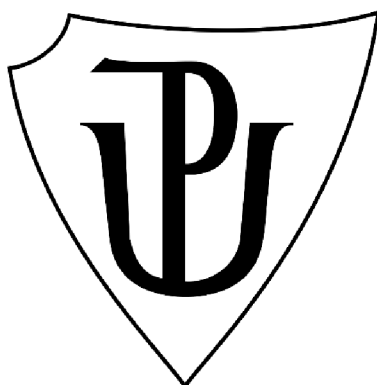


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**CLL u pacientů – Monitorace agregace při léčbě BTK
inhibitory**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Michaela Beňová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Úlehlová, Ph.D.
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Michaela Beňová
Název práce	CLL u pacientů – Monitorace agregace při léčbě BTK inhibitory
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jana Úlehlová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Chronická lymfocytární leukémie je rakovinotvorné onemocnění vyskytující se převážně u starší populace. Nemoc postihuje B lymfocyty, které po dozrání ztrácejí svou funkci tvořit potřebné protilátky. CLL nemá jednotné příznaky onemocnění a lze ji tak diagnostikovat pouze laboratorními testy, mezi které řadíme například vyšetření krevního obrazu. Kvůli variabilnímu průběhu nemoci se velmi často liší i terapie. U lepšího podtypu onemocní s mutovanou variabilní částí IgVH řetězce bývají pacienti často pouze monitorováni, u těžší formy s nemutovanou částí je nutná léčba. Aktuálně se při terapii CLL využívá inhibitorů Bruton tyrosinové kinasy, jejíž metabolismus, zásadní pro signalizační BCR dráhu v B lymfocytech, je esenciální pro progresi onemocnění. Jedním z vedlejších účinků užívání inhibitorů Bruton tyrosinové kinasy se projevuje v nižší funkčnosti krevních destiček, což způsobuje krvácivé stavy. Koncentrace léčiva, která způsobuje trombocytopenii byla změřena optickou transmisní a impedanční agregometrií. Pomocí naměřených dat bylo zjištěno, že koncentrace způsobující krvácivost je daleko vyšší než běžná užívaná dávka a lék samotný by neměl způsobovat těžké krvácivé stavy. Pro lepší prošetření této problematiky byla vytvořena databáze pacientů léčících se s CLL ve Fakultní nemocnici Olomouc od roku 2012 do roku 2024.

Klíčová slova	Chronická lymfocytární leukemie, CLL, Bruton tyrosinová kinasa, BTK inhibitory, Ibrutinib, Acalibrutinib, optická transmisní agregometrie, impedanční agregometrie
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Michaela Beňová
Title	CLL in patients - Aggregation monitoring during BTK inhibitor treatment
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Úlehlová, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

Chronic lymphocytic leukaemia is a cancer predominantly found in the elderly population. The disease affects B lymphocytes, which lose their function to form the necessary antibodies as they mature. CLL has no uniform symptoms and can only be diagnosed by laboratory tests, including blood counts. Because of the variable course of the disease, the therapy often varies. In the better subtype of the disease with the mutated variable part of the IgVH chain, patients are often only monitored, whereas in the more severe form with the non-mutated part, treatment is necessary. Currently, CLL therapy uses inhibitors of Bruton tyrosine kinase, whose metabolism, essential for the BCR signaling pathway in B-lymphocytes, is essential for disease progression. One of the side effects of using Bruton tyrosine kinase inhibitors is reduced platelet function, which causes bleeding conditions. The concentration of the drug that causes thrombocytopenias was measured by optical transmission and impedance aggregometry. Using the measured data, it was found that, that the concentration causing bleeding is much higher than the normal dose used and the drug itself should not cause severe bleeding conditions.. To better investigate this issue, a database of patients treated for CLL at the University Hospital Olomouc from 2012 to 2024 was created.

Keywords	Chronic lymphocytic leukemia, CLL, Bruton tyrosine kinase, BTK inhibitors, Ibrutinib, Acalibrutinib, optical transmission aggregometry, impedance aggregometry
Number of pages	48
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Chronická lymfocytární leukémie	2
2.1.1 Symptomy a Diagnostika CLL	2
2.1.2 Prognóza	4
2.1.3 Terapie CLL	6
2.1.3.1 Mechanismus účinku Ibrutinibu	7
2.1.3.2 Mechanismus účinku Acalibrutinibu	8
2.1.4 Off target efekty Ibrutinibu	9
2.1.4.1 Kardiovaskulární komplikace	9
2.1.4.2 Trombocytopenické komplikace	9
2.2 Trombocytopenie	10
2.3 Richterův syndrom	11
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	13
3.1 Materiál	13
3.2 Přístrojové vybavení	13
3.3 Metody	13
3.3.1 Preanalytická kritéria	14
3.3.2 Optická transmisní agregometrie (LTA)	14
3.3.2.1 Použité reagensy	15
3.3.3 Impedanční agregometrie (MEA)	17
3.3.3.1 Použité reagensy	19
3.4 Vlastní měření	20
3.4.1 Příprava vzorků a reagensů	20
4 VYHODNOCENÍ A DISKUZE	22
4.1 Retrospektivní databáze pacientů	22
4.2 Optická transmisní agregometrie	26
4.3. Impedanční agregometrie	32
5 ZÁVĚR	36
6 LITERATURA	37
7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	41

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

- Provedení literární rešerše ke zvolené problematice

Praktická část

- Zvládnutí základních laboratorních dovedností a zaškolení v obsluze optického transmisního a impedančního agregometru
- Úprava vzorků pro potřeby měřících metod
- Analýza vlivu různých koncentrací inhibitorů BTK na funkci trombocytů
- Retrospektivní zpracování dat pacientů s Chronickou lymfocytární leukémií
- Zpracování dat a optimalizace metodik

1 ÚVOD

Leukemická onemocnění jsou v současné době rozšířena po celém světě a patří mezi běžná rakovinotvorná onemocnění bílých krvinek. Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nádorové onemocnění charakteristické funkčně nekompetentními klonálními B lymfocyty typické morfologie a imunofenotypu (Hallek et al., 2008). Podle diagnostických iwCLL (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia) kritérií je nutná přítomnost alespoň $5 \times 10^9/l$ B lymfocytů v periferní krvi trvající nejméně 3 měsíce s typickým imunofenotypem. Mezi typický Imunofenotyp řadíme průkaz klonality pomocí detekce restrikce lehkých řetězců (kappa či lambda), exprese znaku CD23, exprese znaku CD5, nízká míra exprese povrchového imunoglobulinu a znaků CD20 a CD79b (Campo et al., 2011).

CLL je v západních zemích nejrozšířenější leukemickým onemocněním mezi dospělými a tvoří zhruba 25 až 30 % všech leukemií ve Spojených státech amerických (Chiorazzi et al., 2021). Poměr četnosti onemocnění u mužů se pohybuje od 1,3:1 do 1,7:1 k ženám. CLL je typické onemocnění starší populace, kdy medián věku při diagnóze onemocnění je 70 let, nicméně setkáváme se i s případy diagnózy onemocnění mezi 30 až 40 rokem života jedince (Sant et al., 2010).

V léčbě chronické lymfocytární leukémie (CLL) došlo postupně ke změně léčebné strategie, a to z důvodu zavedení nových léčebných metod pomocí inhibitorů signálních drah. Do této skupiny léčiv patří inhibitory B-buněčného receptoru (iBCR), známé též jako inhibitory Bruton tyrosinové kinasy (BTKi,) Ibrutinib, Idelalisib, Acalabrutinib, Zanubrutinib a dále také inhibitory BCL2 (B-cell lymphoma 2) signalizace, kde se řadí Venetoclax, schopný navodit eradikaci CLL buněk z periferní krve, či tkání (Panovská et al., 2023).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Chronická lymfocytární leukémie

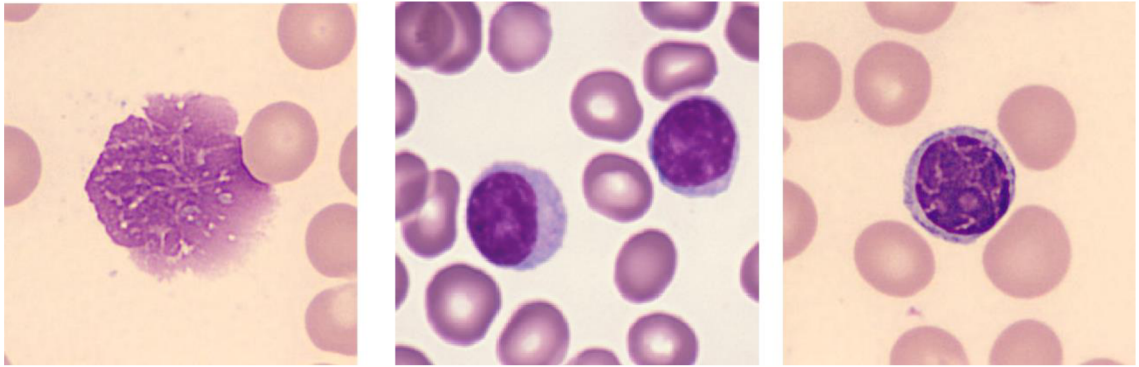
Chronická lymfocytární leukémie je pomalu se šířící lymfoproliferativní onemocnění postihující převážně starší populaci. V roce 2018 ve Spojených státech Amerických byla tato nemoc diagnostikována u 20 940 pacientů, což tvoří 1,2 % všech diagnostikovaných rakovin pro daný rok (Chiorazzi et al., 2021).

Chronická lymfocytární leukémie zasahuje B lymfocyty hlavně v krevní periférii. Zralý maligní B lymfocyt nemá schopnost tvořit protilátky a nemá tak pro organismus žádnou funkci. Ztráta schopnosti je způsobena nadměrnou aktivitou Bruton Tyrosinové kinasy (BTK, EC 2.7.10.2) přítomné v BCR signalizační kaskádě B lymfocytu. Maligní B lymfocyty se nadměrně dělí, vzniká monoklonální B lymfocytóza a stoupá progresa onemocnění. Klinický průběh nemoci je velmi variabilní. Od velmi pomalého růstu onemocnění až po agresivní formy, což dosvědčuje vysokou heterogenitu onemocnění (Brejcha et al., 2023).

2.1.1 Symptomy a Diagnostika CLL

Pacienti s tímto onemocněním mívají většinou nespecifické příznaky a heterogenní průběh onemocnění. Mezi sdružené příznaky můžeme zařadit trombocytopenii, nebolestivě zvětšené mízní uzliny nebo tlaky v břiše a B symptomy, mezi které řadíme úbytek hmotnosti (o více jak 10 % za posledních 6 měsíců), nárazové horečky (neinfekční a trvající déle, jak 2 týdny) a noční pocení (Panovská & Doubek, 2013).

Nejdůležitějším diagnostickým prvkem je vyšetření krevního obrazu, kdy pro určení chronické lymfocytární leukémie musí být v periferní krvi přítomno více, jak $5 \times 10^9/l$ B lymfocytů. V krevním nátěru u typické formy CLL se často vyskytují drobné lymfocyty, které dosahují maximálně dvojnásobku velikosti erytrocytu. Tvar mají kulatý, či mírně oválný. Jádro kulatého tvaru je většinou lehce excentricky uložené a obsahuje větší množství cytoplazmy. Chromatin je hutný, kondenzován typicky ve formě tmavých bloků oddělených světlejším chromatinem, což tvoří mozaikovitou strukturu. Úzký lem cytoplazmy je jasně ohraničený, velmi světlý, vodojasný někdy slabě bazofilní (Obr. 1) (Smolej et al., 2021a). Nádorové lymfocyty mají křehkou strukturu a při krevním nátěru často pozorujeme Gumprechtovy stíny, což jsou zbytky rozpadlých jader bílých krvinek v krevním nátěru (Gumprechtovy stíny, 2000).



Obr. 1: Mikroskopický snímek Gumprechtova stínu (vlevo), zdravých B lymfocytů (uprostřed) a CLL buňky (napravo). Zvětšení 1000x. Převzato od Urbanová, 2021; upraveno

Přítomnost prolymfocytů v krevním nátěru by neměla přesahovat 10 %, při přesáhnutí hranice 55 % se jedná o jiné onemocnění a to B-prolymfocytární leukémii (Panovská & Doubek, 2013).

Průtoková cytometrie je další velmi důležitou diagnostickou metodou v rámci CLL. Tato metoda identifikuje a kvantitativně určuje projev zvolených znaků v buňce. Znaky volíme podle použité fluorescenční protilátky, která po navázání na její specifický antigen, nacházející se na povrchu buňky, vysílá fluorescenční signál zaznamenaný přístrojem. Do speciální kolony vstupují buňky po jedné a jsou ozářeny množstvím laserů. Propustnost je zaznamenána počítačem, který výsledky vyhodnotí v mnohorozměrném grafu buňky rozdělí podle požadavků do tříd (Bernard, 2011).

Další možností průtokové cytometrie je imunofenotypizace před samotným tříděním buněk. Za laserovou celou dojde k rozprášení buněčné suspenze tak, aby každá kapka nesla jen jednu buňku. Pokud počítač vyhodnotí přítomnost žádaného znaku, vychýlí pomocí elektrického proudu kapičku nesoucí žádoucí buňku mimo hlavní proud. Tento typ průtokové cytometrie je nazýván flowcytometrie. Typický vzorek používaný pro průtokovou cytometrii u CLL pacientů je nesrážlivá krev. Fenotypové znaky se silným projevem u CLL pacientů jsou povrchové antigeny B lymfocytů CD19, CD5, CD20 a CD23 anebo v případě diagnostických rozpaků se v rámci diferenciální diagnózy používají vyšetření antigenů jako CD43, CD79b, CD81, CD200, CD10 nebo ROR1koexpresse CD5 a nízká expresse CD79b. Leukemický klon bývá pozitivní na lehké řetězce povrchových imunoglobulinů kappa nebo lambda (Panovská & Doubek, 2013).

CLL buňky jsou obvykle negativní pro cyklin D1 a CD10. FMC7, CD22 a CD79 jsou také negativní, v některých případech pouze slabě exprimované. Naprostá většina případů je reprezentována pouze jedním klonem cirkulujícím v periferní krvi. Raritně mohou být detekovány průtokovou cytometrií klony dva, některé studie uvádí výskyt až u 1,4 % všech případů (Bernard, 2011).

2.1.2 Prognóza

CLL je onemocnění s velmi variabilním průběhem. U části nemocných si CLL zachovává indolentní charakter, a tak nezkracuje předpokládanou délku života pacienta. U jiných se chová příliš agresivně, rychle progreduje a přežití pacienta od stanovení diagnózy je 2–3 roky. Prognóza onemocnění lymfocytární leukémie může být stratifikována klinickým stádiem dle Raie nebo dle Bineta. Tyto klinická stádia se mají své odlišnosti, ale v současné době jsou stále používané oba typy (Tab. 1,2 Klinická stádia dle Raie a Bineta). Při stanovení dle Bineta je zkoumána skupina mízních uzlin, do které se řadí krční, podpažní, tříselné a dále slezina a játra, zatímco klinická stádia podle Raie posuzují hlavně počet lymfocytů (Smolej et al., 2021b). Posouzení klinického stádia doporučuje zahájení léčby. Při stanovení dle Raie se zahájení léčby doporučuje ve stádiu III a IV a při stanovení dle Bineta ve stádiu C.

V současnosti nabývá na významu zejména molekulárně – genetická analýza CLL pacientů. Jsou definovány specifické chromosomální aberace, genové mutace a další prognostické znaky, které v některých případech významně ovlivňují prognózu pacienta a další terapeutický postup. Mezi vyšetření určující prognózu onemocnění řadíme fluorescenci in situ hybridizaci (FISH), přesněji vyšetření genetických aberací. Typické delece zjištěné FISH metodou jsou 13q, 11q, 6q, 17p a méně často trisomie chromosomu 12 (Panovská & Doubek, 2013). Určité abnormality chromosomu jako 11q nebo 17p delece jsou nezávislým prognostickým znakem spojeným s velmi nepříznivou prognózou (Döhner et al., 2000).

