byla 59 % u IA oproti 29 % u DALI (Baumbauer, 2002), podle jiných autorů byla u IA, DSA, HELP i DALI srovnatelná (Schmaldienst, 2000) a pohybovala se v průměru kolem 60 %. MDF redukuje LDL-cholesterol o 56-61%, *lipidfiltration* o cca 61%, HDL cholesterol klesá o 25-42% resp. 6%, Lp(a) o 53-58% resp. o 61% (Geiss, 1999, Julius, 2002). V případě IA je třeba zpracovat větší objemy plazmy k dosažení stejného poklesu LDL-cholesterolu než u DSA (Knisel, 1994). U IA však není množství očištěné plazmy limitováno, adsorpční kapacita, daná střídáním dvou pracovních kolon, je teoreticky nekonečná. Naopak u metody HELP je rozsah procedury limitován omezenou kapacitou filtru (Schaumann, 1996) a nebezpečím pramenícím z poklesu hladiny fibrinogenu. HELP je vzhledem k nutnosti odstranění precipitátu a zbylého heparinu technicky náročnější než metody založené na adsorpci. DALI je naopak technicky nejjednodušší. IA je v eliminaci LDL-cholesterolu nejselektivnější (Thompson, 2003).

#### **2.2.4. Účinky léčby LDL-afézou**

LDL-aféze nejen redukuje plazmatické hladiny LDL-cholesterolu a Lp(a), ale predominantně snižuje především počet malých denzních LDL-částic, které jsou považovány za nejvíce aterogenní (Schamberger, 2000). Z dlouhodobého hlediska je popisován vzestup HDL-cholesterolu a pokles celkového a LDL-cholesterolu. LDL-aféze vede k navození ustáleného stavu, charakterizovaného rovnováhou mezi syntézou a odstraňováním cholesterolu (Borberg, 1997).

Pravidelné procedury vedou ke zpomalení nebo zastavení progresu či dokonce k regresi aterosklerotických plátů a v klinické praxi k redukcí počtu koronárních příhod (Borberg, 1988, 1997). Podle výsledků jedné z největších kontrolovaných klinických studií byla frekvence koronárních příhod u homozygotů FH léčených LDL-afézou v intervalu 14 dnů významně redukována a Kaplan-Mayerovy křivky ukazovaly redukcí rizika smrti na ICHS, rizika nutnosti koronární revaskularizace a rizika nefatálního IM o 72% (Mabuchi, 1998). Thompson provedl metaanalýzu koronarografických studií historické skupiny pacientů bez léčby hypolipidemiky, skupiny léčené statiny a skupiny léčené LDL-afézou spolu se statiny. Po dvouleté léčbě bylo procento pacientů s progresí koronarografického nálezu 46%, 33% resp. 18% pro jednotlivé skupiny, naopak regresi a nebo nález beze změn mělo 54%, 67% resp. 82% pacientů (Thompson, 2003). Regrese aterosklerotických koronárních plátů po roční léčbě LDL-afézou byla prokázána studií LACMART (Low density lipoprotein Apheresis Coronary Morphology And Reserve Trial), která porovnávala koronarografické nálezy a výsledky intravaskulárního ultrazvuku (Matsuzaki, 2002). LDL-aféze vedla po 2,5 letech léčby k signifikantní redukcí koronárních kalcifikací (Hoffmann, 2003), které podle některých prací (Arad, 2000) mají vztah k riziku koronárních příhod.

#### **2.2.5. Vedlejší účinky léčby LDL-afézou**

LDL-aféze patří mezi technicky nejsložitější a časově náročné hemaferetické procedury s relativně velkými objemy zpracované plazmy. K dosažení terapeutického efektu je třeba LDL-afézu pravidelně a dlouhodobě (většinou celoživotně) opakovat. Předčasné ukončení či prodloužení intervalu mezi LDL-afézami vede ke snížení klinického účinku. Četnost a tíže vedlejších účinků, stejně tak jako nepohodlí pacienta sehrávají roli při rozhodování o délce procedur a intervalech mezi nimi, ovlivňují spolupráci s nemocným a ve svém důsledku i efekt léčby.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky hemaferetických procedur, zvláště při vysokých objemech zpracované plazmy, patří příznaky citrátové toxicity. Roztok citrátu umožňuje

na principu tvorby chelátů s kalcium účinnou regionální antikoagulací, potřebnou k zamezení tvorby trombů v přístroji. Je přidáván ke krvi pacienta a po pasáži přístrojem se dostává do jeho oběhu. Přísun citrátu k nemocnému závisí na průtoku krve přístrojem a poměru přidávaného roztoku citrátu k pacientově krvi. Tvorbou komplexů s ionty kalcia působí citrát pokles ionizovaného kalcia v plazmě, na kterém se může podílet i diluce pacientovy plazmy náhradními roztoky nebo aplikace albuminu (Weinstein, 2001). Spolu s poklesem ionizovaného kalcia klesá též ionizované magnézium, fosfáty a kalium (Bolan, 1999, Buchta 2003). V organismu je citrát rychle redistribuován a cestou cyklu trikarboxylových kyselin, probíhajícího především v játrech, metabolizován na bikarbonát. Následkem odbourání citrátu se do krve opět uvolňuje ionizované kalcium, takže při běžném dávkování nedochází k významné systémové antikoagulaci (Hester, 1983). Zajímavé je pozorování reverzibilního prodloužení QT-intervalu na EKG u dárců destiček jako následek snížení hladiny ionizovaného kalcia. Žádný z vyšetřovaných dárců neměl těžší symptomy hypokalcemie. Prodloužení QT-intervalu bylo větší u žen než u mužů a vymizelo do 15 minut po aferéze. Výsledkem tohoto pozorování bylo doporučení vyšetřit osobní a rodinnou anamnézu se zaměřením na synkopy a náhlou smrt v rodině za účelem identifikovat nemocné s vrozeně prodlouženým QT-intervalem (Laspina, 2002).

V současnosti není jednoznačně doporučena metoda, jak redukovat citrátovou toxicitu při hemaferetických procedurách (Bolan, 2002, Buchta, 2003). Obecně je několik postupů, jak citrátové toxicitě předcházet. Prvním je redukce průtoku krve vedoucí ke snížení expozice citrátu v čase, ale za cenu prodloužení délky aferézy. Druhým možným řešením je užití heparinu, které sice sníží spotřebu citrátu, ale vede k systémové antikoagulaci a může být spojeno s rizikem krvácivých a jiných komplikací. Třetím, nejčastějším řešením je suplementace kalcia, a to kontinuální intravenózní infuzí nebo jako intravenózní bolus, profylakticky, nebo až s prvními příznaky (Bolan, 2002, Buchta, 2003). Roztok kalcia lze užít i perorálně. Podobný účinek jako kalcium má i magnézium, které může na principu kompetice o vazbu na citrát zvyšovat hladinu ionizovaného kalcia a naopak. V praxi je možné všechny výše uvedené postupy kombinovat. Potenciální nežádoucí účinky, spojené s podáváním kalcia, jsou především vazodilatace, arytmie a hypotenze. Při aplikaci kalcia je třeba dbát opatrnosti nebo se jí úplně vyhnout u nemocných s anamnézou arytmií a s poruchami vedení na EKG, zvláště pacientů léčených digitálovými preparáty, a při hypokalemii. V souboru 400 vysokoobjemových leukaferéz, publikovaném Bolanem, se nevyskytly v souvislosti s podáváním kalcia žádné vedlejší reakce a užití heparinu nebylo třeba (Bolan, 1999). Přesto se v literatuře objevují ojedinělé zprávy o závažných neočekávaných reakcích u rutinních

hemaferéz, jako je například zpráva o zástavě srdce při velkoobjemové leukaferéze u zdravé nepříbuzenské dárcyně kmenových buněk krvetvorby (Cassens, 2003). Nemocní, léčení LDL-aférou se navíc od zdravých dárců liší pravděpodobnou či prokázanou přítomností koronárního postižení.

V průběhu hemaferéz dochází k individuálně variabilnímu poklesu krevního tlaku, který v závislosti na velikosti poklesu a vnímavosti pacienta může být zcela bez příznaků nebo vyvolat pocit nevolnosti a mdlob a nebo výjimečně vyústit v krátkodobé bezvědomí. Často je spojen s vazo-vagální reakcí. Na hypotenzi může mít podíl i přesun části krve do extrakorporálního oběhu a aktivace kaskády komplementového systému při kontaktu plazmy s povrchem separačního setu a adsorpčních kolon s následkem uvolnění mediátorů anafylaktoidními a vazodilatačními účinky (Shiga, 1998, Fadul, 1998, Sonntag, 1998). S aktivací komplementu může souviset i výskyt horečky, nevolnosti, zvracení, svalové bolesti i dušnosti, zvláště při adsorpčních výkonech používajících stafylokokový protein A, který komplement přímo aktivuje (Toepfer, 1999). Závažné, až život ohrožující jsou hypotenzní reakce, popsané především u dextranulfátových adsorbentů v souvislosti s medikací inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu (ACEI) (Agishi, 1994). Reakce jsou spouštěny kontaktem Hagemanova faktoru s negativně nabitým povrchem dextranulfátu, což vede k produkci bradykininu, potentního vazodilatátoru. (Proud, 1988) ACEI blokují jeho odbourávání s následkem prohloubení hypotenze. Klinickými projevy jsou kromě hypotenze abdominální křeče, edém, zvracení, bolesti na hrudi, bronchospasmus, popřípadě až šokový stav (Proud, 1988). Reakce byly popsány též při imunoadsorpci kolonami obsahujícími stafylokokový protein A (Molinari, 2002) a při různých dalších procedurách (Verresen, 1990, Sweeney, 1998, Petrucco, 1995, Siami, 1997, Owen, 1994). S možností výskytu anafylaktoidní reakce je nutno při použití těchto metod počítat. Doporučuje se přerušit léčbu ACEI na 48-72 hodin před výkonem (Mazzi 1994).

Mezi další vedlejší účinky hemaferéz patří alergické a pyretické reakce, projevy přetížení náhradními roztoky, vzduchová embolie, minerálové dysbalance, hemolýza, obtíže se zavedením žilních vstupů a jejich komplikace (Borberg, 1997).

Před užitím imunoadsorpčních kolon je třeba zcela odstranit roztok PBS pufru s příměsí azidu sodného, kterým jsou kolony konzervovány v době skladování, a který nesmí přijít do styku s oběhem nemocného.

Azid sodný je látka užívána pro svůj baktericidní, herbicidní a antiseptický účinek v laboratořích a pro svůj explozivní potenciál například v airbagu automobilů. Kromě intravenózního podání se do organismu může rychle a snadno dostat respirační cestou,

perorálně nebo vstřebat kůží. Působí jako silný vazodilatátor s četnými toxickými účinky na buněčný metabolismus. Klinicky se otrava projevuje většinou nezávisle na bráně vstupu především těžkou hypotenzí, dále se objevuje nevolnost, zvracení, průjem, bolesti hlavy, dušnost až plicní edém, metabolická acidóza, poruchy srdečního rytmu a různé neurologické postižení. Doba od expozice do nástupu hypotenze má prediktivní hodnotu – rychlý nástup příznaků značí benigní charakter otravy, naopak pozdní nástup příznaků (> 1 h) je známkou fatálního konce. Fatální dávka je  $\geq 700$  mg (10 mg/kg), neletální dávka je 0,3 - 150 mg (0,004 - 2 mg/kg). Specifické antidotum není známo. Prevencí otravy je edukace pracovníků v riziku a striktní dodržování pracovních postupů (Chang, 2003, Miljours, 2003). Jednotlivá pracoviště zavádějí různá bezpečnostní opatření, například proplachování kolon v oddělené místnosti od nemocných.

### **2.2.6. Některé technické aspekty LDL-imunoadsorpce**

Jak bylo uvedeno výše, imunoadsorpční kolony jsou určeny k mnohonásobnému užití. Opakované užívání kolon by mohlo vést ke snižování jejich adsorpční kapacity či ztrátě selektivity. Efektivitou kolon rozumíme schopnost adsorbovat lipoproteiny obsahující apoB<sub>100</sub>, tedy především LDL-cholesterol. Selektivita znamená schopnost specificky adsorbovat pouze molekuly obsahující apoB<sub>100</sub> a nikoliv ostatní látky, především HDL-cholesterol. Při snižování efektivity extrakorporální eliminace s přibývajícím počtem provedených výkonů by k odstranění potřebného množství LDL-cholesterolu bylo nutné prodlužovat délku jednotlivé LDL-afézy s častějším střídáním kolon. To by vedlo k neúměrnému zatěžování nemocných. V případě snižování selektivity by také docházelo k nežádoucí eliminaci látek, jejichž odstranění není cílem. Stárnutí kolon by mohlo mít vliv i na jejich mechanické vlastnosti ve smyslu zhoršování průtoku plazmy kolonami. Projevem obstrukce kolony by tak mohlo být zvyšování tlaků, nutných k zajištění průtoku plazmy kolonou, a z toho důvodu i nutnost zpomalování průtoku plazmy kolonou nebo přerušování procedury. U kolon firmy Baxter (Unterschleissheim, Německo) byla prokázána stabilní efektivita a selektivita kolon v průběhu 60 LDL-aféz (Jovin, 2000). Životnost kolon LDL-Lipopak (Pocard Ltd., Moskva, Rusko) nebyla zatím v literatuře popsána.



### 2.3. Dynamika a vzájemné vztahy některých ukazatelů aktivity aterogeneze

#### u nemocných léčených LDL-aférezou

Pacienti pociťují ústup ischemických obtíží často již po několika LDL-aférezách a při dlouhodobé léčbě bývá klinické zlepšení výraznější, než by odpovídalo změnám angiografických nálezů. Jak bude popsáno níže, LDL-cholesterol má řadu účinků na aktivaci pochodů iniciální i následné fáze aterogeneze. Možným vysvětlením, kromě zlepšení rheologických vlastností krve, je stabilizace ateromatózních plátů díky snížení patologické aktivace endotelu, destiček a monocytů, to vše následkem eliminace aterogenních činitelů, zvláště zvýšených hladin LDL-cholesterolu.

Při léčbě LDL-aférezou se nabízí ojedinělý experimentální model, který dovoluje studium patogenetických mechanismů aterogeneze při různých hladinách LDL-cholesterolu u téhož jedince. To je možné díky bezpečnému a rychlému dosažení výrazného a relativně selektivního poklesu LDL-cholesterolu, navíc s možností opakovat experiment za prakticky stejných podmínek opět po návratu hladin cholesterolu na obdobné hodnoty před následující LDL-aférezou. Tato modelová situace je zcela ojedinělá a nebyla navozena ani u experimentálních zvířat. Cílem tohoto výzkumu je zhodnotit vliv LDL-aférezы na některé ukazatele aktivity jednotlivých činitelů aterogeneze.

Intenzita léčby LDL-aférezou je řízena především podle hladin celkového a LDL-cholesterolu, které jsou sice v kauzálním vztahu k ateroskleróze, neodrážejí však plně aktivitu aterogenetických procesů. Zhodnocení účinků LDL-aférezы pomocí klinického sledování symptomů ischemie je nepřesné. Sledování mizení xantomů, vyšetřování šíře aterosklerotických plátů ultrazvukem či srovnávání angiografických nálezů jsou metody vhodné k hodnocení efektu v dlouhodobém horizontu. V této práci bylo vybráno několik ukazatelů aktivity aterogeneze a zkoumán jejich vztah ke změnám hladin cholesterolu a některých dalších parametrů, které nastávají během LDL-aférezы. Dalším výzkumným záměrem, který bude na tuto práci navazovat, bude využít tyto výsledky k identifikaci potencionálních přesnějších a dostupnějších ukazatelů efektivity léčby LDL-aférezou a ověřit jejich vypovídací hodnotu v praxi.

Při výběru zkoumaných parametrů jsme vycházeli ze známých vztahů mezi hladinou aterogenních lipoproteinů, především LDL-cholesterolu, aktivitou jednotlivých buněčných populací, účastnících se aterogeneze, a ze současných znalostí o jednotlivých činitelích účastnících se aterogeneze.

### 2.3.1. Úloha cholesterolu v aterogenezi

Vysoká hladina cholesterolu je známým rizikovým faktorem aterosklerózy. Cholesterol je v cirkulaci přenášen ve formě lipoproteinů. Dva nejvýznamnější lipoproteiny transportující cholesterol jsou LDL a HDL. Asi 70% cirkulujícího cholesterolu je ve formě LDL. VLDL, bohaté na triacylglyceridy a obsahující apoB<sub>100</sub> a apolipoprotein E, jsou syntetizovány v játrech a jejich funkcí je především transport mastných kyselin do tukové tkáně a svalů. Odevzdáním triacylglyceridů tkáním a odštěpením jiných apolipoproteinů, než je apoB<sub>100</sub>, se VLDL mění přes mezistupeň vysoce aterogenních VLDL-zbytků neboli lipoproteinů o střední hustotě (IDL, intermedial density lipoproteins) na LDL. Fyziologickou rolí LDL je dodávka cholesterolu do tkání. Buňky jsou však často schopny cholesterol syntetizovat samy a nejsou proto na dodávce cholesterolu pomocí LDL-částic závislé. LDL-částice jsou vychytávány pomocí LDL-receptorů, které reagují s apoB<sub>100</sub>. Po navázání LDL-částice je receptor internalizován, cholesterol je uvolněn a receptor je znovu vystaven na povrchu buňky. Internalizace je spojena s inhibicí hydroxymethyl-glutaryl-coenzym A (HMG-CoA) reduktázy, klíčového enzymu syntézy cholesterolu. Plazmatická hladina LDL-částic je z větší části určena mírou jejich vychytávání pomocí LDL-receptorů, především v játrech. Tento fakt lze demonstrovat právě na nemocných s homozygotní formou familiární hypercholesterolemie, u které na genetickém podkladě chybí LDL-receptory, a proto dochází k extrémnímu, konzervativní léčbou a dalšími faktory zevního prostředí neovlivnitelnému zvýšení LDL-cholesterolu v plazmě (Goldstein, 1977, Rader, 2003). Monogenně podmíněná hypercholesterolemie však tvoří minimum případů zvýšeného cholesterolu v populaci. Převážná většina variací vzniká na polygenním podkladě, odrážejícím kumulativní efekt mnoha genů u jednoho individua. V těchto případech je geneticky podmíněno asi 50% interindividuální variability hladin LDL-cholesterolu. V kombinaci s nepříznivými vlivy zevního prostředí obvykle dochází k mírnějšímu zvýšení LDL-cholesterolu, které dobře reaguje na dietní a režimová opatření (Heller, 1993).

Nedostatek cholesterolu v buňce stimuluje transkripci genu pro LDL-receptor a geny pro biosyntézu cholesterolu (Brown, 1997). Statiny, blokující buněčnou syntézu cholesterolu vedou prostřednictvím inhibice HMG-CoA reduktázy k deficitu cholesterolu v buňce a k následné zvýšené expresi LDL-receptorů na jejím povrchu. Tím nepřímo působí zvýšenou clearancí LDL-cholesterolu a pokles jeho plazmatických hladin.

Aterosklerotické léze vznikají jako tukové proužky osídlením subendoteliálních partií velkých arterií makrofágy, fagocytujícími LDL-částice. Spouštěcím faktorem, vedoucím

k akumulaci LDL-cholesterolu ve stěně cév, je jeho oxidativní modifikace (Navab, 1996). Nativní LDL-částice téměř neindukují in vitro změny související s aterosklerózou. Podstatou oxidativní modifikace je změna chemické struktury apolipoproteinu B, skýtající LDL-částici proinflamatorní, protrombotické a aterogenní vlastnosti (Steinberg, 1989, Glass, 2001, Miller, 2003). Příkladem je schopnost zvyšovat monocytární chemotaxi pomocí stimulace syntézy chemokinů, jako je monocytární chemotaktický protein-1 (MCP-1), stimulovat monocyty k produkci cytokinů, zvyšovat leukocytární adhezivitu indukcí exprese adhezních molekul endotelem a stimulovat makrofágy k proliferaci, dále schopnost LDL-částice být zvýšeně vychytávána makrofágy, vést k jejich přeměně v pěnové buňky, indukovat u nich apoptózu a tím přispívat k tvorbě nekrotického jádra aterosklerotického plátu, schopnost indukovat uvolnění tkáňového faktoru a stimulovat agregaci destiček. Vazbou na C-reaktivní protein (CRP) aktivují modifikované LDL-částice komplement klasickou cestou. Oxidativní modifikace vede tvorbou nových epitopů k aktivaci buněčné i humorální imunity. Vzhledem k tomu, že v plazmě je LDL-cholesterol chráněn před oxidací, předpokládá se, že k modifikaci dochází až ve stěně arterie za účasti mnoha oxidativních systémů (například lipooxygenázy, myeloperoxidázy, syntetázy oxidu dusnatého), pocházejících převážně z monocytů (Schwenke, 1989). V závislosti na míře změny chemické struktury je LDL-částice méně či dokonce není vůbec rozpoznávána a vázána LDL-receptorem a naopak reaguje s tzv. „scavenger“ receptory makrofágů a hladkých svalových buněk, ze kterých se postupně stávají buňky pěnové. Ty jsou jedním z zásadních činitelů časně i pokročilé aterosklerózy (Navab, 1996).

**Malé denzní LDL** (small dense LDL) jsou produktem katabolismu atypických velkých VLDL, které jsou tvořeny v játrech při hypertriacylglyceridemii. Množství malých denzních LDL v krvi je na koncentraci triacylglyceridů závislé - při koncentraci pod 1,5 mmol/l je jejich hladina minimální, při vzestupu triacylglyceridů nad 1,5mmol/l se jejich podíl na celkovém množství LDL zvyšuje. Nesou méně cholesterolu než ostatní LDL-částice, proto při jejich zvýšené koncentraci v krvi může být celková hladina cholesterolu v normě, často však bývá zvýšen apoB<sub>100</sub>. Malé denzní LDL-částice jsou vysoce aterogenní. Mají velkou schopnost prostupovat endotelem a snadno podléhají oxidativní modifikaci. Jsou fagocytovány především makrofágy prostřednictvím tzv. „scavenger“ receptorů. Jejich zvýšené hladiny provázejí například familiární kombinovanou hyperlipidemii, metabolický syndrom X, non-inzulin dependentní diabetes mellitus atd. Zvýšená hladina malých denzních

LDL predikuje riziko infarktu myokardu (Griffin, 1994) a existuje negativní korelace mezi velikostí LDL-částic a rizikem infarktu myokardu (Stampfer, 1996).

**HDL-cholesterol** je zásadním činitelem pro reverzní transport cholesterolu ze tkání. Snížení hladiny HDL-cholesterolu pod 1 mmol/l je samostatným rizikovým faktorem aterosklerózy. Naopak jeho zvýšení nad 1,6 mmol/l je tzv. negativním rizikovým faktorem, který snižuje kardiovaskulární riziko a částečně eliminuje vliv jiných rizikových faktorů, včetně zvýšeného LDL-cholesterolu. Podle Framinghamské studie snižuje vysoká koncentrace HDL-cholesterolu kardiovaskulární riziko při jakékoli hladině LDL-cholesterolu (Castelli, 1986). Strukturálním apolipoproteinem HDL je apolipoprotein AI. Podrobnosti o funkci HDL-cholesterolu a transferu cholesterolu ze tkání do jater nejsou náplní této práce. Jsou k dispozici v souhrnné práci Talla (Tall, 2000).

**Lp(a)** je strukturou podobný LDL. Kromě apoB<sub>100</sub> obsahuje apolipoprotein (a), jehož domény jsou strukturálně homologní s plazminogenem. Lp(a) blokuje vazebná místa pro plazminogen na fibrinu a tím inhibuje fibrinolýzu (Loscalzo, 1990). Uvažuje se, že vazba Lp(a) na fibrin za fyziologických podmínek umožňuje dodávku cholesterolových molekul do organizujícího se trombu. V procesu aterogeneze má Lp(a) dvojnásobný negativní efekt – aterogenní v užším slova smyslu, daný přítomností apolipoproteinu B<sub>100</sub>, a antifibrinolytický, vázaný na přítomnost apolipoproteinu (a). Mohou se uplatnit i další aterogenní mechanismy, jako je interakce Lp(a) s ostatními faktory krevního srážení a s hepatálním růstovým faktorem (hepatic growth factor). Estery Lp(a) přispívají k tvorbě pěnových buněk. Lp(a) není rozpoznáván LDL-receptorem. Podle studie PROCAM je nezávislým rizikovým faktorem pro vznik předčasné ischemické choroby srdeční u mužů (Assmann, 1996). Zvýšení Lp(a) bývá podmíněno geneticky, někdy se vyskytuje například u FH. Může být však i sekundární, doprovází stavy jako je například chronická renální insuficience. Lp(a) se chová podobně jako reaktanty akutní fáze, zvyšuje se přechodně například po větších chirurgických zákrocích nebo při akutním infarktu myokardu. Efekt v současnosti dostupné hypolipidemické léčby na hladiny Lp(a) je velmi omezený, extrakorporální eliminace je jediným dostupným prostředkem k účinnému snížení jeho koncentrací. Pokles Lp(a) při LDL-aferéze, kde je doprovodným efektem, je menší než při selektivní Lp(a)-aferéze, která užívá specifické protilátky proti Lp(a) (Pokrovsky, 1995, Pokrovsky, 2005, Baumbauer 2005).

### **Apolipoprotein AI a apolipoprotein B<sub>100</sub>**

Zvýšená koncentrace apoB<sub>100</sub> a snížená koncentrace apolipoproteinu AI (apoAI) jsou samostatné rizikové faktory ischemické choroby srdeční (Durrington, 1988). Koncentrace apoB<sub>100</sub> většinou dobře koreluje s koncentrací LDL-cholesterolu a koncentrace apoAI zpravidla vždy s koncentrací HDL-cholesterolu. Zvýšení apoB<sub>100</sub> při normální koncentraci LDL-cholesterolu může signalizovat zvýšený podíl malých denzních LDL-částic.

**Non-HDL-cholesterol** je hodnota vypočítaná podle vzorce:

$$\text{Non-HDL-cholesterol} = \text{celkový cholesterol} - \text{HDL-cholesterol}$$

Tato hodnota odráží koncentraci všech aterogenních lipoproteinů (LDL, IDL, VLDL, zbytků chylomiker). Význam non-HDL-cholesterolu je zdůrazněn v doporučeních Národního cholesterolového edukačního programu (National Cholesterol Education Program, NCEP) (McKenney, 2003).

**Triacylglyceridy** samy o sobě nezasahují do procesu aterosklerózy. Jsou neseny především v chylomikrech a jejich zbytcích, VLDL a IDL, tedy v lipoproteinech, z některé obsahují též cholesterol. Hypertriacylglyceridemie není rizikovým faktorem proto, že by se samy triacylglyceridy podílely na aterogenezi, ale proto, že odráží zvýšenou koncentraci aterogenních částic. Výjimkou je stav, kdy je hypertriacylglyceridemie způsobená pouze přítomností chylomiker, které kardiovaskulární riziko nezvyšují (Soška, 2001).

Přesto, že zvýšený cholesterol je spojen s aterosklerózou, která je nesporným zdravotním i společenským problémem, jde o molekulu s unikátními chemickými a fyzikálními vlastnostmi, která je základní sloučeninou buněk většiny živočichů. Deficit cholesterolu a jeho prekurzorů byl prokázán u nemocných v kritickém stavu, kde byl spojen s nadledvinovou insuficiencí (Bakalář, 2001). Nedostatečný přívod exogenního cholesterolu může vést ke vzniku inzulinové resistance (Zadák, 2005). Vzhledem extrémní důležitosti těchto molekul pro buněčné pochody je jejich deficit závažnou poruchou, kterou je třeba včas diagnostikovat (Zadák, 2000).

### **2.3.2. Ateroskleróza jako zánětlivý proces**

Procesu aterogeneze se účastní četné buněčné populace. Jsou to nejen endoteliální buňky, tvořící povrch aterosklerotického plátu, ale významnou roli hrají i cirkulující elementy, jako jsou leukocyty a trombocyty (Libby, 2000, Glass, 2001).

**Endotel**, tvořící jednobuněčnou výstelku cév a oddělující intravaskulární obsah od okolních tkání, je nyní chápán jako orgán s mnoha dynamickými funkcemi (Luscher,

1997). Poskytuje netrombogenní povrch, kontroluje pasáž solutů a makromolekul do tkání, produkuje mnoho faktorů modulujících kontrakce přilehlého hladkého svalstva, zprostředkovává interakce mezi cirkulujícími elementy a stěnou cévy a spouští reakce na patogenní stimuly, jako jsou například hypertenze, hyperglykémie a zplodiny cigaretového kouře. Jednou z těchto odpovědí endotelu je produkce adhezních molekul pro leukocyty, která je významným krokem v časně aterogenezi (Libby, 2000). Jinou významnou funkcí endotelu je produkce oxidu dusnatého, molekuly s vazodilatačním účinkem, limitující trombotické a zánětlivé děje (Cooke, 1997). Endotel je schopen rozpoznat patologické děje v přilehlých tkáních, jako například trauma nebo infekci, a reagovat na ně podporou koagulačních a zánětlivých dějů, například zprostředkováním migrace leukocytů apod. (Dart, 1999). Změny ve funkci endotelu vlivem zvýšené hladiny cholesterolu jsou patrné ještě před vývojem zjevného aterosklerotického plátu a jsou podobné fyziologické odpovědi endotelu na trauma či zánět (Dart, 1999). Endoteliální dysfunkce je jednou z prvních změn, nastávajících při aterogenezi a je doprovázena zvýšenou permeabilitou endoteliálních buněk, ztrátou jejich antikoagulační a antiagregační aktivity a mimo jiné i zvýšenou adhezí monocytů k endotelu následkem zvýšené exprese adhezních molekul (Cines, 1998).

Zánětlivé buňky, zahrnující **monocyty, makrofágy a lymfocyty** (především T) hrají zásadní roli v procesu aterogeneze (Ross, 1999). Ilustrací tohoto faktu jsou myši s defektem genu kódujícího růstový faktor pro makrofágy (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) a následnou téměř úplnou absencí monocytů, vedoucí k extrémní rezistenci k proaterogenním vlivům (Smith, 1995).

Cirkulující leukocyty jsou přitahovány do míst s poškozeným endotelem pomocí chemokinů, například monocytárního chemotaktického proteinu-1 (MCP-1). Leukocytární adhezní molekuly hrají významnou roli při kontaktu leukocytů s endotelem a při jejich následném vstupu do stěny cévy a případně transmigraci do okolních tkání. Ve stěně cévy dochází k přeměně monocytů na makrofágy, které spolu s hladkými svalovými buňkami fagocytují lipidové částice a mění se na pěnové buňky, které následně podléhají apoptóze. Pokročilý aterosklerotický plát je tvořen nekrotickým, vysoce trombogenním jádrem, obsahujícím lipidové hmoty, pěnové buňky a jejich zbytky. Infarkt myokardu nejčastěji vzniká rupturou tohoto vulnerabilního plátu, vedoucí k obnažení protrombotického jádra a formaci trombu v lumen arterie. Nestabilní pláty jsou bohatší na makrofágy ve svém jádru (Falk, 1989, Moreno, 1994). Stabilita fibrózní čepičky je dána rovnováhou mezi syntézou extracelulární matrix a její degradací, obojí je ovlivněno zánětlivými stimuly. Makrofágy

produkují pod vlivem cytokinů matrixové metaloproteinázy (Libby, 2000), kolagen degradující enzymy, které odbourávají složky extracelulární matrix a tím přispívají k oslabení fibrózní čepičky plátu (Creemers, 2001, Aikawa, 2004). Produkci oxidantů uvnitř plátu se monocyty podílejí na vzniku oxidativní modifikace LDL-částic. Produkci cytokinů, jako je tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1) a transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ), chemokinů (MCP-1) a růstových faktorů, jako je insulin-like growth factor-I (IL-GF-I) a platelet derived growth factor (PDGF) modulují monocyty zánětlivou reakcí. Prezentací antigenů T-lymfocytům vedou k aktivaci těchto buněk a k další produkci cytokinů, které zánětlivou reakci dále amplifikují. U nemocných s aterosklerózou byly zjištěny zvýšené hladiny reaktantů akutní fáze, jako jsou CRP, interleukin-6, prokalcitonin nebo fibrinogen a dále neopterin, ukazatel systémové imunitní aktivace. Hladiny těchto ukazatelů zánětu mohou reflektovat celkové aterosklerotické postižení daného jedince (Erren, 1999).

**T-lymfocyty** hrají řídicí roli v procesu aterogeneze. Jsou významným zdrojem mnoha proinflamatorních mediátorů, jako jsou chemokiny a cytokiny, zahrnující například interleukiny, interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) a tumor necrosis faktor (TNF) (Libby, 2002). Tyto molekuly mají mnohočetný účinek na buňky účastnící se aterogeneze, například indukují tvorbu adhezních molekul, zvyšují oxidativní stres, redukují produkci oxidu dusnatého endotelem, ovlivňují proliferaci buněk, inhibují tvorbu kolagenu a zvyšují produkci matrixových metaloproteináz.

**Buňky hladkého svalu** jsou základní strukturální součástí stěny tepen a zajišťují vaskulární tonus. Procesu aterogeneze se účastní migrací z medie do intimy tepen a následnou proliferací, fagocytózou tukových částic a formací pěnových buněk v centru aterosklerotického plátu. Jsou významným zdrojem extracelulární matrix, která formuje fibrózní čepičku, pokrývající lipidové jádro plátu (Libby, 2000). Změny ve funkci hladkých svalových buněk, například pokles syntézy kolagenu, mohou přispět k oslabení fibrózní čepičky s následnou nestabilitou plátu a větší náchylností k ruptuře. Buňky hladkého svalu se účastní remodelace arteriální stěny, například jako součást reakce na arteriální hypertenzi.

Adheze **trombocytů** a tvorba murálního trombu hraje významnou roli při formaci aterosklerotického plátu i jeho ruptuře. Obturace cévy trombem vede ke vzniku akutních koronárních syndromů. Trombocyty adherují k dysfunkčnímu endotelu, odhalenému kolagenu a makrofágům (Jebavý, 2003). Po aktivaci uvolňují cytokiny, růstové faktory a další mediátory zánětu, uskladněné v granulích. Jsou zdrojem kyseliny arachidonové, jejíž

přeměnou vzniká jednak tromboxan A<sub>2</sub>, který je jedním z nejsilnějších vazokonstrikčních a proagregačních činitelů, jednak leukotrieny, amplifikující zánětlivou reakci.

Iniciální podnět, který spustí v případě aterosklerózy zánětlivou odpověď, ještě nebyl zcela přesně objasněn, i když je diskutováno několik faktorů, jako například oxidativně modifikované LDL-částice, hyperhomocysteinemie, infekční agens a autoimunitní pochody. Role LDL-cholesterolu při aterogenezi byla probrána výše (viz kapitola Úloha cholesterolu v aterogenezi). Podrobnější popis procesů účastnících se aterogeneze není náplní této práce.

### 2.3.3. Selektinové adhezní molekuly a ateroskleróza

Jak již bylo popsáno v kapitole o roli cholesterolu v aterogenezi, LDL-cholesterol má řadu účinků v iniciální i následné fázi tohoto procesu. Vede mimo jiné ke zvýšené expresi endoteliálních adhezních molekul (Parhami 1993, Scalia, 1998). Ty zajišťují kontakt leukocytů s povrchem endotelu. Následuje migrace leukocytů do stěny cévy a v případě aterogeneze formace aterosklerotického plátu.

První fází interakce mezi leukocyty a endotelem jsou procesy zvané „capture“ a „tethering“ (volně přeloženo jako „zachycení“ či „zajetí“ a „uvázání“ leukocytu), po kterých následuje tzv. „rolling“, valivý pohyb leukocytu po aktivovaném endotelu. Tyto děje zprostředkovávají selektiny (Somers, 2000). V další fázi postupně dochází k pevné adhezi leukocytů k endotelu, která je umožněna integrinovými molekulami na povrchu leukocytů a intracelulárními adhezními molekulami (např. ICAM-1) na straně endotelu. Po pevném přilnutí dochází k transmigraci leukocytů do stěny cévy (Springer, 1990, Vestweber 1999). K expresi adhezních molekul dochází po aktivaci endoteliálních buněk pomocí IL-1, TNF- $\alpha$  a INF- $\gamma$  (Springer, 1990, Weller 1992). Interakce mezi endotelem a složkami cirkulující krve hraje významnou roli v patogenezi mnoha různých stavů, jako je například ateroskleróza a její komplikace a nádorová onemocnění. Solubilní formy selektinů a ICAM-1 jsou považovány za ukazatele zánětlivé aktivace endotelu (Giddings, 2005).

**P-selektin (CD62P)** je zásadní molekulou, umožňující zachycení leukocytu na aktivovaném endotelu a tzv. tethering a rolling. Jeho ligandem je PSGL-1 (P-selectin Glycoprotein Ligand-1), který je přítomen na povrchu většiny leukocytů a v menší míře i na povrchu trombocytů. P-selektin je produkován a skladován v alfa granulích destiček a ve Wiebel-Paladeho tělíscích endoteliálních buněk a je exprimován na jejich membráně po stimulaci, například trombinem nebo histaminem. Kinetika membránového P-selektinu je velmi rychlá, během minut je přesunut z intracelulárních zásob do povrchové membrány



trombocytů a endotelu, odkud je rychle uvolňován do plazmy, kde plní další funkce. Z membrány opět rychle vymizí (McEver, 1995). Zatím nebyl přesně popsán poločas solubilní formy P-selektinu (sP-selektin). U nemocných s ischemickou chorobou srdeční byl nalezen diurnální rytmus sP-selektinu s maximem hladin ve večerních hodinách, plazmatické hladiny sE-selektinu zůstaly během dne stabilní (Osmančík, 2004). Exprese P-selektinu je ukazatelem endoteliální a/nebo trombocytární aktivace (Somers, 2000). Korelace mezi expresí P-selektinu na destičkách a hladinou jeho solubilní formy v plazmě pacientů s bolestmi na hrudi nebyla nalezena (Gurbel, 2000 A). Množství cirkulujícího P-selektinu, který je uvolněn z membrán endotelu a trombocytů, odráží rozsah zánětlivého postižení. Ukázkou je myší model aterosklerózy, kde byla prokázána zvýšená hladina sP-selektinu a většina cirkulujících molekul P-selektinu byla endoteliálního původu (Burger, 2003).

Ačkoli je P-selektin již dlouho považován za klíčovou molekulu zajišťující migraci leukocytů do míst zánětu, až v posledních letech je zdůrazňována jeho významná role v procesech trombózy a hemostázy (Cambien, 2004). Podobně jako u leukocytů, iniciační fázi adheze trombocytů je také tzv. rolling, závislý na expresi P-selektinu na povrchu endotelu (Frenette, 1995). Ligandem pro P-selektin je PSGL-1 (Frenette, 2000) a glykoprotein Ib v membráně trombocytu (Romo, 1999). Obsahem Weibel–Paladeho tělísek endotelu, který se uvolňuje se při aktivaci na jeho povrch, jsou kromě P-selektinu také tzv. zvláště velké (ultra large) multimery von Willebrandova faktoru (Sporn, 1986). Von Willebrandův faktor se váže prostřednictvím glykoproteinu Ib na trombocyty. Nedávno bylo publikováno, že nově uvolněný von Willebrandův faktor je zakotven na povrchu endotelu pomocí P-selektinu (Padilla, 2004). Vlivem P-selektinu se aktivované cirkulující trombocyty sdružují s monocyty (Michelson, 2001) a společně „rolují“ po endotelu (Frenette, 2000). Destičkový i solubilní P-selektin hraje významnou úlohu při vzniku a progresi aterosklerotických lézí (Wagner, 2003). P-selektin vede k formaci prokoagulačních trombocyto-leukocytárních mikroagregátů obsahujících tkáňový faktor a indukuje expresi tkáňového faktoru na monocytech (Lindmark, 2000), účastní se destičkové adheze a agregace. Podporuje také stabilizaci destičkových trombů a depozici fibrinu do trombu (Palabrica, 1992, Sullivan, 2003, Myers, 2003).

Příkladem chorob doprovázených zvýšenou hladinou P-selektinu jsou trombotické konzumpční stavy, jako je disseminovaná intravaskulární koagulace, trombotická trombocytopenická purpura a heparinem indukovaná trombocytopenie (Chong, 1994), dále zánětlivé procesy jako je sepse nebo syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) (Gearing, 1993, Cowley, 1994). Vysoká hladina sP-selektinu je asociována též s arteriální trombózou.

Byla nalezena u ischemické choroby srdeční (Fang, 2004), infarktu myokardu (Ikeda, 1994, Shimomura, 1998), nestabilní anginy pectoris (Ikeda, 1995), infekční endokarditidy (Korkmaz 2001), ischemických cévních mozkových příhod a ischemické choroby dolních končetin (Merten, 2004). Hladina solubilního P-selektinu a ICAM-1 odrážela rozsah koronárního postižení (Hajilooi, 2004). Stanovení hladiny solubilního a na destičky vázaného P-selektinu může usnadnit rozlišení mezi koronárním a nekoronárním typem bolesti na hrudi (Gurbel, 2000 B). Hladina sP-selektinu může být ukazatelem účinnosti trombolytické léčby akutního infarktu myokardu (Gurbel, 2001). Některými autory je P-selektin považován za ukazatel destabilizace aterosklerotického plátu (Draz, 2003). V nepřítomnosti zranění nebo zánětlivého onemocnění může vysoká hladina P-selektinu sloužit jako ukazatel rizika kardiovaskulárních příhod a jejich komplikací (Hillis, 2002, Ridker, 2001).

Zásahem do interakcí mediovaných P-selektinem lze účinně podporovat, nebo naopak omezovat prokoagulační a protrombotické pochody. Například blokáda P-selektinu monoklonální protilátkou má v experimentu příznivý vliv na arteriální i venózní trombózy (Kumar A., 1999, Myers, 2002). Bylo zkoumáno i potencionální využití jeho prokoagulačních vlastností. Infuze P-selektinu vedla k úpravě hemostázy u myšího modelu hemofilie A nebo B (Hrachovinová, 2003).

**E-selektin (CD62E)**, známý též jako **ELAM-1** (endotelial leukocyte adhesion molecule-1) je solubilní adhezní molekula, zodpovědná za tzv. pomalý rolling leukocytů a přechod rollingu v pevnou adhezi. Ligandy E-selektinu nejsou přesně známy, mimo jiné se uvažuje o PSGL-1. E-selektin je produkován pouze endotelem a kromě solubilní formy v plazmě (sE-selektin) se vyskytuje pouze na endoteliálním povrchu (Springer 1990, 1994, Somers, 2000). Detekce sE-selektinu se proto považuje za specifickou známku aktivace endotelu (Leeuwenberg 1992). E-selektin je exprimován na membráně endotelu v řádu hodin po stimulu. Není uvolňován z intracelulárních zásob, ale syntetizován de novo (Gearing, 1993). Inhibitory HMG-CoA reduktázy, statiny, které snižují hladinu cholesterolu, mají i další četné účinky, mimo jiné stabilizují aterosklerotický plát a zlepšují funkci endotelu. S tím je v souladu i pozorování snížení hladin sE-selektinu během léčby statiny (van Haelst, 2001).

#### 2.3.4. Monocytární chemotaktický protein-1 a ateroskleróza

Monocytární chemotaktický protein-1 (MCP-1) patří mezi chemokiny, proteiny, které řídí migraci leukocytů do tkání s probíhajícím zánětem (Butcher, 1991). Transmigrace leukocytů z lumen cévy do místa zánětu je mnohastupňový proces, zahrnující řadu interakcí mezi leukocyty, trombocyty a endoteliálními buňkami (Springer, 1994). Chemokiny poskytují signál, který změní nízkoafinitní rolling leukocytů, mediovaný selektiny, v pevnou adhezi na endotel, zprostředkovanou integriny a následovanou migrací leukocytů z lumina cévy. Chemokiny byly v době zánětu detekovány téměř ve všech tkáních a orgánech a jsou produkovány mnoha buněčnými populacemi. Hlavními stimuly k jejich produkci jsou prozánětlivé cytokiny, jako je IL-1, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-4, dále virové a bakteriální produkty, například lipopolysacharidy (Garcia-Zepeda, 1996). V případě aterosklerózy nejsou chemotaktické signály, působící akumulaci leukocytů v aterosklerotických plátech zcela objasněny, ale právě MCP-1 byl zvýšeně detekován v aterosklerotických lézích (Nelken, 1991, Seino 1995) a je mu připisována role při akumulaci makrofágů a oxidovaných forem LDL-cholesterolu v aterosklerotických plátech (Aiello, 1999, Reckless, 1999). MCP-1 přímo stimuluje také proliferaci a migraci buněk hladkého svalstva (Porreca, 1997). Předpokládá se, že MCP-1 ovlivňuje počet monocytů atrahovaných do stěny cévy a je v literatuře považován za možný další ukazatel nestability aterosklerotického plátu (Tanaka, 2004).

Koncentrace solubilního MCP-1 (sMCP-1) narůstá s věkem a tento vzestup může být spojen s progresí aterosklerotických lézí. Elevace hladin MCP-1 je spojena se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem (de Lemos, 2003). Solubilní MCP-1 je spolu s tkáňovým faktorem zvýšen u akutních koronárních syndromů (Nishiyama, 1998). Absence MCP-1 vedla naopak k prolongované zánětlivé fázi hojení infarktu myokardu a opožděnému nahrazení poškozených kardiomyocytů granulační tkání. Důvodem bylo chybění jeho vlivu na aktivaci fibroblastů a endoteliálních buněk, migraci a aktivaci makrofágů, produkci cytokinů a akumulaci myofibroblastů v hojícím se infarktu myokardu (Frangogiannis, 2004, Dewald, 2005). Terapie statiny snížila produkci MCP-1 a tyto změny korelovaly se snížením oxidativní modifikace LDL-cholesterolu (Rosenson, 2005). Roli makrofágů v aterogenezi a význam MCP-1 při jejich migraci shrnul ve své přehledné práci Boyle (Boyle, 2005).

#### 2.3.5. Neopterin a ateroskleróza

Neopterin (2-amino-4-hydroxy-6-[D-erythro-6-(1,2,3-trihydroxypropyl)]-pteridin) je metabolitem guanosin-triphosfátu, produkováného makrofágy po stimulaci INF- $\gamma$  (Huber,

1984). Měření neopterinu v tělních tekutinách umožňuje zhodnotit aktivitu makrofágů a odráží hladinu oxidativního stresu, působeného těmito buňkami. Sama molekula neopterinu má naopak antioxidační vlastnosti. Neopterin může být užit k monitorování nemocných s chorobami, u kterých dochází k imunitní aktivaci, jako jsou nádorová onemocnění, syndrom získaného imunodeficitu (AIDS), autoimunitní choroby a rejekce transplantátu (Wachter, 1989, Baier-Bitterlich, 1997). Jeho zvýšení bylo pozorováno v cirkulaci nemocných s aterosklerózou karotid (Weiss, 1994), koronárních tepen (Schumacher, 1992) a tepen dolních končetin (Tatzber, 1991). Cirkulující i močový neopterin byly zvýšeny u nemocných s akutními koronárními syndromy (Melichar, 1994, Gupta, 1997). Koncentrace neopterinu korelovaly s rozsahem angiograficky určeného aterosklerotického poškození, stupněm myokardiální ischemie (Gurfinkel, 1999) a s počtem komplexních stenóz (Garcia-Moll, 2000). Bazální hladiny sérového neopterinu byly vyšší u žen s chronickou stabilní anginou pectoris, u kterých došlo během sledování ke koronární příhodě, než u žen bez koronární příhody. Jejich hladiny byly dokonce podobné hladinám pacientek s nestabilní anginou pectoris (Garcia-Moll, 2000). Analogické výsledky byly nalezeny u nemocných s arteriální hypertenzí a negativní anamnézou koronární příhody, u kterých se v průběhu sledování objevila koronární příhoda (Avanzas, 2004), dále u nemocných, kteří prodělali non-Q infarkt myokardu (van Haelst, 2003) a u starší populace, kde zvýšené plazmatické hladiny neopterinu predikovaly kardiovaskulární příhody (Forsblad, 2002). Bylo zjištěno, že statiny snižují INF- $\gamma$  navozenou produkci neopterinu in vitro (Neurauter, 2003), a pokud byly užívány v sekundární prevenci ischemické choroby srdeční, způsobily pokles hladiny adhezních molekul, neopterinu a CRP (van Haelst, 2001). Předpokládá se, že u stabilních aterosklerotických lézí odráží hladina neopterinu celkové množství makrofágů, které je proporcionální objemu stabilních plátů a bazální produkce neopterinu odpovídá bazální aktivitě makrofágů (Tanaka, 2004). Zvýšení neopterinu je nezávislé na séropozitivitě protilátek proti *Chlamydia pneumoniae*, která bývá spojována se zánětlivými změnami u aterosklerózy (Smith, 2003). Tato pozorování ukazují, že neopterin, indikátor aktivace monocyto-makrofágového systému, může ukazovat rozsah a stabilitu aterosklerotických plátů a predikovat kardiovaskulární příhody. Močové vylučování neopterinu podléhá diurnálnímu rytmu s maximem v pozdních nočních a brzkých ranních hodinách (Auzéby, 1988).

