

Možnosti využití vyšetření funkčních změn primární hemostázy analyzátozem PFA-100 a modifikovaným vyšetřením agregace trombocytů v racionalizaci léčby nemocných s familiární hypercholesterolemií léčených mimotělní eliminací LDL-cholesterolu*

Martin Blažek, Milan Bláha, Jaroslav Malý, Vladimír Bláha, Melanie Cermanová, Vladimír Mašín, Miroslav Pecka, Ladislav Slováček

II. interní klinika, Oddělení hematologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Univerzita Karlova v Praze – Lékařská fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, Česká republika

Blažek M, Bláha M, Malý J, Bláha V, Cermanová M, Mašín V, Pecka M, Slováček L (II. interní klinika, Oddělení hematologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Univerzita Karlova v Praze – Lékařská fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, Česká republika). **Možnosti využití vyšetření funkčních změn primární hemostázy analyzátozem PFA-100 a modifikovaným vyšetřením agregace trombocytů v racionalizaci léčby nemocných s familiární hypercholesterolemií léčených mimotělní eliminací LDL-cholesterolu.** *Cor Vasa* 2007;49(9):303–311.

Úvod: LDL-aféze je metoda extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu, používaná u pacientů se závažnou hyperlipidemií, která je rezistentní na farmakoterapii a dietní opatření. Metoda je náročná medicínsky i ekonomicky a je proto žádoucí hledat ukazatele určující optimální intenzitu i četnost jednotlivých léčebných procedur. Z dlouhodobého hlediska jsou ukazatele jasné (zobrazovací metody), chybí však vhodné markery aktuálního stavu. Podle některých prací dochází k normalizaci poměrů aktivovaných trombocytů. Není však jasné, do jaké míry jsou funkční změny krevních destiček vyjádřeny, jak jsou významné a jak brzy se po léčebné proceduře poměry opět horší. Vyšetření funkčních změn krevních destiček před léčebnou LDL-afézou a po ní je potencionálně rychlé a přínosné pro zprostředkované sledování aktivity aterogeneze a tedy přínosné k medicínsky i ekonomicky optimálnímu vedení léčby LDL-afézou. Určení vhodných ukazatelů účinnosti této léčby na dostatečné snížení aktivity aterosklerózy stále zůstává nedořešeným problémem.

Metodika: Bylo použito vyšetření analyzátozem Dade Behring PFA-100 (Marburg, Německo), který umožňuje měřit destičkami zprostředkovanou hemostázu z nesrážlivé krve. Metoda napodobuje aktivaci destiček mechanickou zátěží a kolagenem *in vivo*. Sledujeme 9 pacientů s familiární hypercholesterolemií (FH) (4 ženy a 5 mužů), medián věku 55 let, z nich 2 homozygoti.

Vyšetření agregací trombocytů byla prováděna standardním způsobem na agregometru APACKS-4 (Helena Laboratories, Beaumont, USA). Předně jsme ve výzkumné sondě provedli standardní spektrum agregační vyšetření, kde jediné změny byly naznačeny po stimulaci ADP. Proto jsme dále vyšetřili agregace s použitím 3 různých ředění ADP – konkrétně 2,5 mol/l, 1,25 mol/l a 0,625 mol/l.

Výsledky: Ve všech případech se po separaci hodnoty CT (Closure Time) prodloužily, avšak míra prodloužení CT po procedurách nedosáhla statistické významnosti ($p < 0,14$). Nebyly rozdíly mezi homozygoty a heterozygoty. V modifikovaných testech agregace trombocytů dochází po aféze ke zmenšení strmosti agregační křivky a ke snížení maximální amplitudy ($p < 0,05$).

Závěr: Procedura LDL-afézy u nemocných s familiární hypercholesterolemií zlepšuje poměry primární hemostázy. Modifikovaná vyšetření agregace trombocytů by mohla být dalším ukazatelem vhodným ke sledování aktivity procesu u těchto těžce nemocných. Jde však o relativně technicky a ekonomicky náročná vyšetření. Vyšetření analyzátozem PFA-100 je v klinické praxi relativně lépe dostupné, ale podle prvních zkušeností se zdá samostatně nevhodné pro aktuální posouzení optimální intenzity jednotlivých procedur LDL-afézy.

Klíčová slova: Hemostáza – PFA-100 – LDL-aféze – Ateroskleróza

Blažek M, Bláha M, Malý J, Bláha V, Cermanová M, Mašín V, Pecka M, Slováček L (Department of Internal Medicine II, Division of Hematology, Hradec Králové University Hospital and Charles University in Prague – Medical School at Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic). **Potential uses of assessment of functional changes in primary hemostasis by the PFA-100 analyzer and modified assessment of platelet aggregation in rationalizing management of patients with familiar hypercholesterolemia treated by extracorporeal LDL-cholesterol elimination.** *Cor Vasa* 2007;49(9):303–311.

*Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR č. 8505-3.

Background: LDL-apheresis is a method for extracorporeal LDL-cholesterol elimination, employed in patients with severe hyperlipidemia refractory to pharmacotherapy and dietary measures. As the method is medically demanding and costly, it is desirable to identify parameters defining optimal intensity and frequency of individual therapeutic sessions. While the tools for long-term evaluation have been identified (imaging methods), appropriate markers of the current status are not yet available. Some studies have suggested normalization of activated platelet function. However, it is not clear to what extent the changes in platelet function are expressed, how important the changes are, and how soon the function deteriorates again after a therapeutic session. Assessment of platelet function changes prior to and after LDL-apheresis is potentially fast and beneficial for indirect monitoring of atherogenesis and, hence, contributes to the medically and economically optimal guidance of therapy using LDL-apheresis. Appropriate tools for determining the efficacy of this therapeutic option in adequate reduction of atherosclerosis activity are yet to be identified.

Method: The assessment was performed using a Dade Behring PFA-100 analyzer (Germany), allowing to measure platelet-mediated hemostasis in non-coagulable blood. The method mimics *in vivo* platelet activation by mechanical stress and collagen. Our group of patients included 9 individuals (4 women and 5 men) with familiar hypercholesterolemia, with a mean age of 55 years; of these 2 were homozygotes.