Tab. 1: Klinická stádia dle Raie et al., převzato od Smolej et al, 2021b

Klinická stádia dle Raie et al.	
0	Lymfocytóza
I	Lymfocytóza + Lymfadenopatie
II	Lymfocytóza + Splenohepatomegalie (hepatomegalie)
III	Lymfocytóza + Anémie (hemoglobin < 110 g·l ⁻¹)
IV	Lymfocytóza + Trombocytopenie (PLT < 60·10 ⁹ ·l ⁻¹)

Tab. 2: Klinická stádia dle Bineta et al., převzato od Smolej et al, 2021b

Klinická stádia dle Bineta et al.	
A	Méně jak 3 poškozené skupiny mízní uzliny*
B	Více jak 3 poškozené skupiny mízní uzliny
C	anémie (hemoglobin $<110 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) anebo trombocytopenie ($\text{PLT} < 60 \cdot 10^9 \cdot \text{l}^{-1}$)

*postižené skupiny mízních uzlin - skupiny uzlin: krční, podpažní, tříselné, slezina a játra.

Dále pomocí in situ hybridizace určujeme mutační stav genů pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu (IgVH). Mutační stav variabilní části těžkého řetězce imunoglobulinu určuje podtyp onemocnění CLL s různou prognózou. Jedná-li se o nemutovaný IgVH řetězec, podtyp U-CLL, mají pacienti horší prognózu s dobou přežití asi 8 let. Pokud má pacient mutovaný IgVH, tedy podtyp onemocnění M-CLL, jeho prognóza je značně lepší s dlouhou dobou přežití asi 25 let. Tyto mutace IgVH se dějí v germinálních centrech B lymfocytů (Hallek et al., 2008).

Jako další prognostická metoda je uváděno vyšetření komplexního karyotypu periferní krve po stimulaci mitogeny.(Smolej et al., 2021b). Komplexní karyotyp je definován jako přítomnost třech a více chromosomálních abnormalit v jednom klonu a je detekován u přibližně 16 % pacientů při stanovení diagnózy choroby. Často je asociovaný s nemutovaným IgVH a CD38 expresí. Je spojen s kratším časem do zahájení léčby a celkovým přežitím 52–79 měsíců. Byla prokázána signifikantní asociace mezi 11q nebo 17p delecí. Karyotypové testování by mělo být součástí vyšetření pacienta s CLL stejně jako testování metodou FISH (Papajík et al., 2021).

Mezi špatné prognostické faktory zahrnujeme i molekuly zapojené do signalizace BCR receptoru, ZAP-70 a CD38. Vysoká exprese intracelulárního proteinu ZAP70 vede k agresivnějším formám CLL a nutností terapie. Exprese povrchového antigenu CD38 je spojena s expresí ZAP-70 a obě molekuly jsou častěji přítomné u U-CLL podtypu(Smolej et al., 2021a).

Dohromady dávají tato vyšetření prognózu o délce období bez nutnosti zahájení léčby a celkové přežití pacienta. Stále ale platí, že Chronická lymfocytární leukémie je dostupnými léčivy nevyléčitelná. Jediná kurativní možnost je transplantace kostní dřeně, která se provádí u mladých a fyzicky zdatných pacientů (Panovská & Doubek, 2013).

2.1.3 Terapie CLL

Pacienti s časným stádiem onemocnění (Klinická stádia Rai 0, Binet A) jsou pouze pravidelně monitorováni a neprovádí se u nich terapie (Panovská & Doubek, 2013). Postup v terapii je odvíjen od krevního obrazu a jednotlivých prognostických faktorů (Smolej et al., 2021a).

Léčba u pacientů s CLL se indikuje na základě laboratorního a fyzikálního vyšetření a osobní anamnézy. Pro zahájení léčby musí být u pacienta přítomen minimálně jeden z následujících příznaků. Progresivní selhání kostní dřeně charakteristické rozvojem nebo zhoršením anemie nebo trombocytopenie, masivní nebo proedukující a symptomatická splenomálie s velikostí víc, jak 6 centimetrů pod levým žeberním obloukem nebo lymfadenopatie s velikostí víc, jak 10 centimetrů v nejdelším průměru. Dále se mezi příznaky zahajující léčbu řadí progredující lymfocytóza s růstem za poslední dva měsíce více, jak 50 % nebo autoimunitní anemie se špatnou odpovědí na kortikosteroidy a jiné léčivé metody (Smolej et al., 2021a).

Průřezem historií se léčba CLL stále mění. Jako první léky na leukémii byly obecně užívány tzv. „Nitrogen mustard“. Příklad léčiva z této skupiny byl methyl bis (β -chloroethyl) amin, který patří mezi alkylační činidla (Hall et al., 1956). Od 60. let 20. století byl významně užíván lék Chlorambucil patřící taktéž mezi alkylační činidla. Lék je dodnes používán u některých komorbidních pacientů, ale odpověď na léčbu se pohybuje od 30 k 70 % a kompletní remise je velmi nízká. V 80. letech 20. století se začal preferovat lék Fludarabin, který se značil lepší odpovědí pacientů na léčbu, kdy overall response dosahovala 65 až 89 %. Lék Fludarabin položil základ v kombinaci s Cyklofosamidem pro dnešní terapii s monoklonálními protilátkami. Nevýhodou tohoto léčiva je vysoká hematologická toxicita a zvýšené riziko autoimunitní hemolytické anemie (Panovská & Doubek, 2013).

Monoklonální protilátky umožňují působit cíleně na nádorovou buňku a způsobit její smrt v kombinaci s chemoterapeutiky. Mezi monoklonální protilátky řadíme například Rituximab, který cílí na antigen CD20. Bez kombinací s dalšími léčivy je Rituximab využíván u pacientů s imunitní cytopenií a u pacientů netolerujících myelotoxickou terapii. Daleko víc je tento lék využíván v kombinaci s Fludarabinem a Cyklofosamidem, kdy pacienti s touto terapií dosahují až 95 % léčebné odpovědi a 52 % kompletní remise (Panovská & Doubek, 2013). U pacientů, kteří neodpovídají

na léčbu Fludarabinem se využívá Alemtuzumab, který se taktéž řadí mezi monoklonální protilátky. Jedná se o rekombinantní plně humanizovanou protilátku anti-CD52 neovlivňující p53-dependentní apoptickou dráhu. Díky nezávislosti na apoptické dráze se vyznačuje jako vhodný lék pro CLL pacienty s delecí 17p nebo mutací TP53 (Keating et al., 2002).

Moderní doba přistupuje nejčastěji k léčivům řadícím se do skupiny inhibitorů Brutonovy kinasy (BTKi). Tato léčiva jsou využívána v léčbě relapsu/refrakterní CLL a v první linii terapie pacientů s mutací TP53 nebo delecí 17p (Smolej et al., 2021a). Inhibice BTK způsobuje nižší signalizaci přes BCR signalizační dráhu, což je nezbytná dráha pro přežití nádorové buňky B lymfocytu. Mezi nejznámější léky patřící do této skupiny řadíme Ibrutinib (Imbruvica) a Acalibrutinib (Calquence), které jsou navíc jediné hrazené pojišťovnou v České republice (Panovská et al., 2023).

Brutonova tyrosin kinasa se řadí do Tec rodiny Tyrosinových kinas, které jsou velmi esenciální v BCR signalizační dráze vyskytující se na membráně B lymfocytů. B-buněčný receptor (BCR) je transmembránový protein hrající důležitou roli při aktivaci a proliferaci B lymfocytu a při tvorbě protilátek. Při navázání antigenu na BCR je aktivováno několik signálních drah. Souběžně buňka zpracovává antigen, který je vyloučen na povrch, kde je přístupný T lymfocytům. V aktivovaných signálních drahách je přítomna Bruton tyrosin kinasa, enzym, aktivující fosfolipasu $C\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$, EC 3.1.4.11) po své vlastní fosforylaci. Fosfolipasa $C\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) hydrolyzuje fosfatidylinositoldifosfát (PIP2) na diacylglycerol (DAG) a inositoltrifosfát (IP3), mobilizuje intracelulární vápník a aktivuje další molekuly (AKT, MAP kinasu (EC 2.7.11.24), NFkB). Zúčastňuje se i přenosu signálů z jiných buněčných receptorů (CXCR4, B2M, TLR4), které regulují růst a migraci nádorových buněk. Aktivní signalizace drahami BCR a BTK nezávisle na specifickém antigenu hraje významnou roli v etiopatogenezi B-lymfoproliferativních onemocnění (Fečková Mihályová et al., 2016).

2.1.3.1 Mechanismus účinku Ibrutinibu

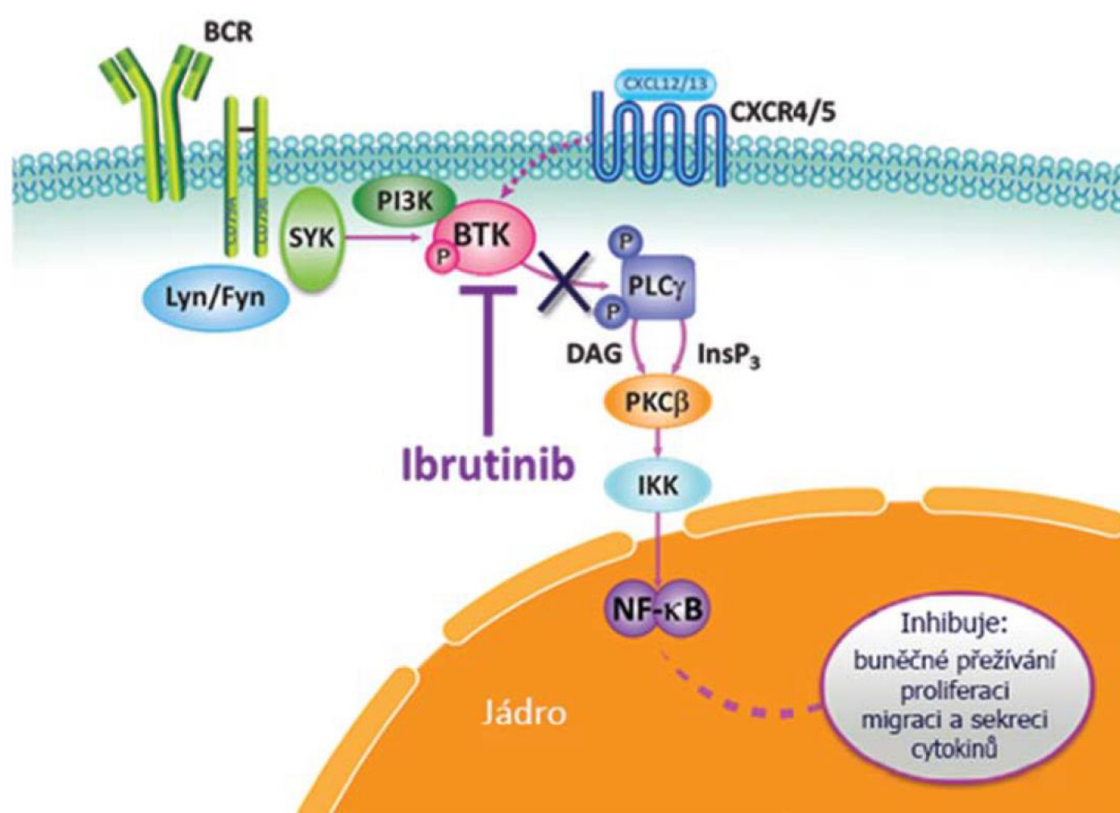
Ibrutinib, označována jako 1. generace BTK inhibitorů, je chemická látka 1-[(3R)-3-[4-amin-3-(4-phenoxyphenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl]-1-piperidinyl]-2-propen-1-on, která se ireverzibilně kovalentně váže na cysteinové reziduum kinasy Cys 481 a brání její fosforylaci (Obr. 2). Znemožňuje přežívání a proliferaci nádorových B lymfocytů, brzdí jejich migraci a inhibuje sekreci některých cytokinů (CCL3, CCL4).

Ibrutinib také necíleně inhibuje kinasy z rodin EGFR (epidermal growth factor receptor), ITK (interleukin-2-inducible T-cell kinase) a TEC (tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma) a má účinek na fosforylaci EGFR na tyrosinových zbytcích y1068 a y1173, což způsobuje nežádoucí účinky (Fečková Mihályová et al., 2016).

2.1.3.2 Mechanismus účinku Acalibrutinibu

Acalibrutinib se řadí do 2. generace selektivního BTK inhibitoru. Chemický název Acalibrutinibu je 4-[8-amino-3-[(2S)-1-but-2-ynoylpyrrolidin-2-yl]imidazo[1,5-a]pyrazin-1-yl]-N-pyridin-2-ylbenzamide. Acalibrutinib se vyznačuje účinnějšími selektivními schopnostmi než 1. generace BTKi (Wu et al., 2016).

Acalibrutinib se kovalentně ireverzibilně váže na reziduum kinasy Cys481 se zlepšenou selektivitou a pokrytím cíle ve srovnání s Ibrutinibem u pacientů s CLL. Acalibrutinib inhibuje signalizace na primárních lidských CLL buňkách a tyrosinovou fosforylaci ERK, IKB a AKT. Tento lék 2. generace na rozdíl od Ibrutinibu neinhubuje EGFR, ITK ani TEC rodiny a nemá žádný účinek na fosforylaci EGFR na tyrosinových zbytcích y1068 a y1173, což u Ibrutinibu způsobuje nežádoucí účinky.



Obr. 2: Mechanismus účinku Ibrutinibu. Převzato od Fečková, Mihályová et al, 2016

2.1.4 Off target efekty Ibrutinibu

Nežádoucí účinky Ibrutinibu jsou způsobené jeho nedokonalou vazbou. Vazba inhibuje kinasy z rodin ITK a TEC, což je spojováno s trombocytopenií a krvácením, EGFR, jehož inhibice způsobuje průjmy s exantémem nebo kinasy z rodiny CSK (C-terminal Src kinase) s rozvojem fibrilace síní (Panovská et al., 2023).

2.1.4.1 Kardiovaskulární komplikace

Fibrilace síní patří mezi typické nežádoucí účinky při užívání BTKi. Častější výskyt je u pacientů nad 70 let, pacientů polykomorbidních s CLL. Pro prevenci rozvoje fibrilace síní je nutná znalost zdravotního stavu pacienta, například pacienti s paroxysmem komorové tachykardie jsou nevhodní k léčbě s BTKi (Panovská et al., 2023).

Arteriální hypertenze je nejčastějším kardiovaskulárním nežádoucím účinkem BTKi. Oproti fibrilaci síní je méně častou příčinou ukončení léčby. Až u 70 % pacientů vzniká arteriální hypertenze de novo a průměrně je to 14 měsíců od zahájení léčby. Pokud pacient má arteriální hypertenzi není nutné ukončit léčbu, ale je vhodné kontrolovat krevní tlak pacienta a nepřidávat další léčiva s možnou inhibicí CYP3A4 pro další zvýšení toxicity. Pokud pacient neodpovídá na úpravu srdečního tlaku hypotenzivou, je následně nutné léčbu přerušit a po stabilizaci začít s redukovanými dávkami (Panovská et al., 2023).

Mezi méně časté kardiovaskulární komplikace spojené s léčbou BTKi patří srdeční selhání. U pacientů s historií chronického srdečního selhání jsou preferované léčiva BTKi 2. generace, které mají nižší riziko rozvoje fibrilace síní (Panovská et al., 2023).