### 2.3.6. Mikroalbuminurie a ateroskleróza

Mikroalbuminurie je přítomnost limitovaného množství albuminu v moči, které překračuje fyziologickou normu. Je považována za ukazatel generalizované mikrovaskulární dysfunkce (Deckert, 1989). Zvýšená hladina albuminu v moči ukazuje nejen časné fáze renálních onemocnění, ale byl prokázán její vztah ke klinickým projevům a následkům aterosklerózy, jako je ischemická choroba srdeční (Borch-Johnsen, 1999), infarkt myokardu (Berton, 1998) levokomorové srdeční selhání, hypertrofie myokardu (Wachtell, 2002, Dell'omo, 2003), tichá ischemie myokardu (Diercks, 2000) a ischemická cévní mozková příhoda (Nakayama, 1997, Beamer, 1999). Mikroalbuminurie je silným a nezávislým prediktorem kardiovaskulární morbidity a mortality a celkové mortality nejen u nemocných s diabetem mellitem (Jarrett, 1984) nebo s arteriální hypertenzí (Jager, 1999, Jensen, 2000), ale i u nediabetických pacientů (Yudkin, 1988, Damsgaard, 1990, Yuyun, 2004). Mikroalbuminurie odráží rozsah a tíži postižení koronárních tepen (Lekatsas, 2004). Riziko kardiovaskulárních příhod, spojené s klasickými rizikovými faktory aterosklerózy, je v přítomnosti mikroalbuminurie více než zdvojnásobeno (Borch-Johnsen, 1999).

Mikroalbuminurie může být stanovena vyšetřením vzorku moči sbírané za 24 hodin, kdy za mikroalbuminurii je považováno vylučování 26-150 mg albuminu za 24 hodin, nebo výpočtem indexu albumin/kreatinin z hodnot, které byly stanoveny v jednorázovém vzorku moči. V tomto případě je mikroalbuminurie definována jako index albumin/kreatinin 2,5-30 mg/mmol u mužů a 3,5-30 mg/mmol u žen. Prevalence mikroalbuminurie v obecné evropské populaci je 5-7% (Romundstad, 2003, Hillege, 2002). Podle nových pozorování se mikroalbuminurie ukazuje jako silný nezávislý prediktor ischemické choroby srdeční dokonce i v případě, kdy hladiny albuminu v moči ještě nesplňují dosud platné normy pro mikroalbuminurii. Proto byla za účelem hodnocení individuálního kardiovaskulárního rizika jako dolní mez indexu albumin/kreatinin doporučena hodnota 0,7 mg/mmol (Klausen, 2004).

Z patofyziologického hlediska je mikroalbuminurie projevem narušené glomerulo – tubulární rovnováhy, tedy nepoměru mezi glomerulární filtrací albuminu a schopností tubulů albumin vstřebávat. Je často následkem zvýšené propustnosti glomerulární membrány pro albumin, způsobené zvětšením pórů bazální membrány a/nebo snížením negativního náboje endoteliální bariéry. Tyto změny byly pozorovány nejen u diabetických pacientů, ale i jako následek zvýšeného intraglomerulárního tlaku doprovázejícího arteriální hypertenzi a byly nalezeny dokonce i u zdravých osob, kde byly asociovány s vyšším krevním tlakem a nižší hladinou apolipoproteinu AI a HDL-cholesterolu (Jensen, 1995). Primárně renální příčiny

mikroalbuminurie, jako jsou například poruchy tubulární resorpce albuminu, jsou nad rámec této kapitoly.

Patogenetické mechanismy spojující mikroalbuminurii a aterosklerózu nejsou doposud plně objasněny. U zvířecího modelu byl zvýšený transvaskulární transport albuminu spojen se zvýšeným únikem lipoproteinů do stěny cév, obojí bylo asociováno s aterosklerózou. Tento únik lipidů byl dlouho považován za jednu z příčin zvýšeného ukládání cholesterolu ve stěně cév (Nordestgaard, 1996). Kinetické studie však ukázaly, že míra úniku cholesterolu nekorelovala ani s velikostí úniku albuminu, tedy s mikroalbuminurií, ani s krevním tlakem, ale s hyperinzulinemií, a to už v prediabetickém stádiu (Jensen, 2004). Zvýšený únik LDL-cholesterolu do stěny cév může být jedním mechanismů, kterým se hyperinzulinemie podílí na aterogenezi. Současná přítomnost hyperinzulinemie a mikroalbumurie výrazně zvyšuje riziko manifestace aterosklerózy (Kuusisto, 1996).

Okolnosti, které byly pozorovány v souvislosti mikroalbuminurií, jsou často buď přímo identické s rizikovými faktory aterosklerózy, nebo se jednalo o stavy, které se vyvinuly v důsledku aterogenetických dějů. Nejsilnějšími determinantami mikroalbuminurie jsou arteriální hypertenze a non-insulin dependentní diabetes mellitus. Asociace mikroalbuminurie s hypercholesterolemií byla nalezena v některých studiích (Shankar, 2004), jiní autoři souvislost nenalezli (Zouvanis, 1995). Sinzinger pozoroval ústup mikroalbuminurie při léčbě hypercholesterolemie atorvastatinem u nemocných s normální glukózovou tolerancí (Sinzinger 2003) a dále v průběhu dlouhodobé léčby familiární hypercholesterolemie LDL-aferézou (Sinzinger, 1999). Zdá se, že hyperlipidemie může ovlivňovat renální funkce a naopak. Důkazem je také úspěšná léčba masivní proteinurie po transplantaci ledvin LDL-aferézou (Yanagisawa, 1996). Mikroalbuminurie byla pozorována též v souvislosti se zvýšenými hladinami fibrinogenu, trombin-antitrombinových komplexů, trombomodulinu, von Willebrandova faktoru a s porušenou fibrinolytickou aktivitou, zvláště u diabetických pacientů. Strukturální alterace glomerulární membrány může být také dána geneticky a mikroalbuminurie může potom být ukazatelem zvýšené individuální náchylnosti k aterogenním inzultům. Identifikací rizikových faktorů pro vznik mikroalbuminurie a stavů, které jsou s jejím výskytem spojeny, se zabývala u diabetických i nediabetických pacientů řada autorů (Kario, 1995, Jones, 1989, Knobl, 1993, Hoogeveen, 1998, Jager, 2001, Stehouwer, 2002, Karalliedde, 2004). Jsou shrnuty v Tabulce 1.

Problematika poruch hemostázy ve vztahu k ateroskleróze není primární náplní této práce. Proto budou z důvodu souvislosti s mikrovaskulární dysfunkcí a jejím projevem –

mikroalbuminurií – jen okrajově zmíněny některé faktory, které byly v rámci této práce vyšetřovány.

**Fibrinogen** je silným nezávislým ukazatelem kardiovaskulárního rizika. Jeho zvýšené hladiny byly nalezeny u stabilních i nestabilních forem ischemické choroby srdeční a v souvislosti s komplikacemi po koronárních intervencích, s cévními mozkovými příhodami, progresí ischemické choroby dolních končetin a konečně i s celkovou mortalitou. Jako protein akutní fáze se fibrinogen zvyšuje při zánětlivých pochodech vlivem cytokinů. Potencionální mechanismy, kterými se podílí na aterogenezi, jsou četné. Fibrinogen je substrátem pro trombin a představuje poslední krok v koagulační kaskádě. Podílí se na agregaci destiček, moduluje funkci endotelu, podporuje migraci a proliferaci buněk hladkého stavu, interaguje s vazbou plazminogenu na jeho receptor, ovlivňuje rheologické vlastnosti krve a prostupuje do intimy a média cév, kde se podílí na formaci aterosklerotického plátu (Siscovick, 1997). V současné době není zcela jasné, do jaké míry je role fibrinogenu v procesu aterogeneze kauzální, přesto však zůstává důležitým rizikovým faktorem kardiovaskulárních chorob (Koenig, 2003).

Proces fibrinolýzy je v rámci komplexu zpětných vazeb aktivován při koagulačních procesech. Fibrinolýza je kontrolována endotelem především prostřednictvím tvorby tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA) a jeho inhibitoru PAI-1. Je tlumena Lp(a), který je strukturou podobný plazminogenu. Porucha fibrinolýzy je v úzkém vztahu k zánětlivým procesům a endoteliální dysfunkci. Zvýšené hladiny t-PA a PAI-1 jsou považovány za rizikový faktor aterosklerózy a prediktivní faktor pro vznik infarktu myokardu. Vyšší hladiny PAI-1 ukazují na aktivaci endotelu. PAI-1 je také řazen mezi proteiny akutní fáze, zvyšuje se při horečce, zánětech a v těhotenství. Vyšší hladiny jsou spjaty také s kombinovanou hyperlipidemií a obezitou (Siscovick, 1997).

K posuzování endoteliální dysfunkce může být použito také stanovení hladin **trombomodulinu**, který je exprimován na endoteliálních buňkách a je receptorem pro trombin. Po vazbě trombinu na trombomodulin ztrácí trombin schopnost štěpit fibrinogen a nabývá schopnost aktivovat protein C. Z povrchu endotelu je trombomodulin uvolňován do cirkulace štěpením elastázou neutrofilů. Hladina solubilního trombomodulinu je závislá na stavu endotelu a zvyšuje se v případě jeho poškození. Je považována za ukazatel poškození endoteliálního systému (Sawada 1992). **Von Willebrandův faktor** je produkován endotelem a zprostředkovává adhezi destiček. Jeho zvýšení v plazmě odpovídá chronické stimulaci

endotelu. Trombomodulin a von Willebrandův faktor jsou asociovány s aterotrombotickým kardiovaskulárním postižením (Hjerkin, 2005).

Souhrnem lze říci, že řada vlivů poškozujících glomerulární membránu je společná s faktory, které se podílejí se na aterogenezi. Mikroalbuminurie tak může být spojena s protrombotickým a/nebo chronickým zánětlivým stavem, asociovaným se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních chorob.

### **Tabulka 1. Faktory a stavy asociované s přítomností mikroalbuminurie**

Věk

Mužské pohlaví

Arteriální hypertenze, absence nočního poklesu krevního tlaku

Abnormální lipidový profil - zvýšení lipoproteinu (a)

- zvýšení celkového cholesterolu

- snížení apolipoproteinu A a HDL-cholesterolu

- zvýšení triacylglyceridů

Zvýšení fibrinogenu

Zvýšení trombin-antitrombinových komplexů

Zvýšení von Willebrandova faktoru

Zvýšení PAI-1

Zvýšení trombomodulinu

Zvýšení homocysteinu

Zvýšení CRP

Zvýšení interleukinu-6

Zvýšení solubilního E-selektinu

Zvýšení celkového počtu leukocytů

Inzulinová resistance a špatná kompenzace glykémie

Centrální obezita

Ischemie myokardu

Hypertrofie levé komory a levokomorová dysfunkce

Prodloužený QTc interval

Retinopatie

Kouření

Zvýšený příjem proteinů

*(upraveno dle Karalliedde a Viberti, 2004)*

### **2.3.7. C-reaktivní protein a ateroskleróza**

C-reaktivní protein (CRP) je protein akutní fáze produkovaný játry pod vlivem prozánětlivých cytokinů, především interleukinu-6, který je uvolňován makrofágy v místě zánětu (Castell, 1990). Zvýšení CRP provází četné stavy charakterizované infekčním nebo neinfekčním zánětem, včetně reakcí na různé poškození tkání, sterilní zánětlivé procesy u autoimunitních chorob a malignit, kde je CRP pravděpodobně stimulován sekrecí TNF- $\alpha$ .



Fyziologickou funkcí CRP je opsonizace mikrobů a aktivace komplementového systému po navázání na patogen nespecifickou vazbou. CRP stimuluje endoteliální buňky k expresi leukocytárních adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 (Pasceri, 2000). CRP má chemotaktický vliv na monocyty. Stejně tak jako LDL-cholesterol, i CRP se ukládá ve stěně arterií během aterogeneze, dokonce jeho přítomnost předchází vstup monocytů do časných aterosklerotických lézí (Torzewski, 2000). In vitro bylo prokázáno, že CRP opsonizuje nativní LDL-částice, které bez opsonizace nejsou fagocytovány, a tím umožňuje jejich pohlcení makrofágy (Zwaka, 2001).

V případě bakteriálních infekcí koncentrace CRP stoupá do výše až stonásobků normálních hodnot. V poslední době jsou publikovány četné studie, ukazující CRP jako indikátor kardiovaskulárního rizika. Koncentrace CRP, hodnocené za tímto účelem, jsou podstatně menší, než koncentrace vyskytující se u akutních infekcí, dokonce jsou pod hranicí detekce konvenčních laboratorních metod. Pro tento účel byly vyvinuty citlivější metody, které dovolují stanovit CRP od 0,1 mg/l (Myers, 2004). Takto stanovený CRP se nazývá „high sensitivity CRP“ (hsCRP). Ke zhodnocení kardiovaskulárního rizika podle hladiny hsCRP byly doporučeny tři kategorie:

1. nízké riziko – hsCRP < 1,0 mg/l
2. střední riziko – hsCRP je v rozmezí 1,0- 3,0 mg/l
3. vysoké riziko – hsCRP > 3,0 mg/l

Pokud je hsCRP > 10mg/l, je doporučeno testy opakovat a pátrat po zdroji infekce nebo jiného zánětu (Myers, 2004).

Výhody hsCRP oproti jiným reaktantům akutní fáze spočívají v relativně nízké ceně stanovení, dále ve stabilitě vzorku při pokojové teplotě či při zmrazení a v absenci cirkadiálního rytmu hladin CRP. Souhrn několika populačních studií neshledal významné rozdíly mezi pohlavími (Ford, 2003, Rifai, 2003) ani významné ovlivnění hladin CRP věkem v kategorii od 20 do 70 let (Ford, 2003). Nebyly prokázány rozdíly mezi rasami (Ford, 2003). Nebyly shledány rozdíly mezi vzorky nalačno a po jídle (Ledue, 2001). CRP stoupá u kuřáků (Koenig, 1999), vyšší hladiny byly nalezeny jak u abstinentů, tak u ethyliků, na rozdíl od běžných konzumentů alkoholu (Imhof, 2001). Byla pozorována korelace koncentrací CRP s inzulínovou resistencí, *body mass indexem* (BMI) a především s obvodem pasu (Pannacciulli, 2001 A). S poklesem hmotnosti dochází též s poklesu CRP (Esposito, 2003). Pokles CRP provází též léčbu statiny a jeho velikost má prognostický význam (Ridker, 2005). CRP klesá též u akutních forem ICHS po podání betablokátorů (Anzai, 2003). Vyšší

koncentrace CRP byla pozorována u lidí s chronickými záněty (chronická bronchitida nebo periodontitida) a s pozitivitou protilátek proti *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, herpetickým virům, viru hepatitidy A a mykoplazmatům. S počtem pozitivních patogenů stoupalo i riziko kardiovaskulárních příhod (Zhu, 2001). Tvorbu CRP a jeho výslednou hladinu ovlivňují i genetické faktory, především polymorfismus genu pro CRP (Zee, 2004) a promotoru genu pro interleukin-6 (Basso, 2002).

Ve studii Physicians Health Study bylo u mužů v kvartilu s nejvyššími hodnotami CRP riziko vzniku infarktu myokardu 2,9-krát vyšší než u mužů s nejnižšími koncentracemi (Ridker, 1998 A). U žen, sledovaných ve studii Woman's Health study, bylo u nemocných s vyššími hodnotami CRP riziko náhlé srdeční smrti 4,4-krát větší a CRP bylo v této studii nejpřesnějším ukazatelem kardiovaskulárního rizika ze všech sledovaných veličin, včetně lipidových parametrů, homocysteinu atd. (Albert, 2002). CRP korelovalo s rozsahem aterosklerotického postižení stanoveným pomocí koronarografie nebo ultrasonografií tepen (Tataru, 2000). Zvýšená koncentrace CRP je též rizikovým faktorem pro rozvoj ischemické choroby dolních končetin (Ridker, 1998 B).

Již před 20 lety byla nalezena vyšší hladina CRP u transmuralního IM ve srovnání s IM netransmurálním (Pietila, 1986). Koncentrace CRP je zvýšena i u nestabilní anginy pectoris. Maximální hodnoty CRP v akutní fázi IM korelovaly s jeho rozsahem a byly vyšší u pacientů s výskytem komplikací ve formě srdečního selhání (v době hospitalizace i po propuštění z nemocnice), poruchami srdečního rytmu a rupturou myokardu (Pietila, 1991, Anzai, 1997). V průběhu IM se maximální koncentrace CRP ukazují být významným nezávislým ukazatelem nižší ejekční frakce levé komory po IM, následného rozvoje srdečního selhání, celkové mortality i mortality na následné srdeční selhání (Berton, 2003). Včasné zprůchodnění uzavřené cévy u akutního IM vede k signifikantně nižším maximálním hladinám hsCRP ve srovnání s pacienty s neúspěšnou revaskularizací (Pietila, 1993). Zvýšený CRP byl spojen se zvýšeným rizikem srdečního selhání i u nemocných bez předchozího infarktu myokardu a u nemocných s asymptomatickým aterosklerotickým postižením ve věku nad 65 let (Vasan, 2003). U obézních žen korelovaly hladiny CRP s miroalbuminurií, která je považována za ukazatele endoteliální dysfunkce u diabetiků i nediabetiků (Pannacciulli, 2001 B).

Dynamika sérových koncentrací CRP během aferéz byla popsána u různých metod extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu několika autory. Většina z nich pozorovala pokles CRP po LDL-aferéze (Otto, 2001, Wieland, 2002, Kobayashi, 2002, Kojima, 2003).

Pokles CRP je pokládán za jeden z dalších mechanismů, kterými LDL-afézeza přispívá k potlačení zánětlivých dějů procesu aterogeneze. Ani při pečlivé rešerši jsme v dosavadní literatuře nenalezli popis změn koncentrací CRP během afézezy s užitím imunoabsorpčních kolon LDL-Lipopak (Pocard, Ltd., Moskva, Rusko).

### **2.3.8. CD40 ligand a ateroskleróza**

CD40 ligand (CD40L, známý jako CD154, TRAP [TNF-Related Activation Protein] nebo TBAM [T-cells B-cell activation molecule]) je multifunkčním ligandem, modulujícím zánětlivé děje. Původně byl objeven na T-lymfocytech, kde pracuje jako mediátor T-buňkami řízené aktivity, proliferace a diferenciaci B-lymfocytů a indukuje jejich izotypové přepnutí při produkci imunoglobulinů. Je exprimován především na aktivovaných CD4+ T-buňkách, ale i na ostatních T- a B-lymfocytech, endoteliích, buňkách hladkého svalu, makrofázích, monocitech, aktivovaných destičkách a fibroblastech, mimo jiné i v aterosklerotických lézích. Je přítomen též v plazmě jako solubilní protein, sCD40L. Stimulace cytokiny (interleukinem-1, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) zvyšuje expresi CD40L na povrchu buněk, který fyziologicky moduluje T-buňčné efektorové funkce a imunitní obranné reakce. Účastní se i patofyziologických dějů u chronických zánětlivých chorob. Interakce mezi CD40 a jeho ligandem spouští tvorbu prozánětlivých mediátorů, jako jsou cytokiny, adhezni molekuly, matrix odbourávající enzymy a tkáňový faktor (Schonbeck, 2000). Je prostředkem řídicího vlivu T-lymfocytů na ostatní složky zánětlivých procesů v aterosklerotickém plátu (Mach, 1998).

Solubilní CD40L se zvyšuje u akutních koronárních příhod. U nemocných s nestabilní anginou pectoris je zvýšení sCD40L ukazatelem zvýšeného rizika koronární příhody (Heeschen, 2003, Yan, 2004) a možného benefitu z protideštičkové léčby abciximabem (Heeschen, 2003). Oxidované formy LDL mohou podporovat expresi CD40 a CD40L v aterosklerotickém plátu, která byla spolu s hladinou LDL-cholesterolu snížena léčbou statiny (Schonbeck, 2002). Zvýšené hladiny sCD40L byly nalezeny u nemocných s familiární hypercholesterolemií a léčba statiny vedla k jejich snížení (Semb, 2003). Snížení hladiny cholesterolu v krvi mělo za následek redukci CD40 i CD40L, snížení aktivity matrixových metaloproteináz, zvýšení obsahu kolagenu v aterosklerotickém plátu a snížení hladiny tkáňového faktoru. To vše přispívá ke stabilizaci aterosklerotických plátů. Hladina sCD40L může být kromě statinů (Kinlay, 2004, Malyszko, 2004) příznivě ovlivněna i glitazony, inhibitory glykoproteinu IIb/IIIa a clopidogrelem (Marx, 2003, Vishnevetsky, 2004). Sledováním hladiny CD40L lze získat informaci o imunitních a zánětlivých dějích

v aterosklerotických plátech a o jejich stabilitě. Podle našich nejlepších znalostí nebyly změny hladin CD40L během LDL-afézy v literatuře popsány.

### 2.3.9. Endoglin (CD105) a ateroskleróza

Endoglin je glykoprotein, který je součástí receptoru pro transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ). Je konstitutivně exprimován ve velkém množství na povrchu endoteliálních buněk, a to především kapilár, arteriál, venul. Dále byl nalezen na povrchu řady buněčných populací včetně aktivovaných monocytů, hladkých svalových buněk a fibroblastů (Guerrero-Esteo, 1999). Výrazně zvýšená exprese endoglinu byla pozorována při aktivaci endoteliálních buněk, například iradiací (Wang, 1995) nebo při aktivní angiogenezi - v regenerujících tkáních nebo v tkáních s probíhajícím zánětem (van de Kerkhof, 1998), a u tumorů (Kumar S., 1999). Tato pozorování vedla k předpokladu, že endoglin může vystupovat jako ukazatel aktivace nebo poškození a reparace endotelu (Li C., 2000).

Přesná funkce endoglinu stále není zcela jasná. Pravděpodobně hraje významnou roli při zprostředkovávání vlivu TGF $\beta$  na endotel (Blanco, 2005). Mutace genu pro endoglin vede k typu 1 hereditární hemorhagické teleangiektasie (McAllister, 1994), charakterizované cévními dyspláziemi s excesivní vrstvou hladkých svalových buněk (Braverman, 1990) a rekurentním krvácením. Endoglin tedy spolupůsobí při diferenciaci hladkých svalových buněk ve stěně cév (Li D.Y., 1999).

Ligand endoglinu, TGF $\beta$ , reguluje mnoho pochodů nutných ke správnému vývoji a reparaci tkání. Mechanizmy tohoto působení na molekulární úrovni nejsou v této chvíli do detailu známy (Blanco, 2005). TGF $\beta$  účinkuje jako negativní modulátor proliferace, migrace a diferenciaci různých buněčných populací (Conley, 2004). V procesech aterosklerózy hraje převážně inhibiční roli. Rozvinuté aterosklerotické léze obsahují obvykle i novotvořené cévní zásobení. TGF $\beta$  je považován za významný inhibitor angiogeneze a modulátor remodelace cévní stěny. Vede k diferenciaci pericytů a buněk hladkého svalstva s cílem vytvořit stěnu cévy a omezit nadměrnou proliferaci a migraci endoteliálních buněk (Conley, 2000). Indukuje tvorbu PAI-1 a fibronektinu s následkem depozice extracelulární matrix. PAI-1 je potentním inhibítozem angiogeneze a migrace endoteliálních buněk (Stefansson, 2001). TGF $\beta$  má supresivní vliv na imunitní reakce. U aterosklerózy se uplatňuje také inhibice migrace a proliferace hladkých svalových buněk. (Kojima, 1991). TGF $\beta$  hraje roli též jako kardioprotektivní činitel po ischemickém insultu prostřednictvím eliminace superoxidových aniontů (Roberts, 1993). TGF $\beta$  zvyšuje expresi endoglinu na buňkách (Lastres, 1996) a ta

vede ke snížení schopnosti TGF $\beta$  inhibovat proliferaci a migraci endotelových buněk (Li C., 2000). Jen část endoglinových molekul na endotelu váže TGF $\beta$  a je pravděpodobné, že endoglin má ještě jiné funkce, nezávislé na tomto faktoru (Cheifetz, 1992).

Hladina aktivního TGF $\beta$  v séru u nemocných s pokročilou aterosklerózou byla oproti zdravým jedincům cca pětikrát snížena a medikace aspirinem vedla k jejímu nárůstu (Grainger, 1995). Nemocní s aterosklerózou měli snížený aktivní TGF $\beta$  i v dalších studiích (Erren, 1999), kde byl dále nalezen zvýšený sérový CRP, interleukin-6 a neopterin. Změny těchto ukazatelů korelovaly s rozsahem koronárního postižení. Snížení TGF $\beta$  se jeví jako nezávislý ukazatel kardiovaskulárního rizika u dialyzovaných (Stefoni, 2002) i nedialyzovaných (Tashiro, 2002) nemocných s ischemickou chorobou srdeční.

Většina hladkých svalových buněk v aterosklerotickém plátu exprimuje velké množství molekul endoglinu, narozdíl od hladkých svalových buněk normální arteriální stěny, na kterých nebyl endoglin detekován (Conley, 2000).

Solubilní endoglin a zároveň i von Willebrandův faktor byly zvýšeny v séru nemocných s aterosklerózou a korelovaly s celkovým cholesterolem (Blann, 1996). Solubilní endoglin byl zvýšen u nemocných s bolestí na hrudi, pozitivním zátěžovým testem a normálním koronarogramem, naopak u pacientů s rozsáhlým postižením koronárních tepen zvýšen nebyl. Nález naznačuje, že vzestup endoglinu provází časnou fázi aterosklerózy, zatímco hladiny endoglinu i TGF $\beta$  u pokročilé ischemické choroby srdeční byly sníženy, pravděpodobně následkem tvorby endoglin-TGF $\beta$  komplexů. Solubilní endoglin může tedy vést ke snížení hladin aktivního (na endoglin nevázaného) TGF $\beta$  (Li, C.G., 2000).

Dynamika hladin endoglinu u nemocných léčených LDL-aférou nebyla zatím v literatuře popsána.

### **3. VLASTNÍ PRÁCE**

Vlastní práce sestává ze dvou částí. **První**, převážně **technická část** se zabývá vyhodnocením technických parametrů procedur LDL-afézy, její účinnosti a bezpečnosti. **Druhá část** je věnována dynamice a vzájemným vztahům některých ukazatelů aktivity aterogeneze u nemocných léčených LDL-aférou.

#### **3.1. Cíle práce**

##### **I. Vyhodnotit některé technické parametry, účinnost a bezpečnost LDL-afézy**

- a) Vzhledem k nejednotnosti postupů při extrakorporální eliminaci LDL-cholesterolu na jednotlivých pracovištích bylo cílem **zhodnotit vlastní modifikaci LDL-afézy** z hlediska délky trvání léčby, intervalů mezi procedurami, technických parametrů, jako jsou objemy zpracované plazmy, průtoky krve a plazmy přístroji, spotřeba roztoku citrátu atd.
- b) Zhodnotit **vliv LDL-afézy na hladiny lipoproteinů, na parametry krevního obrazu a některé další biochemické ukazatele**
- c) Vyhodnotit **výskyt a závažnost vedlejších reakcí a nežádoucích účinků**
- d) Vzhledem k nedostatku literárních údajů pojednávajících o vlastnostech kolon LDL-Lipopak vyhodnotit dlouhodobou **efektivitu a selektivitu těchto kolon** a některé jejich mechanické vlastnosti

##### **II. Posoudit dynamiku a vzájemné vztahy některých ukazatelů aktivity aterogeneze:**

- a) Změny hladin **selektinových adhezních molekul a MCP-1** a jejich vztahy k některým dalším vybraným parametrům u nemocných léčených LDL-aférou
- b) Změny **močového neopterinu a mikroalbuminurie** a jejich vztahy k některým dalším vybraným parametrům u nemocných léčených LDL-aférou
- c) Změny **sérového CRP, neopterinu, solubilního CD40L a endoglinu** a jejich vztahy k některým dalším vybraným parametrům u nemocných léčených LDL-aférou

Sledování souboru bylo postupně rozšiřováno o další parametry podle vývoje literárních dat a sběr vzorků byl proveden v časových odstupech v blocích, které odpovídají jednotlivým kapitolám. V některých případech byla k ověření reprodukovatelnosti výsledků provedena vyšetření týchž parametrů v určitém časovém intervalu od předchozích a nastalé změny vzájemně porovnány. Různé parametry vyšetřované v rámci různých kapitol však nelze vzhledem k časovému odstupu mezi sebou porovnávat nebo jejich srovnání může mít pouze ilustrativní význam. Ze stejného důvodu má každá kapitola také vlastní kontrolní soubor.

### **3.2. Soubor nemocných léčených LDL-aferezou**

#### **3.2.1. Soubor nemocných léčených LDL-imunoadsorpcí**

Vyšetřovaný soubor tvořilo celkem devět pacientů, pět mužů a čtyři ženy s těžkou familiární hyperlipidemií, léčených LDL-aferezou na principu imunoadsorpce. Jejich průměrný věk byl v době vyhodnocování výsledků, tedy při dovršení 1000. LDL-aferezy  $48 \pm 16$  let, rozmezí 19 – 61 let, medián 57 let. Pět pacientů mělo čistou hypercholesterolemii, jednalo se o homozygoty FH nebo heterozygoty s těžkou formou FH. Čtyři nemocní měli kromě zvýšeného cholesterolu také zvýšené triacylglyceridy – dva z nich výrazně, jednalo se o nemocné s těžkou formou familiární kombinované hypercholesterolemie, dva mírně a nepravidelně, šlo o heterozygoty familiární hypercholesterolemie. Pět nemocných mělo též zvýšený Lp(a). Průměrný BMI byl  $26,4 \pm 5,5$ , rozmezí 18,3 - 32,4, medián 28,4. Dvě pacientky (homozygoti FH, označené v Tabulce 2 čísly 5 a 8) měly v úvodu léčby šlachové xantomy, které během léčby vymizely, dva jiní pacienti měli xantelasmata očních víček. Konzervativní léčba dietou, režimová opatření i medikamentózní terapie u těchto nemocných selhala a dlouhodobá pravidelná extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu byla nutná k prevenci další progresse aterosklerotických lézí. Osm nemocných bylo léčeno statiny, jeden v kombinaci s fibrátem, dva pacienti v kombinaci s pryskyřicemi vážícími žlučové kyseliny. Jeden nemocný byl léčen pouze fibrátem. Klinická data nemocných jsou uvedena v Tabulce 2. Všichni nemocní byli nekuřáci. Jeden muž s nízkou úrovní spolupráce (č.9 v Tabulce 2) podstupoval procedury v delších a nepravidelných časových intervalech, proto byl z některých hodnocení vyloučen. Jde o nemocného s metabolickým syndromem X a recidivujícími akutními pankreatitidami.

Tabulka 2. Klinická charakteristika nemocných léčených LDL-imunoadsorpcí

Pacient číslo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pohlaví	M	M	M	M	F	F	F	F	M
Věk (v letech)	61	56	61	38	19	58	60	26	57
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
Arteriální hypertenze	0	+	0	0	0	0	+	0	+
Diabetes mellitus	0	+	0	0	0	0	0	0	+
ICHS	0	+	0	+	0	+	0	0	0
Ischemická CMP	0	0	+	0	0	0	0	0	0
ICHDK	0	0	+	0	0	0	+	0	0
Ateroskleróza	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*M = muž, F = žena, TAG = triacylglyceridy, BMI = body mass index, ICHS = ischemická choroba srdeční, Ischemická CMP = ischemická cévní mozková příhoda, ICHDK = ischemická choroba dolních končetin*

### 3.2.2. Soubor nemocných léčených LDL-imunoadsorpcí nebo filtrační metodou

Počet nemocných léčených imunoadsorpcí je z důvodu vzácného výskytu homozygotních forem FH a také vzhledem k finanční nákladnosti léčby (pořizovací cena imunoadsorpčních kolon, cena výkonů) limitován. Soubor nemocných byl ještě dále redukován vyloučením pacienta s nízkou úrovní spolupráce. Statistické hodnocení parametrů takového souboru je problematické. Za účelem rozšíření vyšetřovaného souboru jsme zařadili po zavedení další velmi účinné metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu – filtrační metody, zvané též frakcionace plazmy – i nemocné léčené touto metodou. Nemocní byli vyšetřováni až po dosažení stabilizovaného stavu metabolismu lipidů opakovanými procedurami.

Tento rozšířený soubor tvořilo 10 pacientů dlouhodobě léčených extrakorporální eliminací LDL-cholesterolu, 6 mužů a 4 ženy s těžkou familiární poruchou metabolismu lipidů, 8 z nich bylo léčeno metodou imunoadsorpce (nemocní 1 – 8 v Tabulce 2), zbylí 2 muži s těžkou heterozygotní formou FH (věk 23 a 40 let, BMI 23,7 a 27,0, oba bez elevace triacylglyceridů a s prokázaným aterosklerotickým postižením karotid) byli léčeni pomocí filtrační metody. Mladší z nich je bratrem homozygotní pacientky označené č. 5 v Tabulce 2. Průměrný věk nemocných byl  $44 \pm 17$  let (19 - 61), medián 48 let. Sedm nemocných mělo čistou hypercholesterolemii, jednalo se o homozygoty (č. 5 a 8 v Tabulce 2) nebo



heterozygoty familiární hypercholesterolemie. Tři nemocní měli zvýšený jak cholesterol, tak triacylglyceridy, jednalo se v jednom případě o těžkou formu familiární kombinované hyperlipidemie a ve dvou případech o heterozygoty familiární hypercholesterolemie s elevací triacylglyceridů v době vyšetření. Pět nemocných mělo zvýšený Lp(a). Průměrný BMI byl  $26,0 \pm 5,3$ , rozmezí 18,3 - 32,5, medián 25,4. Všichni pacienti měli prokázané aterosklerotické postižení. Kromě stavů, uvedených v Tabulce 2, nemocní netrpěli jinými chorobami. Choroby a stavy, o kterých je známo, že zvyšují koncentrace ukazatelů zánětu, jako jsou akutní infekce a jiné akutní poruchy, chronické zánětlivé a autoimunitní choroby a maligní onemocnění, byly vyloučeny. Pacienti neměli v anamnéze renální chorobu, neprodělali infekci močových cest minimálně 3 měsíce před sběrem vzorků k vyšetření močového neopterinu a mikroalbuminurie, a neměli v této době patologické výsledky vyšetření moči chemicky a močového sedimentu. Všichni nemocní byli léčeni statiny, jeden v kombinaci s fibrátem, dva nemocní v kombinaci s pryskyřicemi vázícími žlučové kyseliny.

Tento soubor nemocných byl užit v kapitole 3.5.2.2. *Močový neopterin a mikroalbuminurie u nemocných léčených LDL-aférou* a kapitole 3.5.2.3. *C-reaktivní protein, CD40 ligand, sérový neopterin a endoglin u nemocných léčených LDL-aférou*.

K extrakorporální eliminaci LDL-cholesterolu byli všichni nemocní vybíráni specialisty na problematiku dyslipidemií Kliniky gerontologické a metabolické Fakultní nemocnice Hradec Králové a Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) Praha. Při výběru nemocných vycházeli indikující odborníci z doporučení, která jsou zmíněna v kapitole 2.1.3. *Indikace k léčbě LDL-aférou a její další možné využití* a z doporučení, která byla formulována pro podmínky Fakultní nemocnice Hradec Králové a České republiky Bláhou V., 2001. Následovalo komplexní zhodnocení individuálního stavu nemocných a schválení léčby LDL-aférou indikační komisí České společnosti pro aterosklerózu a po té jednání se zdravotními pojišťovnami. Teprve po jejich souhlasu byly u některých nemocných testovány prosté plazmaferézy, a poté byla zahájena LDL-aféza.

**Indikační komise zohledňovala následující výběrová kritéria (Bláha V., 2001):**

1. Přetrvávající hypercholesterolemie i při plné dietní a farmakologické terapii
2. Očekávaný zisk ze snížení cholesterolemie ve vztahu k ICHS
3. Dodržování dietních a režimových opatření pacienty, nekuřáctví
4. Technické předpoklady – možnost pravidelného dojíždění, ochotu nemocného spolupracovat apod.

**Podle pořadí důležitosti byli léčeni:**

1. Homozygoti FH (jednoznačná a nepochybná indikace)
2. Nemocní s hypercholesterolemií neovlivnitelnou plnou dietní a farmakologickou terapií, zejména v případech:
  - a) koronární aterosklerózy, neřešitelné kardiologicky, případně metodami invazivní kardiologie (angioplastika)
  - b) nemocní po kardiologické nebo invazivně kardiologické intervenci, u nichž trvá vysoká hladina cholesterolu i při maximální konzervativní léčbě a je vysoké riziko progresu aterosklerotických změn nebo restenózy v intervenované oblasti

**3.3. Kontrolní soubory**

Za účelem získání normálních hodnot sledovaných parametrů byli vyšetřováni zdraví dobrovolníci. Způsob odběru vzorků a použité analytické metody byly shodné s metodami užitými u souboru nemocných. Z výše uvedených důvodů je u každé kapitoly hodnocen vlastní kontrolní soubor. Rozsah souboru nemocných i souborů kontrolních byl z technických důvodů omezen a význam porovnávání vyšetřovaných parametrů obou souborů je pouze informativní.

**3.3.1. Kontrolní soubor užitý v kapitole *Selektivní adhezni molekuly a monocytární chemotaktický protein-1 u nemocných léčených LDL-aférou*** tvořilo 10 zdravých jedinců bez známé poruchy lipidového metabolismu, 6 mužů a 4 ženy s průměrným věkem  $47 \pm 10$  (24 – 62), medián 55 let.

**3.3.2. Kontrolní soubor užitý v kapitole *Močový neopterin a mikroalbuminurie u nemocných léčených LDL-aférou*** tvořilo 13 zdravých jedinců, 7 mužů a 6 žen bez známé poruchy lipidového metabolismu. Jejich průměrný věk byl  $47 \pm 11$  (25 – 61), medián 46 let. Byly odebrány vzorky první ranní moči.

**3.3.3. Kontrolní soubor užitý v kapitole *C-reaktivní protein, CD40 ligand, sérový neopterin a endoglin u nemocných léčených LDL-aférou*** tvořilo 10 zdravých jedinců bez známé poruchy lipidového metabolismu, 6 mužů a 4 ženy s věkovým průměrem  $46 \pm 9$  (25 - 60), medián 47 let.

Kontrolní soubory se od souboru nemocných statisticky signifikantně nelišily věkem ani zastoupením obou pohlaví.

### **3.4. Materiál a metody**

#### **3.4.1. Metody extrakorporální eliminace cholesterolu na našem pracovišti**

Jako první byla k léčbě familiárních poruch lipidového metabolismu na našem pracovišti zavedena plazmaferéza, a to od konce 70. let. Od roku 1996 je prováděna imunoadsorpce LDL-cholesterolu kolonami LDL-Lipopak (Pocard, Moskva, Rusko). V roce 2003 byla na našem pracovišti zavedena filtrace pomocí filtrů Evaflux 4A a 5A (Kuraray, Osaka, Japonsko).

**Tato práce je věnována LDL-aféřeze v užším smyslu slova, tedy imunoadsorpci LDL-cholesterolu, ke které se bude (až na některé výjimky) vztahovat další text.**

Pracovní postupy užívané při LDL-aféřeze se mezi jednotlivými pracovišti liší a každé centrum má zavedenu „**vlastní modifikaci LDL-aféřezy**“. Rozdíly spočívají v mnoha technických odlišnostech:

- průtoky krve a plazmy přístroji, množství zpracované plazmy a z toho plynoucí i různá celková délka procedur
- množství zpracované plazmy kolonami při jednotlivých adsorpčních cyklech (v našem případě je objem plazmy určován pomocí originálního počítačového programu vyvinutého na základě našich zkušeností a výsledků ve spolupráci s Katedrou lékařské biofyziky Lékařské fakulty v Hradci Králové. Jde o výsledek výzkumného úkolu IGA MZ ČR NR/7006-3, jehož byla autorka spoluřešitelkou)
- intervaly mezi jednotlivými LDL-aférezami
- způsob promývání kolon regeneračními roztoky při desorpci
- způsob aplikace a dávkování antikoagulace
- přístrojové vybavení a užití různých typů imunoadsorpčních kolon na jednotlivých pracovištích

Naším výzkumným týmem bylo vyvinuto originální zařízení k odvádění vzduchu z kolon, které bylo patentováno jako vynález (viz níže).

##### **3.4.1.1. Imunoadsorpce LDL-cholesterolu**

Od května 1996 do října 2004 bylo na našem pracovišti provedeno 1000 LDL-aférez metodou imunoadsorpce celkem u 9 pacientů. Pacientova plazma byla oddělena od krevních tělísek pomocí separátoru s kontinuálním průtokem Cobe Spectra (COBE BCT inc., Denver, CO, USA), pracujícím na principu centrifugace. Byl užíván program verze 7.0 a separační sety č. 777-005-000 stejné firmy. Plazma byla vedena do adsorpčně - desorpčního automatu

ADA nebo ADA<sub>orb</sub> (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který řídí střídavé plnění (adsorpci) a promývání (regeneraci, desorpci) dvou imunoadsorpčních kolon LDL-Lipopak (Pocard Ltd., Moskva, Rusko) – viz. *Obrázek 1*. Kolony obsahují na sefarózový gel navázané polyklonální ovčí protilátky proti lidskému apoB<sub>100</sub> (viz *Obrázek 2*). Při průchodu kolonou jsou z plazmy odstraňovány LDL-částice a očištěná plazma se po spojení s krevními tělísky vrací zpět do oběhu pacienta. Když je kapacita kolony vyčerpána, adsorpčně-desorpční automat odkloní tok plazmy do druhé kolony a zároveň zahájí regeneraci první kolony roztokem glycinového pufru o pH 2,4 (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který uvolňuje vazbu mezi protilátkami a apoB<sub>100</sub> (viz *Obrázek 3*). Následně je pH v koloně upraveno roztokem PBS pufru o pH 7,4 (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který je po té odstraněn pomocí fyziologického roztoku. V automatu tak současně jednou kolonou prochází plazma a druhá kolona je regenerována. Toto sekvenční použití adsorpce a desorpce vede k teoreticky neomezené kapacitě systému, což má výhodu v možnosti nastavení délky procedury podle individuálních potřeb pacienta. Základem pro volbu délky LDL-afézy byla vstupní hodnota celkového a LDL-cholesterolu. Cílová hodnota celkového cholesterolu po ukončení LDL-afézy byla pod 2 mmol/l. Každý nemocný měl svůj vlastní pár kolon, které jsou určeny k mnohonásobnému použití. Mezi jednotlivými LDL-afézami byly regenerované kolony skladovány při teplotě 2-8°C, naplněny roztokem PBS pufru s příměsí 0,01% azidu sodného (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který byl před dalším užitím zcela odstraněn fyziologickým roztokem (5000 ml F 1/1 na každou kolonu). Vzhledem k toxicitě azidu sodného je na našem pracovišti zvykem pozvat nemocného k zahájení LDL-afézy až po dokončení procesu vymývání roztoku azidu sodného. Rovněž po ukončení terapie byly kolony opět plněny PBS pufrem s příměsí azidu sodného až po odchodu nemocného z oddělení.

U všech nemocných jsme užívali dva periferní venózní vstupy. K antikoagulaci byl použit heparin (Heparin Léčiva inj., Česká republika), podaný v úvodu formou jednorázové dávky 2500 j. i.v. a následně kontinuální intravenózní infuzí 50 j./min. s postupným snižováním dávky od poloviny LDL-afézy až následným vysazením heparinu) a roztok citrátu ACD-A (500ml roztoku obsahuje: kyselina citrónová 4,0 g, citrát sodný 11,0 g, glukóza 12,25 g; výrobce Baxter S.A., Lassines, Belgie), který byl kontinuálně přidáván k plné krvi z přívodné žíly.

### **3.4.1.2. Filtrační metoda**

Vzhledem k obdobné efektivitě eliminace LDL-cholesterolu metodou filtrace a za účelem rozšíření doposud značně limitovaného počtu vyšetřovaných subjektů byli do souboru nemocných zmiňovaných v kapitole 3.5.2.2. *Neopterin v moči a mikroalbuminurie u nemocných léčených LDL-aférou* a v kapitole 3.5.2.3. *C-reaktivní protein, CD40 ligand, sérový neopterin a endoglin u nemocných léčených LDL-aférou* zařazeni i dva nemocní léčení touto metodou. Plazma byla od krevních tělísek oddělena stejně jako u imunoadsorpce, a to pomocí separátoru Cobe-Spectra (COBE, BCT, Denver, CO, USA), vlastní eliminace LDL-částic byla provedena na principu filtrace částic podle jejich velikosti pomocí filtrů Evaflux 4A (Kuraray Co., Osaka, Japonsko), určených k jednorázovému použití. Vlastní filtrační membrány o celkovém povrchu 2 m<sup>2</sup> byly vyrobeny z kopolymeru ethylenu a vinylalkoholu a uspořádány do formy kapilár o vnitřním průměru 175 µm a průměru pórů 0,03 µm. Kapiláry jsou uzavřeny v obalu z polykarbonátové pryskyřice. Schéma celého zařízení, užívaného při filtraci, je znázorněno na *Obrázku 4*, princip eliminace částic filtrací je vysvětlen na *Obrázku 5*. Filtrace byla řízena přístrojem CF 100 (Infomed, Ženeva, Švýcarsko). Cílová hodnota celkového cholesterolu byla stejná jako u imunoadsorpce – 2 mmol/l. Antikoagulace byla zajištěna kontinuálním podáním roztoku citrátu (ACD-A v poměru 1:22 ke krvi z přívodné žíly stejným způsobem, jako u imunoadsorpce) a dále úvodním jednorázovým intravenózním podáním 4000 j. heparinu bez následné kontinuální infuze.

### **3.4.2. Klinické sledování nemocných během LDL-aférou**

Během LDL-aférou byl sledován klinický stav nemocných včetně měření arteriálního krevního tlaku měřeného auskultační metodou, měření pulsu a dechové frekvence. Tyto údaje, dále nežádoucí účinky LDL-aférou a jejich léčba byly zaznamenávány ošetřujícím personálem Separátorového centra do Protokolu o LDL-aférou. K hodnocení vztahu některých parametrů ke krevnímu tlaku byla systolická a diastolická hodnota krevního tlaku stanovena jako průměr ze tří měření auskultační metodou před třemi po sobě následujícími LDL-aféroumi, a to v klidovém stavu (po desetiminutovém odpočinku) na pravé paži. *Body mass index* (BMI) byl vypočítán podle vzorce:  $BMI = \text{váha} / \text{výška}^2$  (kg/m<sup>2</sup>).

### **3.4.3. Metody užití k hodnocení eliminace vyšetřovaných substancí kolonami nebo filtry**

Ke zhodnocení eliminace vyšetřovaných molekul imunoadsorpčními kolonami nebo filtry byly provedeny dva experimenty:

1. Stanovení rozdílů hladin vyšetřovaných parametrů v plazmě přitékající do kolony a v plazmě z kolony vytékající, a to v první polovině prvního adsorpčního cyklu každé kolony (modré šipky na Obrázku 1), u filtrační metody byly stanoveny hladiny vyšetřovaných parametrů před a za filtrem (modré šipky na Obrázku 4).

V případě vyšetření eliminace **selektinů a MCP-1** imunoadsorpčními kolonami byly jedenkrát vyšetřeny obě kolony u devíti nemocných (celkem 18 kolon).

V případě vyšetření eliminace **C-reaktivního proteinu, solubilního CD40 ligandu, sérového neopterinu a solubilního endoglinu** imunoadsorpčními kolonami byly jedenkrát vyšetřeny obě kolony u 8 nemocných (celkově 16 kolon) a k vyšetření filtrace těchto molekul byly užity 4 filtry Evaflex 4A u 4 nemocných.

2. Druhým experimentem bylo stanovení koncentrací sledovaných molekul ve vymývacím roztoku kolon uprostřed regeneračního cyklu. Metoda byla užita v případě selektinů a MCP-1 u 18 kolon.

Ke stanovení koncentrací byly užity laboratorní metody popsané níže, jako materiál byla užita ve všech případech plazma.

#### **3.4.4. Laboratorní vyšetření**

##### **3.4.4.1. Základní laboratorní ukazatele**

Před každou LDL-aférou a ihned po ní bylo provedeno vyšetření sérových hladin celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu, HDL-cholesterolu a triacylglyceridů. Od roku 2000 jsme pravidelně v intervalu tří měsíců mimo jiné vyšetřovali sérový Lp(a), sérové hladiny transamináz, celkovou bílkovinu, albumin, krevní obraz a viskozitu plazmy. Hladina LDL-cholesterolu byla kalkulována podle Friedwaldovy rovnice a v posledních dvou letech stanovována přímou fotometrickou enzymovou metodou. Non-HDL-cholesterol byl kalkulován jako rozdíl mezi koncentrací celkového cholesterolu a HDL-cholesterolu. Ke stanovení biochemických ukazatelů byly užity sety a analyzátor firmy Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Německo). Hemoglobin byl měřen fotometrickou metodou, počet leukocytů pomocí průtokové cytometrie a počet trombocytů impedanční metodou přístrojem Sysmex SE-210 (Sysmex, Kobe, Japonsko). Vyšetření byla provedena akreditovanými laboratořemi Ústavu klinické biochemie a diagnostiky a Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Hradec Králové.

U nemocných s těžkou dyslipidemií není vždy možné přesné laboratorní stanovení některých parametrů, zvláště LDL-cholesterolu a Lp(a). Důvodem jsou jejich abnormální

hladiny v krvi. Procedury s nehodnotitelným laboratorním výsledkem příslušného parametru byly ze souboru vyloučeny. Při hodnocení velikostí poklesu jednotlivých parametrů bylo vyloučeno též prvních 5 LDL-aferez u každého páru kolon, protože bylo zpracováno nestandardně malé množství plazmy.

