

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

**Klinické konsekvence extrakorporální eliminace
LDL-cholesterolu**

MUDr. Melanie Cermanová

Autoreferát disertační práce

Hradec Králové
2005

Práce byla podporována granty IGA MZ ČR NR/8505-3, NR/ 8497-3, NR/8062-3,
MSM 0021620820 a MZO 00179906.

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu v oboru vnitřní nemoci na Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze.

Uchazeč: MUDr. Melanie Cermanová
Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty
v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: Prof. MUDr. Milan Bláha, CSc.
Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty
v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti: Doc. MUDr. Martin Mistrík, Ph.D.
Klinika hematologie a transfuziologie LF Univerzity Komenského
a FNsP Bratislava

MUDr. Jan Pták, Ph.D.
Krevní centrum Fakultní nemocnice s poliklinikou v Ostravě

Autoreferát byl rozeslán dne 21. 3. 2006

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

v úterý dne 18. dubna 2006 od 10.00 hodin,

Onkologický pavilon FN v Hradci Králové
(budova č. 23, třetí podlaží, místnost č. 3.211.

Stanovisko k disertaci vypracovala Katedra interních oborů Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

S disertační prací je možné se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové.

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

SOUHRN

LDL-aféřez je metoda extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu, který je mimo jiné přímým aktivátorem zánětlivých procesů aterosogeneze. Práce je rozdělena do dvou částí.

1. CÍLEM PRVNÍ ČÁSTI PRÁCE bylo zhodnotit 1000 procedur LDL-aféřez metodou imunoadsorpce u 9 pacientů s těžkou formou familiárních poruch metabolismu lipidů, 5 mužů a 4 žen, medián věku 57 (19 - 61) let. Užívali jsme separátory krevních tělísek Cobe Spectra (COBE BCT, USA), adsorpčně-desorpční automat ADA nebo Adasorb (Medicap, Německo) a imunoadsorpční kolony LDL-Lipopak (Pocard, Rusko). Před každou LDL-aféřezou a těsně po ní byly stanovovány sérové hladiny lipidů a dalších parametrů. **Výsledky:** Medián celkové doby léčby LDL-aféřezami byl 6,7 (rozmezí 2,9 - 8,5) let, medián intervalu mezi procedurami byl 17 (4 - 294) dní, u homozygotů familiární hypercholesterolemie 14 dní. Medián trvání jedné procedury byl 3,8 (1,0 - 5,6) h. Medián množství zpracované plazmy byl 7000 ml, t.j. 99 (15 - 156) ml/kg váhy pacienta. Medián průtoku krve primárním přístrojem byl 70,0 (45,0 - 70,0) ml/min., průtoku plazmy 34,5 (20,3 - 38,2) ml/min. Medián poklesu celkového cholesterolu po LDL-aféřezě (v procentech preaféřetické hodnoty) byl 70%, LDL-cholesterolu 86%, Lp(a) 74%, HDL-cholesterolu 26%, triacylglyceridů 59%; hemoglobin i hematokrit klesl o 7%, trombocyty o 9%, viskozita plazmy o 15%. Bylo provedeno 49 (11-109) LDL-aféřez na jeden pár kolon. Medián doby užívání jednoho páru kolon byl 2,6 let. Regresní analýzou jsme neprokázali pokles efektivity ani selektivity imunoadsorpce v závislosti na počtu provedených výkonů. Nežádoucí účinky LDL-aféřez byly mírné a nezávažné a jednalo se o projevy citrátové toxicity a vazo-vagální příhody. Byl vyvinut systém na odsávání vzduchu z imunoadsorpčních kolon. **ZÁVĚR:** Naše modifikace LDL-aféřez na principu imunoadsorpce je účinná, selektivní a bezpečná. Kolony LDL-Lipopak jsou z dlouhodobého hlediska spolehlivým typem adsorbentů. Doporučením je nepřesahovat čtyři hodiny trvání LDL-aféřez.

2. VE DRUHÉ ČÁSTI PRÁCE byl hodnocen vliv dvou po sobě následujících LDL-aféřez na hladiny některých ukazatelů aktivity aterosogeneze.

a) Solubilní P- a E-selektin a monocytární chemotaktický protein-1 (MCP-1). **Výsledky:** U výše popsaného souboru byl po LDL-aféřezě zjištěn signifikantní reprodukovatelný pokles zvýšených hladin P-selektinu, ukazatele endotelální (a trombocytární) aktivity (medián poklesu: o 31% a 30%) a pokles normálních hladin MCP-1 (o 22% a 41%). Hladiny E-selektinu, specifického ukazatele aktivity endotelu, byly též v normě, ale nebyly LDL-aféřezou signifikantně ovlivněny. Na poklesu MCP-1 se podlela především jeho nespecifická vazba v koloně, prokázána poklesem hladin v plazmě vytékající z kolony oproti hladinám v plazmě do kolony přitékající. Adsorpce P- a E-selektinu kolonami prokázána nebyla. **Závěr:** poprvé v literatuře byl hodnocen vliv LDL-imunoadsorpce na hladiny těchto parametrů a posouzena jejich eliminace imunoadsorpčními kolonami.

b) Mikroalbuminurie a neopterin v moči: U souboru 10 nemocných s těžkou familiární dyslipidemií (6 mužů a 4 žen, medián věku 48 let, rozmezí 19 - 61 let), léčených LDL-imunoadsorpčí (n=8) nebo filtrační metodou (n=2) s užitím filtrů Evaflex 4A (Kuraray, Japonsko) byla mezi dvěma LDL-aféřezami sledována mikroalbuminurie, ukazatel mikrovaskulární dysfunkce, a neopterin v moči, ukazatel aktivity monocyto-makrofágového systému. **Výsledky:** Index neopterin/kreatinin v moči nemocných byl oproti kontrolnímu souboru zvýšen a večer po LDL-aféřezě signifikantně poklesl (p=0,006), velikost poklesu korelovala signifikantně negativně s preaféřetickou hladinou celkového a LDL-cholesterolu a s jejich poklesem po LDL-aféřezě. Ranní hodnoty močového neopterinu nebyly LDL-aféřezou signifikantně ovlivněny, stejně tak jako močové vylučování albuminu. Index albumin/kreatinin statisticky významně koreloval s hladinou celkového a LDL-cholesterolu a neopterinu večer po LDL-aféřezě. **Závěr:** Poprvé v literatuře byl hodnocen vliv LDL-

immunoadsorpce na močové vylučování neopterinu a albuminu. Pokles neopterinu v moči večer po aferéze je v souladu s diurnálním rytmem vylučování neopterinu a byl méně vyjádřen u nemocných s těžší hypercholesterolemií, u kterých je aktivita monocyto-makrofágového systému pravděpodobně obtížněji ovlivnitelná LDL-aferézou a/nebo jsou u těchto nemocných zátěže variace diurnálního rytmu vylučování neopterinu, pravděpodobně následkem zvýšené bazální monocytární aktivity pocházející z aterosklerotických plátů. Výsledky ukazují na spojitost mezi mikrovaskulárním postižením, aktivitou monocyto-makrofágového systému a tíží hypercholesterolemie.

c) C-reaktivní protein (CRP), sérový neopterin, endoglin a CD40 ligand (CD40L).

U tétoho souboru v jiné době byl po LDL-aferéze pozorován významný reprodukovatelný pokles normálních sérových hladin vysoce senzitivní metou stanoveného CRP (medián poklesu: o 34% a 40%), CD40L (o 40% a 38 %) a zvýšených hladin endoglinu (o 26% a 21%). Sérová koncentrace neopterinu byla v normě a nebyla LDL-aferézou ovlivněna. Nebyla prokázána eliminace těchto molekul kolonami ani filtry. Hladina CD40L korelovala s hladinami celkového ($r_s = 0,721$, $p = 0,016$) a LDL-cholesterolu ($r_s = 0,818$, $p = 0,002$). **Závěr:** Bylo provedeno originální sledování dynamiky CD40L (prostředníka vlivu T-lymfocytů na zánětlivé procesy) a endoglinu (ukazatele aktivity a postižení endotelu) u extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu, popsán vliv LDL-immunoadsorpce na hladiny sérového neopterinu a CRP a hodnocena eliminace těchto molekul kolonami a filtry.

ZÁVĚR K DRUHÉ ČÁSTI PRÁCE: Zvýšené hladiny některých výše uvedených parametrů ukazují na aktivitu aterogenetických dějů, neboť u nemocných nebyla prokázána jiná zánětlivá choroba. Pokles výše jmenovaných parametrů po LDL-aferéze je multifaktoriální, s podílem dílce oběhu nemocného, v některých případech významnou vazbou molekul v koloně a pravděpodobně jejich sníženou produkcí a/nebo zvýšenou eliminací v důsledku eliminace aterogenních činitelů, především LDL-cholesterolu. Nezávisle na příčině, redukce hladin těchto imunologicky aktivních molekul přispívá k příznivým účinkům LDL-aferézy na aterogenezi.

SUMMARY

LDL-apheresis is a method of extracorporeal elimination of LDL-cholesterol. LDL-cholesterol is known to activate inflammatory processes leading to atherosclerosis. The study was divided into two parts. **THE AIM OF THE FIRST PART** was to evaluate 1000 LDL-apheresis procedures based on immunoadsorption in 9 patients (median age was 57, range 19-61 years) with severe familial hyperlipidemia refractory to conventional treatment. Blood cells separators Cobe Spectra (COBE BCT, USA) were used to separate patients' plasma. Immunoadsorption was performed by means of ADA or Adasorb (Medicap, Germany) and columns LDL-Lipopak (Pocard Ltd., Russia). Before and immediately after the procedure, blood samples were taken and serum levels of lipoproteins and some other parameters were tested. **Results:** Median of the treatment duration was 6,7 (range 2,9 - 8,5) years, median interval between two apheresis procedures was 17 (4 - 294) days, in familial hypercholesterolemia homozygots 14 days. One procedure took 3,8 (1,0 - 5,6) hours. Median volume of processed plasma was 7000 ml, i.e. 99 (15 - 156) ml/kg of body weight. Median blood flow 70,0 (45,0 - 70,0) ml/min., median plasma flow was 34,5 (20,3 - 38,2) ml/min. Median total cholesterol decrease was 70 %, LDL-cholesterol 86%, Lp(a) 74%, HDL-cholesterol 26%, triacylglycerides 59%, both hemoglobin and hematocrite 7%, thrombocytes 9%, plasma viscosity 15% after one procedure. Median number of procedures performed per one pair of columns was 49 (11-109) and one pair of columns was used 2,6 years. The adverse events were mostly mild and represented by vaso-vagal events and manifestation of citrate related toxicity. The selectivity and efficiency of immunoadsorption did not change during the usage of columns. The new air removing system from columns was developed. **CONCLUSION:** Our modification of LDL-immunoadsorption is effective, selective and safe. According to our

experience, LDL-apheresis procedures should not take more than 4 hours. The quality of columns LDL-Lipopak is stable during the treatment.

IN THE SECOND PART OF THIS STUDY, the effect of two consecutive LDL-apheresis procedures on selected indicators of atherogenesis activity was tested.

a) Soluble P- and E-selectin and monocytic chemoattractant protein-1 (MCP-1) levels. Results: In the group of patients described above, a significant ($p < 0,05$) decrease of elevated serum P-selectin levels (median 31% a 30%), a marker of endothelial (and thrombocyte) activity, and of normal levels of MCP-1 (median 22% a 41%) were observed. Levels of E-selectin, a specific marker of endothelium activation, were not elevated and did not change after the LDL-apheresis. MCP-1 was adsorbed in columns. **Conclusion:** For the first time, the effect of LDL-immunoabsorption on P- and E-selectin and MCP-1 levels was described. Elimination of those molecules by columns was evaluated.

b) Urinary neopterin and microalbuminuria. In 10 patients with severe dyslipidemia (median age 48 years, range 19-61 years), treated with LDL-immunoabsorption ($n=8$) or plasma filtration ($n=2$) using filters Evaflux 4A (Kuraray, Japan), levels of urinary neopterin, a specific marker of macrophage activation, and microalbuminuria, an indicator of generalized vascular dysfunction, were investigated between two LDL-apheresis procedures. **Results:** No significant changes of the urinary neopterin levels and microalbuminuria were observed, except a significant ($p < 0.006$) decrease of urinary neopterin/creatinine ratio in the evening after the LDL-apheresis. This decrease showed significant negative correlation with the pre-apheretic levels of total and LDL-cholesterol and with their decrease after the apheresis ($p < 0.05$). Microalbuminuria correlated positively with total and LDL-cholesterol levels before the apheresis and with the evening urinary neopterin/creatinine ratio after the apheresis. **Conclusion:** A single LDL-apheresis procedure did not significantly affect microalbuminuria. The decrease of urinary neopterin in the evening after the apheresis corresponds with the diurnal rhythm of neopterin excretion and was less pronounced in patients with more severe hypercholesterolemia, probably because their macrophage activity was less influenced by LDL-apheresis, and possibly because of narrowing of circadian variation of neopterin excretion as a result of elevated basal neopterin production from atherosclerotic plaques. The correlations between microalbuminuria, neopterin and pre-apheretic cholesterol concentrations indicate a possible connection between microvascular dysfunction, macrophage activity and severity of hypercholesterolemia.

c) C-reactive protein (CRP), serum neopterin, CD40 ligand (CD40L) and soluble endoglin. Results: In the other study but in the identical group of patients, a significant decrease ($p < 0,05$) of normal levels of high-sensitivity CRP (median decrease 34% and 40%) CD40L, a mediator of T-lymphocyte effect on inflammatory process (40% and 38 %) and decrease of elevated levels of endoglin, a marker of endothelial activation and/or damage (26% and 21%) were observed after LDL-apheresis, in contrast to serum neopterin level, which was normal and did not change. CD40L level correlated with total ($r_s = 0,721$, $p = 0,016$) and LDL-cholesterol ($r_s = 0,818$, $p = 0,002$). **Conclusion:** Original observation of CD40L and endoglin levels in extracorporeal LDL-elimination was performed. Serum neopterin was for the first time evaluated in the case of LDL-immunoabsorption. Elimination of those molecules by columns and filters was tested.

CONCLUSION OF THE SECOND PART OF THE STUDY: Elevated levels of parameters described above reflect the presence of atherosclerosis, since other disorders, known to elevate these markers, were excluded. The decrease after LDL-apheresis was partly caused by hemodilution. MCP-1 was adsorbed in columns, elimination of other molecules was not proved. The possible role of the decreased production or increased degradation of these molecules was not quantified. Despite the cause, the decrease of these immunologically active molecules may contribute to the positive effect of LDL-apheresis on atherogenesis.

1. Úvod

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

U heterozygotních jedinců FH je základem léčby dieta, režimová opatření a medikamentózní terapie, která je účinná u více než 95% případů. U homozygotní formy FH se ischemická choroba srdeční (ICHS) vyskytuje již v dětství a často vede ke smrti do 20. roku života. Konzervativní léčba selhává a dlouhodobá pravidelná extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu je pro tyto pacienty život zachraňujícím postupem. Léčba FCH spočívá v dietních a režimových opatřeních a medikamentózní terapii. Extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu je nutná jen zřídka (Borberg, 1997, Goldstein, 2001, Rader, 2003).

1.1. Metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu užívané v současnosti

Název LDL-aféřza byl poprvé užit profesorem Borbergem jako pojmenování pro specifickou eliminaci LDL-cholesterolu na podkladě imunoadsorpce. V tomto smyslu je název stále užíván některými autory (Borberg, 1997, Bláha, 2003). V literatuře se však můžeme čím dál více setkávat s tímto názvem ve smyslu označujícím všechny více-méně selektivní extrakorporální metody odstraňující LDL-cholesterol (viz níže). Vzhledem k tomu, že selektivní metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu jsou v České republice v současnosti prováděny pouze na našem pracovišti, spektrum nemocných je velmi omezené a detaily této problematiky se týkají relativně úzkého okruhu odborníků, nemají některé metody a jejich modifikace zavedený český název.

Plazmaferéřza byla první metodou užitou k extrakorporální eliminaci cholesterolu. Její nevýhodou je neselektivita eliminace, a proto se stala východiskem pro vývoj selektivních metod, které jsou, až na výjimky, založeny na dalším zpracování předem oddělené plazmy. **Imunoadsorpce LDL-cholesterolu (IA, LDL-imunoadsorpce)** je nejstarší ze selektivních metod. Využívá interakci polyklonálních protilátek namířených proti antigenním strukturám apolipoproteinu B₁₀₀ (apoB₁₀₀) (Borberg, 1988). K dispozici jsou například kolony Therasorb firmy Baxter (Unterschleissheim, Německo) nebo LDL-Lipopak, Pocard Ltd. (Moskva, Rusko). **Adsorpce na dextranulfát (DSA, kolony Liposorber L, firma Kaneka, Osaka, Japonsko)** pracuje na principu elektrostatické interakce mezi kladným nábojem apoB₁₀₀ a záporným nábojem řetězců dextranulfátu. **Heparinem navozená extrakorporální precipitace LDL-cholesterolu (Heparin Induced Extracorporeal LDL Precipitation; HELP, firma B. Braun, Melsungen, Německo)** spočívá v elektrostatické interakci mezi heparinem a apoB₁₀₀ při sníženém pH, které zvyšuje počet kladných nábojů v molekule apoB₁₀₀ a usnadňuje precipitaci s heparinem. **Metody založené na filtraci částic z plazmy, nazývané u anglosaské literatuře souhrnně „secondary membrane plasma fractionation“**, odstraňují z plazmy vysokomolekulární proteiny pomocí zařazení sekundárního filtru. Selektivita filtrace závisí na fyzikálních vlastnostech použitého filtru, především na velikosti jeho pórů. Kromě LDL-částic jsou eliminovány i další makromolekuly, jako je fibrinogen, imunoglobuliny atd. Výsledkem je zlepšení rheologických vlastností krve, které lze využít také u různých poruch mikrocirkulace (Klingel, 2000, Siami, 2001). V případě užití primárního přístroje, který pracuje na principu filtrace, jsou modifikace této metody nazývány **dvojitá filtrační plazmaferéřza (double filtration plasmapheresis, DFPP), kaskádová filtrace, rheoferéřza, nebo membránová diferenciální filtrace (membrane differential filtration, MDF)** (Klingel, 2000). V případě užití primárního přístroje, který odděluje plazmu na principu centrifugace, je ve světové literatuře někdy užíván název „plasma fractionation“

(Siami, 2001). Přímá adsorpce lipoproteinů z plné krve (LDL-hemoperfuze) užívá nehemolytického adsorbentu, akrylátu vázaného na polyakrylamid, který umožňuje perfuzi kolony plnou krví, což zjednodušuje technické provedení. Příkladem je systém DALI (*Direct Adsorption of Lipids* firmy Fresenius, St. Wendel, Německo) (Bosch, 2000).

1.2. Účinky léčby LDL-aferezou

Některá data ukazují, že IA, DSA a HELP jsou metody srovnatelně účinné ve snižování LDL-cholesterolu s průměrnou redukcí o 62 %, 65 %, resp. 59 % při jedné proceduře (Richter, 1999). Podle jiné studie jsou IA a DSA stejně účinné a obě mírně účinnější než DALI – snižují LDL-cholesterol o 82 % resp. 84 % oproti 77 % u DALI (Schmaldienst, 2000). MDF redukuje LDL-cholesterol o 56-61% (Julius, 2002).

LDL-aféze vede k navození ustáleného stavu, charakterizovaného rovnováhou mezi syntézou a odstraňováním cholesterolu. Pravidelné procedury vedou ke zpomalení nebo zastavení progresu či dokonce k regresi aterosklerotických plátů a k redukcí počtu koronárních příhod a rizika smrti na ICHS (Borberg, 1997, Mabuchi, 1998, Matsuzaki, 2002).

