

**Wydział Lekarski  
Collegium Medicum  
Uniwersytetu Jagiellońskiego**

**LDL-AFEREZA A PROFIL LIPIDOWY  
I FUNKCJA ŚRÓDBŁONKA U PACJENTÓW  
Z CHOROBAŁ NIEDOKRWIENNAŁ SERCA**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

Bibl. Medyczna CM UJ



1816002568

**lek. med. Stanisław Bartuś**

**Promotor: Prof. dr hab. med. Aldona Dembińska-Kieć**

Pracę wykonano  
w Zakładzie Biochemii Klinicznej,

we współpracy z:  
Kliniką Choroby Wieńcowej,  
Kliniką Chirurgii Serca i Naczyń  
II Kliniką Kardiologii,  
Kliniką Nefrologii  
Collegium Medicum  
Uniwersytetu Jagiellońskiego

**Kraków 2000**

*Wielce Szanownej Pani Prof. dr hab. med. Aldonie Dembińskiej-Kieć, Kierownikowi Zakładu Biochemii Klinicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, serdecznie dziękuję za ogromny wkład w realizację pracy, za cenne uwagi i wskazówki oraz za życzliwość w trakcie tworzenia pracy.*

*Dziękuję także Pani Prof. dr hab. med. Wiesławie Piwowarskiej, Panu Prof. dr hab. med. Antoniemu Działkowiakowi, Panu Prof. dr hab. med. Jackowi S Dubielowi, Panu Prof. dr hab. med. Włodzimierzowi Sułowiczowi i Panu doc. dr hab. Krzysztofowi Żmudce za umożliwienie badań i osobisty wkład w ich realizację.*

*Wyrazy wdzięczności składam także Koleżankom i Kolegom z Zakładu Biochemii Klinicznej z Kliniki Choroby Wieńcowej, Kliniki Chirurgii Serca i Naczyń, II Kliniki Kardiologii, Zakładu Hemodynamiki i Angiokardiografii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, za życzliwość i pomoc w realizacji niniejszej pracy.*

<b>1. WSTĘP .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Wprowadzenie .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Lipidy a rozwój miażdżycy.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Rola śródbłónka naczyń w prewencji rozwoju miażdżycy.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3.1 Utrzymanie napięcia ściany naczynia .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.2 Utrzymanie równowagi procesów krzepnięcia - fibrynoliza.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.4 Znaczenie śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.5 Markery upośledzonej funkcji śródbłónka. ....</b>	<b>23</b>
<b>1.4 Znaczenie LDL-aferezy jako terapii objawowej.....</b>	<b>24</b>
<b>2. CEL BADAŃ.....</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIAŁY I METODY.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Opis grup pacjentów zakwalifikowanych do badań .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Przebieg badań.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3 LDL-afereza - opis metody.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5 Badania biochemiczne.....</b>	<b>37</b>
<b>3.5.1 Poziom lipoprotein.....</b>	<b>37</b>
<b>3.5.2 Oznaczanie poziomu lipoproteiny a [Lp(a)]......</b>	<b>37</b>
<b>3.5.3 Badanie podatności frakcji LDL na oksydację (ex vivo) .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5.3.1 Izolacja lipoprotein LDL metodą ultrawirowania .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5.3.2 Badanie podatności lipoprotein LDL na oksydację .....</b>	<b>38</b>
<b>3.5.4 Ocena fenotypu LDL.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.5 Oznaczanie stężenia fibrynogenu .....</b>	<b>40</b>
<b>3.5.6 Oznaczanie poziomu metabolitów tlenku azotu (NOx) w osoczu krwi pacjentów.....</b>	<b>41</b>
<b>3.5.7 Oznaczanie stężenia vWF w krwi pacjentów .....</b>	<b>41</b>

3.5.8 Oznaczanie stężenia VEGF <sub>165</sub> w krwi pacjentów .....	42
3.5.9 Oznaczanie stężenia β-TG w krwi pacjentów.....	42
3.6 Analiza statystyczna .....	43
3.7 Zgoda Komisji Etycznej .....	43
4. WYNIKI .....	44
4.1 Zmiany w stanie klinicznym pacjentów .....	44
4.2 Przebieg terapii LDL-aferezą .....	47
4.3 Tolerancja próby wysiłkowej w badanych grupach .....	48
4.3 Wyniki badań biochemicznych.....	49
4.3.1 Badanie poziomu lipoprotein .....	49
4.3.2 Zmiany poziomu Lp(a) pod wpływem terapii.....	52
4.3.3 Badanie podatności lipoprotein na modyfikację oksydacyjną .	53
4.3.4 Zmiany fenotypu LDL pod wpływem LDL-aferezy .....	55
4.3.5 Zmiany stężenia fibrynogenu pod wpływem LDL-aferezy.....	56
4.3.6 Zmiany poziomu metabolitów tlenku azotu (NOx) .....	57
4.3.7 Zmiany poziomu czynnika vWF .....	58
4.3.8 Zmiany poziomu czynnika VEGF.....	59
4.3.9 Zmiany poziomu czynnika β-TG .....	60
5. DYSKUSJA .....	62
6. WNIOSKI .....	77
7. STRESZCZENIE.....	78
8. PIŚMIENNICTWO.....	79

# 1. WSTĘP

## 1.1 Wprowadzenie

Dzięki dowodom, których dostarczyły badania prowadzone we Framingham [1] zwiększone stężenia lipoprotein o małej gęstości (LDL), ich zmodyfikowanych form oraz podwyższenie poziomu triglicerydów (TG) w krwi są uważane za istotne czynniki sprzyjające rozwojowi choroby niedokrwiennej serca [1, 2, 3, 4]. W szeregu dalszych badań epidemiologicznych potwierdzono związek pomiędzy podniesionym stężeniem cholesterolu LDL w krwi a rozwojem miażdżycy i ilością incydentów wieńcowych [5,6,18,19,20]. Wykazano ponadto związek pomiędzy zastosowaniem leków obniżających poziom lipidów, a zmniejszeniem śmiertelności zarówno w prewencji pierwotnej jak i wtórnej choroby niedokrwiennej serca [5,6,29].

Terapeutyczne obniżanie stężenia cholesterolu w krwi jest możliwe poprzez zmniejszenie jego podaży w diecie, zmniejszenie syntezy w wątrobie, na drodze zwiększania jego usuwania z organizmu z żółcią przez przewód pokarmowy oraz metodami filtracji w krążeniu pozaustrojowym [7].

LDL-afereza jest metodą pozaustrojowego usuwania nadmiaru cholesterolu z krwi na drodze selektywnej filtracji bogatych w cholesterol i triglicerydy cząstek lipoprotein z krwi [8]. Znajduje ona zastosowanie w leczeniu opornych na farmakoterapię hipercholesterolemii, a więc u osób ze szczególnie nasilonymi zaburzeniami gospodarki lipidowej, u których już w młodym wieku dochodzi do rozwoju miażdżycy np. w postaci choroby niedokrwiennej serca. Pacjenci z chorobą niedokrwinną serca pomimo

skutecznego leczenia metodami inwazyjnej rewaskularyzacji (np. pomostowanie aortalno-wieńcowe - CABG czy przezskórna śródnaczyniowa angioplastyka wieńcowa - PTCA) są wciąż narażeni na incydenty niedokrwienne związane z dalszym postępowaniem miażdżycy, mimo stosowania diety i farmakoterapii. Dla tych osób jedną z najskuteczniejszych i najmniej inwazyjnych metod terapii odpornej hipercholesterolemii jest LDL-afereza [8, 9, 10, 11].

Toksyczność lipoprotein dla śródbłonna stanowi bowiem podstawę patomechanizmu rozwoju miażdżycy tętnic wieńcowych, obwodowych czy mózgowych [20, 12, 13, 14, 15].

Substancje biologicznie czynne uwalniane przez śródbłonek naczyń tętniczych pełnią bardzo ważną rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy procesami krzepnięcia i fibrynolizy, adhezji i agregacji płytek krwi i aktywacji komórek odpowiedzi zapalnej oraz napięcia i przebudowy ściany naczyń [20,36]. Utrzymanie prawidłowego przebiegu tych procesów jest możliwe jedynie w przypadku zachowania prawidłowej aktywności komórek śródbłonna. Szereg czynników fizykochemicznych może w znacznym stopniu zaburzać jego fizjologię. Należą do nich np. zwiększone siły ścinania, wolne rodniki tlenowe, zmodyfikowane formy cząsteczek lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), homocysteina [13, 16, 17, 33, 36].

Na podstawie wyników badań ostatnich lat udowodniono, że odczyn zapalny stanowiący odpowiedź ustroju na zmodyfikowane formy lipoprotein oraz wynikające z niego procesy zaburzające fizjologię śródbłonna leżą u podstaw rozwoju miażdżycy naczyń [33,35,36]. Dlatego chorzy ze szczególnie wysokim stężeniem frakcji LDL czy lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) są tym bardziej narażeni na rozwój miażdżycy. Obniżenie stężenia

lipidów u chorych z tej grupy powoduje spadek zapadalności na chorobę niedokrwinną serca (ChNS) oraz zmniejszenie liczby incydentów wieńcowych [45,67,29]. Wydaje się, że u podstaw tego zjawiska leży poprawa funkcji komórek śródbłonna naczyń [26, 29, 67, 77, 89].

## 1.2 Lipidy a rozwój miażdżycy.

Pod koniec lat czterdziestych obecnego stulecia pojawiły się pierwsze prace w których starano się wykazać związek pomiędzy stężeniem cholesterolu całkowitego w krwi, a występowaniem ChNS. Jednak dopiero rozpoczęte w 1948 roku badania w miejscowości Framingham wykazały epidemiologiczny związek pomiędzy zapadalnością na ChNS, a stężeniem cholesterolu w krwi [1]. Badania te początkowo objęły 740, a następnie 5.000 osób i trwają do dnia dzisiejszego [1]. Późniejsze badania MRFIT (*Multiple Risk Factor Intervention Trial*) wykazały, iż ilość incydentów wieńcowych jest proporcjonalna do stężenia cholesterolu całkowitego w osoczu krwi, a graniczną wartością powyżej której zaczyna gwałtownie narastać zapadalność na ChNS, jest 5,2 mmol/l (200 mg/dl) [18]. Badania *Seven Countries Study* wykazały, że związek pomiędzy poziomem cholesterolu całkowitego, a chorobą wieńcową nie jest związany z narodowością, ale z ilością spożywanych tłuszczów [19]. W badaniach tych stwierdzono ponadto, że w krajach, gdzie spożycie cholesterolu jest duże jak np. w Stanach Zjednoczonych, czy Finlandii, zapadalność na ChNS jest wysoka, natomiast w Japonii oraz krajach basenu morza Śródziemnego, gdzie spożycie cholesterolu jest małe i odsetek osób z ChNS jest niewielki. Z kolei z wyników badań MRFIT oraz PROCAM (*The Prospective Cardiovascular*

*Muenster Heart Study*) wynika, że wzrost stężenia cholesterolu w krwi z 5,2 mmol/l do 6,5 mmol/l zwiększa ryzyko zachorowania na ChNS dwukrotnie, a wzrost do 7,4 mmol/l aż czterokrotnie [20].

W szeregu dalszych badań wykazano korzystny wpływ obniżenia stężenia cholesterolu na śmiertelność wynikającą z miażdżycy. Wśród licznych opublikowanych wyników należy wymienić przede wszystkim badania z zastosowaniem leków z grupy statyn – w prewencji pierwotnej np. *West of Scotland Coronary Prevention Study* (WOSCOPS) [2] oraz w prewencji wtórnej – badania 4S (*Scandinavian Simvastatin Survival Study*) i inne jak *Care (Cholesterol and Recurrent Events)*, *Lipid (Long-term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease)* [3]. Badania WOSCOPS z zastosowaniem prawastatyny przeprowadzono na 6595 osobach w wieku 45-65 lat, bez zawału, z których połowa otrzymywała prawastatynę, a połowa placebo. W tych badaniach wykazano 22% redukcję całkowitej śmiertelności i 31% redukcję epizodów sercowych w grupie osób leczonych prawastatyną w porównaniu do grupy placebo [3].

W badaniach 4S uczestniczyło 4444 pacjentów po zawale serca (były to więc badania dotyczące prewencji wtórnej choroby niedokrwiennej serca), którzy otrzymywali simvastatynę w dawce 20 mg/dobę. Wyniki tych badań wykazały obniżenie śmiertelności całkowitej o 30%, śmiertelności z przyczyn wieńcowych o 42% i zmniejszenie ilości epizodów wieńcowych o 34% [3].

Wyżej wymienione badania dowiodły korzystnego efektu terapeutycznego stosowania statyn, przy czym działanie to przypisuje się głównie obniżeniu stężenia cholesterolu w krwi. Obecnie prowadzone są badania nad możliwymi innymi mechanizmami działania statyn w tym w szczególności nad ich aktywnością antyproliferacyjną w stosunku do



komórek mięśni gładkich ściany naczyń oraz nad własnościami antytrombogenicznymi [21, 22, 23, 24, 25].

Dalszych istotnych wyników dotyczących wpływu podniesionego poziomu cholesterolu na biologię śródbłonna dotyczyły obserwacje z lat 90. Wykazano, że u osób z hipercholesterolemią upośledzona jest zależna od śródbłonna funkcja rozkurczowa naczyń [26] zarówno po podaniu acetylocholin jak i w mechanizmie indukcji rozkurczu naczyń w zjawisku reaktywnej hyperemii [27]. Dodatkowo okazało się, że obniżenie stężenia cholesterolu (np. przy użyciu statyn) doprowadza do zwiększenia przepływu w naczyniach po podaniu acetylocholin w porównaniu z okresem przed terapią, kiedy poziom cholesterolu był podniesiony [28, 29].

### **1.3 Rola śródbłonna naczyń w prewencji rozwoju miażdżycy**

Jak wspomniano poprzednio, szereg badań wskazuje, iż u podłoża rozwoju miażdżycy leży uszkodzenie śródbłonna naczyń krwionośnych głównie na skutek oddziaływania wolnych rodników oraz odczynu zapalnego na zmodyfikowane formy lipoprotein, na przykład oksydowane LDL (ox-LDL) czy też lipoproteinę (a) (Lp(a)) [16, 30, 36, 112, 113]. Jest to jeden z zasadniczych mechanizmów powstawania miażdżycy wykazany u chorych z oporną na farmakoterapię hipercholesterolemią [3, 16,20,77]. Upośledzenie funkcji śródbłonna objawia się między innymi zaburzoną proporcją pomiędzy wydzielaniem endogennych czynników regulujących napięcie ściany naczyń (np. tlenku azotu (NO), prostacykliny (PGI<sub>2</sub>), endoteliny (ET-1) oraz czynników regulujących układ krzepnięcia i fibrynolizy (np. NO, PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, tkankowy aktywator plazminogenu -tPA, PAI-1) [31,54,78,84], co prowadzi m.in. do zwiększenia stopnia gotowości prozakrzepowej i

proskurczowej naczyń [32]. Ponadto obecność zmodyfikowanych form lipoprotein prowadzi do zwiększenia ekspresji molekuł adhezyjnych na powierzchni śródbłonka (np. selektyny P, VCAM-1 *vascular cell adhesion molecule* i ICAM-1 *intercellular adhesion molecule*)[33, 34], jak i ekspresji czynników chemotaktycznych w ścianie naczynia jak np. białka MCP-1 [35, 53]. Powoduje to napływ makrofagów i innych komórek odczynu zapalnego do tworzącego się ogniska miażdżycowego. Zarówno chemotaksja makrofagów jak i fagocytoza zmodyfikowanych lipoprotein przenikających przez śródbłonek powodują indukcję syntezy szeregu mediatorów zapalenia w makrofagach i komórkach ściany naczyń (cytokin, czynników wzrostu, iNOS), które nasilają proces zapalny i przyczyniają się do rozwoju miażdżycy [36, 37,53]. Makrofagi obecne w ścianie naczynia za pośrednictwem specyficznej klasy receptorów (tzw. scavenger receptor: SRAI, SRAII) fagocytują i gromadzą cząsteczki zmodyfikowanych form lipoprotein, co prowadzi do ich przemiany w komórki piankowe i indukuje produkcję szeregu cytokin i czynników wzrostu (PGF, VEGF, TNF $\alpha$ ) [38, 37,53].

Obecność fagocytujących makrofagów wiąże się także z nasileniem wytwarzania w ścianie naczynia enzymatycznie zmodyfikowanych form LDL(ee-LDL) przez enzymy wydzielane z makrofagów (proteazy, fosfolipazy). Takie formy LDL mają także aterogenne własności, podobnie jak ox-LDL [39]. Zarówno ox-LDL jak i ee-LDL indukują ekspresję P-selektyny na powierzchni komórek endotelium [40]. Inicjuje to adhezję i migrację leukocytów do ściany naczynia [41,37, 53]. Ox-LDL mogą indukować produkcję angiogenego naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka (*vascular endothelial growth factor* VEGF) przez makrofagi w obrębie blaszki

miażdżycowej [37,41,42]. Uwalnianie czynniki wzrostowe przyczynia ją się do przebudowy ściany naczynia, co przyspiesza rozwój miażdżycy [42, 43].

### 1.3.1 Utrzymanie napięcia ściany naczynia

Wśród licznych czynników uwalnianych ze śródbłonna, niezwykle ważną rolę w regulacji napięcia ściany naczynia odgrywają tlenek azotu (NO) i endoteliny (ETs). W utrzymaniu równowagi pomiędzy skurczem i rozkurczem naczyń uczestniczy także szereg innych substancji, jak np. wolne rodniki tlenowe, angiotensyna II, tromboksan  $A_2$ , prostaglandyny, prostacyklina, adenozyina i inne [30,52,54]. Ich przeciwstawne działania wpływają na miejscową regulację napięcia naczynia, jakkolwiek wydaje się, że największe znaczenie odgrywa tlenek azotu [30, 46,49,52,54].

Tlenek azotu (NO) został wykryty przez Furchgotta (laureata Nagrody Nobla 1998r.) oraz Zawadzkiego, którzy w 1980 roku stwierdzili, że wywołany acetylocholiną rozkurcz izolowanych tętnic jest mediowany przez łatwo dyfundujący czynnik uwalniany z nieuszkodzonego śródbłonna [44]. Dzięki swemu pierwszemu wykazanemu działaniu biologicznemu czynnik ten został nazwany "*Endothelium - Derived Relaxing Factor*" (EDRF). EDRF jest cząsteczką o parosekundowym okresie półtrwania, posiada zdolność aktywowania rozpuszczonej w cytoplazmie komórek cyklazy guanylowej i podnoszenia poziomu cGMP w komórce [45, 46]. W 1987 roku opublikowano pracę udowadniającą po raz pierwszy, że czynnik uwalniany ze śródbłonna - EDRF jest molekułą tlenku azotu (NO), generowaną przez NO syntazę (NOS) na drodze oksydacji L- argininy [47, 48] przy współdziałaniu kofaktorów takich jak tetrahydrobiopteryna (BH<sub>4</sub>), dwunukleotyd nikotyno-amino-amidowy (NADPH), dwunukleotyd flawinowy (FAD) i mononukleotyd flawinowy (FMN). Reakcja ta przebiega dwuetapowo i składa się dwóch

reakcji monooksygenacji z których pierwsza wymaga oprócz NADPH oraz tlenu także udziału BH<sub>4</sub> jako kofaktora dimeryzacji łańcucha białka NOS. Powstała w pierwszej fazie N<sup>ω</sup>-hydroksyarginina ulega dalszej oksydacji do L-cytruliny i NO [49, 50, 51]

Tlenek azotu jako mała, lipofilna cząstka, łatwo dyfunduje przez błony biologiczne i nie wymagając receptora modyfikuje funkcję komórek np. drogą aktywacji cyklazy guanylowej. Jako wolny rodnik NO może wpływać na czynniki transkrypcyjne genów np. NFκB [49,52].

NO ulega szybkiemu rozkładowi m.in. pod wpływem wolnych rodników. Dlatego tzw. dysmutaza jonów nadadtlenkowych (SOD) usuwając jon nadadtlenkowy "osłania" NO przed destrukcją, wydłużając jego okres półtrwania i potęgując efekt biologiczny [52]. W środowisku wodnym w obojętnym pH końcowymi produktami rozpadu NO są azotyny i azotany (NO<sub>x</sub>) [53]. Ich oznaczenie zmodyfikowaną metodą Griessa, stanowi jedną z metod wykrywania generacji NO in vitro oraz in vivo [224].

Silne powinowactwo NO do grup sulfhydrylowych spowodowało, że niektórzy badacze uważają, że S-nitrozotiole np. białka zawierające ugrupowania –SH są endogennym magazynem aktywnego NO. Większość uważa jednak, że formą czynną jest NO generowany "na żądanie" przez komórkę z L-argininy [54, 55].