2.1.4.2 Trombocytopenické komplikace

Trombocytopenie je další ze specifických nežádoucích účinků při užívání BTK inhibitorů, právě kvůli přítomnosti Bruton tyrosinové kinasy a kinasy z TEC rodiny i v signální dráze pro glykoprotein VI vyskytující se v Koagulační kaskádě trombocytů. Glykoprotein VI se za normálních podmínek podílí na navázání trombocytů na kolagen. Inhibicí BTK je následně menší odezva aktivace krevních destiček (Panovská et al., 2023). Krvácení se pohybuje od malého mukokutánního krvácení až po život ohrožující krvácení. Ibrutinib tedy přináší zvýšené riziko krvácení ve srovnání se standardní chemoterapií. Nejrizikovější krvácivé stavy hrozí u pacientů s antikoagulační či protideštičkovou léčbou. Pacienti užívající BTKi by měli být varováni před používáním nesteroidních protizánětlivých léků, rybích olejů, vitamínu E a přípravků obsahujících

aspirin a měli by zvážit nahrazení Ibrutinibu jiným přípravkem, pokud je indikována duální protideštičková léčba.

2.2 Trombocytopenie

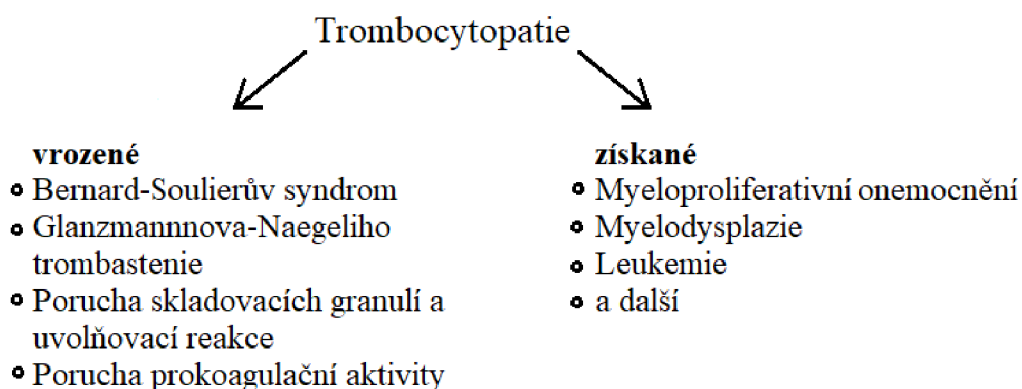
Trombocytopenie neboli funkční poruchy krevních destiček jsou děleny na vrozené nebo získané (Obr. 3). Mezi vrozené řadíme Bernardův-Soulierův syndrom, Glanzmannovu-Naegeliho trombastenii, poruchu skladovacích granulí a uvolňovací reakce a poruchu prokoagulační aktivity destiček (Penka & Buliková, 2009). Mezi získané můžeme zařadit Myeloproliferativní onemocnění, Myelodysplazii a jiné.

Bernardův-Soulierův syndrom se značí poruchou adhezivitu trombocytů. Onemocnění je způsobeno dědičným defektem komplexu Ib/IX a glykoproteinu V, kvůli čemuž na sebe krevní destičky nenavazují von Willebrandův faktor. Projevuje se nadměrně velkými destičkami v krevním nátěru (Penka & Slavičková, 2011).

Glanzmannova-Naegeliho trombastenie je autozomální recesivní zřidkavé onemocnění s poruchou retrakce a neschopností agregace. Tato nemoc je zapříčiněna defektem glykoproteinu IIb/IIIa, kdy tyto destičky na sebe nevážou fibrinogen důležitý pro spojení krevních destiček při hemostázi (Fiore et al., 2023).

Porucha skladovacích granulí a uvolňovací reakce řadíme do poruchy sekrece destiček. Při poruše skladovacích granulí je nedostatek velmi hutných nebo α -granulí, případně i obou, obsahujících proagregační látky. Do této skupiny řadíme více onemocnění např. Chediakův-Higashiho syndrom nebo Wiskottův-Aldrichův syndrom. Porucha uvolňovací reakce je poruchou uvolňování zmíněných skladovacích granulí z granulomeru destičky. Porucha je z důvodu změny funkce cyklu metabolismu kyseliny arachidonové a cyklických endoperoxidů (Penka & Slavičková, 2011).

Porucha prokoagulační aktivity destiček neboli také Scottův syndrom je charakterizován poruchou vazby faktorů Va s Xa a VIIa s IXa. Projevuje se sníženou generací trombinu (Penka & Buliková, 2009) Získané trombocytopenie jsou daleko častější než vrozené trombocytopenie a jsou součástí řady onemocnění jako myeloproliferativní onemocnění, myelodysplastický syndrom, leukemie aj.. Důležitou součástí získaných poruch trombocytů jsou trombocytopenie získané po léčbě, nejčastěji po protizánětlivých lécích (kyselina acetylsalicylová, indometacin, ibuprofen) nebo například po léčbě Ibrutinibem v rámci CLL (Penka & Slavičková, 2011).



Obr. 3: Základní rozdělení trombocytopatií dle patogeneze

2.3 Richterův syndrom

Richterův syndrom (RS) je definován jako agresivní histologická transformace na difuzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) vyskytující se až u 15 % pacientů s CLL (Thompson & Siddiqi, 2022) RS se může transformovat právě z chronické lymfocytární leukémie nebo z lymfomu z malých leukocytů (SLL). Richterův syndrom je biologicky heterogenní a u mnoha případů klonálně příbuzný s CLL. RS se projevuje zvětšením náhlým zvětšením mízních uzlin, nebolestivým otokem v oblasti krku, podpaží a břicha (splenomegalie), B symptomy nebo anémií. Identifikace této transformace podle vnějších příznaků je obtížná, jelikož všechny projevy spadají i do příznaků CLL, podstatné ovšem je, že Richterův syndrom tyto příznaky zhorší, což není pro klasický průběh CLL/SLL typické. Celková remise z této nemoci je pouze okolo 20 % a dlouhodobé přežití spojené s imunochemoterapií je méně než 20 % (Leukemia Foundation, 2019).

Mechanismus vedoucí k RS není zcela popsán a fáze CLL, která předchází RS, není jasně oddělitelná. Richterův syndrom má genomickou složitost mezi CLL a DLBCL. Zhruba v polovině případů je hlavní příčinnou transformace v RS z CLL mechanismus inaktivace TP53 a CDKN2A. Inaktivace TP53 vede k aktivaci MYC (myelocytomatos - kódovací protein) a následně k ztrátě genomu. Druhým významným mechanismem, který může ovlivnit výsledek léčby pacientů s RS, je přítomnost trisomie 12 a zahrnuje přibližně jednu třetinu případů. V tomto případě následuje mutace genu NOTCH1. Tyto dva mechanismy se vzájemně vylučují (Thompson & Siddiqi, 2022).

Prediagnostické vyšetření Richterova syndromu je z PET/CT (18-FDG PET; pozitronová emisní a RTG počítačová tomografie), což je standardní neinvazivní vyšetřovací metoda u pacientů s difuzním B-velkobuněčným lymfomem (DLBCL).

18F-FDG PET využívá toho, že nádorové buňky DLBCL mají významně zvýšený metabolický obrat glukózy, a proto intenzivně zpracovávají také podanou molekulu 18F-FDG. Díky tomu, dokáže metoda přesně lokalizovat patologickou lézi. Intenzitu akumulace 18F-FDG v patologické lézi lze semikvantitativně vyjádřit u každého nemocného pomocí výpočtu tzv. „standardized uptake value“ (SUV). Pokud je u vyšetřeného pacienta hodnota $SUV_{max} < 5$ je velmi nízká pravděpodobnost vzniku Richterova syndromu. Při hodnotách 5 až 10 je pravděpodobnost střední a u hodnot $SUV_{max} > 10$ vysoká. K potvrzení Richterova syndromu je nutná exstirpace mizní uzliny s histologickým vyšetřením (Kapitáňová et al., 2014)(Thompson & Siddiqi, 2022).

Terapií pro pacienty s RS je imunochemoterapie s využitím rituximabu, transplance u mladších a fyzicky zdatných jedinců nebo i terapie pomocí BTKi. V současné době se zkoumá terapie založená na blokádě kontrolních bodů imunitního systému s inhibitory PD-1 nebo pomocí kombinace Ibrutinib-nivolumabu. Kombinace přinesla 35 % celkové remise (Smolej et al., 2021b).

Možná varianta RS je Hodgkinův lymfom, jedná se o vzácný monoklonální lymfoidní nádor s vysokou mírou vyléčení. Biologické a klinické studie rozdělily tuto chorobnou jednotku do dvou odlišných kategorií: klasický Hodgkinův lymfom a Hodgkinův lymfom s převahou nodulárních lymfocytů (NLP-HL). Hodgkinovy lymfomy charakterizují čtyři znaky. Vznik nádoru v krčních lymfatických uzlinách, onemocnění postihuje mladé dospělé okolo 25 let věku, na pozadí směsi nenádorových zánětlivých buněk se mísí roztroušené velké mononukleární Hodgkinovy a vícejaderné (Reed-Sternbergovy) buňky a v okolí charakteristických neoplastických buněk jsou často pozorovány T-lymfocyty. Hodgkinův lymfom má vynikající celkovou prognózu s přibližně 80% mírou vyléčení (Kaseb & Babiker, 2023). Nejčastější léčba je pomocí chemoterapie s ABVD (adriamycin, bleomycin, vinblastin, dekarbazin) nebo BEACOPP (bleomycin, etoposid, adriamycin, cyclofosfamid, vinkristin, prokarbazin, prednison)(Kořen & Trněný, 2015).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

- Lidská plazma obohacená na trombocyty
- HYPHEN BioMed Arachidonic Acid (katalogové číslo AG003K, Neuville-sur-Oise, Francie)
- HYPHEN BioMed ADP (katalogové číslo AG001K, Neuville-sur-Oise, Francie)
- HYPHEN BioMed Epinefrine (katalogové číslo AG002K, Neuville-sur-Oise, Francie)
- Helena Biosciences Europe Ristocetin (katalogové číslo 5199, Gateshead, Velká Británie)
- Fyziologický roztok NaCl 0,9%

3.2 Přístrojové vybavení

- Automatické pipety Eppendorf Research Plus (Eppendorf – Hamburg, Německo)
- Automatické mikropipety ACURA 825 (Socorex – Ecublens, Švýcarsko)
- Laboratorní chladnička (výrobní číslo 818459557, Liebherr – Bulle, Švýcarsko)
- Agregometr APACT 4004 (LABiTec, Ahrensburg, Německo)
- Agregometr Multiplate[®] analyzer (Dynabyte, Mnichov, Německo)
- Laboratorní plasty a sklo
- Analytická váha
- Centrifuga MEGAFUGE 1.0 R (Heraeus)

3.3 Metody

Cílem práce je kvantifikovat hranici koncentrace léčiv Ibrutinibu a Acalibrutinibu, při níž dochází k poruše funkce trombocytů u pacientů, kteří jsou pod léčbou těmito farmaky. Pro zjištění hraniční koncentrace Ibrutinibu a Acalibrutinibu ovlivňující funkci trombocytů byly využity metody optické transmisní agregometrie (LTA) a impedanční agregometrie (MEA). Širší rozhraní koncentrace bylo zjištěno pomocí optické transmisní agregometrie a její hranice byla zúžena a potvrzena impedanční agregometrií

V rámci metod bylo využito i retrospektivní vyhledání všech pacientů s CLL léčících se s onemocněním ve Fakultní nemocnici Olomouc za uplynulých 12 let. Pacienti byli seřazeni do tabulky a byly u nich pozorovány hodnoty optické i impedanční agregometrie.

3.3.1 Preanalytická kritéria

Preanalytická kritéria zahrnují odběr, transport a zpracování biologického materiálu před vyšetřením. Dodržení preanalytické fáze je důležité pro kvalitu a správné vyhodnocení výsledků. Hodnoty výsledků mohou být špatnou preanalytickou fází ovlivněny v oblastech vlastního odběru, transportu materiálu do laboratoře, přípravou a zpracováním biologického materiálu před vyšetřením. Na preanalytickou fázi má také vliv dodržování metodických postupů, správné pracovní návyky, kalibrace přístrojů a mnohá další kritéria. Jednotlivé oblasti preanalytického procesu mají následně vliv na variabilitu výsledků.

K odběru krevních vzorků byly využity odběrové zkumavky a jehly VACUETTE® od společnosti Greiner Bio-One, Rakousko. Odběrové zkumavky VACUETTE® určené pro optickou transmisní agregometrii obsahovaly pufovaný roztok citrátu sodného s koncentrací 0,109 mol/l (3,2 %). Tento roztok váže vápenaté ionty a chrání labilní prokoagulační faktory. Pro impedanční agregometrii byly také využity zkumavky téže firmy s totožnou technikou odběru, avšak jako antikoagulant byl použit hirudin (15 IU/ml), přímý inhibitor trombinu, který neváže vápenaté ionty. Každý odebraný vzorek byl ihned šetrně promíchán a co nejrychleji transportován do laboratoře. Všechny vzorky byly zpracovány do 2 hodin po odběru.

3.3.2 Optická transmisní agregometrie (LTA)

Optická transmisní agregometrie je dlouhodobě využívaná metoda pro monitorování funkce destiček v citrátové plasmě. Ke stanovení se využívá plazmy bohaté na destičky (PRP) i chudé (PPP). Metoda je založena na detekci rozdílu v množství propouštěného světla před a po přidání reagensů – agonistů destiček, měří se tedy změna průchodnosti světla, k níž dochází při vytváření agregátů trombocytů (Koltai et al., 2017). Agregací měření poskytuje křivku agregačního indexu hustoty popisující změny intenzity světelné propustnosti vzorků (Úlehlová, 2018). Pro tuto metodu je zavedena široká škála agonistů s různým mechanismem navázání na trombocyty, což poskytuje možnost diagnózy pro velké množství trombocytopatií. Nejčastěji používanými agonisty je kyselina arachidonová, ADP, kolagen, ristocetin a epinefrin. Maximální rozsah agregace je vyjádřený v procentech rozdílné propustnosti světla tzn. PRP - PPP, kdy 100% vyjadřuje plnou funkčnost trombocytů, zatímco nižší procenta jsou projevem ztráty jejich funkce agregovat (Kadlečíková, 2017). Fyziologické rozmezí se pohybuje od 60% a více.



Obr. 4: Optický agregometr APACT 4004

Dalšími možnými parametry k vyhodnocení může být rychlost nástupu agregační křivky či doba nutná k dosažení poloviny maximální amplitudy (Úlehlová, 2018).

Nevýhodou této metody je přísná preanalytická fáze a také čas. Trombocyty obecně je nutné zpracovat do 2 hodin od odběru a příprava vzorku je poměrně časově náročná. Další rizikový aspekt této metody je poměrně velký objem potřebné plasmy a limitující faktor počtu destiček pod $100 \times 10^9/l$ (Koltai et al., 2017) (Úlehlová, 2018).

Jedním ze zástupců pro LTA je přístroj APACT 4004 (LaBiTec Labor BioMedical Technologies GmbH), který obsahuje 4 oddělené kanály pro až 4 souběžné reakce (Obr. 4). Jednotlivé měřicí kanály přístroje tedy mohou pracovat nezávisle na sobě. To znamená, že měřicí kanály lze libovolně spustit a opět zastavit a měření s různými reagensy lze provádět na každém měřicím kanálu. Přístroj měří při vlnové délce 740 nm pomocí čtyř zabudovaných fotometrů (Kadlečíková, 2017).