1.3. Vedlejší účinky léčby LDL-aferezou

LDL-aféze patří mezi technicky nejsložitější a časově náročné hemaferetické procedury. LDL-afézu je třeba pravidelně a dlouhodobě (většinou celoživotně) opakovat. Proto četnost a tíže vedlejších účinků, vedoucích k předčasnému ukončení LDL-afézy nebo prodlužování intervalu mezi nimi ovlivňují ve svém důsledku i klinický efekt léčby.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky hemaferézy patří příznaky citrátové toxicity. Roztok citrátu je aplikován za účelem zajistit regionální antikoagulaci potřebnou k zamezení tvorby trombů v přístroji. Je přidáván ke krvi pacienta a po pasáži přístrojem se dostává do jeho oběhu. Přísun citrátu k nemocnému závisí na průtoku krve přístrojem a poměru přidávaného roztoku citrátu k pacientově krvi. Tvorbou komplexů s ionty kalcia působí citrát pokles ionizovaného kalcia v plazmě. V organismu je citrát rychle redistribuován a cestou cyklu trikarboxylových kyselin metabolizován na bikarbonát. Následkem odbourání citrátu se do krve opět uvolňuje ionizovaný kalcium, takže při běžném dávkování nedochází k významné systémové antikoagulaci (Simon 1997).

V průběhu hemaferézy dochází k individuálně variabilnímu poklesu krevního tlaku, který v závislosti na velikosti poklesu a vnímavosti pacienta může být zcela bez příznaků nebo vyvolat pocit nevolnosti a mdlob a nebo výjimečně vyústit v krátkodobé bezvědomí. Závažné, až život ohrožující jsou anafylaktoidní reakce, popsané především u dextransulfátových adsorbentů v souvislosti s medikací inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu (Agishi, 1994). Mezi další vedlejší účinky hemaferézy patří alergické a pyretické reakce, projevy přetížení tekutinami, vzduchová embolie, minerálové dysbalance, hemolýza, obtíže se zavedením žilních vstupů a jejich komplikace (Borberg, 1997).

1.4. Dynamika a vzájemné vztahy některých ukazatelů aktivity aterosogeneze u nemocných léčených LDL-aferezou

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

Při léčbě LDL-aferezou se nabízí ojedinělý experimentální model, který dovoluje studium patogenetických mechanismů aterosogeneze při různých hladinách LDL-cholesterolu u téhož jedince. To je možné díky bezpečnému a rychlému dosažení výrazného a relativně

selektivního poklesu LDL-cholesterolu, navíc s možností opakovat experiment za prakticky stejných podmínek opět po návratu hladin cholesterolu na obdobné hodnoty před následující LDL-aférezou. Tato modelová situace je zcela ojedinělá a nebyla navozena ani u experimentálních zvířat. Cílem tohoto výzkumu je zhodnotit vliv LDL-aférezы na některé ukazatele aktivity jednotlivých činitelů aterogeneze.

Intenzita léčby LDL-aférezou je řízena především podle hladin celkového a LDL-cholesterolu, které jsou sice v kauzálním vztahu k ateroskleróze, neodrážejí však plně aktivitu aterogenetických procesů. Zhodnocení účinků LDL-aférezы pomocí klinického sledování symptomů ischemie, mizení xantomů, sledování vyšetřování šíře aterosklerotických plátů ultrazvukem atd. je často nepřesné a vhodné k hodnocení efektu v dlouhodobém horizontu. V této práci bylo vybráno několik ukazatelů aktivity aterogeneze a zkoumán jejich vztah ke změnám hladin cholesterolu a dalších parametrů po LDL-aférezе. Dalším výzkumným záměrem, který bude na tuto práci navazovat, bude využít tyto výsledky k identifikaci potencionálních přesnějších a dostupnějších ukazatelů efektu léčby LDL-aférezou. Při výběru zkoumaných parametrů jsme vycházeli ze známých vztahů mezi hladinou aterogenních lipoproteinů, aktivitou jednotlivých buněčných populací, účastnících se aterogeneze, a ze současných znalostí o těchto činitelích.

1.4.1. Úloha cholesterolu v aterogenezi

Aterosklerotické léze vznikají jako tukové proužky osídlením subendoteliálních partií velkých arterií makrofágy, fagocytujícími LDL-cholesterol. Spouštěcím faktorem, vedoucím k akumulaci LDL-cholesterolu ve stěně cév, je jeho oxidativní modifikace. Nativní LDL-částice téměř neindukují in vitro změny související s aterosklerózou. Podstatou oxidativní modifikace je změna chemické struktury apolipoproteinu B, skýtající LDL-částici četné proinflamatorní, protrombotické a aterogenní vlastnosti. Příkladem je aktivizační vliv na mnohé monocytární funkce, od stimulace jejich chemotaxe, produkce cytokinů, adheze k endotelu, proliferace, schopnosti fagocytovat, až po indukci jejich apoptózy. Modifikované LDL-částice vedou k uvolnění tkáňového faktoru a stimulují agregaci destiček, vazbou na C-reaktivní protein (CRP) aktivují komplement. Tvorbou nových epitopů aktivují buněčnou i humorální imunitu. Naopak aktivované makrofágy přispívají k oxidativní modifikaci LDL-cholesterolu, který po té přednostně reaguje s tzv. „scavenger“ receptory makrofágů, formujícími pěnové buňky (Navab, 1996).

Lipoprotein (a) [Lp(a)] kromě apoB₁₀₀ obsahuje apolipoprotein (a), jehož domény jsou strukturálně homologní s plazminogenem. Lp(a) blokuje vazebná místa pro plazminogen na fibrinu a tím inhibuje fibrinolýzu. Efekt v současnosti dostupné hypolipidemické léčby na hladiny Lp(a) je omezený, extrakorporální eliminace je jediným dostupným prostředkem k účinnému snížení jeho koncentrací. Pokles Lp(a) při LDL-aférezе, kde je doprovodným efektem, je menší než při selektivní Lp(a)-aférezе, která užívá specifické protilátky proti Lp(a) (Baumbauer, 2005).

Přesto, že zvýšený cholesterol je spojen s aterosklerózou, která je nesporným zdravotním i společenským problémem, jde o molekulu s unikátními chemickými a fyzikálními vlastnostmi. Deficit cholesterolu a jeho prekurzorů u nemocných v kritickém stavu je závažnou poruchou, kterou je třeba včas diagnostikovat (Zadák, 2000).

HDL-cholesterol je zásadním činitelem pro reverzní transport cholesterolu ze tkání. Snížení hladiny HDL-cholesterolu pod 1 mmol/l je samostatným rizikovým faktorem aterosklerózy.

1.4.2. Ateroskleróza jako zánětlivý proces

Procesu aterogeneze se účastní četné buněčné populace. **Endotel** je nyní chápán jako orgán s mnoha dynamickými funkcemi. Zprostředkovává interakce mezi cirkulujícími elementy a stěnou cévy a spouští reakce na patogenní stimuly. Příkladem je exprese

adhezních molekul pro leukocyty, která je významným krokem v časně fázi aterosogeneze. Změny ve funkci endotelu vlivem zvýšené hladiny cholesterolu jsou patrné ještě před vývojem zjevného aterosklerotického plátu a jsou podobné fyziologické odpovědi endotelu na trauma či zánět. Endoteliální dysfunkce je jednou z prvních změn, nastávajících při aterosogenezi, a je doprovázena zvýšenou permeabilitou endoteliálních buněk, ztrátou jejich antikoagulační a antiagregační aktivity a mimo jiné i zvýšenou adhezí monocytů k endotelu následkem zvýšené exprese adhezních molekul. Zánětlivé buňky, zahrnující **monocyty**, **makrofágy** a **lymfocyty** hrají zásadní roli v procesu aterosogeneze. Cirkulující **monocyty** jsou přitahovány do míst s poškozeným endotelem pomocí chemokinů, například monocytárního chemotaktického proteinu-1 (MCP-1). Po vstupu do stěny cév, který je zprostředkován adhezními molekulami, dochází k přeměně monocytů na makrofágy, které spolu s hladkými svalovými buňkami fagocytují lipidové částice a mění se na pěnové buňky, které následně podléhají apoptóze. Pokročilý aterosklerotický plát je tvořen nekrotickým, vysoce trombogenním jádrem, obsahujícím lipidové hmoty, pěnové buňky a jejich zbytky. Nestabilní pláty jsou bohatší na makrofágy ve svém jádru (Moreno, 1994). Stabilita fibrózního povrchu plátu je dána rovnováhou mezi syntézou extracelulární matrix a její degradací, obojí je ovlivněno zánětlivými stimuly. Makrofágy produkují pod vlivem cytokinů matrixové metaloproteinázy, kolagen degradující enzymy, které odbourávají složky extracelulární matrix a tím přispívají k oslabení fibrózního povrchu plátu. Produkci oxidantů uvnitř plátu se podléhá na vzniku oxidativní modifikace LDL-částic. Prezentací antigenů T-lymfocytům vedou k aktivaci těchto buněk a k další produkci cytokinů, které zánětlivou reakci dále amplifikují. U nemocných s aterosklerózou byly zjištěny zvýšené hladiny reaktantů akutní fáze, jako jsou CRP, interleukin-6, prokalcitonin, fibrinogen a neopterin. Hladiny těchto ukazatelů zánětu mohou reflektovat celkové aterosklerotické postižení daného jedince (Erren, 1999).

T-lymfocyty hrají řídicí roli v procesu aterosogeneze. Jsou významným zdrojem mnoha proinflamatorních mediátorů s mnohočetnými účinky na ostatní účastníky aterosogeneze (Libby, 2002). Adheze **trombocytů** a tvorba murálního trombu hraje významnou roli při formaci aterosklerotického plátu i jeho ruptuře. Trombocyty adherují k dysfunkčnímu endotelu, odhalenému kolagenu a uvolňují cytokiny, růstové faktory a další mediátory zánětu. Jsou zdrojem kyseliny arachidonové, jejíž přeměnou vzniká jednak tromboxan A₂, který je jedním z nejsilnějších vazokonstrikčních a proagregačních činitelů, jednak leukotrieny, amplifikující zánětlivou reakci.

Iniciální podnět, který spustí v případě aterosklerózy zánětlivou odpověď, ještě nebyl zcela přesně objasněn, i když je diskutováno několik faktorů, jako například oxidativně modifikované LDL-částice, hyperhomocysteinemie, infekční agens a autoimunitní pochody.

Selektivové adhezní molekuly

LDL-cholesterol vede mimo jiné ke zvýšené expresi endoteliálních adhezních molekul (Scalia, 1998). První kontakt leukocytů s povrchem endotelu zajišťují selektiny. V další fázi postupně dochází k pevné adhezí leukocytů k endotelu a následně migraci leukocytů do stěny cévy. Solubilní formy selektinů jsou považovány za ukazatele zánětlivé aktivace endotelu (Giddings, 2005).

P-selektin (CD62P) je zásadní molekulou, umožňující zachycení leukocytu na aktivovaném endotelu. P-selektin je produkován a skladován v alfa granulích destiček a ve Wiebel-Paladeho tělískách endoteliálních buněk a je exprimován na jejich membráně jejich po aktivaci. Kinetika membránového P-selektinu je velmi rychlá, během minut je přesunut z intracelulárních zásob do povrchové membrány trombocytů a endotelu, odkud je rychle uvolňován do plazmy, kde plní další funkce. Z membrány opět rychle vymizí (Mc Ever, 1995). Zatím nebyl přesně popsán počet solubilních forem selektinů. Exprese P-selektinu je ukazatelem endoteliální a/nebo trombocytární aktivace (Somers, 2000). Korelace mezi expresí

P-selektinu na destičkách a hladinou jeho solubilní formy (sP-selektin) v plazmě pacientů s bolestmi na hrudi nebyla nalezena (Gurbel, 2000). Množství cirkulujícího sP-selektinu, který je uvolněn z membrán endotelu a trombocytů, odráží rozsah zánětlivého poškození. Ukázkou je myší model aterosklerózy, kde byla prokázána zvýšená hladina sP-selektinu a větší množství cirkulujících molekul sP-selektinu byla endoteliálního původu (Burger, 2003).

Ačkoli je P-selektin již dlouho považován za klíčovou molekulu zajišťující migraci leukocytů do míst zánětu, až v posledních letech je zdůrazňována jeho významná role v procesech trombózy a hemostázy (Cambien, 2004). Nedávno bylo publikováno, že nově uvolněný von Willebrandův faktor je zakotven na povrchu endotelu pomocí P-selektinu (Padilla, 2004). Vlivem P-selektinu se aktivované cirkulující trombocyty sdružují s monocyty a společně „rolují“ po endotelu. Destičkový i solubilní P-selektin hrají významnou úlohu při vzniku a progresi aterosklerotických lézí. P-selektin vede k formaci prokoagulačních trombocyto-leukocytárních mikroagregátů, obsahujících tkáňový faktor, a indukuje expresi tkáňového faktoru na monocytech, účastní se destičkové adheze a agregace. Podporuje také stabilizaci destičkových trombů a depozici fibrinu do trombu (Myers, 2003).

Příkladem chorob, doprovázených zvýšenou hladinou P-selektinu, jsou kromě trombotických konzumpčních stavů a zánětlivých procesů také choroby asociované s arteriální trombózou. Zvýšená hladina byla nalezena u infarktu myokardu, nestabilní anginy pectoris, infekční endokarditidy, ischemických cévních mozkových příhod a ischemické choroby dolních končetin. Hladina solubilního P-selektinu odrážela rozsah koronárního poškození (Hajilooi, 2004). Některými autory je P-selektin považován za ukazatel destabilizace aterosklerotického plátu (Draz, 2003). V nepřítomnosti zranění nebo zánětlivého onemocnění může vysoká hladina P-selektinu sloužit jako ukazatel rizika kardiovaskulárních příhod a jejich komplikací (Ridker, 2001).

E-selektin (CD62E), známý též jako **ELAM-1** (endotelial leukocyte adhesion molecule-1) je solubilní adhezivní molekula, zodpovědná za tzv. „pomalý *rolling*“ leukocytů. E-selektin je produkován pouze endotelem a kromě solubilní formy v plazmě (sE-selektin) se vyskytuje pouze na endoteliálním povrchu. Detekce sE-selektinu je proto považována za specifickou známku aktivace endotelu. E-selektin je exprimován na membráně endotelu v řádu hodin po stimulu. Není uvolňován z intracelulárních zásob, ale syntetizován de novo (Somers, 2000).

Monocytární chemotaktický protein-1 (MCP-1) patří mezi chemokiny, proteiny, které řídí migraci leukocytů do tkání s probíhajícím zánětem. Poskytuje signál, který změní nízkoafinitivní „*rolling*“ leukocytů, mediovány selektiny, v pevnou adhezi na endotel, zprostředkovanou integriny, a následovanou migrací leukocytů z lumina cévy. Chemokiny jsou produkovány mnoha buněčnými populacemi. Hlavními stimuly k jejich produkci jsou prozánětlivé cytokiny a virové a bakteriální produkty. V případě aterosklerózy nejsou chemotaktické signály, působící akumulaci leukocytů v aterosklerotických plátech zcela objasněny, ale právě MCP-1 byl zvýšeně detekován v aterosklerotických lézích (Nelken, 1991) a je mu připisována role při akumulaci makrofágů a oxidovaných forem LDL-cholesterolu v aterosklerotických plátech. MCP-1 přímo stimuluje také proliferaci a migraci buněk hladkého svalu. Předpokládá se, že MCP-1 ovlivňuje počet monocytů aťahovaných do stěny cévy a je v literatuře považován za možný další ukazatel nestability aterosklerotického plátu (Tanaka, 2004). Koncentrace solubilního MCP-1 (sMCP-1) narůstá s věkem a tento vzestup může být spojen s progresí aterosklerotických lézí. Elevace hladin MCP-1 je spojena se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem a spolu s tkáňovým faktorem byla nalezena u akutních koronárních syndromů. Absence MCP-1 vedla naopak k prologované zánětlivé fázi hojení infarktu myokardu a opožděnému nahrazení poškozených kardiomyocytů granulační tkání (Frangogiannis, 2004, Dewald, 2005). Rolí makrofágů v aterogenezi a význam MCP-1 při jejich migraci shrnul ve své přehledné práci Boyle (Boyle, 2005).

Neopterin je metabolitem guanosin-triphosfátu, produkovaného makrofágy po stimulaci $\text{INF-}\gamma$. Měření neopterinu v tělních tekutinách umožňuje zhodnotit aktivitu makrofágů a odráží míru oxidativního stresu, působeného těmito buňkami. Neopterin může být užít k monitorování nemocných s chorobami, u kterých dochází k imunitní aktivaci, jako jsou nádorová onemocnění, syndrom získaného imunodeficitu (AIDS), autoimunitní choroby a rejekce transplantátu. Jeho zvýšení bylo pozorováno v cirkulaci nemocných s aterosklerózou karotid, koronárních tepen a tepen dolních končetin. Cirkulující i močový neopterin byly zvýšeny u nemocných s akutními koronárními syndromy. Koncentrace neopterinu korelovaly s rozsahem angiograficky určeného aterosklerotického postižení, stupněm myokardiální ischemie (Gurfinkel, 1999) a u žen s počtem komplexních stenóz (Garcia-Moll, 2000). Bazální hladiny sérového neopterinu byly vyšší u žen s chronickou stabilní anginou pectoris, u kterých došlo během sledování ke koronární příhodě, než u žen bez koronární příhody. Jejich hladiny byly dokonce podobné hladinám pacientek s nestabilní anginou pectoris (Garcia-Moll, 2000). Analogické výsledky byly nalezeny u nemocných s arteriální hypertenzí a negativní anamnézou koronární příhody, u kterých se v průběhu sledování objevila koronární příhoda (Avanzas, 2004), dále u nemocných, kteří prodělali non-Q infarkt myokardu (van Haelst, 2003) a u starší populace, kde zvýšené plazmatické hladiny neopterinu predikovaly kardiovaskulární příhody (Forsblad, 2002). Předpokládá se, že u stabilních aterosklerotických lézí odráží hladina neopterinu celkové množství makrofágů, které je proporcionální objemu stabilních plátů, a bazální produkce neopterinu odpovídá bazální aktivitě makrofágů (Tanaka, 2004). Zvýšení neopterinu bylo nezávislé na séropozitivitě protilátek proti *Chlamydia pneumoniae*, která bývá spojována se zánětlivými změnami u aterosklerózy (Smith, 2003). Tato pozorování ukazují, že neopterin, indikátor aktivace monocyto-makrofágového systému, může ukazovat rozsah a stabilitu aterosklerotických plátů a predikovat vznik kardiovaskulární příhody. Močové vylučování neopterinu podléhá diurnálnímu rytmu s maximem v pozdních nočních a brzkých ranních hodinách (Auzeby, 1988).

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

Mikroalbuminurie může být stanovena pomocí výpočtu indexu albumin/kreatinin z hodnot získaných z jednorázového vzorku moči. Je definována jako index albumin/kreatinin 2,5-30 mg/mmol u mužů a 3,5-30 mg/mmol u žen. Prevalence mikroalbuminurie v obecné evropské populaci je 5-7%. Podle nových pozorování se mikroalbuminurie ukazuje jako silný nezávislý prediktor ICHS dokonce i v případě, že hladiny albuminu v moči ještě nespĺňují výše zmíněné normy pro mikroalbuminurii. Proto byla za účelem hodnocení individuálního kardiovaskulárního rizika jako dolní mez indexu albumin/kreatinin doporučena hodnota 0,7 mg/mmol (Kalusen, 2004).

Okolnosti, které byly pozorovány v souvislosti mikroalbuminurii, jsou často buď přímo identické s rizikovými faktory aterosklerózy, nebo se jedná o stavy, které se vyvinuly

v důsledku atherogenních dějů. Nejsilnějšími determinanty mikroalbuminurie jsou arteriální hypertenze a non-insulin dependentní diabetes mellitus. Asociace mikroalbuminurie s hypercholesterolemií byla nalezena v některých studiích (Shankar, 2004), jiní autoři souvislost nenalezli (Zouvanis, 1995). Mikroalbuminurie byla spojena též s poklesem HDL a zvýšením hladin Lp(a). Zdá se, že hyperlipidemie může ovlivňovat renální funkce a naopak. Byl pozorován ústup mikroalbuminurie při léčbě hypercholesterolemie atorvastatinem u nemocných s normální glukózovou tolerancí (Sinzinger 2003) a u tří nemocných v průběhu dlouhodobé léčby familiární hypercholesterolemie dextranulfátovou adsorpcí (Sinzinger, 1999). Jiným důkazem je úspěšná léčba masivní proteinurie po transplantaci ledvin LDL-aférezou (Yanagisawa, 1996). Mikroalbuminurie byla asociována také se zvýšenou hladinou CRP, interleukinu-6, sE-selektinu, se zvýšením celkového počtu leukocytů, hladiny fibrinogenu, trombin-antitrombinových komplexů, trombomodulinu, von Willebrandova faktoru a s porušenou fibrinolytickou aktivitou, zvláště u diabetických pacientů. Strukturální alterace glomerulární membrány může být také dána geneticky a mikroalbuminurie může potom být ukazatelem zvýšené individuální náchylnosti k atherogenním inzultům. Souhrnem lze říci, že řada vlivů poškozujících glomerulární membránu je společná s faktory, které se podílejí se na atherogenezi. Mikroalbuminurie tak může být spojena s protrombotickým a/nebo chronickým zánětlivým stavem, asociovaným se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních chorob.