Tlenek azotu jest produkowany przez enzymy tzw. syntazy tlenku azotu (NOS). Jak do tej pory poznano trzy zasadnicze izoformy tego enzymu. Izofорма I (cNOS, NOS I) została wykryta w mózgu (nNOS) [56,57]. Jest enzymem cytozoolowym (rozpuszczonym w cytoplazmie komórki), zależnym od wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia, kompleksu wapń/kalmodulina, oraz FAD. Izofорма ta występuje także we włóknach

układu NANC, ludzkich mięśniach szkieletowych, komórkach epitelium, macula densa nerek, oraz wysepkach trzustki [45,46,54].

Izoforma II (iNOS, NOS II) jest indukowana przez endotoksyny bakteryjne i cytokiny głównie w makrofagach i w wielu innych komórkach, także w komórkach śródbłonka i mięśniach gładkich naczyń krwionośnych [49,54]. Ta izoforma jest również rozpuszczona w cytoplazmie komórek. Po indukcji, zwłaszcza w komórkach pierwszej linii obronności ustroju - makrofagach, izoforma II NOS produkuje duże ilości NO, którego zadaniem jest wywarcie cytostatycznego i cytotoksycznego działania na komórki obce dla macierzystego organizmu np: pasożyty, bakterie oraz komórki nowotworowe i obumarłe komórki/tkanki, np. ogniska martwicy [44,45]. Do aktywności tej izoformy nie jest konieczny wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia, a jedynie wystarczająca podaż L-argininy jako substratu i tetrahydrobiopteryny (BH<sub>4</sub>) jako kofaktora [58, 59, 65].

Izoforma III (cNOS, NOS III) jest obecna w śródbłonku naczyń (eNOS) i w przeciwieństwie do innych izoform jest związana z błonami komórkowymi i tylko znikoma jej część jest stwierdzana w cytoplazmie komórek śródbłonka. Aktywność izoformy III NOS jest regulowana przez poziom wewnątrzkomórkowego wapnia i kompleks wapń/kalmodulina, a niewielkie ilości NO uwalniane przez autakoidy oraz siły ścinania (*shear stress*) odgrywają rolę w autoregulacji napięcia ściany naczyń, czyli utrzymaniu prawidłowego ciśnienia i przepływu tkankowego, jak i homeostazy między elementami morfotycznymi krwi a ścianą naczyń [54, 60, 47,48,49,50]. Należy podkreślić, że biologiczna aktywność śródbłonkowej eNOS jest również regulowana wzrostem wewnątrzkomórkowego cGMP i prawdopodobnie cGMP-zależnymi kinazami białkowymi [54, 61,62].

NO jest generowany w komórkach śródbłonna naczyń w sposób ciągły [54]. Prawidłowo funkcjonujący śródbłonek wydziela NO, który aktywując cyklazę guanylową i podnosząc poziom komórkowy cGMP, utrzymuje prawidłowe napięcie naczynia, współdziała z prostacykliną w hamowaniu adhezji płytek i neutrofilów do śródbłonna, płytek do neutrofilów hamuje agregację płytek krwi, hamuje mitogenezę i proliferację mięśniówki gładkiej naczyń, oraz podnosi aktywność fibrynolityczną osocza [54,61,62, 63,63,64,65].

Jak wykazano wydzielanie tlenu azotu z komórek śródbłonna zależy także od stężenia lipidów w krwi. Tętnice pobrane od zwierząt z hipercholesterolemią wykazują upośledzenie zależnego od generacji NO rozkurczu naczyń w odpowiedzi na acetylocholinę [54]. Podobnie też zachowują się naczynia wieńcowe pobrane od pacjentów z hipercholesterolemią i miażdżycą [66]. Wykazano, że inkubacja *ex vivo* aorty królika z ludzkimi natywnymi LDL w stężeniach obserwowanych u ludzi z hipercholesterolemią, powoduje zahamowanie rozkurczu naczyń w odpowiedzi na acetylocholinę już po kilku minutach. Jest to efekt całkowicie odwracalny po usunięciu LDL [67]. Zmodyfikowane formy LDL hamują zarówno aktywność NO, jak i ekspresję genów syntaz NO co jest zasadniczą przyczyną spadku uwalniania NO w miażdżycy [67,89]. Ponadto wykazano, że w mięśniówce gładkiej szczura pod wpływem zmodyfikowanych LDL dochodzi również do zahamowania GTP cyklohydrolazy enzymu niezbędnego do odtwarzania wewnątrzkomórkowego poziomu BH4 [68].

Tak więc upośledzenie działania NO przez LDL może zachodzić na dwóch poziomach: na poziomie ekspresji genów dla NOS, syntezy NO jak i na poziomie unieczynniania produktu – NO np. przez cząsteczki LDL [67]. Stwierdzono, że obniżenie poziomu cholesterolu LDL powoduje zwiększenie

indukcji genu eNOS w komórkach śródbłonna naczyń [69]. U chorych z hipercholesterolemią upośledzona funkcja śródbłonna objawiająca się zmniejszeniem zależnego od śródbłonna rozkurczu naczyń tętniczych wydaje się być zależna od zmniejszonej biodostępności NO. Zastosowanie terapii obniżającej poziom cholesterolu zwiększa dostępność NO i rozkurczową funkcję śródbłonna [70, 71, 72, 73, ].

Stwierdzono także, iż brak L-argininy jako substratu lub samych kofaktorów, w szczególności BH<sub>4</sub>, nie tylko może powodować zahamowanie syntezy tlenku azotu, ale także zwiększa syntezę rodników tlenowych przez samą NOS [74,75, 76].

U osób z procesem miażdżycowym obserwuje się rozległe odcinki tętnic z uszkodzonym śródbłonkiem, szczególnie w pobliżu blaszek miażdżycowych lub też miejscowo pokryte „niepełnosprawnym” śródbłonkiem (tzw. pseudoendotelium) [74,75,75,77]. Znaczenie tego faktu jest bardzo istotne dla szeregu procesów związanych z utrzymaniem homeostazy krwi/śródbłonek. W przypadku niedoboru NO substancje takie jak AII, 5-hydroktryptamina (5HT), endotelina 1 (ET-1), czy też acetylocholina powodują stałe obkurczenie naczyń i zaburzenie ich autoregulacji [78, 79, ]. W przypadku uszkodzenia śródbłonna pod wpływem substancji uwalnianych z przylegających do ściany naczynia płytek krwi, leukocytów wielojądźzastych i makrofagów uwalniane są substancje kurczące naczynia krwionośne i sprzyjające ich przebudowie (metaloproteinazy, PDGF, TGF- $\beta$ ,  $\beta$ -FGF, ET-1, TXA<sub>2</sub>, AI, 5HT) [38, 80, 81].

Do substancji naczynioskurczowych, uwalnianych przez sam śródbłonek naczyń, należy też endotelina. Śródbłonek naczyń produkuje ET-1, gdy pozostałe formy endotelin - ET-2, ET-3 są generowane przez inne

tkanki [79, 82, 83]. ET-1 powstaje w wyniku konwersji preproendoeliny do białka tzw. dużej endoteliny, a następnie do aktywnej formy - ET-1[79,82,83]. ET-1 w przeciwieństwie do NO, ma długotrwałe działanie naczynioskurczowe poprzez swoje receptory na komórkach mięśni gładkich (ET<sub>A</sub>) ściany naczyń. Natomiast pobudzenie receptora ET<sub>B</sub> obecnego na komórkach śródbłonna prowadzi do aktywacji wydzielania tlenu azotu [79,84].

Stężenie ET-1 w krwi jest podniesione w szeregu schorzeń przebiegających z niedokrwieniem tkanek, jak np. w miażdżycy, zawale serca, kardiomiopatii rozstrzeniowej i nadciśnieniu [85]. ET-1 jest także produkowana przez makrofagi obecne w blaszce miażdżycowej [86]. Dotyczy to szczególnie chorych z niestabilną dusznicą bolesną u których stwierdzono znaczne nasilenie produkcji ET-1 w blaszkach miażdżycowych [84,85]. Sama akumulacja ox-LDL w makrofach ściany naczyń powoduje zwiększenie syntezy i wydzielania do ich światła endoteliny [87]. Wykazano, że w wyniku aktywacji receptora typu „scavenger” komórek śródbłonna przez ox-LDL dochodzi do indukcji uwalniania ET-1 [87]. U chorych z miażdżycą i hiperlipidemią obserwuje się więc wyraźny wzrost stężenia endoteliny w krwi [85].

Obok silnego działania kurczącego naczynia krwionośne endotelina wywołuje także proliferację mięśniówki gładkiej naczyń wpływając niekorzystnie na przebudowę ściany naczyń w miażdżycy nadciśnieniu, cukrzycy [79-88].

Z powyższych rozważań wynika, że upośledzenie funkcji śródbłonna np. poprzez miażdżycę wywołany jest przede wszystkim zwiększeniem stężenia zmodyfikowanych form lipoprotein i wynika z zahamowania generacji i aktywnego działania NO a z drugiej strony prowadzi do zwiększenia ET-1, co nasila stan spastyczny naczyń [79-88].



### 1.3.2 Utrzymanie równowagi procesów krzepnięcia - fibrynoliza.

Śródbłonek naczyń pełni równie istotną rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy procesami krzepnięcia i fibrynolizy. Proces miażdżycowy jest związany zarówno z aktywacją krzepnięcia jak i hamowaniem fibrynolizy [89,35]. U podstaw tego zjawiska leżą ściśle związane ze sobą procesy zmienionej generacji niektórych białek układu krzepnięcia, np. fibrynogenu [90] czy apoproteiny apo(a) [91], a także upośledzenie antytrombogenicnej funkcji śródbłonka, zwłaszcza zaburzenia równowagi pomiędzy uwalnianiem tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA) [92] jak i jego inhibitora (PAI-1) [91].

W śródbłonku naczyń zachodzi synteza niektórych czynników krzepnięcia, takich jak czynnik V i czynnik vWF (czynnik von Willebranda). Komórki śródbłonka są włączone w kontrolę hemostazy również przez wiązanie i aktywację czynnika XII, IX i HMWK [93]. Składniki *glikokaliks* komórek śródbłonka - proteoglikany: siarczan heparanu, dermatanu i chondroityny są kofaktorami dla antytrombiny III (AT III) i działają wraz z wydzielanymi przez śródbłonek serpinami (np. neksyną I) [94]. Trombomodulina jest receptorem dla trombiny inicjującym aktywację układu białek C i S [95].

Za aktywacją układu fibrynolizy w czasie aktywacji krzepnięcia odpowiedzialny jest układ aktywnego białka C (APC) [95]. Na powierzchni śródbłonka dochodzi do aktywacji białka C poprzez utworzenie kompleksu aktywnego białko C – trombomodulina (TM) [96]. Ten kompleks po połączeniu z kofaktorem - białkiem S (kompleks APC) oprócz hamowania układu krzepnięcia ma zdolność hamowania aktywności PAI-1 [96]. Upośledzenie funkcji śródbłonka wiedzie do zmniejszenia generacji

prostacykliny (PGI<sub>2</sub>), tlenku azotu (NO), zahamowania uwalniania tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) [97]. Towarzyszy temu wzrost stężenia inhibitora t-PA (PAI-1), wzrost czynnika aktywującego płytki (PAF), składników podścieliska co dodatkowo nasila trombogenność śródbłonka [54]. Dochodzi do zwiększonej ekspresji czynnika von Willebranda, białek adhezyjnych (integrzyn) na śródbłonku, płytkach i komórkach układu białokrwinkowego. Ekspresja adhezyn (selektyn i integrzyn) nasila migrację komórek odczynu zapalnego do ściany naczynia [36,35]. Uwalniane w tych procesach cytokiny i czynniki wzrostu wywołują chemotaksję leukocytów, oraz komórek mięśni gładkich. Sprzyja to tworzeniu blaszek miażdżycowych i przebudowie ściany naczynia wiodącej do nasilenia procesów wykrzepiania krwi [36].

Czynnik tkankowy (TF) jest aktywatorem zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia [98]. Ulega on ekspresji w wielu komórkach ustroju, m.in. w tkankach okołonaczyniowych. TF może także ulegać ekspresji w komórkach śródbłonka pod wpływem lipopolisachydów bakteryjnych (LPS), interleukiny 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) [99] oraz trombiny, co może mieć miejsce także w procesie miażdżycowym [100]. Ekspresja TF jest modulowana przez czynniki fizyczne na przykład przez przepływ krwi oraz biochemiczne jak np. kwas retinowy, który hamuje indukcję TF poprzez TNF [101]. Duże ilości TF stwierdza się w obrębie blaszki miażdżycowej, w wyniku aktywacji makrofagów oraz zmienionych fenotypowo komórek mięśni gładkich (*vascular smooth muscle cells* - VSMC), przekształcających się w komórki piankowe [102]. Towarzyszące pęknięciu blaszki miażdżycowej wykrzepianie jest spowodowane właśnie kontaktem krwi z TF rdzenia lipidowego wytworzonego przez obciążone lipidami makrofagi [98].

Czynnik hamujący drogę krzepnięcia zależną od czynnika tkankowego (*tissue factor pathway inhibitor* – TFPI) jest białkiem produkowanym przez komórki śródbłonka oraz hepatocyty [103]. TFPI jest związane z glikozaminoglikanami błon komórkowych, pod śródbłonkiem oraz w płytkach krwi [104]. Jest on jednym z ważniejszych czynników kontrolujących układ krzepnięcia. Hamuje on aktywność kompleksu czynnik tkankowy-aktywny czynnik VII (TF/VIIa) poprzez połączenie się z aktywną formą czynnika X (TFPI/Xa), a następnie poprzez połączenie się kompleksu TFPI/Xa z kompleksem TF/VIIa [105, 106]. TFPI jest uwalniany z wiązań z glikozaminoglikanami śródbłonka pod wpływem heparyny [105] i po zmodyfikowaniu proteolitycznym wiąże się w formie nieaktywnej z lipoproteinami krwi (HDL i LDL). Jest to prawdopodobnie jedna z dróg usuwania TFPI z ustroju (poprzez wychwyt drogą receptora LRP w hepatocytach) [103]. W obecności heparyny TFPI oraz AT III współdziałają w hamowaniu wykrzepiania. AT III oprócz wiązania się z trombiną w obecności heparyny hamuje aktywację czynnika VII związanego z TF a TFPI hamuje działanie już utworzonych kompleksów VIIa/TF [103]. Wydaje się obecnie, że śródbłonek naczyń w miejscach, gdzie pokrywa on całkowicie lub częściowo blaszki miażdżycowe, jest pozbawiony możliwości produkcji TFPI, co odgrywa ważną rolę w przesunięciu równowagi krzepnięcia/fibrynoliza na korzyść krzepnięcia [105,104,103].

Proces fibrynolizy może być aktywowany analogicznie do układu krzepnięcia na dwa sposoby - poprzez układ wewnątrzpochodny kaskady krzepnięcia i drogą zewnątrzpochodną. Zewnątrzpochodna aktywacja fibrynolizy polega na uwolnieniu z tkanek tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA) i tkankowego aktywatora plazminogenu typu

urokinazowego (uPA) [107]. Dla obu tych enzymów substratem jest plazminogen. tPA jest wywarzany np. przez śródbłonek, a jego wydzielanie jest aktywowane przez siły ścinania, PGI<sub>2</sub>, trombinę, bradykininę i inne substancje wazoaktywne [108]. Dodatkowo aktywność enzymu rośnie w obecności fibryny oraz jej produktów degradacji (rozpadu - FDP). Także w komórkach śródbłonna jest wytwarzany inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI 1) hamujący działanie tPA i uPA [107,108].

Ekspresja każdego z wymienionych czynników zależy od aktualnego stanu śródbłonna i toczących się na jego powierzchni procesów wykrzepiania czy też procesu zapalnego którym także jest proces miażdżycowy. Niedobór genu dla tPA, uPA oraz plazminogenu powoduje wystąpienie ciężkiej zakrzepicy [109].

Wykazano także, iż proliferujące mięśnie gładkie izolowane z ludzkich blaszek miażdżycowych są w stanie modulować „fenotyp fibrynolityczny” komórek śródbłonna [110]. W warunkach koinkubacji VSMC i komórek endotelium dochodzi do zwiększenia syntezy PAI-1 w komórkach śródbłonna [94]. Jest to jeden z istotnych mechanizmów łączących rozwój miażdżycy (prolifercja VSMC) z upośledzoną funkcją śródbłonna i zmniejszonym potencjałem fibrynolitycznym ściany naczynia [110].

Podniesione stężenia lipoproteiny (a) (Lp(a)) uważa się za czynnik ryzyka przedwczesnego rozwoju miażdżycy [111]. Jednocześnie u pacjentów z ChNS często obserwowano podwyższenie stężenia inhibitora aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1). W doświadczeniach in vitro pokazano, że oksydacyjna modyfikacja Lp(a) w istotny sposób zwiększa wydzielanie PAI-1 z komórek ludzkiego śródbłonna [112]. Podobne, aczkolwiek nieco słabsze efekty obserwowano w obecności ox-LDL [113]. Ponadto wykazano, że Lp(a)

ze względu na swoją strukturę podobną w budowie do plazminogenu wiąże się z miejscami receptorowymi dla plazminogenu na fibrynie i upośledza działanie plazminy, przez co hamuje proces fibrynolizy. Mogłoby to wyjaśniać prozakrzepowe właściwości Lp(a) [112, 114, 115].

#### **1.3.4 Znacznie śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF)**

Śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) jest wysoce specyficznym mitogenem dla komórek śródbłonka [116, 119, 120], a tym samym odgrywa istotną rolę w waskulogenezie i angiogenezie. Jego struktura wykazuje dużą analogię do PDGF [117]. VEGF jest znany również jako VPF (*vascular permeability factor*) ponieważ nasila on przepuszczalność naczyń, co np. po podaniu białka VEGF lub transfekcji jego genu do ustroju może objawiać się obrzękami [119, 120]. Poznano cztery typy mRNA kodujące VEGF a zawierające 206, 189, 165 oraz 121 aminokwasów. mRNA jest produktem jednego genu, a różnice w budowie powstają na drodze "alternatywnego splacingu" [118]. VEGF<sub>121</sub> oraz VEGF<sub>165</sub> są uwalniane do środowiska, natomiast pozostałe izoformy wiążą się z glikozamoinoglikanami podścieliska i matrix [118, 120]. VEGF może być generowany i wydzielany przez liczne komórki organizmu, również przez komórki mięśni gładkich ściany naczyń [118, 120]. Zwiększoną ekspresję i produkcję tego czynnika wzrostu stwierdzono w łożysku, w niedotlenionych tkankach oraz w nowotworach [119, 120]. Hipoksja jest silnym czynnikiem aktywującym produkcję VEGF, a największą ekspresję VEGF obserwowano w tkankach po 12-24 godzinach od zamknięcia światła naczyń [121, 122]. Selektowna aktywacja przepuszczalności i mitogenezy przez VEGF w komórkach śródbłonka jest

związana z obecnością specyficznych receptorów KDR/flk-1 dla tego mitogenu, a których ekspresję stwierdzono głównie w tych komórkach [120].

Zwrócono uwagę na fakt, iż podawanie egzogenego białka VEGF w modelu doświadczalnym towarzyszy spadek ciśnienia, oraz że VEGF jest w stanie rozkurczać izolowane tętnice [125,127,123]. Efektów tych nie obserwowano przy równoczesnym podaniu inhibitorów syntazy tlenu azotu, co sugeruje udział NO w mechanizmie działania tego czynnika wzrostu. Badania prowadzone przez nasz ośrodek [123] oraz w innych ośrodkach na świecie [124], dowiodły, że istnieje ścisła kooperacja między VEGF a NO. Długotrwała ekspozycja śródbłonna na VEGF (24 godziny) powoduje wzrost poziomu białka eNOS jak i nasila generację NO. Natomiast krótkotrwała ekspozycja komórek śródbłonna na VEGF zwiększa uwalnianie NO poprzez mechanizmy związane z aktywacją kinazy tyrozynowej i PI-3K kinazy [120,124,223].

Niedotlenienie indukuje wydzielanie VEGF<sub>165</sub>, a ten z kolei nie tylko nasila proliferację *endotelium*, ale i aktywuje uwalnianie NO z hodowli komórek śródbłonna. W ten sposób, poprzez rozszerzenie istniejących oraz wytworzenie nowych naczyń może polepszać perfuzję niedokrwionych tkanek [125,120,124,223]

Wykazano również, że VEGF promuje formowanie jonu nadlenkowego. Efekt ten może dominować w przypadku wysokich stężeń VEGF, a powstający jon ponadnadtlenkowy odpowiedzialny jest za inaktywowanie części powstającego NO [126, 127].

