

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**VLIV LDL-AFERÉZY NA PARAMETRY AGREGACE KREVNÍCH
DESTIČEK, KOAGULACI KRVE A ÚČINEK STANDARDNÍCH
LÉČIV**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Veronika Černotová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Veronika Černotová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří jakkoli přispěli k uskutečnění této diplomové práce. Především děkuji prof. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za velmi laskavou a odbornou pomoc a trpělivost při vypracování této diplomové práce. Mé poděkování patří také Mgr. Lukáši Konečnému za ochotu kdykoliv poradit a pomoci při práci v laboratoři.

Velký dík patří i mé rodině a přátelům za jejich podporu a porozumění, které mi poskytovali během celého studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Veronika Černotová

Školitel: prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Lukáš Konečný

Název diplomové práce: Vliv LDL-aférézy na parametry agregace krevních destiček, koagulaci krve a účinek standardních léčiv

LDL-aféréza je metoda, která specificky odstraňuje LDL-cholesterol (LDL-C) z cirkulující krve. Využívá se především u familiární hypercholesterolemie (FH), která způsobuje zvýšenou hladinu LDL-C, což je spojeno s předčasným rozvojem kardiovaskulárních onemocnění. Významnou roli u těchto onemocnění hraje aktivita trombocytů a koagulačního systému, a ty jsou také ovlivněny hladinami lipidů.

Tato práce testovala možné rozdíly v agregaci trombocytů a koagulaci krve u pacientů s FH. Byl porovnán účinek lipidové aferézy a moderních hypolipidemik PCSK9i (protilátek proti proprotein konvertase subtilisin/kexin typu 9). Sledované parametry pak byly srovnány se vzorky věkově odpovídajících zdravých dobrovolníků.

Celkem bylo sledováno 15 pacientů a 15 zdravých dobrovolníků. Šest pacientů podstupovalo lipidovou aferézu a zároveň bylo léčeno PCSK9i, stejný počet pak byl léčen pouze PCSK9i. Agregace destiček byla stanovena pomocí impedanční agregometrie za použití sedmi různých induktorů a třech klinicky užívaných antiagregancií. Dále byly provedeny základní koagulační testy (protrombinový čas a aktivovaný parciální tromboplastinový čas). LDL-aféréza snižovala agregaci na testované induktory, významné rozdíly byly ale nalezeny jen u kolagenu a ristocetinu. Jedinci léčení pouze PCSK9i měli stejnou agregační odpověď jako ti s kombinací aferézy a PCSK9i, s výjimkou agregace na TRAP (thrombin receptor activating peptide). Rozdíly v koagulaci mezi těmito skupinami u obou použitých testů nebyly nalezeny. Protideštičkový účinek ASA a vorapaxaru byl vyšší u pacientů s FH, zatímco tikagrelor účinkoval u pacientů i zdravých dobrovolníků stejně. Koagulace u pacientů s FH a odpověď na některá testovaná antikoagulancia byla také rozdílná oproti zdravým jedincům. Korelační analýza ukázala, že vyšší hodnoty triglyceridů vedly k vyšší

agregaci krevních destiček. Odpověď na ristocetin pak stoupala nejen se zvyšujícími se triglyceridy, ale i cholesterolem.

Závěrem lze říci, že i přes určité limitace, a to nutnost ponechat protideštičkovou i antikoagulační terapii u některých pacientů, naznačila tato studie potenciál PCSK9i nahradit v některých případech LDL-aferézu. Pro potvrzení nižší agregace a koagulace u pacientů s FH je ale potřeba dalších studií.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Veronika Černotová

Supervisor: prof. Přemysl Mladěnka, PharmD., Ph.D.

Consultant: Lukáš Konečný, MSc.

Title of diploma thesis: The influence of LDL-apheresis on aggregation of blood platelets, blood coagulation and the effect of standard drugs

LDL-apheresis is a method that removes LDL-cholesterol (LDL-C) from the blood. It is used to treat familial hypercholesterolemia (FH), a genetic disorder causing high LDL-C levels and an early development of cardiovascular diseases. Blood platelets and coagulation system play an important role in these diseases and their activity is also affected by lipids.

The aim of this thesis was to analyze possible differences in platelet aggregation and blood coagulation in patients suffering from FH. Two methods of treatment in this group were compared – lipid apheresis and PCSK9Ab (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 monoclonal antibodies). The observed parameters were also compared with age-matched healthy volunteers.

Our cohort consisted of 15 patients and 15 healthy donors. Six patients were treated with lipid apheresis and also PCSK9Ab, six subjects only with PCSK9Ab. Platelet aggregation was measured with an impedance aggregometer using 7 different inducers and 3 clinically used antiplatelet drugs. Subsequently, standard coagulation tests (prothrombin time and activated partial thromboplastin time) were performed. LDL-apheresis decreased the platelet aggregation but significant differences were found only in two inducers – collagen and ristocetin. The response to most inducers, except TRAP (thrombin receptor activating peptide), was the same in both groups of patients. There were no differences in coagulation between these groups in both tests. The antiplatelet effect of ASA and vorapaxar was stronger in FH patients, whereas ticagrelor acted in patients and healthy donors equally. The coagulation and response to some of the used anticoagulants was also different in patients compared to healthy subjects. A correlation analysis revealed a relationship between higher levels of triglycerides and the platelet

aggregation. The platelet response to ristocetin was higher not only to increasing triglycerides, but also cholesterol.

In conclusion, despite some limitations, such as the chronic use of antiplatelet and anticoagulant drugs in analyzed patients, this study suggested that PCSK9Ab might completely replace LDL-apheresis in some cases. However, more studies are needed to confirm lower platelet aggregation and coagulation in patients with FH.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	1
2. ÚVOD.....	2
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	3
3.1 FAMILIÁRNÍ HYPERCHOLESTEROLEMIE	3
3.1.1 METABOLISMUS CHOLESTEROLU.....	3
3.1.2 GENETIKA FAMILIÁRNÍ HYPERCHOLESTEROLEMIE	6
3.1.3 PATOFYZIOLOGIE ONEMOCNĚNÍ	7
3.2 ATEROSKLERÓZA	9
3.2.1 FYZIOLOGICKÉ FUNKCE ENDOTELU.....	10
3.2.2 PATOFYZIOLOGIE ATEROGENEZE	11
3.2.3 AGREGACE TROMBOCYTŮ.....	15
3.3 LDL-AFERÉZA.....	25
3.3.1 KONVENČNÍ LÉČBA FAMILIÁRNÍ HYPERCHOLESTEROLEMIE... 26	
3.3.3 METODY LDL-AFERÉZY	27
3.3.4 PŘÍNOSY, VLIV NA KARDIOVASKULÁRNÍ RIZIKO.....	29
3.4 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY A DALŠÍ MODERNÍ LÉČIVA	30
4. CÍL PRÁCE.....	33
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
5.1 MATERIÁL	34
5.1.1 KOHORTA DÁRCŮ	34
5.1.2 ODBĚRY A ZPRACOVÁNÍ KRVE	34
5.1.3 REAGENCIA	38
5.1.4 PŘÍSTROJE A DALŠÍ POMŮCKY	40
5.2 METODIKA PRO MĚŘENÍ AGREGACE TROMBOCYTŮ.....	41
5.2.1 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ INDUKTORŮ A ANTIAGREGANCÍ	41
5.2.2 IMPEDANČNÍ AGREGOMETRIE.....	43
5.3 METODIKA PRO MĚŘENÍ KOAGULACE.....	47
5.3.1 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ INDUKTORŮ A ANTIKOAGULANCÍ	47
5.3.2 PRINCIP MĚŘENÍ KOAGULACE.....	48
5.3.3 PROTROMBINOVÝ ČAS (PT)	49
5.3.4 AKTIVOVANÝ PARCIÁLNÍ TROMBOPLASTINOVÝ ČAS (aPTT)....	50
5.4 STATISTICKÁ ANALÝZA	52
6. VÝSLEDKY	53
6.1 AGREGACE TROMBOCYTŮ	53
6.2 KOAGULACE	64
7. DISKUZE	67
8. ZÁVĚR	72
9. LITERATURA.....	73
9.1 ODBORNÉ ČLÁNKY	73
9.2 KNIHY.....	77
9.3 INTERNETOVÉ ZDROJE	78
9.4 PŘEDNÁŠKY	78

1. SEZNAM ZKRATEK

AA	kyselina arachidonová, z angl. arachidonic acid
apoB	apolipoprotein B
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas, z angl. activated partial thromboplastine time
ASA	kyselina acetylsalicylová, z angl. acetylsalicylic acid
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě, z angl. high density lipoprotein
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IDL	lipoprotein o střední hustotě, z angl. intermediate density lipoprotein
ICHS	ischemická choroba srdeční
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL	lipoprotein o nízké hustotě, z angl. low density lipoprotein
LDL-C	LDL cholesterol
LDL-R	LDL receptor
NO	oxid dusnatý
ox-LDL	oxidované LDL částice
PAF	destičky aktivující faktor, z angl. platelet activating factor
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PAR1/4	trombinové receptory na destičkách, z angl. protease-activated receptors
PCSK9	proprotein konvertáza subtilisin/kexin typu 9
PCSK9i	inhibitory PCSK9
PDGF	růstový faktor pro destičky, z angl. platelet-derived growth factor
PGF	placentární růstový faktor, z angl. placental growth factor
PGI ₂	prostacyklin
PT	protrombinový čas, z angl. prothrombin time
TF	tkáňový faktor (tkáňový tromboplastin)
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TRAP-6	thrombin receptor activating peptide 6
TXA ₂	tromboxan A ₂
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě, z angl. very low density lipoprotein
vWF	von Willebrandův faktor

2. ÚVOD

LDL-aféřza je extrakorporální eliminační metoda, která specificky odstraňuje LDL-cholesterol (LDL-C) z cirkulující krve. Využívá se především u případů těžké familiární hypercholesterolemie (FH), což je vrozená metabolická porucha, která je charakterizována zvýšenou hladinou LDL-C a je spojena s předčasným rozvojem kardiovaskulárních onemocnění. Vyskytuje se v raritní homozygotní formě a v poměrně častější heterozygotní. Nejčastěji je způsobena porušenou funkcí LDL-receptorů (LDL-R), obvykle mutací genu pro tento receptor (*Češka et al. 2015*).

Zvýšená hladina LDL-C v krvi nemocného představuje základní rizikový faktor rozvoje aterosklerózy. Dochází k rozvoji komplexních patologických změn cévní stěny vedoucích k tvorbě aterosklerotického plátu. Nestabilní pláty jsou zatíženy vysokým rizikem ruptury s aktivací primární i sekundární hemostázy (*Blažek et al. 2007, Rokyta et al. 2015*). Na aktivitu trombocytů a koagulačních faktorů má vliv samotná hladina LDL-C již v počátečních stádiích aterosklerózy. Patologicky modifikované částice LDL mají přímý protrombotický účinek zahrnující interakce s krevními destičkami a zvýšení exprese prokoagulačního tkáňového faktoru (TF) v makrofázích, buňkách endotelu a hladké svaloviny (*Wang a Tall 2016, Gąsecka et al. 2021*). Oxidované LDL aktivují trombocyty vazbou na jejich povrch pomocí specifických receptorů. Takto aktivované destičky pak mají vyšší potenciál samy oxidovat další LDL částice a podporovat jejich internalizaci makrofágy, čímž prohlubují rozvoj aterosklerózy (*Gąsecka et al. 2021*).

Neexistují sice klasické velké randomizované studie potvrzující přínos LDL-aféřzy jako léčebné metody, existuje ale řada prací, které prokazují významný pozitivní vliv na kardiovaskulární prognózu u závažné FH (*Thompson a Parhofer 2019, Pottle et al. 2019*). Těžká FH je proto indikována k léčbě LDL-aféřzou, což je zejména u homozygotů život zachraňující postup (*Blažek et al. 2007, Češka et al. 2015*).

Přestože je v poslední době k dispozici několik nových hypolipidemik, jako jsou monoklonální protilátky proti proprotein konvertase subtilisin/kexin typu 9 (PCSK9), pravděpodobně nebude možno dosáhnout cílových hodnot LDL-C, zejména u homozygotů, bez LDL-aféřzy (*Marais a Blom 2013*).

Moje diplomová práce si klade za cíl zhodnotit přínos LDL-aféřzy u poměrně specifického souboru pacientů s FH, léčených současně monoklonálními protilátkami proti PCSK9. Zaměřuje se také na roli cholesterolu v aktivaci trombogenních dějů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 FAMILIÁRNÍ HYPERCHOLESTEROLEMIE

Familiární hypercholesterolemie je autozomálně dominantně dědičné onemocnění. Patří mezi tzv. primární (geneticky podmíněné) dyslipidémie. Ty se vyskytují v populaci méně často než sekundární, které vznikají jako důsledek jiného základního onemocnění. Dyslipidémii můžeme charakterizovat jako nevhodné aterogenní složení lipidů a lipoproteinů v plasmě, významně zvyšující kardiovaskulární riziko (*Češka et al. 2015*).

Základem FH je nejčastěji defekt LDL-receptoru (LDL-R), který hraje významnou roli v metabolismu LDL-cholesterolu. Porucha funkce či snížení počtu těchto receptorů mohou být způsobeny defekty v syntéze LDL-R, ovšem funkci mohou ovlivnit i poruchy intracelulárního transportu, vazebnosti nebo internalizace. Důsledkem jsou pak až extrémně zvýšené plazmatické koncentrace aterogenního LDL-C, vedoucí k aterogenezi s rizikem rozvoje ischemické choroby srdeční (ICHS) (*Stejskal 1999, Češka et al. 2015*).

3.1.1 METABOLISMUS CHOLESTEROLU

Cholesterol je esenciální složkou buněčných membrán, reguluje jejich fluiditu, čímž snižuje jejich propustnost, a interaguje s dalšími lipidy a proteiny. Dále je cholesterol prekurzorem mnoha steroidních molekul, jako jsou žlučové kyseliny, steroidní hormony (gestageny, glukokortikoidy, mineralokortikoidy, androgeny, estrogeny) a vitamin D (*Benito-Vicente et al. 2018, Janoušek et al. 2022*).

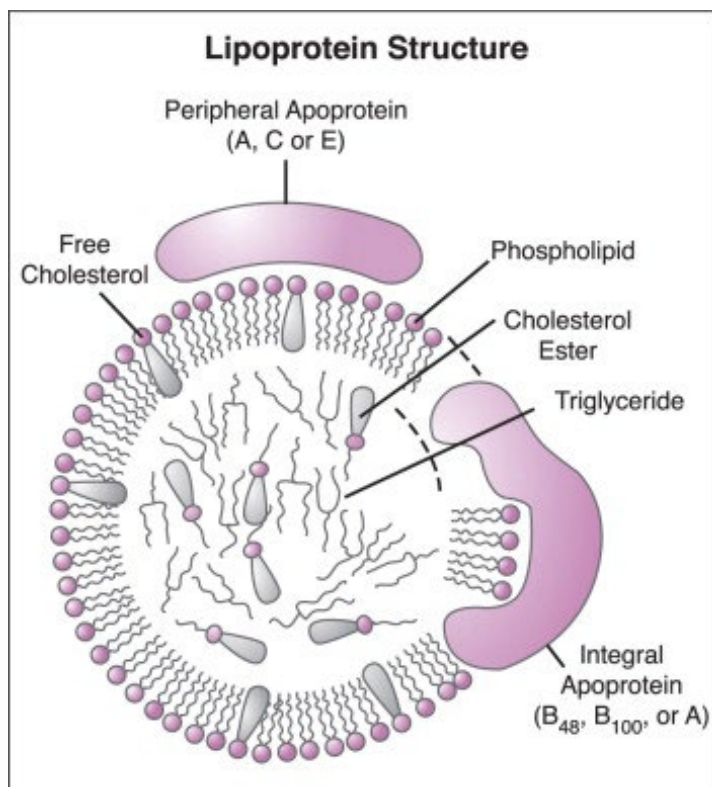
Je získáván z potravy, ale může být i nasyntetizován, a to především v játrech. Cholesterol je pak transportován do periferních tkání pomocí lipoproteinů (*Benito-Vicente et al. 2018*). Lipoproteiny jsou částice nesoucí na svém povrchu fosfolipidy, volný cholesterol, bílkovinnou složku (apolipoproteiny) a uvnitř triacylglyceroly a esterifikovaný cholesterol (viz **Obr. 1**). Dle složení rozlišujeme několik typů lipoproteinů. Čím větší je obsah lipidů, tím mají nižší hustotu., od níž jsou pak odvozeny názvy většiny lipoproteinů (viz **Tab. 1**): chylomikrony, VLDL (lipoproteiny o velmi nízké hustotě, z angl. very low density lipoproteins), IDL (lipoproteiny o střední

hustotě, z angl. intermediate density lipoproteins), LDL (lipoproteiny o nízké hustotě, z angl. low density lipoproteins) a HDL (lipoproteiny o vysoké hustotě, z angl. high density lipoproteins). Lipoproteiny syntetizované *de novo* jsou chylomikrony (tvořené buňkami střevní sliznice z lipidů potravy), VLDL (tvořené v játrech a zajišťující transport triglyceridů do periferních tkání) a částečně HDL (dopravující cholesterol z periferie do jater). HDL vznikají také odštěpováním povrchových struktur chylomikronů a VLDL při jejich katabolismu. Chylomikrony se metabolizují za vzniku remnant (zbytků). Produktem metabolismu VLDL částic jsou IDL a z nich vznikající LDL, které dopravují cholesterol z jater do periferních tkání (Štejfa et al. 2011, Češka et al. 2015).

Bílkovinné části apolipoproteiny jsou velmi důležité komponenty lipoproteinů, jelikož mají nejen strukturní roli, ale slouží i jako ligandy pro receptory, regulují formaci lipoproteinů skrz intenzivní výměnu jednotlivých složek mezi nimi a fungují také jako aktivátory či inhibitory enzymů účastnících se metabolismu lipoproteinů (Feingold 2021a).

LDL částice hrají zásadní roli v metabolismu lipidů a lipoproteinů, a také v rozvoji aterosklerózy. Jsou složeny z jádra tvořeného především estery cholesterolu a menšího množství triglyceridů (viz **Tab. 1**). Slouží jako hlavní transportéry cholesterolu v organismu (Češka et al. 2015).

Co se metabolismu týče, osud LDL může být trojí (viz **Obr. 2**). Fyziologická je jednak cesta využití cholesterolu v játrech, kde je zásadní již zmíněný LDL-receptor, a jednak transport LDL k periferním tkáním, které jsou také vybaveny LDL-R. V játrech je LDL-C využit pro tvorbu žlučových kyselin, které jsou pak secernovány do tenkého střeva jako součást žluči. V periferních tkáních jsou z cholesterolu tvořeny steroidní hormony a buněčné membrány, nebo je v nich uskladněn. Třetí možnost je spojena s rozvojem aterosklerózy. Zejména při nadbytku LDL částic dochází k jejich zvýšenému vychytávání makrofágy za vzniku pěnových buněk, které pak hrají roli v aterogenezi (viz podkapitola 3.2) (Češka et al. 2015).

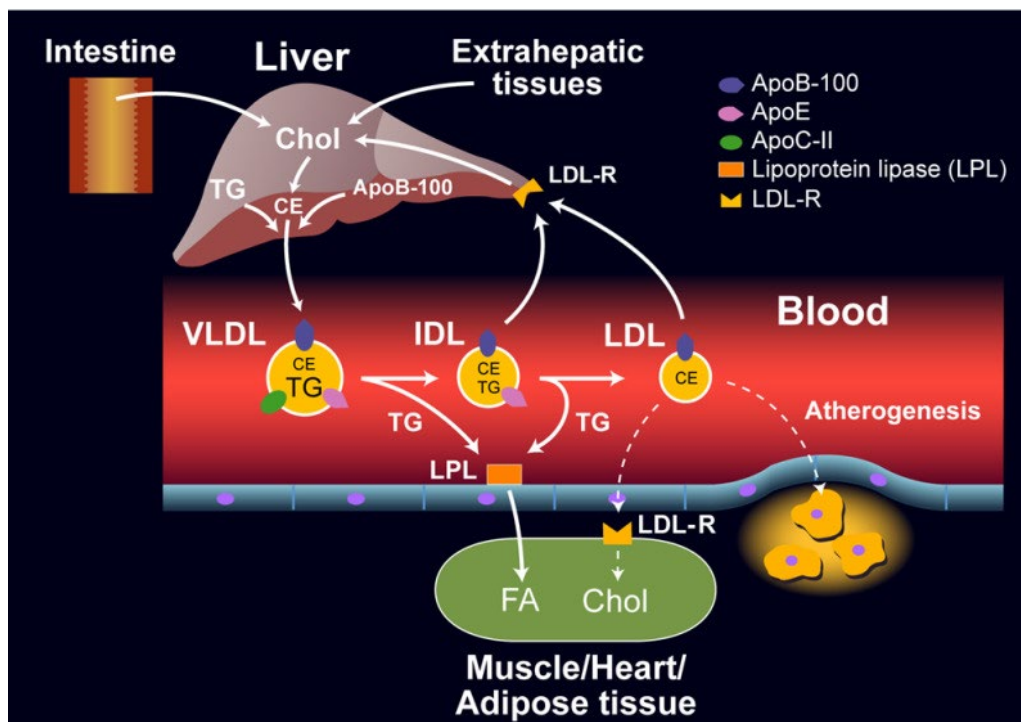


Obr. 1 – Struktura lipoproteinové částice. Převzato z: *Engelking (2015)*

Tab. 1 – Lipoproteiny: obsah cholesterolu a triglyceridů, vztah k ICHS

Název	Cholesterol (obsah v %)	Triacylglyceroly (obsah v %)	Riziko ICHS
chylomikrony	5	86	neovlivňují
zbytky	8	70	zvyšují (++)
chylomikronů			
VLDL	19	55	mírně zvyšují (+)
IDL	38	23	silně zvyšují (+++)
LDL	50	6	silně zvyšují (++++)
HDL	19	4	silně snižují (----)

VLDL – lipoproteiny o velmi nízké hustotě, IDL – lipoproteiny o střední hustotě, LDL – lipoproteiny o nízké hustotě, HDL – lipoproteiny o vysoké hustotě. Modifikováno dle: *Štejfa et al. (2011)*.



Obr. 2 – Metabolismus cholesterolu. ApoB-100, ApoE, ApoC-II – různé typy apolipoproteinů, CE – esterifikovaný cholesterol, TG – triglyceridy, FA – volné mastné kyseliny. Převzato z: *Feingold (2021a)*

3.1.2 GENETIKA FAMILIÁRNÍ HYPERCHOLESTEROLEMIE

Dědičnost FH je autosomálně dominantní, týká se tedy genů umístěných na nepohlavních chromosomech (autosomech). Protože je dominantní, daný znak se projeví fenotypově u homozygotů i heterozygotů. Heterozygoti s neúplnou dominancí mají méně závažné projevy než dominantní homozygoti. Platí zde, že obě pohlaví jsou postižena stejně často a většinou se onemocnění vyskytuje v každé generaci. Pokud jeden z rodičů má heterozygotní FH, existuje 50 % pravděpodobnost, že i potomek ji bude mít (*Otová et al. 2020*).

Pečlivý odběr rodinné anamnézy a vyšetření dostupných příbuzných již diagnostikovaného pacienta je proto zcela zásadní. Většina postižených rodinných příslušníků o svém onemocnění neví, přitom jsou ve velmi vysokém riziku předčasné manifestace závažné kardiovaskulární příhody. Někdy je nemoc odhalena, až když pacienti přicházejí pro klinické obtíže asi ve třetí až čtvrté dekádě svého života (*Češka et al. 2015*).

FH je monogenní postižení, kdy defekt jednoho genu zásadně určuje výslednou podobu onemocnění. Oproti častějším polygenním formám hypercholesterolemie, u kterých se uplatňuje několik genů s menším vlivem a výsledná klinická podoba onemocnění tedy závisí více na interakci s faktory vnějšího prostředí, je u FH vliv vnějšího prostředí méně významný. Tím pádem např. vliv režimových a dietních opatření na snížení LDL-C nebývá výrazný. Udává se, že na dietní opatření reagují pacienti s FH poklesem LDL-C pouze o 5, maximálně 10 % (Češka *et al.* 2015).

Heterozygotní FH se dříve uváděla s prevalencí 1:500, ale recentní studie ukazují, že frekvence je spíše 1:200 až 1:300 (Češka *et al.* 2015), v některých populacích dokonce až 1:100 (Bouhairie a Goldberg 2015). Homozygotní FH se řadí s frekvencí 1:1 000 000 ke vzácným onemocněním, avšak novější výzkumy také ukazují vyšší prevalenci kolem 1:300 000 až 1:400 000 (Vallejo-Vaz *et al.* 2016, Beheshti *et al.* 2020).

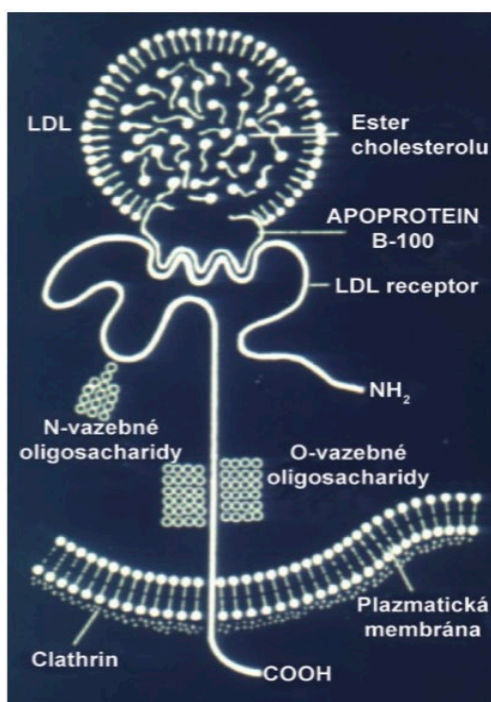
3.1.3 PATOFYZIOLOGIE ONEMOCNĚNÍ

Klasickou formou FH je geneticky determinovaný defekt v LDL-R. Redukce počtu funkčních LDL-R blokuje katabolismus LDL-C a tím vede k jeho akumulaci v plazmě. Omezený vstup LDL-C do jater podpoří dysregulaci jaterní syntézy cholesterolu a může tím zvýšit produkci VLDL. Následkem nedostatku funkčních LDL-R je narušeno odstranění plazmatického VLDL i produktu jeho transformace IDL, tím je dále zvýšena formace LDL v séru. Hypercholesterolemie v případě FH má tedy původ současně ve sníženém katabolismu i zvýšené produkci LDL (Blažek *et al.* 2007).