C-reaktivní protein (CRP) je protein akutní fáze produkovaný játry pod vlivem prozánětlivých cytokinů, především interleukinu-6, který je uvolňován makrofágy v místě zánětu. Zvýšení CRP provází četné stavy charakterizované infekčním či neinfekčním zánětem, včetně reakcí na různé poškození tkání, sterilní zánětlivé procesy u autoimunitních chorob a malignit. Fyziologickou funkcí CRP je opsonizace mikrobů a aktivace komplementového systému po navázání na patogen. CRP stimuluje endoteliální buňky k expresi leukocytárních adhezních molekul. CRP má chemotaktický vliv na monocyty. Stejně tak jako LDL-cholesterol, i CRP se ukládá ve stěně arterií během atherogeneze, dokonce jeho přítomnost předchází vstup monocytů do časných aterosklerotických lézí (Torzewski, 2000). In vitro bylo prokázáno, že CRP opsonizuje nativní LDL-částice, které bez opsonizace nejsou fagocytovány, a tím umožňuje jejich pohlcení makrofágy (Zwaka, 2001).

CRP může být užít jako indikátor kardiovaskulárního rizika. Koncentrace CRP, hodnocené za tímto účelem, jsou podstatně menší, než koncentrace vyskytující se u akutních infekcí, dokonce jsou pod hranici detekce konvenčních laboratorních metod. Pro tento účel byly vyvinuty citlivější metody, které dovolují stanovit CRP od 0,1 mg/l. Takto stanovený CRP se nazývá „high sensitivity CRP“ (hsCRP). Ke zhodnocení kardiovaskulárního rizika podle hladiny hsCRP byly doporučeny tři kategorie: nízké riziko – hsCRP < 1,0 mg/l, střední riziko – hsCRP je v rozmezí 1,0- 3,0 mg/l a vysoké riziko – hsCRP > 3,0 mg/l (Myers, 2004).

Ve studii Physicians Health Study bylo u mužů v kvartilu s nejvyššími hodnotami CRP riziko vzniku infarktu myokardu 2,9-krát vyšší než u mužů s nejnižšími koncentracemi (Ridker, 1998 A). U žen, sledovaných ve studii Woman's Health study, bylo toto riziko dokonce 4,4-krát větší. CRP bylo v této studii nejpřesnějším ukazatelem kardiovaskulárního rizika ze všech sledovaných veličin, včetně lipidových parametrů, homocysteinu atd. (Albert, 2002). CRP korelovalo s rozsahem aterosklerotického postižení stanoveným pomocí koronarografie nebo ultrasonografií tepen (Tataru, 2000). Zvýšená koncentrace CRP je též rizikovým faktorem pro rozvoj ischemické choroby dolních končetin (Ridker, 1998 B). Již před 20 lety byla nalezena vyšší hladina CRP u transmuralního infarktu myokardu ve srovnání s infarktem netrasmuralním. Koncentrace CRP je zvýšena i u nestabilní anginy pectoris. Maximální hodnoty CRP v akutní fázi infarktu myokardu korelovaly s jeho rozsahem a vyšším výskytem jeho komplikací. U obězních žen korelovaly hladiny CRP

s mikroalbuminurií, která je považována za ukazatele endoteliální dysfunkce u diabetiků i nediabetiků (Pannacciulli, 2001).

CD40 ligand (CD40L, CD154) je exprimován především na aktivovaných CD4+ T-lymfocytech, ale i na dalších buněčných populacích včetně endotelí a makrofágů, mimo jiné i v aterosklerotických lézích. CD40L fyziologicky moduluje T-buněčné efektorové funkce a imunitní obranné reakce. Interakce mezi CD40 a jeho ligandem spouští tvorbu prozánětlivých mediátorů, jako jsou cytokiny, adhezni molekuly, matrix odbourávající enzymy a tkáňový faktor (Schonbeck, 2000). Solubilní CD40L se zvyšuje u akutních koronárních příhod. U nemocných s nestabilní anginou pectoris je zvýšení sCD40L ukazatelem zvýšeného rizika koronární příhody (Yan, 2004). Oxidované formy LDL mohou podporovat expresi CD40 a CD40L v aterosklerotickém plátu, která byla spolu s hladinou LDL-cholesterolu snížena léčbou statiny (Schonbeck, 2002). Zvýšené hladiny sCD40L byly nalezeny u nemocných s familiární hypercholesterolemií a léčba statiny vedla k jejich snížení (Semb, 2003). Redukace hladiny cholesterolu v krvi mělo za následek snížení hladin CD40 i CD40L, aktivity matrixových metaloproteináz, hladiny tkáňového faktoru a zvýšení obsahu kolagenu v aterosklerotickém plátu. Hladina sCD40L byla příznivě ovlivněna i glitazony, inhibitory glykoproteinu IIb/IIIa a clopidogrelem (Marx, 2003, Vishnevetsky, 2004).

Sledování hladiny CD40L lze získat informaci o imunitních a zánětlivých dějích v aterosklerotických plátech a o jejich stabilitě. Podle našich znalostí nebyly změny hladin CD40L během LDL-afézy v literatuře popsány.

Endoglin je glykoprotein, který je součástí receptoru pro *transforming growth factor beta* (TGFB). Je konstitutivně exprimován ve velkém množství na povrchu endoteliálních buněk. Dále byl nalezen na povrchu řady buněčných populací včetně aktivovaných monocytů, hladkých svalových buněk a fibroblastů. Výrazně zvýšená exprese endoglinu byla pozorována při aktivaci endoteliálních buněk, například iradiací nebo při aktivní angiogenezi - - v regenerujících tkáních nebo v tkáních s probíhajícím zánětem a u tumorů. Tato pozorování vedla k předpokladu, že endoglin může vystupovat jako ukazatel aktivace nebo poškození a reparace endotelu (Li, 2000). Rozvinuté aterosklerotické léze obsahují obvykle i novotvořené cévní zásobení. Solubilní endoglin a zároveň i von Willebrandův faktor byly zvýšeny v séru nemocných s aterosklerózou a korelovaly s celkovým cholesterolem (Blann, 1996). Dynamika hladin endoglinu u nemocných léčených LDL-aférou nebyla zatím v literatuře popsána.

2. VLASTNÍ PRÁCE

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

2.1. Cíle práce

I. Vyhodnotit některé technické parametry, účinnost a bezpečnost LDL-aférez

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

II. Posoudit vliv LDL-aférez na dynamiku hladin a vzájemné vztahy některých ukazatelů aktivity aterogeneze

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

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

2.2. Soubor nemocných a kontrolní soubory, materiál a metody

Soubor nemocných dlouhodobě léčených LDL-imunoadsorpcí tvořilo 9 pacientů, 5 mužů a 4 ženy s průměrným věkem 48 ± 16 let, rozmezí 19 – 61 let, medián 57 let. Jejich klinická data jsou uvedena v *Tabulce 1*. Dvě pacientky (homozygoti FH, označené čísla 5 a 8) měly v úvodu léčby šlachové xantomy, které během léčby vymizely, dva jiní pacienti měli xantelasmata očních víček. Osm nemocných bylo léčeno statiny, jeden v kombinaci s fibrátem, dva pacienti v kombinaci s pryskyřicemi vázícími žlučové kyseliny, jeden nemocný byl léčen pouze fibrátem. Všichni nemocní byli nekuřáci. Jeden muž s nízkou úrovní spolupráce (číslo 9) podstupoval procedury v delších a nepravidelných časových intervalech, proto byl z některých hodnocení vyloučen.

Tabulka 1. Klinická charakteristika nemocných léčených LDL-imunoadsorpcí

Pacient číslo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pohlaví	M	M	M	M	F	F	F	F	M
Věk (v letech)	61	56	61	38	19	58	60	26	57
Zvýšení TAG	0	++	0	+	0	±	0	0	++
BMI	22,8	29,8	31,1	28,4	23,4	32,0	18,3	19,3	32,4
Arteriální hypertenze	0	+	0	0	0	0	+	0	+
Diabetes mellitus	0	+	0	0	0	0	0	0	+
ICHS	0	+	0	+	0	+	0	0	0
Ischemická CMP	0	0	+	0	0	0	0	0	0
ICHDK	0	0	+	0	0	0	+	0	0
Ateroskleróza	+	+	+	+	+	+	+	+	+

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

Soubor nemocných dlouhodobě léčených LDL-imunoadsorpcí nebo filtrační metodou

Rozsah souboru nemocných léčených LDL-imunoadsorpcí je dán nízkou četností homozygotních forem FH v populaci a finanční nákladností této léčby. Po zavedení další metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu, založené na filtraci, jsme rozšířili tuto studii i o nemocné, léčené touto metodou. Nemocní byli vyšetřováni až po dosažení stabilizovaného stavu metabolismu lipidů opakovanými procedurami. Tento rozšířený soubor tvořilo **10 pacientů, 6 mužů a 4 ženy** s průměrným věkem 44 ± 17 let (19 - 61), **medián 48 let**. Osm z nich bylo léčeno metodou imunoadsorpce (nemocní 1 – 8 v *Tabulce 1*), zbylí dva muži s těžkou heterozygotní formou FH (věk 23 a 40 let, BMI 23,7 a 27,0, oba bez elevace triacylglyceridů a s prokázaným aterosklerotickým postižením karotid, nekufáci) byli léčeni pomocí filtrační metody. Kromě stavů, uvedených v *Tabulce 1*, nemocní netrpěli jinými chorobami. Všichni nemocní byli léčeni statiny, jeden v kombinaci s fibrátem, dva nemocní v kombinaci s pryskyřicemi vázícími žlučové kyseliny.

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

Kontrolní soubory tvořilo 10 zdravých jedinců (6 mužů a 4 ženy), v případě kapitoly *Močový neopterin a mikroalbuminurie* 13 zdravých jedinců (7 mužů a 6 žen), vždy bez známé poruchy lipidového metabolismu. Kontrolní soubory se statisticky významně nelišily věkem ani zastoupením pohlaví od příslušného souboru nemocných. Z výše uvedených důvodů je v každé kapitole hodnocen vlastní kontrolní soubor. **Význam srovnání vyšetřovaného souboru s kontrolním souborem je vzhledem k jejich rozsahu omezen a je pouze ilustrativní.**

Materiál a metody

Tato práce je věnována LDL-aféze v užším smyslu slova, tedy imunoadsorpci LDL-cholesterolu, ke které se bude (až na některé výjimky) vztahovat další text. Pracovní postupy užívané při LDL-imunoadsorpci se mezi jednotlivými pracovišti liší a každé centrum má zavedenu „**vlastní modifikaci LDL-afézy**“. Rozdíly spočívají v mnoha technických odlišnostech, jako jsou různé průtoky krve a plazmy přístroji, množství zpracované plazmy a z toho plynoucí i různá celková délka procedur, množství zpracované plazmy kolonami při jednotlivých adsorpčních cyklech, které jsou v našem případě řízeny originálním počítačovým programem, dále různé intervaly mezi jednotlivými LDL-aférezami, způsob promývání kolon regeneračními roztoky při desorpci, způsob aplikace a dávkování antikoagulační, různé

přístrojové vybavení a užití různých typů imunoadsorpčních kolon na jednotlivých pracovištích. Naším výzkumným týmem bylo vyvinuto a je stále užíváno originální zařízení k odvádění vzduchu z kolon, které bylo patentováno jako vynález (viz níže).

Imunoadsorpce LDL-cholesterolu

Plazma byla oddělena od krevních tělísek pomocí separátoru s kontinuálním průtokem Cobe Spectra (COBE BCT inc., Denver, CO, USA), pracujícím na principu centrifugace, a dále vedena do adsorpčně - desorpčního automatu ADA nebo ADA-sorb (Medicap, GmbH, Ulrichstein, Německo), který řídí střídavé plnění (adsorpci) a regeneraci (desorpci) dvou imunoadsorpčních kolon LDL-Lipopak (Pocard Ltd., Moskva, Rusko) – viz **Obrázek 1**. Kolony obsahují na sefárovový gel navázané polyklonální ovčí protilátky proti lidskému apoB₁₀₀. Při průchodu kolonou jsou z plazmy odstraňovány LDL-částice a zpracovaná plazma se po spojení s krevními tělísky vrací zpět do oběhu pacienta. Když je kapacita kolony vyčerpána, adsorpčně-desorpční automat odkloní tok plazmy do druhé kolony a zároveň zahájí regeneraci první kolony roztokem obsahujícím glycinový pufr o pH 2,4, který uvolňuje vazbu mezi protilátkami a apoB₁₀₀. Následně je pH v koloně upraveno roztokem PBS pufru (Medicap, GmbH, Ulrichstein, Německo), který je po té odstraněn fyziologickým roztokem. Kolony se mohou v práci neomezeně střídát. Cílová hodnota celkového cholesterolu byla pod 2 mmol/l. Každý nemocný měl svůj vlastní pár kolon, určených k mnohonásobnému použití. Mezi jednotlivými LDL-aferezami byly regenerované kolony skladovány při teplotě 2-8°C, naplněny roztokem pufru s příměsí azidu sodného, který byl před dalším užitím zcela odstraněn fyziologickým roztokem. Vzhledem k toxicitě azidu sodného byly manipulace s jeho roztokem prováděny striktně v nepřítomnosti nemocných.

Užívali jsme dva periferní venózní vstupy. K antikoagulaci byl použit heparin, v úvodu formou jednorázové dávky 2500 j. i.v. a následně kontinuální intravenózní infuzí 50 j./min. s postupným snižováním dávky od poloviny LDL-aferezy až následným vysazením heparinu) a roztok citrátu ACD-A (Baxter S.A., Lassines, Belgie), kontinuálně přidávaný v poměru 1:22 ke krvi z přívodné žíly.

Filtrační metoda

Plazma byla od krevních tělísek oddělena stejně jako u imunoadsorpce. Vlastní eliminace LDL-částic byla provedena na principu filtrace částic pomocí filtrů Evaflux 4A (Kuraray Co., Osaka, Japonsko), určených k jednorázovému použití. Filtrační membrány byly vyrobeny z kopolymeru ethylen a vinylalkoholu a uspořádány do formy kapilár s póry o průměru 0,03 µm. Schéma celého zařízení, užívaného při filtraci, je znázorněno na **Obrázku 2**. Filtrace byla řízena přístrojem CF 100 (Infomed, Ženeva, Švýcarsko). Cílová hodnota celkového cholesterolu byla stejná jako u imunoadsorpce. Antikoagulace byla zajištěna kontinuálním podáním roztoku citrátu (ACD-A v poměru 1:22 ke krvi z přívodné žíly stejným způsobem jako u imunoadsorpce) a dále úvodním jednorázovým intravenózním podáním 4000 j. heparinu bez následné kontinuální infuze.

Klinické sledování nemocných během LDL-aferezy

Během LDL-aferezy byl sledován klinický stav nemocných včetně měření arteriálního krevního tlaku měřeného auskultační metodou. Tyto údaje, dále nežádoucí účinky LDL-aferezy a jejich léčba byly zaznamenávány do Protokolu o LDL-afereze.

Hodnocení eliminace vyšetřovaných substancí kolonami nebo filtry

Byly stanoveny hladiny parametrů vyšetřovaných ve II. části práce v plazmě přitékající do kolony a v plazmě z kolony vytékající, a to v první polovině prvního adsorpčního cyklu každé kolony (silné tmavší šipky na **Obrázku 1**), u filtrační metody byly stanoveny hladiny před a za filtrem (silné šipky na **Obrázku 2**). V případě selektinů a MCP-1

byly jedenkrát vyšetřeny obě kolony u devíti nemocných (celkem 18 kolon). V případě CRP, CD40L, sérového neopterinu a endoglinu byly jedenkrát vyšetřeny obě kolony u 8 nemocných (celkově 16 kolon) a 4 filtry Evaflux 4A.

Koncentrace selektinů a MCP-1 byly stanoveny také ve vymývacím roztoku uprostřed regeneračního cyklu u 18 imunoadsorpčních kolon.

Laboratorní vyšetření

Před každou LDL-aférezou a ihned po ní bylo provedeno vyšetření sérových hladin celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu, HDL-cholesterolu a triacylglyceridů. Od roku 2000 jsme pravidelně v intervalu tří měsíců mimo jiné vyšetřovali sérový Lp(a), sérové hladiny transamináz, celkovou bílkovinu, albumin, krevní obraz a viskozitu plazmy. Vzorky byly zpracovány týž den.

Vzorky k vyšetření P- a E-selektinu a MCP-1, hsCRP, sCD40L, solubilního endoglinu a sérového neopterinu byly odebrány před a ihned po příslušné LDL-aféze, neprodleně zamrazeny a skladovány při teplotě -40°C . Parametry hodnocené v různých kapitolách byly odebrány v různou dobu a proto jsou hodnoceny zvlášť. K analýze byla užitá metoda ELISA.

Vzorky moči k vyšetření neopterinu a mikroalbuminurie byly chráněny před světlem, neprodleně zamrazeny a uchovávány při teplotě -20°C . Neopterin v moči byl analyzován vysoce účinnou kapalinovou chromatografií pomocí jeho nativní fluorescence. Koncentrace neopterinu byla vyjádřena jako index neopterin/kreatinin ($\mu\text{mol/mol}$). Kreatinin v moči byl stanoven v tom samém vzorku moči Jaffého kinetickou reakcí. Albumin v moči byl stanoven imunochemickou metodou. Mikroalbuminurie byla vyjádřena jako index albumin/kreatinin (mg/mmol). Vyšetření byla provedena akreditovanými laboratořemi Fakultní nemocnice Hradec Králové.

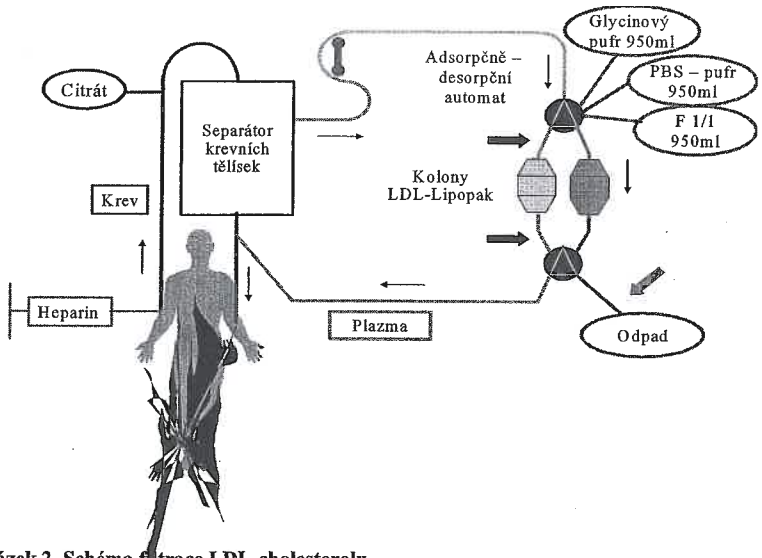
Statistická analýza

Ke statistické analýze byl užit program SigmaStat for Windows, verze 3.0 (SPSS Inc., San Rafael, USA). Vzhledem k variabilitě hodnot proměnných byl za určující parametr zvolen medián. Ke statistickému hodnocení byly použity neparametrické testy. K porovnání rozdílů mezi hodnotami stejného parametru před a po LDL-aféze nebo před a po průchodu plazmy imunoadsorpční kolonou byl užit Wilcoxonův test. Ke zjištění vztahu mezi proměnnými jsme použili Spearmanův koeficient pořadové korelace (r_s). Mann-Whitney Rank Sum test byl užit k testování rozdílů mezi dvěma soubory. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky signifikantní. Pro testování závislosti jedné proměnné na druhé jsme použili regresní analýzu (lineární regresi). Statistické postupy byly konzultovány s pracovníky Katedry lékařské biofyziky Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

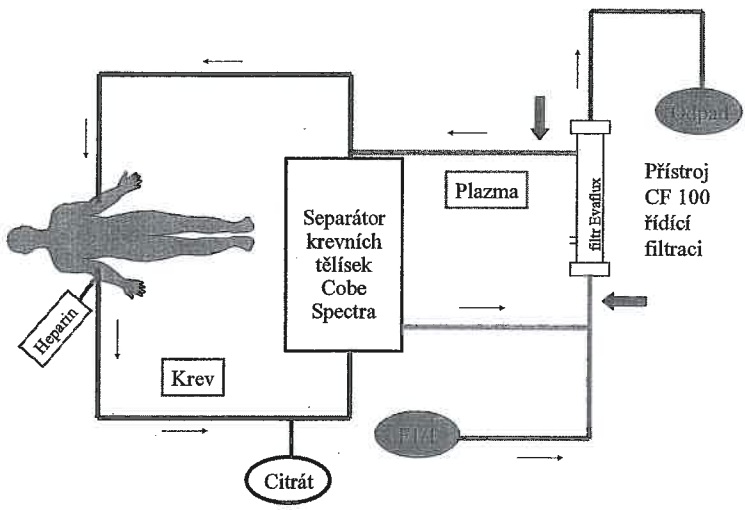
Grafická zobrazení

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

Obrázek 1. Schéma imunoadsorpce LDL-cholesterolu



Obrázek 2. Schéma filtrace LDL-cholesterolu



2.3. Výsledky

2.3.1. Technická část je rozdělena do tří částí. V první části bylo vyhodnoceno 1000 provedených LDL-aferez, a to z hlediska ryze *technických parametrů*, jako jsou objemy zpracované plazmy, průtoky krve a plazmy přístroji atd., z hlediska *vlivu LDL-aferezy na hladiny lipidů* a na některé další parametry a z hlediska *frekvence a závažnosti vedlejších účinků* LDL-aferezy. Druhá část popisuje originální zařízení k odvádění vzduchu z imunoadsorpčních kolon. Třetí část pojednává o životnosti imunoadsorpčních kolon.