Platelet aggregation was examined by standard method on an APACKS-4 aggregometer (Helena Laboratories, Beaumont, USA). First, a standard spectrum-aggregation measurement was performed in a test probe with the only changes suggested following stimulation with ADP. Next, aggregation was determined using 3 different ADP dilutions, specifically 2.5 mol/L; 1.25 mol/L a 0.625 mol/L.

Results: While closure time (CT) increased in all cases upon separation, the degree of post-procedural CT increase did not reach statistical significance ($p < 0.14$). No differences between homozygotes and heterozygotes were seen. In modified tests of platelet aggregation, apheresis was followed by decreases in the aggregation curve slope and maximum amplitude ($p < 0.05$).

Conclusion: In patients with familiar hypercholesterolemia, LDL-apheresis results in primary hemostasis normalization. Modified assessment of platelet aggregation might become another suitable tool for monitoring the activity of the process in these severely-ill patients. However, the assessment is a fairly technically demanding and costly procedure. While being relatively more available, judging by initial experience, separate examination using the PFA-100 analyzer seems unsuitable for current assessment of the optimal intensity of individual LDL-apheresis procedures.

Key words: Hemostasis – PFA-100 – LDL-apheresis – Atherosclerosis

Adresa: MUDr. Martin Blažek, Ph.D., II. interní klinika, Oddělení klinické hematologie, FN Hradec Králové, Sokolská 408, 500 05 Hradec Králové, Česká republika, e-mail: martin_blazek@volny.cz

ÚVOD

Proces aterosklerózy a familiární hypercholesterolemie (FH)

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

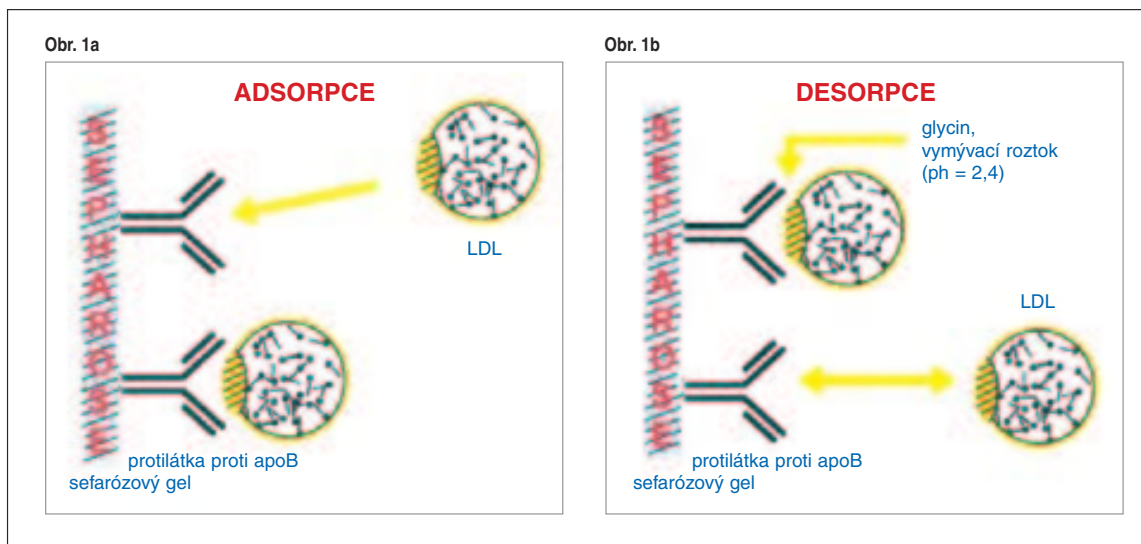
LDL-aféřez je jednou z metod extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu, používá se u pacientů se závažnou hyperlipidemií, která je rezistentní na farmakoterapii a dietní opatření. Mezi takové patří někteří nemocní s vrozenou poruchou metabolismu lipidů.⁽⁷⁾ Familiární hypercholesterolemie (FH) je do-

minantně dědičná choroba, jejíž podstatou je postižení genu pro LDL-receptor. Zvýšená koncentrace LDL-částic v krvi nemocného je příčinou akcelerované aterosklerózy a vede k předčasným úmrtím na ischemickou chorobu srdeční. Heterozygotní jedinci mají zhruba 50 % normálního počtu funkčních LDL-receptorů, koncentrace LDL-cholesterolu se pohybuje kolem 9–14 mmol/l. Výskyt v naší populaci je 1 : 500. Nemocní mívají předčasně aterosklerotické změny cév a mohou mít šlachové xantomy, xantelazmata na víčkách a arcus cornea senilis. Terapie zahrnuje dietní a režimová opatření a medikamentózní léčbu.⁽⁸⁾ Pouze u 3–5 % nemocných konzervativní terapie selhává. Výskyt homozygotních forem je 1 : 1 000 000. Nízké aktivitě jejich reziduálních LDL-receptorů odpovídají i zvýšení koncentrace LDL-cholesterolu v plazmě, které dosahuje mezi 16 až 30 mmol/l. Ischemická choroba srdeční se u těchto jedinců vyskytuje již v dětství a mnozí na ni umírají již kolem 20. roku života. Tito pacienti špatně reagují na konvenční léčbu. Metabolická účinnost LDL-aféřezy koreluje se zpomalením progresu či dokonce s regresí koronární aterosklerózy.⁽⁷⁾

Léčebná LDL-aféřez a familiární hypercholesterolemie

Přínos extrakorporálních eliminačních metod v terapii indikovaných pacientů je nepochybný a podrobný rozbor této problematiky se rozsahem vymyká náplni této práce.

Léčebná LDL-aféřez je metodou specifickou a selektivní, relativně bezpečnou a v klinické praxi účinnou. Synonymem je v odborné terminologii označení vazebná chromatografie či imunoadsorpce. V roce 1981 ji popsal Stoffel⁽⁹⁾ a v témže roce ji Borberg zavedl do klinické praxe. Podstatou metody LDL-aféřezy je



Obr. 1 Princip LDL adsorpce

imunoadsorpce (obrázky 1 a, 1 b). Plazma je nejprve oddělena separátorem z plné krve a po smísení s antikoagulačním roztokem je kontinuálně promývána ve speciální koloně, v níž jsou na povrchu sefárového gelu fixovány ovčí protilátky. Tyto protilátky jsou namířené proti apolipoproteinu B100 (apoB100), který tvoří hlavní proteinovou složku LDL-cholesterolu.^(10,11) V systému jsou umístěny a střídavě zapojeny dvě kolony a tak v době, kdy v jedné koloně dochází k eliminaci LDL-částic adsorpcí na protilátky z protékající plazmy, ve druhé koloně dochází k čištění promýváním pufrům o nízkém pH. V kyselém prostředí se uvolní a odplaví LDL-cholesterol, probíhá tzv. desorpce. Tak je možno každou kolonu opakovaně regenerovat a použít v praxi až ke 100 cyklům výše popsané terapie.⁽¹⁰⁾ Provádění účinných výkonů je bezpečné v rukou specializovaných pracovníků.