### 1.3.5 Markery upośledzonej funkcji śródbłonka.

Czynnik von Willebranda (vWF) jest syntetyzowany (a w niewielkim stopniu magazynowany) w komórkach śródbłonka, megakariocytach i płytkach krwi stwierdza się go w stężeniu ok.  $10\mu\text{g/ml}$  [128, 129]. Po uwolnieniu do krążenia vWF jest częściowo trawiony przez plazminę, a częściowo inkorporowany przez płytki drogą endocytozy do ziarnistości  $\alpha$ . Aktywacja płytek, zwłaszcza uszkodzenie komórek śródbłonka powoduje uwolnienie vWF do krążenia. [129]. W krążeniu vWF łączy się z czynnikiem VIII, co warunkuje normalną funkcję i stabilność czynnika VIII, a także pośredniczy w adhezji płytek w miejscach uszkodzenia śródbłonka. Niedobory czynnika vWF stwierdzane są np. w chorobie von Willebranda, chłoniakach, toczeniu systemowym i innych [130]. vWF oddziałuje z płytkami za pośrednictwem glikoproteiny Ib, która powoduje adhezję płytek do ściany naczynia oraz za pośrednictwem glikoproteiny (Gp) IIb/IIIa ( $\alpha_2\beta_3$ ), będącej receptorem dla fibrynogenu a odgrywającego rolę w agregacji płytek krwi [131,132].

Agregacja płytek oraz tworzenie zakrzepu w obecności sił ścinania (*shear stress*) wymaga interakcji vWF zarówno z Gp Ib jak i IIb/IIIa. Przyłączenie vWF do Gp Ib jest niezależne od stanu aktywacji płytek, gdy wiązanie z Gp IIb/IIIa wymaga ich aktywacji. Sugeruje się również, że wiązanie się z Gp Ib generuje wewnątrzpłytkowy sygnał do zależnej od ADP ekspozycji kompleksu Gp IIb/IIIa [131,132,133].

Interakcja płytki - ściana naczynia odbywa się również przy współdziałaniu różnych składników subendotelialnych białek podścieliska takich jak fibronektyna, laminina, kolagen typu I [134]. Mechanizmy kontrolujące syntezę i wydzielanie vWF są w dalszym ciągu przedmiotem badań. Chociaż

komórki śródbłonna uwalniają vWF zarówno in vivo jak i in vitro, potrzebna jest specyficzna ich aktywacja przez różne czynniki aby spowodować szybkie uwalnianie vWF zgromadzonego w ciałkach Weibel-Paladiego [131 -135]. Pobudzenie przez trombinę, histaminę, IL-1, fibrynę lub lipopolisacharydy komórek śródbłonna pępowiny ludzkiej (HUVEC) prowadzi do wydzielania vWF [138]. Uwalnianie vWF in vivo jest również wzmagane przez wazopresynę i kwas nikotynowy, chociaż żaden z tych czynników nie uwalnia vWF bezpośrednio z hodowli komórkowej śródbłonna [138,139]. Wyniki te sugerują, że uwalnianie vWF ze śródbłonna wymaga obecności dodatkowych czynników, które są obecne w krążącej krwi [136].

Niewielkie ilości czynnika von Willebranda są zawarte w ziarnistościach  $\alpha$  płytek, skąd mogą być uwalniane do krążenia podczas ich aktywacji [137, 138]. W ziarnistościach  $\alpha$  płytek jest również magazynowany czynnik płytkowy 4 (PF 4) i  $\beta$  - tromboglobulina ( $\beta$ -TG). Poziom  $\beta$ -TG i PF 4 we krwi są uważane za wskaźnik przyżyciowej aktywacji płytek [141,139]. Aktywacja płytek prowadzi do uwalniania do krwi  $\beta$ -TG oraz PF4. Z uwagi na udział płytek w procesach zatorowo - zakrzepowych, badanie poziomu  $\beta$ -TG jest więc nieinwazyjnym testem stopnia aktywacji płytek in vivo. Podniesione stężenie  $\beta$ -TG jest stwierdzane m. in. w miażdżycy, wadach zastawkowych serca, zawale serca, DIC, zawale i udarze [139, 140, 141]

#### **1.4 Znaczenie LDL-aferezy jako terapii objawowej**

Przed wprowadzeniem radykalnych metod leczenia pacjenci z rodzinną, oporną, homozygotyczną hypercholesterolemią umierali przed ukończeniem



30 roku życia z powodu powikłań wczesnej miażdżycy jak udar mózgowy czy zawał serca, gdyż leczenie farmakologiczne i dietetyczne nie jest skuteczne w wypadku rodzinnej hypercholesterolemii [8,9,10,11].

W latach 60 zaproponowano po raz pierwszy zastosowanie powtarzanej plazmaferezy do leczenia homozygotycznych postaci hypercholesterolemii rodzinnej [142]. Odstąpiono jednak wtedy od tej metody ponieważ separacja osocza przez wirowanie była mało wydajna, powodowała uszkodzenia elementów morfotycznych krwi i stwarzała niebezpieczeństwo infekcji. W 1975 roku Thompson [143] ulepszył metodę plazmaferezy w leczeniu rodzinnych hipercholesterolemii wprowadzając do zabiegu wynaleziony w parę lat wcześniej separator osocza przy ciągłym przepływie krwi. W 1976 roku Lupien i wsp.[144] zastosowali po raz pierwszy metodę pozaustrojowej, selektywnej eliminacji frakcji LDL, wykorzystując zjawisko swoistego powinowactwa apolipoproteiny B do heparyny. Zastosowano wtedy metodę adsorpcji LDL z krwi pełnej na cząstkach agarozy opłaszczonych heparyną. Termin LDL afereza został wprowadzony przez Stoffela i Demanta w 1981 roku dla określenia wybiórczego usuwania LDL metodą immunoadsorpcji [145].

Inny sposób leczenia hipercholesterolemii, tzw. metodę podwójnej filtracji, polegającą na usuwaniu z oddzielonego osocza większych cząsteczek takich jak np. LDL i VLDL, zastosował w 1982 roku Tanaka [146]. W 1985 roku Yokoyama zaproponował wykorzystanie zjawiska adsorpcji cząstek LDL na celulozie pokrytej siarczanem dekstranu [147]. Metoda ta jest obecnie najpopularniejsza i stanowi podstawę działania kolumn używanych do separacji LDL w zabiegu aferezy-LDL. Jeszcze jednym rozwiązaniem technicznym jest zastosowana przez Armstronga w 1987 precypitacja w

środkowisku kwaśnym LDL przez heparynę (metoda HELP)[148]. W terapii opornych hipercholesterolemii znajduje obecnie największe zastosowanie metoda precypitacji na siarczanie dekstranu oraz metoda HELP.

Jedne z pierwszych badań z zastosowaniem LDL-aferezy dotyczyły ośmiorga dzieci w wieku 7-17 lat z wyjściowym (mimo leczenia farmakologicznego i dietetycznego) poziomem cholesterolu 56 mmol/l [149]. Leczenie prowadzono w przedziałach jedno- i dwutygodniowych przez okres 24 - 64 miesięcy. Uzyskano średnie obniżenie poziomów cholesterolu całkowitego, LDL i Lp(a) o ok. 70-80%, czyli do średniej wartości cholesterolu całkowitego w granicach 6 - 8 mmol/L. W przeciwieństwie do dzieci nie poddanych terapii aferezą, dzieci poddane tej terapii nie wymagały operacyjnego leczenia powikłań miażdżycy (angioplastyka, pomostowanie aortalno-wieńcowe), a konieczne interwencje kardiochirurgiczne ograniczały się do korekty wrodzonych wad serca. Wzrost i rozwój psychofizyczny tych dzieci przebiegał bez różnic z dziećmi zdrowymi. Z wyjątkiem niedoboru żelaza u jednego pacjenta, nie obserwowano istotnych zmian w osoczowych wskaźnikach hematologicznych, poziomach immunoglobulin, stężeniach witamin rozpuszczalnych w tłuszczach [150]. Utrzymanie ciąży u pacjentek z rodzinną hipercholesterolemią było dotąd niemal niemożliwe ze względu na szybki postęp choroby niedokrwiennej serca u matki oraz rozwijającą się niewydolność łożyska [151]. Leczenie rodzinnej hipercholesterolemii homozygotycznej za pomocą LDL-aferezy umożliwia pacjentkom z tą chorobą utrzymanie ciąży i urodzenie dziecka. Z doniesień wynika, że stosowane aferezy podczas całego przebiegu ciąży leczenie nie zaburza rozwoju płodu. Porody oraz połóg przebiegały bez powikłań [152].

Radykalne leczenie hipercholesterolemii rodzinnej dotyczy również form heterozygotycznych tej choroby, gdy standardowym leczeniem nie można uzyskać zalecanej w prewencji kardiologicznej redukcji poziomu cholesterolu LDL poniżej 100 mg/dl (2,6 mmol/l). W półrocznych, randomizowanych próbach wykazano skuteczność terapii LDL-aferezą w leczeniu odpornej na standardowe leczenie, rodzinnej hipercholesterolemii heterozygotycznej. U tych chorych w przebiegu choroby niedokrwiennej serca stosowanie LDL aferezy przynosi korzystne wyniki w prewencji wtórnej i jak wykazały niektóre badania, prowadzi do regresji zmian miażdżycowych w naczyniach nasierdziowych [8,153,154].

## **2. CEL BADAŃ**

Celem pracy była próba określenia skuteczności LDL-aferezy w normalizacji patologicznego profilu lipidów we krwi pacjentów z udowodnioną w angiografii chorobą niedokrwinną serca oraz wpływu tych zmian na wybrane parametry funkcji śródbłonna i tolerancję wysiłku.

### **3. MATERIAŁY I METODY**

#### **3.1 Opis grup pacjentów zakwalifikowanych do badań**

Pacjenci hospitalizowani byli w Klinice Choroby Wieńcowej i II Klinice Kardiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Do badań włączono pacjentów z angiograficznie stwierdzonymi zmianami miażdżycowymi w naczyniach wieńcowych, zakwalifikowanych wstępnie do zabiegów rewaskularyzacji mięśnia sercowego: przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyki (PTCA) lub zabiegu pomostowania naczyń wieńcowych (CABG). Zabiegi rewaskularyzacji wykonywano w Zakładzie Hemodynamiki i Angiokardiografii oraz w Klinice Chirurgii Serca i Naczyń Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Do badań kwalifikowano chorych, u których wykluczono ciężką postać nadciśnienia tętniczego (ciśnienie rozkurczowe powyżej 115 mmHg, skurczowe powyżej 165 mmHg), niewydolność nerek, wątroby, niewydolność krążenia (III i IV klasa wg NYHA), cukrzycę, chorobę nowotworową, zaburzenia krzepnięcia. Ponadto ze względu na zmniejszenie wydajności zabiegów LDL-aferezy u chorych z hipertriglicydemią z badań wyłączono pacjentów ze znacznie podniesionym stężeniem triglicerydów (TG powyżej 4.0mmo/l).

Chorych podzielono na trzy grupy:

1. Grupę pierwszą stanowili chorzy leczeni LDL-aferezą, u których wykonano zabiegi rewaskularyzacyjne (n=7, CABG n=4, PTCA n=3).
2. Grupę kontrolną A stanowili chorzy poddawani zabiegom rewaskularyzacyjnym, bez zabiegów LDL-aferezy (n=8, CABG 6, PTCA 2).
3. Grupę kontrolną B stanowili chorzy nie poddawani zabiegom rewaskularyzacyjnym, ani zabiegom LDL-aferezy, którzy byli leczeni wyłącznie farmakologicznie (n=8).

	<b>Grupa leczona LDL-aferezą</b>	<b>Grupa kontrolna A</b>	<b>Grupa kontrolna B</b>
<b>Liczba chorych</b>	7	8	8
<b>Rodzaj terapii</b>	farmakoterapia (w tym statyny) zabieg rewaskularyzacyjny (CABG lub PTCA) LDL-afereza (3-7 zabiegów u jednego pacjenta)	farmakoterapia (w tym statyny) zabieg rewaskularyzacyjny (CABG lub PTCA)	farmakoterapia (w tym statyny)
<b>Zabiegi rewaskularyzacyjne</b>	CABG (n=4) PTCA (n=3)	CABG (n=6) PTCA (n=2)	CABG (n=0) PTCA (n=0)

Tabela 1. Protokół badania (1): grupy pacjentów i rodzaj terapii w poszczególnych grupach badanych.

Pacjenci nie byli randomizowani do poszczególnych grup. Kryterium doboru do grupy leczonej zachowawczo (Grupa B) był brak możliwości wykonania zabiegu rewaskularyzacyjnego (na podstawie koronarografii) lub brak zgody chorego na takie leczenie. Chorzy kwalifikowani do zabiegów rewaskularyzacyjnych w trybie pilnym oraz nie wyrażających zgody na

leczenie LDL-aferezą byli kwalifikowani do grupy kontrolnej A. Pozostali chorzy z oporną hipercholesterolemią, poddawani zabiegom rewaskularyzacyjnym i spełniającym kryteria włączenia do badań byli kwalifikowani do grupy leczonej LDL-aferezą.

Pacjentom udzielono szczegółowych wskazówek co do przestrzegania diety ubogocholesterolowej z kontrolowaną zawartością kwasów tłuszczowych. Dieta ta polega na ograniczaniu spożycia tłuszczu do 25-30% zapotrzebowania energetycznego, cholesterolu poniżej 200mg/dobę oraz podaży kwasów tłuszczowych w odpowiednim stosunku: NKT (nasycone kwasy tłuszczowe) do JKT (jednonienasycone kwasy tłuszczowe) do WKT (wielonienasycone kwasy tłuszczowe) w stosunku odpowiednio - 1:1,2:0,8. Z diety wyeliminowano między innymi masło, śmietanę, smalec, słoninę, boczek, tłuste mleko i jego przetwory, tłuste gatunki mięs i wędlin, podroby, żółtka jaj oraz utwardzone tłuszcze roślinne (margaryny twarde), które zawierają znaczne ilości izomerów trans kwasów tłuszczowych. Produkty te chorzy zastępowali przez źródła jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (jak olej rzepakowy, oliwa z oliwek) oraz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (jak olej słonecznikowy, sojowy, kukurydziany). Ponadto zwrócono także uwagę na zwiększenie podaży kwasów tłuszczowych z rodziny omega-3-nienasyconych zwartych w rybach morskich. W diecie zwiększono ilość błonnika, witamin antyoksydacyjnych i flawonoidów zawartych w jarzynach i owocach. Ograniczono także spożycie łatwo przyswajalnych węglowodanów (cukier, słodczyce) oraz soli i alkoholu. Chorzy wraz z rodzinami zostali przeszkoleni w zakresie stosowania diety i przestrzegali jej zasad.

Pacjenci otrzymywali następujące leki, stosowane w terapii duszniczy bolesnej: kwas acetylosalicylowy, tiklopidynę, blokery receptorów beta adrenergicznych, blokery kanałów wapniowych, nitraty. Ze względu na możliwość wystąpienia u pacjentów stosujących inhibitory enzymu konwertującego (ACE) spadków ciśnienia tętniczego podczas zabiegów LDL-aferezy[155], odstawiono te leki na 4 tygodnie przed planowanym pierwszym zabiegiem.

Wszyscy chorzy uczestniczący w badaniu otrzymywali przez co najmniej 2 miesiące przed włączeniem do programu simwastatynę w dawce 20-40mg na dobę.

Do badań włączono chorych, u których poziom lipoprotein LDL przekraczał 3,5 mmol/l mimo diety i farmakoterapii

### **3.2 Przebieg badań**

W grupie leczonej LDL-aferezą pierwszy zabieg LDL-aferezy wykonywano na dwa dni przed zabiegiem rewaskularyzacyjnym, drugi do 2-10 dni po zabiegu. Dalsze zabiegi wykonywano co 7-14 dni w zależności od narastania stężenia cholesterolu u chorego, które utrzymywano na poziomie rekomendowanym przez Polskie Towarzystwo Kardiologiczne w prewencji wtórnej choroby niedokrwiennej serca (poziom lipoprotein LDL pomiędzy 2,5 a 3,5mmol/l). Zabiegi aferezy wykonywano przez okres 3 miesięcy po zabiegu rewaskularyzacyjnym. Ilość zabiegów wykonanych u jednego chorego uzależniono od prędkości narastania cholesterolu LDL i wynosiła ona od 3 do 7 zabiegów w ciągu 3 miesięcy po zabiegu rewaskularyzacyjnym.

Leczenie simvastatyną (20-40 mg na dobę) kontynuowano także między poszczególnymi zabiegami aferezy w celu zapobieżenia efektowi nasilenia syntezy cholesterolu po gwałtownym jego usunięciu przez LDL-aferezę.

U wszystkich chorych pobierano krew na badania biochemiczne zgodnie z protokołem badania (Tabela 2).

	<b>Grupa leczona LDL-aferezą</b>	<b>Grupa kontrolna A</b>	<b>Grupa kontrolna B</b>
<b>Włączenie do programu</b>	badania biochemiczne test wysiłkowy	badania biochemiczne test wysiłkowy	badania biochemiczne test wysiłkowy
<b>Przed pierwszą LDL aferezą</b>	badania biochemiczne	-	-
<b>Po pierwszej LDL-aferezie</b>	badania biochemiczne	-	-
<b>Zabieg rewaskularyzacyjny</b>	PTCA lub CABG	PTCA lub CABG	-
<b>Przed LDL aferezą (do 7 zabiegów)</b>	badania biochemiczne	-	-
<b>Po LDL aferezie (do 7 zabiegów)</b>	badania biochemiczne	-	-
<b>Po 3 miesiącach od włączenia do programu</b>	test wysiłkowy	test wysiłkowy	test wysiłkowy
<b>Po 6 miesiącach od włączenia do programu</b>	badania biochemiczne	badania biochemiczne	badania biochemiczne
<b>Po 12 miesiącach od włączenia do programu</b>	badania biochemiczne test wysiłkowy	badania biochemiczne test wysiłkowy	badania biochemiczne test wysiłkowy

Tabela 2. Protokół badania (2): badania w poszczególnych grupach chorych. Badania biochemiczne obejmowały badanie poziomu: lipoprotein (CH, LDL, TG, HDL), Lp(a), ocenę podatności LDL na oksydację, fenotyp LDL, poziom vWF, VEGF, NOx, fibrynogeny i  $\beta$ -TG



Pacjenci, jeśli nie wymagały tego dodatkowe okoliczności, zgłaszali się do kontroli kardiologicznej przez pierwsze 6 miesięcy najmniej trzykrotnie. Podczas wizyty wykonywano badanie podmiotowe, przedmiotowe oraz wykonywano testy wysiłkowe na bieżni ruchomej.

Analizie poddawano testy wysiłkowe wykonane w 3 i 12 miesiącu od włączenia do programu (Tabela 2).

Krew na badania parametrów biochemicznych pobierano w 6 i 12 miesiącu po zabiegu rewaskularyzacyjnym (tj. w 3 i 9 miesiącu po ostatnim zabiegu LDL-aferezy) (Tabela 2).

### **3.3 LDL-afereza - opis metody**

Do zabiegów LDL-aferezy używano aparatu MA-01 japońskiej firmy Kaneka. W kolumnach adsorpcyjnych aparatu jest wykorzystywany mechanizm adsorpcji dodatnio naładowanych cząsteczek apolipoproteiny B LDL na powierzchni ujemnie naładowanych cząstkach siarczanu dekstranu [156]. Cząsteczki te łączą się na drodze elektrostatycznych oddziaływań. Połączenie jest trwałe w środowisku fizjologicznego roztworu 0,9% NaCl. Po zmianie środowiska na 4,5% NaCl połączenia ulegają rozdzieleniu. Mechanizm ten jest wykorzystywany podczas zabiegu do czasowej regeneracji kolumn.

Po standardowym teście aparatu (testowanie komputera i czujników ciśnienia) instalowano do aparatu jednorazowy, sterylny zestaw do LDL aferezy składający się z separatora komórkowego Sulflux FS 0.05, dwóch kolumn LA-15 Liposorber System i filtra osocza stanowiących po instalacji zamknięty obieg. Następnie zestaw wypełniano płynami (NaCl 0,9%, płyn

Ringera) i odpowietrzano. Procedura przygotowania aparatu trwa ok. 1,5 godziny.

Po podaniu dożylnym pacjentowi 5000 U heparyny krew pobierano w sposób ciągły od pacjenta z żyły powierzchownej przy użyciu tymczasowego dostępu do żyły w postaci wkłucia (igła o średnicy  $\Phi 1,1$  lub  $1,2$  mm). W tej metodzie krew jest zasysana z żyły przez pompę krwi (maksymalne ujemne ciśnienie  $-60\text{mmHg}$ ). Następnie przepływa ona przez separator komórkowy (Sulflux FS 0.05 lub HQ 0,05 Kaneka, Japonia), gdzie oddzielane są składniki morfotyczne (erytrocyty, leukocyty a także płytki) od osocza. Następnie osocze jest przepompowywane osobną pompą przez pokryte siarczanem dekstranu kolumny adsorbcyjne (średnie ciśnienie ok.  $120\text{mmHg}$ ). Na powierzchni kolumn, dzięki elektrostatycznym oddziaływaniom pomiędzy apolipoproteiną B i siarczanem dekstranu, cząsteczki zawierające apolipoproteinę B ulegają adsorpcji. Po oczyszczeniu z frakcji LDL i VLDL osocze ulega połączeniu z elementami morfotycznymi płynącymi z separatora komórkowego. Po ogrzaniu do temperatury  $37^{\circ}\text{C}$ , krew powraca do pacjenta poprzez wkłucie do drugiej żyły powierzchownej. Aparat wyposażony jest standardowo w dwie kolumny do adsorpcji LDL. Po przefiltrowaniu ok.  $600\text{ml}$  osocza kolumna ulega wysyceniu i automatycznie jest przełączana w tryb płukania. W czasie regeneracji pierwszej kolumny, druga zostaje automatycznie włączona do filtracji osocza. Osobny obieg płynów regeneruje kolumnę poprzez wypłukiwanie z niej cząstek LDL roztworem  $4,5\%$  NaCl.