#### **3.4.4.2. Analýza solubilního P- a E-selektinu a monocytárního chemotaktického proteinu-1 v plazmě**

Vzorky plazmy ke stanovení hladin sP-, sE-selektinu a MCP-1 byly ihned po odběru zmrazeny a uchovávány při teplotě -40°C. K detekci byla užitá metoda ELISA, komerční sety Parameter human sP-selectin (normální plazmatické hodnoty 51,0 - 113,0 µg/l), Parameter human sE-selectin (normální plazmatické hodnoty 29,1 - 63,4 µg/l) a Quantikine human MCP-1 (normální plazmatické hodnoty 200,0 - 722,0 pg/l) firmy RDS (Mineapolis, MN, USA). Vyšetření byla provedena akreditovanou laboratoří Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Hradec Králové.

#### **3.4.4.3. Analýza neopterinu, albuminu a kreatininu v moči**

Moč k vyšetření neopterinu, albuminu a kreatininu byla po odběru chráněna před světlem a zmrazena na teplotu -20°C. Neopterin v moči byl analyzován pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie, systém Hewlett-Packard (Palo Alto, USA). Pro detekci neopterinu v moči byla využita jeho nativní fluorescence, MPF-3 detektor Perkin-Elmer (Norwalk, USA), excitační vlnová délka 353 nm, emisní vlnová délka 438 nm. Pro kvantitativní stanovení bylo užito externího standardu. Koncentrace neopterinu v moči byla vyjádřena jako index neopterin/kreatinin (µmol/mol kreatininu). Kreatinin v moči byl stanoven v tom samém vzorku moči Jaffého kinetickou reakcí pomocí analyzátoru Hitachi 716 (Tokyo, Japonsko) a enzymatického setu (Boehringer, Mannheim, Německo) podle instrukcí výrobce. Albumin v moči byl stanoven pomocí komerčního setu Polyclonal Rabbit Anti-human Albumin kit (DakoCytomation, Glostrup, Dánsko). Koncentrace albuminu v moči byla vyjádřena jako index albumin/kreatinin (mg/mmol). Vyšetření byla provedena akreditovanou laboratoří Kliniky gerontologické a metabolické a Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové.

#### **3.4.4.4. Analýza některých ukazatelů stavu hemostázy a aktivity endotelu**

Vzorky ke stanovení následujících parametrů bylo odebrány ráno těsně před a ihned po LDL-aféřeze a odstředěná plazma zamrazena na teplotu -80°C. K detekci bylo užito imunochemických metod za pomoci komerčních setů firmy Roche Diagnostics GmbH

(Mannheim, Německo). Koncentrace inhibitoru aktivátoru plazminogenu-1 byla stanovena pomocí setu Asserachrom PAI-1<sup>®</sup>, koncentrace tkáňového aktivátoru plazminogenu pomocí setu Asserachrom t-PA<sup>®</sup>, koncentrace trombomodulinu pomocí setu Asserachrom Thrombomodulin<sup>®</sup>. Ke stanovení antigenu von Willebrandova faktoru (vWFag) byl užit set STA LIAtest vWF<sup>®</sup>. Koncentrace fibrinogenu byla stanovena koagulační metodou podle Clause. Vyšetření byla provedena akreditovanou laboratoří Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Hradec Králové.

#### **3.4.4.5. Analýza CRP, solubilního CD40L, neopterinu a solubilního endoglinu v séru**

Vzorky ke stanovení těchto parametrů byly odebrány ráno před a ihned po LDL-aferéze a zmrazeny na teplotu -40°C. Detekce jejich hladin byla provedena metodou ELISA s použitím komerčních setů IMMULITE High Sensitivity CRP (DPC, Los Angeles, CA, USA), Quantikine<sup>®</sup> human sCD40 Ligand, Quantikine<sup>®</sup> human Endoglin (RDS, Minneapolis, MN, USA) a Neopterin (B.R.A.H.M.S., Hennigsdorf, Německo). Vyšetření byla provedena akreditovanou laboratoří Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Hradec Králové. Normální hodnoty sCD40L v séru zdravých dospělých osob je 5 461 ng/l, rozmezí hodnot 0 - 11451 ng/l, neopterinu  $5,4 \pm 2,3$  nmol/l, horní limit normy je 10 nmol/l a sérového solubilního endoglinu je  $3,96 \pm 0,92$  µg/l, rozmezí 2,54 – 7,06 µg/l.

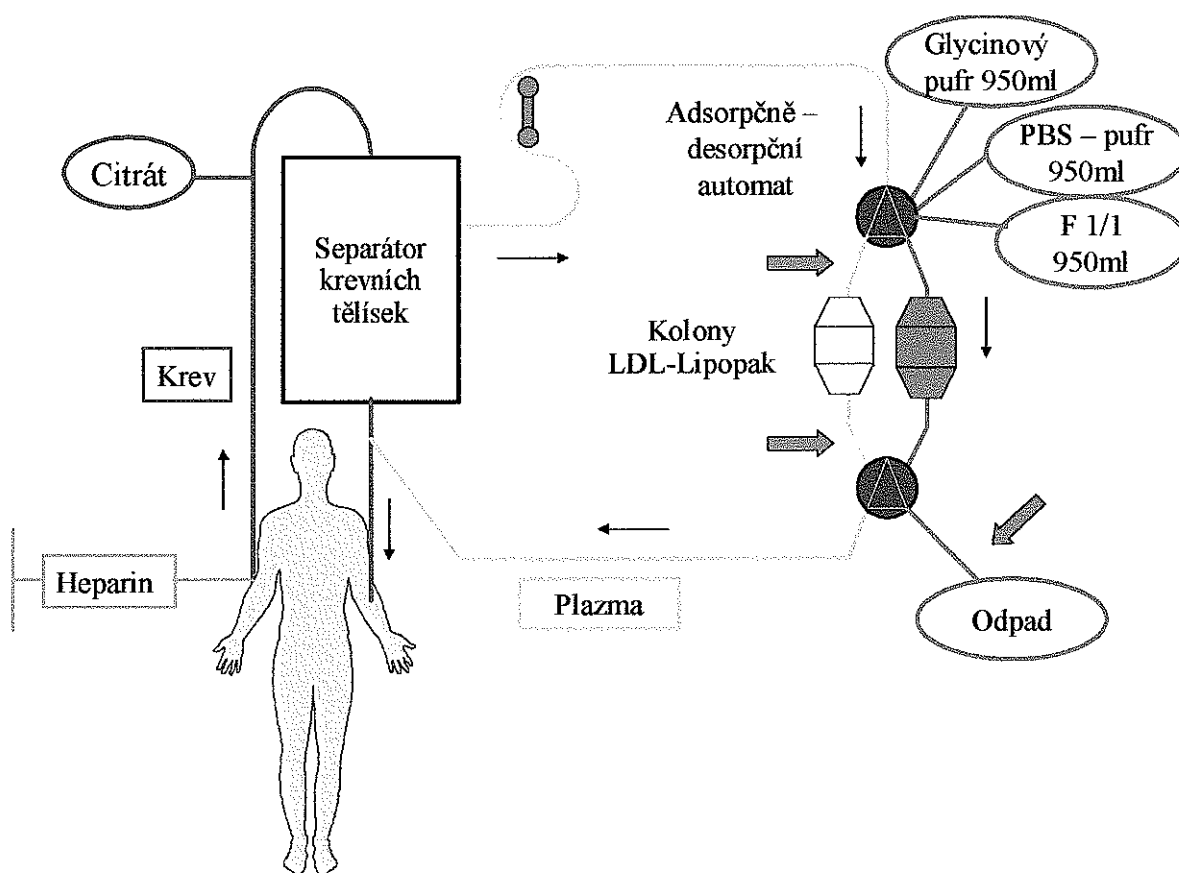
#### **3.4.5. Statistická analýza**

Byl užit program SigmaStat for Windows, verze 3.0 (SPSS Inc., San Rafael, USA). Vzhledem k variabilitě hodnot proměnných byl za určující parametr zvolen medián. Ke statistickému hodnocení byly užity neparametrické testy. K porovnání rozdílů mezi hodnotami stejného parametru před a po LDL-aferéze nebo před a po průchodu plazmy imunoabsorpční kolonou byl užit Wilcoxonův test. Ke zjištění vztahu mezi proměnnými jsme použili Spearmanův koeficient pořadové korelace ( $r_s$ ). Mann-Whitney Rank Sum test byl užit k testování rozdílů mezi dvěma soubory, v našem případě souborem nemocných a kontrolním souborem. Hodnota  $p < 0,05$  byla považována za statisticky signifikantní. Pro testování závislosti jedné proměnné na druhé (například závislosti hodnot laboratorních parametrů na věku nemocných nebo efektivity a selektivity imunoabsorpčních kolon na počtu procedur provedených jednotlivým párem kolon) jsme použili regresní analýzu (lineární regresi). Statistické postupy byly konzultovány s pracovníky Katedry lékařské biofyziky Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

**3.4.6. Grafická zobrazení** byla provedena pomocí programu Microsoft Excel a Microsoft PowerPoint (Microsoft Corporation).

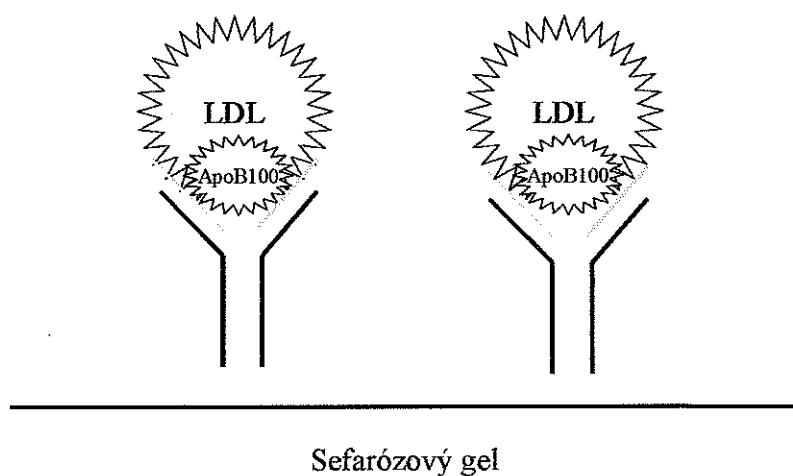


Obrázek 1. Schéma imunoadsorpce LDL-cholesterolu



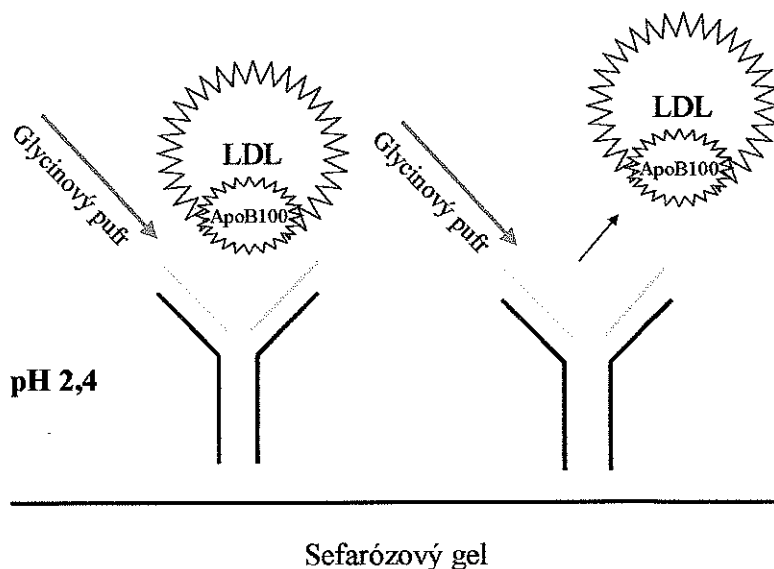
Krev je vedena z periferního žilního vstupu zajištěného speciální jehlou (obvykle 1,6mm – 6G) do separátoru s kontinuálním průtokem Cobe Spectra (COBE, BCT, Denver, USA), který odděluje plazmu od krevních tělísek na principu centrifugace. Plazma je dále čerpána do adsorpčně – desorpčního automatu ADA nebo ADAorb (Medicap, Ulrichstein, Německo), který řídí střídavé plnění (adsorpci) a vymývání (regeneraci, desorpci) dvou adsorpčních kolon LDL-Lipopak (Pocard Ltd., Moskva, Rusko). Jedna kolona je tedy zapojena v pracovním cyklu (znázorněna žlutou barvou) a druhá kolona (znázorněna zelenou barvou) je regenerována pomocí glycinového pufru o pH 2,4. Následně je pH v regenerované koloně upraveno PBS pufr, který je po té vymyt fyziologickým roztokem. Regenerační roztoky jsou vedeny do odpadu. Očištěná plazma vytékající z pracovní kolony je vedena zpět do separátoru, odkud je po smísení s krevními tělísky vracena do periferní žíly nemocného (opět obvykle 1,6mm – 6G). Každá z páru kolon podstoupí cyklus adsorpce a regenerace zpravidla dvakrát. Antikoagulace je zajištěna kontinuálním podáváním roztoku citrátu (ACD-A, Baxter, Belgie) a iniciálním podáním 2500 j. heparinu i.v. s následnou kontinuální infuzí heparinu 50j./min. i.v. s postupným snižováním dávky od poloviny LDL-afézy až vysazením heparinu. Modré šipky označují místa odběrů plazmy kurčení koncentrací sledovaných parametrů před a za kolonou, zelená šipka označuje místo odběru vymývacího roztoku.

Obrázek 2. Princip imunoadsorpce



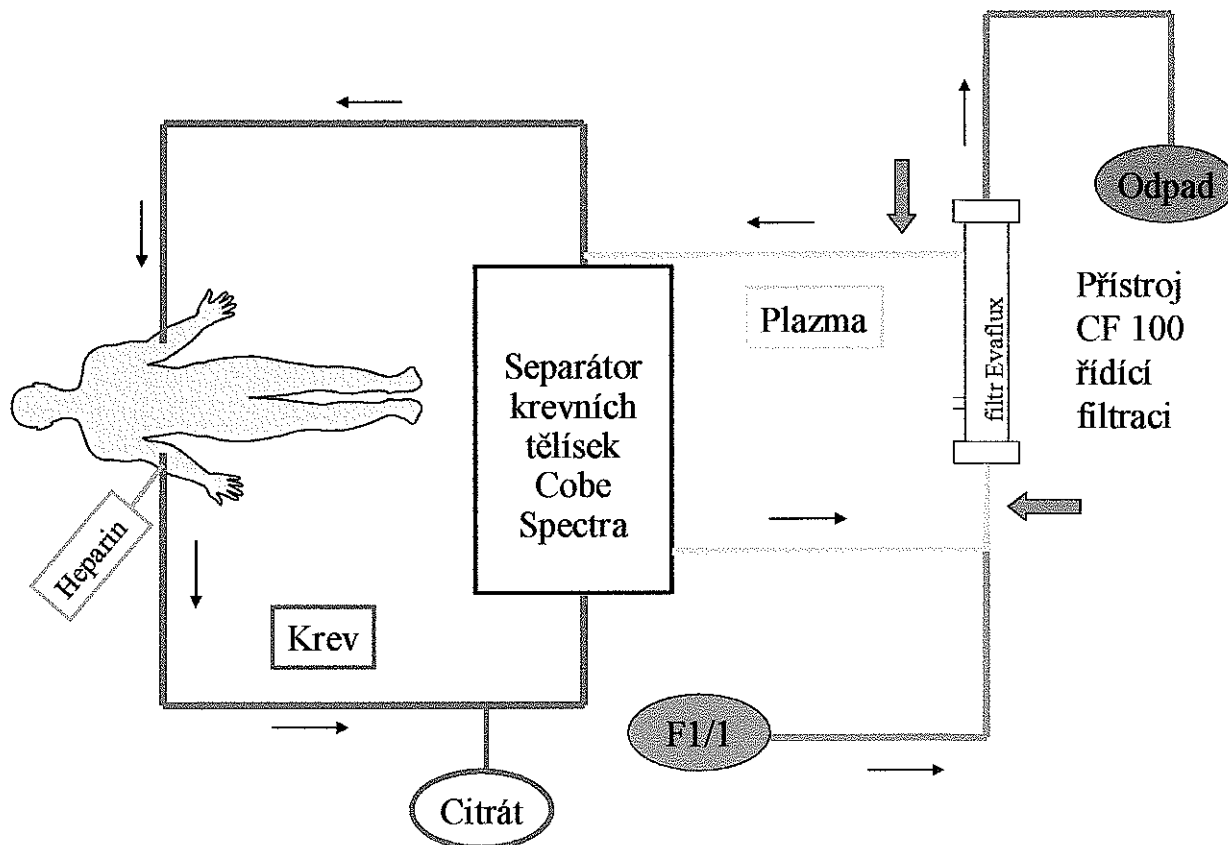
*LDL-částice jsou z plazmy procházející imunoadsorpční kolonou vázány prostřednictvím interakce mezi apoB100 a ovčimi protilátkami proti apoB100, navázanými na sefarózový gel.*

Obrázek 3. Princip regenerace kolon (desorpce)



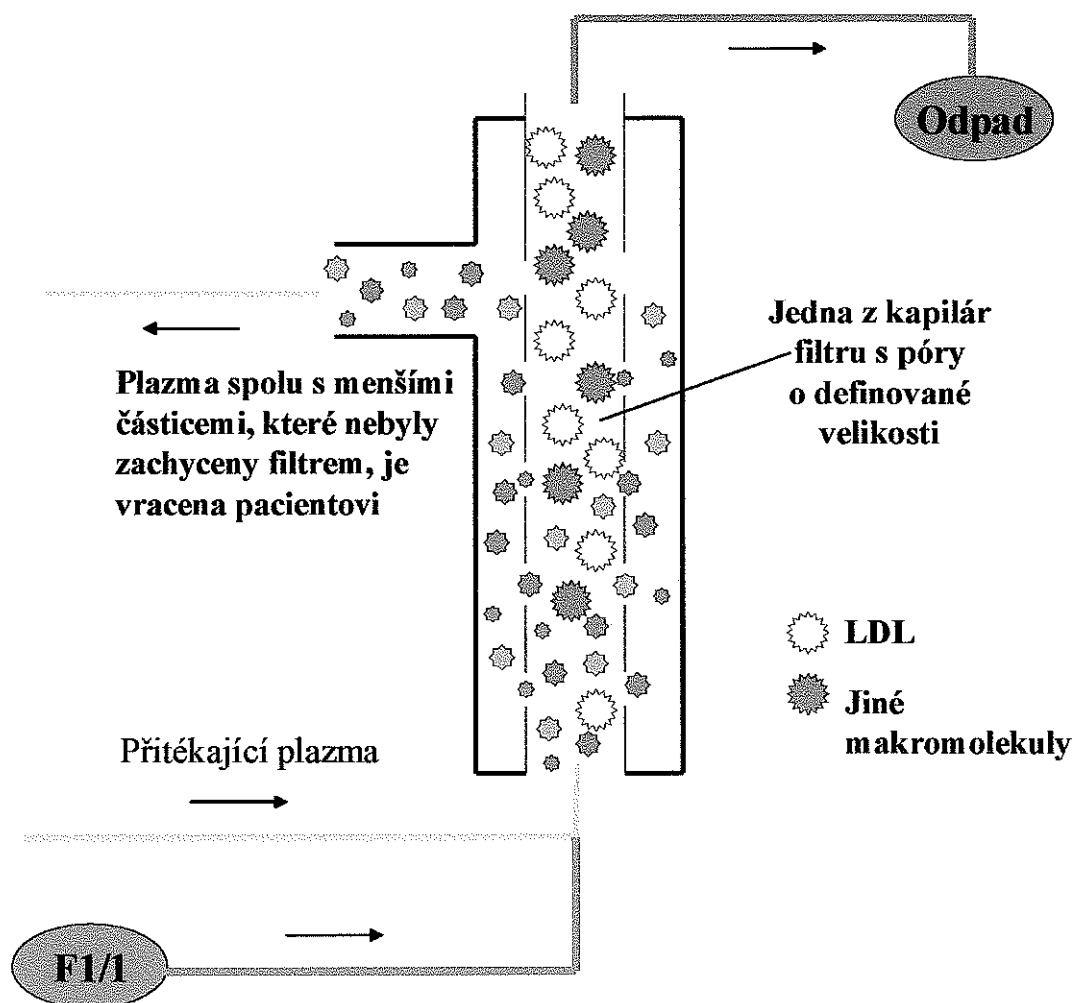
*Vazba LDL-částic na protilátky je uvolněna pomocí glycinového pufru. Následně je pH v koloně upraveno roztokem PBS pufru, který je po té vymyt pomocí fyziologického roztoku.*

Obrázek 4. Schéma filtrace LDL-cholesterolu



Plazma je oddělena od krevních tělísek stejným způsobem jako u imunoadsorpce (pomocí separátoru Cobe Spectra) a dále je vedena čerpadlem separátoru do linek přístroje CF100 (Infomed, Ženeva, Švýcarsko), který řídí průtok plazmy přes kapilární filtr Evaflex 4A nebo 5A (Kuraray, Osaka, Japonsko). Očištěná plazma je po spojení s krevními tělisky vedena zpět do krevního oběhu nemocného. Při známkách obstrukce kapilár filtru přístroj automaticky provede jejich proplach fyziologickým roztokem, který je spolu s odfiltrovanými částicemi odveden do odpadního sáčku. Antikoagulace je zajištěna kontinuální nitrožilní aplikací citrátu (ACD-A, Baxter, Belgie) a iničiálním jednorázovým podáním heparinu 4000 i.v. Místo odběru vzorku plazmy před a za filtrem je označeno modrými šipkami.

Obrázek 5. Princip filtrace LDL-částic



Plazma protéká kapilárami filtru Evaflux 4A (Kuraray, Osaka, Japonsko) o přesně definované velikosti pórů – 30 nm. Makromolekuly - LDL-částice (180-280 nm), fibrinogen, fibronectin, imunoglobuliny,  $\alpha$ -2 makroglobulin apod. jsou zachyceny v kapilárách a pomocí fyziologického roztoku, kterým jsou kapiláry proplachovány, odstraňovány do odpadu. Míra zachycování jednotlivých částic závisí na velikosti jejich molekuly a je přesně definována pomocí tzv. sieving koeficientů, které udávají podíl částic, které prochází póry filtru: Albumin 0,90, IgG 0,83, IgM 0,1, Fibrinogen 0,25, LDL 0,02, HDL 0,82 (data od výrobce filtrů Evaflux). Očištěná plazma je spolu s menšími částicemi, které póry procházejí, vracena pacientovi.

### **3.5. Výsledky**

#### **3.5.1. Technická část**

Technická část je rozdělena do tří částí. V **první části** je vyhodnoceno 1000 provedených LDL-aférz, a to z hlediska ryze **technických parametrů**, jako jsou objemy zpracované plazmy, průtoky krve a plazmy přístroji a spotřeba roztoku citrátu, dále je hodnocen **vliv LDL-aférzy na hladiny lipidů**, na parametry krevního obrazu a některé další biochemické ukazatele a je vyhodnocena **frekvence a závažnost vedlejších účinků** LDL-aférzy. **Druhá část** popisuje originální zařízení k odvádění vzduchu z imunoadsorpčních kolon. **Třetí část** pojednává o životnosti imunoadsorpčních kolon.

#### **3.5.1.1. Vyhodnocení 1000 provedených procedur LDL-aférzy**

##### **3.5.1.1.1. Vyhodnocení základních technických parametrů**

Od května 1996 do října 2004 bylo na našem pracovišti provedeno 1000 LDL-aférz celkem u 9 pacientů. Průměrná celková doba léčby LDL-aférzami ( $\pm$  směrodatná odchylka) byla  $2\,265 \pm 729$  dní, rozmezí 1 032 – 3 070 dní, medián 2 435 dní, tj. průměrně  $6,3 \pm 2,0$  let, rozmezí 2,9 - 8,5 let a medián 6,7 let. Počet LDL-aférz na jednoho pacienta byl  $111 \pm 58$ , rozmezí 47 - 223, medián 105. Průměrný interval mezi jednotlivými LDL-aférzami u všech 9 nemocných byl  $21 \pm 16$  dní, rozmezí 4 – 294 dní, medián 17 dní. Po vyloučení muže s nízkou úrovní spolupráce z vyšetřovaného souboru byl průměrný interval mezi LDL-aférzami  $18 \pm 9$  dní, rozmezí 4 – 91 dní, medián 17 dní. U homozygotů FH  $13 \pm 5$  dní, rozmezí 4 – 41 dní, medián 14 dní. Jedna LDL-aféza trvala průměrně  $230 \pm 33$  min., rozmezí 58 - 333, medián 229 min., tj.  $3,8 \pm 0,5$  hodin, rozmezí 1,0 - 5,6, medián 3,8 hodin. Průměrné absolutní množství zpracované plazmy při jedné LDL-aféze bylo  $6\,654 \pm 968$  ml, v rozmezí 1 200 – 8 734 ml, medián 7 000 ml. Průměrný objem zpracované plazmy na jeden kilogram váhy pacienta byl  $97 \pm 26$  ml/kg, rozmezí 15 - 156, medián 99 ml/kg. Průměrný průtok plazmy byl  $30,2 \pm 4,1$  ml/min, rozmezí 20,3 - 38,2, medián 4,5 ml/min. Průměrný průtok krve  $67,7 \pm 5,4$  ml/min., rozmezí 45 - 70, medián 70 ml/min. Poměr roztoku citrátu sodného (ACD-A) ke krvi byl 1:22. Průměrný průtok ACD-A byl  $3,1 \pm 0,3$  ml/min., rozmezí 2,1 - 3,2, medián 3,2 ml/min. Průměrná spotřeba ACD-A při jedné LDL-aféze byla  $697 \pm 118$  ml, rozmezí 220 – 1060 ml, medián 703 ml.

##### **3.5.1.1.2. Vliv LDL-aférzy na hladiny lipidů, na parametry krevního obrazu a některé další biochemické ukazatele**

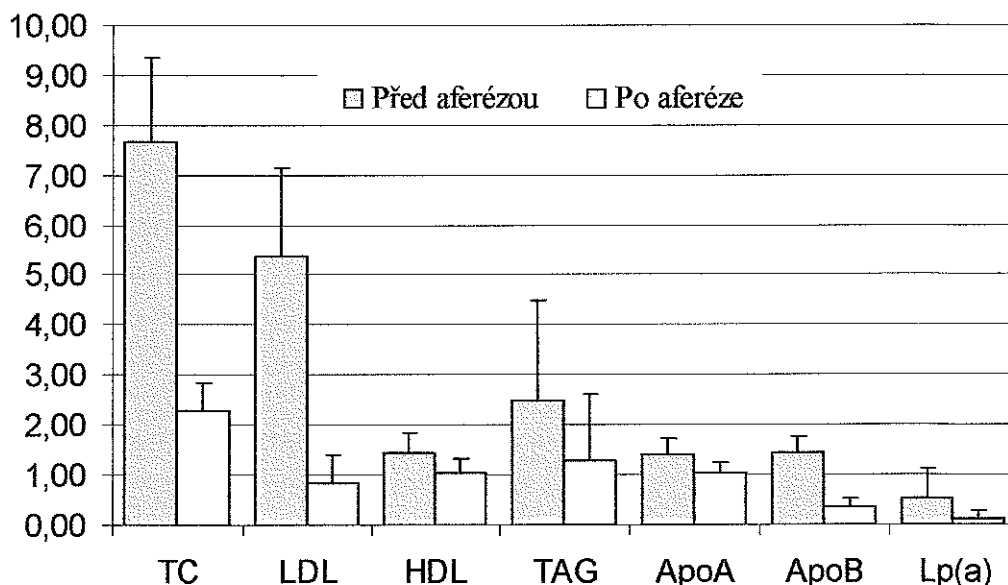
Hladiny lipidů a jejich součástí před a po LDL-aféréze jsou shrnuty v Tabulce 3, jejich pokles po LDL-aféréze, vyjádřený v procentech výchozí hodnoty je uveden v Tabulce 4, procentuální pokles ostatních parametrů je uveden v Tabulce 5.

**Tabulka 3. Hladiny lipidů před a po LDL-aféréze**

	Před LDL-aférézou			Po LDL-aféréze		
	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián
<b>TC</b>	7,67 ± 1,70	4,31 - 14,23	<b>7,49</b>	2,28 ± 0,59	1,09 - 5,91	<b>2,17</b>
<b>LDL</b>	5,38 ± 1,77	1,63 - 12,5	<b>5,29</b>	0,83 ± 0,57	0,00 - 4,72	<b>0,76</b>
<b>HDL</b>	1,44 ± 0,42	0,64 - 2,92	<b>1,43</b>	1,05 ± 0,29	0,29 - 2,10	<b>1,07</b>
<b>TAG</b>	2,47 ± 2,03	0,37 - 16,26	<b>1,70</b>	1,28 ± 1,35	0,10 - 7,30	<b>0,66</b>
<b>Non-HDL</b>	6,25 ± 1,75	2,54 - 12,80	<b>6,04</b>	1,25 ± 0,70	0,06 - 4,81	<b>1,10</b>
<b>ApoA</b>	1,40 ± 0,31	0,86 - 2,41	<b>1,34</b>	1,04 ± 0,22	0,59 - 1,86	<b>1,00</b>
<b>ApoB</b>	1,43 ± 0,34	0,86 - 2,43	<b>1,37</b>	0,35 ± 0,19	0,14 - 1,05	<b>0,32</b>
<b>Lp(a)</b>	0,52 ± 0,59	0,00 - 2,42	<b>0,33</b>	0,13 ± 0,16	0,00 - 0,87	<b>0,09</b>

TC = celkový cholesterol (mmol/l), LDL = LDL-cholesterol (mmol/l), HDL = HDL-cholesterol (mmol/l), TAG = triacylglyceridy (mmol/l). Non-HDL = non-HDL-cholesterol (mmol/l). ApoA = apolipoprotein A (g/l), ApoB = apolipoprotein B (g/l), Lp(a) = lipoprotein (a) (g/l). SD = směrodatná odchylka

**Graf 1. Průměrné hladiny lipidů a jejich součástí před a po LDL-aféréze**



TC = celkový cholesterol (mmol/l), LDL = LDL-cholesterol (mmol/l), HDL = HDL-cholesterol (mmol/l), TAG = triacylglyceridy (mmol/l). ApoA = apolipoprotein A (g/l), ApoB = apolipoprotein B (g/l), Lp(a) = lipoprotein (a) (g/l). Změny všech ukazatelů byly statisticky významné ( $p > 0,05$ ).

Tabulka 4. Pokles lipidů po LDL-aféze (v procentech výchozí hodnoty)

	Průměr ± SD (%)	Rozmezí (%)	Medián (%)	n
<b>TC</b>	69,6 ± 7,1	27,5 - 87,5	<b>70,0</b>	886
<b>LDL</b>	83,9 ± 8,4	35,5 - 97,7	<b>85,9</b>	786
<b>HDL</b>	26,4 ± 7,2	6,0 - 66,7	<b>26,2</b>	885
<b>TAG</b>	55,7 ± 19,3	1,4 - 91,0	<b>59,3</b>	885
<b>Non-HDL</b>	80,1 ± 9,6	30,1 - 98,6	<b>81,1</b>	885
<b>Apo-A</b>	25,6 ± 7,5	2,5 - 62,9	<b>24,1</b>	134
<b>Apo-B</b>	75,2 ± 13,6	26,6 - 92,1	<b>75,3</b>	134
<b>Lp(a)</b>	69,0 ± 23,8	26,1 - 91,3	<b>73,9</b>	58

TC = totální cholesterol, LDL = LDL-cholesterol, HDL = HDL-cholesterol, TAG = triacylglyceridy, non-HDL = non-HDL-cholesterol, ApoA = apolipoprotein A, ApoB = apolipoprotein B, Lp(a) = lipoprotein (a). Pokles všech vyšetřovaných parametrů byl statisticky významnější ( $p \leq 0,001$ ). SD = směrodatná odchylka, n = počet provedených vyšetření.

Tabulka 5. Pokles dalších parametrů po LDL-aféze (v procentech výchozí hodnoty)

n = 117	Průměr ± SD (%)	Rozmezí (%)	Medián (%)	p
<b>Urea (mmol/l)</b>	15,1 ± 7,2	1,5 - 52,5	<b>14,3</b>	<b>≤ 0,001</b>
<b>Kreatinin (μmol/l)</b>	8,1 ± 5,9	-16,4 - 27,5	<b>7,6</b>	<b>≤ 0,001</b>
<b>Kysel. močová (μmol/l)</b>	11,5 ± 3,4	5,1 - 19,9	<b>11,2</b>	<b>≤ 0,001</b>
<b>ALT (μkat/l)</b>	28,3 ± 9,6	0,0 - 67,4	<b>28,6</b>	<b>≤ 0,001</b>
<b>AST (μkat/l)</b>	23,5 ± 12,0	-14,3 - 66,7	<b>25,0</b>	<b>≤ 0,001</b>
<b>Celková bílkovina (g/l)</b>	26,0 ± 4,8	17,7 - 39,0	<b>25,2</b>	<b>≤ 0,001</b>
<b>Albumin (g/l)</b>	24,4 ± 5,3	17,4 - 40,8	<b>23,1</b>	<b>≤ 0,001</b>
<b>Hemoglobin (g/l)</b>	7,2 ± 4,6	-6,9 - 19,5	<b>6,9</b>	<b>≤ 0,001</b>
<b>Hematokrit</b>	7,4 ± 4,8	-2,8 - 23,7	<b>7,2</b>	<b>≤ 0,001</b>
<b>MCV (fl)</b>	-0,1 ± 1,5	-8,2 - 4,7	<b>0,0</b>	<b>0,856</b>
<b>Leukocyty (x10<sup>9</sup>/l)</b>	-3,4 ± 14,7	-53,0 - 29,1	<b>-2,4</b>	<b>0,152</b>
<b>Trombocyty (x10<sup>9</sup>/l)</b>	8,8 ± 11,2	-45,0 - 72,2	<b>8,6</b>	<b>≤ 0,001</b>
<b>Viskozita plazmy (mPa)</b>	14,1 ± 5,1	2,0 - 33,8	<b>14,5</b>	<b>≤ 0,001</b>

ALT = alaninaminotransferáza, AST = aspartátaminotransferáza, MCV = střední objem erytrocytu. Hodnota p vyjadřuje statistickou významnost změny parametru. Pozn.: záporné hodnoty poklesu znamenají vzestup koncentrace po aféze. SD = směrodatná odchylka, n = počet vyšetření

### **3.5.1.1.3. Nežádoucí účinky LDL-aférzy**

Nežádoucí příhody, vyžadující lékařskou intervenci se vyskytly u 5,1% z 1000 hodnocených LDL-aférz. Jedenáctkrát (1,1%) byla LDL-aféza předčasně ukončena, a to pětkrát (0,5%) pro nevolnost s mírným poklesem tlaku krve, jednou pro prekolapsový stav s hypotenzí, čtyřikrát (0,4%) z důvodu nefunkčního periferního žilního vstupu a jednou z důvodu vadného hemaferetického setu.

Nevolnost a/nebo hypotenze, vyžadující lékařskou intervenci, tvořily 63% výše zmíněných vedlejších reakcí, vyskytly se u 3,2% LDL-aférz a byly šestkrát příčinou přerušení procedury, po kterém vždy odezněly. Mírné vazo-vagální reakce, a to obvykle přechodná slabost, mírná nevolnost, lehké a krátkodobé výkyvy krevního tlaku nevyžadující lékařskou intervenci nebyly do celkového počtu významných vedlejších reakcí zahrnuty, stejně tak jako přechodné mírné projevy toxicity citrátu - např. cirkumorální parestézie nebo mírné parestézie akrálních částí končetin, které dobře reagovaly na intravenózní aplikaci kalcia. Významnější projevy toxicity citrátu, jako protrahované parestézie nebo křeče neuspokojivě reagující na léčbu, tvořily 28% vedlejších příhod, tj. vyskytly se u 1,4% všech LDL-aférz a nikdy nevedly k ukončení LDL-aférzy. Jako prevenci jsme v závislosti na konkrétních zkušenostech s daným pacientem užívali kontinuální nebo v případě nedostatečné kapacity návratné žíly jednorázovou intravenózní aplikaci kalcia. Zpravidla bylo během LDL-aférzy aplikováno 20 - 40 ml roztoku Calcium Biotika (Hoechst-Biotika, s.r.o., Martin, Slovenská republika, u kterého 10 ml obsahuje 2,25 mmol ionizovaného kalcia), nejčastěji ve 100 – 300 ml fyziologického roztoku. U homozygotů FH s většími objemy zpracované plazmy jsme výjimečně aplikovali 50 ml roztoku kalcia. Kromě pocitu tepla jsme nepozorovali jiné nežádoucí účinky intravenózní aplikace roztoku kalcia.

Dalšími obtížemi, které pravidelně vznikaly v průběhu LDL-aférz, byly obtíže z vynucené polohy vleže či polosedě se zavedenými venózními vstupy do obou předloktí, omezující hybnost horních končetin. I přes kontinuální péči personálu mohou nemocní během LDL-aférz pociťovat neuspokojení základních potřeb jako např. nemožnost vyprázdnit se, napít, najíst, podrbat a podobně. Výskyt významnějších obtíží z vynucené polohy byl užíváním automaticky polohovatelných lůžek s komfortními matracemi výrazně omezen, nicméně bolesti zad, vyžadující podání analgetika, se objevily v 0,5 % z celkového počtu LDL-aférz. Častá byla svalová slabost a pocit únavy po LDL-aféze, trvající do následujícího dne, někteří nemocní udávali pocit hladu. Přechodný pocit napětí a mírného otoku v prstech rukou a nohou, popřípadě v očních víčkách, se nepravidelně vyskytoval u šesti našich pacientů zvláště úvodu léčby, u třech z nich se objevuje během LDL-aférzy



v mírné formě dodnes. Tento typ reakcí byl přechodný, mírný, nepůsobil výraznější obtíže pacientům a nevyžadoval léčbu. Do celkového souhrnu závažnějších reakcí nejsou tyto obtíže započítány.

Nedostatečnost periferních žil s nutností opakovaně odložit proceduru se vyskytovala především v době zavádění LDL-afézy do praxe a vedla u jedné, v té době sedmnáctileté nemocné ke zhotovení arterio-venózního zkratu na předloktí. Ten je nyní nefunkční. Postupné zlepšení stavu periferních žil, ke kterému přispělo pravidelné posilování svalstva horních končetin, umožnilo bezproblémové zavádění žilních vstupů u této pacientky. Ke kanylaci centrální žíly jsme nikdy nepřistoupili. Drobné hematomy v místě zavedení vstupů byly běžné, významné krvácení do kůže ani okolních tkání jsme nezaznamenali. Infekce v místě vpichu, trombóza žíly či jiné lokální komplikace se neobjevily.

Z dalších, v literatuře zmiňovaných reakcí, jsme nezaznamenali ani projevy přetížení náhradními roztoky, nevyskytly se alergické, anafylaktoidní ani pyretické reakce, arytmie, vzduchová embolie ani významná hemolýza.

#### **3.5.1.1.4. Diskuse**

Provedená měření ukazují, že LDL-aféza efektivně a selektivně odstraňuje LDL-cholesterol a lipoprotein (a). Účinnost naší modifikace imunoadsorpce, prováděné pomocí kolon LDL-Lipopak (Pocard, Ltd.), je velmi dobře srovnatelná s účinností jiných metod uvedených v literatuře (Schmaldienst, 2000).

Selektivitu eliminace je možno posuzovat podle poklesu HDL-cholesterolu. V našich měřeních jsme zaznamenali mírný pokles hladiny HDL-cholesterolu, na kterém se podílí diluce pacientovy krve a pravděpodobně nespecifický záchyt molekul HDL v kolonách. Podle některých prací dochází při LDL-aféze k aktivaci hepatické lipázy a k poklesu aktivity lecitin-cholesterol-acyltransferázy (LCAT), které též mohou přispívat ke snížení hladiny HDL-cholesterolu (Richter, 1993). Průměrná koncentrace HDL-cholesterolu po LDL-aféze však neklesla pod 1 mmol/l. Pokles HDL po LDL-aféze nepovažujeme za klinicky významný a jeho možný negativní vliv je vyvážen příznivým účinkem eliminace aterogenních lipoproteinů.

Pokles hemoglobinu a hematokritu po LDL-aféze je způsoben jak dilucí oběhu nemocného, tak určitými ztrátami krve zůstávající v linkách hemaferetického setu po ukončení procedury. Jistou roli, zvláště z dlouhodobého hlediska, hrají i ztráty působené odběry vzorků k laboratorním vyšetřením. Chronické ztráty při opakovaných procedurách imunoadsorpce mohou přispívat ke vzniku sideropenie, která může podle našich zkušeností

i zkušeností jiných autorů (Pták, 2005) zvláště u žen vyžadovat substituci preparáty železa. Změny ostatních vyšetřovaných parametrů nebyly klinicky významné.

Přesto, že LDL-aféza metodou imunoadsorpce je jednou z technicky a časově nejnáročnějších hemaferetických procedur, neshledali jsme v našem souboru žádné život ohrožující vedlejší reakce. Frekvence jednotlivých vedlejších reakcí, vedoucích k přerušení afézy, se pohybuje v desetinách procent. Podobné výsledky byly publikovány i u jiných metod eliminace lipidů. Například v souboru 5 575 LDL-aféz metodami HELP, dextransulfátovou adsorpcí a imunoadsorpcí bylo pozorováno 4% klinicky zjevných vedlejších účinků, žádné však nebyly vážné (Richter, 1999). V souboru 59 121 LDL-aféz metodou HELP během pěti let bylo zjištěno 4,6% vedlejších reakcí, z toho 1-2% bylo způsobeno přímo afézami (Schuff-Werner, 2003). Rozdíly v publikované četnosti vedlejších reakcí jsou největší mírou způsobeny nestejným hodnocením nežádoucích účinků. Většina autorů nezahrnuje do statistiky mírné projevy toxicity citrátu, mírné vazovagální reakce a obtíže z vynucené polohy při aféze, které jsou sice poměrně časté, ale málo závažné.

Nejčastějším důvodem k přerušení procedury byla v našem souboru nevolnost a hypotenze. Vzhledem ke spojení s dalšími příznaky, jako např. s pocením a nevolností, se domníváme, že se jednalo o převážně vazovagální reakce. Mezi další příčiny, které se mohly podílet na hypotenzii, patří přesun části krve (cca 150 – 350 ml) do extrakorporálního oběhu. Podíl možné cytokinové reakce a zejména aktivace komplementového systému při kontaktu plazmy s povrchem separačního setu a adsorpčních kolon s následkem uvolnění mediátorů s anafylaktoidními a vazodilatačními účinky, které byly popsány u hemaferéz dříve (Shiga, 1998, Fadul, 1998), nebyl zkoumán, nicméně obě reakce se mohly, spolu s možným přechodným zvýšením vaskulární permeability v souvislosti s rychlou změnou hladiny lipoproteinů podílet také na vzniku otoků prstů a očních víček.

Život ohrožujícím závažným vedlejším účinkem při extrakorporální eliminaci LDL-cholesterolu je anafylaktoidní reakce, pozorovaná především při DSA nebo DALI u nemocných léčených inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (Agishi, 1994, Sinzinger, 1994). Tato reakce nebyla v našem souboru pozorována.

Kombinace kontinuálního podávání heparinu a citrátu spolehlivě zajišťuje dostatečnou antikoagulaci. Intravenózní aplikace kalcia, jak jednorázová, nebo formou kontinuální infuze s úpravou dávek podle klinických příznaků poklesu ionizovaného kalcia a podle velikosti přísunu citrátu, účinně a bezpečně zmírnila příznaky citrátové toxicity. Pozorovali

jsme i příznivý vliv intravenózní aplikace magnézia. Protože stres pacienta může prostřednictvím hyperventilace vést k prohloubení poklesu ionizovaného kalcia, je třeba zdůraznit i potřebu pečlivého a citlivého přístupu personálu, který může tento stres účinně eliminovat. Projevy toxicity citrátu sodného nebyly v našem souboru ani jednou důvodem k přerušení léčby, nutnost významnějšího prodloužení a zpomalení procedury byla minimální.

Na základě dlouhodobého pozorování jsme došli k názoru, že časový limit trvání procedur by neměl z hlediska komfortu pro nemocného výrazněji překročit 4 hodiny. Tento limit se snažíme nepřekračovat.

#### **3.5.1.1.5. Závěr**

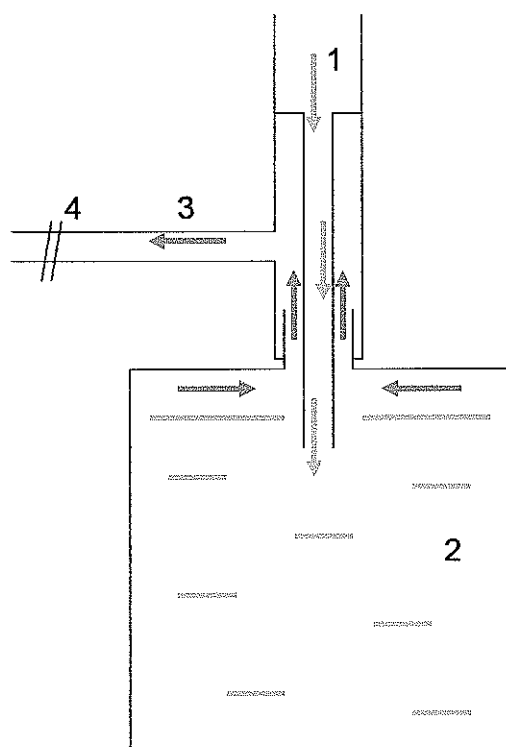
Hodnocený soubor 1000 LDL-afézy metodou imunoadsorpce je pravděpodobně nejrozsáhlejším publikovaným souborem ve světové literatuře, užívajícím adsorbenty LDL-Lipopak. Výsledky tohoto sledování ukázaly, že naše modifikace LDL-afézy na principu imunoadsorpce je bezpečnou metodou s vysokou efektivitou a selektivitou v eliminaci aterogenních lipoproteinů u nemocných s těžkými poruchami metabolismu lipidů. Výhodou LDL-imunoadsorpce oproti jiným metodám extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu je vysoká selektivita adsorpce a velká adsorpční kapacita kolon, daná možností jejich regenerace a sekvenčního použití. Nevýhodou je vysoká pořizovací cena kolon a jednotlivých výkonů. Přítomnost zkušeného personálu je důležitým předpokladem pro předcházení nežádoucím reakcím, což umožňuje dodržet plánovaný rozsah i frekvenci procedur.

#### **3.5.1.2. Vývoj zařízení k odstraňování vzduchu z adsorpční kolony**

Přesto, že je LDL-aféza metodou, která je ve světovém měřítku provozována již léta, byla modifikována naší výzkumnou skupinou, a to zejména po technické stránce. Příkladem je originální řešení zařízení k odstraňování vzduchu z adsorpční kolony. Při původním provedení imunoadsorpce se v horní části kolony hromadil vzduch, který bylo třeba opakovaně odsávat stříkačkou po přerušení procedury, což vedlo k narušení plynulého chodu procedur a k rozpojování mimotělního okruhu během procedury s rizikem jeho kontaminace včetně kontaminace kolon. Ty jsou určené k mnohonásobnému užití a jsou finančně značně nákladné. Nové zařízení umožňuje odsávat vzduch z kolony podle potřeby kdykoli, aniž by bylo nutné přerušit průtok plazmy kolonou. Tím omezuje riziko kontaminace mimotělního oběhu, zajišťuje plynulost procedury, umožňuje také odběry vzorků. Celkově tedy usnadňuje práci personálu a zlepšuje bezpečnost a komfort nemocných v průběhu LDL-afézy. Tento

system byl navržen v rámci výzkumu, který byl součástí této disertace a zároveň součástí řešení výzkumného projektu IGA MZ ČR NB/7006-3. Byl patentován pod názvem Zařízení k odstraňování vzduchu z adsorpční kolony dne 15. 7. 2004, číslo patentu 294 018 (citace č. 308). Autorka této disertace není sice původním autorem vynálezu, ale aktivně se podílela na zkoušení zařízení, na vývoji jeho modifikací a řešení připomínek Úřadu průmyslového vlastnictví a byla členkou výzkumné skupiny, která řešila výše zmíněný výzkumný projekt IGA MZ ČR NB/7006-3. Výzkumný projekt byl obhájen roku 2005 a zařazen do skupiny A.

**Obrázek 6. Schématické zobrazení zařízení na odčerpávání vzduchu z imunoadsorpčních kolon**



*Plazma (žlutě) přitéká linkou setu (1) a protéká přívodní trubicí do adsorpční kolony (2), přičemž nad hladinou se hromadí vzduch (modře), který může být odsáván pomocí odváděcí trubice (3), na kterou lze napojit injekční stříkačku. Odváděcí trubici lze uzavírat pomocí svorky (4). Adsorpční kolona je tak zbavována nežádoucího vzduchu, přičemž tuto operaci lze podle potřeby kdykoliv snadno a bezpečně zopakovat bez nutnosti přerušení procedury.*

### **3.5.1.3. Vyhodnocení životnosti imunoabsorpčních kolon LDL-Lipopak**

#### **3.5.1.3.1. Cíle práce**

Cílem práce bylo zhodnotit životnost imunoabsorpčních kolon LDL-Lipopak (Pocard, Ltd., Moskva, Rusko) z pohledu efektivit a selektivity imunoabsorpce a mechanických vlastností v průběhu jejich užívání.