3.3.2.1 Použité reagensy

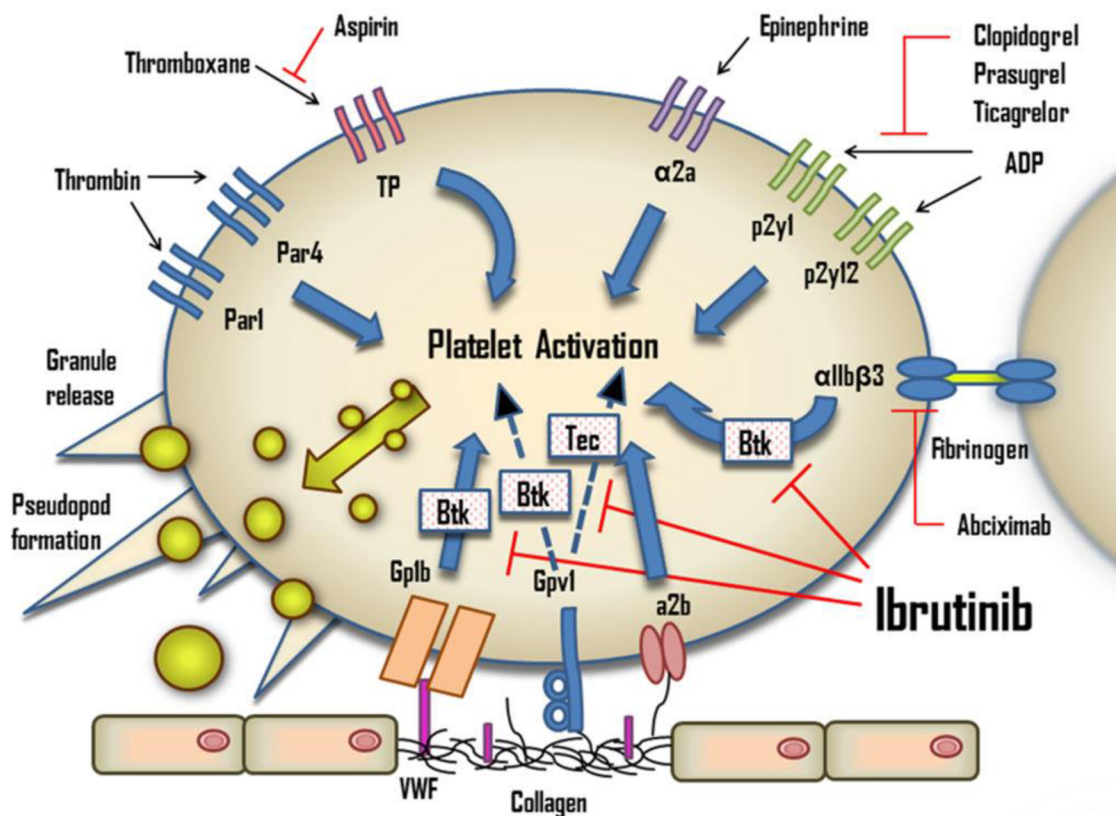
Kyselina arachidonová funguje na základě principu konverze Tromboxanu A_2 (TXA_2) díky enzymu cyklooxygenase (COX; EC 1.14.99.1). Vytvořený TXA_2 vyvolá aktivaci krevních destiček a následné uvolnění granulí, což vede ke změně tvaru destiček, která se projeví poklesem průchodu světla. Kyselina arachidonová je považována za silného agonistu. Využívá se pro screening trombocytopenie ať již vrozené (např. Glanzmannovy trombastenii, Bernard-Soulier syndromu, syndromu šedých

destiček atd.) nebo získané (myelodysplastický syndrom, myeloproliferativní onemocnění, mnohočetný myelom, Waldenströmova choroba, selhání jater či ledvin atd.) nebo také k monitoraci antiagregační léčby pro léčiva obsahující kyselinu acetylsalicylovou (HYPHEN BioMed, 2021a).

Ristocetin po přidání k plazmě bohaté na destičky (PRP) vyvolá interakci mezi von Willebrandovým faktorem (vWF) a jeho destičkovým receptorem, glykoproteinem GP Ib-V-IX, což zapříčiní agregaci trombocytů a změnu v propustnosti světla. Ristocetin reagent je určen pro testy agregace krevních destiček vyvolaných ristocetinem (RIPA). Používá se také pro zjištění von Willebrandovy choroby, konkrétně ke zvýraznění zvýšené afinity von Willebrandova faktoru (vWF) pro GPIb u typu 2B a pro identifikaci Bernard-Soulier syndromu. Ristocetin reagent může být také použit společně s lyofilizovanými destičkami pro test aktivity Ristocetin kofaktoru (vWF: RCo) při diagnostice von Willebrandovy choroby (HYPHEN BioMed, 2021b).

Po přidání ADP do PRP se naváže na receptory P2Y₁ a P2Y₁₂ na povrchu destiček a vyvolává dvoufázový proces agregace (Obr. 5). Aktivace krevních destiček zprostředkovaná ADP vede ke změně tvaru destiček a vyvolává počáteční vlnu agregace. Pokud je koncentrace ADP dostatečně vysoká, objeví se druhá vlna agregace, následovaná uvolněním obsahu granulí destiček skládajícího se mimo jiné ze serotoninu, fibrinogenu, tromboxanu a endogenního ADP. ADP je považován za slabého agonistu, jelikož jeho účinek je částečný a vratný. Využití má stejné jako kyselina arachidonová – screening trombocytopenie vrozené nebo získané, a navíc se využívá pro biologický monitoring antiagregační terapie po podání, thienopyridinů, tento způsob monitorace je vhodné doplnit o prostaglandin E1 zejména z důvodu specifické vazby léčiv na daný receptor (HYPHEN BioMed, 2021c).

Mechanismus funkce epinefrinu (Obr. 5) je na základě navázání se na α_2 -adrenergické receptory na povrchu destiček, čímž vyvolává počáteční vlnu reverzibilní agregace. Tato primární agregace vede k odhalení fibrinogenových receptorů a inhibici aktivity adenylátcyklázy. Druhá vlna agregace, zřetelně odlišená od první, je spuštěna uvolněním ADP z δ granulí a tromboxanem A₂. Epinefrin je považován za slabého agonistu, jelikož jeho účinek je částečný a vratný (HYPHEN BioMed, 2021d).



Obr. 5: Grafické znázornění mechanismu reakcí pro metodu LTA, převzato od Shatzel et al 2017

3.3.3 Impedanční agregometrie (MEA)

Impedanční agregometrie měří změnu elektrické impedance mezi dvěma elektrodami, při vyvolané agregaci pomocí agonisty. Metoda se provádí s použitím plné krve, tudíž není potřeba centrifugovat primární vzorek a získávat plazmu bohatou na krevní destičky (PRP), jako u optické agregometrie. Testování agregace destiček in vitro měří schopnost různých agonistů destiček vyvolat aktivaci agregace mezi trombocyty. Při impedanční agregometrii jsou dva páry elektrod ponořeny do vzorku plné krve a po přidání různých agonistů se měří impedance mezi oběma elektrodami. Dráty senzoru jsou vyrobeny z vysoce vodivé mědi, která je potažena stříbrem. Při aglutinaci nebo shlukování krevních destiček na elektrodách v reakci na různé agonisty se elektrický odpor mezi dráty zvyšuje a tato změna impedance se průběžně zaznamenává (SANG Medicine, 2022).

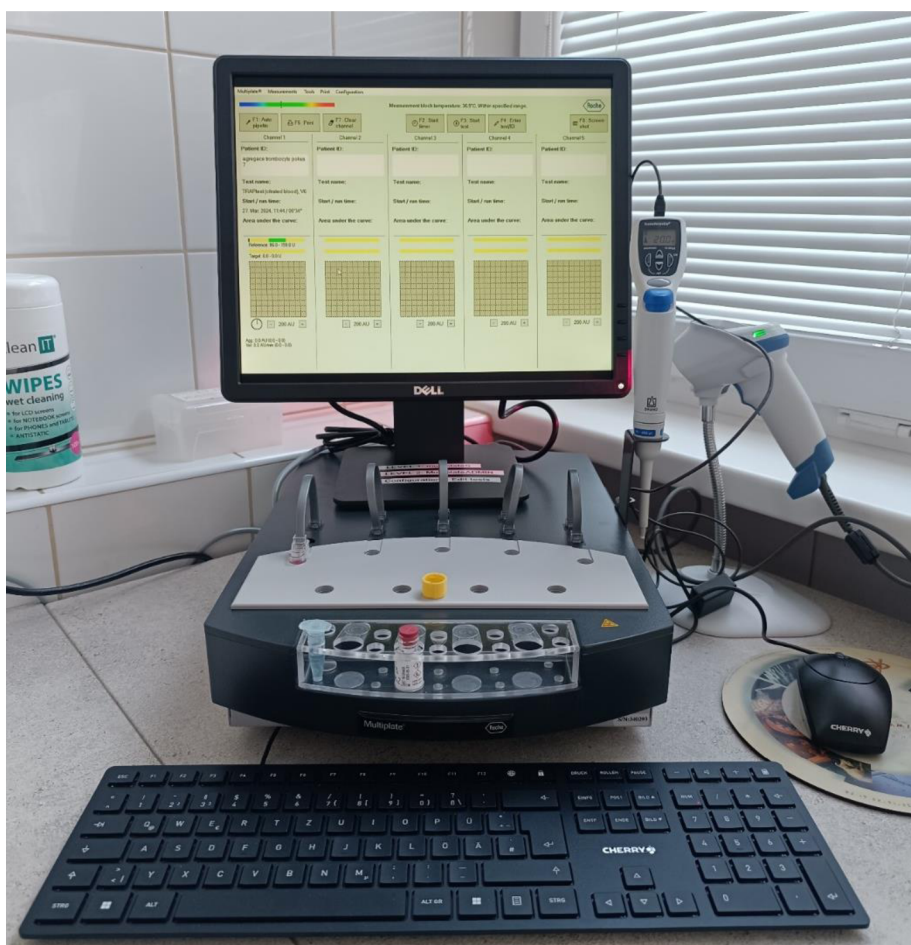
Výsledkem je křivka, která zobrazuje závislost agregace destiček vyjádřenou v agregančních jednotkách (AU), na čase (min) nebo se používá mezinárodní jednotka U.

Z jednoho měřicího kanálu se vytváří dvě agregační křivky, každá z jednoho páru elektrod. Z průměrných hodnot obou křivek patří mezi standardně hodnocené parametry:

- Plocha pod křivkou
- Maximální amplituda agregace
- Maximální sklon agregace

Stejně jako u optické transmisní agregometrie je zde velké množství induktorů jako je například ADP, arachidonová kyselina, kolagen, peptid aktivující trombinový receptor (TRAP), prostaglandin E₁ (Úlehlová, 2018).

Jedním z předních přístrojů pro impedanční agregometrii je Multiplate® Roche. Tento systém umožňující měření agregace krevních destiček pomocí impedanční metody je vybaven vícekanálovým systémem, který umožňuje paralelní provádění několika měření současně. Každý kanál je schopen nezávisle provádět měření agregace, což znamená, že lze spouštět a zastavovat měření podle potřeby a na každém kanálu provádět měření s různými reagenty (Obr. 6).

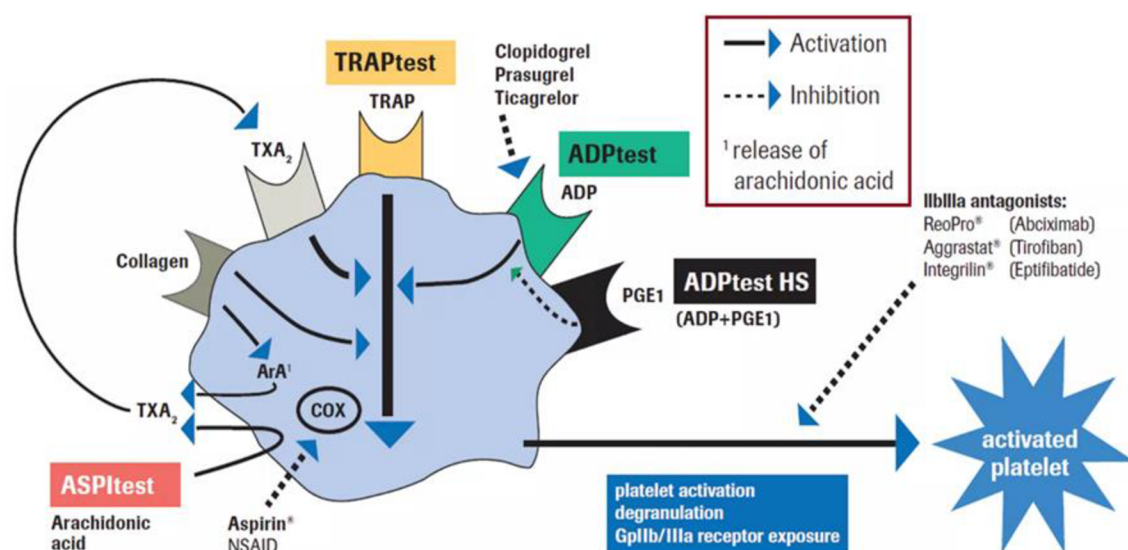


Obr. 6: Impedanční agregometr Multiplate® Roche

3.3.3.1 Použité reagensie

Thrombine receptor-activating peptide test neboli test peptidů aktivující trombinový receptor, též známý jako TRAPtest se využívá pro kvantitativní stanovení in vitro měření funkce trombocytů. Reagensie slouží pro testování trombocytů ve vzorku plné krve a je uváděna pod zkratkou TRAP (Roche, 2022).

Trombin má schopnost aktivovat krevní destičky primární hydrolyzou receptoru asociovaného s G-proteinem na membráně destiček, označovaným jako proteasami aktivovatelný receptor 1 (PAR1), a druhého receptoru (PAR4), který vykazuje nižší citlivost na trombin (Obr. 7). Aktivace trombinem způsobuje agregaci destiček prostřednictvím vazby fibrinogenových řetězců na glykoproteinové receptory IIb/IIIa (GpIIb/IIIa) na membráně destiček. Po aktivaci dochází k fyzické změně konformace receptorů GpIIb/IIIa, čímž vzniká vazebné místo pro fibrinogen s vysokou afinitou. K analýze agregace destiček spuštěné trombinovým receptorem se využívá peptid, který stimuluje PAR1 receptor (TRAP-6). Tato reakce umožňuje testovat funkce destiček aktivovaných PAR1 receptorem bez spuštění tvorby fibrinu ve vzorku, což by se stalo při použití trombinu jako agonisty. Agregace destiček vyvolaná TRAP-6 může být omezená nebo chybějící v přítomnosti antagonistů GpIIb/IIIa, při deficitu receptorů GpIIb/IIIa (tzv. Glanzmannova trombastenie) nebo v případě přítomnosti PAR1 inhibitoru, Vorapaxaru. Reakce agregace indukovaná TRAP-6 je mírně citlivá na inhibici kyselinou acetylsalicylovou nebo na antagonisty ADP receptoru (Roche, 2022).



Obr. 7: Znárodnění mechanismu účinku reagensie TRAP na trombocyt, převzato od Roche, 2022

3.4 Vlastní měření

3.4.1 Příprava vzorků a reagensů

Vzorky krve pro optickou transmisní agregometrii byly centrifugovány při 900 otáčkách za minutu po dobu 10 minut tj. 250 g, aby byly odděleny složky krve a získána PRP. Po centrifugaci byla PRP plazma odebrána do kádinky. Takto byla vytvořena směsná PRP plazma od alespoň tří zdravých dárců krve. Připravený roztok plazmy se v určitém objemu napipetoval s rozpuštěným léčivem ve fyziologickém roztoku do uzavíratelné mikrozkušavky, aby se dosáhlo požadované koncentrace léčiva v plazmě. Roztok se ponechal 10 minut reagovat za občasných protřepání. Do agregační kyvety APACT bylo napipetováno 200 μ l připraveného roztoku a kyveta byla vložena do optického agregometru. Tento vzorek byl použit jako blank. Po změření hodnoty blank bylo do měřicího systému přidáno 20 μ l dané reagensie.