Cały zabieg trwa ok. 3-4 godzin i w czasie jego trwania oczyszczeniu ulega  $3000\text{ ml}$  osocza.

Wszystkie materiały mające kontakt z krwią pacjenta są jednorazowego użytku i stwarzają obieg zamknięty, co zabezpiecza pacjenta i personel przed możliwością infekcji.

### 3.4 Ocena tolerancji wysiłku

Wszystkich chorych poddano testom wysiłkowym na bieżni ruchomej (Marquette Electronics USA) wg zmodyfikowanego protokołu Bruce'a. Test wykonano w chwili włączenia pacjenta do badań (przed zabiegiem rewaskularyzacyjnym oraz przed zabiegami LDL-aferezy), po 6 oraz po 12 miesiącach prowadzonych obserwacji.

Test wysiłkowy na bieżni ruchomej był przeprowadzany wg zmodyfikowanego protokołu Bruce'a [157]. Test składa się z trzyminutowych etapów o narastającym stopniu prędkości bieżni oraz zwiększonym stopniowo nachyleniu bieżni (Tabela 3).

Analizie statystycznej poddano czas trwania wysiłku (tolerancja wysiłku – wyniki przedstawiono w minutach). Spośród wszystkich kryteriów przerwania wysiłku, u badanych chorych występowały: znamienne obniżki odcinka ST, silne zmęczenie oraz osiągnięcie wysiłku submaksymalnego (definiowanego jako tętno obliczone ze wzoru  $220 - \text{wiek} \times 80\%$ ).

stopień	czas trwania etapu (min)	szybkość marszu mil/godz. (km/godz.)	nachylenie bieżni (%)
1	3	1,7 (3)	0
2	3	1,7 (3)	5
3	3	1,7 (3)	10
4	3	2,5 (4,5)	12
5	3	3,4 (6)	14
6	3	5,0 (8)	18
7	3	5,5 (9)	20
8	nieograniczony	6,0 (10)	22

Tabela 3. Test na bieżni ruchomej wg zmodyfikowanego protokołu Bruce'a. Tabela przedstawia prędkość przesuwu bieżnika (szybkość marszu chorego) i stopień nachylenia bieżni w zależności od etapu testu.

### **3.5 Badania biochemiczne**

Krew do badań biochemicznych pobierano zgodnie z protokołem badania (patrz powyżej - Tabela2)

#### **3.5.1 Poziom lipoprotein.**

Poziom cholesterolu całkowitego (CH), triglicerydów (TG) i lipoprotein HDL oznaczano standardową metodą enzymatyczną (Boehringer Mannheim). Poziom lipoprotein LDL w mmol/l wyliczano standardowo wg formuły Friedewalda ( $LDL=CH - HDL - 0,45 \times TG$ ). Jak wspomniano powyżej, ze względu na wydajność zabiegu, do badań nie włączano chorych z hipertriglicerydemią.

Wyniki przedstawiono w mmol/l.

#### **3.5.2 Oznaczanie poziomu lipoproteiny a [Lp(a)].**

Stężenie Lp(a) oznaczano metodą RIA (zestaw apo(a) RIA 100, firmy Pharmacia Diagnostics AB, Niemcy). Wyniki przedstawiono w mg/l.

#### **3.5.3 Badanie podatności frakcji LDL na oksydację (ex vivo)**

##### **3.5.3.1 Izolacja lipoprotein LDL metodą ultrawierowania**

Frakcje lipoprotein uzyskiwano z surowicy pacjentów przed, po każdym zabiegu LDL-aferezy oraz po upływie 6 i 12 miesięcy. Procedurę ultrawierowania przeprowadzono w oparciu o metodę sekwencyjnej flotacji wg Havela [158].

Ultrawierowanie surowicy przeprowadzano w temperaturze +4°C przez 18 godzin, przy 39 000obr./min. za pomocą ultrawirówki Beckman L8-55 w rotorze kątowym 70-Ti służącym do izolacji preparatywnej. Po zakończeniu ultrawierowania zbierano i odrzucano górną frakcję (około 1/3 objętości)

zawierającą IDL i VLDL, natomiast pozostałą surowicę ponownie dogęszczano za pomocą KBr do gęstości  $1.063 \text{ g/cm}^3$  i ultrawirovano w tych samych warunkach co poprzednio. Po zakończeniu wirowania zbierano górną frakcję zawierającą LDL, przenoszono do worka dializacyjnego i oddializowywano KBr względem roztworu soli fizjologicznej zbuforowanej solami potasu (PBS) o pH 7,4. Dializę przeprowadzano w  $4^\circ\text{C}$ , w ciemności przez 48h wymieniając czterokrotnie płyn dializacyjny.

Uzyskane LDL sączono przez filtr Millipore o średnicy porów  $0,22\mu\text{m}$  i przechowywano w ciemności w  $+4^\circ\text{C}$  bez dostępu tlenu atmosferycznego (pod azotem) nie dłużej niż 2 tygodnie.

Stężenie białka LDL oznaczano metodą Lowry'ego [159].

### **3.5.3.2 Badanie podatności lipoprotein LDL na oksydację**

Uzyskane po dializie LDL przenoszono do  $5\mu\text{M}$  roztworu  $\text{CuSO}_4$  i inkubowano przez 4 godz. w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  łagodnie mieszając. W punktach czasowych po upływie: 30, 60, 120, 180 i 240 minut pobierano próbki w celu oznaczenia ilości produktów oksydacji lipidów (malonylodialdehyd MDA), co odzwierciedlało stopień oksydacji LDL (metoda wg Wallin i wsp. [160]). Ilość powstającego MDA mierzono za pomocą spektrofotometrycznego pomiaru absorbancji (przy długości fali 532 i 600nm) po reakcji z kwasem tiobarbiturowym.

Kinetykę oksydacji LDL wyrażano poprzez krzywą oksydacji wyznaczoną przez maksymalne stężenie TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) w 1 mg LDL (nmTBARS/mg LDL) w danych punktach czasowych.  $T_{1/2}$  – wyznaczano jako połowę czasu potrzebną do maksymalnej produkcji

TBARS. Całkowitą ilość wyprodukowanego w tym czasie MDA obliczano z pola powierzchni pod krzywą kinetyczną oksydacji LDL.

Maksymalną produkcję MDA wyrażano w nmol/mg białka LDL,  $T_{1/2}$  wyrażano w minutach, całkowita produkcja TBARS została wyrażona w jednostkach adsorbancji przy długości fali 532nm.

#### 3.5.4 Ocena fenotypu LDL

Oznaczenia fenotypu LDL (A lub B) dokonywano za metodą wg Swinkels i wsp.[161] opracowanej i zmodyfikowanej w Zakładzie Biochemii Klinicznej przez dr n. biol. Jadwigę Hartwich. Określenia u każdego badanego pacjenta wzoru podfrakcji LDL (A lub B) dokonywano za pomocą badania heterogenności składu frakcji LDL.

Badania obrazu podfrakcji LDL dokonywano poprzez ultrawierowanie w gradiencie gęstości bromku potasu próbek surowicy zabarwionej barwnikiem Coomassie Brilliant Blue R. Procedurę wirowania prowadzono w rotorze wychylnym Kontron TST 55,5 według metody Swinkles i wsp. [161] dostosowanej w tutejszej pracowni do analizowania małych objętości stosowanych roztworów z zachowaniem ich oryginalnych proporcji. Skład gradientu był następujący: na dnie przejrzystej probówki wirowniczej z poliwęglanu umieszczano 0,6 ml surowicy, której gęstość powiększano do wartości  $d=1,10$  g/ml poprzez dodanie 84 mg krystalicznego KBr, zabarwionego 20 $\mu$ l wodnego roztworu Coomassie Brilliant Blue R (15 g/l). Na próbkę surowicy kolejno nawarstwiano: 0,4 ml roztworu KBr o gęstości  $d=1,066$  g/ml, 0,6 ml roztworu KBr o gęstości  $d=1,035$  g/ml, 0,7 ml o gęstości  $d=1,020$  g/ml i 0,4 ml roztworu KBr o gęstości  $d=0,006$  g/ml. Natychmiast po nawarstwieniu rozpoczynano wirowanie próbki, które kontynuowano przez

19,5 godziny w temperaturze 20° C przy przeciążeniu 160 000 x g w rotorze wychylnym Kontron TST 55.5.

*Fenotypy LDL były identyfikowane wizualnie oraz na podstawie pomiarów densytometrycznych przezroczy wykonywanych natychmiast po zakończeniu wirowania obiektywem makro TESSAR 2,8/50 na filmach kolorowych FUJI-Chrome. Analizę obrazu obrazu podfrakcji przeprowadzano na podstawie pomiarów pola powierzchni rozdzielonych podfrakcji. Slajdy analizowano w duplikatach w densytometrze EDC HELENA Laboratories. Położenie głównego szczytu krzywej na krzywej densytometrycznej w probówce było określane w odniesieniu do środka menisku jako punktu referencyjnego.*

Wzór A (fenotyp A) LDL oznacza przewagę dużych LDL w stosunku do małych gęstych LDL (ponad 50% pola powierzchni pod krzywą densytometryczną rozdzielonych podfrakcji).

Wzór B (fenotyp A) oznacza przewagę małych cząstek w puli LDL. Za punkt odcięcia małych i dużych LDL przyjęto gęstość frakcji 1,040 g/ml.

### **3.5.5 Oznaczanie stężenia fibrynogenu**

Poziom fibrynogenu był mierzony przy użyciu metody Claussa. Po podaniu nadmiaru trombiny spektrofotometrycznie mierzono czas konwersji fibrynogenu do fibryny. Krzywe kalibracyjne czasu krzepnięcia wyznaczano przy użyciu różnych rozcieńczeń standardowego osocza. Wyniki przedstawiono w g/l.



### **3.5.6 Oznaczanie poziomu metabolitów tlenku azotu (NO<sub>x</sub>) w osoczu krwi pacjentów**

Pomiar stężenia azotanów i azotynów w osoczu krwi (NO<sub>x</sub>) przeprowadzono zmodyfikowaną w naszym Zakładzie przez dr n. biol. Ibeth Guevarę [62].

Dla podniesienia czułości metody (zahamowania syntezy azotanów z azotynów) reakcję prowadzono w obecności kwasu dwuetylenotrójaminooctowego (chelatowanie metali) oraz obniżano temperaturę mieszaniny reakcyjnej do 4°C.

Osocze wirowano (1000 g) przez 10 minut w temp. 4°C. Następnie do 200 µl medium dodawano 50 µl 6.5 nM HCl oraz 50 µl 37.5 mM kwasu sulfanilowego. Mieszaninę inkubowano przez 10 minut w łaźni lodowej, a następnie dodawano 50 µl 12.5 mM naftyetylenodwuaminy. Ponownie inkubowano próbki w łaźni lodowej przez 30 minut. Po odwirowaniu (10 000 g, 10 min., w temp. 4°C) i przeniesieniu próbek (175 µl) na mikroplątki Nunca, absorbancję odczytywano spektrofotometrycznie (aparatur Multiscan) przy długości fali 540 nm. Do wyznaczenia krzywej standardowej używano roztworu azotynu sodu w zakresie stężeń od 1 µM do 100 µM.

Generacja NO była wyrażona jako stężenie azotynów, wyniki przedstawiono w mmol/l.

### **3.5.7 Oznaczanie stężenia vWF w krwi pacjentów**

Stężenie vWF badano w osoczu chorych przy użyciu specyficznego dla vWF zestawu ELISA Asserachrom vWF (Diagnostica Stago, Francja). Zestaw zawiera przeciwciała królicze przeciw ludzkiemu vWF. Zastosowanie fragmentów przeciwciał F(ab')<sub>2</sub> eliminuje możliwość reakcji krzyżowych z

czynnikiem reumatoidalnym. Poziom detekcji metody wynosi do 0,5%. Wyniki przedstawiono w procentach (%).

### **3.5.8 Oznaczanie stężenia VEGF<sub>165</sub> w krwi pacjentów**

Poziom VEGF<sub>165</sub> badano w osoczu chorych przy użyciu specyficznego dla ludzkiego VEGF<sub>165</sub> (brak reakcji krzyżowej z innymi czynnikami wzrostu i interleukinami) zestawu ELISA (R&D-System, Wielka Brytania). Używano dwóch przeciwciał: pierwszego monoklonalnego przeciwciała specyficznego dla VEGF<sub>165</sub>, oraz drugiego poliklonalnego znakowanego peroksydazą chrzanową. Reakcję barwną wywołano przy użyciu tetrametylobenzydyny. Natężenie barwy mierzono na czytniku firmy LAB-System przy długości fali 450 nm. Każde oznaczenie wykonywano w dubletach. Zastosowany do oznaczeń zestaw pozwalał mierzyć stężenia VEGF<sub>165</sub> w szerokim stężeniu do 2000 ng/ml z czułością oznaczeń poniżej 15 ng/ml. Wyniki przedstawiono w ng/ml.

### **3.5.9 Oznaczanie stężenia $\beta$ -TG w krwi pacjentów**

Stężenie  $\beta$ -TG badano w osoczu chorych przy użyciu zestawu ELISA firmy Bohringer Mannheim (Niemcy) zawierającego przeciwciała królicze specyficzne dla ludzkiego  $\beta$ -TG. Zastosowanie fragmentów przeciwciał F(ab')<sub>2</sub> eliminuje możliwość reakcji krzyżowych z czynnikiem reumatoidalnym. Zakres stężeń badanych w tej metodzie wynosi od 5 do 200 IU/ml. Wyniki podano w IU/ml.

### **3.6 Analiza statystyczna**

Wyniki zostały zaprezentowane jako średnie wartości z odchyleniem standardowym uzyskane od wszystkich chorych w poszczególnych grupach. Dane dotyczące bezpośredniego wpływu zabiegu LDL-aferezy na stężenia substancji w ustroju chorego przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowym ze wszystkich zabiegów.

W celu oceny statystycznej istotności obserwowanych różnic stosowano test t-Studenta dla zmiennych niepowiązanych lub analizę wariancji ( ANOVA ). Przyjęto, iż znamienność statystyczna występowała przy  $p < 0.05$ .

### **3.7 Zgoda Komisji Etycznej**

Na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Etycznej do spraw Badań Klinicznych przy Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie dnia 25.10.1995 roku.

## 4. WYNIKI

### 4.1 Zmiany w stanie klinicznym pacjentów

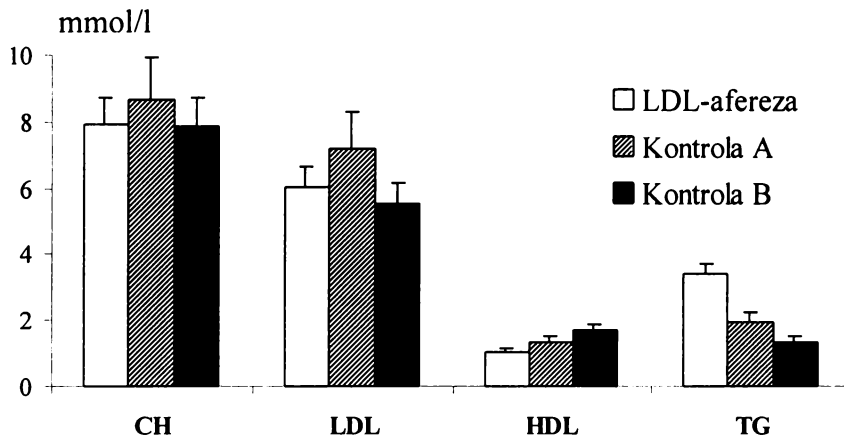
W chwili włączenia do badań grupy chorych nie różniły się pod względem częstości występowania czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca takich jak: nadciśnienie, palenie tytoniu, cukrzyca, wyjściowe stężenie cholesterolu LDL, dodatni wywiad rodzinny, wiek i płeć. Pacjenci nie mieli ciężkiej postaci nadciśnienia tętniczego (ciśnienie rozkurczowe powyżej 115 mmHg), niewydolności nerek, wątroby, niewydolności krążenia w II, III i IV klasie NYHA, cukrzycy. Frakcja wyrzutowa w wentrykulografii wynosiła od 48 do 65% (Tabela 4).

Grupa	LDL-afereza n=7	Kontrola A n=8	Kontrola B n=8	p
Wiek (lata)	57	58	56	ns
Płeć męska	7	7 (87%)	7 (87%)	ns
CCS	2.5	2.5	2.5	ns
Cukrzyca	0	1	1	ns
Palenie tytoniu obecnie	0	0	0	ns
Palenie tytoniu w przeszłości	7	6 (75%)	6 (75%)	ns
Nadciśnienie	3 (42%)	3 (37%)	4 (50%)	ns
obciążony wywiad rodzinny	7	8	8	ns
Choroba jednonaczyniowa	0	0	0	ns
Choroba wielonaczyniowa	7	8	8	ns
Frakcja wyrzutowa w wentrykulografii	55%	51%	50%	ns
Wcześniejsza rewaskularyzacja serca	0	0	0	ns

Tabela 4. Wyjściowa charakterystyka grup chorych

U chorych, po co najmniej 2 miesiącach diety ubogocholesterolowej (opis diety patrz wyżej) stwierdzono wartości cholesterolu całkowitego powyżej 6.0

mmol/l, LDL-cholesterolu powyżej 4,9 mmol/l, a triglicerydów poniżej 4 mmol/l. Z tego powodu wszyscy chorzy, przez co najmniej 2 miesiące przyjmowali simvastatynę w dawce 20 lub 40 mg na dobę. Mimo to nadal wartości cholesterolu LDL były podwyższone u pacjentów wszystkich grup (Ryc. 1).



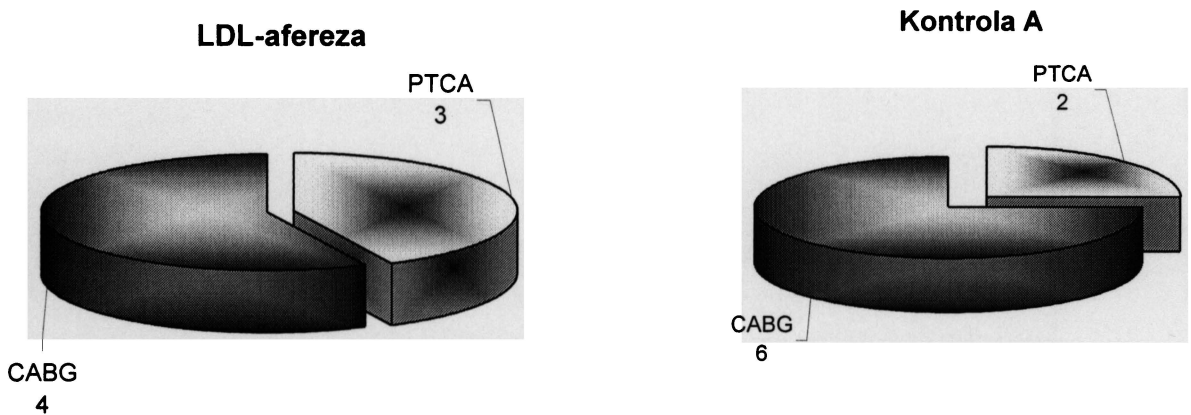
Ryc. 1 Wyjściowe stężenie cholesterolu u pacjentów leczonych aferezą LDL oraz z grup kontrolnych, po co najmniej 2 miesiącach diety niskotłuszczowej i zażywania simvastatyny w dawce 20 lub 40mg na dobę.

W grupie leczonych LDL-aferezą pomimo terapii dietą i simvastatyną poziom LDL-cholesterolu wyjściowo wynosił powyżej 3,5 mmol/l (Ryc. 1). U trzech chorych z tej grupy wykonano zabiegi pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG), natomiast czterech pacjentów poddano zabiegom przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyki (PTCA) (Ryc. 2).

Grupę kontrolną A stanowiło ośmiu pacjentów - siedmiu mężczyzn i jedna kobieta, u których wykonano zabiegi rewaskularyzacyjne tętnic wieńcowych (CABG n=6, PTCA n=2) (Ryc. 2).

Grupę kontrolną B, stanowiło ośmiu chorych (siedmiu mężczyzn i jedna kobieta), których po wykonaniu koronarografii, z powodu braku technicznych możliwości wykonania zabiegu rewaskularyzacyjnego lub brak zgody

pacjenta na jej wykonanie, zakwalifikowano jedynie do leczenia farmakologicznego choroby niedokrwiennej serca oraz hipercholesterolemii.



Ryc. 2 Zabiegi rewerskularyzacyjne u chorych leczonych LDL-aferezą oraz w grupie kontrolnej A.

