

<b>Obsah:</b>	<b>strana</b>
<b>1 Současný stav problematiky</b>	
1.1 Ischemická choroba tepen dolních končetin	2
1.2 Léčba ICHDK	2
1.3 Rizikové faktory ICHDK	2
1.4 Mírná hyperhomocysteinemie	3
1.5 Oxidační stres	4
1.6 Asymetrický dimethylarginin	4
<b>2 Cíle disertační práce</b>	5
<b>3 Metodika</b>	5
<b>4 Výsledky:</b>	
<b>1 Léčba statiny u pacientů s ICHDK</b>	
1.1 Pacienti s poruchou spektra krevních lipidů	6
1.2 Pacienti bez poruchy spektra krevních lipidů	9
<b>2 Léčba pentoxifylinem u pacientů s ICHDK</b>	
2.1 Intravenozní podání jednotlivé dávky	11
2.2 Orální podání jednotlivé dávky	12
2.3 Klauzikační interval před 8 denní infuzní léčbou a po ní	12
<b>3 Léčba foláty u pacientů s ICHDK</b>	
3.1 Výskyt hyperhomocysteinemie u pacientů s ICHDK	13
3.2 Methioninový zátěžový test	14
3.3 Porovnání účinku léčby kyselinou listovou u pacientů s ICHDK a u zdravých seniorů, MTHFR	15
<b>4 Asymetrický dimethylarginin</b>	
4.1 ADMA a konvenční rizikové faktory v populačním vzorku	17
4.2 ADMA u nemocných s předčasnou ICHS a u kontrolní skupiny	18
<b>5 Závěry pro praxi</b>	20
<b>6 Summary</b>	20
<b>7 Literatura</b>	22
<b>8 Seznam publikací a přednášek autora</b>	25

## **1 Současný stav problematiky**

### **1.1 Ischemická choroba tepen dolních končetin**

Ischemická choroba tepen dolních končetin (ICHDK) je nejčastějším a nejvýznamnějším onemocněním periferních tepen, nejčastěji vzniká na podkladě aterosklerotického procesu.

Pacienti s intermitentními klaudikacemi vykazují až v 50-70% také symptomy anginy pectoris (Aronow et al. 2002). Diagnóza ICHDK je založena na pozitivní anamnéze typických klaudikací nebo již klidových bolestí. Při klinickém vyšetření nalézáme šelest na postižených tepnách či až chybění pulzu, pozitivní polohový test a pokles dopplerovského systolického kotníkového tlaku, který dnes považujeme za významný predikátor kardiálního rizika (Leng et al. 1996). Důležitá je objektivizace klaudikační vzdálenosti na pohyblivém chodníku (McGee et al. 1998).

Stadia ischemické choroby DK vychází z Fontainova rozdělení z r.1954. Pacienti v I. stadiu onemocnění jsou asymptomaticí, nalézáme u nich pouze při auskultaci šelest na postižených tepnách. II. stadium je již s typickými klaudikacemi, ve stadiu IIa je dosažená klaudikační vzdálenost delší než 200 m, ve stadiu IIb je kratší než 200 m, z důvodu stratifikace nemocných rozlišujeme ještě velmi krátké klaudikace do 50 m. Nemocní ve III. stadiu mají již klidové bolesti, zejména v noci. Dopplerovský kotníkový tlak vyšší než 50 mm Hg charakterizuje nemocné ve stadiu IIIa, u stadia IIIb je tato hodnota nižší než 50 mm Hg. IV. stadium je charakterizováno ohraničenou nekrózou na dolních končetinách (Hirsch et al 2001).

### **1.2 Léčba ICHDK**

Cílem léčby ICHDK je odstranění či zmírnění ischemických příznaků a zabránění progresu aterosklerotických změn. Rozhodující je eliminace ovlivnitelných rizikových faktorů u všech stádií ICHDK. Z nefarmakologické léčby je zcela zásadní odstranění kuřáckých návyků a intenzivní rehabilitace.

Snahou farmakoterapie je od stadia II ovlivnění mikrocirkulace a reologických vlastností krve. Mezi nejdůležitější léky patří vazodilatancia, reologika, prostaglandiny, antiagregancia a antikoagulancia (Coffman et al. 1979). Vazodilatancia jsou indikována ve III. a IV. stadiu onemocnění (Dormandy et al. 2000), v počátku onemocnění je důležitější intenzivní intervalový trénink (Girolami et al. 1999). Mezi vasodilatační preparáty patří kyselina nikotinová, xantinolnikotinát, teofylin a naftidrofuryl. Novinkou v této oblasti je cilostazol, který selektivně inhibuje fosfodiesterázu III.

Nejčastěji používaným reologikem je pentoxifyllin. Jedná se o xantinový derivát, který má řadu účinků. Kromě blokády cytokinů zlepšuje reologické vlastnosti tím, že snižuje hladinu fibrinogenu (Hiatt et al. 2001), krevní viskozitu, agregaci erytrocytů a jejich deformabilitu, zabraňuje agregaci trombocytů (Hirsch et al. 2006).

### **1.3 Rizikové faktory ICHDK**

Zcela zásadní se jeví ovlivnění všech rizikových faktorů aterosklerózy, pochopení jejich vzájemného vztahu a nalezení účinných populačních preventivních a léčebných opatření (Rosolová a kolektiv 1994). Nejvýznamnějšími rizikovými faktory pro vznik aterosklerózy tepen DK jsou kuřácké návyky, hyperlipidémie, diabetes mellitus, arteriální hypertenze a obezita. Dalšími rizikovými faktory mohou být hyperhomocysteinémie, hyperfibrinogémie, zvýšení PAI-1, hyperurikémie, stres a nedostatek fyzické aktivity.

Skutečnost, že výskyt aterosklerózy souvisí s koncentrací cholesterolu, je znám již delší dobu (Adams et al. 2000). Teprve průlomová multicentrická studie 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group 1994) prokázala výrazné snížení srdeční (42%) i celkové mortality (30%) a rovněž snížení nutnosti operačních výkonů na věnčitých tepnách (37%). Statiny kromě hypolipidemického účinku ovlivňují skladbu a funkci buněčných membrán, hemokoagulaci a vnitřní trombogenní aktivitu, zlepšují funkci endoteliálních buněk, omezují proliferaci a aktivaci buněk hladkého svalstva. Hypolipidemická léčba pravděpodobně vede ke stabilizaci sklerotických plátů, snižuje obsah lipidů v těchto plátech a vede k jejich přeměně na pláty stabilní, které jsou méně náchylné k prasknutí a následnému vzniku akutní trombózy. Dlouhodobé podávání statinů je bezpečné, což nám ukázala 5-ti letá studie se simvastatinem 40mg Heart Protection Study (Heart Protection Study Collaborative Group 2002). Zejména u diabetiků bez ICHS či ICHDK HPS prokázala vysoce významné 33% poměrné snížení výskytu prvních velkých cévních příhod, stejně u mužů i žen. Velmi důležité bylo zjištění, že efekt léčby ve skupině nad 65 let, ale i nad 75 let byl stejný jako u mladších věkových skupin. Byl prokázán prospěch z léčby i u nemocných s výchozími hodnotami LDL pod 2,6 mmol/l.

#### **1.4 Mírná hyperhomocysteinemie**

Novějším možným rizikovým faktorem aterosklerózy je mírná hyperhomocysteinemie (v rozmezí 15-30  $\mu\text{mol/l}$ ). Homocystein (Hcy) je aminokyselina poprvé popsána v roce 1952 de Vigneaudem (De Vigneaud 1952). V plasmě se Hcy vyskytuje jako volný pouze asi v 10%, zbytek je vázán ve směsi bisulfidů, homocystinu a homocystein-cysteinu. Pro praktické potřeby se udává hodnota celkového homocysteinu, tedy hladina po redukci a uvolnění z výše uvedených sloučenin. Homocystein je v těle syntetizován tzv. methioninovým cyklem, který je součástí degradačního systému aminokyselin s obsahem síry. Homocystein je v methioninovém cyklu buď spolupřítomností vitamínu B12 zpětně remetylován enzymem methioninsyntázou, kde jako donátor metylové skupiny působí folát (kyselina listová), či degradován transsulfurační drahou na cystathion a cystein, a to enzymem cystathion- $\beta$  syntázou za přítomnosti vitamínu B6 (Robinson et al. 1994). Defekt tohoto enzymu vede k extrémní hyperhomocysteinemii (Hcy > 500  $\mu\text{mol/l}$ ) provázené mentální retardací a těžkými aterosklerotickými změnami tepen a rizikem tromboembolie již v raném věku (Carson et al. 1962). Poměrně dobře je objasněna remetylační dráha homocysteinu. Dárcem metylové skupiny pro vitamin B12 dependentní konverzi Hcy na methionin je 5-methyltetrahydrofolát, který je syntetizován z 5,10 methylenetetrahydrofolátu. Klíčovým enzymem je metylenetetrahydrofolátreduktáza (MTHFR). Gen pro MTHFR je lokalizován na krátkém chromozómu 1. V případě mutace dochází k záměně cytosinu za tymin v pozici 677. Důsledkem této záměny je změna struktury proteinu MTHFR a ta způsobuje redukovanou aktivitu a vyšší termolabilitu tohoto enzymu. Autosomálně recesivní mutace byla nalezena asi u 17% pacientů s ICHS a v populaci u cca 5% (Kang et al. 1991).

Vyšší hladiny homocysteinu vyvolávají endoteliální dysfunkci (Kanani et al. 1999). Jedním z předpokládaných mechanismů je tvorba peroxidových a superoxidových aniontů a tím zrychlení oxidativní degradace oxidu dusnatého (Stamler et al. 1993). Oxid dusnatý kromě vasodilatačního působení ovlivňuje i agregaci destiček, adhezi monocytů, vznik superoxidových radikálů, proliferaci hladké svaloviny cév (Tsai et al. 1994) a oxidaci LDL částic (Loscalzo 1996).

Kauzalitu Hcy v etiologii vaskulárních onemocnění prokázala řada retrospektivních, ale i prospektivních sledování. Hordalandská studie zjistila, že zvýšení tHcy o 5  $\mu\text{mol/l}$  je

spojeno s nárůstem rizika celkové mortality o 49% a kardiovaskulární mortality o 50% (Vollset et al. 2001). Homocystein je prokázán jako rizikový faktor aterosklerózy i jiného řečiště než koronárního. Studie ECAP (Graham et al. 1997) zařadila i 156 nemocných s ICHDK. Relativní riziko ICHDK bylo v této studii 1.7x vyšší pro nemocné v nejvyšším kvintilu tHcy při srovnání s nižším. Obdobně metaanalýza Boushey (Boushey et al. 1995) našla relativní riziko přítomnosti hyperhomocysteinemie u pacientů s ICHDK (6.8), což bylo překvapivě vyšší než pro ICHS (1.8) či cerebrovaskulární choroby (2.5). Několik významných prací o homocysteinu pochází i z našeho pracoviště. Byla prokázána asociace mezi hyperhomocysteinemií a zvýšenou tuhostí aortální stěny (Filipovský et al. 2004) a inzulinovou rezistencí (Rosolová et al. 2002).

