

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
katedra buněčné biologie**

Ellen Svrčková

**REOFERETICKÉ A AFERETICKÉ
POSTUPY PRO ODSTRANĚNÍ
CHOLESTEROLU A JEJICH DOPAD NA
IMUNITNÍ SYSTÉM**

Diplomová práce

Praha 2010

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ctirad Andrýs, PhD.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a souhlasím s jejím eventuálním zveřejněním v tištěné nebo elektronické podobě.

V Praze dne 27.8.2010

.....

Ellen Svrčková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli panu Doc. Ctiradu Andryšovi, PhD. za odborné vedení, ochotu a pomoc při vedení této práce a za čas, který tomu obětoval.

Poděkování za spolupráci patří také celému kolektivu pracovníků Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice v Hradci králové.

Seznam použitých zkratk

ATS	ateroskleróza
DALI	metoda přímé adsorpce lipidů
DSA	adsorpce na dextransulfát
FCH	familiární kombinovaná hyperlipidémie
FH	familiární hypercholesterolemie
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (High – density lipoproteins)
HELP	heparinem indukovaná extrakorporální precipitace LDL-cholesterolu
hs CRP	vysoce senzitivní C – reaktivní protein
IA	imunoadsorpce
ICAM-1	imunoglobulinová adhezní molekula
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL	interleukin
INF	interferon
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (Low – density lipoproteins)
Lp (a)	lipoprotein (a)
MCP-1	monocytární chemotaktický protein – 1
sCD 40L	solubilní forma ligandu CD 40L
sP-selektin	solubilní forma P-selektinu
TNF	tumor nekrosis factor
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (Very low – density lipoproteins)

Abstrakt

LDL-aféřeza a hemoreoferéza patřĩ mezi nejužívanějšĩ extrakorporální eliminační metody umožňující snížování hladin LDL cholesterolu u familiérní hypercholesterolémie (FH). V případě selhání konzervativní terapie (farmakoterapie a režimová opatření) se pak stávají jedním z mála účinných a dostupných řešení klinického stavu s vysokou morbiditou i mortalitou. Vlastní intervence je nejčastěji sledována pomocí změn hladin složek plazmatických lipidů. V komplexním procesu aterogeneze ale nezastupitelnou roli hraje i imunitní systém se svými působky a předpokládá se, že parametry imunitního systému mohou přímo odrážet stav a progresi aterosklerózy u pacientů postižených FH. Cílem této práce bylo hodnocení hladin vybraných imunologických markerů (glykoprotein α -2-makroglobulin, IL-10, solubilní endoglin, solubilní apoptotický faktor sAPO-1/Fas a solubilní forma adhezivní molekuly P-selektinu) a jejich změny po LDL-aféřeze a hemoreoferéze pomocí enzymoimunoanalýzy a imunonefelometrie. Zkoumaný soubor pacientů (celkem 12) zahrnoval 3 léčené hemoreoferézou a 9 léčených LDL-aféřezou. V hladinách solubilního endoglinu, sAPO-1/Fas a α -2-makroglobulinu byl zaznamenán významný pokles po provedení obou procedur. Pozorované změny mohou být zdrojem informace nejenom o účinnosti intervence ale také o případném zpomalení aterogeneze.

Klíčová slova: LDL-aféřeza, hemoreoferéza, familiérní hypercholesterolémie, ateroskleróza, endoglin

Abstract

LDL-apheresis and haemorheopheresis are the most frequent methods of extracorporeal elimination methods used for lowering the LDL cholesterol in patients with familial hypercholesterolaemia (FH). In case of failure of conservative therapy (represented by pharmacotherapy and/or dietary regime) these methods represent the effective and accessible solution for the clinical status characterized by high morbidity and mortality as well. The lipid components are the most frequent observed markers for the effectiveness of intervention. However, immunity with its effector molecules plays also essential role and there is suppose, that could also reflect the state and progress of atherosclerosis in FH patients. The aim of this thesis was to evaluate the levels of selected immunological markers (plasmatic glykoprotein α -2-macroglobulin, IL-10, soluble endoglin, soluble apoptotic factor sAPO-Fas and soluble form of adhesive P-selectin) and their changes after LDL-apheresis and haemorheopheresis employing enzyme immunoanalysis and immuno nephelometry.

Totally, 12 patients were involved in this study, 3 were treated by haemorheopheresis, the rest 9 received LDL-apheresis. As a results, significant decreases in serum levels of α -2-macroglobulin, soluble endoglin and sAPO-1/Fas were recorded. Observed changes of some markers could serve as a source of information not only about efficacy the intervention but also about the deceleration of atherosclerosis.

Keywords: LDL-apheresis, haemorheopheresis, familial hypercholesterolaemia, atherosclerosis, endoglin

Obsah

Obsah.....	7
1. Úvod.....	8
2. Cíl práce.....	9
3. Literární úvod.....	10
3.1. Poruchy lipidového metabolismu.....	10
3.2. Ateroskleróza jako zánětlivý proces.....	13
3.3. Biomarkery zánětu ve vztahu k ateroskleróze.....	17
3.3.1. Plazmatické glykoproteiny (α -2-makroglobulin).....	17
3.3.2. Adhezivní molekuly (P-selektin).....	18
3.3.3. Endoglin.....	20
3.3.4. IL-10.....	22
3.3.5. Apoptotické faktory - sAPO-Fas (solubilní).....	23
3.4. Metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu.....	24
3.4.1. Aferéza.....	24
3.4.2. Imunoadsorpce LDL-cholesterolu.....	25
3.4.3. Metody založené na filtraci částic z plazmy.....	27
3.4.4. Vliv LDL-aferézy na hladiny lipidů.....	28
3.4.5. Indikace k léčbě LDL-aferézou.....	29
3.4.6. Účinky léčby LDL-aferézou.....	29
3.4.7. Vedlejší účinky léčby LDL-aferézou.....	30
4. Experimentální část.....	31
4.1. Charakteristika souboru.....	31
4.2. Materiál a metody.....	32
4.2.1. LDL – aferéza.....	32
4.2.2. Hemoreoferéza.....	33
4.2.3. Laboratorní metodika stanovení.....	34
4.4. Statistické zpracování výsledků.....	35
5.1. α -2-makroglobulin.....	36
5.2. IL-10.....	37
5.3. sAPO-1/Fas.....	37
5.4. Endoglin (sCD105).....	38
5.5. sP- selektin.....	39
6. Tabulky a grafy.....	40
6.1. Přehled naměřených hodnot.....	40
6.2. Statistické zpracování výsledků.....	40
6.3. Grafické zpracování výsledků.....	40
7. Diskuze.....	51
8. Závěr.....	55
9. Literatura.....	56

1. Úvod

Aterosklerosa (ATS) a její komplikace t.j. ischemická choroba srdeční, cévní mozkové příhody a ischemická choroba periferních tepen jsou závažným zdravotnickým problémem a vedoucími příčinami morbidity v rozvinutých zemích. Úmrtnost na kardiovaskulární choroby činí v České republice 52,4 % ¹ a incidence je podobně jako v jiných západních zemích s vysokou dostupností invazivních vyšetření relativně stabilizovaná ².

ATS se řadí k multifaktoriálním onemocněním, přičemž jedním z klíčových rizikových faktorů je hypercholesterolémie. Je známo, že právě zvýšená plazmatická hladina low-density lipoproteinů (LDL) je zodpovědná za akumulaci LDL v intimně arterií a takovéto poškození endotelu pak iniciuje proces aterogeneze. Mezi klinicky nejzávažnější příčiny zvýšených hladin LDL patří familiární hypercholesterolemie (FH) a familiární kombinovaná hyperlipidemie (FCH). Tyto autozomálně dědičné poruchy jsou charakterizovány vysokou incidencí těžkých kardiovaskulárních komplikací už v relativně nízkém věku. Ačkoliv dieta a úspěšný vývoj hypolipidemik, zvláště inhibitorů hydroxymethyl-glutaryl koenzymu A (statiny) umožňujících relativně úspěšnou terapii u většiny pacientů, stále část (méně než 5 %) heterozygotů s familiární hypercholesterolemií a všichni homozygotní pacienti zůstávají dekompenzováni. Jediným prakticky dostupným postupem léčby těchto pacientů je extrakorporální eliminace - aferéza ³⁻⁵.

V současné době je používáno podle Klingela ⁶ pět prakticky významných možností extrakorporální eliminační terapie:

1. Membránová diferenční filtrace, při použití sekundárního filtru nazývaná **rheoferéza**
2. Specifická imunoadsorpce (**LDL-aferézou**)
3. Heparinem indukovaná extrakorporální precipitace (**HELP**)
4. Dextranulfátová adsorpce (**lipoferéza**)
5. Přímá adsorpce lipoproteinů – **DALI - hemoperfúzní systém**.

Specifická imunoadsorpce (LDL-aferéza) a membránová diferenční filtrace (rheoferéza) patří mezi nejefektivnější metody, přičemž jsou obě tyto metody (LDL aferéza od roku 1996, rheoferéza od roku 2003) jsou na pracovišti hemaferézy Fakultní nemocnice Hradec Králové zavedeny. Pomocí těchto metod lze dosáhnout u pacientů s komplikacemi ateromatózy výrazné

redukce LDL-lipoproteinů, cholesterolu, lipoproteinů (a) a i některých dalších rizikových faktorů. Tyto zákroky mohou mít vliv na celou řadu fyziologických funkcí pacienta včetně změn endoteliálních funkcí, které lze monitorovat pomocí vhodných markerů⁷⁻⁹.

Problematikou porovnávání terapeutického benefitu hemoreotapie nebo LDL aferézy se zabývají mnohá zahraniční pracoviště. Zpravidla prokazují efektivitu intervence pomocí lipidových profilů pacientů, ale často studují i řadu jiných, např. reologických, hemakoagulačních faktorů či endoteliálních faktorů^{3, 9-11}. Ukazuje se však, že i imunologické parametry mohou mít zcela zásadní vliv nejenom na účinnost, ale i na bezpečnost jednotlivých procedur a studium změn vybraných imunologických parametrů je těžištěm i této diplomové práce.

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce v návaznosti na předchozí zkušenosti se specifickou imunoabsorbencí (LDL-aferézou) a rheoferézou (prováděnou kaskádovitou filtrací), nyní již za standardizovaných podmínek, bylo porovnat imunopatologické profily obou těchto přístupů.

Byly sledovány změny vybraných ukazatelů aktivace endotelu a dalších ukazatelů aterogeneze. Jednalo se sledování těchto znaků:

1. Cytokin interleukin IL-10 (IL-10)
2. Solubilní forma endoglinu (CD105)
3. Solubilní forma adhezivní molekuly P-selektinu,
4. Plazmatický glykoprotein α -2-makroglobulin
5. Solubilní forma apoptotického faktoru APO-1/Fas.

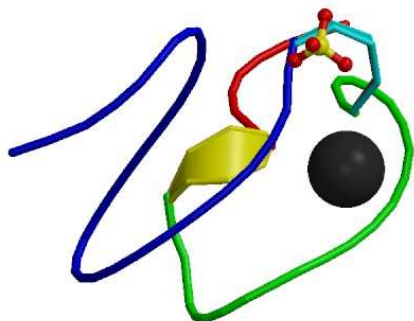
Ke stanovení hladin vyšetřovaných markerů v plazmě byly využity metody enzymoimunoanalýzy a chemiluminiscenční analýzy.

3. Literární úvod

3.1. Poruchy lipidového metabolismu

Jedním ze základních pilířů ATS je narušený metabolismu lipidů. Jednou z nejzávažnějších klinických forem vrozené dyslipoproteinémie je FH s autozomálně dominantním typem dědičnosti.

Podstatou FH je mutace genu LDLR pro LDL-receptor na LDL- receptorovém proteinu (viz obrázek 1 3D struktura LDL-receptorového proteinu ¹²), apolipoproteinu B (ApoB – vazebného partnera LDL receptoru) nebo vzácněji genů pro proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) nebo LDLRAP1 ¹³. Při absenci nebo a funkci těchto struktur receptorů nejsou LDL částice dostatečně vycytávány, ale hromadí se v krvi a jsou odstraňovány pomocí tzv. „scavenger“ receptorů makrofágů a jiných fagocytujících buněk, které formují základ aterosklerotických plátů. Chybí též inhibiční vliv internalizace LDL-receptoru po navázání LDL-částice na syntézu cholesterolu v buňkách, které tak produkují de-novo cholesterol i přes jeho zvýšenou nabídku v krvi ¹¹. Diagnóza klinického onemocnění je založena na vyšetření lipidového profilu, rodinné anamnéze, přítomnosti šlachových a kožních xantomů, klinických známek ICHS nebo aterosklerotického postižení kořene aorty, které působí její supervalvulární stenózu a přechází na koronární ústí.



Obrázek č. 1 3D struktura LDL-receptorového proteinu, zdroj PBD ¹²

Výskyt **heterozygotní formy FH** v populaci je 1:500¹³. V České republice tedy žije asi 20 000 nemocných s FH, z nichž jen malá část je dispenzarizována a adekvátně léčena. Heterozygotní jedinci mají cca 50 % normálního počtu funkčních LDL-receptorů, hladina cholesterolu je velmi variabilní a pohybuje se kolem 7 - 14 mmol/l. Nemocní mívají předčasné aterosklerotické změny cév a klinicky mohou mít šlachové xantomy xantelasmata na víčkách a arcus corneae senilis. Terapie zahrnuje dietní a režimová opatření a farmakologickou léčbu, především statiny. Pouze cca u 5 % nemocných konzervativní terapie selhává¹⁰.

Incidence **homozygotní formy FH** je 1:1.000.000. Míra zvýšení hladiny LDL-cholesterolu v plazmě odpovídá aktivitě reziduálních LDL-receptorů. Hladina cholesterolu se pohybuje v rozmezí 16-30 mmol/l. Ischemická choroba srdeční (ICHS) se u těchto jedinců vyskytuje již v dětství a často vede ke smrti do 20. roku života¹³. Hypercholesterolemie u homozygotů nereaguje na konzervativní farmakologickou léčbu a dlouhodobá pravidelná extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu je pro tyto pacienty život zachraňujícím postupem^{3, 9-11, 13}.

Familiární kombinovaná hyperlipidemie (FCH) je nejčastější geneticky podmíněnou poruchou metabolismu lipoproteinů doprovázenou zvýšenými hladinami LDL triglyceridů (>5 mmol/l) a často také sníženými hladinami HDL. Její frekvence v populaci je odhadována na 1:50 až 1:100. Pomocí (dnes již zřídka využívané) lipoproteinové elektroforézy se tento typ dyslipidémie charakterizoval jako hyperlipoproteinemie typu II B. U nemocných s infarktem myokardu dosahuje výskyt cca 10 %, v rodinách s předčasným infarktem myokardu až 30%¹⁴.

Molekulární základ FCH je neznámý, choroba má podklad v geneticky determinované zvýšené produkci apoB₁₀₀ (bývá pravidlem) a lipoproteinů o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins, VLDL). U dědičného typu je pravděpodobně klíčový polymorfismus enzymů lipoproteinového metabolismu.

V rámci metabolického nebo též syndromu X (Reavenova syndromu) se též uvažuje o tzv. **získané formě kombinované hyperlipidémie** doprovázející diabetes mellitus II. typu, hypertenzi a obezitu centrálního typu. V důsledku zvýšené tkáňové produkce volných mastných kyselin dochází ke zvýšené jaterní syntéze VLDL. Do stavu nasycení je většina VLDL přeměněna na LDL, poté dochází ke zvýšení hladin VLDL¹⁴.

Nejsou přítomny kožní ani šlachové xantomy, mohou se však vyskytnout xantelasmata očních víček. Dietní a režimová opatření zaměřená na snížení hmotnosti jsou základem léčby v kombinaci s medikamentózní léčbou fibráty, léky interagujícími s PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptors α) a statiny, které zvýšenou expresí LDL receptorů zvyšují hepatální vychytání LDL částic¹¹. Extrakorporální eliminace je nutná jen zřídka^{3,10}.

3.2. Ateroskleróza jako zánětlivý proces

Aterogeneze je komplexní proces, kterého se zúčastňují četné buněčné populace. Jsou to složky nejenom endoteliálního povrchu, tvořící povrch aterosklerotického plátu, ale významnou roli hrají i cirkulující elementy, jako jsou leukocyty a trombocyty¹⁵.