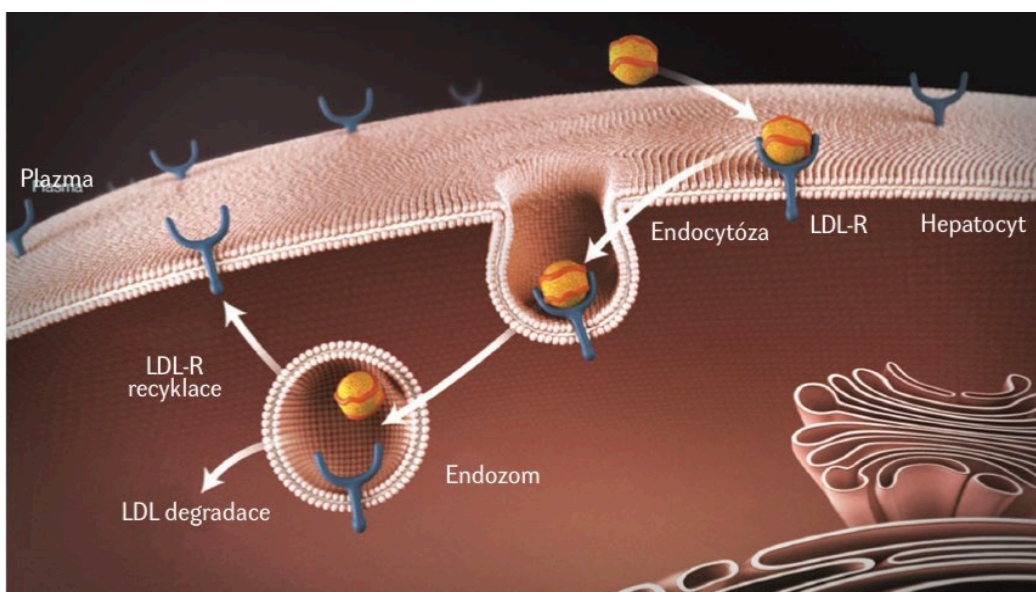
LDL-R je transmembránový protein se čtyřmi doménami, z nichž nejdůležitější z hlediska funkce je vazebná doména. Zde dochází k navázání LDL částice, při kterém hraje zásadní roli apolipoprotein B-100 neboli apoB-100 (viz **Obr. 3**). LDL-R je tvořen v endoplazmatickém retikulu, odkud je transportován do Golgiho komplexu a posléze na povrch buňky. Po navázání LDL na LDL-R dojde k internalizaci tohoto komplexu (endosomu), kde dochází k disociaci LDL z LDL-R. LDL-R je poté znovu transportován zpět na povrch buňky, je tedy opětovně recyklován. LDL je enzymaticky štěpen za uvolnění volného cholesterolu (viz **Obr. 4**) (Češka *et al.* 2015, Benito-Vicente 2018).

Mutace genu pro LDL-R však není jedinou možnou příčinou vzniku FH, jak se vědci původně domnívali. Je zodpovědná za 80-85 % případů FH. Koncem 80. let minulého století byli popsáni nemocní s klinicky typickou FH, ale normálním počtem i funkcí LDL-R. Byl u nich odhalen defekt apolipoproteinu B-100, který je nazýván

familiárně defektní apo B-100. Dle nejnovějších výzkumů může být příčinou FH i mutace genu pro enzym proprotein konvertasu subtilisin/kexin typu 9 (PCSK9), který přispívá k degradaci LDL-R a brání jeho návratu na povrch buňky. Nově odhalená mutace PCSK9 způsobuje vyšší aktivitu tohoto enzymu a počet LDL-R tak klesá (Češka *et al.* 2015). Inhibitory PCSK9 představují moderní biologickou léčbu hypercholesterolemie (viz kapitola 3.4).



Obr. 3 – LDL-R s navázanou LDL částicí. Clathrin – protein pokrývající buněčnou membránu a zajišťující tvorbu transportních vezikul při endocytóze. Převzato z: Češka *et al.* (2015)



Obr. 4 – Funkce LDL receptoru a jeho recyklace. Převzato z: Češka *et al.* (2015)

3.1.4 KLINICKÝ OBRAZ

Základní charakteristikou FH je významná izolovaná hypercholesterolemie. Triglyceridy jsou v normě či mírně zvýšené (většinou nepřekračující 3 mmol/l). U heterozygotů hladina LDL-C obvykle přesahuje 4,9 mmol/l a pohybuje se v průměrných hodnotách 6-12 mmol/l, výjimkou však není ani nález 15 mmol/l nebo vyšší. U homozygotů se LDL-C pohybuje v rozmezí přibližně 15-30 mmol/l. Normální hodnota LDL-C v primární prevenci kardiovaskulárních onemocnění (KVO) je pod 3 mmol/l (*Štejfa et al. 2011, Češka et al. 2015*).

Hypercholesterolemie vede k časně manifestaci ICHS, u heterozygotů ve věku 30-50 let. U mužů to bývá často do 40 let, u žen obvykle asi o 10 let později. Heterozygotní FH bývá často poddiagnostikovaná, protože probíhá asymptomaticky a často se projeví až nejzávažnější komplikací, tj. kardiovaskulární příhodou. U homozygotů dochází k manifestaci onemocnění již v útlém věku, ateroskleróza působí závažné změny v koronárním řečišti mezi 10. – 20. rokem života a většina z nich umírá kolem 20. roku života, pokud není včas zahájena léčba (*Češka et al. 2015*).

Ke klinicky patrným projevům patří depozita cholesterolu na různých částech těla. Projevují se jako xantomy, arcus lipoides corneae a xantelasmata. Zejména xantomy jsou velmi typickým příznakem FH. Jsou to nažloutlé hrbolky na kůži, vznikající v důsledku hromadění cholesterolu v podkoží. Objevují se především v oblasti Achillovy šlachy, šlach kolena, loketního kloubu, na extenzorech na ruce. U nemocných jsou typické záněty až ruptura Achillovy šlachy. Xantelasmata jsou depozita cholesterolu zejména v oblasti očních víček. Arcus lipoides je šedobílý prsteneček lipidových depozit v rohovce. Jedná se o benigní příznak, běžně se vyskytuje ve vyšším věku, ovšem u pacientů s FH se objevuje před 45. rokem. U homozygotů jsou podkožní depozita častější a objevují se již před 10. rokem života (*Stejskal 1999, Bouhairie a Goldberg 2015, Češka et al. 2015*).

3.2 ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je ložiskové degenerativní onemocnění cév, které je spojeno se zánětlivou reakcí a tvorbou aterosklerotických plátů. Postihuje zejména střední a velké arterie (zejména koronární, mozkové, femorální, tepny dolních končetin či karotidy). Její komplikací je rozvoj kardiovaskulárních onemocnění, která jsou v ČR příčinou více než 50 % úmrtí. Klinický dopad aterosklerotických změn odpovídá jejich lokalizaci, rychlosti rozvoje plátu, vzniku sekundárních komplikací a také možnostem kompenzačních

mechanismů. Zejména tzv. nestabilní plát je zatížen vysokým rizikem komplikací, protože vede k obnažení vysoce trombogenních substancí a následné aktivaci hemostázy s rozvojem nasedajícího trombu. Arteriální trombóza je pak často podkladem akutní orgánové ischemie, zejména myokardu, mozku a dolních končetin (*Blažek et al. 2007*).

Obecně bývá ateroskleróza označována za multifaktoriální onemocnění, ale v kontextu familiární hypercholesterolemie představuje hlavní rizikový faktor právě hladina lipidů (především LDL, ale i VLDL) (*Stejskal 1999*). Dyslipoproteinemie je pak ústředním rizikovým faktorem především pro rozvoj ICHS. Centrální (postižení mozkových arterií) a periferní ateroskleróza (ischemická choroba dolních končetin) se vyskytují u nemocných s FH jen ojediněle, pro jejich vznik je významná přítomnost právě již manifestované ICHS a dalších rizikových faktorů, jako je kouření, arteriální hypertenze a diabetes mellitus (*Štejfa et al. 2011*).

Bylo prokázáno, že od cholesterolemie vyšší než 4,0 mmol/l se riziko rozvoje aterosklerózy významně zvyšuje, přičemž při hodnotě celkového cholesterolu větší než 7,8 mmol/l je riziko manifestace aterosklerózy asi čtyřnásobné (*Stejskal 1999*). Kromě dyslipidémie pak hrají zásadní roli v procesu aterogeneze i morfologické a funkční vlastnosti endotelu, který vykonává řadu specializovaných funkcí a regulačně zasahuje do kardiovaskulárního a imunitního systému a také do systému hemostázy (*Blažek et al. 2007*).

3.2.1 FYZIOLOGICKÉ FUNKCE ENDOTELU

Endotel jako jednovrstevná buněčná výstelka cévní stěny (tzv. intima) je aktivní autokrinní a parakrinní orgán, který reguluje buněčnou kompozici a kontraktilitu cévní stěny. Tvoří semipermeabilní bariéru, která reguluje transport částic mezi krví a tkáněmi. Skládá se z monocelulární vrstvy endotelií, spočívající na basální membráně. Endotelové buňky mají schopnost reversibilně měnit během několika minut svoji architekturu a díky svému umístění se významně podílí na udržení homeostázy. Zabezpečují řadu specializovaných funkcí, regulují vasokonstrikci a vasodilataci, udržují rovnováhu mezi stimulací a inhibicí růstu cév, rozhodují o adhezi krevních elementů, podílí se na metabolismu lipoproteinů. Důležitou roli hraje endotel také v regulaci hemostázy, jež je za fyziologických podmínek souborem životně důležitých mechanismů vedoucích k zastavení krvácení a udržení integrity intravaskulárního prostoru. Při iritaci endotelií působením různých patologických faktorů (dyslipidémie, ateroskleróza, hypertenze, vliv imunokomplexů, virů, toxinů, neurotransmiterů, hormonů či substancí produkovaných

trombocyty) však dochází k poruchám hemostázy s rizikem akutních trombotických komplikací (*Stejskal 1999, Blažek et al. 2007*).

Za fyziologických podmínek tvoří endotel intaktní a nesmáčivý povrch lumen cévy, zatímco subendotelium obsahuje tzv. mimobuněčnou matrix a substance vysoce trombogenní. Intaktní endotel brání aktivaci hemostázy díky negativnímu povrchovému náboji buněčné stěny endotelií, dále sekrecí substancí inhibujících aktivaci destiček a navozujících vasodilataci – jsou to zejm. oxid dusnatý (NO), některé prostaglandiny (např. PGE₂, PGD₂ a PGI₂ neboli prostacyklin) a tzv. endotelový hyperpolarizující faktor (EDHF). Tyto substance pak komunikují s buňkami hladké svaloviny, které tvoří druhou vrstvu cévy (medii) a jsou zodpovědné za změny průsvitu cévy. Mezi další účinné antitrombotické mechanismy patří přirozené inhibitory hemostázy vázané na povrchu endotelií (např. antitrombin III), glykosaminoglykany (např. heparan-sulfát) v ochranné povrchové vrstvě endotelu nazývané glykokalyx (heparan-sulfát váže antitrombin III a zvyšuje jeho inhibiční kapacitu) a některé receptory jako trombomodulin, který váže trombin a mění jeho vlastnosti. Oxid dusnatý a prostacyklin inhibují adhezi trombocytů, migraci leukocytů, snižují permeabilitu endotelu a vedou k relaxaci hladkých svalových buněk s následnou vasodilatací. PGI₂ je také funkčním antagonistou proagregačního prostanoиду tromboxanu A₂ (TXA₂). NO navíc inhibuje i migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny (*Blažek et al. 2007, Badimon a Vilahur 2014*).

K zachování rovnováhy tvoří endotel také řadu vasokonstrikčních působků, jako je endotelin. Na stimulaci tvorby endotelinu se mj. podílí lipoproteiny, trombin a fibrin. Endotel dále zasahuje do reparačních mechanismů cév tvorbou řady látek, inhibičních i růstových faktorů. K obnově poškozené buněčné výstelky přispívají také buňky monocyto-makrofágového systému, myocyty a trombocyty (*Blažek et al. 2007*).

3.2.2 PATOFYZIOLOGIE ATEROGENEZE

Při vzniku i progresi aterosklerózy podle dosud získaných experimentálních údajů hraje klíčovou roli zánět, přičemž tyto údaje ukazují na velmi úzký vztah mezi zánětem a hemostázou. Trombocyty i koagulační systém jsou důležitými faktory nejen aterotrombózy, ale i samotné aterogeneze (*Kvasnička 2012*).

Za patologického stavu po stimulaci (příp. iritaci) endotelií působením různých rizikových faktorů může dojít ke změnám sekrece a povrchové exprese řady molekul. Dochází tak k vychýlení rovnováhy fyziologických dějů a postupně i k morfologickým

změnám a objevuje se tzv. dysfunkce endotelu. Ta se projevuje především změnou permeability a dysregulací vasoaktivních, koagulačních i fibrinolytických mechanismů. Rovnováha je vychýlena směrem k vasokonstrikčním, adhezním a protrombotickým dějům (*Stejskal 1999, Blažek 2007*).

Dysfunkci endotelu lze považovat za iniciální stádium aterogeneze. U pacientů s familiární hypercholesterolemií je vyvolávajícím faktorem vysoká hladina LDL-C. Dlouhodobá expozice endotelu nadměrnému množství LDL částic představuje nadměrnou zátěž vedoucí k vyčerpání regulačního potenciálu a dále k jeho funkčním a morfologickým změnám. Je narušena především permeabilita buněk, kterou za fyziologických podmínek omezují těsné spoje (tzv. tight junctions). Důsledkem je zvýšená propustnost pro LDL částice, které se zachycují a akumulují na extracelulární matrix v subendotelu. Zde se stávají terčem oxidativních a enzymatických modifikací. Takto změněné LDL částice jsou vysoce proaterogenní, prozánětlivé a cytotoxické a spouští produkci různých cytokinů i jiných chemoatraktantů, které vedou k sérii prozánětlivých reakcí aktivujících složky vrozené a získané imunity – především monocyty, dále NK-buňky, dendritické buňky, T-lymfocyty (*Maxfield a Tabas 2005, Falk 2006*).

Následuje migrace leukocytů do cévní stěny, která je zprostředkována cytoadhezními molekulami, jako jsou např. glykoproteiny ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), E-selektin a P-selektin. Buňky bílé krevní řady se za fyziologických podmínek nejsou schopny vázat na endotel, ale v případě jeho aktivace vhodným stimulem (zde hyperlipidémie) dochází k expresi zmíněných adhezních molekul. Selektiny podněcují rolování leukocytů po povrchu poškozeného endotelu, čímž zprostředkovávají bližší kontakt s endotelem, a integriny zajišťují pevnější zachycení leukocytů (*Maxfield a Tabas 2005, Falk 2006, Vrablík 2015*).

Monocyty prostupující do cévní stěny se vlivem cytokinů a mitogenů mění v makrofágy. Ty fyziologicky vážou antigen a zajišťují eliminaci cizorodých materiálů v tkáních pomocí fagocytózy. V případě aterogeneze ale vážou oxidované LDL částice. Aktivované makrofágy jsou pak navíc dalším zdrojem cytokinů, chemoatraktantů, mitogenů a enzymů. Tyto látky dále prohlubují migraci buněk monocyto-makrofágového systému a indukují prokoagulační aktivitu endotelu. V systémovém oběhu se zvyšuje koncentrace endotelinu, což vede k vasokonstrikci, a klesá produkce prostacyklinu, NO a dalších vasodilatátorů (*Stejskal 1999, Blažek 2007*).

Pohlcení oxidovaných LDL částic makrofágy se uskutečňuje pomocí tzv. scavengerových receptorů. Zajímavostí je, že mechanismus samotné aterogenní modifikace LDL částic není úplně jasný, ale předpokládá se účast kyslíkových radikálů a enzymů myeloperoxidasy, 15-lipoxygenasy a NO-synthasy, která zajišťuje vznik NO. Oxid dusnatý je účinný oxidant produkovaný endotelem, ale i makrofágy, a může mít protektivní i aterogenní vlastnosti dle jeho původu, místa účinku a koncentrace. Endoteliální NO-synthasa produkuje NO s vasodilatačním účinkem a je ateroprotektivní. Naproti tomu NO produkovaný makrofágy pomocí inducibilní NO-synthasy je silný oxidant, má fyziologicky antimikrobní účinky a je potenciálně proaterogenní. Navíc jsou LDL částice zachycené v intimě izolované od plazmatických antioxidantů, což dále podporuje jejich oxidativní modifikaci (*Falk 2006*).

Za fyziologických podmínek může makrofág pohlcovat LDL částice pomocí LDL-R, ale s vyšším zastoupením cholesterolu v makrofágu dojde k tzv. down-regulaci, tedy snížení exprese LDL-R pro nativní LDL. To vede k supresi další fagocytózy a následné migraci makrofágů zpět do krevního oběhu. Scavengerové receptory, pomocí kterých jsou fagocytovány oxidované LDL-částice, však nemají schopnost down-regulace. Kvůli chybění zpětné vazby není fagocytóza tlumena, v makrofágu se dále hromadí modifikované lipidy, což postupně vede k jeho morfologické přeměně v tzv. pěnovou buňku, typickou pro vyvíjející se ateromovou lézi. Pěnové buňky již nemají schopnost prostoupit strukturou endotelu a zůstávají v intimě cév. Jejich postupným hromaděním vzniká aterosklerotický plát zužující průsvit postižené cévy (*Blažek 2007, Vrablík 2015*).

S pokračujícím zánětlivým procesem aktivované leukocyty a buňky endotelu uvolňují různé růstové faktory, např. PGF (placental growth factor), TGF- β (transforming growth factor β), PDGF (platelet-derived growth factor), endotelin, angiotensin-II aj. Ty vedou k proliferaci hladkých svalů a nadprodukcii kolagenu-I a kolagenu-III, elastinu a proteoglykanů, které přispívají k formaci husté extracelulární matrix typické pro pokročilá stádia aterosklerotické léze. Vzniká tzv. vazivová čepička (fibrous cap), vrstva hyalinního vaziva pokrývající sklerotickou lézi. V pokročilých stádiích aterosklerózy se mohou objevit další degenerativní změny, jako je např. ulcerace, kalcifikace a nasedající krystaly cholesterolu (*Stejskal 1999, Blažek 2007*).

V buňkách nahromaděný oxidovaný cholesterol je toxický. Pěnové buňky proto postupně v pokročilých fázích aterosklerózy podléhají apoptóze a následně nekróze za vzniku na lipidy bohatého nekrotického jádra plátu. Při apoptóze makrofágy uvolňují

aktivní metaloproteinasy (např. gelatinasa, kolagenasa, stromelysin), které narušují vazivovou vrstvu, čímž se sklerotický plát stává náchylnějším k rupturám (*Badimon a Vilahur 2014*).

Ruptury s následným rizikem trombotických komplikací hrozí především u tzv. nestabilních aterosklerotických plátů. Na kolagen bohatá matrix tvoří hlavní komponentu tzv. tvrdých plátů a vede k jejich stabilizaci. Naproti tomu aktivní a nestabilní jsou tzv. měkké pláty s tenkou vazivovou čepičkou, které jsou bohaté na lipidy a makrofágy produkující metaloproteinasy. Tyto enzymy jsou nalézány nejen uvnitř aterosklerotického plátu, ale byly nalezeny také v krvi, přičemž jejich koncentrace korespondují s mírou nestability plátu. Bylo také prokázáno, že patologicky změněné makrofágy přímo stimulují apoptózu buněk hladké svaloviny, což je další faktor podílející se na nestabilitě plátu. Buňky hladké svaloviny jsou hlavním zdrojem kolagenu tvořícího fibrózní čepičku, tudíž jejich zánik má vliv na ztenčení vazivové vrstvy (*Blažek 2007*).

K nestabilitě plátu může dále přispět excentrický charakter cévní stenózy, lokální mechanické a reologické poměry a také endotelová dysfunkce, která je neustále přítomným modulujícím faktorem. Vliv mohou mít i faktory vnějšího prostředí, různé fyzické a psychické stresory, které aktivují sympatikus a uvolnění katecholaminů, což vede k vasokonstrikci. Předpokládá se, že koronární vasospasmy mohou přispět k erozi plátu. Zároveň sympatikus ovlivňuje i hemostázu, kdy zvyšuje aktivitu destiček i koagulaci (*Blažek 2007, Badimon a Vilahur 2014*).

Ruptura plátu je významnou komplikací aterosklerózy, vede ke krvácení do plátu a tvorbě nasedajícího trombu, který může mít rozdílný vliv na další vývoj i prognózu. Arteriální trombóza na podkladě dyslipidémie se manifestuje především jako akutní koronární syndrom, což je souhrnné označení pro nestabilní anginu pectoris, akutní infarkt myokardu a náhlou srdeční smrt. O rozsahu lokální okluze tepny rozhoduje složení plátu (trombogenní charakter), celkový stav endotelu, míra vasokonstrikce. Riziko ruptury odpovídá míře nestability plátu. Klíčovou roli při nasedající trombóze hrají trombocyty, koagulační systém i aktivita fibrinolytického systému (*Blažek 2007*). Shrnutí jednotlivých stádií aterosklerózy poskytuje **Tab. 2**.

Tab. 2 – Morfologický vývoj nestabilního aterosklerotického plátu.

Fáze aterogeneze	Charakteristika	Trombóza	Reverzibilita
Ztluštění intimy	Makrofágy s fagocytovanými lipidy, buňky hladké svaloviny a extracelulární matrix; mikroskopické změny	Nepřítomna	Reverzibilní proces
Lipidní proužkování	Intracelulární hromadění lipidů, vznik pěnových buněk, zánětlivá reakce, makroskopické změny;	Nepřítomna	Reverzibilní proces
Patologické ztluštění intimy	Preateromatózní změny: apoptóza makrofágů, extracelulární ložiska lipidů, vazivová vrstva	Nepřítomna	Ireverzibilní proces
Fibroaterom	Ateromatózní změny: extracelulární lipidy, splývající nekrotické jádro, fibrózní čepička z proteoglykanů a kolagenu, pokračující zánět	Nepřítomna	
Komplikovaná léze	Další degenerativní změny, např. ulcerace, kalcifikace	Nepřítomna	
Nestabilní plát	Intaktní fibrózní vrstva pokrývající nekrotické jádro bohaté na lipidy a zánětlivé buňky	Nepřítomna	
Eroze plátu	Povrchové poškození, nasedající trombus nekomunikuje s nekrotickým jádrem	Obvykle neokluzivní	
Ruptura plátu	Krvácení do plátu, nasedající trombus komunikuje s nekrotickým jádrem	Okluzivní nebo neokluzivní	

Modifikováno dle: *Blažek (2007), Badimon a Vilahur (2014)*.

3.2.3 AGREGACE TROMBOCYTŮ

V patogenezi arteriální trombózy se uplatňuje primární i sekundární hemostáza, jelikož jsou tyto mechanismy úzce propojeny. V iniciální fázi hraje hlavní roli aktivace

a agregace destiček, protože vysoký krevní tok a tlak krve v arteriálním řečišti neumožňuje krevní stázu a odnáší aktivované koagulační faktory. Sekundární hemostáza se uplatňuje až v pozdějších fázích, kdy destičkový trombus začne obturovat lumen a sekundárně tím působí zpomalení krevního toku (*Blažek et al. 2007*).

Trombocyty jsou nejmenší krevní elementy o průměru 2-4 μm . Vznikají z megakaryocytů v kostní dřeni a jsou to bezjaderné buňky. Jejich koncentrace v krvi se pohybuje mezi 150 až 400 x 10⁹/l a životnost bývá 8-10 dní. Co se intracelulárních struktur týče, obsahují destičky mitochondrie, endoplasmatické retikulum a 3 typy granul: α , denzní a lysozomy. Látky z těchto granul jsou pak důležitými mediátory při tvorbě trombu, a to nejen v procesu aterosklerózy (*Michelson 2003, Trojan 2003*).

Alfa granula obsahují von Willebrandův faktor (vWF), destičkový faktor 4 (antagonista heparinu), fibrinogen, trombospondin, faktor V (proakcelerin) a růstový faktor PDGF, který podporuje proliferaci buněk hladké svaloviny cévní stěny a fibroblastů a má i chemotaktické účinky. V α -granulech se také nachází adhezí molekuly, jako je P-selektin, který zajišťuje adhezi monocytů k poškozenému endotelu. Denzní granule mají zásobní funkci, obsahují ATP, ADP, ionty Ca²⁺ a serotonin. Aktivované destičky se podobně jako makrofágy účastní pohlcování oxidovaných částic LDL, které jsou pak skladovány právě v denzních granulách (*Gqsecka et al. 2021*). V cytoplazmě trombocytů se dále nachází tzv. kanalikulární systém propojených kanálků, který komunikuje s povrchem destiček a zajišťuje sekreci aktivních signálních molekul, a denzní tubulární systém, který vychází z endoplasmatického retikula a je klíčový pro syntézu TXA₂. Důležité jsou fosfolipidy (neboli destičkový faktor 3) v membráně trombocytů. Díky svému negativnímu náboji zajišťují vazbu a aktivaci některých enzymů koagulačního systému. Destičky obsahují i kontraktilní proteiny aktin a myosin, které se uplatňují při změně tvaru a uvolnění obsahu granul (*Trojan 2003*).

Formace destičkového trombu může být rozdělena do třech fází (viz **Obr. 5**). V klidovém stádiu předcházejícím vlastní agregaci jsou trombocyty udržovány působením inhibičních faktorů, které brání aktivaci destiček. Tvoří jakýsi práh, který musí být překonán, aby byla vyvolána agregace. Těmito inhibitory jsou PGI₂ a NO produkované endotelem a ADPasa CD39 na povrchu endotelu. Tento enzym hydrolyzuje i malé množství ADP, které by mohlo způsobit nežádoucí aktivaci destiček (*Michelson 2003*).

Při ruptuře plátu v pokročilých stádiích aterosklerózy dochází k narušení vazivové čepičky a obnažení proteinů extracelulární matrix, jako je kolagen. Kolagen je silný

stimulátor destiček a společně s vWF zajišťuje adhezi destiček k odhalenému subendoteliu. Interakce destiček s endotelem a mediátory agregace je zajištěna pomocí povrchových receptorů, přičemž většina jsou receptory spojené s G-proteinem (viz **Obr. 6**). Pro vazbu na kolagen jsou klíčové integrin $\alpha_2\beta_1$ a glykoprotein GPVI, zatímco na vWF glykoprotein GPIb-IX-V. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, také známý jako komplex GPIIb/IIIa, pak váže hlavně fibrinogen. Adhezí k těmto strukturám dochází k aktivaci trombocytů a rychlé změně jejich tvaru činností kontraktilních proteinů, kdy se trombocyty stávají kulovitými a vysílají dlouhé výběžky, tzv. filopodie (*Michelson 2003, Trojan 2003*).

