Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové
Fakultní nemocnice Hradec Králové

ZMĚNY VYBRANÝCH LABORATORNÍCH PARAMETRŮ METABOLIZMU A FAKTORŮ HEMOSTÁZY U NEMOCNÝCH S VROZENOU PORUCHOU METABOLIZMU LIPIDŮ V LÉČBĚ LDL-AFERÉZOU

MUDr. Martin BLAŽEK

Autoreferát dizertační práce

Studijní obor: Vnitřní nemoci

Hradec Králové, 2005

Práce byla zčásti podporována granty **IGA MZ ČR NR/8505-3, NR/8497-3, NR/8062-3**, dále **MŠ MO 0021620820** a **00179906**

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové
Fakultní nemocnice Hradec Králové

ZMĚNY VYBRANÝCH LABORATORNÍCH PARAMETRŮ METABOLIZMU A FAKTORŮ HEMOSTÁZY U NEMOCNÝCH S VROZENOU PORUCHOU METABOLIZMU LIPIDŮ V LÉČBĚ LDL-AFERÉZOU

MUDr. Martin BLAŽEK

Autoreferát dizertační práce

Studijní obor: Vnitřní nemoci

Hradec Králové, 2005

Práce byla zčásti podporována granty IGA MZ ČR NR/8505-3, NR/8497-3, NR/8062-3, dále MŠ MO 0021620820 a 00179906

Dizertační práce ve studijním oboru vnitřní nemoci byla vypracována na Oddělení klinické hematologie při II. interní klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Uchazeč : MUDr. Martin Blažek
II. interní klinika - Oddělení klinické hematologie
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel : Prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.
II. interní klinika - Oddělení klinické hematologie
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel – konzultant : Prof. MUDr. Milan Bláha, CSc.
II. interní klinika - Oddělení klinické hematologie
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti :

1. **MUDr. Zdeňka Gašová, CSc.,**
   Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha
2. **Prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc.,**
   interní hematoonkologická klinika LF MU, Brno

Autoreferát byl rozeslán dne 11. 5. 2006

Obhajoba se koná před komisí pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu všeobecné lékařství v oboru vnitřní nemoci

v pondělí dne 12. června 2006 od 10.00 hodin,
Onkologický pavilon FN v Hradci Králové
(budova č. 23, třetí podlaží, místnost č. 3.211.

Stanovisko k dizertaci vypracovala katedra interních oborů Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové.

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

Prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.
Předseda komise pro obhajoby dizertačních prací
v doktorském studijním programu – obor vnitřní nemoci.

1. Úvod

Ateroskleróza je ložiskovým degenerativním onemocněním cév s tvorbou aterosklerotických plátů, postihuje zejména velké a středně velké tepny. V průmyslově vyspělých zemích patří k nejčastějším příčinám úmrtí. V České republice je více než 50 % všech úmrtí způsobeno kardiovaskulárním onemocněním (1, 2). V kontextu současného poznání fyziologie i patofyziologie homeostázy představují lipidy ústřední rizikový faktor v patogeneze aterosklerózy (3, 4). Při komplexním působení mnoha faktorů se chronické či opakované poškození endotelu jeví jako důležitý mechanizmus v indukci endotelové dysfunkce a aterosklerózy (5, 6), významně určuje i další vývoj. Klinický dopad aterosklerotických změn odpovídá nejen jejich lokalizaci, ale také rychlosti rozvoje plátu, vzniku sekundárních komplikací a v neposlední řadě také možnostem kompenzačních mechanizmů. Zejména tzv. nestabilní sklerotický plát je zatížen vysokým rizikem, neboť ruptura plátu vede k obnažení vysoce trombogenních substancí a tedy k další aktivaci hemostázy s rozvojem nasedajícího trombu (7, 8). Právě arteriální trombóza bývá často podkladem akutní orgánové ischemie, zejména myokardu, mozku a končetin. Ateroskleróza může výrazně limitovat kvalitu i délku života nemocných. Snažíme se tedy o komplexní přístup v primární prevenci, dále o optimální ošetření již přítomné léze a o posouzení míry individuálního rizika společně s prevencí sekundární.

Dietní a kombinovaná medikamentózní opatření jsou léčebně neúčinná v základním přístupu asi u 5 % léčených pacientů (9, 10). U těžkých či geneticky podmíněných dyslipidemií vedou chirurgické metody, jako ileální bypass (11), porto-kavální shunt (12) a transplantace jater (13), k redukci plazmatických hladin lipidů, ale za cenu signifikantního zvýšení morbidity a mortality. Extrakorporální eliminace lipoproteinů je v těchto případech přínosem. U heterozygotů familiární hypercholesterolemie (FH) významně snižuje rychlost rozvoje aterogeneze a snižuje incidenci kardiovaskulárních komplikací, u homozygotů je metodou volby a v tomto smyslu vitální indikací (9). Prakticky všichni nemocní dlouhodobě a pravidelně léčení LDL-aferézou jsou vedle režimových opatření zajištěni i hypolipidemiky, výjimkou jsou pacienti netolerující statiny. I přes příznivý efekt farmakoterapie jsou pacienti s vážnou homozygotní formou FH a někteří heterozygoti FH odkázáni prakticky pouze na léčebný efekt extrakorporální eliminační metody. U homozygotů FH je LDL-aferéza považována za život zachraňující výkon (14). Efektivitu léčby ostatních nemocných s FH lze posoudit obtížně (interpretace je limitována věkem, přidruženou polymorbiditou atp.), ale řada prací také zde prokázala léčebný přínos LDL-aferézy (14, 15, 16, 17, 18).

V České republice se problematikou separačních technik zabývala od začátku 80. let Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK) (14). Oddělení klinické hematologie při II. interní klinice FN HK má jako akreditované separační centrum bohatou zkušenost s více než 1000 léčebnými výkony

LDL-aferézy. Jak plazmaferéza, jako nespecifická metoda, tak od roku 1996 i selektivní LDL-aferéza byly v léčbě hyperlipidémií na našem pracovišti uplatněny jako první v naší zemi. Předmětem našeho léčebného snažení je také komplexní přístup k ovlivnění komplikací vzniklých na podkladě aterosklerózy, opakovaně byla prokázána důležitost fluidokoagulační rovnováhy. Metabolická efektivita LDL-aferézy koreluje se zpomalením progrese či dokonce s regresí koronární aterosklerózy (19).

Od roku 1999 se léčebné LDL-aferéze věnuje také pracoviště při III. interní klinice 1. LF UK a VFN v Praze. Od roku 2004 provádí imunoaferézu u myastenie gravis skupina pracovníků v ÚHKT Praha.

Léčebná LDL-aferéza je metodou specifickou a selektivní, relativně bezpečnou a v klinické praxi efektivní. Podstatou metody LDL-aferézy je imunoadsorpce a synonymem je v odborné terminologii označení vazebná chromatografie či imunoadsorpce. V roce 1981 byla popsána Stoffelem (20) a v témže roce byla Borbergem zavedena do klinické praxe.

2. Cíl práce

Sledovali jsme soubor nemocných v rozsahu popsaném v metodické části; cílem bylo objasnit a interpretovat některé dosud nejasné patogenetické vztahy mezi vyšetřovanými veličinami, zejména šlo o :

- **změny v hematologickém a biochemickém profilu** při dlouhodobé léčbě, jejich vzájemné vazby a význam těchto změn
- změny, které by mohly být považovány za **časný marker optimální účinnosti** léčebných procedur LDL-aferézy (velikost nebo funkce krevních destiček, normalizace zvýšené aktivity adhezních molekul, aktivity endotelu nebo fibrinolýzy či spektra lipoproteinů)
- pilotní sonda analyzátorem **primární hemostázy** měla současně přispět k zavedení nově dostupné laboratorní metody ve FN Hradec Králové (Dade Behring PFA-100)
- K objektivnímu klinickému zhodnocení jsme sledovali **morfologické změny** karotických tepen pomocí neinvazivního UZ vyšetření

Cílem interpretace výsledků byla jejich **klinická aplikace**, snahou bylo :

- využít výsledků k výběru ukazatelů pro optimalizaci celého léčebného postupu (optimalizace jednotlivých procedur léčebné LDL-aferézy, určení optimálních intervalů mezi procedurami, délky cyklů a procedur; dále ke zlepšení monitorace aktivity sklerotických změn, k minimalizaci vedlejších účinků a k zachování kvality života nemocných)
- využít výsledků k ekonomizaci léčby (maximální a optimální využití adsorbérů)

3. Soubor nemocných a metody

Předkládaná práce využívá faktu, že LDL-aferéza je léčebnou metodou, kde během relativně krátké procedury dochází k prudkému poklesu hladin

některých patogeneticky významných faktorů. Tak lze „in vivo" studovat dynamiku relativně velmi rychlých změn plazmatické a buněčně-membránové homeostázy lipidů a také interakce jednotlivých aterogenních faktorů. Tuto situaci někteří autoři přirovnávají až k experimentálním poměrům (21).

Při práci bylo využito i příznivé situace co do možností využít zkušenosti a spolupráci jiných pracovních a výzkumných skupin. Pracoviště Fakultní nemocnice Hradec Králové, zúčastněná na této práci, jsou akreditovanými centry, disponují moderním přístrojovým vybavením a zkušeným klinickým i výzkumným personálem. Zpracování biologického materiálu probíhalo v akreditovaných laboratořích pracujících v systému GLP (good laboratory practice) s odpovídajícím moderním technickým vybavením. Laboratoře splňují nejen podmínky standardních vyšetření (22), ale také náročné požadavky experimentální práce s atesty pro jednotlivá vyšetření včetně napojení na atesty Akademie věd České republiky.

Laboratorní sledování nemocných je úzce spjato s dlouhodobou péčí a klinickým sledováním v akreditovaném hemaferetickém centru II. interní kliniky FN HK a metabolické kliniky FN HK.

3.1. Soubor nemocných

Sledovaný soubor tvoří 9 pacientů s familiární hypercholesterolemií (FH). V tomto počtu jsou zastoupeny 4 ženy a 5 mužů ve věku 17-59 let (průměr 46,4 let a medián 55 let). Genetická porucha metabolizmu lipidů je v daném souboru zastoupena u dvou nemocných v homozygotní formě, v heterozygotní podobě u sedmi pacientů, z toho jedenkrát se jedná o familiární kombinovanou hyperlipidemii (FCHL).

Poznámka k metodice : vzhledem k technické i ekonomické náročnosti dlouhodobé terapie se nepodařilo vytvořit větší soubor nemocných. Jde o největší soubor dlouhodobě sledovaných pacientů v České republice, avšak ani vyspělá zahraniční pracoviště mnohdy nemají obdobné soubory dlouhodobě sledovaných pacientů přesahující počet 10-20. Z toho důvodu je obtížné hodnocení některých klinických parametrů (např. rychlosti progrese ICHS, přežití apod.) obvyklými statistickými metodami. Proto se řada studií zaměřuje na změny ukazatelů, patrných po jednotlivých procedurách; léčebných procedur je i při menších souborech dostatečné množství. I naše studie, přestože hodnotí poměrně širokou paletu laboratorních vyšetření, jež standardně statisticky a v dostatečném počtu hodnotí, musí na druhé straně opomíjet přesné statistické hodnocení některých výše uvedených klinických parametrů.Hodnocení těchto klinických výsledků není předmětem naší studie.

Při výběru a zařazení nemocných jsme postupovali v souladu s indikačními kritérii (14, 23, 24). Náš soubor nemocných s FH vznikl v roce 1996, od té doby je sledován a průběžně doplňován o nově indikované pacienty. V posledních dvou letech nebyl do souboru zařazen nový pacient. Naši nemocní jsou léčeni a sledováni 2-9 let (3,6 ± 0,5 let; mean ± SD), tedy

relativně dlouhou dobu. Všichni v souboru mají vyjádřené orgánové komplikace aterosklerózy (AS, ICHS, CMP, ICHDK) a jsou dlouhodobě ve společné péči II. interní kliniky – Oddělení klinické hematologie (OKH) a Kliniky gerontologické a metabolické FN Hradec Králové. Vedle standardního vedení dietních i režimových opatření, byli a jsou tito pacienti zajištění kombinovanou farmakologickou terapií dle běžných zásad. Současně probíhá dlouhodobá a pravidelná léčba LDL-aferézou za standardních opatření a podmínek akreditovaného separačního centra OKH FNHK.

U nově zařazených pacientů jsme prováděli v úvodu léčby zpravidla výměnnou plazmaferézu, kdy byly hodnoceny mj. compliance pacienta, kvalita žilního přístupu apod. Poté přecházíme k vlastní léčbě LDL-aferézou.

Intervaly mezi léčebnými procedurami byly řízeny podle pravidel, uznávaných většinou současné literatury (21, 25, 26, 27): zásadní význam má podstatné snížení hodnot celkového cholesterolu, a to pod 2 mmol/l po proceduře s tím, že do další procedury má nastoupat jeho hodnota tak, aby se průměrná hodnota (mean cholesterol level) u heterozygotů rovnala horní hodnotě normy. U homozygotů toho nelze docílit; zde je uznávaným nejkratším intervalem mezi procedurami 1 týden. Kratší interval není obvykle možný, protože to netolerují pacienti, ani stav žil (opakované punkce separačními kanylami). V našem souboru 9 nemocných byl interval mezi dvěma léčebnými LDL-aferézami 17,5 ± 1,6 dnů.

3.2. Naše modifikace LDL-aferézy

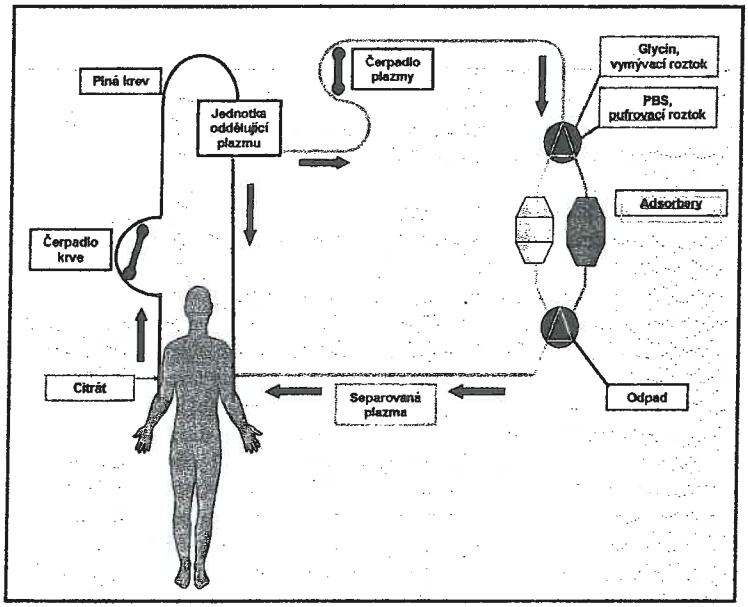
Používáme metodu imunoabsorpční LDL-aferézy, kde léčebná procedura sestává ze dvou hlavních kroků :

1) Plazma je získána z plné krve, z níž je oddělena centrifugou za použití separátoru krevních elementů Cobe Spectra (USA). Plná krev protéká separátorem rychlostí 50-70 ml/min, v závislosti na stavu periferních žil nemocného. Současné přístroje jsou na vysoké technické úrovni, mají moderní programovou výbavu a oddělují tak vysoce čistou plazmu. Jako antikoagulant je používán nefrakcionovaný heparin (UFH) v úvodní nitrožilní dávce 2500 I.U. jako bolus. Následuje kontinuální podání UFH dávkovací pumpou, zpočátku v množství 50 I.U./min i.v. V dalším průběhu je heparinem saturována také absorpční plocha aferetických kolon a podávané množství UFH tak může být sníženo na 25 I.U./min i.v. Zároveň je v systému separátoru automaticky k plné krvi přidáván roztok citrátu, resp. ACD-A (Baxter, Německo) v poměru 1:22. Oddělená plazma je transportována dál k adsorpčním kapslím a zbylá krev je průběžně vracena do cév pacienta.

2) Plazma dále protéká adsorpčními kapslemi. Adsorbery jsou zde uchyceny ve speciálním adsorpčně-desorpčním zařízení ADA (Medicap, Německo), které je automaticky kontrolováno počítačem. Používáme adsorbery Lipopak 400 (Pocard, Rusko), kde je imunoadsorpcí zachycen LDL-cholesterol a následně očištěná plazma je potom vracena zpět do oběhu pacienta. Ve chvíli,

kdy je kapsle nasycena LDL-cholesterolem, přístroj automaticky zapojí do funkčního systému další kapsli a první vymyje a připraví k opětovnému použití. Nasycenou kolonou tak postupně protéká fyziologický roztok, glycin, pufr (PBS; pH korekce) a poté opět fyziologický roztok. K promytí používáme roztoky Serag-Wiessner (Německo). Celý proces je řízen počítačem, v páru adsorpčních kolon se tak obě vzájemně střídají v promývání a zapojení do funkčního okruhu přístroje. Vše probíhá kontinuálně, dokud není dosaženo podstatného poklesu sérové hladiny cholesterolu pod normální hodnoty, cílem je pokles pod 2 mmol/l. Způsob zapojení přístroje a průběh LDL-aferézy je schematicky znázorněn níže (Obr. 1). Adsorbery jsou umístěny ve skleněných kolonách, obsahují ovčí protilátky proti apoproteinu B vázané na sepharosu 4B, aktivovány jsou bromokyanidem.

- **Obr. 1:** Naše modifikace LDL-aferézy, legenda v textu.



Cílem je stabilizovat pacienty s homozygotní FH na průměrné hladině cholesterolu (mean cholesterol level) jen mírně přesahující normální hodnoty a zajistit průměrné normální hodnoty u heterozygotů FH. V období mezi dvěma procedurami léčebné LDL-aferézy je tak dosaženo snížení původní sérové hladiny cholesterolu, to poskytuje vhodné podmínky pro stabilizaci či regresi sklerotických změn.