Endotel, tvořící jednobuněčnou výstelku cév a oddělující intravaskulární obsah od okolních tkání, je nyní chápán jako orgán s mnoha dynamickými funkcemi¹⁶. Poskytuje netrombogenní povrch, kontroluje pasáž molekul do tkání, je místem tvorby řady faktorů modulujících kontrakce přilehlého hladkého svalstva, zprostředkovává interakce mezi cirkulujícími elementy a stěnou cévy a spouští reakci na patogenní stimuly, jako jsou například hypertenze, hyperglykémie a toxické noxy. Jednou z těchto odpovědí endotelu je zvýšená exprese adhezních molekul pro leukocyty, která je významným krokem v časně aterogenezi¹⁵.

Endoteliální dysfunkci navozuje celá řada podnětů. Velmi významným faktorem, který sám o sobě tuto dysfunkci vyvolává, je akumulace lipidů (především LDL, *low density lipoprotein*) v cévním endotelu při jejich zvýšené koncentraci v krvi¹⁵. Po navázání LDL částic popř. jiných lipoproteinů na složky mezibuněčné hmoty dochází k jejich velmi účinné chemické modifikaci a to buď enzymaticky nebo oxidativně. Mimořádně silným oxidantem jsou reaktivní kyslíkové radikály produkované endotelovými buňkami a makrofágy. K modifikaci také dochází působením NO syntézy a 15- lipooxygenázy. Na enzymatické modifikaci se podílí zejména myeloperoxidáza či sekreční fosfolipáza¹⁵. LDL prodělávají rovněž modifikaci glykací, agregací, asociací s proteoglykany či inkorporací do imunitních komplexů¹⁷. Akumulace modifikovaných forem LDL částic v intimě arterií, zejména v místech zvýšeného působení hemodynamických faktorů, je iniciačním krokem zánětlivé odpovědi navozující endoteliální dysfunkci. Změny ve funkci endotelu vlivem zvýšené hladiny cholesterolu jsou patrné ještě před vývojem zjevného aterosklerotického plátu a jsou podobné fyziologické odpovědi endotelu na trauma či zánět¹⁸.

Endoteliální dysfunkce je tedy jednou z prvních změn, nastávajících při aterogenezi a je doprovázena zvýšenou permeabilitou endoteliálních buněk, ztrátou jejich antikoagulační a antiagregační aktivity a mimo jiné i zvýšenou adhezí monocytů k endotelu následkem zvýšené exprese adhezních molekul¹⁹.

Zásadní roli v celém procesu aterosklerozy hrají též zánětlivé buňky, zahrnující **monocyty, makrofágy a lymfocyty** (především T). Cirkulující leukocyty jsou přitahovány do míst s poškozeným endotelem pomocí chemokinů, například monocytárního chemotaktického proteinu-1 (MCP-1). Významnou roli v tomto procesu hrají rovněž leukocytární adhezní molekuly účastnící se při kontaktu leukocytů s endotelem a při jejich následném vstupu do stěny cév či případně transmigraci do okolních tkání. Ve stěně cévy pak dále dochází k přeměně monocytů na makrofágy, které spolu s hladkými svalovými buňkami fagocytují lipidové částice a mění se na pěnové buňky, které následně podléhají apoptóze ¹⁷.

Progrese tohoto zánětlivého procesu vede v důsledku k tvorbě komplexní léze nazývané **aterosklerotický plát**, který zasahuje do cévního lumen. Ruptura plátu a následná trombóza vede k akutním klinickým komplikacím, jako jsou akutní koronární syndromy (infarkt myokardu, nestabilní angina pectoris) a mozková mrtvice (ictus) ¹⁵.

Pokročilý aterosklerotický plát je tvořen nekrotickým, vysoce trombogenním jádrem s obsahem lipidové hmoty, pěnových buněk a jejich zbytků. Případný infarkt myokardu nejčastěji vzniká rupturou tohoto vulnerabilního plátu, vedoucí k obnažení protrombotického jádra a formaci trombu v lumen arterie ¹⁵.

Stabilita vzniklé obnažené fibrózní čepičky je dána rovnováhou mezi syntézou extracelulární matrix a její degradací, kde obojí je ovlivněno zánětlivými stimuly. Makrofágy produkují pod vlivem cytokinů matrixové metaloproteinázy ¹⁵, kolagen degradující enzymy, které odbourávají složky extracelulární matrix a tím přispívají k oslabení fibrózní čepičky plátu ²⁰.

Produkcí oxidantů uvnitř plátu se monocyty podílejí na vzniku oxidativní modifikace LDL-částic. Produkcí cytokinů, jako je tumor necrosis factor alfa (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) a transforming growth factor beta (TGF β), chemokinů (MCP-1) a růstových faktorů, jako je insulin-like growth factor-I (IGF-1) a platelet derived growth factor (PDGF) modulují monocyty zánětlivou reakci. Monocyty prezentují antigeny T-lymfocytům, což vede k aktivaci T-lymfocytů a k další produkci cytokinů, které zánětlivou reakci dále amplifikují.

U nemocných s aterosklerózou byly též zjištěny zvýšené hladiny reaktantů akutní fáze, jako jsou C-reaktivní protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), prokalcitonin nebo fibrinogen a dále neopterin (ukazatel systémové imunitní aktivity). Hladiny těchto ukazatelů zánětu mohou reflektovat celkové aterosklerotické postižení daného jedince ²¹.

T-lymfocyty hrají řídicí roli v procesu aterogeneze. Jsou významným zdrojem mnoha prozánětlivých mediátorů, jako jsou chemokiny a cytokiny, zahrnující například interleukiny, interferon- γ (INF- γ) a tumor necrosis faktor (TNF) ²². Tyto molekuly mají mnohočetný účinek na buňky účastnící se aterogeneze, například indukují expresi adhezních molekul, zvyšují oxidativní stres, redukují produkci oxidu dusnatého endotelem, ovlivňují proliferaci buněk, inhibují tvorbu kolagenu a zvyšují produkci matrixových metaloproteináz ¹⁵.

Podmínkou rozvoje zánětové reakce v arteriální stěně je adheze leukocytárních elementů, zvláště monocytů a T lymfocytů, na aktivovanou endotelovou výstelku. Následuje diapedéza mononukleárních buněk do intimy. Exprese adhezních molekul je regulována působením prozánětlivých cytokinů. Usměrněný pohyb buněk imunitního systému je podmíněn působením chemokinů. Makrofágy, které se nacházejí v intimě, jsou nejvýznamnějším zdrojem pluripotentních prozánětlivých cytokinů a chemokinů. T lymfocyty rozpoznávají antigenní fragmenty prezentované prostřednictvím makrofágů. Prodělávají klonální expanzi a tvoří proaterogenní a prozánětlivé cytokiny ¹⁵.

Buňky hladkého svalu jsou základní strukturální součástí stěny tepen a zajišťují vaskulární tonus. Procesu aterogeneze se účastní migrací z medie do intimy tepen a následnou proliferací, fagocytózou tukových částic a formací pěnových buněk v centru aterosklerotického plátu. Jsou významným zdrojem extracelulární matrix, která formuje fibrózní čepičku, pokrývající lipidové jádro plátu ¹⁵.

Adheze **trombocytů** a tvorba murálního trombu hraje významnou roli při formaci aterosklerotického plátu i jeho ruptuře. Trombocyty adherují k dysfunkčnímu endotelu, odhalenému kolagenu a makrofágům. Po aktivaci uvolňují cytokiny, růstové faktory a další mediátory zánětu, uskladněné v granulích ¹⁵.

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

Jako důsledek aktivace endotelu, k níž jako první přispívají krevní destičky ²³, dochází ke zvýšené expresi adhezivních molekul (VCAM-1, ICAM-1) na povrchu endotelových buněk. Následuje adherence leukocytů (zejména monocytů), jejich migrace do subendotelové vrstvy a

prohloubení zánětlivé reakce v důsledku lokálně produkovaných prozáněťových mediátorů (TNF, IFN). Cytokiny a růstové faktory indukují diferenciaci monocytů na makrofágy. Vedou také ke zvýšené expresi povrchových PRR (*pattern- recognition receptor*) receptorů přirozené imunity, jejichž prostřednictvím jsou identifikovány endogenní i exogenní (mikrobiální) nebezpečné vzory. Za mimořádně významné, s ohledem na vznik a rozvoj aterosklerotického procesu, jsou považovány povrchové molekuly z rodiny vycytávajících (*scavenger*) receptorů a TLR (*Toll like receptors*)¹⁵.

Scavenger receptory účinně váží, kromě fragmentů apoptotických buněk, zejména chemicky modifikované oxidované částice LDL (oxLDL)²³. Vstup modifikovaných LDL částic cestou scavengerových receptorů však neaktivuje zpětnou vazbu, která by bránila jejich dalšímu příjmu. Modifikované LDL se proto v makrofázích neomezeně hromadí (nejčastěji v podobě esterů lipidů) a indukují tak přeměnu makrofágů na pěnové buňky (*foamy cells*), které dominují zvláště v časných fázích aterosklerózy¹⁵.

Prostřednictvím **TLR receptorů** jsou identifikovány mimořádně rozmanité podněty. Rozeznávají jsou především nebezpečné vzory patogenních mikroorganismů a nebezpečné signály, které vznikají patologicky ve vnitřním prostředí těla²⁴. Těmi jsou také např. stresové proteiny Hsp (*heat shock proteins*) či modifikované molekuly mezibuněčné hmoty, produkované v důsledku prohlubující se aterosklerotické léze²². Identifikace nebezpečných vzorů prostřednictvím receptorů TLR vede k iniciaci nitrobuněčných signálních drah. Centrální úlohu při buněčné transdukcii signálů odpovídajících na aterogenní stimuly hraje dráha transkripčního faktoru NFκB. Ten je ve své aktivní formě translokován do jádra, kde se váže na regulační sekvence a navozuje transkripci řady genů, jejichž produkty mají prozáněťové účinky a podílejí se na rozvoji imunitní reakce. Jsou to zejména geny, které kódují cytokiny s převážně prozáněťovou aktivitou (IL-1, TNFα), chemokiny (IL-8, MCP-1), adhezní molekuly (ICAM, VCAM), dále geny kódující molekuly regulující aktivaci buňky a buněčný cyklus^{22, 25, 26}.

3.3. Biomarkery zánětu ve vztahu k ateroskleróze

V rozsáhlých klinických studiích byl ověřen význam mnohých ukazatelů imunitního systému, popisujících zánětovou odpověď, jako biomarkerů s prediktivní vahou určující klinické komplikace aterosklerózy. Jsou jimi zejména zvýšené hladiny prozánětových cytokinů (IL-6, IL-1, IL-18, TNF α), látek uvolňovaných degranulací buněk zánětu (myeloperoxidáza, metaloproteinázy), solubilní formy regulačních membránových molekul (solubilní CD40L), solubilní formy adhezních molekul leukocytů i endotelových buněk (sVCAM.1, P-selektin, E-selektin, ICAM-1), hsCRP, fibrinogen, či adipokiny nebo leptin²⁷.

Uvedené biomarkery jsou tvořeny různými buněčnými typy, které se podílejí v patogenezi aterosklerózy. Zdrojem nejsou pouze buňky imunitního systému, ale i jiné buněčné typy, např. endotelové buňky, buňky hladké svaloviny, a především hepatocyty. Hepatocyty jsou nejvýznamnější zdroj bílkovin akutní fáze, které se zde tvoří po ovlivnění prozánětovými cytokiny, zvláště IL-6. Z bílkovin akutní fáze má nepochybně největší význam pentraxinová molekula CRP. C-reaktivní protein je prokazatelný v aterosklerotických placích, kde se váže na chemicky modifikované LDL lipoproteiny. Svou vazbou, jako solubilního receptoru PRR, stimuluje aktivaci komplementové kaskády a zesiluje akumulaci monocytových elementů. Navíc CRP snižuje tvorbu oxidu dusnatého v endotelových buňkách a zesiluje tvorbu chemokinů v buňkách hladké svaloviny a endotelových buňkách^{2, 17, 22, 27}. Tyto markery mohou sloužit nejenom jako diagnostická kritéria, ale i jako nástroje reflexe úspěšnosti extrakorporální intervence. Řada těchto molekul je sledována i v rámci hodnocení extrakorporálních LDL eliminačních metod^{5, 9, 10, 24}. Problematika markerů ve vztahu k ATS je rozsáhlým tématem a jeho detailnější rozbor by svým rozsahem významně přesáhla meze diplomové práce. V rámci této práce byly podrobněji studovány interleukin IL-10, solubilní forma endoglinu, solubilní forma adhezivní molekula P-selektin, plazmatický glykoprotein α -2-makroglobulin a solubilní apoptotický faktor sAPO-1/Fas.

3.3.1. Plazmatické glykoproteiny (α -2-makroglobulin)

α -2-makroglobulin (viz Obrázek č. 2) je plazmatický glykoprotein produkováný játry, který se váže a inhibuje/štěpí proteinázy většiny podtříd. Jeho fyziologický význam tkví v inhibici nežádoucí excesivní proteinázové aktivity ve tkáních^{28, 29}. Je to jedním z nejdéle známých

imunologických aterogenních faktorů a nověji se poukazuje i na význam jeho polymorfismu v aterogenezi³⁰.



Obrázek č. 2, 3D struktura α -2-makroglobulinu, převzato z PDB¹².

Štěpící schopnost α -2-makroglobulinu se prokazatelně podílí na rozvoji ATS plátů prostřednictvím poškozování intracelulární matrix^{31, 32}. α -2-makroglobulinu byl v aterosklerotických tepnách potvrzen ve zvýšeném množství³². K jeho mechanismu účinku je u myši prokázáno, že působí jako reaktant akutní fáze, u lidí se tento efekt však dokázat nepodařilo. Je známo, že α -2-makroglobulinový receptor je shodný LDL-related jaterním receptorem a podílí se tak na odstraňování chylomikronů z oběhu^{33, 34}. Proto se předpokládá, že α -2-makroglobulin může kompetitivně inhibovat vychytávání chylomikronových zbytků a vést tak k akceleraci ATS³⁵. α -2-makroglobulin byl také identifikován jako inhibitor proteinu C³⁶. Jelikož protein C je proteolytickým inaktivátorem koagulačních faktorů VII a V, zvýšená hladina α -2-makroglobulinu má prokoagulační účinek.

3.3.2. Adhezivní molekuly (P-selektin)

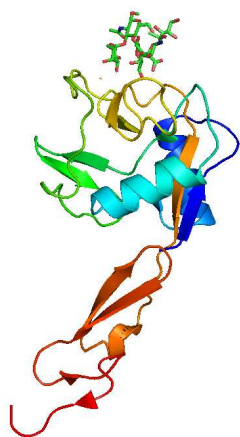
LDL-cholesterol má řadu účinků v iniciální i následné fázi procesu ATS a vede mimo jiné ke zvýšené expresi endoteliálních adhezních molekul³⁷. Ty zajišťují kontakt leukocytů s povrchem endotelu následován migrací leukocytů do stěny cévy a v případě aterogeneze formací aterosklerotického plátu.

První fází interakce mezi leukocyty a endotelem jsou procesy zvané „capture“ a „tethering“ (volně přeloženo jako „zachycení“ či „zajetí“ a „uvázání“ leukocytu), po kterých následuje tzv. „rolling“, valivý pohyb leukocytu po aktivovaném endotelu. Tyto děje zprostředkovávají selektiny³⁸. V další fázi postupně dochází k pevné adhezi leukocytů k endotelu, která je umožněna integrinovými molekulami na povrchu leukocytů a

intracelulárními adhezními molekulami (např. ICAM-1) na straně endotelu. Po pevném přilnutí dochází k transmigraci leukocytů do stěny cévy³⁹.

K expresi adhezních molekul dochází po aktivaci endoteliálních buněk pomocí IL-1, TNF- α a INF- γ ³⁹. Interakce mezi endotelem a složkami cirkulující krve hraje významnou roli v patogenezi mnoha různých stavů, jako je například ateroskleróza a její komplikace a nádorová onemocnění. Solubilní formy selektinů a ICAM-1 jsou považovány za ukazatele zánětlivé aktivity endotelu⁴⁰.

P-selektin (CD62P, viz Obrázek č. 3¹²) je molekulou umožňující zachycení leukocytu na aktivovaném endotelu a tzv. tethering a rolling.



