

**Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta**



**Vliv hypolipidemické léčby na vybrané
faktory procesu atherogeneze**

Doktorandská disertační práce

Tomáš Štulc

III. interní klinika 1.LF UK

Školitel: Doc MUDr Richard Češka, CSc

Praha 2005

PODĚKOVÁNÍ

V této práci se zabývám některými vztahy rozvoje aterosklerózy, dyslipidemií a účinků jejich léčby. Práce vznikla za přispění mnoha kolegů a dalších spolupracovníků; rád bych proto na tomto místě poděkoval všem, kdo se na jejím vzniku podíleli.

Je to především můj školitel a vedoucí Centra preventivní kardiologie VFN doc Richard Češka. Po mém příchodu na III. interní kliniku byl mým prvním učitelem klinické medicíny; o mnoho let později obrátil můj zájem k problematice aterosklerózy a preventivní kardiologie; a posledních několik let mne trpělivě podporoval v průběhu mého postgraduálního studia.

Jsou to také přednostové III. interní kliniky – bývalý, profesor Marek, i současný, profesor Svačina. Oba svým přístupem přispěli k rozvoji vědecké práce a k vytvoření svobodné a tvůrčí atmosféry na tomto pracovišti.

V neposlední řadě jsou to pak všichni kolegové a spolupracovníci z III. interní kliniky i z jiných pracovišť, kteří se podíleli na provádění klinických i laboratorních vyšetření, a bez kterých by tato práce nemohla nikdy vzniknout.

VLIV HYPOLIPIDEMICKÉ LÉČBY NA VYBRANÉ FAKTORY PROCESU ATEROGENEZE

OBSAH

1	ÚVOD	3
2	CHOLESTEROL A ATEROSKLERÓZA; poznámky k patogenezi a možnostem léčby	6
	2.1 Úvod	7
	2.2 Normální struktura a funkce cévní stěny	8
	2.3 Patologická anatomie aterosklerózy	10
	2.4 Vývoj, progres a klinické projevy aterosklerózy	15
	2.5 Patogeneze aterosklerózy	18
	2.6 Vliv hypolipidemické léčby na jednotlivé složky procesu aterosklerózy	25
3	CÍL PRÁCE	29
4	LEUKOCYTÁRNÍ EXPRESE A PLAZMATICKÉ KONCENTRACE CYTOADHEZIVNÍCH MOLEKUL	35
5	METALOPROTEINÁZA PAPP-A	52
6	MIKROVASKULÁRNÍ REAKTIVITA	64
7	KRÁTKODOBÁ LÉČBA LDL-AFERÉZOU	77
8	ZÁVĚR	98
9	SUMMARY	102
10	LITERATURA	105
11	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	119
	PŘÍLOHA - SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ AUTORA	121

1

ÚVOD

Ateroskleróza tepen a kardiovaskulární choroby, které jsou jejím důsledkem, představují závažný celospolečenský problém; v ekonomicky rozvinutých zemích jsou hlavní příčinou nemoci a úmrtnosti v dospělém věku. Hyperlipoproteinémie jsou nejdůležitějším rizikovým faktorem předčasného rozvoje aterosklerózy, zvláště v oblasti koronárních tepen. Ovlivnění rizikových faktorů aterogeneze, především snížení hladiny cholesterolu, je účinným prostředkem snížení výskytu ICHS a je předmětem rozsáhlých léčebných a preventivních programů.

Donedávna se předpokládalo, že hlavní účinek hypolipidemické léčby spočívá v zastavení růstu a v navození regrese aterosklerotických plátů, které působí těsné stenózy průsvitu arterií. Výsledky výzkumů z posledních desetiletí však prokázaly, že příznivý účinek hypolipidemické léčby je podstatně větší, než by odpovídalo navození regrese aterosklerózy, nastupuje dříve, než je regrese prokazatelná, a může být patrný dokonce i tam, kde žádné regrese dosaženo nebylo.

Uvedená klinická pozorování spolu s výsledky experimentálních prací vedly k pochopení, že pro rozvoj kardiovaskulárních příhod není rozhodující velikost aterosklerotických lézí, ale množství dalších faktorů, jako je míra endoteliální dysfunkce, mechanická pevnost plátů a lokální rovnováha protrombotických a antitrombotických faktorů. Dále bylo prokázáno, že tyto faktory jsou přímo ovlivňovány plazmatickou hladinou cholesterolu a že jejich aktivita se při změnách koncentrace cholesterolu mění velmi rychle. Do popředí výzkumného zájmu v této oblasti se proto dostalo studium biologických vlastností aterosklerotických lézí. Jsou studovány molekulární a buněčné procesy, které vedou k rozvoji akutních kardiovaskulárních příhod, a hledány cílené léčebné prostředky, kterými by bylo možno tyto procesy příznivě ovlivnit. V oblasti klinického výzkumu jsou pak studovány nové markery, které by bylo možno použít k identifikaci osob s vysokým

rizikem kardiovaskulárních příhod nebo k sledování účinnosti léčebných a preventivních opatření.

V předkládané práci se zabývám možnostmi hodnocení různých složek procesu aterogeneze v souvislosti s poruchami metabolismu lipidů v klinických podmínkách. V teoretickém úvodu přináším přehled nejdůležitějších poznatků o vlastnostech aterosklerotických lézí, úloze cholesterolu v jejich rozvoji a o mechanismech, kterými hypolipidemická léčba proces aterogeneze příznivě ovlivňuje.

Většina vlastních výsledků byly získány jako součást řešení rozsáhleji koncipovaných grantových projektů „Familiální hyperlipoproteinémie – korelace nálezů ve fenotypu a genotypu“, které byly řešeny na našem pracovišti. Zavedení a ověření účinnosti unikátní metody pro krátkodobou extrakorporální léčbu LDL-aférou bylo předmětem mého samostatného grantového projektu, jehož výsledky byly zařazeny v nejvyšší kategorii hodnocení.

2

CHOLESTEROL A ATEROSKLERÓZA

poznámky k patogenezi a možnostem léčby

2.1 ÚVOD

Ateroskleróza je degenerativní postižení cévní stěny, které může vést k významnému omezení nebo i úplnému přerušení průtoku krve postiženými cévami. Hlavními projevy rozvinuté aterosklerózy jsou proto ischemická choroba srdeční, cévní mozkové příhody a ischemická choroba dolních končetin. Základním projevem aterosklerózy je přítomnost aterosklerotické léze (aterosklerotického plátu). Jedná se o degenerativní postižení cévní stěny, charakterizované akumulací lipidů, zánětlivou infiltrací cévní stěny a množstvím fibrózní tkáně. Počáteční stadia aterosklerózy jsou omezena na cévní intimu, pokročilejší stadia jsou již také provázena změnami medie a adventicie cévní stěny. Ateroskleróza postihuje pouze tepennou část cévního řečiště; v žilní stěně aterosklerotické léze nevznikají.

Ateroskleróza je generalizované onemocnění, ale cévní řečiště postihuje nerovnoměrně. Místa, postížená přítomností aterosklerotických plátů, se střídají s místy bez prokazatelného postižení. Zvláště v počátečních stadiích vývoje aterosklerózy se aterosklerotické léze vyskytují často sporadicky. Dosud není zcela jasné, které faktory rozhodují o tom, v kterém místě tepenného řečiště se léze rozvinou, ale hlavní úlohu mají zřejmě faktory hemodynamické. Aterosklerotické pláty vznikají nejčastěji v místech, kde je snížena rychlost krevního proudu (snížení tzv. „shear stress“ – smykového tření způsobeného při kontraktu proudící krve s endoteliální výstelkou) a v místech s turbulentním prouděním krve. Takovými místy je především oblast cévních bifurkací.

Ateroskleróza se s postupujícím věkem v určité míře rozvíjí u každého člověka a její časná stadia jsou prokazatelná dokonce již od dětství. U některých osob je však rozvoj aterosklerózy výrazně urychlen a projevuje se pak časným výskytem klinických příhod. Rozvoj aterosklerózy závisí do značné míry na přítomnosti a

závažnosti tzv. rizikových faktorů aterogeneze, které vznik a progresi aterosklerotických lézí urychlují a podporují. Jedním z nejvýznamnějších rizikových faktorů aterogeneze jsou hyperlipoproteinémie, především hypercholesterolemie; tato souvislost byla opakovaně doložena mnoha epidemiologickými studiemi. Klinické studie posledních let pak prokázaly, že účinná léčba hyperlipidemií vede k snížení kardiovaskulární morbidity a mortality a k zlepšení prognózy nemocných; hypolipidemická léčba se tak stala jedním z neúčinnějších prostředků v léčbě pacientů s ICHS i s dalšími projevy aterosklerózy. V tomto textu uvádím základní údaje o úloze cholesterolu v rozvoji aterosklerotických lézí a o mechanismech, kterými hypolipidemická léčba příznivě ovlivňuje proces aterogeneze na buněčné a tkáňové úrovni.

2.2 NORMÁLNÍ STRUKTURA A FUNKCE CÉVNÍ STĚNY

Cévní stěna se skládá ze tří vrstev: intimy, medie a adventicie. Cévní intima je na lumenální straně ohraničena endoteliální výstelkou a od medie ji odděluje lamina elastica interna. Medie je nejsilnější vrstvou tepenné stěny; leží mezi lamina elastica interna a externa. Skládá se především z vazivové tkáně a buněk hladkého svalstva; ve stěně největších tepen (aorta a její hlavní větve) převažuje složka elastických vláken, u menších arterií převládá složka hladké svaloviny, která umožňuje účinnou regulaci průsvitu cévy a tím průtoku krve. Adventicie se nachází zevně od lamina elastica externa; obsahuje řídkší vazivové struktury, vasa vasorum a nervové pleteně.

Úlohou cév za fyziologických okolností je zabezpečit přiměřený průtok krve v tkáních, zabránit intravaskulárnímu srážení krve a umožnit výměnu látek mezi krví a tkáněmi. Vzhledem k tomu, že nároky jednotlivých tkání na průtok krve za různých fyziologických situací značně kolísají, musí být cévy schopné zabezpečit zvýšení

průtoku krve často až na úroveň mnohonásobku bazálních hodnot. Cévní stěna však hraje důležitou roli také za patologických situací. V případě poškození se podílí na zástavě krvácení vazokonstrikcí a lokální aktivací proagregačních a protrombotických mechanismů. Cévy také významně ovlivňují migraci leukocytů z krve do tkání, která je důležitá v lokální regulaci imunitních dějů; při patologických procesech ve tkáních zprostředkovává cévní stěna zvýšenou migraci zánětlivých buněk do těchto tkání a podílí se tak na řízení a zánětlivé obranné odpovědi.

V zajišťování všech těchto funkcí cévní stěny má rozhodující regulační úlohu endoteliální výstelka. Endotel se podílí na kontrole napětí hladké svaloviny cévní stěny (VSMC) a tím i průtoku krve cévou (1), reguluje propustnost cévní stěny pro buněčné i nebuněčné složky krve a má důležitou úlohu v kontrole reparačních cévních procesů a angiogeneze. Neporušená endoteliální výstelka vytváří netrombogenní vnitřní povrch cévy, zabraňující adhezi destiček a aktivaci koagulačního systému.

Endoteliální buňky jsou vybaveny receptory pro množství systémově i lokálně působících mediátorů a jsou tak schopny přizpůsobit reaktivitu cévy potřebám okolních tkání za různých fyziologických i patologických okolností (2). Také vlastní regulační působení endotelu je zprostředkováno mnoha různými tkáňovými mediátory a cytokiny. Ústřední místo mezi těmito mediátory má oxid dusnatý (NO, EDRF - endothelium-derived relaxing factor). NO je hlavním vazodilatačně působícím mediátorem cévní stěny (3), tlumí expresi cytoadhezivních molekul na povrchu endoteliálních buněk a tím omezuje adhezi a aktivitu zánětlivých buněk monocytomakrofágového systému (4), snižuje permeabilitu endotelu a zvyšuje jeho antiadhezivní potenciál; působí tlumivě na proliferaci a migraci VSMC (5). NO je v endoteliálních buňkách produkován konstitutivní NO-syntázou, jejíž aktivita podléhá souhrně regulujících vlivů na transkripční, translační i posttranslační úrovni (6, 7).

2.3 PATOLOGICKÁ ANATOMIE ATEROSKLERÓZY

Z morfologického hlediska lze aterosklerotické změny cévní stěny rozdělit do několika základních skupin a podrobněji do většího množství histologických a

Typ léze	Histologická klasifikace	vývojových typů. V současné době je nejznámější klasifikace aterosklerotických lezí podle doporučení American Heart Association, která vychází z prací Satoryho a spolupracovníků (8, 9, 10, 11); v tabulce 2.1 je uvedena upravená verze z roku 2000 (11).
I	Počáteční léze	První skupina lézí (I-III) představuje tzv. časná stadia vývoje aterosklerózy (9); tyto léze jsou charakterizovány akumulací makrofágů, vznikem pěnových buněk a jen v malé míře (ve stadiu III) též ukládáním cholesterolu v extracelulárním prostoru; produkce vaziva je minimální. Změny jsou omezeny na cévní intimu, medie ani adventicie nejsou postiženy.
II	Tukové proužky	
III	Intermediární léze	
IV	Aterom	
V	Fibroaterom	
VI	Komplikovaná léze	
VII	Kalcifikované léze	
VIII	Fibrotické léze	

Tabulka 2.1. Klasifikace aterosklerotických lézí

Další progresí časných lézí vznikají tzv. léze pokročilé (typ IV-VIII), které se dříve dělily do dvou, nyní nově do tří skupin (10, 11); na rozdíl od časných lézí jsou tato pokročilejší stadia provázena již také změnami medie a adventicie cévní stěny. Přímým vývojem lézí III. typu obvykle dochází při dalším hromadění a rozpadu

pěnových buněk k výrazné akumulaci lipidů v extracelulárním prostoru a k vzniku tzv. „lipidového jádra“ aterosklerotického plátu, charakteristického pro léze typu IV a V. Při dezorganizaci extracelulární matrix je narušena hranice mezi intimou a medií, hladké svalové buňky migrují z hlubších vrstev medie do intimy, kde dále proliferují a produkují vazivové složky plátu. Procesem neovaskularizace pronikají do struktur plátu vasa vasorum.

Během vývoje těchto pokročilých lézí může dojít mechanickému narušení krytu plátu (eroze, fisurace, ruptura) s nasedající trombózou, nebo ke krvácení do plátu (z neovaskularizací). Disrupce, trombóza nebo krvácení charakterizují tzv. komplikované léze (typ VI).

Kalcifikované a fibrotické léze s nízkým obsahem cholesterolu (typ VII a VIII) představují konečné vývojové stádium aterosklerotických lézí. Mohou zřejmě vznikat jednak „zhojením“ komplikovaných lézí (vazivovou organizací trombu nebo hematomu), jednak postupným vývojem z ateromu nebo fibroateromu při omezení depozice cholesterolu a převaze fibroprodukce.

Morfologická charakteristika jednotlivých typů aterosklerotických lézí

Léze I. typu – počáteční léze (initial lesions) jsou prvním mikroskopicky prokazatelným projevem aterosklerózy. Jedná se o ztlustění intimy, která je infiltrována izolovanými makrofágy a pěnovými buňkami nebo jejich malými skupinkami (12). Tyto léze většinou nejsou mikroskopicky patrné.

Léze II. typu jsou charakteristické výraznější infiltrací intimy pěnovými buňkami a makrofágy, které se zde nacházejí v souvislých, obvykle vícevrstevných infiltrátech; v malé míře jsou zastoupeny již také zastoupeny T lymfocyty. Kapénky lipidů jsou přítomny též v hladkých svalových buňkách intimy (13). Depozice lipidů

v extracelulárním prostoru je zcela minimální a struktura extracelulární matrix není narušena. Léze II. typu jsou již obvykle (i když ne vždy) patrné pouhým okem a jsou tudíž prvním makroskopicky patrným stadiem aterosklerózy; většinou mají podobu žlutavých **tukových proužků** (fatty streaks) ve stěně arterií.

Léze III. typu – intermediární léze (intermediate lesions, „preatheroma“) jsou poslední z této skupiny tzv. časných lézí (early lesions) a tvoří přechod ke skupině lézí pokročilých (advanced lesions). Jejich charakteristickým znakem je přítomnost většího množství lipidů v extracelulárním prostoru intimy (14). Extracelulárně uložené lipidy zde vytvářejí ložiska, která jsou uložena především mezi vrstvou makrofágů a pěnových buněk a vrstvou hladkých svalových buněk. Přítomnost těchto ložisek narušuje kontinuitu extracelulární matrix (vrstva makrofágů a pěnových buněk se nachází subendoteliálně, VSMC jsou v hlubších vrstvách intimy před lamina elastica interna); na rozdíl od dalšího vývojového stadia aterosklerotických lézí – ateromu – však extracelulární ložiska lipidů nesplývají a nevytvářejí souvislé lipidové jádro. Kromě extracelulární akumulace lipidů jsou již také patrné odchylky v zasatoupení jednotlivých složek mezibuněčné hmoty, která souvisejí s alterací jejich syntézy a se změněnou aktivitou tkáňových proteáz.

Léze IV. typu – ateromy představují první ze skupiny tzv. pokročilých aterosklerotických lézí. Jsou charakterizovány především přítomností souvislého ložiska extracelulárně uložených lipidů –lipidového jádra (lipid core). Lipidové jádro vzniká splýváním jednotlivých extracelulárních ložisek lipidů při pokračující akumulaci lipidů v intermediárních lézích (15). Nachází se v hlubších vrstvách intimy a odděluje její vnitřní vrstvu s částí svalových buněk a lamina elastica interna od vrstev povrchnějších, které jsou tvořeny pěnovými buňkami, makrofágy a vazivovými složkami původní intimy. Aterom je také prvním typem léze, u které je jasně rozlišeno jádro plátu od jeho povrchních vrstev (vazivový kryt plátu). Důležitou částí krytu plátu je oblast na okraji lipidového jádra - tzv. raménko plátu (shoulder region), kde kryt



plátu přechází do struktur normální intimy. Vazivová vrstva je zde obvykle nejslabší a je zde výraznější akumulace zánětlivých buněk (lymfocytů a makrofágů), které mohou produkcí proteolytických enzymů dále narušit mechanickou pevnost vazivového krytu (16, 17). Oblast raménka plátu je navíc mechanicky nejvíce namáhána hemodynamickými silami, a proto právě v tomto místě nejčastěji vznikají eroze a ulcerace plátu s následnou trombózou (18). Přítomnost souvislého lipidového jádra u ateromu vede k výrazné dezorganizaci extracelulárních struktur intimy, narušení souvislosti svalových buněk intimy a porušení hranice mezi intimou a medií. Poprvé se zde také objevuje neovaskularizace aterosklerotického plátu, především na okrajích lipidového jádra a povrchních vrstvách plátu.

V lézích IV. typu není výraznější produkce vaziva; vazivový kryt těchto lézí je tvořen převážně původními vazivovými strukturami intimy, s převahou proteoglykanů a nízkým obsahem kolagenu. Právě výraznější produkce fibrózní tkáně v oblasti krytu plátu charakterizuje **léze V. typu – fibroateromy**. Kromě větší tloušťky vazivového krytu plátu je zde také ve srovnání s prostým ateromem výraznější zastoupení kolagenu a hladkých svalových buněk; jinak je základní histologická struktura fibroateromu vcelku shodná s ateromem (19). Fibroprodukce v oblasti vazivového krytu fibroateromu vzniká jako reparativní reakce na různá poškození v povrchních částech plátu. Může se jednat o reakci na porušení struktury intimy v důsledku výrazné akumulace extracelulárních lipidů a pěnových buněk; v tomto případě může fibroaterom vzniknout postupným vývojem přímo z ateromu, ale nejedná se zřejmě o příliš obvyklou situaci. Fibroaterom vzniká častěji z komplikovaných lézí, vazivovou organizací trombu nebo hematomu po epizodě krvácení do plátu nebo ruptury plátu s následnou trombózou. Krvácení i trombóza přitom může jeden plát postihnout během kratší nebo delší doby i opakovaně (20). Při delším časovém odstupu mezi příhodami se pak mohou epizody reparativních procesů střídat s obdobími další akumulace lipidů. Původní lipidové jádro plátu přitom často zůstane odděleno silnější

vazivovou vrstvou a další akumulací lipidů vzniká nové jádro, povrchněji uložené. Některé léze tak mohou obsahovat i větší počet lipidových jader, nepravidelně na sebe navrstvených a oddělených vrstvami vazivové tkáně.

Léze VI. typu – komplikované léze vznikají rozvojem povrchového defektu (eroze, fisura, ulcerace), trombu nebo krvácení v oblasti plátu (21, 22). I když drobné defekty s mikrotrombotizací mohou zřejmě někdy vzniknout i na povrchu časných lézí i na jinak intaktní stěně tepny, ve významné míře postihují uvedené procesy pouze pokročilé léze předchozích dvou typů – tedy aterom nebo fibroaterom. Fisury a ulcerace vznikají nejčastěji v oblasti raménka plátu v důsledku mechanického namáhání hemodynamickými silami; velikost a hloubka těchto defektů se v jednotlivých případech mohou podstatně lišit (23).

Obnažení subendoteliálního trombogenního materiálu vytváří podmínky pro vznik nasedajícího trombu. Jestli se však trombus vytvoří a v jakém rozsahu, záleží na velikosti defektu a také na lokální i celkové rovnováze prokoagulačních a antikoagulačních faktorů (24). Nejzávažnější trombózy vznikají, když dojde k obnažení lipidového jádra plátu, které je vysoce trombogenní. Naopak na povrchních erozích vznikají většinou tromby menšího rozsahu, nebo se trombus nevytvoří vůbec (25). Rozsáhlé trombózy vedou obvykle k hemodynamicky významnému zúžení nebo úplnému uzávěru postižené tepny, provázenému klinickou symptomatologií (nestabilní angina pectoris nebo srdeční infarkt); tromby menšího rozsahu však většinou zůstávají klinicky němé.

Krvácení do plátu obvykle vzniká v souvislosti se rozvojem fisurací, porušením novotvořených cév v povrchních vrstvách plátu; méně často však může vzniknout i bez vzniku mechanického defektu, rupturou novotvořených cév při mechanickém namáhání plátu (26). Hemoragie vede k náhlému zvětšení objemu plátu, které se může podílet na uzávěru postižené cévy.

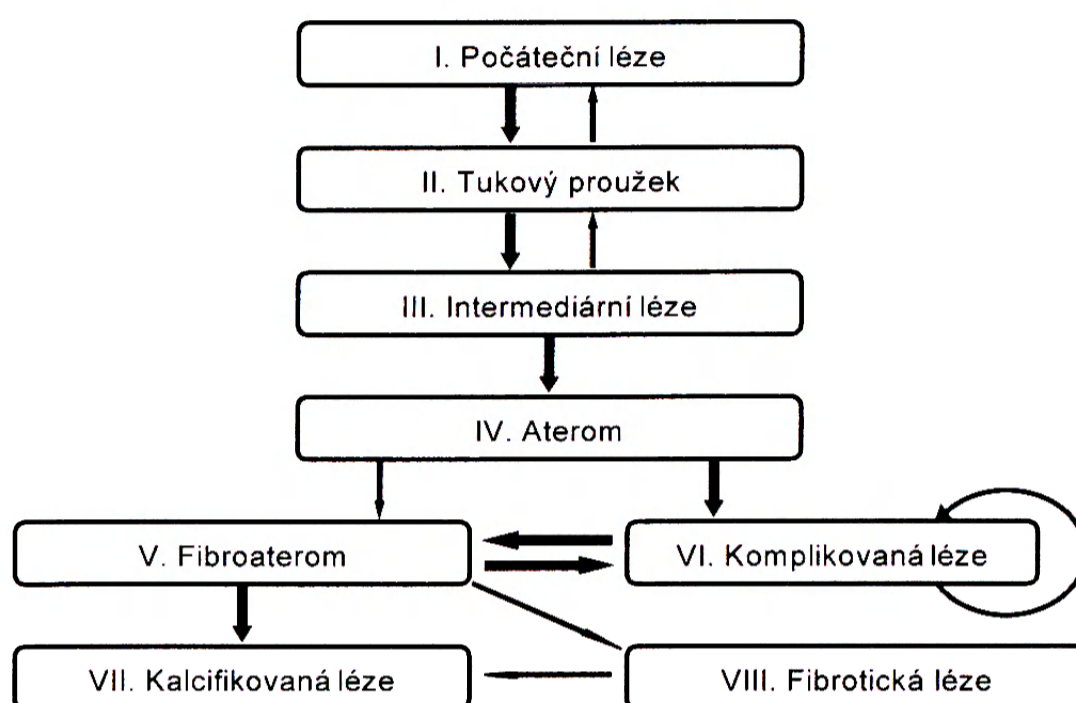
Léze VII. typu – kalcifikované léze vznikají při rozsáhlejší mineralizaci ve strukturách fibroateromu nebo fibrózních lézí (27). Depozice solí kalcia (v podobě různých forem apatitu) probíhá převážně ve vazbě na vlákna elastinu a je regulována přítomností některých proteinů extracelulární matrix (např. „matrix gla protein“).

Léze VIII. typu – fibrotické léze vznikají nejčastěji na podkladě fibroateromu, proti kterému je charakterizuje větší rozsah fibroprodukce a malé až chybějící lipidové jádro (27). Fibrotická tkáň vzniká při vazivové organizaci rozsáhlejších hematomů a trombů a vazivovou přestavbou původního lipidového jádra plátu. Fibrotické léze tak mohou vznikat v situacích, kdy se omezí další akumulace lipidů v plátu, především v důsledku účinné hypolipidemické léčby.

2.4 VÝVOJ, PROGRESE A KLINICKÉ PROJEVY ATEROSKLEROTICKÝCH LÉZÍ

V předchozím textu jsem uvedl podrobnou morfológickou charakteristiku jednotlivých typů aterosklerotických lézí podle současného klasifikačního schématu. Tak jako každá klasifikace, i výše uvedené dělení je ovšem arbitrární. Aterosklerotické léze se samozřejmě vyvíjejí postupným procesem, který zahrnuje některé z výše uvedených morfológických typů, ale také stadia přechodná. Vývoj každé léze se může v některém stadiu zastavit a v různé míře dokonce regredovat; od stadia ateromu se pak navíc vývoj plátu může ubírat různými směry, včetně cyklického vývoje, kdy plát prochází některými morfológickými stadii opakovaně. Některé tyto vazby a souvislosti jsem již uvedl při popisu jednotlivých typů aterosklerotických lézí; v následujících odstavcích rozvedu tuto problematiku podrobněji.

Základní schéma vývoje aterosklerotických plátů je uvedeno na obrázku 2.1. Skupina **časných lézí** (typ I-III) představuje první stadia vývoje aterosklerózy; označení „časné“ však také znamená, že se tyto léze objevují již v časných obdobích života.



Obrázek 2.1. Vývoj aterosklerotických lézí

Časné léze nepůsobí výraznější strukturální poškození intimy a proto je možná částečná nebo i úplná regrese těchto lézí. Léze I. typu se u lidí nacházejí již časně postnatálně (12). Také tukové proužky se rozvíjejí již během dětství; v aortě se vyskytují prakticky u 100% dětí do 15 let věku, především v oblastech od aortálního oblouku distálně; ascendentní aorta je postižena méně (28, 29). V koronárním řečišti se ve větší míře rozvíjejí až v adolescenci; postihují zde především oblast bifurkace levé koronární tepny a proximální část ramus interventricularis posterior (15, 28). Pokročilejší typy lézí, než jsou tukové proužky, se v dětství prakticky nevyskytují; výjimku představují pouze děti s těžkými formami familiárních hyperlipidemií.

Intermediární léze vznikají v časně dospělosti, v přímé návaznosti na tukové proužky, ve stejné lokalizaci (15, 30, 31).

Časné léze neprominují výrazně do lumen tepny ani nejsou náchylné k povrchovým defektům a trombózám; jsou proto klinicky zcela asymptomatické. Od stadia ateromu však již může být velikost lézí dostatečná, aby způsobila významné zúžení nebo uzávěr tepen menšího kalibru. Všechny typy **pokročilých lézí** se také mohou komplikovat vznikem krvácení nebo trombózy plátu a vést tak k akutnímu tepennému uzávěru.

Léze IV. typu - ateromy - vznikají u disponovaných osob dalším vývojem z intermediárních lézí obvykle v průběhu třetího decenia. Až po stadium ateromu probíhá vývoj aterosklerotických plátů jako prostá posloupnost jednotlivých morfologických stadií. Růst plátů je postupný a je způsoben pokračující akumulací lipidů a zvětšováním objemu lipidového jádra; fibroprodukce se na růstu ateromů nepodílí (10). Ateromy již mohou působit hemodynamicky významné stenózy, většinou však významnou překážku pro krevní proud nepředstavují (20). Tenký vazivový kryt plátu však způsobuje náchylnost lézí IV. typu k ruptuře s nasedající trombózou. Klinický význam ateromu proto spočívá především v tom, že se může snadno stát podkladem komplikované léze (18).

Ruptury plátu a následné trombózy mohou být rozsáhlé a vést tak akutně k hemodynamicky významnému zúžení nebo úplnému uzávěru postižené tepny, provázenému klinickou symptomatologií (nestabilní angina pectoris nebo srdeční infarkt). Většina těchto epizod je však malého rozsahu a zůstává proto klinicky němá. Léze se známkami fisurací, trombóz nebo krvácení byly prokázány u mnoha osob středního věku, které nikdy neměly klinickou manifestaci aterosklerózy (25).