Podczas badań oraz obecnie, chorzy przebywają w stałej kontroli kardiologicznej w Klinice Choroby Wieńcowej oraz II Klinice Kardiologii CM UJ. We wszystkich grupach chorych przez cały okres badań, aż do chwili obecnej kontynuowana jest terapia kardiologiczna oraz leczenie obniżające lipidy poprzez stosowanie statyn oraz diety.

Po 12 miesiącach obserwacji spośród siedmiu pacjentów leczonych aferezą LDL, sześciu chorych pozostało bez dolegliwości stenokardialnych. U jednego pacjenta po zabiegu PTCA gałęzi międzykomorowej przedniej, w piątym miesiącu po ostatnim zabiegu aferezy, nastąpił nawrót dolegliwości stenokardialnych o charakterze niestabilnej dusznicy bolesnej. W wykonanej kontrolnej koronarografii stwierdzono brak restenozy w zakresie poszerzanej uprzednio tętnicy. Stwierdzono natomiast progresję miażdżycy w zakresie

pnia lewej tętnicy wieńcowej. U chorego wykonano zabieg pomostowania aortalno-wieńcowego w trybie pilnym. W chwili zakończenia badań (po 12 miesiącach) pacjent pozostawał bez dolegliwości stenokardialnych. W wykonywanych do czasu zabiegu lipidogramach stwierdzano nieznacznie jedynie podwyższone wartości LDL-cholesterolu i triglicerydów, co może sugerować obecność innych czynników sprzyjających progresji miażdżycy u tego pacjenta.

#### **4.2 Przebieg terapii LDL-aferezą**

Przeprowadzone zabiegi LDL-aferezy były bardzo dobrze tolerowane przez pacjentów. U jednego chorego podczas pierwszego zabiegu obserwowano powolny, ok. 30 minutowy spadek ciśnienia tętniczego krwi do 80 mmHg z towarzyszącym obniżeniem załamków T w odprowadzeniach przedsercowych. Chory nie zgłaszał dolegliwości bólowych w klatce piersiowej. Zmiany te wymagały przerwania zabiegu i ustąpiły po podaniu 500 ml dekstranu 40.000. U tego samego pacjenta obserwowano także nieznaczny wzrost poziomu AspAT i ALAT w krwi (norma przekroczona 1,5 razy), co odniesiono do wpływu terapii simvastatyną (40 mg na dobę). Po obniżeniu dawki statyny do 20 mg na dobę wartości enzymów wątrobowych powróciły do normy.

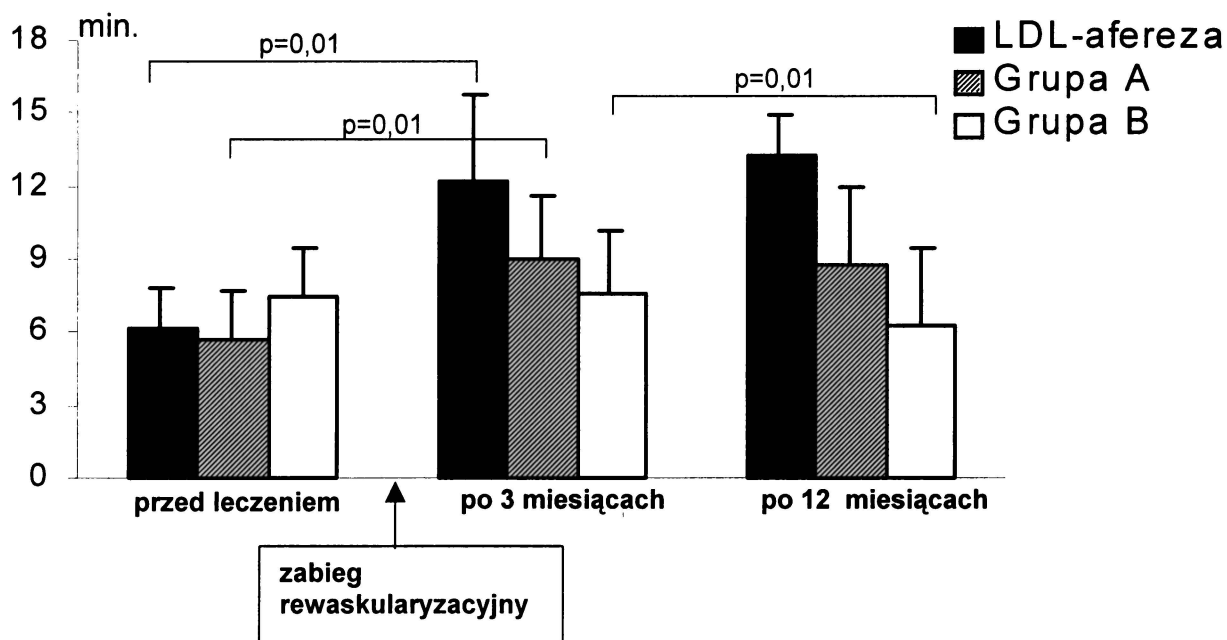
U jednego chorego z wieloletnim wywiadem alergicznym podczas zabiegów wystąpiła trzykrotnie reakcja zbliżona do pyrogennej, która wymagała przerwania zabiegu i ustąpiła po podaniu sterydów.

Głównym utrudnieniem stosowania terapii były wąskie żył obwodowe u pacjentów, co z powodu gorszego wypływu wydłużało czas trwania zabiegu (do 5 godzin).

Poza tym nie obserwowano innych ujemnych efektów ubocznych terapii. Pacjenci zgłaszali dobre samopoczucie zarówno w trakcie jak i po terapii oraz subiektywną poprawę wydolności fizycznej.

#### 4.3 Tolerancja próby wysiłkowej w badanych grupach

U chorych leczonych LDL-aferezą w okresie okołozabiegowym, po upływie 3 i 12 miesięcy od rozpoczęcia leczenia, wykonane testy wysiłkowe na bieżni ruchowej wg zmodyfikowanego protokołu Bruce'a nie wykazywały klinicznych i elektrokardiograficznych cech niedokrwienia mięśnia sercowego.



Rycina 3. Zmiany czasu trwania testu wysiłkowego u leczonych aferezą LDL oraz w grupach kontrolnych A i B. Test wg zmodyfikowanego protokołu Bruce'a,  $p=0,01$ - w stosunku do wartości po 3 miesiącach od włączenia do programu. Przedstawiono średnie czasu trwania wyników w poszczególnych grupach pacjentów (średnia  $\pm$ SD,  $n=7$  w grupie leczonych LDL-aferezą,  $n=8$  w grupie kontrolnej A i  $n=8$  w grupie kontrolnej B).

Pacjenci z grupy kontrolnej A (poddani zabiegom rewaskularyzacyjnym, leczeni simvastatyną, bez LDL-aferezy), do chwili zakończenia badań pozostawali bez dolegliwości bólowych w klatce piersiowej. Wykonane u chorych testy wysiłkowe były ujemne klinicznie i elektrokardiograficznie.



Jednak tolerancja wysiłku (czas trwania wysiłku) w tej grupie uległ nieznamiennemu statystycznie pogorszeniu po upływie 12 miesięcy od zabiegu rewerskularyzacji mięśnia sercowego (Ryc. 3).

W obu grupach leczonych zabiegami rewaskularyzacyjnymi (Grupa LDL-aferezy i Kontrola A) stwierdzono znamienne statystycznie poprawę tolerancji wysiłku po zabiegach rewaskularyzacyjnych, co było efektem przeprowadzonych zabiegów CABG i PTCA.

Spośród pacjentów grupy kontrolnej B (leczonych jedynie farmakologicznie), tolerancja wysiłku uległa stopniowemu pogorszeniu w czasie testów wysiłkowych (wykonanych bez odstawiania leków). Po 12 miesiącach kontroli spadek tolerancji wysiłku w tej grupie chorych był znamienne statystycznie w stosunku do stanu wyjściowego oraz po 3 miesiącach od włączenia do badań (Ryc.3).

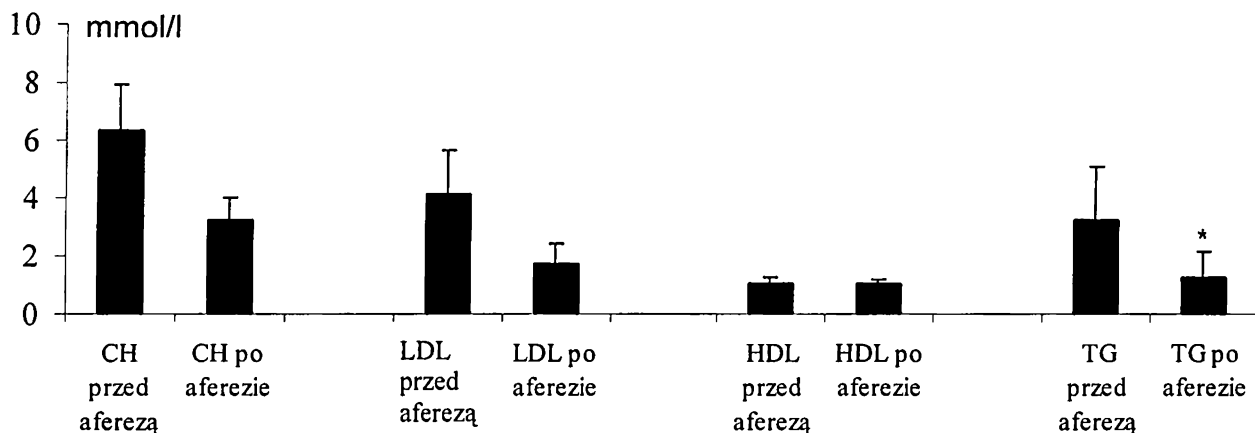
### **4.3 Wyniki badań biochemicznych**

#### **4.3.1 Badanie poziomu lipoprotein**

Po każdym zabiegu LDL-aferezy notowano znamienne statystycznie ( $p < 0,01$ ) spadek poziomu CH, LDL i TG w osoczu (Ryc. 4).

Obniżenie poziomu cholesterolu całkowitego wyniosło średnio 49%, LDL 58%, a triglicerydów 62% (średnia z 32 zabiegów LDL aferezy u 7 chorych).

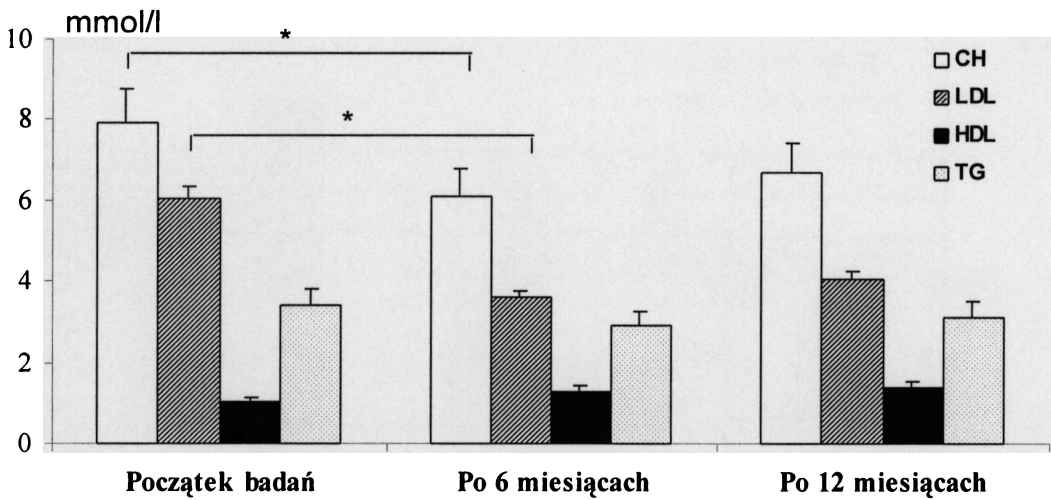
W związku z tym stwierdzono korzystne obniżenie stosunku LDL/HDL z 4,07 do 1,7, a stosunek TC/HDL uległ redukcji z 6,33 do 3,26 (wartości średnie z wszystkich przeprowadzonych zabiegów).



Ryc. 4 Poziom cholesterolu u chorych leczonych LDL-aferezą. Przedstawiono sumaryczne wyniki ze wszystkich zabiegów (n=35, średnia  $\pm$ SD, \*p<0,01 w stosunku do wartości sprzed zabiegu).

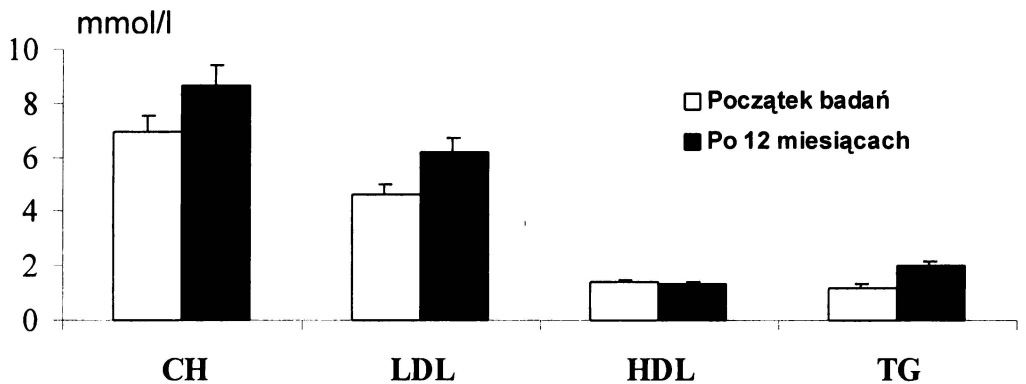
Niskie stężenie poziomu lipoprotein LDL utrzymywało się w grupie chorych leczonych LDL-aferezą przez okres 3 miesięcy terapii (Ryc. 5). Niestety zarówno w tej, jak i w grupach kontrolnych, po 12 miesiącach poziom cholesterolu przekraczał znacznie wartości rekomendowane w prewencji wtórnej przez Polskie Towarzystwo Kardiologiczne, mimo utrzymania stałej terapii simvastatyną i dietą (Ryc. 5).

Ponadto w grupach kontrolnych A i B (grupa A - chorzy leczeni wyłącznie statynami po zabiegach rewaskularyzacyjnych; grupa B - pacjenci bez zabiegów rewaskularyzacyjnych, leczeni statynami) obserwowano tendencję wzrostową stężenia cholesterolu po 6 i 12 miesiącach mimo stosowanej przez chorych terapii simvastatyną oraz diety ubogocholesterolowej.

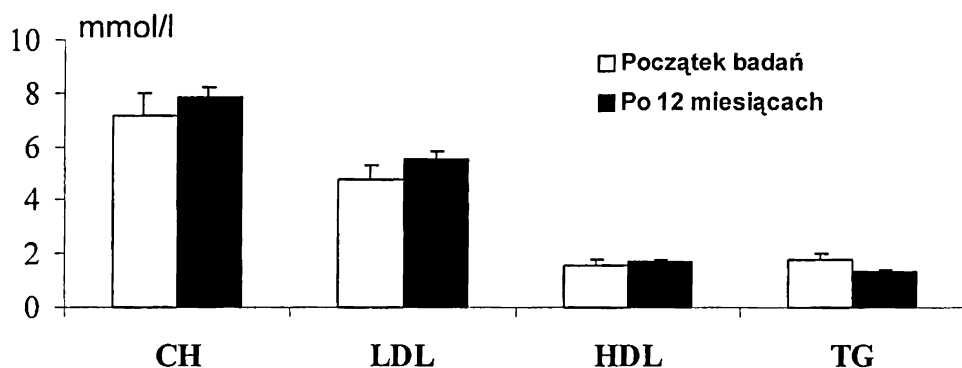


Ryc. 5 Stężenie cholesterolu u pacjentów z grupy leczonej LDL-aferezą w czasie przebiegu badań – wyniki odległe. Przedstawiono sumaryczne wyniki u wszystkich chorych (n=7, średnia  $\pm$ SD, \*p<0,05 w stosunku do wartości na początku badań).

Jak wspomniano po 12 miesiącach kontroli u wszystkich chorych stwierdzono stężenie cholesterolu LDL przewyższające wartości rekomendowane przez Polskie Towarzystwo Kardiologiczne w prewencji wtórnej choroby niedokrwiennej serca (Ryc. 6, Ryc. 7).



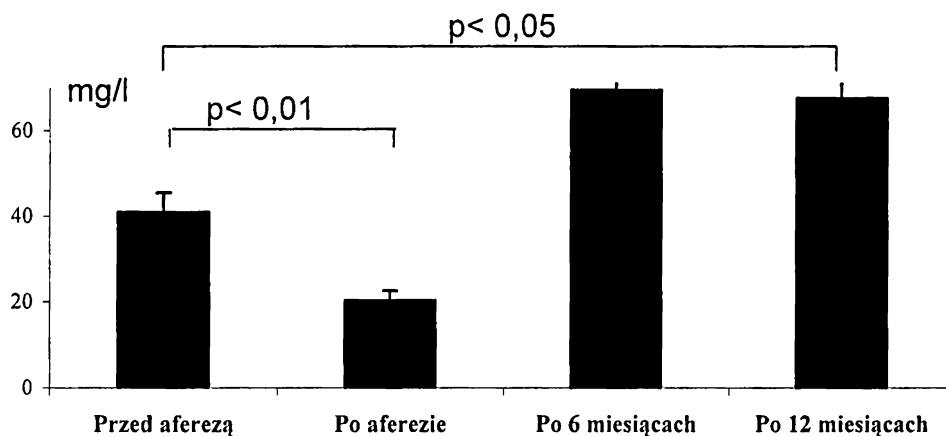
Ryc. 6. Poziom cholesterolu u pacjentów z grupy kontrolnej A na początku badań i po 12 miesiącach. Przedstawiono sumaryczne wyniki ze wszystkich chorych (n=8, średnia  $\pm$ SD, p NS).



Ryc. 7 Poziom cholesterolu u pacjentów z grupy kontrolnej B na początku badań i po 12 miesiącach. Przedstawiono sumaryczne wyniki u wszystkich chorych (n=8, średnia  $\pm$ SD, brak znamienności statystycznej).

#### 4.3.2 Zmiany poziomu Lp(a) pod wpływem terapii

W grupie chorych poddawanych zabiegom LDL-aferezy wyjściowy poziom Lp(a) był wyższy niż w grupach kontrolnych (Ryc. 8, Ryc 9). Podczas każdego zabiegu LDL-aferezy obserwowano obniżenie poziomu w krwi lipoproteiny Lp(a) (z  $40,9 \pm 12$  mg/l do  $20,3 \pm 7,5$  mg/l). Jednak między zabiegami następował stopniowy powrót stężenia Lp(a) do wartości wyjściowych.

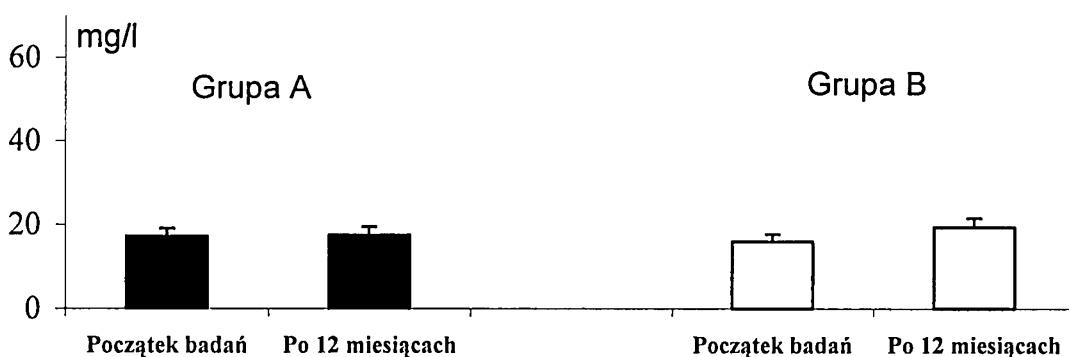


Ryc. 8. Poziom lipoproteiny Lp(a) u chorych poddawanych LDL-aferezie oraz w 12 miesięcznej kontroli. Przedstawiono sumaryczne wyniki u wszystkich chorych (n=7, średnia  $\pm$ SD).

Po 12 miesiącach obserwacji u chorych poddanych LDL-aferezie obserwowano najwyższy poziom Lp(a) 67,6mg/dl (wyższy niż wyjściowy;

$p < 0,05$ ), co świadczy o aktywnym procesie miażdżycowym, a więc i zapalnym w tej grupie pacjentów.