Základem léčby mírné hyperhomocysteinemie je suplementace kyselinou listovou. Podávání vitamínu B12 má pouze přídatný charakter, neboť jeho účinek je poměrně malý. Pyridoxin dokáže snižovat hladinu Hcy pouze po perorální zátěži L-methioninem. Metaanalýza studií s léčbou foláty v dávce 0,2 - 10 mg denně prokázala 25% snížení hladin Hcy u takto léčených osob, spolupodávání vitamínu B12 vedle k dalšímu 7% snížení (HLTG 1998).

### 1.5 Oxidační stres

Volné radikály jsou příčinou řady onemocnění včetně aterosklerózy. Z markerů oxidačního stresu jsou nejčastěji sledovány malondialdehyd (MDA), superoxiddismutáza (SOD) a glutathionperoxidáza (GSHPx). Hladina MDA je do jisté míry úměrná lipoperoxidaci, i když vyjadřuje jen asi 1/10 hodnoty skutečné lipoperoxidace (Ruef et al. 2001). Na druhé straně působí látky antioxidační, superoxiddismutáza a glutathionperoxidáza. SOD stoupá rychle v krvi při zvýšené tvorbě superoxidu. GSHPx štěpí peroxid vodíku a lipidické hydroperoxydy. Při poklesu GSHPx se hromadí peroxid vodíku, který proniká membránami a poškozuje buňky. Glutathion má také detoxikační účinky, sníženou hladinu nalézáme u kardiovaskulárních onemocnění, diabetu a artritidy.

### 1.6 Asymetrický dimetylgarginin

Stále nevíme, zda máme asymetrický dimetylgarginin (ADMA) považovat za rizikový faktor aterosklerózy, či za následek endoteliální dysfunkce. Homocystein a jeho prekursor L-methionin zvyšují hladiny ADMA, a to v závislosti na koncentraci látek. Tento účinek je zprostředkovan snížením aktivity enzymu dimethylarginindimethylaminohydrolázy (DDAH), což je enzym produkovaný endotelem. DDAH degraduje velkou většinou ADMA (při parenterálním podání se ADMA jen v 5% vyloučí do moči nezměněn, zbytek je degradován enzymem především na citrulin). Homocystein inhibuje DDAH tím, že zasahuje sulfhdrylovou skupinu, která je pro tento enzym klíčovou patrně tím, že se s ní váže a vytvoří s DDAH bisulfid. Podařilo se prokázat, že zvýšené hodnoty ADMA inhibují NO-syntázu, a tím vyvolávají endoteliální dysfunkci (Ito et al. 1999). Ke kumulaci ADMA dochází především u nemocných s renální insuficiencí, neboť ADMA je vylučován ledvinami. Nemocní v chronickém dialyzačním programu dnes z velké části umírají na kardiovaskulární nemoci díky pokročilé ateroskleróze. Prospektivní 33 měsíční sledování hemodialyzovaných nemocných (Zoccali et al. 2001) prokázalo vztah hladiny ADMA k celkové mortalitě a výskytu kardiovaskulárních příhod, a to jako druhý nejsilnější faktor hned po věku. Také u mužů středního věku po infarktu myokardu (Valkonen et al. 2001) s normálními renálními funkcemi ADMA predikoval výskyt kardiovaskulárních komplikací, pravděpodobně zde hraje

roli snížená aktivita DDAH. ADMA se pravděpodobně chová jako proaterogenní molekula (Böger et al. 1998), která stimulací sekrece monocytárního chemotaktického proteinu 1 zvyšuje tvorbu endoteliálního superoxidového radikálu a dále potencuje adhezi monocytů, což může částečně vysvětlit horší výsledky provedené koronární angioplastiky u pacientů se zvýšenou hodnotou ADMA před zákrokem. Aktivitu DDAH pravděpodobně ovlivňuje kromě hyperhomocysteinemie i výše cholesterolémie a glykémie. V experimentech bylo zjištěno, že ADMA v hodnotách 1-10  $\mu\text{mol/l}$  inhibuje vasodilataci závislou na endotelu a aktivitu NO syntézy (Thum et al. 2005).

## **2 Cíle disertační práce**

Základním cílem této práce bylo ověřit účelnost běžné farmakoterapie u nemocných s ischemickou chorobou tepen dolních končetin. Sledování bylo zaměřeno na následující 4 oblasti:

**1.** Posouzení dlouhodobého laboratorního a klinického efektu statinů u dvou skupin nemocných s ICHDK; u skupiny nemocných s poruchou lipidových parametrů, a u skupiny bez poruchy lipidového metabolismu.

**2.** Posouzení laboratorního a klinického účinku nejčastěji používaného farmaka v indikaci aterosklerotických uzávěrů periferních tepen - pentoxifyllinu, při i.v. aplikaci a dlouhodobé p.o. medikaci.

**3.** Třetí oblastí sledování byl výskyt mírné hyperhomocysteinemie u nemocných s ICHDK a její farmakologické ovlivnění suplementací kyselinou listovou. Kontrolní skupinou byli zdraví senioři a testována byla též závislost na příslušném genotypu MTHFR.

**4.** Čtvrtou oblastí výzkumu bylo stanovení hladiny asymetrického dimethylargininu a posouzení vztahu mezi ADMA a konvenčními rizikovými faktory u relativně zdravých osob a pacientů s manifestní aterosklerózou.

## **3 Metodika**

### **Laboratorní ukazatele**

Hladiny jednotlivých frakcí lipidů byly stanoveny v plasmě fotometricky pomocí analyzátoru HITACHI 917 s užitím chemikálií od firmy Roche. Nemocný před náběrem 12 hodin lačněl. Stanovovali jsme celkový cholesterol (norma  $< 5 \text{ mmol/l}$ ), LDL cholesterol (norma  $< 3 \text{ mmol/l}$ ), HDL cholesterol (norma  $> 1 \text{ mmol/l}$ ), TG (norma  $< 2 \text{ mmol/l}$ ).

Koagulační parametry fibrinogen, plasminogen a antitrombin III byly stanoveny pomocí komerčních kitů Chromogenix a kitu Instrumental Laboratory.

Pro stanovení markerů oxidativního stavu byla použita heparinizovaná krev. Malondialdehyd byl stanoven pomocí substancí reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS), superoxidodismutaza v erytrocytech, glutathionperoxidaza (GSHPx) v celé krvi a celková antioxidační kapacita pomocí kitů Randox (Crumuluin, N. Ireland, UK). Redukovaný glutathion byl měřen kity Oxis Intern (Bonnie, Marie, Francie). Všechny metody byly adaptovány pro analyzátor Hitachi 717.

Genetický polymorfismus methylenetetrahydrofolatreduktázy byl stanoven PCR metodou (DNA izolace používající Quiagen kity následovaná amplifikací, rozštěpením a elektroforetickou detekcí specifického DNA fragmentu). Všechny subjekty byly testovány na

přítomnost C/C (homozygot s oběma normálními alelami), C/T (heterozygot) anebo T/T (homozygot s oběma mutovanými alelami).

Homocystein a ADMA byly stanovovány metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Vzhledem k technickým potížím se stanovením ADMA metodou HPLC jsme posléze přešli na metodu ELISA. Zjistili jsme, že míra shody je vysoká, a že metoda ELISA je časově mnohem méně náročná (Šířková 2005). ADMA u porovnávaných skupin nemocných byl stanoven vždy shodnou metodikou.

#### **Funkční ukazatele**

Funkční výkonnost pacientů byla testována na pohyblivém chodníku ERGOCOMP EC 560 firmy PPG HELLIGE GmbH při rychlosti 2,5 km/h a stoupání 7,5%. Stanovali jsme klauzikační interval v metrech, tj. maximální vzdálenost, kterou nemocný ušel bez bolesti dolních končetin nutících nemocného zastavit.

Místní tlak na periferních arteriích dolních končetin byl měřen dopplerovským průtokovým detektorem „Dopplex“ firmy Huntleigh Diagnostics Ltd., kotníkový index kalkulován jako poměr hodnoty systolického tlaku na a. tibialis posterior ku hodnotě systolického tlaku na a. brachialis PHK. Vyšetření bylo prováděno vleže po 10 minutách klidu na zádech. Při vstupním vyšetření byl změřen kotníkový index na obou dolních končetinách. Při sledování efektu léčby jsme zvolili více postiženou dolní končetinu s nižším kotníkovým indexem.

#### **Statistika**

Vzhledem k tomu, že sledované veličiny neměly normální rozložení jsme používali neparametrické (pořadové) testy. Normalitu jsme testovali jednoduchým testem pro kontrolu šikmosti a špičatosti. Pro posouzení závislosti jednotlivých veličin byla použita pořadová korelace (Spearman). Souvislost genotypu MTHFR s ostatními veličinami byla testována Kruskal-Waliovým testem (neparametrická analogie ANOVY). Pro porovnání hodnot před a po léčbě byl použit Wilcoxonův párový test. Dvouvýběrový test jsme použili pro srovnání 2 nezávislých skupin.

Veškerá data jsou v práci uvedena v podobě median (kvartilový rozptyl).

## **4 Výsledky:**

### **1 Léčba statiny u pacientů s ICHDK**

#### **1.1 Pacienti s poruchou spektra krevních lipidů - ovlivnění laboratorních ukazatelů a funkční výkonnosti**

##### **Metodika**

Do prospektivního sledování byli zařazováni pacienti s ICHDK II.-III. funkčního stadia, kteří podstoupili angiografické vyšetření tepen DK a byli pro pokročilost aterosklerotických změn léčeni konzervativně. Nejméně 6 týdnů před zařazením do tohoto sledování byla nemocným vynechána veškerá hypolipidemická léčba. Všichni pacienti po zařazení do 24 měsíčního sledování byli léčeni simvastatinem v dávce 20 mg denně, v případě vzestupu hodnoty celkového cholesterolu nad 6 mmol/l byla tato dávka zvýšena na 40 mg. Při vzestupu hodnoty TG nad 3 mmol/l byla hypolipidemická terapie rozšířena o fenofibrát. Konkomitantní terapii jsme se snažili už během vymývací fáze neměnit, dávky byly upravovány pouze při neuspokojivé kompenzaci. V dlouhodobém sledování užívali pacienti vždy pentoxifyllin a antiagregační či antikoagulační léčbu. Studie byla koncipována jako „sám sobě kontrolou“, tj. jako srovnání s výchozí hodnotou před léčbou.