LDL-aféze je v současné době považována za metodu relativně bezpečnou a účinnou. V průběhu jedné extrakorporální léčebné procedury může být v závislosti na použité technice snížena koncentrace LDL-cholesterolu o 60 až 80 % výchozí hodnoty a redukována je také koncentrace Lp(a), jenž je také považována za významný aterogenní rizikový faktor u pacientů s FH.⁽¹²⁾ Současně bylo u poloviny pacientů popsáno zvýšení HDL-cholesterolu až o 60 %.⁽¹³⁾ Velká pozornost je věnována sledování účinku dlouhodobé léčby na cévní, zejména koronární systém, kde byly doloženy příznivé výsledky.^(6,7,14) Zlepšení ischemie myokardu a stabilizace až regrese procesu aterosklerózy byla popsána i dalšími autory u pacientů s FH v dlouhodobé léčbě LDL-aférou.⁽¹⁴⁾

U homozygotů FH je LDL-aféze považována za život zachraňující výkon.⁽¹¹⁾ Účinnost léčby ostatních nemocných s FH lze posoudit obtížně (interpretace je limitována věkem, přidruženou polymorbiditou atd.), ale řada prací také zde prokázala léčebný přínos LDL-aférou.⁽¹¹⁾ Igarashi a spol.⁽¹⁵⁾ uvádějí pozitivní změny již po jedné proceduře LDL-aférou u pacientů s hypercholesterolemií, kde stupeň redukce LDL-cholesterolu přímo koreluje se zlepšením fyziologických

funkcí endotelu (resp. s úpravou známek endotelové dysfunkce). Tamai a spol.⁽¹⁶⁾ popisují zvýšení endotelové syntézy NO po jedné LDL-aféze a korelaci s mírou dosažené vazodilatace v reakci na infuzi ACH (acetylcholin). Tyto práce dokládají, že i jedna terapeutická LDL-aféza vede v krátkém intervalu k pozitivním změnám v úpravě fyziologických funkcí cévní výstelky, endotelu. Další práce popisují příznivý účinek LDL-aférou ve smyslu zvýšení rezistence LDL k oxidaci,⁽¹⁷⁾ snížení exprese leukocytárních adhezních molekul,⁽¹⁸⁾ průkazná je normalizace aktivovaných funkcí trombocytů⁽¹⁹⁾ a zlepšení reologických poměrů.⁽²⁰⁾ To vše může vést ke zpomalení progresu či dokonce k regresi sklerotických změn a ke stabilizaci aterosklerotického plátu se všemi pozitivními důsledky. Následkem výrazného snížení plazmatických koncentrací a zásob cholesterolu v organismu se u nemocných s funkčními LDL-receptory zvyšuje jejich počet v buněčných membránách.⁽¹¹⁾ V tomto smyslu byl pozorován výrazný synergický účinek s farmakoterapií statiny.⁽¹¹⁾ Pravidelná léčba LDL-aférou zlepšuje perfuzi myokardu a snižuje němou či zátěžovou ischemii,⁽²¹⁾ to je přisuzováno zlepšení poměrů v mechanismu endotelem zprostředkované vazodilatace.⁽²²⁻²⁴⁾ V závislosti na použité eliminační metodě může být snížena také plazmatická koncentrace fibrinogenu a viskozita, což má pozitivní vliv na reologické poměry.^(10,25)

SOUBOR NEMOCNÝCH A METODIKA

Sledovaný soubor (tabulka 1) tvoří 9 pacientů s FH. V tomto počtu jsou zastoupeny 4 ženy a 5 mužů ve věku 17–59 let (průměr 46,4 let a medián 55 let). Genetická porucha metabolismu lipidů je zde zastoupena u dvou nemocných v homozygotní formě a v heterozygotní podobě u sedmi pacientů, z toho jedenkrát se jedná o familiární kombinovanou hyperlipidemii (FCHL). Uvedený soubor byl podroben co možno široké analýze, avšak zde prezentujeme pouze dílčí výsledky, další byly publikovány jinde.^(28,32)

Tabulka I
Soubor sledovaných pacientů

Pacient	Pohlaví	Věk (roky)	Hyperlipidemie	AS	ICHS	CMP	ICHDK
1	Žena	17	Homozygot FH	+	0	0	0
2	Žena	24	Homozygot FH	+	0	0	0
3	Muž	36	FH	+	+	0	0
4	Muž	54	FCHL	+	+	0	0
5	Muž	55	FH	+	+	0	0
6	Žena	56	FH	+	+	0	0
7	Muž	58	FH	+	0	0	0
8	Žena	59	FH	+	0	+	0
9	Muž	59	FH	+	0	+	+

FH – familiární hypercholesterolemie, FCHL – familiární kombinovaná hyperlipidemie, AS – prokázaná přítomnost aterosklerózy, ICHS – ischemická choroba srdeční, CMP – cévní mozková příhoda, ICHDK – ischemická choroba dolních končetin

Srovnáván byl klinický stav a laboratorní parametry v intervalech 3 měsíců při dlouhodobé léčbě. Odběry krve probíhaly cestou standardní venepunkce v péči stálého personálu separačního centra Oddělení klinické hematologie, a to před léčebnou LDL-aférezou i po ní. Odběrová média, označení a další zpracování biologického materiálu bylo v souladu s laboratorními standardy zúčastněných akreditovaných pracovišť, jenž mají atesty pro jednotlivá vyšetření a pracují dlouhodobě v systému GLP (Good Laboratory Practice) s odpovídající technikou (Oddělení klinické biochemie a diagnostiky, Ústav klinické imunologie a alergologie, Oddělení klinické hematologie FN Hradec Králové).⁽³³⁾