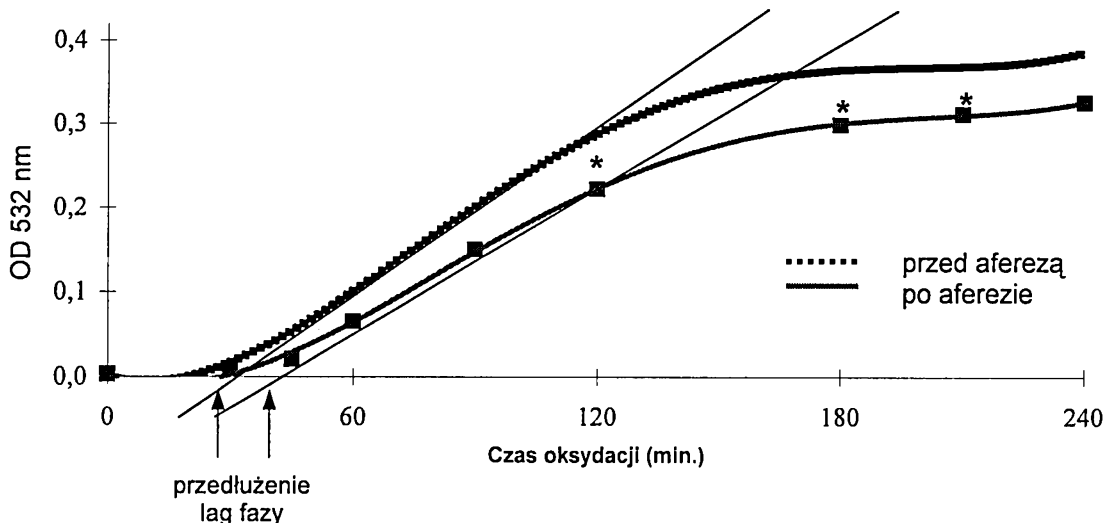
W grupach kontrolnych, gdzie obserwowano stosunkowo niski wyjściowy poziom Lp(a), nie obserwowano statystycznie znamiennych zmian przez cały okres obserwacji (Ryc. 9).



Ryc. 9 Poziom lipoproteiny Lp(a) w krwi pacjentów w grupach kontrolnych A i B. Przedstawiono sumaryczne wyniki u chorych (n=8 w każdej grupie, średnia  $\pm$ SD, brak znamienności statystycznej).

#### 4.3.3 Badanie podatności lipoprotein na modyfikację oksydacyjną

Analiza podatności frakcji LDL na oksydację wykazała, iż u chorych poddawanych zabiegom LDL-aferezy podatność frakcji LDL na oksydacyjną modyfikację *ex vivo* po każdym zabiegu była mniejsza. Przebieg krzywej oksydacji LDL u jednego chorego uśredniony dla 7 zabiegów LDL-aferezy przedstawia Ryc. 10. Na krzywej widoczne jest zmniejszenie kinetyki oksydacji po LDL-aferezie (mniejsze nachylenie krzywej oksydacyjnej, mniejsze  $T_{1/2}$ ), opóźnienie generacji MDA (przedłużenie tzw. „lag fazy”) oraz zmniejszenie pola pod krzywą kinetyczną oksydacji (mniej MDA) we frakcji LDL izolowanej z krwi pacjenta po zabiegu.



Ryc. 9 Przykładowa krzywa oksydacji LDL u chorego przed i po zabiegach LDL aferazy. Zmniejszenie kinetyki oksydacji po LDL-aferezie (mniejsze nachylenie krzywej oksydacyjnej, mniejsze  $T_{1/2}$ ), pionowe strzałki demonstrują opóźnienie generacji MDA (przedłużenie tzw. „lag fazy”) po zabiegu oraz zmniejszenie pola pod krzywą kinetyczną oksydacji (średnia z 7 zabiegów u jednego pacjenta, \* $p < 0,01$ ).

Wartości dla wszystkich chorych poddanych LDL-aferezie przedstawia Tabela 5.

Podatność LDL na oksydację in vitro	PRZED AFEREZĄ (SD)	PO AFEREZIE (SD)	% zmiany wartości parametru
- Maksymalna generacja MDA (TBARS) (nmol/mg białka LDL)	137 (30.5)	67 (27.5)*	- 51%
- ½ czasu produkcji maksymalnej ilości TBARS (min.)	105 (47.6)	118 (5.3)*	+ 12%
- Całkowita ilość TBARS (pole powierzchni pod krzywą kinetyczną oksydacji LDL) (nmol/mg białka)	45,1 (28,7)	38,8 (27,6)*	- 14%

Tabela 5. Podatność LDL na oksydację ex-vivo. Przedstawiono sumaryczne wyniki ze wszystkich zabiegów LDL-aferezy (n=32, średnia  $\pm$ SD, \* $p < 0,05$  w stosunku do wartości sprzed zabiegu).

Zmiany stopnia oksydacji LDL były przejściowe i po 9 miesiącach od ostatniego zabiegu LDL-aferezy stwierdzono powrót do wyjściowej podatności LDL na modyfikację oksydacyjną.

Natomiast w krwi chorych z grup kontrolnych po 12 miesiącach terapii statynami nie wykazano statystycznie znamiennej zmian w stosunku do badania w chwili włączenia do programu. Zarówno badanie poszczególnych grup kontrolnych A i B, jak i wszystkich chorych nie poddanych terapii LDL-aferezą nie wykazywały statystycznie znamiennej zmian co wynikało z dużej osobniczej zmienności chorych (Tabela 6).

Podatność LDL na oksydację in vitro (SD)	W CHWILI WŁĄCZENIA	PO 12 MIESIĄCACH	% zmiany wartości parametru
- Maksymalna produkcja TBARS nmol/mg białka LDL	142 (34.5)	94 (37.5)	- 44%
- 1/2 czasu produkcji maksymalnej ilości TBARS min.	115 (57.6)	118 (7.3)	- 3%
- Całkowita ilość TBARS (pole powierzchni pod krzywą kinetyczną oksydacji LDL)	35,1 (18,7)	42,8 (37,6)	+ 20%

Tabela 6. Podatność na oksydację frakcji LDL ex-vivo pacjentów leczonych statynami (grupa kontrolna A i B). Przedstawiono sumaryczne wyniki u wszystkich chorych leczonych statynami, a więc z obu grup kontrolnych - A i B (n=16, średnia  $\pm$ SD, brak znamienności statystycznej).

#### 4.3.4 Zmiany fenotypu LDL pod wpływem LDL-aferezy

Ultrawierowanie w gradiencie gęstości po każdym zabiegu wykazało zmniejszenie gęstości lipoprotein LDL. Ocena densytometryczna w 30% przypadków po zabiegu wykazała zmianę fenotypu lipoprotein LDL z aterogennego fenotypu B na mniej miażdżycorodny fenotyp A (Tabela 7).

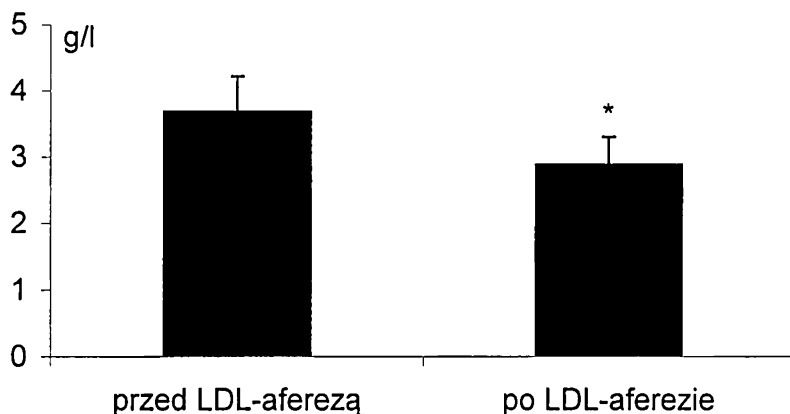


Ultrawierowanie w gradiencie gęstości	PRZED AFEREZĄ	PO AFEREZIE	% zmiany wartości parametru w całej grupie
- zakres gęstości LDL g/ml	1.027 - 1.057	1.026 - 1.045	
- LDL FENOTYP A częstość (%)	50%	80%	+ 30%*
- LDL FENOTYP B częstość (%)	50%	20%	- 30%*

Tabela 7. Zmiany gęstości lipoprotein LDL po zabiegach LDL-aferezy. Przedstawiono sumaryczne wyniki ze wszystkich zabiegów LDL-aferezy (n=32, średnia  $\pm$ SD, \*p<0,05 w stosunku do wartości sprzed zabiegu).

#### 4.3.5 Zmiany stężenia fibrynogenu pod wpływem LDL-aferezy.

U pacjentów poddawanych LDL aferezie obserwowano po każdym zabiegu obniżenie stężenia fibrynogenu o 21% (Ryc. 10).



Ryc. 10 Poziom fibrynogenu w krwi pacjentów leczonych LDL-aferezą. Przedstawiono sumaryczne wyniki u wszystkich chorych ze wszystkich zabiegów, gdzie oznaczano fibrynogen (n=29, średnia  $\pm$ SD, \*p < 0,05).

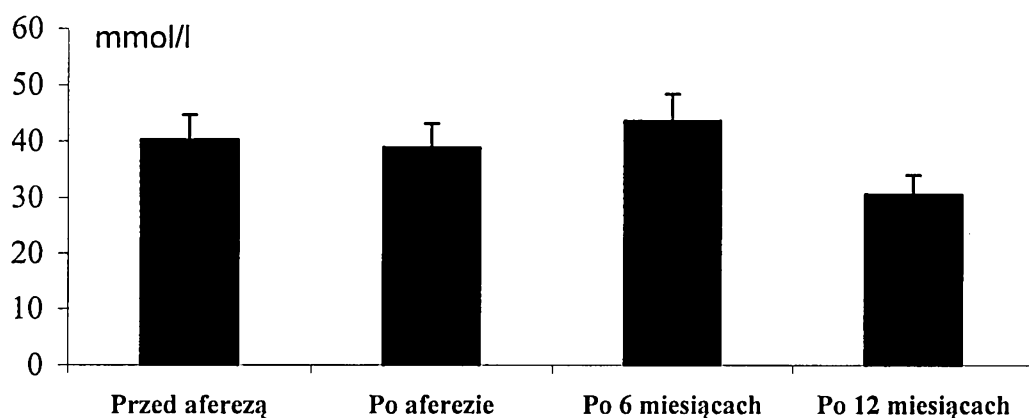
Zmiany te były przejściowe (poziom fibrynogenu powracał do stanu wyjściowego przed kolejnym zabiegiem LDL-aferezy).

Z uwagi na braki w oznaczeniach, nie przedstawiano wyników badań kontrolnych u pacjentów po 6 i 12 miesiącach ani też w grupach kontrolnych.

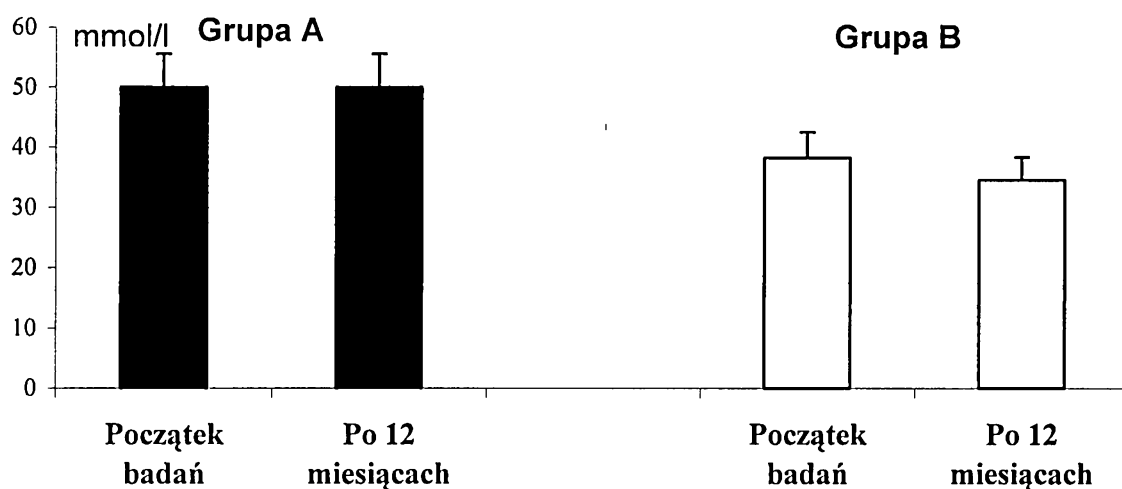


### 4.3.6 Zmiany poziomu metabolitów tlenku azotu (NOx)

Nie obserwowano statystycznie znamiennych zmian poziomu metabolitów tlenku azotu (NOx) w krwi chorych poddawanych LDL-aferezie. We wszystkich grupach pacjentów leczonych LDL-aferezą jak i grup kontrolnych obserwowano po 12 miesiącach nieznaczną tendencję do obniżenia generacji NOx (Ryc 11, 12).



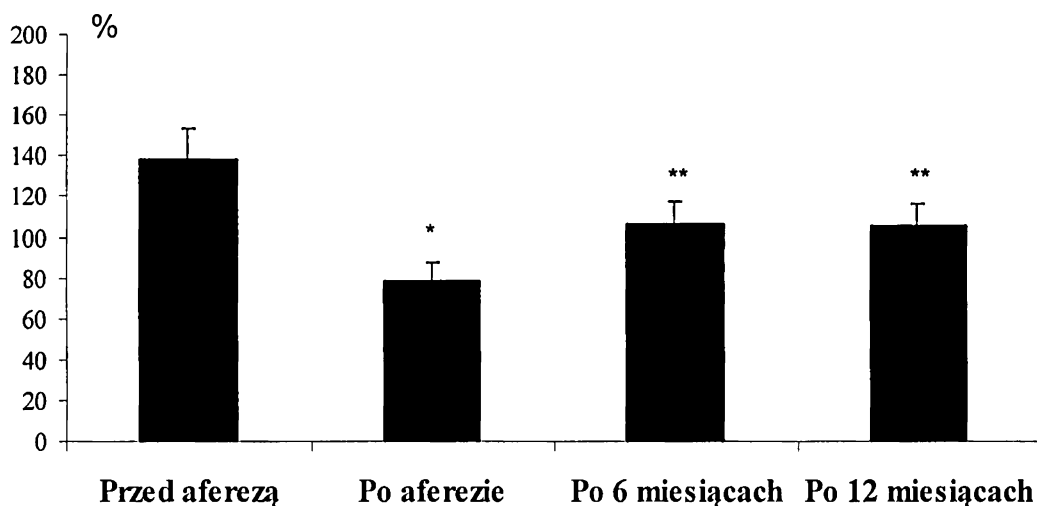
Ryc. 11 Poziom tlenku azotu po zabiegach LDL-aferezy oraz w kontroli 6 i 12 miesięcznej u chorych leczonych aferezą LDL. Przedstawiono sumaryczne wyniki u wszystkich chorych (n=7, średnia  $\pm$ SD, brak znamienności statystycznej).



Ryc. 12 Poziom tlenku azotu w spoczynku u chorych grup kontrolnych. Przedstawiono sumaryczne wyniki u wszystkich chorych (n=8 w każdej grupie, średnia  $\pm$ SD, brak znamienności statystycznej).

### 4.3.7 Zmiany poziomu czynnika vWF

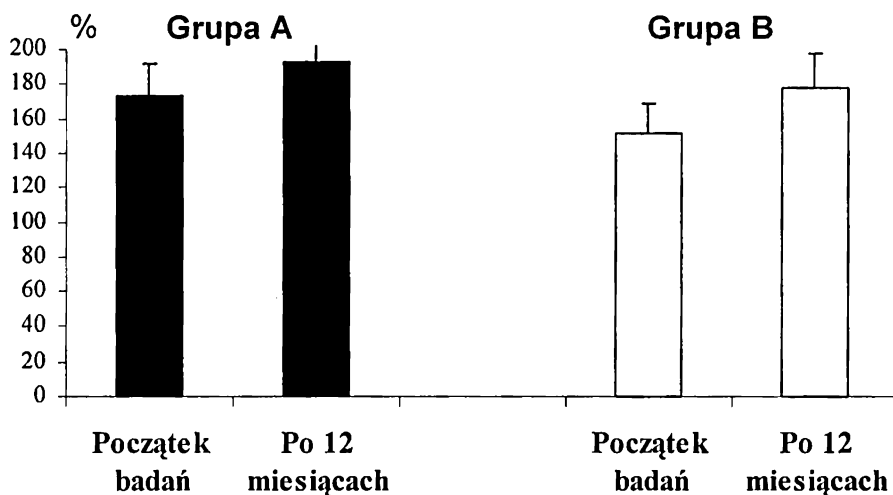
Zabiegi aferezy LDL wywoływały każdorazowo znamienne obniżenie poziomu czynnika vWF w krwi (Ryc. 13).



Ryc. 13 Stężenie czynnika vWF w czasie zabiegów aferezy LDL oraz po 6 i 12 miesiącach. Przedstawiono sumaryczne wyniki u wszystkich chorych leczonych LDL-aferezą (n=7, średnia  $\pm$ SD, \*p<0.01, \*\*p<0.05 – w stosunku do wartości w chwili włączenia do badań).

Zjawisko to może być częściowo związane utratą vWF podczas samego zabiegu, gdyż stwierdziliśmy śladową obecność tego czynnika w efluencie z kolumn filtracyjnych (stężenie vWF poniżej 0,5% - wartość śladowa poniżej detekcji). U pacjentów po 3 jak i po 9 miesiącach od ostatniego zabiegu LDL-aferezy (czyli po 6 i 12 miesiącach od rozpoczęcia programu) stwierdzano nadal obniżone stężenia czynnika vWF w stosunku do wartości oznaczanych na początku terapii (Ryc.13).

Natomiast w grupach kontrolnych obserwowano w ciągu roku stopniowy, nieznamienne statystycznie wzrost stężenia czynnika w krwi vWF (Ryc. 14)

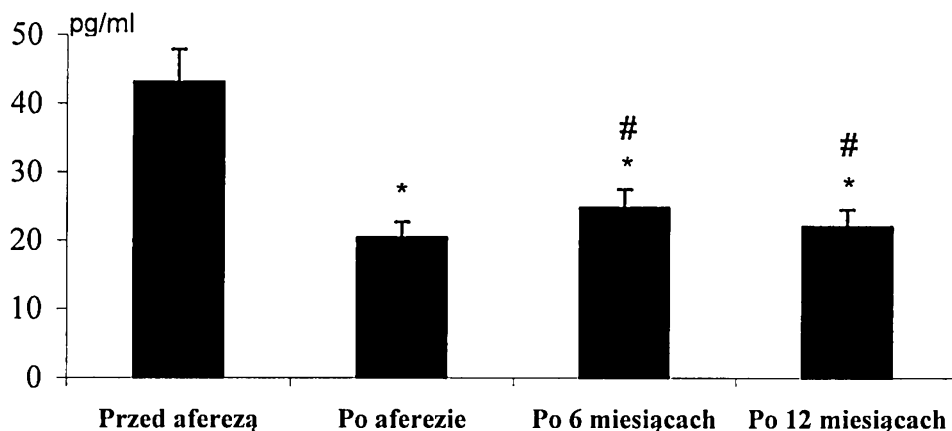


Ryc. 14 Stężenie czynnika vWF w krwi pacjentów z grup kontrolnych. Przedstawiono sumaryczne wyniki u wszystkich chorych (n=8 w każdej grupie, średnia  $\pm$ SD, brak znamienności statystycznej).

#### 4.3.8 Zmiany poziomu czynnika VEGF

Zabiegi aferezy LDL wywoływały każdorazowo znamienne obniżenie poziomu czynnika VEGF<sub>165</sub> w krwi (Ryc. 15).

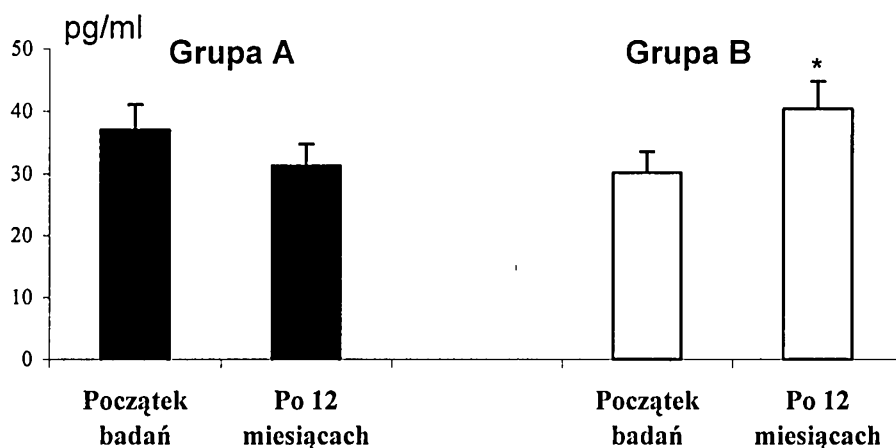
Zjawisko to może być częściowo związane utratą VEGF<sub>165</sub> podczas samego zabiegu, gdyż stwierdziliśmy śladową obecność tego białka w efluencie z kolumn filtracyjnych (stężenie VEGF<sub>165</sub> poniżej 5ng/ml - wartość śladowa poniżej detekcji). Ale u tych pacjentów po trzech jak i po dziewięciu miesiącach od ostatniego zabiegu LDL-aferezy (po sześciu i dwunastu miesiącach od rozpoczęcia programu) stwierdzano nadal obniżone stężenia czynnika VEGF<sub>165</sub> w stosunku do wartości oznaczanych na początku terapii.