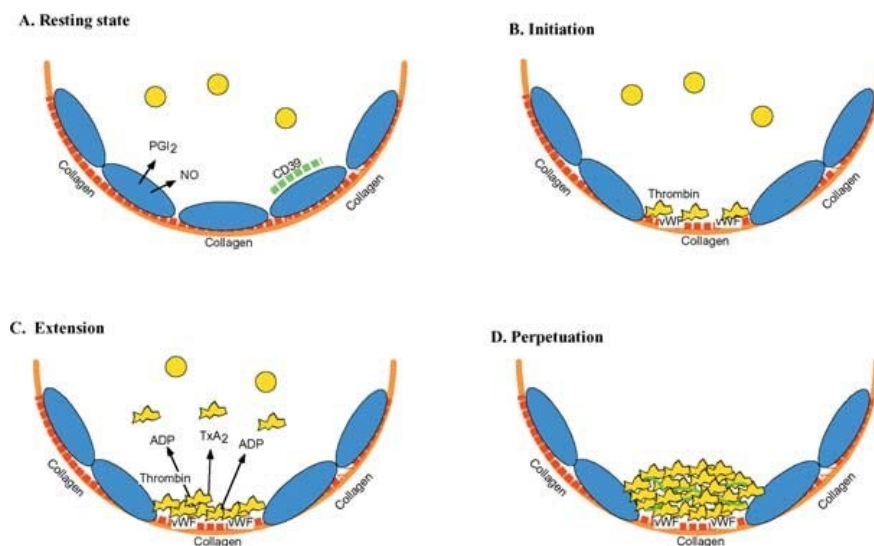
Aktivované destičky se akumulují a vytváří první tenkou vrstvu, která poté podporuje adhezi dalších trombocytů a vlastní agregaci. Při ruptuře plátu zároveň dochází k expozici TF cirkulující krvi. TF neboli koagulační faktor III se podílí na aktivaci tzv. zevní cesty systému koagulace. Je nezbytný pro zahájení přeměny protrombinu na trombin, který nejen hraje zásadní roli při konečné přeměně fibrinogenu na fibrin, ale je i jedním z klíčových aktivátorů destiček. S destičkami trombin interaguje přes receptory PAR1 a PAR4 (protease-activated receptor) štěpením N-konce receptoru, který poté slouží jako ligand. Aktivace PAR1/4 stimuluje několik signálních drah spojených s G-proteinem (G_q , $G_{12/13}$), na jejichž konci dochází ke změně tvaru destiček, sekreci obsahu granul, tvorbě TXA_2 a aktivaci GPIIb/IIIa (*Badimon a Vilahur 2014*).

Tromboxan A_2 je tvořen z kyseliny arachidonové (AA) uvolněné z membrány denzního tubulárního systému působením enzymu fosfolipasy A_2 . AA je poté rychle přeměněna na prostaglandiny G_2 a H_2 pomocí cyklooxygenasy-1 a následně na TXA_2 působením tromboxan synthasy. TXA_2 je uvolněn do krevního oběhu, kde se váže na TX receptor na povrchu dalších destiček a pozitivní zpětnou vazbou dále zesiluje aktivaci a agregaci. TX receptor je také spojen s G-proteinem (G_q), a aktivuje fosfolipasu C, která zajišťuje tvorbu diacylglycerolu (DAG) a inositol trifosfátu (IP3). DAG aktivuje proteinkinasu C, která podporuje změnu tvaru destiček a jejich degranulaci, a IP3 zvyšuje koncentraci cytosolických iontů Ca^{2+} , což vede k reorganizaci cytoskeletu (*Badimon a Vilahur 2014*).

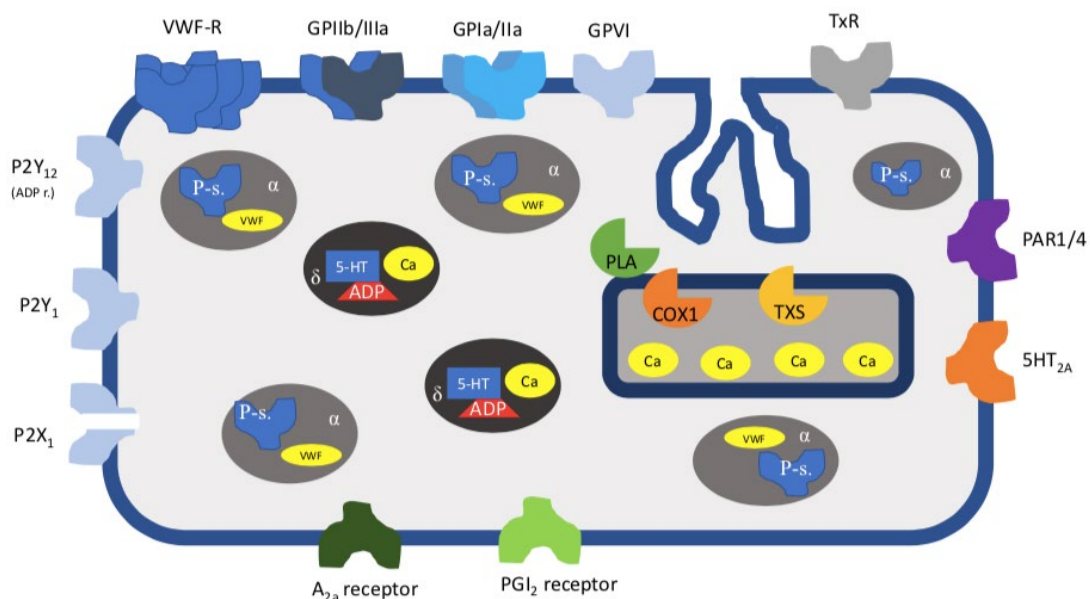
Další proagregační molekuly jsou secernovány z intracelulárních granul – ADP, trombospondin, faktor aktivující destičky (PAF) a další agonisté. PAF je jedním z nejsilnějších stimulátorů trombocytů. Při zánětlivých a infekčních procesech je uvolňován z aktivovaných leukocytů, endotelu i destiček samotných. ADP vzniká jednak degranulací destiček, jednak lýzou erytrocytů a zesiluje agregaci interakcí s purinovými

receptory P2Y₁ a P2Y₁₂ (také spojenými s G-proteinem). S receptorem P2X₁, což je iontový kanál pro Ca²⁺ ionty, pak interaguje ATP. Skrz zmíněné receptory iniciuje ADP dvě signální dráhy: fosfolipasou C řízené zvýšení koncentrace Ca²⁺ iontů a inhibici tvorby cyklického AMP (cAMP), čímž se destičky stávají vnímavější k aktivaci (*Badimon a Vilahur 2014*). Význam ADP jako jednoho z klíčových mediátorů agregace zdůrazňuje fakt, že odpověď destiček na TXA₂ a trombin je slabší v nepřítomnosti ADP receptorů. Tento poznatek podporuje domněnku, že jednotlivé cesty aktivace destiček jsou velmi složité a navzájem propojené. Společné působení všech mediátorů vede ke změně tvaru, degranulaci, adhezi dalších trombocytů a aktivaci GPIIb/IIIa, který podléhá konformační změně a váže fibrinogen. Díky tomu dochází k zachycení mnoha dalších trombocytů v rostoucím trombu a jeho následné stabilizaci. Fibrinogen je pouze jedním z řady lokálních působků, které jsou uvolňovány společně s hlavními aktivátory destiček (ADP, TXA₂, trombin). Další působky jsou např. serotonin, fibronectin, vitronectin, trombospondin, P-selektin a samozřejmě také koagulační faktory, které dále zesilují trombotickou odpověď. Samotné destičky podporují prokoagulační reakce, což dokazuje úzký vztah mezi agregací a koagulací. V pozdějších fázích agregace rostoucí trombus zachycuje i ostatní cirkulující buňky včetně erytrocytů a leukocytů (*Michelson 2003, Trojan 2003, Badimon a Vilahur 2014*).

Platelet Plug Formation



Obr. 5 – Zjednodušené schéma vzniku destičkového trombu. PGI₂ – prostacyklin, NO – oxid dusnatý, CD39 – enzym rozkládající ADP, vWF – von Willebrandův faktor, TXA₂ – tromboxan A₂. Převzato z: *Michelson (2003)*.



Obr. 6 – Povrchové receptory trombocytů a intracelulární struktury. P2Y₁₂, P2Y₁, P2X₁ – receptory pro ADP, VWF-R – receptor pro vWF, TxR – receptor pro TXA₂, PAR1/4 – protease-activated receptor (váže trombin), 5HT_{2A} –serotoninový receptor 2A, PLA – fosfolipasa A, COX1 – cyklooxygenasa 1, TXS – tromboxan synthasa. Receptor A_{2a} (váže adenosin) a rec. pro PGI₂ jsou inhibiční. Převzato z: *Mladěnka a Carazo (2022a)*.

3.2.4 KOAGULACE A FIBRINOLÝZA

Koagulační děje úzce souvisí s agregací destiček. Mezi hlavní společné faktory patří TF, který aktivuje destičky i koagulační kaskádu (vnější cestu) a je považován za primární fyziologický spouštěcí faktor koagulační kaskády. U některých patologických stavů, jako je dyslipidémie, dochází i k aktivaci tzv. vnitřní cesty koagulace. Obě cesty jsou ve velmi úzkém vztahu a společně vedou ke tvorbě trombinu, což je zásadní proteasa pro konečnou konverzi fibrinogenu na fibrin (*Blažek et al. 2007*).

Látky potřebné k vytvoření trombinu pocházejí z plazmy, destiček a tkání. Aktivní koagulační faktory mají většinou charakter proteolytických enzymů. Proces koagulace probíhá kaskádovitě. Aktivace jednotlivých proenzymů na aktivní enzymy spočívá v jejich štěpení enzymem aktivovaným v předchozí reakci (viz **Obr. 7**). Faktory vnitřního systému jsou obsaženy v plazmě, zevní cesta začíná uvolněním tkáňového faktoru. Společná pro všechny reakce (s výjimkou tzv. fáze kontaktu na začátku vnitřního systému) je přítomnost vápenatých iontů (*Trojan 2003*).

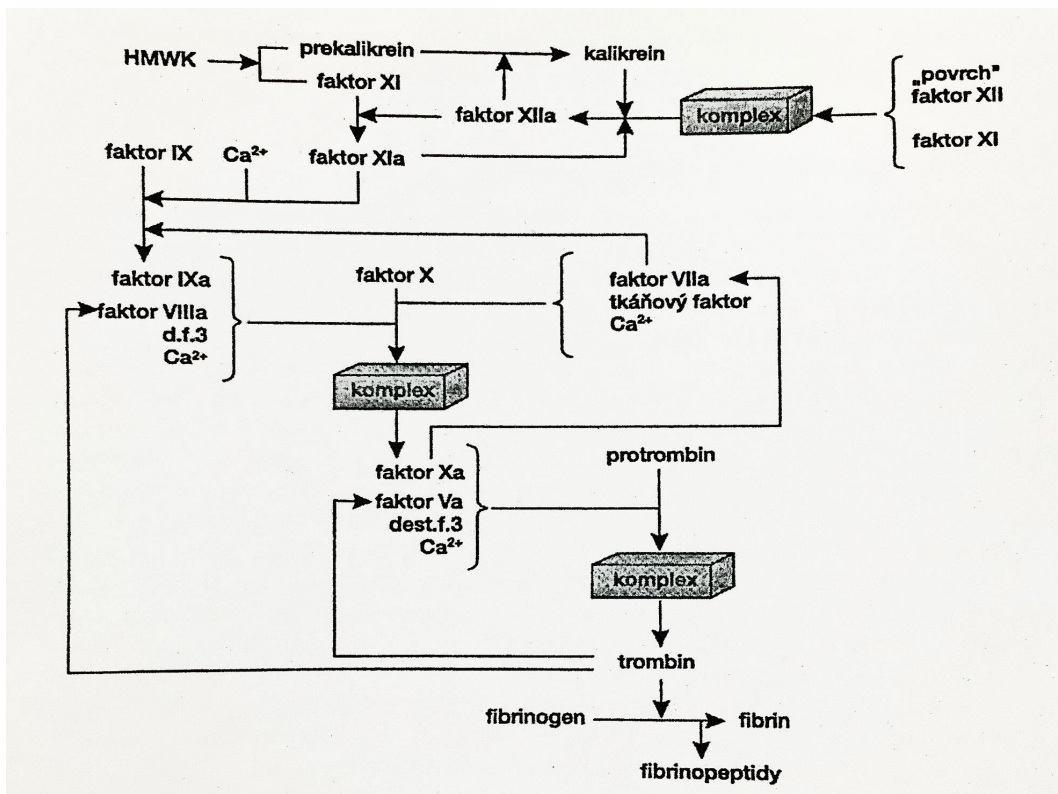
Koagulační faktory jsou označovány římskými číslicemi, které však nevyjadřují sled dějů (jejich přehled a základní poznatky viz **Tab. 3**). U aktivovaných faktorů se připojuje k číslici malé a. Všechny koagulační faktory (kromě f. III a IV) jsou glykoproteiny a patří mezi plazmatické globuliny. Většina faktorů je tvořena v játrech, kromě vWF, který je syntetizován endotelovými buňkami a megakaryocyty. Tvorba faktorů II, VII, IX, X a XIV je závislá na vitamínu K (*Trojan 2003, Mladěnka et al. 2022b*).

Vnitřní systém. Při ruptuře aterosklerotického plátu dochází k obnažení struktur subendotelia, které vytváří negativně nabitý povrch společně s fosfolipidy na povrchu trombocytů. Vnitřní systém tak začíná tzv. fází kontaktu, která spočívá v komplexní interakci mezi negativně nabitým povrchem a čtyřmi proteiny: faktorem XII, prekalikreinem, faktorem XI a HMWK (kininogenem o vysoké molekulové hmotnosti). Stykem s obnaženým povrchem dochází k autoaktivaci faktoru XII. Faktor XIIa aktivuje prekalikrein na kalikrein, který recipročně aktivuje další f. XII. Tím je vytvořeno dostatečné množství f. XIIa pro rychlou aktivaci f. XI. Úkolem HMWK je přinášet do tohoto místa prekalikrein a faktor XI. Faktor XIa poté aktivuje f. IX. Faktor IX může být aktivován za přítomnosti iontů Ca^{2+} nejen faktorem XIa, ale i aktivačním komplexem vnějšího systému. Faktor IXa se pak stává součástí aktivačního komplexu, jehož členy jsou dále f. VIIIa, destičkové fosfolipidy (d. f. 3) a Ca^{2+} ionty. Tento komplex konvertuje f. X na f. Xa. K celému ději aktivace f. X může dojít nejen na povrchu destiček, ale i na buňkách endotelu (*Trojan 2003*).

Vnější systém. Zatímco aktivace f. X ve vnitřním systému je relativně pomalá a zahrnuje celou řadu interakcí mezi několika faktory, konverze f. X na f. Xa v rámci zevního systému je poměrně rychlá. Rupturou plátu a narušením cévní stěny dochází k uvolnění TF (f. III). TF je transmembránový apoprotein, který nabývá koagulační aktivity spojením s membránovým fosfolipidem. Za fyziologických podmínek není exprimován endotelem, ale je hojně syntetizován okolními buňkami (buňky hladké svaloviny, fibroblasty aj.), s nimiž přijde krev do styku jen při narušení vnitřní vrstvy stěny cévy. V rámci aterosklerotické léze je TF lokalizován převážně v makrofázích, pěnových buňkách, buňkách hladké svaloviny a v detritech pěnových buněk v nekrotickém jádře plátu. TF je kofaktorem faktoru VII a tvoří společně s Ca^{2+} ionty komplex. Tato vazba je potřebná pro aktivaci samotného f. VII na f. VIIa, který poté aktivuje f. X (*Trojan 2003, Kvasnička 2012*).

Aktivita tkáňového faktoru je významně vyšší v lézích pacientů s nestabilní anginou pectoris nebo infarktem myokardu než u pacientů se stabilní formou kardiovaskulárních onemocnění, což může ukazovat na důležitou roli tohoto koagulačního proteinu v trombogenicitě plátu (*Kvasnička 2012*).

Společný systém. Vnitřní i vnější systém jsou navzájem propojeny a konvergují do jednotného sledu dějů, který začíná aktivací f. X. Faktor Xa je jediný známý enzym, který štěpí peptidické vazby protrombinu a přeměňuje ho na trombin. Aktivní faktor X účinkuje v komplexu s f. Va, fosfolipidy a ionty Ca^{2+} , vzniká tzv. aktivátor protrombinu. Faktor Va působí jako proteinový potencující kofaktor, který má vysokou afinitu ke kyselým membránovým fosfolipidům. Trombin (f. IIa) je účinný proteolytický enzym s velmi úzce vymezenou substrátovou specifitou. Je klíčovým a terminálním enzymem celého koagulačního systému. Jeho působením dochází nejen k přeměně fibrinogenu na fibrin, ale i k jeho stabilizaci aktivací faktoru XIII. Trombin dále aktivuje i faktory VIII a V pozitivní zpětnou vazbou, účastní se aktivace destiček a vazbou na membránu endotelu umožňuje aktivovat hlavní antikoagulační faktor – protein C (ten inaktivuje f. Va a VIIIa). Při konverzi fibrinogenu na fibrin trombin atakuje aminoterminální části α - a β - řetězců a uvolňuje dvojici malých fibrinopeptidů A a B. Zbývá molekula vznikající po odštěpení těchto částí se nazývá fibrin-monomer. Odstraněním fibrinopeptidů se zpřístupní komplementární místa molekul a umožní se spontánní polymerace fibrin-monomerů nekovalentními vazbami. Následně zasáhne aktivovaný f. XIII, který za přítomnosti Ca^{2+} iontů stabilizuje fibrin-polymer tvorbou kovalentních vazeb mezi α - a γ - řetězci sousedních molekul. Stabilizovaný fibrin je pevnější, elastičtější a odolnější vůči působení fibrinolytických faktorů. Fibrinová síť zpevňuje destičkový trombus a zachycuje erytrocyty. Vytváří tak definitivní hemostatickou zátku (*Trojan 2003*).



Obr. 7 – Koagulační kaskáda. Zobrazeny jsou vnitřní a vnější systém i společná cesta. HMWK – High Molecular Weight Kininogen, d.f.3 – destičkový faktor 3 (fosfolipidy). Převzato z: *Trojan (2003)*.

Tab. 3 – Přehled koagulačních faktorů.

Faktor	Název	Charakteristika, funkce
I	fibrinogen	velký protein tvořený třemi páry polypeptidových řetězců α , β a γ ; α , β mají terminálně vázané fibrinopeptidy, jejichž štěpením vzniká fibrin
II	protrombin	α_2 -globulin, jeho aktivní forma aktivuje faktory I, V, VII, VIII, XI, XIII, protein C a destičky
III	tkáňový faktor (TF)/tkáňový tromboplastin	transmembránový apoprotein, koagulačně aktivním se stává spojením s membránovým fosfolipidem; uplatňuje se jako kofaktor v zevním systému
IV	Ca^{2+} ionty	jsou nezbytné pro většinu interakcí v koagulační kaskádě
V	proakcelerin	kofaktor v komplexu aktivátoru protrombinu
VII	prokonvertin	aktivuje v komplexu zevního systému faktor X
VIII	antihemofilický faktor	chybění této složky je nejčastější vrozenou poruchou koagulace (hemofilie A), uplatňuje se jako regulační protein ve vnitřním systému; v plazmě cirkuluje ve vazbě s vWF
IX	Christmasův faktor	proenzym, po aktivaci v komplexu s f. VIIIa, fosfolipidy a Ca^{2+} přeměňuje f. X na Xa
X	Stuartův-Prowerové faktor	tvoří centrum v kaskádě reakcí při tvorbě aktivátoru protrombinu
XI	PTA (Plasma Thromboplastin Antecedent)	plasmatický předchůdce tromboplastinu, patří mezi proenzymy kontaktního systému
XII	Hagemanův faktor	stojí na začátku vnitřního systému (tzv. fáze kontaktu)
XIII	fibrin stabilizující faktor	podněcuje tvorbu kovalentních vazeb mezi monomery fibrinu a vede k tvorbě fibrinové sítě
	prekalikrein	součást kontaktního systému, jako enzym podporuje aktivaci f. XII a f. XI
	HMWK (High Molecular Weight Kininogen)	kininogen o vysoké molekulové hmotnosti, kofaktor ve fázi kontaktu na začátku vnitřního systému
XIV	protein C	proenzym antikoagulační serin-proteasy, jeho kofaktorem je protein S

Modifikováno dle: *Trojan (2003)*.

Současně s formací fibrinu dochází za fyziologických podmínek k aktivaci fibrinolytického systému, který po určité době štěpí fibrin na degradační produkty. Jeho

součástí jsou čtyři složky: plazminogen, plazmin, aktivátory a inhibitory plazminogenu (*Trojan 2003*).

V pokročilých fázích aterosklerózy ovlivňuje fibrinolytická aktivita pravděpodobně další progresi aterotrombózy. V aterosklerotických plátech byl prokázán zvýšený obsah PAI-1 (inhibitor aktivátoru plazminogenu), což je serinová proteasa představující jeden z nejvýznamnějších inhibitorů fibrinolytického systému. Je obsažen v α -granulech destiček a ochraňuje primární trombus před předčasným rozpuštěním. Při ruptuře plátu je uvolňován z aktivovaných destiček po jejich adhezi a agregaci na nestabilní plát. Zvýšené hodnoty PAI-1 jsou tak markerem zvýšené trombogeneze. Navíc zvýšení hladiny PAI-1 bývá spojeno se zvýšením jednoho z hlavních aktivátorů plazminogenu – tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA), protože t-PA se v séru nachází především vázaný v komplexu s PAI-1. Tento aktivátor proteolytickým štěpením konvertuje proenzym plazminogen na účinný plazmin (*Trojan 2003, Blažek 2007*).

Role t-PA či u-PA (urokinasový aktivátor plazminogenu) v patofyziologii aterotrombózy není zcela objasněna, zdá se však, že v arteriálním řečišti nemají takový antitrombotický vliv jako v žilním systému. Naopak mohou tyto proteázy dále aktivovat destičky nebo přispívat k ruptuře sklerotického plátu (*Blažek 2007*).

3.2.5 KOMPLIKACE ATEROTROMBÓZY

Aterotrombóza je onemocnění charakteristické pro současného člověka. Samotná ateroskleróza je relativně benigní onemocnění, destabilizace sklerotického plátu a trombotická okluze arterie je však maligní komplikací, která výrazně zhoršuje prognózu nemocných. V posledních letech se také ukazuje, že existuje souvislost mezi arteriální a žilní trombózou. Dosud jsme se domnívali, že formy trombogeneze v arteriálním nebo žilním systému se svojí etiopatogenezí zásadně liší – v případě arteriálních trombotických příhod hrají hlavní roli trombocyty, v případě žilního tromboembolismu aktivace koagulace a tvorba fibrinové zátky. Nyní se však ukazuje, že žilní tromboembolismus a aterosklerotický proces mají mnohé společné determinanty. Toto zjištění by mohlo vysvětlovat fakt, že až 67 % pacientů s idiopatickou žilní trombózou trpí zároveň dyslipidemií (*Stejskal 1999, Kvasnička 2012*).

Žilní a arteriální onemocnění zřejmě mohou mít řadu společných rizikových faktorů, jako je dyslipidémie, obezita, arteriální hypertenze, kouření a diabetes mellitus. Z hlediska patofyziologie se zřejmě jedná o podobný mechanismus poškození cévní stěny, na jehož počátku jsou subklinické zánětlivé změny zahrnující selhání regulačních

vlastností endotelu. Nepřímým, ale poměrně silným důkazem možné souvislosti mezi tepennými a žilními onemocněními jsou např. výsledky rozsáhlé placebem kontrolované intervenční studie, ve které *Glynn et al. (2009)* zjistili významný pokles nejen kardiovaskulárních příhod, ale i tromboembolických žilních příhod při podávání rosuvastatinu. Tento účinek nebyl závislý na hypolipidemických účincích, a proto se nabízí ve zmíněné skupině léčiv popsáný účinek převážně protizánětlivý. To dále podporuje teorii o subklinickém cévním zánětu jako společném jmenovateli aterosklerotických tepenných a žilních onemocnění. Zmíněné poznatky naznačují, že obě skupiny onemocnění by mohly být příznivě ovlivněny již zavedenými léčebnými postupy zaměřenými na prevenci kardiovaskulárních onemocnění aterosklerotického původu (*Pitřha et al. 2014*).

3.3 LDL-AFERÉZA

LDL-aféze (některými autory také označována jako lipoproteinaféze či lipidaféze) je velmi efektivní, ale finančně a časově náročná metoda specificky odstraňující LDL-cholesterol z cirkulující krve. Kromě LDL-částic je schopna odstraňovat i jiné lipoproteiny, obsahující (stejně jako LDL) apoB, jako jsou VLDL částice a také lipoprotein (a) neboli Lp (a), který má podobné složení jako LDL. Lipoprotein (a) je samostatný, nezávislý rizikový faktor aterosklerózy. LDL-aféze se řadí mezi léčebné (hem)afézy, což jsou metody odstraňování některých složek krve – např. leukocytáféze, trombocytáféze, erytrocytáféze nebo nespecifická plazmaféze. Ta se dříve používala i pro eliminaci LDL-C, ale dochází zde k prostému odnětí určitého objemu plazmy a jeho nahrazení náhradními roztoky. S žádaným odstraněním LDL-C je tedy odstraněna řada užitečných substancí. Specifičtější LDL-aféze je proto mnohem výhodnější. V současnosti je používáno 6 různých metod afézy. Klasickou metodou je imunoabsorpční LDL-aféze, která byla zavedena roku 1981 a v Československu byla poprvé použita v roce 1996. Od té doby hraje důležitou roli jako mnohdy život zachraňující metoda především u nejtěžší, tj. homozygotní formy FH (*Češka et al. 2015, Thompson a Parhofer 2019*).

3.3.1 KONVENČNÍ LÉČBA FAMILIÁRNÍ HYPERCHOLESTEROLEMIE

Základem terapie heterozygotní formy FH je farmakologická léčba. Hypolipidemická léčba sestává především z nejvyšší tolerované dávky statinu, protože statiny mají jednoznačné doklady o ovlivnění KVO, a měly by tak být první volbou u všech heterozygotů, ale i homozygotů. U heterozygotní formy jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy cholesterolu v hepatocytech, což vede k up-regulaci LDL-R a zvýšenému vychytávání cholesterolu z krve (Češka *et al.* 2015). U homozygotů se tento mechanismus do určité míry může také uplatnit, pokud mají zachovanou nějakou reziduální aktivitu LDL-R. Při totální absenci LDL-R nemají statiny efekt na hladiny LDL-C (Cuchel *et al.* 2014, Bouhairie a Goldberg 2015, Feingold 2021b). Je však známo, že statiny mají mnoho dalších protektivních účinků při rozvoji aterosklerózy a KVO, které se uplatňují v terapii obou forem FH. Působí protizánětlivě, antioxidačně, antitromboticky, zvyšují expresi NO-synthasy v endotelu a stabilitu aterosklerotického plátu, snižují rozvoj hypertrofie a fibrózy myokardu (Oesterle *et al.* 2017).