Každá reagensie (kyselina arachidonová, ADP, ristocetin a epinefrin) byla před použitím rozpuštěna daným množstvím destilované vody uvedeným na lahvičce a důkladně promíchána při laboratorní teplotě. Lahvičky s reagensiemi byly vloženy na příslušné místo v optickém agregometru.

Jako vzorky pro impedanční agregometrii byly použity vzorky plné krve, které byly v daném poměru napipetovány s roztokem léčiva ve fyziologickém roztoku do mikrozkušavky, pro dosažení požadované koncentrace léčiva. Takto připravený roztok 7 minut reagoval za občasných promíchání. Po uplynutí doby bylo 300 μ l vzorku napipetováno do kyvety pro impedanční agregometrii, ke kterému bylo přidáno 300 μ l fyziologického roztoku. Takto připravený vzorek byl inkubován 3 minuty a následně bylo přidáno 20 μ l reagensie TRAP, která byla předtím rozpuštěna v objemu destilované vody uvedeném na lahvičce a důkladně promíchána při laboratorní teplotě. Po přidání reagensie bylo spuštěno vlastní měření.

Pro výpočet koncentrace v běžně užívané dávce byl použit výpočet pro koncentraci s využitím molární hmotnosti účinné látky a průměrným krevním objemem dospělého člověka (Rovnice 1). Za hmotnost léčiva byla dosazena běžně užívaná dávka a to 280 mg u Ibrutinibu a 200 mg acalibrutinibu denně. Molekulární hmotnost Ibrutinibu je 440,507 a Acalibrutinibu je 465,517. Pro průměrný objem krve v lidském organismu byla použita hodnota 5 litrů. Zde jsou uvedeny výpočty:

$$c = \frac{n}{V} = \frac{m}{M_r \times V}$$

$$c = \frac{0,2 \text{ g}}{465,517 \times 5 \text{ l}}$$

$$c = 8,592 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$$

Rovnice 1: Výpočet koncentrace běžné dávky Acalbrutinibu.

Pro získání požadované koncentrace léčiva v měřeném roztoku byla využita rovnice výpočtu koncentrace pro navážku léčiva a směšovací rovnice (Rovnice 2,3).

$$c = \frac{n}{V} = \frac{m}{M_r \times V}$$

$$c = \frac{0,02 \text{ g}}{465,517 \times 0,01 \text{ l}}$$

$$c = 0,0043 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$$

Rovnice 2: Výpočet koncentrace roztoku léčiva v objemu 0,01 l při navážce 0,02 g.

$$c_{acalibr} \times V_{acalibr} + c_{plasma} \times V_{plasma} = c_{roztoku} \times (V_{acalibr} + V_{plasma})$$

$$0,0043 \times V_{acalibr} = 0,5 \times 10^{-3} \times 0,01$$

$$V_{acalibr} = 1,16 \times 10^{-4} \text{ l}$$

$$V_{plasma} = 8,84 \times 10^{-4} \text{ l}$$

Rovnice 3: Výpočet potřebného objemu roztoku léčiva a plasmy pro získání požadované koncentrace $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

4 VYHODNOCENÍ A DISKUZE

4.1 Retrospektivní databáze pacientů

Z celkové databáze Fakultní nemocnice Olomouc bylo zaznamenáno 17 pacientů léčících se s Chronickou lymfocytární leukémií v časovém rozmezí 2012 až 2023 (Tab. 3). Jednotliví pacienti byli označeni podle pohlaví, muži XY a ženy XX. Výsledky z nejnovějších vzorků byly zahrnuty u všech pacientů. U pacientů byly zkoumány a porovnány výsledky optické i impedanční agregometrie.

Většina pacientů prokázala nejpatologičtější výsledky (pod 60%) při testování optické transmisní agregometrie s použitím reagensie epinefrinu, který je považován za nejcitlivější reaktivátor při poruše funkcí trombocytů. Tabulka je tedy uspořádána podle klesající úrovně funkčnosti trombocytů právě s tímto stimulačním činidlem. Nejméně citlivým induktorem je ristocetin, u kterého většina pacientů vykazuje fyziologické hodnoty. Citlivost těchto induktorů závisí na jejich specifické afinitě k vazebným místům. Ristocetin vyvolává interakci mezi von Willebrandovým faktorem (vWF) a jeho destičkovým receptorem, glykoproteinem GP Ib-V-IX, což vede k agregaci trombocytů. Naopak epinefrin, vázící se na α_2 -adrenergní receptory na povrchu destiček, indukuje počáteční fázi reverzibilní agregace. Tato primární agregace vyvolává expozici fibrinogenových receptorů a inhibici aktivity adenylátcyklázy. Následná, druhá vlna agregace, jasně odlišitelná od první, je zahájena uvolněním ADP z δ granulí a tromboxanu A₂. Kyselina arachidonová má velmi podobnou afinitu jako epinefrin. Obě reagensie jsou navíc velmi citlivé na přítomnost acetylsalicylové kyseliny nebo tzv. salicylátů. Tyto látky jsou často přítomné v běžných léčivech proti bolesti, jako například ibalgin. Většina perorálních antiagregačních léčiv působí na krevní destičku ireverzibilně, což může ovlivnit výsledek agregometrického stanovení.

Výsledky MEA se velmi liší od optické agregometrie skoro u všech pacientů. V případě MEA je referenční rozmezí 25-45 AU·min⁻¹. Toto rozmezí nespĺňují ani pacienti s výsledky LTA v normě. Metoda MEA se jeví jako více přesná, respektive více simuluje podmínky *in vivo* nejspíše i díky zvolené reagensii TRAP, která je velmi citlivá na poruchu funkce trombocytů. Trombin aktivuje krevní destičky prostřednictvím receptorů PAR1 a PAR4. Tato aktivace způsobuje jejich agregaci tím, že mění konformaci receptorů GpIIb/IIIa, což umožňuje vázání fibrinogenu. Pro testování agregace destiček pomocí receptoru PAR1 se používá peptid TRAP-6. Tento přístup umožňuje zkoumat funkci destiček aktivovaných receptorem PAR1 bez spuštění tvorby fibrinu.

Tab. 3: Seznam pacientů léčících se s CLL pomocí inhibitorů brutonových kinas ve FN Olomouc v letech 2012 – 2023 s výsledky optické a impedanční agregometrie

Označení pacienta	LTA				MEA
	AA* [%]	ADP† [%]	RISTO‡ [%]	EPI§ [%]	TRAP** [AU·min ⁻¹]
XY 1	75,0	76,0	88,0	87,0	14,4
XY 2	51,0	92,0	99,0	85,0	15,8
XY 3	87,0	80,0	83,0	84,0	32,5
XX 1	99,0	99,0	99,0	81,0	18,5
XY 4	33,0	34,0	99,0	79,0	16,7
XX 2	99,0	99,0	99,0	79,0	23,6
XY 5	99,0	90,0	99,0	71,0	14,5
XY 6	91,0	8,6	99,0	63,3	16,0
XX 3	78,0	94,6	97,0	55,8	16,5
XX 4	58,0	98,0	99,0	48,0	18,8
XX 5	70,0	99,0	99,0	44,0	36,2
XX 6	47,0	35,0	43,0	42,0	9,8
XY 7	70,0	34,2	80,0	36,0	30,3
XX 7	99,0	98,1	99,0	34,3	16,8
XX 8	83,0	99,0	95,0	25,4	17,7
XY 8	56,0	5,5	99,0	2,0	4,8
XX 9	96,0	99,0	99,0	17,0	12,8
XY 9	72,0	8,0	99,0	1,0	16,3
XY 10	47,0	1,0	3,0	0,0	0,7

*AA – reagensie kyselina arachidonová

†ADP – reagensie ADP

‡RISTO – reagensie ristocetin

§EPI – reagensie epinefrin

**TRAP – reagensie pro TRAPtest (test peptidů aktivující trombinový receptor)

Kromě výsledků obou agregometrií u sledovaných pacientů byla zohledněna léčiva, které pacienti užívají a mohly by mít vliv na funkčnost trombocytů (Tab. 4). Mezi taková léčiva mohou být zařazeny:

Alopurinol, lék využívaný pro snížení kyseliny močové v krvi, může způsobit trombocytopenii (snížení počtu trombocytů) jakožto vzácný vedlejší účinek. Novorapid a Lantus řadíme mezi inzulíny, ačkoli sami o sobě nemají přímý vliv na funkci trombocytů, mohou ovlivnit hladinu glukózy v krvi, což může nepřímo ovlivnit hemostázu a negativně ovlivnit funkci trombocytů. Fraxiparin je nízkomolekulární heparin, který má antikoagulační účinek, může tedy negativně ovlivnit srážlivost krve a tím i funkci trombocytů. Trombex se řadí mezi antiagregační léčiva. Účinná látka Clopidogrel funguje jako inhibitor destičkové agregace, brání tedy ve vytváření krevních sraženin. Účinnost léčby Trombexem je možné monitorovat pomocí LTA či MEA. Jako induktoru se využívá ADP v kombinaci prostaglandinu E1. Tento lék je využíván u pacientů s nadměrnou srážlivostí krve. Sortis a Stacyl patří mezi statiny, které se používají k léčbě vysokého cholesterolu. Statiny mohou mít antitrombotické účinky a mohou ovlivnit funkci trombocytů, jelikož díky snižování cholesterolu mohou ovlivnit kvalitu krevních sraženin. Euthyrox je lék ovlivňující funkci štítné žlázy obsahující hormon thyroxin. Při nedostatečné nebo nadměrné dávce může mít vliv na hemostázu, což může ovlivnit i funkci trombocytů. Bisoprolol je β -blokátor, který má vliv na srdeční rytmus a krevní tlak. I když není přímým antitrombotikem, může mít nepřímý vliv na funkci trombocytů prostřednictvím regulace krevního tlaku a srdečního rytmu. Mezi nejzávažnější léčiva obsažená ve farmakoprofilu pacientů můžeme zařadit Fraxiparin a Trombex, jelikož obě léčiva patří do skupiny protisrážlivých léčiv a přímo ovlivňují funkci trombocytů.

Data o léčivech byla nastudována z jednotlivých SPC (Souhrn charakteristik produktu) dostupných na webu Státního ústavu pro kontrolu léčiv – SÚKL <https://www.sukl.cz/> (19.04.2024).

Mezi nejrizikovější retrospektivně sledované pacienty můžeme zařadit pacienty XY1, XY3, XY4 a XY9. Všichni uvedení pacienti mají ve svém farmakoprofilu minimálně dvě léčiva ovlivňující funkci trombocytů. Jejich přítomnost může u pacientů léčících se Chronickou lymfocytární leukémií způsobit horší trombocytopenie. Pacienti XX3, XX5, XY7, XX8 a XX9 neužívají žádná léčiva ovlivňující funkci trombocytů, a i přes to nemají tito pacienti optimální výsledky agregace.

Tab. 4: Seznam léčiv pacientů léčících se s CLL ve FN Olomouc v letech 2012 – 2023

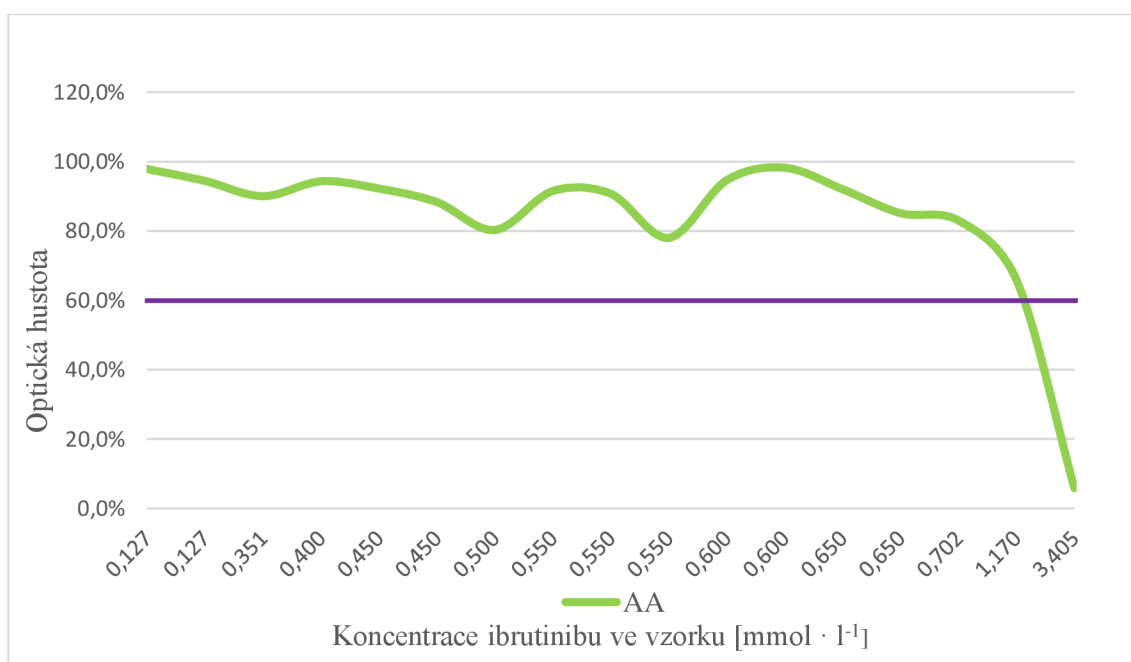
Označení pacienta	Léčiva				
XY 1	Alopurinol	Roxilip	Novorapid	Lantus	Imbruvica
XY 2	Milurit Xarelto Imbruvica	Detralex Tonarssa	Furon Apo-Omet	Anopyrin Trombex	Atoris Concor
XY 3	Imatinib	Vigantol	Alopurinol	Fraxiparin	
XX 1	Ramipril	Alopurinol	Imbruvica		
XY 4	Levetiracetam Sortis	Trombex Geratam	Herpesin Cosyrel	Nolpaza Imbruvica	Ezetrol Cotrimoxazol
XX 2	Imbruvica Toujeo	Betaloc Ventolin	Omeprazol Fiasp	Desloratadin Alopurinol	Glucophage
XY 5	Tamsulosin	Alopurinol	Calquence	Solifenacin	
XY 6	Godasal	Alopurinol	Calquence		
XX 3	Milurit Imbruvica	Metformin Zinnat	Amlozek Taflotan	Lokren Diaprel	Januvia
XX 4	Imbruvica Helicid	Trombex Apo-amlo	Mertenil Nebilet	Medrol Metformin	Milurit Elicea
XX 5	Imbruvica				
XX 6	Euthyrox Kalnormin Imbruvica	Zovirax Seretid	Cavinton Alpha D3	Rivocor Magnesii	Zodac Prestarium NEO
XY 7	Anopyrin Zovirax	Milgamma N Maxitrol	Rosucard OcuFlash	Helicid Gordius	Hylocomod Zeffix
XX 7	Tulip Letrox	Metformin Zanibrutinib	Folinar Ascorutin	Zovirax	Alopurinol
XX 8	Zovirax	Calquence			
XY 8	Bisoprolol Inzulin	Tarmisol Imbruvica	Siofor	Milurit	Janumet
XX 9	Tezefort Imbruvica	Detralex Indap	Milurit	Controloc	Concor
XY 9	Stacyl Calquence	Rosucard Alopurinol	Betaloc	Triplixam	Tamsulosin
XY 10	Imbruvica				