Ryc. 15 Stężenie czynnika VEGF w czasie zabiegów aferezy LDL oraz w 6 i 12 miesięcznej kontroli. Przedstawiono sumaryczne wyniki u wszystkich chorych (n=7, średnia  $\pm$ SD, \*p<0.01 – w stosunku do wartości przed pierwszą aferezą, #p<0.05 – w stosunku do wartości po 3 miesiącach zabiegów LDL-aferezy).

Natomiast w grupach kontrolnych obserwowano w ciągu roku stopniowy wzrost stężenia czynnika VEGF<sub>165</sub> (Ryc. 16).

Wzrost stężenia VEGF<sub>165</sub> w grupie kontrolnej B po 12 miesiącach kontroli był znamieny statystycznie.



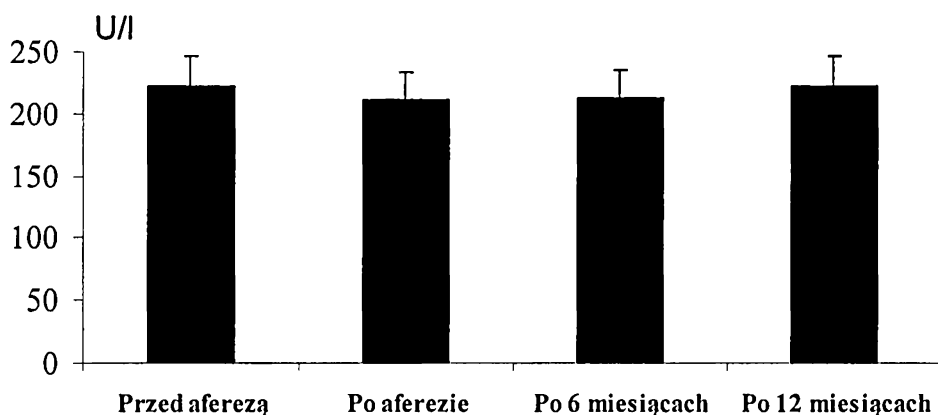
Ryc. 16 Stężenie czynnika VEGF w krwi pacjentów z grup kontrolnych. Przedstawiono sumaryczne wyniki u wszystkich chorych (n=8 w każdej grupie, średnia  $\pm$ SD, \*p<0.05 – w stosunku do wartości w chwili włączenia do badań).

#### 4.3.9 Zmiany poziomu czynnika $\beta$ -TG

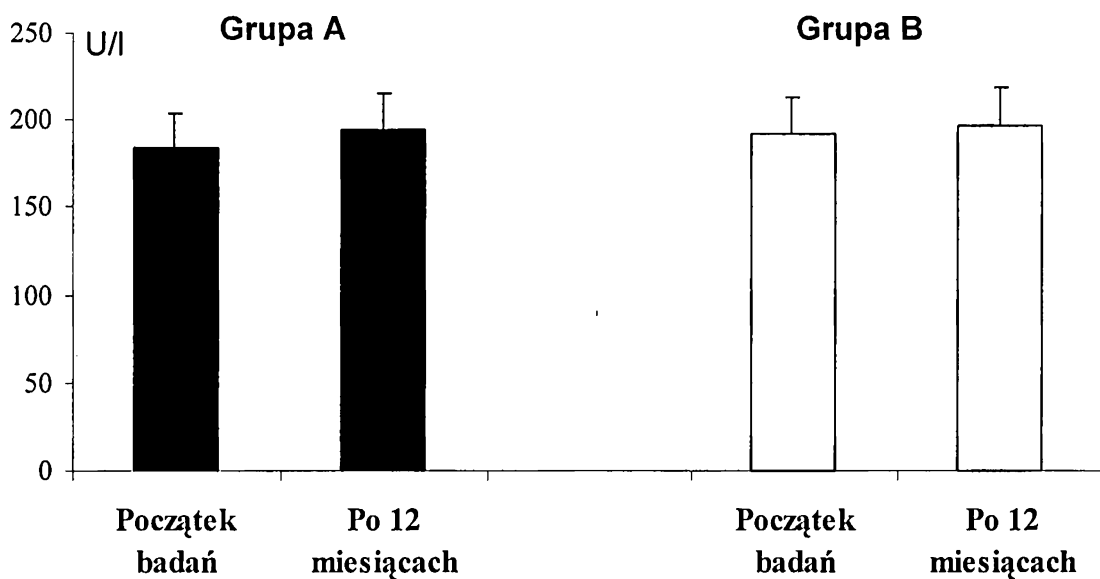
Nie obserwowano statystycznie znamiennego wpływu terapii LDL-aferezą na poziom  $\beta$ -TG w krwi chorych. Wydaje się, iż jest to konsekwencją

dobrej konstrukcji filtra osocza, który nie pozwala na przepływ płytek krwi przez układ filtrujący, co zapobiega ich aktywacji *in vivo*.

We wszystkich grupach pacjentów leczonych LDL-aferezą jak i grup kontrolnych po 12 miesiącach nie obserwowano statystycznie znamiennej zmian w stężeniu  $\beta$ -TG (Ryc 17, 18).



Ryc. 17 Stężenie  $\beta$ -TG w krwi chorych po zabiegach LDL-aferezy oraz po 6 i 12 miesiącach od włączenia do programu. Przedstawiono sumaryczne wyniki u wszystkich chorych (n=7, średnia  $\pm$ SD, p NS).



Ryc. 18 Stężenie  $\beta$ -TG u pacjentów z grup kontrolnych. Przedstawiono sumaryczne wyniki u wszystkich chorych (n=8 w każdej grupie, średnia  $\pm$ SD, p NS).

## 5. DYSKUSJA

W przedstawionych badaniach wykazano korzystny wpływ LDL-aferezy na poziom lipoprotein oraz na badane parametry funkcji śródbłonna. Utrzymanie poprawy stanu śródbłonna przez dalsze 9 miesięcy od ostatniego zabiegu LDL-aferezy może przyczyniać się do zachowanej lepszej tolerancji wysiłku w tej grupie chorych.

Do najważniejszych zmian w profilu lipidowym w wyniku zastosowania terapii LDL-aferezą należało obniżenie poziomu cholesterolu całkowitego, poziomu lipoprotein LDL, zmniejszenie poziomu zmodyfikowanych frakcji tych lipoprotein jak Lp(a) oraz obniżenie poziomu triglicerydów. Zmiany te są wynikiem usuwania przez LDL-aferezę z ustroju bardziej gęstych cząstek LDL, co wyrażało się zmianą fenotypu LDL z aterogennego typu B na mniej aterogenny typ A po zabiegu. Ponadto obserwowano zmniejszenie podatności pozostałej w krążeniu frakcji LDL na badaną *ex vivo* oksydacyjną modyfikację.

Za poprawą stanu śródbłonna przemawia obniżone stężenia czynnika vWF, a więc jego mniejsza podatność na uszkodzające działanie sił mechanicznych. Natomiast wynikiem poprawy ukrwienia tkanek jest prawdopodobnie niższy poziom VEGF<sub>165</sub>, co może wynikać z lepszej miejscowej dostępności NO i PGI<sub>2</sub> jak i z zahamowania toczącego się w blaszkach miażdżycowych procesu zapalnego. Zmiany te obserwowano nie tylko po każdym zabiegu LDL-aferezy, ale były one długotrwałe, gdyż po sześciu i dwunastu miesiącach w badaniu kontrolnym stwierdzono nadal utrzymywanie się obniżonego stężenia tych parametrów w stosunku do wartości wyjściowych.

Redukcja stężenia cholesterolu całkowitego, lipoprotein LDL i VLDL to podstawowe cele wprowadzenia metody LDL-aferezy bez względu na technikę, której użyto do usunięcia z ustroju lipoprotein podczas zabiegu. W piśmiennictwie światowym oraz w wynikach badań własnych obserwowano znaczne obniżenie stężenia wymienionych lipoprotein [153, 204, 226, 8].

Z danych z piśmiennictwa wynika, że poziom cholesterolu ( $CH > 5,2\text{mmol/l}$ ), a także lipoprotein LDL ( $LDL > 3,0\text{mmol/l}$ ) są uznanymi czynnikami ryzyka choroby niedokrwiennej serca [1,4,5,6]. Do chwili obecnej opublikowano wyniki ok. piętnastu dużych wieloośrodkowych badań z użyciem leków z grupy żywic jonowymiennych, statyn, LDL-aferezy oraz niacyny i probukolu u pacjentów z podniesionym lub normalnym stężeniem lipidów w krwi [162, 163, 164, 165, 166, 167]. W dwunastu z nich wykazano wyraźną poprawę funkcji śródbłonka mierzoną za pomocą modelu zależnego od śródbłonka rozkurczu naczyń po podaniu acetylocholiny. Przy stosowaniu terapii farmakologicznej za pomocą wyżej wymienionych leków poprawę funkcji śródbłonka obserwowano najwcześniej po dwóch tygodniach. Natomiast po zabiegu radykalnego usunięcia cholesterolu z ustroju przy użyciu LDL-aferezy takie zmiany obserwowano już po 1 godzinie od zabiegu [168].

Dane z piśmiennictwa wskazują, że poprawa stanu śródbłonka może prowadzić do stabilizacji blaszki miażdżycowej, co z kolei przyczynia się do zmniejszenia liczby incydentów wieńcowych [56,168].

Napoli i wsp. [169] obserwowali zmniejszenie podatności LDL na oksydację w trakcie prowadzenia terapii LDL-aferezą. Podobne wyniki uzyskano w badaniach LAARS (*The LDL-apheresis Atherosclerosis Regression Study*) [170]. Dowiodły one, że LDL-afereza nie tylko przyczynia się do długotrwałego spadku poziomu cholesterolu LDL, ale przede

wszystkim poprawia przepływ krwi przez mięsień sercowy u chorych z ciężką hipercholesterolemią, co jest związane z usuwaniem z krążenia toksycznych dla śródbłonna zmodyfikowanych form LDL [170]. Zmodyfikowane lipoproteiny, głównie LDL (ale też zmodyfikowane HDL[171]), wydają się mieć zasadnicze znaczenie w początkowych fazach rozwoju procesu miażdżcowego poprzez uszkodzenie funkcji komórek śródbłonna, np. przez zmniejszenie produkcji tlenku azotu i prostacykliny, aktywację płytek krwi, adhezję i migrację komórek odczynu zapalnego przebudowę ściany naczyń i mięśnia sercowego [172, 173].

Wyniki uzyskane w naszych badaniach wskazują, iż LDL-afereza ma korzystny wpływ nie tylko na stężenie lipoprotein LDL w krwi, ale w sposób istotny zmienia ich skład. Stwierdziliśmy, iż zabieg LDL-aferezy przede wszystkim usuwa małe gęste cząsteczki lipoprotein LDL (tzw. fenotyp B), które są bardziej podatne na modyfikację [174, 175]. Usunięcie ich powoduje, iż pozostała w ustroju pula cząsteczek lipoprotein LDL jest bardziej oporna na oksydację, dzięki czemu nie wpływa toksycznie na ścianę naczyń [176]. Udowodniono, że chorzy z fenotypem A lipoprotein LDL są mniej podatni na incydenty wieńcowe [191,5]. Po każdym zabiegu stwierdzaliśmy więc nie tylko zmniejszenie podatności LDL na modyfikację oksydacyjną w badaniu *ex vivo*, ale także zmniejszenie średniej gęstości cząsteczek LDL w analizie densytometrycznej. Podobne obserwacje zostały niedawno opublikowane przez zespół Tamai i wsp.[127], którzy stwierdzali, iż podczas każdego zabiegu LDL-aferezy dochodzi do eliminacji z ustroju nie tylko nadmiaru LDL, ale także form zmodyfikowanych (np. ox-LDL), co połączone było z poprawą rozkurczu naczyń w odpowiedzi na acetylocholinę [170].

Lipoproteina Lp(a) jest uznanym czynnikiem odpowiedzialnym za progresję miażdżycy [177]. Jak wykazano, skuteczne obniżenie poziomu



Lp(a) w surowicy krwi, jest możliwe przy użyciu terapii estrogenami [178] oraz LDL-aferezą [179]. Powoduje to zmniejszenie ryzyka wystąpienia zawału oraz redukcję częstości wystąpienia restenozy po zabiegach PTCA [180, 181, 182]. Lp(a) powoduje indukcję np. VCAM-1, selektyny E i P w komórkach śródbłonna wyhodowanych z naczyń wieńcowych (*cultured human coronary artery endothelial cells* - HCAEC). Zjawisko to przyczynia się do nasilenia procesu chemotaksji komórek odpowiedzi immunologicznej i odczynu zapalnego w ścianie naczyń i promuje rozwój blaszki miażdżycowej [183]. Jak wykazano wysokie stężenie Lp(a) może również hamować połączenie plazminogenu do jego miejsc receptorowych na fibrynie [184]. Ponadto Lp(a) współzawodniczy z plazminogenem o miejsce receptorowe (przyłączenie do aktywującej plazminogen aneksyny II) [185] na powierzchni nieuszkodzonych komórek śródbłonna [186]. Oba te zjawiska wiodą do zahamowania trombolizy, co przyczynia się do niekorzystnego zaburzenia równowagi pomiędzy toczącymi się równolegle w naczyniach procesami wykrzepiania i fibrynolizy.

Zarówno nasilenie procesu zapalnego przez zmodyfikowane formy LDL (jaką jest też Lp(a) [187]), jak i hamowanie fibrynolizy może sprzyjać nasilaniu powikłań miażdżycy w postaci zakrzepów i zatorów.

LDL-afereza powoduje jedynie okresową normalizację poziomu Lp(a), co obserwowaliśmy także w naszych badaniach [153]. Jakkolwiek nawet czasowa normalizacji poziomu Lp(a), w okresie bezpośrednio poprzedzającym zabieg PTCA może być zjawiskiem korzystnym. Stwierdzono bowiem, iż usunięcie Lp(a) przy użyciu LDL-aferezy bezpośrednio przed zabiegiem, powoduje zahamowanie restenozy u 37% chorych poddawanych zabiegom PTCA [188]. Chorzy poddawani zabiegom PTCA zarówno w grupie LDL-aferezy jak w grupie kontrolnej A nie

wykazywali objawów restenozy. Jednak, aby wykazać korzystny efekt takiej terapii należałoby wykonać badania na większej liczbie chorych. Obniżenie stężenia lipoprotein LDL oraz jej zmodyfikowanych form może przyczyniać się do zahamowania progresji miażdżycy oraz do zmniejszenia rozległości blaszek miażdżycowych lub zmiany ich składu. Koga i wsp.[189] przedstawili na przykład wyniki badań z zastosowaniem koronarografii ilościowej (QCA – *Quantitative Coronary Angiography*), dającej możliwość dokładnej oceny ilościowej obrazu uzyskiwanego z koronarografii oraz obraz histologiczny naczyń wieńcowych u pacjenta z hipercholesterolemią rodzinną i chorobą niedokrwienną serca oraz poziomem cholesterolu całkowitego powyżej 15 mmol/l, u którego stosowano aferezę LDL przez ponad dwa lata. W badaniach tych wykazano zmniejszenie o 14% - 20% zwężeń w 13 badanych segmentach naczyń wieńcowych oraz brak progresji zwężeń w pozostałych 10 segmentach. Badanie anatomopatologiczne wykonane po śmierci chorego, wykazało w omawianym przypadku obecność nietypowych blaszek miażdżycowych - stwardniałych, ekscentrycznych ognisk, bogatych we włókna kolagenu. Zmiany te mogą wskazywać na involucję blaszek miażdżycowych w kierunku bliznowacenia na skutek zahamowania procesu zapalnego wywołanego obecnością lipoprotein w krążeniu [189]. Podobne wyniki uzyskano w jednorocznym, prospektywnym badaniu nad skutecznością LDL aferezy powtarzanej co dwa tygodnie u 13 pacjentów ze współistniejącą chorobą niedokrwienną serca i hypercholesterolemią (LDL > 5,2 mmol/l) (*Osaka LDL-Apheresis Multicenter Trial Group*) [190].

Jednakże wyniki badań dotyczących regresji zmian morfologicznych w naczyniach nasierdziowych pod wpływem terapii LDL-aferezą nie są jednoznaczne. Regresji zmian w naczyniach wieńcowych pod wpływem LDL-aferezy nie obserwowali np. Thompson i Waidner [191, 192]. Ostatnio

opublikowane wyniki wielośrodkowego badania L-CAPS (*Low-density Apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study*) [193] przeprowadzone na 25 chorych z hipercholesterolemią wykazały nie tylko brak progresji zmian w naczyniach wieńcowych lub tylko ich nieznaczną regresję, podczas gdy w grupie kontrolnej stwierdzono znaczną progresję zmian w naczyniach wieńcowych ocenianą w QCA po 2 do 3 latach.

Wydaje się, że u podstaw tych niejednoznacznych wyników leży zmiana morfologii blaszki, a nie zmniejszanie się jej rozległości i objętości. Blaszka miażdżycowa bogata w złogi cholesterolu łatwiej pęka i częściej jest przyczyną zawału oraz niestabilnej dusznicy bolesnej. Wydaje się, że u chorych leczonych statynami oraz LDL-aferezą dochodzi do obniżenia ryzyka wystąpienia incydentów wieńcowych głównie z uwagi na stabilizację blaszki miażdżycowej oraz poprawę funkcji śródbłonka, czyli zmniejszenie trombogenności blaszki [194].

W naszych badaniach nie wykonywano kontrolnego badania koronarograficznego, ani też nie prowadzono terapii LDL-aferezą przez wystarczająco długi okres czasu, aby można się było spodziewać się regresji zmian morfologicznych w naczyniach wieńcowych. Jakkolwiek obserwowane u naszych pacjentów zmiany miały charakter czynnościowy, ale wyrażony lepszą tolerancją wysiłku w porównaniu z grupami kontrolnymi chorych, a towarzyszyła im poprawa parametrów funkcji śródbłonka jak np. obniżenie vWF i VEGF. W tym przypadku VEGF<sub>165</sub> może być traktowany jako wykładnik nasilenia procesu zapalnego i miażdżycy oraz markerem niedokrwienia tkanek [195].

Szereg badań epidemiologicznych udowodniło korelację pomiędzy podniesionym stężeniem fibrynogenu, a zapadalnością na chorobę niedokrwinną serca [196, 197]. U chorych z już rozwiniętą ChNS stężenie

fibrynogenu może być wykładnikiem zaawansowania choroby [198], ilości incydentów wieńcowych [199] oraz czynnikiem ryzyka restenozy [198] po zabiegach PTCA [200]. Poza udziałem w procesie krzepnięcia krwi i zmian w reologii krwi, wykazano, że fibrynogen może brać udział w przebudowie ściany naczyń [198-200]. W badaniach *in vitro* wykazano mitogenny wpływ fibrynogenu na mięśnie gładkie ściany naczyń [201]. Fibrynogen aktywuje także komórki mięśni gładkich ściany naczyń do proliferacji i migracji, a zwiększając agregację płytek nasila uwalnianie czynników wzrostowych (jak np. PDGF) [125]. Przenikające do ściany naczyń lub syntetyzowane przez makrofagi cząsteczki fibrynogenu mogą być czynnikiem kotwiczącym miazdźcorodne lipoproteiny w ścianie naczyń. [201].

Fibrynogen jest uważany za białko ostrej fazy generowane w wątrobie. Wysokie stężenie fibrynogenu spotyka się u pacjentów palących tytoń, osób z wysokim stężeniem lipoprotein LDL, triglicerydów, czy z cukrzycą [202]. Obniżenie wagi ciała, wysiłek fizyczny, zaprzestanie palenia oraz zastosowanie leków jak np. bezafibratu przyczyniają się do redukcji poziomu fibrynogenu [203].

LDL afereza pozwala również na okresowe usuwanie fibrynogenu z ustroju człowieka [204]. Obserwowana w naszych badaniach redukcja wyjściowego stężenia fibrynogenu o ok. 20% podczas każdego zabiegu była przejściowa i po okresie ok. 14-21 dni stężenie fibrynogenu wracało do stanu wyjściowego. Wyniki te są zbieżne z danymi opublikowanymi niemal jednocześnie przez badaczy japońskich, którzy obserwowali u swoich chorych średnio 26% redukcję stężenia fibrynogenu w krwi [205]. Redukcja stężenia fibrynogenu zmniejsza lepkość krwi [206], dzięki czemu polepszają się warunki reologii i przepływ w naczyniach. Nawet okresowa poprawa przepływu krwi, zwłaszcza w okresie okołozabiegowym sprzyja adaptacji serca i naczyń do nowych

warunków, stwarza to nadzieję, że dzięki zachowaniu równowagi procesów krzepnięcia, fibrynolizy i przebudowy naczyń może dojść do redukcji częstości restenozy po zabiegach PTCA.