3.3. Použitý výzkumný program

Uvedený soubor nemocných byl podroben co možno široké analýze. Srovnáván je klinický stav a laboratorní parametry v průběhu léčby, před a po dlouhodobé léčbě. Odběry krve probíhaly cestou standardní venepunkce v péči stálého personálu separačního centra OKH, před i po LDL-aferéze ráno, tzn. po zahájení pracovního dne. K odběru žilní krve používá naše pracoviště komerčně vyráběné vakuové uzavřené systémy. Odběrová média, označení a další zpracování biologického materiálu bylo v souladu s laboratorními standardami zúčastněných akreditovaných pracovišť, jenž mají atesty pro jednotlivá vyšetření a jsou vybavena odpovídající technikou: Oddělení klinické biochemie a diagnostiky, Ústavu klinické imunologie a alergologie, Oddělení klinické hematologie FN Hradec Králové. Podrobnosti uvádí mj. Seznam metod prováděných ve Fakultní nemocnici Hradec Králové (28). Pokud není uvedeno jinak, laboratorní odběry byly prováděny před a po LDL aferéze a to v intervalu jednou za tři měsíce.

Práce byla zčásti podporována granty ***IGA MZ ČR NR/8505-3, NR/8497-3, NR/8062-3***, dále ***MŠ MO 0021620820*** a ***00179906***.

3.3.1. Přehled sledovaných parametrů

3.3.1.1. Podrobné **anamnestické a klinické vyšetření** nemocných.

3.3.1.2. Sledování **základních hematologických a biochemických parametrů** - dle dříve v jiném výzkumu stanoveného schématu (tj. výzkumný projekt MZ ČR NB6549-3, jehož je autor této práce spoluřešitelem) a dle klinických požadavků na sledování poruch metabolizmu lipidů standardně prováděných při sledování nemocných familiární hyperlipoproteinémií v programu léčby ve FN Hradec Králové.

a) V hematologických parametrech tak byla standardním působem sledována: sedimentace erytrocytů (FW), analyzátory byl stanoven hemoglobin (Hb), hematokrit (Htc), střední objem erytrocytu (MCV), celkový počet leukocytů (WBC) a trombocytů (Plt).
b) Z biochemického profilu v séru: glykémie, sodík (Na), draslík (K), chloridy (Cl), vápník (Ca), fosfor (P), urea, kreatinin, kyselina močová, celkový bilirubin, alaninaminotransferáza (ALT), aspartátaminotransferáza (AST), gamaglutamyltranspeptidáza (GMT), kreatinkináza (CK), alkalická fosfatáza (ALP), celková bílkovina séra (TP), albumin.

3.3.1.3. V literatuře je udáván i pokles středního objemu krevních destiček (MPV) a nevelké změny v celkovém počtu při terapii LDL-aferézou (29). Normalizace původně zvýšeného objemu destiček by mohla být jedním z jednoduchých parametrů, které by mohly sloužit ke kontrole účinnosti terapie (29). Sledovali jsme proto i **základní parametry fyziologie krevní destičky:** počet trombocytů (Plt), střední objem trombocytu (MPV), šíři distribuce histogramu krevních destiček podle jejich objemu (PDW), destičkový hematokrit (Pct).

3.3.1.4. V posledních letech se zdůrazňuje také **význam funkcí krevních destiček a význam labilní protrombogenní a antitrombogenní funkce cévního endotelu.** Za fyziologických podmínek převažuje antitrombogenní funkce destiček a endotelu, ale situace se mění při patologicky vysoké koncentraci lipoproteinů apod. Makrofágy v plátech stimulují syntézu tkáňového tromboplastinu a PAI-1. Poškození endotelu vede k zánětlivým a protrombogenním změnám.

a) K posouzení **adhezní schopnosti endotelu** jsme sledovali: von Willebrandův faktor (vWF antigen, STA LIAtest vWF) a trombomodulin (Asserachrom Thrombomodulin).

b) K posouzení **aktivity fibrinolýzy** jsme při terapii sledovali: inhibitor aktivátoru plazminogenu (Asserachrom PAI-1), tkáňový aktivátor plazminogenu (Asserachrom t-PA), fibrinogen (koagulačně dle Clause).

c) **Funkce destiček:** Podle některých prací se zdá, že dochází k normalizaci poměrů aktivovaných trombocytů při terapii LDL-aferézou (29, 30, 31, 32). Není však jasné, do jaké míry jsou funkční změny trombocytů vyjádřeny, jak jsou významné a jak brzy se po léčebné proceduře agregace opět horší. K upřesnění funkčních změn krevních destiček jsme tedy v intervalech tří měsíců sledovali před a po léčebné LDL-aferéze také **agregace krevních destiček.** Vyšetření byla prováděna na agregometru PACKS-4 (Helena Laboratories) (31, 32). Ke sledovaným parametrům patří strmost agregační křivky (tzv. slope, [%/min]) a časové údaje popisující průběh agregační křivky, z nich např. maximální amplituda agregační křivky apod. Předně jsme ve výzkumné sondě provedli standardní agregační vyšetření, při kterém se destičky stimulují pomocí ADP, epinefrinu, kolagenu, kyseliny arachidonové a ristocetinu. Dále jsme cíleně sledovali spontánní agregace a křivky vyvolané použitím 3 různých ředění ADP - konkrétně 2,5 μM, 1,25 μM a 0,625 μM. Dalším použitým induktorem byl kationický propylgalát v komerčně dostupném testu SPAT (slide platelet aggregation test) (32). Podrobnosti uvádíme v dizertační práci.

d) Prováděli jsme vyšetření **exprese solubilních adhezních molekul** E-selektinu, P-selektinu a chemotaktického proteinu monocytů MCP-1 technikou ELISA (33, 34) za použití komerčních detekčních souprav firmy RDS (USA): Parameter Human sP-selectin, Parameter Human sE-selectin, Quantikine Human MCP-1. Stanovení cytoadhezních molekul bylo prováděno v plazmě před i po provedení léčebné LDL-aferézy, v době po šesti a dvanácti měsících léčby LDL-aferézou. Vyšetření proběhlo současně také v eluátu z aferetické kolony (absorbent Lipopak, Pocard, Rusko).

3.3.1.5. Z **vyšetření reologických poměrů** byla standardním způsobem stanovena viskozita plné krve a plazmy, neboť je literárně udávána změna

těchto parametrů při terapii LDL-aferézou (31). To by mohlo příznivě působit na změny způsobené v mikrocirkulaci smykovým stresem (tzv. shear-stress).

3.3.1.6. K parametrům sledovaným pravidelně vždy před a po každé léčebné LDL-aferéze patří **spektrum lipoproteinů:** celkový cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triacylglyceroly (TAG), apolipoprotein A (Apo A), apolipoprotein B (Apo B), Lipoprotein (a).

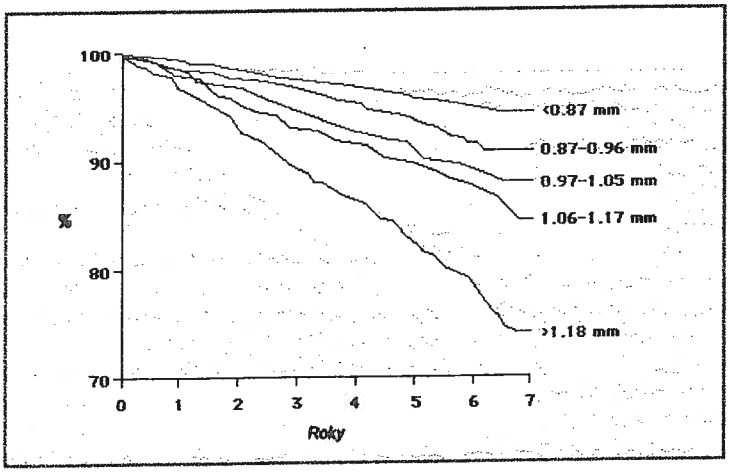
3.3.1.7. Součástí práce bylo **morfologické sledování aktivity sklerotických změn pomocí duplexní sonografie karotid,** kde jsme hodnotili stav cévní intimy a dynamiku či stabilizaci ateromatózního plátu při terapii LDL-aferézou. Kontroly probíhaly v časových intervalech šesti měsíců v období 3,6 ± 0,5 let. Touto neinvazivní metodou byla sledována tloušťka mezi intimou a medií cévy (IMT, intima-media thickness), měřeno na zadní stěně společné karotidy a to 1cm pod bifurkací na obou stranách krku (35). Měření bylo prováděno sondou s vysokým rozlišením (B-mode s frekvencí vyšší než 6 MHz), u zdravých jedinců je udávána norma IMT do 0,75 mm (35). Vyšetření byla prováděna opakovaně stejnými lékaři Radiodiagnostické kliniky FNHK, čímž měla být metoda zatížena stejnou mírou subjektivního zkreslení. Použit byl přístroj Toshiba Aplio SSA-700A (Toshiba, Japonsko) vybavený sondou 14-MHz PLT-1204AT a příslušným softwarem.

Účelem sledování bylo ověření účinnosti terapie. Manifestace ischemické choroby srdeční a cévní mozkové příhody má, u starších jedinců, vztah k dynamice sonografického nálezu sklerotických změn vyjádřených tloušťkou IMT na karotických tepnách. V obrazové příloze (Obr. 2) je znázorněn průběh sledování 4476 pacientů po dobu 6 let. V tomto souboru byli zastoupeni jedinci starší 65 let, kteří byli v úvodu studie bez klinické manifestace kardiovaskulární choroby a byli rozděleni do pěti skupin dle zjištěné hodnoty IMT (do 0,87 mm / 0,87-0,96 mm / 0,97-1,05 mm / 1,06-1,17 mm / 1,18 mm a více). Ve sledovaném období korelovala doba přežití s hodnotou IMT.

3.3.1.8. Jako součást analýzy primární hemostázy a funkce krevních destiček byla ve smyslu pilotní sondy provedena **vyšetření komerčním analyzátorem Dade Behring PFA-100**, Německo (PFA, platelet function analyse). Tato diagnostika byla tak nově zavedenou laboratorní metodou k využití ve FNHK a je podrobně popsána v textu. Přístroj umožňuje kvantitativně měřit primární, tedy destičkami zprostředkovanou hemostázu (8, 36) z materiálu nesrážlivé, resp. citrátové krve. Metoda napodobuje aktivaci destiček mechanickou zátěží, smykovým napětím (shear stress) a styk destiček s kolagenem in vivo. Jako standardní screeningové testy se zde v současnosti používají měřící moduly kolagen/epinephrin (Col/Epi) a kolagen/ADP (Col/ADP). Tímto se rozpoznají hlavní z defektů primární hemostázy. Výstupním parametrem je čas potřebný od aktivace primární hemostázy k uzavření diagnostické kapiláry destičkovým trombem, tzv. CT (closure–time), který je ovlivněn stavem destičkových funkcí. Z literatury např.

vyplývá, že u sledování antiagregační terapie při podávání ASA je senzitivita metody asi 95 % a specifita až 89 % (8, 36). To vedlo k hypotéze, že by uvedené vyšetření mohlo být vhodným markerem též ke sledování účinnosti LDL-aferézy. Měření probíhalo před a po LDL-aferéze. Podrobnosti uvádíme v dizertační práci.

- **Obr. 2:** Manifestace ischemické choroby srdeční a cévní mozkové příhody u starších jedinců, vztah k dynamice sonografického nálezu sklerotických změn vyjádřených tloušťkou IMT na karotických tepnách. Legenda v textu dizertační práce. *(Převzato a upraveno dle: O'Leary, DH, Polak, JF, Kronmal, RA, et al., N Engl J Med 1999, 340:14)*



3.3.2. Způsob vyhodnocení

Shromážděná data byla statisticky vyhodnocena na odborném pracovišti Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové. Použit byl software : Statistica 6.0, StatSoft. Inc., Tulsa (USA). Data byla vzájemně korelována, byly sestaveny konfidenční intervaly a přehledné grafy.

3.4. Další sledování

Při dizertační práci vzniklo několik dalších problémů a hypotéz, na jejichž řešení se autor dizertace podílel. Níže jsou uvedeny dvě další oblasti sledování, kde se autor účastnil větší mírou. Náplň naší práce byla badatelsky zajímavá a přinesla klinicky důležité poznatky, některé z nich jsou zcela nové a publikované v impaktovaných časopisech nebo jsou tč. k publikaci připravené.

3.4.1. Vedlejší účinky léčebných procedur LDL-aferézy

Imunoaferetické procedury patří k technicky nejsložitějším léčebným hemaferetickým postupům. Také délka procedur je nezanedbatelná a může být pacienty obtížně snášena, zejména proto, že horní končetiny jsou upoutány při zavedení odběrových jehel. Proto se autor věnoval také posouzení vedlejších účinků nebo komplikací terapie a její tolerability již po standardizaci metodiky na akreditovaném pracovišti s dostatečně zkušeným ošetřujícím personálem. Vycházeli jsme ze skutečnosti, že adsorpční procedura se nejvíce blíží výměnné plazmaferéze. Řada technických i klinických detailů je zcela stejná. Proto jsme především sledovali vedlejší účinky, které jsme sami zaznamenali nebo o kterých je vůbec známo, že se mohou vyskytnout při velké výměně plazmy a jiných hemaferézách (37, 38, 39). Vedlejší účinky byly aktivně sledovány zkušeným personálem po celou dobu léčebné procedury a po ní, pokud byl pacient přítomen na oddělení, eventuální pozdní následky byly zjišťovány při ambulantních kontrolách později. V této práci bylo vyhodnoceno 463 LDL-aferéz provedených za poslední 3 roky.

3.4.2. Optimalizace, individualizace a predikce výsledku LDL-aferézy

Dosud není přesně dořešena metodika procedur LDL-aferézy a lékaři tak spoléhají na údaje výrobce, dále na svou zkušenost nebo zkušenost z jiných pracovišť a u daného pacienta na protokoly z předešlých procedur (40). Jde o to, že by mělo být podle výchozí hodnoty cholesterolu, funkční kapacity kolon, dynamické rychlosti jímání cholesterolu a dalších méně podstatných faktorů exaktně určeno množství plazmy, kdy je kolona přesně zaplněna a přesně v té době přepnout na další kolonu. Protože je koncentrace cholesterolu v plazmě v té době již nižší, snese další kolona větší množství plazmy nežli je zaplněna a podobně další kolona atd. To bylo dosud řešeno empiricky.

V poslední době se v literatuře objevily hlavní údaje a experimentální výsledky, podle kterých bylo možno predikovat přesněji procedury a "šít je na míru" podle akutálního stavu nemocných i absorpčních kolon (40) a také sami jsme již měli zkušenost s dostatečným počtem procedur. Přesvědčili jsme se, že přes řadu ukazatelů, které léčbu ovlivňují, je jen několik prakticky rozhodujících. Je rovněž známo, že absorpční kolona má výrobcem danou kapacitu jímání LDL cholesterolu, která klesá při používání. Přesvědčili jsme se také, že životnost námi používaných kapslí je zpravidla delší, nežli 50 udávaných záručních procedur. Tím vším by bylo možno medicinsky zpřesnit proces léčby a docílit lepšího efektu. Musí to ovšem být predikce přesná - použití přeplněných absorberů nebo po době jejich životnosti by ohrozilo výsledky léčby, komfort a stav nemocného. K predikci bylo nutno vybrat paletu nejnutnějších klinických a laboratorních ukazatelů, které budou určovat spolehlivě délku jednotlivých cyklů za různých výchozích hodnot cholesterolu při daném opotřebování a daných vlastnostech jednotlivých kolon tak, aby byla nejrychleji a ekonomicky docílena konečná žádaná hodnota cholesterolu

po léčbě za podmínek ještě přijatelných pro pacienta (délka procedur, ani jejich frekvence nesmí být neúnosné).

4. Výsledky a jejich statistické zpracování

Byly vyhodnoceny léčebné procedury LDL-aferézy za roky 2001 až 2003, hodnocení výsledků probíhalo v roce 2004. Bylo tak vyhodnoceno celkem 463 procedur, kde interval mezi jednotlivými léčebnými LDL-aferézami byl 17.5 ± 1.6 dnů.

4.1. Porovnání longitudinálního vývoje dat

Při porovnání longitudinálního vývoje dat nebyla nalezena statisticky významná diference mezi laboratorními parametry v období prvních 100 dnů po zahájení léčby a v období 600 až 800 dnů od zahájení léčby LDL-aferézou. Porovnány byly průměrné hodnoty parametrů před LDL-aferézou, tedy průměrné „pre hodnoty" (Tab.1).

4.2. Změny laboratorních parametrů před a po LDL-aferéze

Změny laboratorních parametrů před a po LDL-aferéze, resp. procentní diference hodnoty před a po proceduře vyjadřuje popisná statistika hodnot sledovaných parametrů (Tab.2). Zvýrazněny jsou významné procentní diference (tj. *[100 x (hodnota před plazmaferezou – hodnota po plazmafereze) / hodnota před plazmaferezou]*), za významné považujeme výsledky, kde $p<0,05$. Variační koeficienty odrážejí variabilitu hodnot laboratorních parametrů (průměry pre hodnot) u každého nemocného za celé sledované období (Tab.3).

4.3. Agregační schopnost trombocytů

K upřesnění funkčních změn krevních destiček jsme v intervalech tří měsíců sledovali před a po léčebné LDL-aferéze parametry agregace trombocytů. Vyšetření bylo prováděno po ukončení procedury, trvající asi 4 hodiny, maximálně 5 hodin (ojediněle). Provádět vyšetření později, např. druhý den či podle možností nemocných a laboratoře do 5 dnů, je pro nemocné neúnosné (stoupá množství odebrané krve, pacienti dojíždějí mnohdy k výkonu zdaleka) a také hladina cholesterolu po výkonech relativně rychle stoupá, výsledky by nebyly standardní. Vyšetření byla prováděna na agregometru PACKS-4 (Helena Laboratories) (31, 32). V klasické agregometrii vyvolává postupná tvorba agregátu změnu průchodu světla, kterou lze měřit a prezentovat v procentech oproti kalibrační křivce a dále potom interpretovat.

Ke sledovaným parametrům patří strmost agregační křivky (tzv. slope, [%/min]) a časové údaje popisující průběh agregační křivky, z nich např. maximální amplituda agregační křivky.

- **Tab. 1:** Longitudinální porovnání laboratorních parametrů, legenda v textu.