V současnosti jsou preferovány atorvastatin (v max. dávce 80 mg) a rosuvastatin (40 mg). Někdy však nejvyšší dávky nevedou dokonce ani k přiblížení k cílovým hodnotám, navíc jsou provázeny vyšším výskytem nežádoucích účinků. U řady nemocných se proto musí volit nižší dávky nebo méně účinné, ale bezpečnější statiny (fluvastatin, pravastatin). Protože monoterapie statiny nedosahuje cílů, využívá se často kombinační léčba, aby došlo alespoň k co nejtěsnějšímu přiblížení k cílovým hodnotám LDL-C. Využívá se kombinace s ezetimibem, který blokuje vstřebávání cholesterolu ve střevě, a je díky němu možné snížit dávku statinu. Tato kombinační léčba vede až k 70% redukci LDL-C. Někdy se využívá i trojkombinace – statin, ezetimib a pryskyřice (inhibitory reabsorpce žlučových kyselin). Další možností jsou fibráty, ty ale nejsou lékem volby pro kombinační léčbu FH. Výhodné jsou tam, kde jsou mírně zvýšené hladiny triglyceridů (Češka *et al.* 2015, Turgeon *et al.* 2016).

Cílové hodnoty LDL-C dle doporučení American Heart Association (AHA) a European Society of Cardiology (ESC) jsou <3 mmol/l v primární prevenci, u vysokého kardiovaskulárního rizika <2,5 mmol/l (v sekundární prevenci) a u velmi vysokého rizika <1,8 mmol/l (po proběhlé kardiovaskulární příhodě). European Atherosclerosis Society uvádí u pacientů s FH cílové hodnoty LDL-C <2,5 mmol/l a u pacientů s projevy ICHS a/nebo diabetem nebo jiným KVO <1,8 mmol/l (Češka *et al.* 2015, Thompson a Parhofer

2019). U pacientů s FH je ale obtížné těchto hodnot dosáhnout, proto je za cíl terapie považováno snížení LDL-C o více než 50 % původní hodnoty (Češka et al. 2015).

3.3.2 INDIKACE K LÉČBĚ LDL-AFERÉZOU

U závažných případů homozygotní FH, kdy standardní farmakoterapie v kombinaci s přísným dodržováním dietních a režimových opatření nevede k dosažení cílových hodnot LDL, je LDL-aferéza doporučena jako metoda volby. Další indikací LDL-aferézy jsou heterozygotní pacienti rezistentní na konvenční léčbu, netolerující vysoké dávky statinů nebo např. těhotné pacientky, u kterých jsou statiny i ezetimib kontraindikovány. U heterozygotních pacientů je potřeba LDL-aferézu zvážit zejména, pokud je již přítomna progresivní ICHS a pokud není dosahováno cílových hodnot LDL-C maximální tolerovanou hypolipidemickou farmakoterapií (Češka et al. 2015, Thompson a Parhofer 2019, Feingold 2020).

Efekt LDL-aferézy může být posílen v kombinaci s užíváním statinů. Výrazně ovlivňuje prognózu a délku přežití, homozygotní pacienti se díky ní dožívají 40-50 let, někdy i více (Bouhairie a Goldberg 2015, Benito-Vicente et al. 2018).

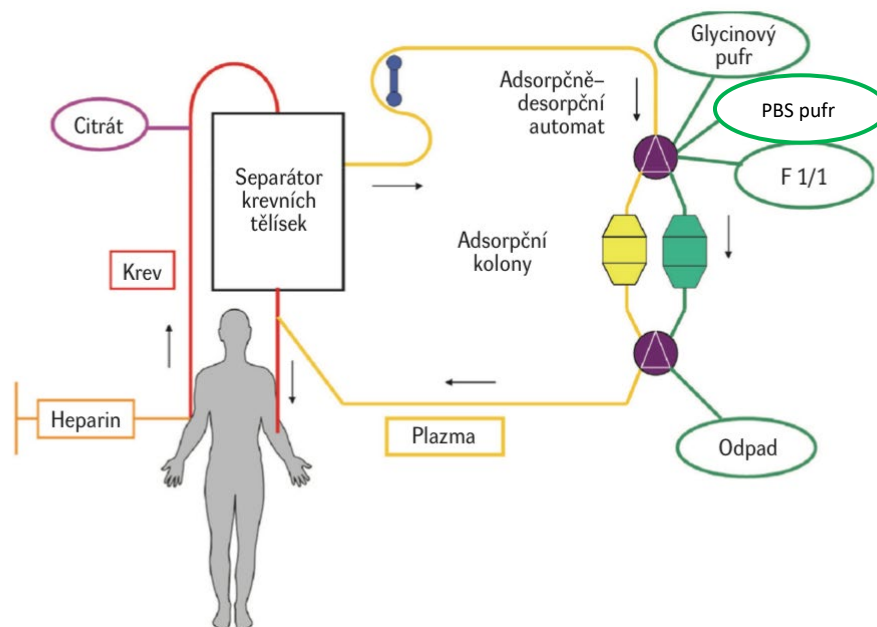
3.3.3 METODY LDL-AFERÉZY

V současné době je k dispozici šest metod LDL-aferézy: imunoadsorpce, dvojitá filtrace plazmy, metoda využívající dextransulfát, heparinem indukovaná precipitace (HELP), přímá adsorpce lipoproteinů (DALI) a dextransulfátová přímá adsorpce. Dvě poslední zmíněné metody odstraňují LDL-C z plné krve, zbylé metody primárně získávají plazmu buď centrifugací, nebo filtrací a s ní dále pracují (Češka et al. 2015).

Základem všech metod je odstraňování LDL-C v mimotělním oběhu. Pomocí jedné kanyly je krev odebírána z periferní žíly obvykle horní končetiny a je vedena do aferetického přístroje. Po odstranění LDL-C se očištěná krev vrací zpět druhou kanylou zavedenou do žíly stejné nebo druhé paže. U jednotlivých metod se pak liší způsob separace LDL-C v aferetickém přístroji (Češka et al. 2015, Feingold 2020).

Klasická LDL-aferéza, která je využívána i ve Fakultní nemocnici Hradec Králové, funguje na principu imunoadsorpce, kdy jsou využívány ovčí protilátky proti lidskému apoB. Schéma této metody je uvedeno na **Obr. 8**. Z odebrané krve je oddělována plazma centrifugačním (příp. membránovým) separátorem. Antikoagulace je

zajištěna úvodním bolusem heparinu a poté v mimotělním oběhu smísením plazmy s tzv. Acid Citrate Dextrose (ACD), což je vodný roztok kyseliny citronové, citrátu sodného a glukózy. Citrát váže vápenaté ionty za vzniku komplexu, který brání uplatnění kalcia v koagulační kaskádě. Tento komplex je pak bez problému odbourán v játrech. Oddělená plazma je dále čerpána do dvou adsorpčních kolon, uložených v řídicím adsorpčně-desorpčním automatu. Kolony obsahují polysacharid sepharosu, na kterou je kovalentně navázána ovčí protilátka proti apoB, tudíž je v koloně zachycen LDL obsahující apoB na základě imunologické reakce antigen-protilátka. Po průtoku určitého množství plazmy je první kolona zaplněna a pak automat přepne na druhou kolonu. Naplněná kolona je promývána fyziologickým roztokem a následně glycinem o nízkém pH, čímž se zachycené částice LDL uvolní z vazby (dochází k desorpci) a odtékají do odpadu. Poté je kolona ještě promyta pufrům pro úpravu pH, fyziologickým roztokem a je připravena k dalšímu použití. Systém páru kolon tedy pracuje střídavě a opakovaně, až je docíleno žádaného snížení množství LDL-C. V praxi toto trvá přibližně 3-5 hodin při přítoku z periferní žíly. Adsorpční kolony mohou být pro daného pacienta používány opakovaně, garantuje se 50 použití (Češka *et al.* 2015).



Obr. 8 – Schéma imunoabsorpční LDL-afézy. PBS pufr (Phosphate Buffered Saline) – fyziologický roztok s fosfátovým pufrům, F1/1 – fyziologický roztok. Převzato z: Češka *et al.* (2015).

3.3.4 PŘÍNOSY, VLIV NA KARDIOVASKULÁRNÍ RIZIKO

Všechny současně dostupné metody LDL-aférezы snižují hladinu LDL-C hluboce pod normu, obecně se udává průměrné snížení o 60-80 %. Tohoto účinku nebylo možné dříve docílit žádným jiným dosud známým medikamentózním způsobem. Na rozdíl od plazmaferézy nemá LDL-aférezа negativní dopad na HDL-C, albumin nebo imunoglobuliny (*Češka et al. 2015*).

Nevýhodou však je tzv. rebound fenomén. Po proceduře LDL-aférezы vzniká velmi důležitá, přibližně jednodenní perioda hypocholesterolemie, kdy se redistribuuje LDL-C z tkání. Následně ovšem dochází k opětovnému, poměrně rychlému vzestupu hladiny LDL-C, která se asi za dva týdny navrácí k původním hodnotám před procedurou. Proto je nutné výkony pravidelně opakovat v týdenních nebo dvoutýdenních intervalech. Každá procedura je navíc časově náročná, trvá přibližně 3-5 hodin. Přestože rychle dochází k rebound fenoménu, může pravidelná a dlouhodobá léčba LDL-aférezou zajistit průměrný pokles LDL-C asi o 40 % (*Bouhairie a Goldberg 2015, Češka et al. 2015*).

Může docházet i ke snížení hladiny HDL částic, ale jejich hladina se vrací na původní hodnotu během 24 hod. Podobný efekt můžeme pozorovat u triglyceridů, zde však také dochází k vyrovnání hladiny během 24 hod po proceduře. LDL-aférezа nevede pouze ke snížení hladiny LDL-C, vykazuje pleiotropní účinky na kardiovaskulární systém. Snižuje aktivitu zánětlivých markerů (např. CRP), fibrinogenu a dalších koagulačních faktorů, komplementu i hladin PCSK9 (*Feingold 2020*).

Jak již bylo zmíněno v úvodu, neexistují velké mezinárodní randomizované zaslepené a placebem kontrolované studie, které by detailně zhodnotily vliv LDL-aférezы na kardiovaskulární riziko. Provedení takové studie by bylo velmi obtížné vzhledem k tomu, že hypercholesterolemie je spojena se vznikem kardiovaskulárních příhod. Z etického hlediska by tak bylo nevhodné pacienty s velmi vysokými hladinami LDL-C záměrně neléčit. Byla však provedena řada jiných řízených studií, které potvrzují benefity LDL-aférezы a její efekt na prognózu FH (*Češka et al. 2015, Feingold 2020*).

Všechny dostupné studie a zkušenosti z velkých center potvrzují klinický benefit pravidelné a dlouhodobé léčby LDL-aférezou na kardiovaskulární systém. Poměr nákladů a efektivity je rovněž pozitivní (*Češka et al. 2015*). Byl také pozorován výrazný synergický efekt LDL-aférezы s farmakoterapií statiny, kdy dochází k signifikantní redukci stenózy (resp. zvýšení průsvitu) koronárních arterií (*Tatami et al. 1992, Kroon et al. 1996*). Dále byla popsána stabilizace až regrese procesu aterosklerózy (*Levine et al.*

1995, Kroon et al. 1998, Bláha et al. 2004), zlepšení perfúze myokardu a snížení němé či zátěžové ischemie (Aengevaeren et al. 1996). Jiné práce zase dokládají pozitivní změny ve fyziologických funkcích endotelu již po jedné proceduře LDL-afézy, včetně zvýšení syntézy NO (Igarashi et al. 1995, Tamai et al. 1997). Mezi další příznivé efekty metody, které vedou ke zlepšení prognózy, patří zvýšení rezistence LDL částic k oxidaci (Leitinger et al. 1996, Donner et al. 1999) či snížení exprese adhezních molekul (Uno et al. 1995). Důležitá je také prokázána normalizace funkce aktivovaných trombocytů (Sinzinger et al. 1996).

Více jak čtyřicetileté zkušenosti potvrzují úspěšnost a bezpečnost LDL-afézy. U vysoce rizikové skupiny homozygotních pacientů lze dosáhnout regrese aterosklerózy, primární i sekundární prevence aterogenních komplikací, a tak významně ovlivnit kvalitu života i délku přežití (Cuchel et al. 2014, Bláha et al. 2015). Heterozygoti jsou častěji léčeni až v rámci sekundární prevence a odstranění či výrazné zmírnění anginózních i klaudikačních symptomů se příznivě odrazí zejména ve zvýšení kvality života. Nicméně i u těchto pacientů s těžkou hypercholesterolemií (refrakterních či netolerujících léčbu statiny) řada prací prokázala nespornou účinnost LDL-afézy a snížení kardiovaskulární morbiditity (Thompson 2013, Bláha et al. 2015).

LDL-aféza je také jako jediná metoda možná v těhotenství. Díky léčbě LDL-aférou může těhotenství někdy hladce proběhnout i u homozygotních pacientek (Češka et al. 2015).

3.4 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY A DALŠÍ MODERNÍ LÉČIVA

V současné době jsou na trhu dostupná novější léčiva, která lze využít v případě, že pacienti netolerují léčbu statiny nebo nedosahují cílových hodnot. Díky vývoji těchto nových hypolipidemik se v budoucnu pravděpodobně sníží nutnost použití LDL-afézy u některých pacientů s FH, především u heterozygotů. Léčba LDL-aférou by se tedy mohla zúžit na homozygotní pacienty (Feingold 2020).

Jednou z možností moderní farmakoterapie heterozygotní formy FH (a případně i homozygotní formy s reziduální aktivitou LDL-R) jsou PCSK9-inhibitory (PCSK9i). Pokud nestačí terapie statiny, ev. statiny v kombinaci s ezetimibem, má být zváženo právě přidání PCSK9i. Za určitých podmínek, např. statinové intolerance mohou být využity v monoterapii, ale jsou vhodné i do dvoj- nebo trojkombinace. PCSK9i snižují LDL-C

v průměru o 50–60 % (v monoterapii i v kombinacích) a redukují riziko aterosklerotických kardiovaskulárních příhod (*Soška a Kyselák 2021*).

Jedná se o monoklonální protilátky proti enzymu PCSK9 a v současnosti jsou dostupné dvě – alirokumab a evolokumab. Jejich mechanismus účinku spočívá ve vazbě na PCSK9 a jeho inaktivaci. Tím je znemožněna vazba PCSK9 na LDL-R a internalizace tohoto komplexu v endozomu, která brání recyklaci LDL-R. Výsledkem je zvýšení počtu povrchových LDL-R s následným urychlením vychytávání a degradace částic LDL a poklesem hladiny LDL-C (*Vrablík 2014, Soška a Kyselák 2021*). Role PCSK9 v metabolismu LDL-R je znázorněna na **Obr. 9**.

PCSK9i jsou primárně eliminovány buněčnou endocytózou a fagocytózou, nejsou metabolizovány ani vylučovány játry či ledvinami, není proto potřeba upravovat dávkování u pacientů se sníženou funkcí jater nebo ledvin. Nebyly u nich pozorovány žádné lékové interakce, neinteragují s enzymy cytochromu P450 ani transportními proteiny (*Feingold 2021b*).

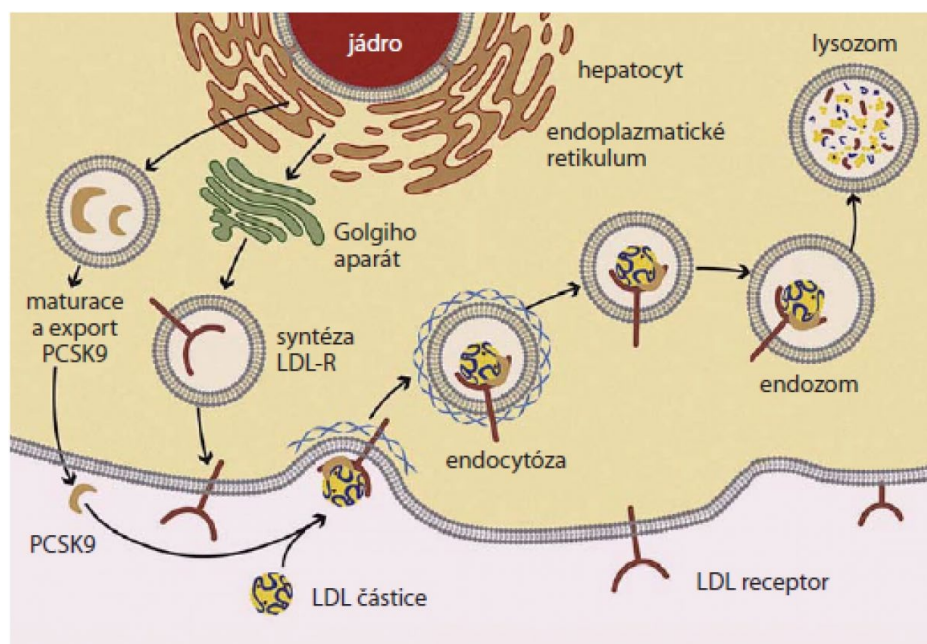
Podávají se subkutánně v závislosti na dávce jednou nebo dvakrát měsíčně. Jejich výhodou je vysoká účinnost a malé množství nežádoucích účinků. Významné nežádoucí účinky zahrnují většinou pouze reakce v místě aplikace. Byly u nich dokonce prokázány pleiotropní účinky podobně jako u statinů – antiaterosklerotické, účinky stabilizující aterosklerotický plát, protizánětlivé, antitrombotické či antineoplastické. Díky těmto účinkům je jejich použití přínosné i u homozygotní formy FH. Nevýhodou monoklonálních protilátek je ale vysoká cena (*Basiak et al. 2021, Feingold 2021b*).

Mezi nejnovější léčiva schválená pro léčbu FH patří inkliširan, který patří do skupiny malých interferujících molekul RNA (siRNA, z angl. small interfering RNA). Indikace inkliširanu jsou shodné s monoklonálními protilátkami PCSK9i a týkají se dospělých pacientů s primární hypercholesterolemií (heterozygotní familiární a nefamiliární formou) nebo smíšenou dyslipidémií (*Slíva 2021*).

Mechanismem účinku se inkliširan podobá inhibitorům PCSK9. Působí v hepatocytech, kde specificky stimuluje štěpení mRNA kódující PCSK9, čímž redukuje syntézu PCSK9 a výrazně tak snižuje jeho hladiny v plazmě (*Feingold 2021b, Slíva 2021*).

Výsledky klinických studií ukazují, že při terapii inkliširanem dochází k významnému snížení hladiny LDL-C. Nespornou výhodou této léčby oproti monoklonálním protilátkám je podávání subkutánně jednou za 6 měsíců, což by mohlo zvýšit compliance pacientů. Prozatím jedinými nežádoucími účinky spojenými

s užíváním inklisiranu byly opět nežádoucí účinky v místě vpichu (*Feingold 2021b, Sliva 2021*).



Obr. 9 – PCSK9 a degradace LDL-R. Převzato z: *Vrablík (2014)*.

Pro léčbu homozygotní FH s nefunkčními LDL-R jsou pak schválená léčiva lomitapid a mipomersen (ten je zatím schválen pouze v USA). Mechanismus účinku těchto léčiv není na rozdíl od statinů, ezetimibu či monoklonálních protilátek proti PCSK9 závislý na aktivitě LDL-R. Lomitapid je inhibitor MTP (microsomal transfer protein). Tento protein hraje významnou roli v transportu cholesterolu, triglyceridů a produkci VLDL v játrech a chylomikronů ve střevě. Lomitapid tak snižuje hladinu LDL-C i triglyceridů. Mipomersen je antisense oligonukleotid inhibující syntézu apolipoproteinu B a je podáván ve formě subkutánních injekcí (*Češka et al. 2015, Bouhairie a Goldberg 2015, Benito-Vicente et al. 2018*).

4. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo otestovat možné rozdíly v agregaci trombocytů a koagulaci krve u pacientů s FH, a to ve vztahu k použité léčebné metodě a v porovnání se zdravými jedinci. FH pacienti byli léčeni monoklonálními protilátkami proti PCSK9 a část z nich navíc podstupovala LDL-afézu.

Dalším cílem bylo zjistit, zda existuje korelace mezi agregací destiček a hladinami lipidů – triglyceridů, celkového, LDL-cholesterolu a tzv. „non-HDL“ cholesterolu, který vyjadřuje sumu cholesterolu obsaženého ve všech potenciálně aterogenních lipoproteinových částicích – LDL, IDL, VLDL a zbytcích chylomikronů.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 MATERIÁL

5.1.1 KOHORTA DÁRCŮ

Vzorky krve byly získány ve spolupráci s III. interní gerontometabolickou klinikou Fakultní nemocnice Hradec Králové (Prof. Milan Bláha), kam také pacienti s FH docházeli na LDL-aférezu. Vzhledem k tomu, že FH patří mezi méně častá onemocnění, skládala se kohorta dárců krve z menšího souboru patnácti pacientů. Jednalo se ale o všechny pacienty, kteří do této nemocnice docházejí s diagnózou FH. V této skupině pak osm pacientů podstoupilo LDL-aférezu, zbylých sedm nebylo léčeno aferézou. Šest pacientů na LDL-aférezu bylo zároveň léčeno inhibitory PCSK9. Stejně tak ve skupině bez aferézy šest pacientů užívalo inhibitory PCSK9. Ke vzorkům krve všech nemocných byly pro porovnání získány vzorky od zdravých dobrovolníků, věkově shodných s pacienty s FH (stejná klinika, MUDr. Pavel Skořepa).

Všichni účastníci studie před odběrem vyplnili informovaný souhlas, GDPR dokumenty a dotazník s klíčovými informacemi ve vztahu k našemu projektu. Součástí dotazníku byla hmotnost a výška pacienta, věk, pohlaví, kouření (ANO/NE), diagnóza/y (u pacientů jiná než FH) a užívaná léčiva. Základní data o pacientech s FH jsou shrnuta v **Tab. 4-6**. Studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (číslo 202007 S01P z 18. června 2020) a všechny experimenty byly provedeny v souladu s principy aktuálního znění Helsinské deklarace.

5.1.2 ODBĚRY A ZPRACOVÁNÍ KRVE

U pacientů podstupujících LDL-aférezu byly provedeny vždy dva odběry – první těsně před aferézou a druhý ihned po jejím skončení. Aferéza trvala vždy cca 4 hodiny. První odběr před procedurou probíhal ráno na lačno a sestra postupně krev odebírala do zkumavek v následujícím pořadí: 6 ml srážlivé krve na serum do zkumavky s akcelerátorem agregace pro stanovení hladin lipidů (LDL-C, HDL-C, triglyceridy), glykémie, zánětlivých markerů a vitamínu K; 2x4,5 ml krve do citrátových zkumavek (obsahujících 3,2 % citrát sodný) pro měření koagulace a stanovení mikrodestiček a agregátů leukocyt-destička; 2x10 ml krve do heparinizovaných zkumavek (170 IU/10 ml) pro měření agregace. Stejný postup byl zopakován u pacientů s FH, kteří

nepodstoupili LDL-afézu, a zdravých dobrovolníků, kdy byl proveden pouze jeden ranní odběr.

Transport odebrané krve byl vždy zajištěn tak, aby byl experiment zahájen přesně 30 minut po ukončení odběru. Po dopravení vzorků na FaF bylo odebráno 750 μ l citrátové krve na průtokovou cytometrii a zbytek se ihned dal centrifugovat na plazmu pro stanovení koagulace při 3795 otáčkách/min (2000 g) na centrifuze Hettich Universal 320 R (radius rotor 138 mm), po dobu 20 min. Heparinizovaná krev byla po přinesení opatrně promíchána a totéž se dělo pravidelně při provádění experimentu před každou další sérií.

Lipidy a glykémie byly stanoveny standardním způsobem na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Tab. 4 - Genetická data pacientů s FH.

Pacient č. (pohlaví)	LDL- aféza (roky)	Bez aferézy	Fenotyp	Gen	Varianta 1 změny DNA	Varianta 2 změny proteinu	Lokace exonu
1 (M)	-	ANO	HeFH	-	-	-	E4-8
2 (M)	-	ANO	HeFH	LDL-R	-	p.Asp345Ala	E9
3 (Ž)	-	ANO	HeFH	LDL-R	-	p.Gln378Pro	E8
4 (M)	-	ANO	HeFH	LDL-R	-	p.Gly324Ala fsX46	E7
5 (M)	-	ANO	HeFH	LDL-R	c.2072C>A	p.Ser691Ter	-
6 (M)	-	ANO	HeFH	LDL-R	c.2072C>A	p.Ser691Ter	-
7 (M)	-	ANO	HeFH	LDL-R	c.1775G>A	p.Gly592Glu	E12
8 (Ž)	ANO (22)	-	HoFH	LDL-R	c.1474G>A; c.1775G>A	-	E10; E12
9 (Ž)	ANO (10)	-	HoFH	LDL-R	-	p.Asp354Ala	E8
10 (Ž)	ANO (5)	-	HoFH	LDL-R	c.1729T>G; c.1414G>T	p.Trp577Gly p.Asp472Tyr	-
11 (Ž)	ANO (22)	-	HeFH	-	-	-	-
12 (M)	ANO (5)	-	HeFH	-	EX9_14del	-	E9-14
13 (Ž)	ANO (19)	-	HeFH	-	-	-	-
14 (M)	ANO (25)	-	HeFH	-	-	-	-
15 (M)	ANO (20)	-	HoFH	LDL-R	c.1775G>A; c.2390- 1G>A	-	E12; E16

M: muž; Ž: žena; HeFH: heterozygotní familiární hypercholesterolemie; HoFH: homozygotní familiární hypercholesterolemie; LDL-R: low density lipoprotein receptor.

Tab. 5 - Charakteristika pacientů s FH.