Do sledování po dobu 24 měsíců bylo zařazeno 50 pacientů, věku 64,3 (51,7-72,8), 44% nemocných aktuálně kouřilo, 20% nemocných byli diabetici 2.typu.

## Výsledky

Poruchu lipidového metabolismu při vstupu do sledování lze charakterizovat jako středně závažnou ve všech ukazatelích (tab. 1). Přítomny byly také další změny, byla zvýšená hladina homocysteinu (norma < 15  $\mu\text{mol/l}$ ), ukazatele oxidačního stavu lze hodnotit jako nakloněné prooxidačním směrem, především při srovnání s hodnotami z dalšího vývoje. Přes pečlivou titraci dávky simvastatinu bylo dosaženo normálních hodnot až za 24 měsíců. Hladina homocysteinu během sledování statisticky významně klesala bez specifické léčebné intervence. Glykémie se při kontrolních náběrech postupně zvyšovala, při poslední kontrole lehce přesahovala normu. Fibrinogen zaznamenal v průběhu měsíců pozvolný statisticky nevýznamný vzestup v limitu normálních hodnot.

**Tabulka č. 1: Pacienti s ICHDK s poruchou spektra krevních lipidů – změna laboratorních ukazatelů a funkční výkonnosti oproti vstupnímu vyšetření**

Počet pacientů	vstupní.vyš.		za 12 měsíců			za 24 měsíců		
	n=50		n=50			n=50		
Parametr	median	kvart. rozptyl	median	kvart. rozptyl	<i>p</i>	median	kvart. rozptyl	<i>p</i>
Celk.cholesterol (mmol/l)	6,91	5,71-7,12	5,44	5,08-6,29	***	4,94	4,32-5,16	***
LDL cholesterol (mmol/l)	4,88	4,65-5,16	3,42	3,19-3,71	***	2,96	2,55-3,29	***
HDL cholesterol (mmol/l)	0,95	0,84-1,32	1,22	1,12-1,57	***	1,33	1,10-1,64	***
TG (mmol/l)	2,71	2,52-3,16	2,17	1,67-2,42	***	1,78	1,39-2,08	***
Homocystein ( $\mu\text{mol/l}$ )	22,1	18,1-24,5	18,31	15,2-23,9	***	17,54	11,6-21,4	**
Fibrinogen (g/l)	3,66	3,29-4,01	4,01	3,77-4,22	**	3,85	3,32-4,08	n.s.
Glykémie (mmol/l)	4,76	4,1-4,99	5,79	5,52-6,08	***	5,60	5,38-6,05	***
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	3,09	2,61-3,59	2,98	2,74-3,46	n.s.	2,27	1,94-2,37	***
SOD (U/g Hb)	1203,6	1145-1289	1199,7	1148-1254	n.s.	1372,1	1312-1405	***
GSHPx (U/g Hb)	47,2	39,2-59,6	49,5	40,7-59,8	n.s.	46,8	38,2-58,4	n.s.
GSH (mmol/l Ery)	1,68	1,38-1,95	1,66	1,31-1,88	n.s.	1,68	1,35-2,01	n.s.
CAC (mmol/l)	1,31	1,23-1,42	1,34	1,31-1,56	n.s.	1,49	1,33-1,81	***
Klaud.interval (m)	161,8	86-204	169,8	78-219	n.s.	170,9	80-228	n.s.
Kotník.index	0,491	0,36-0,59	0,533	0,40-0,62	*	0,511	0,39-0,57	n.s.

MDA, malondialdehyd; SOD, superoxididismutáza; GSHPx, glutathionperoxidáza; GSH, glutathion v ery;

CAC, celková antioxidační kapacita

Wilcoxon.párový test: \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , n.s. nesignifikantní, srovnání se vstupním vyšetřením

U ukazatelů oxidačního stavu jsme hodnotili především jejich časovou dynamiku. Malondialdehyd jako možný ukazatel lipoperoxidace od 18. měsíce statisticky významně klesal. Superoxiddismutáza jako enzym zúčastněný při peroxidaci statisticky významně stoupala od 18. měsíce. Glutathion v erytrocytech se po celou dobu sledování neměnil, aktivita glutathionperoxidázy byla za 12.-18. měsíců snad o trochu vyšší. Nápadná je v tuto dobu shoda upravujících se poměrů skladby krevních lipidů a úpravy oxidačního stavu. Klaukikační interval se v průběhu jednotlivých měsíců prodlužoval. Za 3, 6 a 12 měsíců bylo prodloužení statisticky nevýznamné, v kritickém 18. měsíci byl zaznamenán statisticky významný rozdíl (při této kontrole se rovněž normalizovaly lipidové parametry a byly též významně nižší parametry oxidačního stavu). Později se již klaukikační interval neprodlužoval. Kotníkovy index se také zvyšoval, statisticky významný je rozdíl ve 12. měsíci.

## Diskuze

Prospektivní sledování 50 pacientů s ICHDK se vstupní smíšenou hyperlipidémií léčených simvastatinem nezaznamenalo trend k dalšímu zhoršování funkčního stavu, ale naopak trend k prodloužení klaukikační vzdálenosti s dosažením statistické významnosti za 18 měsíců. Lipidové parametry byly sledovány jednak z důvodů monitorování účinku statinů, ale také jako korelát ke stanovovaným markerům oxidačního stavu. Jejich ovlivnění jsme hypoteticky předpokládali jako nezávislý účinek prováděné léčby. Oxidační stav za 18 a 24 měsíců lze hodnotit jako nejnižší ve srovnání s předcházejícími intervaly a je zajímavé, že v tuto dobu se navozuje normalizace lipidových parametrů a zároveň se statisticky významně také prodloužil klaukikační interval. Interpretace parametrů oxidačního stresu je nejednoznačná, stále nevíme, zda normalizace lipidových parametrů snižuje oxidační zátěž cévního endotelu či zda elevace oxidačních markerů může sama o sobě vést k endoteliální dysfunkci. Léčba statiny byla též provázena snižováním homocysteinu, jak jsme zaznamenali po 12 měsících léčby. Příčinná souvislost není z dosavadních poznatků vysvětlitelná. Hladina fibrinogenu v průběhu měsíců postupně stoupala, např. ve 12. měsíci dosáhla významnosti rozdílu ( $p < 0.01$ ).

Obdobné výsledky přineslo i několik zahraničních studií. Podávání 40 mg simvastatinu (Aronow et al. 2003) u nemocných s ICHDK starších 60 let a vstupní hodnotou  $LDL \geq 3,2$  mmol/l vedlo po 1 roce u 31 nemocných léčených statinem k prodloužení vstupního klaukikačního intervalu o 95 sekund ( $p < 0,001$ ). U 29 nemocných léčených placebem došlo ke zkrácení vstupního klaukikačního intervalu o 10 sekund (n.s.). Srovnání 12 měsíčního efektu 10 mg a 80 mg atorvastatinu s placebem u 601 nemocných s ICHDK (Emile et al. 2003) se vstupní hodnotou LDL nižší než 4,14 mmol/l vedlo k signifikantnímu prodloužení klaukikačního intervalu v léčené skupině o 78 sekund. Ve skupině léčené placebem byl významně vyšší výskyt vaskulárních komplikací oproti léčeným skupinám. V podskupině pacientů s ICHDK léčených ve studii 4S (Pedersen et al. 1998) vedla terapie simvastatinem ke 40% snížení rizika zhoršení klaukikací.



## 1.2 Pacienti bez poruchy spektra krevních lipidů - ovlivnění laboratorních ukazatelů a funkční výkonnosti

### Metodika

Zařazování do prospektivního sledování byli opět pacienti s uzavěrovou chorobou tepen DK II.-III. funkčního stadia, kteří podstoupili arteriografické vyšetření tepen DK a byli pro pokročilost aterosklerotických změn léčeni konzervativně a byl předpoklad jejich spolupráce. Podmínkou zařazení byly normální vstupní hodnoty lipidogramu, tj. celkový cholesterol < 5 mmol/l, LDL < 3 mmol/l, HDL > 1 mmol/l a TG < 2 mmol/l. Toto sledování bylo koncipováno jako srovnání pacientů s ICHDK randomizovaně zařazených do skupiny léčené simvastatinem 20 mg denně a skupiny s doporučením dietního režimu (bez hypolipidemické léčby) po dobu 24 měsíců. Všichni nemocní užívali pentoxifyllin a antiagregační či antikoagulační léčbu. Konkomitanti terapii jsme se snažili neměnit, dávky byly upravovány pouze při neuspokojivé kompenzaci.

Do skupiny léčené simvastainem bylo zařazeno 20 nemocných, věku 61,5 (52,3-71,7), 40 % z nich aktuálně kouřilo. Ve skupině na pouhém dietním režimu bylo 22 pacientů, věku 64,9 (53,9-72,4), 55% z nich aktuálně kouřilo.

### Výsledky

Vstupní průměrné hodnoty spektra krevních lipidů byly v limitu normálních hodnot v obou skupinách (tab. 2).