Trombus na povrchu plátu je obvykle v prvních hodinách po svém vzniku lokálními trombolytickými mechanismy z části rozpuštěn, zbývající část trombu je procesem vazivové organizace inkorporována do povrchních vrstev plátu. Tímto mechanismem se z ateromu přes komplikovanou lézi vyvíjí fibroaterom. Proti pomalému narůstání objemu plátu postupnou akumulací lipidů může fibrotickou přestavbou trombu dojít v krátké době k výraznému zvětšení plátu a rozvoji významné stenózy. Od stadia ateromu se tedy aterosklerotické léze mohou vyvíjet nejen postupným nárůstem, ale také epizodami ruptur s následnou inkorporací vzniklého trombu. Fibroaterom však může vzácněji vzniknout také přímo z ateromu, bez rozvoje komplikované léze, vazivovou reparací porušené intimy při rychlém růstu jádra plátu.

Další vývoj fibroateromu závisí na rovnováze mnoha faktorů. Epizody trombóz se mohou v rámci jednoho plátu objevovat i opakovaně, někdy i ve velmi krátkém časovém odstupu. Vazivová organizace trombu však obvykle zvýší mechanickou pevnost krytu plátu a vede alespoň přechodně k jeho stabilizaci (20). Při pokračující akumulaci lipidů a zánětlivé infiltraci plátu se však stabilita plátu opět po určité době snižuje a může dojít k další ruptuře s trombózou; některá z těchto epizod se může stát podkladem akutní klinické příhody – někdy i fatální. Epizody trombóz však mohou být převážně klinicky němé a narůstající plát tak postupně způsobí hemodynamicky významnou stenózu s chronickou symptomatologií (stabilní angina pectoris, klaudikace aj.).

Pokud se výrazně zpomalí další akumulace lipidů – obvykle při účinné hypolipidemické léčbě, může dojít ke zmenšení jádra plátu a jeho částečné nebo úplné fibrotické přestavbě za vzniku fibrózní léze. Mineralizací vazivových struktur fibroateromu nebo fibrózní léze pak vzniká léze kalcifikovaná. Kalcifikované a fibrotické léze představují podle současných znalostí konečná vývojová stadia aterosklerotického plátu. Pokud jsou rozsáhlé, mohou působit hemodynamicky

významné stenózy (27); z mechanického hlediska jsou však stabilní a nebývají proto podkladem pro vznik komplikovaných lézí a rozvoj akutních ischemických syndromů.

2.5 PATOGENEZE ATEROSKLERÓZY

Počáteční stadia aterosklerózy jsou způsobena zvýšeným průnikem aterogenních lipoproteinů a zánětlivých buněk z krve přes endoteliální výstelku a jejich akumulací v subendoteliálním prostoru. Teprve v pozdějších fázích procesu aterogeneze se v různé míře přidružují fibroproduktivní a degenerativní procesy, které jsou reakcí na zvýšenou depozici lipidů a zánětlivou infiltraci cévní stěny. Rozhodujícími faktory pro rozvoj aterosklerózy jsou proto koncentrace aterogenních lipoproteinů v krvi, intenzita zánětlivé infiltrace subendoteliálního prostoru a propustnost endoteliální výstelky pro leukocyty a lipoproteiny.

Názory na příčiny a mechanismus vzniku aterosklerotických změn prošly dlouhým vývojem a postupně bylo formulováno několik teorií, které se snažily etiopatogenezi aterosklerózy vysvětlit. Každá z těchto teorií zdůrazňuje některý z výše uvedených hlavních etiopatogenetických mechanismů: účinek plazmatických lipidů, poruchu funkce endotelu a zvýšenou aktivitu zánětlivých mechanismů.

Mnoho desetiletí převládala teorie lipidová, jejíž základy byly formulovány již začátkem 20. století (32), která rozhodující úlohu na rozvoji aterosklerózy připisovala plazmatickému cholesterolu. Vznikla na základě skutečnosti, že velké cholesterolové jádro je nejnápadnější komponentou pokročilých aterosklerotických lézí. Tyla tato teorie byla z klinického hlediska podpořena nálezem časně aterosklerózy u osob s hypercholesterolémií a v experimentální oblasti pak možností vyvolat aterosklerotické změny dietou bohatou na cholesterol. Lipidová teorie původně

předpokládala, že ukládání cholesterolu v cévní stěně je v zásadě pasivní proces, který je určován především koncentrací cholesterolu v krvi.

Pokračující výzkumy však postupně ukázaly, že ukládání cholesterolu v cévní stěně podstatným způsobem závisí na přítomnosti tkáňových makrofágů. Makrofágy cholesterol aktivně vychytávají a akumulují za vzniku pěnových buněk, a teprve rozpadem pěnových buněk vznikají souvislá extracelulární ložiska cholesterolu a lipidové jádro plátu. Ukázalo se také, že průnik cholesterolu i monocytů do prostoru cévní stěny jsou závislé na funkčním stavu endoteliální výstelky, a že poškození endotelu jeho propustnost pro tyto faktory výrazně zvyšuje. Zánětlivá infiltrace přitom vede k poškození endotelu a poškozený endotel naopak dále vyvolává zánětlivou infiltraci. Novější klinická pozorování pak ukázala, že ateroskleróza se často rozvíjí i u osob s normální nebo jen mírně zvýšenou hladinou cholesterolu, a že rozvoj aterosklerózy je urychlen v přítomnosti faktorů, které vedou k poškození endotelu (např. kouření, diabetes, hypertenze). Tato pozorování vedla k formulaci tzv. teorie endoteliálního poškození (někdy též zánětlivé teorie vzniku aterosklerózy), která zdůrazňuje význam endoteliálního poškození, zánětlivých mechanismů a jejich vzájemné potenciace pro rozvoj aterosklerózy (33). Podle krajních zastánců této teorie je význam samotné hyperlipidémie druhotný; výraznější průnik lipidů do cévní stěny a jejich akumulace jsou možné pouze v přítomnosti endoteliálního poškození.

Teorie lipidová i teorie endoteliálního poškození mají stále své vyhraněné zastánce (a odpůrce); přesto je stále více zřejmé, že ani jedna z nich není schopna uspokojivě vysvětlit všechny aspekty a souvislosti rozvoje aterosklerózy. Již delší dobu a stále výrazněji se proto prosazuje pohled, který bere v úvahu podíl všech výše zmíněných faktorů na procesu aterogeneze a poskytuje pružný a otevřený rámec pro inkorporaci nových poznatků. Tento nový pohled bývá obvykle označován jako jednotná teorie vzniku aterosklerózy (34). Podle jednotné teorie se na vývoji aterosklerotické léze vždy současně podílí účinek aterogenních lipoproteinů, endoteliální poškození i

zánětlivé mechanismy, i když podíl těchto faktorů může být v různých situacích různý. Tyto faktory jsou navíc ve složitě vzájemné interakci a navzájem se potencují. V následujících odstavcích jejich podíl na procesu aterosklerózy podrobněji.

Endoteliální dysfunkce a ateroskleróza

Reakci cévní stěny na poškození různými zátěžovými a škodlivými faktory zprostředkovává endoteliální výstelka. Reakce endotelu na poškození je poměrně uniformní (svým průběhem málo závislá na mechanismu endoteliálního poškození); projevuje se omezenou schopností vazodilatace, převahou vazokonstrikce, zvýšenou propustností endoteliální výstelky, převahou protrombotických a prokoagulačních dějů a zvýšenou expresí cytoadhezivních molekul (35, 36, 37). Jedním z prvních projevů poškození endoteliální funkce, který zprostředkovává uvedené reakce, je snížení aktivity NO-syntázy (7).

Lokalizovaná a časově omezená reakce endotelu na poškození je z hlediska organismu účelná, protože zprostředkovává množství obranných a reparačních dějů. Některé faktory však působí poškození endotelu generalizovaně a dlouhodobě; generalizovaná reakce endotelu na působení těchto faktorů bývá označována jako endoteliální dysfunkce. Endoteliální dysfunkce ztrácí svůj původní význam účelné ochranné reakce a má při dlouhodobém působení množství závažných patologických důsledků. Endoteliální dysfunkce může být vyvolána mnoha různými vlivy; nejčastější příčinou jsou známé rizikové faktory aterosklerózy – kouření (38), hypertenze (39), hyperglykémie a produkty neenzymatické glykace proteinů (40), hyperhomocysteinémie (41) a především aterosklerogenní LDL-částice (2, 42, 43).

V současné době je endoteliální dysfunkce považována za první stádium vývoje aterosklerózy, které lze prokázat dlouho před rozvojem morfologicky prokazatelných

aterosklerotických lézí. Porucha funkce endotelu se však podílí na všech stádiích procesu aterotrombogeneze. Zvýšená propustnost endoteliální výstelky zvyšuje průnik aterogenních lipoproteinů z krve a jejich akumulaci v prostoru intimy. Exprese endoteliálních cytoadhezivních molekul zvyšuje transendoteliální migraci leukocytů a zánětlivou infiltraci cévní stěny. Tkáňové makrofágy vedou ke vzniku pěnových buněk a zánětlivá infiltrace se podílí na snížení mechanické pevnosti plátu a tím na rozvoji komplikovaných lézí. Poškozený endotel se také přímo podílí na vzniku komplikovaných lézí svými protrombotickými vlastnostmi.

Na rozdíl od morfologicky prokazatelných aterosklerotických lézí, které jsou vždy více nebo méně lokalizovaným postižením cévní stěny, je však endoteliální dysfunkce generalizovanou poruchou endotelu, která je přítomna i v místech, která aterosklerózou postižena nejsou. Endoteliální dysfunkce se tak podílí na poruše vazomotorické reaktivity a poruše funkce mikrocirkulace, které mohou dále zhoršovat projevy ischemie při aterosklerotickém postižení.

Záněť a aterogeneze

Infiltrace subendoteliálního prostoru leukocyty hraje v procesu aterogeneze důležitou úlohu (44, 45). Leukocyty jsou podkladem pro vznik pěnových buněk, zhoršují endoteliální dysfunkci, vytvářejí a udržují zánětlivou infiltraci plátu a ovlivňují myointimální proliferaci (36, 46, 47). Podílejí se však i na vzniku akutních aterotrombotických příhod: v určité fázi vývoje plátu produkují proteolytické enzymy, které snižují mechanickou pevnost plátu a zvyšují riziko jeho ruptury (48). Přestup leukocytů přes endoteliální výstelku i jejich aktivita v prostoru cévní stěny je ovlivňována přítomností velkého množství parakrinně i autokrinně působících mediátorů a především přítomností aterogenních lipoproteinů.

Prvním krokem v přestupu leukocytů z cévního řečiště do subendoteliálního prostoru je jejich adheze na endoteliální buňky. Adheze a transendoteliální migrace leukocytů je zprostředkována interakcí mezi endoteliálními a leukocytárními cytoadhezivními molekulami; mezi tyto molekuly patří E a P selektin , ICAM-1 a PECAM na endoteliálních buňkách a L-selektin, ICAM-1 a integriny na leukocytech (44, 49, 37). Dosud se předpokládalo, že celý proces transendoteliální migrace leukocytů je regulován hlavně prostřednictvím endoteliálních adhezivních molekul; novější práce však ukazují, že se na tomto procesu významně podílí též modulace exprese cytoadhezivních molekul na leukocytech (50, 51, 52, 53).

Makrofágy v subendoteliálním prostoru vychytávají nativní i modifikované LDL-částice (54). Vychytávání nativních LDL-částic v makrofázích je zprostředkováno LDL-receptorem a podléhá zpětnovazebně regulaci; když makrofágy akumulují přiměřené množství cholesterolu, vycestují do cirkulace. Vychytávání oxidovaných LDL-částic však probíhá cestou scavengerového receptoru, která významnější zpětnovazebně regulaci nepodléhá; pokud se tyto částice vyskytují ve větší míře, jsou proto v makrofázích akumulovány v nadbytku (55). Makrofágy s nadbytkem cholesterolu pak již nejsou schopny vycestovat do cirkulace, zůstávají spolu s akumulovaným cholesterolem v subendoteliálním prostoru a mění se v tzv. pěnové buňky (56), které jsou podkladem pro vznik lipidového jádra plátu.

Kromě toho, že se mechanicky podílejí na objemu plátu, jsou makrofágy a pěnové buňky také zdrojem cytokinů, které atrahují další monocyty a T-lymfocyty do subendoteliálního prostoru (57); udržují a prohlubují tak zánětlivou infiltraci plátu. Zánětlivé buňky produkují mediátory, které dále zhoršují endoteliální funkci a usnadňují průnik dalších LDL částic do subendoteliálního prostoru; kromě toho se také samy podílejí na oxidaci LDL-částic. Mediátory pěnových buněk spolu s oxidovanými LDL-částicemi vyvolávají migraci VSMC z medie do subendoteliálních vrstev (58), jejich proliferaci a nakonec transformaci v buňky sekrečního fenotypu,

které produkují extracelulární matrix - především kolagen (59). Z transformovaných VSMC a okolní extracelulární matrix se tak nad lipidovým jádrem plátu vytváří fibrózní kryt (58).

Úloha cholesterolu v procesu aterogeneze

V rozvoji endoteliální dysfunkce i v další progresi aterosklerotických lézí mají zásadní úlohu aterogenní lipoproteiny; Nejvýznamnější z nich jsou LDL-částice, které byly chemicky modifikovány oxidací, glykosylací nebo acetylací (43); nativní LDL-částice nemají na funkci endotelu ani dalších složek cévní stěny výraznější vliv. Oxidace LDL-částic probíhá z menší části již v plazmě, ale především po jejich průchodu do subendoteliálního prostoru (60). LDL-částice pronikají do subendoteliálního prostoru v určité míře i za fyziologických podmínek. Jejich oxidace není za těchto okolností výrazná a oxidované LDL-částice jsou v menším množství účinně odstraňovány makrofágy cévní stěny prostřednictvím scavengerového receptoru (55). Při větší produkci oxidovaných LDL-částic však kapacita makrofágů pro jejich vychytávání nestačí a tyto částice se pak hromadí v prostoru intimy a způsobují toxické poškození okolních struktur. Pokud nejsou přítomny další faktory, které endotel poškozují, dochází k nadměrné produkci oxidovaných LDL-částic pouze při výraznější hyperlipidémii; při poškození endotelu dalšími faktory - například diabetem - propustnost endotelu stoupá a oxidované LDL-částice se kumulují i při nižších hladinách lipidů (43).

Škodlivé působení LDL-částic v prostoru intimy má dvě hlavní složky. Oxidované LDL-částice jednak působí přímým toxickým vlivem na struktury okolní intimy, jednak stimulací zánětlivé aktivity plátu (61). Přímým účinkem na endotel působí LDL-částice endoteliální dysfunkcí s převahou vazokonstrikčního působení, celkovým zvýšením propustnosti a zvýšenou expresí cytoadhezivních a prokoagulačních

molekul. Stimulací VSMC vedou oxidované LDL-částice k jejich proliferaci a nadprodukcí extracelulární matrix (62).

Kromě přímého toxického vlivu na struktury cévní stěny působí oxidované LDL-částice také poruchu funkce tkáňových makrofágů (54). LDL-částice působí přímým chemotaktickým způsobem na monocyty; tak zvyšují zánětlivou infiltraci subendoteliálního prostoru jednak přímo, jednak nepřímo přes zvýšení exprese endoteliálních cytoadhezivních molekul. Vazba modifikovaných LDL-částic na scavengerové receptory makrofágů a pěnových buněk vede k jejich aktivaci a k produkci řady cytokinů a dalších látek, které udržují zánětlivou reakci v subendoteliálním prostoru; degradují okolní extracelulární matrix, stimulují proliferaci VSMC (63, 64) a prohlubují endoteliální dysfunkci.

2.6 VLIV HYPOLIPIDEMICKÉ LÉČBY NA JEDNOTLIVÉ SLOŽKY PROCESU ATEROGENEZE

Vliv na cévní reaktivitu

Převaha vazokonstrikce a neschopnost přiměřené vazodilatace v odpověď na podněty, které obvykle vasodilataci vyvolávají, jsou obvyklým nálezem při hypercholesterolémii. Ztráta schopnosti vazodilatace souvisí především s omezením vazodilatačního účinku kyslíčnicku dusnatého (NO). Zvýšená produkce volných kyslíkových radikálů při nadbytku oxidovaných LDL-částic vede k přímé inaktivaci NO (65). Oxidované LDL-částice v experimentálních podmínkách snižují transkripční aktivitu genu pro NO-syntázu, destabilizují mRNA pro tento protein (66) a interferují s nitrobuněčným přenosem signálů, které vedou k stimulaci produkce NO (67). Zvýšená trombogenita endotelu vede k aktivaci destiček a uvolňování tromboxanu s vazokonstriktivní aktivitou. Tyto účinky oxidovaných LDL-částic závisí na jejich

koncentraci a době působení; obvykle nastupují poměrně rychle po přidání LDL-částic a jsou také často reverzibilní během několika málo hodin po jejich odstranění. Klinickým korelátem popsaných patogenních mechanismů je porucha vazodilatace závislé na endotelu, kterou lze prokázat například pletyzmograficky, sonograficky nebo nepřímo metodou pozitronové emisní tomografie (68).

Experimentální i klinické studie opakovaně prokázaly, že snížení plazmatické hladiny cholesterolem dietou (69), hypolipidemikou (70) nebo pomocí LDL-aferézy (71) vede k významnému zlepšení vazodilatace závislé na endotelu. Doba, která je nutná pro rozvoj klinicky prokazatelného zlepšení endoteliální funkce zřejmě závisí na velikosti a rychlosti snížení cholesterolu; v případě dietní intervence se jedná o měsíce, při podávání účinných hypolipidemik o týdny (70) a při razantním snížení cholesterolu o 60-80% během několika hodin je zlepšení pozorovatelné prakticky bezprostředně po provedení LDL-aferézy (71). Přejít z diety bohaté na cholesterol na dietu normální vedlo v experimentu na opicích během několika měsíců nejen k normalizaci sérového cholesterolu, ale také k normalizaci vazodilatace závislé na endotelu a ústupu zánětlivé infiltrace cévní stěny (69). Hypolipidemická léčba cholestyraminem a dietou významně zlepšila koronární vasodilataci závislou na endotelu u pacientů s hyperlipidemií během 6 měsíců (72). V jiné studii se zlepšila vazodilatace závislá na endotelu na tepnách předloktí po 12 týdnech hypolipidemické léčby, a zhoršila se k výchozím hodnotám již za 6 týdnů po přechodném vysazení léčby (73). Po výrazném snížení cholesterolu pomocí LDL-aferézy se vazodilatace závislá na endotelu v oblasti koronárního řečiště i na tepnách předloktí zlepšila dokonce již během několika hodin (71, 74).

Ovlivnění zánětlivých procesů v cévní stěně

Aterogenní lipoproteiny krevní plazmy zvyšují expresi leukocytárních i endoteliálních cytoadhezivních molekul (75) a zvyšují schopnost adheze leukocytů k endoteliálním buňkám in vitro (76); zvýšená exprese leukocytárních cytoadhezivních molekul byla též pozorována u pacientů s hypercholesterolémií (50, 77). Aktivace monocytů a makrofágů v subendoteliálním prostoru oxidovanými LDL-částicemi udržuje zánětlivou infiltraci plátu a prohlubuje endoteliální dysfunkci. Uvedené procesy jsou z větší části reverzibilní po snížení hladiny cholesterolu. Snížení cholesterolu potlačuje expresi cytoadhezivních molekul na povrchu endoteliálních buněk a sížuje plazmatickou koncentraci těchto molekul (78). Tento efekt hypolipidemické léčby přitom nastupuje velmi rychle; koncentrace ICAM-1 a ELAM-1 byla snížena o 25-30% bezprostředně po provedení LDL aferézy a vrátila se postupně k původním hodnotám během 5-7 dní (79). Obdobně vede hypolipidemická léčba k snížení exprese leukocytárních cytoadhezivních molekul v experimentálních (80) i klinických podmínkách (50). Po hypolipidemické léčbě se také snižuje akumulace cholesterolu v makrofázích, klesá počet makrofágů a snižuje se produkce metalloproteináz těmito buňkami v aterosklerotickém plátu (63, 81).

Systémové ukazatele zánětu po hypolipidemické léčbě

Podíl lokální zánětlivé reakce na vzniku aterosklerotické léze vyvolal otázku, zda se tento zánětlivý proces projevuje také zvýšením hladiny plazmatické koncentrace systémových ukazatelů zánětu. Několik epidemiologických studií prokázalo souvislost mezi hladinou některých těchto proteinů (CRP a sérového amyloidu A - SAA) a rizikem rozvoje akutních koronárních příhod (82). V poslední době se objevily práce zabývající se vlivem hypolipidemické léčby na plazmatickou hladinu ukazatelů zánětu. Ve studii CARE byla patrná souvislost mezi hladinou CRP a SAA a rizikem

vzniku koronární příhody; podávání pravastatinu vedlo k významnému poklesu obou těchto proteinů a snížení jejich hladiny bylo spojeno se snížením koronárního rizika (83). Pokles hladiny CRP byl také pozorován po dalších statinech a po podávání fibrátů (84).

Vliv na funkci trombocytů a faktory koagulace

Agregace destiček a vznik trombu v místě porušeného endoteliálního krytu nestabilního plátu je procesem, který je v největší míře přímo zodpovědný za vznik úplného uzávěru cévního lumen a za rozvoj tkáňové ischemie. Velikost vzniklého trombu a rychlost jeho rozpuštění závisejí na velikosti a trombogenitě exponovaného subendoteliálního materiálu a na rovnováze lokálních i celkových protrombotických a antitrombotických mechanismů (85). Agregabilita destiček je přímo závislá na funkci endotelu a endoteliální dysfunkce je provázena zvýšenou agregabilitou a trombogenním potenciálem destiček (86). Hladiny destičkového cGMP, jehož produkce je závislá na endoteliální syntéze oxidu dusnatého (NO), jsou nižší při vyšších hladinách cholesterolu. Agregabilita destiček je však ovlivněna hladinou cholesterolu také přímo; pacienti s hypercholesterolmií mají vyšší poměr cholesterolu proti fosfolipidům v membránách trombocytů, což je provázeno jejich zvýšenou agregabilitou (87). Snížení cholesterolu farmakologickými i nefarmakologickými postupy vede k normalizaci funkce endotelu i poměru lipidů v membránách trombocytů a k snížení jejich agregability (88, 89).

3

CÍL PRÁCE

Vlastní výzkumná práce zahrnovala čtyři tematické okruhy

- leukocytární exprese cytoadhezivních molekul
- metaloproteináza PAPP-A jako nový marker aterogeneze
- mikrovaskulární reaktivita
- možnosti krátkodobé léčby LDL-aférou u pacientů s těžkou hypercholesterolémií a ICHS.

V následujících odstavcích uvádím stručně hlavní východiska a cíle práce v těchto jednotlivých oblastech.

Leukocytární exprese cytoadhezivních molekul

Zánětlivá infiltrace aterosklerotických lézí leukocyty se významně podílí na všech stádiích procesu aterogeneze. Prvním krokem v přestupu leukocytů z cévního řečiště do subendoteliálního prostoru je jejich adheze na endoteliální buňky. Adheze a transendoteliální migrace leukocytů je zprostředkována pomocí tzv. cytoadhezivních molekul, které se nacházejí na povrchu leukocytů i endoteliálních buněk. Různé proaterogenní faktory včetně hyperlipidémie vedou ke zvýšení exprese cytoadhezivních molekul a tento mechanismus zřejmě přispívá k urychlení procesu aterogeneze.

V klinických podmínkách byly dosud studovány především plazmatické koncentrace endoteliálních cytoadhezivních molekul, které jsou nepřímým ukazatelem jejich endoteliální exprese. Jedná se o vyšetření velmi jednoduché, ale - vzhledem k tomu, že se jedná o nepřímý - nepřiliš citlivé. Na rozdíl od endoteliálních buněk lze leukocytární expresi adhezivních molekul stanovovat i v klinických podmínkách

přímo, vyšetřením leukocytů periferní krve. Je proto možno předpokládat, že exprese leukocytárních adhezivních molekul bude citlivějším ukazatelem zánětlivé infiltrace než plazmatické koncentrace endoteliálních adhezivních molekul.

Cílem této části práce proto bylo

- zavést metodu imunocytochemické detekce cytoadhezivních molekul na leukocytech periferní krve metodou průtokové cytometrie
- porovnat výsledky vyšetření leukocytárních a endoteliálních cytoadhezivních molekul u pacientů s těžkou izolovanou hypercholesterolémií a u zdravých osob a studovat jejich změny po hypolipidemické terapii atorvastatinem.

Metaloproteináza PAPP-A jako nový marker aterogeneze

Výsledky výzkumu posledních desetiletí ukazují, že riziko vzniku akutních aterotrombotických příhod příliš nezávisí na velikosti aterosklerotických plátů (a tedy závažnosti stenózy), ale především na množství dalších faktorů, které souhrnně určují tzv. stabilitu plátu. Stabilita plátu je určena poměrem zastoupení buněčných a nebuněčných složek plátu a aktivitou různých enzymatických a signálních mechanismů. Studiu vlastností stabilních a nestabilních lézí a možnosti jejich farmakologického ovlivnění je proto v poslední době věnována velká pozornost.

Metaloproteináza PAPP-A (akronym „pregnancy-associated plasma protein-A“) byla dosud využívána především v prenatální diagnostice Downova syndromu; její fyziologická funkce nebyla donedávna známa. V posledních několika letech bylo zjištěno, že tento enzym zřejmě působí jako lokální modulátor aktivity systému IGF-I a podílí se tak na řízení proliferativních dějů v různých tkáních organismu. Vysoká

exprese PAPP-A byla prokázána v nestabilních aterosklerotických lézích a výrazně zvýšené koncentrace PAPP-A jsou nacházeny u pacientů s nestabilní anginou pectoris nebo s akutním srdečním infarktem. Proto je tato molekula v poslední době studována jako možný laboratorní marker akutních koronárních syndromů.

Hypercholesterolemie je významným rizikovým faktorem aterogeneze a mnoha mechanismy ovlivňuje vývoje a stabilitu aterosklerotických plátů. Hypercholesterolemie je také provázena alterací různých laboratorních a funkčních ukazatelů procesu aterogeneze, a hypolipidemická léčba vede k úpravě těchto ukazatelů. Určitá míra exprese PAPP-A byla v experimentu prokázána také ve stabilních aterosklerotických plátech, a je proto možné, že se tato proteáza podílí na vývoji aterosklerotických lézí. Vztah mezi koncentrací PAPP-A a rizikovými faktory aterogeneze však dosud studován nebyl.

Cílem této části práce bylo zjistit, jestli koncentrace PAPP-A jsou vyšší u pacientů s hypercholesterolemií než u osob bez hyperlipidémie a jestli hypolipidemická léčba atorvastatinem vede k poklesu jejích hodnot.

Mikrovaskulární reaktivita

Endoteliální dysfunkce je v současné době považována za první stádium vývoje aterosklerózy, které lze prokázat dlouho před rozvojem morfologicky prokazatelných aterosklerotických lézí. Proto je v současné době rozvoji metod pro hodnocení endoteliální dysfunkce v klinické praxi věnováno značné výzkumné úsilí. Jedním z hlavních projevů endoteliální dysfunkce je porucha tepenné vazodilatace závislé na endotelu; při endoteliální dysfunkci je endotelem zprostředkovaná vazodilatace omezená, nebo dokonce nepřítomná. Při vyšetřování vazodilatace závislé na endotelu se měří změna průsvitu tepny v odpověď na různé vazodilatační podněty;

všechny metody pro vyšetřování endoteliální dysfunkce jsou však metodicky velmi náročné a často též invazivní. Proto jsou studovány a rozvíjeny nové metody, které by umožnily endoteliální dysfunkci posoudit jednodušším a způsobem.

V nedávné době byla vyvinuta metoda vyšetření mikrocirkulace pomocí laser-dopplerovského měření průtoku krve kapilárami (vyšetření mikrovaskulární reaktivity, MVR). V klinických podmínkách byla tato metoda zatím využívána především k vyšetření mikrocirkulace u pacientů s diabetem nebo k sledování funkčního stavu tkání např. v tranplantační chirurgii. U pacientů s hyperlipidémií nebo s klinicky manifestní aterosklerózou však byla MVR studována zatím jen zcela ojediněle.

V rámci této části práce jsme proto studovali MVR u pacientů s hyperlipidémií, kteří neměli klinické projevy aterosklerózy, a u osob s ischemickou chorobou srdeční. Výsledky jsme srovnali s nálezy u kontrolního souboru zdravých osob a několika skupin diabetiků, kteří byli již dříve vyšetřeni na našem pracovišti. U pacientů s hypercholesterolémií jsme dále studovali vliv hypolipidemické léčby atorvastatinem a u pacientů s ICHS účinek léčby LDL-aférezou.

Možnosti krátkodobé léčby LDL-aférezou

Hyperlipidémie jsou hlavním rizikovým faktorem ICHS a léčba hyperlipidémií je v současné době nejúčinnějším prostředkem v rámci primární i sekundární prevence kardiovaskulárních chorob. Základem léčby hyperlipidémií je kombinace nefarmakologické léčby a hypolipidemik, která u naprosté většiny pacientů postačuje k úpravě lipidogramu i k stabilizaci klinického stavu. Přesto zůstává menšina pacientů, u kterých prostředky konzervativní léčby selhávají a riziko koronárních příhod u nich zůstává vysoké. V omezeném rozsahu se v poslední době jako nový léčebný postup pro tyto pacienty využívá LDL-afézeza.