		LDL- aferéza	Bez LDL- aferézy	p-hodnota
Pacienti, N		8	7	
Věk ^a	40-77	57 ± 13	48 ± 6	0,151
BMI ^a	18,5-30+	27,65 ± 4,21	30,87 ± 4,17	0,191
Kouření	ANO	1 (12,5 %)	-	0,333
COVID-19 ^b	ANO	2 (25 %)	3 (42,9 %)	0,464
KVO	Arteriální hypertenze	3 (37,5 %)	-	0,070
	AKB	2 (25 %)	2 (28,6 %)	0,876
	AS karotid	3 (37,5 %)	3 (42,9 %)	0,833
	ICHS	5 (62,5 %)	2 (28,6 %)	0,189
	PAD	2 (25 %)	-	0,155
	AS+kalcifikace/AS+defekt/ pouze AS	3 (37,5 %)	1 (14,3 %)	0,310
	aortální chlopně			
	CMP	1 (12,5 %)	-	0,333
	Mírná stenóza levé ACC	1 (12,5 %)	-	0,333
	Bilaterální AS a kalcifikace ACC	1 (12,5 %)	-	0,333
Hemodyn. nevýznamná aort. stenóza	1 (12,5 %)	-	0,333	
Onemocnění	FH	8 (100 %)	7 (100 %)	-
	Diabetes mellitus typ 1	2 (25 %)	1 (14,3 %)	0,605
	Hypothyreóza	3 (37,5 %)	-	0,070
	Anémie	1 (12,5 %)	-	0,333
	Alergie	1 (12,5 %)	-	0,333
	Glaukom	1 (12,5 %)	-	0,333
	Astma bronchiale	1 (12,5 %)	-	0,333

AKB: aortokoronární bypass; ACC: společná karotida, z lat. *arteria carotis communis*; AS: ateroskleróza; BMI: body-mass index; CMP: cévní mozková příhoda; ICHS: ischemická choroba srdeční; KVO: kardiovaskulární onemocnění; PAD: onemocnění periferních tepen (**p**eripheral **a**rtery **d**isease); N: počet pacientů. Data jsou prezentována jako počet pacientů v obou skupinách a v procentech z celkového počtu subjektů ve skupině s aferézou (n=8) a bez aferézy (n=7). P-hodnoty byly stanoveny pomocí statistického softwaru GraphPad 9.3.1 s využitím nepárového t-testu nebo Chí-kvadrátového (a Fisherova exaktního) testu. BMI bylo vypočítáno pomocí vzorce: hmotnost [kg]/ (výška [m])². ^a Věk a BMI jsou prezentovány jako průměr ± SD. ^b Pacienti, kterým byl diagnostikován COVID-19 v období 3–7 měsíců před odběry krve.

Tab. 6 – Léčiva užívaná pacienty s FH.

		Hypolipidemická léčba	Antiagregancia	Antikoagulancia
M	HeFH	PCSK9i + S + E		
M	HeFH	PCSK9i + S + E		
F	HeFH	PCSK9i + S + E		
M	HeFH	PCSK9i + S + E		
M	HeFH	PCSK9i + S + E	enterosolventní ASA	
M	HeFH	PCSK9i + S + E	ASA	
M	HeFH	S + E		
F	HoFH	LDL-aferéza + PCSK9i + S + E		warfarin
F	HeFH	LDL-aferéza + PCSK9i + S + E	enterosolventní ASA	apixaban
M	HeFH	LDL-aferéza + PCSK9i + E	ASA	
F	HoFH	LDL-aferéza + PCSK9i + S + E	klopidogrel, ASA	
M	HoFH	LDL-aferéza + PCSK9i + S + E + L	ASA	
F	HeFH	LDL-aferéza + S + E		warfarin, Detralex®
M	HeFH	LDL-aferéza + S + Fi	klopidogrel, enterosolventní ASA	
F	HoFH	LDL-aferéza + PCSK9i + S + E + L		

Hypolipidemika + ATC kód: S – statiny (C10AA); Fi – fenofibrát (C10AB); E – ezetimib (C10AX09); L – lomitapid (C10AX12); PCSK9i – monoklonální protilátky (C10AX13-14).

5.1.3 REAGENCIA

Induktory agregace

V této práci bylo použito celkem sedm induktorů pro otestování různých cest aktivace destiček. Byly použity fyziologické induktory jako kolagen, ADP a PAF (konkrétně PAF-16), ale i syntetické sloučeniny aktivující požadované cesty agregace. Mezi ně patřily kyselina arachidonová (AA), ristocetin, U-46619 a thrombin receptor activating peptide (TRAP). Tato analoga byla použita, abychom se vyhnuli problémům

spojeným s použitím endogenních látek. Ristocetin, původně antibiotikum, přímo interaguje s vWF a jeho receptorem, proto byl s výhodou použit místo endogenního vWF, což je příliš velká a heterogenní molekula. U-46619 je dobře známý a stabilní analog tromboxanu A₂, který je naopak velmi nestabilní. TRAP je využíván jako analog trombinu, jehož nevýhodou je, že kromě agregace aktivuje i koagulaci. TRAP reprezentuje N-terminální sekvenci aminokyselin vznikající po navázání trombinu na PAR enzymatickým odštěpením z tohoto receptoru. Tato sekvence pak slouží jako ligand pro PAR. Výhodou TRAP je, že postrádá enzymatickou aktivitu trombinu, tím pádem aktivuje pouze destičky.

- AA – Roche (Basel, Švýcarsko)
- kolagen – Diagnostica, a.s. (Praha, ČR)
- ADP – Roche (Basel, Švýcarsko)
- TRAP-6 – Roche (Basel, Švýcarsko)
- ristocetin – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
- PAF-16 – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
- U-46619 – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)

Antiagregancia

V experimentu byla využita tři klinicky užívaná antiagregancia: kyselina acetylsalicylová (ASA) – inhibitor COX₁, tikagrelor – antagonist receptoru P2Y₁₂ pro ADP, vorapaxar – antagonist thrombinového receptoru PAR-1 (relativně novější léčivo, používá se momentálně jen v USA, v Evropě ne).

- ASA – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
- tikagrelor – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
- vorapaxar – Selleck Chemicals GmbH (Planegg, Německo)

Induktory koagulace

Všechny induktory byly zakoupeny od Technoclone (Viedeň, Rakousko). Také kontrolní plazma byla zakoupena od tohoto výrobce.

- Technoplastin HIS[®] – tkáňový tromboplastin (f. III) s ionty Ca²⁺ (PT test)
- Dapttin TC[®] – oxid křemičitý, sulfatid (druh sfingolipidu) představující záporně nabitý povrch a směs purifikovaných fosfolipidů (aPTT test)
- chlorid vápenatý – CaCl₂ (aPTT test)

Antikoagulancia

- heparin (5000 IU/ml) – komerčně dostupný preparát HEPARIN LÉČIVA (Zentiva, ČR)
- apixaban – Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)
- argatroban – Selleck Chemicals GmbH (Planegg, Německo)
- dabigatran – Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
- rivaroxaban – Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)

Rozpouštědla

- dimethylsulfoxid (DMSO) – Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
- superčistá voda – připravena přístrojem Milli-Q[®] RG (Merck Millipore, Massachusetts, USA)
- fyziologický roztok – B.Braun (Melsungen, Německo)

5.1.4 PŘÍSTROJE A DALŠÍ POMŮCKY

- impedanční agregometr Multiplate[®] Analyzer (Roche Diagnostic, Basel, Švýcarsko)
- koagulometr Ceveron[®] (Technoclone, Vídeň, Rakousko)
- analytické váhy (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- vortex IKA[®] Vortex Genius 3 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- centrifuga Hettich Universal 320 R (Hettich, Tuttlingen, Německo)
- mikrozkmavky – 0,5 ml; 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- automatické pipety (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- špičky k pipetám (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- kyvety pro stanovení agregace krevních destiček – Multiplate[®] Test Cells (Roche Diagnostic, Basel, Švýcarsko)
- kyvety pro stanovení koagulace (Technoclone, Vídeň, Rakousko)

5.2 METODIKA PRO MĚŘENÍ AGREGACE TROMBOCYTŮ

5.2.1 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ INDUKTORŮ A ANTIAGREGANCIÍ

Před přípravou reagensů bylo nutné zapnout agregometr, který se postupně vytemperoval na 37°C. Zároveň byl z lednice vytažen fyziologický roztok a naplnil se do zkumavek, které byly vloženy do přístroje, aby se roztok zahřál na požadovanou teplotu. Většina induktorů byla předpipetována a uchovávána ve formě zásobních roztoků k rychlému využití v experimentu. Zásobní roztoky AA, ADP, TRAP a U-46619 jsou stabilní 4 týdny při uchovávání při – 20 °C, kolagen v lednici (2–8 °C) také 4 týdny, ristocetin v lednici 1 týden a PAF při – 80 °C má zaručenou stabilitu 3 měsíce. Antiagregancia vorapaxar a tikagrelor byla také uložena ve formě zásobních roztoků při – 20 °C se stabilitou 4 týdny, zatímco ASA neměl předem připravené zásobní roztoky, pracovní roztoky byly připraveny vždy až v den experimentu.

Po zapnutí přístroje bylo potřeba vytáhnout z mrazáku (– 20 °C) balíček obsahující induktory AA (95 µl, 15 mM), ADP (95 µl, 0,2 mM), TRAP (60 µl, 1 mM) a protidestičková léčiva vorapaxar a tikagrelor. Induktory byly po rozmrznutí již připraveny k použití v uvedených koncentracích. Analogicky byl uchováván induktor U-46619 (1 mM), ten byl ale rozmražen a naředěn až těsně před vlastním měřením. Následovalo vytažení hluboce zmrazeného zásobního roztoku PAF (2 mM). K 10 µl tohoto roztoku bylo ihned přidáno 90 µl ethanolu, čímž jsme získali koncentraci 200 µM.

V dalším kroku byly připraveny roztoky antiagregancií. U ASA byl nejprve připraven zásobní roztok o koncentraci 30 mM. Navážka a potřebné množství rozpouštědla (DMSO) pro přípravu 30 mM roztoku byla vždy vypočítána dopředu. Po rozpuštění ASA se ze zásobního roztoku připravily i pracovní roztoky.

Dále se naředily již rozmrzlé zásobní roztoky vorapaxaru a tikagreloru a z lednice se vytáhl ristocetin a kolagen. Pro zásobní roztok kolagenu bylo k dispozici výrobcem určené nespécifikované rozpouštědlo určené pro ředění kolagenu. Nakonec byly naředěny roztoky PAF a U-46619. Deset minut před zahájením experimentu byl připraven finální pracovní roztok PAF. K 10 µl roztoku o koncentraci 200 µM, připraveného v prvních krocích, bylo přidáno 790 µl fyziologického roztoku, čímž jsme získali roztok 2,5 µM. Pracovní roztok U-46619 byl připraven až těsně před jeho použitím v experimentu. Po vytažení z mrazáku bylo ihned k 10 µl 1 mM roztoku přidáno 990 µl fyziologického roztoku, a byl tak získán 10 µM pracovní roztok.

Detaily ředění reagensů jsou znázorněny v **Tab. 7** a **Tab. 8**. Použité koncentrace induktorů byly většinou zvoleny na základě výsledků předchozích studií výzkumné skupiny Kardiiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie se zdravými dobrovolníky. Byla vždy zvolena nejnižší koncentrace, která vyvolala maximální efekt v předchozích experimentech (*Carazo et al. 2023*). Koncentrace ristocetinu byla vybrána na základě dostupných údajů z literatury (*Frontroth a Favaloro 2017*). U tikagreloru a ASA byla také zvolena koncentrace použitá v jiných studiích, jedná se o léčiva již dobře známá. Vorapaxar je však relativně nové klinicky používané antiagregans, proto byla u něj nejprve na vzorcích krve několika dobrovolníků stanovena na dávce závislá míra inhibice. Ze vzniklé křivky této závislosti byla odečtena IC₅₀ (polovina maximální inhibiční koncentrace), a ta pak byla použita v našem experimentu (*Carazo et al. 2023*).

Tab. 7 – Příprava roztoků induktorů.

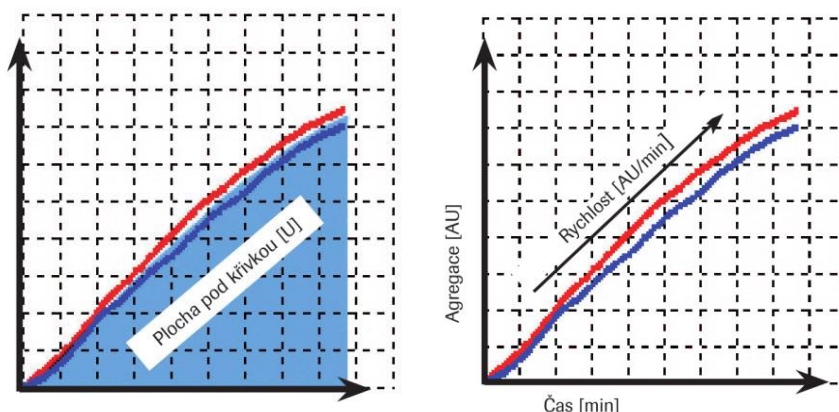
Induktor	Koncentrace zás. roztoku	Objem zás. roztoku	Ředění: rozpouštědlo + objem	Koncentrace pracovního roztoku
AA	15 mM	-	připraven k použití po rozmražení	15 mM
ADP	0,2 mM	-	připraven k použití po rozmražení	0,2 mM
TRAP	1 mM	-	připraven k použití po rozmražení	1 mM
kolagen	1 mg/ml	20 µl	180 µl „collagen diluent R2“	100 µg/ml
ristocetin	12,5 mM	-	připraven k použití	12,5 mM
PAF	2 mM	10 µl	90 µl ethanolu	200 µM
PAF	200 µM	10 µl	790 µl fyz. roztoku	2,5 µM
U-46619	1 mM	10 µl	990 µl fyz. roztoku	10 µM

Tab. 8 – Příprava roztoků inhibitorů.

Inhibitor	Koncentrace zás. roztoku	Objem zás. roztoku	Ředění: rozpuštědlo + objem	Koncentrace prac. roztoku
vorapaxar	10 mM	10 µl	70 µl DMSO	1,25 mM
vorapaxar	1,25 mM	10 µl	90 µl DMSO	0,125 mM
tikagrelor	0,625 mM	10 µl	90 µl DMSO	0,0625 mM
ASA	30 mM	85 µl	215 µl DMSO	8,5 mM
ASA	30 mM	37 µl	263 µl DMSO	3,7 mM

5.2.2 IMPEDANČNÍ AGREGOMETRIE

Agregace destiček byla měřena pomocí přístroje Multiplate[®] Analyzer, který pracuje na principu impedanční agregometrie. V praxi se přístroj používá pro vyšetření funkčních defektů krevních destiček a monitorování protideštičkové léčby, kdy analyzátor detekuje pouze aktivované destičky. Přidáním různých induktorů můžeme monitorovat různé cesty aktivace adheze a agregace destiček. Samotné měření se provádí v jednorázových kyvetách, které obsahují dva senzory, každý tvořený dvěma elektrodami pokrytými vrstvou stříbra. Tímto způsobem je zajištěna vnitřní kontrola kvality každého měření. Jednotlivé kyvety jsou propojeny s pěti nezávislými měřicími kanály, které umožňují měření pěti vzorků současně. Přidáním vhodného induktoru je zahájen proces aktivace a agregace krevních destiček. Destičky se přichycují na povrch elektrod, což se projeví nárůstem impedance (odporu) mezi elektrodami. Přístroj převádí impedanci na velikost agregace v čase [vnitřní jednotky AU]. Další parametr, který přístroj vypočítá, je rychlost procesu agregace, což je směrnice přímky [AU/min]. Nejdůležitějším parametrem je však plocha pod agregační křivkou (AUC) udávaná v bezrozměrných jednotkách [U], která nejlépe vyjadřuje celkovou aktivitu destiček. Protože máme v kyvetách dva na sobě nezávislé senzory, máme i dvě křivky grafu, které jsou hodnoceny zvlášť (viz **Obr. 10**). Vypočítané parametry jsou průměrem hodnot jednotlivých křivek. Přístroj zaznamenává rozdíl mezi křivkami a počítá korelační koeficient, který by neměl být menší než 0,98 (*Hoffmann-La Roche Ltd., 2017-2021*).



Obr. 10 – Výstupní parametry agregometru Multiplate®. Převzato z: *Hoffmann-La Roche Ltd. (2017-2021).*

Při měření se postupovalo podle jasně daného schématu (**Tab. 9-14**), které sestávalo ze šesti sérií měření. Na začátku každé série bylo do měřicích kyvet napipetováno 300 μ l přehřátého fyziologického roztoku a 300 μ l plné krve. Poté se podle schématu krev nechala inkubovat s inhibítorem (ASA, tikagrelor, vorapaxar) nebo rozpouštědlem DMSO (finální koncentrace 0,8 %) po dobu 3 min. Následně byla stimulována agregace přidáním induktorů v požadované koncentraci (viz **Tab. 15**) a monitorována 6 min. Po skončení každého cyklu se zaznamenaly hodnoty AUC [U], velikost agregace [AU] a rychlost [AU/min].

Tab. 9 - Schéma antiagregační série 1.

Kanál č.	Inhibitor/rozpouštědlo			Induktor		
	typ	μ l	koncentrace	induktor	μ l	koncentrace
1	DMSO	5	-	U-46619	5	0,01 mM
2	DMSO	5	-	PAF	5	2,5 μ M
3	DMSO	5	-	PAF	5	2,5 μ M
4	DMSO	5	-	U-46619	5	0,01 mM
5	4-MC*	5	2,4 mM	kolagen	6	100 μ g/ml

* 4-MC (4-methylkatechol) byl součástí experimentu, ale ne této diplomové práce.

Tab. 10 - Schéma antiagregační série 2.

Inhibitor/rozpouštědlo				Induktor		
Kanál č.	typ	μl	koncentrace	induktor	μl	koncentrace
1	DMSO	5	-	kolagen	6	100 μg/ml
2	ASA	5	8,5 mM	kolagen	6	100 μg/ml
3	ASA	5	8,5 mM	kolagen	6	100 μg/ml
4	4-MC*	5	2,4 mM	kolagen	6	100 μg/ml
5	DMSO	5	-	kolagen	6	100 μg/ml

* 4-MC (4-methylcatechol) byl součástí experimentu, ale ne této diplomové práce.

Tab. 11 - Schéma antiagregační série 3.

Inhibitor/rozpouštědlo				Induktor		
Kanál č.	typ	μl	koncentrace	induktor	μl	koncentrace
1	ASA	5	3,7 mM	AA	8	15 mM
2	ASA	5	3,7 mM	AA	8	15 mM
3	DMSO	5	-	AA	8	15 mM
4	ASA	5	8,5 mM	AA	8	15 mM
5	4-MC*	5	1,2 mM	AA	8	15 mM

* 4-MC (4-methylcatechol) byl součástí experimentu, ale ne této diplomové práce.

Tab. 12 - Schéma antiagregační série 4.

Inhibitor/rozpouštědlo				Induktor		
Kanál č.	typ	μl	koncentrace	induktor	μl	koncentrace
1	DMSO	5	-	AA	8	15 mM
2	4-MC*	5	1,2 mM	AA	8	15 mM
3	ASA	5	8,5 mM	AA	8	15 mM
4	DMSO	5	-	TRAP	6	1 mM
5	vorapaxar	5	0,125 mM	TRAP	6	1 mM

* 4-MC (4-methylcatechol) byl součástí experimentu ale ne této diplomové práce.

Tab. 13 - Schéma antiagregační série 5.

Kanál č.	Inhibitor/rozpouštědlo			Induktor		
	typ	μl	koncentrace	induktor	μl	koncentrace
1	vorapaxar	5	0,125 mM	TRAP	6	1 mM
2	DMSO	5	-	TRAP	6	1 mM
3	DMSO	5	-	ADP	15	0,2 mM
4	tikagrelor	5	0,0625 mM	ADP	15	0,2 mM
5	DMSO	5	-	ristocetin	20	12,5 mM

Tab. 14 - Schéma antiagregační série 6.

Kanál č.	Inhibitor/rozpouštědlo			Induktor		
	typ	μl	koncentrace	induktor	μl	koncentrace
1	tikagrelor	5	0,0625 mM	ADP	15	0,2 mM
2	DMSO	5	-	ADP	15	0,2 mM
3	DMSO	5	-	ristocetin	20	12,5 mM
4 ¹						
5						

¹ Místo pro zopakování měření u identických vzorků v případě, že by se u nich příliš lišila AUC (>30 %).

Tab. 15 – Finální koncentrace induktorů a inhibitorů agregace.

Induktor	Koncentrace	Inhibitor	Koncentrace
kolagen	1 μg/mL	ASA	30 a 70 μM
AA	200 μM	4-MC	10 a 20 μM
PAF-16	20 nM	vorapaxar	1 μM
U-46619	80 nM	tikagrelor	504 nM
ristocetin	400 μM		
ADP	5 μM		
TRAP-6	10 μM		

5.3 METODIKA PRO MĚŘENÍ KOAGULACE

5.3.1 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ INDUKTORŮ A ANTIKOAGULANCÍ

Prvním krokem před samotnou přípravou reagensů bylo zapnutí přístroje pro měření koagulace a zvolení typu testu: protrombinový čas (PT) nebo parciální tromboplastinový čas (aPTT). Poté bylo potřeba vyčkat přibližně 10–15 minut, než se přístroj vytemperuje na teplotu 37°C.

Většina reagensů byla získána ve formě komerčně vyráběných lyofilizovaných prášků. V této formě byla jejich stabilita 3 roky při uchovávání v chladu. Antikoagulancia však byla předem rozpuštěna a zamrazena. Vzniklé zásobní roztoky pak byly uchovávány při -20°C (stabilita 2 roky), proto se před dalším ředěním musely nechat nejprve rozmraznout. Jediný heparin byl zakoupen již ve formě zásobního roztoku v koncentraci 5000 IU/ml a uchováván v chladu. Z této koncentrace byly připraveny pracovní roztoky vždy čerstvé až v den experimentu, a to v koncentraci 500 IU/ml (pro PT test) a 50 IU/ml (pro aPTT test). Zásobní roztoky zbylých antikoagulancií byly připraveny v následujících koncentracích: rivaroxaban 10 mM (rozpuštědlo DMSO), apixaban 50 mM (DMSO), argatroban 500 mM (DMSO), dabigatran 4 mM (0,1 M HCl). Následně z nich byly připraveny pracovní roztoky v koncentraci 100 µM. Finální koncentrace antikoagulancií pak byla vždy 1 µM a byla zvolena na základě předchozích experimentů stanovením na dávce závislé míry inhibice. Detaily přípravy pracovních roztoků zobrazuje **Tab. 16**.

Technoplastin[®] HIS, Dapttin[®] TC a CaCl₂ byly uchovávány v chladu (2-8°C). Po vytažení z lednice se po dobu 3-5 minut nechaly zahřát na pokojovou teplotu. CaCl₂ byl již k dispozici ve formě roztoku (v koncentraci 25 mmol/l). Z tohoto roztoku bylo odebráno 1300 µl a tento objem napipetován do zkumavky, která se umístila do přístroje, aby byl roztok po celou dobu experimentu vytemperován na teplotu 37°C. Technoplastin HIS[®] a Dapttin TC[®] musely být nejprve rekonstituovány. K Technoplastinu[®] bylo přidáno 10 ml destilované vody a opatrným promísením byla zajištěna homogenizace. Dapttin[®] byl rekonstituován přidáním 2 ml destilované vody. Z 10 ml roztoku Technoplastinu byly odebrány 2-3 ml do zkumavky a ta opět umístěna do přístroje pro zahřátí na požadovanou teplotu. Stejný postup se provedl u rekonstituovaného Dapttinu[®], pro experiment bylo odebráno 1300 µl. Rekonstituovaná reagentia mohla být používána max. 6 hodin (Technoplastin[®]) a 8 hodin (Dapttin[®]). Zbylé množství obou roztoků mohlo být uchováváno pro další experimenty v chladu (2-8°C) nebo hluboce zmražené (-20°C).

Technoplastin® je v chladu stabilní 6 dní, při -20°C 2 měsíce a Dapttin® v chladu 15 dní, hluboce zmražený 6 měsíců.

Plazma dárce v množství 2600 µl získaná, jak bylo výše uvedeno, centrifugací citrátové krve byla odebrána do nové zkumavky a opět umístěna do přístroje pro zahřátí na teplotu 37°C. Tato plazma mohla být používána max. po dobu 2 hodin. Kontrolní plazma byla podobně jako předchozí reagentia dostupná v lyofilizované formě. Prášek uchovávaný v chladu byl nejprve ponechán 3-5 min při pokojové teplotě, poté se plazma rekonstituovala přidáním 1 ml destilované vody. Z tohoto roztoku bylo odebráno 210 µl do nové zkumavky a vloženo do přístroje k vytemperování. Takto rekonstituovaná kontrolní plazma byla stabilní max. 4 hod.

Tab. 16 – Příprava pracovních roztoků antikoagulancií.

Antikoagulans	Koncentrac e zás. roztoku	Objem zás. roztoku	Ředění: rozpuštědlo + objem	Koncentrace pracovního roztoku
Heparin	5000 IU/ml	10 µl	90 µl fyz. roztoku	500 IU/ml
	500 IU/ml	10 µl	90 µl fyz. roztoku	50 IU/ml
Rivaroxaban	10 mM	5 µl	495 µl DMSO	100 µM
Apixaban	50 mM	5 µl	2495 µl DMSO	100 µM
Argatroban	500 mM	1 µl	4 999 µl DMSO	100 µM
Dabigatran	4 mM	5 µl	195 µl 0,1 M HCl	100 µM

5.3.2 PRINCIP MĚŘENÍ KOAGULACE

Měření koagulace bylo založeno na metodě využívající kovovou kuličku. Do přístroje se vloží jednorázové kyvety a do každé z nich jedna nerezová kulička. Kyvety se v průběhu měření otáčejí kolem své osy a kulička díky magnetu v přístroji zůstává na jednom místě na dně kyvety. Ještě před začátkem koagulace je zapnuto měření času a následně přidán induktor, který spouští koagulační kaskádu. Vznikající vlákna fibrinu pak změň tekutou plazmu v pevnou sraženinu, a kulička se tak stane její součástí a rotuje okolo. To zaznamená elektromagnetický senzor a dochází k zastavení měření času.

5.3.3 PROTROMBINOVÝ ČAS (PT)

Protrombinový čas neboli tromboplastinový čas či také Quickův test je testem vnější a společné cesty koagulace. Měření PT i aPTT probíhalo podobně jako měření agregace podle jasně daného schématu (**Tab. 17-24**). Nejprve bylo odebráno 210 μl plazmy dárce a smícháno s 2,1 μl příslušného antikoagulancia (dabigatran, rivaroxaban, apixaban, argatroban) nebo heparinu nebo rozpouštědla (DMSO). Z této směsi bylo napipetováno 100 μl do kyvety v měřicím přístroji (každý vzorek dvakrát), byla tak získána finální koncentrace 1 μM u zmíněných přímých antikoagulancií a 5 IU/ml u heparinu. Dále se přidaly dva vzorky komerčně získané plazmy pro kontrolu a výpočet INR. Celkem proběhly 4 série měření, v jednom cyklu mohly být testovány max. 2 různá reagentia (obě po dvou vzorcích, přístroj se skládá ze 4 měřicích kanálů). Po přidání antikoagulancia nebo rozpouštědla byly vzorky inkubovány po dobu 1 min. Ihned poté se přidalo ke všem vzorkům v kyvetách 200 μl Technoplastinu[®] HIS a bylo spuštěno měření času. Po skončení měření byl zaznamenán čas do vzniku sraženiny (s), procenta normálu (%) a INR vypočítané dle vzorce: $INR = \left(\frac{PT \text{ vzorku}}{PT \text{ kontrolní plazmy}} \right)^{ISI}$, kde PT je protrombinový čas (s) a ISI faktor účinnosti použitého tromboplastinu daný výrobcem.