**Tabulka č. 2: Pacienti s ICHDK bez poruchy spektra krevních lipidů - laboratorní ukazatele a funkční výkonnost oproti vstupnímu vyšetření**

Počet pacientů		vstupní vyš.		za 12 měsíců		p	za 24 měsíců		p
		dieta (n=22)	statin (n=20)	dieta (n=22)	statin (n=20)		dieta (n=22)	statin (n=20)	
Parametr		median	kvart. rozptyl	median	kvart. rozptyl		median	kvart. rozptyl	
Celkový cholesterol	dieta	4,70	4,40-4,90	5,55	5,15-5,89	***	6,28	5,89-6,85	***
	statin	4,80	4,28-5,09	4,57	4,12-4,71	*	4,29	3,68-4,83	*
LDL cholesterol	dieta	2,95	2,59-3,12	3,69	3,28-4,01	***	4,32	4,11-4,79	***
	statin	3,19	2,62-3,32	2,74	2,36-3,01	**	2,46	1,81-2,92	**
HDL cholesterol	dieta	1,14	0,99-1,26	1,09	1,04-1,15	n.s.	1,03	0,95-1,09	*
	statin	1,11	1,02-1,20	1,22	1,13-1,28	**	1,30	1,24-1,39	***
Triglyceridy (mmol/l)	dieta	1,72	1,62-2,11	2,27	1,88-2,65	***	2,69	2,28-2,98	***
	statin	1,54	1,28-1,69	1,40	1,29-1,58	n.s.	1,51	1,22-1,75	n.s.
Klaudikační interval (m)	dieta	172,5	78-215	152,5	95-205	n.s.	143,5	94-193	*
	statin	119,0	69-162	153,0	72-189	**	156,0	85-257	***
Kotníkový index	dieta	0,395	0,26-0,62	0,365	0,25-0,55	**	0,330	0,26-0,55	**
	statin	0,360	0,25-0,51	0,380	0,32-0,58	**	0,405	0,30-0,62	***

Celkový, LDL a HDL cholesterol (mmol/l)

Wilcoxon.párový test: \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05, n.s. neznámá, srovnání se vstupním vyšetřením

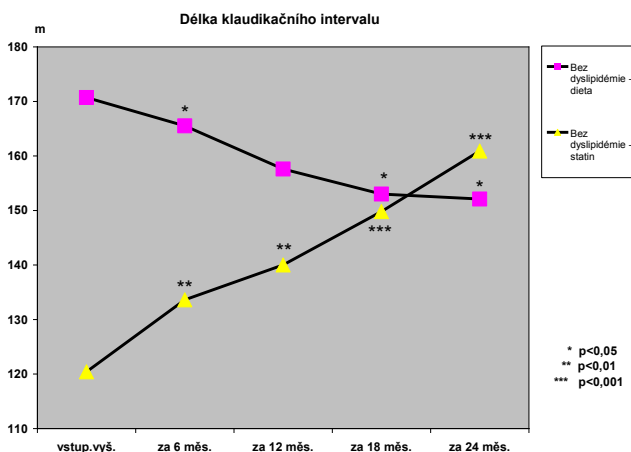
Ve skupině s dietním režimem se parametry lipidového metabolismu již od 6 měsíců statisticky významně zhoršovaly, tento trend zhoršování byl zachován i při následujících kontrolách, HDL cholesterol mírně klesal.

Ve skupině léčené simvastatinem došlo v průběhu měsíců k dalšímu statisticky významnému poklesu LDL cholesterolu a vzestupu HDL cholesterolu, ačkoliv se vše dělo v rozmezí normálních hodnot. Jen triglyceridy byly vyšší za 6 a 24 měsíců.

Parametr délky klaudikačního intervalu se měnil v obou skupinách s opačným trendem (graf 1). Ve skupině s dietním režimem došlo v 6. měsíci k statisticky významnému zkrácení, trend dalšího zkracování se prohluboval za 18 a 24 měsíců. Také kotníkový index se snížil již za 6 měsíců, trend kopíroval vývoj klaudikačního intervalu.

Ve skupině léčené statiny bylo zaznamenáno prodlužování klaudikačního intervalu, a to již v 6. měsíci. Tento trend se s uspokojivou statistickou významností uplatňoval i v dalších měsících. Kotníkový index se zvyšoval se statisticky významnými rozdíly proti výchozí hodnotě ve všech intervalech sledování.

**Graf 1:**



## Diskuze

Při nižších počtech pacientů jsme sice nedocílili úplného vyvážení všech vstupních parametrů pacientů, přesto je trend vývoje délky klaudikačního intervalu zřetelně opačný, zkracuje se ve skupině léčené dietou a prodlužuje se ve skupině léčené statiny. Tento závažný fakt není potlačován skutečností, že vstupní klaudikační interval měl větší rozptyl. Lipidové ukazatele zřetelně klesaly ve skupině léčené statiny na hodnoty nižší než byla vstupní hodnota, pokles se ovšem odehrával v normálním limitu. Ve skupině s dietním režimem došlo již od 6. měsíce k signifikantnímu vzestupu celkového a LDL cholesterolu, vzestupu triglyceridů, HDL cholesterol klesal pouze nesignifikantně.

Zahraniční práce věnující se této problematice zařazovaly nemocné s hodnotami LDL nižší než 3 mmol/l současně s pacienty s hodnotami LDL nad 3 mmol/l do sledovaných souborů, nemocní s ICHDK a s LDL < 3 mmol/l nebyli samostatně sledováni.

Současný pohled na nelipidové účinky statinů je mírně skeptický. Snížení kardiovaskulární a celkové mortality je připisován hypolipidemickému efektu statinů. Pokud byli nemocní léčeni LDL-aferezou, pak dramatický pokles LDL byl také provázen zlepšením endoteliální dysfunkce a poklesem ultrasenzitivního CRP. CRP klesá i při léčbě fibráty a ezetimibem.

Příznivý dopad užívání statinů dříve přičítaný nelipidovým účinkům je spíše dán tím, že snižování lipidů je prospěšné také v rozmezí hodnot, které jsme dříve pokládali za normální. Studie HPS se simvastatinem nám přinesla jednoznačný důkaz o snížení kardiovaskulárních příhod u nemocných s vysokým KV rizikem, jejichž lipidový profil byl normální či lehce nad normu. V této studii byli sledováni i nemocní s manifestní ICHDK.

Všichni nemocní s manifestní ICHDK by měli užívat statin, pokud hodnota celkového cholesterolu je  $\geq 3,5$  mmol/l.

## 2 Léčba pentoxifyllinem u pacientů s ICHDK

### Farmakodynamické a terapeutické účinky pentoxifyllinu

#### 2.1 Intravenózní podání jednotlivé dávky

##### Metodika

Ve studii byli sledováni nemocní s ICHDK II. a III. stadia hospitalizovaní na lůžkové části Oddělení klinické farmakologie FN Plzeň, kteří podstoupili arteriografické vyšetření tepen DK. Nemocným byla 14 dnů před přijetím vynechána vasodilatační léčba pentoxifyllinem či naftidrofurylem. Náběry byly provedeny před a po podání 200 mg pentoxifyllinu ve 250 ml fyziologického roztoku po dobu 2 hodin. Během aplikace nemocní byli v klidu na lůžku.

##### Výsledky

Po intravenózním podání došlo ke snížení průměrné hodnoty fibrinogenu ( $p < 0,05$ ), zvýšila se aktivita superoxididismutázy a glutathionperoxidázy ( $p < 0,05$ ), což lze interpretovat jako projev možného snížení oxidačního stavu (tab. 3).

**Tabulka č. 3: Laboratorní parametry před a po podání jednotlivé dávky 200mg pentoxifyllinu v i.v. infuzi po dobu 2 hod**

Počet pacientů	před podáním n=30		po podání n=30		P
	median	kvartilový rozptyl	median	kvartilový rozptyl	
Fibrinogen (g/l)	3,72	3,69 - 4,17	3,45	3,21 - 3,86	<0,05
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	3,31	2,96 - 3,51	3,29	2,98 - 3,55	n.s.
SOD (U/g Hb)	1151,9	1112 - 1184	1186,7	1132 - 1308	<0,05
GSHPx (U/g Hb)	41,5	41,2 - 41,8	44,0	43,8 - 44,5	<0,05
GSH (mmol/l Ery)	1,66	1,51 - 1,75	1,67	1,58 - 1,81	n.s.
CAC (mmol/l)	1,30	1,21 - 1,52	1,32	1,26 - 1,59	n.s.

MDA, malondialdehyd; SOD, superoxididismutáza; GSHPx, glutathionperoxidáza; GSH, glutathion v ery; CAC, celková antioxidační kapacita

Wilcoxon.párový test, n.s. nesignifikantní, srovnání s hodnotami před podáním

## 2.2 Orální podání jednotlivé dávky

### Metodika

Ve studii byli sledováni nemocní s ICHDK II. a III. stadia dispenzarizovaní v cévní poradně při Oddělení klinické farmakologie FN Plzeň. Nemocní užívali dlouhodobě vasodilatační léčbu pentoxifyllynem (minimálně 6 měsíců). Pentoxifyllyl byl podán v retardované tabletě (Agapurin retard) v dávce 400 mg 50 pacientům. Stanovení bylo provedeno před a 2 hodiny po podání tablety. Během těchto 2 hodin nemocní seděli v klidu v čekárně.

### Výsledky

Po perorálním podání se snížila průměrná hodnota fibrinogenu ( $p < 0.05$ ) a zvýšila se aktivita superoxidodismutázy ( $p < 0.05$ ) a celková antioxidační aktivita (tab. 4). Výsledky jsou obdobné jako při intravenózním podávání pentoxifyllynu po 14 denní vymývací periodě. Pentoxifyllyl si pravděpodobně zachovává účinnost i při dlouhodobém p.o. podávání.

**Tabulka č. 4: Účinek jednotlivé dávky pentoxifyllynu 400 mg orálně podaného v jedné retardované tabletě**

Počet pacientů	před podáním		po podání		P
	median	kvartilový rozptyl	median	kvartilový rozptyl	
Fibrinogen (g/l)	3,93	3,76 - 4,57	3,75	3,51 - 4,36	<0,05
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	3,21	2,94 - 3,62	3,23	2,91 - 3,75	n.s.
SOD (U/g Hb)	1249,3	1192 - 1286	1270,2	1211 - 1306	<0,05
GSHPx (U/g Hb)	47,5	47,3 - 47,9	48,2	47,9 - 48,7	n.s.
GSH (mmol/l Ery)	1,66	1,41 - 1,95	1,67	1,38 - 1,91	n.s.
CAC (mmol/l)	1,31	1,11 - 1,72	1,42	1,24 - 1,89	<0,05

MDA, malondialdehyd; SOD, superoxidodismutáza; GSHPx, glutathionperoxidáza; GSH, glutathion v ery; CAC, celková antioxidační kapacita

Wilcoxon.párový test, n.s. ne-signifikantní, srovnání se vstupním vyšetřením

## 2.3 Klaudivkační interval před 8 denní infúzní léčbou a po ní

### Metodika

Ve studii byli sledováni nemocní s ICHDK II. a III. stadia přijímaní na lůžkovou část Oddělení klinické farmakologie FN Plzeň pro zhoršení klaudivkačních bolestí. Nemocní před přijetím užívali dlouhodobě vasodilatační léčbu pentoxifyllynem (minimálně 6 měsíců). Infúzní terapie pentoxifyllynem v dávce 200 mg ve 250 ml fyziologického roztoku byla podávána 2x denně po dobu 8 dní. Pokud byl nemocný hospitalizován po dobu delší než 8 dní, byl i u těchto nemocných vyhodnocen stav 8. dne hospitalizace. Během podávání infúze nemocní leželi v klidu na lůžku. Během hospitalizace byl prováděn intenzivní intervalový trénink.

### Výsledky

Infúzní terapie pentoxifyllynem po dobu 8 dní vedla ve skupině 50 pacientů ke statisticky významnému prodloužení klaudivkačního intervalu ( $p < 0.01$ ) a vzestupu kotníkového indexu ( $p < 0.001$ ) (tab. 5).