Obrázek č. 3, 3D struktura p-selektinu, převzato z PDB

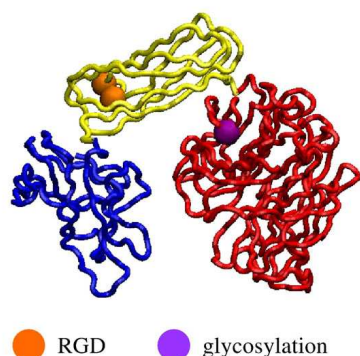
Jeho vazebným partnerem je PSGL-1 (P-selectin Glycoprotein Ligand-1), přítomný na povrchu většiny leukocytů a v menší míře i na povrchu trombocytů. P-selektin je produkován a skladován v α granulích destiček a ve Weibel-Paladeho tělískách endoteliálních buněk a je exprimován na jejich membráně po stimulaci, například trombinem nebo histaminem⁴¹. Kinetika membránového P-selektinu je velmi rychlá, během minut je přesunut z intracelulárních zásob do povrchové membrány trombocytů a endotelu, odkud je rychle uvolňován do plazmy, kde plní další funkce. Z membrány pak opět rychle vymizí⁴². Poločas solubilní formy P-selektinu (sP-selektin) nebyl prozatím stanoven. U nemocných s ischemickou chorobou srdeční byl nalezen diurnální rytmus sP-selektinu s maximem hladin ve večerních hodinách, zatímco plazmatické hladiny sE-selektinu zůstaly během dne stabilní⁴³.

Ve vztahu k ATS je exprese P-selektinu považována za indikátor endoteliální a/nebo trombocytární aktivace ³⁸. Množství cirkulujícího P-selektinu, který je uvolněn z membrán endotelu a trombocytů, odráží rozsah zánětlivého poškození. U myšního modelu ATS byla prokázána zvýšená hladina sP-selektinu, přičemž většina cirkulujících molekul P-selektinu byla endoteliálního původu ⁴⁴.

Podobně jako u leukocytů, iniciální fází adheze trombocytů je také tzv. rolling, závislý na expresi P-selektinu na povrchu endotelu ⁴⁵. Vlivem P-selektinu se aktivované cirkulující trombocyty sdružují s monocyty ⁴⁶ a společně „rolují“ po endotelu ⁴⁷. Destičkový i solubilní P-selektin hrají také významnou úlohu při vzniku a progresi aterosklerotických lézí ⁴⁸. P-selektin je též považován za ukazatel destabilizace aterosklerotického plátu ⁴⁹. V nepřítomnosti zranění nebo zánětlivého onemocnění může vysoká hladina solubilního P-selektinu sloužit jako ukazatel rizika kardiovaskulárních příhod a jejich komplikací ⁵⁰.

3.3.3. Endoglin

Endoglin (CD105, viz obrázek číslo 4 ⁵⁰) je homodimerický transmembránový glykoprotein o molekulární hmotnosti 180 kDa (Obrázek č. 3D struktura lidského endoglinu) ⁵¹.



Obrázek č. 4, 3D struktura lidského endoglinu s vyznačením RGD (motivu buněčné adheze) a místa glykosylace) ⁵¹

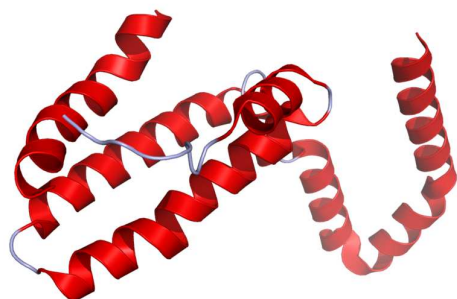
Patří do rodiny transformujících růstových faktorů β (transforming growth factor β , TGF- β). Endoglin je vazebným partnerem TGF- β 1 a TGF- β 3 a prostřednictvím modulace buněčné odpovědi na tyto cytokiny ovlivňuje angiogenezi. Tato interakce je zprostředkována cytoplazmatickými proteiny z rodiny Smad⁵². Je selektivně konstitutivně exprimován na aktivovaném endotelu, nejčastěji na kapilárách, arteriolách a venulách⁵³. Endoglin byl také popsán na líních monocytů a hladkosvalových buněk^{54, 55}, kožních buněk⁵⁶ a fibroblastů⁵⁷. Zvýšená exprese endoglinu byla popsána u hladkosvalových buňkách ve studii buněčných populací aktivovaných buněk aterosklerotických plátů, zatímco u kontrolních nepostižených buněk arteriálních stěn se jej detekovat nepodařilo⁵⁸.

CD105 může být též uvolněn do oběhu z buněčné membrány jako solubilní endoglin (sCD105). Plazmatické nebo sérové hladiny sCD105 jsou užitečným znakem aktivace endotelu či jeho poškození nebo reparační^{59, 60}. sCD105 a von Willebrandův faktor jsou zvýšeny u pacientů s ATS a korelují s celkovými hladinami cholesterolu⁶¹. Normalizace hladin endoglinu je považována za důležitý indikátor regrese ATS u pacientů s FH, kde aktivace endoglinu (výše popsané buněčné typy) hraje zásadní roli^{54, 56, 57, 60}. Elevace hladin sCD105 byla pozorována u pacientů s angiózními bolestmi (stenokardií), s pozitivním stresovým testem, ale s normálním nálezem kardiogramu. Naopak, u pacientů s extensivním poškozením koronárních arterií hladiny sCD105 zvýšeny nebyly. Elevace hladin sCD105 by tedy mohla sloužit jako indikátor časného poškození, zatímco jeho snížení spolu s hladinami TGF- β by hovořilo pro pozdější fáze. Vysvětlením tohoto jevu by mohlo být vyvázání volného aktivního TGF- β solubilním endoglinem⁶⁰.

Ve vztahu k extrakorporálnímu LDL eliminační terapii je endoglin sledovaným markerem a jeví se jako slibný kandidát na ukazatele účinnosti vlastní terapie⁶². Rozsáhlejší studie, která by status sCD105 nezpochybnitelně potvrdila, však doposud chybí.

3.3.4. IL-10

IL-10 (viz. Obrázek č. 5) je jeden z hlavních imunoregulačních cytokinů zánětlivé reakce.



Obrázek č. 5, 3D struktura Interleukinu 10, převzato z PDB¹²

Hraje zásadní roli v down-regulaci adaptivní i přirozené imunity zodpovědné za odpověď na chronická zánětlivá onemocnění. Původně byl popsán jako inhibitor produkovaný T_H2 lymfocyty⁶³. Jeho hlavní fyziologickou funkcí je restrikce zánětlivých odpovědí, blokování tvorby proinflamatorních cytokinů a regulace proliferace řady buněčných populací jako např. T a B lymfocytů, NK buněk, dendritických a žírných buněk. V současnosti stoupá i jeho význam v regulaci prozánětlivé odpovědi u alergií⁶⁴. Bylo prokázáno, že respirační expozice alergenům může indukovat T buněčnou toleranci proti rozvoji astmatické reakce. Bylo prokázáno, že klíčovou roli v tomto procesu hraje právě produkce IL-10 dendritickými buňkami s následnou indukcí tolerance⁶⁵. Mimoto, T_H2 odpověď charakteristická pro manifestaci alergie je regulována přirozenými CD4+ T regulačními lymfocyty produkující IL-10⁶⁶

Ve vztahu k ATS inhibuje IL-10 produkci řady cytokinů⁶⁷ a jeho schopnost atenuace progresu byla nezpochybnitelně prokázána na několika animálních modelech⁶⁸. Řada studií se pak zabývá vztahem IL-10 a koronárního arteriálního syndromu a akutní koronární ATS a výsledky naznačují, že právě IL-10 by mohl být klíčovým momentem stabilizace anginy pectoris proti proinflamatorním působkům (např. $TNF\alpha$)⁶⁹. Uvažuje se o jeho stabilizačním působení na ATS plát⁷⁰. V jiné studii byla exprese IL-10 v ATS plátu snížena opotí hladinám proinflamatorních cytokinů, což teorii o nerovnováze způsobené jeho nedostatečnou produkcí podporuje⁷¹. Podání IL-10 zhoršilo LDL-indukovanou monocyto/endoteliální interakci *in-vivo* a experimenty s IL-10 transgenními a deficientními myšmi modely jeho kritickou roli v jak v tvorbě, tak při stabilizaci ATS lézí jen potvrzují⁷². IL-10 pozitivně ovlivňuje příjem

cholesterolu makrofágy, avšak zároveň podporou jeho exfluxu brání jeho toxickému působení na tyto buňky a jejich přeměně na buňky pěnové ⁷³. Asi nejvýstižněji lze IL-10 ve vztahu k ATS označit jako „imunologický skalpel“ ⁷⁴.

3.3.5. Apoptotické faktory - sAPO-Fas (solubilní)

Apo-1 (též CD95) je jedním ze zástupců skupiny „death receptors“. Po spojení se svým vazebným partnerem (Fas-ligand –CD178) dochází k indukci cesty vnější apoptotické kaskády.

Ve vztahu k procesu ATS bylo prokázáno, že solubilní forma Fas (sFas) receptoru je u pacientů s terminálním renálním selháním spojená s koronární a periferní ATS ^{75, 76}. Pozdější publikace nálezů u pacientů s hypertenzí ale měřením tloušťky karotidální intimy a média (intima-media thickness) potvrdila pozitivní korelaci s pouze s Fas-ligandem, nikoliv se solubilním Fas receptorem ⁷⁷. Korelace Fas ligandu a endoteliální dysfunkce byla nalezena i na úrovni mRNA u cirkulujících leukocytů. Tento nález byl potvrzen specificky pouze u hyperlipidemických pacientů ⁷⁸. Jednoznačnost proatherogennosti solubilního Fas receptoru nebyla potvrzena ani ve studii na zdravé populaci ⁷⁹. Membránová exprese Fas receptoru je však uvažována za mechanismus apoptogenního působení angiotensinu II v hladkosvalových cévních buňkách ⁸⁰. Situace ohledně významu sAPO-1/Fas tak není doposud v literatuře jednoznačně vyřešena.

3.4. Metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu

3.4.1. Aferéza

Slovo aferéza pochází z řečtiny a znamená odstranění. Pojem LDL-aferéza lze tedy chápat jako odstranění LDL-cholesterolu. Tento název byl poprvé užit profesorem Borbergem jako pojmenování pro selektivní eliminaci LDL-cholesterolu na podkladě imunoadsorpce, reakce specifické protilátky s odpovídající strukturou LDL-částice. V tomto smyslu je název stále užíván některými autory^{5, 10}.

V literatuře je však stále běžnější se s tímto názvem setkat ve smyslu označujícím všechny metody odstraňující LDL-cholesterol, a to i v případě těch, které nejsou v eliminaci LDL-částic zdaleka tak selektivní, jako je „původní“ LDL-aferéza na principu imunoadsorpce.

Selektivní metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu jsou v České republice v současnosti prováděny pouze na několika málo specializovaných pracovištích a středisko hemaferézy FN Hradec Králové patří mezi ně. Spektrum nemocných je velmi omezené a detaily této problematiky se týkají relativně úzkého okruhu odborníků. Proto některé metody extrakorporální eliminace a jejich modifikace nemají zavedený český název.

První metodou užitou k extrakorporální eliminaci cholesterolu byla **plazmaferéza**. Principem plazmaferézy je odstranění plazmy obsahující nežádoucí součásti. Její oddělení z plné krve probíhá buď pomocí centrifugace, nebo s pomocí membránové separace, spočívající v použití membrán o definované velikosti pórů, zadržujících krevní tělíčka. Odstraněná plazma může být nahrazena roztoky krystaloidů nebo koloidů, albuminem nebo plazmou od zdravých dárců.. Nevýhodou této metody je neselektivita eliminace nežádoucí látky, v tomto případě LDL-cholesterolu. Při déletrvající léčbě dochází k závažným ztrátám imunoglobulinů, hormonů, transportních proteinů a stopových prvků. Nežádoucí je i odstranění lipoproteinů o vysoké hustotě (high density lipoproteins, HDL). Plazmaferéza se stala východiskem pro vývoj selektivnějších metod, které jsou až na výjimky založeny na dalším zpracování separátorem oddělené plazmy⁴.

Selektivní metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu již pracují na základě imunitní nebo fyzikálně chemické interakce mezi aktivním povrchem eliminačního média a hlavní substancí LDL-částic apolipoproteinem B₁₀₀ (apo B₁₀₀), nebo na principu filtrace podle velikosti částic.

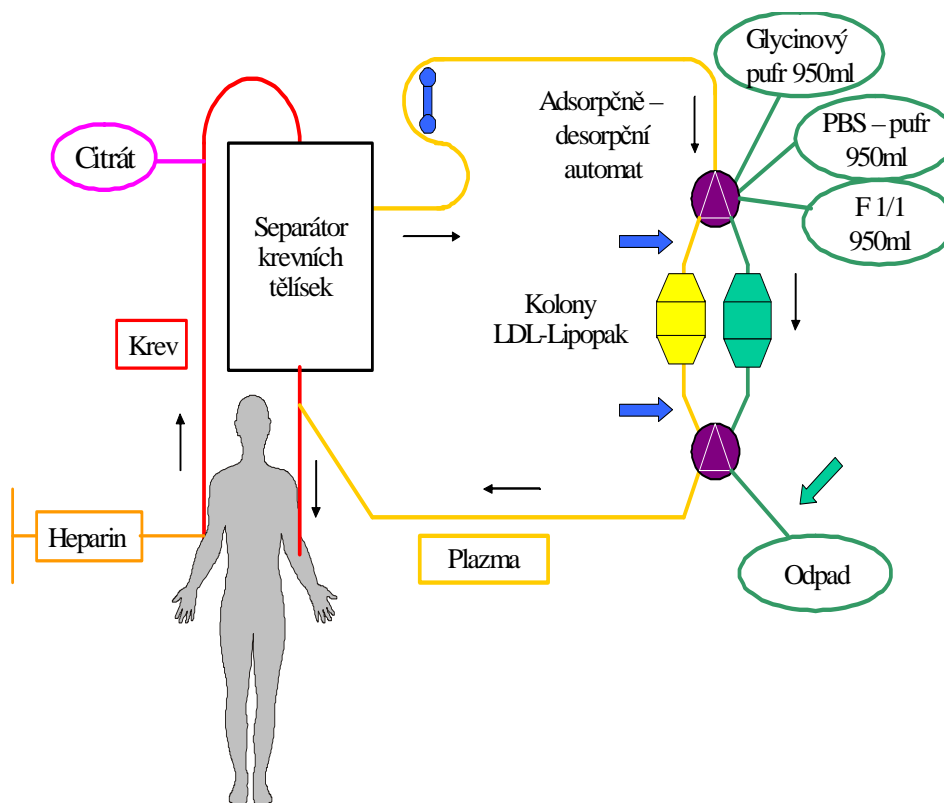
3.4.2. Imunoadsorpce LDL-cholesterolu

Imunoadsorpce LDL-cholesterolu (IA, LDL-imunoadsorpce) je nejstarší ze selektivních metod. Využívá specifickou interakci polyklonálních protilátek s antigenními strukturami apoB₁₀₀. Tento princip zajišťuje vysokou selektivitu eliminace.

Přístrojový systém (viz Obrázek č. 6 ⁸¹) se skládá ze separátoru krevních tělísek, pracujícího na principu buď centrifugace nebo filtrace, a adsorpčně-desorpčního automatu, který řídí střídavou adsorpci a regeneraci (desorpci) dvou kolon, obsahujících protilátky proti lidskému apoB₁₀₀. Kolony jsou určeny k opakovanému použití ⁸². K dispozici jsou například kolony Therasorb firmy Baxter (Unterschleissheim, Německo) nebo LDL-Lipopak, Pocard Ltd. (Moskva, Rusko).

Kolony LDL-Lipopak (Pocard), používané na pracovišti hemaferézy FN HK, obsahují na sepharózový gel navázané polyklonální ovčí protilátky proti lidskému apoB₁₀₀. Při průchodu kolonou jsou z plazmy odstraňovány LDL-částice a očištěná plazma se po spojení s krevními tělísky vrací zpět do oběhu pacienta. Když je kapacita kolony vyčerpána, adsorpčně-desorpční automat odkloní tok plazmy do druhé kolony a zároveň zahájí regeneraci první kolony roztokem glycinového pufru o pH 2,4 (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který uvolňuje vazbu mezi protilátkami a apoB₁₀₀. Následně je pH v koloně upraveno roztokem PBS pufru o pH 7,4 (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který je poté odstraněn pomocí fyziologického roztoku. V automatu tak současně jednou kolonou prochází plazma a druhá kolona je regenerována. Toto sekvenční použití adsorpce a desorpce vede k teoreticky neomezené kapacitě systému, což má výhodu v možnosti nastavení délky procedury podle individuálních potřeb pacienta.