LDL-aféza je extrakorporální metoda, která umožňuje selektivní eliminaci LDL částic z krve pacienta. Tato metoda je bezpečná a mimořádně účinná; v kombinaci s farmakoterapií vede ke snížení koncentrace cholesterolu až o 80%. Dosud byla používána především k dlouhodobé léčbě pacientů s těžkými formami ICHS a hyperlipidémií rezistentní na léčbu. V poslední době se však objevily první práce, které studovaly možnosti krátkodobé aplikace LDL-afézy u vybraných skupin pacientů .

Teoretickým východiskem pro výzkum krátkodobé léčby LDL-afézou jsou novější poznatky o biologických vlastnostech aterosklerotických plátů. Stabilita plátů je významně ovlivněna koncentrací plazmatických lipidů a změny koncentrace LDL-cholesterolu přitom vedou ke změnám jejich vlastností dokonce již během několika hodin až dní. Účinné snížení plazmatického cholesterolu proto může ovlivnit klinický stav pacientů během velmi krátké doby.

V této části práce jsme studovali účinnost krátkodobé léčby LDL-afézou u pacientů s hyperlipidémií a těžkou, revaskularizací neřešitelnou ICHS. Vzhledem k tomu, že technika pro provádění krátkodobé léčby LDL-afézou nebyla v době návrhu projektu v ČR dostupná, bylo jedním z cílů práce i vlastní zavedení této metody na našem pracovišti.

4

LEUKOCYTÁRNÍ EXPRESE A PLAZMATICKÉ KONCENTRACE CYTOADHEZIVNÍCH MOLEKUL

**Vliv atorvastatinu na leukocytární a endoteliální
cytoadhezivní molekuly u pacientů s hypercholesterolémií**

Úvod

Infiltrace subendoteliálního prostoru leukocyty hraje v procesu aterogeneze důležitou úlohu. Leukocyty jsou podkladem pro vznik pěnových buněk, zhoršují endoteliální dysfunkci, vytvářejí a udržují zánětlivou infiltraci plátu a ovlivňují myointimální proliferaci (44). Podílejí se však i na vzniku akutních aterosklerotických příhod: v určité fázi vývoje plátu produkují proteolytické enzymy, které snižují mechanickou pevnost plátu a zvyšují riziko jeho ruptury (48).

Prvním krokem v přestupu leukocytů z cévního řečiště do subendoteliálního prostoru je jejich adheze na endoteliální buňky. Adheze a transendoteliální migrace leukocytů je zprostředkována pomocí tzv. cytoadhezivních molekul, které se nacházejí na povrchu leukocytů i endoteliálních buněk (35, 36, 37, 52, 53). Různé proaterogenní faktory vedou ke zvýšení exprese cytoadhezivních molekul endoteliálními buňkami in vitro (44, 76), a donedávna se předpokládalo, že celý proces transendoteliální migrace leukocytů je regulován hlavně prostřednictvím endoteliálních adhezivních molekul. Zvýšená koncentrace těchto molekul v krvi byla také pozorována osob s hyperlipidémií nebo s jinými rizikovými faktory aterogeneze, a hypolipidemická léčba vedla k jejich poklesu (90). Změny pozorované u pacientů však obvykle nejsou příliš výrazné (91), zřejmě především proto, že plazmatické koncentrace cytoadhezivních molekul jsou jen nepřímým ukazatelem jejich endoteliální exprese.

Novější práce ukazují, že na regulaci transendoteliální migrace leukocytů se významně podílí také změny exprese leukocytárních cytoadhezivních molekul. Aterogenní lipoproteiny zvyšují expresi těchto molekul in vitro (75, 76, 92) i v klinických podmínkách (50, 77), a nedávno bylo také prokázáno, že snížení cholesterolu farmakologickými i nefarmakologickými prostředky významně potlačuje

expresi integrinů a lipopolysacharidového receptoru na monocytech a snižuje adhezi leukocytů k endotelu (50, 51, 93).

Na rozdíl od endoteliálních buněk lze leukocytární expresi adhezivních molekul i v klinických podmínkách stanovovat přímo, vyšetřením leukocytů periferní krve. Je proto možno předpokládat, že exprese leukocytárních adhezivních molekul bude citlivějším ukazatelem zánětlivé infiltrace než plazmatické koncentrace endoteliálních adhezivních molekul. Proto jsme provedli porovnání těchto dvou skupin ukazatelů u pacientů s těžkou izolovanou hypercholesterolémií a u zdravých osob a studovali jejich změny po hypolipidemické terapii atorvastatinem.

Metody

Vyšetřené skupiny osob a uspořádání studie

Do studie jsme zařazovali pacienty s hypercholesterolémií (TC >7,0 mmol při dietní léčbě); pacienti byli bez hypolipidemické léčby alespoň 4 týdny před vstupním vyšetřením. Ze studie byly vyloučeny osoby s ICHS nebo jinými klinickými projevy aterosklerózy, s významnou hypertriglyceridémií (TG >4,5 mmol/l), sekundárními hyperlipidemiemi, diabetem mellitem, malignitami a dalšími závažnými chorobami.

Do kontrolní skupiny byly zařazovány osoby s TC <6,0 mmol/l, TG <2,0 mmol/l, bez klinických projevů aterosklerózy a bez dalších závažných chorob; přítomnost arteriální hypertenze nebyla překážkou pro zařazení do skupiny pacientů ani do kontrolního souboru.

Pacienti byli léčeni atorvastatinem (Sortis, tbl 20mg 1x denně večer) po dobu 10-12 týdnů. Vyšetření byla provedena před začátkem a po ukončení léčby; osoby

z kontrolního souboru byly vyšetřeny jednorázově. Odběr krve pro laboratorní vyšetření byl prováděn ráno, po celonočním lačnění (12-14 hodin).

Vyšetření leukocytárních cytoadhezivních molekul

Vyšetření leukocytárních cytoadhezivních molekul byla prováděna vždy v den odběru. K vyšetření byla používána nesrážlivá krev (s EDTA jako antikoagulačním prostředkem); krev byla až do vyšetření přechovávána při 4°C, aby se předešlo aktivaci leukocytů in vitro.

Na povrchu leukocytů periferní krve jsme vyšetřovali expresi L-selektinu (CD62L), jednotlivých α -podjednotek integrinů LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b) a VLA-4 (CD49d) a společné β -podjednotky β -2 integrinů (CD18). Expresi cytoadhezivních molekul byla měřena imunofluorescenční metodou pomocí jednostupňového barvení monoklonálními protilátkami. 100 μ l krve jsme inkubovali 15 minut s příslušnou protilátkou při pokojové teplotě; poté jsme lysovali erytrocyty přidáním 2ml FACS lysis solution (7minut), zcentrifugovali a 1x promyli PBS. Fluorescenci jsme kvantifikovali průtokovou cytometrií (FACSCalibur, Becton – Dickinson, Mountain View, CA, USA); populace lymfocytů, monocytů a granulocytů jsme hodnotili odděleně. Expresi každého z vyšetřovaných antigenů byla vyjádřena jako tzv. specifická fluorescence, která je vypočtena jako rozdíl fluorescence buněk označených příslušnou protilátkou a nespecifické fluorescence buněk označených kontrolní protilátkou (obrázek 4.1). K detekci antigenů jsme používali následující myší monoklonální protilátky: anti-CD11a/FITC (klon MEM-25), anti-CD11b/FITC (klon CR3 Bear-1) anti-CD18/FITC (klon CLB-LFA-1/1) a anti-CD62L/PE (klon DREG-56), vše od Caltag Laboratoires, Burlingame, USA, a dále anti-CD49d/FITC (klon HP2/1) a nespecifickou kontrolní protilátku (značenou FITC i PE, klon 679.1Mc7) od Immunotech, Marseille, Francie; všechny protilátky byly isotypu IgG1.

Další laboratorní vyšetření

Koncentrace endoteliálních molekul v séru byly stanovovány metodou ELISA pomocí komerčně dostupných kitů; vyšetřovali jsme molekuly ICAM-1, E-selektin (RD Systems, Abingdon, UK) a von Willebrandův faktor (IMTEC Immunodiagnostika, Berlín, Německo). Pro tato stanovení byla používána zmražená séra, která byla po odběru uschována při teplotě -85°C .

Základní laboratorní vyšetření včetně sérové koncentrace cholesterolu, HDL-C a TG byla prováděna v den odběru rutinní metodikou pomocí automatických analyzátorů. Koncentrace LDL-C byla vypočítána pomocí Friedewaldovy rovnice. Jako ukazatele bezpečnosti léčby byly stanovovány hodnoty iontů, urey, kreatininu, transamináz a kreatinfosfokinázy.

Statistické zpracování

Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm SD. Významnost rozdílů exprese / koncentrace cytoadhezivních molekul mezi skupinami byla hodnocena Mann-Whitneyho U-testem; významnost změn po léčbě byla hodnocena Wilcoxonovým párovým testem. Rozdíly v dalších parametrech byly hodnoceny Studentovým t-testem. Vzájemná závislost mezi jednotlivými proměnnými byla posuzována pomocí Spearmanova korelačního koeficientu.

Výsledky

Do studie bylo zařazeno 29 pacientů s hypercholesterolémií a 27 zdravých osob z kontrolního souboru. Všichni zařazení pacienti studii dokončili; průměrná doba léčby byla 89 ± 8 dní. Léčba byla dobře tolerována; během studie se nevyskytly závažné

nežádoucí účinky ani významné změny v laboratorních ukazatelích bezpečnosti léčby.

Základní charakteristiky obou sledovaných skupin jsou uvedeny v tabulce 4.1. Skupiny byly srovnatelné pokud jde o věk, pohlaví a index tělesné hmotnosti. Podíl hypertoniků a kuřáků byl poněkud vyšší mezi pacienty než v kontrolní skupině, ale rozdíly nebyly statisticky významné.

Hladiny cholesterolu, LDL-C a TG byly významně vyšší ve skupině pacientů než v kontrolním souboru; hodnota všech těchto parametrů se po léčbě atorvastatinem významně snížila (tabulka 4.1). Koncentrace HDL-C byla v obou skupinách obdobná a nebyla léčbou ovlivněna.

Expresí leukocytárních adhezivních molekul u vyšetřených osob je uvedena v tabulce 4.2 a na obrázku 4.2. Pacienti s hyperlipidemií měli na všech leukocytárních populacích zvýšenou expresi L-selektinu i všech vyšetřovaných integrinů s výjimkou LFA-1; rozdíl byl na hranici významnosti u integrinu CD18 a nevýznamný u integrinu VLA-4 na monocytech; ve všech ostatních případech bylo zvýšení statisticky významné. Léčba atorvastatinem vedla k významnému poklesu všech integrinů s výjimkou Mac-1 (opět na všech populacích leukocytů); v případě L-selektinu byl patrný pokles, který byl významný na granulocytech; na lymfocytech a monocytech nedosáhl statistické významnosti. Je patrné, že u jednotlivých molekul měly rozdíly exprese mezi skupinami i její změny po léčbě na lymfocytech, monocytech i granulocytech podobnou velikost. Mezi expresí cytoadhezivních molekul a hladinami lipidů nebyly patrné významné korelace. Počet leukocytů v krvi ani zastoupení jednotlivých leukocytárních subpopulací se mezi pacienty a kontrolami nelišily a nebyly léčbou ovlivněny.

Koncentrace ICAM-1 v séru byla u pacientů zvýšena; koncentrace E-selektinu a von Willebrandova faktoru (vWF) byla podobná jako u zdravých osob. Koncentrace žádné z těchto molekul se po léčbě atorvastatinem výrazněji nezměnila (tabulka 4.1).

Diskuse

Leukocytární exprese většiny studovaných cytoadhezivních molekul byla u pacientů s hypercholesterolémií zvýšená, a léčba atorvastatinem vedla k jejímu poklesu. Naše práce tak rozšiřuje dosavadní poznatky o významu zvýšené adhezivity leukocytů v procesu aterogeneze.

Faktory ovlivňující adhezi leukocytů k endoteliálním buňkám in-vitro byly podrobně studovány, ale údajů o expresi cytoadhezivních molekul na leukocytech v klinických podmínkách dosud není mnoho. Přestup leukocytů z cévního řečiště do subendoteliálního prostoru závisí na několika skupinách molekul. Tento proces začíná labilní vazbou integrinů na jejich glykoproteinové ligandy. Během této počáteční fáze dochází k aktivaci integrinů na povrchu leukocytů, což umožňuje následující pevnou adhezi leukocytů k endoteliálním buňkám. Posledním krokem je pak vlastní migrace leukocytů do subendoteliálního prostoru (37, 50, 94). Většina autorů studovala pouze omezený počet těchto molekul. V této studii jsme vyšetřovali L-selektin i několik různých integrinů, a naše práce proto patří spolu s prací Rezaie-Majd (95) svým rozsahem k největším. U pacientů s hyperlipidémií a aterosklerózou byl nejčastěji studován integrin Mac-1; bylo popsáno zvýšení exprese ve srovnání se zdravými kontrolami (50, 77), v některých případech však bylo zvýšení jen nevýrazné (51) nebo dokonce žádné (96). Také efekt hypolipidemické léčby se pohyboval od výrazného snížení exprese přes nevýrazný pokles až po žádný efekt. Kromě molekuly Mac-1 byla u pacientů s hyperlipidémií nebo aterosklerózou popsána

zvýšená exprese integrinů LFA-1 (95), CD18 (95) a VLA-4 (97) a její pokles po hypolipidemické léčbě; a též snížená (50), ale i normální (77) exprese L-selektinu.

Z uvedeného přehledu je zřejmé, že dosud publikované údaje o leukocytární expresi cytoadhezivních molekul v klinických podmínkách nejsou zcela jednotné. Rozpornost některých výsledků lze pravděpodobně vysvětlit především rozdíly v metodickém přístupu. Většina autorů vyšetřovala leukocyty, které byly z krve separovány gradientovou centrifugací (51, 93, 95, 97), zatímco jiné práce používaly k měření leukocytárních markerů plnou krev (50, 77, 96). Další potenciálně důležité rozdíly v metodice představují teplota, při které jsou vzorky zpracovávány, a antikoagulační prostředky použité k odběru krve. Všechny tyto faktory mohou ovlivňovat výsledky měření. In-vitro manipulace obecně vede k aktivaci leukocytů, a tento efekt je výraznější při vyšších teplotách (20-37 °C), zatímco v chladu je vliv manipulace omezen. Výrazný stimulující faktor pak představuje použití gradientově centrifugace (94). Pro aktivaci integrinů jsou nezbytné Ca^{2+} ionty, a použití EDTA jako antikoagulace proto jejich (aktivaci ve srovnání např. s heparinem) omezuje. Naopak v případě L-selektinu vede aktivace leukocytů ke ztrátě jeho povrchové exprese (tzv. shedding, 50). Metody zahrnující separaci leukocytů, navíc při pokojové teplotě, proto posuzují spíše stimulační potenciál leukocytů, než skutečnou úroveň aktivace leukocytů in-vivo. V naší práci jsme se snažili in-vitro stimulaci omezit co nejvíce; předpokládáme proto, že výsledky odrážejí skutečnou expresi cytoadhezivních molekul u obou vyšetřených skupin pacientů.

Při hodnocení leukocytární exprese integrinů je také nutné vzít v úvahu, že adheze leukocytů k endotelu nezávisí pouze na počtu molekul integrinů (expresi), ale také na konformačních změnách jejich molekuly – tzv. aktivaci. Tyto konformační změny molekul mohou ovlivňovat leukocytární adhezivitu více, než změny jejich exprese (98). Ve shodě s tím byl v práci Webbera pokles adhezivitu leukocytů po léčbě statinem výraznější, než pokles exprese integrinů (51).

Expresi adhezivních molekul jsme v naší práci hodnotili na lymfocytech, monocytech i granulocytech; je zajímavé, že výsledky získané vyšetřením těchto leukocytárních subpopulací byly velmi podobné. Po léčbě atorvastatinem měly změny exprese jednotlivých molekul na lymfocytech, monocytech i granulocytech podobnou velikost; také rozdíly exprese těchto molekul mezi pacienty a kontrolami byly na jednotlivých leukocytárních subpopulacích obdobné. Většina dosavadních prací studovala především monocyty (51, 93, 95, 97), zřejmě proto, že jsou prekurzorem makrofágů a posléze pěnových buněk, a jejich význam v rozvoji aterosklerózy je zdánlivě nejdůležitější. Na procesu aterogeneze a trombogeneze se však podílejí i lymfocyty a granulocyty. T-lymfocyty hrají úlohu především v regulaci imunitních reakcí uvnitř aterosklerotických plátů; jejich zastoupení mezi ostatními typy buněk dosahuje 10-20%, a jsou ve zvýšené míře lokalizovány ve vulnerabilních oblastech plátu (45, 46). Granulocyty se pak především podílejí na rozvoji tkáňového poškození během ischemie a reperfuze v průběhu akutních atherotrombotických příhod (99). Význam lymfocytů, monocytů i granulocytů pro rozvoj aterosklerózy a jejich komplikací je tedy navzájem srovnatelný. Naše výsledky ukazují, že tyto leukocytární subpopulace jsou také podobně ovlivněny hyperlipidémií a že obdobně reagují na hypolipidemickou léčbu.

Na rozdíl od leukocytární exprese adhezivních molekul byly při hyperlipidémií sérové koncentrace endoteliálních aktivačních markerů zvýšeny jen nekonstantně (pouze zvýšení ICAM-1) a hypolipidemickou léčbou nebyly ovlivněny vůbec. Tento nález může být na první pohled překvapivý, protože úloha endotelu v regulaci transendoteliální migrace leukocytů je zcela nepochybná (35, 36), a ICAM-1 a E-selektin jsou hlavní molekuly, které se na tomto procesu podílejí (52, 53, 44). vWF je protein uvolňovaný endoteliálními buňkami, který podporuje adhezi a agregaci trombocytů (100, 108). Experimentální práce také prokázaly zvýšení exprese cytoadhezivních molekul endoteliálními buňkami pod vlivem aterogenních

lipoproteinů a pokles jejich exprese v působení některých hypolipidemik (101, 102). Přímé vyšetřování endoteliálních buněk (na rozdíl od leukocytů) je však v klinických podmínkách prakticky nemožné, a jako nepřímého ukazatele se proto používá stanovení koncentrace endoteliálních molekul v krvi. Zvýšená koncentrace endoteliálních cytoadhezivních molekul a vWF v krvi byla pozorována u osob s hyperlipidémií nebo s jinými rizikovými faktory aterosogeneze, a hypolipidemická léčba vedla k jejich poklesu (90, 91, 100, 103, 104). Změny pozorované u pacientů však obvykle nejsou příliš výrazné (90, 91, 104), a některé práce změny sérových koncentrací cytoadhezivních molekul u osob s hyperlipidémií neprokázaly vůbec (105, 106). Vyšetření sérových koncentrací však není příliš citlivým ukazatelem jejich endoteliální exprese, což je zřejmě hlavní příčina negativního výsledku práce naší i některých dalších autorů i částečné diskrepance experimentálních a klinických pozorování.

Je zajímavé, že změny v expresi adhezivních molekul po léčbě nekorelovaly se změnami koncentrace lipidů; to naznačuje, že účinek atorvastatinu na leukocyty by mohl být zprostředkován přímým, na lipidech nezávislým mechanismem. Podobný pokles leukocytárních adhezivních molekul byl však pozorován také po snížení cholesterolu LDL-aférou (93, 97), a v případě této nefarmakologické léčby nelze její účinek vysvětlit jinak, než poklesem cholesterolu. Je tedy zřejmé, snížení exprese leukocytárních adhezivních molekul po hypolipidemické léčbě může být vysvětleno samotným snížením koncentrace cholesterolu. Také nález zvýšené exprese cytoadhezivních molekul u osob s hypercholesterolémií svědčí pro přímé ovlivnění leukocytárních funkcí hladinami plazmatického cholesterolu. Na druhé straně výsledky některých experimentálních prací ukazují, že statiny mají také přímý, na lipidech nezávislý účinek na expresi leukocytárních adhezivních molekul (51, 92, 95). Tento přímý účinek statinů je dáván do souvislosti s inhibicí syntézy intracelulárních izoprenoidů a následnou blokádou faktoru (NF)- κ -B, interferencí se signální cestou

Rho/Rho-kinázy a ovlivněním cytoskeletonu (92, 107). Je tedy pravděpodobné, že vliv statinů na leukocytární cytoadhezivní molekuly má jak složku závislou na hypolipidemickém účinku, tak na tomto působení nezávislou.

Závěr

U pacientů s hyperlipidémií byla zvýšená leukocytární exprese většiny studovaných cytoadhezivních molekul, a léčba atorvastatinem vedla k významnému poklesu jejich exprese. Do jaké míry se tento nově prokázaný účinek podílí na antiaterogennímu působení hypolipidemické léčby, není dosud jasné. Lze však předpokládat, že pokles exprese leukocytárních adhezivních molekul může přispívat k snížení zánětlivé infiltrace a zvýšení stability aterosklerotických plátů. Definitivní odpověď na otázku, zda se tento účinek na leukocyty podílí na snížení kardiovaskulárního rizika u pacientů léčených statiny, však mohou přinést pouze rozsáhlejší klinické studie.

	Kontrolní soubor	Pacienti před léčbou	Pacienti po léčbě
Počet	29	27	
Pohlaví (muži/ženy)	9 / 20	8 / 19	
Věk [roků]	47,8 ± 6,5	52,3 ± 11,5	
BMI [kgm ⁻²]	25,2 ± 3,4	26,7 ± 4,3	
Hypertenze	6 (21%)	9 (33%)	
Kouření	5 (17%)	9 (33%)	
TC [mmol/l]	5,14 ± 0,72	8,59 ± 1,60 ^a	5,87 ± 1,12 ^x
LDL-C [mmol/l]	2,99 ± 0,64	6,20 ± 1,39 ^a	3,67 ± 0,94 ^x
HDL-C [mmol/l]	1,61 ± 0,32	1,63 ± 0,32	1,61 ± 0,33
TG [mmol/l]	1,21 ± 0,66	1,67 ± 0,63 ^b	1,33 ± 0,37 ^y
ICAM-1 [mg/l]	405 ± 126	479 ± 136 ^c	495 ± 136
E-selektin [mg/l]	56,3 ± 36,0	58,5 ± 38,3	59,4 ± 34,5
vWF [U/ml]	0,99 ± 0,89	0,84 ± 0,42	0,99 ± 0,47

Tabulka 4.1. Vstupní charakteristika a hladiny lipidů a cytoadhezivních molekul u vyšetřených osob

BMI –index tělesné hmotnosti, TC – celkový cholesterol, TG – triglyceridy, HDL-C - HDL-cholesterol, LDL-C - LDL-cholesterol, vWF – von Willebrandův faktor. Hypertenze a kouření jsou uvedeny jako absolutní počet (v závorce procentní podíl) hypertoniků, resp. kuřáků.

^a p<0,001, ^b p<0,01, ^c p<0,05 pacienti vs. kontroly

^x p<0,001, ^y p<0,01, ^z p<0,05 pacienti před léčbou vs. po léčbě

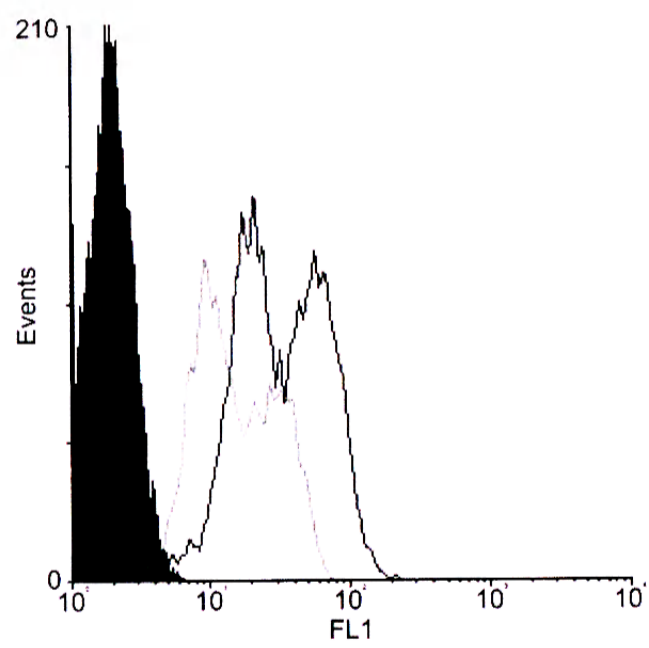
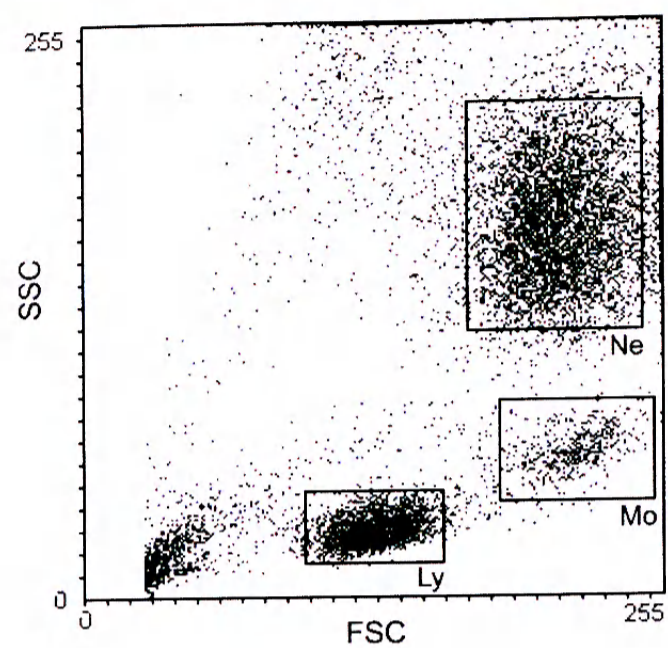
	Kontrolní soubor	Pacienti před léčbou	Pacienti po léčbě
LFA-1			
Lymfocyty	80,7 ± 28,3	80,8 ± 20,7	58,8 ± 21,3 ^x
Monocyty	159 ± 55	151 ± 26	113 ± 33 ^x
Granulocyty	36,2 ± 10,3	35,4 ± 6,6	26,0 ± 7,3 ^x
Mac-1			
Lymfocyty	2,33 ± 1,58	5,60 ± 3,58 ^a	5,42 ± 2,95
Monocyty	21,8 ± 13,3	52,5 ± 25,9 ^a	64,8 ± 21,7
Granulocyty	23,2 ± 13,6	52,3 ± 25,1 ^a	62,5 ± 17,1
CD18			
Lymfocyty	18,1 ± 6,2	25,6 ± 12,1 ^c	20,0 ± 7,5 ^z
Monocyty	45,6 ± 16,2	65,0 ± 31,4 ^c	50,2 ± 13,6 ^y
Granulocyty	23,0 ± 10,2	35,4 ± 17,7 ^c	27,6 ± 9,6 ^z
VLA-4			
Lymfocyty	20,7 ± 4,0	24,6 ± 5,6 ^c	21,5 ± 5,1 ^z
Monocyty	32,0 ± 10,4	34,8 ± 7,8	30,5 ± 8,3 ^z
L-selectin			
Lymfocyty	315 ± 62	411 ± 153 ^c	385 ± 119 ^z
Monocyty	368 ± 83	488 ± 179 ^c	411 ± 145
Granulocyty	291 ± 96	453 ± 177 ^b	354 ± 134

Tabulka 4.2. Leukocytární exprese cytoadhezivních molekul u vyšetřených osob

Expresce cytoadhezivních molekul na povrchu lymfocytů, monocytů a granulocytů u zdravých osob a u pacientů s hypercholesterolémií před léčbou a po léčbě atorvastatinem. Výsledky (v arbitrárních jednotkách fluorescence) jsou uvedeny jako průměr ± SD. Expresce molekuly VLA-4 na granulocytech nebyla prakticky detekovatelná a není proto uvedena; expresce molekuly Mac-1 na lymfocytech byla velmi nízká a význam měření je tímto částečně omezen.