4.2 Optická transmisní agregometrie

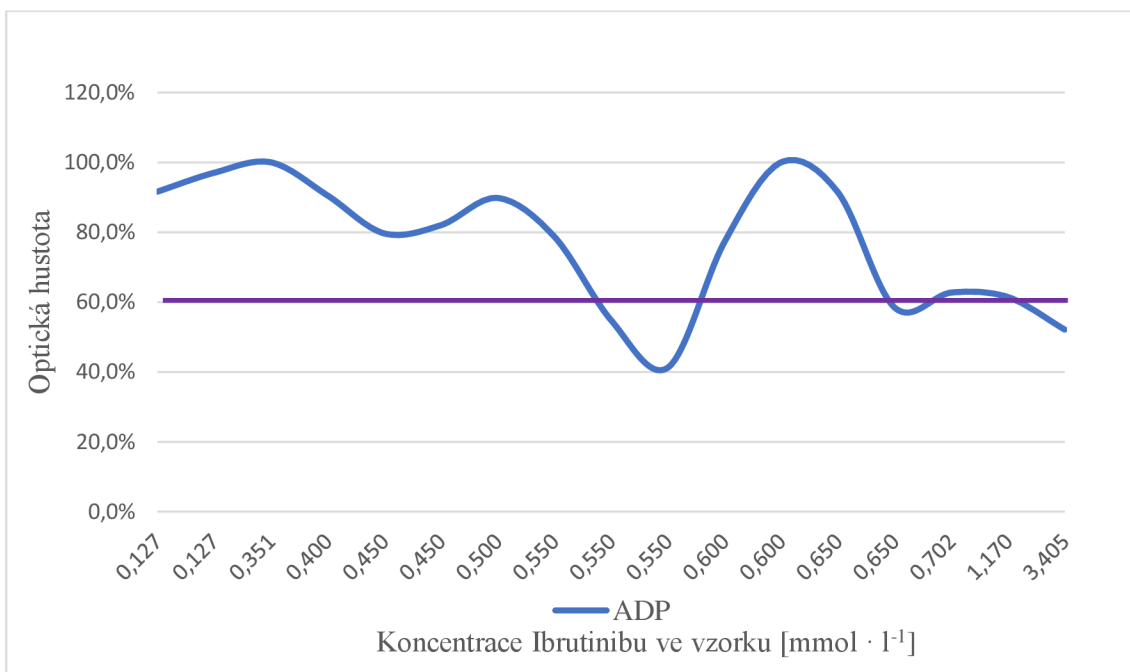
V rámci metody byly změřeny vzorky Ibrutinibu (Obr. 8 – 11) a Acalibrutinibu (Obr. 12 – 15) s různou koncentrací pro zjištění dávky negativně ovlivňující funkci trombocytů. Nejprve byly u obou léčiv změřeny koncentrace běžné dávky léčiva (280 mg u Ibrutinibu a 200 mg u Acalibrutinibu) a následně se koncentrace zvyšovaly, dokud nedošlo k prokazatelné trombocytopenii. Měření probíhalo s 4 reagensy, a to AA (arachidonová kyselina), ADP, RISTO (ristocetin) a EPI (epinefrin). Pro lepší přehlednost výsledků bylo měření s každou reagensí uvedeno zvlášť ve svém grafu. Porucha funkce byla určena při výsledku LTA pod 60 %, což je znázorněno fialovou přímkou v grafech 8 až 15.

Měření koncentrace Ibrutinibu pomocí metody LTA, které způsobuje poruchu trombocytů ukázalo, že nejcitlivější reagensí je epinefrin. Při stejné koncentraci, kdy reakce s epinefrin ukazovala pod hodnotu 60 % ostatní reagensie vykazovaly výsledek ve fyziologickém rozmezí.

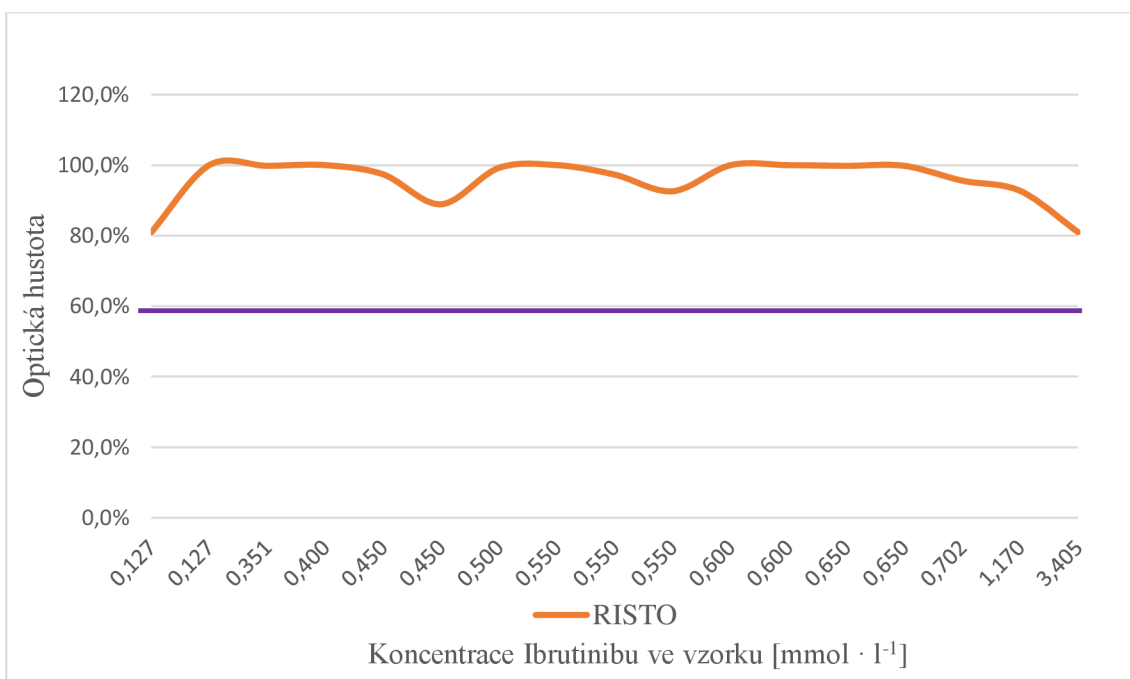
Mezní koncentrace Ibrutinibu byla určena metodou LTA v rozmezí 0,45 – 0,55 mmol · l⁻¹. Tato koncentrace je přibližně 3,5krát vyšší než běžná dávka užívaná pacientem. Je tedy nepravděpodobné, že by pacientům způsoboval vážnou poruchu funkce trombocytů lék samotný.



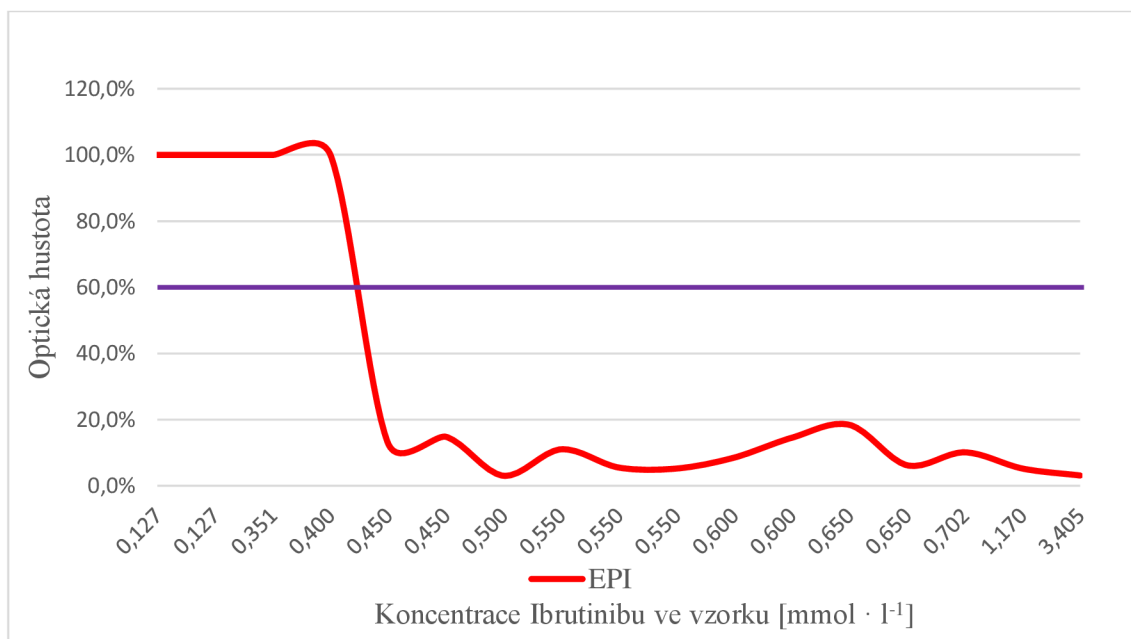
Obr. 8: Absorbance vzorků s různou koncentrací Ibrutinibu v reakci s kyselinou arachidonovou



Obr. 9: Absorbance vzorků s různou koncentrací Ibrutinibu v reakci s ADP



Obr. 10: Absorbance vzorků s různou koncentrací Ibrutinibu v reakci s ristocetinem



Obr. 11: Absorbance vzorků s různou koncentrací Ibrutinibu v reakci s epinefrinem

Výsledky LTA u Ibrutinibu jsou srovnatelné s výzkumem (Ninomoto et al., 2020), kde ve skupině zdravých pacientů došlo k lehkému snížení agregace u kyseliny arachidonové a u ADP, ale nedošlo k žádné změně agregace u induktoru ristocetin, což odpovídá i výsledkům této práce. S reagentii epinefrin pracovala studie (Sokol et al., 2016), kdy byla měřena agregace na pacientech pravidelně užívajících Ibrutinib. Reagencie Epinefrin potvrdila pokles agregace, ale neukázal se jako nejcitlivější reagent, jakož tomu je v této práci. Je zřejmé, že Ibrutinib působí na signalizační dráhu trombocytů. Aktivovaná BTK v trombocytech za běžných podmínek aktivuje fosfolipázu C (PLC), což spouští její agregační funkci. Inhibicí BTK v trombocytech se zastavuje i aktivace PLC, která je nutným počátkem agregační kaskády. Trombocyty mají mimo BTK i jiné dráhy aktivace PLC, například receptory spřažené s G proteinem (GPCR), které dokáží nahradit funkci BTK. Možný pokles v křivkách agregace může být odůvodněn nedostatečnou aktivací PLC pouze pomocí GPCR.

Dále bylo pro metodu LTA stanovena opakovatelnost měření pro zlomovou koncentraci $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Ibrutinibu. Do opakovatelnosti měření byl zahrnut průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient (Tab. 5). Podle toho měření byly analogicky provedeny měření i pro další koncentrace.

Tab. 5: Opakovatelnost měření metody LTA pro Ibrutinib s příkladem koncentrace $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

	Počet měření	AA* [%]	ADP† [%]	RISTO‡ [%]	EPI§ [%]
Koncentrace $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	1	80,3	79,8	99,2	13,2
	2	80	66,1	94,3	15,7
	3	75,37	67	92,2	13,62
	4	85,9	83,17	100	19,11
	5	91,5	78,7	100	16
Průměr		82,61	74,95	97,14	15,53
Směrodatná odchylka		5,56	7,02	3,26	2,10
Variační koeficient [%]		6,73	9,37	3,35	13,55