#### **3.5.1.3.2. Soubor vyhodnocených LDL-aférez, materiál a metody**

Hodnocení životnosti kolon proběhlo v období od května 1996 do října 2004, kdy bylo na našem pracovišti provedeno 1000 LDL-aférez celkem u 9 pacientů léčených LDL-imunoabsorpcí kolonami LDL-Lipopak (viz kapitola 3.2.1. *Soubor nemocných léčených LDL-imunoabsorpcí*). Ke stanovení základních údajů (celkový počet LDL-aférez na jeden pár kolon a celková doba užívání jednoho páru kolon) byly hodnoceny pouze páry kolon již vyřazené z užívání – tedy 15 párů kolon. K vyhodnocení efektivit a selektivity (viz kapitola 2.2.6. *Některé technické aspekty LDL-imunoabsorpce*) byly hodnoceny všechny LDL-aférez s dostupnými výsledky u všech 24 párů užitých kolon. Hodnoceno bylo 780 LDL-aférez.

**Technické provedení LDL-aférez** bylo probráno v kapitole 3.4. *Materiál a metody*.

#### **Odběr krve ke stanovení biochemických ukazatelů**

Krev ke stanovení sérových koncentrací LDL- a HDL-cholesterolu byla odebrána z periferní žíly před a ihned po ukončení LDL-aférez. Laboratorní metody jsou popsány v kapitole 3.4. *Materiál a metody*, v části 3.4.4.1. *Základní laboratorní ukazatele*.

#### **Kalkulace ukazatelů efektivit imunoabsorpčních kolon**

Pro každou hodnocenou LDL-aférezu kalkulovány následující parametry:

1. **Absolutní pokles hladiny LDL-cholesterolu po LDL-aférezě**, daný rozdílem koncentrací LDL-cholesterolu před (*LDL1*) a po (*LDL2*) LDL-aférezě:

$$\Delta LDL = LDL1 - LDL2 \text{ (mmol/l)}$$

2. **Absolutní pokles hladin LDL-cholesterolu po LDL-aférezě na jednotku zpracované plazmy**, daný podílem předchozího parametru množstvím zpracované plazmy při jedné LDL-aférezě ( $\text{mmol/l}^{-2}$ ).

- 3. Relativní pokles hladiny LDL-cholesterolu** po LDL-aféze, získaný jako podíl absolutního poklesu hladin LDL-cholesterolu ( $\Delta LDL$ ) a preaférické koncentrace LDL-cholesterolu ( $LDL1$ ):

$$\delta LDL = \frac{LDL1 - LDL2}{LDL1} = \frac{\Delta LDL}{LDL1}$$

Po vynásobení stem se rovná procentuálnímu poklesu LDL-cholesterolu.

Množství odstraněného LDL-cholesterolu při jedné LDL-aféze je závislé na jeho preaférické koncentraci a na množství zpracované plazmy při LDL-aféze. Proto jsme při hodnocení efektivity zařadili také parametry zmíněné v bodech 2. a 3.

### **Kalkulace ukazatelů selektivity imunoabsorpčních kolon**

Ke zhodnocení selektivity imunoabsorpčních kolon byl zvolen HDL-cholesterol, jehož eliminace při LDL-aféze je nežádoucí. Byly kalkulovány tyto parametry:

- 1. Absolutní pokles hladiny HDL-cholesterolu** po LDL-aféze, daný rozdílem hladiny HDL-cholesterolu před ( $HDL1$ ) a po ( $HDL2$ ) LDL-aféze:

$$\Delta HDL = HDL1 - HDL2 \quad (mmol/l)$$

- 2. Relativní pokles hladiny HDL-cholesterolu** po LDL-aféze, získaný jako podíl absolutního poklesu hladin HDL-cholesterolu ( $\Delta HDL$ ) a preaférické hodnoty HDL-cholesterolu ( $HDL1$ ):

$$\delta HDL = \frac{HDL1 - HDL2}{HDL1} = \frac{\Delta HDL}{HDL1}$$

Po vynásobení stem se rovná procentuálnímu poklesu HDL-cholesterolu.

### **Vyhodnocení vlivu stárnutí imunoabsorpčních kolon na jejich mechanické vlastnosti**

V Přílohách k Protokolu o imunoabsorpci byl vyhledán u každé vyšetřované procedury zaznamenaný průtok krve separátorem a průtok plazmy adsorpčně-desorpčním automatem a dále údaj o době trvání LDL-afézy. V Protokolu o imunoabsorpci byly získány údaje o komplikacích výkonu, případně důvodech předčasného přerušování procedury.

**Ke statistickému hodnocení** byla použita regresní analýza (viz kapitola 3.4.5. *Statistická analýza*).

### **3.5.1.3.3. Výsledky**

#### **I. Základní údaje**

K provedení 1000 LDL-aferez ve výše uvedeném období bylo použito celkem 24 párů kolon u 9 nemocných, tj. průměrně 2,6 (1 - 4) páru kolon na jednoho pacienta. Devět párů kolon bylo v době šetření stále používáno, 15 párů bylo již vyřazeno z užívání a bylo možné u nich kompletně zhodnotit následující údaje: průměrně bylo provedeno 54 LDL-aferez na jeden pár kolon, rozmezí hodnot 11-109, průměrná doba užívání jednoho páru kolon byla 35,9 měsíců, tj. 3,0 let.

#### **II. Efektivita imunoadsorpčních kolon**

*Závislost poklesu LDL-cholesterolu na pořadovém čísle LDL-aferezy u každého páru imunoadsorpční kolony*

Pro absolutní pokles koncentrací LDL-cholesterolu byla hodnota regresního koeficientu  $0,015$  a  $p = 3,8 \cdot 10^{-5}$ , pro absolutní pokles koncentrace LDL-cholesterolu, korigovaný na 1 ml zpracované plazmy byla hodnota regresního koeficientu rovna  $6,5 \cdot 10^{-4}$  a  $p = 0,230$  (viz *Graf 2*), pro relativní pokles koncentrací LDL-cholesterolu byla hodnota regresního koeficientu  $-6,8 \cdot 10^{-5}$  a  $p = 0,723$  (viz *Graf 3*). Statisticky signifikantní závislost na pořadovém čísle LDL-aferezy u každého páru imunoadsorpčních kolon byla tedy prokázána pouze u absolutního poklesu LDL-cholesterolu po LDL-afereze, a to vzhledem k pozitivní hodnotě regresního koeficientu znamená nárůst absolutního poklesu hladin LDL-cholesterolu s počtem provedených LDL-aferez. Závislost ostatních parametrů nebyla statisticky signifikantní.

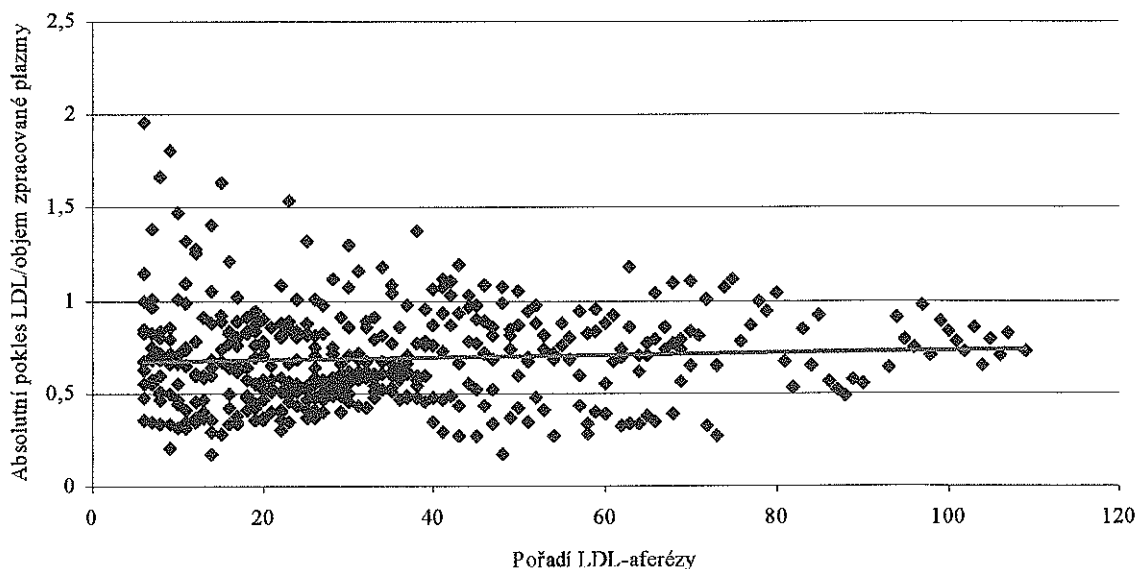
#### **III. Selektivita imunoadsorpčních kolon**

*Závislost poklesu HDL-cholesterolu na pořadovém čísle LDL-aferezy u každého páru imunoadsorpční kolony*

Pro absolutní pokles koncentrací HDL-cholesterolu byla hodnota regresního koeficientu  $-2,4 \cdot 10^{-4}$ ,  $p = 0,466$  (viz *Graf 4*), pro relativní pokles koncentrací HDL-cholesterolu byla hodnota regresního koeficientu  $2,5 \cdot 10^{-4}$  a  $p = 0,067$  (viz *Graf 5*). Nebyla tedy prokázána závislost absolutního ani relativního poklesu koncentrací HDL-cholesterolu na pořadovém čísle LDL-aferezy u jednotlivých párů imunoadsorpčních kolon.

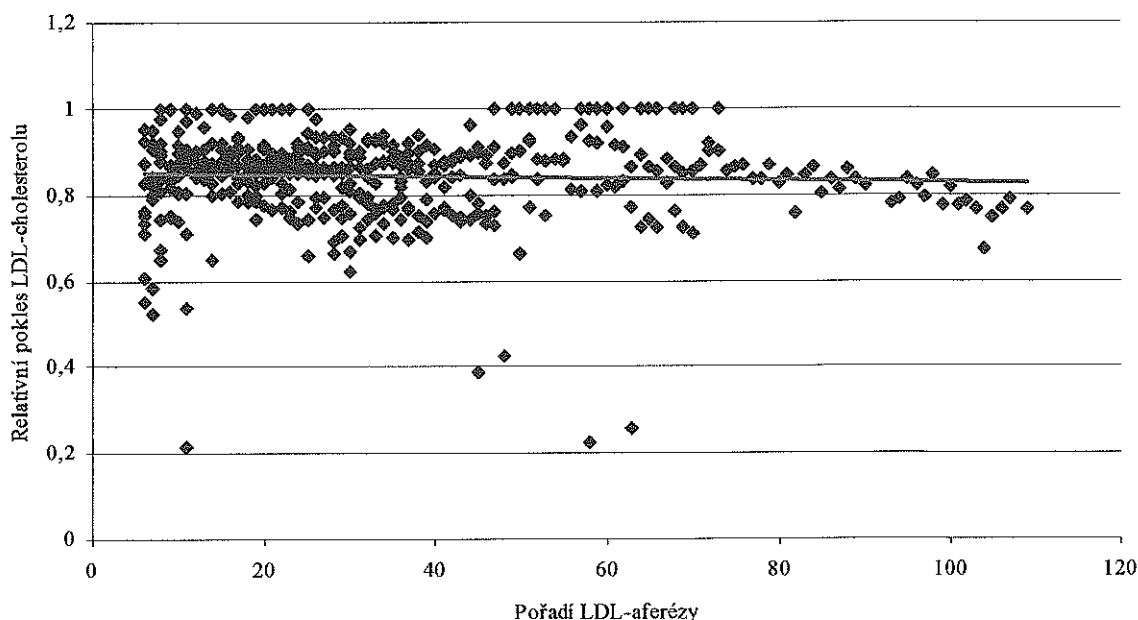
Pro ilustraci, ani po poslední provedené LDL-afereze u 10 párů nejdéle užívaných kolon (průměr 68 LDL-aferez, rozmezí 41-109, medián 72 aferez) neklesla průměrná koncentrace HDL-cholesterolu pod normu - byla  $1,02 \pm 0,19$ , medián  $1,08$  mmol/l.

**Graf 2. Závislost absolutního poklesu LDL-cholesterolu, korigovaného na jednotku zpracované plazmy na pořadovém čísle LDL-aférézy u každého páru kolon**



Závislost absolutního poklesu LDL-cholesterolu korigovaného na 1 ml zpracované plazmy na pořadovém čísle LDL-aférézy u jednotlivých párů imunoabsorpčních kolon nebyla prokázána (regresní koeficient =  $6,5 \cdot 10^{-4}$ ,  $p = 0,230$ ).

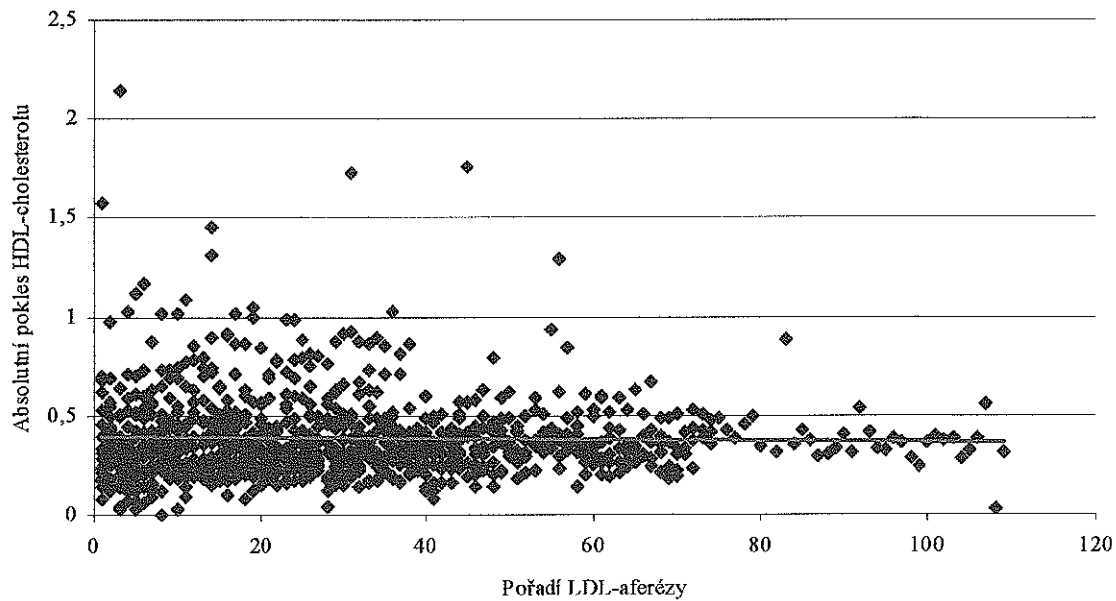
**Graf 3. Závislost relativního poklesu LDL-cholesterolu na pořadovém čísle LDL-aférézy u každého páru kolon**



Závislost relativního poklesu LDL-cholesterolu na pořadí LDL-aférézy u jednotlivých párů imunoabsorpčních kolon nebyla prokázána (regresní koeficient =  $-6,8 \cdot 10^{-5}$ ,  $p = 0,723$ ).

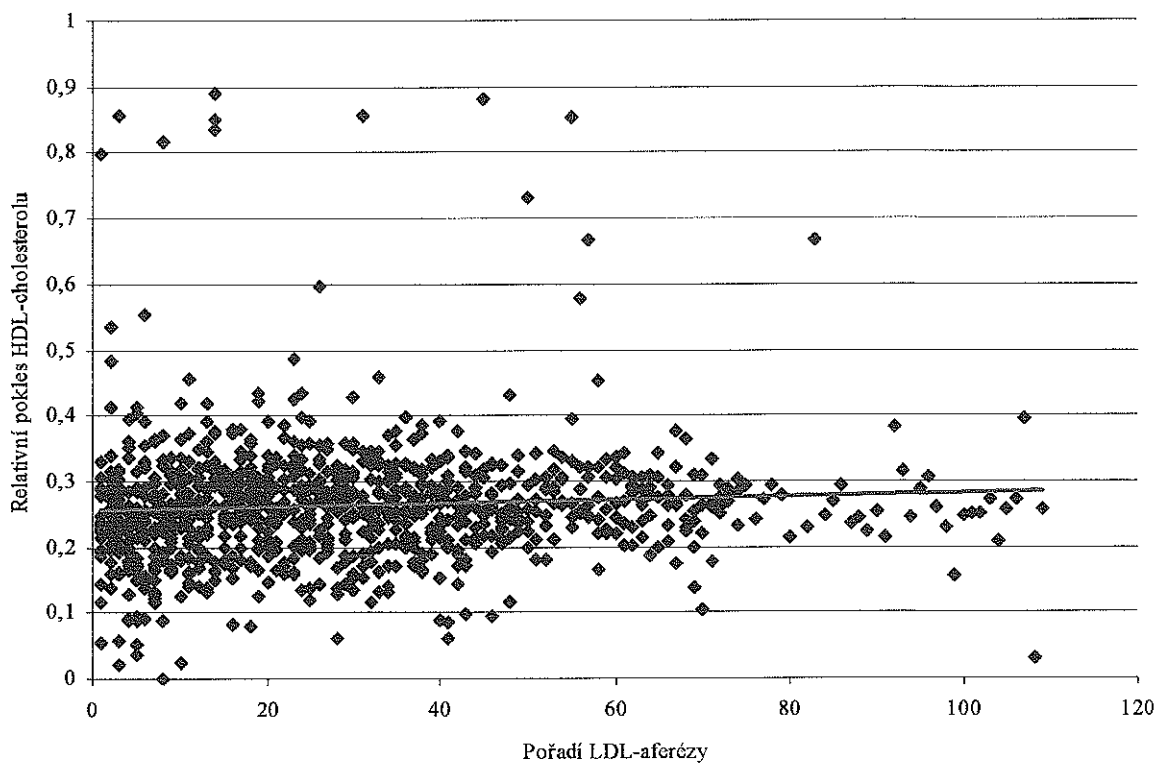


**Graf 4. Závislost absolutního poklesu HDL-cholesterolu na pořadovém čísle LDL-aférézy u každého páru kolon**



Závislost absolutního poklesu HDL-cholesterolu na pořadí LDL-aférézy nebyla prokázána (regresní koeficient =  $-2,4 \cdot 10^{-4}$ ,  $p = 0,466$ ).

**Graf 5. Závislost relativního poklesu HDL-cholesterolu na pořadovém čísle LDL-aférézy u každého páru kolon**



Závislost relativního poklesu HDL-cholesterolu na pořadí LDL-aférézy nebyla statisticky signifikantní (regresní koeficient =  $2,5 \cdot 10^{-4}$ ,  $p = 0,067$ ).

#### **IV. Některé ukazatele mechanických vlastností kolon**

Nebyla zjištěna statisticky signifikantní závislost průměrného průtoku krve ani plazmy přístroji, ani doby trvání LDL-afézy na pořadí jednotlivých LDL-aféz u každého páru imunoadsorpčních kolon ( $p > 0,05$ ). Prvních 5 procedur bylo ze souboru vyloučeno pro nestandardní množství zpracované plazmy při zavádění nového páru kolon do užívání. Nebyl pozorován nárůst výskytu technických komplikací s počtem provedených LDL-aféz.

##### **3.5.1.3.4. Diskuse**

Statisticky významná závislost parametrů efektivity imunoadsorpce na pořadovém čísle LDL-afézy každého páru kolon byla zjištěna pouze u absolutního poklesu LDL-cholesterolu po LDL-aféze, a to vzhledem k pozitivní hodnotě regresního koeficientu ve smyslu tendence k vyššímu poklesu LDL-cholesterolu v průběhu užívání kolon. Jedním z faktorů přispívajících k tomuto výsledku může být menší množství zpracované plazmy při zavádění každého nového páru imunoadsorpčních kolon (cca 1000-4000 ml u prvních pěti LDL-aféz oproti průměrně 7000 ml u dalších LDL-aféz), které se při závislosti poklesu LDL-cholesterolu po LDL-aféze na množství zpracované plazmy ( $p < 0,005$ ) může projevit jako závislost tohoto poklesu na pořadovém čísle LDL-afézy. Nelze vyloučit ani možný podíl postupného zlepšování techniky LDL-aféz s nabýváním zkušeností s touto metodou a se zaváděním nových postupů, které mohly vést k vzestupu účinnosti eliminace. Pokles LDL-cholesterolu, korigovaný na jednotku zpracované plazmy a relativní pokles LDL-cholesterolu však již na pořadovém čísle LDL-afézy závislý nebyl. Lze tedy uzavřít, že efektivita, tedy schopnost kolon eliminovat LDL-cholesterol, v průběhu jejich užívání významně neklesala.

Selektivita kolon se v průběhu jejich užívání statisticky významně neměnila. Přesto byl patrný mírný trend k vzestupu množství odstraněného HDL cholesterolu s počtem provedených LDL-aféz, který však nebyl klinicky významný. Neprokázáli jsme ovlivnění mechanických vlastností kolon v průběhu užívání.

Faktorů, limitujících přesnost použité metody je několik. Celkový tělesný cholesterol je rozdělen do několika kompartmentů, který tvoří tzv. rychle směnitelný pool (krevní lipoproteiny, erytrocyty, játra a střeva), středně rychle směnitelný pool (cholesterol v tukové tkáni a kůži), pomalu směnitelný pool (cholesterol ve tkáních, především svalech a také v cévní stěně) a nesměnitelný pool (cholesterol v centrálním nervovém systému). Ke změnám hladiny v plazmě přispívá též příjem potravou a vylučování cholesterolu především do žluči (Goodman, 1973). Při hodnocení vlivu přesunu LDL-cholesterolu na výsledky našeho měření

jsme vycházeli z práce Stefance (Stefanec, 1999), podle jehož kompartmentového modelu by tvořil přísun cholesterolu do směnitelného kompartmentu u nemocného bez per-orálního příjmu během 4 hodin cca 3,5% celkového množství rychle směnitelného kompartmentu, pro ilustraci se jedná o cca 164 mg LDL-cholesterolu u muže střední postavy. Odstraněné množství při LDL-aféze tvoří několik gramů (Bláha, 2002). Na základě těchto údajů byly přesuny cholesterolu mezi jednotlivými kompartmenty zanedbány.

Při kalkulaci změn hladin LDL a HDL-cholesterolu byl zanedbán vliv diluce pacientova oběhu náhradními roztoky, který pro zjednodušení považujeme u jednotlivých nemocných za konstantní. Jak bylo uvedeno výše, vzhledem k vývoji pracovních postupů a relativně dlouhé průměrné době užívání jednoho páru kolon (3 roky) nebyly u jednotlivých LDL-aféz dodrženy identické podmínky. Přes to, že jsme neprokázali významné změny v adsorpci HDL jako ukazatele selektivity imunoadsorpce, nevyloučili tím změny adsorpce jiných součástí plazmy, které taktéž není cílem eliminovat.

Tato metoda hodnotí pár kolon jako celek, neodhalí však případné kvalitativní rozdíly mezi nimi. Kolony jsou sice pořizovány jako pár a v léčbě se pravidelně střídají, jsou tedy obě stejně staré i stejně opotřebené, nelze však vyloučit neočekávanou závadu jedné z nich, kterou tato metoda není schopna detekovat. Při podezření na snížení adsorpční kapacity jedné z kolon lze užít měření hladin LDL-cholesterolu v plazmě odtékající z kolony. Příkladem kolony se sníženou adsorpční kapacitou může být *Graf 6*, který ukazuje zvýšenou hladinu LDL-cholesterolu za kolonou B, která je zařazena jako druhá a čtvrtá, narozdíl od kolony A, která je zcela funkční a je zařazena jako první a třetí. Růžová křivka ukazuje průběh hladin LDL-cholesterolu v pacientově plazmě, tedy i v plazmě přitékající do kolon. Vzhledem k horší funkci jedné z kolon klesá růžová křivka méně než modrá křivka očekávaných hladin LDL-cholesterolu.

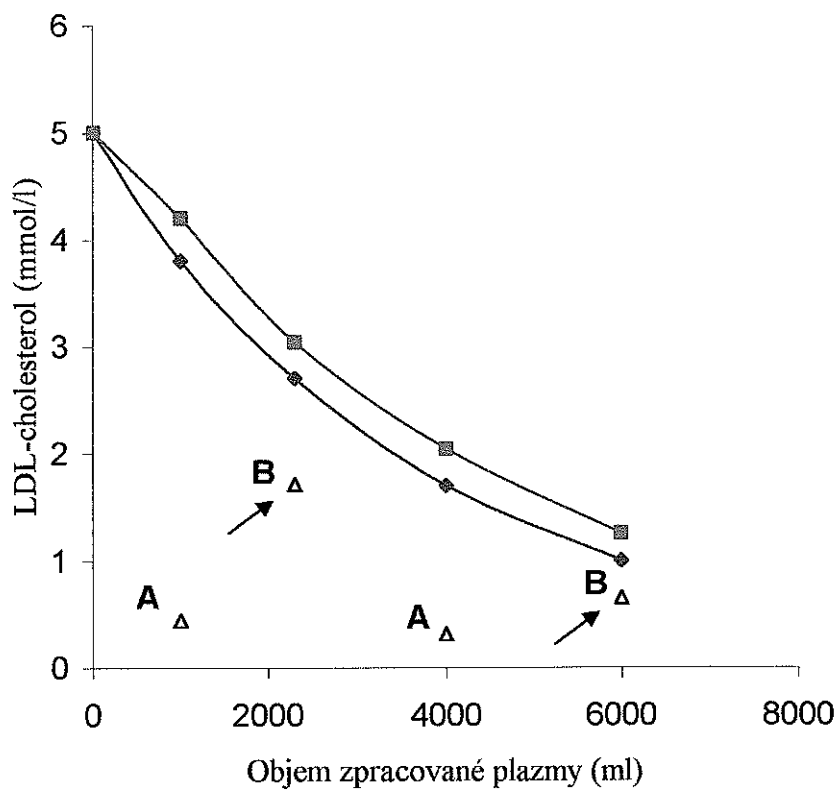
#### **3.5.1.3.5. Závěr**

Prokázali jsme stabilní efektivitu, selektivitu i mechanické vlastnosti imunoadsorpčních kolon LDL-Lipopak v průběhu jejich užívání.

Výsledky práce byly využity v dalším výzkumu, zaměřeném na vypracování postupů k určení co nejpřesnějšího objemu plazmy, který by měl projít kolonou, aby došlo k využití její maximální adsorpční kapacity, ale nedocházelo k jejímu přeplnění, kdy míra adsorpce cholesterolu prudce klesá a procedura stává neúčinnou. Za tímto účelem a s využitím výše uvedených výsledků byl ve spolupráci s MUDr. V. Mašínem z Katedry lékařské biofyziky

Lékařské Fakulty v Hradci Králové vyvinut počítačový program. Tato problematika není náplní této disertační práce.

**Graf 6. Průkaz snížené účinnosti jedné z kolon**



*Legenda – viz text.*

### **3.5.2. DYNAMIKA A VZÁJEMNÉ VZTAHY NĚKTERÝCH UKAZATELŮ AKTIVITY ATEROGENEZE U NEMOCNÝCH LÉČENÝCH LDL-AFERÉZOU**

#### **3.5.2.1. Selektinové adhezní molekuly a monocytární chemotaktický protein-1 u nemocných léčených LDL-aferezou**

##### **3.5.2.1.1. Cíle práce**

Cílem práce je zhodnotit vliv LDL-aferezy a s ní spojených rychlých a poměrně izolovaných změn hladiny LDL-cholesterolu na hladiny solubilních selektinových adhezních molekul a monocytárního chemotaktického proteinu-1 (MCP-1) a posoudit vliv LDL-aferezy na aktivitu aterogenních procesů, zejména na adhezivní vlastnosti endotelu a chemotaxi monocytů.

##### **3.5.2.1.2. Soubor nemocných, kontrolní soubor, materiál a metody**

Měřili jsme hladiny solubilního P- a E-selektinu (sP-selektin a sE-selektin), a MCP-1, celkového, LDL- a HDL-cholesterolu a triacylglyceridů u 9 nemocných dlouhodobě (nejméně jeden rok) léčených LDL-aferezou metodou imunoadsorpce (viz kapitola 3.2.1. *Soubor nemocných léčených LDL-imunoadsorpce*). Vzorky krve byly odebrány před zahájením LDL-aferezy a ihned po jejím ukončení. Totéž jsme zopakovali při následující LDL-afereze.

**Kontrolní soubor byl popsán v kapitole 3.3.1. Kontrolní soubor užitý v kapitole Selektinové adhezní molekuly a monocytární chemotaktický protein-1 u nemocných léčených LDL-aferezou, technické provedení LDL-aferez, metody užití k hodnocení eliminace molekul kolonami, použité laboratorní analytické metody a statistická analýza byly popsány v kapitole 3.4. Materiál a metody.**

##### **3.5.2.1.3. Výsledky**

Medián plazmatických koncentrací sP-selektinu kontrolního souboru zdravých jedinců byl 69,5 µg/l, rozmezí 56,5 - 101,0 µg/l, sE-selektinu 55,1 µg/l, rozmezí 35,5 – 65,1 µg/l a MCP-1 288,2 pg/l, rozmezí 212,1- 607,2 pg/l.

Plazmatické koncentrace sledovaných parametrů u nemocných před a po první sledované LDL-afereze jsou uvedeny v *Tabulce 6*, koncentrace před a po následující LDL-afereze jsou uvedeny v *Tabulce 7*.

Plazmatické koncentrace sP-selektinu nemocných byly oproti kontrolnímu souboru zvýšeny ( $p < 0,05$ ), a to před i po obou LDL-aferezách. Koncentrace sE-selektinu

u nemocných se statisticky významně nelišily od koncentrací kontrolního souboru ( $p > 0,05$ ) a medián koncentrací sE-selektinu nemocných byl při horní hranici normy dané laboratoře. Koncentrace MCP-1 byly v mezích normy a nelišily se od kontrolního souboru ( $p > 0,05$ ).

Pokles koncentrací všech parametrů, vyjádřený v procentech výchozí hodnoty po první sledované LDL-aféře je uveden v *Tabulce 8*, pokles po následující LDL-aféře je uveden v *Tabulce 9*.

Koncentrace celkového, LDL- a HDL-cholesterolu a triacylglyceridů po obou LDL-aféřích významně klesly ( $p < 0,005$ ). Velikost poklesu lipidů po první a po následující LDL-aféře se statisticky významně nelišily ( $p > 0,05$ ). Koncentrace lipidů před a po první sledované LDL-aféře jsou znázorněny *Grafem 7*, před a po následující LDL-aféře *Grafem 8*.

Po obou LDL-aféřích statisticky významně klesla plazmatická koncentrace sP-selektinu a MCP-1. Koncentrace sE-selektinu se statisticky významně nezměnila (viz *Tabulka 8 a 9*). Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi velikostí změn, které nastaly po první a po následující LDL-aféře u sE-selektinu ( $p = 0,301$ ), MCP-1 ( $p = 0,359$ ), ani u sP-selektinu ( $p = 1,000$ ). Koncentrace selektinů a MCP-1 před a po první sledované LDL-aféře *Grafem 9*, před a po následující LDL-aféře *Grafem 10*.

Pokles sP-selektinu koreloval na hranici statistické významnosti s poklesem LDL-cholesterolu po LDL-aféře ( $r_s = 0,633$ ,  $p = 0,058$ ) a statisticky významně negativně s hladinami sE-selektinu před ( $r_s = -0,700$ ,  $p = 0,030$ ) a po LDL-aféře ( $r_s = -0,920$ ,  $p = 0,000$ ).

Medián hladin sP-selektinu v plazmě přitékající do kolony byl 50,7  $\mu\text{g/l}$ , rozmezí 30,1 – 79,2  $\mu\text{g/l}$ , sE-selektinu 29,2  $\mu\text{g/l}$ , rozmezí 15,5 – 35,4  $\mu\text{g/l}$  a MCP-1 135,1  $\text{pg/l}$ , rozmezí 71,5 – 205,2  $\text{pg/l}$ . Medián hladin v plazmě z kolony vytékající byl u sP-selektinu 55,9  $\mu\text{g/l}$ , rozmezí 28,7 – 83,2  $\mu\text{g/l}$ , sE-selektinu 28,9  $\mu\text{g/l}$ , rozmezí 18,5 – 35,8 a u MCP-1 84,2  $\text{pg/l}$ , rozmezí 35,5 – 155,8  $\text{pg/l}$ . Na rozdíl od sP- a sE-selektinů, MCP-1 v plazmě po pasáži kolonou statisticky významně klesl ( $p < 0,005$ ). Ve vzorku z vymývacího roztoku, který byl odebrán uprostřed vymývacího cyklu, byly hladiny obou selektinů i MCP-1 pod hladinou detekce.

**Tabulka 6. Koncentrace selektinů (μg/l), MCP-1 (pg/l) a lipidů (mmol/l) před a po první sledované LDL-aféze**

	Před první LDL-aférou			Po první LDL-aféze		
	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián
<b>sP-selektin</b>	353,7 ± 222,5	95,7 - 821,3	<b>295,3</b>	235,5 ± 160,9	50,9 - 567,1	<b>232,6</b>
<b>sE-selektin</b>	81,7 ± 41,7	43,9 - 156,4	<b>63,9</b>	73,4 ± 61,4	8,1 - 213,7	<b>54,1</b>
<b>MCP-1</b>	219,0 ± 55,4	116,2 - 277,1	<b>216,4</b>	167,9 ± 46,7	95,9 - 241,1	<b>159,7</b>
<b>TC</b>	7,41 ± 1,86	5,15 - 9,94	<b>7,28</b>	2,16 ± 0,38	1,39 - 2,74	<b>2,16</b>
<b>LDL</b>	5,17 ± 1,85	3,15 - 7,63	<b>5,05</b>	0,74 ± 0,36	0,31 - 1,15	<b>0,83</b>
<b>HDL</b>	1,56 ± 0,53	0,88 - 2,57	<b>1,53</b>	1,12 ± 0,35	0,64 - 1,7	<b>1,14</b>
<b>TAG</b>	2,52 ± 1,32	0,62 - 4,32	<b>3,15</b>	1,29 ± 1,21	0,19 - 3,29	<b>1,00</b>

*TC = celkový cholesterol, LDL = LDL-cholesterol, HDL = HDL-cholesterol, TAG = triacylglyceridy, SD = směrodatná odchylka*

**Tabulka 7. Koncentrace selektinů (μg/l), MCP-1 (pg/l) a lipidů (mmol/l) před a po následující LDL-aféze**

	Před následující LDL-aférou			Po následující LDL-aféze		
	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián
<b>sP-selektin</b>	170,7 ± 117,3	88,1 - 420,4	<b>110,5</b>	123,0 ± 96,8	52,7 - 337,3	<b>85,9</b>
<b>sE-selektin</b>	53,5 ± 41,6	5,1 - 115,9	<b>47,7</b>	53,4 ± 56,2	5,6 - 180,0	<b>34,9</b>
<b>MCP-1</b>	276,1 ± 134,9	62,6 - 498,2	<b>277,1</b>	174,6 ± 113,4	40,6 - 433,4	<b>168,8</b>
<b>TC</b>	7,33 ± 2,02	4,87 - 10,71	<b>6,95</b>	2,13 ± 0,59	1,09 - 3,01	<b>2,09</b>
<b>LDL</b>	4,48 ± 1,95	2,17 - 7,86	<b>4,15</b>	0,64 ± 0,52	0,10 - 1,71	<b>0,55</b>
<b>HDL</b>	1,62 ± 0,57	0,83 - 2,64	<b>1,62</b>	1,17 ± 0,38	0,61 - 1,78	<b>1,28</b>
<b>TAG</b>	3,09 ± 2,50	1,00 - 7,01	<b>1,87</b>	1,55 ± 1,84	0,15 - 4,54	<b>0,41</b>

*TC = celkový cholesterol, LDL = LDL-cholesterol, HDL = HDL-cholesterol, TAG = triacylglyceridy, SD = směrodatná odchylka*

**Tabulka 8. Pokles selektinů, MCP-1 a lipidů po první sledované LDL-aféře**

	Průměr ± SD (%)	Rozmezí (%)	Medián (%)	p (srovnání s hodnotou před LDL-aférou)
<b>sP-selektin</b>	29,1 ± 37,6	-39,6 - 74,7	<b>31,0</b>	<b>0,020</b>
<b>sE-selektin</b>	16,2 ± 35,5	-36,6 - 85,1	<b>6,2</b>	<b>0,444</b>
<b>MCP-1</b>	21,0 ± 23,4	-32,9 - 44,2	<b>22,0</b>	<b>0,020</b>
<b>TC</b>	69,8 ± 7,0	56,4 - 78,6	<b>69,3</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>LDL</b>	84,7 ± 9,0	63,5 - 94,6	<b>87,3</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>HDL</b>	27,8 ± 4,3	18,6 - 33,9	<b>27,7</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>TAG</b>	55,5 ± 24,5	6,55 - 81,3	<b>63,2</b>	<b>&lt; 0,005</b>

*TC = celkový cholesterol, LDL = LDL-cholesterol, HDL = HDL-cholesterol, TAG = triacylglyceridy, SD = směrodatná odchylka*

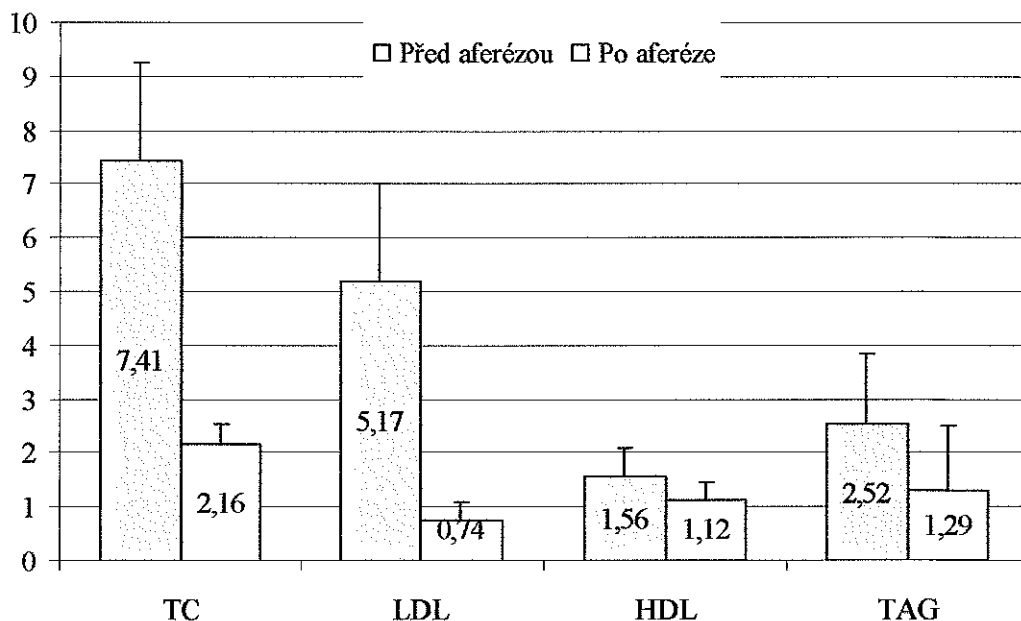
**Tabulka 9. Pokles selektinů, MCP-1 a lipidů po následující LDL-aféře**

	Průměr ± SD (%)	Rozmezí (%)	Medián (%)	p (srovnání s hodnotou před LDL-aférou)
<b>sP-selektin</b>	30,7 ± 14,0	12,4 - 49,4	<b>30,0</b>	<b>0,004</b>
<b>sE-selektin</b>	6,2 ± 33,1	-56,1 - 47,2	<b>19,4</b>	<b>0,359</b>
<b>MCP-1</b>	36,6 ± 24,5	-6,7 - 68,8	<b>41,4</b>	<b>0,020</b>
<b>TC</b>	70,3 ± 5,6	65,7 - 81,4	<b>67,6</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>LDL</b>	87,8 ± 6,6	75,3 - 96,2	<b>86,8</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>HDL</b>	27,2 ± 4,95	18,3 - 32,6	<b>27,9</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>TAG</b>	61,7 ± 23,2	15,1 - 89,7	<b>69,8</b>	<b>&lt; 0,005</b>

*TC = celkový cholesterol, LDL = LDL-cholesterol, HDL = HDL-cholesterol, TAG = triacylglyceridy, SD = směrodatná odchylka*

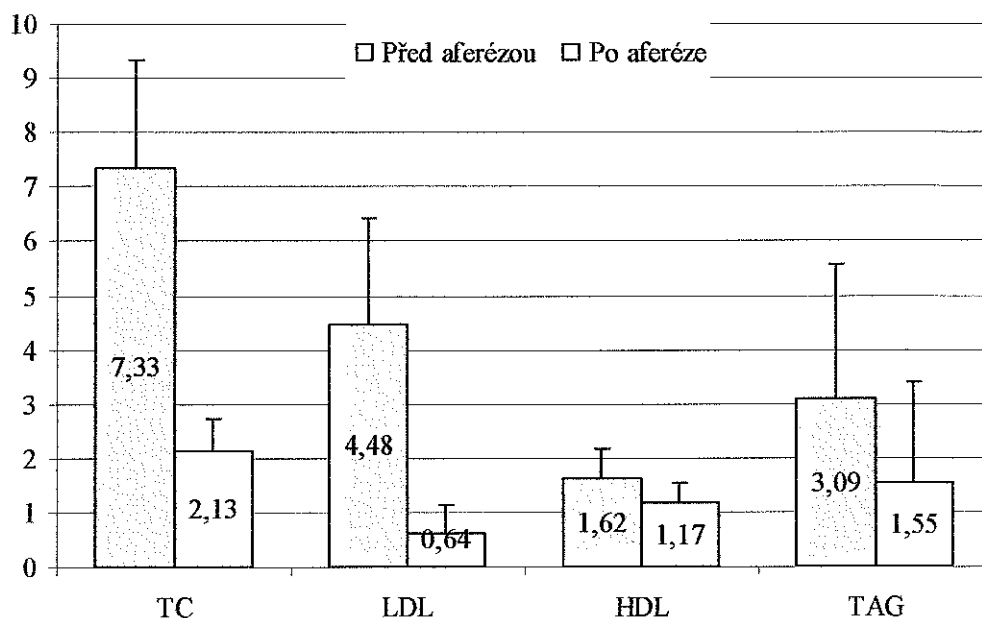


**Graf 7. Koncentrace celkového, LDL- a HDL-cholesterolu a triacylglyceridů (mmol/l) před a po první sledované LDL-aféře**



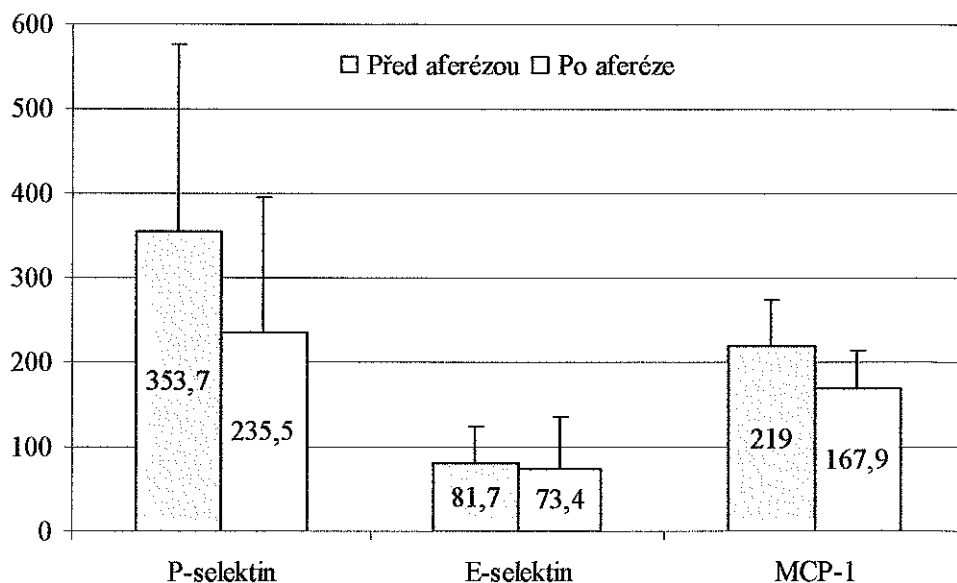
Změny koncentrací všech parametrů byly statisticky významné ( $p < 0,005$ ).  
 TC = celkový cholesterol, TAG = triacylglyceridy.

**Graf 8. Koncentrace celkového, LDL- a HDL-cholesterolu a triacylglyceridů (mmol/l) před a po následující LDL-aféře**



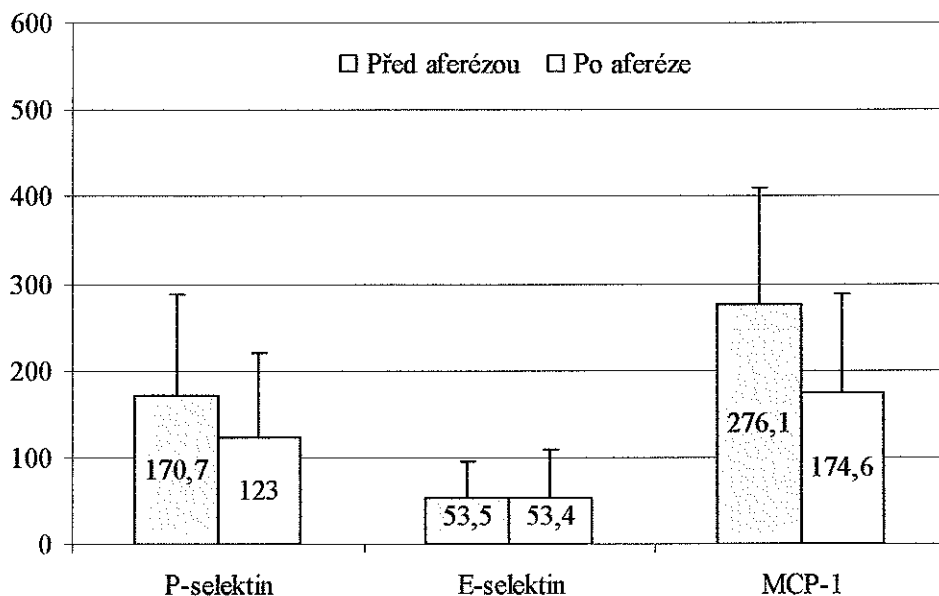
Změny koncentrací všech parametrů byly statisticky významné ( $p < 0,005$ ) a jejich velikost se statisticky významně nelišila od změn nastalých při první sledované LDL-aféře. TC = celkový cholesterol, TAG = triacylglyceridy.

**Graf 9. Hladiny P-selektinu, E-selektinu ( $\mu\text{g/l}$ ) a MCP-1 ( $\text{pg/l}$ ) před a po první sledované LDL-aféře**



*Pokles koncentrace P-selektinu a MCP-1 po první sledované LDL-aféře byl statisticky významný ( $p = 0,020$  v obou případech), koncentrace E-selektinu se statisticky významně nezměnila ( $p = 0,444$ ).*

**Graf 10. Hladiny P-selektinu, E-selektinu ( $\mu\text{g/l}$ ) a MCP-1 ( $\text{pg/l}$ ) před a po následující LDL-aféře**



*Pokles koncentrace P-selektinu a MCP-1 po následující LDL-aféře byl také statisticky významný ( $p = 0,004$  resp.  $p = 0,020$ ), koncentrace E-selektinu se statisticky významně nezměnila ( $p = 0,359$ ). Změny, které nestaly při obou LDL-aféřích se statisticky významně od sebe nelišily.*

#### **3.5.2.1.4. Diskuse**

Plazmatické hladiny leukocytárních adhezních molekul P- a E-selektinu jsou považovány za ukazatele aktivace endoteliálních buněk. Pomocí sledování dynamiky jejich hladin při léčbě LDL-aférou jsme studovali možný vliv změn hladin cholesterolu na adhezivní vlastnosti endotelu.

Exprese **P-selektinu** je ukazatelem endoteliální a/nebo trombocytární aktivace (Somers, 2000). Podle posledních znalostí, koncentrace sP-selektinu v plazmě odráží spíše aktivitu endoteliálních buněk. U myšího modelu aterosklerózy byla většina cirkulujících molekul sP-selektinu endoteliálního původu (Burger, 2003) a u nemocných s bolestí na hrudi nebyla zjištěna korelace mezi expresí P-selektinu na destičkách a hladinou jeho solubilní formy v plazmě (Gurbel, 2000 A). Zvýšení hladiny sP-selektinu je považováno u nemocných bez jiného zánětlivého onemocnění či traumatu za ukazatel kardiovaskulárního rizika (Hillis, 2002, Ridker, 2001).

Hladiny sP-selektinu byly v našem souboru nemocných s těžkou familiární hypercholesterolemií zvýšeny i navzdory pravidelné léčbě LDL-aférou. U nemocných nebylo zjištěno jiné akutní ani chronické zánětlivé onemocnění. Elevace sP-selektinu má pravděpodobnou souvislost s aktivitou procesů aterogeneze, především s aktivitou endoteliálních buněk.