2.3.1.1. Vyhodnocení 1000 provedených procedur LDL-aferezy

A) Vyhodnocení základních technických parametrů

Od května 1996 do října 2004 bylo na našem pracovišti provedeno 1000 LDL-aferez celkem u 9 pacientů. Průměrná celková doba léčby LDL-aferezami (\pm směrodatná odchylka) byla $6,3 \pm 2,0$ let, rozmezí 2,9 - 8,5 let a **medián 6,7 let**. **Počet LDL-aferez na jednoho pacienta** byl 111 ± 58 , rozmezí 47 - 223, **medián 105 aferez**. **Průměrný interval mezi jednotlivými LDL-aferezami** u všech 9 nemocných byl 21 ± 16 dní, rozmezí 4 - 294 dní, **medián 17 dní**. Po vyloučení muže s nízkou úrovní spolupráce z vyšetřovaného souboru byl průměrný interval mezi LDL-aferezami 18 ± 9 dní, rozmezí 4 - 91 dní, **medián 17 dní**, u homozygotů FH 13 ± 5 dní, rozmezí 4 - 41 dní, **medián 14 dní**. **Jedna LDL-afereza trvala** průměrně 230 ± 33 min., rozmezí 58 - 333, **medián 229 min.**, tj. $3,8 \pm 0,5$ hodin, rozmezí 1,0 - 5,6, **medián 3,8 hodin**. Průměrné **absolutní množství zpracované plazmy** při jedné LDL-afereze bylo $6\,654 \pm 968$ ml, v rozmezí 1 200 - 8 734 ml, **medián 7 000 ml**. Průměrný **objem zpracované plazmy na jeden kilogram váhy pacienta** byl 97 ± 26 ml/kg, rozmezí 15 - 156, **medián 99 ml/kg**. Průměrný **průtok krve** primárním přístrojem byl $67,7 \pm 5,4$ ml/min., rozmezí 45,0 - 70,0, **medián 70,0 ml/min**. Průměrný **průtok plazmy** byl $30,2 \pm 4,1$ ml/min, rozmezí 20,3 - 38,2, **medián 34,5 ml/min**. **Poměr roztoku citrátů sodného (ACD-A) ke krvi** byl 1:22. Průměrný **průtok ACD-A** byl $3,1 \pm 0,3$ ml/min., rozmezí 2,1 - 3,2, **medián 3,2 ml/min**. Průměrná **spotřeba ACD-A** při jedné LDL-afereze byla 697 ± 118 ml, rozmezí 220 - 1060 ml, **medián 703 ml**.

B) Vliv LDL-aferezy na hladiny lipidů, na parametry krevního obrazu a některé další biochemické ukazatele

Hladiny lipidů a jejich součástí před a po LDL-afereze jsou shrnuty v *Tabulce 2*, jejich pokles po LDL-afereze, vyjádřený v procentech výchozí hodnoty, je uveden v *Tabulce 3*, procentuální pokles ostatních hodnocených parametrů je uveden v *Tabulce 4*.

Tabulka 2. Hladiny lipidů před a po LDL-afereze

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

TC = celkový cholesterol, TAG = triacylglyceridy (obojí v mmol/l), ApoA = apolipoprotein A (g/l), ApoB = apolipoprotein B (g/l), Lp(a) = lipoprotein (a) (g/l). SD = směrodatná odchylka.

Tabulka 3. Pokles lipidů po LDL-aféřeze (v procentech výchozí hodnoty)

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

TC = celkový cholesterol, TAG = triacylglyceridy, ApoA = apolipoprotein A, ApoB = apolipoprotein B. Pokles všech parametrů byl statisticky signifikantní ($p \leq 0,001$). SD = směrodatná odchylka, n = počet vyšetřených LDL-aféřeze.

Tabulka 4. Pokles dalších parametrů po LDL-aféřeze (v procentech výchozí hodnoty)

n = 117	Průměr ± SD (%)	Rozmezí (%)	Medián (%)	p
Urea (mmol/l)	15,1 ± 7,2	1,5 - 52,5	14,3	≤ 0,001
Kreatinin (μmol/l)	8,1 ± 5,9	-16,4 - 27,5	7,6	≤ 0,001
Kysel. močová (μmol/l)	11,5 ± 3,4	5,1 - 19,9	11,2	≤ 0,001
ALT (μkat/l)	28,3 ± 9,6	0,0 - 67,4	28,6	≤ 0,001
AST (μkat/l)	23,5 ± 12,0	-14,3 - 66,7	25,0	≤ 0,001
Celková bílkovina (g/l)	26,0 ± 4,8	17,7 - 39,0	25,2	≤ 0,001
Albumin (g/l)	24,4 ± 5,3	17,4 - 40,8	23,1	≤ 0,001
Hemoglobin (g/l)	7,2 ± 4,6	-6,9 - 19,5	6,9	≤ 0,001
Hematokrit	7,4 ± 4,8	-2,8 - 23,7	7,2	≤ 0,001
Leukocyty ($\times 10^9/l$)	-3,4 ± 14,7	-53,0 - 29,1	-2,4	0,152
Trombocyty ($\times 10^9/l$)	8,8 ± 11,2	-45,0 - 72,2	8,6	≤ 0,001
Viskozita plazmy (mPa)	14,1 ± 5,1	2,0 - 33,8	14,5	≤ 0,001

ALT = alaninaminotransferáza, AST = aspartátaminotransferáza Pozn.: záporné hodnoty poklesu znamenají vzestup koncentrace po aféřeze. SD = směrodatná odchylka

C) Nežádoucí účinky LDL-aféřeze

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

Nevolnost a/nebo hypotenze, vyžadující lékařskou intervenci, tvořily 63% výše zmíněných vedlejších reakcí, vyskytly se u 3,2% LDL-aféřeze a byly šestkrát příčinou přerušení procedury. Mírné vazo-vagální reakce, a to obvykle přechodná slabost, mírná nevolnost, lehké a krátkodobé výkyvy krevního tlaku nevyžadující lékařskou intervenci nebyly do celkového počtu významných vedlejších reakcí zahrnuty, stejně tak jako přechodné mírné projevy toxicity citrátu - např. cirkumorální parestézie nebo mírné parestézie akrálních částí končetin, které dobře reagovaly na intravenózní aplikaci kalcia.

Významnější projevy toxicity citrátu, jako protrahované parestázie nebo křeče neuspokojivě reagující na léčbu, tvořily 28% vedlejších příhod, tj. vyskytly se u 1,4% všech LDL-aferez a nikdy nevedly k ukončení LDL-aferezy. Jako prevenci jsme v závislosti na konkrétních zkušenostech s daným pacientem užívali kontinuální nebo jednorázovou intravenózní aplikaci kalcia. Zpravidla bylo během LDL-aferezy aplikováno 20 - 40 ml roztoku Calcium Biotika (Hoechst-Biotika, s.r.o., Martin, Slovenská republika), u kterého 10 ml obsahuje 2,25 mmol ionizovaného kalcia), u homozygotů FH s většimi objemy zpracované plazmy jsme výjimečně aplikovali 50 ml roztoku kalcia. Kromě pocitu tepla jsme nepozorovali jiné nežádoucí účinky intravenózní aplikace roztoku kalcia.

Pravidelně se vyskytovaly obtíže z vynucené polohy vleže či polosedě se zavedenými venózními vstupy do obou předloktí. Jejich výskyt byl užíváním automaticky polohovatelných lůžek s komfortními matracemi a kontinuální péčí personálu výrazně omezen, nicméně bolesti zad vyžadující podání analgetika se objevily v 0,5% z celkového počtu aferéz.

Dále se objevovala mírná svalová slabost a pocit únavy po LDL-afereze, trvající do následujícího dne, někteří nemocní udávali pocit hladu. Přechodný pocit napětí a mírného otoku v prstech rukou a nohou, popřípadě v očních víčkách, se nepravidelně vyskytoval u 6 našich pacientů zvláště úvodu léčby, u třech z nich se objevuje během LDL-aferezy u mírné formě a nepravidelně doposud. Tento typ reakcí byl sice poměrně častý, ale vždy přechodný, nepůsobil výraznější obtíže pacientům a nevyžadoval léčbu. Do celkového souhrnu závažnějších reakcí nebyl započítán.

Nedostatečnost periferních žil s nutností odložit proceduru se vyskytla především v době zavádění LDL-aferez do praxe a vedla u jedné, v té době sedmnáctileté nemocné ke zhotovení arterio-venózního zkratu na předloktí. Ten je nyní nefunkční. Postupně zlepšení stavu periferních žil, ke kterému přispělo pravidelné posilování svalstva horních končetin, umožnilo nyní bezproblémové zavádění žilních vstupů. Ke kanylaci centrální žíly jsme nikdy nepřistoupili. Drobné hematomy v místě zavedení vstupů jsou běžné, významné krvácení do kůže ani jiné lokální komplikace se neobjevily. Další, v literatuře zmiňované reakce, jsme nezaznamenali.

Diskuse a závěr

LDL-afereza efektivně a selektivně odstraňuje LDL-cholesterol a lipoprotein(a). Účinnost naší modifikace imunoadsorpce, prováděné pomocí kolon LDL-Lipopak je velmi dobře srovnatelná s účinností jiných metod uvedených v literatuře (Schmaldienst, 2000). Na poklesu hladiny HDL-cholesterolu se podílí diluce pacientovy krve a pravděpodobně nespecifický záchyt molekul HDL v kolonách. Podle některých prací přispívá k poklesu HDL také aktivace hepatické lipázy a pokles aktivity lecitin-cholesterol-acyltransferázy (LCAT) (Richter, 1993). Průměrná koncentrace HDL-cholesterolu po LDL-afereze však neklesla pod 1 mmol/l. Pokles HDL po LDL-afereze nepovažujeme za klinicky významný a jeho možný negativní vliv je vyvážen příznivým účinkem eliminace aterogenních lipoproteinů. Pokles hemoglobinu a hematokritu po LDL-afereze je způsoben jak dilucí oběhu nemocného, tak určitými ztrátami krve zůstávající v linkách hemaferetického setu po ukončení procedury. Jistou roli, zvláště z dlouhodobého hlediska hrají i ztráty působené odběry vzorků k laboratorním vyšetřením. Podle našich zkušeností, ale i podle dalších autorů (Pták, 2004) mohou chronické krevní ztráty při opakovaných procedurách imunoadsorpce přispívat ke vzniku sideropenie s nutností substituce preparáty železa, zvláště u žen. Změny ostatních vyšetřovaných parametrů nebyly klinicky významné.

Přes technickou náročnost LDL-imunoadsorpce jsme neshledali žádné život ohrožující vedlejší reakce. Frekvence jednotlivých vedlejších reakcí, vedoucích k přerušení aferézy, se pohybuje v desetinách procent.

Nejčastějším důvodem k přerušení procedury byla nevolnost a hypotenze. Vzhledem ke spojení s dalšími příznaky, jako např. s pocením a nevolností, se domníváme, že se jednalo o převážně vazo-vagální reakce. Mezi další příčiny, které se mohly podílet na hypotenzii, patří přesun části krve (cca 150 – 350 ml) do extrakorporálního oběhu. Podíl cytokinové reakce a především aktivace komplementového systému při kontaktu plazmy s povrchem separačního setu a adsorpčních kolon s následkem uvolnění mediátorů s anafylaktoidními a vazodilatačními účinky, která byla popsána u hemaferezé dříve (Shiga, 1998, Pták, 2004), nebyl zkoumán, nicméně obě reakce se mohly, spolu s možným přechodným zvýšením vaskulární permeability v souvislosti s rychlou změnou hladiny lipoproteinů, podílet také na vzniku otoků prstů a očních víček.

Kombinace kontinuálního podávání heparinu a citrátu spolehlivě a bezpečně zajistila dostatečnou antikoagulaci. Intravenózní aplikace kalcia bezpečně zmírnila příznaky citrátové toxicity. Pozorovali jsme i příznivý vliv intravenózní aplikace magnézia. Protože stres pacienta může prostřednictvím hyperventilace vést k prohloubení ionizované hypokalcémie, je třeba zdůraznit i potřebu pečlivého a citlivého přístupu personálu, který může tento stres účinně eliminovat. Projevy toxicity citrátu nebyly důvodem k přerušení léčby ani k významnějšímu prodloužení a zpomalení procedur.

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

2.3.1.2. Vývoj zařízení k odstraňování vzduchu z adsorpční kolony

S přibýváním zkušeností s extrakorporálními eliminačními metodami byla LDL-afézeza modifikována naší výzkumnou skupinou, a to zejména po technické stránce. Příkladem je originální řešení zařízení k odstraňování vzduchu z adsorpční kolony. Při původním provedení imunoadsorpce se v horní části kolony hromadil vzduch, který bylo třeba opakovaně odsávat stříkačkou po přerušení procedury a rozpojení mimotělního okruhu. Nové zařízení umožňuje odsávat vzduch z kolony podle potřeby kdykoli, aniž by bylo nutné přerušit průtok plazmy kolonou. Tím omezuje riziko kontaminace mimotělního oběhu, zajišťuje plynulost procedury, umožňuje také odběry vzorků. Celkově tedy usnadňuje práci personálu a zlepšuje bezpečnost a komfort nemocných v průběhu LDL-afézezy. Autorka této disertace není autorem vynálezu, ale podílela se aktivně na jeho vývoji a na zkoušení jeho modifikací. Tento systém byl navržen v rámci výzkumu, který byl součástí řešení výzkumného projektu IGA MZ ČR NB/7006-3, jehož byla autorka této disertační práce spoluřešitelkou. Systém byl patentován jako vynález (č. patentu CZ 294018 B6)

2.3.1.3. Vyhodnocení životnosti imunoadsorpčních kolon LDL-Lipopak

Pro každou hodnocenou LDL-afézezu byly kalkulovány následující parametry:

A. Ukazatele efektivity kolon

1. **Absolutní pokles hladiny LDL-cholesterolu po LDL-afézeze**, daný rozdílem koncentrací LDL-cholesterolu před a po LDL-afézeze ($mmol/l$).
2. **Absolutní pokles hladin LDL-cholesterolu po LDL-afézeze na jednotku zpracované plazmy**, daný podílem předchozího parametru množstvím zpracované plazmy při jedné LDL-afézeze ($mmol/l^2$).
3. **Relativní pokles hladiny LDL-cholesterolu po LDL-afézeze**, získaný jako podíl absolutního poklesu hladin LDL-cholesterolu a preaféretické koncentrace LDL-cholesterolu. Po vynásobení stem se rovná procentuálnímu poklesu LDL-cholesterolu.

B. Ukazatele selektivity kolon

Ke zhodnocení selektivity imunoadsorpčních kolon byl zvolen HDL-cholesterol, jehož eliminace při LDL-afézeze je nežádoucí.

1. **Absolutní pokles hladiny HDL-cholesterolu** po LDL-aféřeze, daný rozdílem hladiny HDL-cholesterolu před a po LDL-aféřeze (mmol/l).
2. **Relativní pokles hladiny HDL-cholesterolu** po LDL-aféřeze, získaný jako podíl absolutního poklesu hladiny HDL-cholesterolu a preaféretické hodnoty HDL-cholesterolu. Po vynásobení stem se rovná procentuálnímu poklesu HDL-cholesterolu.

Výsledky

I. Základní údaje

K provedení 1000 LDL-aférez ve výše uvedeném období bylo použito celkem 24 párů kolon u 9 nemocných, tj. průměrně 3 (1 - 4), medián 3 páry kolon na jednoho pacienta. Devět párů kolon bylo v době šetření stále používáno, 15 párů bylo již vyřazeno z užívání a bylo možné u nich kompletně zhodnotit následující údaje: průměrně bylo provedeno 54 (11-109), medián 49 LDL-aférez na jeden pár kolon. Průměrná doba užívání jednoho páru kolon byla 35,9 měsíců, tj. 3,0 let, medián 2,6 let. K vyhodnocení efektivity a selektivity kolon bylo hodnoceno 780 LDL-aférez provedených pomocí všech 24 použitých párů kolon.

II. Efektivita imunoadsorpčních kolon

Závislost poklesu LDL-cholesterolu na počtu provedených LDL-aférez u každého páru imunoadsorpčních kolon

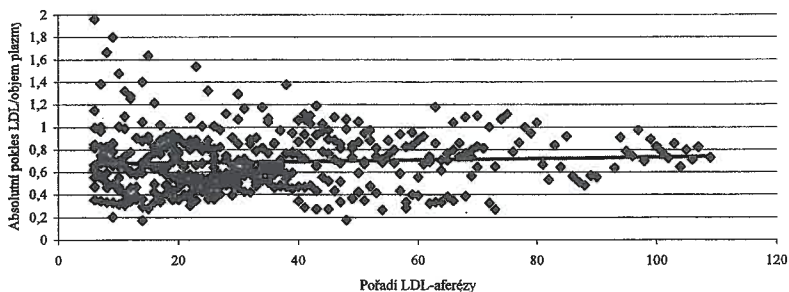
Pro absolutní pokles koncentrací LDL-cholesterolu byla hodnota regresního koeficientu $0,015$ a $p = 3,8 \cdot 10^{-5}$, pro absolutní pokles koncentrace LDL-cholesterolu, korigovaný na 1 ml zpracované plazmy byla hodnota regresního koeficientu rovna $6,5 \cdot 10^{-4}$ a $p = 0,230$ (viz *Graf 1*), pro relativní pokles koncentrací LDL-cholesterolu byla hodnota regresního koeficientu rovna $-6,8 \cdot 10^{-5}$ a $p = 0,723$ (viz *Graf 2*).

III. Selektivita imunoadsorpčních kolon

Závislost poklesu HDL-cholesterolu na počtu provedených LDL-aférez u každého páru imunoadsorpčních kolon

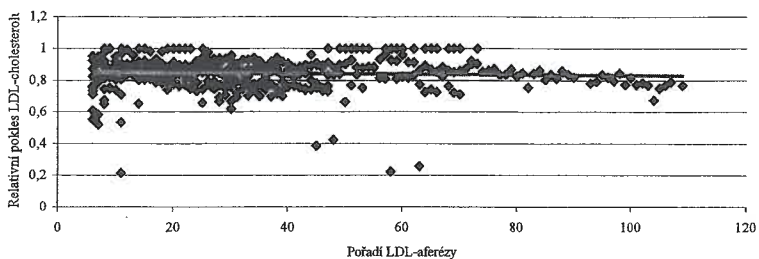
Pro absolutní pokles koncentrací HDL-cholesterolu byla hodnota regresního koeficientu $-2,4 \cdot 10^{-4}$, $p = 0,466$ (viz *Graf 3*), pro relativní pokles koncentrací HDL-cholesterolu byla hodnota regresního koeficientu $2,5 \cdot 10^{-4}$ a $p = 0,067$ (viz *Graf 4*). Pro ilustraci, ani po poslední provedené LDL-aféřeze u 10 párů nejdéle užívaných kolon neklesla průměrná koncentrace HDL-cholesterolu pod normu - byla $1,02 \pm 0,19$, medián 1,08 mmol/l.