**Tabulka č. 5: Parametry funkční výkonnosti před a po 8 denní vasodilatační infúzní terapii**

Počet pacientů	před léčbou n=50		po léčbě n=50		p
	median	kvartilový rozptyl	median	kvartilový rozptyl	
Parametr	median	kvartilový rozptyl	median	kvartilový rozptyl	p
Klaudikační interval (m)	163,7	94 - 219	179,5	112 – 239	<0,05
Kotníkový index	0,491	0,38 - 0,57	0,54	0,43 - 0,62	n.s.
STK na PHK (mmHg)	138,0	131 - 156	137,0	132- 154	<0,05

Wilcoxon.párový test, n.s. nesignifikantní, srovnání s hodnotami před infúzemi

## Diskuze

Positivní efekt pentoxifyllinu na snížení hladiny fibrinogenu byl pozorován při perorálním i infúzním podávání pentoxifyllinu. Získaná data připouští, že se dostavuje i určitý antioxidační účinek. Osmi-denní infúzní léčba vedla k statisticky významnému prodloužení klaudikačního intervalu a nárůstu kotníkového indexu. Pravděpodobně se zde uplatnil i efekt infúzí na zvýšení intravaskulárního objemu a vliv intenzivní rehabilitace. Zda se jednalo o skutečný efekt pentoxifyllinu, by bylo možno ověřit pouze ve studii kontrolované placebem, kdy kontrolní skupina by dostávala infúze s čistým fyziologickým roztokem. Ze získaných dat považujeme hospitalizaci nemocných se zhoršením klaudikačního intervalu za účelnou vzhledem ke zmírnění klaudikačních bolestí při komplexní léčbě včetně intenzivní rehabilitace. Výsledky připouští, že protekční účinek pentoxifyllinu nastává širším mechanismem, než jsou jen dosud popisované reologické a vasodilatační účinky.

Sledování účinku pentoxifyllinu nepatří mezi zájmy farmaceutických společností. V roce 1982 byla provedena první randomizovaná studie s pentoxifyllem (Porter et al. 1982) u 128 nemocných s ICHDK, která vedla po 6 měsících k nesignifikantnímu 12% prodloužení klaudikačního intervalu oproti placebu. Obdobná studie (Lingarde et al. 1989) u 150 pacientů s ICHDK vedla také po 6 měsících k nesignifikantnímu prodloužení klaudikačního intervalu oproti placebu o 21%. Studie (Dawson et al. 2000) u 689 nemocných s ICHDK nenalezla po 6 měsících rozdíl v klaudikační vzdálenosti u nemocných léčených placebem a pentoxifyllem.

V současné době patří pentoxifyllin stále k bazální terapii ICHDK, bohužel nebyly provedeny žádné prospektivní dlouhodobé placebem kontrolované klinické studie, které by posoudily efektivnost této léčby. Metaanalýza (Hood S.C et al.1996) celkem 11 studií sledující nemocné s ICHDK zjistila průměrné prodloužení klaudikačního intervalu o 29 metrů u 308 pacientů léčených pentoxifyllem oproti 304 nemocným na placebu. Signifikantní nález byl pouze při selekci nemocných s ICHDK II. stadia a se vstupním klaudikačním intervalem 50 - 200 metrů.

## 3 Léčba foláty u pacientů s ICHDK

### 3.1 Výskyt hyperhomocysteinemie u pacientů s ICHDK

**Metodika** V souboru 150 pacientů s ICHDK I-III. stadia náhodně vybraných z ambulanti klientely Oddělení klinické farmakologie byl sledován výskyt hyperhomocysteinemie a její možný vztah k hodnotám lipidogramu a fibrinogenu.

## Výsledky

Pacienti byli rozděleni na skupinu s nadnormální hodnotou homocysteinu ( $> 15 \mu\text{mol/l}$ ) a normální hodnotou homocysteinu ( $< 15 \mu\text{mol/l}$ ). V obou skupinách byly nalezeny nadnormální hodnoty celkového a LDL cholesterolu, triglyceridů a fibrinogenu, avšak bez vazby na zvýšenou či normální hladinu homocysteinu (tab. 6).

**Tabulka č. 6: Výskyt hyperhomocysteinemie u nemocných s ICHDK**

Počet pacientů	Hyperhomocysteinemie		Normohomocysteinemie		<i>p</i>
	n=96	n=54	n=96	n=54	
Parametr	median	kvartilový rozptyl	median	kvartilový rozptyl	
Homocystein ( $\mu\text{mol/l}$ )	31,22	23,7 - 33,6	13,12	10,1 - 14,7	$<0,001$
Celkový cholesterol (mmol/l)	5,95	5,38 - 7,12	5,85	5,11 - 6,99	n.s.
LDL cholesterol (mmol/l)	4,17	3,38 - 4,92	3,75	3,40 - 4,81	$<0,05$
Triglyceridy (mmol/l)	2,26	1,88 - 2,62	2,57	1,99 - 2,76	$<0,05$
Fibrinogen (g/l)	4,47	4,18 - 4,75	4,43	4,07 - 4,82	n.s.

Wilcoxon.dvouvýběrový test, n.s. nesignifikantní

## 3.2. Methioninový zátěžový test.

### Metodika

V sestavě 50 pacientů s ICHDK I-III. stadia sledovaných v cévní poradně při Oddělení klinické farmakologie byl sledován účinek jednotlivé dávky L-methioninu v dávce 50mg / kg během zátěžového methioninového testu. Nemocní byli požádáni o spolupráci při pravidelné ambulanci kontrole, byl jim pečlivě vysvětlen význam a bezpečnost testu, nemocní vyjádřili ústní souhlas s tímto testem. Při výběru nemocných jsme neznali vstupní hodnotu homocysteinu. Náběry krve jsme provedli za 3, 6 a 12 hodin po podání L-methioninu.

## Výsledky

**Tabulka č. 7: Účinek podání jednotlivé dávky L- methioninu orálně (50mg / kg) během zátěžového metabolického testu**

Počet pacientů	před podáním		za 6 h po podání		<i>p</i>
	n=50	n=50	n=50	n=50	
Parametr	median	kvartilový rozptyl	median	kvartilový rozptyl	
Homocystein ( $\mu\text{mol/l}$ )	21,2	13,5 - 30,2	53,6	29,5 - 71,3	$<0,001$
Fibrinogen (g/l)	3,62	3,28 - 4,02	3,64	3,22 - 3,99	n.s.
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	3,14	2,62 - 3,41	3,55	2,89 - 3,72	$<0,01$
SOD (U/g Hb)	1206,1	1143 - 1281	1198,1	1135 - 1276	n.s.
GSHPx (U/g Hb)	46,9	38,5 - 59,1	47,2	39,1 - 58,6	n.s.
GSH (mmol/l Ery)	1,70	1,47 - 1,92	1,66	1,39 - 1,85	n.s.
CAC (mmol/l)	1,31	1,25 - 1,38	1,30	1,27 - 1,38	n.s.

MDA, malondialdehyd; SOD, superoxidismutáza; GSHPx, glutathionperoxidáza; GSH, glutathion v ery; CAC, celková antioxidantní kapacita

Wilcoxon.párový test, n.s. nesignifikantní, srovnání s hodnotami před podáním

Vzestup homocysteinu vrcholil za 6 hodin, proto jsme v tuto dobu současně vyhodnotili i další laboratorní parametry (tab. 7). Za 6 hodin po podání L-methioninu dosáhl homocystein zhruba 2,5 násobku vstupní hodnoty, ve stejnou dobu došlo k vzestupu MDA ( $p < 0.01$ ), také ostatní ukazatele jevíly nesignifikantní posun prooxidačním směrem.

### 3.3 Porovnání účinku léčby kyselinou listovou u pacientů s ICHDK a u zdravých seniorů, plazmatická hladina homocysteinu, parametry koagulačního a oxidačního stavu, význam genotypu methyilentetrahydrofolátreduktázy

**Metodika** Do studie byli zařazeni pacienti s hyperhomocysteinemií (plazmatické hladiny  $> 20 \mu\text{mol/l}$ ), 33 z nich mělo uzávěrovou chorobu tepen DK ověřenou arteriografií DK, věku 63,5 (54,8 - 71,1), 55% z nich aktuálně kouřilo.

Ze souboru zdravých seniorů bylo vybráno 26 osob věku 68,2 (61,1-74,6), 19% z nich aktuálně kouřilo.

Uspořádání studie bylo identické v obou sledovaných skupinách. Všechny osoby byly po vstupní placebové fázi léčeny kyselinou listovou v dávce 5 nebo 10 mg denně po dobu 3 měsíců, dávka byla použita náhodně.

#### Výsledky

#### Pacienti s uzávěrovou chorobou tepen DK (tab. 8)

**Tabulka č. 8: Změny ukazatelů po 3 měsíční léčbě kyselinou listovou u pacientů s ICHDK**

Počet pacientů	před léčbou		po léčbě		p
	n=33		n=33		
Parametr	median	kvart. rozptyl	median	kvart. rozptyl	
Homocystein ( $\mu\text{mol/l}$ )	26,70	23,6-33,5	20,0	17,8-26,5	<0,0001
Kyselina listová ( $\mu\text{g/l}$ Ery)	210,0	174-255	549,0	485-635	<0,0001
Fibrinogen (g/l)	4,10	3,50-4,50	3,50	3,30-3,80	<0,0001
Plasminogen (%)	94,0	88-102	105,0	90-114	<0,0001
Antithrombin III (%)	88,0	74-101	93,0	81-105	<0,05
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	3,10	2,60-3,60	2,60	2,40-2,80	<0,0001
SOD (U/g Hb)	1118,0	1058-1173	1196,0	1142-1286	<0,001
GSH (mmol/l Ery)	1,59	1,37-1,92	1,86	1,63-2,17	<0,0001
GSHPx (U/g Hb)	39,2	35,4-51,4	44,1	38,6-59,0	<0,005
CAC (mmol/l)	1,30	1,23-1,42	1,31	1,22-1,35	<0,05
Celkový cholesterol mmol/l)	6,03	5,37-7,08	5,95	5,24-6,75	n.s.
HDL cholesterol (mmol/l)	1,28	1,06-1,43	1,27	0,99-1,39	<0,05
LDL cholesterol (mmol/l)	3,99	3,34-4,98	3,68	3,40-4,63	n.s.
Triglyceridy (mmol/l)	1,61	1,24-2,74	1,94	1,38-2,84	n.s.
Glykémie (mmol/l)	5,70	5,30-6,50	5,70	5,30-6,90	n.s.
Systolický TK (mmHg)	142,0	120-156	140,0	132-154	n.s.
Diastolický TK (mmHg)	86,0	80-90	91,0	84-95	<0,05

MDA, malondialdehyd; SOD, superoxididismutáza; GSH, glutathion v erytrocytech; GSHPx, glutathionperoxidáza; CAC, antioxidační kapacita, Wilcoxon.párový test, n.s. nesignifikantní, Wilcoxon.párový test, n.s. nesignifikantní, srovnání s hodnotami před léčbou

Vstupní hodnota homocysteinu v plazmě statisticky významně klesla po 3 měsíční léčbě kyselinou listovou klesla ( $p < 0.0001$ ). Obdobný trend zaznamenal i fibrinogen, naopak hodnota plasminogenu a antitrombinu III se zvýšila.