^a p<0,001, ^b p<0,01, ^c p<0,05 pacienti vs. kontroly

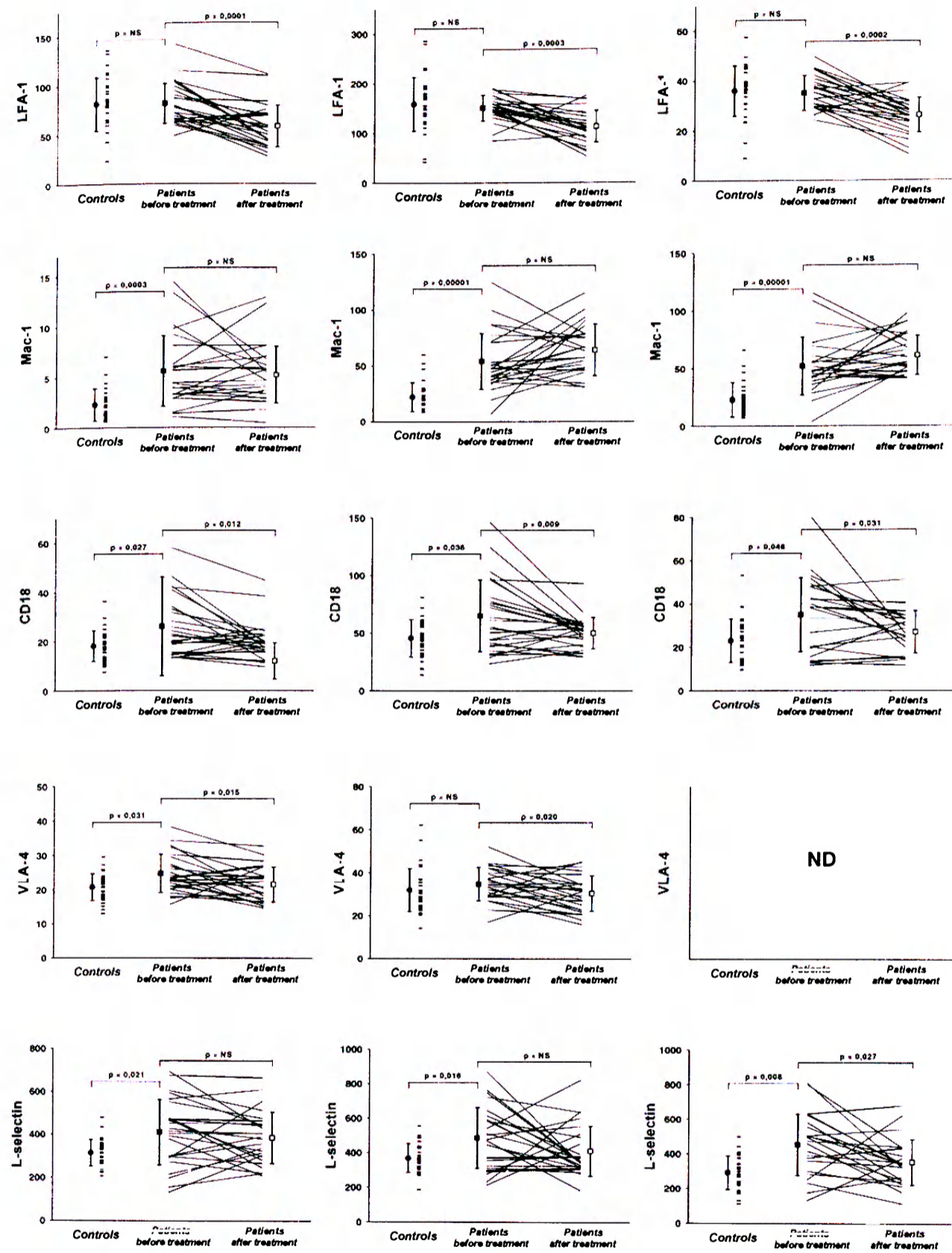
^x p<0,001, ^y p<0,01, ^z p<0,05 pacienti před léčbou vs. po léčbě



Obrázek 4.1

Obrázek 4.1. Vyšetření leukocytární exprese cytoadhezivních molekul

Expresse jednotlivých cytoadhezivních molekul byla měřena průtokovou cytometrií, pomocí jednostupňového barvení monoklonálními protilátkami. **a)** Populace lymfocytů (Ly), monocytů (Mo) a granulocytů (Ne) byly identifikovány podle rozptylu světla v přímém směru (FSC, forward scatter) a v pravém úhlu (SSC, side scatter). **b)** Expresse antigenů byla vyjádřena jako tzv. specifická fluorescence (F_{spec}), která je vypočtena jako rozdíl celkové fluorescence buněk označených příslušnou protilátkou (F_{tot}) a nespecifické fluorescence buněk označených kontrolní protilátkou (F_{bgd}); fluorescence je uvedena v arbitrárních jednotkách. Na tomto obrázku je uveden příklad vyšetření molekuly CD18 na povrchu lymfocytů; černá čára – pacient před léčbou, šedá čára – pacient po léčbě, plná plocha – vzorek označený nespecifickou protilátkou.



Obrázek 4.2

Obrázek 4.2. Leukocytární exprese cytoadhezivních molekul u vyšetřených osob

Expresce cytoadhezivních molekul na povrchu lymfocytů (levý sloupec), monocytů (prostřední sloupec) a granulocytů (pravý sloupec) u zdravých osob (kolečka) a u pacientů s hypercholesterolémií před léčbou (plné čtverečky) a po léčbě atorvastatinem (prázdné čtverečky). Data jsou zobrazena jako průměr \pm SD a jako individuální hodnoty; hodnoty jsou uvedeny v arbitrárních jednotkách fluorescence. Expresce molekuly VLA-4 na granulocytech nebyla prakticky detekovatelná a není proto uvedena (ND = neměřitelné hodnoty); expresce molekuly Mac-1 na lymfocytech byla velmi nízká a význam měření je tímto částečně omezen.

Hladiny významnosti jsou uvedeny u jednotlivých grafů; NS = nesignifikantní rozdíl.

5

METALOPROTEINÁZA PAPP-A

**Sérové koncentrace metaloproteinázy PAPP-A u pacientů s hypercholesterolémií:
vliv léčby atorvastatinem**

Úvod

Minulá desetiletí přinesla výraznou změnu v pohledu na proces vzniku a vývoje aterosklerózy i na patogenezi akutních ischemických příhod (především příhod koronárních). Do nedávné doby ještě převládal předpoklad, že vývoj aterosklerotických lézí je pomalý, postupně a celkem stabilně probíhající proces, a že akutní aterotrombotický uzávěr tepny se rozvíjí jako komplikace pokročilých, hemodynamicky velmi závažných stenóz. Posuzování závažnosti aterosklerotického postižení se proto vycházelo především z angiografického hodnocení velikosti aterosklerotických lézí a diagnostika akutních koronárních příhod se opírala o elektrokardiografické projevy ischemie a biochemické ukazatele nekrózy myokardu. Novější poznatky však jednoznačně ukazují, že rozvoj akutních aterotrombotických příhod příliš nezávisí na velikosti stenózy (109), ale na množství dalších faktorů, které souhrnně určují tzv. stabilitu plátu. Stabilní pláty jsou charakteristické silným vazivovým krytem plátu, menším lipidovým jádrem a nízkým počtem a aktivitou zánětlivých buněk. Nestabilní pláty naopak mají tenký fibrózní kryt, velké lipidové jádro a vysokou míru zánětlivé infiltrace a aktivity (110). Všechny tyto faktory vedou k nízké mechanické pevnosti nestabilních plátů, které jsou náchylné k mechanickému poškození (eroze, fisurace, ruptura) a následné trombóze – a to i v případě, že plát samotný nepůsobí hemodynamicky významnou stenózu (18).

S rozvojem účinných metod léčby akutních koronárních syndromů vyvstala velmi naléhavá potřeba nových diagnostických testů, které by pomohly rozpoznat i velmi časná stádia koronárních příhod – dříve než dojde k rozvoji myokardiální nekrózy. Vzhledem k výraznému podílu různých typů buněk na destabilizaci plátu je při hledání vhodných diagnostických markerů věnována velká pozornost právě různým molekulám, které mají souvislost se zánětlivou, proliferativní nebo naopak

proteolytickou aktivitou v oblasti plátu (111, 112, 113). Mezi těmito molekulami je v posledních několika letech věnována pozornost také metaloproteináze PAPP-A.

Zvýšené množství PAPP-A (akronym „pregnancy-associated plasma protein-A“) bylo v nedávné době nekropticky prokázáno v nestabilních a erodovaných aterosklerotických lézích (114) a též (experimentálně) v cévní stěně poškozené balónkovou angioplastikou (115). Ve stejné době bylo také zjištěno, že koncentrace PAPP-A v krvi jsou výrazně zvýšeny u pacientů s nestabilní angínou pectoris nebo s akutním srdečním infarktem (114, 116). Tato pozorování vedla k představě, že PAPP-A nějakým způsobem odráží nestabilitu aterosklerotických plátů a že by se tato molekula mohla tudíž stát novým markerem akutních koronárních syndromů (113).

Hypercholesterolemie je významným rizikovým faktorem aterogeneze a mnoha mechanismy ovlivňuje všechna stadia vývoje aterosklerotických plátů, včetně jejich stability. Léčba hypercholesterolemie také výrazně snižuje riziko rozvoje akutních koronárních příhod; tento pokles rizika je provázen snížením hladiny různých markerů zánětu a aktivace endotelu (83, 90, 117). Vztah mezi koncentrací PAPP-A a hladinami lipidů však dosud popsán nebyl. Cílem této práce proto bylo zjistit, jestli koncentrace PAPP-A jsou vyšší u pacientů s hypercholesterolemií než u osob bez hyperlipidémie a jestli hypolipidemická léčba atorvastatinem vede k poklesu jejich hodnot.

Metody

Vyšetřené skupiny osob a uspořádání studie

Do studie jsme zařazovali pacienty s těžkou hypercholesterolémií (TC >7,0 mmol při dietní léčbě); pacienti byli bez hypolipidemické léčby alespoň 4 týdny před vstupním vyšetřením. Ze studie byly vyloučeny osoby s ICHS nebo jinými klinickými projevy aterosklerózy, s těžší hypertriglyceridémií (TG >4,5 mmol/l), sekundárními hyperlipidemiemi, diabetem mellitem, malignitami a dalšími závažnými chorobami.

Do kontrolní skupiny byly zařazovány osoby bez hyperlipidémie (TC <6,0 mmol/l, TG <2,0 mmol/l), bez klinických projevů aterosklerózy a bez dalších závažných chorob; přítomnost arteriální hypertenze nebyla překážkou pro zařazení do skupiny pacientů ani do kontrolního souboru.

Pacienti byli léčeni atorvastatinem (Sortis, tbl 20mg 1x denně večer) po dobu 10-12 týdnů. Vyšetření byla provedena před začátkem a po ukončení léčby; osoby z kontrolního souboru byly vyšetřeny jednorázově.

Laboratorní vyšetření

Odběr krve pro laboratorní vyšetření byl prováděn ráno, po celonočním lačnění (12-14 hodin). Séra byla po odběru uschována při teplotě -85°C. Koncentrace PAPP-A a CRP („vysoce senzitivní“ stanovení - high-sensitivity CRP, hsCRP) v séru byly stanovovány imunometricky (kity PAPP-A a us-CRP, Cezanne, Francie) metodou „time resolved amplified cryptate emission technology“ (TRACE) na přístroji Kryptor (Cezanne, Francie). Základní laboratorní vyšetření včetně sérové koncentrace celkového a HDL-cholesterolu, triglyceridů byla prováděna rutinní metodikou pomocí automatických analyzátorů. Koncentrace LDL-cholesterolu byla vypočítána pomocí

Friedewaldovy rovnice. Jako ukazatele bezpečnosti léčby byly stanovovány hodnoty iontů, urey, kreatininu, transamináz, LDH a kreatinfosfokinázy.

Statistické zpracování

Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm SD. Významnost rozdílů koncentrací CRP a PAPP-A mezi skupinami byla hodnocena Mann-Whitneyho U-testem; významnost změn po léčbě byla hodnocena Wilcoxonovým párovým testem. Rozdíly v dalších parametrech byly hodnoceny Studentovým t-testem. Vzájemná závislost mezi jednotlivými proměnnými byla posuzována pomocí Spearmanova korelačního koeficientu.

Výsledky

Do studie bylo zařazeno 29 pacientů s hypercholesterolémií a 27 zdravých osob z kontrolního souboru. Všichni zařazení pacienti studii dokončili; průměrná doba léčby byla 89 ± 8 dní. Léčba byla dobře tolerována; během studie se nevyskytly závažné nežádoucí účinky ani významné změny v laboratorních ukazatelích bezpečnosti léčby (poznámka – jedná se o stejné soubory vyšetřených osob, jako v kapitole 4).

Základní charakteristiky obou sledovaných skupin jsou uvedeny v *tabulce 5.1*. Skupiny byly srovnatelné pokud jde o věk, pohlaví a index tělesné hmotnosti. Podíl hypertoniků a kuřáků byl poněkud vyšší mezi pacienty než v kontrolní skupině, ale rozdíly nebyly statisticky významné.

Hladiny celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu a triglyceridů byly významně vyšší ve skupině pacientů než v kontrolním souboru; hodnota všech těchto parametrů se

po léčbě atorvastatinem významně snížila (*tabulka 5.1*). Koncentrace HDL cholesterolu byla v obou skupinách obdobná a nebyla léčbou ovlivněna.

Koncentrace PAPP-A u pacientů před léčbou byla významně vyšší než u normolipidemických osob (*tabulka 5.1, obrázek 5.1*). Po léčbě atorvastatinem došlo k mírnému poklesu koncentrace PAPP-A, který však nebyl statisticky významný. Obdobně byla u pacientů zvýšena též koncentrace CRP, na rozdíl od PAPP-A však byl po léčbě patrný výrazný a statisticky významný pokles jeho hodnot (*tabulka 5.1, obrázek 5.2*). Mezi koncentracemi CRP ani PAPP-A a hladinami lipidů nebyly patrné významné korelace.

Diskuse

Naše studie je první prací, která ukázala, že koncentrace PAPP-A v krvi jsou zvýšeny u pacientů s hypercholesterolémií, kteří nemají klinické projevy aterosklerózy. Současně se jedná o první práci, která studovala souvislost mezi PAPP-A a rizikovými faktory aterogeneze.

PAPP-A byl původně objeven v séru těhotných žen (118). PAPP-A je produkován placentou; v těhotenství jeho hladiny výrazně stoupají a stanovení sérových koncentrací PAPP-A je užíváno v prenatalní diagnostice Downova syndromu (119, 120). Teprve nedávno byl PAPP-A prokázán v tkáních mimo reprodukční trakt (121, 122); mimo těhotenství jsou jeho koncentrace v krvi u o několik řádů nižší, než v graviditě (123).

Fyziologický význam PAPP-A byl dlouho nejasný a byl částečně objasněn teprve v posledních několika letech. PAPP-A je metaloproteináza s vysokou substrátovou specifitou, která v tkáních štěpí vazebný protein 4 pro IGF-I (IGFBP-4) (121).

Degradací IGFBP-4 dochází k uvolňování IGF-I z vazby na tento protein a následně k zvýšení koncentrace volného IGF-I a k zvýšení jeho tkáňového účinku. PAPP-A tedy zřejmě působí jako lokální regulátor aktivity IGF-I a může se tím podílet na řízení proliferativních dějů v tkáních. Nález zvýšené exprese PAPP-A v nestabilních plátech (114) spolu se zvýšením jeho koncentrace v krvi u osob s hypercholesterolémií a s koronární aterosklerózou (114, 116) svědčí pro to, že působení této proteázy je významné i z klinického hlediska.

Dosud byly publikovány tři práce, které studovaly souvislost mezi sérovými koncentracemi PAPP-A a aterosklerózou. Bayes-Genis se spolupracovníky (114) zjistili, že hladiny PAPP-A jsou u osob s akutním infarktem myokardu a s nestabilní anginou pectoris výrazně vyšší, než u kontrolních osob (20,6 mIU/l a 14,9 mIU/l proti 7,4 mIU/l). Podobně Denktas se spolupracovníky (116) pozorovali zvýšení hladin PAPP-A u osob akutními koronárními syndromy (7,1 mIU/l) ve srovnání se zdravými osobami (5,5 mIU/l). Quin se spolupracovníky pak podrobněji studovali vývoj koncentrací PAPP-A u pacientů s akutním infarktem myokardu v časovém rozmezí 1-72 hodin od vzniku příhody (124). U většiny pacientů prokázali vzestup koncentrace PAPP-A v souvislosti s koronární příhodou; mezi jednotlivými pacienty však byly velké rozdíly v časovém průběhu i velikosti změn koncentrace tohoto ukazatele. Na základě všech těchto výsledků byla formulována domněnka, že působení PAPP-A souvisí s nestabilitou aterosklerotických plátů a že by stanovení jeho sérových koncentrací mohlo být využíváno v diagnostice akutních koronárních syndromů.

V naší studii jsme však prokázali významné zvýšení koncentrací PAPP-A u jinak zdravých osob s hypercholesterolémií, navzdory nepřítomnosti klinických projevů aterosklerózy. Je tedy pravděpodobné, že zvýšení PAPP-A nesouvisí pouze s přítomností nestabilních plátů a klinicky manifestní aterosklerózy, ale odráží zřejmě též přítomnost jejích časnějších, klinicky dosud asymptomatických stadií. Interpretace výsledků měření PAPP-A v séru je však zatím obtížná: Hodnoty,

referované skupinami Bayes-Genis a Denktase pro pacienty s akutními koronárními syndromy se významně liší, a naopak hodnoty, které jsme sami pozorovali u zdravých osob s hypercholesterolémií jsou velmi podobné hodnotám, které pozorovali Denktas s kolegy u osob s akutními koronárními syndromy. Pro tuto diskrepanci zatím není uspokojivé vysvětlení; je však zřejmé, že případnému klinickému využití PAPP-A jako markeru aterosklerózy bude muset předcházet množství podrobnějších klinických i laboratorních studií.

Léčba atorvastatinem nevedla k významnějšímu poklesu koncentrací PAPP-A, navzdory výraznému snížení hladin lipidů. To je v kontrastu k výraznému poklesu koncentrací CRP, který jsme v naší studii zaznamenali: U pacientů před léčbou byly hladiny CRP ve srovnání s kontrolními osobami dvojnásobné, a léčba atorvastatinem vedla k jejich poklesu o 27%. Také pro tuto diskrepanci je obtížné najít vysvětlení. Zvýšení koncentrací PAPP-A u pacientů s akutními koronárními syndromy a zvýšení jeho exprese v nestabilních plátech by mohlo svědčit pro účast PAPP-A na zánětlivých složkách procesu aterogeneze. Zánětlivá infiltrace plátu i sérové ukazatele zánětu se snižují již v krátké době po snížení lipidů, a obdobnou dynamiku by tedy zdánlivě bylo možno očekávat také v případě PAPP-A; výsledky naší studie však tento předpoklad nepodporují. Odlišnou dynamiku PAPP-A a „zánětlivých“ ukazatelů lze nejspíše vysvětlit pravděpodobným mechanismem působení PAPP-A. Jak bylo uvedeno výše, PAPP-A se zřejmě podílí na regulaci proliferativních dějů; přímá prozánětlivá aktivita PAPP-A v experimentálních podmínkách pozorována nebyla. V oblasti patofyziologie cévní stěny byla prokázána zvýšená exprese PAPP-A v důsledku mechanického poškození cévní stěny, což nasvědčuje jeho účasti na reparativních procesech (115). Tento účinek PAPP-A zřejmě souvisí s jeho regulační úlohou v systému IGF-I. IGF-I stimuluje proliferaci a migraci hladkých svalových buněk cévní stěny (125), a nadprodukce IGFBP-4 v cévní stěně vede k hypoplazii hladkých svalových buněk, způsobené bloádou působení IGF-I (126). PAPP-A

naopak působí – prostřednictvím proteolytické degradace IGFBP-4 – zvýšení lokální koncentrace volného IGF-I (115, 121); tím se může podílet na proliferativních procesech v aterosklerotických plátech. Výrazně zvýšená exprese PAPP-A v nestabilních plátech zřejmě odráží vystupňovanou reparativní aktivitu, která je důsledkem vystupňované degradace extracelulární matrix v těchto plátech; mírně zvýšené hladiny PAPP-A u osob s hyperlipidémií pak mohou odpovídat proliferativní aktivitě subklinických aterosklerotických lézí. Závislost proliferativních dějů na změnách koncentrací sérových lipidů však může být zcela odlišná od reakce ukazatelů zánětu; z charakteru těchto dějů lze usuzovat na spíše pomalejší dynamiku změn. Je proto možné, že trvání hypolipidemické léčby v naší studii bylo příliš krátké na to, aby pokles koncentrace lipidů v krvi umožnil rozvoj výraznějších změn v hladinách PAPP-A.

Závěr

Výsledky této studie ukazují, že koncentrace PAPP-A v krvi jsou zvýšeny u pacientů s hypercholesterolémií, kteří nemají klinické projevy aterosklerózy. Zvýšené koncentrací PAPP-A tedy zřejmě nejsou pouze ukazatelem nestability aterosklerotických plátů, jak naznačují dosavadní práce, ale také odrazem přítomnosti subklinických stadií aterosklerózy u osob hyperlipidémií. Hypolipidemická léčba atorvastatinem však nevedla k výraznějšímu poklesu koncentrací PAPP-A.

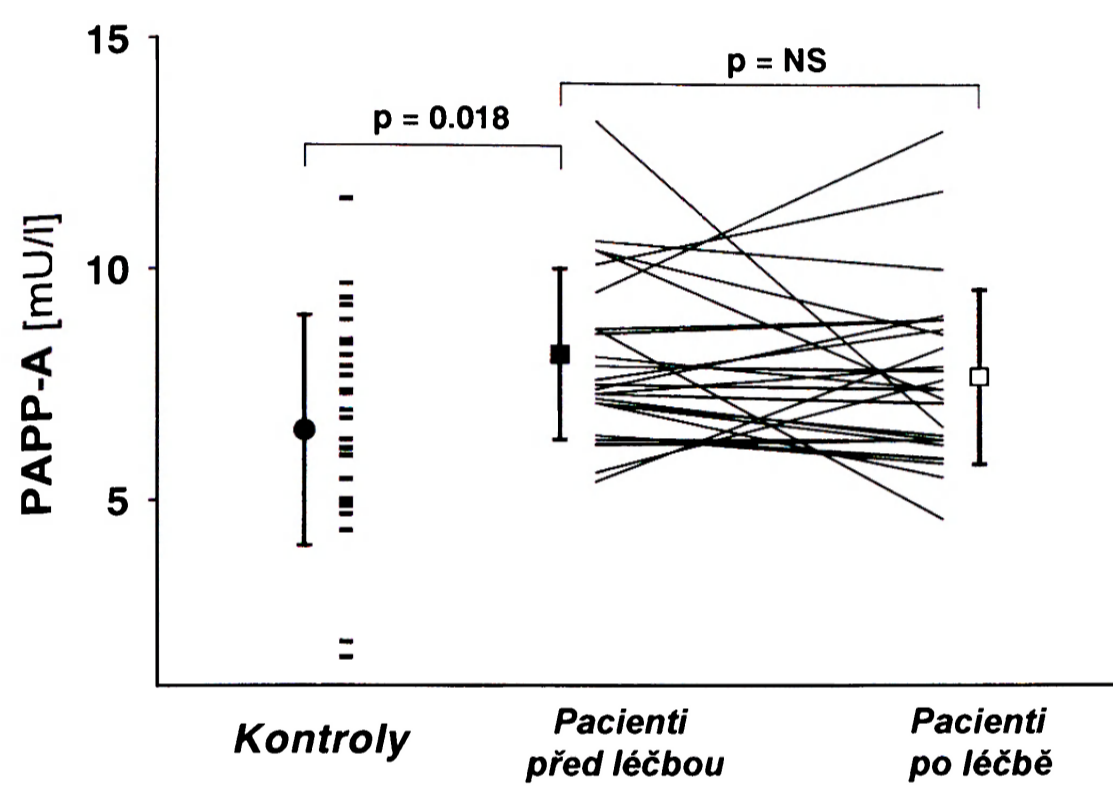
	Kontrolní soubor	Pacienti před léčbou	Pacienti po léčbě
Počet	29	27	
Pohlaví (muži/ženy)	9 / 20	8 / 19	
Věk [roků]	47,8 ± 6,5	52,3 ± 11,5	
BMI [kgm ⁻²]	25,2 ± 3,4	26,7 ± 4,3	
Hypertenze	6 (21%)	9 (33%)	
Kouření	5 (17%)	9 (33%)	
TC [mmol/l]	5,14 ± 0,72	8,59 ± 1,60 ^a	5,87 ± 1,12 ^x
LDL-C [mmol/l]	2,99 ± 0,64	6,20 ± 1,39 ^a	3,67 ± 0,94 ^x
HDL-C [mmol/l]	1,61 ± 0,32	1,63 ± 0,32	1,61 ± 0,33
TG [mmol/l]	1,21 ± 0,66	1,67 ± 0,63 ^b	1,33 ± 0,37 ^y
PAPP-A [mU/l]	6,50 ± 2,54	8,02 ± 1,86 ^c	7,67 ± 1,89
CRP [mg/l]	1,11 ± 1,10	2,21 ± 1,72 ^b	1,63 ± 1,65 ^z

Tabulka 5.1. Vstupní charakteristika a hladiny lipidů, PAPP-A a CRP u vyšetřených osob

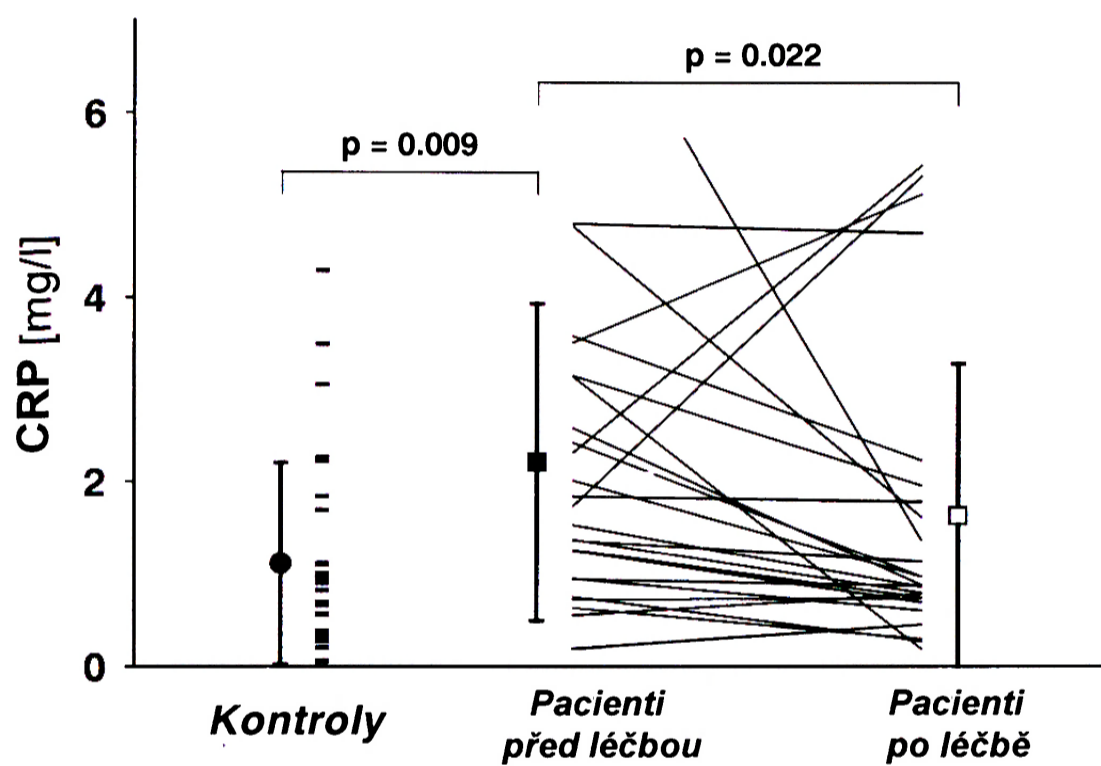
BMI – index tělesné hmotnosti, TC – celkový cholesterol, TG – triglyceridy, HDL-C - HDL-cholesterol, LD-C - LDL-cholesterol, CRP – C-reaktivní protein; hypertenze a kouření jsou uvedeny jako absolutní počet (v závorce procentní podíl) hypertoniků, resp. kuřáků.

^a p<0,001, ^b p<0,01, ^c p<0,05 pacienti vs. kontroly

^x p<0,001, ^y p<0,01, ^z p<0,05 pacienti před léčbou vs. po léčbě



Obrázek 5.1. Kontrace PAPP-A v kontrolním souboru (kolečko) a u pacientů s hypercholesterolémií před léčbou (plný čtvereček) a po 12 týdnech léčby atorvastatinem (prázdný čtvereček). Data jsou zobrazena jako individuální hodnoty a jako průměr \pm SD.



Obrázek 5.2. Kontrace CRP v kontrolním souboru (kolečko) a u pacientů s hypercholesterolémií před léčbou (plný čtvereček) a po 12 týdnech léčby atorvastatinem (prázdný čtvereček). Data jsou zobrazena jako individuální hodnoty a jako průměr \pm SD.

6

MIKROVASKULÁRNÍ REAKTIVITA

**Mikrovaskulární reaktivita u pacientů s hyperlipidémií a diabetem:
vliv hypolipidemické léčby**

Úvod

Endoteliální dysfunkce je v současné době považována za první stádium vývoje aterosklerózy, které lze prokázat dlouho před rozvojem morfologicky prokazatelných aterosklerotických lézí (62). Provází však proces aterogeneze i v jeho pozdějších stádiích a podílí se též na rozvoji akutních atherotrombotických příhod. Bylo prokázáno, že osoby s endoteliální dysfunkcí mají zvýšené riziko rozvoje kardiovaskulárních příhod (127, 128, 129). Proto je v současné době rozvoji metod pro hodnocení endoteliální dysfunkce v klinické praxi věnováno značné výzkumné úsilí.

Jedním z hlavních projevů endoteliální dysfunkce je porucha tepenné vazodilatace závislé na endotelu. Při vyšetřování vazodilatace závislé na endotelu se měří změna průsvitu tepny v odpověď na vazodilatační podněty, které působí prostřednictvím endotelu; při endoteliální dysfunkci je vazodilatace po těchto podnětech omezená, nebo dochází dokonce k paradoxní vazokonstrikci. Cévní reaktivita se obvykle vyšetřuje na arteria brachialis (130, 131, 132); méně často se k měření využívá angiografie, která však umožňuje vyšetřit i další tepenná povodí, především koronární tepny (128, 129). Jako vazodilatační podnět se původně používala intraarteriální aplikace různých látek přímo do povodí vyšetřované tepny. Vzhledem k invazivnosti tohoto způsobu aplikace se však (alespoň při vyšetřování končetinových tepen) v současné době k vyvolání vazodilatace obvykle používá zvýšení průtoku krve tepnou, vyvolané přechodnou ischemií (tzv. flow-mediated vasodilation, FMD) (130, 132).