Graf 1. Závislost absolutního poklesu LDL-cholesterolu korigovaného na jednotku zpracované plazmy na počtu provedených LDL-aférez u každého páru kolon



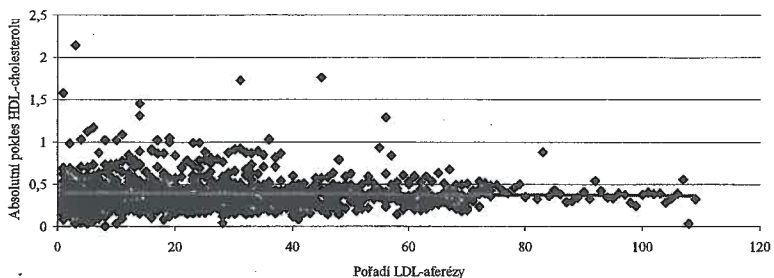
Regresní koeficient = $6,5 \cdot 10^{-4}$, $p = 0,230$

Graf 2. Závislost relativního poklesu LDL-cholesterolu na počtu provedených LDL-aferez u každého páru kolon



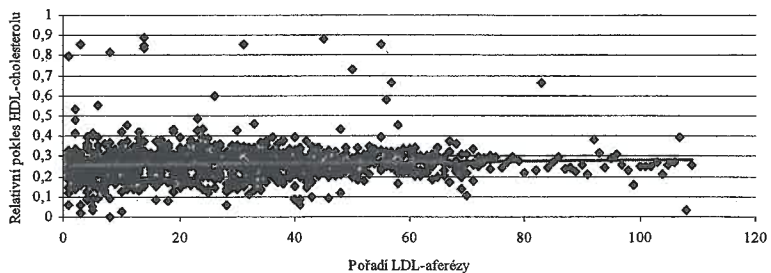
Regresní koeficient = $-6,8 \cdot 10^{-5}$, $p = 0,723$

Graf 3. Závislost absolutního poklesu HDL-cholesterolu na počtu provedených LDL-aferez u každého páru kolon



Regresní koeficient = $-2,4 \cdot 10^{-4}$, $p = 0,466$

Graf 4. Závislost relativního poklesu HDL-cholesterolu na počtu provedených LDL-aferez u každého páru kolon



Regresní koeficient = $2,5 \cdot 10^{-4}$, $p = 0,067$

Diskuse a závěr

Nebyl prokázán signifikantní pokles efektivity, tedy schopnosti kolon eliminovat LDL-cholesterol, s počtem provedených LDL-aferez. Selektivita imunoadsorpce se v průběhu užívání kolon také významně neměnila. Faktorů, limitujících přesnost použité metody je několik. Na základě výsledků práce Stefance (Stefanec, 1999) byl zanedbán vliv přesunu cholesterolu mezi jednotlivými kompartmenty na změny hladin cholesterolu po LDL-aféře. Dále byl zanedbán vliv diluce pacientova oběhu, který pro zjednodušení považujeme u jednotlivých nemocných za konstantní. Vzhledem k vývoji pracovních postupů a relativně dlouhé průměrné době užívání jednoho páru kolon (3 roky) nebyly u jednotlivých LDL-aferez dodrženy zcela identické podmínky. Tato metoda hodnotí pár kolon jako celek, neodhalí však rozdíly v kvalitě mezi jednotlivými kolonami. K tomu je třeba užít například hodnocení hladin cholesterolu v plazmě vytékající z kolon.

2.3.2. Dynamika a vzájemné vztahy některých ukazatelů aktivity aterogeneze u nemocných léčených LDL-aférou

2.3.2.1. Selektinové adhezni molekuly a monocytární chemotaktický protein-1 u nemocných léčených LDL-aférou

Soubor nemocných a kontrolní soubor byly popsány v kapitole *Soubor nemocných léčených LDL-imunoadsorpcí* a v kapitole *Kontrolní soubory*. Vzorky krve byly odebrány před zahájením a ihned po ukončení LDL-aféře. Totéž bylo provedeno při následující LDL-aféře.

Výsledky

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

Plazmatické koncentrace všech sledovaných parametrů u nemocných před a po první sledované LDL-aféře jsou uvedeny v *Tabulce 5*, před a po následující LDL-aféře v *Tabulce 6*. Koncentrace sP-selektinu nemocných byly oproti kontrolnímu souboru zvýšeny ($p < 0,05$), a to před i po obou LDL-aféřích. Koncentrace sE-selektinu u nemocných se statisticky signifikantně nelišily od koncentrací kontrolního souboru ($p > 0,05$) a medián koncentrací sE-selektinu nemocných byl při horní hranici normy příslušné laboratoře. Koncentrace MCP-1 byly v mezích normy a nelišily se od kontrolního souboru.

Pokles koncentrací všech parametrů (vyjádřený v procentech výchozí hodnoty) po první sledované LDL-aféře je uveden v *Tabulce 7*, pokles po následující LDL-aféře je uveden v *Tabulce 8*. Po obou LDL-aféřích statisticky významně klesla plazmatická koncentrace MCP-1 a sP-selektinu. Koncentrace sE-selektinu se statisticky významně neměnila (viz *Tabulka 7 a 8*). Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi velikostí změn, které nastaly po první a po následující LDL-aféře u všech sledovaných parametrů.

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

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

Tabulka 5. Koncentrace selektinů (µg/l), MCP-1 (pg/l) a lipidů (mmol/l) před a po první sledované LDL-aféřeze

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

TC = celkový cholesterol, TAG = triacylglyceridy, SD = směrodatná odchylka

Tabulka 6. Koncentrace selektinů (µg/l), MCP-1 (pg/l) a lipidů (mmol/l) před a po následující LDL-aféřeze

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

TC = celkový cholesterol, TAG = triacylglyceridy, SD = směrodatná odchylka

Tabulka 7. Pokles selektinů, MCP-1 a lipidů po první LDL-aféřeze (%)

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

TC = celkový cholesterol, TAG = triacylglyceridy, SD = směrodatná odchylka

Tabulka 8. Pokles selektinů, MCP-1 a lipidů po následující LDL-aféřeze (%)

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

TC = celkový cholesterol, TAG = triacylglyceridy, SD = směrodatná odchylka

Diskuse a závěr

Nemocní, léčení LDL-aferezou, měli signifikantně zvýšenou plazmatickou koncentraci P-selektinu, která po jednotlivé proceduře LDL-aferezy významně klesla, nedosáhla však normálních hodnot. Zvýšená hladina sP-selektinu je známkou zvýšené aktivity trombocytů a především endoteliálních buněk, pravděpodobně v souvislosti s aktivitou aterosklerotického postižení. U nemocných nebylo prokázáno jiné zánětlivé onemocnění. Pokles sP-selektinu po proceduře byl popsán také u metody HELP, kde se však, na rozdíl od našeho souboru, podílela také významná eliminace P-selektinu v koloně (Pulawski, 2002).

Hladiny E-selektinu a MCP-1 u vyšetřovaného souboru nebyly signifikantně zvýšeny. Koncentrace E-selektinu, specifického ukazatele aktivace endotelu, se po LDL-afereze statisticky signifikantně nezměnila, narozdíl od výsledků Sampietra, který shledal významný pokles zvýšených hladin sE-selektinu u 8 nemocných s FH po LDL-afereze metodou DSA (Sampietro, 1997), přičemž eliminace E-selektinu kolonou nebyla prokázána. Naše studie byla provedena u nemocných dlouhodobě léčených LDL-aferezou v relativně stabilizovaném stavu, kdy již mohlo dojít k alespoň částečné normalizaci endoteliálních funkcí, na které se dále pravděpodobně podílela i dlouhodobá medikace statiny, které snižují nejen hladiny sE-selektinu (van Haelst, 2001), ale i MCP-1 (Rosenson, 2005).

Pokles sE-selektinu po proceduře byl popsán i v další studii, to při užití nejen výše zmíněné metody DSA (7 nemocných), ale i u metody HELP (7 nemocných) a u metody DALI (6 nemocných). U všech metod byla obdobná míra poklesu LDL-cholesterolu. Největší pokles E-selektinu byl pozorován v případech metody HELP (31%), kde byla však prokázána i největší vazba v koloně, u zbylých dvou metod klesl E-selektin o 6% (Empen, 2002).

Signifikantní pokles koncentrace MCP-1 v naší studii byl významnou měrou způsoben jeho nespecifickou vazbou v koloně. Neprokázali jsme eliminaci P- a E-selektinu kolonami, na rozdíl od některých výše zmíněných eliminačních systémů. Pokles koncentrací byl z části způsoben dilucí pacientova oběhu náhradními roztoky. Podíl snížené produkce a/nebo zvýšeného odbourávání molekul nebyl kvantifikován.

Redukce hladin P-selektinu a MCP-1 jakožto imunologicky aktivních molekul se pravděpodobně podílí na příznivém efektu LDL-aferez na proces aterogeneze. Preaferetická hladina MCP-1 a selektinů může odrážet aktivitu imunitního a endoteliálního systému u nemocných dlouhodobě léčených LDL-aferezou a změny P-selektinu by se mohly po dalším zkoumání stát ukazatelem efektu jednotlivé LDL-aferezy. Signifikantní negativní korelaci velikosti poklesu sP-selektinu s hladinami sE-selektinu před i po LDL-afereze je možné vysvětlit zvýšenou aktivitou endoteliálních buněk, kterou předpokládáme u nemocných se zvýšenou hladinou sE-selektinu, a která může být obtížněji ovlivnitelná LDL-aferezou. Ta proto mohla vést k menšímu poklesu sP-selektinu u těchto nemocných. Výsledky mohou být ovlivněny limitovaným počtem pacientů.

Dynamika hladin selektinů u LDL-imunoadsorpce byla v literatuře popsána pouze u našeho souboru nemocných (Bláha, 2004). Kromě dat publikovaných naším týmem nám není toho času znám žádný další literární zdroj pojednávající o dynamice hladin MCP-1 během některé z eliminačních metod LDL-cholesterolu.

2.3.2.2. Močový neopterin a mikroalbuminurie u nemocných léčených LDL-aferezou

Soubor nemocných byl popsán v kapitole *Soubor nemocných léčených LDL-imunoadsorpce a filtrační metodou*, **kontrolní soubor** v kapitole *Kontrolní soubory*.

Sběr a zpracování vzorků

První vzorek ranní moči ke stanovení neopterinu, albuminu a kreatininu byl odebrán ráno před LDL-aferezou, další 1., 2., 5. a 14. den po aferéze, poslední vzorek v den další aferézy ráno. Vzorky byly označeny D0, D+1, D+2, D+5, D+14 a D_{poslední}. Jeden vzorek byl

odebrán také v den aferézy večer v 18:00 hodin a označen D0_{18:00}. Vzorky krve ke stanovení ostatních parametrů byly odebrány z periferní žíly před a ihned po skončení LDL-aferézy.

Výsledky

Po LDL-aferéze statisticky signifikantně poklesl celkový, HDL- a LDL-cholesterol, apolipoprotein B, triacylglyceridy a Lp(a) - viz *Tabulka 9*.

Tabulka 9. Hladiny lipidů před a po LDL-aferéze a jejich pokles po LDL-aferéze

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

Pokles (%) = pokles hladin vyjádřený v procentech výchozí hodnoty. SD = směrodatná odchylka.

Index neopterin/kreatinin

Medián indexu neopterin/kreatinin u zdravých jedinců odpovídajícího věku a pohlaví byl 108 μmol/mol, rozmezí 55 – 228 μmol/mol. Hodnoty indexu neopterin/kreatinin v moči pacientů v jednotlivých dnech a jejich srovnání s D0 a hodnotami kontrolního souboru jsou uvedeny v *Tabulce 10*.

Index neopterin/kreatinin v moči ráno před LDL-aferézou byl signifikantně vyšší oproti indexu zdravých jedinců, zvýšení bylo signifikantní i v některých dalších dnech (viz *Tabulka 10*). Nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi ranními hodnotami indexu neopterin/kreatinin během období mezi dvěma LDL-aferézami, ale byl zjištěn statisticky signifikantní ($p = 0,006$) pokles hodnoty indexu v den LDL-aferézy večer (D0_{18:00}) oproti ranní preaferetické hodnotě a dále hraničně významně snížen ($p = 0,064$) první den po LDL-aferéze ráno (D+1), opět oproti preaferetické hodnotě (viz *Tabulka 10*).

Velikost poklesu indexu neopterin/kreatinin v den LDL-aferézy večer signifikantně negativně korelovala s hladinou celkového a LDL-cholesterolu před LDL-aferézou a s jejich poklesem po LDL-aferéze, dále negativně s objemem zpracované plazmy na kilogram váhy pacienta (absolutní pokles neopterinu: $r_s = -0,778$, $p = 0,015$, procentuální pokles neopterinu: $r_s = -0,635$, $p = 0,071$). Ranní hodnoty indexu neopterin/kreatinin (kromě D+1) s hladinou lipidů nekorelovaly. Korelace indexu neopterin/kreatinin s koncentracemi lipidů jsou uvedeny v *Tabulce 11* a znázorněny *Grafy 5-7*.

Tabulka 10. Hodnoty indexu neopterin/kreatinin v moči ($\mu\text{mol/mol}$)

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

SD = směrodatná odchylka

Tabulka 11. Korelace indexu neopterin/kreatinin se sérovými lipidy

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

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

Index albumin/kreatinin

Hodnoty indexu albumin/kreatinin jsou uvedeny v *Tabulce 12*. Mikroalbuminurie se vyskytla u dvou (20%) pacientů, limit 0,7 mg/mmol, významný při posuzování kardiovaskulárního rizika, byl dosažen celkem u třech (30%) nemocných. U dalších šesti pacientů byl index pozitivní, ale nedosáhl tohoto limitu. Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v ranních hodnotách tohoto indexu v jednotlivých dnech, ani po LDL-aferéze večer. Index neopterin/kreatinin večer po LDL-aferéze koreloval s indexem albumin/kreatinin ráno před LDL-aferézou ($r_s = 0,817$, $p = 0,002$), D+1 ($r_s = 0,753$, $p = 0,009$), D+2 ($r_s = 0,859$, $p = 0,000$), D+5 ($r_s = 0,699$, $p = 0,022$). Korelace indexu albumin/kreatinin s lipidy a velikostí poklesu lipidů po LDL-aferéze jsou uvedeny v *Tabulce 13*. Jediný pacient s poruchou metabolismu glycidů, a to s diabetem mellitem II. typu, měl hodnoty indexu albumin/kreatinin v normě.

Index albumin/kreatinin nekoreloval s parametry uvedenými v *Tabulce 14*, ani nezávisel na věku nemocných.

Tabulka 12. Hodnoty indexu albumin/kreatinin v moči (mg/mmol)

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

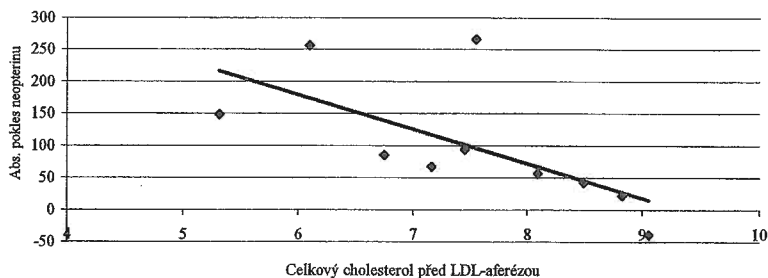
SD = směrodatná odchylka

Tabulka 13. Korelace indexu albumin/kreatinin se sérovými lipidy

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

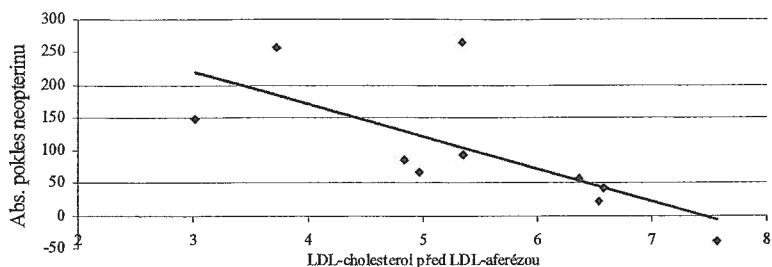
(abs) = pokles absolutní, (%) = pokles v procentech výchozí hodnoty. r_s = Spearmanův koeficient pořadové korelace

Graf 5. Vztah absolutního poklesu indexu neopterin/kreatinin po LDL-aferéze a koncentrace celkového cholesterolu před LDL-aferézou

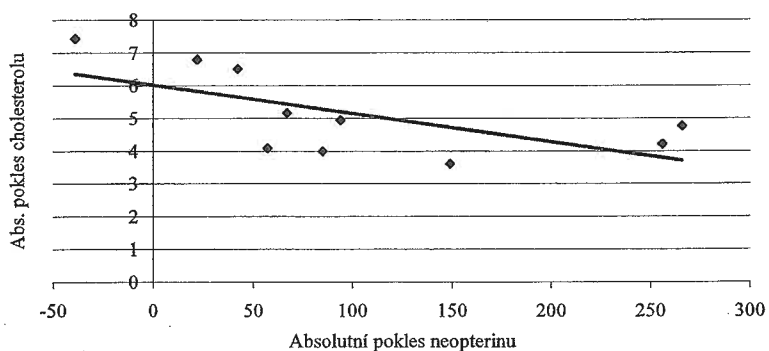


$r_s = -0,770, p = 0,007$

Graf 6. Vztah absolutního poklesu indexu neopterin/kreatininu po LDL-aferéze a koncentrace LDL-cholesterolu před LDL-aferézou



Graf 7. Vztah absolutního poklesu koncentrace celkového cholesterolu a absolutního poklesu hodnoty indexu neopterin/kreatininu po LDL-aferéze



$$r_s = -0,673, p = 0,029$$

Tabulka 14. Hodnoty parametrů, stanovených pouze před LDL-aferézou

	Průměr ± SD	Rozmezí	Medián
Systolický tlak krve (Torr)	126 ± 16	90 – 140	125
Diastolický tlak krve (Torr)	71 ± 12	50 – 85	75
Urea (mmol/l)	4,3 ± 1,2	2,7 - 6,5	4,0
Kreatinin (μmol/l)	86,5 ± 12,2	64,0 - 103,0	87,5
Kyselina močová (μmol/l)	356 ± 72	215 - 475	364
Glykémie (mmol/l)	4,2 ± 0,4	3,5 - 5,1	4,8
Albumin (g/l)	43,5 ± 2,5	39,4 - 47,0	42
Leukocyty (x10 ⁹ /l)	6,5 ± 0,8	3,8 - 12,0	5,8
Trombocyty (x10 ⁹ /l)	210 ± 61	93 - 295	201
Střední objem erytrocytu (fl)	90,8 ± 4,7	84,0 - 99,1	94,3

BMI = body mass index, SD = směrodatná odchylka

Diskuse a závěr

Močový neopterin pacientů byl před LDL-aférezou signifikantně zvýšen i přes intenzivní léčbu hypercholesterolemie a absenci klinických známek progresu aterosklerózy. Vysvětlením může být aktivita makrofágů v aterosklerotických plátech. Přítomnost jiných patologických stavů, zvyšujících produkci neopterinu nebyla prokázána, naopak všichni nemocní měli aterosklerotické postižení.

Signifikantní pokles neopterinu večer po LDL-aféze je v souladu s diurnálním rytmem neopterinu. Ranní močové koncentrace neopterinu i přes mohutné a rychlé změny hladin aterogenních činitelů nebyly ovlivněny LDL-aférou signifikantně. V současné době nelze vyloučit přímý podíl jednotlivé procedury LDL-afézy na poklesu večerní koncentrace močového neopterinu, i když negativní korelace poklesu neopterinu s množstvím zpracované plazmy a tudíž s rozsahem LDL-afézy hovoří spíše proti tomuto vlivu. Dostupná data nyní nedovolují vzhledem k limitovanému počtu nemocných učinit v tomto ohledu další závěry.