	< 100 dnů				600 – 800 dnů			
	N	Mean	95% Conf	95% Conf	N	Mean	95% Conf	95% Conf
glukóza (pre)	16	6.9	5.0	8.8	18	7.4	5.7	9.1
Na (pre)	16	141	140	142	18	140	139	142
K (pre)	16	4.2	4.0	4.5	18	4.1	4.0	4.3
Cl (pre)	15	103	101	105	11	103	100	106
Ca (pre)	16	2.22	2.14	2.29	18	2.35	2.30	2.39
P (pre)	16	1.1	1.0	1.2	18	1.0	0.9	1.2
Urea (pre)	16	4.8	4.3	5.3	18	4.7	4.3	5.2
kreatinin (pre)	16	74	67	81	18	86	78	93
kys. močová (pre)	16	344	294	395	18	342	306	379
ALT (pre)	16	0.52	0.39	0.65	18	0.41	0.26	0.56
AST (pre)	16	0.50	0.42	0.58	18	0.46	0.41	0.50
GMT (pre)	16	0.61	0.40	0.81	17	0.60	0.36	0.84
ALP (pre)	16	1.40	1.17	1.62	18	1.17	0.87	1.48
Bilirubin (pre)	16	7	6	9	18	8	7	10
cholesterol (pre)	16	6.9	6.2	7.7	16	7.8	6.6	9.0
LDL (pre)	16	4.6	3.8	5.4	16	5.5	4.4	6.6
HDL (pre)	16	1.4	1.2	1.7	16	1.2	1.1	1.4
TAG (pre)	16	2.2	1.4	2.9	16	2.5	1.7	3.3
ApoA (pre)	16	1.3	1.2	1.5	18	1.3	1.2	1.4
ApoB (pre)	16	1.4	1.3	1.6	18	1.5	1.3	1.7
Lp(a) (pre)	15	0.40	0.21	0.60	15	0.71	0.33	1.10
TP (pre)	16	70	68	72	18	71	70	73
Viskozita pl. (pre)	12	2.09	1.85	2.32	18	1.91	1.82	1.99
Hb (pre)	16	130	123	136	18	132	123	141
hematokrit (pre)	16	0.39	0.37	0.41	18	0.39	0.37	0.41
MCV (pre)	16	90.2	88.4	91.9	18	87.1	83.8	90.4
leukocyty (pre)	16	7.5	6.2	8.7	18	6.6	5.6	7.5
trombocyty (pre)	16	187	141	233	18	221	197	245
Pct (pre)	16	0.28	0.26	0.3	18	0.29	0.27	0.31
MPV (pre)	16	9.43	8.66	10.20	18	10.91	10.36	11.45

*Poznámka : ze statistických charakteristik je v tabulce průměr (**Mean**), dále **Conf 95%** jsou spodní a horní hranice 95% intervalu spolehlivosti pro průměr, označení **N** zde vyjadřuje počet statisticky hodnocených položek. Pokud se 95% intervaly spolehlivosti překrývají, pak se průměry statisticky významně neliší.*

- **Tab. 2:** Popisná statistika procentních diferencí sledovaných parametrů.

% diference (post-pre)/pre x100	N	Mean	Conf 95%	Conf 95%	Min	Max	Lower Quart.	Upper Quart.	SD	SE
Na	73	**2.1**	1.7	2.4	-2.14	6.77	1.41	2.88	1.52	0.18
K	65	**-2.5**	-5.2	0.2	-35.59	21.95	-6.98	4.76	10.94	1.36
Cl	73	**2.0**	1.5	2.6	-5.56	8.25	0.99	3.16	2.38	0.28
Ca	74	**-0.5**	-2.6	1.7	-56.41	25.29	-4.66	3.11	9.28	1.08
P	11	**-11.2**	-17.9	-4.6	-24.19	1.49	-19.66	-2.38	9.88	2.98
urea	76	**-14.3**	-15.8	-12.7	-31.71	-1.54	-18.56	-10.20	6.76	0.77
kreatinin	77	**-7.9**	-9.4	-6.5	-27.5	16.4	-11.9	-4.3	6.36	0.72
Kys. močová	77	**-10.7**	-11.7	-9.8	-19.86	-0.58	-13.29	-7.73	4.10	0.47
glukóza	74	5.6	-1.1	12.2	-52.14	82.76	-8.96	26.36	28.68	3.33
bilirubin	63	4.1	-4.7	12.8	-50.00	100.00	-16.67	25.00	34.77	4.38
cholesterol	74	**-67.0**	-69.2	-64.8	-82.26	-33.83	-73.30	-64.05	9.49	1.10
HDL	72	**-25.3**	-26.7	-23.9	-39.76	-11.48	-28.69	-20.28	5.90	0.69
LDL	65	**-82.2**	-85.1	-79.4	-99.58	-34.21	-89.88	-76.75	11.53	1.43
TAG	73	**-51.7**	-56.4	-47.1	-97.62	-7.81	-67.65	-38.64	19.74	2.31
ApoA	74	**-24.0**	-26.2	-21.7	-62.89	27.61	-28.22	-20.00	9.65	1.12
ApoB	69	**-73.2**	-76.4	-70.0	-97.14	-9.17	-82.84	-67.78	13.43	1.62
Lp(a)	49	**-67.6**	-73.0	-62.2	-97.52	-14.29	-81.97	-57.53	18.77	2.68
TP	74	**-25.1**	-26.4	-23.8	-39.00	1.27	-28.48	-22.19	5.55	0.64
ALT	77	**-27.3**	-29.7	-24.9	-47.95	25.00	-33.80	-21.74	10.43	1.19
AST	73	**-22.5**	-25.0	-20.0	-50.79	8.11	-29.55	-16.28	10.85	1.27
GMT	10	**-34.3**	-43.2	-25.5	-56.25	-19.05	-40.74	-26.67	12.33	3.90
ALP	11	**-27.0**	-30.8	-23.2	-37.78	-17.80	-31.46	-23.26	5.68	1.71
viskozita pl.	52	**-15.2**	-17.8	-12.5	-32.14	16.27	-19.02	-12.33	9.45	1.31
Hb	76	**-7.3**	-8.4	-6.3	-16.7	3.5	-10.8	-4.8	4.49	0.51

% diference (post-pre)/pre x100	N	Mean	Conf 95%	Conf 95%	Min	Max	Lower Quart.	Upper Quart.	SD	SE
hematokrit	76	-7.9	-10.5	-5.4	-90.2	8.6	-10.4	-4.0	11.04	1.27
trombocyty	76	0.2	-0.1	0.5	-4.7	5.7	-0.6	0.8	1.42	0.16
leukocyty	76	4.1	-0.8	9.0	-89.4	84.8	-5.4	13.1	21.61	2.48
MCV	76	-8.1	-11.6	-4.6	-72.2	62.8	-13.8	-3.9	15.24	1.75
MPV	71	-2.1	-4.3	0.2	-51.1	31.3	-4.4	1.2	9.42	1.12
t-PA	143	-5.0	-10.1	0.1	-73.33	125.81	-24.17	7.35	30.65	2.56
TM	126	-29.1	-32.8	-25.3	-75.83	25.27	-48.68	-12.62	21.24	1.89
PAI-1	142	-1.3	-8.8	6.2	-71.74	302.56	-29.82	19.47	45.27	3.80
fibrinogen	148	-21.7	-23.2	-20.3	-76.00	3.70	-27.54	-16.44	8.90	0.73
vWF	145	-15.1	-19.0	-11.2	-74.58	103.13	-24.00	-7.53	23.83	1.98

*Poznámka : ze statistických charakteristik je v tabulce průměr **(Mean)**, standardní chyba průměru **(SE)** a směrodatná odchylka **(SD)**. **Conf 95%** jsou spodní a horní hranice 95% intervalu spolehlivosti pro průměr (pokud interval obsahuje 0, není průměrná diference odlišná od 0). **Min** a **Max** jsou minimální a maximální diference. **Lower** a **Upper Quartile** jsou 25. a 75. percentil. Zvýrazněny jsou zde statisticky významné rozdíly.*

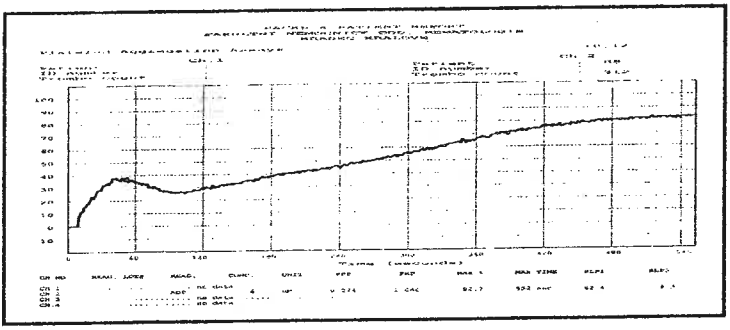
- **Tab. 3**: Variační koeficienty hodnot laboratorních parametrů (pre hodnot) u každého nemocného za sledované období, legenda v textu.

Nemocný č.	1		2		3		4		5		6		7		8		9		Mean	SE
Pre	N	% CV	N	% CV	N	% CV	N	% CV	N	% CV	N	% CV	N	% CV	N	% CV	N	% CV		
glukóza	3	2.9	6	19.9	8	10.2	7	11.1	10	18.0	11	18.1	10	35.8	11	7.5	11	24.6	**16.4**	**3.3**
Na	3	1.9	6	2.8	8	1.3	7	1.8	11	1.4	11	1.4	10	2.1	11	1.4	11	1.2	**1.7**	**0.2**
K	3	4.9	6	2.5	8	13.4	7	3.7	11	6.5	11	5.0	9	3.5	11	4.3	11	6.3	**5.6**	**1.1**
Cl	3	3.9	6	3.6	7	3.5	6	2.6	10	4.2	9	1.7	7	3.9	9	2.0	10	2.0	**3.1**	**0.3**
Ca	3	1.6	6	4.0	8	9.9	7	1.9	10	5.0	11	3.1	9	3.4	11	3.8	11	4.5	**4.1**	**0.8**
P	3	10.5	6	14.8	8	11.2	7	4.2	11	18.9	11	13.8	10	9.2	11	14.2	11	8.1	**11.7**	**1.4**
urea	3	9.2	6	18.8	8	15.3	7	15.2	11	15.0	11	6.2	10	13.1	11	10.3	11	23.7	**14.1**	**1.7**
kreatinin	3	8.1	6	7.6	8	7.0	7	4.7	11	8.1	11	6.6	10	11.1	11	7.7	11	9.9	**7.9**	**0.6**

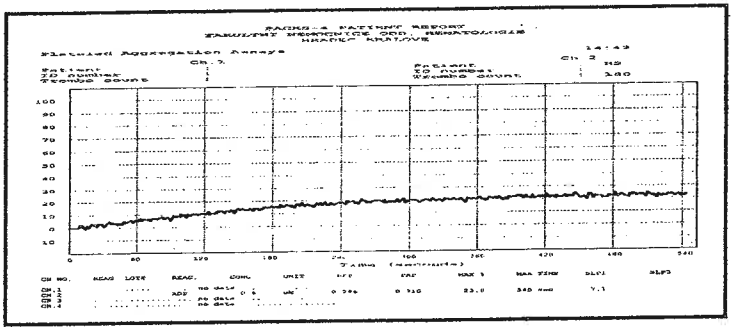
Nemocný č.	1		2		3		4		5		6		7		8		9		Mean	SE
Pre	N	% CV	N	% CV	N	% CV	N	% CV	N	% CV	N	% CV	N	% CV	N	% CV	N	% CV		
kys. močová	3	11.7	6	12.7	8	7.5	7	11.3	11	13.2	11	5.3	10	8.4	11	5.3	11	11.5	9.7	1.0
ALT	3	23.2	6	34.7	8	25.2	7	10.4	11	31.2	11	21.6	10	26.4	11	22.3	11	33.5	25.4	2.5
AST	3	28.8	6	22.5	8	17.1	7	7.1	11	25.6	11	16.6	9	14.5	11	12.7	11	8.2	17.0	2.5
CK	3	63.0	3	11.9	5	9.8	7	11.1	3	90.1	8	23.3	5	23.5	7	26.3	4	33.5	32.5	9.0
GMT	3	11.1	6	11.9	8	21.2	7	14.2	11	21.2	10	10.5	9	25.8	11	20.1	11	11.7	16.4	1.9
ALP	3	1.5	6	13.3	8	43.7	7	10.4	11	19.5	11	17.1	8	7.6	11	6.7	11	8.6	14.3	4.1
bilirubin	3	24.7	6	32.9	8	18.7	7	39.2	11	40.9	11	20.1	10	36.7	11	18.8	11	16.1	27.6	3.3
cholesterol	3	7.1	5	3.4	8	5.9	7	6.6	11	11.6	10	20.9	9	13.7	11	10.7	11	8.6	9.8	1.7
LDL	3	2.8	5	13.3	7	9.1	7	21.7	11	14.2	10	26.3	8	11.3	11	9.2	11	9.9	13.1	2.4
HDL	3	12.2	5	9.9	7	7.7	7	19.9	11	5.5	10	10.8	9	6.2	11	10.1	11	10.3	10.3	1.4
TAG	3	17.2	5	25.3	8	14.0	7	18.8	11	28.1	10	37.2	9	28.9	11	9.4	11	24.1	22.5	2.8
ApoA	3	11.9	6	3.7	8	11.2	7	16.2	11	10.7	11	13.1	9	6.7	11	9.9	11	11.8	10.6	1.2
ApoB	3	6.9	6	7.7	8	6.3	7	20.9	11	11.0	11	21.8	9	12.3	11	11.1	11	10.1	12.0	1.9
Lp(a)	3	26.6	6	74.5	7	14.3	3	133	10	63.3	10	28.1	1	0.0	11	46.5	11	44.6	47.9	13.2
TP	3	5.2	6	4.5	8	3.8	7	2.4	11	3.3	11	2.9	9	8.7	11	2.1	11	3.1	4.0	0.7
albumin	3	3.8	3	3.4	2	1.6	4	1.6	4	3.3	4	3.4	3	4.1	4	2.1	4	5.1	3.2	0.4
viskozita pl.	3	7.9	4	6.6	5	26.7	5	2.9	7	14.1	8	7.3	7	14.9	8	16.3	7	13.1	12.2	2.4
Hb	3	1.9	6	3.2	8	4.8	7	7.1	11	4.0	11	9.1	10	4.3	11	4.2	11	4.9	4.8	0.7
hematokrit	3	1.9	6	3.7	8	4.3	7	9.2	11	4.0	11	7.6	10	5.0	11	4.2	11	4.0	4.9	0.7
MCV	3	0.9	6	2.2	8	4.6	7	3.4	11	0.9	11	5.3	10	2.0	11	1.8	11	1.9	2.6	0.5
leukocyty	3	8.6	6	12.0	8	10.0	7	11.0	11	18.6	11	19.1	10	9.7	11	13.1	11	18.6	13.4	1.4
trombocyty	3	9.8	6	10.2	8	36.2	7	26.5	11	8.4	11	17.2	10	5.8	11	9.5	11	11.2	15.0	3.4
MPV	3	13.9	6	11.1	8	9.7	4	27.9	11	12.1	11	9.1	10	11.4	11	10.6	11	13.2	13.2	1.9

Poznámka : ze statistických charakteristik je v tabulce směrodatná odchylka v procentech průměrné pre hodnoty za celé sledované období (%CV), průměrná hodnota %CV (Mean) a standardní chyba průměru (SE). Označení N zde vyjadřuje počet statisticky hodnocených položek u každého jednotlivého pacienta (množství statisticky hodnocených dat odpovídá mj. také individuální délce sledovaného období, resp. době od zařazení pacienta do sledovaného souboru nemocných). Variační koeficienty odrážejí variabilitu hodnot laboratorních parametrů (pre hodnot) u každého nemocného za celé sledované období.

- **Obr. 3:** Vyšetření agragace trombocytů před LDL-aferézou, legenda v textu.



- **Obr. 4:** Vyšetření agragace trombocytů po LDL-aferéze, legenda v textu.



Vyšetření agregace trombocytů jsme prováděli u 7 našich dlouhodobě léčených nemocných. Předně jsme ve výzkumné sondě provedli standardní agregační vyšetření, při kterém se destičky stimulují 10 μM ADP, 300 μM epinefrinu, 10 μg/ml kolagenu, 500 μg/ml kyseliny arachidonové a 1500 μg/ml ristocetinu. Dalším použitým induktorem byl kationický propylgalát v komerčně dostupném testu SPAT (32). Nebyly však zjištěny významné změny v agregabilitě destiček, což jsme předpokládali, neboť použité metody nejsou schopné odhalit mírné změny v aktivitě krevní destičky. Jediné změny byly při standardním vyšetření naznačeny po stimulaci ADP. Z těchto důvodů jsme vyslovili hypotézu, že by bylo vhodnější použít metodiku agregace po ADP a k vyvolání křivek použít jeho různých koncentrací.

Bylo tedy provedeno 88 agregačních vyšetření u 7 léčených nemocných s těžkou FH a to před a po léčebné proceduře LDL-aferézy. Vyšetřovány byly vždy: spontánní agregace a dále křivky s použitím 3 různých ředění ADP -

konkrétně 2,5 μM, 1,25 μM a 0,625 μM (Obr. 3, Obr. 4). Typické výsledky jsou prezentovány v obrazové příloze :

- Obr. 3 : Agregační křivka u homozygotní nemocné před LDL-aferézou, při ředění ADP 0,625 μM.
- Obr. 4 : Agregační křivka u stejné nemocné a při stejném ředění ADP (0,625 μM), ukazuje výsledek po léčebné proceduře LDL-aferézy. Je zřetelné, že po výkonu dochází ke zmenšení strmosti křivky a ke snížení maximální amplitudy po 360 sekundách (v obrazové příloze odpovídá označení MAX).

Při těchto agregačních vyšetřeních jsme zjistili zřetelný pokles agregability trombocytů u **homozygotů**, kde je hladina LDL cholesterolu nejvyšší a kde je také pokles cholesterolu po léčebném výkonu největší. U pacientů stabilizovaných a také u **heterozygotů**, již situace tak jasná není. U obou skupin pacientů však zřejmě záleží na velikosti poklesu hladiny cholesterolu po léčebné LDL-aferéze oproti výchozí hodnotě před procedurou.