LDL-aférou způsobila signifikantní reprodukovatelný pokles sP-selektinu, nevedla však k normalizaci jeho hladin. Významná adsorpce sP-selektinu v imunoadsorpční koloně nebyla prokázána. Na poklesu se podílí diluce plazmy nemocného náhradními roztoky. Na souvislost poklesu hladiny P-selektinu s poklesem hladiny LDL-cholesterolu ukazuje přítomnost jejich vzájemná korelace, i když nad hranicí statistické významnosti. Lze tedy soudit, že LDL-aférou pravděpodobně měla, a to především prostřednictvím poklesu LDL-cholesterolu za následek pokles zvýšené aktivity endotelu, kterou sP-selektin především odráží. Kromě přímé souvislosti se změnami LDL-cholesterolu je možná i spojitost pozorovaného poklesu hladin sP-selektinu s eliminací či naopak aktivací některých dalších činitelů během LDL-aférou. Tyto změny se tak mohou podílet na „pleotropních“ účincích LDL-aférou. Analogický, i když z dlouhodobého hlediska hodnocený je nález redukce původně zvýšených koncentrací v tomto případě sE-selektinu při léčbě nemocných s těžkou hypercholesterolemií statiny, o kterých je známo, že kromě snižování cholesterolu mají širokou paletu dalších účinků, mimo jiné na stabilizaci aterosklerotických plátů (Hackman, 1996).

Signifikantní negativní korelaci velikosti poklesu sP-selektinu s hladinami sE-selektinu před i po LDL-aféřeze je možné vysvětlit zvýšenou aktivitou endoteliálních buněk, kterou předpokládáme u nemocných se zvýšenou hladinou sE-selektinu, a která může být obtížněji ovlivnitelná LDL-aférezou. Ta proto mohla vést k menšímu poklesu sP-selektinu u těchto nemocných.

Pokles sP-selektinu po proceduře byl popsán také v případě heparinem indukované precipitace LDL-cholesterolu (metoda HELP firmy B. Braun, Melsungen, Německo), kde se však, na rozdíl od našeho souboru, na poklesu podílela také eliminace P-selektinu v koloně (Pulawski, 2002).

Koncentrace **E-selektinu**, který má původ výhradně v aktivovaném endotelu a je považován za specifický ukazatel aktivace endotelu, byly v normě. V rozporu s našimi výsledky, Sampietro shledal ve své studii signifikantní zvýšení průměrné bazální hladiny sE-selektinu u 8 nemocných s familiární hypercholesterolemií před pravidelně prováděnou LDL-aférezou, v tomto případě na principu dextransulfátové adsorpce pomocí systému Liposorber LA-15 (Kaneka Co., Osaka, Japonsko) (Sampietro, 1997). Naše studie byla provedena u nemocných dlouhodobě léčených LDL-aférezou v relativně stabilizovaném stavu, kdy již mohlo dojít k alespoň částečné normalizaci endoteliálních funkcí. Údaj o celkové délce léčby LDL-aférezou, stejně tak jako explicitní údaj o léčbě statiny, které naši nemocní všichni v době odběrů dlouhodobě užívali a které mohou snižovat zvýšené hladiny sE-selektinu u hypercholesterolemických pacientů (Hackman, 1996), ve výše uvedené studii chybí.

Po LDL-aféřeze nedošlo ke signifikantnímu poklesu hladin sE-selektinu. Narozdíl od našich výsledků pozoroval Sampietro statisticky významný pokles hladiny sE-selektinu po LDL-aféřeze (o 26%) přes to, že poklesy hladin lipidů po LDL-aféřeze byly srovnatelné s poklesy hladin našeho souboru. Jedním z možných vysvětlení absence poklesu sE-selektinu po LDL-aféřeze v našem souboru je skutečnost, že jeho hladiny nebyly statisticky signifikantně zvýšeny. Předpokládaný pokles aktivity endotelu, vyvolaný rychlou redukcí koncentrace cholesterolu může být v tomto případě menší a tudíž obtížněji detekovatelný než v případě, že jsou hladiny sE-selektinu významně zvýšeny. Dalším tématem k zamyšlení a možným důvodem, proč sP-selektin klesl a sE-selektin ne je odlišná kinetika sP- a sE-selektinu. Zatím co změny u membránového P-selektinu se pohybují v řádu minut, u E-selektinu jsou významně pomalejší. Je nutno zdůraznit, že tato fakta se netýkají solubilních, ale membránových selektinových molekul. U solubilních forem není rychlost změn plazmatických hladin do detailu známa. Proto je otázkou, zda je našimi metodami detekovatelný pokles sE-selektinu během 3-4 hodin trvání LDL-aféřezy vůbec možný, pokud

není způsoben adsorpcí v koloně nebo v linkách separačního setu. Adsorpce v koloně byla však ve studii Sampietra, který pokles sE-selektinu po adsorpci LDL-cholesterolu na dextransulfát prokázal, vyloučena srovnáním hladin před a po vstupu do kolony. Autor zmiňované práce považuje vliv naředění pacientova oběhu náhradními roztoky za zanedbatelný díky vhodnému načasování odběrů. Významná eliminace sE-selektinu kolonami určenými k dextransulfátové adsorpci nebyla potvrzena ani v další studii, která prokázala také signifikantní pokles sE-selektinu po LDL-aféřeze, a to při užití nejen výše zmíněné metody adsorpce LDL-cholesterolu na dextransulfát (systém Liposorber LA-15 firmy Kaneka, Osaka, Japonsko) u 7 nemocných, ale i u heparinem indukované precipitace LDL-cholesterolu (metoda HELP firmy Braun, Melsungen, Německo) také u 7 nemocných a u metody přímé adsorpce LDL-cholesterolu (DALI firmy Fresenius, St. Wendel, Německo) u 6 nemocných (Empen, 2002). U všech metod byla obdobná míra poklesu LDL-cholesterolu. Největší pokles E-selektinu byl pozorován v případě heparinem indukované precipitace (31%), kde byla však i největší vazba adhezních molekul v koloně, u zbylých dvou metod klesl E-selektin o 6% (Empen, 2002). Tyto výsledky tedy ukazují, že alespoň v případě dextransulfátové adsorpce je signifikantní pokles E-selektinu, který nebyl způsoben vazbou v koloně, možný i v omezeném časovém intervalu během LDL-aféřezy a že byl, stejně tak jako pokles sP-selektinu ve studii naší, způsoben alespoň z části buď snížením syntézy a/nebo uvolňování molekul nebo zvýšením jejich odbourávání, které nastalo během LDL-aféřezy. U kolon LDL-Lipopak (Pocard, Ltd.), užívaných na našem pracovišti, jsme adsorpci E-selektinu neprokázali.

MCP-1 řídí migraci leukocytů do tkání postižených zánětem (Butcher, 1991). Jeho zvýšení je spojeno se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem (de Lemos, 2003). Plazmatické hladiny MCP-1 byly v souboru nemocných v normě a nelišily se od kontrolního souboru. Po LDL-aféřeze statisticky signifikantně klesly. Na tomto poklesu se významně podílela adsorpce MCP-1 v koloně, kterou jsme prokázali srovnáním jeho hladin v plazmě před a po průtoku kolonou. Přesto byly koncentrace MCP-1 ve vymývacím roztoku z kolon pod hranicí detekce. Nepovažujeme proto testování hladin sledovaných parametrů ve vymývacím roztoku z kolon uprostřed jejich regenerace za vhodnou metodou k vyloučení adsorpce v koloně. Příčinou selhání může být načasování odběru vzorku v průběhu vymývání nebo nedostatečná citlivost užití metody. Eliminace MCP-1 během LDL-aféřezy může teoreticky krátkodobě omezit chemotaxi monocytů a přispět k celkovému příznivému efektu LDL-aféřezy.

### **3.5.2.1.5. Závěr**

Studovali jsme hladiny sP-selektinu, sE-selektinu a MCP-1 u nemocných s těžkou familiární poruchou metabolismu lipidů a jejich změny po LDL-aféřeze. Dynamika hladin selektinů byla v případě LDL-aféřezy založené na principu imunoadsorpce v literatuře popsána pouze u našeho souboru nemocných (Bláha, 2004 A), a to na základě těchto výsledků. Vliv extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu na hladinu MCP-1 nebyl popsán u žádné v současnosti užívané metody. Preaféretická hladina MCP-1 a selektinů může odrážet aktivitu imunitního a endoteliálního systému u nemocných dlouhodobě léčených LDL-aférezou. Po LDL-aféřeze klesla hladina P-selektinu a MCP-1. Pokles byl z části způsoben dilucí pacientova oběhu náhradními roztoky, u MCP-1 významnou vazbou v imunoadsorpčních kolonách. Vliv snížené produkce a/nebo zvýšeného odbourávání těchto imunologicky aktivních molekul nebyl kvantifikován, nicméně jejich redukce se pravděpodobně podílí na celkovém efektu LDL-aférez na proces aterosklerózy. P-selektin by se mohl po dalším zkoumání stát ukazatelem efektu jednotlivé LDL-aféřezy především na endoteliální, v menší míře na destičkové funkce.

U kolon LDL-Lipopak nedochází, na rozdíl od některých jiných eliminačních systémů LDL-cholesterolu, k významné adsorpci P- a E-selektinu v koloně. Jiné kolony určené k LDL-imunoadsorpci nebyly s ohledem na eliminaci selektinových adhezních molekul a MCP-1 podle doposud dostupných literárních údajů testovány.

### **3.5.2.2. Močový neopterin a mikroalbuminurie u nemocných léčených LDL-aférou**

#### **3.5.2.2.1. Cíle práce**

- a) zjistit, zda prudký pokles LDL-cholesterolu při LDL-aférou má odezvu v aktivitě imunitního systému a mikrovaskulární permeabilitě pro albumin. Hypotézou bylo, že případné změny v močovém vylučování neopterinu odrážejí změny aktivity monocytárního systému, spojené s eliminací cholesterolu.
- b) zhodnotit možný vztah hladin močového neopterinu a albuminu k tíži hypercholesterolemie u nemocných léčených LDL-aférou.
- c) alespoň v základních rysech zhodnotit vztah mikroalbuminurie k fibrinolytickému systému a funkci endotelu u sledovaného souboru nemocných. V této části jsme využili měření některých parametrů, které jsou v literatuře uváděny ve vztahu k mikroalbuminurii a ateroskleróze, a které byly stanoveny v téže době jako součást společného výzkumného úkolu IGA MZ ČR NR/7006-3 a výzkumu Dr. Blažka. Jedná se o trombomodulin, inhibitor aktivátoru plazminogenu-1 (PAI-1), tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) a von Willebrandův faktor (vWF). Podrobné hodnocení těchto parametrů samotných však není cílem této práce.

#### **3.5.2.2.2. Soubor nemocných, kontrolní soubor, materiál a metody**

**Soubor nemocných** tvořilo 10 pacientů (6 mužů a 4 ženy) dlouhodobě léčených extrakorporální eliminací LDL-cholesterolu, v 8 případech metodou imunoadsorpce, u 2 nemocných filtrační metodou (viz kapitola 3.2.2. *Soubor nemocných léčených LDL-imunoadsorpcí a filtrační metodou*). **Kontrolní soubor** byl popsán v kapitole 3.3.2. *Kontrolní soubor pro kapitolu Močový neopterin a mikroalbuminurie u nemocných léčených LDL-aférou*.

#### **Sběr a zpracování vzorků**

První vzorek ranní moči ke stanovení neopterinu, albuminu a kreatininu byl odebrán ráno před LDL-aférou, další 1., 2., 5. a 14. den po LDL-aférou, poslední vzorek v den další LDL-aférou ráno. Vzorky byly označeny D0, D+1, D+2, D+5, D+14 a D<sub>poslední</sub>. Jeden vzorek byl odebrán také v den aférou večer v 18:00 hodin a označen D0<sub>18:00</sub>. Vzorky byly chráněny před světlem, ihned zmrazeny na teplotu -20°C a skladovány při téže teplotě. Vzorky krve ke stanovení celkového, LDL- a HDL-cholesterolu, Lp(a), močoviny, kreatininu, kyseliny močové, albuminu, glukózy a krevního obrazu byly odebrány z periferní žíly před a ihned po skončení LDL-aférou a vyšetřeny v ten samý den. Vzorky krve k vyšetření koncentrací fibrinogenu, PAI-1, trombomodulinu, von Willebrandova faktoru a t-PA byly odebrány stejným způsobem a plazma zamrazena a uchovávána při teplotě -80°C.

**Technické provedení LDL-aférez, použité laboratorní metody a statistická analýza** byly popsány v kapitole 3.4. *Materiál a metody*.

### **3.5.2.2.3. Výsledky**

#### **I. Technické parametry LDL-aférez**

Průměrný objem zpracované plazmy na kilogram váhy pacienta byl  $98 \pm 18$  ml/kg (78 - 123), medián 95 ml/kg. Objem zpracované plazmy na kg váhy pacienta pozitivně koreloval s procentuálním poklesem celkového cholesterolu ( $r_s = 0,707$ ,  $p = 0,037$ ). Interval mezi předchozí LDL-aférezou a právě vyšetřovanou LDL-aférezou byl  $26,8 \pm 18,4$  dní, medián 24,5 dní. Interval do následující procedury byl  $23,4 \pm 7,75$ , medián 26,0 dní. Tyto intervaly se statisticky významně nelišily ( $p = 0,938$ ).

#### **II. Hladiny lipidů a jejich změny po LDL-aférez**

Po LDL-aférezě statisticky signifikantně ( $p < 0,001$ ) poklesl celkový a LDL-cholesterol, apolipoprotein B, triacylglyceridy a Lp(a). HDL-cholesterol byl redukován méně výrazně, ale též statisticky významně ( $p < 0,05$ ). Hladiny lipidů a jejich komponent před a po aferéze a jejich pokles po LDL-aférez, vyjádřený v procentech výchozí hodnoty, jsou uvedeny v *Tabulce 10*.

**Tabulka 10. Hladiny lipidů před a po LDL-aférez a jejich pokles po LDL-aférez**

	<b>Před LDL-aférezou</b> Průměr ± SD <b>Medián</b>	<b>Po LDL-aférez</b> Průměr ± SD <b>Medián</b>	<b>Pokles (%)</b> Průměr ± SD <b>Medián</b>
<b>Celkový cholesterol</b> (mmol/l)	7,48 ± 1,20 <b>7,50</b>	2,33 ± 0,72 <b>2,02</b>	68,3 ± 9,3 <b>68,5</b>
<b>LDL – cholesterol</b> (mmol/l)	5,43 ± 1,39 <b>5,35</b>	1,06 ± 0,76 <b>0,85</b>	80,9 ± 12,2 <b>87,1</b>
<b>Triacylglyceridy</b> (mmol/l)	2,29 ± 1,66 <b>1,88</b>	1,15 ± 1,31 <b>0,55</b>	56,7 ± 20,6 <b>57,5</b>
<b>Non-HDL-cholesterol</b> (mmol/l)	6,00 ± 1,35 <b>6,03</b>	1,31 ± 0,76 <b>1,04</b>	77,9 ± 10,9 <b>79,1</b>
<b>Apolipoprotein-B</b> (g/l)	1,34 ± 0,37 <b>1,30</b>	0,29 ± 0,19 <b>0,31</b>	78,1 ± 15,5 <b>79,1</b>
<b>Lipoprotein (a)</b> (g/l)	0,64 ± 0,81 <b>0,78</b>	0,14 ± 0,20 <b>0,07</b>	68,8 ± 33,7 <b>81,2</b>
<b>HDL-cholesterol</b> (mmol/l)	1,48 ± 0,39 <b>1,39</b>	1,02 ± 0,22 <b>0,98</b>	29,1 ± 10,9 <b>27,8</b>

*LDL-cholesterol = Low density lipoprotein cholesterol, Non-HDL-cholesterol = non-high density lipoprotein cholesterol, HDL-cholesterol = high density lipoprotein cholesterol. SD = směrodatná odchylka. Pokles (%) = pokles hladin parametrů vyjádřený v procentech výchozí hodnoty.*



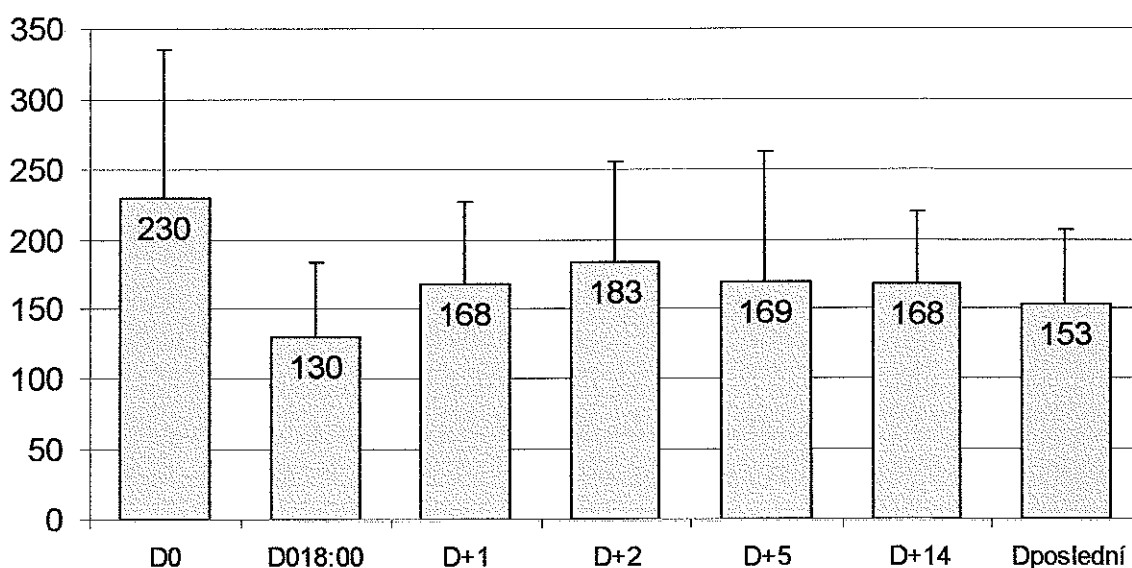
**III. Index neopterin/kreatinin****IIIa) Index neopterin/kreatinin – dynamika a korelace se sérovými lipidy**

Průměrná hodnota ( $\pm$  směrodatná odchylka) indexu neopterin/kreatinin u zdravých jedinců odpovídajícího věku a pohlaví byla  $123 \pm 53$   $\mu\text{mol/mol}$ , rozmezí 55 - 228, medián 108  $\mu\text{mol/mol}$ . Hodnoty indexu neopterin/kreatinin v moči pacientů v jednotlivých dnech jsou uvedeny v *Tabulce 11* a znázorněny *Grafem 11*.

**Tabulka 11. Hodnoty indexu neopterin/kreatinin v moči ( $\mu\text{mol/mol}$ )**

	Průměr $\pm$ SD	Rozmezí	Medián	p (srovnání s hodnotou před (D0))	p (srovnání s kontrolami)
<b>Před aferézou (D0)</b>	230 $\pm$ 105	151– 422	<b>179</b>	-	0,006
<b>Po aferéze (D0<sub>18:00</sub>)</b>	130 $\pm$ 53	57 – 242	<b>127</b>	<b>0,006</b>	0,766
<b>D+1</b>	168 $\pm$ 58	108 – 276	<b>152</b>	<b>0,064</b>	0,072
<b>D+2</b>	183 $\pm$ 73	122 – 371	<b>171</b>	<b>0,131</b>	0,020
<b>D+5</b>	169 $\pm$ 94	97 – 365	<b>133</b>	<b>0,064</b>	0,136
<b>D+14</b>	168 $\pm$ 51	95 – 259	<b>174</b>	<b>0,105</b>	0,047
<b>D před další aferézou</b>	152 $\pm$ 53	88 – 259	<b>153</b>	<b>0,064</b>	0,114

*SD* = směrodatná odchylka

**Graf 11. Průměrné hodnoty indexu neopterin/kreatinin ( $\mu\text{mol/mol}$ ) v jednotlivých sledovaných dnech**

Pokles indexu neopterin/kreatinin v den LDL-aferézy večer (D0<sub>18:00</sub>) oproti preaferetické hodnotě (D0) byl statisticky signifikantní ( $p = 0,006$ ).

Index neopterin/kreatinin v moči ráno před LDL-aferézou byl signifikantně vyšší než index neopterin/kreatinin u zdravých jedinců, zvýšení bylo signifikantní i 2. a 14. den po LDL-aferéze, v dalších dnech se pohybovalo pod hranicí statistické významnosti (viz *Tabulka 11*). Nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi ranními hodnotami indexu neopterin/kreatinin během období mezi dvěma LDL-aferézami, ale byl zjištěn statisticky signifikantní ( $p = 0,006$ ) pokles hodnoty indexu v den LDL-aferézy večer ( $D0_{18.00}$ ) oproti ranní preaferetické hodnotě a dále hraničně významné snížení ( $p = 0,064$ ) první den po LDL-aferéze ráno ( $D+1$ ), opět oproti preaferetické hodnotě (viz *Tabulka 11 a Graf 11*).

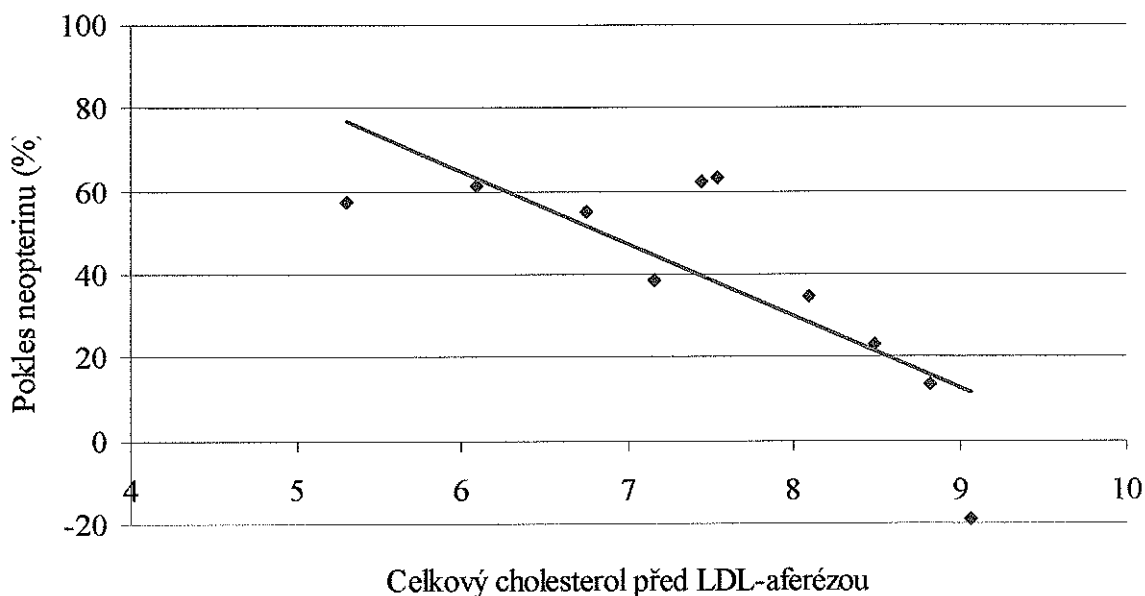
Velikost poklesu indexu neopterin/kreatinin v den LDL-aferézy večer signifikantně negativně korelovala s hladinou celkového a LDL-cholesterolu před LDL-aferézou a s jejich poklesem po LDL-aferéze, dále negativně s objemem zpracované plazmy na kilogram váhy pacienta (absolutní pokles neopterinu:  $r_s = -0,778$ ,  $p = 0,015$ , procentuální pokles neopterinu:  $r_s = -0,635$ ,  $p = 0,071$ ). Naopak nekorelovala s preaferetickou hodnotou indexu neopterin/kreatinin ( $r_s = 0,261$ ,  $p = 0,446$ ). Ranní hodnoty indexu neopterin/kreatinin (kromě  $D+1$ ) s hladinou lipidů nekorelovaly ( $p > 0,05$ ). Korelace indexu neopterin/kreatinin a s koncentracemi lipidů a jejich změnami po LDL-aferéze jsou uvedeny v *Tabulce 12* a znázorněny *Grafy 12-17*.

Tabulka 12. Korelace indexu neopterin/kreatinin se sérovými lipidy

Index neopterin/kreatinin	Korelován s	$r_s$	p
D+1	Lipoprotein (a) před aferézou	0,802	<b>0,003</b>
	Lipoprotein (a) po aferéze	0,718	<b>0,016</b>
	Pokles non-HDL-cholesterolu (%)	0,648	<b>0,038</b>
	Non-HDL-cholesterol po aferéze	- 0,661	<b>0,033</b>
	Pokles apolipoproteinu B (%)	0,624	<b>0,048</b>
	Pokles lipoprotein (a) (abs)	0,736	<b>0,013</b>
Pokles (%)	Celkový cholesterol před aferézou	- 0,806	<b>0,003</b>
	LDL-cholesterol před aferézou	- 0,806	<b>0,003</b>
	Non-HDL-cholesterol před aferézou	- 0,794	<b>0,004</b>
	HDL/LDL před aferézou	0,636	<b>0,043</b>
	Celkový cholesterol před další aferézou	- 0,758	<b>0,009</b>
	LDL-cholesterol před další aferézou	- 0,733	<b>0,013</b>
	Pokles celkového cholesterolu (abs)	- 0,733	<b>0,013</b>
	Pokles LDL-cholesterolu (abs)	- 0,758	<b>0,009</b>
Pokles (abs)	Celkový cholesterol před aferézou	- 0,770	<b>0,007</b>
	Pokles celkového cholesterolu (abs)	- 0,673	<b>0,029</b>
	LDL-cholesterol před aferézou	- 0,794	<b>0,004</b>
	Pokles LDL-cholesterolu (abs)	- 0,721	<b>0,016</b>
	Non-HDL-cholesterol před aferézou	- 0,782	<b>0,005</b>

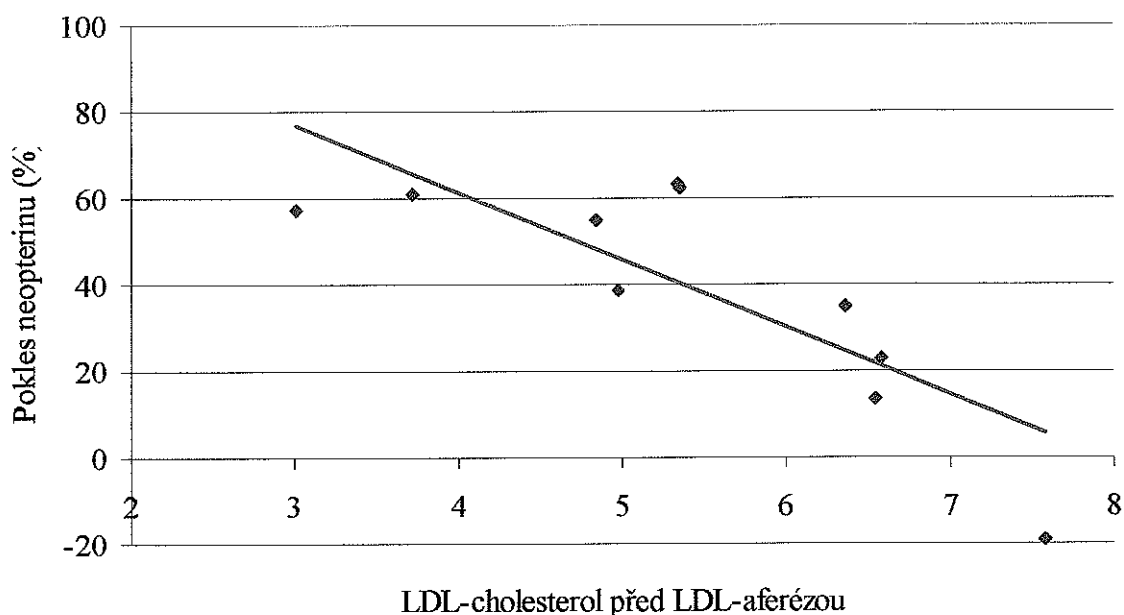
(abs) = pokles absolutní, (%) = pokles v procentech výchozí hodnoty.  $r_s$  = Spearmaniv koeficient pořadové korelace

**Graf 12. Vztah procentuálního poklesu indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféře a koncentrace celkového cholesterolu před LDL-aférou**



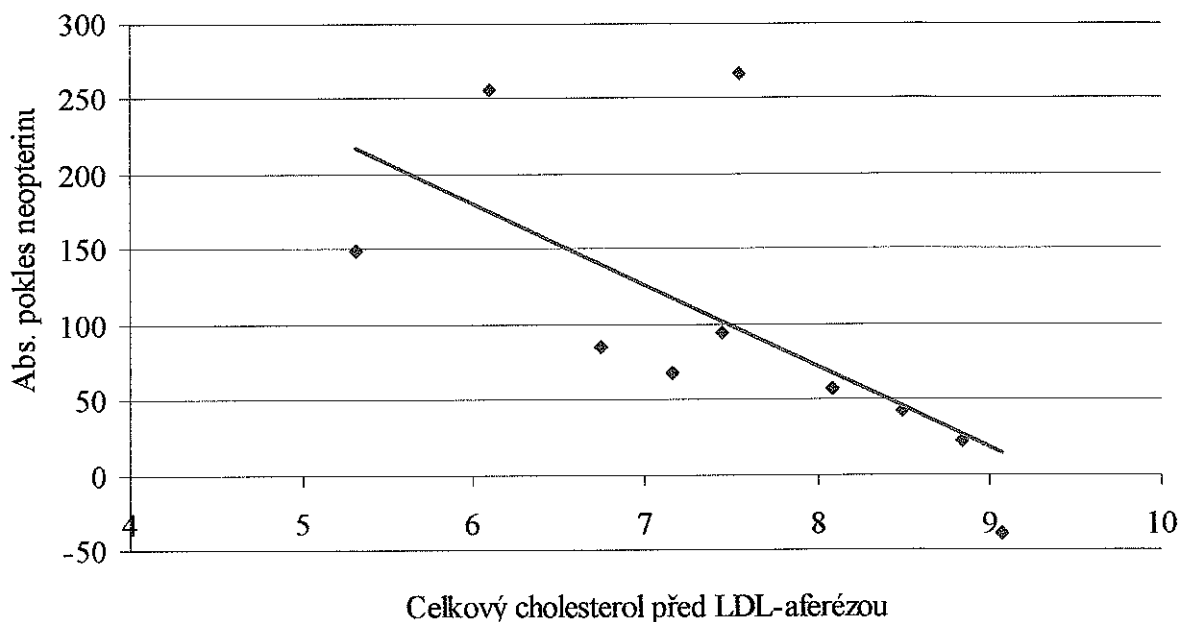
*Procentuální pokles hodnoty indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféře významně negativně koreloval s koncentrací celkového cholesterolu (mmol/l) před LDL-aférou ( $r_s = -0,806$ ,  $p = 0,003$ ).*

**Graf 13. Vztah procentuálního poklesu indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféře a koncentrace LDL-cholesterolu před LDL-aférou**



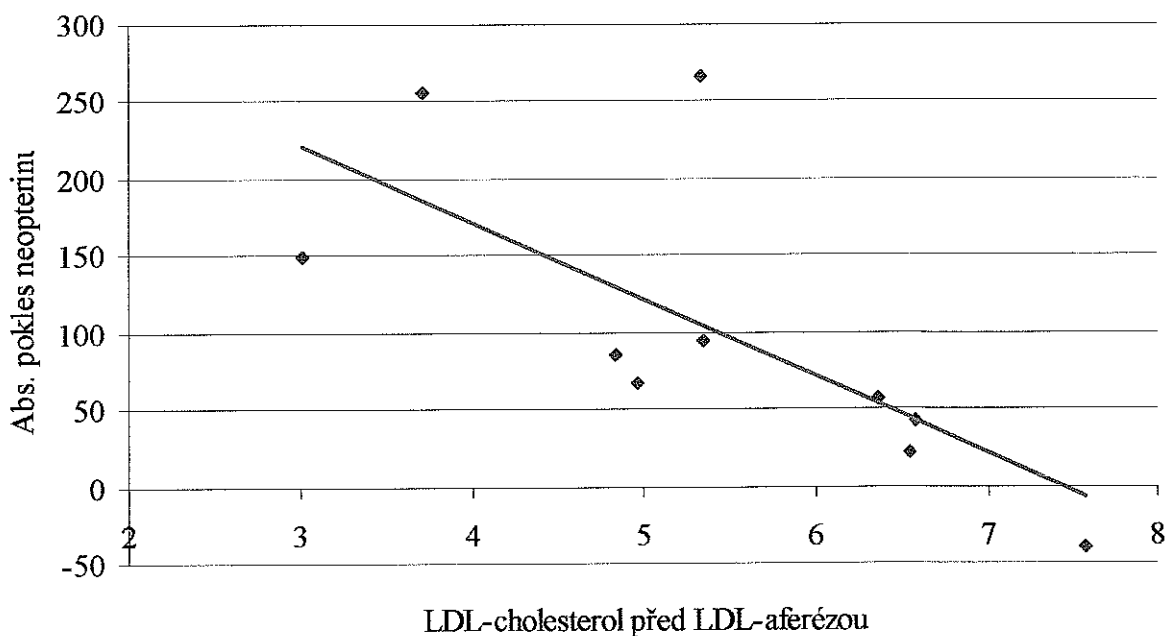
*Procentuální pokles hodnoty indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféře významně negativně koreloval s koncentrací LDL-cholesterolu (mmol/l) před LDL-aférou ( $r_s = -0,806$ ,  $p = 0,003$ ).*

**Graf 14. Vztah absolutního poklesu indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféze a koncentrace celkového cholesterolu před LDL-aférou**



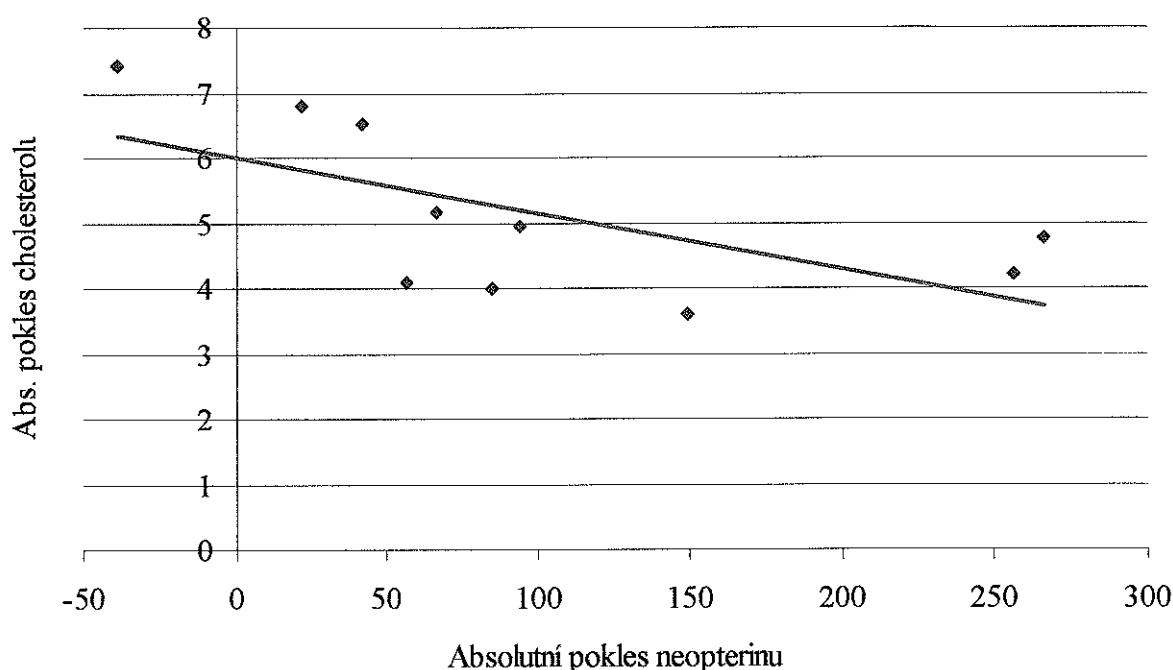
*Absolutní pokles hodnoty indexu neopterin/kreatinin ( $\mu\text{mol/mol}$ ) po LDL-aféze signifikantně negativně koreloval s koncentrací celkového cholesterolu (mmol/l) před LDL-aférou ( $r_s = -0,770$ ,  $p = 0,007$ ).*

**Graf 15. Vztah absolutního poklesu indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféze a koncentrace LDL-cholesterolu před LDL-aférou**



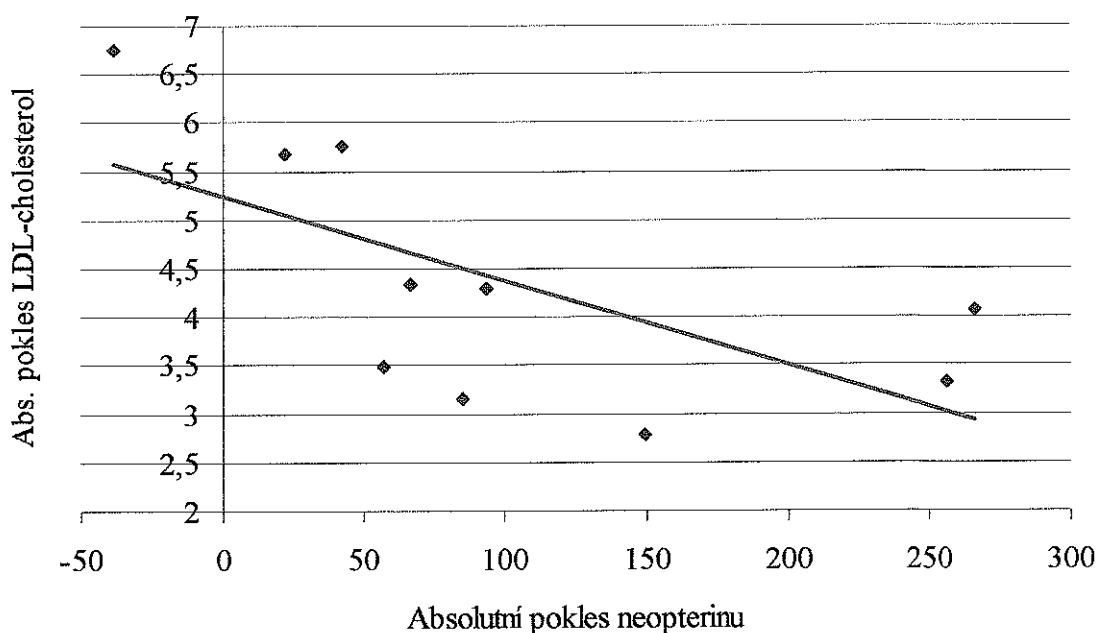
*Absolutní pokles hodnoty indexu neopterin/kreatinin ( $\mu\text{mol/mol}$ ) po LDL-aféze signifikantně negativně koreloval s koncentrací LDL-cholesterolu (mmol/l) před LDL-aférou ( $r_s = -0,794$ ,  $p = 0,004$ ).*

**Graf 16. Vztah absolutního poklesu koncentrace celkového cholesterolu a absolutního poklesu hodnoty indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféře**



*Absolutní pokles celkového cholesterolu (mmol/l) statisticky významně negativně koreloval s absolutním poklesem indexu neopterin/kreatinin ( $\mu\text{mol/mol}$ ) po LDL-aféře ( $r_s = -0,673$ ,  $p = 0,029$ ).*

**Graf 17. Vztah absolutního poklesu koncentrace LDL-cholesterolu a absolutního poklesu hodnoty indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféře**



*Absolutní pokles LDL-cholesterolu (mmol/l) statisticky významně negativně koreloval s absolutním poklesem indexu neopterin/kreatinin ( $\mu\text{mol/mol}$ ) po LDL-aféře ( $r_s = -0,673$ ,  $p = 0,029$ ).*

**IIIb) Index neopterin/kreatinin a některé ukazatele aktivace endotelu a stavu hemostázy**

Hladiny fibrinogenu, trombomodulinu, von Willebrandova faktoru, t-PA a PAI-1 před a po LDL-aféze a jejich průměrný pokles jsou uvedeny v *Tabulce 13*. Koncentrace všech parametrů po LDL-aféze statisticky významně klesla ( $p = 0,002$ , resp.  $0,008$ , resp.  $0,016$ , resp.  $0,016$ , resp.  $0,008$ ), viz *Graf 18 a 19*.

**Tabulka 13. Hladiny některých ukazatelů aktivace endotelu a stavu hemostázy před a po LDL-aféze**

	<b>Před LDL-afézou</b> Průměr ± SD (rozmezí) <b>Medián</b>	<b>Po LDL-aféze</b> Průměr ± SD (rozmezí) <b>Medián</b>	<b>Pokles (%)</b> Průměr ± SD (rozmezí) <b>Medián</b>
<b>Fibrinogen</b> (g/l)	3,2 ± 0,6 (2,4 - 4,0) <b>3,2</b>	2,3 ± 0,7 (1,3 - 3,3) <b>2,4</b>	27,5 ± 14,1 (10,8 - 58,3) <b>24,3</b>
<b>Trombomodulin</b> (µg/l)	4,03 ± 1,34 (2,35 - 6,63) <b>3,70</b>	2,72 ± 0,68 (2,05 - 4,17) <b>2,52</b>	30,5 ± 9,3 (12,8 - 43,2) <b>30,3</b>
<b>vWF</b> (%)	129 ± 28 (82 - 162) <b>131</b>	112 ± 31 (53 - 136) <b>122</b>	14,6 ± 12,4 (-5,2 - 35,4) <b>12,6</b>
<b>t-PA</b> (µg/l)	4,8 ± 1,9 (2,2 - 7,5) <b>5,0</b>	4,2 ± 1,7 (2,2 - 6,6) <b>4,5</b>	12,8 ± 10,2 (0,0 - 33,3) <b>10,2</b>
<b>PAI-1</b> (µg/l)	85,5 ± 50,2 (27,1 - 172,0) <b>94,5</b>	65,8 ± 55,9 (15,3 - 166,0) <b>52,9</b>	31,0 ± 26,0 (75,8 - 3,49) <b>25,8</b>

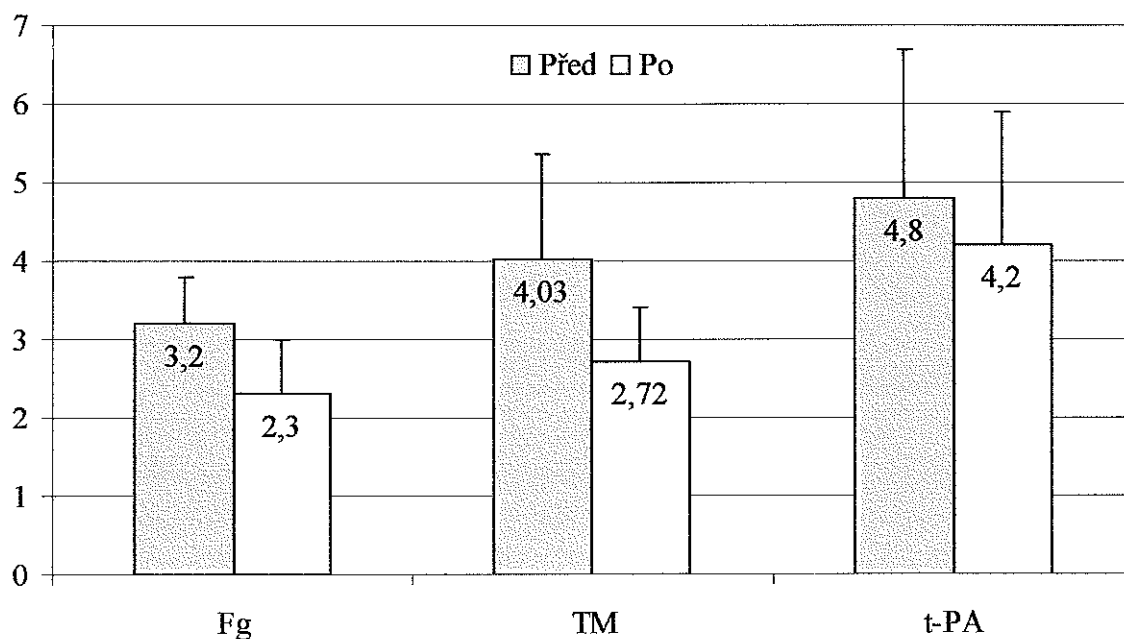
vWF = von Willebrandův faktor, t-PA = tkáňový aktivátor plazminogenu, PAI-1 = inhibitor aktivátoru plazminogenu-1, SD = směrodatná odchylka. Pokles (%) = pokles hladin jednotlivých parametrů vyjádřený v procentech výchozí hodnot; u všech parametrů byl statisticky významný ( $p < 0,05$ ).

Index neopterin/kreatinin v moči nekoreloval s hladinami fibrinogenu, trombomodulinu, von Willebrandova faktoru ani t-PA ( $p > 0,05$ ), ale 1. den po LDL-aféze ráno (D+1) koreloval s velikostí poklesu trombomodulinu ( $r_s = 0,760$ ,  $p = 0,009$ ), von Willebrandova faktoru ( $r_s = 0,857$ ,  $p < 0,002$ ), t-PA ( $r_s = 0,620$ ,  $p = 0,048$ ) a PAI-1 ( $r_s = 0,748$ ,  $p = 0,011$ ) po LDL-aféze.

**IIIc) Index neopterin/kreatinin a další parametry**

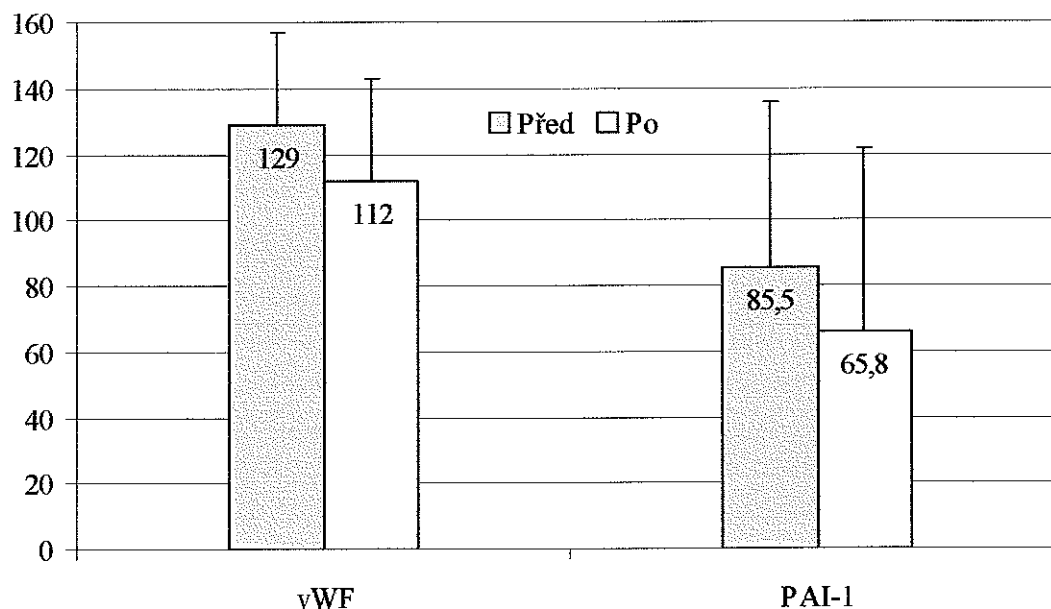
Index neopterin/kreatinin v moči nekoreloval s žádným z dalších parametrů uvedených v *Tabulce 16* (viz níže).

**Graf 18. Průměrné koncentrace fibrinogenu, trombomodulinu a tkáňového aktivátoru plazminogenu-1 před a po LDL-aféřeze**



*Fg = fibrinogen (g/l), TM = trombomodulin ( $\mu\text{g/l}$ ), t-PA = tkáňový aktivátor plazminogenu ( $\mu\text{g/l}$ ). Pokles koncentrace všech uvedených ukazatelů po LDL-aféřeze byl statisticky signifikantní ( $p < 0,05$ ).*

**Graf 19. Průměrné koncentrace von Willebrandova faktoru a inhibitoru aktivátoru plazminogenu-1 před a po LDL-aféřeze**



*vWF = von Willebrandův faktor (%), PAI-1 = inhibitor aktivátoru plazminogenu-1 ( $\mu\text{g/l}$ ). Oba parametry po LDL-aféřeze signifikantně klesly ( $p < 0,05$ ).*



#### **IVa) Index albumin/kreatinin – dynamika a korelace s indexem neopterin/kreatinin a se sérovými lipidy**

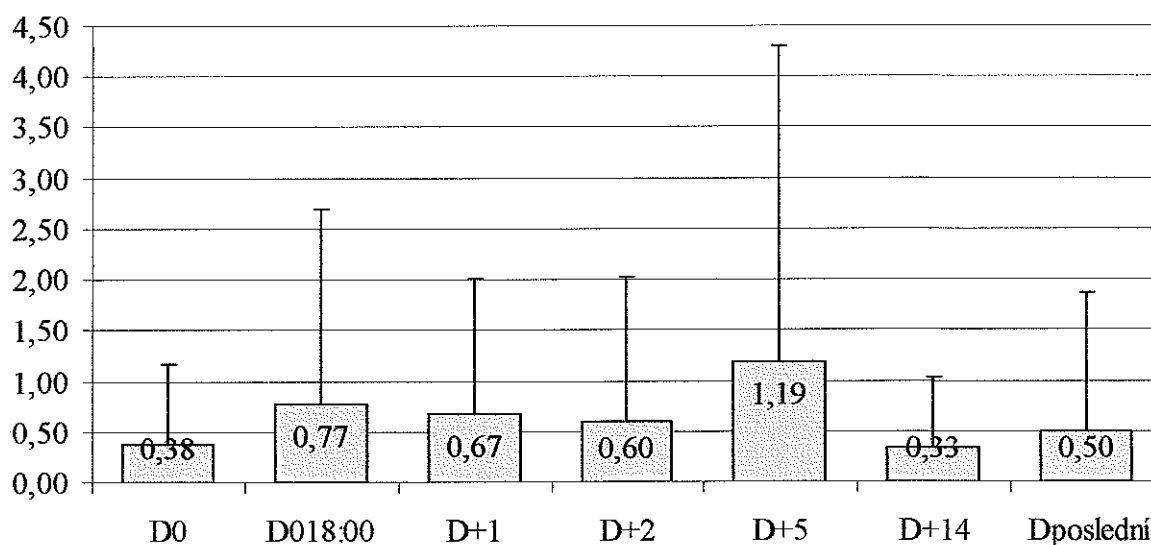
Hodnoty indexu albumin/kreatinin jsou uvedeny v *Tabulce 14.* a zobrazeny v *Grafu 20.* Mikroalbuminurie se vyskytla u dvou (20%) pacientů. Limit 0,7 mg/mmol, který je považován za významný při posuzování individuálního rizika aterosklerózy, byl dosažen celkem u třech (30%) nemocných. U dalších 6 pacientů byl index pozitivní, ale nedosáhl tohoto limitu. Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v ranních hodnotách tohoto indexu v jednotlivých dnech, ani po aferéze večer ( $p > 0,05$ ).