Signifikantní negativní korelace velikosti poklesu neopterinu večer po LDL-aféze s hladinou celkového a LDL-cholesterolu před LDL-aférou a s velikostí jejich poklesu po LDL-aféze může mít různá vysvětlení. Pacienti s lehký hypercholesterolemií mohou mít i méně rozsáhlé a/nebo méně aktivní aterosklerotické léze. Systémová imunitní aktivace u těchto nemocných může být snadněji ovlivněna rychlým poklesem cholesterolu než u nemocných s těžší hypercholesterolemií. Menší pokles močového neopterinu večer po LDL-aféze u nemocných s těžší hypercholesterolemií může též odrážet zúžení fyziologických diurnálních variací močové exkrece neopterinu následkem zvýšené bazální monocytární aktivity, pravděpodobně pocházející z aterosklerotických plátů.

Nález mikroalbuminurie u pacientů s FH je v rozporu s výsledky Zouvanise, který neshledal mikroalbuminurii ani u jednoho z 15 nemocných s FH (Zouvanis, 1995), naopak vztah hypercholesterolemie a mikroalbuminurie byl pozorován jinými autory (Brndiar, 2001, Shankar, 2004). U nemocných s větším močovým vylučováním albuminu byly signifikantně vyšší hladiny cholesterolu a vyšší močový neopterin večer po LDL-aféze. Je možné, že nadír neopterinu odráží reziduální systémovou imunitní aktivitu pocházející z aterosklerotických plátů. Ta koreluje s ukazatelem mikrovaskulární dysfunkce – mikroalbuminurii.

Mikroalbuminurie se signifikantně nelišila v průběhu doby mezi dvěma LDL-aférami, narozdíl výsledků Sinzinger, který popsal pokles mikroalbuminurie druhý den po LDL-aféze metodou DSA u tří pacientů s FH (Sinzinger, 1999). V našem souboru byl večer po LDL-aféze pozorován dokonce vzestup albuminu v moči u 70% nemocných a 1.den po LDL-aféze u 50% nemocných, změny však nebyly statisticky signifikantní. Možné zvýšení mikrovaskulární permeability pro albumin po LDL-aféze by mohlo být následkem systémových změn nastávajících stykem krve s extrakorporálním oběhem, například aktivací komplementového systému, která u výše zmiňované adsorpce na dextranulfát bez účasti živočišných bílkovin nemusí být tolik vyjádřena, jako u imunoadsorpce pomocí ovčích protilátek, u které byla tato reakce již dříve prokázána (Pták, 2004). Jinou příčinou může být hypoperfuze ledvin následkem přechodné hypotenze, která je častým vedlejším účinkem hemaférez a může být spjata také s aktivací komplementu.

Výsledky ukazují spojitost mezi mikrovaskulárním postižením, které je představováno mikroalbuminurii, aktivitou monocyto-makrofágového systému, reflektovanou hladinou neopterinu v moči a tíží hypercholesterolemie. Velikost hodnoceného souboru nemocných je důvodem k opatrnosti v interpretaci výsledků, nicméně se zdá, že močový neopterin večer (po LDL-aféze) a pokles neopterinu večer (po LDL-aféze) ve srovnání s ranní hodnotou jsou parametry, které si zaslouží další zkoumání, nejen u nemocných léčených LDL-aférou. Mikroalbuminurie, zvláště je-li stanovena jako index neopterin/kreatinin, je levným a snadno dostupným parametrem, jehož vyšetření neobtěžuje nemocného dvacetitýhodinovým

sběrem moči a přinese cenné informace o jeho kardiovaskulárním riziku. Naším doporučením je rozšířit užívání tohoto parametru v klinické praxi. Sledování mikroalbuminurie u pacientů léčených LDL-aférezou je ve světové literatuře zatím ojedinělé.

2.3.2.3. C-reaktivní protein, solubilní CD40 ligand, sérový neopterin a solubilní endoglin u nemocných léčených LDL-aférezou

Soubor nemocných byl popsán dříve v kapitolách *Soubor nemocných léčených LDL-immunoadsorpce nebo filtrační metodou*, **kontrolní soubor** byl popsán v kapitole *Kontrolní soubory*. Vzorky ke stanovení vyšetřovaných parametrů byla odebrána z periferní žíly těsně před a po dvou po sobě následujících LDL-aférezách.

Výsledky

Medián sérové koncentrace **hsCRP** kontrolního souboru byl 0,98 mg/l, rozmezí hodnot 0,16 - 2,98 mg/l, **sCD40L** 6 407 ng/l, rozmezí 2 884 - 9 130 ng/l, **neopterinu** 5,9 nmol/l, rozmezí 3,3 - 8,3 nmol/l a **solubilního endoglinu** 3,56 µg/l, rozmezí 1,89 - 6,37 µg/l. Sérové koncentrace vyšetřovaných parametrů u pacientů před a po první sledované LDL-aféze jsou uvedeny v *Tabulce 15*, koncentrace před a po následující LDL-aféze v *Tabulce 16*. Pokles koncentrací po první sledované LDL-aféze, vyjádřený v procentech preaféretické hodnoty, je uveden v *Tabulce 17*, po následující LDL-aféze v *Tabulce 18*. Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi změnami jednotlivých parametrů při první sledované a při následující LDL-aféze, ani statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolním souborem a souborem nemocných u koncentrací **hsCRP** ($p = 0,443$, resp. 0,792), **sCD40L** ($p = 0,955$, resp. 0,792) a u **neopterinu** ($p = 0,974$, resp. 0,955) před oběma LDL-afézami. Naopak koncentrace **endoglinu** nemocných byla před oběma LDL-afézami statisticky signifikantně zvýšena ($p = 0,002$ resp. $p = 0,038$), po obou sledovaných LDL-afézách se již od kontrolního souboru statisticky signifikantně nelišila ($p > 0,05$).

Sérová koncentrace **sCD40L** před první sledovanou LDL-aférou korelovala s celkovým cholesterolem ($r_s = 0,721$, $p = 0,016$) a LDL-cholesterolem ($r_s = 0,818$, $p = 0,002$, *Graf 8*) před LDL-aférou a LDL-cholesterolem po LDL-aféze ($r_s = 0,770$, $p = 0,007$). Při následující LDL-aféze korelovala koncentrace **sCD40L** před LDL-aférou pouze s LDL-cholesterolem po LDL-aféze ($r_s = 0,784$, $p = 0,005$) a negativně s velikostí poklesu LDL-cholesterolu po LDL-aféze ($r_s = -0,733$, $p = 0,013$), korelace s celkovým cholesterolem před LDL-aférou nebyla statisticky signifikantní ($r_s = 0,558$, $p = 0,067$).

U všech vyšetřovaných parametrů nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl mezi změnami sérových koncentrací, které nastaly v případě imunoadsorpce a v případě rheofézy. Koncentrací sledovaných parametrů před vstupem a po výstupu z eliminačních médií se statisticky signifikantně nelišily ($p > 0,05$).

Tabulka 15. Hladiny sledovaných parametrů před a po první sledované LDL-aféze

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

SD = směrodatná odchylka

Tabulka 16. Hladiny sledovaných parametrů před a po následující LDL-aféze

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

SD = směrodatná odchylka.

Tabulka 17. Pokles koncentrací sledovaných parametrů po první sledované LDL-aféře, vyjádřený v procentech preaferetické hodnoty

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

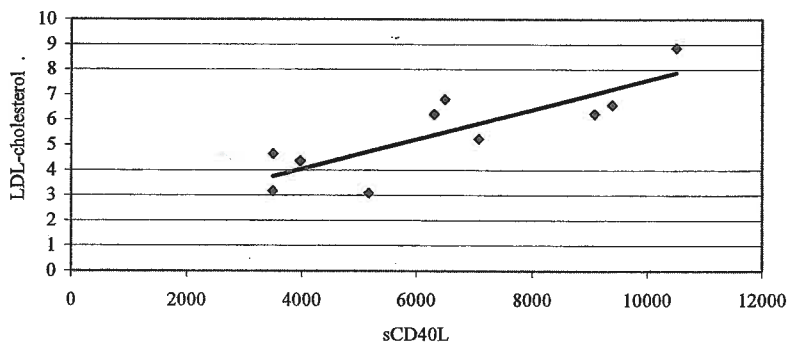
SD = směrodatná odchylka.

Tabulka 18. Pokles koncentrací sledovaných parametrů po následující LDL-aféře, vyjádřený v procentech preaferetické hodnoty

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

SD = směrodatná odchylka

Graf 8 . Vztah sérových koncentrací sCD40L a LDL-cholesterolu



$r_s = 0,818, p = 0,002$

Diskuse a závěr

Koncentrace CRP, sCD40L a neopterinu nebyla i přes přítomnost závažné poruchy metabolismu lipidů a prokázaného aterosklerotického postižení u nemocných zvýšena. Vysvětlením je pravděpodobně vliv dlouhodobé extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu, která, kromě k regresi aterosklerotických lézí (Matsuzaki, 2002), vede také ke snížení hladin CRP (Otto, 2004) a neopterinu (Vrecko, 1999). Dalším faktorem mohl být také efekt léčby statiny, o kterých je známo, že také snižují hladiny neopterinu, CRP (van Haelst, 2001, Ridker, 2005) a sCD40L (Semb, 2003, Kinlay, 2004, Malyszko, 2004). Zvýšená hladina endoglinu může být známkou přetrvávající aktivace/postižení endotelu.

Oproti sérovému neopterinu, neopterin v moči (popsaný v předchozí kapitole) byl u stejného souboru nemocných zvýšen. Vzorky nebyly odebrány ve stejnou dobu, ale s odstupem několika měsíců, což kromě obecně nestejných podmínek mohlo způsobit i snížení aktivity makrofágů následkem další stabilizace nemocných LDL-aferezou v době stanovení sérových hladin. Nelze vyloučit, že při dobré funkci ledvin může být zvýšená produkce neopterinu eliminována močí a nemusí dojít k elevaci jeho hladin v krvi. Výsledky mohou být ovlivněny také omezeným rozsahem vyšetřovaného souboru.

Reprodukovatelný pokles koncentrací CRP, sCD40L a solubilního endoglinu jako imunologicky aktivních molekul po LDL-afereze mohl nastat z části následkem snížení aktivity imunitního a endoteliálního systému vlivem eliminace aterogenních činitelů a zároveň mohl vést k alespoň krátkodobému a částečnému omezení prozánětlivé aktivity těchto molekul. Na poklesu se podílil diluce pacientovy krve náhradními roztoky. Měřením hladin v plazmě před a po výstupu z eliminačních médií jsme neprokázali eliminaci žádného z parametrů ani v kolonách, ani filtry, i když mírný vliv na pokles plazmatických hladin nelze touto metodou zcela vyloučit. Příčiny poklesu hladin jsou velmi pravděpodobně multifaktoriální a zahrnují výše zmíněné vlivy. LDL-afereza vedla k normalizaci hladin endoglinu. Sérová koncentrace neopterinu nebyla LDL-aferezou významně ovlivněna.

Pokles koncentrací CRP byl pozorován u různých extrakorporálních eliminačních metod LDL-cholesterolu i dalšími autory. Redukci koncentrací CRP o 65% popsali shodně u metody HELP Moriarty na souboru 4 pacientů a Wieland na souboru 13 pacientů (Moriarty, 2001, Wieland, 2002). Pokles o 56% a 53% v případech adsorpce na dextranulfát (DSA) publikovali u 6 pacientů Kobayashi a u 7 nemocných Kojima, nalezli však téměř stoprocentní eliminaci CRP v koloně (Kobayashi, 2002, Kojima, 2003). Srovnáním několika metod LDL-aferezy se zabýval Otto, který popsal průměrný pokles o 62% u metody HELP (10 pacientů), 56% u DSA (15 pacientů), a shodně 25% u imunoadsorpce (7 pacientů) a přímé adsorpce lipidů z plné krve (DALI) (6 pacientů) při srovnatelném poklesu LDL-cholesterolu (Otto, 2001). Pokles sérového neopterinu po proceduře byl pozorován u 30 nemocných léčených metodou HELP (Vrecko, 1999). Důvodem odlišných výsledků může být jiné spektrum nemocných, kteří narozdíl od našich pacientů měli vstupní hladinu neopterinu zvýšenou. Přesná délka léčby extrakorporální eliminací LDL-cholesterolu nebyla uvedena.

Nemocní s těžší hypercholesterolemií měli vyšší hladiny sCD40L, který je považován za nástroj řídicího vlivu T-lymfocytů na zánětlivé procesy v aterosklerotickém plátu (Mach, 1998). Pozorování je v souladu s dalšími autory, kteří popsali zvýšené hladiny sCD40L u nemocných hypercholesterolemií (Semb, 2003). Příčinou může být přímý vliv oxidovaných forem LDL, které v experimentu vedly k expresi CD40 a CD40L v aterosklerotickém plátu a jejichž hladina byla spolu s expresí obou molekul snížena statiny (Schonbeck, 2002). Dynamika CD40L nebyla v souvislosti s extrakorporální eliminací LDL-cholesterolu v literatuře popsána.

Velikost souboru nedovoluje stanovení jednoznačných závěrů a další výzkum je třeba k objasnění vztahů jednotlivých faktorů v procesu aterogeneze.

2.4. Splnění cílů a závěr

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

Vyhodnocením 1000 provedených LDL-aferez jsme specifikovali některé technické parametry LDL-aférez, jako jsou množství zpracované plazmy, průtoky krve a plazmy přístroji a spotřeba antikoagulačního roztoku.

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

Na základě klinického pozorování nemocných a vyhodnocení nežádoucích účinků LDL-aférez byly provedeny technické úpravy zařízení za účelem zlepšit komfort nemocných a byla doporučena maximální délka procedury s ohledem na únosnost procedury pro nemocné. I přes nespornou technickou náročnost, spočívající v součinnosti separátoru krevních tělísek a sekundárního přístroje, zajišťujícího imunoadsorpci LDL-částic z plazmy, je LDL-aféze v rukou zkušeného personálu bezpečnou metodou s minimem technických komplikací a limitovaným výskytem nežádoucích účinků převážně mírného charakteru. Tento předpoklad umožňuje dodržet rozsah i frekvenci jednotlivých procedur, což je základní podmínkou úspěchu léčby.

Výhodou imunoadsorpce oproti jiným metodám extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu je kromě specifity adsorpce také téměř neomezená eliminační kapacita systému, daná možností střídavě užívat dvě imunoadsorpční kolony. Hlavní nevýhodou stále zůstává vysoká cena imunoadsorpčních kolon a cena jednotlivých výkonů.

Prokázali jsme, že kolony LDL-Lipopak jsou z dlouhodobého hlediska spolehlivým a bezpečným typem adsorbentů s relativně stabilní efektivitou i selektivitou imunoadsorpce v průběhu užívání. Tento nálezn je jak z hlediska vyšetřovaného objektu, tak i z hlediska použité metodiky unikátní a získané výsledky sloužily v dalším výzkumu při vývoji počítačového programu, určeného k optimalizaci objemů plazmy, zpracovaných střídajícími se kolonami. Program byl vyvinut v rámci výzkumného projektu IGA MZ ČR NB/7006-3, jehož byla autorka této disertace spoluřešitelkou.

Z krátkodobého hlediska byl zhodnocen vliv jednotlivých procedur LDL-aférez na vybrané ukazatele aktivity aterogeneze a zhodnocen jejich vztah ke změnám koncentrací lipoproteinů během LDL-aférez i jejich vztahy k sobě navzájem. Z těchto výsledků jsou opět některé unikátní.

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

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

Závěrem lze říci, že LDL-aféze má kromě významné přímé redukce LDL-cholesterolu a Lp(a) i další „pleotropní účinky“, které se mohou podílet na omezení aktivity procesů aterogeneze a vést ke zlepšení klinického stavu nemocných. Příkladem je redukce hladin přímých účastníků aterogenetických pochodů, jako jsou selektivní adhezí molekuly, MCP-1, endoglin, CD40L a CRP, a zlepšení rheologických vlastností krve mimo jiné následkem snížení viskozity krve. Příčiny poklesu koncentrací těchto parametrů jsou multifaktoriální, s účastí diluce oběhu nemocného, v některých případech významné eliminace molekul v imunoadsorpční koloně a/nebo následkem omezení jejich produkce nebo urychleným odbouráváním. Vzhledem k vysoké specificitě eliminace molekul obsahujících apoB₁₀₀ odráží LDL-imunoadsorpce změny aktivity zánětlivých pochodů vyvolané samotným poklesem LDL-cholesterolu pravděpodobně ne selektivněji ze všech extrakorporálních metod eliminace LDL-cholesterolu. V eliminaci dalších účastníků zánětlivých dějů je však také pravděpodobně nejméně účinná.

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

Seznam použité literatury:

1. Agishi T. Anion-blood contact reaction (ABC reaction) in patients treated by LDL apheresis with dextran sulfate-cellulose column while receiving ACE inhibitors. *JAMA* 1994;271(3):195-6.
2. Albert C.M., Ma J., Rifai N., Stampfer M.J., Ridker P.M. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation* 2002; 105: 2595-9.
3. Auzeby A., Bogdan A., Krosi Z., Touitou Y. Time-dependence of urinary neopterin, a marker of cellular immune activity. *Clin Chem* 1988; 34(9): 1866-7.
4. Avanzas P., Arroyo-Espliquero R., Cosin-Sales J., Quiles J., Zouridakis E., Kaski J.C. Prognostic value of neopterin levels in treated patients with hypertension and chest pain but without obstructive coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2004; 93: 627-9.
5. Bambauer R Is lipoprotein (a)-apheresis useful? *Ther Apher Dial* 2005;9:142-7.
6. Bláha M. Extracorporeal LDL-cholesterol elimination in the treatment of severe familial hypercholesterolemia. *Acta Med (Hradec Králové)* 2003;46(1):3-7.
7. Bláha M., Krejsek J., Bláha V., Andrys J., Vokurková D., Malý J., Blažek M., Skořepová M. Selectins and monocyte chemotactic peptide as the markers of atherosclerosis activity. *Physiol Res* 2004;53(3):273-8.
8. Blann A.D., Wang J.M., Wilson P.B., Kumar S. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1996; 120: 221-6.
9. Borberg H., Gaczkowski A., Hombach V., Oette K., Stoffel W. Treatment of familial hypercholesterolemia by means of specific immunoabsorption. *J Clin Apheresis* 1988;4(2-3):59-65.
10. Borberg H. LDL-apheresis and LDL-elimination therapies. 2nd Seminar of Applied Technology in Haemapheresis (Proceedings). In: European School of Haematology. Paris: ESH, 1997: 1-8.
11. Borch-Johnsen K., Feldt-Rasmussen B., Strandgaard S., Schroll M., Jensen J.S. Urinary albumin excretion. An independent predictor of ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1992-7.
12. Bosch T., Lennertz A. Schmidt B., Fink E., Keller C., Toepfer M., Dräger J., Samtleben W. DALI apheresis in hyperlipidemic patients: biocompatibility, efficacy, and selectivity of direct adsorption of lipoproteins from whole blood. *Artif Organs* 2000;24(2):81-90.
13. Boyle J.J. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol* 2005;3(1):63-8.