Proto jsme **provedených 88 vyšetření dále rozdělili** na ta, kde došlo po léčebné LDL-aferéze k poklesu cholesterolu o 6 a více mmol/l, dále na skupinu s poklesem o 5 - 5,99 mmol/l a na skupinu s poklesem nižším než-li 5 mmol/l. Vyhodnocením výsledků jsme zjistili, že :

- při poklesu vyšším jak 6 mmol/l dochází u obou homozygotů v našem souboru ke snížení agregability trombocytů po separaci, u těžkého případu heterozygota však dochází k mírnému zvýšení. Snižuje se také strmost agregační křivky.
- při poklesu cholesterolu o 5 - 5,9 mmol/l dochází u jednoho z homozygotů v souboru a také u těžkého případu heterozygota k mírnému zvýšení agregability po stimulaci 2,5 μM ADP, avšak na další koncentrace ADP již pacienti po separaci reagují snížením agregační křivky. U obou těchto nemocných také shodně dochází ke snížení strmosti agregační křivky.
- pokles cholesterolu o 4,9 mmol/l a méně již zřejmě nemá specifický a tak výrazný vliv na agregabilitu destiček, neboť destičky po separaci agregují jednou poněkud méně, jindy více. Je známo, že agregabilitu ovlivňuje řada dalších faktorů, které se zde zřejmě uplatňují.

Byla rovněž provedena výzkumná sonda s vyšetřeními před a po LDL-aferéze pomocí přístroje **PFA-100** (Dade Behring, Německo), který sleduje také destičkové funkce. Z celkového počtu 70 vyšetření (Tab. 4) bylo 18 párů vyšetření pomocí COL/EPI membrány (kolagen/epinephrin) a 17 párů vyšetření pomocí COL/ADP membrány (kolagen/ADP).

Ve 12 vyšetřeních pomocí COL/EPI a v 8 COL/ADP jsme zaznamenali překročení referenčních mezí již před léčebnou procedurou. Po LDL-aferéze došlo ve všech případech k prodloužení CT oproti hodnotám před výkonem, z toho překročení referenčních mezí jsme stanovili v 10 vyšetřeních pomocí

COL/EPI a v 6 COL/ADP. Míra prodloužení po procedurách ovšem nedosáhla statistické významnosti ($p<0,14$). Současně nebyly zaznamenány rozdíly mezi homozygoty a heterozygoty.

- **Tab. 4 :** Vyšetření přístrojem PFA-100 před a po LDL-aferéze.

	N	Před LDL- aferézou (mean ± SD)	Po LDL- aferéze (mean ± SD)
COL/EPI Referenční mez 82-150s (pro 3.2% citrátovou krev)	18	129,4 ± 46,8	146,7 ± 42,1
COL/ADP Referenční mez 62-100s (pro 3.2% citrátovou krev)	17	87,8 ± 14,6	98,6 ± 13,2

*Poznámka : ze statistických charakteristik je v tabulce průměr (**Mean**) a směrodatná odchylka (**SD**) 95% intervalu spolehlivosti pro průměr.*

Modifikovaná vyšetření agregace trombocytů by mohla být dalším ukazatelem, vhodným ke sledování aktivity procesu u těchto těžce nemocných. Jde však o vyšetření, která lze provádět pouze ve specializované laboratoři a také ekonomicky jsou relativně náročnější.

4.4. Výsledky vyšetřování selektinů a MCP-1

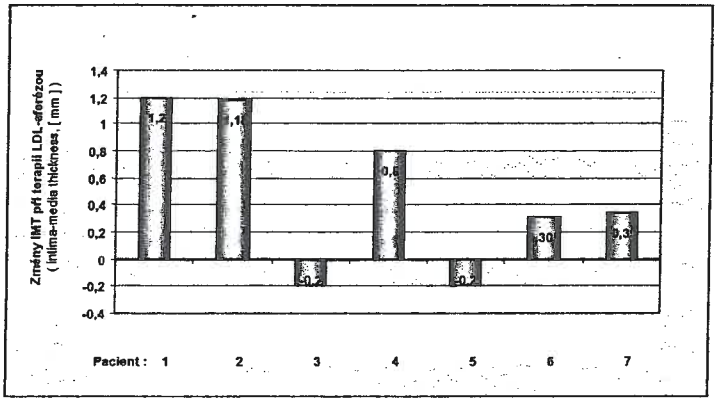
Provedli jsme celkem 80 měření a to opakovaně u 6 pacientů se závažnou familiární hypercholesterolémií, zařazených do programu dlouhodobé léčby LDL-aferézou. K analýze byly použity metody ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Zjištěné výsledky jsou :

- před procedurou : P-selectin 204 ± 179 (norma: 51 - 113 ng/ml)
  E-selectin 32,1 ± 33,7 (norma: 29,1 - 63,4 ng/l)
  MCP-1 323,8 ± 121 (norma: 200 - 722 pg/l)
- po proceduře : P-selectin 131,6 ± 134
  E-selectin 33,1 ± 51
  MCP-1 200,4 ± 15
- v plasmě před a za absorpční kolonou :
  P-selectin 50,7 ± 15 / 55,9 ± 19
  E-selectin 29,3 ± 34 / 28,1 ± 2,5
  MCP-1 131,1 ± 61 / 83,8 ± 46
- v eluátu z absorberu uprostřed promývacího procesu :
  minimální či nedetekovatelné změny

Jde tedy o signifikantní zvýšení koncentrace P-selektinu a MCP-1 v krvi pacientů s hypercholesterolémií, ačkoliv jsou dlouhodobě léčeni intenzivní hypolipidemizující intervencí. Bezprostředně po LDL-aferéze se signifikantně

snižuje hodnota P-selektinu a MCP-1. Tyto markery jsou využitelné v hodnocení efektivity léčby. Podrobnosti tohoto sledování byly zveřejněny r. 2004 v naší publikované práci (33).
Poznámka : uvedená publikace (33) je k dispozici v příloze dizertační práce.

- **Obr. 5:** Longitudinální vývoj IMT při terapii LDL-aferézou, legenda v textu. *(Změny jsou vztaženy k výchozím hodnotám pacientů, zde označeno jako 0.)*



4.5. Výsledky ultrazvukového vyšetření karotid

Neinvazivní sonografickou metodou jsme měřili vzdálenost IMT (intima-media thickness) v definovaném úseku arteria carotis communis. Cílem bylo posoudit dynamiku ateromatózního plátu při terapii LDL-aferézou.

Vyhodnocena byla data v souboru 7 pacientů a bylo zjištěno, že v období posledních 4 let léčby LDL-aferézou vykazovaly místní aterosklerotické změny mírnou progresi u 5 z těchto pacientů a regrese byla zaznamenána u 2 nemocných ve sledovaném souboru (Obr. 5). Po dobu studie nedošlo u žádného nemocného ke vzniku obtíží, které bychom mohli považovat za klinickou manifestaci symptomů aterosklerotického původu. Podrobnosti tohoto sledování jsme již publikovali jinde (42).

4.6. Vedlejší účinky procedur léčebné LDL-aferézy

Vedlejší účinky LDL-aferézy byly aktivně sledovány po celou dobu procedury a po ní, pokud byl pacient přítomen na oddělení; případné pozdní vedlejší projevy byly zjišťovány při ambulantních kontrolách později. Při vyhodnocení 463 léčebných LDL-aferéz provedených na našem pracovišti v letech 2001 až 2003 bylo zaznamenáno 6,26 % vedlejších účinků. V příloze (Tab.5) jsou v obecném přehledu uvedeny vedlejší reakce, které podle literatury i vlastních zkušeností s jinými hemaferézami mohou nastat a číselná data potom odpovídají výskytu vedlejších reakcí v našem konkrétním souboru

za uvedené období. Nejčastější byly vasovagální příhody, a to obyčejně nevolnost, slabost, lehké a krátkodobé poklesy krevního tlaku. Byly dobře ovlivnitelné symptomatickou terapií. Kanylaci velkých žil jsme sice v době výzkumu nemuseli provádět, ale na začátku naší činnosti (před 7 léty) se několikrát vyskytly obtíže se žilním přístupem, kdy by byla kanylace nutná. Raději jsme však výkon přerušili a opakovali později. U jedné nemocné jsme tehdy indikovali arteriovenózní shunt.

- **Tab. 5:** Vedlejší účinky procedur léčebné LDL-aferézy, legenda v textu.

		TYP VEDLEJŠÍ REAKCE	Výskyt v souboru (počet)
Časné reakce	Cévního původu	1. Nutná katetrizace velké žíly	0
		2 Hematomy v místě vpichu	1
		3. Zcela nezdařený odběr	3
		4. Gangrény	0
		5. Centrálně nervové příhody (embolie)	0
		6. Perforace velkých žil	0
		7. Infekce z míst vpichu (až sepse)	0
	Kardio-vaskulárního původu	1. Přechodná slabost, nevolnost, bolesti na hrudi	0
		2. Hypotenze	2
		3. Krátkodobá vasovagální reakce až mdloba	2
		4. Nadměrné zatížení tekutinou	0
		5. Arytmie	0
	Vliv náhradních roztoků	1. Citrátová toxicita: a) obličejové parestesie	6
		b) pocit svalového napětí	1
		2. Jiné roztoky: pyrogeny (horečka)	0
	Další reakce	1. Celkové příznaky (nevolnost, nauzea, neurovegetativní labilita, třesavka, teplota, cephalea)	11
		2. Hypokalemie	0
		3. Hemolýza	0
		4. Vzduchová embolie	0
		5. Hypovolémie	0
		6. Alergické reakce nejasného původu (převážně kožní)	0
		7. Asthmatický záchvat	0
		8. Obtíže ze ztrnulé polohy při výkonu	3
Pozdní reakce		1. Krvácení, anebo trombózy	0
		2. Bakteriální a virové infekce	0
		3. Imunologické poruchy	0
Celkem			29

Pokud jde o citrátové obtíže, jsou uvedeny jen velmi zřetelné reakce. Mírné projevy se vyskytují téměř pravidelně, takže v naší modifikaci metodiky LDL-aferézy byl do systému zařazen vstup, kde jsou obsaženy 4 ampule calcium gluconicum v 50 ml fyziologického roztoku. Tato infúze může podle potřeby pomalu přikapávat. Průměrná spotřeba za celou 4 hodinovou proceduru bývá 25 až 35 ml roztoku, jen u jedné citlivější homozygotní nemocné činí zpravidla celé množství 50 ml.

Téměř bezvýhradně pravidelně a především na počátku léčby LDL-aferézou bývá přítomen pocit napětí až lehkých edémů podkoží, nejčastěji v oblasti nohou, někdy i na horních končetinách (zejm. prsty rukou) a na očních víčkách. Vzhledem k tomu, že jsou tyto projevy u léčebných procedur téměř standardně přítomny, v přehledné tabulce komplikací nejsou uvedeny. Připisují se dočasné větší cévní propustnosti nejen v souvislosti s rychlými změnami hladin lipoproteinů, ale i reakcím cytokinů po styku s ovčím imunoglobulinem. Blíže nebyly zkoumány. Projevy jsou obvykle velmi mírné, trvají několik hodin a někdy jsou spojeny i se zvýšenou únavností. Nevyžadují zvláštní terapii a většinou příliš pacienta neobtěžují. V našem souboru mělo tyto projevy 6 pacientů na počátku terapie, u dalších 3 nemocných pozorujeme tyto projevy po léčebných procedurách dosud.

Popsány jsou i těžké reakce při použití dextransulfátového absorberu, jestliže pacient užívá blokátory ACE (39). Pak může dojít k aktivaci komplementu aj. mediátorů a těžké hypotenzní anafylaktoidní reakci. Je způsobena hlavně sníženým odbouráváním bradykininu a jeho zvýšenou tvorbou, z čehož se obviňují negativně nabité částice dextransulfátu. Proto jsou nemocní i personál poučeni o tomto riziku a před procedurami jsou aktivně nemocní dotazováni. Tyto reakce se v naší sestavě nevyskytly.

K technickým obtížím lze konstatovat, že výkony LDL-aferézy patří k nejsložitějším mezi hemaferetickými terapeutickými zákroky. Správné a bezpečné provedení závisí na teoretické připravenosti a technické zručnosti personálu, který je dobře zaškolen teprve po cca 100 procedurách. Do té doby se vyskytovaly drobnější technické závady. Za celé tři poslední roky však již k tomu nedošlo.

Snášenlivost léčebných procedur i dlouhodobá tolerance výkonů je relativně velmi dobrá. Při léčbě LDL-aferézou byl podrobně sledován celkový klinický stav nemocných, včetně základních vitálních funkcí (frekvence srdeční akce, krevní tlak, dechová frekvence, případně také EKG apod.). Výsledky monitorování klinického stavu a výskyt vedlejších reakcí (doplněno také sledováním základních laboratorních ukazatelů) svědčí pro to, že změny sledovaných ukazatelů nebyly klinicky významné a nepodmínily zřetelné klinické reakce, symptomatologii nebo poruchy zdravotního stavu.

Na základě hodnocení vedlejších účinků léčby i výsledků ostatního výše uvedeného sledování klinického stavu a výzkumu byl navržen a zaveden do používání (po konsultaci se SÚKL Praha) protokol o imunoadsorpci, který je součástí záznamu každé procedury.

4.7. Optimalizace, individualizace a predikce výsledku procedury léčebné LDL-aferézy

Průběh LDL aferézy lze zvažovat v klinické praxi jako problém kontinuální filtrace, kdy z absorpční kolony odtéká plazma s prakticky nulovou

koncentrací LDL cholesterolu, pokud kolona není přeplněna. O tom svědčily výsledky provedených 100 měření.

a) Koncentrace LDL cholesterolu v plazmě klesá podle křivky, která je matematicky definovatelná jako :

$$C_x = C_0 . e^{-\frac{Vp}{PV}}$$

Tato rovnice vyjadřuje vztah, kde koncentrace cholesterolu v bodě x (C_x) je závislá na koncentraci výchozí (C_0), současně PV znamená vypočtený objem plazmy (na základě hematokritu, hmotnosti a výšky pacienta) a Vp celkový objem perfúze. Na základě toho matematického vztahu byl vytvořen program v prostředí Microsoft Excel (vyžadující Excel 95 nebo vyšší) a jeho HTML verze (vyžadující Microsoft Internet Explorer 5.0 nebo novější), které jsou nyní prakticky testovány.

b) Standardní vstupní údaje tvoří data o pacientovi (hmotnost, váha, pohlaví, výchozí hodnota LDL cholesterolu). Objem plazmy je potom počítán programem zabudovaným standardně v námi používaném separátoru krevních tělísek Cobe Spectra (software verze 5.1). Námi vyvinutý program potom dále ze standardních dat a výsledků vypočítá vlastní adsorpční kapacitu kolon k jejich optimálnímu využití, ze vztahu :

$$m_{adscol} = 208.\ C_0 + 500$$

Výstupem tohoto matematického vztahu je adsorpční kapacita separační kolony m_{adscol} [mg], kde C_0 představuje výchozí koncentraci LDL cholesterolu [mmol/l].

c) Množství LDL cholesterolu m_{ads}, který je adsorbován kolonou po promytí objemem plazmy V_p je spočten jako plocha pod křivkou koncentrace. Pro první kolonu v pořadí platí matematický vztah :

$$m_{ads} = \int_0^{V_p} C_0 . e^{-\frac{V_p}{PV}} dV_p = C_0 . PV . \left(1 - e^{-\frac{V_p}{PV}}\right)$$

Pro každou další kolonu je pro správný výpočet zapotřebí na pozici C_0 dosadit aktuální hodnotu sérové hladiny LDL cholesterolu, tedy aktuální výchozí hodnotu před zahájením promývání dané kolony.

d) Množství LDL cholesterolu, který je adsorbován kolonou se rovná adsorpční kapacitě kolony a je tedy možné vypočítat V_p jako:

$$V_p = -\ln\left(1 - \frac{m_{adscol}}{C_0 . PV}\right) . PV$$

Tyto naše závěry jsme opakovaně prakticky využili.

Uvádíme konkrétní příklad a výstup softwarového výpočtu – na základě výše uvedených předpokladů je zde určeno optimální množství kolon, které je nutno použít a množství plazmy, které musí protéci k dosažení cílové hodnoty LDL cholesterolu. Jde o příklad pacienta o hmotnosti 80 kg, výšce 170 cm, který má výchozí hladinu LDL cholesterolu 10 mmol/l (Obr.6a).

- **Obr. 6:** Příklady výpočtu potřebného počtu kolon a jejich plnění, legenda v textu.

a)

	A	B	C	D	E
1	Body mass [kg]	80			
2	Body height [cm]	170			
3	LDL_0 [mmol/L]	10			
7	Plasma volume [mL]	2988			
8					
9		LDL [mmol/L]	V [mL]	V´[mL]	LDL´[mmol/L]
10	T=0	10,0			
11	Column 1	7,8	755	750	7,8
12	Column 2	5,9	808	800	5,9
13	Column 3	4,4	874	850	4,5
14	Column 4	3,2	991	950	3,2
15	Column 5	2,2	1149	1100	2,2

b)

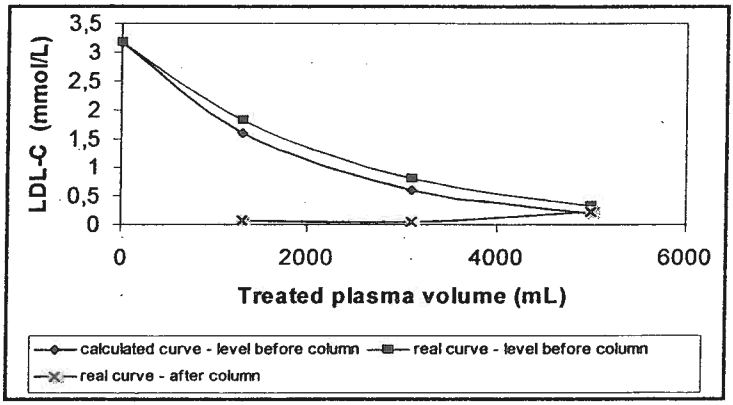
	A	B	C	D	E
1	Body mass [kg]	80			
2	Body height [cm]	170			
3	LDL_0 [mmol/L]	2,5			
7	Plasma volume [mL]	2988			
8					
9		LDL [mmol/L]	V [mL]	V´[mL]	LDL´[mmol/L]
10	T=0	2,5			
11	Column 1	1,6	1299	1250	1,6
12	Column 2	0,9	1815	1800	0,9
13	Column 3	0,3	3199	3150	0,3
14	Column 4	0,0	0	0	0,0
15	Column 5	0,0	0	0	0,0

Potom by stačilo promýt první kolonou objem V = 755 ml plazmy, což se z technických důvodů upraví na objem V´= 750 ml. Druhá kolona by vyžadovala objem V = 808 ml apod. V tomto konkrétním případě je k optimálnímu léčebnému výsledku nutné zapojit 5 kolon. Zároveň může obsluha separátoru simulovat i další uvedený případ (Obr.6b), kdy má pacient vstupní hodnotu LDL cholesterolu jen 2,5 mmol/l. Potom by podobným způsobem stačilo k proceduře použít 3 kolon.