Mezi jednotlivými LDL-aferezami jsou regenerované kolony skladovány při teplotě 2-8°C, naplněny roztokem PBS pufru s příměsí 0,01% azidu sodného (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který je před dalším užitím zcela odstraněn fyziologickým roztokem (5000 ml F 1/1 na každou kolonu).



Obrázek č. 6 Schéma imunoadsorpce LDL-cholesterolu ⁸¹

Další vysoce selektivní metodou je **adsorpce na dextransulfát (DSA**, firma Kaneka, Osaka, Japonsko), která pracuje na principu elektrostatické interakce mezi kladným nábojem apoB₁₀₀ a záporným nábojem řetězců dextransulfátu ⁸³ Kolona váže VLDL, LDL a lipoprotein (a) [(Lp(a)]. I zde je užívána dvojice kolon (Liposorber LA), které se střídají v pracovním a regeneračním cyklu.

3.4.3. Metody založené na filtraci částic z plazmy

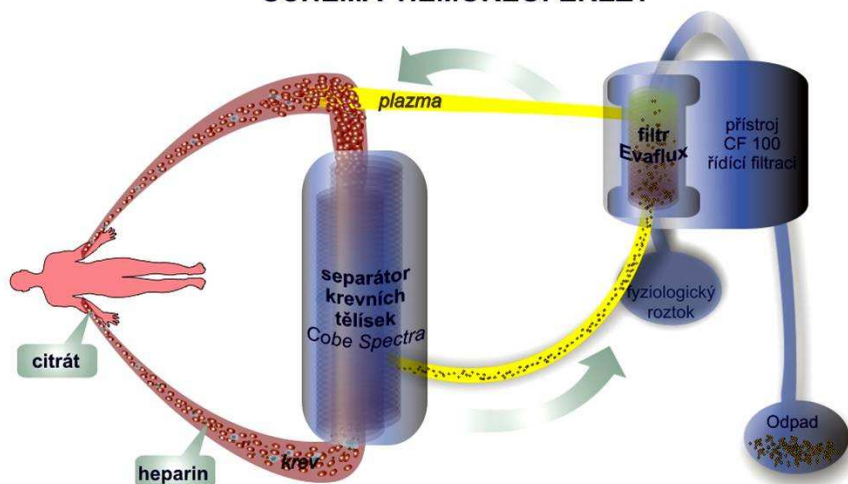
Metody založené na filtraci částic z plazmy, nazývané v anglosaské literatuře souhrnně „*secondary membrane plasma fractionation*“ odstraňují z plazmy vysokomolekulární proteiny pomocí sekundárního filtru. Selektivita filtrace závisí na fyzikálních vlastnostech použitého filtru, především na velikosti jeho pórů.

Kromě odstranění patologické substance, v našem případě LDL-částic, jsou eliminovány i další makromolekuly, jako je fibrinogen, α -2-makroglobulin, imunoglobuliny, fibronektin atd. Výsledkem je zlepšení reologických vlastností krve, dané především snížením viskozity plazmy, ale i snížením agregace a adhezivity trombocytů a erytrocytů a zlepšením jejich flexibility. Následkem je relativně setrvalé zlepšení mikrocirkulace a tím i tkáňové oxygenace.

V případě užití primárního přístroje, který pracuje na principu filtrace, jsou modifikace této metody nazývány **dvojitá filtrační plazmaferéza (*double filtration plasmapheresis, DFPP*)**, **kaskádová filtrace**, **rheoferéza**, **nebo membránová diferenciální filtrace (*membrane differential filtration, MDF*)** ^{6, 84}.

V této diplomové práci využívaném uspořádání rheoferézy je plazma získávána kvalitním separátorem (Cobe- Spectra), je perfektně prostá buněčných elementů po vysokootáčkové centrifugaci Pak je proháněna „druhým stupněm“- filtrem. Jako sekundární filtry se doporučují filtry Asii, Kurare, Kaneka, Ciprex, Excorim i další^{62, 85}. Na pracovišti FNHK se používají pro práci filtry Evalux 4A a 5a (Kurare) s etylen- vinyl- alkoholovými dutými vlákny, která mají otvory o velikosti 0,03 nebo 0,04 mikrometru. Průtok plazmy je kontinuální, antikoagulace je prováděna heparinem. Velikost pórů filtru umožňuje záchyt značného množství LDL-cholesterolu, lipoproteinu (a), fibrinogenu, alfa₂ makroglobulinu a imunoglobulinů, zejména IgM. Princip modifikace hemorheoferézy prováděné na pracovišti FNHK je uveden na obrázku č 7.

SCHÉMA HEMOREOFERÉZY



Plazma je oddělena od krevních tělísek pomocí separátoru Cobe Spectra a dále je čerpána pumpou separátoru do linek přístroje CF100 (Infomed, Ženeva, Švýcarsko), který řídí průtok plazmy přes kapilární filtr Evaflux 4A nebo 5A (Kuraray, Osaka, Japonsko). Očištěná plazma se spojuje s krevními tělisky a je vedena zpět do krevního oběhu nemocného. Při vzestupu tlaku v kapilárách filtru přístroj automaticky provede proplach kapilár filtru fyziologickým roztokem, který je spolu s odfiltrovanými částicemi odveden do odpadního vaku. Antikoagulace je zajištěna kontinuální nitrožilní aplikací citronanu sodného (ACD-A, Baxter, Mnichov, Německo) a iniciálním jednorázovým podáním heparinu 4000 i.v.

Obrázek č 7 Princip modifikace hemoreoferézy prováděné na pracovišti FNHK⁵

Na rozdíl od výše popsané mnohem selektivnější imunoadsorpce, dochází u těchto metod k významné eliminaci imunoglobulinů – IgG 15%, IgA 24%, IgM 63%⁸⁶. Z pohledu eliminace LDL-cholesterolu platí, že čím více je metoda selektivní, tím má menší účinky na rheologické vlastnosti krve.

3.4.4. Vliv LDL-aferézy na hladiny lipidů

Některá data ukazují, že metody IA, DSA a HELP jsou srovnatelně účinné ve snižování LDL-cholesterolu s průměrnou redukcí o 62 %, 65 %, resp. 59 % při jedné proceduře⁸⁷. Podle jiné studie jsou IA a DSA stejně účinné a obě mírně účinnější než DALI – snižují LDL-cholesterol o 82 % resp. 84 % oproti 77 % u DALI⁸⁸. Další studie neshledala signifikantní rozdíly mezi IA a DALI ve změnách LDL, HDL a triacylglyceridů⁸⁹. DSA a DALI mohou snižovat HDL-cholesterol méně než IA⁸⁸. Redukce Lp(a) při jednom sezení byla 59 % u IA oproti 29 % u DALI⁸⁹, podle jiných autorů byla u IA, DSA, HELP i DALI srovnatelná⁸⁸ a pohybovala se v průměru kolem 60 %.

V případě IA je třeba zpracovat větší objemy plazmy k dosažení stejného poklesu LDL-cholesterolu než u DSA⁹⁰. U IA však není množství očištěné plazmy limitováno, adsorpční

kapacita, daná střídáním dvou pracovních kolon, je teoreticky nekonečná. Naopak u metody HELP je rozsah procedury limitován omezenou kapacitou filtru ⁹¹ a nebezpečím pramenícím z poklesu hladiny fibrinogenu. HELP je vzhledem k nutnosti odstranění precipitátu a zbylého heparinu technicky náročnější než metody založené na adsorpci. Dle literatury je nejselektivnější metodou IA je v eliminaci LDL-cholesterolu IA ⁹².

3.4.5. Indikace k léčbě LDL-aferezou

U nemocných s těžkou familiární hypercholesterolemií může být dosažení cílových hladin LDL-cholesterolu obtížné až nemožné a LDL-aféza může být jediným život zachraňujícím postupem. Jedná se však o metodu technicky, časově a finančně náročnou. Procedury LDL-afézy je navíc možno provádět pouze ve specializovaných centrech a je nutné je zpravidla celoživotně a pravidelně opakovat. Při zvažování indikace léčby LDL-aferezou je nutný individuální přístup k nemocným. ^{3-5, 9-11, 62}. Indikace k léčbě LDL-aferezou vycházejí z výše nastíněných specifik a vyvíjí se s úrovní znalostí o rizicích a možnostech prevence aterosklerózy. Např. v USA jsou podle *Food and Drug Administration* (FDA) indikováni k léčbě LDL-aferezou homozygoti FH s hladinou LDL-cholesterolu >13 mmol/l, což v praxi splňují zpravidla všichni tito nemocní, dále heterozygoti FH s LDL-cholesterolem > 7,8 mmol/l bez ICHS nebo nad 5,2 mmol/l s ICHS. Kritéria jsou hodnocena až po šesti měsících přísné diety a maximální medikamentózní léčby ⁹³. Podle nových doporučení amerického Národního cholesterolového edukačního programu (National Cholesterol Education Program, NCEP) a Evropské společnosti pro aterosklerózu (European Atherosclerotic Society, EAS) byly rozšířeny indikace k intenzivní cholesterol-snižující terapii u nemocných s ICHS s cílem dosáhnout hladiny LDL-cholesterolu pod 2,6 mmol/l.

3.4.6. Účinky léčby LDL-aferezou

LDL-aféza nejen redukuje plazmatické hladiny LDL-cholesterolu a Lp(a), ale predominantně snižuje především počet malých denzních LDL-částic, které jsou považovány za nejvíce aterogenní ⁹⁴.

Z dlouhodobého hlediska je popisován vzestup hladin HDL-cholesterolu a pokles celkového a LDL-cholesterolu. LDL-aféza vede k navození ustáleného stavu,

charakterizovaného rovnováhou mezi syntézou a odstraňováním cholesterolu ³. Pravidelné procedury vedou ke zpomalení nebo zastavení progresu či dokonce k regresi aterosklerotických plátů a v klinické praxi k redukci počtu koronárních příhod ^{3, 9, 10}. Regrese aterosklerotických koronárních plátů po roční léčbě LDL-aférou byla prokázána studií LACMART (Low density lipoprotein Apheresis Coronary Morphology And Reserve Trial), která porovnávala koronarografické nálezy a výsledky intravaskulárního ultrazvuku ⁹⁵. LDL-aféza vedla po 2,5 letech léčby k signifikantní redukci koronárních kalcifikací ⁹⁶, které podle některých prací ⁹⁷ mají vztah k riziku koronárních příhod.

3.4.7. Vedlejší účinky léčby LDL-aférou

LDL-aféza patří mezi technicky nejsložitější a časově náročné hemaferetické procedury s relativně velkými objemy zpracované plazmy.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky hemaferetických procedur patří:

- příznaky citrátové toxicity
Roztok citrátu umožňuje na principu tvorby chelátů s kalcium účinnou regionální antikoagulaci, potřebnou k zamezení tvorby trombů v přístroji. Je přidáván ke krvi pacienta a po pasáži přístrojem se dostává do krevního oběhu ⁹⁸.
- individuálně variabilní pokles krevního tlaku
V závislosti na velikosti poklesu a vnímavosti pacienta může být zcela bez příznaků nebo vyvolat pocit nevolnosti a mdlob a/nebo výjimečně vyústit v krátkodobé bezvědomí. Často je spojen s vazo-vagální reakcí.
- aktivace komplementu při kontaktu plazmy s povrchem separačního setu a adsorpčních kolon s následkem uvolnění mediátorů s anafylaktoidními a vazodilatačními účinky ⁹⁹.
- alergické a pyretické reakce
- projevy přetížení náhradními roztoky
- vzduchová embolie
- minerálové dysbalance
- hemolýza
- obtíže se zavedením žilních vstupů a jejich komplikace ¹⁰.

4. Experimentální část

4.1. Charakteristika souboru

Do studie byli začlenění nemocní (dle kritérií studie Gordona¹⁰⁰) s mírnými změnami:

A. Pacienti s homozygotní familiární hypercholesterolemie bez výjimky

B. V případech heterozygotní familiární hypercholesterolemie pak byli vybráni:

a) **sekundární prevence:** komplikace aktivní ATS, např. ischemická choroba srdeční a LDL cholesterol při dietě a maximálně tolerovatelných kombinacích hypolipidemik více než 4,9 mmol/L s cílovou hodnotou LDL-cholesterolu pod 3,4 mmol/L.

b) **primární prevence:** LDL cholesterol více než 6,4 mmol/L + pozitivní familiární anamnéza + 1 nebo více rizikových faktorů, s cílovou hodnotou LDL cholesterolu méně nežli 5,2 mmol/L.

Celkově bylo do studie zahrnuto 12 pacientů (viz Tabulka č. 1 Soubor pacientů), z toho 3 byli léčeni hemorheoferézou (těžká komplikovaná heterozygotní familiární hypercholesterolemie, kde standardní léčba nebyla úspěšná) a 9 podstoupilo LDL_ aferézu (z toho 6 nemocných s těžkou komplikovanou heterozygotní familiární hypercholesterolémií, kde standardní léčba nebyla úspěšná a 3 nemocní homozygotní formou familiární hypercholesterolemie). Jednalo se o nemocné, kde se předpokládala dlouhodobá léčba. V druhé části výzkumu byli nemocní již relativně stabilizováni na maximálních tolerovatelných dávkách léků a opakované extrakorporální eliminační terapii.

Jako kontrolní skupina byl zvolen definovaný soubor sér zdravých dárců krve z Transfúzního oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Pacient číslo	pohlaví	věk	léčba
1	M	29	LDL- aferéza
2	F	25	LDL- aferéza
3	F	57	hemorheoferéza
4	M	44	LDL- aferéza
5	M	55	hemorheoferéza
6	M	67	LDL- aferéza
7	F	64	LDL- aferéza
8	M	67	LDL- aferéza
9	M	46	hemorheoferéza
10	M	62	LDL- aferéza
11	F	66	LDL- aferéza
12	F	32	LDL- aferéza

Tabulka. č. 1 Soubor pacientů

4.2. Materiál a metody

Při léčbě těžkých forem FH byly použity dva extrakorporální eliminační léčebné postupy: LDL-aferéza a hemorheoferéza.

4.2.1. LDL – aferéza

Pacientova plazma byla oddělena od krevních tělísek pomocí separátoru s kontinuálním průtokem Cobe Spectra (COBE BCT inc., Denver, CO, USA), pracujícím na principu centrifugace. Byl užíván program verze 7.0 a separační sety č. 777-005-000 stejné firmy.

Plazma byla vedena do adsorpčně - desorpčního automatu ADA nebo ADAorb (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který řídí střídavé plnění (adsorpci) a promývání (regeneraci, desorpci) dvou imunoadsorpčních kolon LDL-Lipopak (Pocard Ltd., Moskva, Rusko).

Kolony obsahovaly na sefárovový gel navázané polyklonální ovčí protilátky proti lidskému apoB₁₀₀. Při průchodu kolonou jsou z plazmy odstraňovány LDL-částice a očištěná plazma se po spojení s krevními tělísky vrací zpět do oběhu pacienta. Když je kapacita kolony

vyčerpána, adsorpčně-desorpční automat odkloní tok plazmy do druhé kolony a zároveň zahájí regeneraci první kolony roztokem glycinového pufru o pH 2,4 (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který uvolňuje vazbu mezi protilátkami a apoB₁₀₀. Následně je pH v koloně upraveno roztokem PBS pufru o pH 7,4 (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který je po té odstraněn pomocí fyziologického roztoku. V automatu tak současně jednou kolonou prochází plazma a druhá kolona je regenerována. Toto sekvenční použití adsorpce a desorpce vede k teoreticky neomezené kapacitě systému, což má výhodu v možnosti nastavení délky procedury podle individuálních potřeb pacienta.

Základem pro volbu délky LDL-afézy je vstupní hodnota celkového a LDL-cholesterolu. Cílová hodnota celkového cholesterolu po ukončení LDL-afézy byla stanovena pod 2 mmol/l. Každý nemocný má svůj vlastní pár kolon, které jsou určeny k mnohonásobnému použití.