Při výběru a zařazení nemocných jsme postupovali v souladu s indikačními kritérii.^(9,34,35) Náš soubor nemocných s FH vznikl v roce 1996, od té doby je sledován a průběžně doplňován o nově indikované pacienty. Nemocní jsou léčeni a sledováni 2–9 let ($3,6 \pm 0,5$ let; mean \pm SD), tedy relativně dlouhou dobu. Mají některé orgánové komplikace aterosklerózy (aortální stenóza, ischemická choroba srdeční, cévní mozková příhoda, ischemická choroba dolních končetin) a jsou dlouhodobě ve společné péči II. interní kliniky – Oddělení klinické hematologie (OKH) Kliniky gerontologické a metabolické Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK) Vedle standardního vedení dietních i režimových opatření byli a jsou tyto pacienti zajištěni kombinovanou farmakologickou terapií podle běžných zásad. Současně probíhá dlouhodobá a pravidelná léčba LDL-aférezou za standardních opatření a podmínek akreditovaného separačního centra OKH FN HK. Intervaly mezi léčebnými procedurami byly řízeny podle pravidel, uznávaných většinou současně literatury;⁽⁹⁾ zásadní význam má podstatné snížení hodnot celkového cholesterolu, a to pod 2 mmol/l po proceduře s tím, že do další procedury se má zvýšit jeho hodnota tak, aby se průměrná hodnota (mean cholesterol level) u heterozygotů rovnala horní hodnotě normy. U homozygotů toho nelze docílit; zde je uznávaným nejkratším intervalem mezi procedurami jeden týden. Kratší interval není obvykle možný, protože to netolerují pacienti, ani stav žil (opakované punkce separačními kanyly). V souboru byl interval mezi dvěma léčebnými LDL-aférezami $17,5 \pm 1,6$ dnů (mean \pm SD). Používáme adsorbéry Lipopak 400 (Pocard, Rusko). Technické podrobnosti o procedurách jsme uvedli jinde.^(10,32,35)

Shromážděné údaje byly statisticky vyhodnoceny na odborném pracovišti Univerzity Karlovy v Praze,

Lékařské fakulty v Hradci Králové. Použit byl software: Statistica 6.0, StatSoft. Inc. (Tulsa, USA).

POUŽITÝ VÝZKUMNÝ PROGRAM

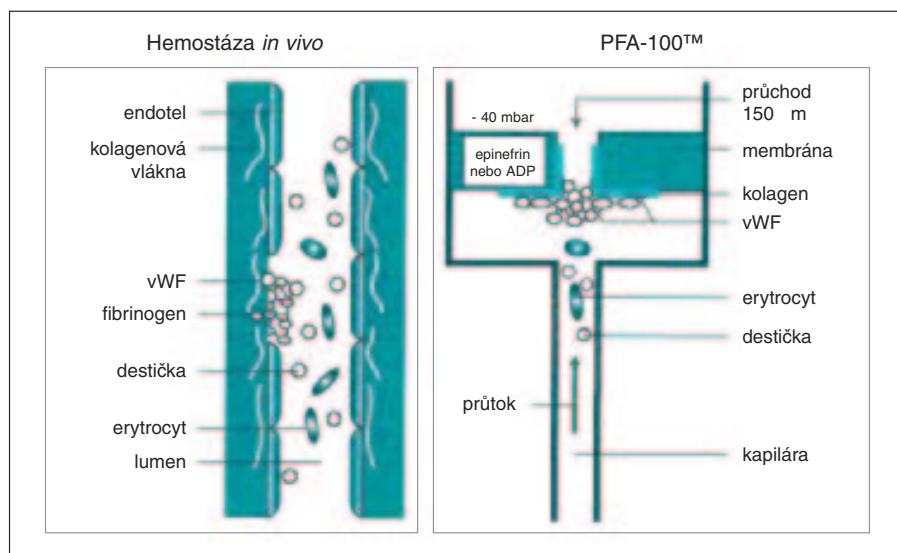
Hypotéza možné racionalizace léčby LDL-aférezou pomocí sledování funkčních změn primární hemostázy

LDL-aférezá je metoda náročná medicínsky i ekonomicky a je proto žádoucí hledat ukazatele určující optimální intenzitu i četnost jednotlivých léčebných procedur. Z dlouhodobého hlediska jsou ukazatele jasné (zobrazovací metody), chybí však vhodné markery aktuálního stavu. Naše pracoviště provádí LDL-aférezu jako v současné době jediné v ČR a má během 10 let zkušenosti zhruba s 1 200 procedurami. Během minulých let jsme vyzkoušeli řadu markerů pro optimální řízení terapie, které podle literárních nebo vlastních zkušeností připadaly v úvahu. Oproti literárním údajům^(26,27) se ukázaly některé z nich jako nevhodné (např. velikost krevních destiček nebo jejich hematokrit), jiné sice vhodnější, ale hůře kvantitativně hodnotitelné nebo obtížněji vyšetřitelné jak po stránce technické, tak ekonomické – např. některé selektiny, MCP-1, endotelin-1⁽²⁸⁾ a další. Určení vhodných ukazatelů účinnosti této léčby na dostatečné snížení aktivity aterosklerózy stále zůstává nedořešeným problémem.⁽²⁹⁾

V procesu komplikací aterosklerózy hraje významnou roli aktivita primární hemostázy a podle některých prací dochází k normalizaci poměrů aktivovaných trombocytů. Vyšetření funkčních změn krevních destiček před léčebnou LDL-aférezou a po ní je potenciale rychle a přínosně pro zprostředkované sledování aktivity aterogeneze, a tedy přínosné k medicínsky i ekonomicky optimálnímu vedení léčby LDL-aférezou. Jako součást analýzy primární hemostázy se může uplatnit vyšetření agregace trombocytů.^(29,30) V posledních letech se naděje vkládaly do nových metodik – např. vyšetření komerčním analyzátozem Dade Behring PFA-100 – Marburg, Německo (PFA, Platelet Function Analysis).⁽³¹⁾ To vedlo k hypotéze, že by uvedené vyšetření mohlo být vhodným markerem též ke sledování účinnosti LDL-aférezы. Cílem naší práce bylo tuto hypotézu ověřit.