**Tabulka 14. Hodnoty indexu albumin/kreatinin v moči (mg/mmol)**

	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián	p (srovnání s D0)
<b>Před aferézou (D0)</b>	0,38 ± 0,78	0,00 – 2,45	<b>0,01</b>	-
<b>Po aferéze (D0<sub>18:00</sub>)</b>	0,77 ± 1,93	0,00 – 6,24	<b>0,11</b>	<b>0,359</b>
<b>D+1</b>	0,67 ± 1,34	0,00 – 4,12	<b>0,07</b>	<b>0,375</b>
<b>D+2</b>	0,60 ± 1,42	0,00 – 4,59	<b>0,07</b>	<b>0,563</b>
<b>D+5</b>	1,19 ± 3,12	0,00 – 9,98	<b>0,01</b>	<b>0,438</b>
<b>D+14</b>	0,33 ± 0,71	0,00 – 2,26	<b>0,06</b>	<b>0,844</b>
<b>Před další aferézou</b>	0,50 ± 1,36	0,00 – 4,35	<b>0,01</b>	<b>1,000</b>

*SD = směrodatná odchylka*

**Graf 20. Průměrné hodnoty indexu albumin/kreatinin v jednotlivých dnech (mg/mmol)**



*Hodnoty indexu albumin/kreatinin se v jednotlivých sledovaných dnech statisticky signifikantně nelišily ( $p > 0,05$ ).*

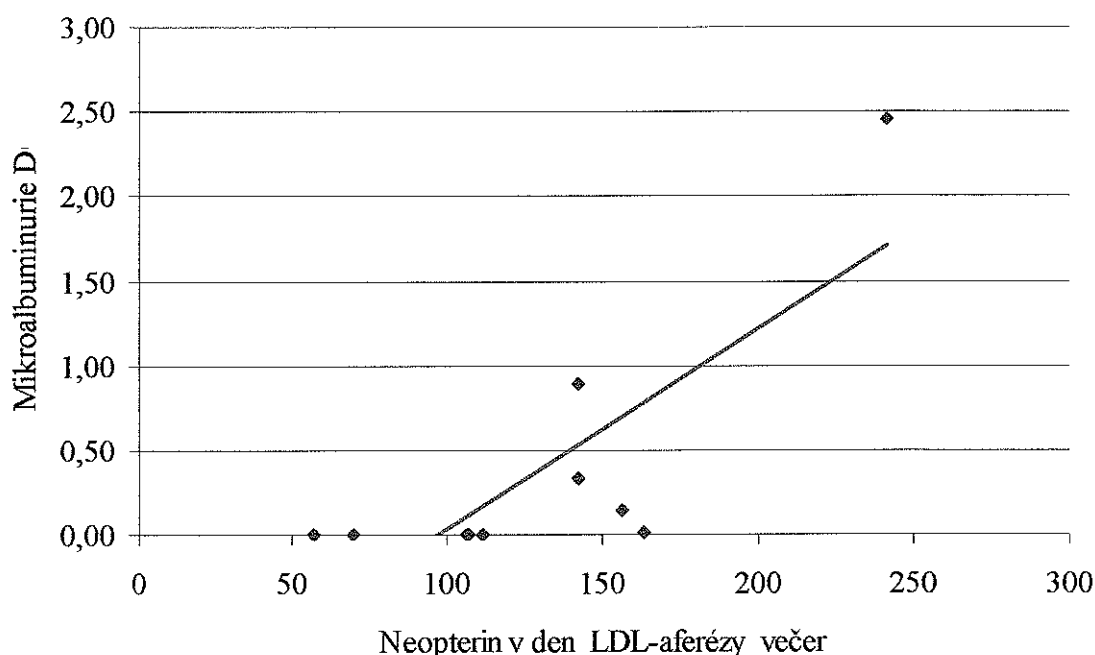
Index neopterin/kreatinin večer po aferéze koreloval s indexem albumin/kreatinin ráno před aferézou ( $r_s = 0,817$ ,  $p = 0,002$ , viz *Graf 21*), D+1 ( $r_s = 0,753$ ,  $p = 0,009$ ), D+2 ( $r_s = 0,859$ ,  $p = 0,000$ ), D+5 ( $r_s = 0,699$ ,  $p = 0,022$ ). Korelace velikosti poklesu indexu neopterin/kreatinin večer po aferéze s indexem albumin/kreatinin ráno před aferézou byla nad hranicí statistické významnosti ( $p = 0,067$ ,  $r_s = -0,588$ ). Korelace indexu albumin/kreatinin s lipidy a velikostí poklesu lipidů po LDL-aferéze jsou uvedeny v *Tabulce 15*. Nebyla zjištěna korelace mezi indexy albumin/kreatinin a ranními hodnotami indexu neopterin/kreatinin ani hladinou triacylglyceridů ( $p > 0,05$ ).

**Tabulka 15. Korelace indexu albumin/kreatinin se sérovými lipidy**

Index albumin/kreatinin	Korelován s	$r_s$	p
D0 před aferézou	Celkový cholesterol před aferézou	0,718	<b>0,016</b>
	LDL-cholesterol před aferézou	0,679	<b>0,025</b>
	Pokles celkového cholesterolu (%)	0,718	<b>0,016</b>
	Pokles LDL-cholesterolu (abs)	0,718	<b>0,016</b>
Před další aferézou	Celkový cholesterol před další aferézou	0,694	<b>0,022</b>
	LDL-cholesterol před další aferézou	0,675	<b>0,029</b>
D+1	Celkový cholesterol před aferézou	0,652	<b>0,038</b>
	Lp (a) před aferézou	0,750	<b>0,011</b>
	Pokles LDL-cholesterolu (abs)	0,714	<b>0,019</b>
	Poklesem Lp(a) (abs)	0,753	<b>0,009</b>
D+5	LDL-cholesterol před aferézou	0,683	<b>0,025</b>
	Celkový cholesterol před aferézou	0,772	<b>0,007</b>
	Non-HDL-cholesterol před aferézou	0,649	<b>0,038</b>
	Lp (a) před aferézou	0,644	<b>0,038</b>
	Pokles LDL-cholesterolu (abs)	0,683	<b>0,025</b>
	Poklesem Lp(a) (abs)	0,657	<b>0,033</b>
D+14	Lp (a) před aferézou	0,749	<b>0,011</b>
	Lp (a) po aferéze	0,663	<b>0,033</b>

(abs) = pokles absolutní, (%) = pokles v procentech výchozí hodnoty.  $r_s$  = Spearmanův koeficient pořadové korelace

**Graf 21. Vztah indexu neopterin/kreatinin v den LDL-aférézy večer a indexu albumin/kreatinin před LDL-aférézou**



Graf je zařazen pro ilustraci zjištěných pozitivních korelací mezi indexem neopterin/kreatinin v den LDL-aférézy večer a indexem albumin/kreatinin, stanoveným v několika různých dnech (viz text). V uvedeném případě pro index albumin/kreatinin před LDL-aférézou je  $r_s = 0,817$ ,  $p = 0,002$ .

#### **IVb) Index albumin/kreatinin a některé ukazatele aktivity endotelu a stavu hemostázy**

Index albumin/kreatinin nekoreloval s fibrinogenem, t-PA ani s PAI-1, ale byla nalezena korelace na hranici statistické významnosti indexu albumin/kreatinin před LDL-aférézou s trombomodulinem před ( $r_s = 0,683$ ,  $p = 0,047$ ) a po aféře ( $r_s = 0,675$ ,  $p = 0,059$ ) a s velikostí jeho poklesu během aférézy ( $r_s = 0,602$ ,  $p = 0,060$ ). Také v D+1, D+5, D+14 a v den před další aférézou koreloval index albumin/kreatinin s trombomodulinem před ( $r_s = 0,802$ ,  $p = 0,010$ , resp.  $r_s = 0,888$ ,  $p = 0,000$ , resp.  $r_s = 0,615$ ,  $p = 0,086$ , resp.  $r_s = 0,856$ ,  $p = 0,002$ ) i po aféře ( $r_s = 0,826$ ,  $p = 0,005$ , resp.  $r_s = 0,913$ ,  $p = 0,000$ , resp.  $r_s = 0,675$ ,  $p = 0,059$ , resp.  $r_s = 0,984$ ,  $p = 0,000$ ). Index albumin/kreatinin v D+1, D+2 a v D+5 na hranici statistické významnosti koreloval s velikostí poklesu trombomodulinu po LDL-aféře ( $r_s = 0,602$ ,  $p = 0,060$ , resp.  $r_s = 0,596$ ,  $p = 0,060$ , resp.  $r_s = 0,623$ ,  $p = 0,048$ ). Hodnoty výše zmíněných parametrů a jejich změny po LDL-aféře jsou uvedeny v *Tabulce 13*.

**IVc) Index albumin/kreatinin a některé další parametry, které byly vyšetřeny pouze před LDL-aférou**

Hodnoty urey a kreatininu i parametry chemického vyšetření moči a močového sedimentu byly u všech nemocných v mezích normy. Index albumin/kreatinin nekoreloval ani s hladinou urey, kreatininu, ani s glykemií ( $p > 0,05$ ). Nemocní byli sledováni v metabolických poradnách, kde byl kontrolován stav metabolismu glycidů. Ve sledovaném souboru byl pouze jediný pacient s poruchou metabolismu glycidů, a to nemocný s diagnózou diabetu mellitu II. typu. U něho byla hodnota indexu albumin/kreatinin v normě, dokonce ve většině z vyšetřovaných dní byla nulová. Nebyla zjištěna korelace indexu albumin/kreatinin a počtu leukocytů a trombocytů, jejichž hodnoty se mohou zvyšovat při zánětlivém onemocnění, ani se středním objemem erytrocytů, který může být snížen u chronických zánětlivých stavů. Index albumin/kreatinin nekoreluje s hladinou sérového albuminu, negativního proteinu akutní fáze, jehož koncentrace se může snižovat při zánětlivých stavech, ani s dalšími parametry v *Tabulce 16*. Nebyla prokázána jeho signifikantní závislost na věku nemocných.

**Tabulka 16. Hodnoty parametrů, stanovených pouze před LDL-aférou**

	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián
<b>Věk (roky)</b>	44 ± 17	19 – 61	<b>48</b>
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26,0 ± 5,3	18,3 – 32,5	<b>25,4</b>
<b>Systolický tlak krve (Torr)</b>	126 ± 16	90 – 140	<b>125</b>
<b>Diastolický tlak krve (Torr)</b>	71 ± 12	50 – 85	<b>75</b>
<b>Urea (mmol/l)</b>	4,3 ± 1,2	2,7 - 6,5	<b>4,0</b>
<b>Kreatinin (μmol/l)</b>	86,5 ± 12,2	64,0 - 103,0	<b>87,5</b>
<b>Kyselina močová (μmol/l)</b>	356 ± 72	215 – 475	<b>364</b>
<b>Glykémie (mmol/l)</b>	4,2 ± 0,4	3,5 - 5,1	<b>4,8</b>
<b>Albumin (g/l)</b>	43,5 ± 2,5	39,4 - 47,0	<b>42,1</b>
<b>Leukocyty (x10<sup>9</sup>/l)</b>	6,5 ± 0,8	3,8 – 12,0	<b>5,8</b>
<b>Trombocyty (x10<sup>9</sup>/l)</b>	210 ± 61	93 – 295	<b>201</b>
<b>Sřední objem erytrocytu (fl)</b>	90,8 ± 4,7	84,0 - 99,1	<b>94,3</b>

*BMI = body mass index, SD = směrodatná odchylka*

#### **3.5.2.2.4. Diskuse**

Studie ukázala mírné, ale signifikantní zvýšení močového neopterinu u pacientů léčených LDL-aférou, přítomné i přes intenzivní léčbu hypercholesterolemie a absenci klinických známek progresu aterosklerózy. Zvýšení neopterinu může být vysvětleno aktivitou makrofágů v aterosklerotických plátech. Přítomnost jiných patologických stavů zvyšujících produkci neopterinu nebyla prokázána, naopak všichni nemocní měli prokázané aterosklerotické postižení v různých lokalizacích.

Signifikantní pokles neopterinu večer po aféře ve srovnání s hodnotou před LDL-aférou je v souladu s diurnálním rytmem neopterinu. Vliv LDL-aféry je v této chvíli nejasný. Trend poklesu neopterinu je patrný i následující den ráno po aféře a ranní hodnota neopterinu v tento den korelovala jako jediná s poklesem lipidů po aféře. Nicméně ve dnech před další aférou není zřetelně patrný očekávaný návrat neopterinu k preaférickým hodnotám přes to, že intervaly mezi aférami ( $p = 0,938$ ), ani hladiny cholesterolu ( $p = 0,922$ ) se před oběma aférami signifikantně nelišily. Nemocní s vyššími hladinami cholesterolu před aférou měli větší objemy zpracované plazmy a větší pokles cholesterolu během aféry. Pokud by pokles koncentrace neopterinu byl způsoben LDL-aférou, měl by být více vyjádřen u těchto nemocných ve srovnání s nemocnými s menšími objemy zpracované plazmy a nižšími vstupními hladinami cholesterolu. Avšak výsledky jsou opačné, s negativní korelací mezi velikostí poklesu neopterinu a objemem zpracované plazmy hladinou cholesterolu před aférou. I přes mohutné a rychlé změny hladin aterogenních činitelů LDL-aféra neovlivnila ranní močové koncentrace neopterinu signifikantně a statisticky významný pokles byl patrný pouze v den LDL-aféry večer. V současné době nelze vyloučit podíl jednotlivé procedury LDL-aféry na poklesu koncentrace močového neopterinu, dostupná data však nedovolují vzhledem k limitovanému počtu nemocných učinit v tomto ohledu další závěry. Podle našich znalostí, pouze jediná studie se zabývala vlivem extrakorporální eliminace cholesterolu na koncentrace neopterinu. U 30 nemocných s aterosklerózou, léčených metodou HELP byl sledován pokles zvýšených hladin sérového neopterinu po LDL-aféře, koncentrace močového neopterinu se však nezměnila (Vrecko, 1999).

Signifikantní negativní korelace velikosti poklesu neopterinu s hladinou celkového a LDL-cholesterolu před aférou a s velikostí poklesu celkového a LDL-cholesterolu po aféře může mít různá vysvětlení. Pacienti s lehčí hypercholesterolemií mohou mít i méně rozsáhlé a/nebo méně aktivní aterosklerotické léze. Systémová imunitní aktivace u těchto nemocných může být snadněji ovlivněna rychlým poklesem cholesterolu než u nemocných

s těžší hypercholesterolemií, kde imunitní aktivace plynoucí z pokročilejší aterosklerózy může být obtížněji ovlivněna změnami hladin cholesterolu. Menší pokles močového neopterinu večer po aferéze u nemocných s těžší hypercholesterolemií může též odrážet zúžení fyziologických diurnálních variací močové exkrece neopterinu následkem zvýšené bazální monocytární aktivity, pravděpodobně pocházející mimo jiné z aterosklerotických plátů.

Nemocní s větším poklesem trombomodulinu, vWF a PAI-1, ukazatelů aktivity endotelu měli vyšší koncentraci neopterinu v moči ráno po LDL-aferéze. Ta korelovala jako jediná ranní hodnota indexu neopterin/kreatin signifikantně s koncentrací Lp(a) před a po aferéze, s velikostí poklesu Lp(a) a s koncentrací non-HDL-cholesterolu po aferéze. Význam tohoto nálezu není zcela jasný. Je pravděpodobně další známkou přítomnosti vzájemných vazeb mezi aktivitou endotelu a imunitního systému, které jsou pod vlivem aterogenních činitelů, jako je Lp(a) a non-HDL-cholesterol. Nelze však vyloučit, že některé z nalezených signifikantních korelací jsou náhodné.

Nález mikroalbuminurie u pacientů s familiární hypercholesterolemií a korelace s hladinami cholesterolu je v rozporu s výsledky a závěry Zouvanise, který neshledal mikroalbuminurii ani u jednoho z 15 nemocných s familiární hypercholesterolemií (Zouvanis, 1995). Pozorování vysvětlil tím, že není souvislost mezi mikroalbuminurií a aterosklerózou familiární hypercholesterolemie, protože mikroalbuminurie ve spojení s aterosklerózou souvisí spíše s inzulinovou rezistencí a metabolickým syndromem (charakterizovaným mimo jiné hypertriacylglyceridemií a sníženou hladinou HDL-cholesterolu), než s čistou hypercholesterolemií. V našem případě byla mikroalbuminurie, tak, jak je doposud definována, nalezena u dvou homozygotů familiární hypercholesterolemie, třetí nemocný, který dosáhl limitu 0,7 mg/mmol, měl také čistou hypercholesterolemii. Všichni tři neměli zvýšené glykémie nalačno. Mikroalbuminurie nekorelovala ani s glykemií, HDL-cholesterolem, triacylglyceridy, kyselinou močovou, *BMI*, ani s krevním tlakem a obvodem pasu. U jediného nemocného s diabetem mellitem v souboru nebyla mikroalbuminurie nalezena. Stejně tak jako v našem souboru, asociace mikroalbuminurie s hypercholesterolemií byla nalezena i dalšími autory (Brndiar, 2001, Shankar, 2004).

U nemocných s větším močovým vylučováním albuminu byly, nehledě na splnění arbitrárně stanoveného limitu pro mikroalbuminurii, nalezeny signifikantně vyšší hladiny cholesterolu a vyšší močový neopterin večer po aferéze, na hranici statistické významnosti nižší pokles neopterinu večer po aferéze. Je možné, že nadir neopterinu odráží reziduální systémovou imunitní aktivitu pocházející z aterosklerotických plátů. Ta koreluje s ukazatelem mikrovaskulární dysfunkce – mikroalbuminurií. Tyto závěry podporuje i korelace indexu

albumin/kreatinin s trombomodulinem, ukazující na souvislost s aktivací a/nebo postižením endotelu.

Mikroalbuminurie se signifikantně nelišila v průběhu doby mezi dvěma LDL-aferézami. Toto pozorování je v rozporu s výsledky Sinzingera, který popsal pokles mikroalbuminurie druhý den po LDL-aferéze metodou adsorpce na dextransulfát s užitím kolon Liposorber LA-15 (Kaneka Co., Osaka, Japonsko) u tří pacientů s familiární hypercholesterolemií (Sinzinger, 1999). V našem souboru byl večer po LDL-aferéze pozorován dokonce vzestup koncentrace albuminu v moči u 7 nemocných (70%) a ráno po aferéze u 5 (50%) nemocných, změny však nebyly statisticky signifikantní. Možné zvýšení mikrovaskulární permeability pro albumin po LDL-aferéze by mohlo být následkem systémových změn nastávajících stykem krve s extrakorporálním oběhem, například aktivací komplementového systému, která u výše zmiňované adsorpce na dextransulfát bez účasti živočišných bílkovin nemusí být tolik vyjádřena, jako u imunoadsorpce pomocí ovčích protilátek, u které byla tato reakce již dříve prokázána (Pták, 2004). Jinou příčinou může být hypoperfuze ledvin následkem přechodné hypotenze, která je častým vedlejším účinkem hemaferéz a může být spjata také s aktivací komplementu.

#### **3.5.2.2.5. Závěr**

Krátkodobé změny močového vylučování neopterinu a albuminu v souvislosti s imunoadsorpcí LDL-cholesterolu nebyly doposud v literatuře popsány. Závěrem lze říci, že výsledky ukazují spojitost mezi mikrovaskulárním postižením, které je představováno mikroalbuminurií, aktivitou monocyto-makrofágového systému, reflektovanou hladinou neopterinu v moči a tíží hypercholesterolemie. Přítomnost mikrovaskulárního postižení je dokreslena korelací mikroalbuminurie s koncentrací trombomodulinu, reprezentující postižení/a nebo aktivaci endoteliálního systému. Velikost hodnoceného souboru nemocných je důvodem opatrnosti v interpretaci výsledků, nicméně se zdá, že močový neopterin večer (po aferéze) a pokles neopterinu večer (po aferéze) ve srovnání s ranní hodnotou jsou parametry, které si zaslouží další zkoumání, nejen u nemocných léčených LDL-aferézou. Mikroalbuminurie, zvláště je-li stanovena jako index neopterin/kreatinin, je levným a snadno dostupným parametrem, jehož vyšetření neobtěžuje nemocného dvacetičtyřhodinovým sběrem moči a přinese cenné informace o jeho kardiovaskulárním riziku. Naším doporučením je rozšířit užívání tohoto parametru v klinické praxi.

### **3.5.2.3. C-reaktivní protein, CD40 ligand, sérový neopterin a endoglin u nemocných léčených LDL-aférou**

#### **3.5.2.3.1. Cíle práce**

Cílem práce bylo vyhodnotit vliv změn působených LDL-aférou na dynamiku sérových koncentrací C-reaktivního proteinu, stanoveného vysoce senzitivní metodou (high-sensitivity CRP, hsCRP), solubilního CD40 ligandu (sCD40L), sérového neopterinu a solubilního endoglinu. Dalším cílem bylo vyhodnotit vzájemný vztah těchto parametrů mezi sebou a k hladinám lipidů, které jsou užívány jako prakticky jediný biochemický ukazatel při určování délky LDL-aférou a délky intervalů mezi LDL-aféroumi.

#### **3.5.2.3.2. Soubor nemocných, kontrolní soubor, materiál a metody**

**Soubor nemocných** byl popsán dříve v kapitolách 3.2.2. *Soubor nemocných léčených LDL-imunoadsorpcí nebo filtrační metodou*, **kontrolní soubor** byl popsán v kapitole 3.3.2. *Kontrolní soubor užitý v kapitole C-reaktivní protein, CD40 ligand, sérový neopterin a endoglin u nemocných léčených LDL-aférou*. **Technické provedení LDL-aférou, laboratorní vyšetření, metody užití k hodnocení eliminace vyšetřovaných substancí v eliminačním zařízení a statistická analýza** byly popsány v příslušných částech kapitoly 3.4. *Materiál a metody*.

#### **Sběr a zpracování vzorků**

Krev ke stanovení sérových koncentrací hsCRP, endoglinu, sCD40L, celkového, LDL- a HDL-cholesterolu a triacylglyceridů byla odebrána z periferní žíly těsně před a po dvou po sobě následujících LDL-aférou. Vzorky plazmy byly zmrazeny a uchovávány při teplotě -40°C.

#### **3.5.2.3.3. Výsledky**

Koncentrace všech vyšetřovaných parametrů u nemocných před a po první sledované LDL-aférou jsou uvedeny v *Tabulce 17*, koncentrace před a po následující LDL-aférou jsou uvedeny v *Tabulce 18*. Jejich pokles po první sledované LDL-aférou, vyjádřený v procentech výchozí hodnoty je pro první sledovanou LDL-aférou uveden v *Tabulce 19*, pro následující LDL-aférou v *Tabulce 20*.

#### **I. Lipidy v séru**

Pokles hladin lipidů po obou LDL-aférou byl statisticky signifikantní a jeho velikost se vzájemně od sebe signifikantně nelišila ( $p > 0,05$ , viz *Graf 22*).



## **II. High sensitivity CRP**

Průměrná sérová koncentrace hsCRP kontrolního souboru byla  $1,22 \pm 0,99$  mg/l, rozmezí 0,16 - 2,98 mg/l, medián 0,98 mg/l. Hodnoty hsCRP nemocných se před první, ani před následující LDL-aférou signifikantně nelišily od hodnot hsCRP kontrolního souboru ( $p = 0,443$ , resp.  $p = 0,792$ ).

Pokles hsCRP po obou LDL-aférou byl statisticky signifikantní (*Graf 23*) a jeho velikost se při obou LDL-aférou vzájemně od sebe statisticky signifikantně nelišila ( $p = 1,000$ ).

Neprokázali jsme statisticky signifikantní korelaci koncentrací hsCRP v séru s hladinami lipidů, s jejich změnami během aferézy, s koncentracemi ostatních vyšetřovaných parametrů, ani závislost na věku nemocných.

## **III. Solubilní CD40L**

Průměrná sérová koncentrace sCD40L kontrolního souboru byla  $6\ 361 \pm 1\ 546$  ng/l, rozmezí 2 884 – 9 130 ng/l, medián 6 407 ng/l. Koncentrace sCD40L nemocných před oběma LDL-aférou se statisticky signifikantně nelišily od sérových koncentrací kontrolní skupiny ( $p = 0,955$  resp.  $0,792$ ). Žádný z pacientů nevybočil z mezí norem dané laboratoře ani při první, ani při následující LDL-aférou.

V obou případech byl pokles hladiny CD40L statisticky signifikantní (*Graf 24*). Velikost poklesu, který nastal při obou LDL-aférou, se vzájemně od sebe statisticky signifikantně nelišila ( $p = 0,900$ ).

Sérová koncentrace sCD40L před první sledovanou LDL-aférou korelovala s celkovým cholesterolem ( $r_s = 0,721$ ,  $p = 0,016$ ) a LDL-cholesterolem před LDL-aférou ( $r_s = 0,818$ ,  $p = 0,002$ ) a LDL-cholesterolem po LDL-aférou ( $r_s = 0,770$ ,  $p = 0,007$ ). Při následující LDL-aférou korelovala koncentrace sCD40L před LDL-aférou pouze s LDL-cholesterolem po LDL-aférou ( $r_s = 0,784$ ,  $p = 0,005$ ) a negativně s velikostí poklesu LDL-cholesterolu po LDL-aférou ( $r_s = -0,733$ ,  $p = 0,013$ ), korelace s celkovým cholesterolem před LDL-aférou nebyla statisticky signifikantní ( $r_s = 0,558$ ,  $p = 0,067$ ). Nebyly nalezeny významné korelace s ostatními parametry, jejich změnami po LDL-aférou, ani závislost na věku nemocných.

## **IV. Neopterin v séru**

Průměrná sérová koncentrace neopterinu kontrolního souboru byla  $5,6 \pm 1,5$  nmol/l, rozmezí 3,3 - 8,3 nmol/l, medián 5,9 nmol/l. Koncentrace neopterinu nemocných před oběma LDL-aférou se statisticky signifikantně nelišily od sérových koncentrací neopterinu

kontrolní skupiny ( $p = 0,974$  resp.  $p = 0,955$ ). Při první LDL-aféře žádný z pacientů nepřekročil horní hranici normy dané laboratoře, před následující LDL-aférou měl jeden nemocný preaféretickou hladinu zvýšenu.

Změny, které nastaly po první sledované a po následující LDL-aféře se od sebe statisticky významně nelišily ( $p = 0,545$ ) a nebyly ani v jednom případě statisticky významné ( $p > 0,05$ ), viz *Graf 25*.

Nebyly pozorovány statisticky významné korelace koncentrací sérového neopterinu s žádným z ostatních parametrů, ani jejich závislost na věku nemocných.

#### **V. Solubilní endoglin**

Průměrná sérová koncentrace solubilního endoglinu u kontrolního souboru byla  $3,85 \mu\text{g/l} \pm 1,25$ , rozmezí  $1,89 - 6,37 \mu\text{g/l}$ , medián  $3,56 \mu\text{g/l}$ .

Ve srovnání s koncentracemi kontrolního souboru byla koncentrace endoglinu nemocných před oběma LDL-aférami statisticky významně zvýšena ( $p = 0,002$  resp.  $p = 0,038$ ), u hladin po obou LDL-aférami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl ( $p > 0,05$ ). Horní hranici normy dané laboratoře překročili před první LDL-aférou 3 nemocní (30%), před následující LDL-aférou 2 nemocní (20%), po první LDL-aféře byla koncentrace endoglinu u všech nemocných v normě, po následující LDL-aféře zůstala u jednoho nemocného hladina zvýšená přesto, že poklesla.

V obou případech byl pokles statisticky významný (*Graf 26*) a velikost poklesu při obou LDL-aférami se statisticky významně nelišila ( $p = 0,678$ ).

Koncentrace solubilního endoglinu nekorelovaly významně s žádným ze sledovaných parametrů a nebyla pozorována závislost na věku nemocných.

U všech vyšetřovaných parametrů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi změnami sérových koncentrací, které nastaly v případě imunoadsorpce a v případě reoféře ( $p > 0,05$ ).

**Výsledky koncentrací sledovaných parametrů v plazmě před vstupem a po výstupu z eliminačních médií** jsou uvedeny v *Tabulce 21*.

**Tabulka 17. Hladiny lipidů, hsCRP, sCD40L, neopterinu a endoglinu před a po první sledované LDL-aféřeze**

	Před LDL-aféřezou			Po LDL-aféřeze		
	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián
<b>Celkový cholest.</b> (mmol/l)	7,63 ± 1,62	5,45 - 10,82	<b>7,63</b>	2,14 ± 0,46	1,62 - 2,91	<b>2,13</b>
<b>LDL-cholesterol</b> (mmol/l)	5,52 ± 1,78	3,09 - 8,86	<b>5,73</b>	0,79 ± 0,56	0,24 - 2,08	<b>0,60</b>
<b>HDL-cholesterol</b> (mmol/l)	1,58 ± 0,45	0,94 - 2,30	<b>1,53</b>	1,08 ± 0,34	0,62 - 1,69	<b>1,09</b>
<b>Triacylglyceridy</b> (mmol/l)	2,26 ± 2,11	0,59 - 6,41	<b>1,20</b>	0,96 ± 0,95	0,25 - 2,89	<b>0,50</b>
<b>hsCRP</b> (mg/l)	1,88 ± 1,71	0,28 - 4,71	<b>1,00</b>	1,32 ± 1,52	0,21 - 4,36	<b>0,71</b>
<b>sCD40L</b> (pg/ml)	6498 ± 2529	3494 - 10500	<b>6395</b>	4057 ± 2560	409 - 8375	<b>3576</b>
<b>Neopterin</b> (nmol/l)	5,7 ± 1,1	4,2 - 7,3	<b>5,6</b>	5,5 ± 1,3	4,3 - 8,8	<b>5,1</b>
<b>Endoglin</b> (ng/ml)	5,74 ± 1,47	3,33 - 7,65	<b>5,55</b>	4,25 ± 1,17	2,49 - 6,28	<b>4,03</b>

SD = směrodatná odchylka

**Tabulka 18. Hladiny lipidů, hsCRP, sCD40L, neopterinu a endoglinu před a po následující LDL-aféře**

	Před LDL-aférou			Po LDL-aféře		
	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián
<b>Celkový cholest.</b> (mmol/l)	7,45 ±1,65	5,54 – 10,81	<b>7,28</b>	2,04 ± 0,39	1,53 – 2,91	<b>1,96</b>
<b>LDL-cholesterol</b> (mmol/l)	5,42 ± 1,71	3,06 – 8,84	<b>5,57</b>	0,79 ± 0,53	0,21 – 2,10	<b>0,68</b>
<b>HDL-cholesterol</b> (mmol/l)	1,56 ± 0,43	0,91 – 2,10	<b>1,51</b>	1,01 ± 0,32	0,60 – 1,67	<b>1,02</b>
<b>Triacylglyceridy</b> (mmol/l)	2,21 ± 2,08	0,61 – 5,98	<b>1,19</b>	0,89 ± 0,88	0,26 – 2,75	<b>0,49</b>
<b>hsCRP</b> (mg/l)	1,87 ± 1,64	0,20 - 4,88	<b>1,65</b>	1,21 ± 1,04	0,10 - 2,75	<b>0,99</b>
<b>sCD40L</b> (pg/ml)	3562 ± 3640	144 - 8710	<b>1986</b>	2045 ± 2598	59 – 7324	<b>706</b>
<b>Neopterin</b> (nmol/l)	5,0 ± 1,9	1,9 – 9,7	<b>4,5</b>	3,9 ± 1,8	0,9 – 6,2	<b>4,6</b>
<b>Endoglin</b> (ng/ml)	5,23 ± 1,78	1,90 – 8,31	<b>5,05</b>	4,2 ± 1,21	2,80 – 7,08	<b>3,94</b>

SD = směrodatná odchylka

**Tabulka 19. Pokles koncentrací lipidů, hsCRP, sCD40L, neopterinu a endoglinu po první sledované LDL-aféře, vyjádřený v procentech preaféretické hodnoty**

Pokles (%)	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián	p
<b>Celkový cholesterol</b>	71,7 ± 4,0	66,5 - 80,9	<b>71,3</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>LDL-cholesterol</b>	86,6 ± 5,6	76,5 - 92,2	<b>88,2</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>HDL-cholesterol</b>	31,6 ± 10,9	14,3 - 52,2	<b>32,4</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>Triacylglyceridy</b>	56,0 ± 17,4	18,9 - 73,4	<b>60,6</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>hsCRP</b>	32,0 ± 17,5	3,8 - 58,7	<b>34,2</b>	<b>0,002</b>
<b>sCD40L</b>	31,1 ± 43,6	-52,8 - 95,6	<b>40,2</b>	<b>0,037</b>
<b>Neopterin</b>	4,0 ± 15,7	-31,3 - 21,1	<b>6,5</b>	0,250
<b>Endoglin</b>	25,2 ± 12,5	3,9 - 51,2	<b>26,3</b>	<b>0,002</b>

SD = směrodatná odchylka. p udává statistickou významnost změny.

**Tabulka 20. Pokles koncentrací lipidů, hsCRP, sCD40L, neopterinu a endoglinu po následující LDL-aféze, vyjádřený v procentech preaféretické hodnoty**

Pokles (%)	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián	p
<b>Celkový cholesterol</b>	72,1 ± 4,6	64,2 – 79,6	<b>72,4</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>LDL-cholesterol</b>	86,4 ± 5,5	76,5 – 93,1	<b>88,1</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>HDL-cholesterol</b>	31,8 ± 11,2	13,9 – 53,3	<b>32,1</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>Triacylglyceridy</b>	57,1 ± 17,5	18,7 – 74,0	<b>61,1</b>	<b>&lt; 0,005</b>
<b>hsCRP</b>	37,7 ± 10,7	19,8 - 50,0	<b>40,0</b>	<b>0,002</b>
<b>sCD40L</b>	28,2 ± 56,2	-114,0 - 91,6	<b>37,7</b>	<b>0,014</b>
<b>Neopterin</b>	1,8 ± 74,1	-194,7 - 63,0	<b>10,7</b>	0,294
<b>Endoglin</b>	10,8 ± 44,7	-112,6 - 43,1	<b>20,9</b>	<b>0,038</b>

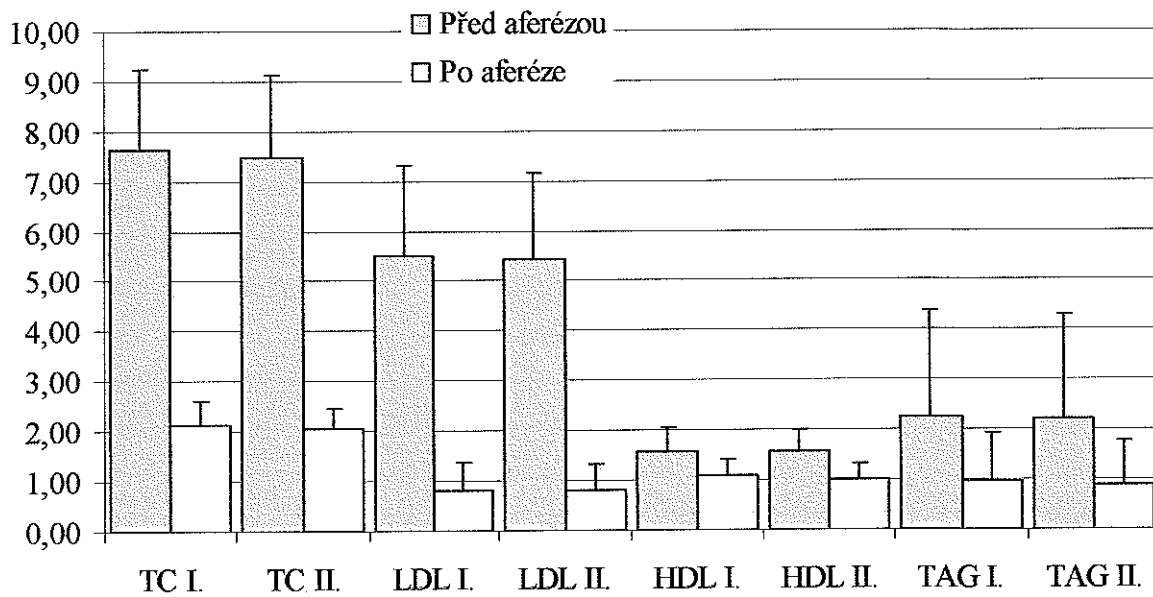
SD = směrodatná odchylka. p udává statistickou významnost změny.

**Tabulka 21. Výsledky koncentrací sledovaných parametrů v plazmě před vstupem a po výstupu z eliminačních médií**

Parametr	Typ kolony		Průměr ± SD	Medián	p
<b>hsCRP</b> (mg/l)	<b>LDL-Lipopak</b> n = 16	Před	3,03 ± 2,88	<b>1,9</b>	<b>p = 0,722</b>
		Po	2,83 ± 2,39	<b>2,65</b>	
	<b>Evaflux 4A</b> n = 4	Před	1,93 ± 1,36	<b>1,5</b>	<b>p = 0,115</b>
		Po	1,43 ± 0,93	<b>1,05</b>	
	<b>Oba</b> n = 20	Před	2,81 ± 2,65	<b>1,50</b>	<b>p = 0,225</b>
		Po	2,55 ± 2,23	<b>1,85</b>	
<b>CD40L</b> (pg/ml)	<b>LDL-Lipopak</b> n = 16	Před	55,4 ± 14,2	<b>52,9</b>	<b>p = 0,093</b>
		Po	48,6 ± 11,0	<b>49,2</b>	
	<b>Evaflux 4A</b> n = 4	Před	42,43 ± 5,0	<b>42,8</b>	<b>p = 0,225</b>
		Po	46,93 ± 3,1	<b>47,2</b>	
	<b>Oba</b> n = 20	Před	52,8 ± 13,8	<b>50,9</b>	<b>p = 0,231</b>
		Po	48,2 ± 9,9	<b>48,8</b>	
<b>Neopterin</b> (nmol/l)	<b>LDL-Lipopak</b> n = 16	Před	0,34 ± 0,33	<b>0,20</b>	<b>p = 0,765</b>
		Po	0,36 ± 0,32	<b>0,20</b>	
	<b>Evaflux 4A</b> n = 4	Před	0,40 ± 0,25	<b>0,35</b>	<b>p = 0,250</b>
		Po	0,95 ± 0,62	<b>1,1</b>	
	<b>Oba</b> n = 20	Před	0,36 ± 0,31	<b>0,2</b>	<b>p = 0,208</b>
		Po	0,48 ± 0,44	<b>0,3</b>	
<b>Endoglin</b> (ng/ml)	<b>LDL-Lipopak</b> n = 16	Před	3,31 ± 0,64	<b>3,20</b>	<b>p = 0,978</b>
		Po	3,25 ± 0,81	<b>3,25</b>	
	<b>Evaflux 4A</b> n = 4	Před	2,43 ± 0,95	<b>2,50</b>	<b>p = 0,562</b>
		Po	2,25 ± 1,40	<b>2,15</b>	
	<b>Oba</b> n = 20	Před	3,13 ± 0,77	<b>3,10</b>	<b>p = 0,621</b>
		Po	3,05 ± 1,01	<b>3,15</b>	

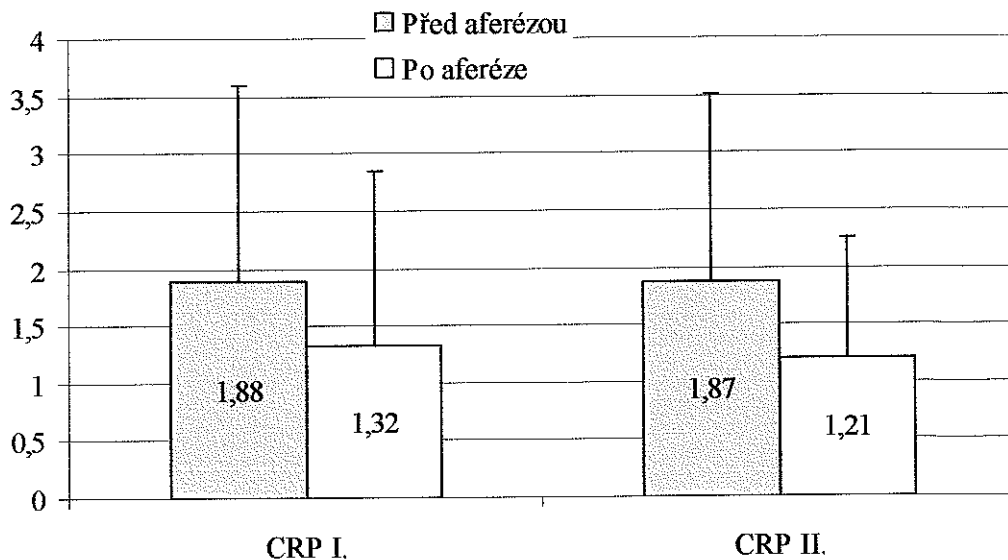
SD = směrodatná odchylka. p udává statistickou významnost změny

**Graf 22. Sérové koncentrace lipidů před a po obou sledovaných LDL-aferezách**



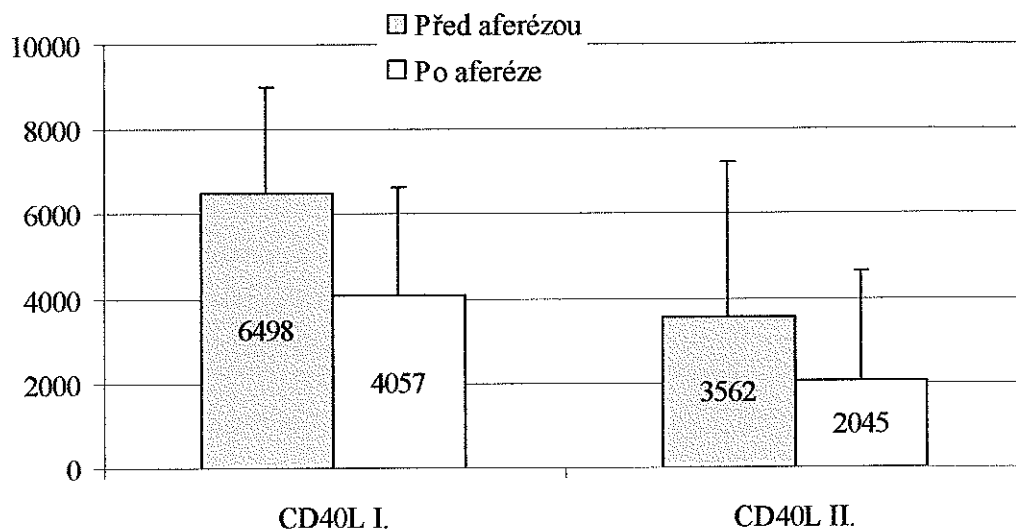
TC = celkový cholesterol, LDL = LDL-cholesterol, HDL = HDL-cholesterol a TAG = triacylglyceridy. Číslice I. resp. II. označují koncentrace vztahující se k první sledované resp. k následující LDL-aféře. Pokles všech sledovaných parametrů byl statisticky signifikantní ( $p < 0,005$ ) - viz Tabulka 17 - 20.

**Graf 23. Sérové koncentrace hsCRP před a po obou sledovaných LDL-aferezách**



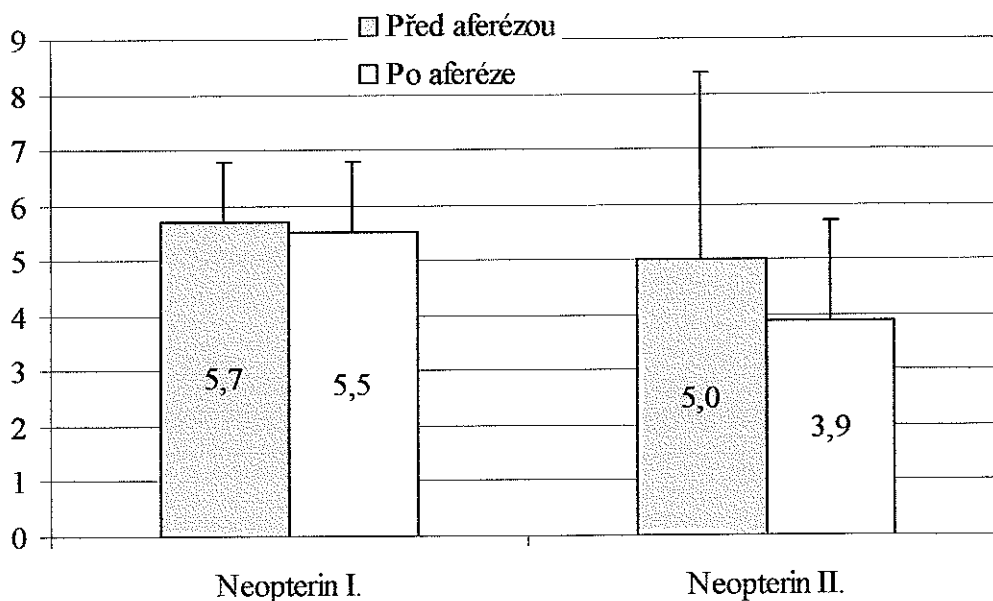
CRP I. označuje průměrné sérové koncentrace CRP před a po první sledované LDL-aféře. CRP II. označuje koncentrace před a po následující LDL-aféře. Pokles koncentrací CRP byl po obou LDL-aferezách statisticky signifikantní ( $p = 0,002$  pro obě aferézy). Velikost poklesu se při obou LDL-aferezách vzájemně statisticky signifikantně nelišila ( $p = 1,000$ ). Viz Tabulka 17 - 20.

**Graf 24. Sérové koncentrace CD40L před a po obou sledovaných LDL-aferezách**



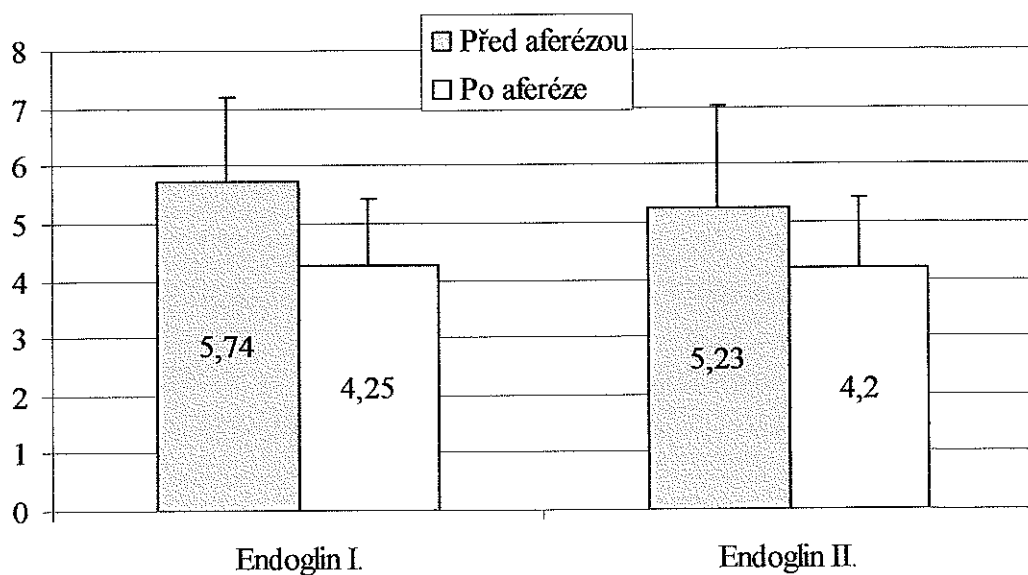
CD40L I. označuje průměrné sérové koncentrace CD40L před a po první sledované LDL-aféře, CD40L II. označuje koncentrace před a po následující LDL-aféře. Pokles byl při obou LDL-aferezách statisticky signifikantní ( $p = 0,037$  resp.  $0,014$ ). Velikost poklesu při obou LDL-aferezách se vzájemně od sebe nelišila ( $p = 0,900$ ). Viz Tabulka 17 - 20.