V obvyklé klinické praxi postačí před zahájením procedury změřit hodnotu LDL cholesterolu v krvi. Podle základních údajů o pacientovi (viz výše uvedený příklad) je počítačem vypočten objem plazmy. Dále náš software stanoví optimální design procedury, tj. kolik kolon je nutno promýt k dosažení cílové hodnoty cholesterolu a jaký je nejvhodnější objem plazmy k dokonalému zaplnění jednotlivých kolon, neboť ten se liší pro každou jednotlivou kolonu. Pro názornost uvádíme také grafický výstup softwarového zpracování konkrétní procedury LDL-aferézy (Obr.7), jenž je příkladem optimálního využití našich výpočtů v běžné klinické praxi (vypočtené a reálné hodnoty sérového LDL cholesterolu).

Poznámka : tyto výsledky byly dosaženy v řešitelském kolektivu ukončeného grantu IGA 7006-3, jehož byl autor spoluřešitelem a na docílených výsledcích se obvyklou měrou podílel. Podrobnosti jsou obsahem publikace přijaté r.2005 impaktovaným časopisem (43).

- **Obr. 7:** Grafický výstup z počítačového zpracování procedury LDL-aferézy, legenda v textu.



5. Diskuse

V předkládané práci jsou podrobeny relativně širokému rozboru celkem 463 léčebné procedury LDL-aferézy v souboru 9 pacientů se závažnou formou FH a to 2 homozygotů a 7 heterozygotů. Shromážděná data poskytla dostatečné podklady pro statistické hodnocení parametrů sledovaných před a po léčebných LDL-aferézách. Hodnocení klinických výsledků (např. známky stability nebo regrese ateromatózy, výskyt komplikací aktivní aterosklerózy v podobě ICHS či CMP, přežití nemocných atp.) naopak nebyly statisticky hodnoceny pro malý počet nemocných v daném souboru. Větší soubor však nebylo možno vytvořit z důvodů především ekonomických, ale také z důvodů technických (kapacity zúčastněných pracovišť).

5.1. Diluce

K rozboru základních hematologických, biochemických, ale i dalších parametrů je nutno poznamenat, že vyšetření bezprostředně po proceduře podléhá jisté chybě z naředění, resp. z diluce. V rámci standardního průběhu léčebné LDL-aferézy nemocný dostane nejméně 500 ml fyziologického roztoku, který je podáván v průběhu procedury a po jejím ukončení; může se jednat celkově o větší množství a detailní sledování je obtížné. Přesně je znám pouze obsah tzv. setu, tedy komerční soupravy hadic, které se při proceduře používají a které jsou naplněny fyziologickým roztokem před započetím vlastního léčebného výkonu. V případě naší modifikace procedury jde o necelých 250 ml. Další objem je však vyplavován z adsorbérů po jejich promytí, kdy je celý obsah adsorbéru naplněn fyziologickým roztokem – tento objem je sice po promytí odpouštěn do odpadu a pak teprve začíná vracení

plazmy do oběhu nemocného; tedy by teoreticky mělo jít jen o plazmu s odadsorbovaným LDL cholesterolem, ale prakticky bylo změřeno, že je nemocnému současně vracena i část před tím z kapslí nedokonale vymytého fyziologického roztoku. Jednotlivé firmy deklarují mírně odlišné hodnoty naředění, firma Pocard na náš dotaz doporučuje kalkulovat s dilucí asi 10 %. To odpovídá také výsledkům našeho sledování, kde je zřetelné, že statisticky významný pokles základních hodnot v plazmě je v této relaci (Tab.2) : např. P poklesl o 11,2 %, urea o 14,3 %, kreatinin se snížil statisticky významně, ale jen o 7,9 %, kyselina močová o 10,7 % atd. Předpokladu takto způsobené diluce odpovídá i skutečnost, že naopak hodnoty Na a Cl stouply, sice klinicky zcela nevýznamně (cca o 2 %), ale statisticky významně. To koreluje s faktem, že byl NaCl pacientům podáván.

5.2. Porovnání longitudinálního vývoje dat

Při porovnání longitudinálního vývoje dat (Tab.1) nebyla nalezena statisticky významná diference mezi laboratorními parametry v období prvních 100 dnů po zahájení léčby a v období 600 až 800 dnů od zahájení léčby. Výsledky tedy svědčí pro to, že pacienti byli (po delší léčbě započaté již před zahájením této studie) relativně stabilizovaní na hodnotách parametrů jak před, tak po výkonech. U každého z nich je to výsledek snahy podat maximálně intenzívní terapii (dieta, tolerovatelné dávky hypolipidemik, účinné LDL-aferetické procedury v únosných intervalech). Porovnány byly průměrné hodnoty parametrů před LDL-aferézou, tedy průměrné pre hodnoty.

5.3. Změny laboratorních parametrů před a po LDL-aferéze

Změny laboratorních parametrů před a po LDL-aferéze (resp. procentní diference hodnoty pre a post) vyjadřuje popisná statistika hodnot sledovaných parametrů (Tab.2). Zvýrazněny jsou významné diference, z nich některé jsou statisticky významné ($p<0,05$). Variační koeficienty odrážejí variabilitu hodnot laboratorních parametrů (průměry pre hodnot) u každého nemocného za celé sledované období (Tab.3).

Vyhodnocená data lze interpretovat v jednotlivých tématických celcích:

LDL-aferéza statisticky významně snižuje spektrum sérových lipoproteinů. Pokles procentních diferencí v závislosti na proceduře LDL-aferézy je signifikantní pro (Tab.2; mean ± SD): celkový cholesterol (-67,0 ± 9,49), LDL cholesterol (-82,2 ± 11,53) a HDL cholesterol (-25,3 ± 5,9), triacylglyceroly (-51,7 ± 19,74), apolipoprotein A (-24,0 ± 9,65), apolipoprotein B (-73,2 ± 13,43), Lipoprotein(a) (-67,6 ± 18,77). Současně jsou sníženy i parametry jaterních testů, ALT (-27,3 ± 10,43), AST (-22,5 ± 10,85), GMT (-34,3 ± 12,33), ALP (-27,0 ± 5,68). Obecně lze říci, že proteiny jsou součástí sérových lipoproteinů a jejich přítomnost je důležitá v mechanizmu imunoadsorpce procesu LDL-aferézy – tomu odpovídají i pozitivní korelace ve vztahu sérových lipoproteinů k celkovému proteinu (TP). To se patrně

podílí i na statisticky významném poklesu sérových hodnot TP v průběhu LDL-aferézy (-25,1 ± 5,55), když současně nelze vyloučit ani jistý podíl nespecifické adsorpce dalších podobných substancí proteinové povahy v aferetické koloně. Potom by např. laboratorní pokles některých markerů mohl být komplexní povahy – tedy nejen sekundární při celkově pozitivním působení snížení aterogenních lipoproteinů v séru, ale i přímým mechanizmem nespecifické adsorpce se zpětnou vazbou na proces aterosklerózy. Pozitivní korelace byla zaznamenána ve vztahu TP k fibrinogenu ($r = 0,50$, $p<0,005$), negativní však ve vztahu TP k dalším ze sledovaných markerů hemostázy. Statisticky významné jsou také korelace TP k enzymům reflektujícím jaterní funkce.

5.4. Shrnutí z hlediska ovlivnění základních rizikových faktorů aterosklerózy

Přední důležitosti je fakt, že LDL cholesterol klesá po procedurách značně: dle našich výsledků (Tab.2) o 82,2 %, po odečtení 10 % diluce je to 72,2 %. Pro dané nemocné to je faktor základní důležitosti. Ačkoliv ve specializované literatuře lze nalézt různé modifikace hledisek, shodují se prakticky jednotně v tom, že pokles LDL cholesterolu po proceduře má být o více nežli 60 % (38, 43, 44). Jedině tehdy lze považovat procedury za účinné do té míry, že mohou vést i k regresi dosud reverzibilních změn (kalcifikované pláty například již resorbovatelné nejsou). Výhodný a významný je i nalezený značný pokles apoB, Lp(a) a samozřejmě celkového cholesterolu, méně i TAG. Naopak pokles HDL je po odečtení diluce klinicky jen málo významný a rychle se vrací k původní hodnotě (38, 45). Při měřeních během 600 dnů se však hodnota HDL neměnila (resp. neklesala), ale nepozorovali jsme ani jeho vzestup, jak někteří autoři udávají (38, 45). Pacienti byli pravděpodobně již v roce 2001 (tzn. na počátku této práce) stabilizováni. Pro to svědčí i longitudinální porovnání dat (Tab.1), kde se významně neměnily hodnoty sledovaných parametrů v období úvodních 100 dnů po zahájení léčby a hodnoty v období 600 až 800 dnů od zahájení terapie. Při procedurách byl splněn i požadavek, na němž se rovněž odborná literatura sjednocuje: pokles celkového cholesterolu po účinné proceduře má být pod 2 mmol/l (41, 44, 45).

5.5. Posouzení aktivity fibrinolýzy

K posouzení aktivity fibrinolýzy jsme při terapii sledovali dynamiku PAI-1 a t-PA, nezaznamenali jsme však statisticky významné změny. Také korelace PAI-1 a t-PA k dalším parametrům jsou negativní.

5.6. Reologické poměry

Zlepšení reologických poměrů a zmenšení smykového stresu v mikrořečišti je v případech aktivní ateromatózy velmi žádoucí. K ovlivnění těchto poměrů je výhodné kromě odstranění lipoproteinů také odstranění některých velkých

molekul, jako je zejména fibrinogen, některé koagulační faktory a další (speciálně na ovlivnění mikrořečiště je zaměřena léčba tzv. reoferézou, se kterou jsme na naší klinice začali zatím u 4 pacientů s těžkou FH).

Při hodnocení naší studie jsme zjistili pokles fibrinogenu po procedurách. Byl statisticky významný (-21,7 ± 8,9) s pozitivní korelací k TP ($r = 0,50$, $p<0,005$). Je výhodné, že poločas tvorby fibrinogenu je relativně dlouhý (kolem 3 dnů), takže k výchozí hodnotě se vrací až koncem týdne po léčebné proceduře. Zlepšení reologických poměrů tedy trvá u homozygotů po větší část intervalu mezi procedurami LDL-aferézy.

Rovněž zjištěný pokles vWF je i v tomto směru výhodný (blíže uvedeno níže). V důsledku zjištěných změn, ale též v důsledku jistě dalších, nesledovaných nebo nezjištěných změn došlo i podle měření viskozity plazmy ke zlepšení reologických poměrů : byl zjištěn statisticky významný pokles procentní diference viskozity plazmy (-15,2 ± 9,45) v závislosti na LDL-aferéze (k vyšetření byl použit rotační viskozimetr firmy Brookfield s typovým označením DV-II+Pro, s nástavcem pro měření malých objemů; USA). Přesnější měření bude patrně možné provádět v dalším výzkumu, neboť naše pracoviště plánuje využití přístroje Rheolog (Rheologics, USA) k průtokové viskozimetrii, jenž simuluje průtok kapilárou za různé rychlosti i teploty plné krve.

5.7. Adhezní vlastnosti endotelu

K posouzení změn adhezních vlastností endotelu jsme porovnali vývoj sérových hladin vWF (-15,1 ± 23,83) a TM (-29,1 ± 21,24), kde pokles procentních diferencí je statisticky významný. Pozitivní je korelace fibrinogenu k TM ($r = 0,18$, $p<0,05$), negativní je korelace vWF k TM ($r = 0,12$, $p<0.14$).

5.8. Základní hematologické parametry

V základních hematologických parametrech jsme po LDL-aferéze zaznamenali změny v hodnotách Hb a Htc (pokles průměrně o 7,3 g/l a 7,9 %) (Tab.2). Jde jistě v širokých souvislostech o komplexnější vlivy, podílí se zde kromě výše uvedené možnosti diluce také ztráty zbytkové krve v soupravě hadic přístrojů (tzn. separátoru a adsorpčně-desorpčního automatu), i drobné ztráty při odběrech krve. Po 600 až 800 dnech léčby (Tab.1) jsme zaznamenali naznačený pokles MCV (v procentech diference před a po proceduře) z průměrných hodnot 90,2 fl na 87,1 fl. U všech pacientů jsme proto nejméně po 300 dnech léčby vyšetřili podrobněji parametry metabolizmu železa a v případě poklesu jeho zásob (zjišťováno hlavně poklesem ferritinu; vyšetřována však byla vždy i sideremie, vazebná kapacita a procento sycení transferinu) byly dle potřeby podávány perorální preparáty železa k doplnění zásob. V literatuře je udáván také pokles středního objemu krevních destiček a nevelké změny v jejich celkovém počtu při terapii LDL-aferézou (221, 223,

235), v našem souboru dlouhodobě léčených pacientů jsme však statisticky významné změny těchto parametrů nezaznamenali.

5.9. Sledování morfologických změn

Přesné sledování morfologických změn je při hodnocení aktivity aterosklerózy obtížné. Opakované použití invazivních vyšetřovacích metod je ke sledování nemožné. Stav pacientů v našem souboru se natolik zlepšil, že k nim také nebyla indikace a nebylo by to etické. Zdůrazňujeme, že pacienti našeho souboru (kromě homozygotů, kteří byli zachyceni dostatečně včas) jsou léčeni v rámci sekundární prevence, neboť měli v anamnéze opakované ataky infarktu myokardu, mozkových příhod a periferních cévních příhod, které musely být řešeny v některých případech také operativně. Od zahájení extrakorporální eliminace neměl nikdo z nich další epizodu těchto příhod. Pokud došlo k progresi ateromatózních změn, byly tedy klinicky němé. Většina autorů provádí proto sledování alespoň pomocí jiných, neinvazivních metod, o kterých je známo, že korelují s pokročilostí ateromatózních změn.

Sami jsme jako měřítko odpovídající morfologickým změnám zvolili ultrazvukové vyšetření provedené zkušeným specialistou na kvalitním přístroji v pravidelných intervalech. Vývoj nálezu sklerotických změn vyjádřených tloušťkou IMT v definovaném úseku karotických tepen by mohl odpovídat změnám v jiných oblastech, jak popisuje literatura (35, 46).

Vyhodnotili jsme shromážděné ultrazvukové nálezy u 7 našich pacientů a výsledek naší studie je pozitivní (Obr.5), neboť ve 2 případech jsme pozorovali dokonce regresi morfologických změn. Ve zbývajících 5 případech došlo sice k progresi, ta však mnoho nepřesahovala 1 mm, což dle dostupné literatury ve sledovaném časovém intervalu prakticky odpovídá věkovým změnám (pacienti jsou sledováni 3 až 10 let) (35, 46).

Při statistickém hodnocení bylo také zjištěno, že vývoj sonografického nálezu signifikantně koreluje s dynamikou solubilních adhezních molekul, resp. s plazmatickou hodnotou MCP-1 (před LDL-aferézou $r = 0,679$, $p = 0,022$; po výkonu $r = 0,663$, $p = 0,026$).

5.10. Vyšetření primární hemostázy

Pilotní sondou je „in vitro" vyšetření primární hemostázy analyzátorem PFA-100. Přístroj relativně dokonale napodobuje proces, který se odehrává v mikrořečišti a v jiných indikacích se osvědčil. Naše hypotéza byla potvrzena jen v tom, že vyšetření (Tab. 4) vykazují po LDL-aferéze známky zlepšení sledovaných parametrů, avšak v našem souboru ne zcela přesvědčivě : rozdíly výsledků před a po LDL-aferéze jsou statisticky nevýznamné ($p<0,14$).

Podobně lze hodnotit i vyšetření agregace krevních destiček, ať již provedené standardním způsobem či za použití ADP v různém ředění nebo s kationickým propylgalátem v roli induktoru (SPAT). Očekávaný výstup agregačního vyšetření (Obr. 3, Obr. 4) má po LDL-aferéze známky poklesu výšky agregačních křivek i jejich strmosti.

V klinické praxi je výsledek individuálně modifikován mnoha dalšími faktory, mj. také dlouhodobě indikovanou antiagregační terapií. Tím lze pravděpodobně vysvětlit i prodloužení parametrů CT před LDL-aferézou, a to až mimo referenční meze u některých pacientů. Samotná LDL-aferéza v širokých souvislostech příznivě ovlivňuje také primární hemostázu a tím i sledované výsledky vyšetření po léčebné proceduře. Pacienti dlouhodobě léčení v našem souboru mohou být již stabilizováni, potom změny parametrů před a po LDL-aferéze i longitudinální vývoj dat mohou být již statisticky nevýznamné, a to při porovnání dat jednotlivých pacientů i při vyhodnocení souboru jako celku.

Pro správnost interpretace vyhodnocených výsledků je nutno zohlednit i nevelký počet pacientů ve sledovaném souboru, kdy jsme tč. vyšetřili dva páry vzorků od každého z 9 nemocných. Vzhledem k technické i ekonomické náročnosti dlouhodobé terapie se nepodařilo vytvořit větší soubor nemocných. Jde o největší soubor dlouhodobě sledovaných pacientů v České republice, avšak ani vyspělá zahraniční pracoviště mnohdy nemají obdobné soubory dlouhodobě sledovaných pacientů přesahující počet 10-20.