Standardní a modifikovaná vyšetření agregace trombocytů

Vyšetření agregací trombocytů byla prováděna standardním způsobem na agregometru APACT-4 (Bioge-



Obr. 2
Princip hodnocení primární hemostázy pomocí analyzátoru PFA-100

(Převzato a upraveno podle Dade PFA-100 Reagents, 2002)

nic). V klasické agregometrii vyvolává postupná tvorba agregátů změnu průchodu světla, kterou lze měřit a prezentovat v procentech oproti kalibrační křivce a dále potom interpretovat. Ke sledovaným parametrům patří strmost agregační křivky (tzv. slope, [%/min]) a časové údaje popisující průběh agregační křivky, z nich např. maximální amplituda agregační křivky apod. Předně jsme ve výzkumné sondě provedli standardní spektrum agregační vyšetření, při kterém se destičky stimulují 10 mol/l ADP (adenosine diphosphate), dále 300 mol/l adrenalinu, 10 g/ml kolagenu, 500 g/ml kyseliny arachidonové a 1 500 g/ml ristocetinu. Jediné změny při standardních testech byly naznačeny po stimulaci ADP. Proto jsme dále vyšetřili modifikované agregace s použitím 3 různých ředění ADP – konkrétně 2,5 mol/l, 1,25 mol/l a 0,625 mol/l. Bylo takto vyhodnoceno 88 agregačních vyšetření provedených u 7 léčených nemocných s těžkou FH a to před LDL-aférou a po LDL-aféře.

Wyšetření primární hemostázy analyzátozem Dade Behring PFA-100

Bylo použito vyšetření analyzátozem Dade Behring PFA-100 (Marburg, Německo), který umožňuje měřit destičkami zprostředkovanou hemostázu^(31,35) z materiálu nesrážlivé, respektive citrátové krve. Metoda napodobuje aktivaci destiček mechanickou zátěží a kolagenem *in vivo* (obrázek 2). Použitá membrána v diagnostickém modulu je potažena kolagenem (COL), tedy proteinem, který se obecně považuje za

iniciátor počáteční fyziologické aktivace trombocytů. Dále jsme použili modul s membránou potaženou adrenalinem, resp. epinephrinem (výrobce analyzátoru užívá označení epinephrin, EPI) nebo ADP, tedy dalšími fyziologicky významnými agonisty agregace trombocytů. Přítomnost těchto destičkových biochemických induktorů a vysoký stupeň střížných sil indukovaný standardizovaným průtokem krve kapilárou vede k destičkové adhezi, aktivaci a agregaci, tím se postupně vytváří stabilní destičkový trombus v mikroskopickém otvoru diagnostické kapiláry. Výstupním parametrem je čas potřebný od aktivace primární hemostázy k uzavření diagnostické kapiláry destičkovým trombem, tzv. CT (closure-time), který je ovlivněn stavem destičkových funkcí.

Jako standardní screeningové testy pro zjištění dysfunkce primární hemostázy se v současnosti používají měřicí moduly kolagen/epinephrin (COL/EPI), k další základní diferenciální diagnostice slouží modul kolagen/ADP (COL/ADP). Tímto se rozpoznají hlavní z defektů primární hemostázy, ať již primární či sekundární etiologie (tabulka II). To vedlo k hypotéze, že by uvedené vyšetření mohlo být vhodným markerem též ke sledování účinnosti LDL-aférey.

VÝSLEDKY

Pro úplnost zde uvádíme nejprve vybrané původní údaje, které dokumentují pokles hlavních a pro progresi aterosklerózy nejdůležitějších parametrů (tabulka III).

Tabulka II

Vyšetření primární hemostázy analyzátozem Dade Behring PFA-100 (Převzato a upraveno podle Dade PFA-100 Reagents, 2002)

POUŽITÝ MODUL	ČAS		
	Norma COL/EPI: 82–150 s (3,2% citrátová krev)		
	Norma COL/ADP: 62–100 s (3,2% citrátová krev)		
	zdravý jedinec	kyselina acetylsalicylová	von Willebrandův syndrom
COL/EPI	normální	čas prodloužen	čas prodloužen
COL/ADP	normální	normální	čas prodloužen

Tabulka III
Popisná statistika vybraných laboratorních parametrů

% difference (post-pre)/pre x100	N	Průměr procentní difference	Spodní a horní hranice 95% intervalu spolehlivosti pro průměr	
Cholesterol celkový	74	-67.0	-69.2	-64.8
HDL-cholesterol	72	-25.3	-26.7	-23.9
LDL-cholesterol	65	-82.2	-85.1	-79.4
TAG	73	-51.7	-56.4	-47.1
ApoA	74	-24.0	-26.2	-21.7
ApoB	69	-73.2	-76.4	-70.0
Lp(a)	49	-67.6	-73.0	-62.2
Viskozita plazmy	52	-15.2	-17.8	-12.5
Trombomodulin	126	-29.1	-32.8	-25.3
PAI-1	142	-1.3	-8.8	6.2
Fibrinogen	148	-21.7	-23.2	-20.3
VWF	145	-15.1	-19.0	-11.2

HDL – lipoprotein o vysoké hustotě (High Density Lipoprotein), LDL – lipoprotein o nízké hustotě (Low Density Lipoprotein), TAG – triglycerid, ApoA – apolipoprotein A, ApoB – apolipoprotein B, Lp(a) – lipoprotein (a), PAI – inhibitor aktivátoru plazminogenu (Plasminogen-Activator Inhibitor), vWF – von Willebrandův faktor

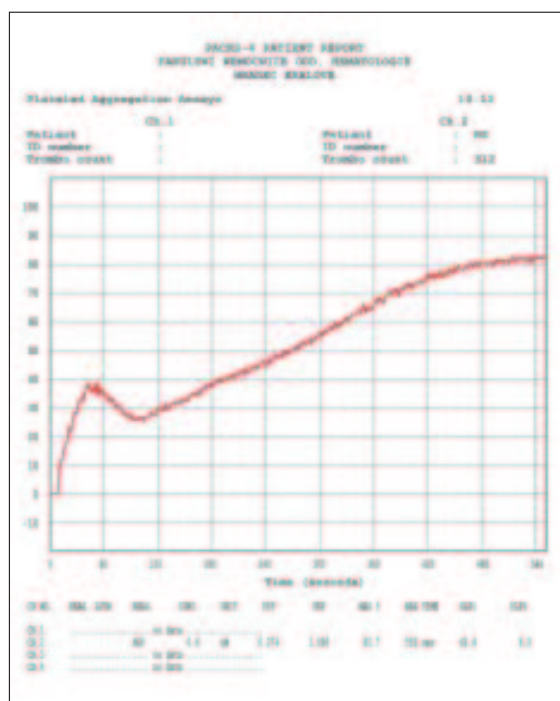
Poznámka: Ze statistických charakteristik je v tabulce průměr (mean), dále spodní a horní hranice 95% intervalu spolehlivosti pro průměr. Zvýrazněny jsou zde statisticky významné rozdíly.