**Graf 25. Sérové koncentrace neopterinu před a po obou sledovaných LDL-aferezách**



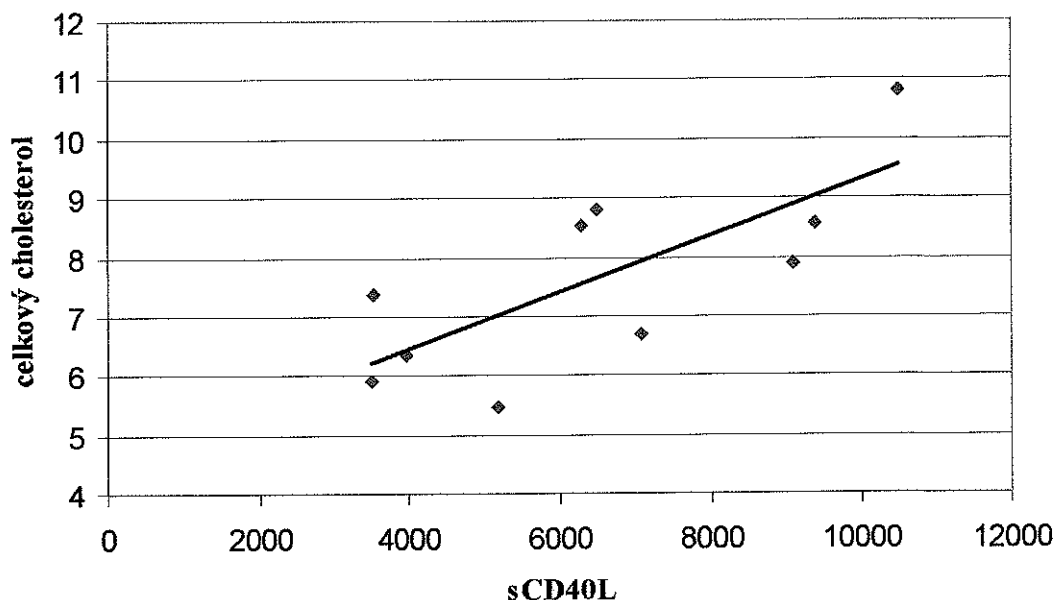
Neopterin I. označuje průměrné sérové koncentrace neopterinu před a po první sledované LDL-aféře, Neopterin II. označuje koncentrace před a po následující LDL-aféře. Změny koncentrace neopterinu při obou LDL-aferezách nebyly statisticky signifikantní ( $p > 0,05$ ). Viz Tabulka 19 - 20.

Graf 26. Sérové koncentrace endoglinu před a po obou sledovaných LDL-aferezách



Endoglin I. označuje průměrné sérové koncentrace endoglinu před a po první sledované LDL-aféze, Endoglin II. koncentrace endoglinu před a po následující LDL-aféze. Pokles koncentrace endoglinu byl po obou LDL-afézách statisticky signifikantní ( $p = 0,037$  resp.  $0,014$ ) a jeho velikost se vzájemně od sebe statisticky významně nelišila ( $p = 0,678$ ). Viz Tabulka 21 - 24.

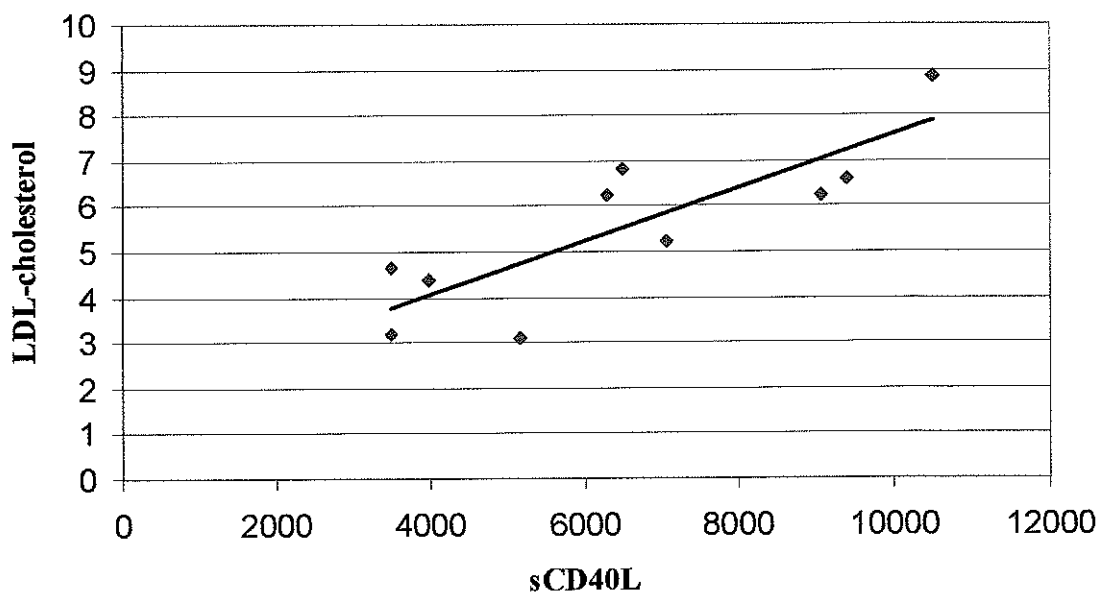
Graf 27 . Vztah sérových koncentrací sCD40L a celkového cholesterolu



Korelace koncentrací sCD40L a celkového cholesterolu byla statisticky signifikantní ( $r_s = 0,721$ ,  $p = 0,016$ ).



Graf 28. Vztah sérových koncentrací sCD40L a LDL-cholesterolu



Korelace koncentrací sCD40L a LDL-cholesterolu byla statisticky signifikantní ( $r_s = 0,818$ ,  $p = 0,002$ ).

#### **3.5.2.3.4. Diskuse**

Koncentrace hsCRP nemocných se statisticky signifikantně nelišily od koncentrací kontrolního souboru, a to i přes přítomnost závažného rizikového faktoru aterosklerózy v podobě těžké poruchy metabolismu lipidů a přítomnost prokázaného aterosklerotického postižení u všech nemocných. Jedním z vysvětlení je účinnost pravidelné dlouhodobé léčby LDL-aférou, o které je známo, že vede k zastavení progresu, někdy dokonce i regresi aterosklerotických lézí (Matsuzaki, 2002), k redukci rizika kardiovaskulárních příhod a ke zlepšení prognózy nemocných (Mabuchi, 1998). Regrese tloušťky intima-media karotických cév byla pozorována i u našich nemocných, léčených LDL-imunoadsorpční (Bláha M., 2004 B). Pokles koncentrace CRP o 49% byl popsán během šestiměsíční léčby LDL-aférou metodou HELP (Otto, 2004). U našich nemocných nebyla hodnota hsCRP před začátkem dlouhodobé terapie LDL-aférou stanovena. K efektu LDL-aférou na koncentraci CRP připívá i efekt léčby statiny, která podle některých autorů vedla k poklesu koncentrací CRP (Ridker, 2005).

Hladina hsCRP klesla po obou sledovaných LDL-aférou a mezi velikostí poklesu nebyl statisticky významný rozdíl. Akutní pokles koncentrace hsCRP tedy není náhodný a souvisí s LDL-aférou. Pokles hsCRP byl pozorován u různých extrakorporálních

eliminačních metod LDL-cholesterolu i dalšími autory. Redukci koncentrací CRP o 65% popsali shodně u metody HELP Moriarty na souboru 4 pacientů a Wieland na souboru 13 pacientů (Moriarty, 2001 B, Wieland, 2002). Pokles o 56% a 53% v případě adsorpce na dextransulfát (DSA) publikovali u 6 pacientů Kobayashi a u 7 nemocných Kojima (Kobayashi, 2002, Kojima, 2003). Srovnáním několika metod LDL-aferézy se zabýval Otto, který popsal průměrný pokles o 62% u metody HELP (10 pacientů), 56% u DSA (15 pacientů), a shodně 25% u imunoadsorpce (7 pacientů) a přímé adsorpce lipidů z plné krve (DALI) (6 pacientů) při srovnatelném poklesu LDL-cholesterolu (Otto, 2001).

Poločas CRP v plazmě je cca 19 hodin. Akutní pokles koncentrace CRP po LDL-aferéze pravděpodobně nebyl pouze následkem omezení zánětlivých dějů během LDL-aferézy, ale nastal pravděpodobně z i jiných příčin. Na prvním místě je třeba zvážit vliv nespecifické vazby CRP v eliminačním mediu. Téměř stoprocentní eliminace v koloně byla potvrzena u metody DSA, kde však byl popsán více než 50% pokles koncentrace hsCRP po aferéze (Kojima, 2003). V souladu s vysokou selektivitou eliminace LDL-cholesterolu metodou imunoadsorpce nebyl u námi užívaných kolon LDL-Lipopak nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi koncentrací CRP ve vzorku plazmy vtékající do kolony a z kolony vytékající. Eliminace CRP nebyla prokázána ani v případě filtrů Evaflux, i když mírnou vazbu CRP v obou typech eliminačních médií vzhledem malému počtu vyšetření nelze v této chvíli zcela vyloučit. Na základě těchto nálezů usuzujeme, že eliminace CRP kolonami není významná, a pokud se vůbec na poklesu CRP po LDL-aferéze určitou měrou podílí, pak jistě není jeho hlavní a jedinou příčinou. Předpokládáme, že v eliminaci jiných součástí plazmy, než jsou molekuly obsahující apolipoprotein B<sub>100</sub>, je imunoadsorpce vzhledem k faktu, že odstraňuje tyto molekuly specificky, nejméně účinná ze všech extrakorporálních metod eliminace LDL-cholesterolu. Je možné, že proto právě imunoadsorpce odráží změny aktivity zánětlivých pochodů, vyvolané samotným poklesem LDL, nejselektivněji. Přesto nelze opominout vliv naředění pacientovy krve náhradními roztoky, který činí podle našich dřívějších zkušeností cca 8-10%. Příčina poklesu CRP je velmi pravděpodobně multifaktoriální a zahrnuje výše zmíněné vlivy.

CRP není pouhým ukazatelem aktivity zánětu, ale přímým účastníkem a spouštěcím faktorem zánětlivých pochodů. Jeho pokles během LDL-aferézy pravděpodobně není pouze pasivním následkem nastalých změn, ale může vést k dalšímu omezení prozánětlivých dějů. Tento efekt je u imunoadsorpce menší než u méně selektivních metod LDL-aferézy a je pravděpodobně dočasný, nicméně při dlouhodobé léčbě extrakorporální eliminací LDL-

cholesterolu byl pozorován dlouhodobý výrazný pokles hladiny CRP (Otto, 2001), který již lze považovat za odraz snížené aktivity zánětlivých pochodů.

K určení individuálního rizika jednotlivých nemocných jsme použili průměr ze dvou po sobě následujících měření hsCRP před LDL-aférou. U šesti nemocných se průměr hodnot pohyboval v pásmu mírného kardiovaskulárního rizika, dva nemocní měli průměrnou hodnotu hsCRP v mezích středního a dva v oblasti vysokého rizika. Oba dva pacienti s vysokým rizikem dle hodnoty hsCRP byli zároveň nemocní s nejtěžším aterosklerotickým postižením. Jeden z nich měl aterosklerotické postižení karotid, ischemickou chorobu srdeční a prodělal opakovaně infarkt myokardu, měl aorto-koronární bypassy. Druhý pacient měl ischemickou chorobu dolních končetin a těžké sklerotické postižení karotid, řešené endarterektomií. Z celého souboru měl tento nemocný nejvyšší hodnoty Lp(a) a byl jedním ze dvou nemocných, u kterých bylo splněno kritérium pro mikroalbuminurii. Další dva pacienti s hladinou hsCRP v rozmezí středního rizika byly ženy. Jedna z nich byla homozygot FH s nejtěžší hypercholesterolemií a xantomy v úvodu léčby a měla také nejtěžší mikroalbuminurii. Druhá nemocná měla rozsáhlé aterosklerotické postižení tepen dolních končetin. Výsledky nás vedly k podezření na společný výskyt mikroalbuminurie a zvýšeného hsCRP, který byl dříve pozorován i jinými autory (Pannacciulli, 2001 B). Proto jsme provedli korelaci mezi průměrem hodnot indexu albumin/kreatinin v moči u každého nemocného a průměrem jeho sérových koncentrací hsCRP, výsledek však předpokládanou korelaci nepotvrdil. Tyto výsledky jsou limitovány rozsahem souboru a mají pouze orientační význam. Jejich výpovědní hodnotu dále snižuje fakt, že odběry po sobě následovaly s odstupem několika měsíců. Přes absenci korelace koncentrací hsCRP s dalšími biochemickými ukazateli závažnosti a rozsahu aterosklerotického postižení nebo míry aktivity aterogeneze, označila hodnota hsCRP převyšující meze mírného rizika (až na jednu pacientku s ICHS) všechny nemocné s jiným prokázaným aterosklerotickým postižením, než jsou asymptomatické karotické pláty.

Hladiny sCD40L vyšetřovaného souboru nemocných byly v normě a nelišily se statisticky významně od hladin sCD40L kontrolního souboru, narozdíl od dříve publikovaných dat, kde nemocní s hypercholesterolemií měli 27x zvýšenou hladinu sCD40L, která klesla cca o 40% v souvislosti s léčbou statiny (Semb, 2003). Tento rozdíl je vysvětlitelný opět vlivem opakovaných LDL-aférou a dlouhodobé medikace statiny. Ty snižovaly hladinu sCD40L i v některých dalších studiích (Kinlay, 2004, Malyszko, 2004). Pokles hladiny CD40L po obou LDL-aférou byl signifikantní a reprodukovatelný a mohl být mimo jiné projevem snížení aktivity buněk imunitního systému následkem eliminace

aterogenních činitelů během LDL-afézy. V naší studii byly vyšší koncentrace sCD40L spojeny s vyšší hladinou LDL-cholesterolu, který je znám aktivací imunitního děje. CD40L je považován za prostředek řídicího vlivu T-lymfocytů na ostatní složky zánětlivých procesů v aterosklerotickém plátu (Mach, 1998). Léčba nemocných s těžkou familiární hypercholesterolemií LDL-aférou tedy pravděpodobně účinně redukuje spouštěcí faktory aktivity aterogeneze. Významná přímá eliminace CD40L kolonami, stejně jako v případě CRP, nebyla prokázána.

Sérové koncentrace **neopterinu** byly srovnatelné s kontrolním souborem zdravých jedinců odpovídajícího věku a pohlaví. Vysvětlení je opět stejné, jako u předchozích parametrů – pravidelná léčba LDL-aférou a statiny eliminuje vliv vysokých hladin lipidů, tentokrát na aktivaci makrofágů. Jednotlivá LDL-aféza neměla přímý vliv na sérové koncentrace neopterinu, měřené ihned po jejím dokončení. To však ještě nevylučuje její vliv na monocyto–makrofágový systém, jehož aktivitu koncentrace neopterinu odráží. Čtyři hodiny trvání LDL-afézy nemusí být doba dostatečná k pozorování těchto změn. Avšak ani výsledky vyšetřování neopterinu v moči nenasvědčují tomu, že jednotlivá LDL-aféza aktuální produkci neopterinu významně snižuje, neboť pokles indexu neopterin/kreatinin v moči večer po aferéze souvisel především s diurnálním rytmem vylučování neopterinu a pokles druhý den po aferéze již nebyl statisticky signifikantní (viz kapitola *Neopterin v moči a mikroalbuminurie u nemocných léčených LDL-aférou*). Na základě absence změn neopterinu v séru po LDL-aféze a také v plazmě před a za kolonou a před a za filtrem můžeme vyloučit významnou eliminaci neopterinu v médiích, která by mohla být jednou z příčin večerního poklesu koncentrace močového neopterinu po LDL-aféze, popsaného ve výše jmenované kapitole. Oproti sérovému neopterinu, neopterin v moči byl u stejného souboru nemocných zvýšen ve srovnání se zdravými jedinci. Možných vysvětlení je několik. V první řadě mohou být výsledky ovlivněny omezeným rozsahem souboru nemocných. Vzorky dále nebyly odebrány ve stejnou dobu, ale s odstupem několika měsíců, což kromě nestejných podmínek mohlo způsobit i snížení aktivity makrofágů následkem stabilizace nemocných LDL-aférou v době odběrů krve k vyšetření sérových hladin. Pokles hladin neopterinu během dlouhodobé léčby extrakorporální eliminací LDL-cholesterolu byl již dříve popsán (Vrecko, 1999). Nelze také vyloučit, že při dobré funkci ledvin může být zvýšená produkce neopterinu eliminována močí a nemusí dojít k elevaci jeho hladin v krvi. Ve výše zmíněné studii byly prokázány - narozdíl od našeho pozorování - zvýšené sérové hladiny neopterinu u 30 nemocných s různými formami aterosklerotického postižení, léčených metodou HELP, a dále signifikantní pokles hladin neopterinu po aferéze (Vrecko, 1999).

Důvodem odlišných výsledků může být jiné spektrum nemocných, kteří narozdíl od našich pacientů měli vstupní hladinu neopterinu zvýšenou. Přesná délka léčby extrakorporální eliminací LDL-cholesterolu nebyla uvedena. Neprokázali jsme korelaci sérového neopterinu s fibrinogenem, popsanou v téže studii. Kromě naší práce se jedná o jedinou studii zabývající se sledováním změn koncentrací sérového a močového neopterinu u nemocných léčených extrakorporální eliminací LDL-cholesterolu, v tomto případě metodou HELP.

**Endoglin**, ukazatel aktivace nebo poškození/reparace endotelu (Li C., 2000), byl v séru nemocných léčených LDL-aférou statisticky signifikantně zvýšen oproti hladinám zdravých jedinců. Toto zvýšení ukazuje na postižení a zvýšenou aktivitu především endoteliálního systému u vyšetřovaných pacientů. LDL-aféza vedla k normalizaci hladin endoglinu. Na poklesu koncentrace endoglinu po LDL-aféze se může mimo jiné podílet omezení aktivity endotelu vlivem eliminace působení aterogenních činitelů. Eliminace endoglinu kolonami, stejně tak jako u předchozích parametrů, nebyla prokázána.

#### **3.5.2.3.5. Závěr**

Průměrné koncentrace hsCRP, sCD40L a neopterinu se nelišily od koncentrací zdravých jedinců. Vysvětlením může být dlouhodobý příznivý vliv LDL-afézy a léčby statiny. Zvýšená hladina endoglinu oproti kontrolnímu souboru může být známkou přetrvávající aktivace/postižení endotelu a LDL-aféza vedla k její normalizaci. Nemocní s těžší hypercholesterolemií měli vyšší hladiny sCD40L, který je nástrojem řídicího vlivu T-lymfocytů na proces aterogeneze. Reprodukovatelný pokles koncentrací CRP, sCD40L a solubilního endoglinu jako imunologicky aktivních molekul po LDL-aféze může být částečně následkem snížení aktivity imunitního systému vlivem eliminace aterogenních činitelů a zároveň může vést k alespoň krátkodobému a částečnému omezení jejich prozánětlivé aktivity. Na poklesu se podílí naředění pacientova oběhu při LDL-aféze. Měření hladin před a po výstupu z eliminačního média jsme neprokázali eliminaci CRP, CD40L, neopterinu ani endoglinu v kolonách ani filtrech, i když mírný vliv na pokles plazmatických hladin nelze touto metodou zcela vyloučit. Sérová koncentrace neopterinu nebyla jednotlivou LDL-aférou významně ovlivněna. Nedochází tak k omezení jeho příznivého antioxidačního vlivu. Vyšetření hsCRP přispělo k určení individuálního rizika nemocných. Jeho změny z dlouhodobého hlediska by se mohly stát ukazatelem účinnosti léčby LDL-aférou.

## **Splnění cílů a závěr**

Soubor 1000 procedur imunoadsorpce kolonami LDL-Lipopak u 9 pacientů je ve světovém měřítku pravděpodobně nejrozsáhlejším z publikovaných souborů, užívajících tento typ adsorbentu. Naše pracoviště je jediné v České republice, které v současné době provádí některou ze selektivních metod extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu, která je pro nemocné s těžkými formami dyslipidemie život zachraňujícím postupem. Přesto, že LDL-aferéza je metodou, která je v zahraničí léta provozována, byla modifikována naší výzkumnou skupinou, a to zejména po technické stránce. Příkladem je originální patentované zařízení k odstraňování vzduchu z adsorpční kolony, které zlepšuje bezpečnost a komfort nemocných a usnadňuje práci personálu.

Vyhodnocením 1000 provedených LDL-aferéz jsme specifikovali některé technické parametry LDL-aferéz, jako jsou množství zpracované plazmy, průtoky přístroji a spotřeba roztoku citrátu apod.

Prokázali jsme, že naše modifikace imunoadsorpce LDL-částic účinně a selektivně eliminuje LDL-cholesterol a Lp(a). Změny dalších vyšetřovaných laboratorních ukazatelů, kromě poklesu hemoglobinu a hematokritu, které mohou z dlouhodobého hlediska vést k sideropenii, nemají zásadní klinický význam.

Na základě klinického pozorování nemocných a vyhodnocení nežádoucích účinků LDL-aferéz byly provedeny technické úpravy zařízení za účelem zlepšit komfort nemocných a byla doporučena maximální délka procedury s ohledem na únosnost procedury pro nemocné. I přes nespornou technickou náročnost, spočívající v součinnosti separátoru krevních tělísek a sekundárního přístroje, zajišťujícího imunoadsorpci LDL-částic z plazmy, je LDL-aferéza v rukou zkušeného personálu bezpečnou metodou s minimem technických komplikací a limitovaným výskytem nežádoucích účinků převážně mírného charakteru. Tento předpoklad umožňuje dodržení rozsahu i frekvence jednotlivých procedur LDL-aferézy, které je základní podmínkou úspěchu léčby. Výhodou imunoadsorpce oproti jiným metodám extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu je kromě specificity adsorpce také téměř neomezená eliminační kapacita systému, daná možností střídavě užívat dvě imunoadsorpční kolony. Hlavní nevýhodou stále zůstává vysoká cena imunoadsorpčních kolon a cena výkonů.

Prokázali jsme, že kolony LDL-Lipopak jsou z dlouhodobého hlediska spolehlivým a bezpečným typem adsorbentů s relativně stabilní efektivitou i selektivitou imunoadsorpce v průběhu užívání. Tento nálezn je jak z hlediska vyšetřovaného objektu, tak i z hlediska použité metodiky unikátní a získané výsledky sloužily v dalším výzkumu při vývoji počítačového programu určeného k optimalizaci objemů plazmy, zpracovaných střídajícími se

kolonami. Program byl vyvinut v rámci výzkumného projektu IGA MZ ČR NB/7006-3, jehož byla autorka této disertace spoluřešitelkou.

Z krátkodobého hlediska byl zhodnocen vliv jednotlivých procedur LDL-afézy na vybrané ukazatele aktivity některých činitelů, účastnících se procesů aterogeneze, zhodnocen jejich vztah ke změnám koncentrací lipoproteinů během LDL-afézy i jejich vztahy k sobě navzájem. Z těchto výsledků jsou opět některé unikátní.

Ve světovém měřítku byla poprvé byla hodnocena dynamika selektivních adhezních molekul během imunoadsorpce LDL-cholesterolu. Dynamika MCP-1 nebyla popsána ani u žádné jiné z metod extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu, stejně tak jako dynamika CD40L a solubilního endoglinu. Poprvé byl vyšetřován vliv LDL-imunoadsorpce na koncentrace neopterinu v moči a séru a na mikrovaskulární permeabilitu pro albumin.

Poprvé byly hodnoceny také adsorpční vlastnosti kolon LDL-Lipopak ve smyslu eliminace jednotlivých vyšetřovaných molekul kolonami.

Závěrem lze říci, že LDL-aféza má kromě významné přímé redukce LDL-cholesterolu a Lp(a) i další „pleotropní“ účinky, které se mohou podílet na omezení aktivity procesů aterogeneze a vést ke zlepšení klinického stavu nemocných. Příkladem je redukce hladin přímých účastníků aterogenetických pochodů, jako jsou selektivní adhezní molekuly, MCP-1, endoglin, CD40L a CRP nebo zlepšení rheologických vlastností krve mimo jiné následkem poklesu viskozity krve. Příčiny poklesu koncentrací těchto parametrů jsou multifaktoriální, s účastí diluce oběhu nemocného, v některých případech významné eliminace molekul v imunoadsorpční koloně a/nebo následkem omezení jejich produkce nebo urychleným odbouráváním.

Vzhledem k vysoké specifitě eliminace molekul obsahujících apoB<sub>100</sub> odráží LDL-imunoadsorpce změny aktivity zánětlivých pochodů vyvolané samotným poklesem LDL-cholesterolu pravděpodobně nejselektivněji ze všech extrakorporálních metod eliminace LDL-cholesterolu. V eliminaci dalších účastníků zánětlivých dějů je však také pravděpodobně nejméně účinná.

Cíle práce byly zcela splněny. Byly získány některé unikátní výsledky, uvedené výše.

## Seznam použité literatury

1. Agishi T., Kaneko I., Hasuo Y., Hayasaka Y., Sanaka T., Ota K., Amemiya H., Sugino N., Abe M., Ono T., Kawai S., Yamane T. Double filtration plasmapheresis. 1980. *Ther Apher* 2000;4(1):29-33.
2. Agishi T. Anion-blood contact reaction (ABC reaction) in patients treated by LDL apheresis with dextran sulfate-cellulose column while receiving ACE inhibitors. *JAMA* 1994;271(3):195-6.
3. Aiello R.J., Bourassa P.A., Lindsey S., Weng W., Natoli E., Rollins B.J., Milos P.M. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(6):1518-25.
4. Aikawa M., Libby P. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol* 2004;13(3):125-38.
5. Albert C.M., Ma J., Rifai N., Stampfer M.J., Ridker P.M. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation* 2002; 105(22): 2595-9.
6. Anzai T., Yoshikawa T., Shiraki H., Asakura Y., Akaishi M., Mitamura H., Ogawa S. C-reactive protein as a predictor of infarct expansion and cardiac rupture after a first Q-wave acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96(3): 778-84.
7. Anzai T., Yoshikawa T., Takahashi T., Maekawa Y., Okabe T., Asakura Y., Satoh T., Mitamura H., Ogawa S. Early use of beta-blockers is associated with attenuation of serum C-reactive protein elevation and favorable short-term prognosis after acute myocardial infarction *Cardiology* 2003; 99(1): 47-53.
8. Arad Y., Spadaro L.A., Goodman K., Newstein D., Guerci A.D. Prediction of coronary events with electron beam computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(4): 1253-60.
9. Assmann G., Schulte H., von Eckardstein A. Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am J Cardiol* 1996;77: 1179-84.
10. Auzeby A., Bogdan A., Krosi Z., Touitou Y. Time-dependence of urinary neopterin, a marker of cellular immune activity. *Clin Chem* 1988;34(9): 1866-7.
11. Avanzas P., Arroyo-Espliquero R., Cosin-Sales J., Quiles J., Zouridakis E., Kaski J.C. Prognostic value of neopterin levels in treated patients with hypertension and chest pain but without obstructive coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2004; 93: 627-9.
12. Baier-Bitterlich G., Fuchs D., Wachter H. Chronic immune stimulation, oxidative stress, and apoptosis in HIV infection. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 755-763.
13. Bakalář B., Zadák Z, Páchl J. Severe hypocholesterolemia is associated with adrenal insufficiency in multiple trauma patients. *Intens Care Med* 2001;27 (2):253.



14. Basso F., Lowe G.D., Rumley A., McMahon A.D., Humphries S.E. Interleukin-6 - 174G>C polymorphism and risk of coronary heart disease in West of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 599-604.
15. Baumbauer R. Low-density lipoprotein apheresis: clinical results with different methods. *Artif Organs* 2002;26(2):133-9.
16. Baumbauer R. Is lipoprotein (a)-apheresis useful? *Ther Apher Dial* 2005;9:142-7.
17. Beamer M.B., Coull B.M., Clark W.M., Wynn M. Microalbuminuria in ischemic stroke. *Arch Neurol* 1999; 56: 699-702.
18. Berrouschot J., Barthel H., Koster J., Hesse S., Rossler A., Knapp W.H., Schneider D. Extracorporeal rheopheresis in the treatment of acute ischemic stroke: A randomized pilot study. *Stroke* 1999;30(4): 787-92.
19. Berton G., Cordiano R., Mbaso S., De Toni R., Mormino P., Palatini P. Prognostic significance of hypertension and albuminuria for early mortality after acute myocardial infarction. *J. Hypertens* 1998;16: 525-530.
20. Berton G., Cordiano R., Palmieri R., Pianca S., Pagliara V., Palatini P. C-reactive protein in acute myocardial infarction: association with heart failure. *Am Heart J* 2003; 145(6): 1094-101. Citace A
21. Berton G., Palatini P. Risk stratification after acute myocardial infarction: role of neurohormones, inflammatory markers and albumin excretion rate. *Ital Heart J* 2003;4(5): 295-304. Citace B
22. Bláha V., Zadák Z., Bláha M., Havel, E., Vyroubal, P., Malý, J. Klinické využití imunoabsorpční LDL-aférezý v léčbě hypercholesterolemíí. *Diabetol Metabol Endokrinol Výživa* 2001;4:36.
23. Bláha M. Extracorporeal LDL-cholesterol elimination in the treatment of severe familial hypercholesterolemia. *Acta Med (Hradec Králové)* 2003;46(1): 3-7.
24. Bláha M., Krejsek J., Bláha V., Andrýs J., Vokurková D., Malý J., Blažek M, Skořepová M. Selectins and monocyte chemotactic peptide as the markers of atherosclerosis activity. *Physiol Res* 2004;53(3):273-8. Citace A.
25. Bláha M., Ungermann L., Bláha V., Andrýs C., Blažek M., Cermanová M., Solichová D., Malý J.: The influence of long-term aggressive lipid lowering with immunoapheresis on endothelial dysfunction and carotid intima-media thickness. In: Sborník abstrakt, 10. pracovní dny Společnosti pro transfúzní lékařství. Hradec Králové: HK Credit, 2004, s. 34. ISBN 80-86780-10-04. Citace B.
26. Blanco F.J., Santibanez J.F., Guerrero-Esteo M., Langa C., Vary C.P., Bernabeu C. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol* 2005; 204(2): 574-84.

27. Blann A.D., Wang J.M., Wilson P.B., Kumar S. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. : *Atherosclerosis* 1996; 120(1-2): 221-6.
28. Bolan C.D., Cecco S.A., Wesley R.A. Citrate effects and intravenous calcium administration: a controlled study in allogenic blood stem cell donors undergoing large volume leukapheresis. *Transfusion* 1999; 39:122S.
29. Bolan C.D., Leitman SF. Management of anticoagulation-associated toxicity during large-volume leukapheresis of peripheral blood stem cell donors. *Blood* 2002;99(5): 1878.
30. Borberg H., Gaczkowski A., Hombach V., Oette K., Stoffel W. Treatment of familial hypercholesterolemia by means of specific immunoadsorption. *J Clin Apheresis* 1988; 4(2-3):59-65.
31. Borberg H. LDL-apheresis and LDL-elimination therapies. 2<sup>nd</sup> Seminar of Applied Technology in Haemapheresis (Proceedings). In: *European School of Haematology*. Paris: ESH, 1997: 1-8.
32. Borch-Johnsen K., Feldt-Rasmussen B., Strandgaard S., Schroll M., Jensen J.S. Urinary albumin excretion. An independent predictor of ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1992-7.
33. 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 compatible with human whole blood. *Artif Organs* 1993;17: 640-52.
34. Bosch T. Lipid apheresis: from a heroic treatment to routine clinical practice. *Artif. Organs* 1996; 20: 414-419.
35. Bosch T., Lennertz A., Schmidt B., Fink E., Keller C., Toepfer M., Drager J., Samtleben W. DALI apheresis in hyperlipidemic patients: biocompatibility, efficacy, and selectivity of direct adsorption of lipoproteins from whole blood. *Artif Organs* 2000; 24(2): 81-90.
36. Boyle J.J. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3(1): 63-8.
37. Braverman I.M., Keh A., Jacobson B.S. Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Invest Dermatol* 1990; 95(4): 422-7.
38. Brndiar M. Mikroalbuminurie při poruše metabolismu lipidů. In: Brndiar M. Možné příčiny a časná detekce některých nefropatií. Habilitační práce. Vojenská Lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně v Hradci Králové. Hradec Králové, 2001, s. 33-48.
39. Brown M.S., Goldstein J.L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89: 331-40.
40. Brunner R., Widder R.A., Fischer R.A., Walter P., Bartz-Schmidt K.U., Heimann K., Borberg H. Clinical efficacy of haemorheological treatment using plasma exchange,

selective adsorption and membrane differential filtration in maculopathy, retinal vein occlusion and uveal effusion syndrome. *Transfus Sci* 1996; 7(4):493-8.

41. Buchta C., Macher M., Bieglmayer C., Hocker P., Dettke M. Reduction of adverse citrate reactions during autologous large-volume PBPC apheresis by continuous infusion of calcium-gluconate. *Transfusion* 2003; 43(11): 1615-21.
42. Burger P.C., Wagner D.D. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood* 2003;101(7): 2661-6.
43. Butcher E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67(6):1033-6.
44. Cambien B., Wagner D.D. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med* 2004;10(4): 179-86.
45. Cassens U., Baumann C., Hillmann H., Reinecke H., Silling G., Booke M., Wawer A., Sibrowski W. Circulatory arrest during PBPC apheresis in an unrelated donor. *Transfusion* 2003; 43(6): 736-41.
46. Castell J.V., Gomez-Lechon M.J., David M., Fabra R., Trullenque R., Heinrich P.C. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* 1990; 12: 1179-86.
47. Castelli W.P., Garrison R.J., Wilson P.W.F., Abbott R.D., Kalousdian S., Kannel W.B. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 1986; 256(20): 2835-8.
48. Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., Loscalzo J., Zimmerman G.A., McEver R.P., Pober J.S., Wick T.M., Konkle B.A., Schwartz B.S., Barnathan E.S., McCrae K.R., Hug B.A., Schmidt A.M., Stern D.M. Endothelial cells in physiology and the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91(10): 3527-61.
49. Conley B.A., Smith J.D., Guerrero-Esteo M., Bernabeu C., Vary C.P. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques *Atherosclerosis* 2000; 153(2): 323-35.
50. Conley B.A., Koleva R., Smith J.D., Kacer D., Zhang D., Bernabeu C., Vary C.P. Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem* 2004; 279(6): 27440-9.
51. Cooke J.P., Dzau V.J. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997; 48: 489-509.
52. Cowley H.C., Heney D., Gearing A.J., Hemingway I., Webster N.R. Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with the systemic inflammatory response syndrome: a prospective cohort study. *Crit Care Med* 1994; 22(4): 651-7.

53. Creemers E.E., Cleutjens J.P., Smits J.F., Daemen M.J. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001; 89(3): 201-10.
54. Damsgaard E.M., Frøland A., Jørgensen O.D., Mogensen C.E. Microalbuminuria as predictor of increased mortality in elderly people. *BMJ* 1990; 300(6720): 297-300.
55. Dart A.M., Chin-Dusting J.P. Lipids and the endothelium. *Cardiovasc Res* 1999; 43(2): 308-22.
56. Deckert T., Feldt-Rasmussen B., Borch-Johnsen K., Jensen T., Kofoed-Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage: the Steno hypothesis. *Diabetologia* 1989; 32 219-226.
57. de Lemos J.A., Morrow D.A., Sabatine M.S., Murphy S.A., Gibson C.M., Antman E.M., McCabe C.H., Cannon C.P., Braunwald E. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 107(5): 690-5.
58. Dell'omo G., Giorgi D., Di Bello V., Mariani M., Pedrinelli R. Blood pressure independent association of microalbuminuria and left ventricular hypertrophy in hypertensive men. *J Intern Med* 2003; 254: 76-84.
59. Dewald O., Zymek P., Winkelmann K., Koerting A, Ren G., Abou-Khamis T., Michael L.H. Rollins B.J. Entman M.L., Frangogiannis N.G. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Regulates Inflammatory Responses Critical to Healing Myocardial Infarcts. *Circ Res* 2005;96(8): 881-9.
60. Diercks G.F., van Boven A.J., Hillege H.L. Janssen W.M., Kors J.A. de Jong P.E. Microalbuminuria is independently associated with ischaemic electrocardiographic abnormalities in a large non-diabetic population: the PREVEND study. *Eur Heart J* 2000; 21: 1922-1927.
61. Draz N., Hamdy M.S. Gomaa Y., Ramzy A.A. Soluble P-selectin is a marker of plaque destabilization in unstable angina. *Egypt J Immunol* 2003;10(1): 83-7.
62. Durrington P.N., Ishola M., Hunt L., Arrol S., Bhatnagar D. Apolipoproteins (a), AI, and B and parental history in men with early onset ischaemic heart disease *Lancet* 1988; 1:1070-3.
63. Eisenhauer T., Schuff-Werner P., Armstrong V.W. Simultaneous heparin-induced extracorporeal LDL precipitation and haemodialysis: first clinical experience. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1991; 37: M494-6.
64. Empen K., Otto C., Brodl U.C., Parhofer K.G. The effects of three different LDL-apheresis methods on the plasma concentrations of E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1. *J Clin Apher* 2002;17(1):38-43.
65. Erren M., Reinecke H., Junker R., Fobker M., Schulte H., Schurek J.O., Kropf J., Kerber S., Breithardt G. Assmann G., Cullen P. Systemic inflammatory parameters in patients

with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2355-63.

66. Esposito K., Pontillo A., Di Palo C. Giugliano G., Masella M., Marfella R., Giugliano D. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* 2003; 289: 1799-804.
67. Fadul J.E.M., Alarabi A.A., Wikström B., Danielson B.G., Nilsson B. Identification of complement activators and elucidation of the fate of complement activation products during extracorporeal plasma purification therapy. *J Clin Apher* 1998;13:167-173.
68. Falk E. Morphological features of unstable atherothrombotic plaques underlying acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 1989; 63: 114E-120E.
69. Fang L., Wei H., Mak K.H., Xiong Z., Song J. Wang D., Lim Y.L., Chatterjee S. Markers of low-grade inflammation and soluble cell adhesion molecules in Chinese patients with coronary artery disease. *Can J Cardiol* 2004;20(14): 1433-8.
70. Ford E.S., Giles W.H., Myers G.L., Mannino D.M. Population distribution of high-sensitivity C-reactive protein among US men: findings from National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Clin Chem* 2003; 49: 686-90.
71. Forsblad J., Gottsater A., Persson K., Jacobsson L., Lindgrade F. Clinical manifestations of atherosclerosis in elderly population are related to plasma neopterin, NGAL and endothelin-1, but not to Chlamydia pneumoniae serology. *Int Angiol* 2002; 21: 173-9.
72. Frangogiannis N.G. The role of the chemokines in myocardial ischemia and reperfusion. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; 2(2): 163-74.
73. Frenette P.S., Johnson R.C., Hynes R.O., Wagner D.D. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(16): 450-4.
74. Frenette P.S., Denis C.V. Weiss L., Jurk K., Subbarao S. Kehrel B., Hartwig J.H., Vestweber D., Wagner D.D. Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 2000; 191(8):1413-22.
75. Garcia-Moll X., Cole D., Zouridakis E, Kaski J.C. Increased serum neopterin: a marker of coronary artery disease activity in women. *Heart* 2000; 83: 346-50.
76. Garcia-Zepeda E.A., Combadiere C., Rothenberg M.E. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol* 1996; 157: 5613-5626.
77. Gearing A.J., Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993; 14(10): 506-12.

78. Geiss H.C., Parhofer K.G., Donner M.G., Schwandt P. Low density lipoprotein apheresis by membrane differential filtration (cascade filtration). *Ther Apher* 1999; 3(3): 199-202.
79. Geusau A., Schmaldienst S., Derfler K., Papke O., Abraham K. Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin (TCDD) intoxication: kinetics and trials to enhance elimination in two patients. *Arch Toxicol* 2002; 76(5-6):316-25.
80. Giddings J.C. Soluble adhesion molecules in inflammatory and vascular diseases. *Biochem Soc Trans* 2005;33: 406-8.
81. Glass C.K. and Witztum J.L. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 2001; 104: 503-16.
82. Goldstein J.L., Brown M.S.: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Review Biochem* 1977; 46: 897-930.
83. Goldstein J., Hobbs H., and Brown M. Familial hypercholesterolemia. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, and D. Valle, editors. New York, USA: McGraw-Hill, 2001, p. 2863–2913.
84. Gordon B.R., Stein E., Jones P., Illingworth D.R.: Indications for low-density lipoprotein apheresis. *Am. J. Cardiol* 1994; 74: 1109–1112.
85. Grainger D.J., Kemp P.R. Metcalfe J.C. Liu A.C., Lawn R.M., Williams N.R., Grace A.A. Schofield P.M., Chauhan A. The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med* 1995;1: 74-9.
86. Griffin B.A. Freeman D.J. Tait G.W., Thomson J., Caslake M.J., Packard C.J., Shepherd J. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL) subfractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis* 1994;106: 241-53.
87. Guerrero-Esteo M., Lastres P., Letamendia A. Perez-Alvarez M.J.Langa C., Lopez L.A., Fabra A., Garcia-Pardo A., Vera S. Letarte M. Bernabeu C. Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 1999; 78: 614-23.
88. Gupta S., Fredericks S., Schwartzman R.A. Holt D.W., Kaski J.C. Serum neopterin in acute coronary syndromes. *Lancet* 1997; 349: 1252-1253.
89. Gurbel P.A. Kereiakes D.J., Serebruany V.L. Soluble P-selectin is not a surrogate marker for platelet P-selectin: evidence from a multicenter chest pain study group. *J Thromb Thrombolysis* 2000;10(1): 15-22. Citace A.
90. Gurbel P.A., Kereiakes D.J., Dalesandro M.R., Bahr R.D. O'Connor C.M., Serebruany V.L.. Role of soluble and platelet-bound P-selectin in discriminating cardiac from noncardiac chest pain at presentation in the emergency department. *Am Heart J* 2000;139:320-8. Citace B.

91. Gurbel P.A., O'Connor C.M., Dalesandro M.R., Serebruany V.L. Relation of soluble and platelet P-selectin to early outcome in patients with acute myocardial infarction after thrombolytic therapy. *Am J Cardiol* 2001;87(6): 774-7.
92. Gurfinkel E.P., Scirica B.M., Bozovich G., Macchia A., Manos E., Mautner B. Serum neopterin levels and the angiographic extent of coronary arterial narrowing in unstable angina pectoris and in non-Q-wave acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1999; 83: 515-8.
93. Hackman A., Abe Y., Insull W., Jr., Pownall H., Smith L., Dunn K., Gotto A.M., Jr., Ballantyne C.M. Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation*. 1996;93(7):1334-8.
94. Hajilooi M., Sanati A., Ahmadiéh A., Ghofraniha A., Massoud A. Circulating ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin, and TNFRII in patients with coronary artery disease. *Immunol Invest* 2004;33(3): 263-75.
95. Heeschen C., Dimmeler S., Hamm C.W., van den Brand M.J. Boersma E., Zeiher A.M., Simoons M.L.; CAPTURE Study Investigators. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003; 348: 1104-11.
96. Heller D.A., de Faire U., Pedersen N.L. Genetic and environmental influences in serum lipid levels in twins. *N Engl. J. Med.* 1993; 328: 1150-1156.
97. Hester J.P., McCullough J., Mishler J.M., Szymanski I.O. Dosage regimen for citrate anticoagulans. *J Clin Apheresis*. 1983;1:149-157.
98. Hillege H.L., Fidler V., Diercks G.F., van Gilst W.H., de Zeeuw D., van Veldhuisen D.J.: Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) Study Group. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation*. 2002; 106: 1777-82.
99. Hillis G.S., Terregino C., Taggart P., Killian A., Zhao N., Dalsey W.C., Mangione A. Elevated soluble P-selectin levels are associated with an increased risk of early adverse events in patients with presumed myocardial ischemia *Am Heart J*. 2002;143(2):235-41.
100. Hjerkin E.M., Seljeflot I., Sandvik L., Hjerkmann I., Arnesen H. Markers of endothelial cell activation in elderly men at high risk for coronary heart disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2005; 65:201-9.
101. Hoffmann U., Derfler K., Haas M., Stadler A., Brady T.J., Kostner K. Effects of combined low-density lipoprotein apheresis and aggressive statin therapy on coronary calcified plaque as measured by computed tomography. *Am J Cardiol* 2003;91(4):461-4.
102. Hoogeveen E.K., Kostense P.J., Jager A., Heine R.J., Jakobs C., Bouter L.M., Donker A.J., Stehouwer C.D. Serum homocysteine level and protein intake are related to risk of microalbuminuria: the Hoorn Study. *Kidney Int* 1998; 54(1): 203-9.
103. Hrachovinová I., Cambien B., Hafezi-Moghadam A., Kappelmayer J., Camphausen R.T., Widom A., Xia L., Kazazian H.H., Jr, Schaub R.G., McEver R.P., Wagner D.D.

Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat Med* 2003; 9(8):1020-5.

104. Huber C., Batchelor J.R., Fuchs D., Hausen A., Lang A., Niederwieser D. Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med* 1984; 160: 310-6.
105. Chang S., Lamm S.H. Human health effects of sodium azide exposure: a literature review and analysis. : *Int J Toxicol* 2003;22(3):175-86.
106. Cheifetz S., Bellon T., Cales C., Vera S., Bernabeu C., Massague J., Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 19027-30.
107. Chong B.H., Murray B., Berndt M.C., Dunlop L.C., Brighton T, Chesterman C.N. Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders. *Blood* 1994;83(6):1535-41.
108. Ikeda H., Nakayama H., Oda T., Kuwano K., Muraishi A., Sugi K., Koga Y., Toshima H. Soluble form of P-selectin in patients with acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis* 1994;5(6):515-8.
109. Ikeda H., Takajo Y., Ichiki K., Ueno T., Maki S., Noda T., Sugi K., Imaizumi T. Increased soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. *Circulation* 1995;92(7):1693-6.
110. Imhof A., Froehlich M., Brenner H., Boeing H., Pepys M.B., Koenig W. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet* 2001; 357: 763-7.
111. Jaeger B.R., Meiser B., Nagel D., Uberfuhr P., Thiery J., Brandl U., Bruckner W., von Scheidt W., Kreuzer E., Steinbeck G., Reichart B., Seidel D. Aggressive lowering of fibrinogen and cholesterol in the prevention of graft vessel disease after heart transplantation. *Circulation* 1997; 96(9 Suppl):II-154-8.
112. Jager A., Kostense P.J., Ruhe H.G., Heine R.J., Nijpels G., Dekker J.M., Bouter L.M., Stehouwer C.D. Microalbuminuria and peripheral arterial disease are independent predictors of cardiovascular and all-cause mortality, especially among hypertensive subjects: five-year follow-up of the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(3): 617-24.
113. Jager A., Kostense P.J., Nijpels G., Dekker J.M., Heine R.J., Bouter L.M., Donker A.J., Stehouwer C.D. Serum homocysteine levels are associated with the development of (micro)albuminuria: the Hoorn study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(1):74-81.
114. Jarrett R.J., Viberti G.C., Argyropoulos A., Hill R.D., Mahmud U., Murrels T.J. Microalbuminuria predicts mortality in non-insulin-dependent diabetes. *Diabet Med*. 1984; 1: 17-19.
115. Jebavý L., Malý J. Hematologie a transfuziologie. In: *Vnitřní lékařství pro nelékařské fakulty*. Praha: Manus, 2003, s. 141-179. ISBN 80-86571-02-5.