14. Brndiar M. Mikroalbuminurie při poruše metabolismu lipidů. In: Brndiar M. Možné příčiny a časná detekce některých nefropatií. Habilitační práce. Vojenská Lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně v Hradci Králové. Hradec Králové, 2001, s. 33-48.
15. Burger P.C, Wagner D.D. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood* 2003;101(7):2661-6.
16. Cambien B., Wagner D.D. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med* 2004;10(4):179-86.
17. Deckert T., Feldt-Rasmussen B., Borch-Johnsen K., Jensen T., Kofoed-Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage: the Steno hypothesis. *Diabetologia* 1989; 32 219-226
18. Dewald O., Zymek P., Winkelmann K., Koerting A, Ren G., Abou-Khamis T., Michael L.H. Rollins B.J. Entman M.L., Frangogiannis N.G. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Regulates Inflammatory Responses Critical to Healing Myocardial Infarcts. *Circ Res* 2005;96(8): 881-9.
19. Draz N., Hamdy M.S., Gomaa Y., Ramzy A.A. Soluble P-selectin is a marker of plaque destabilization in unstable angina. *Egypt J Immunol* 2003;10(1):83-7.
20. Empen K., Otto C., Brodl U.C., Parhofer K.G. The effects of three different LDL-apheresis methods on the plasma concentrations of E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1. *J Clin Apher* 2002;17(1):38-43.
21. Erren M., Reinecke H., Junker R. Fobker M.Schulte H. Schurek J.O., Kropf J., Kerber S., Breithardt G., Assmann G., Cullen P. Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2355-63.
22. Forsblad J., Gottsater A., Persson K, Jacobsson L., Lindgrade F. Clinical manifestations of atherosclerosis in elderly population are related to plasma neopterin, NGAL and endothelin-1, but not to Chlamydia pneumoniae serology. *Int Angiol* 2002; 21: 173-9.
23. Frangogiannis N.G. The role of the chemokines in myocardial ischemia and reperfusion. *Curr Vasc Pharmacol* 2004;2(2):163-74.
24. Garcia-Moll X., Cole D., Zouridakis E., Kaski J.C. Increased serum neopterin: a marker of coronary artery disease activity in women. *Heart* 2000; 83: 346-50.
25. Giddings J.C. Soluble adhesion molecules in inflammatory and vascular diseases. *Biochem Soc Trans* 2005;33:406-8.
26. Goldstein J., Hobbs H., Brown M. Familial hypercholesterolemia. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, and D. Valle, editors. New York, USA: McGraw-Hill, 2001, p. 2863–2913.
27. Gurbel P.A., Kereiakes D.J., Serebruany V.L. Soluble P-selectin is not a surrogate marker for platelet P-selectin: evidence from a multicenter chest pain study group. *J Thromb Thrombolysis* 2000;10(1):15-22.
28. Gurfinkel E.P., Scirica B.M., Bozovich G., Macchia A., Manos E., Mautner B. Serum neopterin levels and the angiographic extent of coronary arterial narrowing in unstable angina pectoris and in non-Q-wave acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1999; 83: 515-8.
29. Hajilooi M., Sanati A., Ahmadiéh A., Ghofraniha A., Massoud A. Circulating ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin, and TNFRII in patients with coronary artery disease. *Immunol Invest* 2004;33(3):263-75.
30. Julius U., Metzler W., Pietzsch J., Fassbender T., Klingel R. Intraindividual comparison of two extracorporeal LDL apheresis methods: lipidfiltration and HELP. *Int J Artif Organs* 2002;25(12):1180-8.
31. Kinlay S., Schwartz G.G., Olsson A.G., Rifai N., Sasiela W.J., Szarek M., Ganz P., Libby P. Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL)

- Study Investigators. Effect of atorvastatin on risk of recurrent cardiovascular events after an acute coronary syndrome associated with high soluble CD40 ligand in the Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study. *Circulation* 2004; 110: 386-91.
32. Klausen K., Borch-Johnsen K., Feldt-Rasmussen B., Jensen G., Clausen P., Scharling H., Appleyard M., Jensen J.S. Very low levels of microalbuminuria are associated with increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes. *Circulation* 2004; 110(1): 32-5.
 33. Klingel R., Fassbender C., Fassbender T., Erdtracht B., Berrouschot J. Rheopheresis: rheologic, functional, and structural aspects. *Ther Apher* 2000;4(5):348-57.
 34. Kobayashi J., Katsube S., Shimoda M., Furuhashi K., Kitano S., Masuda M., Maruyama T., Shinomiya M. Single LDL apheresis improves serum remnant-like particle-cholesterol, C-reactive protein, and malondialdehyde-modified-low-density lipoprotein concentrations in Japanese hypercholesterolemic subjects. *Clin Chim Acta* 2002; 321: 107-12.
 35. Kojima S., Shida M., Yokoyama H. Changes in C-reactive protein plasma levels during low-density lipoprotein apheresis. *Ther Apher Dial* 2003; 7: 431-4.
 36. Lekatsas I., Kranidis A., Ioannidis G., Kalofoutis C., Tavernarakis A., Thalassinos N., Kalofoutis A., Anthopoulos L., Koulouris S. Comparison of the extent and severity of coronary artery disease in patients with acute myocardial infarction with and without microalbuminuria. *Am J Cardiol* 2004; 94: 334-337.
 37. Li C., Hampson I.N., Hampson L., Kumar P., Bernabeu C., Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 2000; 14: 55-64. A
 38. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420(6917):868-74.
 39. Mabuchi H., Koizumi J., Shimizu M., Kajinami K., Miyamoto S., Ueda K., Takegoshi T. Long-term efficacy of low-density lipoprotein apheresis on coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. Hokuriku-FH-LDL-Apheresis Study Group. : *Am J Cardiol* 1998;82(12):1489-95.
 40. Mach F., Schonbeck U., Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis* 1998; 137 Suppl:S89-95.
 41. Malyszko J., Malyszko J.S., Hryszko T., Mysliwiec M. Increased soluble CD40L levels are reduced by long-term simvastatin treatment in peritoneally dialyzed patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004;15: 463-7.
 42. Marx N., Imhof A., Froehlich J., Siam L., Ittner J., Wierse G., Schmidt A., Maerz W., Hombach V., Koenig W. Effect of rosiglitazone treatment on soluble CD40L in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Circulation* 2003;107:1954-7.
 43. Matsuzaki M., Hiramori K., Imaizumi T., Kitabatake A., Hishida H., Nomura M., Fujii T., Sakuma I., Fukami K., Honda T., Ogawa H., Yamagishi M. Intravascular ultrasound evaluation of coronary plaque regression by low density lipoprotein-apheresis in familial hypercholesterolemia: the Low Density Lipoprotein-Apheresis Coronary Morphology and Reserve Trial (LACMART). *J Am Coll Cardiol* 2002;40(2):220-7.
 44. McEver R.P., Moore K.L., Cummings R.D. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 1995;270(19):11025-8.
 45. Moreno P.R., Falk E., Palacios I.F., Newell J.B., Fuster V., Fallon J.T. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: Implications for plaque rupture. *Circulation* 1994; 90: 775-778.
 46. Moriarty P.M., Gibson C.A., Shih J., Matias M.S. C-reactive protein and other markers of inflammation among patients undergoing HELP LDL apheresis. *Atherosclerosis* 2001; 158: 495-8.

47. Myers D., Hawley A.E., Farris D.M., Wroblewski S.K., Thanaporn P., Schaub R.G., Wagner D.D., Kumar A., Wakefield T.W. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis *J Vasc Surg* 2003;38(5):1075-89.
48. Myers G.L., Rifai N., Tracy R.P., Roberts W.L., Alexander R.W., Biasucci L.M., Catravas J.D., Cole T.G., Cooper G.R., Khan B.V., Kimberly M.M., Stein E.A., Taubert K.A., Warnick G.R., Waymack P.P.; CDC; AHA. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: report from the laboratory science discussion group. *Circulation* 2004;110: e545-9.
49. Navab M., Berliner J.A., Watson A.D., Hama S.Y., Territo M.C., Lusis A.J., Shih D.M., Van Lenten B.J., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Fogelman A.M. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 831-42.
50. Neiken N.A., Coughlin S.R., Gordon D., Wilcox J.N. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 1991;88:1121-1127.
51. Otto C. and Schwandt P. C-reactive protein concentration is reduced by different types of LDL apheresis. *Atherosclerosis* 2001; 2 :81-82.
52. Otto C., Geiss H.C., Empen K., Parhofer K.G. Long-term reduction of C-reactive protein concentration by regular LDL apheresis. *Atherosclerosis* 2004;174: 151-6.
53. Padilla A., Moake J.L., Bernardo A., Ball C., Wang Y., Arya M., Nolasco L., Turner N., Berndt M.C., Anvari B., Lopez J.A., Dong J.F. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood* 2004;103(6):2150-6.
54. Pannacchiulli N., Cantatore F.P., Minenna A., Bellacicco M., Giorgino R., De Pergola G. Urinary albumin excretion is independently associated with C-reactive protein levels in overweight and obese nondiabetic premenopausal women. *J Intern Med* 2001; 250: 502-7.
55. Pták J. Aktivace komplementu. In: Pták J. Imunoadsorpce v léčbě myastenii gravis. Disertační práce. Lékařská fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové, 2004, s. 86-90.
56. Pulawski E., Mellwig K.P., Brinkmann T., Kleesiek K., Horstkotte D. Influence of single low-density lipoprotein apheresis on the adhesion molecules soluble vascular cellular adhesion molecule-1, soluble intercellular adhesion molecule-1, and P-selectin. *Ther Apher* 2002;6(3):229-33.
57. Rader J., Cohen J., Hobbs H.H. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J.Clin. Invest* 2003; 111: 1795-1803
58. Ridker P.M., Glynn R.J., Hennekens C.H. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation* 1998;97(20):2007-11. Citace A
59. Ridker P.M., Cushman M., Stampfer M.J., Tracy R.P., Hennekens C.H. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation* 1998; 97: 425-8. Citace B.
60. Ridker P.M., Buring J.E., Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation* 2001;103(4):491-5.
61. Ridker P.M., Cannon C.P., Morrow D., Rifai N., Rose L.M., McCabe C.H., Pfeffer M.A., Braunwald E. Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 (PROVE IT-TIMI 22) Investigators. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 2005; 352: 20-8.
62. Richter W.O., Jacob B.G., Ritter M.M., Suhler K., Vierneisel K., Schwandt P. Three-year treatment of familial heterozygous hypercholesterolemia by extracorporeal low-density lipoprotein immunoabsorption with polyclonal apolipoprotein B antibodies. *Metabolism* 1993;42(7):888-94.

63. Richer W.O., Donner M.G., Schwandt P. Three low density lipoprotein apheresis techniques in treatment of patients with hypercholesterolemia: a long-term evaluation. *Ther Apher* 1999;3:203-8.
64. Rosenson R.S., Tangney C.C., Levine D.M., Parker T.S., Gordon B.R. Association between reduced low density lipoprotein oxidation and inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 production in statin-treated subjects. *J Lab Clin Med* 2005;145(2):83-7.
65. Sampietro T., Tuoni M., Ferdeghini M., Ciardi A., Marraccini P., Prontera C., Sassi G., Taddei M., Bionda A. Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecule expression in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1997;96(5):1381-5.
66. Scalia R., Appel JZ 3rd, Lefer A.M. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(7):1093-100.
67. Semb A.G., van Wissen S., Ueland T., Smilde T., Waehre T., Tripp M.D., Froland S.S., Kastelein J.J., Gullestad L., Pedersen T.R., Aukrust P., Stalenhoef A.F. Raised serum levels of soluble CD40 ligand in patients with familial hypercholesterolemia: downregulatory effect of statin therapy. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 275-9.
68. Shankar A., Klein R., Moss S.E., Klein B.E., Wong T.Y. The relationship between albuminuria and hypercholesterolemia. *J Nephrol* 2004;17(5):658-65.
69. Shiga Y., Fujihara, K., Onodera, H. Complement activation as a cause of transient hypotension during plasmapheresis. *Artif Organs* 1998;22:1067-1069.
70. Schmaldienst S., Banyai S., Stulnig T.M., Heinz G., Jansen M., Hori W.H., Derfler K. Prospective randomised cross-over comparison of three LDL-apheresis systems in statin pretreated patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2000;151:493-9
71. Schonbeck U., Mach F., Libby P. CD154 (CD40 ligand). *Int J Biochem Cell Biol.* 2000; 32: 687-93.
72. Schonbeck U., Gerdes N., Varo N., Reynolds R.S., Horton D.B., Bavendiek U., Robbie L., Ganz P., Kinlay S., Libby P. Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation* 2002; 106: 2888-93.
73. Siami G.A., Siami F.S. Membrane plasmapheresis in the United States: a review over the last 20 years. *Ther Apher* 2001;5(4):315-20.
74. Simon T.L., McLeod B.C. Physiology of apheresis. In McLeod BC, Price TH, Drew MJ, eds. *Apheresis: Principles and Practice*. Bethesda, MD: AABB Press, 1997:67-84
75. Sinzinger H., Kritz H. LDL-apheresis improves microalbuminuria in patients with severe familial heterozygous hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1999; 143(1): 223-4.
76. Sinzinger H., Kritz H., Furberg C.D. Atorvastatin reduces microalbuminuria in patients with familial hypercholesterolemia and normal glucose tolerance. *Med Sci Monit* 2003; 9(7) :88-92.
77. Smith D.A., Zouridakis E.G., Mariani M., Fredericks S., Cole D., Kaski J.C. Neopterin levels in patients with coronary artery disease are independent of Chlamydia pneumoniae seropositivity. *Am Heart J* 2003; 146(1): 69-74.
78. Somers W.S., Tang J., Shaw G.D., Camphausen R.T. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* 2000;103(3):467-79.
79. Stefanec G.M.: Prädiktionsparameter extrakorporaler Eliminationstherapien an Modell der LDL-apherese. *Disertationsarbeit*, Eds.: Copy Team, Köln, Germany 1999, 118s. ISBN 80-7262-147-5.
80. Tanaka T., Nakamura Y., Nasuno A., Mezaki T., Higuchi K., Fukunaga H., Tsuchida K., Ozaki K., Hori T., Matsubara T., Aizawa Y. Plasma concentrations of monocyte

- chemoattractant protein 1 (MCP-1) and neopterin in the coronary circulation of patients with coronary artery disease. *Circ J* 2004;68(2):114-20.
81. Tataru M.C., Heinrich J., Junker R., Schulte H., von Eckardstein A., Assmann G., Koehler E. C-reactive protein and the severity of atherosclerosis in myocardial infarction patients with stable angina pectoris. *Eur Heart J* 2000; 21: 1000-8.
 82. Torzewski M., Rist C., Mortensen R.F., Zwaka T.P., Bienek M., Waltenberger J., Koenig W., Schmitz G., Hombach V., Torzewski J. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2094-9.
 83. Van Haelst P.L., van Doormaal J.J., May J.F., Gans R.O., Crijns H.J., Cohen Tervaert J.W. Secondary prevention with fluvastatin decreases levels of adhesion molecules, neopterin and C-reactive protein. *Eur J Intern Med* 2001; 12: 503-509.
 84. Van Haelst P.L., Liem A., van Boven A.J., Veeger N.J., van Veldhuisen D.J., Tervaert J.W. Usefulness of elevated neopterin and C-reactive protein levels in predicting cardiovascular events in patients with non-Q-wave myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2003; 92:1201-3.
 85. Vishnevetsky D., Kiyani V.A., Gandhi P.J. CD40 ligand: a novel target in the fight against cardiovascular disease. *Ann Pharmacother* 2004; 38: 1500-8.
 86. Vrecko K., Walzl M., Tafeit E., Reibnegger G. Relationship among serum and urine neopterin, fibrinogen, and other serum analytes in atherosclerotic patients and long-term effect of H.E.L.P. therapy. *Pteridines* 1999; 10: 190-196.
 87. Wieland H., Seidel D. A simple method for precipitation of low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1983;24:904.
 88. Wieland E., Schettler V., Armstrong V.W. Highly effective reduction of C-reactive protein in patients with coronary heart disease by extracorporeal low density lipoprotein apheresis. *Atherosclerosis* 2002; 162: 187-91.
 89. Yan J.C., Zhu J., Gao L., Wu Z.G., Kong X.T., Zong R.Q., Zhan L.Z. The effect of elevated serum soluble CD40 ligand on the prognostic value in patients with acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta* 2004; 343: 155-9
 90. Yanagisawa T., Otsubo O., Nozaki H., Inou T., Sugimoto H., Inoue S., Kuzuhara K. Massive proteinuria after renal transplantation treated with LDL-apheresis. *Transplant Proc* 1996;28(3):1482-3.
 91. Yuyun M.F., Khaw K.T., Luben R., Welch A., Bingham S., Day N.E., Wareham N.J. Microalbuminuria, cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity in a British population: the EPIC-Norfolk population-based study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2004; 11(3): 207-13.
 92. Zadák Z., Hyšpler R., Bakalář B., Crhová Š. Úloha cholesterolu a intermediárních metabolitů jeho syntézy v intenzivní péči a umělé výživě Vnitř. Lék. 2000;46(11):776 - 781.
 93. Zouvanis M., Raal F.J., Joffe B.I., Seftel H.C. Microalbuminuria is not associated with cardiovascular disease in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1995;113(2): 289-92.
 94. Zwaka T.P., Hombach V., Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 2001; 103: 1194-7.

Seznam publikací autora:

Původní práce autora

1. **Cermanová M.,** Melichar B., Solichová D, Bláha M., Bláha V., Blažek M., Mašín V., Cerman J., Jr., Zadák Z. Urinary neopterin and microalbuminuria in patients treated by low-density lipoprotein apheresis. Pteridines, přijato k tisku. **Impakt faktor 0,406.**
2. **Cermanová M.,** Bláha M., Bláha V., Havel E., Vyroubal P, Zadák Z, Blažek M., Malý J., Mašín V. LDL-aféřeza – hodnocení výsledků 1000 provedených procedur. Trans. Hemat. dnes 2005;3:116-121.
3. Bláha M., Mašín V., Stránský P., Bláha V., **Cermanová M.,** Malý J., Belada D. Optimization of the therapeutic procedure during LDL-apheresis - a computerized model. Transfus Apher Sci 2005;32(2):149-156. **Impakt faktor 0,853.**
4. Bláha M., Krejsek J., Bláha V., Andrys C., Vokurková D., Malý J., Blažek M., **Cermanová M.** Selectins and monocyte chemotactic peptide as the markers of atherosclerosis activity. Physiol Res 2004; 53: 273-278. **Impakt faktor 0,984.**
5. Bláha M., **Skořepová M.,** Mašín V., Špásová I., Paráková Z., Malý J., Žák P., Belada D., Turková A. The role of erythrocytapheresis in secondary erythrocytosis therapy. Clin. Hemorheol Micro 2002; 26(4), 273-276. **Impakt faktor 0,297.**
6. Bláha V., Solichová D., Bláha M., Havel E., **Pivokonská M.,** Zadák Z. Analysis of fatty acid and lipoprotein metabolism by GC and HPLC: effect of low-density lipoprotein apheresis. Microchimica Acta 2001; 136 (1-2): 23-29. **Impakt faktor 0,866.**
7. Bláha V., Solichová D., Bláha M., **Cermanová M.,** Hyšpler R., Vyroubal P, Havel E., Zadák Z. Non-lipid effects of the therapy by low-density lipoprotein apheresis on atherosclerosis, microvascular dysfunction and lipoperoxidation. In: Aterosklerosa 2005. Diagnostika, léčba, prevence v dětském věku. IV. interní klinika 1. LF UK Praha, Praha, 2005, s.11-17. ISBN: 80-239-5545-4.

Souhrnné články

1. **Cermanová M.,** Blažek M., Bláha M. LDL-aféřeza a další metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu. Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové 2004; 49 (7-8):243-251.
2. Blažek M., Bláha M., Malý J., **Cermanová M.,** Slovácěk L. Endotel v systému hemostázy. Část II: Diagnostika endotelové dysfunkce a léčebné možnosti. Trans. Hemat. dnes 2005; 11 (2): 35-39.
3. Bláha M., Zadák Z., Bláha V., Havel E., Vyroubal P., **Pivokonská M.,** Malý J., Žák P. LDL-apheresis as a method of extracorporeal LDL-cholesterol elimination. Atheroskleróza 2001;5(1):19-23.
4. Bláha M., Zadák Z., Bláha V., Havel E., **Pivokonská M.,** Vyroubal P., Malý J., Žák P. LDL-apheresis and Other Methods of Extracorporeal Elimination of Lipoproteins. Transfuzie dnes 2000; 6 (1):18-22.

Abstrakta a kapitoly ve sbornících

1. **Pivokonská M.,** Bláha M., Kmoníček M., Malý J., Jebavý L., Měřička P., Krejsek J., Žák P., Filip S. Increasing yield of progenitor cells and possibility of using unprocessed whole blood for transplantation. Bone Marrow Transplantation, 2000; 25 (1), 139. **Impact factor 2,111.**
2. **Cermanová M.,** Bláha M., Blažek M., Bláha V., Mašín V. Mikroalbuminurie a další ukazatele aktivity aterosklerózy u nemocných léčených LDL-aférezou. In: Sborník abstrakt XIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Olomouc: Rubico, 2005, s. 82. ISBN 80-7346-051-3. Podporováno výzkumným projektem MZ ČR NR/8505-3.