Výsledky byly získány při laboratorním sledování stejného souboru pacientů a ve stejném časovém období, kdy byly sledovány také změny primární hemostázy pomocí analýzy PFA-100 a vyšetření agregace trombocytů. Změny laboratorních parametrů před LDL-aférezou a po ní, resp. procentní difference hodnoty před procedurou a po proceduře zde vyjadřuje popisná statistika hodnot sledovaných parametrů (tabulka III). Zvýrazněny jsou významné procentní difference (tj. [100 (hodnota před plazmaferézou – hodnota po plazmaferéze)/hodnota před plazmaferézou]), za významné považujeme výsledky, kde $p < 0,05$.

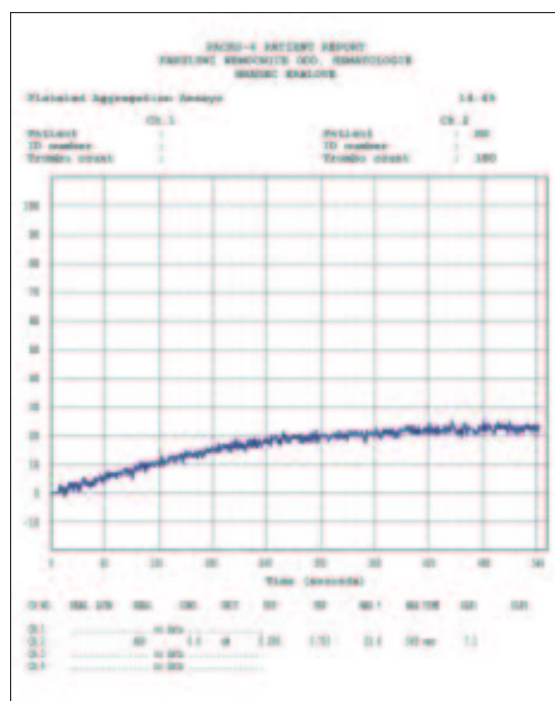
Při porovnání longitudinálního vývoje údajů nebyla nalezena statisticky významná difference mezi laboratorními parametry v období prvních 100 dnů po zahájení léčby a v období 600 až 800 dnů od zahájení léčby LDL-aférezou. Porovnány byly průměrné hodnoty parametrů před LDL-aférezou, tedy průměrné „pre-hodnoty“.

Výsledky modifikovaných vyšetření agregace trombocytů před aferézou a po aferéze

Bylo provedeno a vyhodnoceno 88 modifikovaných agregačních vyšetření u 7 léčených nemocných s těž-



Obr. 3 Vyšetření agregace trombocytů před LDL-aférezou



Obr. 4 Vyšetření agregace trombocytů po LDL-aférezě

kou FH, a to před léčebnou procedurou LDL-aférezou a po léčebné proceduře. Vyšetřovány byly vždy: spontánní agregace a dále křivky s použitím 3 různých ředění ADP – konkrétně 2,5 mol/l, 1,25 mol/l a 0,625 mol/l. Typické výsledky jsou uvedeny v obrazové příloze: 1. agregační křivka u homozygotní nemocné před LDL-aférezou, při ředění ADP 0,625 mol/l (obrázek 3); 2. agregační křivka u stejné nemocné a při stejném ředění ADP (0,625 mol/l), ukazuje výsledek po léčebné proceduře LDL-aférezou (obrázek 4). Je zřetelné, že po výkonu dochází ke zmenšení strmosti křivky a ke snížení maximální amplitudy po 360 sekundách (maximální amplitudě v obrazové příloze odpovídá označení MAX, dále v zápisu a grafickém výstupu analyzátoru PFA-100 odpovídá označení ředění M jednotkám mol/l).

Při těchto agregačních vyšetřeních jsme zjistili zřetelný pokles agregability trombocytů u homozygotů, kde je koncentrace LDL-cholesterolu nejvyšší a kde je také pokles cholesterolu po léčebném výkonu největší.

U pacientů stabilizovaných a také u heterozygotů již situace tak jasná není. Proto při vyhodnocení jsme dál všech 88 provedených vyšetření rozdělili na ta, kde došlo po léčebné LDL-aférezě k poklesu cholesterolu o 6 a více mmol/l, dále na skupinu s poklesem o 5–5,99 mmol/l a na skupinu s poklesem nižším než 5 mmol/l. Zjistili jsme, že: 1. při poklesu vyšším než 6 mmol/l dochází u obou homozygotů v našem souboru ke snížení agregability trombocytů po separaci, snižuje se také strmost agregační křivky u všech nemocných; 2. při poklesu cholesterolu o 5–5,9 mmol/l dochází u jednoho z homozygotů v souboru a také u těžkého případu heterozygota k mírnému zvýšení agregability po stimulaci 2,5 mol/l ADP, avšak na další koncentrace ADP již pacienti po separaci reagují snížením agregační křivky; u obou těchto nemocných také shodně dochází ke snížení strmosti agregační křivky; 3. pokles cholesterolu o 4,9 mmol/l a méně již zřejmě nemá specifický a tak výrazný vliv na agregabilitu destiček, neboť destičky po separaci agregují jednou poněkud méně, jindy více. Je známo, že agregabilitu ovlivňuje řada dalších faktorů, které se zde zřejmě uplatňují. U obou skupin pacientů (resp. u homozygotů i heterozygotů) zřejmě záleží na velikosti poklesu koncentrace cholesterolu po léčebné LDL-aférezě oproti výchozí hodnotě před procedurou.