Mezi jednotlivými LDL-afézami jsou regenerované kolony skladovány při teplotě 2-8°C, naplněny roztokem PBS pufru s příměsí 0,01% azidu sodného (Medicap Clinic GmbH, Ulrichstein, Německo), který je před dalším užitím zcela odstraněn fyziologickým roztokem (5000 ml F 1/1 na každou kolonu). Vzhledem k toxicitě azidu sodného je zvykem pozvat nemocného k zahájení LDL-afézy až po dokončení procesu vymývání roztoku azidu sodného. Rovněž po ukončení terapie jsou kolony opět plněny PBS pufrům s příměsí azidu sodného až po odchodu nemocného z oddělení.

U všech nemocných byly užívány dva periferní venózní vstupy. K antikoagulaci je použit heparin (Heparin Léčiva inj., Česká republika), podaný v úvodu formou jednorázové dávky 2500 j. i.v. a následně kontinuální intravenózní infuzí 50 j./min. s postupným snižováním dávky od poloviny LDL-afézy až následným vysazením heparinu) a roztok citrátu ACD-A (500 ml roztoku obsahuje: kyselina citrónová 4,0 g, citrát sodný 11,0 g, glukóza 12,25 g; výrobce Baxter S.A., Lassines, Belgie), který je kontinuálně přidáván k plné krvi z přívodné žíly.

4.2.2. Hemoreoferéza

Plazma byla získávána stejným postupem separátorem (Cobe-Spectra); je prostá buněčných elementů po vysokootáčkové centrifugaci, získává se opět separátorem (Cobe-Spectra). Pak je proháněna “druhým stupněm” – filtrem. Jako sekundární filtry se doporučují

filtry Asahi, Kuraray, Kaneka, Ciprex, Excorim i další. Na pracovišti FNHK se používají filtry Evaflux 4A a 5A (Kuraray) s ethylen-vinyl-alkoholovými dutými vlákny, která mají otvory o velikosti 0,03 nebo 0,04 mikrometru. Průtok plazmy je kontinuální, antikoagulace prováděna heparinem, základní množství zpracovávané plazmy – 1,5 tělního objemu, vypočteno počítačem separátoru Cobe. Velikost pórů filtru umožňuje záchyt značného množství LDL-cholesterolu, lipoproteinu(a), fibrinogenu, α -2-makroglobulinu a imunoglobulinů, zejména IgM. Bližší specifikaci záchytu je nutno experimentálně přesněji vymezit a určit v jednotlivých indikacích u filtrů Evaflux (v ČR nejsou žádné, jinde nejsou s konkrétními filtry vyčerpávající zkušenosti). Technické detaily metody jsou obvyklé jako při aferetických procedurách.

4.2.3. Laboratorní metodika stanovení

Pacientům byly odebrány vzorky krve před a bezprostředně po provedené LDL-aferéze či hemoreoferéze. Z ní získané vzorky plazmy či séra byly ihned zmrazeny a uchovávány při teplotě -40°C . K detekci hladin vybraných ukazatelů aterogeneze byly využity metody enzymoimunoanalýzy (EIA) – ELISA a imunonefelometrie.

Sérové hladiny α -2-makroglobulinu byly stanoveny **imunonefelometricky** pomocí nefelometru IMAGE 800 (Beckman Coulter, Velká Británie) a imunoreagencií téže firmy.

Koncentrace IL-10 a sAPO-1/Fas byly stanoveny pomocí komerčních ELISA kitů (Bender MedSystems, Rakousko).

Hladiny endoglinu (sCD105) a sP-selektinu byly změřeny za použití ELISA souprav (R&D Systems, USA).

Ve všech případech se jednalo o využití principu sandwichové imunoanalýzy. Výsledná absorbance byla měřena na spektrofotometru MRX (Dynex) a vyhodnocena pomocí software Revelation (Dynex).

4.4. Statistické zpracování výsledků

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí software MedCalc (Mariakerke, Belgie). Normalita rozložení hodnot v souboru i podsouborech byla testována Pomocí *Kolmogorov-Smirnovova* testu. Základní charakteristikou zkoumaných souborů byl aritmetický průměr (v případě zjištěné normality) či medián (při nenormálním rozložení hodnot).

Testovací statistika

Po kontrole normality dat byly podsoubory sledovaného parametru porovnávány mezi sebou (PŘED aferézou × PO aferéze):

- parametrickým *t – testem* (tzv. Studentovým testem) v případě normálního rozložení dat
- neparametrickým *Wilcoxonovým testem* v případě nenormálního rozložení dat.

Úroveň statistických rozdílů je vyjádřena pomocí parametru p :

- vysoká statistická významnost $p < 0,001$
- střední statistická významnost $p (0,001 – 0,01)$
- nízká statistická významnost $p (0,01 – 0,05)$
- bez statistické významnosti $p > 0,05$

5. Výsledky

U vybraného souboru pacientů byly sledovány hladiny vybraných ukazatelů aterogeneze (plazmatický glykoprotein α -2-makroglobulin, IL-10, solubilní endoglin, solubilní apoptotický faktor sAPO-1/Fas a solubilní adhezivní molekulu P-selektin) a jejich změny po LDL- aferéze a reoferéze pomocí enzymoimunoanalýzy a imunonefelometrie.

Hodnoty koncentrace sledovaných parametrů u nemocných před a po LDL- aferéze a hemoreoferéze jsou uvedeny v Tabulce č. 2 a v Tabulce č.3. je uveden v Tabulce č. 4.

Statistické zhodnocení jednotlivých parametrů před a po LDL- aferéze, hemoreoferéze a oběma metodami je shrnuto v Tabulce. č. 5.

5.1. α -2-makroglobulin

Sérové hladiny α -2-makroglobulinu byly stanoveny imunonefelometricky pomocí analyzátoru IMAGE 800 firmy Beckman a imunoreagencií téže firmy. Průměrná koncentrace α -2-makroglobulin kontrolního souboru (n=63) byla 150,73 pg/ml.

- Podsoubor „ α -2-makroglobulin PŘED LDL-aferézou“ měl průměrnou koncentraci 181,06 pg/ml.
- Podsoubor „ α -2-makroglobulin PO LDL-aferéze“ měl průměrnou koncentraci 123,26 pg/ml.
- Podsoubor „ α -2-makroglobulin PŘED hemoreoferézou“ měl průměrnou koncentraci 213,84 pg/ml.
- Podsoubor „ α -2-makroglobulin PO hemoreoferéze“ měl průměrnou koncentraci 80,77 pg/ml.

Pokles koncentrace α -2-makroglobulinu po LDL- aferéze byl statisticky signifikantní ($p = 0,0001$; tj. vysoká statistická významnost) a je znázorněn v Grafu č. 1. Pokles koncentrace α -2-makroglobulinu po hemoreoferéze byl statisticky signifikantní ($p < 0,001$; tj. vysoká statistická významnost) a je znázorněn v Grafu č. 2. Pokles koncentrace alfa₂makroglobulinu po

LDL- aferéze byl o 31,92 %. Pokles koncentrace α -2-makroglobulin po hemoreoferéze byl o 62,23 %.

5.2. IL-10

Koncentrace IL-10 byla stanovena pomocí komerčních ELISA kitů (Bender MedSystems, Rakousko). Průměrná koncentrace IL-10 kontrolního souboru (n=63) byla 6,9 pg/ml.

- Podsubor „IL-10 PŘED LDL-aférezou“ měl průměrnou koncentraci 65,6 pg/ml.
- Podsubor „IL-10 PO LDL-aféřeze“ měl průměrnou koncentraci 65,13 pg/ml.
- Podsubor „IL-10 PŘED hemorheoferéze“ měl průměrnou koncentraci 53,02 pg/ml.
- Podsubor „IL-10 PO hemorheoferéze“ měl průměrnou koncentraci 51,37 pg/ml.

Pokles koncentrace IL-10 po LDL- aferéze nebyl statisticky signifikantní (p= 0,8825; bez statistické významnosti) a je znázorněn v Grafu č. 3. Pokles koncentrace IL-10 po hemoreoferéze nebyl statisticky signifikantní (p= 0,5457; bez statistické významnosti) a je znázorněn v Grafu č. 4. Pokles koncentrace IL-10 po LDL- aferéze byl o 0,72 %. Pokles koncentrace IL-10 po hemoreoferéze byl o 3,11 %.

5.3. sAPO-1/Fas

Koncentrace sAPO-1/Fas byla stanovována pomocí komerčních ELISA kitů (Bender MedSystems, Rakousko). Průměrná koncentrace sAPO-1/Fas kontrolního souboru (n=63) byla 841,1 pg/ml

- Podsubor „sAPO-1/Fas PŘED LDL-aférezou“ měl průměrnou koncentraci 792,13 pg/ml.

- Podsubor „sAPO-1/Fas PO LDL-afereze“ měl průměrnou koncentraci 576,92 pg/ml.
- Podsubor „sAPO-1/Fas PŘED hemoreoferézou“ měl průměrnou koncentraci 815,92 pg/ml.
- Podsubor „sAPO-1/Fas PO hemoreoferéze“ měl průměrnou koncentraci 623,18 pg/ml.

Pokles koncentrace sAPO/Fas po LDL- afereze byl statisticky signifikantní ($p= 0,0001$; vysoká statistická významnost) a je znázorněn v Grafu č. 5. Pokles koncentrace sAPO/Fas po hemoreoferéze byl statisticky signifikantní ($p= 0,0001$; vysoká statistická významnost) a je znázorněn v Grafu č. 6. Pokles koncentrace sAPO/Fas po LDL- afereze byl o 27,17 %. Pokles koncentrace sAPO/Fas po hemoreoferéze byl o 23,62 %.

5.4. Endoglin (sCD105)

Hladiny endoglinu (sCD105) byly změřeny za použití ELISA souprav (R&D Systems, USA). Průměrná koncentrace endoglinu (sCD105) kontrolního souboru ($n=63$) byla 4,88 mg/ml

- Podsubor „endoglin (sCD105) PŘED LDL-aferezou“ měl průměrnou koncentraci 6,3 mg/ml.
- Podsubor „endoglin (sCD105) PO LDL-afereze“ měl průměrnou koncentraci 5,28 mg/ml.
- Podsubor „endoglin (sCD105) PŘED hemoreoferézou“ měl průměrnou koncentraci 5,41 mg/ml.
- Podsubor „endoglin (sCD105) PO hemoreoferéze“ měl průměrnou koncentraci 5,00 mg/ml.

Pokles koncentrace endoglinu po LDL- afereze byl statisticky signifikantní ($p= 0,0001$; vysoká statistická významnost) a je znázorněn v Grafu č. 7. Pokles koncentrace endoglinu po hemoreoferéze byl statisticky významný ($p= 0,0205$; tj. nízká statistická významnost) je znázorněn v Grafu č. 8. Pokles koncentrace endoglinu po LDL- afereze byl o 16,19 %. Pokles koncentrace endoglinu po hemoreoferéze byl o 7,58%.

5.5. sP- selektin

Hladiny sP-selektinu byly změřeny za použití ELISA souprav (R&D Systems, USA). Průměrná koncentrace sP- selektinu kontrolního souboru (n=63) byla 90,78 mg/ml.

- Podsoubor „sP- selektin PŘED LDL-aférou“ měl průměrnou koncentraci 159,02 mg/ml.
- Podsoubor „sP- selektin PO LDL-aférou“ měl průměrnou koncentraci 168,23 mg/ml.
- Podsoubor „sP- selektin PŘED hemoreoferézou“ měl průměrnou koncentraci 96,29 mg/ml.
- Podsoubor „sP- selektin PO hemoreoferéze“ měl průměrnou koncentraci 87,92 mg/ml.

Pokles koncentrace sP- selektinu po LDL- aferéze byl statisticky signifikantní ($p= 0,0001$; vysoká statistická významnost) a je znázorněn v Grafu č. 9. Pokles koncentrace sP- selektinu po hemoreoferéze byl statisticky významný ($p= 0,0463$; tj. nízká statistická významnost) a je znázorněn Grafu č. 10. K poklesu koncentrace sP- selektinu po LDL- aferéze nedošlo. Byl zde nárůst koncentrace o 5,79 %. Pokles koncentrace sP- selektinu po hemoreoferéze byl o 8,69 %.

6. Tabulky a grafy

6.1. Přehled naměřených hodnot

V tabulkách č. 2 a č. 3 jsou uvedeny naměřené hodnoty všech sledovaných ukazatelů aterogeneze, a to PŘED procedurami (Tabulka č.2) a PO procedurách (Tabulka č.3). Přehled naměřených hodnot sledovaných parametrů u kontrolní skupinky uvádí tabulce. č. 4.

6.2. Statistické zpracování výsledků

Vyhodnocení významnosti poklesu hodnot u sledovaných ukazatelů aterogeneze. Statistické zhodnocení jednotlivých parametrů před a po LDL- aferéze, hemoreoferéze a obojím jsou uvedeny v Tabulce. č. 5. Procento rozdílu poklesu hladiny základních patogenických činitelů po LDL- aferéze, hemoreoferéze a obojím ukazuje Tabulka č. 6. Procento rozdílu poklesu hladiny sledovaných činitelů po LDL- aferéze, hemoreoferéze a oběma těmito metodami ukazuje Tabulka. č. 7.

6.3. Grafické zpracování výsledků

Změny sledovaných parametrů po LDL- aferéze a hemoreoferéze jsou znázorněny pomocí sloupcových grafů (Grafy č.1-10). Grafy jsou zobrazeny v podobě „Box and Whisker plotu“: Střed obdélníku představuje medián, spodní hrana 25. percentil, horní hrana 75. percentil a úsečky minimum a maximum po vyloučení odlehlých hodnot, které jsou znázorněny samostatnými body.

parametr	skupina	n	před	
			průměr	SD
A2M	LDL	78	181,06	55,89
	LDL rheo	44	213,84	35,67
	LDL + rheo	122	192,88	51,86
IL-10	LDL	78	65,6	31,85
	LDL rheo	44	53,02	24,45
	LDL + rheo	122	61,07	29,91
sAPO/Fas	LDL	78	792,13	279,61
	LDL rheo	44	815,92	359,14
	LDL + rheo	122	800,71	309,39
sP-selektin	LDL	78	159,02	67,1
	LDL rheo	44	96,29	23,77
	LDL + rheo	122	136,4	63,09
endoglin	LDL	78	6,3	1,51
	LDL rheo	44	5,41	1,68
	LDL + rheo	122	5,98	1,62

Tabulka č.2 Přehled naměřených parametrů před LDL- aferézou, hemoreoferézou a kombinace obou těchto metod.

LDL = nemocní s FH, léčení LDL-aferézou; LDL rheo = nemocní s FH, léčení rheoferézou; LDL + rheo = oba soubory dohromady, tj. všichni sledovaní nemocní; n= počet hodnot, SD= směrodatná odchylka

parametr	skupina	n	Po	
			průměr	SD
A2M	LDL	78	123,26	50,82
	LDL rheo	44	80,77	31,87
	LDL + rheo	122	107,94	49,23
IL-10	LDL	78	65,13	29,98
	LDL rheo	44	51,37	23,05
	LDL + rheo	122	60,17	28,37
sAPO/Fas	LDL	78	576,92	275,84
	LDL rheo	44	623,18	252,32
	LDL + rheo	122	593,6	267,47
sP-selektin	LDL	78	168,23	196,82
	LDL rheo	44	87,92	23,77
	LDL + rheo	122	139,27	162,33
Endoglin	LDL	78	5,28	1,73
	LDL rheo	44	5	1,62
	LDL + rheo	122	5,18	1,69

Tabulka č. 3 Přehled naměřených parametrů po LDL- aferéze, hemoreoferéze a kombinace obou těchto metod.