Tab. 17 – Schéma PT testu (1. série).

Kanál č.	Antikoagulans/ rozpouštědlo	Objem reagentia přidaný k 210 μl plazmy (μl)	Plazma + reagens (μl)	Technoplastin (μl)
1	DMSO	2,1	100	200
2	DMSO	2,1	100	200
3	Heparin	2,1	100	200
4	Heparin	2,1	100	200

Tab. 18 – Schéma PT testu (2. série).

Kanál č.	Antikoagulans/ rozpouštědlo	Objem reagensia přidaný k 210 μ l plazmy (μ l)	Plazma + reagens (μ l)	Technoplastin (μ l)
1	dabigatran	2,1	100	200
2	dabigatran	2,1	100	200
3	rivaroxaban	2,1	100	200
4	rivaroxaban	2,1	100	200

Tab. 19 – Schéma PT testu (3. série).

Kanál č.	Antikoagulans/ rozpouštědlo	Objem reagensia přidaný k 210 μ l plazmy (μ l)	Plazma + reagens (μ l)	Technoplastin (μ l)
1	apixaban	2,1	100	200
2	apixaban	2,1	100	200
3	argatroban	2,1	100	200
4	argatroban	2,1	100	200

Tab. 20 – Schéma PT testu (4. série) - Syntetická kontrolní plazma.

Kanál č.	Antikoagulans/ rozpouštědlo	Objem reagensia + 210 μ l plazmy (μ l)	Plazma (μ l)	Technoplastin (μ l)
1	-	-	100	200
2	-	-	100	200

5.3.4 AKTIVOVANÝ PARCIÁLNÍ TROMBOPLASTINOVÝ ČAS (aPTT)

Tento test sleduje vnitřní a společnou cestu koagulace. Postup měření byl podobný jako u PT testu, opět probíhal podle příslušného schématu (viz níže). K 210 μ l plazmy dárce bylo přidáno 2,1 μ l antikoagulancia, heparinu nebo DMSO a z toho roztoku bylo napipetováno 100 μ l do kyvet v přístroji (opět každý vzorek dvakrát, stejně jako u PT testu). Byla tak získána finální koncentrace 1 μ M u antikoagulancií a 0,5 IU/ml

u heparinu. Dále se přidaly dva vzorky syntetické plazmy pro kontrolu. Do každé kyvety pak bylo přidáno 100 μl Dapttinu[®] TC a ve stejné chvíli byla zahájena inkubace na 2 min. Ihned po skončení inkubace se do každé kyvety napipetovalo 100 μl roztoku CaCl_2 a zároveň bylo spuštěno měření času. Po dokončení měření byl zaznamenán koagulační čas, tedy čas do vzniku fibrinové sraženiny (s).

Tab. 21 – Schéma aPTT testu (1. série).

Kanál č.	Inhibitor/ DMSO	Objem reagensia přidaný k 210 μl plazmy (μl)	Plazma + reagens (μl)	Technoplastin (μl)	CaCl_2 (μl)
1	DMSO	2,1	100	100	100
2	DMSO	2,1	100	100	100
3	Heparin	2,1	100	100	100
4	Heparin	2,1	100	100	100

Tab. 22 – Schéma aPTT testu (2. série).

Kanál č.	Inhibitor/ DMSO	Objem reagensia přidaný k 210 μl plazmy (μl)	Plazma + reagens (μl)	Technoplastin (μl)	CaCl_2 (μl)
1	RIV	2,1	100	100	100
2	RIV	2,1	100	100	100
3	DAB	2,1	100	100	100
4	DAB	2,1	100	100	100

Tab. 23 – Schéma aPTT testu (3. série).

Kanál č.	Inhibitor/ DMSO	Objem reagensia přidaný k 210 μl plazmy (μl)	Plazma + reagens (μl)	Technoplastin (μl)	CaCl_2 (μl)
1	API	2,1	100	100	100
2	API	2,1	100	100	100
3	ARG	2,1	100	100	100
4	ARG	2,1	100	100	100

Tab. 24 – Schéma aPTT testu (4. série) – Syntetická kontrolní plazma.

Kanál č.	Inhibitor/ DMSO	Objem reancia přidaný k 210 μl plazmy (μl)	Plazma (μl)	Technoplastin (μl)	CaCl₂ (μl)
1	-	-	100	100	100
2	-	-	100	100	100

5.4 STATISTICKÁ ANALÝZA

Výsledky měření byly zpracovány pomocí statistického softwaru GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) a jsou prezentovány pomocí mediánu a 95 % konfidenčních intervalů. Rozdíly byly vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) s následným využitím Dunnettovy metody mnohonásobného porovnávání pro analýzu zjištěných rozdílů, nebo byl použit nepárový t-test (Studentovo t-rozdělení) v závislosti na počtu proměnných. V případě vzorků před a po aferéze byl použit párový t-test. Pokud nebylo nalezeno normální (gaussovské) rozložení (pomocí Shapiro-Wilkova testu) byl využit Mannův-Whitneyho test pro nepárové hodnoty nebo odpovídající Wilcoxonův párový test pro párové hodnoty. Dále byla provedena korelační analýza a stanoven Pearsonův korelační koeficient. V případě nalezení signifikantní korelace byla provedena lineární regrese.

6. VÝSLEDKY

6.1 AGREGACE TROMBOCYTŮ

V prvním kroku byl porovnán účinek hlavních léčebných prostředků ve skupině pacientů s FH. Konkrétně byla u skupiny nemocných pacientů podstupujících LDL-aférezu a zároveň léčených PCSK9i sledována odpověď destiček na různé induktory a inhibitory agregace ve srovnání s pacienty léčenými pouze PCSK9i (**Obr. 11-13**). U pacientů léčených LDL-aférezou byla porovnána agregace před a po proceduře.

Samotná LDL-aférezu vždy minimálně numericky snižovala agregaci na testované induktory. Statisticky významného rozdílu bylo dosaženo u kolagenu v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ (**Obr. 11 A**) a u ristocetinu (**Obr. 11 B**). Při porovnání odpovědi destiček pacientů před aferézou a pacientů na farmakoterapii nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v agregaci destiček, až na jedinou výjimku. Tou byla poněkud překvapivě snížená odpověď destiček na TRAP u skupiny léčené pouze farmakoterapií (**Obr. 11 C**).

Ani porovnání agregace destiček po provedené lipoaférezu k samotné farmakoterapii neukázalo výrazné rozdíly. Jediný rozdíl byl nalezen u ristocetinu, na který reagovaly silněji destičky pacientů léčených pouze farmakoterapií (**Obr. 11 B**).

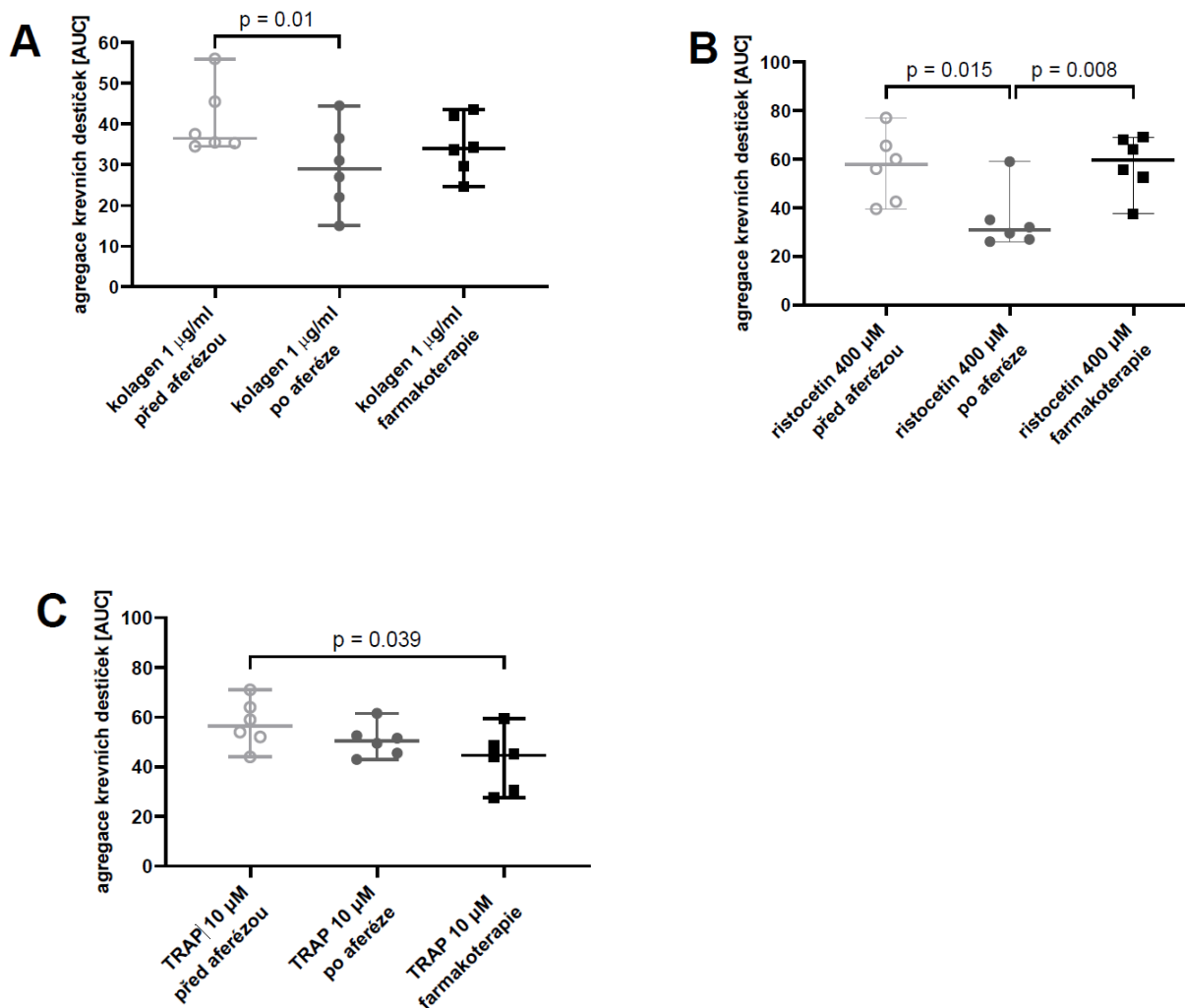
Reakce na kyselinu acetylsalicylovou a tikagrelor se také nelišila (**Obr. 13 B-E**), ale logicky s popsány rozdíly u induktoru TRAP byla agregace navozená tímto induktorem po premedikaci destiček vorapaxarem nižší ve skupině, které byla podána čistě farmakoterapie, tj. inhibice agregace byla silnější (**Obr. 13 A**).

Následně byly porovnány reakce destiček pacientů trpících FH a zdravých dobrovolníků. Signifikantně rozdílné odpovědi byly nalezeny u pěti ze sedmi testovaných induktorů, a to: AA (**Obr. 14 A**), kolagenu (**Obr. 14 B**), ADP (**Obr. 14 C**), ristocetinu (**Obr. 14 D**) a U-46619 (**Obr. 14 E**). U všech těchto induktorů byla nižší agregace u pacientů trpících FH. Významné rozdíly nebyly nalezeny po inkubaci s PAF a TRAP (**Obr. 15**).

Také byl porovnán vliv různých inhibitorů agregace u všech pacientů a věkově odpovídajících zdravých dobrovolníků (**Obr. 16**). Kyselina acetylsalicylová v nižší koncentraci 30 μM (**Obr. 16 A**) i ve vyšší koncentraci 70 μM (**Obr. 16 B**) snížila agregaci indukovanou pomocí AA (200 μM) více u pacientů s FH, než tomu bylo u zdravých jedinců. V případě agregace navozené kolagenem byl rozdíl v agregaci krve

premedikované ASA pouze numerický, ale ne významný (**Obr. 16 E**). Statisticky významný rozdíl byl také v odpovědi na vorapaxar 1 μM (s induktorem TRAP 10 μM), kde opět pacienti měli vyšší profit z jeho účinku než zdraví dobrovolníci (**Obr. 16 C**). V případě tikagreloru nebyly mezi pacienty a zdravými dobrovolníky nalezeny rozdíly (**Obr. 16 D**).

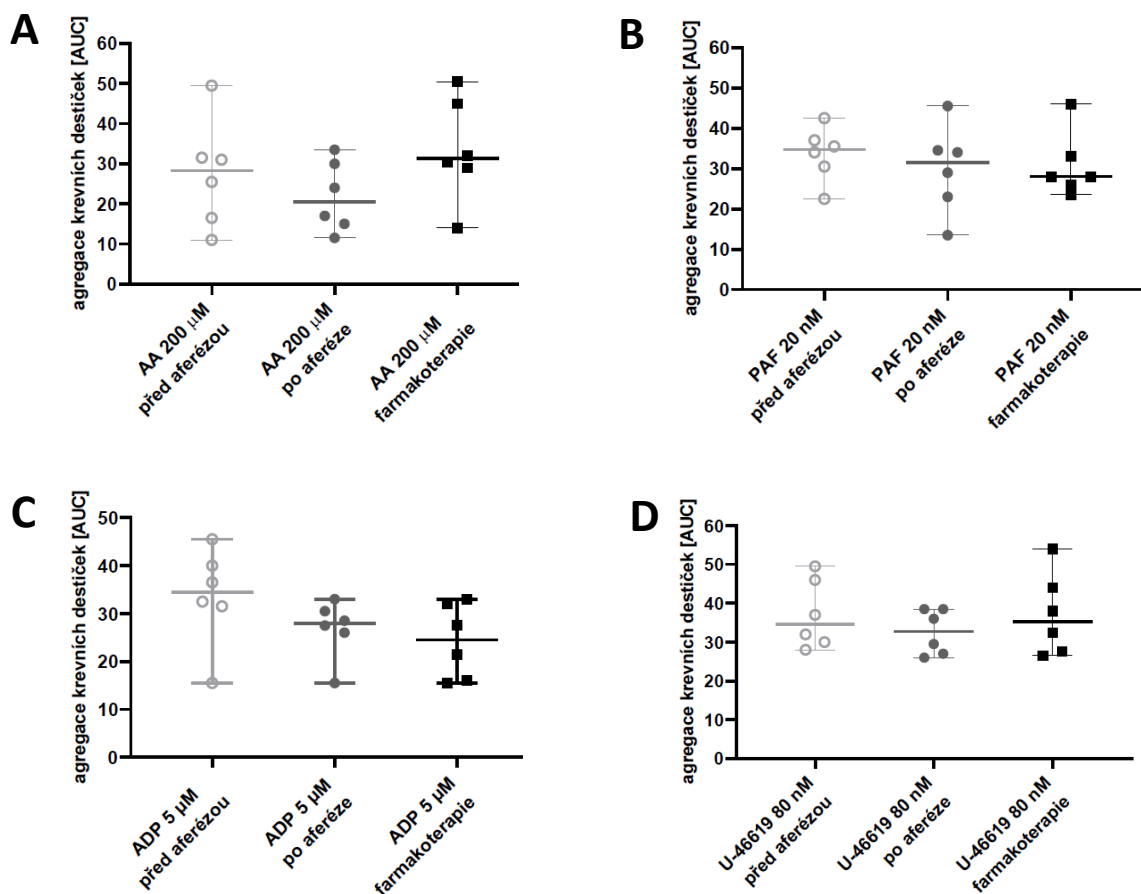
Dále byla testována korelace hladin lipidů (LDL, non-HDL, celkový cholesterol a triglyceridy) s mírou agregace destiček u všech pacientů s FH, tzn. jedinců podstupujících aferézu i jedinců léčených pouze farmakoterapií. Výsledky korelační analýzy jsou uvedeny v **Tab. 25** a grafické znázornění korelací je na **Obr. 17-18**. Statisticky významné korelace byly nalezeny u triglyceridů s několika induktory a inhibitory (**Obr. 17**). V případě triglyceridů, čím vyšší byla jejich hladina, tím vyšší byla agregace. Tento vztah byl nalezen u agregace navozené AA (200 μM), kolagenem (1 $\mu\text{g/ml}$) (**Obr. 17 A a C**) a také ristocetinem (**Obr. 18 B**). Stejný výsledek byl pozorován po přidání protideštičkových léčiv ke dvěma induktorům: ASA (30 μM) + AA (**Obr. 17 B**) a ASA (70 μM) + kolagen (**Obr. 17 D**). U induktorů byla nalezena statisticky významná korelace zejména u ristocetinu, který koreloval kromě zmíněných triglyceridů i s dalšími lipidy, a to LDL-C, non-HDL a celkovým cholesterolem (**Obr. 18**). I zde platilo, že čím vyšší byla hladina lipidů, tím větší byla agregace navozená ristocetinem.



Obr. 11 – Porovnání agregace destiček u pacientů léčených LDL-aferézou (před a po) + PCSK9i, a pacientů léčených pouze PCSK9i – část I.

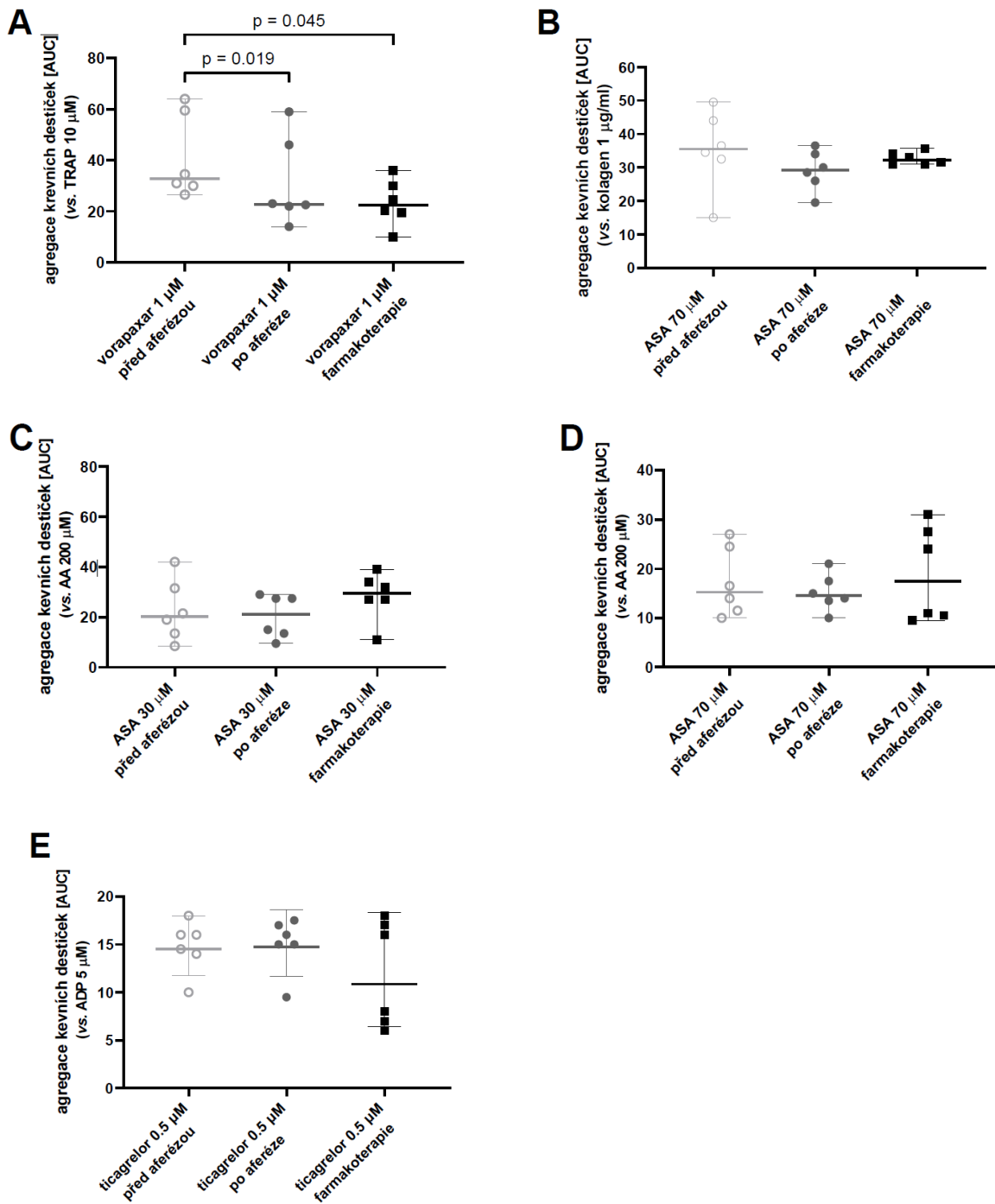
A: Agregace navozená kolagenem (1 μg/ml), **B:** Odpověď na ristocetin (400 μM),

C: Reakce na TRAP (10 μM). Počet pacientů byl v obou skupinách 6.



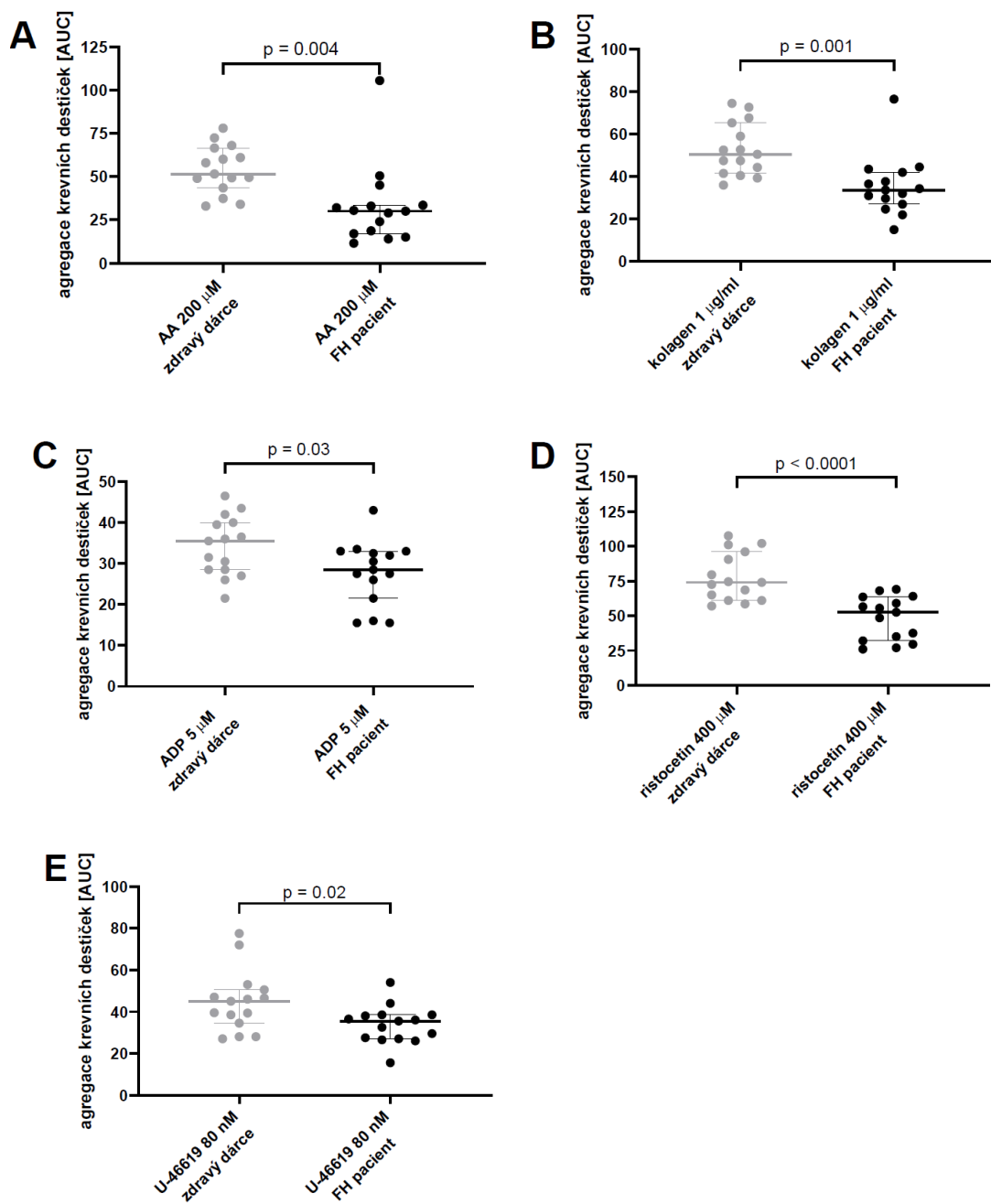
Obr. 12 – Porovnání agregace destiček u pacientů léčených LDL-aferézou (před a po) + PCSK9i, a pacientů léčených pouze PCSK9i – část II.

A: Reakce na AA (200 µM), **B:** Odpověď destiček na PAF (20 nM), **C:** Induktor ADP (5 µM), **D:** Agregace indukovaná U-46619 (80 nM). Počet pacientů byl v obou skupinách 6. V žádném z těchto případů nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.



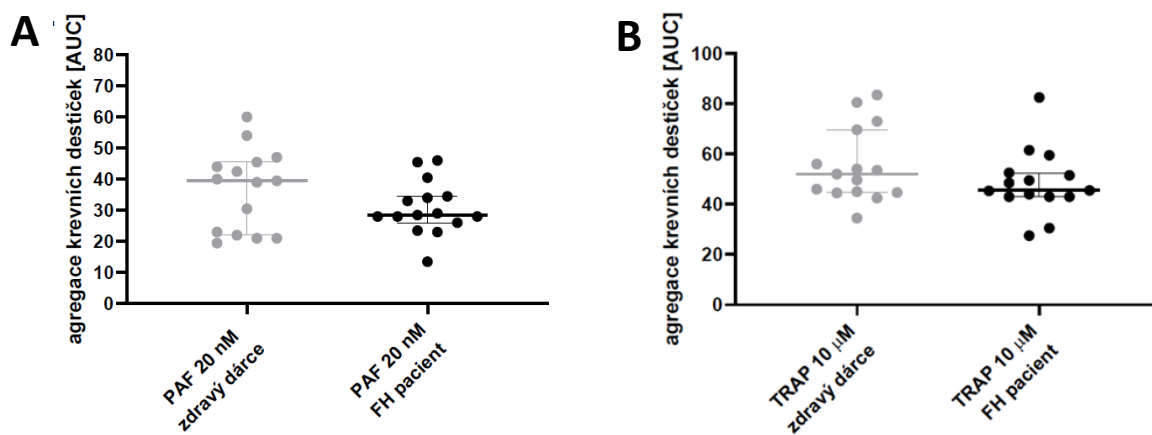
Obr. 13 - Porovnání účinku antiagregancií u pacientů léčených LDL-aferézou (před a po) + PCSK9i, a pacientů léčených pouze PCSK9i.