Vyšetřování primární hemostázy a funkcí krevních destiček provádíme i nadále, neboť šlo o pilotní sondu a s množstvím shromážděných dat je možné, že později tento závěr přehodnotíme. Dosud se však tato vyšetření nejeví vhodná pro sledování progrese změn, efektu léčby nebo k posouzení intenzity jednotlivých procedur LDL-aferézy.

5.11. Vedlejší účinky terapie

Ačkoliv jsou léčebné imunoaferézy jednou z technicky nejobtížnějších a nejdelších hemaferetických procedur (44, 47), nelze v literatuře najít větší sestavy, kde by byla problematika vedlejších účinků imunoaferéz cíleně sledována. Obyčejně lze nalézt pouze dílčí zmínky v odborných pracech, které se primárně věnují jiné problematice. Četnost vedlejších projevů (44, 48) bývá obvykle udávána od 0 do 5 %, výjimečně více. Při použití metodiky HELP například autoři uzavírají, že vyhodnocení parametrů dlouhodobé tolerance a bezpečnosti nevykazuje statisticky významné odlišnosti (49, 50). Lze uzavřít, že léčebné imunoaferézy jsou efektivní a relativně bezpečné metody (51, 52, 53), tomu odpovídá i naše pozorování. Námi hodnocená modifikace léčebné LDL-aferézy je v rukou zkušeného personálu bezpečná, když za dodržování pravidel uvedených výše jsme pozorovali jen 6,7 % nezávažných komplikací a snášenlivost procedur je přijatelná. Zde považujeme časový interval 4 hodin za únosný pro délku léčebné procedury, kdy je možno dosáhnout cílových hodnot cholesterolu a ještě je přijatelná tolerance nemocných.

5.12. Optimalizace, individualizace a predikce procedur LDL-aferézy

Na počátku tvorby vhodného programu k optimalizaci procedur bylo uvažováno o řadě faktorů, které by bylo třeba v programu zohlednit. Po

ověření výsledků vlastními měřeními bylo možno přistoupit k vývoji software, který byl postupně zjednodušován a zpřesňován a nakonec zahrnoval pouze minimum vstupních údajů: pohlaví pacienta, hmotnost, výšku a výchozí hodnotu sérové hladiny LDL cholesterolu. Ostatní údaje jsou relativně fixní, vloženy do programu (získané při vyhodnocení prvních výsledků a týkající se dynamiky adsorpce a adsorpční kapacity kolon Lipopak). Pro uživatele bude jistě vhodné, že finální program vyžaduje jen dnes zcela běžnou výpočetní techniku.

Stručně tedy můžeme shrnout výsledky naší práce: vytvořený software umožňuje poměrně přesnou predikci průběhu léčebné procedury LDL-aferézy. Program pracuje s těmi informacemi o metabolizmu cholesterolu, které jsou za daných podmínek maximálně relevantní a jeho využití není zatěžující v běžné klinické praxi, neboť k analýze vyžaduje pouze několik základních a běžně dostupných vstupních hodnot (21, 41, 43).

Počítačové simulace a programové analýzy nejrůznějších situací zaujímají významné místo nejen v oblasti medicínského výzkumu, ale tyto postupy jsou aplikovány také do každodenní klinické praxe (54, 55, 56).

5.13. Markery vhodné ke sledování účinnosti LDL-aferézy

Při léčbě nemocných LDL-aferézou dojde sice k prudkému snížení hladiny LDL cholesterolu hluboce pod normu, ale poté následuje podle tíže choroby opět relativně rychlé zvyšování jeho hladiny a léčebný výkon tak musí být v jistých intervalech opakován. Protože léčebná procedura je relativně dlouhá (asi 4 hodiny, kdy je nemocný upoután na lůžko a probíhá kontinuální extrakorporální eliminace LDL cholesterolu) a také proto, že je metoda technicky i ekonomicky náročná, je nutno se snažit o co nejmenší frekvenci výkonů. Jejich četnost však musí být taková, aby aktivita ateromatózy byla potlačena. Proto se stále hledají optimální markery (57), které by okamžitě po proceduře predikovaly s dostatečnou přesností účinnost terapie.

V odborné literatuře lze pozorovat snahu o vyhledávání jednoduchých a rychlých ukazatelů. Sami jsme vyzkoušeli sledování aktivity trombocytů (31) nebo vyšetřování primární koagulace, což není příliš jednoduché ani ekonomicky výhodné a tyto postupy mají i další úskalí – viz níže. Brõijersen (29) publikoval pozitivní výsledky při sledování pouhé velikosti krevních destiček (tj. střední objem trombocytu, MPV), kdy zjistil, že původně větší trombocyty se intenzivní léčbou normalizují. V naší práci jsme také sledovali parametry MPV, které jsme doplnili o destičkový hematokrit (Pct), ale ani při výzkumné sondě před zahájením této práce (provedeno v rámci grantu IGA 6549-3), ani při tomto výzkumu jsme neshledali signifikantní změny. Velikost destiček a destičkový hematorkit tedy nepovažujeme za optimální ukazatele účinnosti extrakorporální eliminace lipoproteinů LDL-aferézou.

Nadějným se jevilo sledování hladiny některých adhezních molekul, solubilního selektinu P a selektinu E, také monocytárního faktoru MCP-1.

V naší studii jsme pozorovali statisticky významné zvýšení koncentrace P-selektinu a MCP-1 v krvi pacientů se závažnou hypercholesterolémií, ačkoliv jsou dlouhodobě léčeni intenzivní hypolipidemizující intervencí. Bezprostředně po LDL-aferéze se statisticky významně snižuje hodnota P-selektinu a MCP-1, tyto markery by mohly být využity jako jeden z ukazatelů v hodnocení efektivity léčby LDL-aferézou (bezprostředně po léčebné proceduře) a při pozdějším porovnání by mohly sloužit i jako marker pro stanovení intenzity léčby.

Po ukončení této dizertační práce jsme se zaměřili na další nadějné predikční ukazatele účinnosti aferéz: high sensitivity LDH, endotelin-1, destičkové agregáty a znak CD40L. Všechny při předběžném statistickém hodnocení ukazují možnost zařazení do palety predikčních ukazatelů efektivity LDL-aferéz.

Vyšetření selektinů a dalších uvedených faktorů vyžaduje specializovanou, adekvátně vybavenou laboratoř a zkušený personál. Podobné podmínky jsou nezbytné ke správnému a bezpečnému provádění léčby LDL-aferézou, která tak může být poskytována pouze ve specializovaných, tzn. technicky moderně vybavených a personálně dostatečně zkušených centrech. V takových centrech by neměl být problém s vyšetřením selektinů, MCP-1 a dalších uvedených markerů, jejich stanovení je i relativně ekonomicky dostupné.

6. Závěry, splnění cíle výzkumu

1) Při výzkumu byla zjištěna řada vzájemných vztahů a změn v hematologickém a biochemickém profilu nemocných, z nichž některé byly známé z literatury, některé jsme v literatuře nenašli nebo ne v obdobné komplexní formě sledování a relací, jsou tedy nové. Nové jsou zejména poznatky, pokud jde o vlastnosti a využití adsorbérů Lipopak; v literatuře jsou o nich jen velmi sporé zprávy.

Pro klinickou praxi jsou nejdůležitější tyto závěry:

- Naše modifikace procedury je provázena hematologickými a biochemickými změnami, které nejsou provázeny nebezpečnými výkyvy ukazatelů. Některé změny naopak korelují se zlepšením reologických vlastností krve a jsou užitečné.
- Metodika je vysoce účinná co do odstranění hlavních patogenetických činitelů FH, zejména LDL cholesterolu i lipoproteinu(a)
- Procedury mají minimum vedlejších účinků a ty jsou dobře zvládnutelné. Nutná je však péče specializovaného a zkušeného týmu.

2) Bylo zjištěno, že časným ukazatelem účinnosti procedur může být sledování hladiny některých adhezních molekul, solubilního E-selektinu (resp. sE-selektinu) a MCP-1. Za podmínek specializované laboratoře může být využitelné i sledování agregačních vlastností destiček nebo primární hemostázy (mj. také při této práci zavedenou metodou na přístroji PFA-100), což je ovšem z medicínského hlediska i ekonomicky náročné. Jako uvedený

marker nelze použít některé rychlé a ekonomicky výhodné ukazatele, jako je velikost destiček nebo jejich hematokrit.

3) Z morfologických ukazatelů je vhodné sledování úspěšnosti terapie pomocí měření vrstvy intima-media (IMT) specializovanou ultrazvukovou metodikou. Rovněž výsledky tohoto sledování prokázaly účinnost naší modifikace LDL-aferézy.

4) Naše modifikace léčebné LDL-aferézy byla optimalizována (včetně vhodné délky jednotlivých procedur, jejich průběhu, intervalů mezi procedurami) s využitím počítačového programu. K ekonomizaci této relativně drahé léčby přispěly výsledky zkoumání účinnosti a selektivity adsorbérů po jejich delším používání.

Při této činnosti vznikla vlastní modifikace procedury, která byla patentována jako vynález *(číslo patentu: 293227, název vynálezu: Systém pro extrakorporální odstraňování cholesterolu)*. Tato část práce byla řešena v rámci grantu IGA; autor této práce nebyl sice autorem vynálezu, ale byl členem řešitelského týmu grantu a na práci kolektivu a modifikacích procedury se prokazatelně podílel.

Lze tedy uzavřít, že cíle výzkumu byly zcela splněny.

7. Souhrn

Lipidy představují ústřední rizikový faktor procesu aterosklerózy. Familiární hypercholesterolemie (FH) a familiární kombinovaná hyperlipidemie (FCH) jsou geneticky podmíněná onemocnění, která jsou spojená s vysokou incidencí těžkých kardiovaskulárních komplikací. Extrakorporální eliminační metody jsou užívány k selektivnímu odstranění rizikového LDL-cholesterolu u pacientů s těžkou hypercholesterolemií, kteří neodpovídají adekvátně na kombinovaná „standardní" léčebná opatření; invazivní terapie redukcí rizikových lipidů významně snižuje i progresi aterosklerózy u těchto pacientů.

Dlouhodobě byl sledován soubor 9 pacientů s FH ve věku 17-59 let (medián 55 let), kteří byli léčeni opakovanou LDL-aferézou na bázi imunoabsorpce (interval 17,5±1,6 dnů). Používán byl separátor Cobe Spectra (USA); počítačem řízené adsorpčně–desorpční zařízení ADA Medicap (Německo) s absorbery Lipopak Pocard (Rusko). Kromě sledování změn metabolizmu lipidů byl soubor podroben další široké analýze v základních laboratorních parametrech, sledovali jsme také poměry primární a sekundární hemostázy, morfologické a funkční změny trombocytů, změny exprese cytoadhezních molekul a další. U dlouhodobě sledovaných pacientů jsme zjišťovali vývoj cévních morfologických změn pomocí sonografického vyšetření. Dlouhodobě byly monitorovány vedlejší účinky léčby LDL-aferézou. Byl vytvořen systém predikce a optimalizace procedur LDL-aferézy tak, aby léčba byla maximálně účinná a bezpečná, přitom dobře tolerována dlouhodobě léčenými pacienty.

Samotná procedura léčebné LDL-aferézy vede ke statisticky významnému poklesu sérových koncentrací aterogenních lipidů. Přitom také pozitivně

ovlivňuje poměry hemostázy, příznivě působí na vývoj morfologických cévních změn, celkově přispívá ke stabilizaci rizikových nemocných. Léčebná LDL-aferéza je invazivní, velmi efektivní a relativně bezpečná metoda v rukách zkušeného personálu specializovaného pracoviště.

8. Summary

Lipids present the main risk factor of atherosclerosis in progress. Familial hypercholesterolaemia (FH) and familial combined hyperlipidaemia (FCHL) are inherited disorders associated with high incidence of severe cardiovascular complications. So extracorporeal elimination is used for selective removal of LDL-cholesterol in severe hypercholesterolaemias as combined strength of conservative and invasive lipid-lowering therapy may reduce progress of atherosclerosis in these high-risk patients.

We take care of 9 patients suffering from FH, in age from 17 to 59 years (median 55 years). Repeated LDL-apheresis based on immunoadsorption has been used to treat this long-term patients (treatment interval 17,5±1,6 days). Primary device Cobe Spectra (USA) was used; secondary device ADA (Adsorption-Desorption Automat, Medicap, Germany) with absorbers Lipopak (Pocard, Russia), the ADA system automatically performs. In addition to lipid metabolism we went after various markers of basic laboratory screening, we also measured markers of primary and secondary haemostasis, morphological and operative evidence of thrombocytes, plasma concentration of cytoadhesive molecules etc. In long-term patiens we detect morphological changes of vessel wall with ultrasound device. We went after side effects of LDL-apheresis too. Finaly we tried to predict and optimize procedure of therapeutic LDL-apheresis to be most effective, safe and well accepted by our long-term patients.

Therapeutic procedure of LDL-apheresis induced a significant interrelated decrease of atherogenic lipoproteins. At the same time it also induced positive changes of haemostasis, it also positively affected morphological changes of vesel wall and finaly stabilized these high-risk patients. Therapeutic LDL-apheresis is an invasive, safe and effective method in use of experienced staff in specialised workplace.

9. Použité zkratky

ACD-A	komerčně dostupný roztok citrátu používaný při LDL-aferéze (acid citrate dextrose)
ACEi	inhibitor enzymu konvertujícího angiotenzin II (angiotensin-converting enzyme inhibitor)
ADA	adsorpčně-desorpční automat
ADP	adenozindifosfát
ALT	alaninaminotransferáza
ALP	alkalická fosfatáza
Apo	apolipoprotein
AS	ateroskleróza
AST	aspartátaminotransferáza
AT	antitrombin
Ca	vápník celkový, kalcium (calcium)

CD	označení v nomenklatuře buněčných glykoproteinů (cluster of differentiation)
CK	kreatinkináza
Cl	chloridy
CMP	cévní mozková příhoda
CT	zde čas potřebný k uzavření kapiláry analyzátoru (closure time)
FCH	familiární kombinovaná hypercholesterolemie (familial combinated hypercholesterolaemia)
FH	familiární hypercholesterolemie (familial hypercholesterolaemia)
FN	fakultní nemocnice
FN HK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
f.II - f.XII	koagulační faktory II - XII
FW	sedimentace erytrocytů
GLP	certifikát správné laboratorní práce (good laboratory practice)
GMT	gamaglutamyltranspeptidáza
Hb	hemoglobin
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
Htc	ematokrit erytrocytů (hematocrite)
HTML	hypertextový značkový jazyk (hypertext markup language)
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHS	ischemická choroba srdeční
IMT	vzdálenost mezi intimou a medií cévní stěny (intima-media thickness)
I.U.	mezinárodní jednotka (international unit)
i.v.	nitrožilní, intravenózní
K	draslík (kalium)
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (low density lipoprotein)
LF	lékařská fakulta
LF UK	lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Lp(a)	lipoprotein (a)
MCP-1	chemotaktický protein monocytů (monocyte chemotactic protein)
MCV	střední objem erytrocytu (mean corpuscular volume, mean cell volume)
MPV	střední objem trombocytu (mean platelet volume)
N	zde počet statisticky hodnocených položek či subjektů (statistické označení)
Na	sodík (natrium)
NaCl	chlorid sodný
OKH	Oddělení klinické hematologie
P	fosfor (phosphor)
PAI	inhibitor aktivátoru plazminogenu (plasminogen-activator inhibitor)
PBS	označení pro komerčně dostupný roztok pufru používaný při LDL-aferéze
Pct	destičkový hematokrit
PDW	šíře distribuce krevních destiček podle objemu (platelet distribution width)
PFA	analýza funkce destiček (platelet function analyse)
Plt	krevní destička (platelet)
SD	statistické označení pro směrodatnou odchylku (standard deviation)
SE	statistické označení pro standardní chybu průměru (standard error)
SPAT	test agregace trombocytů, induktorem kationický propylgalát (slide platelet aggregation test)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TAG	triacylglycerol
TP	celková bílkovina séra (total protein)
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu (tissue plasminogen activator)
TM	trombomodulin
UFH	nefrakcionovaný heparin (unfractionated heparin)
ÚHKT	Ústav hematologie a klinické transfuziologie Praha
UK	Univerzita Karlova v Praze
UZ	ultrazvukové vyšetření, sonografie
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice
vWF	von Willebrandův faktor
WBC	leukocyty (white blood cell)

10. Přehled vybrané citované literatury:

1. Karlson P., et al.: Pathobiochemie. Praha : Academia, 1987. 480 s.
2. Widimský J.: Léčba dyslipidémií a ICHS. Praha : Triton, 1998. 202 s.
3. Assmann G., et al.: Lipid Metabolism Disorders and Coronary Heart Disease. Munich : MMV-Medizin Verl., 1993. 281 s.
4. Češka R.: Diagnostika a léčba hyperlipoproteinemií. Praha : Triton, 2002. 95 s.
5. Turay J.: Dyslipoproteinémia a ateroskleróza. Pardubice : STAPRO, 1992. 140 s.
6. Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993, vol. 362, p. 801-809.
7. Aschermann M., et al.: Trendy soudobé kardiologie: nestabilní angina pectoris. Praha : Galén, 2001. s. 11-36.
8. Vojáček J., et al.: Arteriální a žilní trombóza. Praha : Grada, 2004. 276 s.
9. Stejskal D.: Ateroskleróza. Etiopatogeneze, diagnostika a léčba. BMS, 1999. 230 s.
10. Češka R.: Cholesterol a ateroskleróza. Praha : Maxdorf, 1999. s. 9-160.
11. Buchwald H., et al.: Effect of partial ileal bypass surgery on mortality and morbidity from coronary heart-disease in patients with hypercholesterolemia report of the program on the surgical control of the hyperlipidemias (POSCH). *N. Engl. J. Med.* 1990, vol. 323, p. 946-955.
12. Bilheimer D.W.: Portacaval-shunt and livertransplantation in treatment of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1989, vol. 9, p. I158-I163.
13. Bilheimer D.W., et al.: Liver transplantation to provide low density lipoprotein receptors and lower plasma cholesterol in a child with homozygous familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 1984, vol. 311, p. 1658-1664.
14. Bláha V., et al.: LDL-aferéza: Historie a současná praxe v České republice. *Kapitoly z kardiologie*. 2001, roč. 3, č. 2, s. 72-76.
15. Igarashi K., et al.: Acute cholesterol lowering therapy with LDL-apheresis improves endothelial function of the coronary microcirculation in patients with hypercholesterolemia. *Circulation*. 1995, vol. 92, suppl. no. 452.
16. Tamai O., et al.: Single LDL-apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation*. 1997, vol. 95, p. 76-82.
17. Leitinger N., et al.: Decreased susceptibility of low-density lipoproteins to in-vitro oxidation after dextran-sulfate LDL apheresis treatment. *Atherosclerosis*. 1996, vol. 126, p. 305-312.
18. Uno H., et al.: Removal of LDL from plasma by adsorption reduces adhesion molecules on mononuclear cells in patients with arteriosclerosis obliterans. *Atherosclerosis*. 1995, vol. 116, p. 93-102.
19. Bláha V., et al.: Vliv agresívní hypolipidemické intervence na vývoj aterosklerotických změn a endoteliální dysfunkce. In *Intenzivní a metabolická péče ve vnitřním lékařství*. Hradec Králové : Nucleus HK, 2004, s. 60.
20. Stoffel W., et al.: Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterolemia. *Lancet*. 1981, vol. 318, no. 8254, p. 1005-1007
21. Bláha M., et al.: Strategie léčby rezistentní hyperlipidémie: standardizace a optimalizace léčby LDL-aferézou. In *Intenzivní a metabolická péče ve vnitřním lékařství*. Hradec Králové : Nucleus, 2004, s. 58 – 59.
22. Carsten, O., et al.: Efficacy and safety of a new whole-blood-low-density lipoprotein apheresis system (Liposorber D) in severe hypercholesterolemia. *Artif. Organs*. 2003, vol. 27, p. 1116–1122.
23. Gordon BR., et al.: Indications for low-density lipoprotein apheresis. *Am. J. Cardiol.* 1994, vol. 74, p. 1109-1112.
24. Bláha V., et al.: Selekční kriteria k léčbě závažných hypercholesterolémií metodou LDL-aferézy. *Čas. Lék. čes.* 1998, roč. 137, č. 14, s. 424-429.