Výsledky analýzy PFA-100 před LDL-aférezou a po ní

Z celkového počtu 70 vyšetření (tabulka IV) bylo 18 párů vyšetření pomocí COL/EPI membrány (kola-

gen/epinephrin, resp. kolagen/adrenalin) a 17 párů vyšetření pomocí COL/ADP membrány (kolagen/ADP). Ve 12 vyšetřeních pomocí COL/EPI a v 8 COL/ADP jsme zaznamenali překročení referenčních mezí již před léčebnou procedurou. Po LDL-aférezě došlo ve všech případech k prodloužení CT oproti hodnotám před výkonem, z toho překročení referenčních mezí jsme stanovili v 10 vyšetřeních pomocí COL/EPI a v 6 COL/ADP. Míra prodloužení po procedurách ovšem nedosáhla statistické významnosti ($p < 0,14$). Současně nebyly rozdíly mezi homozygoty a heterozygoty.

DISKUSE

Naše hypotéza byla potvrzena v tom, že vyšetření vykazují po LDL-aférezě známky zlepšení sledovaných parametrů. Rozdíly výsledků před LDL-aférezou a po LDL-aférezě jsou u metody PFA-100 statisticky nevýznamné, neboť hodnoty CT jsou již na začátku procedur pozitivní a proto není tento test dobře použitelný v klinické praxi. Avšak vypracovaný postup modifikovaných vyšetření agregací trombocytů s použitým ředěním ADP se ukázal nadějný, ač pro běžnou praxi je složitý a vyžaduje technické zázemí specializované laboratoře.

Samotná LDL-aférezou je metoda účinná (tabulka III) co do snížení patologicky zvýšených hodnot totálního cholesterolu, zejména však LDL-cholesterolu, ale i lipoproteinu(a) a dalších, což jsme podrobněji rozebrali jinde.^(30,32,35) Výsledkem je příznivé ovlivnění aktivity ateromatózy.^(28,29,32,35–37) Léčebná LDL-aférezou tím v širokých souvislostech příznivě ovlivňuje také primární hemostázu a tedy i sledované výsledky vyšetření po léčebné proceduře. Pacienti dlouhodobě léčení v našem souboru mohou být již stabilizováni, potom změny parametrů před LDL-aférezou a po aférezě i longitudinální vývoj údajů mohou být již statisticky nevýznamné, a to při porovnání údajů jednotlivých pacientů i při vyhodnocení souboru jako celku.

Pro správnost interpretace vyhodnocených výsledků je nutno zohlednit nevelký počet pacientů ve sledovaném souboru. Vzhledem k technické i ekonomické náročnosti dlouhodobé terapie se nepodařilo vytvořit větší soubor nemocných. Jde o největší soubor dlouhodobě sledovaných pacientů v České republice, avšak ani vospělá zahraniční pracoviště mnohdy nemají obdobné soubory dlouhodobě sledovaných pacientů přesahující počet 10–20. V klinické praxi je výsledek dále individuálně modifikován mnoha dalšími faktory, mj. také dlouhodobě indikovanou antiagregační terapií (anamnéza ICHS apod.). Tím lze

Tabulka IV
Vyšetření přístrojem PFA-100 před LDL-aférezou a po ní

	N	Před LDL-aférezou (mean ± SD)	Po LDL-aférezě (mean ± SD)
COL/EPI			
Referenční mez 82–150 s (pro 3,2% citrátovou krev)	18	129,4 ± 46,8	146,7 ± 42,1
COL/ADP			
Referenční mez 62–100 s (pro 3,2% citrátovou krev)	17	87,8 ± 14,6	98,6 ± 13,2

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

možná vysvětlit i prodloužení parametrů CT před LDL-aférou, a to u některých až mimo referenční meze.

V odborné literatuře lze pozorovat snahu o vyhledávání v ekonomicky dostupných, technicky jednoduchých a rychlých ukazatelů účinnosti LDL-aférou. Sami jsme vyzkoušeli sledování aktivity trombocytů⁽³⁰⁾ nebo vyšetřování koncentrace některých selektivních, ⁽²⁸⁾ což není příliš jednoduché ani ekonomicky výhodné a tyto postupy mají i další úskalí. Brøijersen⁽²⁶⁾ publikoval pozitivní výsledky při sledování pouze velikosti krevních destiček (tj. střední objem trombocytu, MPV – Mean Platelet Volume), kdy zjistil, že původně větší trombocyty se intenzivní léčbou normalizují. V naší práci jsme také sledovali změny velikosti krevních destiček (MPV), které jsme doplnili o destičkový hematokrit (Pct), ale při našem výzkumu jsme neshledali signifikantní změny. Ani velikost destiček a destičkový hematokrit tedy nepovažujeme za optimální ukazatele účinnosti extrakorporální eliminace lipoproteinů pomocí LDL-aférou.

ZÁVĚR

LDL-aférou u nemocných s FH zlepšuje poměry primární hemostázy. Modifikovaná vyšetření agregace trombocytů by mohla být dalším ukazatelem vhodným ke sledování aktivity procesu u těchto těžce nemocných. Jde o relativně technicky a ekonomicky náročná vyšetření.

Vyšetření analyzátozem PFA-100 je v klinické praxi svým provedením potencionálně lépe dostupné, přístroj relativně dokonale napodobuje proces, který se odehrává v mikrorečisti a v jiných indikacích se osvědčil. Podle prvních zkušeností se však zdá vyšetření PFA-100 samostatně nevhodné pro aktuální posouzení optimální intenzity jednotlivých procedur aférou.

Vyšetřování primární hemostázy a funkcí krevních destiček provádíme i nadále, neboť šlo o ne příliš rozsáhlý počet vyšetření, a s množstvím shromážděných dat je možné, že později tento závěr přehodnotíme. Dosud se však tato vyšetření nejvíce vhodná pro sledování progresu změn, účinku léčby nebo k posouzení intenzity jednotlivých procedur LDL-aférou.