A: Odpověď na vorapaxar 1 µM (induktor TRAP 10 µM), **B:** Inhibiční vliv ASA 70 µM (induktor kolagen 1 µg/ml), **C:** ASA 30 µM (induktor AA 200 µM). **D:** ASA 70 µM (induktor AA 200 µM), **E:** Odpověď na ticagrelor 0,5 µM (induktor ADP 5 µM). Počet pacientů byl v obou skupinách 6. Statisticky významné rozdíly byly nalezeny jen v případě vorapaxaru.



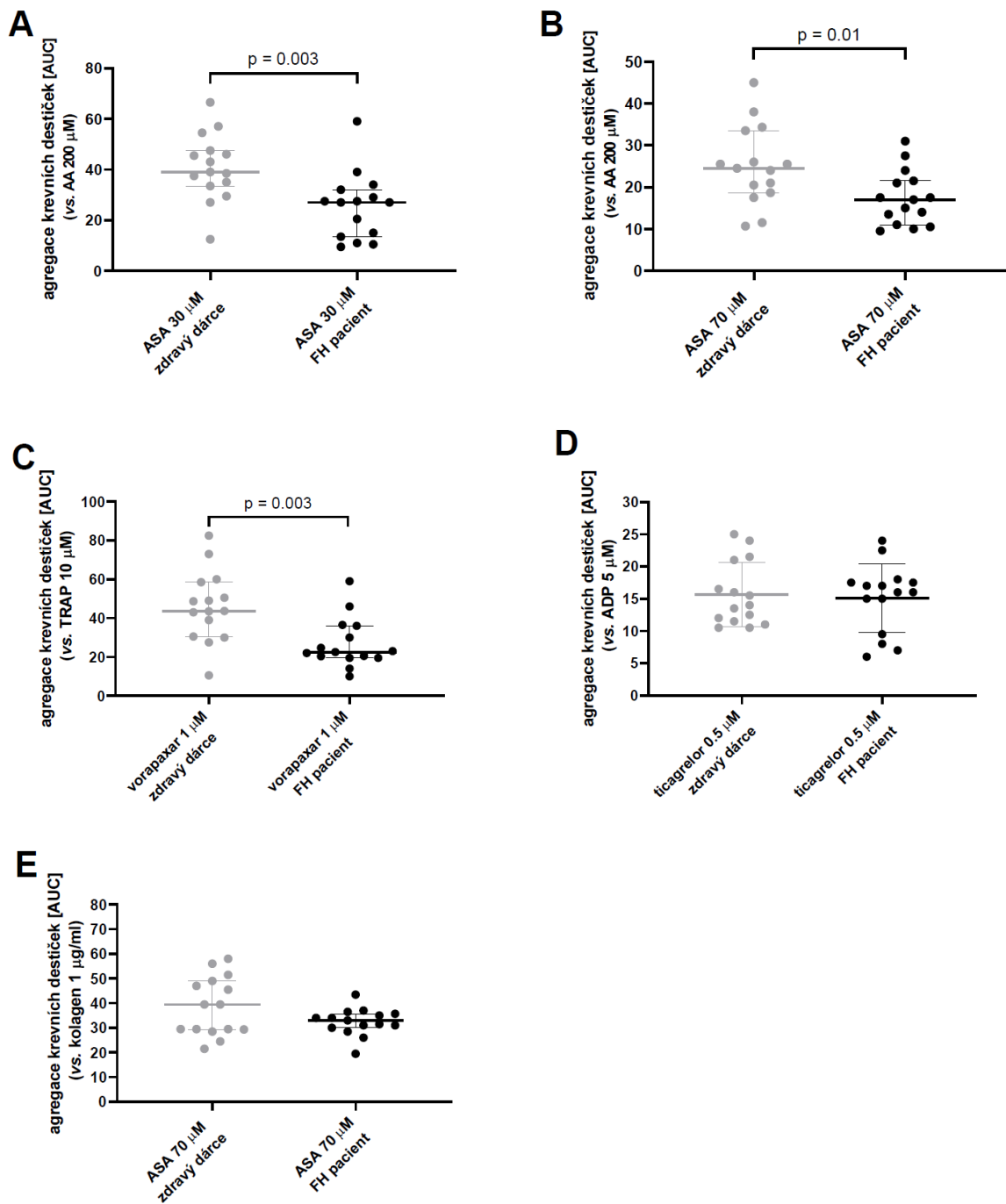
Obr. 14 - Porovnání agregace destiček bez inhibice u zdravých dobrovolníků a pacientů trpících FH – část I.

A: Porovnání agregace navozené AA (200 μ M). **B:** Kolagenem (1 μ g/ml) indukovaná agregace. **C:** Účinek ADP (5 μ M). **D:** Rozdíly v agregaci při použití ristocetinu (400 μ M). **E:** Vliv U-46619 (80 nM) na agregaci destiček. Počet pacientů v obou skupinách byl 15.



Obr. 15 - Porovnání agregace destiček bez inhibice u zdravých dobrovolníků a pacientů trpících FH – část II.

A: Odpověď na PAF (20 nM), **B:** Agregace navozená TRAP (10 μM). Počet pacientů v obou skupinách byl 15. V obou případech nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.



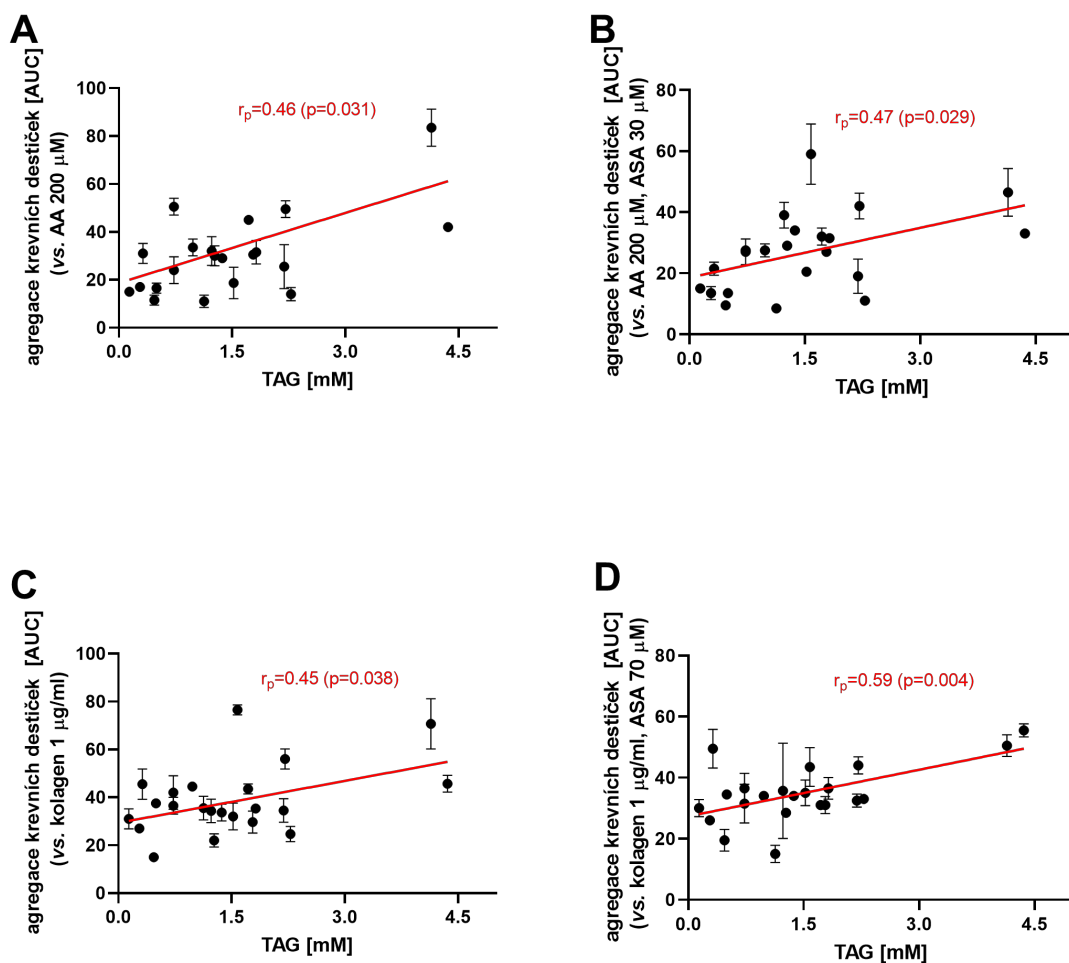
Obr. 16 – Porovnání účinku antiagregancií u zdravých dárců a pacientů trpících FH.

A: Antiagregační účinek ASA v nižší koncentraci 30 μM , induktor AA 200 μM , **B:** Efekt ASA ve vyšší koncentraci 70 μM se stejným induktorem, **C:** Účinek vorapaxaru 1 μM , agregace indukovaná pomocí TRAP 10 μM , **D:** Odpověď na tikagrelor 0,5 μM , induktor ADP 5 μM , **E:** Vliv ASA 70 μM na agregaci indukovanou kolagenem 1 $\mu\text{g/ml}$. Počet zdravých jedinců i pacientů byl 15.

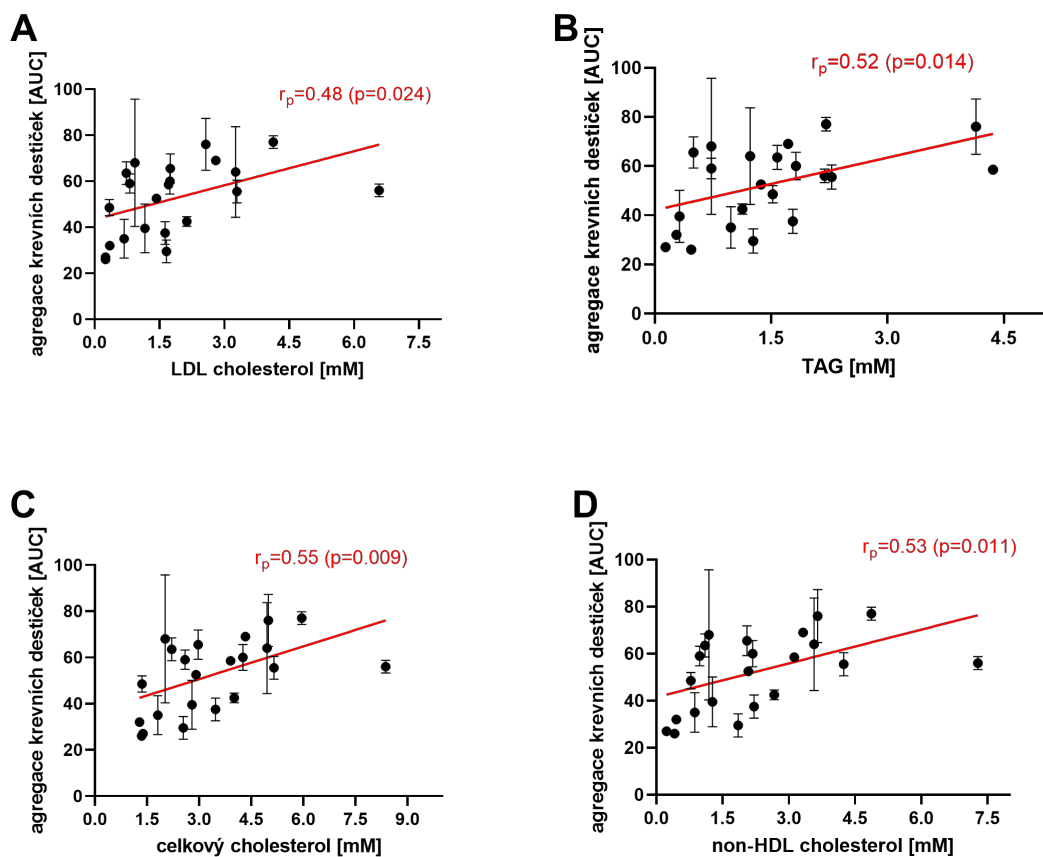
Tab. 25 – Korelace různých lipidů s induktory a inhibitory.

	LDL-C	HDL-C	TG	TC	Non-HDL-C	Glukóza
AA 200 μ M	0,05	0,09	0,46*	0,12	0,11	-0,13
AA 200 μ M vs. ASA 30 μ M	0,07	0,13	0,46*	0,14	0,12	-0,07
AA 200 μ M vs. ASA 70 μ M	-0,14	0,23	0,10	-0,06	-0,11	0,06
kolagen 1 μ g/ml	0,11	0,18	0,45*	0,19	0,16	-0,24
Kolagen 1 μ g/ml vs. ASA 70 μ M	0,13	0,15	0,59**	0,24	0,21	0,04
ADP 5 μ M	0,12	0,03	0,31	0,15	0,15	0,02
ADP 5 μ M vs. tikagrelor 0,5 μ M	-0,26	-0,23	0,10	-0,25	-0,22	0,30
TRAP 10 μ M	-0,01	0,21	0,23	0,06	0,02	-0,20
TRAP 10 μ M vs. vorapaxar 1 μ M	0,22	0,51*	0,13	0,31	0,22	-0,14
Ristocetin 400 μ M	0,48*	0,19	0,51*	0,55**	0,53**	-0,12
PAF 20 nM	0,30	0,22	-0,03	0,29	0,26	-0,19
U-46619 80 nM	0,11	-0,02	-0,08	0,09	0,10	0,03

Výsledky jsou prezentovány pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Červeně zvýrazněné hodnoty představují signifikantní korelace. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Induktory a inhibitory agregace jsou uvedeny ve finálních koncentracích. Data byla získána ze 23 vzorků pacientů trpících FH (u pacientů léčených aferézou byly k dispozici vždy 2 vzorky, před a po aferéze). TC: celkový cholesterol (total cholesterol), TG: triglyceridy.



Obr. 17 – Korelace triglyceridů (TAG) s různými induktory a inhibitory.
 r_p – Pearsonův korelační koeficient. **A:** TAG a agregace navozená AA 200 μM . **B:** TAG a inhibice agregace indukované AA pomocí ASA v nižší koncentraci (30 μM). **C:** TAG a odpověď na kolagen (1 $\mu\text{g/ml}$). **D:** TAG a inhibice agregace indukované kolagenem pomocí ASA v koncentraci 70 μM .



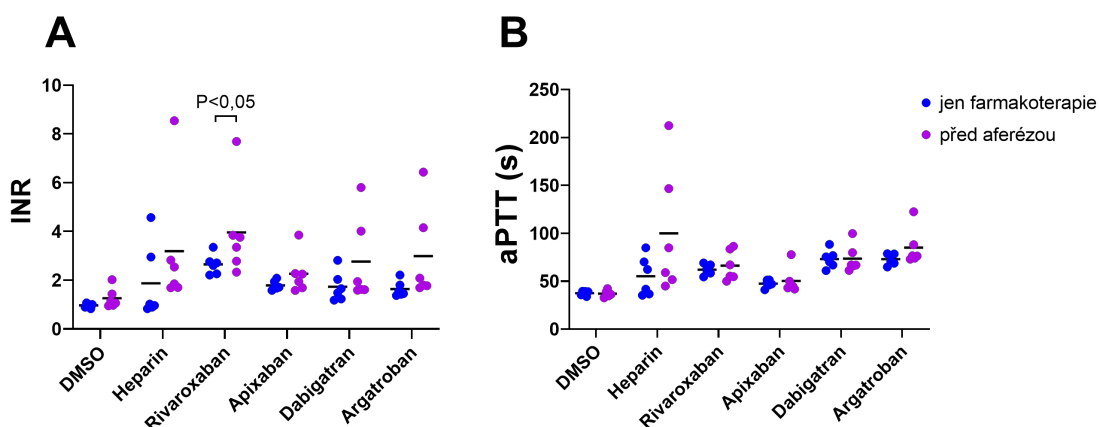
Obr. 18 – Korelace různých (potenciálně aterogenních) lipidů s ristocetinem.

A: LDL-C a odpověď na ristocetin. **B:** TAG a odpověď na ristocetin. **C:** Celkový cholesterol a agregace navozená ristocetinem. **D:** Korelace hladin non-HDL cholesterolu a odpovědi na ristocetin.

6.2 KOAGULACE

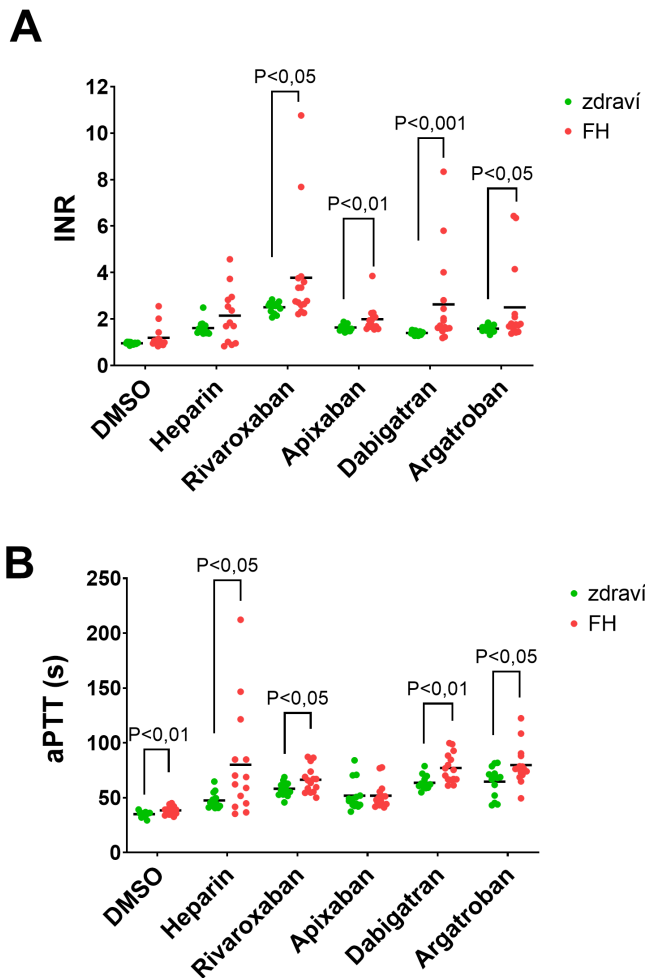
V případě krevní koagulace byly porovnány pouze vzorky krve před aferézou s těmi od pacientů léčených pouze farmakoterapií. Vzorky po aferéze nejsou použitelné pro porovnání, protože při vlastní aferéze se používá antikoagulant (viz kapitola 3.3.3 Metody LDL-aferézy). Samotný typ terapie, tj. aferéza s PCSK9i vs. samotné PCSK9i, neměl rozdílný vliv na koagulační parametry (**Obr. 19**). Významný rozdíl byl nalezen jen u rivaroxabanu, a to navíc pouze u protrombinového času, ne u aPTT (**Obr. 19 A**).

Naopak při porovnání s věkově odpovídající skupinou zdravých jedinců byly nalezeny u léčených pacientů s FH významné rozdíly, a to často u obou sledovaných koagulačních parametrů (**Obr. 20**). Protrombinový čas, a tedy i výsledná hodnota INR se signifikantně lišily u všech antikoagulancií kromě heparinu. Větší účinek měla antikoagulancia u pacientů s FH (**Obr. 20 A**). Při měření aPTT byly zjištěny signifikantní rozdíly v koagulaci, kdy u pacientů byly časy do vytvoření zátky delší, koagulace tedy byla nižší. Vliv antikoagulancií se signifikantně projevil podobně jako u PT testu, pouze odpověď na apixaban nebyla statisticky významná. Větší inhibice koagulace byla opět u pacientů s FH (**Obr. 20 B**).



Obr. 19 – Porovnání koagulace a vlivu antikoagulancií u pacientů léčených aferézou i PCSK9i a pacientů léčených pouze PCSK9i.

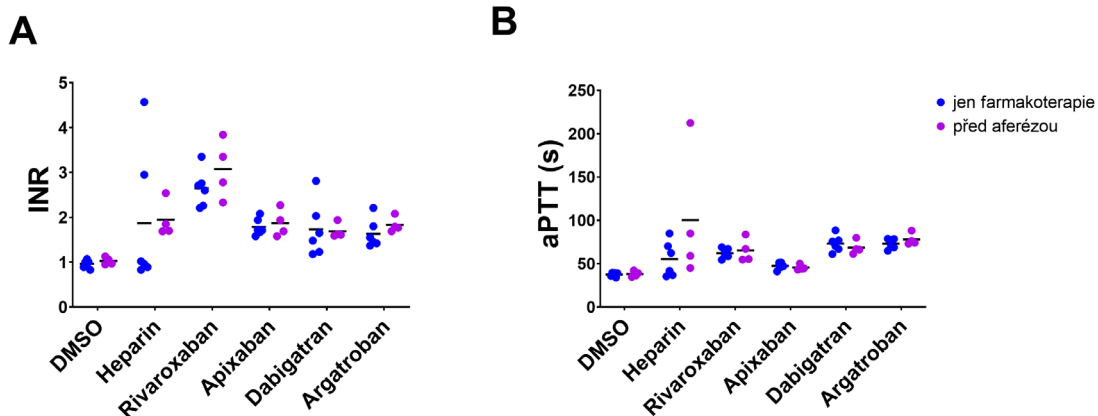
A: PT test – vliv antikoagulancií na INR, **B:** aPTT test – ovlivnění času do vytvoření fibrinové zátky. Počet pacientů byl v obou skupinách 6. Jediný statisticky významný rozdíl byl zjištěn u rivaroxabanu, ale pouze při hodnocení INR.



Obr. 20 – Porovnání koagulace a vlivu antikoagulancií u pacientů s FH a zdravých dobrovolníků.

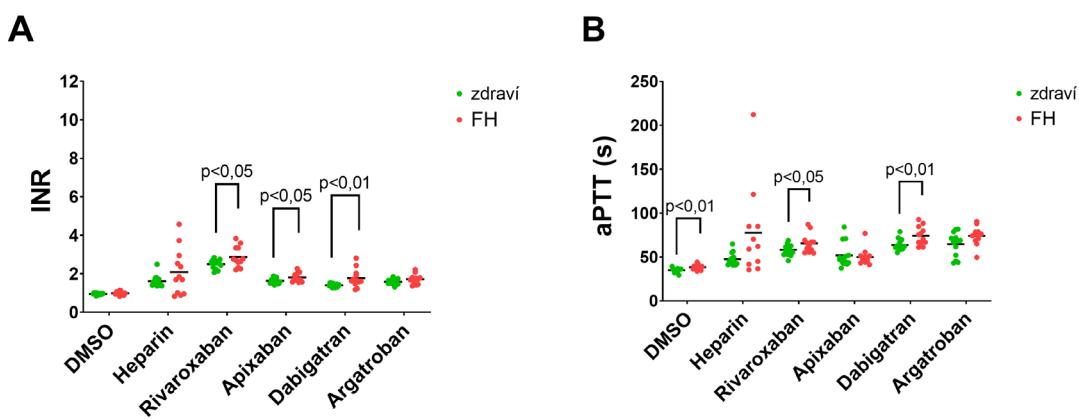
A: PT test – vliv jednotlivých inhibitorů na hodnotu INR, **B:** aPTT test – vliv inhibitorů na čas do vytvoření fibrinové zátky. Počet pacientů byl v obou skupinách 15.

Vzhledem k tomu, že 3 pacienti z 15 zahrnutých byli pravidelně léčeni antikoagulancií, v další analýze jsme tyto pacienty vyloučili, aby případně neovlivnili finální analýzu (**Obr. 21 a 22**). Došlo sice k určitým změnám ve významnosti, ale principiálně se potvrdily předchozí výsledky, tj. že dobře léčení pacienti s FH mohou odpovídat silněji na antikoagulancia, a to speciálně na rivaroxaban a dabigatran. U těchto dvou přímých antikoagulancií byly rozdíly jak u PT, tak u aPTT.



Obr. 21 – Porovnání koagulace a vlivu antikoagulancií u pacientů léčených aferézou i PCSK9i a pacientů léčených pouze PCSK9i po vyloučení pacientů léčených antikoagulancií.

A: PT test – vliv antikoagulancií na INR, **B:** aPTT test – ovlivnění času do vytvoření fibrinové zátky. Počet pacientů byl 6 ve skupině s farmakoterapií a 4 ve skupině před aferézou.



Obr. 22 – Porovnání koagulace a vlivu antikoagulancií u pacientů s FH a zdravých dobrovolníků po vyloučení pacientů léčených antikoagulancií.

A: PT test – vliv jednotlivých inhibitorů na hodnotu INR, **B:** aPTT test – vliv inhibitorů na čas do vytvoření fibrinové zátky. Počet zdravých pacientů byl 15, zatímco FH pacientů bylo 12.

7. DISKUZE

Cílem této práce bylo otestovat vliv LDL-C na agregaci trombocytů a koagulaci krve u pacientů s FH. Patologicky zvýšená hladina LDL-C, typická pro toto onemocnění, je dobře známým rizikovým faktorem rozvoje kardiovaskulárních onemocnění na podkladě aterosklerózy. V současnosti je známo, že mimo tradiční roli v procesu aterogeneze ovlivňují lipidy, resp. lipoproteiny (zejména LDL) také trombogenezi působením na biogenezi a aktivitu destiček i koagulační systém. Zvýšená aktivita trombocytů hraje klíčovou roli v mobilizaci imunitních buněk a prozánětlivých mediátorů již v počátečních stádiích aterosklerózy (*Wang a Tall 2016, Gąsecka et al. 2021*).