116. Jensen J.S., Borch-Johnsen K., Jensen G., Feldt-Rasmussen B. Atherosclerotic risk factors are increased in clinically healthy subjects with microalbuminuria. *Atherosclerosis*. 1995; 112(2): 245-52.
117. Jensen J.S., Feldt-Rasmussen B., Strandgaard S., Schroll M., Borch-Johnsen K. Arterial hypertension, microalbuminuria, and risk of ischemic heart disease. *Hypertension*. 2000; 35(4): 898-903.
118. Jensen J.S., Feldt-Rasmussen B., Jensen K.S., Clausen P., Scharling H., Nordestgaard B.G. Transendothelial lipoprotein exchange and microalbuminuria. *Cardiovasc Res*. 2004; 63(1): 149-54.
119. Jones S.L., Close C.F., Mattock M.B., Jarrett R.J., Keen H., Viberti G.C. Plasma lipid and coagulation factor concentrations in insulin dependent diabetics with microalbuminuria. *BMJ*. 1989; 298(6672): 487-90.
120. Jovin I.S., Taborski U., Muller-Berghaus G. Analysis of the long-term efficacy and selectivity of immunoabsorption columns for low density lipoprotein apheresis. *ASAIO J*. 2000;46(3):298-300.
121. Julius U., Metzler W., Pietzsch J., Fassbender T., Klingel R. Intraindividual comparison of two extracorporeal LDL apheresis methods: lipidfiltration and HELP. *Int J Artif Organs*. 2002;25(12):1180-8.
122. Kajinami K. and Mabuchi H. Therapeutic effects of LDL apheresis in the prevention of atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol*. 1999;10:401–406.
123. Karalliedde J., Viberti G. Microalbuminuria and cardiovascular risk. *Am J Hypertens*. 2004; 17(10): 986-93.
124. Kario K., Matsuo T., Kobayashi H., Matsuo M., Sakata T., Miyata T. Activation of tissue factor-induced coagulation and endothelial cell dysfunction in non-insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15(8): 1114-20.
125. Keller C. Indication of low-density lipoprotein apheresis in severe hypercholesterolemia and its atherosclerotic vascular complications: dextran sulfate cellulose low-density lipoprotein apheresis. *Ther Apher Dial*. 2003;7(3):345-9.
126. Kinlay S., Schwartz G.G., Olsson A.G., Rifai N., Sasiela W.J., Szarek M., Ganz P., Libby P: Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. Effect of atorvastatin on risk of recurrent cardiovascular events after an acute coronary syndrome associated with high soluble CD40 ligand in the Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study. *Circulation*. 2004; 110: 386-91.
127. Klausen K., Borch-Johnsen K., Feldt-Rasmussen B., Jensen G., Clausen P., Scharling H., Appleyard M., Jensen J.S. Very low levels of microalbuminuria are associated with

- increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes. *Circulation*. 2004; 110(1): 32-5.
128. Klingel R., Fassbender C., Fassbender T., Erdtracht B., Berrouschot J. Rheopheresis: rheologic, functional, and structural aspects. *Ther Apher*. 2000;4(5):348-57.
  129. Klingel R., Fassbender C., Fassbender T., Gohlen B. Clinical studies to implement Rheopheresis for age-related macular degeneration guided by evidence-based-medicine. *Transfus Apheresis Sci*. 2003; 29(1):71-84. Citace A.
  130. Klingel R., Mumme C., Fassbender T., Himmelsbach F., Altes U., Lotz J., Pohlmann T., Beyer J., Kustner E. Rheopheresis in patients with ischemic diabetic foot syndrome: results of an open label prospective pilot trial. *Ther Apher Dial*. 2003 Aug;7(4):444-55. Citace B.
  131. Klingel R., Mausfeld P., Fassbender C., Goehlen B. Lipidfiltration - safe and effective methodology to perform lipid-apheresis. *Transfus Apheresis Sci*. 2004;30(3):245-54.
  132. Knisel W., Pfohl M., Muller M., Besenthal I., di Nicuolo A., Voelker W., Risler T., Eggstein M. Comparative long-term experience with immunoadsorption and dextran sulfate cellulose adsorption for extracorporeal elimination of low-density lipoproteins. *Clin Investig*. 1994;72(9):660-8.
  133. Knobl P., Schernthaner G., Schnack C., Pietschmann P., Griesmacher A., Prager R., Muller M. Thrombogenic factors are related to urinary albumin excretion rate in type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*. 1993; 36(10): 1045-50.
  134. Kobayashi J., Katsube S., Shimoda M., Furuhashi K., Kitano S., Masuda M., Maruyama T., Shinomiya M. Single LDL apheresis improves serum remnant-like particle-cholesterol, C-reactive protein, and malondialdehyde-modified-low-density lipoprotein concentrations in Japanese hypercholesterolemic subjects. *Clin Chim Acta*. 2002; 321: 107-12.
  135. Koenig W., Sund M., Frohlich M., Fischer H.G., Lowel H., Doring A., Hutchinson W.L., Pepys M.B. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation*. 1999; 99: 237-42.
  136. Koenig W. Fibrin(ogen) in cardiovascular disease: an update. *Thromb Haemost*. 2003; 89(4): 601-9.
  137. Koga N. Beneficial effect of aggressive low-density lipoprotein apheresis in a familial hypercholesterolemic patient with severe diabetic scleredema. *Ther Apher*. 2001;5(6):506-12.
  138. Kojima S., Harpel P.C., Rifkin D.B. Lipoprotein (a) inhibits the generation of transforming growth factor beta: an endogenous inhibitor of smooth muscle cell migration. *J Cell Biol*. 1991; 113: 1439-45.

139. Kojima S., Shida M., Yokoyama H. Changes in C-reactive protein plasma levels during low-density lipoprotein apheresis. *Ther Apher Dial.* 2003; 7: 431-4.
140. Korkmaz S., Ileri M., Hisar I., Yetkin E., Kosar F. Increased levels of soluble adhesion molecules, E-selectin and P-selectin, in patients with infective endocarditis and embolic events. *Eur Heart J.* 2001;22(10):874-8.
141. Kumar A., Villani M.P., Patel U.K., Keith J.C., Jr., Schaub R.G. Recombinant soluble form of PSGL-1 accelerates thrombolysis and prevents reocclusion in a porcine model. *Circulation.* 1999;99:1363-9.
142. Kumar S., Ghellal A., Li C., Byrne G., Haboubi N., Wang J.M., Bundred N. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.* 1999; 59: 856-61.
143. Kuusisto J., Mykkanen L., Pyorala K., Laakso M. Hyperinsulinemic microalbuminuria. A new risk indicator for coronary heart disease. *Circulation.* 1995; 91(3):831-7.
144. Laspina S.J., Browne M.A., McSweeney E.N., Lawlor J., Whelan D.M., Kinsella A.L., Murphy W.G. QTc prolongation in apheresis platelet donors. *Transfusion.* 2002;42(7):899-903.
145. Lastres P., Letamendia A., Zhang H., Rius C., Almendro N., Raab U., Lopez L.A., Langa C., Fabra A., Letarte M., Bernabeu C. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol.* 1996; 133: 1109-21.
146. Ledue T.B., Rifai N. High sensitivity immunoassays for C-reactive protein: promises and pitfalls. *Clin Chem Lab Med.* 2001; 39: 1171-6.
147. Lees R.S., Cashin-Hemphill L., Lees A.M. Non-pharmacological lowering of low-density lipoprotein by apheresis and surgical techniques. *Curr Opin Lipidol.* 1999;10: 575-9.
148. Leeuwenberg J.F., Smeets E.F., Neeffjes J.J., Shaffer M.A., Cinek T., Jeunhomme T.M., Ahern T.J., Buurman W.A.. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology.* 1992;77(4):543-9.
149. Lekatsas I., Kranidis A., Ioannidis G., Kalofoutis C., Tavernarakis A., Thalassinos N., Kalofoutis A., Anthopoulos L., Koulouris S. Comparison of the extent and severity of coronary artery disease in patients with acute myocardial infarction with and without microalbuminuria. *Am J Cardiol* 2004; 94: 334-337.
150. Li C., Hampson I.N., Hampson L., Kumar P., Bernabeu C., Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J.* 2000; 14: 55-64.
151. Li C.G., Bethell H., Wilson P.B., Bhatnagar D., Walker M.G., Kumar S. The significance of CD105, TGFbeta and CD105/TGFbeta complexes in coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2000; 152: 249-56.

152. Li D.Y., Sorensen L.K., Brooke B.S., Urness L.D., Davis E.C., Taylor D.G., Boak B.B., Wendel D.P. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*. 1999;284:1534-7.
153. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med*. 2000;247(3):349-58.
154. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74.
155. Lindmark E., Tenno T., Siegbahn A. Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(10):2322-8.
156. Loscalzo J. Lipoprotein (a), fibrin binding and plasminogen activation. *Atherosclerosis*. 1990; 10: 240-245.
157. Luke C., Widder R.A., Soudavar F., Walter P., Brunner R., Borberg H. Improvement of macular function by membrane differential filtration in diabetic retinopathy. *J Clin Apheresis*. 2001;16(1):23-8.
158. Luscher T.F., Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*. 1997;20(11 Suppl 2):II-3-10.
159. Mabuchi H., Koizumi J., Shimizu M., Kajinami K., Miyamoto S., Ueda K., Takegoshi T. Long-term efficacy of low-density lipoprotein apheresis on coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. Hokuriku-FH-LDL-Apheresis Study Group. *Am J Cardiol*. 1998;82(12):1489-95.
160. Mabuchi H, Higashikata T, Kawashiri MA. Clinical applications of long-term LDL-apheresis on and beyond refractory hypercholesterolemia. *Transfus Apher Sci*. 2004;30(3):233-43.
161. Maher V.M.G., Thompson G.R. LDL apheresis: role in the treatment of atherosclerosis. *J. Irish Coll. Phys. Surgeons*. 1996; 25: 96–99.
162. Mach F., Schonbeck U., Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis*. 1998; 137 Suppl:S89-95..
163. Malyszko J., Malyszko J.S., Hryszko T., Mysliwiec M. Increased soluble CD40L levels are reduced by long-term simvastatin treatment in peritoneally dialyzed patients. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004;15: 463-7.
164. Marx N., Imhof A., Froehlich J., Siam L., Ittner J., Wierse G., Schmidt A., Maerz W., Hombach V., Koenig W. Effect of rosiglitazone treatment on soluble CD40L in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Circulation*. 2003;107:1954-7.
165. Matic G., Kohlschein P., Wallstab U., Tiess M., Winkler R., Prophet H., Ramlow W., Schuff-Werner P. Comparison of two filter combinations for low-density lipoprotein apheresis by membrane differential filtration: a prospective crossover controlled clinical study. *Artif Organs*. 2002 ;26(4):371-7.

166. Matsuzaki M., Hiramori K., Imaizumi T., Kitabatake A., Hishida H., Nomura M., Fujii T., Sakuma I., Fukami K., Honda T., Ogawa H., Yamagishi M. Intravascular ultrasound evaluation of coronary plaque regression by low density lipoprotein-apheresis in familial hypercholesterolemia: the Low Density Lipoprotein-Apheresis Coronary Morphology and Reserve Trial (LACMART). *J Am Coll Cardiol.* 2002;40(2):220-7.
167. Mazzi, G., Govoni, M., Raineri, A. A severe anaphylactoid reaction during cascade filtration in a patient receiving ACE inhibitors. *Transf.Sci.*, 1994;15: 79-82
168. McAllister K.A., Grogg K.M., Johnson D.W., Gallione C.J., Baldwin M.A., Jackson C.E., Helmbold E.A., Markel D.S., McKinnon W.C., Murrell J. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet.* 1994; 8: 345-51.
169. McEver R.P., Moore K.L., Cummings R.D. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem.* 1995;270(19):11025-8.
170. McKenney J.M. Update on the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines: getting to goal. *Pharmacotherapy.* 2003; 23: 26S-33S.
171. Melichar B., Gregor J., Solichova D., Lukes J., Tichy M., Pidrman V. Increased urinary neopterin in acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1994; 40: 338-339.
172. Merten M., Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis. *Z Kardiol.* 2004;93(11):855-63.
173. Michelson A.D., Barnard M.R., Krueger L.A., Valeri C.R., Furman M.I. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001;104(13):1533-7.
174. Miljours S., Braun C.M. A neuropsychotoxicological assessment of workers in a sodium azide production plant. *Int Arch Occup Environ Health.* 2003;76:225-32.
175. Miller Y.I., Chang M.K., Binder C.J., Shaw P.X., Witztum J.L. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol.* 2003; 14: 437-45.
176. Molinaro G., Adam A., Lepage Y., Hammerschmidt D., Koenigbauer U., Eastlund T. Hypotensive reaction during staphylococcal protein A column therapy in a patient with anomalous degradation of bradykinin and Des-Arg9-bradykinin after contact activation. *Transfusion.* 2002;42(11):1458-65.
177. Moreno P.R., Falk E., Palacios I.F., Newell J.B., Fuster V., Fallon J.T. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: Implications for plaque rupture. *Circulation* 1994; 90: 775-778.
178. Moriarty P.M., Gibson C.A. Low-density lipoprotein apheresis in the treatment of atherosclerosis and other potential uses. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2001;3:156–162. Citace A.

179. Moriarty P.M., Gibson C.A., Shih J., Matias M.S. C-reactive protein and other markers of inflammation among patients undergoing HELP LDL apheresis. *Atherosclerosis*. 2001; 158: 495-8. Citace B.
180. Muso E., Mune M., Fujii Y., Imai E., Ueda N., Hatta K., Imada A., Takemura T., Miki S., Kuwahara T., Takamitsu Y., Tsubakihara Y.; Kansai FGS LDL Apheresis Treatment (K-FLAT) Study Group. Significantly rapid relief from steroid-resistant nephrotic syndrome by LDL apheresis compared with steroid monotherapy. *Nephron*. 2001;89(4):408-15.
181. Myant N.B. Familial defective apolipoprotein B-100: A review, including some comparisons with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1993;104:1-18.
182. Myers D., Wroblewski S., Londy F., Fex B., Hawley A., Schaub R., Greenfield L., Wakefield T. New and effective treatment of experimentally induced venous thrombosis with anti-inflammatory rPSGL-Ig. *Thromb Haemost*. 2002;87(3):374-82.
183. Myers D., Hawley A.E., Farris D.M., Wroblewski S.K., Thanaporn P., Schaub R.G., Wagner D.D., Kumar A., Wakefield T.W. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis *J Vasc Surg*. 2003;38(5):1075-89.
184. Myers G.L., Rifai N., Tracy R.P., Roberts W.L., Alexander R.W., Biasucci L.M., Catravas J.D., Cole T.G., Cooper G.R., Khan B.V., Kimberly M.M., Stein E.A., Taubert K.A., Warnick G.R., Waymack P.P.; CDC; AHA. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: report from the laboratory science discussion group. *Circulation*. 2004;110: e545-9.
185. Nakayama T., Date C., Yokoyama T., Yoshiike N., Yamaguchi M., Tanaka H. A 15,5-year follow-up study of stroke in a Japanese provincial city: the Shibata Study. *Stroke* 1997; 28: 45-52.
186. Navab M., Berliner J.A., Watson A.D., Hama S.Y., Territo M.C., Lusis A.J., Shih D.M., Van Lenten B.J., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Fogelman A.M. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16: 831-42.
187. Nelken N.A., Coughlin S.R., Gordon D., Wilcox J.N. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 1991;88:1121-1127.
188. Neurauter G., Wirleitner B., Laich A., Schennach H., Weiss G., Fuchs D. Atrovastatin supresses interferon- $\gamma$ -induced neopterin formation and tryptophan degradation in human peripheral blood mononuclear cells and monocytic cell lines. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 264-267.
189. Nishiyama K., Ogawa H., Yasue H., Soejima H., Misumi K., Takazoe K., Yoshimura M., Kugiyama K., Tsuji I., Kumeda K. Simultaneous elevation of the levels of circulating monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor in acute coronary syndromes. *Jpn Circ J*. 1998;62(9):710-2.

190. Nordestgaard B.G. The vascular endothelial barrier--selective retention of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7(5): 269-73.
191. Nosé Y., Usami M., Malchesky P.S. Clinical thermofiltration: initial application. *Artif Organs* 1985;9:425-7.
192. Osmančik P., Kvasnička J., Widimský P., Tarnok A. Diurnal variation of soluble E- and P-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 in patients with and without coronary artery disease. *Cardiology* 2004;102(4):194-9.
193. Otto, C. and Schwandt P. C-reactive protein concentration is reduced by different types of LDL apheresis. *Atherosclerosis* 2001; 2 :81–82.
194. Otto C., Geiss H.C., Empen K., Parhofer K.G. Long-term reduction of C-reactive protein concentration by regular LDL apheresis. *Atherosclerosis* 2004;174: 151-6.
195. Owen H.G., Brecher M.E. Atypical reactions associated with use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and apheresis. *Transfusion* 1994;34(10):891-4.
196. Padilla A., Moake J.L., Bernardo A., Ball C., Wang Y., Arya M., Nolasco L., Turner N., Berndt M.C., Anvari B., Lopez J.A., Dong J.F. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood* 2004;103(6):2150-6.
197. Palabrica T., Lobb R., Furie B.C., Aronovitz M., Benjamin C., Hsu Y.M., Sajer S.A., Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992;359(6398):848-51.
198. Pannacciulli N., Cantatore F.P., Minenna A., Bellacicco M., Giorgino R., De Pergola G. C-reactive protein is independently associated with total body fat, central fat, and insulin resistance in adult women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25: 1416-20. Citace A
199. Pannacciulli N, Cantatore FP, Minenna A, Bellacicco M, Giorgino R, De Pergola G. Urinary albumin excretion is independently associated with C-reactive protein levels in overweight and obese nondiabetic premenopausal women. *J Intern Med* 2001 B; 250: 502-7. Citace B.
200. Parhami F., Fang Z.T., Fogelman A.M., Andalibi A., Territo M.C., Berliner J.A. Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Invest* 1993;92(1):471-8.
201. Pasceri V., Willerson J.T., Yeh E.T. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000; 102: 2165-8.
202. Petrucco A., Bordin P., Da Col P.G., Fonda M., Cattin L. Hypotension during sham apheresis in a patient taking ACE inhibitors. *JAMA* 1995;273(7):520-1.
203. Pietila K., Harmoinen A., Poyhonen L., Ruosteenoja R. C-reactive protein in subendocardial and transmural myocardial infarcts. *Clin Chem* 1986; 32: 1596-7.

204. Pietila K., Harmoinen A., Teppo A.M. Acute phase reaction, infarct size and in-hospital morbidity in myocardial infarction patients treated with streptokinase or recombinant tissue type plasminogen activator. *Ann Med* 1991;23: 529-35.
205. Pietila K., Harmoinen A., Hermens W., Simoons M.L., Van de Werf F., Verstraete M. Serum C-reactive protein and infarct size in myocardial infarct patients with a closed versus an open infarct-related coronary artery after thrombolytic therapy. *Eur Heart J* 1993; 14: 915-9.
206. Pokrovsky S.N., Sussekov A.V., Adamova I.Y., Afanasieva O.I., Benevolenskaya G.F., Konovalov G.A., Kukharchuk V.V. Development of immunosorbents for apoB-containing lipoproteins apheresis. *Artif Organs* 1995;19:500-5.
207. Pokrovsky S., Straube R., Afanasieva O., Kukharchuk V., Konovalov G. Lp(a) apheresis for the treatment of severe CHD patients with Lp(a) hyperlipidemia. *Ther Apher Dial* 2005;9(5):A40.
208. Porreca E., Di Febbo C., Reale M., Castellani M.L., Baccante G., Barbacane R., Conti P., Cuccurullo F., Poggi A. Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) is a mitogen for cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 1997;34(1):58-65.
209. Proud D., Kaplan A.P. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu Rev Immunol* 1988;6:49-83.
210. Pták J. Aktivace komplementu. In: Pták J. Imunoadsorpce v léčbě myastenia gravis. Disertační práce. Lékařská fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové, 2004, s. 86-90.
211. Pulawski E., Mellwig K.P., Brinkmann T., Kleesiek K., Horstkotte D. Influence of single low-density lipoprotein apheresis on the adhesion molecules soluble vascular cellular adhesion molecule-1, soluble intercellular adhesion molecule-1, and P-selectin. *Ther Apher* 2002; 6(3):229-33.
212. Rader, J., Cohen, J., Hobbs, H.H. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J.Clin. Invest* 2003; 111: 1795-1803.
213. Reckless J., Rubin E.M., Verstuyft J.B., Metcalfe J.C., Grainger D.J. Monocyte chemoattractant protein-1 but not tumor necrosis factor-alpha is correlated with monocyte infiltration in mouse lipid lesions. *Circulation* 1999;99(17):2310-6.
214. Rech J., Bernhart K., Kalden, J.R.: Repetitive cyclic LDL-apheresis by the new Lipocollect 200 adsorber in combination with the ADA-sorb Device. Proceedings 5<sup>th</sup> World congress of the International Society for Apheresis. Rostock, 4.-7.5. 2005. B-29.
215. Ridker P.M., Glynn R.J., Hennekens C.H. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation* 1998;97(20):2007-11. Citace A.



216. Ridker P.M., Cushman M., Stampfer M.J., Tracy R.P., Hennekens C.H. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation* 1998; 97: 425-8. Citace B.
217. Ridker P.M., Buring J.E., Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation* 2001;103(4):491-5.
218. Ridker P.M., Cannon C.P., Morrow D., Rifai N., Rose L.M., McCabe C.H., Pfeffer M.A., Braunwald E; Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 (PROVE IT-TIMI 22) Investigators. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 2005; 352: 20-8.
219. Rifai N., Ridker P.M. Population distributions of C-reactive protein in apparently healthy men and women in the United States: implication for clinical interpretation. *Clin Chem* 2003; 49: 666-9.
220. Richter W.O., Jacob B.G., Ritter M., Sühler K., Vierneisel K., Schwandt P. Three-Year Treatment of Familial Heterozygous Hypercholesterolemia by Extracorporeal Low-Density Lipoprotein Immunoabsorption with Polyclonal Apolipoprotein B Antibodies. *Metabolism* 1993; 42: 888-94.
221. Richer W.O., Donner M.G., Schwandt P. Three low density lipoprotein apheresis techniques in treatment of patients with hypercholesterolemia: a long-term evaluation. *Ther Apher* 1999;3:203-8.
222. Roberts A.B., Sporn M.B. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* 1993; 8: 1-9.
223. Romo G.M., Dong J.F., Schade A.J., Gardiner E.E., Kansas G.S., Li C.Q., McIntire L.V., Berndt M.C., Lopez J.A. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* 1999;190(6):803-14.
224. Romundstad S., Holmen J., Kvenild K., Hallan H., Ellekjaer H. Microalbuminuria and all-cause mortality in 2,089 apparently healthy individuals: a 4.4-year follow-up study. The Nord-Trondelag Health Study (HUNT), Norway. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 466-73.
225. Rosenson R.S., Tangney C.C., Levine D.M., Parker T.S., Gordon B.R. Association between reduced low density lipoprotein oxidation and inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 production in statin-treated subjects. *J Lab Clin Med* 2005;145(2):83-7.
226. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999;138(5 Pt 2):S419-20.
227. Rossler A., Berrouschot J., Barthel H., Hesse S., Koster J., Schneider D. Potential of rheopheresis for the treatment of acute ischemic stroke when initiated between 6 and 12 hours *Ther Apher* 2000;4(5):358-62.

228. Sampietro T., Tuoni M., Ferdeghini M., Ciardi A., Marraccini P., Prontera C., Sassi G., Taddei M., Bionda A. Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecule expression in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1997;96(5):1381-5.
229. Sawada K., Yamamoto H., Yago H., Suehiro S. A simple assay to detect endothelial cell injury; measurement of released thrombomodulin from cell. *Exp Mol Pathol* 1992; 57: 116-123.
230. Scalia R., Appel J.Z. 3rd, Lefer A.M. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(7):1093-100.
231. Seino Y., Ikeda U., Takahashi M., Hojo Y., Irokawa M. Kasahara T., Shimada K. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular tissue. *Cytokine* 1995;7(6):575-9.
232. Semb A.G., van Wissen S., Ueland T., Smilde T., Waehre T., Tripp M.D., Froland S.S., Kastelein J.J., Gullestad L., Pedersen T.R., Aukrust P., Stalenhoef A.F. Raised serum levels of soluble CD40 ligand in patients with familial hypercholesterolemia: downregulatory effect of statin therapy. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 275-9.
233. Shankar A., Klein R., Moss S.E., Klein B.E., Wong T.Y. The relationship between albuminuria and hypercholesterolemia. *J Nephrol* 2004;17(5):658-65.
234. Shiga Y., Fujihara K., Onodera H. Complement activation as a cause of transient hypotension during plasmapheresis. *Artificial organs* 1998;22:1067-1069.
235. Shimomura H., Ogawa H., Arai H., Moriyama Y., Takazoe K., Hirai N., Kaikita K., Hirashima O., Misumi K., Soejima H., Nishiyama K., Yasue H. Serial changes in plasma levels of soluble P-selectin in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1998;81(4):397-400.
236. Schamberger B.M., Geiss H.C., Ritter M.M., Schwandt P., Parhofer K.G. Influence of LDL apheresis on LDL subtypes in patients with coronary heart disease and severe hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res* 2000;41(5):727-33.
237. Schaumann D., Welch-Wichary M., Voss A. Schmidt H., Olbricht C.J. Prospective cross-over comparisons of three low-density lipoprotein (LDL)-apheresis methods in patients with familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 1996;26(11):1033-8.
238. Schettler V., Monazahian M., Wieland E., Thomssen R., Muller G.A. Effect of heparin-induced extracorporeal low-density lipoprotein precipitation (HELP) apheresis on hepatitis C plasma virus load. *Ther Apher* 2001;5(5):384-6.
239. Schettler V., Wieland E., Armstrong V.W., Kleinoeder T., Grunewald R.W., Muller G.A.; Participants of the Gottingen Consensus Conferences. First steps toward the establishment of a German low-density lipoprotein-apheresis registry: recommendations for the indication and for quality management. *Ther Apher* 2002;6(5):381-3.

240. Schmaldienst S., Banyai S., Stulnig T.M., Heinz G., Jansen M., Horl W.H., Derfler K. Prospective randomised cross-over comparison of three LDL-apheresis systems in statin pretreated patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2000;151:493-9.
241. Schonbeck U., Mach F., Libby P. CD154 (CD40 ligand). *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 687-93.
242. Schonbeck U., Gerdes N., Varo N., Reynolds R.S., Horton D.B., Bavendiek U., Robbie L., Ganz P., Kinlay S., Libby P. Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation* 2002; 106: 2888-93.
243. Schuff-Werner P. Clinical long-term results of H.E.L.P.-apheresis. *Z Kardiol* 2003; 92: III 28-9.
244. Schumacher M., Eber B., Tatzber F., Kaufmann P., Esterbauer H., Klein W. Neopterin levels in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1992; 94: 87-88.
245. Schwenke D.C., Carew T.E. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis* 1989;9: 895-907.
246. Siami G.A., Siami F.S., Morrow J.D., Stone W.J. Cryofiltration apheresis and plasma fractionation causing anaphylactoid reactions in patients receiving angiotensin converting enzyme inhibitors. *Ther Apher* 1997;1(4):325-9.
247. Siami G.A., Siami F.S. Membrane plasmapheresis in the United States: a review over the last 20 years. *Ther Apher* 2001;5(4):315-20.
248. Sinzinger H., Kritz H. LDL-apheresis improves microalbuminuria in patients with severe familial heterozygous hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1999; 143(1): 223-4.
249. Sinzinger H., Kritz H., Furberg C.D. Atorvastatin reduces microalbuminuria in patients with familial hypercholesterolemia and normal glucose tolerance. *Med Sci Monit* 2003; 9(7) :88-92.
250. Siscovick D.S., Schwartz S.M., Rosendaal F.R., Psaty B.M. Thrombosis in the young: effect of atherosclerotic risk factors on the risk of myocardial infarction associated with prothrombotic factors. *Thromb Haemost* 1997; 78(1): 7-12.
251. Smith J.D., Trogan E., Ginsberg M., Grigaux C., Tian J., Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(18):8264-8.
252. Smith D.A., Zouridakis E.G., Mariani M., Fredericks S., Cole D., Kaski J.C. Neopterin levels in patients with coronary artery disease are independent of Chlamydia pneumoniae seropositivity. *Am Heart J* 2003; 146: 69-74.

253. Somers W.S., Tang J., Shaw G.D., Camphausen R.T. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* 2000;103(3):467-79.
254. Sonntag J., Emeis M., Vornwald A. Complement activation during plasma production depends on the apheresis technique. *Transfusion medicine* 1998; 8: 205-208
255. Soška V. Cholesterol a triglyceridy – vztah k ateroskleróze. In: Soška V. Poruchy metabolismu lipidů. Diagnostika a léčba. Praha: Grada Publishing, 2001, s. 31. ISBN 80-247-0234-7.
256. Sporn L.A., Marder V.J., Wagner D.D. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell* 1986;46(2):185-90.
257. Springer T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346(6283):425-34.
258. Springer T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76(2):301-14.
259. Stampfer M.J., Krauss R.M., Ma J., Blanche P.J., Holl L.G., Sacks F.M., Hennekens C.H. A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1996; 276: 882-8.
260. Stefanec G.M: Prädiktionsparameter extrakorporaler Eliminationstherapien an Modell der LDL-apherese. Disertationsarbeit. Eds.: Copy Team. Köln, Germany: 1999. 118 s. ISBN 80-7262-147-5.
261. Stefansson S., Peticlec E., Wong M.K., McMahon G.A., Brooks P.C., Lawrence D.A. Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 2001; 276: 8135-41.
262. Stefoni S., Cianciolo G., Donati G., Dormi A., Silvestri M.G., Coli L., De Pascalis A., Iannelli S. Low TGF-beta1 serum levels are a risk factor for atherosclerosis disease in ESRD patients. *Kidney Int* 2002; 61: 324-35.
263. Stehouwer C.D., Gall M.A., Twisk J.W., Knudsen E., Emeis J.J., Parving H.H. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes* 2002; 51(4): 1157-65.
264. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-24.
265. Straube R., Gackler D., Thiele A., Muselmann L., Kingreen H., Klingel R. Membrane differential filtration is safe and effective for the long-term treatment of Refsum syndrome - an update of treatment modalities and pathophysiological cognition. *Transfus Apheresis Sci* 2003; 29: 85-91.

266. Suckfull M.; Hearing Loss Study Group. Fibrinogen and LDL apheresis in treatment of sudden hearing loss: a randomised multicentre trial. *Lancet* 2002;360(9348):1811-7.
267. Sullivan V.V., Hawley A.E., Farris D.M., Knipp B.S., Varga A.J., Wroblewski S.K., Thanapron P., Eagleton M.J., Myers D.D., Fowlkes J.B., Wakefield T.W. Decrease in fibrin content of venous thrombi in selectin-deficient mice. *J Surg Res* 2003;109(1):1-7.
268. Sweeney J.D., Dupuis M., Mega A.P. Hypotensive reactions to red cells filtered at the bedside, but not to those filtered before storage, in patients taking ACE inhibitors. *Transfusion* 1998;38(4):410-1
269. Tall A.R., Jiang X., Luo Y., Silver D. 1999 George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1185-8.
270. Tanaka T., Nakamura Y., Nasuno A., Mezaki T., Higuchi K., Fukunaga H., Tsuchida K., Ozaki K., Hori T., Matsubara T., Aizawa Y. Plasma concentrations of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and neopterin in the coronary circulation of patients with coronary artery disease. *Circ J* 2004;68(2):114-20.
271. Tashiro H., Shimokawa H., Sadamatu K., Yamamoto K. Prognostic significance of plasma concentrations of transforming growth factor-beta in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2002; 13: 139-43.
272. Tataru M.C., Heinrich J., Junker R., Schulte H., von Eckardstein A., Assmann G., Koehler E. C-reactive protein and the severity of atherosclerosis in myocardial infarction patients with stable angina pectoris. *Eur Heart J* 2000; 21(12): 1000-8.
273. Tatzber F., Rabl H., Koriska K., Erhart U., Puhl H., Waeg G. Elevated serum neopterin levels in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1991; 89: 203-208.
274. Thompson G.R. LDL apheresis. *Atherosclerosis* 2003;167(1):1-13.
275. Toepfer M., Sitter T., Burchardi C. Klinische immunoadsorption. *Dtsch. med. Wschr.* 1999; 124:461-465.
276. Torzewski M., Rist C., Mortensen R.F., Zwaka T.P., Bienek M., Waltenberger J., Koenig W., Schmitz G., Hombach V., Torzewski J. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(9): 2094-9.
277. Tsunoda S., Daimon S., Miyazaki R., Fujii H., Inazu A., Mabuchi H. LDL apheresis as intensive lipid-lowering therapy for cholesterol embolism. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14(4):1041-2.
278. Valbonesi M., Mora F., Mora R., Carrier P. Rheopheresis for sudden hearing loss (SHL). : *Int J Artif Organs* 2004;27(9):806-9.

279. Van de Kerkhof P.C., Rulo H.F., van Pelt J.P., van Vlijmen-Willems I.M., De Jong E.M. Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm Venereol* 1998; 78: 19-21.
280. Van Haelst P.L., van Doormaal J.J., May J.F., Gans R.O., Crijns H.J., Cohen Tervaert J.W. Secondary prevention with fluvastatin decreases levels of adhesion molecules, neopterin and C-reactive protein. *Eur J Intern Med* 2001; 12: 503-509.
281. Van Haelst P.L., Liem A., van Boven A.J., Veeger N.J., van Veldhuisen D.J., Tervaert J.W. Usefulness of elevated neopterin and C-reactive protein levels in predicting cardiovascular events in patients with non-Q-wave myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2003; 92:1201-3.
282. Vasan R.S., Sullivan L.M., Roubenoff R., Dinarello C.A., Harris T., Benjamin E.J., Sawyer D.B., Levy D., Wilson P.W., D'Agostino R.B.; Framingham Heart Study. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2003; 107(11): 1486-91
283. Vella A., Pineda A.A., O'Brien T. Low density lipoprotein apheresis for the treatment of refractory hyperlipidemia. *Mayo Clin Proc* 2001;76:1039-46.
284. Verresen L., Waer M., Vanrenterghem Y., Michielsens P. Angiotensin-converting-enzyme inhibitors and anaphylactoid reactions to high-efflux membrane dialysis. *Lancet* 1990;336:1360-2.
285. Vestweber D., Blanks J.E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999;79(1):181-213.
286. Vishnevetsky D., Kiyani V.A., Gandhi P.J. CD40 ligand: a novel target in the fight against cardiovascular disease. *Ann Pharmacother* 2004; 38(9): 1500-8.
287. Vrecko K., Walzl M., Tafeit E., Reibnegger G. Relationship among serum and urine neopterin, fibrinogen, and other serum analytes in atherosclerotic patients and long-term effect of H.E.L.P. therapy. *Pteridines* 1999; 10(4): 190-196.
288. Wagner D.D., Burger P.C. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(12):2131-7.
289. Wachtell K., Palmieri V., Olsen M.H., Bella J.N., Aalto T., Dahlöf B. Urine albumine/creatinine ratio and echocardiographic left ventricular structure and function in hypertensive patients with electrocardiographic left ventricular hypertrophy: the LIFE study. *Am Heart J* 2002; 143: 319-326.
290. Wachter H., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Werner E.R. Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem* 1989; 27:81-141.
291. Wang J.M., Kumar S., van Agthoven A., Kumar P., Pye D., Hunter R.D. Irradiation induces up-regulation of E9 protein (CD105) in human vascular endothelial cells. *Int J Cancer* 1995; 62: 791-6.

292. Weinstein R. Hypocalcemic toxicity and atypical reactions in therapeutic plasma exchange. *J Clin Apher* 2001;16(4):210-1.
293. Weiss G., Willeit J., Kiechl S., Fuchs D., Jarosch E., Oberhollenzer F. Increased concentrations of neopterin in carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1994; 106: 263-271.
294. Weller A., Isenmann S., Vestweber D. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 1992;267(21):15176-83
295. Wieland H., Seidel D. A simple method for precipitation of low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1983;24:904.
296. Wieland E., Schettler V., Armstrong V.W. Highly effective reduction of C-reactive protein in patients with coronary heart disease by extracorporeal low density lipoprotein apheresis. *Atherosclerosis* 2002; 162: 187-91.
297. Yan J.C., Zhu J., Gao L., Wu Z.G., Kong X.T., Zong R.Q., Zhan L.Z. The effect of elevated serum soluble CD40 ligand on the prognostic value in patients with acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta* 2004; 343: 155-9.
298. Yanagisawa T., Otsubo O., Nozaki H., Inou T., Sugimoto H., Inoue S., Kuzuhara K. Massive proteinuria after renal transplantation treated with LDL-apheresis. *Transplant Proc* 1996;28(3):1482-3.
299. Yokoyama S., Hayashi R., Satani M., Yamamoto A. Selective removal of low density lipoprotein by plasmapheresis in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 1985;5:613-22.
300. Yudkin J.S., Forrest R.D., Jackson C.A. Microalbuminuria as predictor of vascular disease in non-diabetic subjects: Islington diabetes survey. *Lancet* 1988; 2: 530-533.
301. Yuyun M.F., Khaw K.T., Luben R., Welch A., Bingham S., Day N.E., Wareham N.J. Microalbuminuria, cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity in a British population: the EPIC-Norfolk population-based study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2004; 11(3): 207-13.
302. Zadák Z., Hyšpler R., Bakalář B., Crhová Š. Úloha cholesterolu a intermediárních metabolitů jeho syntézy v intenzivní péči a umělé výživě Vnitř. Lék. 2000;46(11):776 - 781.
303. Zadák Z., Hyšpler R., Bláha V., Tichá A., Solichová D, Šmahelová A., Sobotka L., Bakalář B. Změny absorpce a syntézy cholesterolu – nutriční a metabolické důsledky. In: *Klinická výživa u postižení ledvin, Metabolismus vápníku a Akutní metabolická péče.* Luboš Sobotka, Vladimír Teplan, Pavel Těšínský, Zdeněk Zadák. Hradec Králové: Nukleus HK<sup>®</sup>, 2005, s. 35-36. ISBN 80-86225-69-0.

304. Zee R.Y., Hegener H.H., Fernandez-Cruz A., Lindpaintner K. C-reactive protein gene polymorphisms and the incidence of post-angioplasty restenosis. *Atherosclerosis* 2004; 176: 393-6.
305. Zhu J., Nieto F.J., Horne B.D., Anderson J.L., Muhlestein J.B., Epstein S.E. Prospective study of pathogen burden and risk of myocardial infarction or death. *Circulation* 2001; 103: 45-51.
306. Zouvanis M., Raal F.J., Joffe B.I., Seftel H.C. Microalbuminuria is not associated with cardiovascular disease in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1995;113(2): 289-92.
307. Zwaka T.P, Hombach V., Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*. 2001; 103: 1194-7.
308. Fakultní nemocnice Hradec Králové. Zařízení k odstraňování vzduchu z adsorpční kolony. Původce vynálezu: Bláha V., Faktor F., Bláha M., Zadák Z. Int CI B01L 3/00/B6. Česká republika. Patentový spis 294018. 15. 7. 2004.



**Seznam tabulek**

Tabulka 1. Faktory a stavy asociované s přítomností mikroalbuminurie .....	31
Tabulka 2. Klinická charakteristika nemocných léčených LDL-imunoadsorpcí.....	39
Tabulka 3. Hladiny lipidů před a po LDL-aferéze .....	53
Tabulka 4. Pokles lipidů po LDL-aferéze .....	54
Tabulka 5. Pokles dalších parametrů po LDL-aferéze .....	54
Tabulka 6. Koncentrace selektinů ( $\mu\text{g/l}$ ), MCP-1 ( $\text{pg/l}$ ) a lipidů ( $\text{mmol/l}$ ) před a po první sledované LDL-aferéze .....	70
Tabulka 7. Koncentrace selektinů ( $\mu\text{g/l}$ ), MCP-1 ( $\text{pg/l}$ ) a lipidů ( $\text{mmol/l}$ ) před a po následující LDL-aferéze .....	70
Tabulka 8. Pokles koncentrace selektinů, MCP-1 a lipidů po první sledované LDL-aferéze .....	71
Tabulka 9. Pokles koncentrace selektinů, MCP-1 a lipidů po následující LDL-aferéze .....	71
Tabulka 10. Hladiny lipidů před a po LDL-aferéze a jejich pokles po LDL-aferéze.....	79
Tabulka 11. Hodnoty indexu neopterin/kreatinin v moči ( $\mu\text{mol/mol}$ ) .....	80
Tabulka 12. Korelace indexu neopterin/kreatinin se sérovými lipidy .....	82
Tabulka 13. Hladiny některých ukazatelů aktivace endotelu a stavu hemostázy před a po LDL-aferéze .....	86
Tabulka 14. Hodnoty indexu albumin/kreatinin v moči ( $\text{mg/mmol}$ ) .....	88
Tabulka 15. Korelace indexu albumin/kreatinin se sérovými lipidy .....	89
Tabulka 16. Hodnoty parametrů, stanovených pouze před LDL-aferézou.....	91
Tabulka 17. Hladiny lipidů, hsCRP, sCD40L, neopterinu a endoglinu před a po první sledované LDL-aferéze.....	98
Tabulka 18. Hladiny lipidů, hsCRP, sCD40L, neopterinu a endoglinu před a po následující LDL-aferéze .....	99
Tabulka 19. Pokles koncentrací lipidů, hsCRP, sCD40L, neopterinu a endoglinu po první sledované LDL-aferéze, vyjádřený v procentech preaferetické hodnoty .....	99
Tabulka 20. Pokles koncentrací lipidů, hsCRP, sCD40L, neopterinu a endoglinu po následující LDL-aferéze, vyjádřený v procentech preaferetické hodnoty .....	100
Tabulka 21. Výsledky koncentrací sledovaných parametrů před vstupem a po výstupu z eliminačních médií .....	100

## Seznam grafů

Graf 1. Průměrné hladiny lipidů a jejich součástí před a po LDL-aféřeze .....	53
Graf 2. Závislost absolutního poklesu LDL-cholesterolu korigovaného na jednotku zpracované plazmy na pořadovém čísle LDL-aféřezy u každého páru kolon .....	63
Graf 3. Závislost relativního poklesu LDL-cholesterolu na pořadovém čísle LDL-aféřezy u každého páru kolon .....	63
Graf 4. Závislost absolutního poklesu HDL-cholesterolu na pořadovém čísle LDL-aféřezy u každého páru kolon .....	64
Graf 5. Závislost relativního poklesu HDL-cholesterolu na pořadovém čísle LDL-aféřezy u každého páru kolon .....	64
Graf 6. Průkaz snížené účinnosti jedné z kolon .....	67
Graf 7. Koncentrace celkového, LDL- a HDL- cholesterolu a triacylglyceridů (mmol/l) před a po první sledované LDL-aféřeze.....	72
Graf 8. Koncentrace celkového, LDL- a HDL- cholesterolu a triacylglyceridů (mmol/l) před a po následující LDL-aféřeze .....	72
Graf 9. Hladiny P-selektinu, E-selektinu ( $\mu\text{g/l}$ ) a MCP-1 (pg/l) před a po první sledované LDL-aféřeze .....	73
Graf 10. Hladiny P-selektinu, E-selektinu ( $\mu\text{g/l}$ ) a MCP-1 (pg/l) před a po následující LDL-aféřeze .....	73
Graf 11. Průměrné hodnoty indexu neopterin/kreatinin ( $\mu\text{mol/mol}$ ) v jednotlivých sledovaných dnech .....	80
Graf 12. Vztah procentuálního poklesu indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféřeze a koncentrace celkového cholesterolu před LDL-aféřou .....	83
Graf 13. Vztah procentuálního poklesu indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféřeze a koncentrace LDL-cholesterolu před LDL-aféřou .....	83
Graf 14. Vztah absolutního poklesu indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféřeze a koncentrace celkového cholesterolu před LDL-aféřou .....	84
Graf 15. Vztah absolutního poklesu indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféřeze a koncentrace LDL-cholesterolu před LDL-aféřou .....	84
Graf 16. Vztah absolutního poklesu koncentrace celkového cholesterolu a absolutního poklesu hodnoty indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféřeze .....	85
Graf 17. Vztah absolutního poklesu koncentrace LDL-cholesterolu a absolutní ho poklesu hodnoty indexu neopterin/kreatinin po LDL-aféřeze .....	85

Graf 18. Průměrné koncentrace fibrinogenu, trombomodulinu a tkáňového aktivátoru plazminogenu-1 před a po LDL-aféřeze .....	87
Graf 19. Průměrné koncentrace von Willebrandova faktoru a inhibitoru aktivátoru plazminogenu-1 před a po LDL-aféřeze .....	87
Graf 20. Průměrné hodnoty indexu albumin/kreatinin v jednotlivých dnech (mg/mmol) .....	88
Graf 21. Vztah indexu neopterin/kreatinin v den LDL-aféřezy večer a indexu albumin/kreatinin před LDL-aféřou .....	90
Graf 22. Sérové koncentrace lipidů před a po obou sledovaných LDL-aféřách.....	101
Graf 23. Sérové koncentrace hsCRP před a po obou sledovaných LDL-aféřách .....	101
Graf 24. Sérové koncentrace CD40L před a po obou sledovaných LDL-aféřách .....	102
Graf 25. Sérové koncentrace neopterinu před a po obou sledovaných LDL-aféřách .....	102
Graf 26. Sérové koncentrace endoglinu před a po obou sledovaných LDL-aféřách .....	103
Graf 27 . Vztah sérových koncentrací sCD40L a celkového cholesterolu .....	103
Graf 28. Vztah sérových koncentrací sCD40L a LDL-cholesterolu .....	104

**Seznam obrázků**

Obrázek 1. Schéma imunoadsorpce LDL-cholesterolu .....	48
Obrázek 2. Princip imunoadsorpce .....	49
Obrázek 3. Princip regenerace kolon (desorpce) .....	49
Obrázek 4. Schéma filtrace LDL-cholesterolu (frakcionace plazmy) .....	50
Obrázek 5. Princip filtrace LDL-cholesterolu .....	51
Obrázek 6. Schématické zobrazení zařízení na odčerpávání vzduchu z imunoadsorpčních kolon .....	59

## Seznam zkratek

- ACEI = inhibitor angiotensin konvertujícího enzymu
- ALT = alaninaminotransferáza
- apoB<sub>100</sub> = apolipoprotein B<sub>100</sub>
- apoAI = apolipoprotein AI
- AST = aspartátaminotransferáza,
- BMI = body mass index
- CD40L = CD40 ligand, známý též jako CD154, TRAP (TNF-Related Activation Protein)  
nebo TBAM (T-cells B-cell activation molecule)
- CMP = cévní mozková příhoda
- CRP = C-reaktivní protein
- DALI = Direct Adsorption of Lipids - přímá adsorpce lipoproteinů pomocí  
hemoperfuze, LDL-hemoperfuze
- DFPP = double filtration plasmapheresis - dvojitá filtrační plazmaferéza
- DSA = adsorpce na dextransulfát
- ELAM-1 = endotelial leukocyte adhesion molecule-1 = E-selektin
- FCH = familiární kombinovaná hyperlipidemie
- FDA = *Food and Drug Administration*
- FH = familiární hypercholesterolemie
- HDL = high density lipoprotein, lipoprotein o vysoké hustotě
- HELP = Heparin Induced Extracorporeal LDL Precipitation - heparinem navozená  
extrakorporální precipitace LDL-cholesterolu
- HMG-CoA reductáza = hydroxymetyl-glutaryl-coenzym A reductáza
- hsCRP = high sensitivity C-reaktivní protein (CRP stanovený vysoce senzitivní metodou)
- IA = imunoadsorpce
- ICAM-1 = intracellular adhesion molecule-1
- IDL = intermedial density lipoproteins, lipoproteiny o střední hustotě
- ICHDK = ischemická choroba dolních končetin
- ICHS = ischemická choroba srdeční
- INF- $\gamma$  = interferon- $\gamma$
- IM = infarkt myokardu
- IL-1 = interleukin-1
- IL-4 = interleukin-4

LCAT = lecitin-cholesterol-acyltransferáza  
LDL = low density lipoprotein, lipoprotein o nízké hustotě  
Lp(a) = lipoprotein (a)  
MCP-1 = monocytic chemoattractant protein-1, monocytární chemotaktický protein-1  
M-CSF = macrophage colony stimulating factor, faktor stimulující makrofágy  
MCV = střední objem erytrocytu  
MDF = membrane differential filtraton, membránové diferenciální filtrace  
NCEP = Národní cholesterolový edukační program, National Cholesterol Education Program  
non-HDL = non-HD-cholesterol  
PAI-1 = plasminogen activator inhibitor-1, inhibitor tkáňového aktivátoru plazminogenu-1  
PDGF = platelet derived growth factor  
PSGL-1 = P-selectin Glycoprotein Ligand-1  
RNA = ribonucleic acid, ribonukleová kyselina  
sCD40L = solubilní CD40 ligand  
sE-selektinu = solubilní forma E-selektinu v plazmě, solubilní E-selektin  
SIRS = Systemic Inflammatory Response Syndrome, syndrom systémové zánětlivé odpovědi  
sP-selektin = solubilní forma P-selektinu v plazmě, solubilní P-selektin  
sMCP-1 = solubilní forma MCP-1 v plazmě, solubilní MCP-1  
TAG = triacylglyceridy  
TC = celkový cholesterol  
TCDD = tetrachlorodibenzodioxin  
TGF $\beta$  = transforming growth factor  $\beta$   
TNF- $\alpha$  = tumor necrosis factor- $\alpha$   
t-PA = tkáňový aktivátor plazminogenu  
VCAM-1 = vascular cellular adhesion molecule-1  
VLDL = very low density lipoprotein, lipoprotein o velmi nízké hustotě  
vWF = von Willebrandův faktor

## **Poděkování**

Závěrem bych ráda poděkovala těm, kteří mi pomohli k napsání této práce. Především bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. MUDr. M. Bláhovi, CSc., který zavedl separační metody ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, zasvětil mě do jejich problematiky a poskytl mi cenné rady. Děkuji také všem pracovníkům Separátorového centra, bez jejichž účasti a pomoci by moje práce nebyla možná. Za inspiraci v mé práci děkuji také jednomu ze zakladatelů LDL-aférezы ve Fakultní nemocnici, prof. MUDr. Z. Zadákovi, CSc. Dále děkuji prof. MUDr. J. Malému, CSc., s jehož laskavým svolením jsem mohla práci provést na jím vedeném pracovišti – Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky LF v Hradci Králové a FN Hradec Králové. Děkuji za spolupráci doc. MUDr. B. Melicharovi, PhD. z Katedry vnitřního lékařství a MUDr. V. Mašinovi z Katedry lékařské biofyziky LF Hradec Králové za cenné rady v oblasti statistického zpracování výsledků.