Malondialdehyd považovaný surčitou rezervou za ukazatel lipoperoxidace poklesl, superoxidodismutáza vykazovala vyšší aktivitu (pravděpodobně nebyla spotřebováána), glutathion a korespondující enzym glutathionperoxidáza rostla (pravděpodobně nebyly také spotřebovávány při možném poklesu produkce peroxidu vodíku). Hladina celkové antioxidační kapacity se snížila v souvislosti s poklesem oxidativní zátěže. Parametry lipidového a glycidového metabolismu se nezměnily.

### Zdraví seniorů

Vstupní hodnoty homocysteinu byly u zdravých seniorů nižší než u nemocných s manifestovanou aterosklerózou. Po 3 měsíční léčbě došlo také ke statisticky významnému snížení hodnoty Hcy ( $p < 0.0001$ ) (tab. 9).

Koagulační stav se upravoval ve smyslu snížení hladiny fibrinogenu a zvýšení aktivity plasminogenu, antitrombin III se nezměnil.

Indikátory oxidativního stavu nebyly modifikovány tak zřetelně jako v předcházející skupině.

**Tabulka č. 9: Změny ukazatelů po 3 měsíční léčbě kys.listovou u zdravých seniorů**

Počet vyšetřených Parametr	před léčbou n=26			po léčbě n=26		p
	median	kvart.	rozptyl	median	kvart. rozptyl	
Homocystein ( $\mu\text{mol/l}$ )	24,35	20,5-27,4		18,6	15,8-20,0	<0,0001
Kyselina listová ( $\mu\text{g/l}$ Ery)	209,5	153-257		783	706-814	<0,0001
Fibrinogen (g/l)	3,05	2,85-3,19		2,57	2,39-2,93	<0,0001
Plasminogen (%)	91,5	86-97		103,0	101-112	<0,0001
Antithrombin III (%)	90,0	82-100		93,0	86-102	n.s
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	3,30	2,5-4,0		3,20	2,5-3,8	n.s
SOD (U/g Hb)	1182,0	1139-1265		1316,1	1219-1364	<0,001
GSH (mmol/l Ery)	1,49	1,22-1,87		1,81	1,72-2,15	<0,001
GSHPx (U/g Hb)	48,8	38,6-58,8		58,6	52,4-73,3	<0,001
CAC (mmol/l)	1,28	1,21-1,33		1,29	1,27-1,34	n.s.
Celkový cholesterol (mmol/l)	6,29	5,71-6,58		6,28	5,89-6,96	n.s.
HDL cholesterol (mmol/l)	1,66	1,29-1,90		1,63	1,29-1,88	n.s.
LDL cholesterol (mmol/l)	4,12	3,66-4,49		4,06	3,59-4,60	n.s.
Triglyceridy (mmol/l)	1,28	0,98-1,63		1,25	0,96-2,04	n.s.
Glykémie (mmol/l)	5,45	5,30-5,70		5,20	5,0-5,80	n.s.
Systolický TK (mmHg)	140,0	129-156		134,0	124-148	n.s.
Diastolický TK (mmHg)	83,0	77-92		83,0	78-92	n.s.

MDA, malondialdehyd; SOD, superoxidodismutáza; GSH, glutathion v erythrocytech; GSHPx, glutathionperoxidáza; CAC, antioxidační kapacita

Wilcoxon.párový test, n.s. nesignifikantní, srovnání s hodnotami před léčbou

Velikost dávky kyseliny listové se v účinku neprojevila, parametry se měnily ve stejném smyslu po vyšší i nižší dávce.



### **Změny sledovaných parametrů hodnocené dle MTHFR genotypu**

Ve sledovaných souborech byla u 5 osob nalezena T/T mutace MTHFR. Tyto osoby měly nejvyšší vstupní hodnotu homocysteinu bez statistické signifikace vzhledem k malému počtu oproti porovnávaným skupinám.

Při statistickém vyhodnocení sledovaných ukazatelů byla zjištěna jen u vstupní hodnoty fibrinogenu statisticky významná asociace s genotypem, nejvyšší hodnotu měl genotyp T/T .

### **Diskuze**

Ateroskleróza tepen dolních končetin byla provázena zvýšenými hladinami homocysteinu. Při sledování byl pokles hladiny homocysteinu docílený podáváním kyseliny listové zřetelně provázen snižováním prokoagulačního a prooxidačního potenciálu. Superoxididismutáza a glutathionperoxidáza se zvýšily po léčbě kyselinou listovou. Možné snížení oxidační zátěže organismu při poklesu homocysteinu se projevilo snížením hodnoty malondialdehydu a zachováním antioxidační kapacity.

Fibrinogen klesal a naopak antikoagulačně účinkující faktory plasminogen a antitrombin III stoupaly. Výsledky korespondují s výsledky (Undas A. et al. 1999), které ukázaly pokles trombin-antitrombinového komplexu po vitamínu B6, B12 a kyselině listové.

Nalezli jsme asociaci hladiny fibrinogenu na genetickém polymorfizmu MTHFR. Tento nálezní potvrzuje domněnku o vyšším riziku žilní tromboembolie u nemocných s mutací MTHFR. Léčebná odpověď na substituci foláty nebyla závislá na přítomném genotypu.

V současné době převládá mírná skepse k významu homocysteinu a především ke vztahu hyperhomocysteinemie ke kardiovaskulární morbiditě a mortalitě. Byly opakovaně prokázány vyšší hodnoty homocysteinu u pacientů s aterosklerotickým postižením, ale nebylo zřejmé, zda provádět populační screening a poté i léčbu. Teprve studie Norvit sledující 4000 nemocných, kteří užívali vitaminy B a kyselinu listovou, dala jasnou odpověď (Bona et al. 2006). Tato suplementace nevedla ke snížení výskytu kardiovaskulárních onemocnění, ve skupině léčené vyšší dávkou kyseliny listové byl prokázán vyšší výskyt nádorů. Samostatnou skupinou zůstávají nemocní s těžkou familiární hyperhomocysteinemií na podkladě defektu cystathionin- $\beta$  syntázy (Yap et al. 2001). U těchto nemocných existují důkazy, že snižování Hcy vede ke snížení extrémně vysokého KV rizika.

## **4 Asymetrický dimethylarginin**

### **4.1 ADMA a konvenční rizikové faktory v populačním vzorku MONICA**

#### **Metodika**

ADMA jsme stanovili u 250 relativně zdravých osob sledovaných ve studii MONICA. Studie MONICA sleduje kardiovaskulární rizikové faktory u náhodně vybraných skupin probandů z obecné populace ve věku 25-65 let v devíti okresech ČR. Stanovení ADMA jsme provedli u 250 nemocných vyšetřených na podzim 2000 ze zamražených vzorků séra.

## Výsledky

Ve vyšetřovaném vzorku populace byla nalezena zvýšená hodnota lipidů, pouze však 9% osob užívalo hypolipidemickou léčbu (tab. 10). Průměrná hodnota homocysteinu byla v normě, obdobně i ADMA se nacházela v mezích normy. Hodnoty ADMA jsme korelovali s konvenčními rizikovými faktory aterosklerózy, posoudili jsme vztah mezi hladinou ADMA a kategorizovanými rizikovými faktory. ADMA se jevil jako nezávislý parametr na konvenčních rizikových faktorech aterosklerózy. Hladina ADMA pouze významně rostla s věkem.

**Tabulka č. 10: Základní charakteristiky a koncentrace ADMA náhodného populačního vzorku ze studie MONICA ( n=250)**

Parametr	
Pohlaví (% žen)	51,9
Věk (roky)	48,9 (39,4-56,0)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25,9 (23,5-28,7)
Aktuální kouření (%)	32,0
STK (mmHg)	124,0 (114,7-135,3)
DTK (mmHg)	80,0 (75,0-86,4)
Antihypertenzní léčba (%)	19,2
Celkový cholesterol (mmol/l)	5,78 (5,09-6,41)
Triglyceridy (mmol/l)	1,41 (1,01-2,01)
HDL cholesterol (mmol/l)	1,42 (1,22-1,67)
LDL cholesterol (mmol/l)	3,61 (2,96-4,28)
Hypolipidemická léčba (%)	9,2
Glykémie (mmol/l)	5,40 (5,10-5,80)
Antidiabetická léčba (%)	4,4
Homocystein (μmol/l)	10,15 (8,78-11,91)
ADMA (μmol/l) *	0,49 (0,42-0,57)

data uvedena v podobě...median ( kvartýlova rozptylka)

\* stanovena pouze u 99 osob a metodou HPLC

## 4.2 ADMA u nemocných s předčasnou ICHS a u kontrolní skupiny ve věku 45-55 let

### Metodika

Vyšetřili jsme 80 nemocných s předčasnou manifestací koronární aterosklerózy ve věku 45-55 let a kontrolní skupinu 80 jedinců stejného věku bez ischemické choroby srdeční a bez diabetes mellitus 2. typu. U těchto nemocných jsme stanovovali základní rizikové faktory aterosklerózy a současně jsme vyšetřovali i hladinu ADMA.

### Výsledky

U nemocných s ICHS byly obdobně jako u zdravých jedinců zjištěny uspokojivé hodnoty krevního tlaku, 90% nemocných s ICHS užívalo antihypertenzní léčbu (tab. 11). Lipidové parametry u nemocných s ICHS byly nadnormální, pozitivní je, že 70% z nich bylo léčeno

hypolipidemikem. Stále však 20% nemocných s ICHS kouřilo. U kardiaků byla nalezena statisticky vyšší hodnota homocysteinu stále ještě v mezích normy. Hladina ADMA se u těchto skupin nelišila.