Oxidované LDL částice (ox-LDL) interagují s destičkami vazbou na specifická místa na povrchu destiček, a mají tak přímé protrombotické účinky. Konkrétně se jedná o scavengerové receptory CD36 a LOX1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1) (*Gąsecka et al. 2021*). Fyziologická role CD36 není ještě zcela pochopena. CD 36 se nachází také na povrchu makrofágů a endotelií, kde slouží jako signální molekula (*Podrez et al. 2007*). Ox-LDL vazbou na tento receptor ovlivňují expresi P-selektinu a aktivaci integrinu $\alpha_{IIb}\beta_3$, fibrinogenového receptoru. Trombocyty s navázanými ox-LDL uvolňují mediátory zánětu, podporují aktivaci endotelií zvýšením exprese adhezních molekul, jako je ICAM-1, a podporují transformaci monocytů na makrofágy, což vede k urychlení pohlcování modifikovaných LDL (*Gąsecka et al. 2021*). Druhý receptor, LOX1, je exprimován na povrchu destiček a také endotelií. Touto cestou aktivují ox-LDL již zmíněný integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ a také receptor $\alpha_2\beta_1$ pro kolagen. Samotný LOX1 váže aktivované destičky a podílí se na stabilizaci vznikajícího trombu, dále snižuje stabilitu sklerotického plátu působením na produkci metaloproteinů a na apoptózu buněk hladkého svalstva (*Gąsecka et al. 2021, Xu et al. 2013*). Bylo také zjištěno, že LDL jsou schopny aktivovat signální dráhy některých induktorů agregace, jako je ADP, tromboxan A_2 či trombin (*Knorr et al. 1988*). Aktivované destičky produkují reaktivní formy kyslíku (angl. zkr. ROS), a tak přispívají k oxidaci LDL. Částice LDL vázané na povrchu jsou postupně internalizovány a ukládány v denzních granulách. Zvýšené množství ox-LDL v aktivovaných trombocytech podporuje další produkci ROS, které hrají roli jako signální molekuly, regulují přesun destiček do místa poškození cévy i jejich aktivaci a následnou agregaci (*Gąsecka et al. 2021*).

Kromě interakcí s trombocyty aktivují ox-LDL i koagulační systém. Mechanismy tohoto působení však nejsou zatím dostatečně popsány. Některé *in vitro* studie naznačují,

že ox-LDL aktivují expresi TF v monocitech/makrofázích, endoteliích a buňkách hladké svaloviny. Zvýšená hladina TF zároveň koreluje s aktivací zánětlivé odpovědi a zvýšenou produkcí prozánětlivých mediátorů. Interakce ox-LDL s monocyty probíhá skrz receptory na povrchu těchto buněk, resp. receptorový komplex CD36/TLR4/TLR6 (toll-like receptory, účastní se vrozené imunitní odpovědi). Vazbou na tento komplex aktivují LDL částice expresi TF a některých cytokinů, působí touto cestou tedy prokoagulačně i prozánětlivě (*Owens et al. 2012*).

Výše uvedené poznatky naznačují možnost využití interakce LDL s trombocyty a koagulačním systémem jako marker účinnosti jednotlivých metod léčby FH. Především u LDL-afézy, která je časově i ekonomicky náročná, je nutné se snažit o co nejmenší frekvenci výkonů, ovšem s dostatečným přínosem. Proto je nutné nalezení vhodných markerů, které by ihned po proceduře s dostatečnou přesností predikovaly účinnost terapie (*Blažek et al. 2007*).

U pacientů podstupujících LDL-afézu a zároveň léčených PCSK9i byl zaznamenán pokles agregace bezprostředně po proceduře. LDL-aféza u většiny induktorů snižovala agregaci pouze numericky, statisticky významné zlepšení sledovaných parametrů bylo pozorováno jen u kolagenu a ristocetinu. Tyto dva induktory se účastní prvních kroků aktivace agregace, proto je podobná odpověď očekávaná. Při interpretaci výsledků je potřeba brát v úvahu, že pacienti ve sledovaném souboru jsou již stabilizovaní, proto změny parametrů před a po aféze (a longitudinální vývoj dat) nemusí být již statisticky významné.

Významné rozdíly nebyly nalezeny při porovnání účinku LDL-afézy a farmakoterapie PCSK9i. Obě metody léčby se jeví jako srovnatelné. PCSK9i mají dle výsledků několika studií vliv na aktivitu destiček podobně jako statiny a také LDL-aféza. Ovlivnění aktivity destiček spočívá jednak ve snížení plazmatické hladiny LDL částic, jednak ve schopnosti snížit expresi LOX1 receptorů (*Ding et al. 2015, Basiak et al. 2021*). Zároveň některé studie poukazují na roli enzymu PCSK9, který podporuje účinek induktorů agregace (*Puccini et al. 2022*). Naše výsledky by mohly odpovídat závěrům studií od *Lappegård et al. (2016)* a *Baum et al. (2019)*, které porovnaly účinnost LDL-afézy a PCSK9i u heterozygotní formy FH a zjistily stejný účinek na snížení hladin LDL-C při přechodu z LDL-afézy na farmakoterapii, a tak i signifikantní snížení potřeby LDL-afézy. Studie, které by pro porovnání uvedených metod léčby využívaly měření parametrů agregace trombocytů a koagulaci krve, však zatím chybí.

V případě přidání antiagregancií k testovaným vzorkům pacientů s FH jsme zaznamenali rozdíl v agregaci pouze u vorapaxaru, kdy pacienti dobře reagovali na vorapaxar bezprostředně po aferéze. Pacienti pouze s PCSK9i měli vyšší profit z vorapaxaru než jedinci před aferézou, to bylo pravděpodobně dáno slabší odpovědí na induktor TRAP u těchto pacientů (**Obr. 11 C**).

Při porovnání pacientů trpících FH se zdravými dobrovolníky byla nalezena signifikantně nižší odpověď pacientů na většinu testovaných induktorů. Podobná odpověď na čtyři induktory (AA, kolagen, ristocetin, U-46619) vyplývá z jejich role v aktivaci destiček. Kolagen a ristocetin (vWF) společně aktivují tvorbu kyseliny arachidonové, která pak dále podléhá metabolismu cyklooxygenasou 1 a tromboxansynthasou za vzniku tromboxanu A₂, který dále stimuluje své receptory. Tromboxan A₂ je značně nestabilní, v naší studii jsme použili jeho stabilní analog U-46619. Významný rozdíl se ukázal také v případě ADP, který nemá přímou souvislost s uvedenými induktory, nicméně AA a následně vznikající tromboxan A₂ jsou schopné dále stimulovat destičky právě např. aktivací sekrece ADP. Nižší míra agregace na většinu testovaných induktorů u pacientů s FH pravděpodobně souvisí se dvěma fakty: 1) pacienti s FH měli nižší hladiny cholesterolu, a to tedy odpovídá nižší agregaci, 2) není možno ani vyloučit vliv protideštičkových léčiv, protože řada pacientů, i když ne všichni (viz **Tab. 6**), byla léčena i protideštičkovými léčivy z důvodu prevence kardiovaskulárních onemocnění. Z etických důvodů samozřejmě nebylo možné tuto terapii přerušit. Z podávaných léčiv se jednalo hlavně o ASA a antagonistu na ADP-receptorech klopidogrel. Na druhé straně byly ovlivněny evidentně i nesouvisející kaskády a z tohoto důvodu je velmi pravděpodobné, že podávání těchto léčiv nebylo jediným důvodem pozorovaných změn. Je také nutno zmínit, že dva pacienti dostávali enterosolventní ASA (preparát Stacyl[®]), která je podle aktuálních znalostí spíše neúčinná na rozdíl od konvenční ASA (*Gaziano et al. 2018*).

Zatímco u odpovědi na induktory agregace se projeví určité rozdíly v použitých metodách u pacientů s FH, u koagulace typ léčby nehrál roli, sledované parametry se téměř nelišily. I tady sice 3 pacienti dostávali antikoagulantia, ale vzhledem k jejich relativně nízkému počtu bylo možné, na rozdíl od antiagregancií, provést podanalýzu výsledků vyřazením těchto pacientů. Bylo tak možné přímo porovnat vliv terapie FH a rozdíly vzhledem ke zdravým jedincům. Na druhé straně nemohla být koagulace sledována bezprostředně po aferéze, metody léčby FH tedy mohly být porovnány jen z hlediska dlouhodobého účinku. Na řadu antikoagulantů reagovali silněji u obou testů

pacienti. Nelze ale úplně vyloučit vliv antiagregační terapie. Trombocyty se podílí na aktivaci koagulační kaskády a bylo prokázáno, že ASA inhibuje vznik trombinu a jeho funkci v koagulačním systému. Kromě známého účinku na aktivitu COX-1 je schopna acetylovat další proteiny účastníci se koagulace včetně fibrinogenu, čímž podporuje efektivitu fibrinolýzy (*Undas et al. 2014*). Kromě toho nesmíme opomenout efekt statinů a PCSK9i. V experimentální studii s 21 dobrovolníky s izolovanou hypercholesterolemií a aterosklerózou, kterým byl podáván PCSK9i, *Basiak et al. (2022)* pozorovali snížení hladin a aktivity fibrinogenu, faktoru VII a PAI-1 a tendenci k prodloužení PT i aPTT.

Se zvýšeným rizikem aterogeneze je spojován nejen LDL-C, ale i jiné lipidy, především triglyceridy (*Peng et al. 2017*). Zbytky lipoproteinů obsahujících nejvíce triglyceridů, tzn. chylomikronů a VLDL, a jsou schopny také infiltrovat subendotelium. Navíc oproti LDL obsahují díky jejich velikosti mnohem více cholesterolu a nemusí být modifikovány/oxidovány, aby se staly aterogenními. Lipoproteiny bohaté na triglyceridy a jejich zbytky by tak mohly mít větší aterogenní účinek než LDL. Bylo zjištěno, že podporují aktivitu destiček a prokoagulační stav zvýšením hladiny fibrinogenu, faktorů VII a XII a exprese PAI-1 (*Olufadi a Byrne 2006, Peng et al. 2017, Sandesara et al. 2019*). V naší studii jsme našli pozitivní korelace mezi agregací destiček a hladinami různých lipoproteinů. Nalezená korelace LDL-C s ristocetinem odpovídala předchozím výsledkům, kdy po LDL-aferéze byla odpověď na ristocetin nižší, a to i oproti farmakoterapii. Zajímavá byla korelace ostatních lipidů s tímto induktorem, a to jako jediným z testovaných molekul. Ristocetin je analog vWF, který je významným mediátorem hemostázy. Jeho primární funkce je zajištění adheze a agregace destiček, ale také slouží jako přenašeč faktoru VIII v krevním oběhu a brání jeho degradaci. Zvýšená plazmatická hladina vWF je nalézána u ICHS, po prodělaném infarktu myokardu, ischemické CMP a je spojována s horší prognózou, vyšším rizikem aterotrombózy a kardiovaskulární mortalitou (*Kiouptsi a Reinhardt 2020, Atiq et al. 2021*). Dlouhodobě zvýšené hladiny LDL a dalších lipoproteinů mohou tedy, jak se zdá, korelovat se zvýšenou hladinou vWF a větší vnímavostí destiček k tomuto induktoru.

Tato práce má několik limitů. Především je to malý počet pacientů, což samozřejmě vyplývá z prevalence FH. Prevalence této nemoci v heterozygotní formě je sice mnohem vyšší, než se původně předpokládalo (*Singh a Bittner 2015*), ale počet pacientů, který má schválenou nákladnou specifickou léčbu (tj. lipidovou aferézu a/nebo PCSK9i) je velmi malý. Kromě zmíněné finanční náročnosti je lipidová aferéza i technicky náročná a momentálně jsou pouze dvě centra v ČR, která ji provozují.

V našem souboru jsme zahrnuli všechny pacienty, kteří dlouhodobě podstupující lipidovou aferézu ve FN Hradec Králové. Ani vyspělá zahraniční pracoviště mnohdy nemají obdobné soubory dlouhodobě sledovaných pacientů přesahujících počet 10-20. Je také potřeba brát v úvahu vliv dlouhodobé léčby sledovaného souboru pacientů na některé výsledky (např. aferézu někteří podstupují 20 i více let). Co se zdravých dobrovolníků týče, u pacientů starších 60 let nebylo jednoduché získat zcela zdravé jedince, kteří by neužívali žádná léčiva. Obecně ale všichni dobrovolníci užívali minimum nebo žádná léčiva, takže nepředpokládáme, že by měla nějaký vliv na naše výsledky. Podávání antiagregancií, antikoagulancií a jiných léčiv, která ovlivňují srážení krve (např. nesteroidní antiflogistika), bylo vylučovacím kritériem v rámci kontrolního souboru zdravých dobrovolníků. Prevalenci některých onemocnění (např. alergie a astma bronchiale) nepovažujeme za významné konfoundery. V případě experimentálního stanovení koagulace nebylo možné porovnat parametry před a po LDL-aferéze vzhledem k použité antikoagulaci při provádění procedury. Z tohoto důvodu se měření koagulace nejvíce jako vhodný ukazatel účinnosti aferézy ihned po jejím provedení. Na rozdíl od zdravých dobrovolníků nebylo v souboru pacientů s FH možné vyloučit jedince léčené antikoagulancií a/nebo antiagregancií, protože byla tato léčba indikována u řady z nich. Z důvodu malé četnosti pacientů s antikoagulační terapií však bylo možné tyto jedince vyloučit pro další podanalýzu. Stejný postup ale nebylo možné uplatnit u antiagregancií, neboť by se náš zkoumaný soubor výrazně zmenšil a výsledky takové statistické analýzy by neposkytly jednoznačné výsledky.

8. ZÁVĚR

Na závěr lze dodat, že tato práce je první, která komplexně hodnotí trombogenní děje u familiární hypercholesterolemie, navíc u dvou různých typů léčby a v porovnání se zdravými jedinci.

Lipidová aferéza vždy minimálně numericky snižovala agregaci na testované induktory. Mezi použitými metodami léčby (aferéza, farmakoterapie) nebyl významný rozdíl (s jedinou výjimkou u ristocetinu), a to ani při měření koagulace. Tento fakt podporuje tvrzení některých studií, že by v budoucnu aferéza mohla být u některých pacientů plně nahrazena PCSK9i. Monoklonální protilátky používané v terapii hypercholesterolemie však stále patří mezi relativně nová léčiva, proto je potřeba provést další výzkum pro upřesnění jejich účinků z hlediska dlouhodobého použití a možnosti úplného nahrazení aferézy v indikovaných případech. Standardně užívaná antiagregancia ASA a tikagrelor účinkovala mezi pacienty bez významnějších rozdílů, účinek vorapaxaru nebyl u všech pacientů jednoznačný. Oproti zdravým dobrovolníkům však měli pacienti silnější reakci na některá antiagregancia i antikoagulancia, což bylo potvrzeno za použití jak PT, tak aPTT testu.

Byly také nalezeny pozitivní korelace dalších potenciálně aterogenních lipidů s aktivitou destiček u některých induktorů. Význam tohoto nálezu by bylo potřeba podpořit dalšími studii. Dále je nutné upřesnit význam a mechanismy interakcí LDL s trombocyty i koagulačním systémem pro optimalizaci léčby trombotických komplikací u těchto pacientů.

9. LITERATURA

9.1 ODBORNÉ ČLÁNKY

1. Aengevaeren WR, Kroon AA, Stalenhoef AF, Uijen GJ, van der Werf T. Low density lipoprotein apheresis improves regional myocardial perfusion in patients with hypercholesterolemia and extensive coronary artery disease. LDL-Apheresis Atherosclerosis Regression Study (LAARS). *J Am Coll Cardiol*. 1996;28(7):1696-704.
2. Atiq F et al. Endothelial Dysfunction, Atherosclerosis, and Increase of von Willebrand Factor and Factor VIII: A Randomized Controlled Trial in Swine. *Thromb Haemost*. 2021;121(5):676-686.
3. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014;276(6):618-32.
4. Basiak M et al. Pleiotropic Effects of PCSK-9 Inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):3144.
5. Basiak M, Hachula M, Kosowski M, Okopien B. Effect of PCSK9 Inhibitors on Hemostasis in Patients with Isolated Hypercholesterolemia. *J Clin Med*. 2022;11(9):2542
6. Baum SJ et al. Effect of evolocumab on lipoprotein apheresis requirement and lipid levels: Results of the randomized, controlled, open-label DE LAVAL study. *J Clin Lipidol*. 2019;13(6):901-909.e3.
7. Benito-Vicente A, Uribe KB, Jebari S, Galicia-Garcia U, Ostolaza H, Martin C. Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3426.
8. Beheshti SO, Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. *J Am Coll Cardiol* 2020;75(20):2553-2566.
9. Bláha M et al. Activity of thrombocytes as a marker of sufficient intensity of LDL-apheresis in familial hypercholesterolaemia. *Transfus Apher Sci*. 2004;30(2):83-7
10. Bláha V et al. LDL-aferéza: indikace, kontraindikace, klinický význam a vlastní zkušenosti. *Hypertenze a kardiiovaskulární prevence*. 2015;4(1):47-51.

11. Bouhairie VE, Goldberg AC. Familial hypercholesterolemia. *Cardiol Clin.* 2015;33(2):169-79
12. Carazo A et al. Sex-Related Differences in Platelet Aggregation: A Literature Review Supplemented with Local Data from a Group of Generally Healthy Individuals. *Semin Thromb Hemost.* 2022.
13. Cuchel M et al; European Atherosclerosis Society Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia. Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J.* 2014;35(32):2146-57.
14. Ding Z et al. Cross-talk between LOX-1 and PCSK9 in vascular tissues. *Cardiovasc Res.* 2015;107(4):556-67.
15. Donner MG, Parhofer KG, Richter WO, Schwandt P. Low-density lipoprotein (LDL) oxidizability before and after LDL apheresis. *Metabolism.* 1999;48(7):881-6.
16. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(8 Suppl):C7-12.
17. Frontroth JP, Favaloro EJ. Ristocetin-Induced Platelet Aggregation (RIPA) and RIPA Mixing Studies. *Methods Mol Biol.* 2017;1646:473-494.
18. Gąsecka A, Rogula S, Szarpak Ł, Filipiak KJ. LDL-Cholesterol and Platelets: Insights into Their Interactions in Atherosclerosis. *Life (Basel).* 2021;11(1):39.
19. Gaziano JM et al.; ARRIVE Executive Committee. Use of aspirin to reduce risk of initial vascular events in patients at moderate risk of cardiovascular disease (ARRIVE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2018;392(10152):1036-1046.
20. Glynn RJ et al. A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2009;360(18):1851-61.
21. Igarashi K. et al. Acute cholesterol-lowering therapy with LDL-apheresis improves endothelial function of the coronary microcirculation in patients with hypercholesterolemia. *Circulation.* 1995;92(8):2157.
22. Janoušek J et al. Vitamin D: sources, physiological role, biokinetics, deficiency, therapeutic use, toxicity, and overview of analytical methods for detection of vitamin D and its metabolites. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2022;59(8):517-554.
23. Kiouptsi K, Reinhardt C. Physiological Roles of the von Willebrand Factor-Factor VIII Interaction. *Subcell Biochem.* 2020;94:437-464.

24. Knorr M et al. Rapid activation of human platelets by low concentrations of low-density lipoprotein via phosphatidylinositol cycle. *Eur J Biochem.* 1988;172(3):753-9.
25. Kroon AA, van Asten WN, Stalenhoef AF. Effect of apheresis of low-density lipoprotein on peripheral vascular disease in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Ann Intern Med.* 1996;125(12):945-54.
26. Kroon AA et al. LDL-Apheresis Atherosclerosis Regression Study (LAARS): Effect of aggressive versus conventional lipid lowering treatment on coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1998;93(10):1826-1835.
27. Kvasnička T. Hemokoagulační mechanismy v procesu aterotrombózy. *Vnitř Lék.* 2012; 58(2):123-128.
28. Lappegård KT, Enebakk T, Thunhaug H, Hovland A. Transition from LDL apheresis to evolocumab in heterozygous FH is equally effective in lowering LDL, without lowering HDL cholesterol. *Atherosclerosis.* 2016;251:119-123.
29. Leitinger N, Pirich C, Blazek I, Endler G, Sinzinger H. Decreased susceptibility of low-density lipoproteins to in-vitro oxidation after dextran-sulfate LDL-apheresis treatment. *Atherosclerosis.* 1996;126(2):305-12.
30. Levine GN, Keaney JF Jr, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. *N Engl J Med.* 1995;332(8):512-21.
31. Marais AD, Blom DJ. Recent advances in the treatment of homozygous familial hypercholesterolaemia. *Curr Opin Lipidol.* 2013;24(4):288-94.
32. Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature.* 2005;438(7068):612-21.
33. Michelson AD. How platelets work: platelet function and dysfunction. *J Thromb Thrombolysis.* 2003;16(1-2):7-12.
34. Mladěnka P et al.; OEMONOM researchers and collaborators. Vitamin K – sources, physiological role, kinetics, deficiency, detection, therapeutic use, and toxicity. *Nutr Rev.* 2022b ;80(4):677-698.
35. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res.* 2017;120(1):229-243.
36. Olufadi R, Byrne CD. Effects of VLDL and remnant particles on platelets. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2006;35(3-4):281-91.

37. Owens AP 3rd et al. Monocyte tissue factor-dependent activation of coagulation in hypercholesterolemic mice and monkeys is inhibited by simvastatin. *J Clin Invest.* 2012;122(2):558-68.
38. Peng J, Luo F, Ruan G, Peng R, Li X. Hypertriglyceridemia and atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):233.
39. Piřha J, Auzký O, Roztočil K. Co mají společného žilní a tepenná onemocnění? *Vnitř Lék.* 2014; 60(11): 985-989.
40. Podrez EA et al. Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat Med.* 2007;13(9):1086-95.
41. Pottle A et al. Lipoprotein apheresis efficacy, challenges and outcomes: A descriptive analysis from the UK Lipoprotein Apheresis Registry, 1989-2017. *Atherosclerosis.* 2019;290:44-51.
42. Puccini M, Landmesser U, Rauch U. Pleiotropic Effects of PCSK9: Focus on Thrombosis and Haemostasis. *Metabolites.* 2022;12(3):226.
43. Sandesara PB, Virani SS, Fazio S, Shapiro MD. The Forgotten Lipids: Triglycerides, Remnant Cholesterol, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk. *Endocr Rev.* 2019;40(2):537-557.
44. Singh S, Bittner V. Familial hypercholesterolemia--epidemiology, diagnosis, and screening. *Curr Atheroscler Rep.* 2015;17(2):482.
45. Sinzinger H, Pirich C, Bednar J, O'Grady J. Ex-vivo and in-vivo platelet function in patients with severe hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis. *Thromb Res.* 1996;82(4):291-301.
46. Slíva J. Inkliširan: inovativní přístup v léčbě dyslipidemie. *Svět praktické medicíny.* 2021;3:63-66.
47. Sořka V, Kyselák O. Nezapomínáme na možnost biologické terapie hypercholesterolemie pomocí PCSK9-inhibitorů? *Vnitř Lék* 2021; 67(3): 138-142.
48. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation.* 1997;95(1):76-82.
49. Tatami R et al. Regression of coronary atherosclerosis by combined LDL-apheresis and lipid-lowering drug therapy in patients with familial hypercholesterolemia: a multicenter study. The LARS Investigators. *Atherosclerosis.* 1992;95(1):1-13.
50. Thompson GR. The evidence-base for the efficacy of lipoprotein apheresis in combating cardiovascular disease. *Atheroscler Suppl.* 2013;14(1):67-70.

51. Thompson GR, Parhofer KG. Current Role of Lipoprotein Apheresis. *Curr Atheroscler Rep.* 2019;21(7):26.
52. Turgeon RD, Barry AR, Pearson GJ. Familial hypercholesterolemia: Review of diagnosis, screening, and treatment. *Can Fam Physician.* 2016;62(1):32-7.
53. Undas A, Brummel-Ziedins K, Mann KG. Why does aspirin decrease the risk of venous thromboembolism? On old and novel antithrombotic effects of acetyl salicylic acid. *J Thromb Haemost.* 2014;12(11):1776-87.
54. Uno H et al. Removal of LDL from plasma by adsorption reduces adhesion molecules on mononuclear cells in patients with arteriosclerosis obliterans. *Atherosclerosis.* 1995;116(1):93-102.
55. Vallejo-Vaz AJ et al.; EAS Familial Hypercholesterolaemia Studies Collaboration. Pooling and expanding registries of familial hypercholesterolaemia to assess gaps in care and improve disease management and outcomes: Rationale and design of the global EAS Familial Hypercholesterolaemia Studies Collaboration. *Atheroscler Suppl.* 2016;22:1-32.
56. Vrablík M. Monoklonální protilátky proti PCSK9 v léčbě dyslipidemií. *Kardiol Rev Int Med* 2014;16(6):485-488.
57. Vrablík M. Ateroskleróza – od etiologie po možnosti ovlivnění. *Vnitř Lék* 2015;61(11):925-931.
58. Wang N, Tall AR. Cholesterol in platelet biogenesis and activation. *Blood.* 2016;127(16):1949-53.
59. Xu S, Ogura S, Chen J, Little PJ, Moss J, Liu P. LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(16):2859-72.

9.2 KNIHY

1. Blažek M, Bláha M, Malý J, Pecka M, Bláha V, Mašín V. Změny parametrů metabolismu a hemostázy u familiární hypercholesterolemie v léčbě LDL-aférezou. Hradec Králové: Nucleus HK, 2007.
2. Češka R, Freiburger T, Vaclová M, Bláha V, Urbanová Z. Familiární hypercholesterolemie. Praha: TRITON, 2015.
3. Engelking LR. Textbook of Veterinary Physiological Chemistry. 3rd Edition. Academic Press, 2015.

- Otová B, Mihalová R, Bobková K. Základy biologie a genetiky člověka. 2. aktualizované vydání. Praha: Karolinum, 2020: s. 25-26.
- Rokyta R et al. Fyziologie a patologická fyziologie pro klinickou praxi. Praha: Grada Publishing, a.s., 2015: s. 266-270.
- Stejskal D. Ateroskleróza: Etiopatogeneze, diagnostika a léčba. Přerov: Knihtiskárna Strojil Přerov, 1999.
- Štejfá M et al. Kardiologie. 3. vydání, přepracované a doplněné. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011: s. 219-222.
- Trojan S et al. Lékařská fyziologie. 4. vydání, přepracované a doplněné. Praha: Grada Publishing, a.s., 2003: s 140-150.

9.3 INTERNETOVÉ ZDROJE

- Feingold KR. Lipoprotein Apheresis. 2020. In: Endotext [Internet]. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK425700/>. Přístup 28.10., 17.11. 2022.
- Feingold KR. Introduction to Lipids and Lipoproteins. 2021a. In: Endotext [Internet]. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>. Přístup 25.9. 2022.
- Feingold KR. Cholesterol Lowering Drugs. 2021b. In: Endotext [Internet]. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK395573/>. Přístup 15.12. 2022, 1.2. 2023.
- Hoffmann-La Roche Ltd., H. 2017-2021. Multiplate® analyzer: Stručná příručka. Germany: Roche Diagnostics GmbH. Dostupné na URL: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/>. Přístup 5.2. 2023.

9.4 PŘEDNÁŠKY

- Mladěnka P, Carazo A. Platelets, their structure, receptors, signalling pathways, antiplatelet drugs and experimental approaches [přednáška]. 2022a. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, 21.2. 2022.