LITERATURA

1. Aschermann M, Veselka J. Trendy soudobé kardiologie: Nestabilní angina pectoris. Praha: Galen, 2001:11–36.
2. Widimský J. Léčba dyslipidemií a ICHS. Praha: Triton, 1998:202.
3. Assmann G, Schulte H. Lipid Metabolism Disorders and Coronary Heart Disease. Munich: MMV-Medizin Verl., 1993:281.
4. Vaverková H, Soška V, Rosolová H, et al. Doporučení pro diagnostiku a léčbu dyslipidemií v dospělosti, vypracované výborem České společnosti pro aterosklerózu. Cor Vasa 2007;49:K73–K86.
5. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 1993;362: 801–9.
6. Thompson J, Thompson PD. A systematic review of LDL apheresis in the treatment of cardiovascular disease. Atherosclerosis 2006;189:31–8.
7. Nishimura S, Yamaguchi H. Effects of intensive lipid lowering by low-density lipoprotein apheresis on regression of coronary atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia: Japan LDL-apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study (LCAPS). Atherosclerosis 1999;144:409–17.
8. Mayer O jr. Je při intenzivní hypolipidemické léčbě v sekundární prevenci vhodnější používat statin ve vysokých dávkách nebo v kombinaci s ezetimibem? Cor Vasa 2006;48:417–9.
9. Stoffel W, Borberg H, Greve V. Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterolemia. Lancet 1981;318:1005–7.
10. Blaha M, Zadák Z, Blaha V, et al. LDL-apheresis as a method of extracorporeal LDL-cholesterol elimination. Atherosclerosis 2001;155:19–23.
11. Blaha M. LDL-aférou: Historie a současná praxe v České republice. Kapitoly z kardiologie 2001;3:72–6.
12. Gordon BR, Saal SD. Immunoabsorption and dextran sulphate cellulose LDL-apheresis for severe hypercholesterolemia: the Rogosin Institute experience. Transfus Sci 1993;14:261–8.
13. Tatami R, Inoue N, Itoh H, et al. Regression of coronary atherosclerosis by combined LDL-apheresis and lipid lowering drug therapy in patients with familial hypercholesterolemia: a multicenter study. Atherosclerosis 1992;95:1–13.
14. Kroon AA, Aengevaeren WRM, van der Werf T, et al. LDL-apheresis atherosclerosis regression study (LAARS): Effect of aggressive versus conventional lipid lowering treatment on coronary atherosclerosis. Circulation 1998;99:1826–35.
15. Igarashi K, Horimoto M, Takenaka T, et al. Acute cholesterol lowering therapy with LDL-apheresis improves endothelial function of the coronary microcirculation in patients with hypercholesterolemia. Circulation 1995;92 (Suppl 452).
16. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, et al. Single LDL-apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. Circulation 1997;95:76–82.
17. Leitinger N, Pirich C, Blazek I, et al. Decreased susceptibility of low-density lipoproteins to in-vitro oxidation after dextran-sulfate LDL apheresis treatment. Atherosclerosis 1996;126:305–12.
18. Uno H, Ueki Y, Murashima J, et al. Removal of LDL from plasma by adsorption reduces adhesion molecules on mononuclear cells in patients with arteriosclerosis obliterans. Atherosclerosis 1995;116:93–102.
19. Sinzinger H, Pirich C, Bednar J, et al. Ex-vivo and in-vivo platelet function in patients with severe Hypercholesterolemia undergoing LDL apheresis. Thromb Res 1996;82:291–301.
20. Rubba P, Iannuzzi A, Postiglione A, et al. Hemodynamic changes in the peripheral circulation after repeat low density lipoprotein apheresis in familial hypercholesterolemia. Circulation 1990;81:610–6.
21. Aengevaeren WR, Kroon AA, Stalenhoef AFH, et al. Low density lipoprotein apheresis improves regional myocardial perfusion in patients with hypercholesterolemia and extensive coronary artery disease. The LDL-Apheresis Atherosclerosis Regression Study (LAARS). J Am Coll Cardiol 1996;28:1696–704.
22. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, et al. Beneficial effects of cholesterol lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. New Engl J Med 1995;332:481–7.
23. O'Driscoll G, Green D, Taylor RK. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor improves endothelial function within one month. Circulation 1997;95: 1126–31.
24. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, et al. The effect of cholesterol lowering and antioxidant therapy on endothelium dependent coronary vasomotion. New Engl J Med 1995;332:488–93.
25. Schuff-Werner P, Schutz E, Seyde WC, et al. Improved haemorrhage associated with a reduction in plasma

- fibrinogen and LDL in patients being treated by heparin-induced extracorporeal LDL precipitation (HELP). Eur J Clin Invest 1989;19:30-7.
26. Broijersen A, Eriksson M, Larsson PT, et al. Effects of selective LDL-apheresis and pravastatin therapy on platelet function in familiar hypercholesterolaemia. Eur J Clin Invest 1994;24:488-98.
27. Thompson GR, Lowenthal R, Myant NB. Plasma exchange in the management of familial hypercholesterolemia. Lancet 1975;305:7918:1208-11.
28. Blaha M, Krejsek J, Blaha V, et al. Selectins and monocyte chemotactic peptide as the markers of atherosclerosis activity. Physiol Res 2004;53:273-8.
29. Blažek M, Bláha M, Bláha V, et al. Změny primární hemostázy u pacientů léčených LDL-aférezou. Cor Vasa 2006;48 (Suppl):8-9.
30. Blaha M, Pecka M, Urbankova J, et al. Activity of Thrombocytes as a Marker of Sufficient Intensity of LDL-apheresis in Familial Hypercholesterolaemia. Transfus Apheresis Sci 2004;30:83-87.
31. Vojáček J, Malý M, Alan D, et al. Arteriální a žilní tromboza. Praha: Grada, 2004:276.
32. Cermanová M, Bláha M, Bláha V, et al. LDL-aférezá – hodnocení výsledků 1000 provedených procedur. Transfuzie a hematologie dnes 2005;11:116-21.
33. Živný P, Palička V. Seznam metod prováděných ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Hradec Králové: ATD, 1997:147.
34. Bláha V, Zadák Z, Bláha M, et al. Selekční kritéria k léčbě závažných hypercholesterolémií metodou LDL-aférezou. Čas Lék čes 1998;137:424-9.
35. Blažek M, Bláha M, Malý J, et al. Změny parametrů metabolismu a hemostázy u familiární hypercholesterolemie v léčbě LDL-aférezou. Hradec Králové: Nucleus HK, 2007:136.
36. Masaki N, Tatami R, Kumamoto T, et al. Ten-year follow-up of familial hypercholesterolemia patients after intensive cholesterol-lowering therapy. Int Heart J 2005; 46:833-43.
37. Borberg H. Quo vadis haemapheresis. Current developments in haemapheresis. Transfus Apher Sci 2006;34: 51-73.

Došlo do redakce 30. 1. 2007
Přijato po úpravách 27. 5. 2007

PRESTARIUM®

PRESTARIUM® COMBI

PREDUCTAL® MR

TENAXUM®

Procoralan® 5_{mg}