25. Bláha M.: Terapeutická hemaferéza. In *Seminář z vnitřního lékařství XVII.* Hradec Králové : HK Credit, 2004, s.12-15.

26. Thompson G.R., et al.: Plasma exchange in the management of familial hypercholesterolemia. *Lancet.* 1975, vol. 305, no. 7918, p. 1208-1211.

27. Mabuchi H., et al.: A new low density lipoprotein apheresis system using two dextran sulphate columns in an automated column regenerating unit (LDL continuous apheresis). *Atherosclerosis.* 1987, vol. 68, p. 1925.

28. Živný P., et al.: Seznam metod prováděných ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Hradec Králové : ATD, 1997. 147 s.

29. Brõijersen A., et al.: Effects of selective LDL-apheresisi and pravastatin therapy on platelet function in familiar hypercholesterolaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* 1994, vol. 24, p. 488-498.

30. Bláha M., et al.: Platelet aggregation and lipoprotein levels in patients with familial hypercholesterolemia after selective LDL-apheresis. *Nutrition,* 2003, 19, (4), s. 397-400.

31. Bláha M., et al.: Activity of Thrombocytes as a Marker of Sufficient Intensity of LDL-apheresis in Familial Hypercholesterolaemia. *Transfus. Apheresis Sci.* 2004, vol. 30, no. 2, p. 83-87.

32. Speck R.E.: Comparison of Slide Platelet Aggregation Reagens. *Am. Clin. Lab.* 1994, vol. 13, no. 9, p. 22-23.

33. Bláha M., et al.: Selectins and monocyte chemotactic peptide as the markers of atherosclerosis activity. *Physiol. Res.* 2004, vol. 53, s. 273 – 278.

34. Blaha M., et al.: Adhesive selectin molecules during extracorporeal cholesterol elimination. *Hematol. J.* 2003, vol. 4, suppl. 2, p. 71-78.

35. Ludwig M.M., et al.: Detection of early structural wall changes in arteries by high resolution ultrasound. *Herz Kreislauf.* 1995, vol. 27, p. 5-25.

36. Kvasnička J., et al.: Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi. Praha : Grada, 2003. 299 s.

37. Bláha M., et al.: Tolerability and side effects of extracorporeal LDL-lowering immunoapheresis in familial hyperlipoproteinaemia. In *Atherosklerosa* 2004. Praha : Společnost patologické a klinické fyziologie ČLS JEP, 2004, s. 12.

38. Molinaro G., et al.: Hypotensive reaction during staphylococcal protein A column therapy in a patient with anomalous degradation of bradykinin and Des-Arg^9- bradykinin after contact activation. *Transfusion.* 2002, vol. 42, p. 1458-1465.

39. Gašová Z.: Terapeutické hemaferézy. In *Sborník postgraduálních přednášek z 2. celostátní hematologickotransfuziologické konference.* Pieštany : SLS, 2001, s. 97-107.

40. Stefanec G.M.: Prädiktionsparameter extrakorporaler Eliminationstherapien am Modell der LDL-apherese. Köln am Rhein : Copy Team KMS, 1999. 117 s.

41. Bláha M. et al.: Optimization of therapeutic procedure during LDL-apheresis – a multivariate computerized model. In *14th Congres of European Interdisciplinary Society for Hemapheresis and Hemotherapy, 10. – 13. 9.2003, Praha, abstract book.* Hradec Králové : HK Credit, 2003, p. 56.

42. Bláha M. et al.: The influence of long-term aggressive lipid lowering with imunoapheresis on endothelial dysfunction and carotid intima-media thickness. In *10. pracovní dny Společnosti pro transfúzní lékařství, 8.-10. září 2004, Rožnov pod Radhoštěm: sborník abstrakt.* Hradec Králové : HK Credit, 2004, s. 34.

43. Bláha M., et al.: Prediction of the optimal therapeutic procedure during LDL apheresis suitable for routine clinical practice. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* 2005, *přijato k tisku.*

44. Thompson G.R.: LDL apheresis. *Atherosclerosis.* 2003, vol. 167, p. 1–13.

45. Borberg H.: LDL-Apheresis and LDL-Elimination Therapies. In European School of Haematology. In *2nd Seminar of Applied Technology in Haemapheresis (Proceedings).* Paris: ESH, 1997, p. 1-8.

46. Mabuchi H., et al.: Long-term efficacy of low-density lipoprotein apheresis on coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *A. J. Cardiol.* 1998, vol. 82, p. 1489 - 1495.

47. Matic G.B., et al.: Release of microparticles in LDL apheresis. *Transfus. Apheresis Sci.* 2001, vol. 24, no. 2, p.129-133.

48. Bambauer R., et al.: Low-density lipoprotein apheresis: an overview. *Therap. Apher. Dial.* 2003, vol. 7, no. 4, p. 391 – 396.

49. Blessing F., et al.: The efficacy and safety of the new heparin-induced extracorporeal low-density lipoprotein precipitation system (Plasmat Futura) in comparison with the currently used system (Plasmat Secura). *Therap. Apher. Dial.* 2004, vol. 8, no. 1, p. 33-38.

50. Blessing F., et al.: Heparin-induced extracorporeal low-density liprotein precipitation: rationale for a specific adjuvant therapy in cardiovascular disease. *Transfus. Apheresis Sci.* 2004, vol. 30, no. 3, p. 255 – 266.

51. Borberg H.: LDL-Apheresis and LDL-Elimination Therapies. In *European School of Haematology: 2nd Seminar of Applied Technology in Haemapheresis (Proceedings).* Paris : ESH, 1997, s. 1-8.

52. Bláha V., et al.: Imunoadsorpční LDL-aferéza v léčbě závažných hypercholesterolémií. In *Nutriční a metabolická podpora u kritických stavů a orgánového selhání.* Praha : Galén, 2001, s. 159-162.

53. Borberg H.: Results of an open, longitudinal multicenter LDL-apheresis trial. *Transfusion Sci.* 2000, vol. 20, p. 83-94.

54. Jin Y., et al.: Software for interactive segmentation of the carotid artery from 3D black blood magnetic resonance images. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* 2004, vol. 75, p. 31-43.

55. Ozer M., et al.: A computer software for simulating single-compartmental model of neurons. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* 2004, vol. 75, p. 51-57.

56. Blaha M., et al.: Optimization of therapeutic procedure during LDL-apheresis – a computerized model. *Transfus. Apheresis Sci.* 2005, vol. 32, no. 2, p. 149-156.

57. Bláha M., et al.: The importance and mutual correlation between the indicators of atheromatosis activity after LDL-apheresis. *Acta Medica (Hradec Králové).* 2002, sv. 45, č. 2, s. 48.

Seznam všech publikací uchazeče

1. Bláha M., Andrýs C., Bláha V., Krejsek J., Cermanová M., Filip S., Malý J., **Blažek M.** Adhesive selectin molecules during extracorporeal cholesterol elimination. *Hematology Journal*, 2003, 4, (Suppl. 2), s. 23-24.

2. Bláha M., **Blažek M.**, Cermanová M., Bláha V., Solichová D., Malý J., Širký O. LDL-lowering immunoapheresis is well tolerated and safe procedure in familial hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis. 2005, 6, (Suppl. 1), s. 171*

3. Bláha M., Cermanová M., Bláha V., Mašín V., **Blažek M.**, Solichová D., Malý J. Adverse events during long lasting LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinemia. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*, 2004, 7, (Suppl. 3), s. 40.

4. Bláha M., Krejsek J., Bláha V., Andrýs C., Vokurková D., Malý J., **Blažek M.**, Cermanová M. Selectins and monocyte chemotactic peptide as the markers of atherosclerosis activity. *Physiological Research*, 2004, 53, (3), s. 273-278.

5. Bláha M., Krejsek J., Bláha V., Skořepová M., Andrýs J., **Blažek M.**, Malý J. Soluble selectins and monocyte chemotactic protein-1 levels during LDL-apheresis. In *Laboratorní hematologie 2002.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2002. s. 91.

6. Bláha M., Malý J., Bláha V., Pecka M., Urbánková J., Cermanová M., **Blažek M.** Platelet aggregation and lipoprotein levels in patients with familial hypercholesterolemia after

selective LDL-apheresis. *Nutrition*, 2003, 19, (4), s. 397-400.

7. Bláha M., Malý J., Bláha V., Pecka M., Urbánková J., Skořepová M., **Blažek M.** Agregace trombocytů po snížení hladiny lipidů selektivní LDL-aferézou u familiární hypercholesterolémie. In Zadák, Z. (ed.). *Intenzivní metabolická péče a klinická výživa.* 1. vyd. Praha: Společnost klinické výživy a intenzivní metabolické péče ČLS JEP, 2002. s. 143.
8. Bláha M., Mašín V., Bláha V., Cermanová M., **Blažek M.**, Solichová D., Malý J. Tolerability and side effects of extracorporeal LDL-lowering immunoapheresis in familial hyperlipoproteinaemia. In *Atherosklerosa 2004.* 1. vyd. Praha: Společnost patologické a klinické fyziologie ČLS JEP, 2004. s. 12-16.
9. Bláha M., Mašín V., Stránský P., Bláha V., Cermanová M., Malý J., **Blažek M.** Assessment of absorber efficacy dutiny LDL-apheresis. *Atherosclerosis. 2005, 6, (Suppl. 1), s. 102*
10. Bláha M., Mašín V., Stránská P., Bláha V., Cermanová M., Malý J., **Blažek M.**, Filip S., Babu A.: Computer controlled prediction of the optimal therapeutic procedure during LDL apheresis suitable for routine clinical practice. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* 2005, **v recenzním řízení.**
11. Bláha M., Pecka M., Bláha V., Malý J., Ženatová M., Skořepová M., **Blažek M.** Aktivita krevních destiček po LDL-aferéze u familiární hyperlipoproteinémie. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*, 2001, 4, (Suppl.), s. 44.
12. Bláha M., Pecka M., Urbánková J., Bláha V., Malý J., Zadák Z., **Blažek M.** Activity of Thrombocytes as a Markef of Sufficient Intensity of LDL-apheresis in Familial Hypercholesterolaemia. *Transfusion and Apheresis Science*, 2004, 30, (2), s. 83-87.
13. 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 imunoapheresis on endothelial dysfunction and carotid intima-media thickness. In *10. pracovní dny Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2004. s. 34.
14. Bláha M., Ungermann L., Bláha V., Solichová D., Andrýs C., **Blažek M.**, Cermanová M., Malý J. Laboratory indicators of endothelial dysfunction and carotid intima-media thickness - changes after the extra corporeal long-term lipid lowering immunotherapy. In *Laboratorní hematologie 2004.* 1. vyd. HK: HK Credit, 2004. s. 81.
15. Bláha M., Zadák Z., Bláha V., Malý J., Cermanová M., **Blažek M.**, Hyšpler R. LDL-apheresis - results of the long time treatment. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2003, 46, (2), s. 40.
16. Bláha M., Zadák Z., Bláha V., Malý J., Skořepová M., **Blažek M.**, Hyšpler R. The importance and mutual correlation between the indicators of atheromatosis activity after LDL-apheresis. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2002, 45, (2), s. 48.
17. Bláha M., Cermanová M., Bláha V., **Blažek M.**, Malý J., Procházková R., Solichová D. Široký O. LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinaemia: Results of long lasting therapy. *Transfusion and Apheresis Science*, 2005, 33, (2), p. 242.
18. Bláha, M., Měřička, P., Cermanová, M., Procházková, R., **Blažek, M.**, Štěpánová, V., Malý, J., Jebavý. Danger of infection during hematological progenitor cell transplantation. *Transfusion and Apheresis Science*, 2005, 33, (2), p. 239.
19. **Blažek M.**, Bláha M., Malý J., Pecka M., Slováček L. Hemostáza a léčebná LDL-aferéza. In *Laboratorní hematologie 2004.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2004. s. 22.
20. **Blažek M.**, Bláha M., Bláha V., Malý J., Cermanová M., Pecka M. Haemostasis and LDL-apheresis in hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis. 2005, 6, (Suppl. 1), s. 170.*
21. **Blažek M.**, Bláha M., Malý J., Pecka M., Cermanová M. LDL aferéza v léčbě familiární hypercholesterolemie a změny parametrů hemostázy. In *Trombóza a hemostáza 2005.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2005. s. 79.
22. **Blažek M.**, Bláha M., Malý J., Pecka M., Cermanová M. LDL aferéza v terapii familiární hypercholesterolemie a pilotní vyšetření primární hemostázy analyzátorem PFA-100. In *Trombóza a hemostáza 2005.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2005. s. 78.
23. **Blažek M.**, Bláha M., Malý J., Slováček L. Endotel v systému hemostázy. Část I: Základní patofyziologické vlastnosti endotelu. *Transfuze a hematologie dnes*, 2005, 11, (1), s. 5-9.

24. **Blažek M.**, Bláha M., Malý J., Cermanová M., Slováček L. Endotel v systému hemostázy. Část II: Diagnostika endotelové dysfunkce a léčebné možnosti. *Transfuze a hematologie dnes*, 2005, 11, (2), s. 35-39.

25. **Blažek M.**, Malý J., Bláha M. LDL afereza v terapii familiární hypercholesterolemie a dynamika vybraných laboratorních parametrů. In *Trombóza a hemostáza 2003.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2003. s. 77.

26. **Blažek M.**, Malý J., Bláha M. Možnosti sledování a ovlivnění ateroskleróza, dysfunkce endotelu a dyslipidémie. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*, 2004, 49, (5-6), s. 166-177.

27. **Blažek M.**, Malý J., Sobotka L., Pecka M. Možnosti vyšetření nestabilního ateromatozního plátu. In *Trombóza a hemostáza 1999.* 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus, 1999. s. 89.

28. **Blažek M.**, Slováček L., Malý J., Bláha M. LDL-aferéza v terapii familiární hypercholesterolémie a dynamika vybraných laboratorních parametrů. In *4. konference odborné Společnosti vojenských lékařů a farmaceutů ČLS JEP.* 1.vyd. Hradec Králové: VLA JEP, 2004. s. 22.

29. **Blažek M.**, Bláha M., Bláha V., Pták J., Malý J., Cermanová M., Slováček L., Pecka M. Long-term LDL-apheresis in familial hypercholesterolemia and changes of hemostasis. *Transfusion and Apheresis Science*, 2005, 33, (2), p. 241-242.

30. **Blažek M.**, Malý J., Bláha M., Pecka M., Cermanová M. Vyšetření primární hemostázy u pacientů léčených LDL-aferézou pro závažnou familiární hypercholesterolemii. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*, 2005, **v tisku.**

31. Cermanová M., Bláha M., Andrýs C., Bláha V., Krejsek J., **Blažek M.**, Malý J. Selektinové adhesivní molekuly v průběhu LDL-aferézy. In *Trombóza a hemostáza 2003.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2003. s. 108.

32. Cermanová M., Bláha M., **Blažek M.**, Bláha V., Mašín V., Malý J. Vedlejší účinky a komplikace extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu. In *XVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí.* 1. vyd. Olomouc: Rubico, 2004. s. 28-29.

33. Cermanová M., Bláha M., Mašín V., **Blažek M.**, Malý J. Zhodnocení vedlejších účinků a tolerability dlouhodobé léčby LDL- aferézou. In *Laboratorní hematologie 2004.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2004. s. 83.

34. Cermanová M., **Blažek M.**, Bláha M. LDL-aferéza a další metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*, 2004, 49, (7-8), s. 243-251.

35. Cermanová M., Bláha M., Bláha V., Havel E., Vyroubal P., Zadák Z., **Blažek M.**, Malý J., Mašín V. LDL-aferéza – hodnocení výsledků 1000 provedených procedur. *Transfuze a hematologie dnes*, 2005, 11, (3), s. 116-121.