LDL = nemocní s FH, léčení LDL-aferézou; LDL rheo = nemocní s FH, léčení rheoferézou; LDL + rheo = oba soubory dohromady, tj. všichni sledovaní nemocní; n= počet hodnot, SD= směrodatná odchylka

parametr	n	průměr	SD
A2M(pg/ml)	63	150,73	53,44
IL-10 (pg/ml)	63	1,44	1,01
sAPO-Fas (pg/ml)	63	841,1	407,4
sP- selektin (ng/ml)	63	90,78	21,98
endoglin (ng/ml)	63	4,88	0,95

Tabulka. č. 4: Hodnoty kontrolního souboru

N= počet hodnot, SD= hodnota směrodatné odchylky

parametr	před procedurou				po proceduře			před x po proceduře	
	skupina	n	průměr	rozložení	n	průměr	rozložení	test	hodnota p
<i>α-2-makroglobulin (pg/ml)</i>	FH+LDL	78	181,06	NO	78	123,26	NO	t-test	< 0,0001
	FH+rheo	44	213,84	NO	44	80,77	NE	Wilcoxon test	< 0,0001
	FH	122	192,88	NO	122	107,94	NO	t-test	< 0,0001
IL-10 (pg/ml)	FH+LDL	78	65,6	NO	78	65,13	NO	t-test	0,8825
	FH+rheo	44	53,02	NO	44	51,37	NO	t-test	0,5457
	FH	122	61,07	NO	122	60,17	NO	t-test	0,6916
sAPO-Fas (pg/ml)	FH+LDL	78	792,13	NO	78	576,92	NO	t-test	< 0,0001
	FH+rheo	44	815,92	NO	44	623,18	NO	t-test	< 0,0001
	FH	122	800,71	NO	122	593,6	NO	t-test	< 0,0001
sP-selektin (ng/ml)	FH+LDL	78	159,02	NO	78	168,23	NE	Wilcoxon test	0,0001
	FH+rheo	44	96,29	NO	44	87,92	NO	t-test	0,0463
	FH	122	136,4	NE	122	139,27	NE	Wilcoxon test	< 0,0001
endoglin (ng/ml)	FH+LDL	78	6,3	NO	78	5,28	NO	t-test	< 0,0001
	FH+rheo	44	5,41	NO	44	5	NO	t-test	0,0205
	FH	122	5,98	NO	122	5,18	NO	t-test	< 0,0001

Tabulka. č. 5: Statistické zhodnocení jednotlivých parametrů před a po LDL- aferéze, hemoreoferéze a oběma těmito metodami.

n- počet hodnot; NE- nenormální rozložení; NO- normální rozložení; P – statistická významnost

Parametr	Skupina	n	Před	Po		% rozdílů
			Průměr	n	Průměr	(před-po)/před x100
Celkový cholesterol (mmol/L)	FH+LDL	75	5,97	75	1,84	69,18
	FH+rheo	44	6,54	44	2,45	62,54
	FH	119	6,18	119	2,07	66,5
LDL-cholesterol (mmol/L)	FH+LDL	74	4,06	75	0,64	84,24
	FH+rheo	44	4,44	44	1,36	69,37
	FH	118	4,2	119	0,91	78,33
HDL-cholesterol (mmol/L)	FH+LDL	74	1,7	75	1,01	40,59
	FH+rheo	44	1,23	44	0,75	39,02
	FH	118	1,32	119	0,91	31,06
α-2-makroglobulin (mg/dl)	FH+LDL	78	181,06	78	123,26	31,92
	FH+rheo	44	213,84	44	80,77	62,23
	FH	122	192,88	122	107,94	44,04

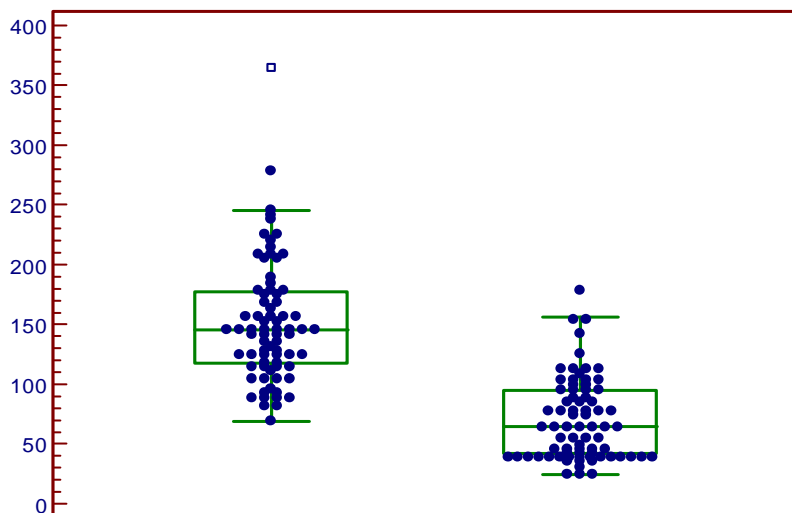
Tabulka č. 6: Procento rozdílů poklesu hladiny základních patogenických činitelů po LDL-aféřeze, hemorheoferéze a oběma metodami.

FH+LDL = nemocní s FH, léčení LDL-aférezou; FH+rheo = nemocní s FH, léčení rheoferézou; FH = oba soubory dohromady, tj. všichni sledovaní nemocní

Parametr	Skupina	n	Před	Po		% rozdílu
			Průměr	n	Průměr	(před-po)/před x100
IL-10 (pg/ml)	FH+LDL	78	65,6	78	65,13	0,72
	FH+rheo	44	53,02	44	51,37	3,11
	FH	122	61,07	122	60,17	1,47
sAPO-Fas (pg/ml)	FH+LDL	78	792,13	78	576,92	27,17
	FH+rheo	44	815,92	44	623,18	23,62
	FH	122	800,71	122	593,6	25,87
sP-selektin (ng/ml)	FH+LDL	78	159,02	78	168,23	-5,79
	FH+rheo	44	96,29	44	87,92	8,69
	FH	122	136,4	122	139,27	-2,1
Endoglin (ng/ml)	FH+LDL	78	6,3	78	5,28	16,19
	FH+rheo	44	5,41	44	5	7,58
	FH	122	5,98	122	5,18	13,38

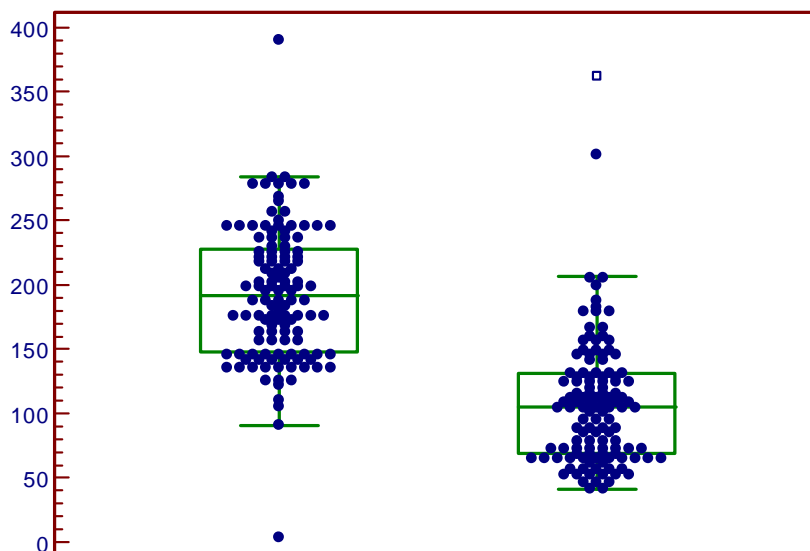
Tabulka. č. 7: Procento rozdílu poklesu hladiny sledovaných činitelů po LDL- aferéze, hemorheoferéze a oběma metodami.

FH+LDL = nemocní s FH, léčení LDL-aferézou; FH+rheo = nemocní s FH, léčení rheoferézou; FH = oba soubory dohromady, tj. všichni sledovaní nemocní



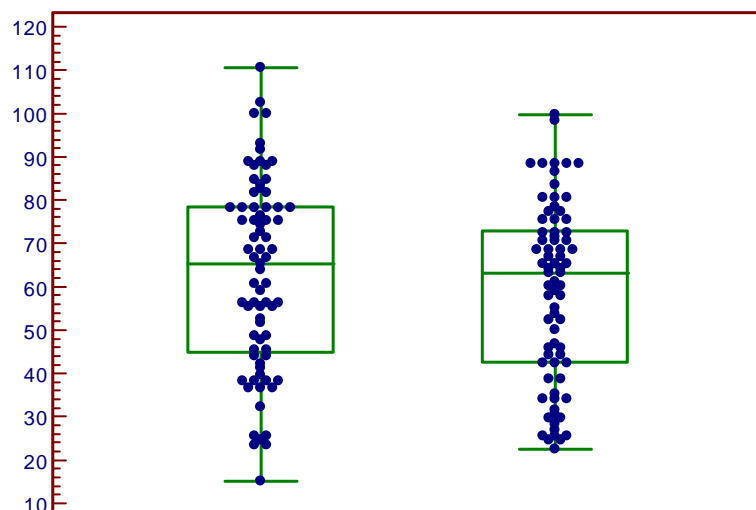
Graf č. 1. Hodnoty koncentrace alfa₂-makroglobulinu po LDL- aferéze.

Pokles koncentrace α -2-makroglobulinu po LDL- aferéze byl statisticky signifikantní ($p = 0,0001$; tj. vysoká statistická významnost).



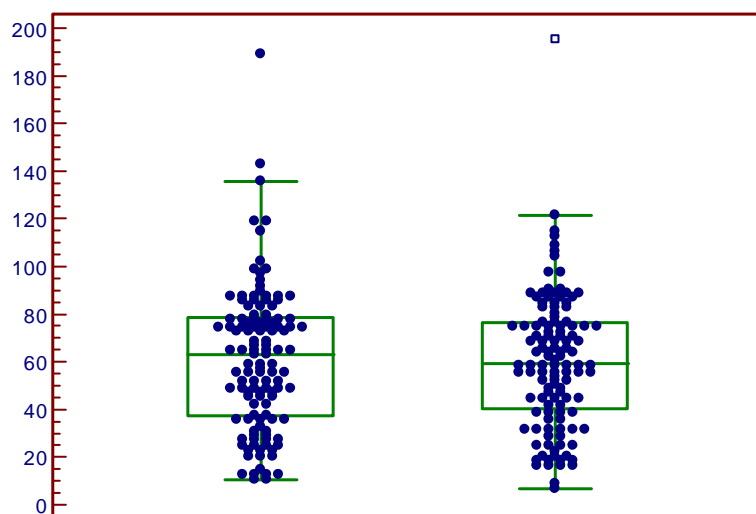
Graf č. 2 Hodnoty koncentrace α -2-makroglobulinu po hemoreoferéze.

Pokles koncentrace α -2-makroglobulinu po hemoreoferéze byl statisticky signifikantní ($p= 0$; tj. vysoká statistická významnost)



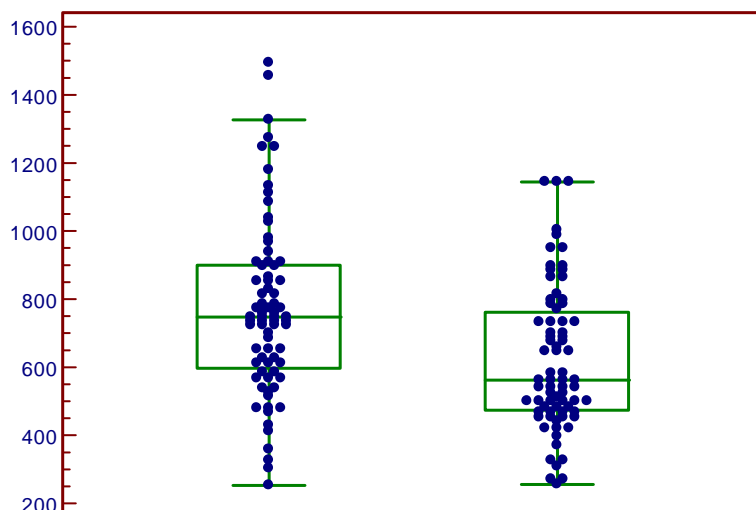
Graf č. 3. Hodnoty koncentrace IL-10 po LDL- aferéze.

Pokles koncentrace IL-10 po LDL- aferéze byl bez statistické významnosti ($p=0,8825$)



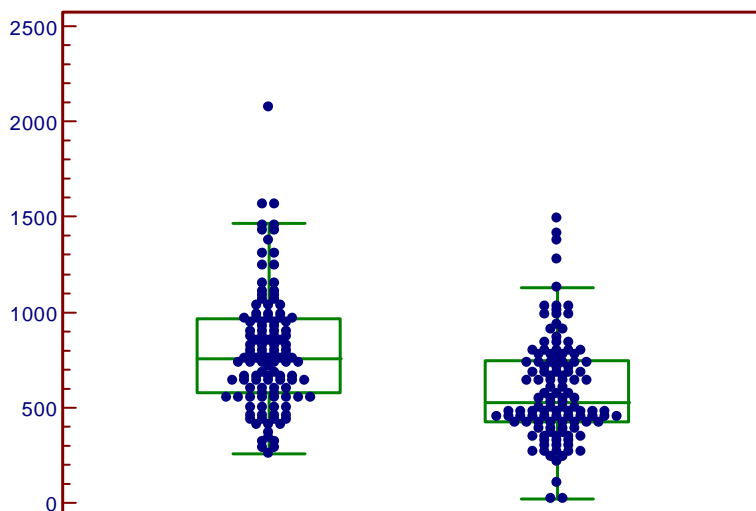
Graf č. 4. Hodnoty koncentrace IL-10 po hemoreoferéze.

Pokles koncentrace IL-10 po hemoreoferézi bez statistické významnosti ($p=0,5457$)



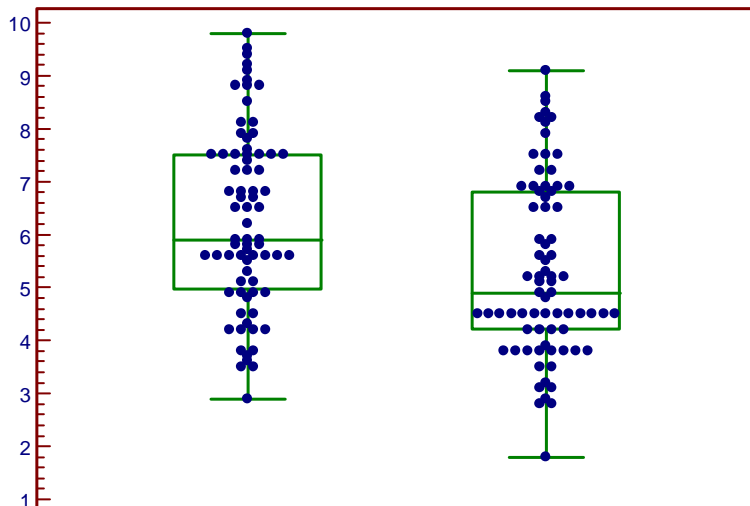
Graf č. 5. Hodnoty koncentrace sAPO-1/Fas po LDL- aferéze.

Pokles koncentrace sAPO-1/Fas po LDL- aferéze byl statisticky signifikantní ($p = 0,0001$; tj. vysoká statistická významnost).



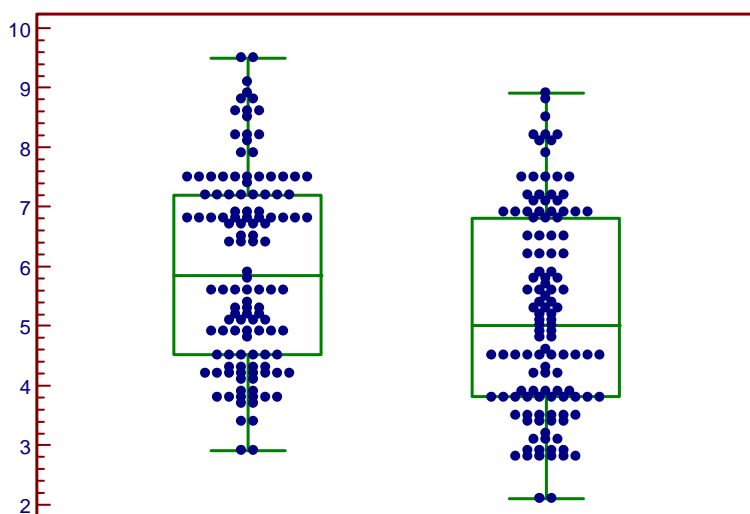
Graf č. 6. Hodnoty koncentrace sAPO-1/Fas po hemoreoferéze.

Pokles koncentrace sAPO-1/Fas po hemoreoferézi byl statisticky signifikantní ($p = 0,0001$; tj. vysoká statistická významnost).