Vyšetřování endoteliální dysfunkce výše uvedeným způsobem je velmi náročné na čas, přístrojové vybavení a standardizaci vyšetřovacího postupu; v mnoha modifikacích se také jedná o vyšetření invazivní. Proto jsou studovány a rozvíjeny

nové metody, které by umožnily endoteliální dysfunkci posoudit jednodušším a způsobem. V nedávné době byla vyvinuta metoda vyšetření mikrocirkulace pomocí laser-dopplerovského měření průtoku krve kapilárami (vyšetření mikrovaskulární reaktivity, MVR) (133, 134). Tato metoda byla zatím využívána především k vyšetření mikrocirkulace u pacientů s diabetem, ale též k sledování funkčního stavu tkání např. v tranplantační chirurgii nebo gastroenterologii a v mnoha oblastech v experimentu na zvířatech. U pacientů s hyperlipidemií nebo s klinicky manifestní aterosklerózou však byla MVR studována zatím jen zcela ojediněle (135, 136, 137). V naší práci jsme proto vyšetřili MVR u pacientů s hyperlipidemií, kteří neměli klinické projevy aterosklerózy, u osob s ischemickou chorobou srdeční a u kontrolního souboru zdravých osob. Výsledky jsme dále srovnali s nálezy u několika skupin diabetiků, kteří byli již dříve vyšetřeni na našem pracovišti. U pacientů s hypercholesterolémií jsme dále studovali vliv hypolipidemické léčby atorvastatinem a u pacientů s ICHS účinek léčby LDL-aferezou.

Metody

Vyšetřené skupiny osob

Pacienti s hypercholesterolémií bez klinických projevů aterosklerózy (skupina HLP₀).

Do této skupiny jsme zařazovali pacienty s těžkou hypercholesterolémií (TC >7,0 mmol při dietní léčbě); pacienti byli bez hypolipidemické léčby alespoň 4 týdny před vstupním vyšetřením. Ze studie byly vyloučeny osoby s ICHS nebo jinými klinickými projevy aterosklerózy, s těžší hypertriglyceridémií (TG >4,5 mmol/l), sekundárními hyperlipidemiemi, diabetem mellitem, malignitami a dalšími závažnými chorobami.

Pacienti s hypercholesterolémií a ICHS (skupina HLP_{ICHS}). V této skupině byli zařazováni pacienti, kteří měli hyperlipidémií nedostatečně kompenzovanou při

konzervativní léčbě a současně těžkou, revaskularizací neřešitelnou ICHS. Podmínkou pro zařazení do studie byla koncentrace celkového cholesterolu $>5,0$ mmol/l nebo LDL-cholesterolu $>3,0$ mmol/l při zavedené terapii. Tito pacienti měli současně ICHS s námahovou anginou pectoris; v minulosti mohli ale nemuseli prodělat AIM a / nebo revaskularizací (PTCA nebo koronární bypass). Poslední provedená koronarografie však musela vylučovat provedení (další) revaskularizace. Nezařazovali jsme pacienty obézní (BMI $>30,0$), s dekompenzovanou hypertenzí (TK $>160/100$), těžkou kardiální insuficiencí (EF $<0,30$), diabetiky léčené inzulínem a kuřáky.

Pacienti s diabetem mellitem. Do studie jsme zařadili též pacienty s diabetem mellitem I. a II. typu (skupiny DM1 a DM2); každá z těchto skupin byla dále rozdělena na podskupiny bez retinopatie (DM1₀ a DM2₀) a s lehčí retinopatií (DM1_{RNP} a DM2_{RNP}). Pacienti s proliferativní retinopatií, dekompenzovanou hypertenzí, symptomatickou ICHS a kuřáci nebyli do těchto skupin zařazováni. Skupiny diabetiků na našem pracovišti vyšetřeny již dříve a podrobné výsledky byly publikovány (134).

Do *kontrolní skupiny* byly zařazovány osoby bez hyperlipidémie (TC $<6,0$ mmol/l, TG $<2,0$ mmol/l), bez diabetu, bez klinických projevů aterosklerózy a bez dalších závažných chorob; přítomnost kompenzované arteriální hypertenze nebyla překážkou pro zařazení do této skupiny.

Základní charakteristiky jednotlivých skupin osob, zařazených do této studie, jsou uvedeny v *tabulce 6.1*.

Léčba

Pacienti s hypercholesterolémií (skupina HLP₀) byli léčeni atorvastatinem (Sortis, tbl 20mg 1x denně večer) po dobu 10-12 týdnů. Vyšetření byla provedena před začátkem a po ukončení léčby.

Pacienti s hypercholesterolémií a ICHS (skupina HLP_{ICHS}) byli zařazeni do programu krátkodobé léčby LDL-aférou; u každého pacienta byla provedena celkem tři ošetření v týdenních intervalech. Pacienti byli vyšetřeni před léčbou, den po první a den po třetí aféře. Podrobnosti o léčbě LDL-aférou jsou uvedeny v příslušné kapitole.

Vyšetření mikrovaskulární reaktivity

Reaktivita kožní mikrocirkulace po stimulaci termálním a ischemickým podnětem byla vyšetřována na ventrální části předloktí. Vyšetření byla prováděna ráno nalačno, při pokojové teplotě; před vlastním vyšetřením byly vyšetřované osoby v klidu po dobu půl hodiny. K měření byl použit dvoukanálový přístroj PeriFlux PF4001 (Perimed, Švédsko) s termostatickou jednotkou PeriTemp 4005 Heater. Sonda přístroje byla ke kůži fixována náplastí; po 5 minutách stabilizačního intervalu byl proveden klidový záznam. Poté byla provedena třiminutová okluze a. brachialis (manžetou tonometru nafouknutou na tlak o 20 mmHg vyšší než systolický TK pacienta). Po vyfouknutí manžety byly zaznamenány změny průtoku k posouzení postokluzivní reaktivní hyperémie (PORH). Po dalším 5-minutovém stabilizačním intervalu byla kožní teplota zvýšena na 44°C a proveden záznam termální hyperémie (TH). Hodnoty průtoku byly zaznamenány v arbitrárních tzv. perfuzních jednotkách (PU).

Na základě provedených měření byly pro každý test vypočteny následující parametry: 1) maximální perfuze jako rozdíl nejvyšší dosažené hodnoty po stimulaci



a bazální hodnoty perfuze (PORHmax, THmax, vyjádřeno v PU) a 2) rychlost vzestupu perfuze po stimulaci (PORHmax/t, THmax/t, vyjádřeno v PU.s⁻¹).

Laboratorní vyšetření a statistické zpracování

Základní laboratorní vyšetření včetně sérové koncentrace celkového a HDL-cholesterolu, triglyceridů byla prováděna rutinní metodikou pomocí automatických analyzátorů. Koncentrace LDL-cholesterolu byla vypočítána pomocí Friedewaldovy rovnice. Jako ukazatele bezpečnosti léčby byly stanovovány hodnoty iontů, urey, kreatininu, transamináz, LDH a kreatinfosfokinázy. Odběr krve pro laboratorní vyšetření byl prováděn ráno, po celonočním lačnění.

Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm SD. Významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena Mann-Whitneyho U-testem; významnost změn po léčbě byla hodnocena Wilcoxonovým párovým testem. Vzájemná závislost mezi jednotlivými proměnnými byla posuzována pomocí Spearmanova korelačního koeficientu.

Výsledky

Srovnání parametrů mikrovaskulární reaktivity mezi jednotlivými skupinami.

Výsledky jsou shrnuty v *tabulce 6.2*. I přes těžkou hypercholesterolémii nebyly ve skupině HLP₀ hodnoty mikrovaskulární reaktivity snižené. Naopak, ve všech parametrech byly hodnoty vyšší než v kontrolní skupině (v případě paramterů TH statisticky významně). U osob s hyperlipidémií a ICHS (skupina HLP_{ICHS}) byly hodnoty MVR nižší než u kontrol – v případě TH opět statisticky významně. Ve skupině HLP₀ nebyla patrná výraznější souvislost (korelace) mezi parametry MVR a

koncentrací lipidů nebo glukózy v séru, věkem a BMI. Ve skupině HLP_{ICHs} nebyly vzhledem k nízkému počtu zařazených osob podobné analýzy prováděny.

U pacientů s diabetem bez retinopatie byly hodnoty MVR prakticky normální ve skupině DM1₀ a mírně snížené (proti kontrolnímu souboru) ve skupině DM2₀. V obou skupinách pacientů s retinopatií (DM1_{RNP} a DM2_{RNP}) byly hodnoty MVR výrazně a statisticky významně snížené.

U diabetiků I. typu byla patrná negativní korelace mezi hodnotami PORH_{max}, TH_{max} a TH_{max}/t (ale ne PORH_{max}/t) a sérovou koncentrací glukózy ($r = -0,49, -0,39$ a $-0,42, p = 0,001 - 0,007$) a glykovaného hemoglobinu ($-0,45, -0,41$ a $-0,43, p = 0,002 - 0,005$). u diabetiků II. typu podobná souvislost zaznamenána nebyla. V žádné ze skupin diabetiků také nebyl zjištěn vztah mezi MVR a věkem, BMI nebo trváním diabetu.

Vliv léčby hyperlipidémie na mikrovaskulární reaktivitu

Vliv léčby atorvastatinem a LDL-aferézou na MVR u skupin HLP₀ a HLP_{ICHs} je uveden na *obrázku 6.1*. Ve skupině HLP₀ vedlo podávání atorvastatinu k poklesu celkového cholesterolu o $31 \pm 12\%$ (z $8,59 \pm 1,60$ na $5,87 \pm 1,12$ mmol/l), LDL-cholesterolu o $40 \pm 14\%$ (z $6,20 \pm 1,39$ na $3,67 \pm 0,94$ mmol/l) a triglyceridů o $14 \pm 31\%$ (z $1,67 \pm 0,63$ na $1,33 \pm 0,37$ mmol/l); koncentrace HDL-cholesterolu se nezměnila. I přes tento výrazný pokles koncentrací sérových lipidů se hodnoty MVR prakticky nezměnily; byl patrný jen nevýznamný trend ke zvýšení v parametrech PORH_{max}/t a TH_{max}/t.

Ve skupině HLP_{ICHs} vedla léčba LDL-aferézou k poklesu celkového cholesterolu o $36 \pm 10\%$ a LDL-cholesterolu o $46 \pm 13\%$ (podrobnější údaje viz *tabulka 7.2* v kapitole

7). Bezprostředně po provedení obou aferéz bylo patrné určité zlepšení ve všech parametrech MVR (7-30%), které však nebylo statisticky významné.

Diskuse

Hlavním zjištěním naší práce je skutečnost, že u pacientů s hypercholesterolémií bez klinických projevů aterosklerózy nebyla mikrovaskulární reaktivita (posuzovaná laser-dopplerovskou metodou) snižena, a že hypolipidemická léčba atorvastatinem u těchto pacientů neměla na parametry mikrovaskulární reaktivity výraznější vliv.

Prací, které by se zabývaly podobnou problematikou, je dosud v literatuře velmi málo. Khan (135) provedl studii u pacientů s hyperlipidémií a ischemickou chorobou dolních končetin. Fluvastatin nevedl u těchto pacientů k zlepšení MVR závislé na NO (iotoféza acetylcholinu), a mírné zlepšení NO-independentní MVR (aplikace nitruprussidu sodného) bylo patrné pouze po delší době stimulace. V jiné studii, provedené u pacientů s hypercholesterolémií (137), vedla léčba fluvastatinem k časnému a výraznému zlepšení postichemické MVR (posuzované kapilaroskopií), ale pouze k hraničnímu zlepšení termální MVR (posuzované laser-dopplerovským vyšetřením) po delší době léčby. Poslední publikovanou studií v tomto směru je práce Asbergova s atorvastatinem (136), provedená u pacientů po transplantaci ledvin, kteří měli mírnou hypercholesterolémií, a byli na imunosupresivní léčbě cyklosporinem. Mírné zlepšení MVR (+17%) bylo zaznamenáno po acetylcholinové iontoforéze, ale ne po ischemické stimulaci (PORH). Všechny uvedené studie se od naší práce i od sebe navzájem v mnoha ohledech liší, takže přímé srovnání výsledků je obtížné. Všeobecně však lze říci, že změny v MVR po hypolipidemické léčbě byly v rozmezí od žádné změny po nejvýše mírné zlepšení. V některých případech byl

patrný trend k zlepšení, který nedosáhly statistické významnosti – zjevně především pro velkou variabilitu studovaných parametrů.

Srovnání MVR u pacientů s hyperlipidemií s normolipidemickými osobami bylo (mimo naší práci) provedeno pouze ve studii Khanově (135). V naší studii měli pacienti s hypercholesterolemíí MVR zcela normální (resp. dokonce vyšší, než kontrolní soubor). V Khanově studii měli pacienti s hyperlipidemií a manifestní aterosklerózou hodnoty MVR proti kontrolám podstatně snížené. Podobně i v naší studii měli pacienti s hyperlipidemií a ICHS hodnoty MVR nižší, než zdravé osoby. V naší studii nebyla patrná korelace mezi parametry MVR a koncentrací lipidů v krvi, což je ve shodě s výše citovanými pracemi (135, 137). Společně s výsledky naší studie byla publikována také další práce Asbergova (138), provedené opět u pacientů po transplantaci ledvin. V této studii fluvastatin nevedl k výraznějšímu zlepšení MVR; rozdílný výsledek od předcházející práce s atorvastatinem lze nejspíše vysvětlit množstvím metodických odlišností, které snížily citlivost této studie k průkazu sledovaných změn.

Všechny výše uvedené nálezy dohromady svědčí pro to, že hyperlipidémie jako taková má na mikrovaskulární reaktivitu jen malý vliv. MVR zřejmě tedy zřejmě není příliš citlivým ukazatelem časných cévních změn, vyvolaných hyperlipidemií, ale odráží spíše pokročilejší změny, které se objevují v pozdějších stádiích aterogeneze. Chybění souvislosti mezi hyperlipidemií a MVR, stejně jako nepřesvědčivý efekt hypolipidemické léčby, je v rozporu s opakovaně prokázaným vlivem hyperlipidémie a hypolipidemické na endoteliální dysfunkci v oblasti muskulárních tepen (70, 71). Výzkumy přitom naznačují, že vyšetření v obou lokalizacích (tepenné řečiště i mikrocirkulace) odráží funkci endotelu. Mezi oběma částmi cévního řečiště je však množství rozdílů, a jejich poškození patologickými procesy, stejně jako reakce na farmakologickou léčbu, mohou být různé.

U pacientů s diabetem byly změny MVR výraznější ve skupinách s mikroangiopatií (retinopatie) než ve skupinách bez mikroangiopatie; u diabetiků I. typu bez retinopatie byla MVR dokonce téměř normální. Vztah mezi diabetem, retinopatií a mikrovaskulární dysfunkcí je tudíž obdobný jako vztah mezi hypercholesterolémií, aterosklerózou a MVR: výraznější porucha mikrovaskulární reaktivity je vázána spíše až na klinicky manifestní cévní onemocnění (mikroangiopatie nebo ateroskleróza), než na vyvolávající příčinu (diabetes nebo hyperlipidémie).

Závěr

U osob s těžkou hypercholesterolémií, které neměly klinické projevy aterosklerózy, nebyla přítomna porucha mikrovaskulární reaktivity, a hypolipidemická léčba atorvastatinem také u těchto osob neměla na mikrovaskulární reaktivitu výraznější vliv. Významné snížení mikrovaskulární reaktivity jsme však zaznamenali u pacientů s hyperlipidémií a ischemickou chorobou srdeční.

	Kontroly	HLP ₀	HLP _{ICH5}	DM1 ₀	DM1 _{RNP}	DM2 ₀	DM2 _{RNP}
Počet	26	27	8	20	24	18	18
Pohlaví (muži/ženy)	16 / 10	8 / 19	8 / 0	10 / 10	12 / 12	13 / 5	10 / 8
Věk [roků]	38±16	52±12	55±17	32±9	44±9	56±8	58±9
BMI[kg/m ²]	23,5±2,4	26,7±4,3	25,4±3,9	23,1±2,4	24,2±2,3	29,0±4,7	32,0±4,0
sTK [torr]	121±15	129±13	131±21	120±12	126±14	141±11	152±15
dTK [torr]	78±11	82±8	85±18	78±8	81±7	86±8	86±10
TC [mmol/l]	4,7,0±1,0	8,6±1,6	5,7±0,6	NA	NA	5,5±1,0	6,5±0,9
LDL-C [mmol/l]	2,8±0,8	6,2±1,4	4,0±0,5	NA	NA	3,3±0,9	4,0±1,2
HDL-C [mmol/l]	1,5±0,3	1,6±0,3	1,0±0,2	NA	NA	1,2±0,3	1,0±0,2
TG [mmol/l]	1,1±0,4	1,7±0,6	1,5±0,5	NA	NA	2,2±1,0	3,5±2,1
Glykémie [mmol/l]	4,5±0,2	5,2±0,5	1±0,2	8,8±4,3	8,9±3,0	9,5±2,8	11,9,±4,2
HbA _{1c} [%]	4,7±0,3	NA	NA	7,6±1,1	7,9±1,3	7,4±1,6	8,7±1,2

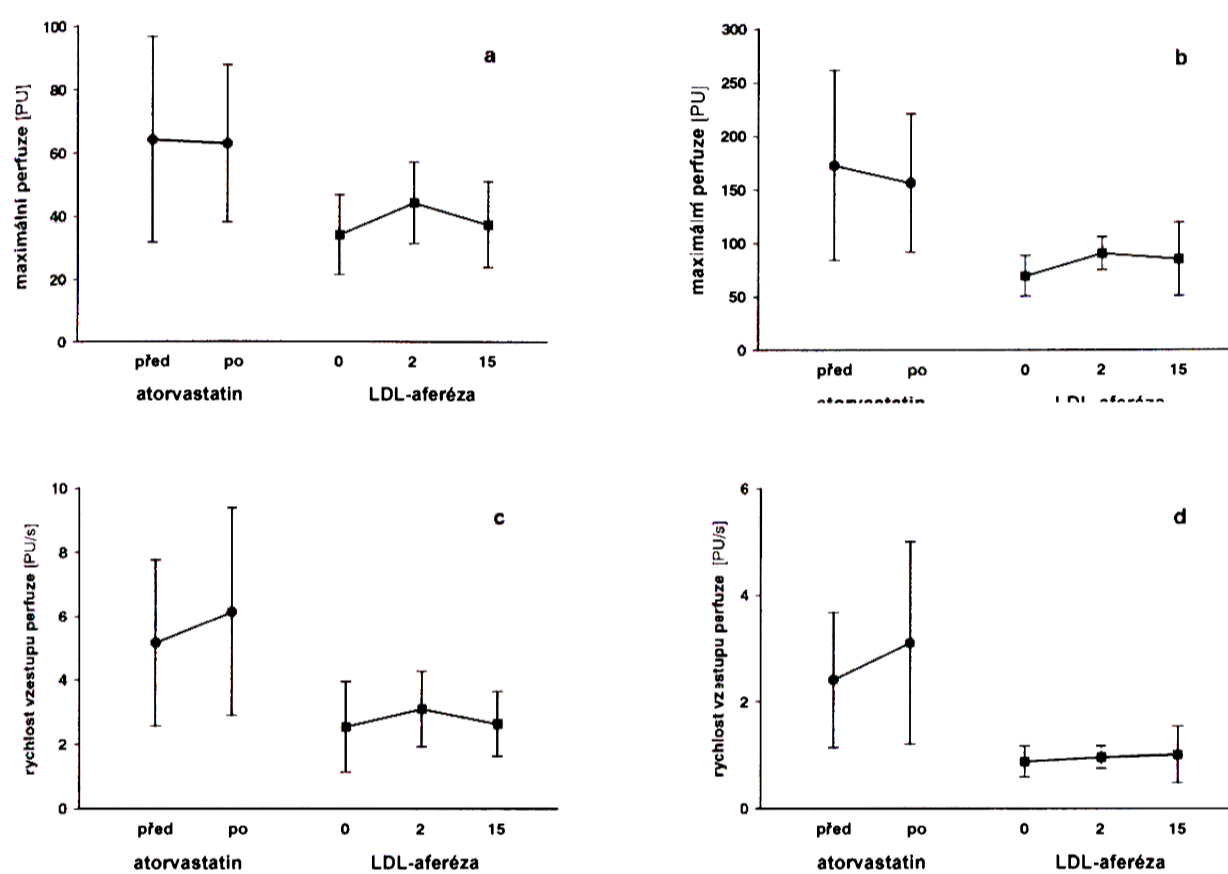
Tabulka 6.1. Vstupní charakteristika a hladiny lipidů vyšetřených osob

BMI – index tělesné hmotnosti, sTK – systolický tlak, dTK – diastolický tlak, TC – celkový cholesterol, HDL-C - HDL-cholesterol, LDL-C - LDL-cholesterol, TG – triglyceridy, HbA_{1c} - glykovaný hemoglobin HbA_{1c}

	Kontroly	HLP ₀	HLP _{ICH5}	DM1 ₀	DM1 _{RNP}	DM2 ₀	DM2 _{RNP}
PORHmax [PU]	51±23	64±32	40±23	37±16 ^{x b}	27±13 ^{x b}	36±18 ^x	30±16 ^x
PORHmax/t [PU/s]	4,1±2,4	5,2±2,6	3,6±2,4	4,7±2,5 ^b	2,5±1,3 ^{x b}	4,1±2,1	3,4±1,8
THmax [PU]	115±46	173±89 ^{x a}	86±46 ^a	99±41 ^b	70±24 ^{x b}	83±36 ^x	73±31 ^x
THmax/t [PU/s]	1,7±0,7	2,4±1,3 ^{x a}	0,9±0,4 ^{x a}	1,6±0,7 ^b	1,2±0,6 ^{x b}	1,1±0,4 ^x	1,0±0,4 ^x

Tabulka 6.2. Srovnání mikrovaskulární reaktivity mezi jednotlivými vyšetřenými skupinami.

^x p < 0.05 proti kontrolní skupině, ^a p < 0.05 HLP₀ proti HLP_{ICH5}, ^b p < 0.05 DM1₀ proti DM1_{RNP}



Obrázek 6.1. Vliv hypolipidemické léčby na mikrovaskulární reaktivitu.

Vyšetření byla provedena po ischemické ($PORH_{max}$ – a, $PORH_{max}/t$ - c) a termální stimulaci (TH_{max} – b, TH_{max}/t - d). Pacienti s hyperlipidémií bez ICBS byli vyšetřeni před léčbou a po 12 týdnech léčby atorvastatinem (kolečka). Pacienti s hyperlipidémií a ICBS byli vyšetřeni před léčbou, v den následující po první a po třetí aferéze (dny 0, 2 a 15; čtverečky).

7

KRÁTKODOBÁ LÉČBA LDL-AFERÉZOU

Úvod

Ischemická choroba srdeční (ICHS) je nejčastějším a z hlediska zdravotních důsledků také nejzávažnějším projevem aterosklerózy. Jednou z nejdůležitějších složek péče o pacienty s ICHS představuje důsledná léčba všech ovlivnitelných rizikových faktorů aterogeneze (sekundární prevence), které snižuje riziko rozvoje dalších kardiovaskulárních příhod a vede tak k prodloužení života pacientů a zlepšení jeho kvality. Hyperlipidémie jsou hlavním rizikovým faktorem ICHS. Klinické studie pak prokázaly, že snížení celkového a především LDL cholesterolu vede k snížení kardiovaskulární morbidity a mortality, a léčba hyperlipidemií se stala nejúčinnějším prostředkem v rámci sekundární prevence u pacientů s ICHS.

Základem léčby hyperlipidemií jsou nefarmakologické prostředky (dieta, fyzická aktivita, a snaha o dosažení přiměřené tělesné hmotnosti) a podávání hypolipidemik. U naprosté většiny pacientů je možno uvedenými prostředky dosáhnout úpravy lipidogramu a stabilizace klinického stavu. Přesto zůstává menšina pacientů, u kterých prostředky konzervativní léčby selhávají a riziko recidivy koronárních příhod u nich zůstává vysoké. U mnoha z těchto rizikových pacientů charakter postižení koronárních tepen neumožňuje provedení účinného revaskularizačního zákroku; jedná se většinou o pacienty s mnohočetným (difuzním) postižením a o pacienty po předcházejících revaskularizačních operacích. U těchto pacientů byly donedávna léčebné možnosti velmi omezené a jejich prognóza zůstává špatná. V omezeném rozsahu se v poslední době jako nový léčebný postup pro tyto pacienty využívá LDL-aferéza (139, 140).

LDL-aferéza je extrakorporální metoda, která umožňuje selektivní eliminaci LDL částic z krve pacienta (71, 141, 142). V průběhu aferézy prochází krev pacienta eliminačním zařízením (kolonou), ve kterém jsou selektivně odstraňovány LDL

částice; pro eliminaci LDL částic se využívá imunologické (143) nebo chemické interakce (144, 145) s aktivním povrchem kolony. Kromě LDL cholesterolu je v některých modifikacích odstraňován také lipoprotein (a) a fibrinogen (142, 146) a je prokázáno zlepšení reologických vlastností krve (147), zlepšení endoteliální dysfunkce (71) a zánětlivých ukazatelů (97, 148). LDL-aféza je metoda bezpečná a mimořádně účinná; v kombinaci s farmakoterapií vede ke snížení koncentrace cholesterolu až o 80% (141). Dosud byla používána především k dlouhodobé léčbě pacientů s těžkými formami ICHS a současně přítomnou hyperlipidémií rezistentní na léčbu (139, 140, 142, 149). V poslední době se však objevily první práce, které studovaly možnosti krátkodobé aplikace LDL-afézy u vybraných skupin pacientů (1, 150, 151, 152).

Teoretickým východiskem pro výzkum krátkodobé léčby LDL-afézou byly poznatky z posledních let, které ukazují, že klinické projevy aterosklerózy nejsou určeny pouze velikostí aterosklerotických lézí (hemodynamická závažnost stenózy - 18, 109), ale především také mechanickými a biologickými vlastnostmi plátů (mechanická pevnost, zánětlivá infiltrace - 16, 17) a vlastnostmi okolních úseků cévní stěny (endoteliální dysfunkce, protrombogenní vlastnosti - 18, 153). Důležitějším faktorem, který ovlivňuje biologické vlastnosti a stabilitu plátu, je plazmatická koncentrace aterogenních LDL-částic (42, 43, 76) změny koncentrace LDL-cholesterolu přitom vedou ke změně vlastností cévní stěny i aterosklerotických plátů dokonce již během několika hodin až dní (70, 71, 74, 97). Účinné snížení plazmatického cholesterolu farmakologickými i nefarmakologickými prostředky může ovlivnit klinický stav pacientů během velmi krátké doby (110).

Uvedené poznatky vedly k předpokladu, že výrazné a rychle dosažitelné snížení koncentrace plazmatického cholesterolu by bylo možné využít při krátkodobé léčbě LDL-afézou k dosažení stabilizace u pacientů s akutními ischemickými epizodami především v oblasti koronárního řečiště, tepen dolních končetin a mozkových tepen.

Kromě příznivého vlivu snížení cholesterolu na endoteliální dysfunkci a stabilitu aterosklerotických plátů se předpokládá také zlepšení tkáňové perfuze v důsledku zlepšení reologických vlastností krve (147). Tyto předpoklady vedly k experimentálnímu využití krátkodobé léčby LDL-aférou (154, 155). Rozsah léčby je v těchto případech omezen přibližně na 2-15 aplikací, prováděných 1-2x týdně. Krátkodobá léčba LDL-aférou byla dosud aplikována především u pacientů s kritickou ischemií dolních končetin (150, 152), u pacientů s ICHS v období plánované koronární angioplastiky (151, 156) a u pacientů s cerebrovaskulární ischemií (157). Ve všech těchto případech vedla léčba k statisticky zlepšení klinického stavu. Laboratorní a funkční vyšetření pak potvrdila příznivý účinek léčby na hemoreologické parametry, tkáňovou perfuzi a endoteliální dysfunkci. Kromě uvedených nejčastějších indikací byly referovány též příznivé výsledky krátkodobé LDL-aférou při léčbě akutní poruchy sluchu (158), uzávěru retinálních cév (159) a nefrotického syndromu (160). Pokud by se příznivý účinek této léčby potvrdil, byla by krátkodobá léčba LDL-aférou velmi zajímavá i z ekonomického hlediska, protože je ve srovnání s dlouhodobou léčbou spojena s výrazně nižšími náklady.

V naší práci jsme studovali účinnost krátkodobé léčby LDL-aférou u pacientů s hyperlipidemií a těžkou, revaskularizací neřešitelnou ICHS. Vzhledem k tomu, že technika pro provádění krátkodobé léčby LDL-aférou nebyla v době návrhu projektu v ČR dostupná, bylo jedním z cílů práce i vlastní zavedení této metody na našem pracovišti.

Metody

Vyšetřené skupiny osob a uspořádání studie

Skupina léčená LDL-aférou (skupina HLP_{ICH9}): Do této skupiny byli zařazováni pacienti, kteří měli hyperlipidémii nedostatečně kompenzovanou při konzervativní léčbě a současně těžkou, revaskularizací neřešitelnou ICHS. Podmínkou pro zařazení do studie byla koncentrace celkového cholesterolu >5,0 mmol/l nebo LDL-cholesterolu >3,0 mmol/l při zavedené terapii. Tito pacienti měli současně ICHS s námahovou angínou pectoris; v minulosti mohli, ale nemuseli prodělat AIM a / nebo revaskularizací (PTCA nebo koronární bypass). Poslední provedená koronarografie však musela vylučovat provedení (další) revaskularizace. Nezařazovali jsme pacienty obézní (BMI >30,0), s dekompenzovanou hypertenzí (TK >160/100), těžkou kardiální insuficiencí (EF<0,30), diabetiky léčené inzulínem a kuřáky. U každého pacienta bylo plánováno provedení celkem tří ošetření LDL-aférou v týdenních intervalech.