36. Dulíček P., Malý J., Beránek M., Pecka M., Široký O., **Blažek M.** Výskyt žilního tromboembolizmu u žen s mutací F V Leiden v souvislosti s graviditou a šestinedělím. In *Laboratorní hematologie 2002.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2002. s. 87.

37. Dulíček P., Malý J., Pecka M., Beránek M., Široký O., **Blažek M.** Výskyt žilního tromboembolismu u žen s mutací FV Leiden v souvislosti s užíváním hormonální antikoncepce. In *Laboratorní hematologie 2002.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2002. s. 86.

38. Dulíček P., Malý J., Pecka M., Široký O., **Blažek M.** Možnosti a úskalí monitorování antikoagulační terapie heparinem. In *Laboratorní hematologie 2002.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2002. s. 30-31.

39. Dulíček P., Malý J., Pecka M., Široký O., **Blažek M.** Možnosti a úskalí monitorování antikoagulační terapie heparinem. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*, 2003, 48, (1-2), s. 72-73.

40. Malý J., **Blažek M.**, Bláha M., Pecka M. Změny hemostázy u maligních onemocnění. *Vnitřní lékařství*, 2002, 48, (7), s. 614-618.

41. Malý J., **Blažek M.**, Jebavý L., Kmoníček M., Pecka M., Žák P., Bláha M. Vyšetření

hemostázy u nemocných s převody PBSB. In *XIV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí.* 1. vyd. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého, 2000. s. 142.

42. Malý J., Dulíček P., Pecka M., **Blažek M.** Disseminovaná intravakulární koagulace (DIC). In Křivánek, Z. (ed.). *Anestezie u závažných úrazových stavů.* 1. vyd. Pardubice: Silueta, 2001. s. 54-56.

43. Malý J., Dulíček P., Pecka M., **Blažek M.** Nové možnosti farmakologické prevence žilních tromboembolií. In *Laboratorní hematologie 2004.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2004. s. 45-51.

44. Malý J., Dulíček P., Pecka M., **Blažek M.**, Jebavý L., Kmoníček M., Žák P. Nové možnosti farmakologické prevence žilních tromboembolií. In *XI. Slovensko-česká konferencia o hemostáze a trombóze.* 1. vyd. Bratislava: Univerzita Komenského, 2004. s. 4-10.

45. Malý J., Pecka M., Dulíček P., Bláha M., Jebavý L., **Blažek M.** Aktivita inhibitorového systému u sepse. In *Trombóza a hemostáza 2001.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2001. s. 9-11.

46. Malý J., Pecka M., Dulíček P., **Blažek M.**, Gregor J., Malý R. Aspirinová resistence. In *Laboratorní hematologie 2002.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2002. s. 26-27.

47. Malý J., Pecka M., Dulíček P., **Blažek M.**, Gregor J., Malý R., Pudil R. Aspirinová resistence. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*, 2003, 48, (1-2), s. 69-71.

48. Malý J., Pecka M., Dulíček P., **Blažek M.**, Gregor J., Malý R., Pudil R. Aspirinová resistence a možnosti jejího stanovení. In *Trombóza a hemostáza 2003.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2003. s. 98.

49. Malý J., Pecka M., Dulíček P., **Blažek M.**, Malý R. Existuje economy class syndrom? In *Trombóza a hemostáza 2003.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2003. s. 32-33.

50. Malý J., Pecka M., Dulíček P., Malý R., Gregor J., **Blažek M.**, Bláha M. Vyšetření aktivity destičkových funkcí se vztahem k rezistenci na kyselinu acetylosalicylovou. In *XI. Slovensko-česká konferencia o hemostáze a trombóze.* 1. vyd. Bratislava: Univerzita Komenského, 2004. s. 26-29.

51. Malý J., Peychl J., Rudolf E., Červinka M., Fiedler Z., Geršl V., Adamcová M., Rešl M., Jandík P., Vobořil Z., Bureš J., Kopáčová M., Horáček J., Poznarová A., **Blažek M.**, Melichar B., Králíčková P., Kmoníček M., Žák P., Jebavý L. Pathogenesis, diagnosis and therapy of malignant diseases. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2002, 45, (2), s. 58.

52. Malý J., Peychl J., Rudolf E., Červinka M., Fiedler Z., Geršl V., Adamcová M., Rešl M., Jandík P., Vobořil Z., Bureš J., Kopáčová M., Horáček J., Poznarová A., **Blažek M.**, Melichar B., Králíčková P., Žák P., Kmoníček M., Jebavý L. Pathogenesis, diagnosis and therapy of malignant diseases. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2003, 46, (2), s. 50-51.

53. Malý J., Pecka M., Dulíček P., **Blažek M.**, Smolej L. Protidestičková léčba. *Vnitřní lékařství*, 2005, 51, (7&8), s. 826-832.

54. Malý J., Pecka M., Gregor J., Dulíček P, **Blažek M.**, Malý R., Pudil R., Bláha M. Rezistence na kyselinu acetylosalicylovou (bioindikátor léčebné strategie). *Transfuze a hematologie dnes*, 2005, 11, (Suppl. 2), s. 41-45.

55. Malý J., Pecka M., Dulíček P., **Blažek M.** Laboratorní vyšetření hemostázy při kardiologických výkonech. *Interv. Akut. Kardiol.*, 2005, 4, s. 90-92.

56. Peychl J., Rudolf E., Červinka M., Fiedler Z., Geršl V., Adamcová M., Rešl M., Jandík P., Vobořil Z., Bureš J., Kopáčová M., Horáček J., Poznarová A., Malý J., **Blažek M.**, Melichar B., Králíčková P., Kmoníček M., Žák P., Jebavý L. Pathogenesis, diagnosis and therapy of malignant diseases. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2001, 44, (2), s. 62.

57. Skořepová M., Bláha M., Andrýs C., Bláha V., Krejsek J., **Blažek M.**, Malý J. Selektinové adhesivní molekuly v průběhu LDL-aferézy. In *Trombóza a hemostáza 2003.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2003. s. 108.

58. Skořepová M., Bláha M., Malý J., Bláha V., Pecka M., Urbánková J., **Blažek M.** Lipoprotein levels and platelet aggregation with familial hypercholesterolemia after LDL-apheresis. In

Berger, J. (ed.). *Cells IV.* 1. vyd. České Budějovice: Kopp, 2002. s. 97.

59. Slováček L., **Blažek M.** Příspěvek k diferenciální diagnostice nádorů mezihrudí. *Vojenské zdravotnické listy*, 2004, 72, (5), s. 208-212.

60. Slováček L., **Blažek M.**, Bartoň P., Jebavý L. Thymom - mezioborový problém. In *4. konference odborné Společnosti vojenských lékařů a farmaceutů ČLS JEP.* 1. vyd. Hradec Králové: VLA JEP, 2004. s. 79-80.

61. Slováček L., **Blažek M.**, Bartoň P., Jebavý L., Kačerovský J. Karcinoid appendixu. *Interní medicína pro praxi*, 2004, 6, (7), s. 77-78.

62. Slováček L., **Blažek M.**, Jebavý L., Kačerovský J., Horáček J. Thymom - mezioborový problém. *Transfuze a hematologie dnes*, 2003, 9, (4), s. 166-169.

63. Slováček L., **Blažek M.**, Slováčková B., Bartoň P., Jebavý L. Hematologické paraneoplastické syndromy. Paraneoplastická leukocytóza - diferenciálně diagnostický přístup. In *4. konference odborné Společnosti vojenských lékařů a farmaceutů ČLS JEP.* 1. vyd. Hradec Králové: VLA JEP, 2004. s. 77-78.

64. Slováček L., **Blažek M.**, Zachoval R., Jebavý L. Obstrukční ikterus - jeden z časných příznaků karcinomu hlavy pankreatu. *Vojenské zdravotnické listy*, 2004, 73, (3), s. 85-88.

65. Slováček L., Slováčková B., **Blažek M.**, Jebavý L. Kvalita života - jeden z důležitých parametrů komplexního hodnocení léčby. *Vojenské zdravotnické listy*, 2004, 73, (1), s. 6-9.

66. Slováček L., Slováčková B., Jebavý L., **Blažek M.** Transplantace krvetvorných buněk a kvalita života. In *4. konference odborné Společnosti vojenských lékařů a farmaceutů ČLS JEP.* 1. vyd. Hradec Králové: VLA JEP, 2004. s. 81-83.

67. Slováček L., Slováčková B., Jebavý L., **Blažek M.** Kvalita života nemocných po transplantaci krvetvorných buněk na oddělení klinické hematologie II.interní kliniky FN Hradec Králové. In *Trombóza a hemostáza 2005.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2005. s. 100.

68. Slováček L., Slováčková B., Jebavý L., **Blažek M.** Globální kvalita života nemocných po transplantaci krvetvorných buněk na oddělení klinické hematologie II.interní kliniky FN Hradec Králové. In *Edukační sborník – XXIX. Brněnské onkologické dny.* 1. vyd. Brno, Dataprint Brno , 2005. s. 261.

Seznam publikovaných prací uchazeče se vztahem k řešené dizertační práci

1. Bláha M., Krejsek J., Bláha V., Andrýs C., Vokurková D., Malý J., **Blažek M.**, Cermanová M. Selectins and monocyte chemotactic peptide as the markers of atherosclerosis activity. *Physiological Research*, 2004, 53, (3), s. 273-278.

2. Bláha M., Malý J., Bláha V., Pecka M., Urbánková J., Cermanová M., **Blažek M.** Platelet aggregation and lipoprotein levels in patients with familial hypercholesterolemia after selective LDL-apheresis. *Nutrition*, 2003, 19, (4), s. 397-400.

3. Bláha M., Mašín V., Bláha V., Cermanová M., **Blažek** M., Solichová D., Malý J. Tolerability and side effects of extracorporeal LDL-lowering immunoapheresis in familial hyperlipoproteinaemia. In *Atherosklerosa 2004.* 1. vyd. Praha: Společnost patologické a klinické fyziologie ČLS JEP, 2004. s. 12-16.

4. Bláha M., Mašín V., Stránský P., Bláha V., Cermanová M., Malý J., **Blažek M.**, Filip S., Babu A.: Computer controlled prediction of the optimal therapeutic procedure during LDL apheresis suitable for routine clinical practice. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* 2005, **v recensním řízení.**

5. Bláha M., Pecka M., Urbánková J., Bláha V., Malý J., Zadák Z., **Blažek M.** Activity of Thrombocytes as a Markef of Sufficient Intensity of LDL-apheresis in Familial Hypercholesterolaemia. *Transfusion and Apheresis Science*, 2004, 30, (2), s. 83-87.

6. **Blažek M.**, Bláha M., Malý J., Slováček L. Endotel v systému hemostázy. Část I: Základní patofyziologické vlastnosti endotelu. *Transfuze a hematologie dnes*, 2005, 11, (1), s. 5-9.

7. **Blažek M.**, Bláha M., Malý J., Cermanová M., Slováček L. Endotel v systému hemostázy.

Část II: Diagnostika endotelové dysfunkce a léčebné možnosti. *Transfuze a hematologie dnes*, 2005, 11, (2), s. 35-39.

8. **Blažek M.**, Malý J., Bláha M., Pecka M., Cermanová M. Vyšetření primární hemostázy u pacientů léčených LDL-aferézou pro závažnou familiární hypercholesterolemii. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*, 2005, **v tisku.**
9. Cermanová M., **Blažek M.**, Bláha M. LDL-aferéza a další metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*, 2004, 49, (7-8), s. 243-251.
10. Cermanová M., Bláha M., Bláha V., Havel E., Vyroubal P., Zadák Z., **Blažek M.**, Malý J., Mašín V. LDL-aferéza – hodnocení výsledků 1000 provedených procedur. *Transfuze a hematologie dnes*, 2005, 11, (3), s. 116-121.

Seznam publikovaných abstrakt uchazeče se vztahem k řešené dizertační práci

1. Bláha M., Andrýs C., Bláha V., Krejsek J., Cermanová M., Filip S., Malý J., **Blažek M.** Adhesive selectin molecules during extracorporeal cholesterol elimination. *Hematology Journal*, 2003, 4, (Suppl. 2), s. 23-24.
2. Bláha M., **Blažek M.**, Cermanová M., Bláha V., Solichová D., Malý J., Širký O. LDL-lowering immunoapheresis is well tolerated and safe procedure in familial hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis. 2005, 6, (Suppl. 1), s. 171*
3. Bláha M., Cermanová M., Bláha V., Mašín V., **Blažek M.**, Solichová D., Malý J. Adverse events during long lasting LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinemia. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*, 2004, 7, (Suppl. 3), s. 40.
4. Bláha M., Krejsek J., Bláha V., Skořepová M., Andrýs J., **Blažek M.**, Malý J. Soluble selectins and monocyte chemotactic protein-1 levels during LDL-apheresis. In *Laboratorní hematologie 2002.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2002. s. 91.
5. Bláha M., Malý J., Bláha V., Pecka M., Urbánková J., Skořepová M., **Blažek M.** Agregace trombocytů po snížení hladiny lipidů selektivní LDL-aferézou u familiární hypercholesterolémie. In Zadák, Z. (ed.). *Intenzivní metabolická péče a klinická výživa.* 1. vyd. Praha: Společnost klinické výživy a intenzivní metabolické péče ČLS JEP, 2002. s. 143.
6. Bláha M., Mašín V., Stránský P., Bláha V., Cermanová M., Malý J., **Blažek M.** Assessment of absorber efficacy dutiny LDL-apheresis. *Atherosclerosis. 2005, 6, (Suppl. 1), s. 102*
7. Bláha M., Cermanová M., Bláha V., **Blažek M.**, Malý J., Procházková R., Solichová D. Široký O. LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinaemia: Results of long lasting therapy. *Transfusion and Apheresis Science*, 2005, 33, (2), p. 242.
8. Bláha M., Pecka M., Bláha V., Malý J., Ženatová M., Skořepová M., **Blažek M.** Aktivita krevních destiček po LDL-aferéze u familiární hyperlipoproteinémie. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*, 2001, 4, (Suppl.), s. 44.
9. 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 imunoapheresis on endothelial dysfunction and carotid intima-media thickness. In *10. pracovní dny Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2004. s. 34.
10. Bláha M., Ungermann L., Bláha V., Solichová D., Andrýs C., **Blažek M.**, Cermanová M., Malý J. Laboratory indicators of endothelial dysfunction and carotid intima-media thickness - changes after the extra corporeal long-term lipid lowering immunotherapy. In *Laboratorní hematologie 2004.* 1. vyd. HK: HK Credit, 2004. s. 81.
11. Bláha M., Zadák Z., Bláha V., Malý J., Cermanová M., **Blažek M.**, Hyšpler R. LDL-apheresis - results of the long time treatment. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2003, 46, (2), s. 40.
12. Bláha M., Zadák Z., Bláha V., Malý J., Skořepová M., **Blažek M.**, Hyšpler R. The importance and mutual correlation between the indicators of atheromatosis activity after LDL-apheresis. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2002, 45, (2), s. 48.
13. **Blažek M.**, Bláha M., Malý J., Pecka M., Slováček L. Hemostáza a léčebná LDL-aferéza. In

Laboratorní hematologie 2004. 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2004. s. 22.

14. **Blažek M.**, Bláha M., Bláha V., Malý J., Cermanová M., Pecka M. Haemostasis and LDL-apheresis in hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis. 2005, 6, (Suppl. 1), s. 170.*
15. **Blažek M.**, Bláha M., Bláha V., Pták J., Malý J., Cermanová M., Slováček L., Pecka M. Long-term LDL-apheresis in familial hypercholesterolemia and changes of hemostasis. *Transfusion and Apheresis Science*, 2005, 33, (2), p. 241-242.
16. **Blažek M.**, Bláha M., Malý J., Pecka M., Cermanová M. LDL aferéza v léčbě familiární hypercholesterolemie a změny parametrů hemostázy. In *Trombóza a hemostáza 2005.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2005. s. 79.
17. **Blažek M.**, Bláha M., Malý J., Pecka M., Cermanová M. LDL aferéza v terapii familiární hypercholesterolemie a pilotní vyšetření primární hemostázy analyzátorem PFA-100. In *Trombóza a hemostáza 2005.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2005. s. 78.
18. **Blažek M.**, Malý J., Bláha M. LDL afereza v terapii familiární hypercholesterolemie a dynamika vybraných laboratorních parametrů. In *Trombóza a hemostáza 2003.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2003. s. 77.
19. **Blažek M.**, Slováček L., Malý J., Bláha M. LDL-aferéza v terapii familiární hypercholesterolémie a dynamika vybraných laboratorních parametrů. In *4. konference odborné Společnosti vojenských lékařů a farmaceutů ČLS JEP.* 1. vyd. Hradec Králové: VLA JEP, 2004. s. 22.
20. Cermanová M., Bláha M., Andrýs C., Bláha V., Krejsek J., **Blažek M.**, Malý J. Selektinové adhesivní molekuly v průběhu LDL-aferézy. In *Trombóza a hemostáza 2003.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2003. s. 108.
21. Cermanová M., Bláha M., **Blažek M.**, Bláha V., Mašín V., Malý J. Vedlejší účinky a komplikace extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu. In *XVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí.* 1. vyd. Olomouc: Rubico, 2004. s. 28-29.
22. Cermanová M., Bláha M., Mašín V., **Blažek M.**, Malý J. Zhodnocení vedlejších účinků a tolerability dlouhodobé léčby LDL- aferézou. In *Laboratorní hematologie 2004.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2004. s. 83.
23. Skořepová M., Bláha M., Andrýs C., Bláha V., Krejsek J., **Blažek M.**, Malý J. Selektinové adhesivní molekuly v průběhu LDL-aferézy. In *Trombóza a hemostáza 2003.* 1. vyd. Hradec Králové: HK Credit, 2003. s. 108.
24. Skořepová M., Bláha M., Malý J., Bláha V., Pecka M., Urbánková J., **Blažek M.** Lipoprotein levels and platelet aggregation with familial hypercholesterolemia after LDL-apheresis. In Berger, J. (ed.). *Cells IV.* 1. vyd. České Budějovice: Kopp, 2002. s. 97.

MUDr. Martin Blažek
II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie
Fakultní nemocnice Hradec Králové
Sokolská 408
500 05 Hradec Králové
martin_blazek@volny.cz