3. Cerman J., Cermanová M., Mottl R., Sobotka L., Malý J. Relative adrenal insufficiency in critically ill hematology patients. *Critical Care* 2005, 9 (suppl 1): P400. **Impact factor 1,9.**
4. Bláha M., Měříčka P., Cermanová M., Štěpánová V., Malý J., Vávra L., Jebavý L., Filip S. Potential risk of infection transmission during haematological progenitor cells transplantation. In: Sborník abstrakt XIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Olomouc: Rubico, 2005, s. 85. ISBN 80-7346-051-3. Supported by the research task MH CZ MZO 00179906.
5. Bláha M., Mašín V., Stránský P., Bláha V., Cermanová M., Malý J., Blažek M., Filip S. Computer controlled prediction of the optimal procedure during LDL-apheresis suitable for routine clinical practice. In: Sborník abstrakt XIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Olomouc: Rubico, 2005, s. 35. ISBN 80-7346-051-3. Supported by the research task MH CZ MZO 00179906.
6. Blažek M., Bláha M., Malý J., Cermanová M., Pecka M., Slováček L. Vyšetření hemostázy analyzátozem PFA-100 u nemocných s familiární hypercholesterolemií v léčbě LDL aferézou. In: Sborník abstrakt XIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Olomouc: Rubico, 2005, s. 97. ISBN 80-7346-051-3. Podporováno výzkumným projektem MZ ČR NR/8505-3, NR/8062-3.
7. Bláha M., Mašín V., Stránský P., Bláha V., Cermanová M., Malý J., Blažek M. Assessment of adsorber efficacy during LDL-apheresis. *Atherosclerosis* 2005; 6 (1): 102. Supported by the grants of IGA MH CZ 8062-3/2004, NR/8505-3. **Impact factor 3,603.**
8. Blažek M., Bláha M., Malý J., Bláha V., Cermanová M., Pecka M. Haemostasis and LDL-apheresis in familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2005; 6 (1): 102. Supported by the grants of IGA MH CZ 8062-3/2004. **Impact factor 3,603.**
9. Bláha M., Blažek M., Cermanová M., Bláha V., Solichová D., Malý J., Široký O. LDL-lowering immunoapheresis is well tolerated and safe procedure in familial hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* 2005; 6 (1): 102. Supported by the grants of IGA MH CZ 8062-3/2004. **Impact 3,603.**
10. Mašín V., Bláha M., Cermanová M., Bláha V., Stránský P., Malý J. Computer aided optimization and standardization of the procedures in lipid lowering immunotherapy. *Atherosclerosis* 2005; 6 (1): 114. Supported by the grants of IGA MH CZ 8062-3/2004, NR/8505-3. **Impact factor 3,603.**
11. Bláha M., Filip S., Žák P., Malý J., Maisnar V., Cermanová M., Blažek M., Belada D. Periferní progenitorové buňky krvetvorby pro transplantace (jejich mobilizace, techniky a rizika aferetického odběru, výhled do budoucna). In: Sborník abstrakt 1. Morfologický postgraduální kurz, LF UK Hradec Králové. Hradec Králové: Libor Dvořák, 2005, s. 1-3. ISBN 80-239-4381-2.
12. Bláha M., Cermanová M., Bláha V., Blažek M., Malý J., Solichová D. LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinaemia: side effects during long lasting therapy. In: Sobotka L., Teplan V., Těšínský P., Zadák Z.: Klinická výživa u postižení ledvin, metabolismus vápníku, intenzivní péče. Hradec Králové: Nucleus HK, 2005, s. 81-83. ISBN 80-86225-69-0. Supported by the grant of MH CZ NR/8062-3, 8505-3.
13. Bláha M., Andrýs C., Bláha V., Malý J., Tošovský M., Blažek M., Cermanová M. Level of sP-, sE-selectin, monocyte chemotactic peptide and endothelin-1 in the LDL-apheresis. In: Sobotka L., Teplan V., Těšínský P., Zadák Z. Klinická výživa u postižení ledvin, metabolismus vápníku, intenzivní péče. Hradec Králové: Nucleus HK, 2005, s. 84-85. ISBN 80-86225-69-0. Supported by the grant of MH CZ NR/8505-3.
14. Blažek M., Bláha M., Malý J., Pecka M., Cermanová M. LDL aferéza v terapii familiární hypercholesterolemie a pilotní vyšetření primární hemostázy analyzátozem PFA-100. In:

- Malý J. a Pecka M.: Trombóza a hemostáza 2005. Hradec Králové: HK Credit, 2005, s. 78. ISBN 80-86780-20-1. Podporováno výzkumným projektem MZ CR VZO 00179906.
15. Blažek M., Bláha M., Malý J., Pecka M., **Cermanová M.**: LDL aferéza v léčbě familiární hypercholesterolemie a změny parametrů hemostázy. In: Malý J. a Pecka M.: Trombóza a hemostáza 2005. Hradec Králové: HK Credit, 2005, s. 79. ISBN 80-86780-20-1. Podporováno výzkumným projektem MZ CR VZO 00179906.
 16. Blažek M., Bláha M., Malý J., **Cermanová M.**, Slovák L., Pecka M.: Změny hemostázy při léčbě familiární hypercholesterolemie LDL-aferézou. In: Sborník abstrakt XIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Olomouc: Rubico, 2005, s. 98. ISBN 80-7346-051-3. Podporováno výzkumným projektem MZ ČR MZ0 00179906.
 17. Malý J. Blažek M., Bláha M., Bláha V., Pecka M., **Cermanová M.** LDL-aferéza a endoteliální funkce (LDL-apheresis and endothelial function) In. Atherosclerosis 2005. Praha, IV. Interní klinika LFUK, 2005, s.4. ISBN 80-239-5545-4.
 18. **Cermanová M.**, Bláha M., Blažek M., Bláha V., Mašín V., Malý J. Vedlejší účinky a komplikace extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu. In: Sborník abstrakt XVIII. Olomoucké hematologické dny. Olomouc: Rubico, 2004, s. 28-29. ISBN 80-7346-023-8. Podporováno granty NB/7006-3, XB/8062/3, NB/6999-3.
 19. Mašín V., Bláha M., **Cermanová M.**, Stránský P., Bláha V., Solichová D., Malý J. Long-term aggressive lipid lowering therapy: strategy, optimization and standardization of the procedures. In: Sborník abstrakt XVIII. Olomoucké hematologické dny. Olomouc: Rubico, 2004, s. 28. ISBN 80-7346-023-8. Podporováno granty NB/7006-3, XB/8062/3, NB/6999-3.
 20. Bláha M., Ungermann L., Bláha V., Andrys C., Blažek M., **Cermanová M.**, Solichová D., Malý J. The influence of long-term aggressive lipid lowering with immunoapheresis on endothelial dysfunction and carotid intima-media thickness. In: Sborník abstrakt 10. Pracovní dny Společnosti pro transfúzní lékařství, Rožnov pod Radhoštěm. Hradec Králové, HK Credit, 2004, s. 34. ISBN 80-86780-10-04. Podporováno grantem IGA MZ NB/7006-3, NR/8062-3, NB/6933-3.
 21. 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. Atherosclerosis 2004. Praha: Společnost patologické a klinické fyziologie ČLS JEP, 2004. ISBN 80-239-3523-2. Supported by the grant IGA MH CZ NB/7006-3.
 22. Bláha M., Mašín V., Stránský P., Bláha V., **Cermanová M.**, Malý J., Belada D. Laboratory assessment of adsorber efficacy during LDL-apheresis. In: Laboratorní hematologie. Hradec Králové: HK Credit, 2004, s. 77-80. ISSN 80-86780-13-9. Supported by the grant MH CZ 7006-3.
 23. **Cermanová M.**, Bláha M., Mašín V., Blažek M., Malý J. Zhodnocení vedlejších účinků a tolerability léčby LDL-aferézou. In: Laboratorní hematologie. Hradec Králové: HK Credit, 2004, s. 83. ISSN 80-86780-13-9. Podporováno granty IGA MZ ČR 7006-3, NR8062-3, NB 6999-3.
 24. Mašín V., Bláha M., **Cermanová M.** Lipid lowering immunotherapy: computer aided optimization and standardisation of the procedures. In: Laboratorní hematologie. Hradec Králové: HK Credit, 2004, s. 88-100. ISBN 80-86780-13-9. Podporováno granty MH CZ 7006-3, XB8062-3, NB6999-3.
 25. Bláha M., Ungermann L., Bláha V., Solichová D., Andrys C., Blažek M., **Cermanová M.**, Malý J. Laboratory indicators of endothelial dysfunction and carotid intima-media thickness – changes after the extracorporeal long-term lipid lowering immunotherapy. In: Laboratorní hematologie. Hradec Králové: HK Credit, 2004, s. 81. ISSN 80-86780-13-9. Podporováno granty MH CZ 7006-3, XB8062-3, NB6999-3.

26. Bláha M., Cermanová M., Bláha V., Mašín V., Blažek M., Solichová D., Malý J. Adverse events during long lasting LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinemia. VIII. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův mlýn, 2. – 4. prosinec 2004. DMEV, 2004, Suppl. 3, s. 27. ISSN 1211-9326. Supported by the grants IGA MH CZ NB/7006-3, NB/8062-3, NB 6999-3.
27. Bláha M., Andrýs C., Bláha V., Krejsek J., Skořepová M., Malý J. Adhesive selectin molecules during extracorporeal cholesterol elimination. *Nutrition*, 2004; 20 (2): 245. ISSN 0899-9007. **Impact factor 1.425**. Supported by the grant: IGA MH CZ NB6549/3.
28. Skořepová M., Žák P., Benešová P., Voglová J., Kmoníček M., Jebavý L., Malý J. Regrese osteomyelosklerózy u nemocného s myelofibrosou po alogenní transplantaci periferních kmenových buněk. In: Sborník abstrakt XVII. Olomouckých hematologických dnů s mezinárodní účastí, Olomouc: Univerzita Palackého, 2003, s. 26-27.
29. Cerman J., Žák P., Skořepová M. Úspěšná léčba multiorgánového selhání u nemocné s akutní promyelocytární leukémií. In: Sborník abstrakt XVII. Olomouckých hematologických dnů s mezinárodní účastí, Olomouc: Univerzita Palackého, 2003, s. 21.
30. Žák P., Kmoníček M., Plíšková L., Jebavý L., Bláha M., Malý J., Skořepová M. Occurrence of CMV infection and disease in patients after non-myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-NST). *Bone Marrow Transplantation* 2003;31 (1), S98.
31. Skořepová M., Bláha M., Andrýs C., Bláha V., Krejsek J., Blažek M., Malý J. Selektivní adhesivní molekuly v průběhu LDL-aférezý. In Sborník X. česko – slovenská konference o tromboze a hemostáze. Hradec Králové: HK Kredit, 2003, s. 108. ISBN 80-903238-5-5.
32. Bláha M., Andrýs A., Bláha V., Krejsek J., Skořepová M., Filip S., Malý J., Blažek M. Adhesive molecules during extracorporeal cholesterol elimination. *The hematology Journal*, 2003;4 (2): 23. ISSN 1466-4860.
33. Bláha M., Zadák Z., Bláha V., Malý J., Skořepová M., Blažek M., Hyšpler R. LDL-apheresis – results of the long time treatment. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2003;46(2): 40. Supported by the grants of IGA MH CZ No NB/6549-3,6822-3, 7006-3.
34. Bláha M., Zadák Z., Bláha V., Malý J., Skořepová M., Mašín V. The computerized model of prediction, optimization and individualisation of LDL-apheresis. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2003;46(2): 41. Supported by the grants of IGA MH CZ No NB/7006-3.
35. 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. Vědecká konference LF dne 23. 1. 2002. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2002; 455(2): 48.
36. Bláha M., Měřička P., Žák P., Filip S., Štěpánová V., Vávra J., Malý J., Jebavý L., Kmoníček M., Drahošová M., Toušová K., Skořepová M. Danger of infection transmission by the transplanted graft – system of prevention. *Bone Marrow Transplantation*, 2002;29 (suppl. 2):136-137. **Impact factor 2,111**. Podporováno granty: MH CR NB 6822-3, 6549-3, FRVŠ 1716/G3.
37. Bláha M., Vokurková D., Skořepová M., Vávrová J., Filip S., Krejsek J., Kopecký, O. Malý J., Měřička P., Jebavý L. CD34+/CD41a+, CD34+/AC133+, CD34+/CD33-examination in cryopreserved peripheral stem cells concentrates suitable for improving the recovery prediction of hematopoiesis after transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2002;29(suppl.2):122. **Impact factor 2,111**. Podporováno granty: MH CR NB 6822-3, 6549-3, FRVŠ 1716/G3.
38. Bláha M., Malý J., Bláha V., Pecka M., Urbánková J., Skořepová M., Blažek M. Agregace trombocytů po snížení hladiny lipidů selektivní LDL-aférezou u familiární

- hypercholesterolemie. In: Zadák, Z.: Intenzivní metabolická péče a klinická výživa. Praha: Společnost klinické výživy a intenzivní metabolické péče České lékařské společnosti JEP, 2002, s. 143. ISBN 80-238-8244-9. Podporováno granty IGA NB 6549-3, 6822-3, 7006-3, 6999-3.
39. **Skořepová M.**, Bláha M., Vokurková D., Vávrová J., Filip S., Krejsek J., Kopecký O., Malý J., Měřička P., Vávra L., Jebavý L.: CD34+/CD41a+, CD34+/CD33-, CD34+/AC133+ cells examination from the cryopreserved peripheral blood stem cell concentrates. In: Cryopreservation and safe keeping of cells and tissues. Sborník abstrakt. Hradec Králové: Nucleus HK, 2002, s. 29-30. ISBN 80-86225-22-4.
 40. Bláha M., Krejsek J., Andrýs J., Vokurková D., Malý J., **Skořepová M.** sP-selectin, sE-selectin and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) levels during extracorporeal cholesterol elimination. In: Berger, J.: Cells IV. České Budějovice: Kopp Publ., 2002, s. 198. ISBN 80-7232-181-1. Supported by grant Czech MH NB/6549-3.
 41. **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.: Cells IV. České Budějovice: Kopp Publ., 2002, s. 97. ISBN 80-7232-181-1. Supported by grants Czech MH 6549-3, 7006-3.
 42. Bláha M., Malý J., Jebavý L., **Skořepová M.**, Žák P. Terapeutická plazmaferéza a imunoadsorpce. In: Sborník postgraduálních přednášek z 2. Celoštátní hematologicko-transfuziologické konference. Piešťany: 2001, s. 103-111.
 43. Bláha M., Filip S., Krejsek J., Vávrová J., **Skořepová M.**, Malý J. Nové poznatky o kmenové buňce a její léčebné využití. In: Sborník abstrakt z 2. Celoštátní hematologicko-transfuziologické konference. Piešťany: 2001, s. 46.
 44. Bláha M., Filip S., **Skořepová M.**, Maisnar V., Malý J., Vávrová J., Jebavý L., Žák P., Měřička M. Improved yield of stem cells for transplantation in lymphomas and myelomas. In: Sborník abstrakt z 2. Celoštátní hematologicko-transfuziologické konference. Piešťany 2001, s. 47.
 45. Bláha M., Malý J., Bláha V., Jebavý L., **Skořepová M.**, Žák P. Plazmaferéza a specifitější léčebná modifikace, imunoadsorpce. In: Trombóza a hemostáza. Hradec Králové: HK Credit, 2001, s. 62–70. ISBN 80-902753-4-6.
 46. **Skořepová M.**, Bláha M., Vávrová J., Vokurková D., Malý J., Filip S. Pokus o přesnější recovery hematopoézy po transplantaci podle kvality koncentrátu kmenových buněk. In: Trombóza a hemostáza. Hradec Králové: HK Credit, 2001, s. 123a. ISBN 80-902753-4-6.
 47. Paráková Z., Bláha M., Mašín V., Koblížek V., Voňková V., Malý J., **Skořepová M.** Léčba polyglobulie u plicních chorob erythrocytaferézou (výsledky za 5 let). In: Tuberkulóza, respirační insuficience, karcinom plic, ošetřovatelství. Hradec Králové: Nucleus HK, 2001, s. 76-79. ISBN 80-86225-13-5.
 48. Bláha M., Paráková Z., Mašín V., Špásová I., Koblížek V., Malý J., **Skořepová M.** Erythrocytaferéza v léčbě polyglobulie. In: Tuberkulóza, respirační insuficience, karcinom plic, ošetřovatelství. Hradec Králové: Nucleus HK, 2001, s. 69-79. ISBN 80-86225-13-5.
 49. **Skořepová M.**, Bláha M., Filip S., Maisnar V., Voglová J., Žák P., Kmoníček M., Malý J., Měřička P. Rostoucí výtěžky separace periferních kmenových buněk pro transplantaci. In: Sborník abstrakt XV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Olomouc: Epava Olomouc, 2001, s. 10. Podporováno granty FRVS 1761/G3, IGAMZ CR 5205-3, NB6549-3, 6822.
 50. **Skořepová M.**, Bláha M., Vokurková D., Vávrová J., Krejsek J., Kopecký O., Malý J., Měřička P. Improved recovery prediction of thrombopoiesis after peripheral blood stem cell transplantation. In: Berger, J.: Cells IV. České Budějovice: Kopp Publ., 2001, s. 206. ISBN 80-7232-154-4.

51. Bláha M., Paráková Z., Špásová I., Malý J., **Skořepová M.**, Jebavý L.: Erythrocytapheresis – a symptomatic therapeutic possibility for polyglobulic patients with pulmonary diseases. In: Berger, J.: Cells IV. České Budějovice: Kopp Publ., 2001, s. 208-209. ISBN 80-7232-154-4.
52. Bláha M., **Skořepová M.**, Filip S., Maisnar V., Voglová J., Žák P., Kmončák M., Malý J., Měřička P. Increasing yields in peripheral stem cell separations for transplantation. In: Proceedings of XIII. Congress of the European Society for Haemapheresis. Riva del Garda, Italy: 2001. s. 177.
53. Bláha M., Solichová D., Bláha V., **Skořepová M.**, Žďánský P., Havel E., Vyroubal P., Malý J., Zadák Z.: LDL-apheresis: impact upon composition of atherogenic lipoproteins. In: Proceedings of XIII. Congress of the European Society for Haemapheresis. Riva del Garda, Italy: 2001. s. 178.
54. **Skořepová M.**, Bláha M., Mašín V., Hrubá I., Paráková Z., Špásová I., Malý J. Therapeutic application of erythrocytapheresis. In: Proceedings of XIII. Congress of the European Society for Haemapheresis. Riva del Garda, Italy: 2001. s. 204.
55. **Skořepová M.**, Bláha M., Mašín V., Hrubá I., Malý J. Erythrocytapheresis – our twenty years experience. In: Kniha Abstrakt, Český a slovenský hematologický a transfuziologický kongres s mezinárodní účastí. Praha, 2002, O45.
56. Bláha M., Pecka M., Bláha V., Malý J., Ženatová M., Urbánková J., **Skořepová M.**, Blažek M. Aktivita krevních destiček po LDL-aféře u familiární hypercholesterolemie. Diabetologie metabolismus endokrinologie výživa 2001;4(4): 44. ISSN 1211-9326.
57. Bláha M., Solichová D., Bláha V., **Pivokonská M.**, Žďánský E., Havel E., Vyroubal P., Zadák Z., Malý J. LDL-apheresis: the impact upon biochemical composition of atherogenic lipoproteins. In: J. Berger: Cells II. České Budějovice: Nakladatelství Kopp, 2000, s. 101–02. ISBN 80-7232-120-X.
58. **Pivokonská M.**, Bláha M., Filip S., Maisnar V., Vávrová J., Malý J., Jebavý L., Měřička P., Krejssek J., Žák P. Cells from whole blood for transplantation (improved priming and yield of progenitor cells). In: J. Berger: Cells II. České Budějovice: Nakladatelství Kopp, 2000, s. 175. ISBN 80-7232-120-X.
59. Bláha M., Filip S., **Pivokonská M.**, Maisnar V., Vávrová J., Malý J. Peripheral stem cells for transplantation – improved yield in lymphomas and myeloma multiplex. In: „Lymphoma 2000“ – Proceedings of first international symposium on biology and treatment of aggressive lymphomas. Saarland, Germany: University of Saarland, 2000, s. 37.
60. Musilová B., Täubnerová E., Bláha M., **Pivokonská M.** Komplikace hemaferez. In: Nové trendy v ošetrovatelství. Hradec Králové: Nucleus, 1999, s.124–127. ISBN 80-86225-01-1.