Další vyšetřené skupiny pacientů: Nálezy pacientů léčených LDL-aférou jsme v případě některých metod srovnali s nálezy u dalších skupin osob, které byly vyšetřeny na našem pracovišti, jedná se především o pacienty s izolovanou hypercholesterolémií (TC bez hypolipidemické léčby >7,0 mmol/l), kteří neměli ICHS ani jiné klinické projevy aterosklerózy (*skupina HLP₀*). Pacienti byli léčeni atorvastatinem v dávce 20mg denně (tato skupina je podrobně popsána v kapitolách 4 a 5). Další skupiny pacientů jsou zmíněny v oddíle Výsledků.

Kontrolní soubor zahrnoval zdravé osoby bez hyperlipidémie (TC <6,0 mmol/l, TG <2,0 mmol/l), bez klinických projevů aterosklerózy a bez dalších závažných chorob; přítomnost kompenzované arteriální hypertenze nebyla překážkou pro zařazení do této skupiny (podrobnější údaje jsou opět uvedeny v kapitolách 4 a 5).

Pacienti ze skupiny léčené LDL-aférou byli vyšetřeni před začátkem léčby, opakovaně v jejím průběhu a v odstupu 8 týdnů od skončení léčby. Časový harmonogram vyšetření je uveden v *příloze 7.1*. Pacienti ze skupiny léčené atorvastatinem byli vyšetřeni před začátkem a po 12 týdnech léčby; osoby z kontrolního souboru byly vyšetřeny jednorázově.

LDL-aféza

LDL-aféza byla prováděna metodou HELP (B.Braun Melsungen, SRN). Tato metoda využívá elektrostatické interakce mezi kladným nábojem ApoB a záporně nabitým řetězcem heparinu (142, 145). Po separaci plazmy od krevních částic (pomocí plazmafiltru) probíhá v kyselém prostředí precipitace LDL částic s molekulami heparinu; spolu s LDL částicemi jsou precipitovány také molekuly Lp(a) a fibrinogenu. Vzniklý makromolekulární precipitát je pak odstraněn filtrací. Po odfiltrování precipitátu jsou objem a pH plazmy upraveny bikarbonátovou dialýzou na původní hodnoty a nadbytečný heparin je odstraněn specifickou adsorpcí; plazma je pak spolu s krevními částicemi vrácena do krevního oběhu.

Činnost přístroje pro provádění aferézy je řízena automaticky; pro vlastní ošetření jsou používány sety na jedno použití a soupravy pracovních roztoků dodané výrobcem zařízení. Pro připojení extrakorporálního okruhu jsou nutné dva samostatné žilní přístupy; ve srovnání s hemodialýzou je průtok krve přístrojem podstatně menší (50-100 ml/min) a pro zajištění žilního přístupu se používají periferní žíly (není tedy nutné zakládat a-v pištěl). Pro punkci žil se používají slabší dialyzační jehly. Během výkonu pacient leží nebo sedí v pohodlném křesle. Celé ošetření včetně přípravné fáze trvá 4-6 hodin.

Hodnocení klinické účinnosti léčby

Klinickou účinnost léčby LDL-aferézou jsme posuzovali pomocí upraveného Minnessotského dotazníku kvality života a podle tolerance zátěže během bicyklové ergometrie. Text Minnessotského dotazníku je uveden v *příloze 7.2*. Výsledky jsou uváděny po normalizaci na hodnotu před léčbou (=100%). Tolerance fyzické zátěže byla hodnocena během bicyklové ergometrie jako celková doba trvání zátěže při standardizovaném vyšetřovacím protokolu. Vyšetření bylo ukončeno při dosažení jednoho z uvedených kritérií: jakékoliv subjektivní obtíže, které obvykle vedou k přerušení zátěže, dosažení kritických hodnot tepové frekvence nebo krevního tlaku a překročení stanovených denivelací ST segmentu na ekg. Počáteční zátěž při vyšetření byla 25W a zvyšovala se vždy po 2 minutách o 25W. Výsledky jsou uváděny po normalizaci na hodnotu před léčbou (=100%).

Vyšetření cévní reaktivity

Jako funkční ukazatel účinku léčby na endoteliální funkci jsme používali vyšetření vazodilatace závislé na endotelu. Vyšetření jsme prováděli pomocí neinvazivního ultrazvukového měření změn průsvitu a. brachialis v odpověď na ischemii (tzv “flow-mediated vasodilation” – FMD). Jako kontrolní test k vyloučení poruchy dalších složek cévní stěny byl současně prováděn též test vazodilatace nezávislé na endotelu (po podání nitroglycerinu). Parametr FMD je uváděn jako procentní změna průsvitu tepny po stimulaci ve srovnání s klidovou hodnotou; podrobnější popis metody je uveden v publikaci z našeho pracoviště (161). Dále jsme vyšetřovali reaktivitu mikrocirkulace laser-dopplerovskou metodou; popis této metody je uveden v kapitole 6.

Laboratorní vyšetření

Odběr krve pro laboratorní vyšetření byl prováděn ráno, po celonočním lačnění (12-14 hodin); pouze odběry prováděné v den aferézy bezprostředně po ošetření nebyly nalačno. Séra byla po odběru uschována při teplotě -85°C . Základní laboratorní vyšetření včetně sérové koncentrace celkového a HDL-cholesterolu, triglyceridů a plazmatické hladiny fibrinogenu byla prováděna rutinní metodikou pomocí automatických analyzátorů. Koncentrace LDL-cholesterolu byla vypočítána pomocí Friedewaldovy rovnice. Koncentrace apolipoproteinu B byla stanovována imunoelektroforeticky podle Laurell-Manchiniové. Sérové koncentrace endoteliálních cytoadhezivních (ICAM-1, E-selektin, P-selektin) a ukazatelů systémového zánětu (orosomukoid, α -2-makroglobulinu) byly stanovovány metodou ELISA s využitím komerčních kitů. Sérové koncentrace CRP (supersenzitivní metoda) a metaloproteinázy PAPP-A byly stanovovány metodou imunochemickou metodou TRACE (viz kapitola 5).

Výsledky

Zavedení metody LDL-aferézy

V první fázi projektu jsme připravili technické podmínky pro provádění LDL-aferézy na našem pracovišti. Vypracovali jsme podrobné protokoly pro obě navrhované studie a zajistili organizační návaznost všech potřebných vyšetřovacích postupů. Po předchozím zaškolení na zahraničním pracovišti jsme zavedli techniku LDL-aferézy metodou HELP a získali jsme zkušenost s prováděním vlastního ošetření včetně řešení obvyklých technických problémů. Jedná se přitom o léčebnou metodu technicky i organizačně velmi náročnou a současně unikátní: naše pracoviště je první a dosud jediné v zemích bývalého východního bloku, které metodu HELP provádí, a

jediné v České republice, které má k dispozici metodu pro krátkodobou léčbu LDL-aférou (LDL-aférou metodou imunoadsorpce, kterou nelze z technologických důvodů použít ke krátkodobé léčbě, zavedlo k dlouhodobé léčbě pacientů již o několik let dříve pracoviště LF UK v Hradci Králové).

Vstupní charakteristika a vyšetřených skupin osob

V rámci projektu jsme vyšetřili pacienty s hyperlipidémií a ICHS, kteří absolvovali krátkodobou léčbu LDL-aférou (skupina HLP_{ICHs}), klinicky asymptomatické pacienty s hypercholesterolémií, kteří byli léčeni atorvastatinem (skupina HLP_0) a kontrolní soubor zdravých osob bez hyperlipidémie. Základní charakteristiky těchto skupin osob jsou uvedeny v *tabulce 7.1*. Získané výsledky jsme v případě některých metod srovnali s nálezy u dalších skupin pacientů, které byly dříve vyšetřeny na našem pracovišti.

Počet pacientů s nerevaskularizovatelnou ICHS byl poněkud nižší, než jsme původně plánovali (15 osob). Bylo to dáno nedostatkem vhodných pacientů: z 19 osob, které splňovaly kritéria pro vstup do studie, byly 4 osoby vyřazeny pro nedostatečný cévní přístup a 3 osoby účast ve studii odmítly. Z 12 pacientů, kteří byli zařazeni do studie, čtyři nedokončili první ošetření pro obtíže s cévním přístupem; zbývajících 8 pacientů dokončilo plánovanou léčbu.

Klinická účinnost léčby LDL-aférou

Klinickou účinnost léčby jsme posuzovali pomocí upraveného Minnessotského dotazníku kvality života a podle tolerance zátěže během bicyklové ergometrie. Výsledky (po normalizaci na hodnotu před léčbou) jsou uvedeny na *obrázku 7.1*. Bezprostředně po skončení léčby se zvýšila tolerance zátěže při ergometrii (+21%) a zlepšilo se skóre kvality života (+16%); za 8 týdnů po skončení léčby však bylo toto

zlepšení již méně výrazné. Tyto změny však vzhledem k velké variabilitě a nízkému počtu pacientů nedosáhly statistické významnosti.

Vliv léčby na hladinu plazmatických lipidů, lipoproteinů, fibrinogenu a leptinu

Přehled výsledků je uveden v *tabulce 7.2*. LDL-aféza vedla k dramatickému poklesu celkového a LDL-cholesterolu a fibrinogenu. Bezprostředně po aferéze se snížila hladina celkového cholesterolu o 36%, LDL-cholesterolu o 46% a fibrinogenu o 58%; podle očekávání byl obdobně významný i pokles hladiny apoB (-39%) a Lp(a) (-50%).

Vliv léčby LDL-aférou na cévní reaktivitu

Výsledky vyšetření cévní reaktivity (FMD) u zdravých osob, u asymptomatických pacientů s hyperlipidemií a u pacientů s ICHS před léčbou a po léčbě LDL-aférou jsou shrnuty v *tabulce 7.3*. Hodnoty FMD byly u obou skupin pacientů významně nižší, než u zdravých osob. Po léčbě LDL-aférou byl patrný trend k zlepšení hodnot FMD, který nedosáhl statistické významnosti. V případě vyšetření FMD jsou skupiny asymptomatických pacientů s hyperlipidemií i zdravých kontrol odlišné od skupiny HLP₀ i kontrol, které jsou uvedeny v *tabulce 7.1*. Jedná se o osoby, které byly na našem pracovišti vyšetřeny dříve v rámci studie FAT (161).

Výsledky vyšetření mikrovaskulární reaktivity laser-dopplerovskou metodou jsou uvedeny v kapitole 6 (*tabulka 6.2, obrázek 6.1*).

Koncentrace endoteliálních cytoadhezivních molekul v séru

Jako laboratorní ukazatel endoteliální dysfunkce jsme stanovovali koncentraci cytoadhezivních molekul v séru; výsledky jsou shrnuty v *tabulce 7.4*. Sérové hladiny ICAM-1 a E-selektinu se významně snížily bezprostředně po skončení léčby; během

8 týdnů po skončení léčby se však vrátili k výchozím hodnotám. Hladina P-selektinu nebyla léčbou významně ovlivněna.

Ukazatele zánětu a stability aterosklerotických plátů

Kromě cytoadhezivních molekul jsme stanovovali koncentrace CRP, orosomukoidu a α -2-makroglobulinu jako ukazatelů systémového zánětu a koncentraci metaloproteinázy PAPP-A, která je ukazatelem nestability aterosklerotických lézí (*tabulka 7.4*). Po léčbě byl trend k poklesu hladiny CRP a přechodný významný pokles hladiny orosomukoidu; změny ustoupily během 8 týdnů po skončení léčby. Koncentrace PAPP-A nebyly léčbou významně ovlivněny.

Úspěšnost, bezpečnost a tolerance léčby

Úspěšnost vlastní léčby byla v naší studii limitována především obtížemi s cévním přístupem. Nedostatečný cévní přístup (nedostupnost kvalitních periferních žil) již předem vyloučil provedení léčby u některých pacientů a znemožnil její úspěšné dokončení u dalších třetiny z těch kteří byli do projektu zařazeni. Nedostatečný průtok krve přitom komplikoval i mnoho ostatních ošetření, i když nevedl k přerušení léčby. Technické problémy s přístrojem se prakticky nevyskytly a závažnější nežádoucí reakce vedla k ukončení ošetření v jednom případě. Lehčí nežádoucí reakce se vyskytly při 40% všech ošetření (vertigo, pocit slabosti, lehčí dušnost, nevolnost, tlak v hlavě). Většina nežádoucích reakcí se přitom vyskytovala během prvního ošetření. Závažnější reakce (těžší hypotenze provázená stenokardií) se vyskytla v jednom případě.

Diskuse

I když se nepodařilo projekt krátkodobé léčby LDL-aférou uskutečnit v původně plánovaném rozsahu (léčbu dokončila pouze polovina z původně plánovaného počtu pacientů), přinesla tato studie množství zajímavých a důležitých výsledků. Již samotné zavedení metody HELP pro léčbu LDL-aférou představuje významné obohacení terapeutického potenciálu v oborech lipidologie a neinvazivní kardiologie; v zavedení této metody se přitom jedná o prioritu v oblasti střední a východní Evropy. Podrobné laboratorní a funkční vyšetření pacientů pak přineslo množství poznatků, které jsou zajímavé z výzkumného hlediska.

LDL-aféza vedla u ošetřených pacientů k bezprostřednímu a dramatickému poklesu plazmatické hladiny cholesterolu, některých apolipoproteinů a fibrinogenu; pokles celkového i LDL-cholesterolu i koncentrace apo-B byl velmi významný. Z hlediska změny těchto parametrů je nejdůležitější skutečnost, že se jedná o další snížení hodnot proti stavu, kterého bylo u každého z pacientů dosaženo maximální hypolipidemickou léčbou (tedy: pokud např. lze hypolipidemiky dosáhnout poklesu LDL-cholesterolu o 40% a LDL-aférou o dalších 50%, pak je kombinací těchto metod dosaženo úhrnného poklesu 70% proti výchozí hodnotě!). Pokud jde o koncentrace fibrinogenu a lipoproteinu Lp(a), jejich hladiny jsou farmakologickou léčbou ovlivnitelné jen velmi málo nebo vůbec; LDL-aféza tedy představuje prakticky jedinou možnost snížení těchto aterogenních faktorů.

Příznivé změny koncentrace lipidů byly provázeny zlepšením některých klinických, funkčních i laboratorních ukazatelů. Trend ke zlepšení byl patrný ve většině sledovaných parametrů; vzhledem k nízkému počtu zařazených osob však změny mnohdy nebyly statisticky významné; při kontrole v delším časovém odstupu od skončení léčby však byl patrný návrat k výchozím hodnotám. Časová souvislost mezi

změnami sledovaných laboratorních i funkčních parametrů a výraznými změnami hladiny cholesterolu během studie je ve shodě s novými poznatky o tom, že změny koncentrace plazmatických lipidů ovlivňují funkční stav cévního řečiště i aterosklerotických lézí velmi rychle. Tato pozorování proto poskytují podporu pro názor, že hypolipidemická terapie u nejvíce ohrožených pacientů by měla být dostatečně razantní, nasazena co nejdříve a neměla by být zbytečně přerušována.

Z klinického hlediska je jistě nejzajímavější poměrně výrazné subjektivní zlepšení stavu nemocných a zvýšení tolerance tělesné zátěže. I když při nedostatečném počtu zařazených pacientů tyto změny nedosáhly statistické významnosti, jsou ve shodě s údaji ze studií dlouhodobé léčby LDL-aférou, které uvádějí, že subjektivní stav nemocných se výrazně zlepšil již krátce po zahájení léčby (142).

Vazodilatace závislá na endotelu (FMD) i mikrovaskulární reaktivita byly u pacientů s hyperlipidemií a těžkou ICHS významně nižší, než u osob bez hyperlipidémie. Byly také nižší než u jinak zdravých osob s hyperlipidemií, a to i přesto, že pacienti s ICHS měli výrazně nižší hladiny plazmatických lipidů. Výrazné (i když při nízkém počtu pacientů opět ne významné) zvýšení hodnoty FMD po léčbě aférou je opět ve shodě s obdobnými literárními údaji. Podrobnější diskuse výsledků měření mikrovaskulární reaktivity je uvedena v kapitole 6.

Byl také patrný přechodný pokles koncentrace některých cytoadhezivních molekul, s návratem k původním hodnotám po skončení léčby. I když změny byly v těchto případech statisticky významné, nebyly příliš výrazné. Tyto výsledky jsou ve shodě s naší zkušeností o omezené souvislosti těchto ukazatelů s změnami plazmatických lipidů.

Úspěšnost vlastní léčby byla v naší studii byla limitována především obtížemi s cévním přístupem, které již předem vyloučily provedení léčby nebo znemožnily její

úspěšné dokončení u mnoha pacientů a komplikovaly i průběh dalších ošetření. Obtíže s cévním přístupem tak představovaly nejvýznamnější komplikaci a omezení možností léčby; pro krátkodobou léčbu přitom není přijatelné zřízovat trvalý cévní přístup (shunt). Léčba LDL-aférou je v zásadě bezpečná a dobře tolerovaná, ale u pacientů s těžkými formami ICHS byl výskyt lehčích nežádoucích reakcí podstatně vyšší, než je obvykle udáváno. Nežádoucí reakce se přitom vyskytovaly téměř výhradně během prvního ošetření, během kterého probíhá přizpůsobování režimu terapie podmínkám konkrétního pacienta. Při nízkém počtu ošetření u každého pacienta je tak celkový výskyt nežádoucích reakcí podstatně vyšší, než by bylo možné očekávat u dlouhodobé léčby.

Závěr

LDL-aféza vede u pacientů s ICHS a hyperlipidemií k bezprostřednímu a dramatickému poklesu plazmatické hladiny celkového a LDL-cholesterolu a fibrinogenu. Tyto změny byly provázeny subjektivním zlepšením klinického stavu, zvýšením tolerance tělesné zátěže a zlepšením některých ukazatelů endoteliální funkce a aktivity procesu aterogeneze; uvedená zlepšení však odezněla krátce po ukončení léčby.

Možnosti léčby jsou u mnoha pacientů omezeny nedostatečným cévním přístupem. Také celkový výskyt nežádoucích reakcí je při krátkodobé léčbě podstatně vyšší, než by bylo možné očekávat u dlouhodobé léčby, vzhledem k tomu, že nežádoucí reakce se vyskytují převážně během prvního ošetření.

Krátkodobá léčba LDL-aférou u pacientů s těžkou ICHS a hyperlipidemií tedy přináší určité subjektivní i objektivní zlepšení zdravotního stavu, které je však pouze přechodné. Toto zlepšení není adekvátní organizační, technické a ekonomické

náročnosti léčby. Z výsledků našeho projektu tedy vyplývá, že zavedení krátkodobé léčby LDL-aférou u pacientů s těžkými formami ICHS do klinické praxe nelze doporučit. Využití LDL-aférou zůstane zřejmě omezeno na dlouhodobou léčbu rizikových pacientů s nejtěžšími formami hyperlipidemií, rezistentních na dietní a farmakologickou léčbu.

	Kontroly	HLP₀	HLP_{ICHS}
Počet (muži / ženy)	29 (9 / 20)	27 (8 / 19)	12 (11 / 1)
Věk [roky]	48 ± 7	53±11	57±13
AIM [%]	0	0	60
Hypertenze	6 (21%)	9 (33%)	4 (33%)
Kouření	5 (17%)	9 (33%)	0
BMI [kg/m²]	25,2±3,4	26,7±4,2	25,2±3,9
EF [%]	NA	NA	51±10
sTK [torr]	121±15	129±13	127±19
dTK [torr]	78±11	82±8	84±16
TC [mmol/l]	5,1±0,7	8,6±1,6	5,9±0,7
LDL-C [mmol/l]	3,0±0,6	6,2±1,4	4,1±0,6
HDL-C [mmol/l]	1,61±0,32	1,6±0,3	1,1±0,2
TG [mmol/l]	1,21±0,66	1,7±0,6	1,6±0,5
ASA [%]	0	19	83
ACEI [%]	10	7	50
BB [%]	7	22	67
Statiny [%]	0	0	100
Fibráty [%]	0	0	0
Pryskyřice [%]	0	0	17

Tabulka 7.1. Vstupní charakteristika a hladiny lipidů u vyšetřených skupin osob.

AIM – akutní infarkt myokardu v anamnéze, BMI – index tělesné hmotnosti, EF – ejekční frakce levé komory, sTK – systolický krevní tlak, dTK – diastolický krevní tlak, TC – celkový cholesterol, TG – triglyceridy, HDL-C - HDL-cholesterol, LD-C - LDL-cholesterol, ASA – kyselina acetylsalicylová, ACEI – inhibitory ACE, BB – betablokátory. Hypertenze a kouření jsou uvedeny jako absolutní počet (v závorce procentní podíl) hypertoniků, resp. kuřáků. U léků je uveden procentní podíl osob, které lék z dané skupiny užívaly.

	Před léčbou	Po léčbě	Rozdíl abs.	Rozdíl %
TC [mmol/l]	5,40 ± 0,64	^x 3,40 ± 0,49	-2,00 ± 0,73	-36 ± 10
LDL-C [mmol/l]	3,62 ± 0,62	^x 1,93 ± 0,41	-1,69 ± 0,66	-46 ± 13
HDL-C [mmol/l]	1,01 ± 0,15	^y 0,87 ± 0,10	-0,14 ± 0,13	-13 ± 12
TG [mmol/l]	1,45 ± 0,33	1,41 ± 0,33	-0,04 ± 0,39	0 ± 26
apoA [g/l]	1,33 ± 0,30	^y 1,15 ± 0,35	-0,18 ± 0,16	-14 ± 14
apoB [g/l]	1,14 ± 0,21	^x 0,68 ± 0,17	-0,46 ± 0,21	-39 ± 14
Lp(a) [g/l]	0,07 ± 0,06	^x 0,04 ± 0,04	0,03 ± 0,03	-51 ± 39
Fibrinogen [g/l]	3,59 ± 1,09	^x 1,49 ± 0,68	-2,10 ± 0,77	-58 ± 13

Tabulka 7.2. Vliv léčby LDL-aférou na hladiny lipidů, apolipoproteinů a fibrinogenu.

TC – celkový cholesterol, TG – triglyceridy, HDL-C - HDL-cholesterol, LD-C - LDL-cholesterol, ApoA – apolipoprotein A, ApoB –apolipoprotein B, Lp(a) – lipoprotein(a).

^x p<0,001, ^y p<0,01 pacienti před léčbou vs. po léčbě

Poznámka: Hodnoty uvedené v tabulce 7.2 jsou průměrem ze všech tří provedených ošetření; hodnoty jednotlivých parametrů před léčbou se proto liší od vstupních hodnot (t.j. hodnot před provedením první aferézy), které jsou uvedeny v tabulce 7.1.

	Kontroly	HLP	Před léčbou	Po léčbě
FMD [%]	4,75 ± 2,52	^c 2,26 ± 2,10	^c 0,76 ± 2,03	^c 2,13 ± 1,45

Tabulka 7.3. Vyšetření cévní reaktivity (FMD)

Výsledky u pacientů s ICHS před léčbou a po léčbě LDL-aférezou, u zdravých osob a u asymptomatických pacientů s hyperlipidémií.

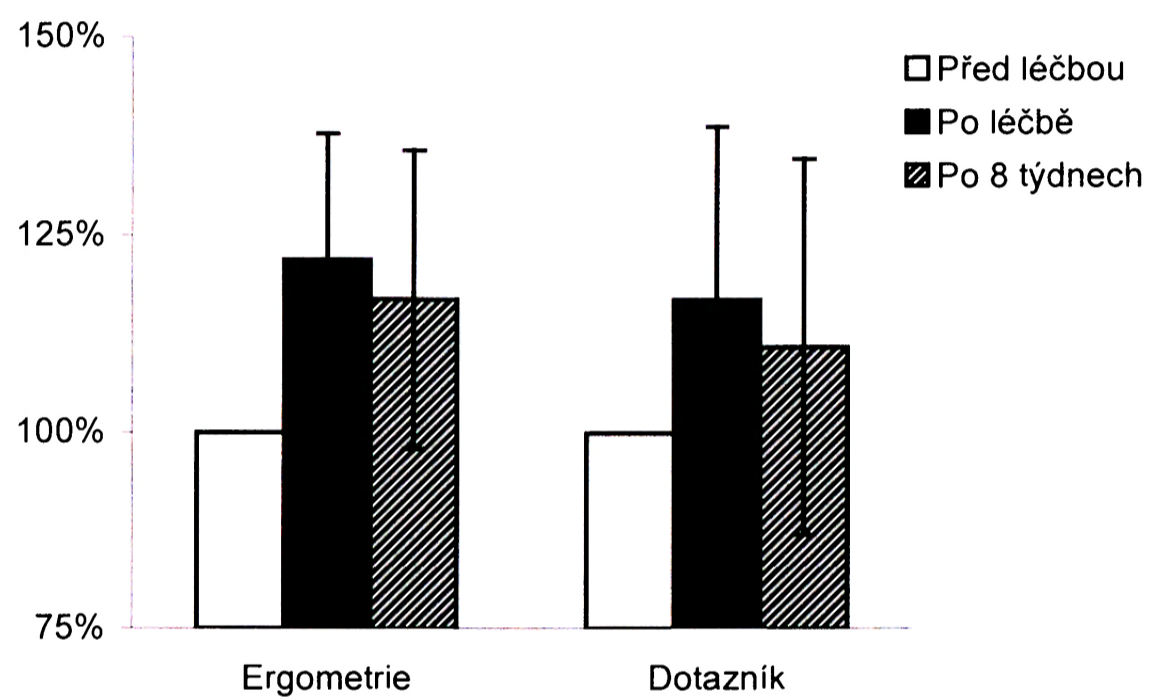
^c p<0,05 pacienti vs. kontroly

	Před léčbou	Po 1. aféze	Po 3. aféze	Po 8 týdnech
CRP [mg/l]	1,49 ± 1,21	1,21 ± 1,09	1,37 ± 1,50	NA
ICAM-1 [mg/l]	265 ± 88	279 ± 42	^z 243 ± 97	279 ± 93
E-selektin [mg/l]	42,5 ± 12,5	^z 29,0 ± 7,9	^z 30,1 ± 11,8	44,6 ± 14,3
P-selektin [mg/l]	102 ± 32	114 ± 38	110 ± 39	113 ± 24
A2M [g/l]	1,65 ± 0,55	1,45 ± 0,48	1,43 ± 0,46	1,48 ± 0,49
Oro [g/l]	0,82 ± 0,21	^z 0,53 ± 0,07	0,72 ± 0,33	0,87 ± 0,40
PAPP-A [mU/l]	7,98 ± 2,79	7,73 ± 1,45	9,18 ± 2,19	NA

Tabulka 7.4. Vyšetření endoteliálních cytoadhezivních molekul a ukazatelů zánětu

Výsledky u pacientů s ICHS před léčbou a po léčbě LDL-aférezou. A2M - α -2-makroglobulin, Oro - orosomukoid.

^z p<0,05 proti nálezu před léčbou



Obrázek 7.1. Klinická účinnost léčby LDL-aférezou

Tolerance zátěže během bicyklové ergometrie a skóre kvality života podle Minnessotského dotazníku před léčbou, bezprostředně po skončení léčby a za 8 týdnů po skončení léčby. Výsledky jsou normalizovány na hodnotu před léčbou (=100%).

LDL-aféřza u pacientů s HLP a chronickou ICHS

Přehled provedených vyšetření

Jméno:

	0 / 1	0 / 2	1	2	3	7 / 1	7 / 2	8	14 / 1	14 / 2	15	16	21	70	71
Biochemie															
KO															
Koagulace															
Průtok. cytometrie															
Lipid. laborator															
Dotazník	Vitán												Vitán	Vitán	
Laser-doppler	Zařazen												Zařazen	Zařazen	
Cévní reaktivita															
Ergometrie															
Tonoport															

Příloha 7.1. Harmonogram vyšetřeni u pacientů v programu krátkodobé léčby LDL-aféřzou.

8

ZÁVĚR

Cílem práce bylo studovat souvislost hyperlipidemií s laboratorními a funkčními ukazateli procesu aterogeneze a možnost ovlivnění těchto faktorů hypolipidemickou léčbou. Většina výsledků byla získána rozsáhlým vyšetřením souboru pacientů s těžkou izolovanou hypercholesterolémií, kteří neměli klinické projevy aterosklerózy. U pacientů jsme studovali vliv hypolipidemické léčby atorvastatinem a nálezy srovnali s kontrolním souborem osob bez hyperlipidémie.

Kromě toho jsme zavedli metodu HELP pro léčbu LDL-aférou, která je dosud unikátní v zemích bývalého východního bloku. Možnosti krátkodobého využití této léčby jsme posoudili u menšího souboru pacientů s hyperlipidemií a pokročilou ICHS. V následujících odstavcích uvádím hlavní výsledky, kterých jsme v jednotlivých oblastech dosáhli.

Leukocytární exprese cytoadhezivních molekul

Zavedli jsme metodu kvantitativního hodnocení exprese cytoadhezivních molekul na leukocytech periferní krve průtokovou cytometrií.

Leukocytární exprese většiny studovaných cytoadhezivních molekul byla u pacientů s hypercholesterolémií zvýšená.

Léčba atorvastatinem vedla k významnému poklesu leukocytární exprese těchto molekul.

Na rozdíl od leukocytární exprese byly plazmatické koncentrace endoteliálních cytoadhezivních molekul u pacientů s hypercholesterolémií obdobné, jako u zdravých osob. Léčba atorvastatinem neměla na koncentrace těchto molekul žádný vliv.