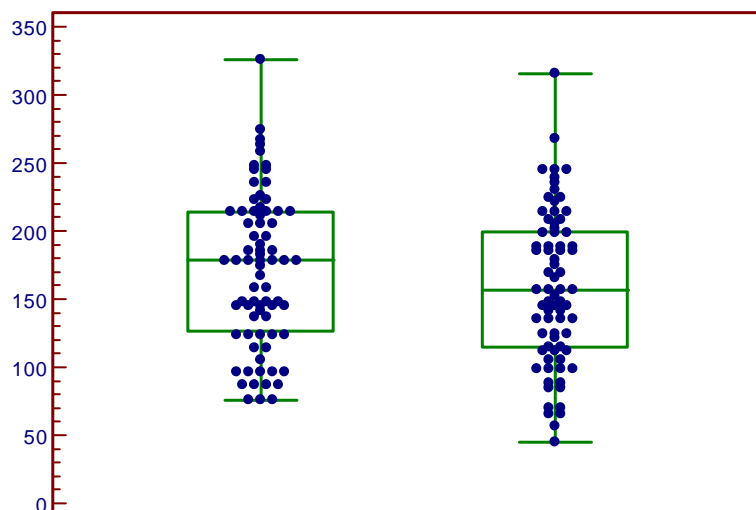
Graf č. 7. Hodnoty koncentrace endoglinu po LDL-aféze.

Pokles koncentrace endoglinu po LDL-aféze byl statisticky signifikantní ($p=0,0001$; vysoká statistická významnosť).



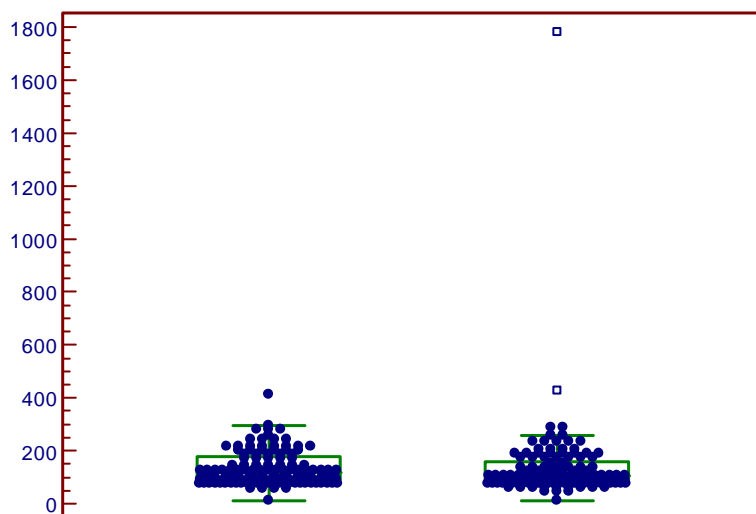
Graf č. 8. Hodnoty koncentrace endoglinu po hemoreoferéze.

Pokles koncentrace endoglinu po hemoreoferéze byl statisticky signifikantní ($p=0,0205$; nízka statistická významnosť).



Graf č. 9 Hodnoty koncentrace sP- selektinu po LDL-aféze.

K poklesu koncentrace sP- selektinu po LDL- aféze nedošlo.



Graf č. 10 Hodnoty koncentrace sP- selektinu po hemoreoferéze.

Pokles koncentrace sP- selektinu po hemoreoferéze byl statisticky významný ($p=0,0463$; tj. nízká statistická významnost).

7. Diskuze

Familiární hypercholesterolemie je onemocnění prokazatelně spojené s dysfunkcí endotelu považovanou za klinicky němou fázi aterosklerózy¹⁰¹. Klíčovou roli v tomto procesu hraje nakumulování LDL-částic a jejich následné ukládání v intimě arterií. Snížení plazmatických hladin LDL cholesterolu je považováno pak za jednu z neefektivnějších intervencí snižujících morbiditu a mortalitu v populaci vyspělých zemí. Důležitou roli v celém komplexu aterogeneze hraje imunitní systém prostřednictvím svých efektorových a regulačních molekul a jeho obraz je odrazem progresu ATS.

V této práci, která navazuje a je součástí komplexního studia extrakorporálních deplečních metod jsme se zaměřili na změny vybraných ukazatelů aktivace endotelu po LDL-aferéze a hemoreoferéze. Současně jsme si kladli za cíl srovnat tyto dvě metody z pohledu právě vybraných markerů (plazmatický glykoprotein α -2-makroglobulin, IL-10, solubilní endoglin, solubilní apoptotický faktor sAPO-1/Fas a solubilní adhezivní molekulu P-selektin. Vyšetřovaný soubor tvořilo dvanáct pacientů s prokázáním aterosklerotickým postižením.

Existuje řada zahraničních studií, které se zabývaly skupinou obdobných hyperlipidemických pacientů, léčených jak metodou LDL-aferézy, tak i hemoreoferézou. Zpravidla prokazují účinnost léčby (změny lipidových faktorů), což je u pacientů s FH léčených extrakorporální eliminací základním laboratorním ukazatelem. I když nejde o okamžitý ukazatel aktivity ateromatosy, jako se např. ukázal být endoglin, je to důležitý léčebný efekt z hlediska dlouhodobější prognózy.

V rámci širšího konceptu studie bylo i měření lipidového profilu prováděného paralelně s příslušnými imunologickými ukazateli.

Ve všech sledovaných lipidových parametrech (celkový cholesterol, LDL-cholesterol a HDL-cholesterol) byl prokázán významný pokles. LDL cholesterol klesá po procedurách velmi podstatně, což je věc zásadní důležitosti – průměrně o 78,33 %, a to více po LDL-aferéze (84,24 %), po hemoreoferéze méně – o 69,37 %. I když tento výsledek a rozdíl je pokládán za klinicky významný a v literatuře diskutovaný a takto ve starších pracech hodnocený^{3, 10, 11}, při našem

statistickém hodnocení není rozdíl poklesu při LDL-aféřeze oproti reoferéze významný ($p = 0,11$). K významnému poklesu došlo i u ostatních sledovaných parametrů (viz Tabulka č. 6).

Plazmatický glykoprotein **α -2-makroglobulin** je jedním z nejdéle známých imunologických aterogenních faktorů a nověji se poukazuje i na význam jeho polymorfismu v atherogenezi³⁰. Štěpící schopnost α -2-makroglobulinu se prokazatelně podílí na rozvoji ATS plátů prostřednictvím poškozování intracelulární matrix^{31, 32} a v aterosklerotických tepnách byl nalezen ve vyšších hladinách³². V této studii byl jak u LDL-aféřezy, tak u hemoreoferézy pozorován signifikantní pokles hladin po proceduře (v obou případech s $p < 0,001$; tj. s vysokou statistickou významností). Pokles hladin u LDL-aféřezy činil 31,92 %, zatímco u hemoreoferézy to bylo dvojnásobně (44,04 %). Důvodem rozdílnosti tohoto poklesu může být schopnost reoferézy selektivně eliminovat v závislosti na použitém filtru kromě LDL částic i jiné makromolekuly jako např. lipoprotein (a), fibrinogen, α -2-makroglobulin a imunoglobuliny, zejména IgM^{5, 86}. V případě rozdílnosti nárůstu se tedy jedná spíše o přímý důsledek eliminační metody než o sekundární jev způsobený regresí atherogeneze. Na druhou stranu signifikantní pokles mediánu hodnot v případě LDL-aféřezy ukazuje, že v důsledku LDL deplece dochází i významnému sekundárnímu působení a zlepšení atherogeneze^{9, 10}. Positivní účinek snížení plazmatických hladin α -2-makroglobulinu může být podtržen jeho schopností inhibice prokoagulačního proteinu C³⁶.

IL-10 je zásadním hráčem v down-regulaci adaptivní i přirozené imunity. Ve vztahu k ATS inhibuje IL-10 produkci řady cytokinů⁶⁷ a jeho schopnost atenuace progresu byla nezpochybnitelně prokázána na několika animálních modelech⁶⁸ a uvažuje se, že by mohl být důležitým momentem stabilizace anginy pectoris proti proinflamatorním působkům⁶⁹ či jako stabilizátor ATS plátu⁷⁰. V této studii nebyl pokles hladin IL-10 jak po LDL-aféřeze (0,72 %), tak po hemoreoferéze (3,11 %) signifikantní (LDL-reoferéza $p = 0,8825$, hemoreoferéza $p = 0,5457$). V našem případě se ale jedná o pozitivní výsledek, neboť snížení antiaterogenního faktoru, označovaného jako „imunologický skalpel“⁷⁴ v obou případech bylo nežádoucím¹⁰².

Pozoruhodné bylo i sledování proapoptického ukazatele **sAPO-1/Fas** (též CD95). Ten po spojení se svým vazebným partnerem (Fas-ligand – CD178) indukuje cesty vnější apoptotické kaskády. sAPO-1/Fas byl u osob s renálním selháním prokázán ve spojení s koronární a periferní ATS^{75, 76}. Korelace Fas ligandu a endoteliální dysfunkce byla nalezena i na úrovni mRNA u cirkulujících leukocytů. Tento nález byl potvrzen specificky pouze u

hyperlipidemických pacientů⁷⁸. V našem výzkumu byla hladina sAPO-1/Fas jak po LDL- aferéze tak po hemoreoferéze snížena signifikantně ($p=0,0001$; vysoká statistická významnost). Pokles koncentrace sAPO-1/Fas po LDL- aferéze byl o 27,17 %, pokles koncentrace sAPO-1/Fas po hemoreoferéze byl o 23,62 %. Obě tyto metody jsou tedy se týče efektivity snížení srovnatelné a vedou k významnému snížení proaterogenního faktoru. Otázka klinického významu tohoto nálezu však ve světle novějších studií nevyznívá právě jednoznačně. U pacientů s hypertenzí měřením tloušťky karotidální intimy a média (intima-media thickness) potvrdila pozitivní korelaci totiž s pouze Fas-ligandem, nikoliv se solubilním Fas receptorem⁷⁷ a jednoznačnost proterogenního působení solubilního Fas receptoru nebyla potvrzena ani ve studii na zdravé populaci⁷⁹. Zatímco tedy membránová exprese Fas receptoru je jednoznačně zvažována jako mechanismus apoptogenního působení angiotensinu II v hladkosvalových cévních buňkách⁸⁰, otázka významu sAPO-1/Fas ve vztahu k ATS zůstává otevřená.

Sledování **P-selektinu** (CD62P) umožnilo pozorovat změny adhezivního proaterogenních faktorů a nahlédnout tak pod pokličku časných markerů aterogenních změn trombocytární³⁸ i endoteliální⁴⁴ aktivace. Jeho působení je komplexní, participuje také na interakci trombocytů s monocyty⁴⁵ aby pak společně mohly migrovat do endotelu⁴⁷. Je to důležitý ukazatel nejenom vzniku, ale i progresu ATS⁴⁸ a je rovněž považován za ukazatele stability aterosklerotických plátů⁴⁹. V našem měření byl zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl koncentrace sP-selektinu po LDL- aferéze ($p=0,0001$; vysoká statistická významnost) i po hemoreoferéze ($p=0,0463$; tj. nízká statistická významnost). Hladina sP-selektinu se ale u našich pacientů nechovala standardně. V předchozí studii o několika desítkách měření u 6 pacientů s FH po LDL- aferéze klesala, takže se uvažovalo o využití tohoto jevu jako ukazatele aktivity atheromatosy⁹. V tomto výzkumu však hladina sP-selektinu po LDL- aferéze lehce stoupla (5,79 %). Naopak po reoferéze poněkud poklesla (o 8,69 %). Při hodnocení skupiny jako celku byl vzestup hladiny po výkonu o 2,1 %, což jistě není významné klinicky, ale statisticky ano. Jde pravděpodobně o malá čísla, bude třeba dalších měření. Pokles P-selektinu by se dal podpořit výsledky studie heparinem indukované precipitace LDL-cholesterolu (metoda HELP firmy B. Braun, Melsungen, Německo), kde se však, na rozdíl od našeho souboru, na poklesu podílela také eliminace P-selektinu v koloně¹⁰³.

Plazmatické nebo sérové hladiny solubilního **endoglinu** (sCD105) jsou považovány za znak aktivace endotelu či jeho poškození nebo reparace^{59, 60} a korelují i s celkovými hladinami cholesterolu⁶¹. Normalizace hladin endoglinu je považována za důležitý indikátor regrese ATS u

pacientů s FH, kde aktivace endoglinu (výše popsané buněčné typy) hraje zásadní roli^{54, 56, 57, 60}. Ve vztahu k extrakorální LDL eliminační terapii se endoglin jeví jako slibný sérový marker ukazující účinnost extrakorální eliminace a tato hypotéza byla později potvrzena⁶². Rozsáhlejší studie, která by status sCD105 nezpochybnitelně potvrdila, však doposud chybí. V našem výzkumu byl rozdíl koncentrací endoglinu po LDL- aferéze statisticky signifikantní ($p=0,0001$; vysoká statistická významnost). Pokles koncentrace endoglinu po hemoreoferéze byl statisticky významný ($p=0,0205$; tj. nízká statistická významnost). Pokles hladin po LDL- aferéze byl sice klinicky významný (16,19 %), ale s nízkou statistickou významností rozdílu. Naproti tomu, pokles hladin u hemoreoferézy byl sice nižší (7,58 %), ale pokles měl vysokou statistickou významnost a hovoří spíše ve prospěch hemoreoferézy. Studie tedy potvrdila předchozí nálezy, že u LDL-deplečních metod se endoglin může skutečně uplatnit jako marker regrese aterosklerotických změn⁶².

8. Závěr

Z pohledu sledovaných imunologických markerů byly pozorovány tyto změny:

- a) V případě α -2-makroglobulinu došlo v obou případech k statisticky významnému snížení, u LDL-afézy toto snížení bylo dvojnásobné ve srovnání s hemoferézou.
- b) U antiaterogenního faktoru IL-10 nedošlo vlivem užití deplečních metod ke změnám plazmatických hladin.
- c) U proapoptického markeru sAPO-1/Fas došlo u obou metod k významnému a srovnatelnému poklesu.
- d) Hladina solubilního P-selektinu po LDL-aféze lehce stoupla, naopak po reoferéze došlo k mírnému poklesu.
- e) U endoglinu pokles hladin po LDL-aféze byl sice klinicky významný, ale s nízkou statistickou významností rozdílu. Naproti tomu, pokles hladin u hemoferézy byl sice nižší, ale měl vysokou statistickou významnost.

Komparaci LDL-afézy a hemoferézy však nelze řešit pouhým konstatováním z jednoho hlediska (např. lipidologického, reologického, imunologického či finančního). Z pohledů ostatních dat komplexní studie vyznívá LDL-aféza příznivěji.