**Tabulka č. 11: Základní charakteristiky, koncentrace ADMA a srovnání pacientů s předčasnou manifestací ICHS a kontrolní skupiny bez manifestní vaskulární choroby**

Počet vyšetřených	pacienti s předčasnou ICHS n=80	osoby bez vaskulární choroby n=80	p
Parametr			
Pohlaví (% žen)	12,5	50,0	<0,003
Věk (roky)	50,5 (48,0-52,8)	52,5 (48,9-54,7)	<0,0001
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	28,7 (26,0-31,0)	27,0 (24,0-29,0)	0,68
Aktuální kouření (%)	20,0	16,3	<0,01
STK (mmHg)	125,5 (117,0-139,5)	129,5 (119,0-141,0)	0,28
DTK (mmHg)	83,0 (77,0-89,0)	89,5 (80,0-93,0)	<0,0003
Antihypertenzní léčba (%)	90,0	17,5	<0,0001
Celkový cholesterol (mmol/l)	5,65 (5,17-6,24)	5,0 (5,0-6,0)	<0,03
Triglyceridy (mmol/l)	1,57 (1,24-2,86)	1,0 (1,0-2,0)	<0,02
HDL cholesterol (mmol/l)	1,16 (0,99-1,42)	1,5 (1,0-2,0)	<0,03
LDL cholesterol (mmol/l)	3,98 (3,51-4,56)	3,64 (3,09-4,16)	<0,002
Hypolipidemická léčba (%)	70,0	12,5	<0,0001
Glykémie (mmol/l)	6,0 (5,6-6,55)	5,0 (5,0-6,0)	0,08
Antidiabetická léčba (%)	3,8	0	-
Homocystein (μmol/l)	11,94 (9,96-13,78)	10,0 (9,0-12,0)	<0,002
ADMA (μmol/l)	0,77 (0,71-0,85)	0,78 (0,73-0,83)	0,49*

data uvedena v podobě.... median (kvartýlova rozpytka)

\*adjustováno na věk

Wilcoxon.dvouvýběrový test

## Diskuze

ADMA se jeví jako parametr nezávislý na konvenčních rizikových faktorech aterosklerózy, hodnota ADMA u zdravých osob stoupala pouze s věkem. Neprokázali jsme staticky signifikantně vyšší hodnotu ADMA u nemocných s definitivní aterosklerózou oproti kontrolní skupině stejného věku. Neprokázali jsme asociaci zvýšené hodnoty ADMA s hyperhomocysteinemií, přestože Hcy blokuje enzym odbourávající ADMA. Možná je role ADMA u zdravých lidí malá, ale uplatňuje se u osob s pokročilým aterosklerotickým postižením a u osob s renální insuficiencí, kde je porušeno odbourávání ADMA.

V současné době není stále zřejmý význam ADMA na ovlivnění funkce endotelu. Stále se nabízí možnost podávání L-argininu jako přirozeného zdroje NO.

## 5 Závěry pro praxi

1. Léčba statiny se u nemocných s pokročilou aterosklerózou manifestovanou ischemickou chorobou tepen dolních končetin projevila jako ochranná minimálně ve smyslu zdržení vývoje u pacientů s poruchou lipidického metabolismu. Zaznamenána byla úprava prooxidačního stavu, která sledovala dynamiku úpravy porušeného spektra krevních lipidů.

U pacientů bez poruchy lipidového metabolismu léčených statiny bylo prokázáno zlepšení výkonnosti ve smyslu prodloužení délky klaudikačního intervalu a nárůstu kotníkového indexu, kdežto u srovnatelné skupiny s doporučenými dietními opatřeními docházelo k dalšímu zhoršování výkonnosti. Zajímavý je pokles hladiny homocysteinu při léčbě statiny. Bylo prokázáno, že dlouhodobé podávání statinů je bezpečné.

2. Aterosklerotické onemocnění DK bylo spojeno s vyšší hladinou homocysteinu. Pokles docílený kyselinou listovou byl provázen úpravou prokoagulačního a prooxidačního stavu jak u pacientů s ICHDK, tak u zdravých seniorů s hyperhomocysteinemií. Domnívám se ale, že homocystein bychom měli považovat za marker aterosklerózy, nikoliv za rizikový faktor. Tuto hypotézu podporují závěry studie NORVIT.

3. Široce prováděná léčba pentoxifylinem u pacientů s aterosklerózou nemá sice stále důkaz typu evidence based medicine, ale získané dílčí výsledky ve smyslu snižování hladiny fibrinogenu, potlačování oxidačního stavu, i prodloužení klaudikačního intervalu odpovídají pozitivním terapeutickým zkušenostem.

4. ADMA se jeví jako parametr nezávislý na konvenčních rizikových faktorech aterosklerózy, hodnota ADMA u zdravých osob stoupala pouze s věkem. Neprokázali jsme staticky signifikantně vyšší hodnotu ADMA u mladších nemocných s koronární aterosklerózou oproti kontrolní skupině stejného věku. ADMA je stále intenzivně studován, může hrát významnou roli především u starších osob s významným aterosklerotickým postižením a s renálním postižením. Význam stanovení ADMA pro klinickou praxi nebyl stanoven.

## 6 Summary

### 1 **Statin therapy in patients with peripheral artery obstructive disease (PAOD)**

#### 1.1 **Patients with lipid metabolism disorders**

Simvastatin therapy with the dose titration adjusted to the effect led to the prolongation of claudication interval and to the elevation of ankle-brachial pressure index, which was statistically significant at the interval of 18 months after starting the therapy. At the same time we observed normalization of lipid levels and the lowest levels of oxidative stress markers.

Statin use was also associated with lowering homocysteine level.

#### 1.2 **Patients without lipid metabolism disorders – the influence on laboratory parameters and functional capacity**

In patients without lipid metabolism disorder, treated with simvastatin 20 mg daily, we noted an improvement, i.e. prolongation of claudication interval and elevation of ankle-brachial pressure index, while in the control group treated only with a diet we observed further deterioration of capacity. In the control group, the parameters of lipid metabolism were statistically significantly worse after six months and this trend remained even in further control visits with HDL cholesterol slightly lowering. In the simvastatin group, a statistically significant decrease of LDL occurred during several months as well as elevation of HDL cholesterol within normal range.

## **2 Pentoxifyllin therapy in patients with PAOD**

### **Farmacodynamic and therapeutic effects of pentoxifyllin.**

#### **2.1 Oral and intravenous application of an individual dose.**

After an oral application the mean fibrinogen level decreased ( $p < 0.05$ ) and the activity of superoxidismutase ( $p < 0.05$ ) as well as total antioxidant capacity increased. Similar results were obtained subsequently to intravenous pentoxifyllin therapy after 14 days of wash-out period. Pentoxifyllin probably keeps its efficacy even in the case of long term oral use.

#### **2.2 Claudication interval before and after infusion therapy (lasting 8 days)**

8 days of infusion therapy with pentoxifyllin together with intensive physical training in patients admitted for worsened symptoms of PAOD led to statistically significant prolongation of claudication interval ( $p < 0.01$ ) and to the increase of ankle-brachial pressure index ( $p < 0.001$ ).

## **3 Folate therapy in patients with PAOD**

### **3.1 The prevalence of hyperhomocysteinaemia in patients with PAOD.**

We found no association of lipid metabolism parameters and fibrinogen with homocysteine level. 64% of patients with PAOD had mild hyperhomocysteinaemia.

### **3.2 Methionine loading test.**

6 hours after L- methionine ingestion the level of homocysteine raised approximately 2.5 fold, at the same time we observed a significant elevation of malondialdehyde ( $p < 0.01$ ) as well as a nonsignificant shift of other markers towards prooxidant state.

### **3.3 Comparison of the effect of folic acid in PAOD patients and in a group of healthy seniors**

Atherosclerotic disease of leg vessels was associated with higher homocysteine level. The level was lowered by folic acid use with simultaneous modification of procoagulant and prooxidant state in patients with PAOD as well as in healthy seniors with hyperhomocysteinaemia.

The dose of folic acid did not play a significant role in the effect; the modification of the parameters was comparable after higher and lower dose. In the followed groups, we found T/T mutation in MTHFR gene in 5 patients. These persons had the highest initial level of homocysteine. The initial level of fibrinogen showed statistically significant association with a genotype, with the highest value in T/T genotype.

## **4 Asymetric dimethylarginine (ADMA)**

### **4.1 ADMA and conventional risk factors in a population sample MONICA**

In the studied population we found higher lipid levels, the mean level of homocysteine was in normal range as well as ADMA. ADMA seems to be a parameter independent of conventional atherosclerotic risk factors. The level of ADMA increased significantly only with age.

### **4.2 ADMA in patients with premature coronary artery disease (CAD) and in a control group aged 45-55 years**

In patients with CAD we found satisfactory values of blood pressure as well as in healthy persons, 90% of the CAD patients used antihypertensive therapy. Lipid parameters in CAD patients were above normal, 70% patients used hypolipidemic therapy. However, 20% of CAD patients did not quit smoking. In CAD patients we found statistically higher level of homocysteine, still in the normal range. The level of ADMA did not differ between these groups.

## 7 Literatura

- Aboyans V, Criqui MH, Denenberg JO**, et al. Risk factors for progression of peripheral arterial disease in large and small vessels. *Circulation* 2006; 113:2623
- Adams MR, Kinlay S, Blake GJ**, et al. Atherogenic lipids and endothelial dysfunction: mechanism in the genesis of ischemic syndromes. *Ann Preview of Medicine* 2000; 51:149-67
- Aronow WS, Batak D, Woodworth S, Ahn C**. Effect of simvastatin versus placebo on treadmill exercise time until onset of intermittent claudication in older patients with peripheral arterial disease at six months and a one year after treatment. *Am J Cardiol* 2003; 92:711
- Aronow WS, Ahn C**. Frequency of new coronary events in older persons with peripheral arterial disease and serum low-density lipoprotein cholesterol  $\geq 125$  mg/dl treated with statins versus no lipid-lowering drug. *Am J Cardiol* 2002; 90:789-791
- Bonaa KH, Njolstad I, Ueland PM**, et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 354:1578
- Böger RH, Bode-Boger S.M., Szuba A**, et al. Asymmetric dimethylarginine: a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98:1842
- Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS**, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995; 274:1049-57
- Carson NA, Neil DW**. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child*. 1962; 32:505-13
- Clagett GP, Sobel M, Jackson MR**, et al. Antithrombotic therapy in peripheral arterial occlusive disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic Therapy. *Chest* 2004; 126:609
- Coffman JD**. Drug therapy: Vasodilator drugs in peripheral vascular disease. *N Engl J Med* 1979; 300:713
- Constans J, Blann AD**, et al. Endothelial dysfunction during acute methionine load in hyperhomocysteinaemic patients. *Atherosclerosis* 1999; 147 (2): 411-3
- Dawson DL, Cutler BS, Hiatt WR**, et al. A comparison of cilostazol and pentoxifylline for treating intermittent claudication. *Am J Med* 2000; 109:523-30
- De Vigneaud VE**. Trail of research in sulphur chemistry and metabolism and related fields. Cornell University Press, Ithaca (NY) 1952
- Dormandy JA, Rutherford RB**. Management of peripheral arterial disease. TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg* 2000; 31:S1
- Filipovský J, Mayer O Jr., Cifková R, Tichá M, Roučka P**. The relationship of large artery properties with homocysteine levels in healthy subjects. *J Hypertension* 2004; 22: S198.
- Girolami B, Bernardi E, Prins MH**, et al. Treatment of intermittent claudication with physical training, smoking cessation, pentoxifylline, or nafronyl: A meta-analysis. *Arch Intern Med* 1999; 159:337
- Graham IM, Daly EL, Refsum HM**, et al. Plasma homocysteine as risk factor for vascular disease. *JAMA* 1997; 277:1775-81
- Heart Protection Study Collaborative Group**. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360:7-22
- Hiatt WR**. Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. *N Engl J Med* 2001; 344:1608

**Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, et al.** ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease. *Circulation* 2006; 113:463

**Hirsch AT, Criqui MH, Jacobson D, et al.** Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* 2001; 286:1317

**Homocystein Lowering Trialist Group (HLTG):** Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomized trials *BMJ* 1998; 316: 894-8

**Hood S.C, Moher D., Barber G.G.** Management of intermittent claudication with pentoxifylline: meta-analysis of randomized controlled trials. *CMAJ* 1996; 155:1053

**Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, et al.** Novel mechanism for endothelial dysfunction: Dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99:3092

**Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalyszyn J, Strokosch G.** Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methyltetrahydrofolatreductase. *Am J Hum Genet* 1988; 43:414-21

**Kang SS, Wong PWK, Sukmano A, et al.** Thermolabile methyltetrahydrofolatreductase: an inherited risk factor for coronary artery diestase. *Am J Hum Genet* 1991; 48:536-45

**Kannani PM, Sinkey CA, Browning RL et al.** Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocysteinemia in humans. *Circulation* 1999; 100:1161-8

**Leng, GC, Fowkes FG, Lee, AJ, et al.** Use of ankle brachial pressure index to predict cardiovascular events and death: a cohort study. *BMJ* 1996; 313:1440

**Lindgarde F, Jernes R, Bjorkman H, et al.** Conservative drug treatment in patients with moderately severe chronic occlusive peripheral arterial disease. *Circulation* 1989; 80:1549-56

**Loscalzo J.** The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 1996; 98:5-7

**McGee SR, Boyko EJ.** Physical examination and chronic lower extremity ischemia.: A critical review. *Arch Intern Med* 1998; 158:1357

**Mayer O.jr., Šimon J., Rosolová H., Hromádka M, et al.:** The effects of folate supplementation on some coagulation parameters and oxidative status surrogates. *Eur J Clin Pharmacol* 2002; 58:1-5

**Mohler ER, Hiatt WR, Creager MA.** Cholesterol reduction with atorvastatin improves walking distance in patients with peripheral arterial disease. *Circulation* 2003; 108:1481-6

**Mondillo S, Ballo P, Barbati R, et al.** Effects of simvastatin on walking performance and symptoms of intermittent claudication in hypercholesterolemic patients with peripheral vascular disease. *Am J Med* 2003; 114:359

**Pedersen TR, Kjekshus J, Pyorala K, et al.** Effect of simvastatin on ischemic signs and symptoms in the Scandinavian Simvastatin Study (4S). *Am J Cardiol* 1998; 81:333-6

**Porter JM, Cutler BS, Lee BY, et al.** Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients. *Am Heart J* 1982; 104:66-72

**Robinson K, Mayer E, Jacobsen DW.** Homocystein and coronary artery disease. *Cleveland Clin J Med* 1994; 61:438-48

**Rosolová H, Šimon J, Šefrna F:** Impact of cardiovascular risk factors on morbidity and mortality in Czech middle-aged men – Pilsen Longitudinal Study. *Cardiology* 1994; 85:61-8

**Rosolová H, Mayer O.jr., Šimon J.:** Unexpected inverse relationship of insulin resistance and serum homocysteine in healthy subjects. *Physiol Res* 2002; 51:93-8

**Ruef J, Peter K, et al.** Oxidative stress and atherosclerosis: its relationship to growth factors, thrombus formation and therapeutic approaches. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 1:32-7

**Scandinavian Simvastatin Survival Study Group.** Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344:1383-89.

**Schnabel R, Blankenberg D, Lubos E,** et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005; 97:53

**Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O,** et al. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; 91:308-18

**Stewart KJ, Hiatt WR, Regensteiner JG, Hirsch AT.** Exercise training for claudication. *N Engl J Med* 2002; 347:1941

**Široká R, Trefil L, Rajdl D, Racek J, Eiselt J, Filipovský J.** Asymmetric dimethylarginine – comparison of HPLC and ELISA methods. *Clin Chemistry Lab Medicine* 2005; 43: A32.

**Thum T, Tsikas D, Stein S,** et al. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:1693

**Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M,** et al. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:6369-6373

**Undas A, Domagala TB, Jankowski M, Szczeplik A.** Treatment of hyperhomocysteinemia with folic acid and vitamins B12 a. B6 attenuates thrombin generation. *Thromb Res* 1999; 95: 281-8

**Valkonen V.P, Paiva H, Salonen J.T,** et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358:2127

**Vollset SE, Refsum H, Tverdal A,** et al. Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality : the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 2001; 74: 130-6

**Yap S, Boers G, Wilcken B,** et al. Vascular outcome in patients with homocysteinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency treated chronically: a multicenter observational study. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2001; 21:2080-85.

**Zoccali C, Bode-Boger SM, Mallamaci F,** et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001; 358:2113-7



## 8 Seznam publikací a přednášek autora

1. **Hromádka M**, Filipovský J. Asymetrický dimethylarginin-nový rizikový faktor endoteliální dysfunkce ? Cor et Vasa 2004; 46: 556-7
2. **Hromádka M**, Filipovský J. Pacient po infarktu myokardu. Medicína po promoci 2005; 6:67-9.
3. **Hromádka M**, Filipovský J. Terapeutické přístupy k pacientovi se stabilní anginou pectoris. Medicína po promoci 2006; 7: 46-9
4. Mayer O, **Hromádka M**. Statiny v léčbě nemocných s uzávěrovou chorobou tepen dolních končetin. Vnitřní lékařství 2001; 47: 664-9
5. Mayer O, Filipovsky J, **Hromadka M**, et al. Treatment of hyperhomocysteinemia with folic acid: Effects on homocysteine levels, coagulation status, and oxidative stress markers. Journal of Cardiovascular Pharmacology 2002; 39:851-7
6. Mayer O Jr, Simon J, Roslova H, **Hromadka M**, Subrt I, Votrubova I. The effects of folate supplementation on some coagulation parametrs and oxidative status surrogates. European Journal of Clinical Pharmacology 2002; 58:1-5

## Odborné akce

1. **Hromádka M**, Polívková H, Stehlík P, Poklopová Z, Mayer O. Homocystein – význam stanovení u pacientů s aterosklerózou, teorie, praxe a vlastní zkušenost Tradiční angiologické dny, 3/1999, Praha, přednáška
2. **Hromádka M**, Mayer O, Šimon J. Vliv doplnění folátů a polymorfismu metylenetetrahydrofolát reduktázy na markery oxidativního stresu u nemocných s mírnou hyperhomocysteinemií Tradiční angiologické dny, 4/2000, Praha, přednáška
3. **Hromádka M**, Mayer O, Šimon J. Vliv terapie foláty a MTHFR polymorfismu na oxidační markery u nemocných s mírnou hyperhomocysteinemií VIII. sjezd České kardiologické společnosti 5/2000, Brno, poster
4. **Hromádka M**, Mayer O, Šimon J, et al. The influence of folate supplementation and MTHFR polymorphism on oxidative stress markers in patients with mild hyperhomocysteinemia XIIth International Symposium on Atherosclerosis, Stockholm, Sweden 6/2000, poster
5. **Hromádka M**, Mayer O, Polívková H. Vliv terapie statiny na klinický a laboratorní nálezy u pacientů s ICHDK IIa-IIc bez poruchy lipidového metabolismu. XVII. konference České společnosti pro hypertenzi, 8/2000, Znojmo, poster
6. **Hromádka M**, Mayer O, Polívková H. Vliv terapie foláty a MTHFR polymorfismu na oxidační markery u osob s mírnou hyperhomocysteinemií IV. konference České společnosti pro aterosklerózu 12/2000, Špindlerův Mlýn, poster
7. **Hromádka M**, Polívková H, Mayer O. Vliv terapie simvastatinem na funkční a laboratorní parametry u pacientů s uzávěrovou chorobou tepen DK VI. Konference České společnosti pro aterosklerózu, 10/2002, Plzeň, poster
8. **Hromádka M**, Polívková H, Mayer O. Vliv terapie simvastatinem na funkční a laboratorní parametry u pacientů s uzávěrovou chorobou tepen DK Postgraduální lékařské dny Plzeň, 2003, přednáška

9. **Hromádka M**, Šířoká R, Filipovský J: Asymetrický dimetylarginin – nový rizikový faktor aterosklerózy?  
XXII. konference České společnosti pro hypertenzi, 10/2005, Český Krumlov, poster
10. Polívková H, **Hromádka M**, Stehlík P, Mayer O. Hyperhomocysteinemie – význam stanovení u nemocných s pokročilou arteriosklerózou.  
XV. konference o arteriální hypertenzi, 10/1998, Rožnov pod Radhoštěm, poster
11. Mayer O, **Hromádka M**. Folate treatment and decrease of pro-coagulation and oxidative status in patients with mild hyperhomocysteinemia and definitive atherosclerosis.  
9th International congress on Cardiovascular Pharmacotherapy Salvador, Bahia, Brasil, 3/2000, poster
12. Mayer O jr., Šimon J, **Hromádka M**, Rosolová H. The influence of MTHFR polymorphisms on folate supplementation efficacy in patient with mild hyperhomocysteinemia.  
Meeting of the Working Group on Epidemiology and Prevention of the European Society of Cardiology, Gdansk, Poland 5/2000, poster.
13. Mayer O, **Hromádka M**, Polívková H. Endoteliální dysfunkce u pokročilé aterosklerózy, některé ukazatele z vlastního pozorování  
XVII. Konference České společnosti pro hypertenzi, 8/2000, Znojmo-poster
14. Polívková H, **Hromádka M**, Tintěra J, Mayer O. Použití MRI vyšetření při sledování volumových změn LKS u pacientů s CHSS vlivem antagonisty endotelinu  
XVIII. konference České společnosti pro hypertenzi, 9/2001, Český Krumlov, poster
15. Filipovský J, **Hromádka M**. Antagonisté vasopresinu – nová perspektiva v léčbě srdečního selhání a hyponatremických stavů.  
X. sjezd pracovní skupiny Kardiovaskulární rehabilitace České kardiologické společnosti, 1/2007, Konstantinovy Lázně.