Leukocytární exprese cytoadhezivních molekul je tedy zřejmě citlivějším ukazatelem aktivity procesu aterogeneze než plazmatické koncentrace endoteliálních adhezivních molekul.

Metaloproteináza PAPP-A jako nový marker aterogeneze

U osob s těžkou hypercholesterolémií jsou koncentrace PAPP-A v krvi zvýšeny, i když nemají klinické projevy aterosklerózy.

Zvýšené koncentrací PAPP-A tedy zřejmě nejsou pouze ukazatelem nestability aterosklerotických plátů, jak naznačují dosavadní práce, ale také odrazem přítomnosti subklinických stadií aterosklerózy u osob hyperlipidémií.

Hypolipidemická léčba atorvastatinem však nevedla k výraznějšímu poklesu koncentrací PAPP-A.

Mikrovaskulární reaktivita

U osob s těžkou hypercholesterolémií, které neměly klinické projevy aterosklerózy, nebyla přítomna porucha mikrovaskulární reaktivity.

Hypolipidemická léčba atorvastatinem neměla u těchto osob na mikrovaskulární reaktivitu výraznější vliv.

Významné snížení mikrovaskulární reaktivity jsme prokázali u pacientů s hyperlipidémií a ischemickou chorobou srdeční.

Mikrovaskulární reaktivita tedy zřejmě není příliš citlivým ukazatelem časných cévních změn, vyvolaných hyperlipidemií, ale odráží spíše pokročilejší změny, které se objevují v pozdějších stádiích aterosklerózy.

Možnosti krátkodobé léčby LDL-aférou

LDL-aférou vede u pacientů s ICHS k bezprostřednímu zlepšení klinického stavu, zvýšení tolerance tělesné zátěže a zlepšením některých ukazatelů endoteliální funkce a aktivity procesu aterosklerózy

Tyto příznivé změny jsou však jen přechodné a odezněly krátce po ukončení léčby.

Krátkodobá léčba LDL-aférou je provázena vyšším výskytem nežádoucích účinků než léčba dlouhodobá.

Přínos krátkodobé léčby LDL-aférou u pacientů s těžkou ICHS není adekvátní technické a ekonomické náročnosti léčby a její zavedení do klinické praxe nelze doporučit. Využití LDL-aférou zůstane zřejmě omezeno na dlouhodobou léčbu rizikových pacientů s nejtěžšími formami hyperlipidemií, rezistentních na dietní a farmakologickou léčbu.

9

SUMMARY

Lipid lowering treatment substantially reduces the risk of cardiovascular diseases. The effects of lipid lowering go far beyond limiting the extent of atherosclerotic lesions and decreasing the severity of atherosclerotic stenoses. Recently recognised effects of cholesterol on plaque stability, endothelial function, thrombosis, and plaque inflammation have been subject to intensive research during the past two decades. The effect lipid lowering treatment on the various aspects of the plaque development are being investigated in search of novel therapies to reduce the risk of atherosclerosis. In this work, we examined cell adhesion molecules, microvascular reactivity and metalloproteinase PAPP-A in patients with hypercholesterolemia and investigated the effect of lipid lowering with atorvastatin and LDL-apheresis.

Leukocyte and endothelial adhesion molecules mediate leukocyte recruitment into subendothelial space, contributing thus to plaque inflammation. PAPP-A is a protease which has been related to plaque instability and acute coronary events; its role in stable atherosclerotic lesions hasn't been studied yet. Microvascular reactivity is supposed to reflect endothelial function in the microvascular bed; the knowledge of the effect of hyperlipidemia on microvasculature is currently limited.

Patients with severe hypercholesterolemia, who were free of vascular disease, were examined at the baseline and after 10 weeks of atorvastatin treatment. Patients with hypercholesterolemia and coronary artery disease were examined before and after the treatment with LDL-apheresis. Both patient groups were compared to healthy normolipidemic controls. Expression adhesion molecules on blood leukocytes was measured by flow cytometry, and serum endothelial markers and PAPP-A were measured by immunometric assays. Skin microvascular reactivity was examined by laser-Doppler flowmetry.

In patients with hyperlipidemia, there was an increased leukocyte expression of most cell adhesion molecules studied, which was considerably decreased after the atorvastatin treatment. In contrast, there was nearly no effect of hypercholesterolemia and/or atorvastatin on the serum endothelial molecules. Leukocyte molecules may therefore be a more sensitive marker of atherogenesis than endothelial molecules. Our results support the role of increased leukocyte adhesiveness in the development of atherosclerosis.

PAPP-A levels were elevated in hypercholesterolemic subjects without clinical signs of atherosclerosis. PAPP-A may therefore not only reflect plaque instability (as suggested earlier), but also serve as a marker of total atherosclerotic burden in asymptomatic subjects with hyperlipidemia. However, PAPP-A levels were not influenced by atorvastatin treatment.

Microvascular reactivity was normal in otherwise healthy subjects with hyperlipidemia; on the contrary, it was impaired in patients with hyperlipidemia and coronary heart disease. There was no effect of atorvastatin or LDL-apheresis on microvascular reactivity. These results suggest that microcirculation is not involved in the early vascular dysfunction induced by HLP and that MVR rather reflects changes which appear later in the course of the atherosclerotic disease.

10

LITERATURA

1. Furchgott RF: Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983; 53:557-73.
2. Born GVR, Schwarz CJ: *Vascular endothelium - physiology, pathology and therapeutic opportunities*. GVR Born, Schwarz CJ (eds.), Schatauer, Stuttgart, New York, 1997.
3. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
4. Marui N, Offermann MK, Swerlick R: Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 93: 1866-1874.
5. Myers PR, Tanner MA: Vascular endothelial cell regulation of extracellular matrix collagen: role of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 717-722.
6. Wever R, Stroes E, Rabelin TJ: Nitric oxide and hypercholesterolemia: a matter of oxidation and reduction? *Atherosclerosis* 1998; 137: S51-60.
7. Feron O. Intracellular localization and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; 8: 55-59.
8. Stary HC, Blakenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1992; 85: 391-405.
9. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994; 89: 2462-2478.
10. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92: 1355-1374.
11. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions. An update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1177-1178.
12. Stary HC. Macrophages macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis* 1987; 64: 91-108.

13. Katsuda S, Boyd HC, Fligner C, Ross R, Gown AM. Human atherosclerosis, part III: immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. *Am J Pathol* 1992; 140: 907-9014.
14. Katz SS, Shipley GG, Small DM. Physical chemistry of the lipids of human atherosclerotic lesions. Demonstration of a lesion intermediate between fatty streaks and advanced plaques. *J Clin Invest* 1976; 58: 200-211.
15. Stary HC: Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 1989; 9(S-1): 119-132.
16. Jonason L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 131-138.
17. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; 89: 36-44.
18. Gutstein DE, Fuster V: The pathophysiology and clinical significance of atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 323-333.
19. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis: insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 1018-1031.
20. Davies MJ: Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996; 94: 2013-2020.
21. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring: the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 1985; 53: 363-373.
22. Tracy RE, Devaney K, Kissing G. Characteristics of the plaque under a coronary thrombus. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985; 405: 411-427.
23. Mann JM, Davies MJ. Vulnerable plaque: relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. *Circulation* 1996; 94: 928-931.
24. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* 1993; 69: 377-381.
25. Bini A, Fenoglio JJ Jr, Mesa-Tajeda R, Kudryk B, Kaplan KL. Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis: use of monoclonal antibodies. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 109-121.
26. Barger AC, Beeuwkes R III, Lainey LL, Silverman KJ. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries – a possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1984; 310: 175-177.

27. Stary HC. Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. *Basic Res Cardiol* 1994; 89(S-1): 17-32.
28. Eggen DA, Solberg LA. Variation of atherosclerosis with age. *Lab Invest* 1968; 18: 571-579.
29. Cornhill JF, Herderick EE, Stary HC. Topography of human aortic sudanophylic lesions. *Monogr Atheroscler* 1990; 15: 13-19.
30. Stary HC. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J* 1990; 11(S-E): 3-19.
31. Stary HC. Atheroma arises in eccentric intimal thickening from concurrent fatty streak lesions: electron microscopic study of coronary arteries of 540 persons 1 week to 29 years old. *Fed Proc* 1987; 46: 418.
32. Muller G. Xanthomata, hypercholesterolemia and angina pectoris. *Acta Med Scand* 1938; 89S: 75-84.
33. Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science* 1976; 193: 1094-1100.
34. Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherosclerosis. Current concepts. *JAMA* 1990; 264: 3047-3052.
35. McGorisk GM, Treasure CB: Endothelial dysfunction in coronary heart disease. *Curr Opin Cardiol* 1996; 11: 341-350.
36. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002; 91: 281-291.
37. Rosenfeld ME. Leukocyte recruitment into developing atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 361-363.
38. Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C, Nanas J, Kontoyannis D, Stamatelopoulos S, Mouloupoulos S : Effect of acute cigarette smoking on endothelium dependent brachial artery dilatation in healthy individuals. *Am J Cardiol* 1997; 79: 529-531.
39. Rizzoni D, Porteri E, Castellano M: Endothelial dysfunction in hypertension is independent from the etiology and from vascular structure. *Hypertension* 1998; 31: 335-341.
40. Chowienczyk BJ, Watts GE: Endothelial dysfunction, insulin resistance and non-insulin dependent diabetes. *Endocrinology and Metabolism* 1997; 4: 225-232.
41. Doshi SN, Goodfellow J, Lewis MJ, McDowell IFW: Homocysteine and endothelial function. *Cardiovascular Res* 1999; 42: 578-582.
42. Greager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ: Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990; 86: 228-234.

43. Galle J, Schneider R, Winner B, Lehmann-Bodem C, Schinzel R, Munch G, Conzelmann E, Wanner C: Glyc-oxidized LDL impair endothelial function more potently than oxidized LDL: role of enhanced oxidative stress. *Atherosclerosis* 1998; 138: 65-77.
44. Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand* 2001; 173: 35-43.
45. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulation of T-cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 131-138.
46. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; 89: 36-44.
47. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
48. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. *Circ Res* 2002;90:251-262.
49. Patel SS, Thiagarajan R, Willerson JT, Yeh ET. Inhibition of alpha4 integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. *Circulation* 1998; 97: 75-81.
50. Serrano CV Jr, Yoshida VM, Venturinelli ML et al. Effect of simvastatin on monocyte adhesion molecule expression in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2001;157:505-512.
51. Weber C, Erl W, Weber KSC, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:1212-1217.)
52. Krieglstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J hypertens* 2001; 14: 44S-54S.
53. Meerschaert JA, Furie MB. The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICA-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. *J Immunol* 1995; 154: 4099-4112.
54. Brown MS, Goldstein JL: Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 223-261.
55. Kurihara Y, Matsumoto A, Itakura H, Kodama T: Macrophage scavenger receptors. *Curr Opin Lipidol* 1991; 2: 295-300.
56. Aviram M, Hussein O, Rosenblat M, Schlezinger S, Hayek T, Keidar S: Interactions of platelets, macrophages and lipoproteins in hypercholesterolemia: antiatherogenic effects of HMG-CoA reductase inhibitor therapy. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 39-45.

57. Hansson GK, Holm J, Jonasson L: Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1989; 135: 169-175.
58. Newby AC, George SJ: Proposed roles for growth factors in mediating smooth muscle proliferation in vascular pathologies. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 1173-1183.
59. Bacakova L, Herget J, Wilhelm J: Influence of macrophages and macrophage-modified collagen I in the adhesion and proliferation of vascular smooth muscle cells in culture. *Physiol Res* 1999; 48: 341-351.
60. Cox DA, Cohen ML: Effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular contraction and relaxation: clinical and pharmacological implications in atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 1996; 48: 3-19.
61. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H, Yokode M. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 947: 199-205.
62. Berliner JA, Territo MC, Sevanian A: Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 1990; 85: 1260-1266.
63. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y: Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: A potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 1998; 97: 2433-2444.
64. Galis ZS, Suhova GK, Kranshofer R, Clark S, Libby P: Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively express matrix-degrading proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 402-406.
65. Ohara Y, Peterson TE, Harn DG: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91: 2546-2551.
66. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL: Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995; 270: 319-324.
67. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM: Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 1991; 83: 652-660.
68. Gould KL: Coronary arteriography and lipid lowering: limitations, new concepts, and new paradigms in cardiovascular medicine. *Am J Cardiol* 1998; 82: 12M-21M.
69. Harrison DG, Armstrong ML, Freiman PC, Heistad DD: Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *J Clin Invest* 1987; 80: 1808-1811.
70. Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, Theroux P: Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE trial. *Circulation* 1999; 99: 3227-33.

71. Tamai O, Matsuoka H, Nishida H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Nomura G, Imaizumi T: Single LDL-apheresis improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 1997; 95: 76-82.
72. Leung WH, Lau CP, Wong CK: Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolaemic patients. *Lancet* 1993; 341: 1496-500.
73. Stroes ESG, Koomans HA, de Bruin TWA, Rabelink TJ: Vascular function in the forearm of hypercholesterolaemic patients off and an lipid-lowering medication. *Lancet* 1995; 356: 467-471.
74. Mellwig KP, Bailer D, Gleichmann U, Moll D, Betker S, Weise R, Notohamiprodjo G: Improvement of coronary vasodilatation capacity through single LDL-apheresis. *Atherosclerosis* 1998; 139: 173-178.
75. Lehr HA, Krombach F, Munzing S et al. In vitro effects of oxidized low density lipoprotein on CD11b/CD18 and L-selectin presentation on neutrophils a monocytes with relevance for the in vivo situation. *Am J Pathol* 1995;146:218-227.
76. Ragab MS, Selvaraj P, Sgoutas DS. Oxidized lipoprotein(a) induces cell adhesion molecule MAC-1 (CD 11b) and enhances adhesion of the monocytic cell line U937 to cultured endothelial cells. *Atherosclerosis* 1996; 123:103-113.
77. Kassirer M, Zeltser D, Prochorov V et al. Increased expression of the CD11b/CD18 antigen on the surface of peripheral white blood cells in patients with ischemic heart disease: Further evidence for smoldering inflammation in patients with atherosclerosis. *Am Heart J* 1999;138:555-559.
78. Corsini A, Pazzucconi F, Arnaboldi L, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, Sirtori C: Direct effects of statins on the vascular wall. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 773-778.
79. Sampietro T, Tuoni M, Ferdeghini M, Ciardi A, Marraccini P, Prontera C, Sassi G, Taddei M, Bionda A: Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecule expression in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; 96: 1381-1385.
80. Kimura M, Kurose I, Russell J, Granger DN: Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1521-1526.
81. Aikawa M, Rabkin E, Voglic SJ, Shing H, Nagai R, Shoen FJ, Libby P: Lipid lowering promotes accumulation of mature smooth muscle cells expressing smooth muscle myosin heavy chain isoforms in rabbit atheroma. *Circ Res* 1998; 83: 1015-1026.
82. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN, for the MRFIT Research Group: Relationship of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 537-547.
83. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S, Flaker GC, Braunwald E, for the CARE Investigators: Inflammation, pravastatin, and the

- risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *Circulation* 1998; 98: 839-844.
84. Strandberg TE, Vanhanen H, Tikkanen MJ: Effect of statins on C-reactive protein in patients with coronary artery disease. *Lancet* 1999; 353:118-9.
 85. Rosenson RS, Lowe GDO: Effects of lipids and lipoproteins on thrombosis and rheology. *Atherosclerosis* 1998; 140: 271-80.
 86. Badimon JJ, Badimon L, Turitto VT, Fuster V: Platelet deposition at high shear rates is enhanced by high plasma cholesterol levels: in vivo study in the rabbit model. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 392-402.
 87. Mazeaud MM, Driss F, Le Quan Sang KH: Biochemical and functional alterations associated with hypercholesterolemia in platelets from hypertensive patients. *Atherosclerosis* 1992; 94: 201-211.
 88. Rosenson RS, Tangney CC: Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. *JAMA* 1998; 279: 1643-50.
 89. Hochgraf E, Levy Y, Aviram M, Brook JG, Cogan U: Lovastatin decreases plasma and platelet cholesterol levels and normalizes elevated platelet fluidity and aggregation in hypercholesterolemic patients. *Metabolism* 1994; 43: 11-17.
 90. Kowalski J, Okopien B, Madej A, Zielinski M, Belowski D, Kalina Z, Herman ZS. Effects of fenofibrate and simvastatin on plasma sICAM-1 and MCP-1 concentrations in patients with hyperlipoproteinemia. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003; 41: 241-7.
 91. Semaan HB, Gurbel PA, Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist JF, Horne BD, Serebruany VL. Soluble VCAM-1 and E-selectin, but not ICAM-1 discriminate endothelial injury in patients with documented coronary artery disease. *Cardiology*. 2000; 93: 7-10.
 92. Kawakami A, Tanaka A, Nakajima K, Shimokado K, Yoshida M. Atorvastatin attenuates remnant lipoprotein-induced monocyte adhesion to vascular endothelium under flow conditions. *Circ Res* 2002; 91:263-271.
 93. Rovers C, Netea MG, de Bont N, Demacker PNM, Jacobs C, Kullberg BJ, van der Meer JWM, Stalenhoef AFH. LPS-induced cytokine production and expression of β 2-integrins and CD14 by peripheral blood mononuclear cells of patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1998; 141: 99-105.
 94. Wautier JL, Schmid-Schonbein GW, Nash GB. Measurement of leukocyte rheology in vascular disease: clinical rationale and methodology. *Clin Hemorheol an Microcirculation* 1999; 21: 7-24.
 95. Rezaie-Majd A, Prager GW, Bucek RA, Schernthaner GH, Maca T, Kress HG, Valent P, Binder BR, Minar E, Baghestanian M. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 397-403.

96. Mazzone A, de Servi S, Mazzucchelli I, Fossati G, Gritti D, Canale C, Cusa C, Ricevuti G. Increased expression of CD11b/CD18 on phagocytes in ischaemic disease: a bridge between inflammation and coagulation. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 648-652.
97. Uno H, Ueki Y, Murashima J, Miyake S, Tominaga Y, Eguchi K, Yano K. Removal of LDL from plasma by adsorption reduces adhesion molecules on mononuclear cells in patients with arteriosclerotic obliteration. *Atherosclerosis* 1995; 116: 93-102.
98. Diamond MS, Springer TA. A subpopulation of MAC-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol* 1993; 120: 545-556.
99. Jordan JE, Zhao ZQ, Johansen JV. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Res* 1999;43:860-878.
100. Folsom AR, Wu KK, Rosamond WD, Sharrett AR, Chambless LE. Prospective Study of Hemostatic Factors and Incidence of Coronary Heart Disease : The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 1997; 96: 1102-1108.
101. Li D, Chen H, Romeo F, Sawamura T, Saldeen T, Mehta JL. Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 601-605.
102. Yuan Y, Verna LK, Wang NP, Liao HL, Ma KS, Wang Y, Zhu Y, Stemerman MB. Cholesterol enrichment upregulates intercellular adhesion molecule-1 in human vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1534: 139-148.
103. Wang Y, Blessing F, Walli AK, Uberfuhr P, Fraunberger P, Seidel D. Effects of heparin-mediated extracorporeal low-density lipoprotein precipitation beyond lowering proatherogenic lipoproteins: reduction of circulating proinflammatory and procoagulatory markers. *Atherosclerosis* 2004; 175: 145-150.
104. Hernandez C, Lecube A, Barbera G, Chacon P, Lima J, Simo R. Effects of hypolipidemic treatment on serum markers of vascular inflammation in dyslipidemic men. *Med Sci Monit* 2003; 9: 114-119.
105. Rosenson RS, Wolff D, Tangney CC. Statins reduce oxidized low-density lipoprotein levels, but do not alter soluble intercellular cell-adhesion molecule-1 and vascular cell-adhesion molecule-1 levels in subjects with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*. 2004; 106: 215-217.
106. Sbarouni E, Kroupis C, Kyriakides ZS, Koniavitou K, Kremastinos DT. Cell adhesion molecules in relation to simvastatin and hormone replacement therapy in coronary artery disease. *Eur Heart J* 2000;21: 975-80.
107. Rodriguez-Fernandez JL, Sanchez-Martin L, Rey M, Vincente-Mazaneres M, Narumiya S, Texido J, Sanchez-Madrid F, Cabanas C. Rho, and Rho-associated kinase modulate the tyrosine kinase PYK2 in T-cells through regulation of the activity of the integrin LFA-1. *J Biol Chem* 2001; 276: 40518-40527.

108. Ruggeri ZM, Ware J. The structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost.* 1992; 67: 594-599.
109. Hacket D, Davies G, Maseri A: Pre-existing coronary stenoses in patients with first myocardial infarction are not necessarily severe. *Eur Haert J* 1988; 9: 1317-1323.
110. Rabbani R, Topol EJ: Strategies to achieve coronary arterial plaque stabilization. *Cardiovascular Res* 1999; 41: 402-417.
111. Hojo Y, Ikeda U, Takahashi M. Increased levels of monocyte-related cytokines in patients with unstable angina. *Atherosclerosis* 2002;161:403-408.
112. Speidl WS, Graf S, Hornykewycz S. High-sensitivity C-reactive protein in the prediction of coronary events in patients with premature coronary artery disease. *Am Heart J* 2002;144:449-455.
113. Futtermann LG, Lemberg L. Novel markers in the acute coronary syndrome: BNP, IL6, PAPP-A. *Am J Crit Care* 2002;11:168-172.
114. Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2001;345:1022-1029.
115. Bayes-Genis A, Schwartz RS, Lewis DA. Insulin-like growth factor binding protein-4 protease produced by smooth muscle cells increases in the coronary artery after angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:335-341.
116. Denktas AE, Best PJM, Woodrum JE. Pregnancy associated plasma protein-A levels are elevated in patients with unstable angina. *Eur Heart J* 2002;23(Abstract Suppl):P2373.
117. Wieland E, Schettler V, Armstrong VW. Highly effective reduction of C-reactive protein in patients with coronary heart disease by extracorporeal low density lipoprotein apheresis. *Atherosclerosis* 2002;162:187-191.
118. Linn TM, Galbert SP, Kiefer DJ. Characterisation of four human pregnancy-associated plasma proteins. *Am J Obstet Gynecol* 1974;118: 223-236.
119. Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK. Integrated screening for Downs's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters. *N Eng J Med* 1999;341:461-467.
120. Quin QP, Christiansen M, Pettersson K. Point-of-care time-resolved immunofluorometric assay for human Pregnancy-associated plasma protein A: Use inf first-trimester screening for Down syndrome. *Clinical Chemistry* 2002; 48: 473-483.
121. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF-binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci USA*1999;96:3149-3153.
122. Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M. Messenger ribonucleic acid levels of Pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major

basic protein: expression in human reproductive and nonreproductive tissues. *Biol Reprod* 1999;61:1083-1089.

123. Quin QP, Christiansen M, Oxvig C. Double-monoclonal immunofluorometric assay for pregnancy-associated plasma protein A/proeosinophil major basic protein (PAPP-A/proMBP) complex in the first-trimester maternal serum screening for Down syndrome. *Clin Chem* 1997;43:2323-2332.
124. Qin QP, Laitinen P, Majamaa-Voltti K, Eriksson S, Kumpula E, Pettersson K. Release patterns of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in patients with acute coronary syndromes. *Scand Cardiovasc J* 2002; 36: 358-361.
125. Bornfeldt KE, Raines EW, Nakao T. Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor- β induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signalling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest* 1994;93:1266-1274.
126. Wang J, Niu W, Witte DP, Chernusek SD, Nikiforov YE, Clemens TL, Sharifi B, Strauch AR, Fagin JA. Overexpression of insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) in smooth muscle cells of transgenic mice through a smooth muscle α -actin-IGFBP-4 fusion genes induces smooth muscle hypoplasia. *Endocrinology* 1998;139:2605-2614.
127. Vita JA, Keaney JF jr. Endothelial function. A barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002; 106: 640-642.
128. Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; 106: 653-658.
129. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 1899-1906.
130. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340:1111-1115.
131. Higashi Y, Sasaki S, Kurisu S, Yoshimizu A, Sasaki N, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide. *Circulation* 1999;100: 1194-1202.
132. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. A noninvasive measurement of reactive hyperemia that can be used to assess resistance artery endothelial function in humans. *Am J Cardiol.* 2001; 87: 121-5.
133. Morris SJ, Shore AC, Tooke JE. Responses to the skin microcirculation to acetylcholine and sodium nitroprusside in patients with IDDM. *Diabetologia* 1995; 38: 1337-1344.

134. Škrha J, Prázný M, Haas T, Kvasnička J, Kalvodová B. Comparison of laser-Doppler flowmetry with biochemical indicators of endothelial dysfunction related to early microangiopathy in Type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2001; 15: 234-240.
135. Khan F, Litchfield SJ, Stonebridge PA, Belch JJF. Lipid-lowering and skin vascular responses in patients with hypercholesterolaemia and peripheral arterial obstructive disease. *Vascular Medicine* 1999; 4: 233-238.
136. Asberg A, Hartmann A, Fjeldsa E, Holdaas H. Atorvastatin improves endothelial function in renal-transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1920-1924.
137. Haak E, Abletshauser C, Weber S, Goedicke C, Martin N, Hermanns N et al. Fluvastatin therapy improves microcirculation in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2001; 155: 395-401.
138. Asberg A, Holdaas H, Jardine AG, Edvardsen C, Hartmann A. Fluvastatin reduces atherogenic lipids without any effect on native endothelial function early after kidney transplantation. *Clin Transplant* 2003; 17: 385-390.
139. Gordon BR, Stein E, Jones P, Illingworth DR. Indications for low-density lipoprotein apheresis. *Am J Cardiol* 1994;74:1109-1112.
140. Greten H, Bleifeld W, Beil FU, Daerr W, Strauer BE, Kleophas W, Gries FA, Schuff-Werner P, Thiery J, Seidel D. LDL-Apherese. Ein therapeutisches Verfahren bei schwerer Hypercholesterinämie. *Deutsches Ärzteblatt* 1992;89:48-49.
141. Bosch T. State of the art of lipid apheresis. *Artif organs* 1996; 30: 292-295.
142. Seidel D. H.E.L.P apheresis therapy in the treatment of severe hypercholesterolemia: 10 years of clinical experience. *Artif Organs* 1996; 20: 303-310.
143. Stoffel W, Demant T. Selective removal of apolipoprotein B containing serum lipoproteins from blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 611-615.
144. Yokoyama S, Hayashi R, Satani M, Yamamoto A. Selective removal of LDL by plasmapheresis in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 1985; 5: 613-622.
145. Wieland H., Seidel D. A simple specific method for precipitation of low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1983;24:904-909.
146. Pokrokovsky SN, Sussekov AV, Afanasieva OY, Adamovy IY, Lyashikev AA, Kukharchuk VV. Extracorporeal immunoabsorption for the specific removal of lipoprotein(a) (Lp(a)) apheresis: preliminary clinical data. *Chem Phys Lipids* 1994;67/68: 323-330.
147. Fadul JE, Linde T, Sandhagen B, Wikstrom B, Danielson BG. Effect of extracorporeal hemapheresis on blood rheology. *J Clin Apheresis* 1997; 12: 183-186.

148. Wang Y, Blessing F, Walli AK, Uberfuhr P, Fraunberger P, Seidel D. Effects of heparin-mediated extracorporeal low-density lipoprotein precipitation beyond lowering proatherogenic lipoproteins--reduction of circulating proinflammatory and procoagulatory markers. *Atherosclerosis* 2004; 175: 145-50.
149. Thompson GR. LDL Apheresis. *Atherosclerosis* 2003; 167: 1-13.
150. Mii S, Mori A, Sakata H, Nakayama M, Tsuruta H. LDL apheresis for arteriosclerosis obliterans with occluded bypass graft: change in prostacyclin and effect on ischemic symptoms. *Angiology* 1998; 49: 175-180.
151. Adachi H, Niwa A, Shinoda T. Prevention of restenosis after coronary angioplasty with low-density lipoprotein apheresis. *Artif Organs* 1995; 19: 1243-1247.
152. Iizuka T, Takeda H, Inoue H, Miyamoto T, Ito H, Omura M, Tsuji H, Chiba S, Nishikawa T. Clinical trial of low density lipoprotein-apheresis for treatment of diabetic gangrene. *Intern Med* 1997; 36: 898-902.
153. Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, Charbonneau F, Delagrangé D, Creager MA, Selwyn AP, Ganz P. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995; 75: 71B-74B.
154. Mabuchi H, Higashikata T, Kawashiri MA. Clinical applications of long-term LDL-apheresis on and beyond refractory hypercholesterolemia. *Transfus Apheresis Sci* 2004; 30: 233-43.
155. Blessing F, Wang Y, Walli AK, Seidel D. Heparin-mediated extracorporeal low-density lipoprotein precipitation: rationale for a specific adjuvant therapy in cardiovascular disease. *Transfus Apheresis Sci* 2004; 30: 255-66.
156. Daida H, Lee YJ, Yokoi H, Kanoh T, Ishiwata S, Kato K, Hishikawa H, Takatsu F, Kato H, Kutsumi Y, Yamada N, Noma A, Yamaguchi H. Prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty by reducing lipoprotein (a) levels with low-density lipoprotein apheresis. *Am J Cardiol* 1994; 73: 1037-1040.
157. Walzl M, Schied G, Walzl B. Effects of ameliorated haemorheology on clinical symptoms in cerebrovascular disease. *Atherosclerosis* 1998; 139: 385-9.
158. Suckfull M, Wimmer C, Jager B, Schorn K, Thiery J. Heparin induced extracorporeal low-density-lipoprotein precipitation (H.E.L.P.) to improve the recovery of hearing in patients with sudden idiopathic hearing loss. *eur Arch Otorhinolaryngol* 2000; 257: 59-61.
159. Ramunni A, Giancipoli G, Saracino A, Guerriero S, Salianni MT, Gentile MC, Sborgia C, Coratelli P. LDL-apheresis in acute anterior ischemic optic neuropathy. *Int J Artif Organs*. 2004; 27: 337-41.
160. Muso E, Mune M, Fuji Y, Emai E, Ueda N, Hatta K, Imada A, Miki S, Kuwahara T, Yoshihiro T, Takemura T, Yoshiharu T. Low density lipoprotein apheresis therapy for steroid-resistant nephrotic syndrome. *Kidney International* 1999; 71: S122-S125.