9. Literatura

- (1) Spacil, J. *Cas Lek Cesk* **2006**, *145*, 284-287.
- (2) Hollander, M.; Hak, A. E.; Koudstaal, P. J.; Bots, M. L.; Grobbee, D. E.; Hofman, A.; Witteman, J. C.; Breteler, M. M. *Stroke* **2003**, *34*, 2367-2372.
- (3) Thompson, G. R. *Atherosclerosis* **2008**, *198*, 247-255.
- (4) Thompson, G. R.; Barbir, M.; Davies, D.; Dobral, P.; Gesinde, M.; Livingston, M.; Mandry, P.; Marais, A. D.; Matthews, S.; Neuwirth, C.; Pottle, A.; le Roux, C.; Scullard, D.; Tyler, C.; Watkins, S. *Atherosclerosis*, *208*, 317-321.
- (5) Blaha, M. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **2003**, *46*, 3-7.
- (6) Klingel, R.; Fassbender, T.; Fassbender, C.; Gohlen, B. *Ther Apher Dial* **2003**, *7*, 350-358.
- (7) Blaha, M.; Rencova, E.; Blaha, V.; Maly, R.; Blazek, M.; Studnicka, J.; Andrys, C.; Fatorova, I.; Filip, S.; Kasparova, M.; Prochazkova, R.; Maly, J.; Zimova, R.; Langrova, H. *Clin Hemorheol Microcirc* **2009**, *42*, 37-46.
- (8) Blaha, M.; Pit'ha, J.; Blaha, V.; Lanska, M.; Maly, J.; Filip, S.; Langrova, H. *J Biomed Biotechnol*, *2010*, 419520.
- (9) Blaha, M.; Zadak, Z.; Blaha, V.; Andrys, C.; Havel, E.; Vyroubal, P.; Blazek, M.; Filip, S.; Lanska, M.; Maly, J. *Atheroscler Suppl* **2009**, *10*, 17-20.
- (10) Borberg, H. *Transfus Apher Sci* **2009**, *41*, 49-59.
- (11) Thompson, G. R. *Heart* **2004**, *90*, 949-955.
- (12) In <http://www.wwpdb.org/>.
- (13) Rader, D. J.; Cohen, J.; Hobbs, H. H. *J Clin Invest* **2003**, *111*, 1795-1803.
- (14) Sniderman, A. D.; Castro Cabezas, M.; Ribalta, J.; Carmena, R.; de Bruin, T. W.; de Graaf, J.; Erkelens, D. W.; Humphries, S. E.; Masana, L.; Real, J. T.; Talmud, P. J.; Taskinen, M. R. *Eur J Clin Invest* **2002**, *32*, 71-73.
- (15) Libby, P. *J Intern Med* **2000**, *247*, 349-358.
- (16) Luscher, T. F.; Barton, M. *Clin Cardiol* **1997**, *20*, II-3-10.
- (17) Ross, R. *N Engl J Med* **1999**, *340*, 115-126.
- (18) Dart, A. M.; Chin-Dusting, J. P. *Cardiovasc Res* **1999**, *43*, 308-322.
- (19) Cines, D. B. *Am Heart J* **1998**, *135*, S152-159.
- (20) Creemers, E. E.; Cleutjens, J. P.; Smits, J. F.; Daemen, M. J. *Circ Res* **2001**, *89*, 201-210.
- (21) Erren, M.; Reinecke, H.; Junker, R.; Fobker, M.; Schulte, H.; Schurek, J. O.; Kropf, J.; Kerber, S.; Breithardt, G.; Assmann, G.; Cullen, P. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1999**, *19*, 2355-2363.
- (22) Libby, P. *Sci Am* **2002**, *286*, 46-55.
- (23) Hansson, G. K. *N Engl J Med* **2005**, *352*, 1685-1695.
- (24) Blaha, M.; Krejsek, J.; Blaha, V.; Andrys, J.; Vokurkova, D.; Maly, J.; Blazek, M.; Skorepova, M. *Physiol Res* **2004**, *53*, 273-278.
- (25) Kapoor, M. C.; Ramachandran, T. R. *Ann Card Anaesth* **2004**, *7*, 113-128.
- (26) Cole, J. E.; Georgiou, E.; Monaco, C. *Mediators Inflamm*, *2010*, 393946.
- (27) Siervo, M.; Ruggiero, D.; Sorice, R.; Nutile, T.; Aversano, M.; Stephan, B. C.; Ciullo, M. *J Intern Med*.

- (28) Abe, K.; Yamamoto, K.; Sinohara, H. *J Biochem* **1989**, *106*, 564-568.
- (29) Fryksmark, U.; Ohlsson, K.; Rosengren, M.; Tegner, H. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **1983**, *364*, 793-800.
- (30) Larionov, S.; Dedeck, O.; Birkenmeier, G.; Orantes, M.; Ghebremedhin, E.; Thal, D. R. *Neuropathol Appl Neurobiol* **2006**, *32*, 451-454.
- (31) Barrett, A. J.; Starkey, P. M. *Biochem J* **1973**, *133*, 709-724.
- (32) Smith, E. B. *Am J Pathol* **1977**, *86*, 665-674.
- (33) Kristensen, T.; Moestrup, S. K.; Gliemann, J.; Bendtsen, L.; Sand, O.; Sottrup-Jensen, L. *FEBS Lett* **1990**, *276*, 151-155.
- (34) Strickland, D. K.; Ashcom, J. D.; Williams, S.; Burgess, W. H.; Migliorini, M.; Argraves, W. S. *J Biol Chem* **1990**, *265*, 17401-17404.
- (35) Mori, T.; Sasaki, J.; Kawaguchi, H.; Handa, K.; Takada, Y.; Matsunaga, A.; Kono, S.; Arakawa, K. *Am Heart J* **1995**, *129*, 234-238.
- (36) Hoogendoorn, H.; Toh, C. H.; Nesheim, M. E.; Giles, A. R. *Blood* **1991**, *78*, 2283-2290.
- (37) Parhami, F.; Fang, Z. T.; Fogelman, A. M.; Andalibi, A.; Territo, M. C.; Berliner, J. A. *J Clin Invest* **1993**, *92*, 471-478.
- (38) Somers, W. S.; Tang, J.; Shaw, G. D.; Camphausen, R. T. *Cell* **2000**, *103*, 467-479.
- (39) Springer, T. A. *Nature* **1990**, *346*, 425-434.
- (40) Giddings, J. C. *Biochem Soc Trans* **2005**, *33*, 406-408.
- (41) Cambien, B.; Wagner, D. D. *Trends Mol Med* **2004**, *10*, 179-186.
- (42) McEver, R. P.; Moore, K. L.; Cummings, R. D. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 11025-11028.
- (43) Osmancik, P.; Kvasnicka, J.; Widimsky, P.; Tarnok, A. *Cardiology* **2004**, *102*, 194-199.
- (44) Burger, P. C.; Wagner, D. D. *Blood* **2003**, *101*, 2661-2666.
- (45) Frenette, P. S.; Johnson, R. C.; Hynes, R. O.; Wagner, D. D. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 7450-7454.
- (46) Michelson, A. D.; Barnard, M. R.; Krueger, L. A.; Valeri, C. R.; Furman, M. I. *Circulation* **2001**, *104*, 1533-1537.
- (47) Frenette, P. S.; Denis, C. V.; Weiss, L.; Jurk, K.; Subbarao, S.; Kehrel, B.; Hartwig, J. H.; Vestweber, D.; Wagner, D. D. *J Exp Med* **2000**, *191*, 1413-1422.
- (48) Wagner, D. D.; Burger, P. C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**, *23*, 2131-2137.
- (49) Draz, N.; Hamdy, M. S.; Gomaa, Y.; Ramzy, A. A. *Egypt J Immunol* **2003**, *10*, 83-87.
- (50) Hillis, G. S.; Terregino, C.; Taggart, P.; Killian, A.; Zhao, N.; Dalsey, W. C.; Mangione, A. *Am Heart J* **2002**, *143*, 235-241.
- (51) Llorca, O.; Trujillo, A.; Blanco, F. J.; Bernabeu, C. *J Mol Biol* **2007**, *365*, 694-705.
- (52) del Re, E.; Babitt, J. L.; Pirani, A.; Schneyer, A. L.; Lin, H. Y. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 22765-22772.
- (53) Wong, S. H.; Hamel, L.; Chevalier, S.; Philip, A. *Eur J Biochem* **2000**, *267*, 5550-5560.
- (54) McAllister, K. A.; Grogg, K. M.; Johnson, D. W.; Gallione, C. J.; Baldwin, M. A.; Jackson, C. E.; Helmbold, E. A.; Markel, D. S.; McKinnon, W. C.; Murrell, J.; et al. *Nat Genet* **1994**, *8*, 345-351.
- (55) Li, D. Y.; Zhang, Y. C.; Philips, M. I.; Sawamura, T.; Mehta, J. L. *Circ Res* **1999**, *84*, 1043-1049.

- (56) van de Kerkhof, P. C.; Rulo, H. F.; van Pelt, J. P.; van Vlijmen-Willems, I. M.; De Jong, E. M. *Acta Derm Venereol* **1998**, *78*, 19-21.
- (57) Guerrero-Esteo, M.; Lastres, P.; Letamendia, A.; Perez-Alvarez, M. J.; Langa, C.; Lopez, L. A.; Fabra, A.; Garcia-Pardo, A.; Vera, S.; Letarte, M.; Bernabeu, C. *Eur J Cell Biol* **1999**, *78*, 614-623.
- (58) Tashiro, H.; Shimokawa, H.; Sadamatu, K.; Yamamoto, K. *Coron Artery Dis* **2002**, *13*, 139-143.
- (59) Li, C. G.; Bethell, H.; Wilson, P. B.; Bhatnagar, D.; Walker, M. G.; Kumar, S. *Atherosclerosis* **2000**, *152*, 249-256.
- (60) Li, C.; Hampson, I. N.; Hampson, L.; Kumar, P.; Bernabeu, C.; Kumar, S. *FASEB J* **2000**, *14*, 55-64.
- (61) Blann, A. D.; Wang, J. M.; Wilson, P. B.; Kumar, S. *Atherosclerosis* **1996**, *120*, 221-226.
- (62) Blaha, M.; Cermanova, M.; Blaha, V.; Jarolim, P.; Andrys, C.; Blazek, M.; Maly, J.; Smolej, L.; Zajic, J.; Masin, V.; Zimova, R.; Rehacek, V. *Atherosclerosis* **2008**, *197*, 264-270.
- (63) Fiorentino, D. F.; Bond, M. W.; Mosmann, T. R. *J Exp Med* **1989**, *170*, 2081-2095.
- (64) Woszczek, G.; Chen, L. Y.; Naginei, S.; Shelhamer, J. H. *J Immunol* **2008**, *180*, 7597-7603.
- (65) Akbari, O.; DeKruyff, R. H.; Umetsu, D. T. *Nat Immunol* **2001**, *2*, 725-731.
- (66) Hawrylowicz, C. M.; O'Garra, A. *Nat Rev Immunol* **2005**, *5*, 271-283.
- (67) Moore, K. W.; de Waal Malefyt, R.; Coffman, R. L.; O'Garra, A. *Annu Rev Immunol* **2001**, *19*, 683-765.
- (68) Pinderski Oslund, L. J.; Hedrick, C. C.; Olvera, T.; Hagenbaugh, A.; Territo, M.; Berliner, J. A.; Fyfe, A. I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1999**, *19*, 2847-2853.
- (69) Brunetti, N. D.; Munno, I.; Pellegrino, P. L.; Ruggiero, V.; Correale, M.; Cuculo, A.; De Gennaro, L.; Campanale, G.; Mavilio, G.; Ziccardi, L.; Di Biase, M. *J Interv Cardiol* **2007**, *20*, 248-257.
- (70) Waehre, T.; Halvorsen, B.; Damas, J. K.; Yndestad, A.; Brosstad, F.; Gullestad, L.; Kjekshus, J.; Froland, S. S.; Aukrust, P. *Eur J Clin Invest* **2002**, *32*, 803-810.
- (71) Mallat, Z.; Heymes, C.; Ohan, J.; Faggin, E.; Leseche, G.; Tedgui, A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1999**, *19*, 611-616.
- (72) Mallat, Z.; Besnard, S.; Duriez, M.; Deleuze, V.; Emmanuel, F.; Bureau, M. F.; Soubrier, F.; Esposito, B.; Duez, H.; Fievet, C.; Staels, B.; Duverger, N.; Scherman, D.; Tedgui, A. *Circ Res* **1999**, *85*, e17-24.
- (73) Han, X.; Kitamoto, S.; Lian, Q.; Boisvert, W. A. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 32950-32958.
- (74) Terkeltaub, R. A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1999**, *19*, 2823-2825.
- (75) Hebert, M. J.; Masse, M.; Vigneault, N.; Sirois, I.; Troyanov, S.; Madore, F. *Am J Kidney Dis* **2001**, *38*, 1271-1276.
- (76) Masse, M.; Hebert, M. J.; Troyanov, S.; Vigneault, N.; Sirois, I.; Madore, F. *Nephrol Dial Transplant* **2002**, *17*, 485-491.
- (77) Okura, T.; Watanabe, S.; Jiang, Y.; Nakamura, M.; Takata, Y.; Yang, Z. H.; Kohara, K.; Kitami, Y.; Hiwada, K. *J Hypertens* **2002**, *20*, 895-898.
- (78) Kotani, N.; Fukuo, K.; Yasuda, O.; Sugimoto, K.; Katuya, T.; Takemura, Y.; Kawamoto, H.; Yokoi, T.; Suzuki, A.; Ogihara, T. *Hypertens Res* **2006**, *29*, 217-225.
- (79) van der Meer, I. M.; Oei, H. H.; Hofman, A.; Pols, H. A.; de Jong, F. H.; Witteman, J. C. *Atherosclerosis* **2006**, *189*, 464-469.
- (80) Li, Y.; Song, Y. H.; Mohler, J.; Delafontaine, P. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2006**, *290*, H2116-2123.

- (81) Blaha, M.; Masin, V.; Stransky, P.; Blaha, V.; Cermanova, M.; Maly, J.; Belada, D. *Transfus Apher Sci* **2005**, *32*, 149-156.
- (82) Boberg, K. M.; Skrede, S. *Scand J Gastroenterol* **1988**, *23*, 442-448.
- (83) Yokoyama, S.; Hayashi, R.; Satani, M.; Yamamoto, A. *Arteriosclerosis* **1985**, *5*, 613-622.
- (84) Agishi, T.; Kaneko, I.; Hasuo, Y.; Hayasaka, Y.; Sanaka, T.; Ota, K.; Amemiya, H.; Sugino, N.; Abe, M.; Ono, T.; Kawai, S.; Yamane, T. *Ther Apher* **2000**, *4*, 29-33.
- (85) Nakaji, S. *Ther Apher* **2001**, *5*, 301-305.
- (86) Matic, G.; Kohlschein, P.; Wallstab, U.; Tiess, M.; Winkler, R.; Prophet, H.; Ramlow, W.; Schuff-Werner, P. *Artif Organs* **2002**, *26*, 371-377.
- (87) Richter, W. O.; Donner, M. G.; Schwandt, P. *Ther Apher* **1999**, *3*, 203-208.
- (88) Schmaldienst, S.; Banyai, S.; Stulnig, T. M.; Heinz, G.; Jansen, M.; Horl, W. H.; Derfler, K. *Atherosclerosis* **2000**, *151*, 493-499.
- (89) Bambauer, R.; Schiel, R.; Latza, R. *Ther Apher* **2000**, *4*, 213-217.
- (90) Knisel, W.; Pfohl, M.; Muller, M.; Besenthal, I.; di Nicuolo, A.; Voelker, W.; Risler, T.; Eggstein, M. *Clin Invest* **1994**, *72*, 660-668.
- (91) Schaumann, D.; Welch-Wichary, M.; Voss, A.; Schmidt, H.; Olbricht, C. J. *Eur J Clin Invest* **1996**, *26*, 1033-1038.
- (92) Thompson, G. R. *Atherosclerosis* **2003**, *167*, 1-13.
- (93) Vella, A.; Pineda, A. A.; O'Brien, T. *Mayo Clin Proc* **2001**, *76*, 1039-1046.
- (94) Schamberger, B. M.; Geiss, H. C.; Ritter, M. M.; Schwandt, P.; Parhofer, K. G. *J Lipid Res* **2000**, *41*, 727-733.
- (95) Matsuzaki, M.; Hiramori, K.; Imaizumi, T.; Kitabatake, A.; Hishida, H.; Nomura, M.; Fujii, T.; Sakuma, I.; Fukami, K.; Honda, T.; Ogawa, H.; Yamagishi, M. *J Am Coll Cardiol* **2002**, *40*, 220-227.
- (96) Hoffmann, U.; Derfler, K.; Haas, M.; Stadler, A.; Brady, T. J.; Kostner, K. *Am J Cardiol* **2003**, *91*, 461-464.
- (97) Arad, Y.; Spadaro, L. A.; Goodman, K.; Newstein, D.; Guerci, A. D. *J Am Coll Cardiol* **2000**, *36*, 1253-1260.
- (98) Hester, J. P.; McCullough, J.; Mishler, J. M.; Szymanski, I. O. *J Clin Apher* **1983**, *1*, 149-157.
- (99) Shiga, Y.; Fujihara, K.; Onodera, H.; Nagata, T.; Itoyama, Y. *Artif Organs* **1998**, *22*, 1067-1069.
- (100) Gordon, B. R.; Kelsey, S. F.; Dau, P. C.; Gotto, A. M., Jr.; Graham, K.; Illingworth, D. R.; Isaacsohn, J.; Jones, P. H.; Leitman, S. F.; Saal, S. D.; Stein, E. A.; Stern, T. N.; Troendle, A.; Zwiener, R. J. *Am J Cardiol* **1998**, *81*, 407-411.
- (101) Sampietro, T.; Tuoni, M.; Ferdeghini, M.; Ciardi, A.; Marraccini, P.; Prontera, C.; Sassi, G.; Taddei, M.; Bionda, A. *Circulation* **1997**, *96*, 1381-1385.
- (102) Hovland, A.; Hardersen, R.; Sexton, J.; Mollnes, T. E.; Lappegard, K. T. *J Clin Apher* **2009**, *24*, 247-253.
- (103) Pulawski, E.; Mellwig, K. P.; Brinkmann, T.; Kleesiek, K.; Horstkotte, D. *Ther Apher* **2002**, *6*, 229-233.