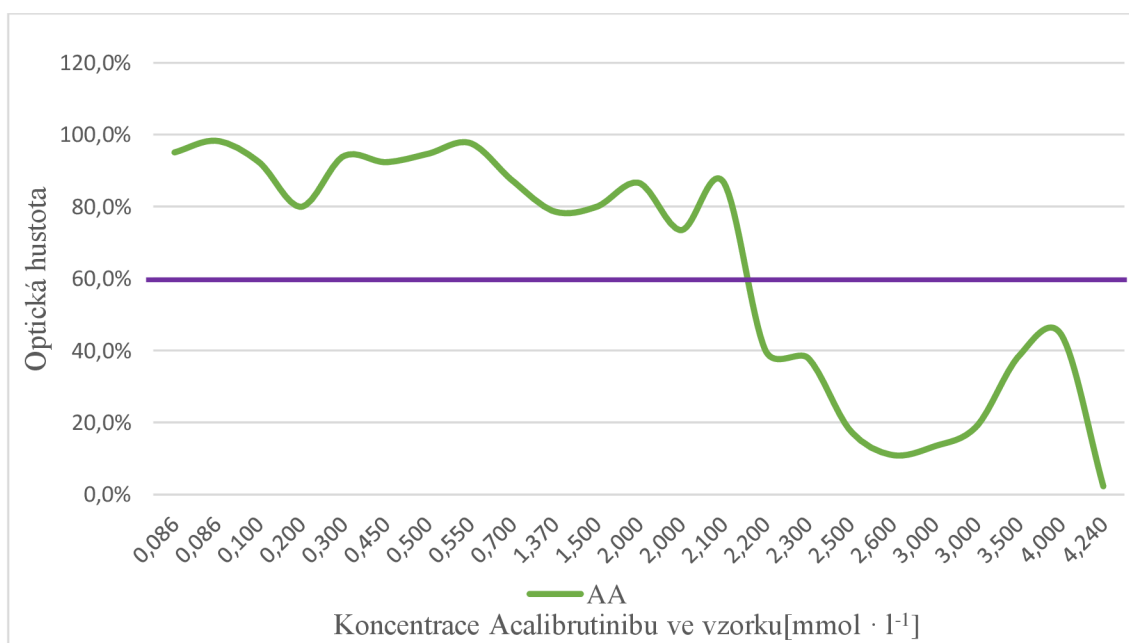
*AA – reagencie kyselina arachidonová

†ADP – reagencie ADP

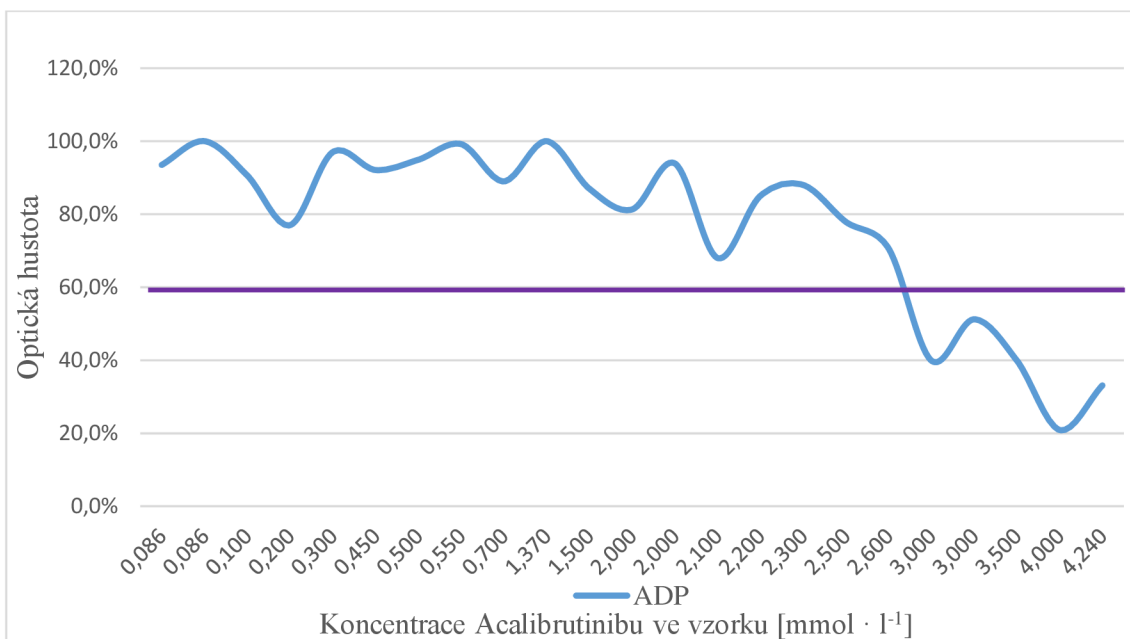
‡RISTO – reagencie ristocetin

§EPI – reagencie epinefrin

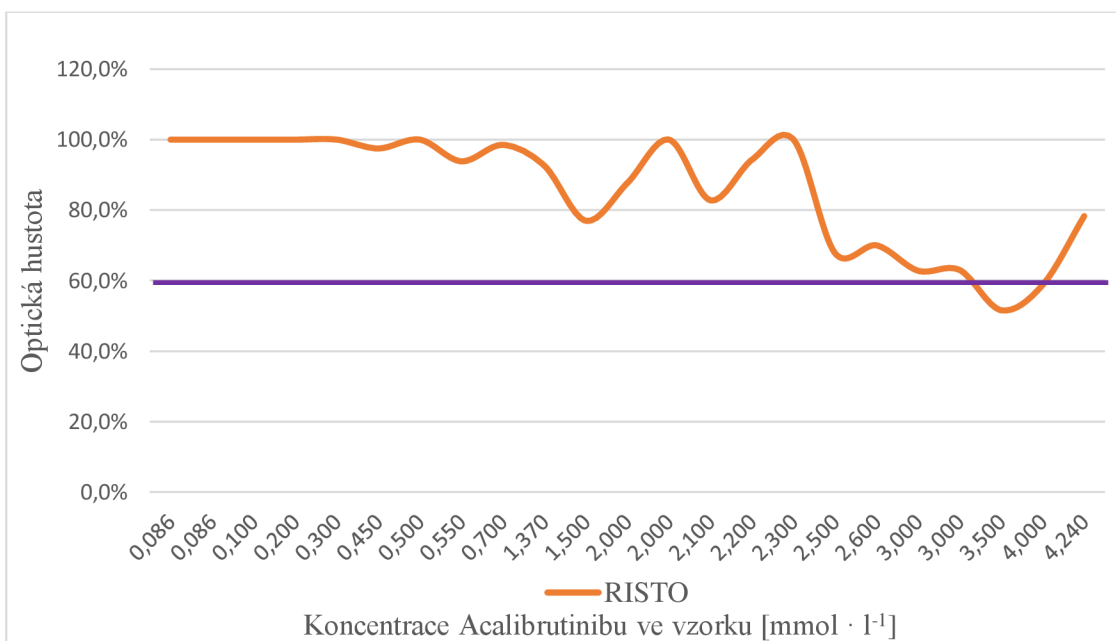
Při měření koncentrace Acalibrutinibu metodou LTA byly výsledky reagií variabilnější. U Ibrutinibu nejcitlivější epinefrin se ukázal jako méně citlivý reaktivátor v reakci s Acalibrutinibem a nejcitlivější reagií byla kyselina arachidonová, naopak nejméně citlivý reagent byl opět ristocetin. Mezní koncentrace způsobující poruchu trombocytů byla stanovena v rozmezí $2,2 - 2,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tato koncentrace odpovídá zhruba 27násobku běžně užívané dávky.



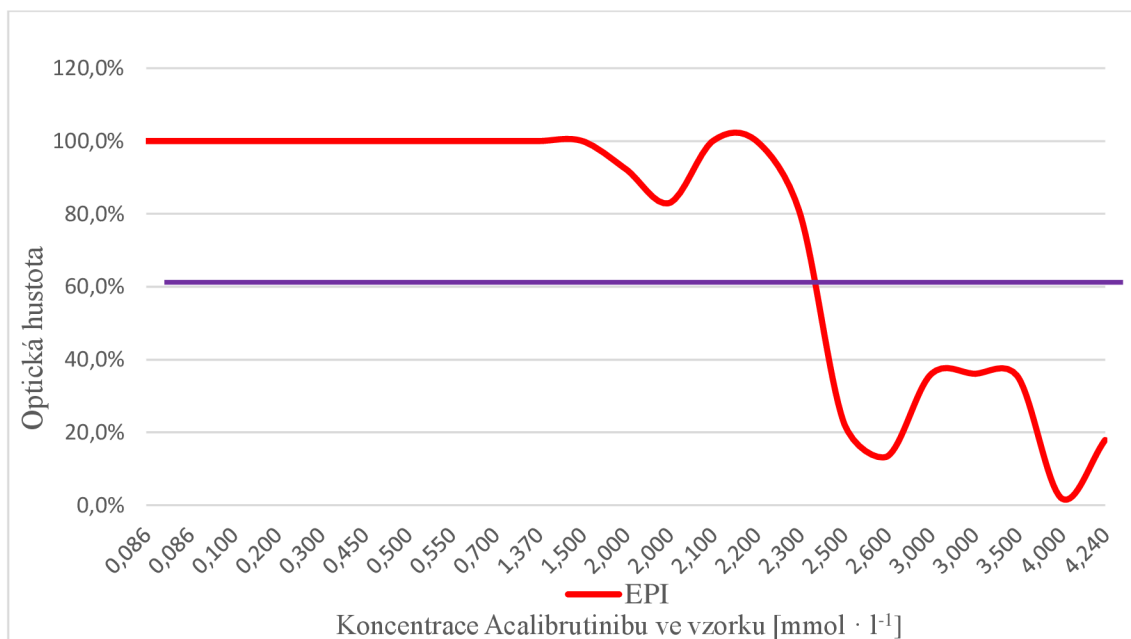
Obr. 12: Absorbance vzorků s různou koncentrací Acalibrutinibu v reakci s kyselinou arachidonovou



Obr. 13: Absorbance vzorků s různou koncentrací Acalibrutinibu v reakci s ADP



Obr. 14: Absorbance vzorků s různou koncentrací Acalibrutinibu v reakci s ristocetinem



Obr. 15: Absorbance vzorků s různou koncentrací Acalabrutinibu v reakci s epinefrinem

Acalabrutinib je blokátor BTK 2. generace, který se stejně jako Ibrutinib ireverzibilně váže na Bruton tyrosinovou kinasu, přesněji na cysteinové reziduum Cys 481 a je vysoce vázán na plazmatické proteiny. Acalabrutinib má podobný, na dávce závislý účinek na agregaci krevních destiček jako Ibrutinib. Je potřeba 27násobek denní dávky léčiva, aby se projevila porucha agregace trombocytů, což potvrzuje nižší vliv 2. generace inhibitoru na Bruton tyrosinovou kinasu v trombocytech, kdy u Ibrutinibu stačí pouze 3,5násobek.

Dále bylo pro metodu LTA stanovena opakovatelnost měření pro zlomovou koncentraci 0,5 mmol · l⁻¹ Acalabrutinibu. Do opakovatelnosti měření byl zahrnut průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient (Tab. 6). Podle toho měření byly analogicky provedeny měření i pro další koncentrace.

Tab. 6: Opakovatelnost měření metody LTA pro Acalibrutinib s příkladem koncentrace 2,5 mmol·l⁻¹

	Počet měření	AA * [%]	ADP† [%]	RISTO‡ [%]	EPI§ [%]
Koncentrace 2,5 mmol·l ⁻¹	1	56,20	58,20	96,20	21,20
	2	50,00	52,10	89,10	17,90
	3	56,40	50,00	83,50	16,60
	4	53,00	47,70	81,10	15,50
	5	43,90	60,80	80,80	18,10
Průměr		51,90	53,76	86,14	17,86
Směrodatná odchylka		4,64	4,96	5,85	1,92
Variační koeficient [%]		8,94	9,22	6,79	10,73

*AA – reagencie kyselina arachidonová

†ADP – reagencie ADP

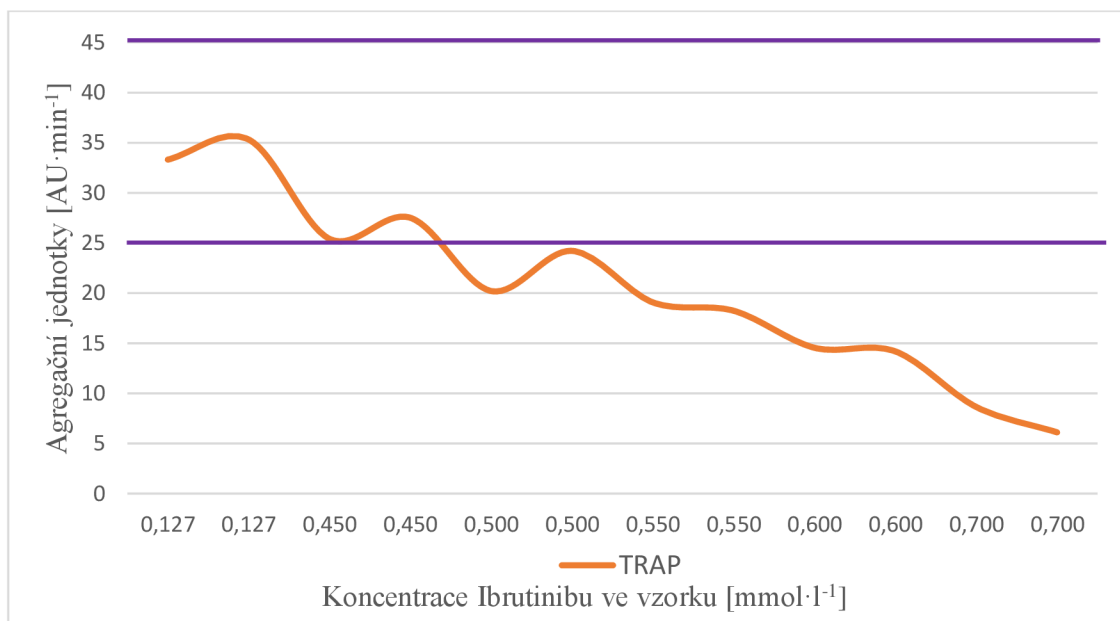
‡RISTO – reagencie ristocetin

§EPI – reagencie epinefrin

4.3. Impedanční agregometrie

Tato metoda byla využita pro opětovné zjištění koncentrace BTKi léčiv Ibrutinibu a Acalibrutinibu, které způsobují poruchu agregace trombocytů. Před vlastním měřením touto metodou byly vyhodnoceny grafy metody LTA a impedanční agregometrií byly upřesněny koncentrace BTKi léčiv způsobující trombocytopatie. Pro ověření funkčnosti metody byly nejprve změřeny koncentrace léčiv odpovídající běžné denní dávce a dále se měřilo okolo cut off hodnoty LTA, jak u Ibrutinibu, tak Acalibrutinibu.

Fyziologické rozpětí impedanční agregometrie pro Ibrutinib bylo stanoveno v rozmezí 25 – 45 AU·min⁻¹ znázorněno fialovými přímkami v grafu 16 a 17. Při měření agregace koncentrace standardní denní dávky Ibrutinibu bylo zjištěno, že tato hranice je dodržena (Obr. 16). Postupně byly provedeny měření agregace pro různé koncentrace Ibrutinibu, které vykazovaly trombocytopatii. Toto spektrum koncentrací bylo stanoveno pomocí optické transmisní agregace v rozmezí 0,45–0,55 mmol·l⁻¹. Po podrobném vyhodnocení těchto koncentrací bylo rozpětí upřesněno na hodnotu 0,5 mmol·l⁻¹, kdy tato koncentrace již leží pod fyziologickou hranicí impedanční agregometrie. Nadále byly sledovány vyšší koncentrace pro potvrzení trendu klesajících hodnot agregace s jejím postupným zvyšováním.



Obr. 16 Výsledek impedanční agregometrie pro vzorky s různou koncentrací Ibrutinibu

Ovlivnění agregace Ibrutinibem bylo potvrzeno i v práci (Series et al., 2019), kde taktéž pracovali s metodou impedanční agregometrie a potvrdili pokles agregace u vzorků ovlivněných Ibrutinibem.

Na závěr měření metody MEA pro Ibrutinib byla změřena opakovatelnost měření pro zlomovou koncentraci 0,5 mmol·l⁻¹ (Tab. 7). Podle toho měření byly analogicky provedeny měření i pro další koncentrace.

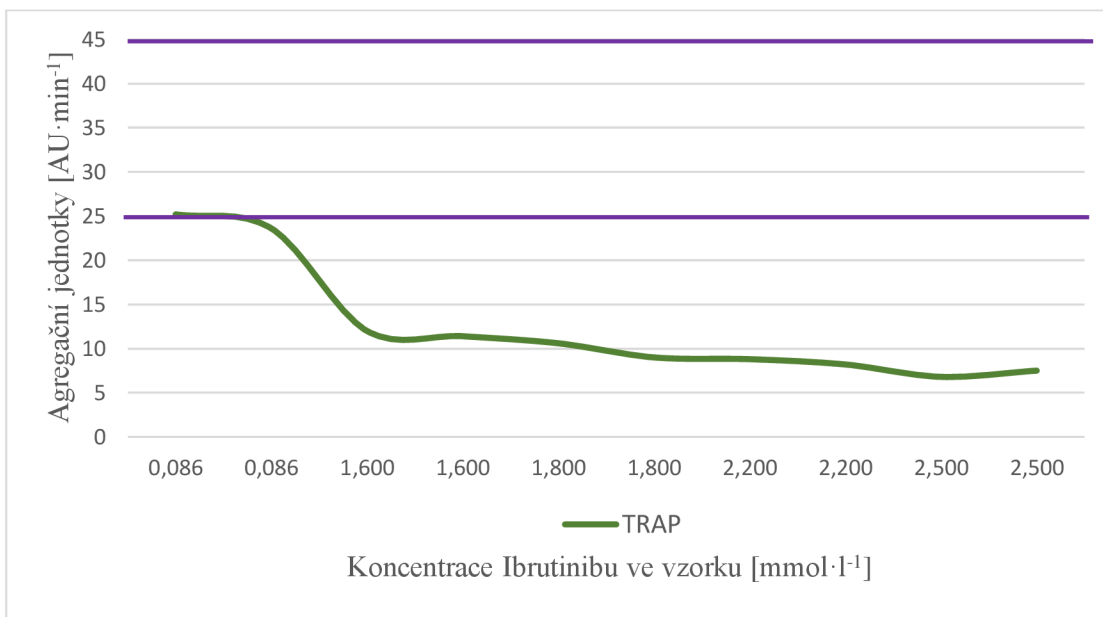
Tab. 7: Měření opakovatelnosti metody MEA pro Ibrutinib při koncentraci 0,5 mmol·l⁻¹

	Počet měření	TRAP* [AU·min ⁻¹]
Koncentrace 0,5 mmol·l ⁻¹	1	20,2
	2	24,2
	3	23,6
	4	20,1
	5	25,6
Průměr		22,74
Směrodatná odchylka		2,21
Variační koeficient [%]		9,73

*TRAP – reagencie pro TRAPtest (test peptidů aktivující trombinový receptor)

Metodou impedanční agregometrie byla taktéž změřena agregace trombocytů v přítomnosti Acalibrutinibu (Obr.17). Zde bylo rozmezí určeno stejně jako u Ibrutinibu, a to 25 - 45 AU·min⁻¹. Běžná denní dávka Acalibrutinibu, tedy koncentrace 0,086 mmol·l⁻¹ sotva dosáhla na spodní hranici fyziologického rozmezí. Podle výsledků metody LTA byla následně měřena přechodová hodnota 2,2 – 2,5 mmol·l⁻¹, bohužel výsledky impedanční agregometrie byly velmi nízké. Při snižování měřené koncentrace byly výsledky agregace stále nízké a za přechodovou hodnotu byla ponechána u této metody koncentrace 0,086 mmol·l⁻¹.

Metoda impedanční agregometrie pro výzkum vlivu koncentrace BTKi léčiv je velmi neprozkoumaná, a tudíž výsledky Acalibrutinibu nebyly zatím příliš publikovány. Studie zabývající se vlivem CLL léčiv (Series et al., 2019), kde impedanční agregometrie byla monitorována v přítomnosti Acalibrutinibu a trombopatie nebyla zachycena. Výsledky této metody jsou velmi překvapivé i z pohledu, že Acalibrutinib je léčivem 2. generace BTKi a nejsou u něho zaznamenány, tak velké problémy s trombocytopenií jako u Ibrutinibu.