161. Malik J, Melenovsky V, Wichterle D, Haas T, Simek J, Ceska R. Both fenofibrate and atorvastatin improve vascular reactivity in combined hyperlipidaemia (fenofibrate versus atorvastatin trial - FAT). *Cardiovascular Research* 2001; 52: 290-298.

11

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CRP	C reaktivní protein
DM	diabetes mellitus
FMD	flow-mediated vasodilation
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě, high density lipoprotein
IGFBP4	vazebný protein 4 pro IGF-I
IGF-I	insulin-like growth factor I
ICHS	ischemická choroba srdeční
LDL	lipoprotein o nízké hustotě, low density lipoprotein
MVR	mikrovaskulární reaktivita
NO	kyslíčkový dusnatý
PAPP-A	pregnancy-associated plasma protein-A
PORH	postokluzivní reaktivní hyperémie
TC	celkový cholesterol
TG	triglyceridy
TH	termální hyperémie
VSMC	hladké svalové buňky cévní stěny
vWF	von Willebrandův faktor

PŘÍLOHA

SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ AUTORA

Články v časopisech s uváděným IF

1. Štulc T, Klement D, Kvasnička J, Štěpán J; Immunocytochemical detection of estrogen receptors in bone cells using flow cytometry. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1356: 95
2. Redlich K, Pietschmann P, Štulc T, Peterlik M; Comparative study on the effect of calcium channel blockers on basal and parathyroid hormone-induced bone resorption in vitro. *Pharmacol Toxicol* 1997; 80(6): 262-265.
3. Štulc T, Češka R, Hořínek A, Štěpán J; Bone mineral density in patients with apolipoproteine E type 2/2 and 4/4 genotypy. *Physiological Research* 2000; 49(4): 435-439.
4. Clee SM, Kastelejn JJP, van Dam M, Marcil M, Room K, Zwarts ZK, Collins JA, Roelants R, Tamasawa N, Štulc T, Suda T, Češka R, Boucher B, Colette R, DeSouich C, Brooks-Wilson A, Molhuizen HOF, Frohlich J, Genest J Jr, Hayden MR. Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. *The Journal of Clinical Investigation* 2000; 106(10): 1263-1270.
5. Štulc T, Češka R; Cholesterol lowering and the vessel wall: new insights and future perspectives. *Physiological Research* 2001; 50(5): 461-471.
6. Štulc T, Melenovský V, Grauová B, Kožich V, Češka R; Folate supplementation prevents plasma homocysteine increase after fenofibrate therapy. *Nutrition* 2001; 17(9): 721-723.
7. Štulc T, Vrablík M, Marinov I, Kasalová Z, Češka R. Atorvastatin reduces expression of leukocyte adhesion molecules in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2003; 166(1): 197-198.
8. Češka R, Štulc T, Fialová L, Zima T, Malbohan I. PAPP-A, a novel marker of unstable plaque, is not influenced by hypolipidemic treatment in contrast to CRP. *Atherosclerosis* 2003; 166(1): 195-196.
9. Štulc T, Kasalová Z, Prázný M, Vrablík M, Škrha J, Češka R. Microvascular reactivity in patients with hypercholesterolemia: the effect of lipid lowering treatment. *Physiological Research* 2003; 52(4): 439-445.
10. Melenovský V, Štulc T, Kožich V, Grauová B, Krijt J, Wichterle D, Haas T, Malík J, Hradec J, Češka R. Effect of folic acid on fenofibrate-induced elevation of homocysteine and cysteine. *Am Heart J* 2003; 146(1): 110.
11. Malík J, Štulc T, Češka R. Unraveling Reaven's syndrome X: serum insulin-like growth factor-I and cardiovascular disease. *Circulation*. 2003 May 27; 107(20): e190-2.
12. Vrablík M, Hořínek A, Češka R, Štulc T, Kvasnička T. Familial dysbetalipoproteinemia in three patients with apoE 2*(Arg136->Cys) gene variant. *Physiological Research* 2003; 52(5): 647-50.
13. Štulc T, Malbohan I, Malík J, Fialová L, Soukupová J, Češka R. Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A in patients with hypercholesterolemia: the effect of atorvastatin treatment. *Am Heart J*. 2003; 146(6): 1060(e21).
14. Češka R, Melenovský V, Malík J, Králíková E, Štulc T, Vrablík M: Hypolipidemic drugs, blood pressure, heart rate, heart rate variability and sympathetic activity. *International Congress Series* 2004; 1262: 458-461.
15. Škrha J, Štulc T, Hilgertová J, Weiserová H, Kvasnička J, Češka R. Effect of simvastatin and fenofibrate on endothelium in type 2 diabetes. *European Journal of Pharmacology* 2004; 493: 183-189.
16. Malík J, Wichterle D, Haas T, Melenovský V, Šimek J, Štulc T. Repeatability of

- noninvasive surrogates of endothelial function. *Am J Cardiol* 2004; 94: 693-696.
17. Šulcová J, Štulc T, Hill M, Hampl R, Mašek Z, Vondra K, Česka R. Decrease in serum dehydroepiandrosterone level after fenofibrate treatment in males with hyperlipidemia. *Physiol Res*. 2005; 54(2): 151-157.
 18. Štulc T, Kasalová Z, Krejčí H, Doležalová R, Česka R. Effect of rosiglitazone on homocysteine and creatinine levels in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2005; 183:367-368.
 19. Malík J, Štulc T, Česka R. Matrix metalloproteinases in isolated hypercholesterolemia. *International Angiology* 2005; 24: 300-303.

Články v časopisech bez stanoveného IF

1. Štulc T, Štěpán J. Receptory a mechanismus působení estrogenů v kosti. *Česká gynekologie*, 1998; 3(3): 244.
2. Štulc T. Receptory estradiolu. *Osteologický bulletin* 1998; 63(3): 243.
3. Štulc T, Česka R. Léčba hyperlipidemií v prevenci rozvoje aterosklerózy. *Sestra* 1998; 6: Int. 6
4. Štulc T, Česka R. LDL-aféza - vývoj, technika a léčebné možnosti. *Diabetes, metabolismus, endokrinologie, výživa* 1999; 2(3): 121-127.
5. Štulc T, Česka R. Léčba hyperlipoproteinemií. *Causa Subita* 1999; 2(6): 31-34.
6. Štulc T, Česka R. Diagnostika hyperlipoproteinemií. *Causa Subita* 1999; 2(9): 10-14.
7. Štulc T, Česka R. Radikální léčebné postupy u hyperlipoproteinemií. *Diagnóza* 1999; č.29: 11.
8. Štulc T, Česka R, Hořínek A, Štěpán J. Hyperlipoproteinémie, genotyp ApoE a kostní denzita. *Časopis lékařů českých* 2000; 139(9): 267-271.
9. Česka R, Štulc T. Fenofibrate 250 SR Pharmavit u nemocných se smíšenou hyperlipoproteinemií. Výsledky sledování u 189 nemocných ze 13 center v ČR. *Časopis lékařů českých* 2000; 139(12): 369-373.
10. Štulc T, Sedláček K, Česka R. Snížení cholesterolu: víc než jen regrese aterosklerózy. *Remedia* 2000;10(2): 170-173.
11. Štulc T, Hořejší B, Česka R. Postavení LDL-afézy v terapii hyperlipoproteinemií. *Medica revue* 2000; 7(2): 28-29.
12. Janota T, Štulc T, Česka R. Statiny v léčbě hyperlipidemií. *Interna* 2000; 1(4): 5-8.
13. Štulc T, Janota T, R. Česka. Místo fibrátů v moderní léčbě hyperlipidemií. *Interna* 2000; 1(5): 16-22.
14. Česka R, Štulc T. Fenofibrate 250 SR Pharmavit u nemocných se smíšenou hyperlipoproteinemií. Výsledky sledování u 189 nemocných ze 13 center v ČR. *Kapitoly z kardiologie* 2000; 2(4): 144-147.
15. Štulc T, Česka R. Diagnostika a léčba hyperlipoproteinemií v prevenci rozvoje aterosklerózy. *Forum Medicinæ* 2000; 2(5-6): 31-37.
16. Česka R, Štulc T. LDL-aféza ve VFN – nová naděje pro nemocné s kardiovaskulárními chorobami? *Nemocnice* 2000; 2: 30-34.
17. Štulc T, Grauová B, Česka R. Krátkodobá léčba LDL-afézou u nemocných s hyperlipoproteinemií a ICHS: teoretická východiska a první zkušenosti. *Kapitoly z kardiologie* 2001; 3(2), 77-79.

18. Štulc T, Češka R. Zásady diagnostiky a léčby hyperlipidemií. *Causa Subita* 2002; 5(4):160-165.
19. Vrablík M, Štulc T. Statiny nejen v léčbě hyperlipidemií. *Causa Subita* 2002; 5(5); 245-246.
20. Štulc T, Vrablík M, Češka R. Místo fibrátů v léčbě hyperlipidemií. *Causa Subita* 2002; 5(6):269-272.
21. Křížová J, Štulc T, Spáčil J, Češka R. S antikoncepcí autobusem do Velké Británie. *Kapitoly z kardiologie* 2002; 4(3): 106-107.
22. Jarkovská Z, Štulc T, Češka R. recidivující transitorní ischemické ataky při kritické stenóze vnitřní karotické tepny. *Kapitoly z kardiologie* 2002; 4(4): 146-147.
23. Štulc T, Kasalová Z, Vrablík M, Marinov I, Češka R. Vliv atorvastatinu na leukocytární expresi cytoadhezivních molekul u pacientů s hypercholesterolemii. *Cor et Vasa* 2003; 45 (1): 54-55.
24. Štulc T, Vrablík M. Radikální léčebné postupy u pacientů s hyperlipidemií. *Kardioforum* 2003; 1(3): 29-33.
25. Vrablík M, Štulc T. Hyperlipoproteinémie ve vyšším věku – podceňované riziko? *Kardioforum* 2003; 1(3): 37-39.
26. Dobiáš M, Štulc T, Semrád M, Češka R. Cardio-cutaneous fistula due to retained epicardial pacing electrodes after CABG surgery. *Intervenční a akutní kardiologie* 2004; 2: 9-10.
27. Štulc T, Vrablík M, Králíková E. Zásady diagnostiky a léčby hyperlipoproteinemií. *Medicína po promoci* 2004; 5(3): 68-73.
28. Vrablík M, Štulc T, Králíková E, Kvasilová M, Procházková R. Statiny, fibráty a jejich kombinace v léčbě hyperlipoproteinemií. *Medicína po promoci* 2004; 5(4): 53-59.
29. Štulc T. Novinky v léčbě statiny u diabetiků. *Kazuistiky v diabetologii* 2004; 2(4): 64.
30. Češka R, Herber O, Skoupá J, Štulc T, Býma S, Karen I, Seifert B. Dyslipidémie. Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2004.
31. Štulc T, Češka R. Atorvastatin. *Farmakoterapie* 2005; 1(2): 126-133.
32. Češka R, Vaverková H, Vrablík M, Housová J, Štulc T, Reiner Ž Rumboldt Z. Srovnání účinnosti semi-generického a originálního atorvastatinu. *Interní medicína pro praxi* 2005; 7(3): 127-130.
33. Štulc T. Dyslipidémie metabolického syndromu. *Medical Tribune* 2005; 1(14): 14.
34. Štulc T. Mechanismus účinku fibrátů: cílená terapie k redukci rizika u diabetu 2. typu. *Medicína po promoci* 2005; 6(7): 82-84.
35. Štulc T. Ateroskleróza a choroby srdce a cév. *Vademecum zdraví* 2005; 1(1): 22-24.

Abstrakta z konferencí, publikovaná v časopisech s uváděným IF

1. Redlich K, Štulc T, Pietschmann P, Peterlik M; Effects of different calcium channel blockers on basal and parathyroid hormone-induced bone resorption in vitro. *Bone* 1995; 16(3): 405 (A52).
2. Štěpán J, Štulc T. Specificity of a two-site immunoradiometric assay for human bone alkaline phosphatase in serum. *Calcified Tissue Int* 1995; 56(5): 486 (A254).

3. Štulc T, Kružík P, Klement D, Kvasnička J, Štěpán J; A novel approach to the detection of estrogen receptors in bone cells. *Osteoporos Int* 1996; 6(S1): 222.
4. Štulc T, Češka R, Hořínek A, Štěpán J; Bone mineral density in patients with ApoE type 2/2 and 4/4 genotype. *Calcified Tissue Int* 1999; 64(S1): S83.
5. Štulc T, Štěpán J, Hořínek A, Češka R. ApoE genotype is not associated with variations in bone mineral density. *Atherosclerosis* 1999; 144(S1): 103.
6. Spáčil J, Čeka R, Haas T, Štulc T, Hořejší B: The relationship of flow-dependent dilatation of the popliteal artery to common carotid artery intima media thickness. *Atherosclerosis* 2000; 151: 27.
7. Štulc T, Melenovský V, Grauová B, Kožich V, Češka R. Folate supplementation prevents plasma homocysteine increase after fenofibrate therapy. *Atherosclerosis Supplements* 2001; 2(2): 95(P194).
8. Štulc T, Melenovský V, Grauová B, Kožich V, Češka R. Folate supplementation prevents plasma homocysteine increase after fenofibrate therapy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2001; 17(9): 721-723.
9. Melenovský V, Štulc T, Grauová B, Wichterle D, Kožich V, Krijt J, Haas T, Češka R. Folic acid supplementation substantially reduces hyperhomocysteinemia induced by fenofibrate. *J Am Coll Cardiol*; 39(5 Suppl.A): 270A.
10. Malik J, Melenovský V, Kršek M, Štulc T, Justová V, Šimek J, Češka R. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha increases serum insulin-like growth factor-1 levels but decreases insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(5):a-52.
11. Štulc T, Vrablík M, Marinov I, Kasalová Z, Češka R. Leukocyte expression of cell adhesion molecules in patients with hypercholesterolemia: Effect of atorvastatin treatment. *Atheroscler Suppl* 2002; 3(2): 233.
12. Kasalová Z, Štulc T, Vrablík M, Prázný M, Škrha J, Češka R. Effect of atorvastatin on microvascular reactivity in patients with hypercholesterolemia. *Atheroscler Suppl* 2002; 3(2):233.
13. Štulc T, Kasalová Z, Vrablík M, Prázný M, Škrha J, Češka R. Microvascular reactivity in patients with hypercholesterolemia: effect of atorvastatin treatment. *Eur Hear J* 2002; 23(Abstr suppl): 224.
14. Melenovský V, Malík J, Štulc T, Šimek J, Češka R. Atorvastatin therapy increases baroreflex sensitivity in subjects with combined hyperlipidemia. *Circulation* 2002; 19(Suppl. II): 75.
15. Štulc T, Marinov I, Kasalová Z, Vrablík M, Češka R. Leukocyte but not endothelial cell adhesion molecules are increased in patients with hypercholesterolemia: the effect of atorvastatin treatment. *Eur Heart J* 2003; 24(Abstr suppl): 336.
16. Štulc T, Škrha J, Malbohan I, Fialová L, Malík J, Češka R. Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A in patients with hypercholesterolemia and diabetes: the effect of lipid lowering. *Eur Heart J* 2003; 24(Abstr suppl): 458.
17. Štulc T, Češka R, Kožich V, Škrha J. Fenofibrate but not simvastatin increases serum homocysteine and creatinine in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atheroscler Suppl* 2003; 4(2): 120.
18. Štulc T, Marinov I, Kasalová Z, Vrablík M, Češka R. Leukocyte but not endothelial cell adhesion molecules are increased in patients with hypercholesterolemia: the effect of atorvastatin treatment. *Atheroscler Suppl* 2003; 4(2): 144.

19. Štulc T, Škrha J, Malbohan I, Fialová L, Malík J, Češka R. Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A in patients with hypercholesterolemia and diabetes: the effect of lipid lowering. *Atheroscler Suppl* 2003; 4(2): 331.
20. Vrablík M, Hořínek A, Štulc T, Zlatohlávek L, Kvasnička T, Češka R. Apolipoprotein AV polymorphism is the only genetic marker associated with severe hypertriglyceridemia. Results of analysis of four gene loci. *Atheroscler Suppl* 2003; 4(2): 236.
21. Štulc T, Malík J, Češka R, Kožich V, Škrha J. Fenofibrate but not simvastatin increases serum homocysteine and creatinine in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2003; 108(17S): 719(Abstr.3258).
22. Štulc T., Malík J, Češka R: Circulating matrix metalloproteinases are altered in patients with hypercholesterolemia: the effect of atorvastatin treatment. *Atherosclerosis Suppl* 2004; 5(1): 20.
23. Štulc T., Malík J, Melenovský V, Justová V, Lacinová Z, Češka R: IGF-I levels are decreased in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis Suppl* 2004; 5(1): 60.
24. Prázný M, Kasalová Z, Štulc T, Vrablík M, Škrha J. Microvascular reactivity after statin treatment in hyperlipidemic diabetic and non-diabetic patients. *Journal of Vascular Research* 2004; 41(S2): 21.
25. Prázný M, Kasalová Z, Štulc T, Vrablík M, Škrha J. Microvascular reactivity after statin treatment in hyperlipidemic diabetic and non-diabetic patients. *Journal of Vascular Research* 2004; 41(S2): 21.
26. Štulc T, Kasalová Z, Perušičová J, Krejčí H, Češka R. Effect of rosiglitazone on homocysteine and creatinine levels in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis Suppl* 2005; 6(1): 98.

Abstrakte z konferencí, publikovaná v samostatných sbornících nebo v časopisech bez stanoveného IF

1. Štulc T, Kružík P, Kvasnička J, Štěpán J; Stanovení estrogenních receptorů v kostních buňkách průtokovou cytometrií. XVIII. endokrinologické dny v Olomouci 1995; Abstrakta přednášek.
2. Štulc T. Receptory estradiolu. *Časopis lékařů českých* 1987; 136(16): 515.
3. Štulc T, Šobra J, Češka R. Hypercholesterolaemia in postmenopausal osteoporosis patients with and without vertebral fractures. 70th EAS Congress 1988; Abstract book: 148.
4. Štulc T, Češka R, Dobiášová M, Frohlich J. Pacientka s familiární analfalipoproteinémií - kazuistika. III. kongres České společnosti pro aterosklerózu 1999; Abstrakta přednášek.
5. Štulc T, Melenovský V, Grauová B, Kožich V, Češka R. Vliv kyseliny listov na hladinu homocysteinu u pacientů léčených fenofibrátem. *Diabetes, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2000; 3(S3): 34.
6. Štulc T, Grauová B, Kvasnička T, Prázný M, Malík J, Češka R. Účinnost krátkodobé léčby LDL-aférou u pacientů s chronickou ICHS bez možnosti revaskularizace. *Diabetes, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2000; 3(S3): 44.
7. Kvasnička T, Kvasnička J, Češka R, Štulc T. "Modulace" zánětlivé reakce u pacientů s kombinovanou hyperlipoproteinémií. *Diabetes, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2000; 3(S3): 48.
8. Štulc T, Melenovský V, Grauová B, Kožich V, Češka R: Folate supplementation prevents plasma homocysteine increase after fenofibrate therapy. Kongres "Drugs affecting lipid metabolism", New York, 9.-12.9.2001, Abstract book.

9. Štulc T, Vrablík M, Kasalová Z, Češka R. Vliv atorvastatinu na mikrocirkulaci a leukocytární expresi cytoadhezivních molekul. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2001; 4(S4): 33.
10. Melenovský V, Štulc T, Kožich V, Grauová B, Češka R. Vzestup homocysteinu při léčbě fenofibrátem lze omezit podáváním kyseliny listové. *Cor et Vasa* 2001; 44(4): 59.
11. Štulc T, Vrablík M, Kasalová Z, Češka R. Atorvastatin reduces leukocyte expression of cell adhesion molecules in patients with hypercholesterolemia. 6th international symposium on global risk of coronary heart disease and stroke. Florence, Italy, 12.-15.6.2002, Abstract book.
12. Štulc T, Kasalová Z, Vrablík M, Prázný M, Škrha J, Češka R: Microvascular reactivity in patients with hypercholesterolemia: effect of atorvastatin treatment. 6th international symposium on global risk of coronary heart disease and stroke. Florence, Italy, 12.-15.6.2002, Abstract book.
13. Vrablík M, Hořínek A, Pazourková E, Češka R, Štulc T. LPL gene variants in primary combined hyperlipidaemia. 6th international symposium on global risk of coronary heart disease and stroke. Florence, Italy, 12.-15.6.2002, Abstract book.
14. Vrablík M, Hořínek A, Šobra J, Češka R, Štulc T. Familial dysbetalipoproteinaemia and structural variant apoE2*(Arg136Cys). 6th international symposium on global risk of coronary heart disease and stroke. Florence, Italy, 12.-15.6.2002, Abstract book.
15. Prázný M, Škrha J, Kasalová Z, Štulc T, Vrablík M, Češka R: Mikrovaskulární reaktivita u diabetiků 1. a 2. typu a u pacientů s hyperlipidemií. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2002; 5(S1): 40.
16. Kasalová Z, Štulc T, Prázný M, Vrablík M, Škrha J, Češka R: Effect of atorvastatin on microvascular reactivity in patients with hypercholesterolemia. Konference "Traditional angiological days 2002", Praha, 14.-16.3.2002, Book of abstracts.
17. Štulc T, Vrablík M, Kasalová Z, Češka R. Effect of atorvastatin on leukocyte expression of cell adhesion molecules in patients with hypercholesterolemia. Konference "Traditional angiological days 2002", Praha, 14.-16.3.2002, Book of abstracts.
18. Štulc T, Vrablík M, Marinov I, Kasalová Z, Češka R. Vliv atorvastatinu na leukocytární expresi cytoadhezivních molekul u pacientů s hypercholesterolemii. *Cor et Vasa* 2002; 44(4S): 118.
19. Kasalová Z, Štulc T, Vrablík M, Prázný M, Škrha J, Češka R. Vliv atorvastatinu na mikrovaskulární reaktivitu u pacientů s hypercholesterolemii. *Cor et Vasa* 2002; 44(4S): 53.
20. Štulc T, Vrablík M, Marinov I, Kasalová Z, Češka R. Vliv atorvastatinu na leukocytární expresi cytoadhezivních molekul u pacientů s hypercholesterolemii. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2002; 5: 197.
21. Vrablík M, Hořínek A, Štulc T, Češka R. Genetická determinace extrémní kombinované hyperlipoproteinémie. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2002; 5: 196.
22. Štulc T, Vrablík M, Marinov I, Kasalová Z, Češka R. Vliv atorvastatinu na leukocytární a endoteliální cytoadhezivní molekuly u pacientů s hypercholesterolemii. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2002; 5(S3): 38.
23. Kasalová Z, Štulc T, Prázný M, Vrablík M, Škrha J, Češka R: Mikrovaskulární reaktivita u pacientů s hyperlipidemií a u diabetiků: vliv hypolipidemické léčby. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2002; 5(S3): 20.
24. Štulc T, Malbohan I, Malík J, Fialová L, Češka R. Zvýšené koncentrace metaloproteinázy PAPP-A u pacientů s hypercholesterolemii: vliv léčby atorvastatinem. *Cor et Vasa* 2003; 45(4S): 98.

25. Malík J, Štulc T, Melenovský V, Justová V, Lacinová Z, Šimek J, Wichterle D. Vztah inzulin like growth factoru-I a hyperlipidemie. *Cor et Vasa* 2003; 45(4S): 59.
26. Štulc T, Škrha J, Malbohan I, Fialová L, Češka R. Zvýšené koncentrace metaloproteinázy PAPP-A u pacientů s hypercholesterolémií a diabetem: vliv hypolipidemické léčby. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2003; 6(S3): 17.
27. Malík J, Štulc T, Melenovský V, Šimek J, Wichterle D. Hladiny cirkulujících matrix-metalloproteináz a jejich ovlivnění hypolipidemickou léčbou u jedinců s hypercholesterolémií. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2003; 6(S3): 44.
28. Malík J, Štulc T, Melenovský V, Šimek J, Wichterle D. Hladiny inzulin like growth factor-I u různých fenotypů hyperlipidemie. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2003; 6(S3): 22.
29. Štulc T, Škrha J, Malbohan I, Fialová L, Češka R. Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A in patients with hypercholesterolemia and diabetes: the effect of lipid lowering. *CEVJ* 2004; 3(1):29.
30. Malík J, Spáčilová J, Slavíková M, Štulc T. Kardiovaskulární rizikové faktory u nemocných v chronickém dialyzačním programu. *Cor Vasa* 2004; 46(4S): 55.
31. Malík J, Spáčilová J, Slavíková M, Štulc T. Využití arterio-alveolární difference oxidu uhličitého v diagnostice akutní plicní embolie. *Cor Vasa* 2004; 46(4S): 55.
32. Malík J, Spáčilová J, Slavíková M, Štulc T. Tyreotoxická krize na koronární jednotce. *Cor Vasa* 2004; 46(4S): 55.
33. Vrablík M, Štulc T, Svobodová H, Češka R, Haas T. Triglyceride levels predict vascular complications in familial hypercholesterolemia. XV International symposium on drugs affecting lipid metabolism, Venice, Italy, 24-27.10.2004, Abstract book.
34. Štulc T, Škrha J, Marinov I, Češka R. Leukocytární a endoteliální cytoadhezivní molekuly u pacientů s hyperlipidémií a diabetem. Vliv hypolipidemické léčby. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2004; 7(3): 159.
35. Štulc T. Nelipidové účinky hypolipidemik. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2004; 7(S3): 22.
36. Prázný M, Kasalová Z, Štulc T, Vrablík M, Škrha J. Mikrovaskulární reaktivita po léčbě statinem u diabetiků 2. typu a u nediabetiků s hypercholesterolémií. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2004; 7(S3): 36.
37. Havlíková H, Kancheva L, Šulcová J, Štulc T, Češka R. Léčba hyperlipidemie fenofibrátem u mužů snižuje sérové hladiny dehydroepiandrosteronu. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2004; 7(S3): 42.
38. Kasalová Z, Štulc T, Krejčí H, Doležalová R, Perušičová J, Češka R. Vliv rosiglitazonu na hladinu homocysteinu a kreatininu u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2005; 8(S1): 26.
39. Kasalová Z, Prázný M, Doležalová R, Krejčí H, Perušičová J, Malík J, Štulc T, Vopálková L. Účinek rosiglitazonu na mikrovaskulární reaktivitu u diabetes mellitus 2. typu. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2005; 8(S1): 26.
40. Štulc T, Kasalová Z, Perušičová J, Krejčí H, Češka R. Vliv rosiglitazonu na hladinu homocysteinu a kreatininu u pacientů s diabetem 2. typu. *Cor Vasa* 2005; 47(4S): 109.
41. Malík J, Kasalová Z, Štulc T, Doležalová R, Wichterle D, Šimek J, Chytilová E, Housová J, Škrha J. Vliv rosiglitazonu na autonomní regulaci u diabetiků 2. typu. *Cor Vasa* 2005; 47(4S): 65.

42. Kasalová Z, Prázný M, Doležalová R, Krejčí H, Perušičová J, Malík J, Štulc T, Vopálková L. Effect of rosiglitazone on microvascular reactivity in type 2 diabetes mellitus. *Cor Vasa* 2005; 47(4S): 46.
43. Svobodová H, Štulc T, Kasalová Z, Doležalová R, Krejčí H, Marinov I, Češka R. Leukocytární exprese prozánětlivých a protrombotických molekul u diabetiků 2.typu: vliv léčby rosiglitazonem. XIII. konference České společnosti pro hypertenzi, Český Krumlov, 6.-8.10.2005; Sborník abstrakt.
44. Štulc T. Hypolipidemická léčba a metabolický syndrom. XIII. konference České společnosti pro hypertenzi, Český Krumlov, 6.-8.10.2005; Sborník abstrakt.
45. Svobodová H, Štulc T, Kasalová Z, Doležalová R, Krejčí H, Marinov I, Češka R. Vliv rosiglitazonu na leukocytární expresi prozánětlivých a protrombotických molekul u diabetiků. *Vnitřní lékařství* 2005; 51(10): 1212.
46. Štulc T, Kasalová Z, Doležalová R, Krejčí H, Melenovský V, Malík J, Kožich V, Češka R. Receptory PPAR, homocystein a renální funkce. *Vnitřní lékařství* 2005; 51(10): 1138.
47. Svobodová H, Štulc T, Kasalová Z, Doležalová R, Krejčí H, Marinov I, Češka R. Vliv rosiglitazonu na leukocytární expresi prozánětlivých a protrombotických molekul u diabetiků. *Vnitřní lékařství* 2005; 51(10): 1212. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2005; 8(S3): 24.
48. Malík J, Kasalová Z, Štulc T, Doležalová R, Šimek J, Housová J, Škrha J. Autonomní dysfunkce u diabetiků 2.typu a vliv rosiglitazonu. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2005; 8(S3): 22.
49. Štulc T, Kasalová Z, Doležalová R, Krejčí H, Melenovský V, Malík J, Kožich V, Češka R. Receptory PPAR, homocystein a renální funkce. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2005; 8(S3): 20.