Obr. 17: Výsledek impedanční agregometrie pro vzorky s různou koncentrací Acalibrutinibu

Na závěr měření metody MEA pro Acalibrutinib byla změřena opakovatelnost měření pro zlomovou koncentraci $0,086 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tab. 8). Podle toho měření byly analogicky provedeny měření i pro další koncentrace.

Tab. 8: Měření opakovatelnosti metody MEA pro Ibrutinib při koncentraci $0,086 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

	Počet měření	TRAP* [$\text{AU}\cdot\text{min}^{-1}$]
Koncentrace $0,086 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	1	25,21
	2	27,00
	3	23,60
	4	26,10
	5	25,63
Průměr		25,51
Směrodatná odchylka		1,12
Variační koeficient [%]		4,41

*TRAP – reagencie pro TRAPtest (test peptidů aktivující trombinový receptor)

5 ZÁVĚR

Inhibitory Bruton tyrosinové kinasy zlepšily dosavadní terapii Chronické lymfocytární leukémie. Tato léčiva mají vedlejší účinky jako fibrilaci síni a trombocytopenie. Na základě provedených měření v experimentální části byly zjištěny koncentrace těchto léčiv, které silně ovlivňují funkci trombocytů.

Experimentální část této práce analyzovala vliv různých koncentrací Ibrutinibu a Acalibrutinibu na funkci trombocytů *in vitro* pomocí optické transmisní agregometrie a imedanční agregometrie. Výsledky ukazují, že ve vzorcích zdravých pacientů s přítomností trombocytů $> 100 \cdot 10^9 \cdot l^{-1}$, koncentrace obou léčiv přesahují běžnou denní dávku a samy o sobě by neměly způsobovat velké krvácivé potíže. Nejcitlivější reagent pro metodu LTA byl epinefrin, který díky svému mechanismu vykazoval nejcitlivější výsledky. Za obdobně působící reagenty můžeme považovat i kyselinu arachidonovou, která má podobný mechanismus účinku. Jako nejméně ovlivnitelný reagent BTKi lze považovat ristocetin, který ani u jednoho léčiva nevykazoval patologické výsledky. Reagent ADP taktéž nevykazoval náležitou citlivost jako epinefrin nebo kyselina arachidonová. Metodou LTA bylo u obou léčiv stanoveno širší rozmezí koncentrace způsobující krvácivé problémy. Následně bylo toto širší rozmezí změřeno metodou MEA, za účelem jeho zúžení. Tohoto cíle bylo dosaženo pouze u léčiva Ibrutinib. U Acalibrutinibu nebyla nalezena signifikantní závislost LTA a MEA. Rozdílné výsledky bude zapotřebí podrobit dalším analýzám, možná dojde i k úpravě referenčního rozmezí pro stanovení MEA po indukci TRAP. Tato nová metodika přinesla nové poznatky pro terapii CLL pacientů s BTK inhibitory.

V experimentální části byla provedena i retrospektivní rešerše pacientů s CLL léčících se v FN Olomouc od roku 2012 do roku 2024. Většina pacientů užívá v rámci terapie CLL právě Ibrutinib a Acalibrutinib a mají problémy s agregací. Tito pacienti mají bohužel polykomorbidní profil, kterému náleží obsáhlý farmaceutický profil. Komorbidity vyžadují u pacientů mnohdy antikoagulační léčbu, která v kombinaci s BTKi léčivou může způsobit vážné trombocytopenie.

6 LITERATURA

Bernard, V. (2011). *Průtoková cytometrie flow-cytometrie*. https://www.med.muni.cz/biofyz/files/gerontologie/prutokova_cytometrie_prezentace.pdf

Brejcha, M., Doubek, M., Écsiiová, D., Lysák, D., Fečková Mihályová, J., Panovská, A., Papajík, T., Pelouchová, J., Prehliková, A., Rozsivalová, P., Šimkovič, M., Špaček, M., Urbanová, R., & Zuchnická, J. (2023). *Chronická lymfocytární leukemie: informace pro pacienty a jejich blízké*. Česká skupina pro chronickou lymfocytární leukemii. https://cll.cz/sites/default/files/2020-03/CLL_Strucny_pruvodce_pro_kazdodenni_praxi.pdf

Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., & Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, *117*(19), 5019-5032. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-293050>

Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., & Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, *343*(26), 1910-1916. <https://doi.org/10.1056/NEJM200012283432602>

Fečková Mihályová, J., Ďuraš, J., Zuchnická, J., Kaščák, M., & Hájek, R. (2016). Ibrutinib v hematonekologii. *Klinická farmakologie a farmacie*, *30*(3), 8-14. <https://doi.org/10.36290/far.2016.022>

Fiore, M., Giraudet, J. -S., Alessi, M. -C., Falaise, C., Desprez, D., d'Oiron, R., Voisin, S., Hurtaud, M. -F., Boutroux, H., Saultier, P., Lavenu-Bombled, C., Bagou, G., Dubucs, X., Chauvin, A., Leroy, C., Meckert, F., Kerbaul, F., Giraud, N., Pühler, A., et al. (2023). Emergency management of patients with Glanzmann thrombasthenia: consensus recommendations from the French reference center for inherited platelet disorders. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s13023-023-02787-2>

Gumprechtovy stíny. (2000). Velký lékařský slovník. Retrieved November 5, 2023, from <https://lekarske.slovníky.cz/lexikon-pojem/gumprechtovy-stiny-5>

Hall, Willet, Feichtmeir, & Dowling. (1956). Current trends in cancer chemotherapy. *California Medicine*, *1956*(1), 9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13276822/>

Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M. J., Montserrat, E., Rai, K. R., & Kipps, T. J. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, *111*(12), 5446-5456. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-093906>

- HYPHEN BioMed. (2021). *ADP pro testy agregace krevních destiček*. https://www.hyphen-biomed.com/uploads/distributors/IFU/02-23_Czech/AGxxxx/23_001K_ADP_v3_2021-08.pdf
- HYPHEN BioMed. (2021). *Epinefrin pro testy agregace krevních destiček*. https://www.hyphen-biomed.com/uploads/distributors/IFU/02-23_Czech/AGxxxx/23_002K_Epi_v3_2021-08.pdf
- HYPHEN BioMed. (2021). *Kyselina arachidonová pro testy agregace krevních destiček*. https://www.hyphen-biomed.com/uploads/distributors/IFU/02-23_Czech/AGxxxx/23_003K_AcAra_v5_2021-08.pdf
- HYPHEN BioMed. (2021). *Ristocetin pro testy agregace krevních destiček*. https://www.hyphen-biomed.com/uploads/distributors/IFU/02-23_Czech/AGxxxx/23_004K-Ristocetin_v6_2021-10.pdf
- Chiorazzi, N., Chen, S. -S., & Rai, K. R. (2021). Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 11(2), 35. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035220>
- Kadlečíková, K. (2017). *Vliv počtu trombocytů na vyšetření indukované agregace trombocytů* [Bakalářská, Masarykova univerzita]. https://is.muni.cz/th/b8xa4/Bakalarska_prace.pdf
- Kapitáňová, Z., Henzlová, L., Buriánková, E., Obr, A., Mysliveček, M., & Papajík, T. (2014). Přínos časného PET/CT vyšetření pro prognostickou stratifikaci a léčbu nemocných s difúzním B-velkobuněčným lymfomem. *Onkologie*, 2014(8), 5. <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2014/03/04.pdf>
- Kaseb, H., & Babiker, H. M. (2023). *Hodgkin Lymphoma*. StatPearls Publishing.
- Keating, M. J., Flinn, I., Jain, V., Binet, J. -L., Hillmen, P., Byrd, J., Albitar, M., Brettman, L., Santabarbara, P., Wacker, B., & Rai, K. R. (2002). Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood*, 99(10), 3554-3561. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3554>
- Koltai, K., Kesmarky, G., Feher, G., Tibold, A., & Toth, K. (2017). Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081803>
- Kořen, J., & Trněný, M. (2015). Hodgkin's Lymphoma – the Treatment Approaches Development and Current Trends. *Klinická onkologie*, 28(Suppl 3), 3S87-3S94. <https://doi.org/10.14735/amko20153S87>
- Leukemia Foundation. (2019, July 18). *Richter's Syndrome*. Leukaemia.org. Retrieved December 10, 2023, from <https://www.leukaemia.org.au/blood-cancer/leukaemia/chronic-lymphocytic-leukaemia/richters-syndrome/>
- Ninomoto, J., Mokatri, A., Kinoshita, T., Marimpietri, C., Barrett, T. D., Chang, B. Y., Sukbuntherng, J., James, D. F., & Crowther, M. (2020). Effects of ibrutinib on in vitro

platelet aggregation in blood samples from healthy donors and donors with platelet dysfunction. *Hematology*, 25(1), 112-117. <https://doi.org/10.1080/16078454.2020.1730080>

Panovská, A., & Doubek, M. (2013). Chronická lymfocytární leukemie – diagnostika a léčba. In *Onkologie* (p. 4). Solen.

Panovská, Arpáš, Šimkovič, Špaček, Papajík, Lysák, Bezděková, & Doubek. (2023). Prevence a léčba kardiovaskulárních a krvácivých komplikací u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií léčených inhibitory Brutonovy kinázy. *Transfúze a hematologie dnes*, 29(3), 6. <https://doi.org/10.48095/cctahd2023prolekare.cz12>

Papajík, T., Urbánková, H., & Kreigová, E. (2021). Význam prognostických a prediktivních bio markerů u chronické lymfocytární leukémie. *Transfúze a hematologie dnes*, 27(Supplementum 1), 3. <https://www.prolekare.cz/casopisy/transfúze-hematologie-dnes/archiv-cisel/2023-supplementum-1-1>

Penka, M., & Buliková, A. (2009). *Neonkologická hematologie* (2., dopl. a zcela přeprac. vyd). Grada.

Penka, M., & Slavičková, E. (2011). *Hematologie a transfúzní lékařství*. Grada.

Roche. (2022). *TRAPtest agregace krevních destiček*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/<https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/api/downloads/5f12732c-259e-ec11-1191-005056a71a5d?countryIsoCode=cz>

Sant, M., Allemani, C., Tereanu, C., De Angelis, R., Capocaccia, R., Visser, O., Marcos-Gragera, R., Maynadié, M., Simonetti, A., Lutz, J. -M., & Berrino, F. (2010). Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*, 116(19), 3724-3734. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-282632>

Series, J., Garcia, C., Levade, M., Viaud, J., Sié, P., Ysebaert, L., & Payrastre, B. (2019). Differences and similarities in the effects of ibrutinib and acalabrutinib on platelet functions. *Haematologica*, 104(11), 2292-2299. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.207183>

Shatzel, J. J., Olson, S. R., Tao, D. L., McCarty, O. J. T., Danilov, A. V., & DeLoughery, T. G. (2017). Ibrutinib-associated bleeding: pathogenesis, management and risk reduction strategies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 15(5), 835-847. <https://doi.org/10.1111/jth.13651>

Smolej, L., Špaček, M., Pospíšilová, Š., Jarošová, M., Papajík, T., Urbanová, R., Šimkovič, M., Lysák, D., Brejcha, M., & Doubek, M. (2021). Doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukemie. In *Transfúze a hematologie dnes* (Vol. 27, pp. 91-106). <https://doi.org/10.48095/cctahd202191>

Smolej, L., Špaček, M., Pospíšilová, Š., Jarošová, M., Papajík, T., Urbanová, R., Šimkovič, M., Lysák, D., Brejcha, M., & Doubek, M. (2021). Recommendations for chronic lymphocytic leukaemia diagnosis and therapy 2021. In *Transfúze a hematologie dnes* (Vol. 27, pp. 91-106). <https://doi.org/10.48095/cctahd202191>

Sokol, J., Chudej, J., Hrnčar, M., Skornova, I., Ferodova, J., Kubisz, P., & Stasko, J. (2016). Effect of ibrutinib on platelet aggregation. In *Transfúze a hematologie dnes* (2016 ed., p. 4). Solen.

Thompson, P. A., & Siddiqi, T. (2022). Treatment of Richter's syndrome. *Hematology*, 2022(1), 329-336. <https://doi.org/10.1182/hematology.2022000345>

Úlehlová, J. (2018). *Monitorování účinku antiagregační terapie* [Disertační, Univerzita Palackého]. https://theses.cz/id/3nfzqx/?lang=en;zoomy_is=1

Urbanová, R. (2021). *CLL 2021 Urbanová*.

Wu, J., Zhang, M., & Liu, D. (2016). Acalabrutinib (ACP-196): a selective second-generation BTK inhibitor, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0250-9>

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABVD	chemoterapeutická léčba používaná k léčbě Hodgkinova lymfomu
AA	arachidonová kyselina
ADP	adenosindifosfát
AKT	protein kinasa B (PKB) - protein kinasa, hrající roli v buněčné proliferaci a přežívání buněk
BFSF-R	bazofilní faktor růstu signalizující receptor
BCR	povrchový proteinový receptor na B-lymfocytech
BEACOPP	chemoterapeutická léčba používaná k léčbě Hodgkinova lymfomu
BTK	brutonova tyrosinová kinasa
CD	cluster of Differentiation - označení pro specifické povrchové proteiny na buňkách
CDKN2A	cyklin-dependentní kinasa inhibitor 2A - gen supresor nádorů
CCL3 a CCL4	chemokin ligand 3 a 4 - chemokiny, regulující imunitní odpověď
CLL	chronická lymfocytární leukémie
COX	cyklooxygenáza
CSK	C-src tyrosine kinasa, regulující aktivitu SRC protein kinas
CYP3A4	cytochrom P450 3A4
CXCR4	chemokinový receptor 4
Cys 481	cysteinová aminokyselina na pozici 481 v sekvenci proteinu
DAG	diacylglycerol
Delece 17p	ztráta oblasti chromozomu 17p
DLBCL	difuzní velkobuněčný B-lymfom
EGFR	epidermální růstový faktorový receptor
EPI	epinefrin
FISH	fluorescence in situ hybridizace
FN	fakultní nemocnice
GP VI	glykoprotein VI
IKB	inhibitor kappa B
IgVH	variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu
IP3	inositol-trifosfát
ITK	Tyrosinová kinasa Itk – skupina kinas důležitých pro signální dráhy lymfocytů

iwCLL	interaktivní pracovní skupina pro chronickou lymfocytární leukémii
LTA	optická transmisní agregometrie
MEA	impedanční agregometrie
MAP kinasa	mitogen-aktivovaná proteinová kinasa
M-CLL	malobuněčný lymfocytární lymfom
MYC	onkogenický protein regulující buněčný růst a přežití
NLP-HL	Hodgkinův lymfom s převahou nodulárních lymfocytů
NFkB	nukleární faktor kappa B - transkripční faktor
NOTCH1	transmembránový receptor
PAR1	receptor 1 aktivovaný proteasami
PAR4	receptor 4 aktivovaný proteasami
PET/CT	pozitronová emisní tomografie/spořádaná tomografie
PIP2	fosfatidylinositol bisfosfát
PPP	plazma chudá na krevní destičky
PRP	plazma bohatá na krevní destičky
RIPA	testy agregace krevních destiček vyvolaných ristocetinem
RS	Richterův syndrom
SLL	malobuněčný lymfocytární lymfom
SUV	standardized Uptake Value - kvantitativní měření koncentrace
SUVmax	maximal standardized uptake value - nejvyšší naměřená hodnota SUV v oblasti zájmu
TEC	Tyrosinová kinasa Tec – skupina kinas důležitých pro signální dráhy lymfocytů
TP53	Tumor protein 53 (p53) - gen pro supresor nádorů
TRAP-6	Thrombin receptor activating peptide 6
TXA2	tromboxan A2
vWF	von Willebrandův faktor