Tlenek azotu (NO) jest jednym z najważniejszych czynników regulujących przepływ tkankowy krwi [47,48,49,54]. W wielu badaniach stwierdzono, że u chorych z hiperlipidemią dochodzi do hamowania ekspresji śródbłonkowej syntazy NO (eNOS), co prowadzi do obniżenia generacji tego czynnika [207,208,209]. W konsekwencji dochodzi do upośledzenia uwarunkowanego przez śródbłonek rozkurczu naczyń [210], wzrostu podatności płytek na agregację [211], wzrostu podatności monocytów na adhezję do śródbłonka naczyniowego [212], zwiększenia proliferacji komórek mięśni gładkich w naczyniach i nasilenia przebudowy ściany naczynia [210-212]. Upośledzenie generacji tlenu azotu przez śródbłonek wydaje się mieć związek z rozwojem (bądź progresją) miażdżycy u chorych z zaburzeniami lipidowymi [54,13,26,29,54,77]. W modelach zwierzęcych farmakologiczne zahamowanie syntezy NO powoduje przyspieszenie rozwoju miażdżycy, gdy zwiększenie wydzielania NO powoduje zahamowanie progresji choroby [213, 214].

Istotną rolę w procesie hamowania generacji i wydzielania tlenu azotu ze śródbłonka odgrywają zmodyfikowane formy LDL. ox-LDL hamują zależny od śródbłonka naczyniowego rozkurcz tętnic [215,216]. Zmodyfikowane LDL hamują generację NO przez bezpośrednie hamowanie NOS [217]. Udowodniono, iż ox-LDL inaktywują wydzielany z komórek śródbłonka NO [218]. Kolejnym mechanizmem upośledzającym u dyslipemicznych pacjentów biosyntezę NO może być zwiększony stres oksydacyjny. Zmodyfikowane formy LDL jak i proces fagocytozy przez komórki (np. makrofagi) zwiększa produkcję anionu ponadtlenkowego ( $O_2^-$ ), który

unieczynnienia NO [219]. Obniżenie poziomu lipidów poprzez stosowanie diety [220], leki antyoksydacyjne [221] czy dysmutaza nadtlenkowa [222] nie tylko hamują syntezę wolnych rodników, ale także poprawiają zależny od śródbłonka rozkurcz naczyń tętniczych. Nie jest też wykluczony hamujący wpływ zmodyfikowanych form lipoprotein na ekspresję genu dla eNOS jak i dla cyklooklohydrolazy, enzymu dostarczającego syntazie NO kofaktora – tetrahydrobiopteryny (BH4) [207-209,223].

Przy stosowaniu ogólnie przyjętej w badaniach klinicznych metody [143], nie obserwowaliśmy istotnych różnic w uwalnianiu NO<sub>x</sub> podczas terapii. Opisywana w piśmiennictwie natychmiastowa poprawa perfuzji tkankowej po zabiegach LDL-aferezy oraz zwiększenie rozkurczu naczynia po podaniu acetylocholin w trakcie terapii aferezą [168]. W cytowanych badaniach również nie obserwowano znamiennej zmiany stężenia metabolitów NO (NO<sub>x</sub>) w krążącej krwi [168]. Jest wysoce prawdopodobne, iż stosowaną przez nas metodą, która wykazuje zmiany NO<sub>x</sub> po wysiłku fizycznym (czyli pod wpływem działania sił "shear stress") lub po aktywacji acetylocholiną, nie można wykazać subtelnych zmian w miejscowo generowanym w ścianie naczyń NO [224]. U naszych pacjentów ze względu na stan kliniczny nie było możliwości zastosowania testów wysiłkowych bezpośrednio po każdym zabiegu LDL-aferezy, ani też nie przewidziano stosowania acetylocholin w protokole badań.

Czynnik von Willebranda (vWF) jest molekułą pośredniczącą w inicjacji adhezji płytek krwi i jest syntetyzowany (a w niewielkim stopniu magazynowany) w komórkach śródbłonka, megakariocytach i płytkach krwi [93, 225]. Z uwagi na ścisły związek pomiędzy stopniem uszkodzenia śródbłonka, a poziomem vWF czynnik ten jest uważany za wskaźnik uszkodzenia śródbłonka naczyń [129,131,176].

Wykazano, że vWF różnicuje mechaniczne uszkodzenie śródbłonka u chorych z chorobą niedokrwienną serca od „biochemicznego” uszkodzenia obserwowanego u chorych z zespołem X. U chorych z ChNS zaobserwowaliśmy po wysiłku wzrost wydzielania vWF, podczas, gdy u chorych z kardiologicznym zespołem X nie stwierdziliśmy tego efektu, co może świadczyć jedynie o zaburzeniach funkcjonalnych śródbłonka [226].

Wykazano, że dieta niskotłuszczowa i bogata w błonnik prowadzi nie tylko do obniżenia poziomu cholesterolu całkowitego, LDL, i triglicerydów lecz także obniża stężenie vWF. Może to wskazywać na poprawę stanu śródbłonka. Również w trakcie skutecznego leczenia obniżającego ciśnienie krwi u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym stężenie vWF ulega normalizacji [128]. Poprawę stanu śródbłonka wyrażaną obniżeniem poziomu vWF obserwowano również w dużych badaniach prospektywnych u kobiet leczonych substytucyjnie estrogenami [131].

W naszych badaniach stwierdzono obniżenie stężenia vWF po każdym zabiegu LDL-aferezy. Może to sugerować usuwanie czynnika vWF z ustroju przez sam zabieg. Jednakże u chorych leczonych LDL-aferezą obserwowaliśmy znamienne niższe stężenie vWF po trzech i dziewięciu miesiącach od ostatniego zabiegu LDL-aferezy w porównaniu do stanu sprzed leczenia. Natomiast w grupach kontrolnych, mimo zastosowania leczenia rewaskularyzacyjnego i terapii statynami, nie stwierdzono tego efektu. Wydaje się, więc że LDL-afereza stosowana przez trzy miesiące mogła spowodować u chorych długotrwałą poprawę funkcji śródbłonka.

W ziarnistościach alfa płytek obok czynnika płytkowego 4 (PF-4) magazynowana jest też beta - tromboglobulina ( $\beta$ -TG). Zmiany poziomu PF-4 i  $\beta$ -TG we krwi są uważane za wskaźnik aktywacji płytek *in vivo* [227]. W naszych badaniach nie stwierdziliśmy znamiennej zmiany w stężeniu  $\beta$ -TG

po zabiegach LDL-aferezy ani też zmian tego parametru w czasie kontroli 12 miesięcznej u chorych poddawanych zabiegom LDL-aferezy czy u pacjentów z grup kontrolnych.

Aktywacja angiogenezy jest fizjologiczną reakcją tkanek na niedotlenienie bądź niedokrwienie i ma na celu zwiększenie unaczynienia tkanki. Istnieje wiele czynników odpowiedzialnych za inicjację i przebieg procesu naczyniotworzenia (waskulogenezy, czyli angiogenezy) [120]. VEGF<sub>165</sub> jest jednym z istotnych czynników indukujących proliferację komórek śródbłonna, a więc inicjujących te procesy [228]. Może być on uwalniany z niedokrwionych lub niedotlenionych tkanek. Szczególnie duże stężenia VEGF<sub>165</sub> stwierdzano u chorych z miażdżycą tętnic obwodowych i ChNS, a więc u osób, u których występują strefy niedokrwienia tkanek jednocześnie z rozległym prosem zapalnym indukowanym lipoproteinami [229].

Wykazano, że niedotlenienie indukuje gen dla VEGF oraz iNOS, ale także iż VEGF<sub>165</sub> aktywuje uwalnianie tlenu azotu NO z hodowli komórek śródbłonna przez eNOS [230, 231, 232]. Udowodniono, że zmodyfikowane lipoproteiny, znajdujące się w szczególnie dużym stężeniu u chorych z hipercholesterolemią indukują uwalnianie VEGF<sub>165</sub> z makrofagów obecnych w blaszce miażdżycowej [195]. Czynniki te uwalniane w rejonie blaszki miażdżycowej powoduje zwiększenie migracji monocytów i makrofagów, a także wzrost produkcji przez te komórki czynnika tkankowego (TF) [233, 234]. Dodatkowo wykazano, że rozwojowi blaszki miażdżycowej towarzyszy powstawanie mikronaczyń w blaszce, z czym jest także związany VEGF<sub>165</sub> wydzielany przez makrofagi blaszki [235]. Mimo korzystnego działania VEGF<sub>165</sub> w procesie rewaskularyzacji niedokrwionych tkanek, wydaje się, że



czynnik ten ma działanie promujące rozwój procesu zapalnego w blaszce miażdżycowej [195].

W naszych badaniach stwierdziliśmy obniżenie stężenia VEGF<sub>165</sub> po każdym zabiegu LDL-aferezy. Podobnie jak w przypadku czynnika vWF takie zmiany mogą świadczyć o bezpośrednim usuwaniu VEGF<sub>165</sub> podczas zabiegu. Jednakże u pacjentów po 3-miesięcznej terapii LDL-aferezą jak również w odległej kontroli (po 9 miesiącach od ostatniego zabiegu) stwierdzono znamienne niższe stężenia VEGF<sub>165</sub>. Zmian takich nie obserwowano u chorych poddawanych zabiegom rewaskularyzacji i leczeniu statynami, ani też u chorych wyłącznie leczonych zachowawczo.

Zjawisko powyższe można próbować wyjaśnić w następujący sposób: obniżenie stężenia zmodyfikowanych lipoprotein przez LDL-aferezę zwiększa dostępność biologiczną NO w ścianie naczynia [236]. Powoduje to zmniejszenie stopnia niedokrwienia tkanek natychmiast po zabiegu. Polepszenie perfuzji tkankowej zmniejsza wydzielanie VEGF<sub>165</sub>. Badania prowadzone przez innych badaczy potwierdzają polepszenie przepływu tkankowego natychmiast po każdym zabiegu aferezy [170].

Z drugiej strony zmniejszenie stężenia ox-LDL przez zabieg LDL-aferezy zmniejsza proces zapalny i wydzielanie VEGF<sub>165</sub> z makrofagów. Może to hamować proces dalszej rekrutacji komórek odpowiedzi zapalnej, proces migracji komórek mięśni gładkich i mikrowaskularyzacji blaszki miażdżycowej. W ten sposób poprzez obniżenie stężenia ox-LDL może dochodzić do zahamowania procesu zapalnego towarzyszącego rozwojowi blaszki miażdżycowej [195]. Wydaje się więc, że długotrwałe obniżenie stężenia VEGF<sub>165</sub> może być korzystnym objawem.

VEGF<sub>165</sub> jest czynnikiem odpowiedzialnym za proliferacyjne zmiany naczyniowe w siatkówce u chorych z cukrzycą [237]. Dlatego obniżenie

przez LDL-aferezę nie tylko poziomu lipidów, ale też angiogennie czynnego VEGF<sub>165</sub> może przynieść dodatkowe korzystne efekty w grupie pacjentów z zaburzeniami lipidowymi i cukrzycą poddawanych zabiegom LDL-aferezy.

Tolerancja wysiłku ma ogromne znaczenie w diagnostyce oraz w rokowaniu u chorych z ChNS. Test wysiłkowy ma również duże znaczenie w ocenie stanu wydolności pacjentów z czynnikami ryzyka rozwoju miażdżycy, u których nie stwierdzono jeszcze angiograficznie istotnych zmian miażdżycowych. Dane z piśmiennictwa wskazują, że już u dzieci, z podniesionym stężeniem LDL, przy takim samym obciążeniu w teście dochodzi do znacznie większego wzrostu ciśnienia tętniczego krwi w porównaniu do jednowiekowych grup kontrolnych dzieci normolipemicznych [238]. Może to świadczyć o upośledzonej perfuzji tkanek u dzieci z podniesionym stężeniem lipidów, czyli o upośledzeniu funkcji śródbłonka. Samo obniżenie poziomu cholesterolu nie zawsze wpływa na kliniczną manifestację poprawy wydolności układu krążenia. W badaniach nad wpływem statyn na tolerancję wysiłku u chorych z hipercholesterolemią nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami leczonymi placebo w porównaniu z statyną [239]. Natomiast bardziej radykalne obniżanie stężenia cholesterolu u 44 chorych z ciężką hipercholesterolemią i bardzo znacznie nasilonymi zmianami miażdżycowymi w naczyniach wieńcowych poddawanych zabiegom LDL-aferezy w ośrodkach niemieckich przez okres ok. 15 miesięcy wykazało znaczne polepszenie tolerancji wysiłku na cykloergometrze rowerowym u 73% chorych. Jedynie u 16% stwierdzono pogorszenie tolerancji wysiłku, u czterech chorych wystąpił zgon wieńcowy [240].

W badaniach własnych porównaliśmy tolerancję wysiłku u chorych z grup leczonych rewaskularyzacyjnie i LDL-aferezą oraz poddawanych

wyłącznie rewaskularyzacji. Przebieg badań kontrolnych po sześciu i dwunastu miesiącach od zabiegu rewaskularyzacyjnego wykazał, iż chorzy poddawani zabiegom LDL-aferezy wykazywali lepszą tolerancję wysiłku na poziomie stwierdzanym bezpośrednio po zabiegu rewaskularyzacji serca. U chorych poddawanych zabiegom rewaskularyzacji serca, ale nie leczonych zabiegami LDL-aferezy (grupa kontrolna A) stwierdzono po dwunastu miesiącach od zabiegu pogorszenie tolerancji wysiłku, jakkolwiek nie było ono znamienne statystycznie. Pacjenci z obu grup byli poddawani zabiegom rewaskularyzacyjnym, jednak w grupie kontrolnej przez cały okres po zabiegu obserwowano podniesione stężenie cholesterolu ponad zalecany przez PTK poziom. Wydaje się, iż okres 3 miesięcy wykonywania zabiegów był zbyt krótki, aby wykazać statystyczną różnicę pomiędzy grupami w zakresie tolerancji wysiłku.

U pacjentów leczonych zachowawczo (grupa kontrolna B, pacjenci leczeni wyłącznie farmakoterapią) stwierdzono skrócenie czasu trwania testu wysiłkowego. Zmiany te należy przypisać progresji miażdżycy. U pacjentów z grup kontrolnych nie udało się w pełni uzyskać zalecanych przez PTK wartości cholesterolu mimo diety i farmakoterapii.

Poprawa parametrów funkcji śródbłonna i sugerowany uprzednio wzrost perfuzji tkanek może tłumaczyć utrzymanie dobrej tolerancji wysiłku u chorych z ciężką hipercholesterolemią, leczonych LDL-aferezą w odległej obserwacji. W porównaniu do kontrolnych grup chorych (nie leczonych LDL-aferezą) można stwierdzić, iż próba normalizacji poziomu lipoprotein przy pomocy diety i statyn nie jest wystarczająca u tych chorych.

Powyższe wyniki i dane z piśmiennictwa wskazują na konieczność objęcia terapią osób z genetycznie uwarunkowaną hipercholesterolemią. Z uwagi na ograniczoną możliwość zastosowania przeszczepów wątroby i

małą efektywność terapii genowej w leczeniu tej choroby, w dalszym ciągu jedyną skuteczną metodą leczenia osób z rodzinną hipercholesterolemią jest LDL-afereza [241, 242]. Obecnie jednak, ze względu na koszty terapii, wciąż jeszcze zastosowanie tej metody jest ograniczone [243].

Natomiast duże nakłady związane z zabiegami rewaskularyzacji mięśnia sercowego, kończyn i przeszczepami narządów będą w przyszłości wymuszały stosowanie tej metody u chorych z podwyższonym poziomem lipidów poddawanych wyżej wymienionym procedurom [153]. U chorych z tych grup w celu osłony naczyń po zabiegach CABG oraz w celu zapobiegania angiopatii w narządzie przeszczepionym można z dobrym skutkiem stosować LDL-aferezę [244].

Kolejnym budzącym nadzieje zastosowaniem LDL-aferezy jest leczenie wtórnej hipercholesterolemii, która nasila proces zapalny w naczyniach jak np. ma to miejsce w zespole nerczycowym. W szeregu badań udowodniono częściową remisję choroby podstawowej pod wpływem leczenia LDL-aferezą u tych pacjentów [245].

## 6. WNIOSKI

1. LDL-afereza jest objawową i wymagającą powtarzania metodą obniżającą skutecznie poziom lipidów w krwi chorych z oporną na farmakoterapię hipercholesterolemią.
2. Stosowanie LDL-aferezy powoduje nie tylko zmniejszenie poziomu aterogennych frakcji lipoprotein (LDL, Lp(a), ox-LDL), ale także przejściowo zmniejsza podatność pozostałych w ustroju frakcji na modyfikację oraz zmienia fenotyp B LDL na mniej aterogenny fenotyp A.
3. Wszystkie te zmiany prowadzą do natychmiastowej poprawy funkcji śródbłonna (mierzonej obniżeniem stężenia vWF i VEGF<sub>165</sub>), co wydaje się być efektem długotrwałym i daje chorym korzyści w postaci utrzymania dobrej tolerancji wysiłku w badaniu odległym.
4. Obniżone stężenie VEGF<sub>165</sub> i Lp(a) sugeruje korzystny wpływ LDL aferezy na towarzyszący miażdżycy proces zapalny indukowany przez ox-LDL.
5. Powyższe wyniki przemawiają za wskazanym stosowaniem terapii LDL-aferezą u chorych poddawanych zabiegom rewaskularyzacji.

## 7. STRESZCZENIE

LDL-afereza jest efektywną metodą pozaustrojowego usuwania lipoprotein LDL i VLDL z krwi, która znajduje zastosowanie w leczeniu opornych na farmakoterapię hipercholesterolemii.

**Cel badań** Celem pracy była próba określenia skuteczności LDL-aferezy w normalizacji patologicznego profilu lipidów we krwi pacjentów z zaawansowaną chorobą niedokrwienną serca oraz wpływu tych zmian na wybrane parametry funkcji śródbłonna i tolerancję wysiłku.

**Materiały i metody:** LDL-aferezę przeprowadzono u 7 mężczyzn w wieku 39-54 lat z chorobą niedokrwienną serca, zakwalifikowanych do zabiegu PTCA lub CABG, u których po miesiącu stosowania diety i farmakoterapii nadal stwierdzano poziom cholesterolu LDL w krwi powyżej 3,5 mol/l.

Pierwszą LDL-aferezę wykonywano na 2-3 dni przed rewskularyzacją, a następne w 3-7 dni po niej. Grupy kontrolne stanowili chorzy bez terapii LDL-aferezą, którzy byli poddawani zabiegom PTCA i CABG (grupa A) lub chorzy leczeni tylko zachowawczo (grupa B).

**Wyniki i wnioski:** Wykonane zabiegi LDL-aferezy prowadziły do skutecznego obniżenia poziomu cholesterolu całkowitego, LDL oraz triglicerydów, były bezpieczne dla chorych. Stosowanie LDL-aferezy, w porównaniu do grup pacjentów bez leczenia aferezą, powodowało okresowe zmniejszanie poziomu aterogennych frakcji lipoprotein (LDL, Lp(a), ox-LDL), zmniejszyło podatność pozostałych w krążeniu LDL na oksydacyjną modyfikację. Fenotyp cząsteczek LDL ulegał okresowo zmianie na mniej aterogenny. Pomimo spodziewanej aktywacji płytek krwi pod wpływem aferezy LDL nie stwierdzono wzrostu stężenia  $\beta$ -TG w surowicy. Również stężenie metabolitów NO pozostawało niezmiennione w czasie terapii.

Zaobserwowano natomiast znamienne obniżenie stężenia w krwi vWf i VEGF bezpośrednio po zabiegach aferezy jak i w odległej kontroli, co może być wyrazem poprawy funkcji śródbłonna oraz zmniejszenia natężenia stanu zapalnego związanego z rozwojem miażdżycy. Obserwacje te mogą tłumaczyć zachowaną dobrą tolerancję wysiłku u chorych leczonych aferezą nawet w odległej (12 miesięcznej) kontroli. W grupach kontrolnych obserwowano stopniowy spadek tolerancji wysiłku i pogorszenie badanych parametrów funkcji śródbłonna co może świadczyć o postępie miażdżycy w tej grupie chorych.

## 8. PIŚMIENICTWO

---

- 1 Castelli, W.P.; Garrison, R.J.; Wilson P.W.F. et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 1986; 256: 2835-8.
- 2 . Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. National Cholesterol Education Program: second report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). *Circulation*. 1994;89:1329-1445
- 3 Rossouw JE, Lewis B, Rifkind BM. The value of lowering cholesterol after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1990;323:1112-1119
- 4 Smith SC, Blair SN, Criqui MH, et al, Secondary Prevention Panel. Preventing heart attack and death in patients with coronary disease. *Circulation*. 1995;92:2-4
- 5 Schepers J., Cobbe S.M., Ford I., et al. For the West of Scotland Coronary Prevention Study Group: Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N.Engl. J Med*. 1995; 333: 1301.
- 6 Scandinavian Simvastatin Survival Study Group: Baseline serum cholesterol and treatment effect in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1995; 345: 1274
- 7 Goodman DS. The National Cholesterol Education Program: guidelines, status, and issues. *American Journal of Medicine*. 90(2A):32S-35S, 1991
- 8 Partyka Ł, Konduracka E, Bartuś S, Dudek D, Piwowarska W, Dubiel J, Dziatkowiak A, Dembińska-Kieć A. LDL-afereza przegląd badań klinicznych. *Kardiologia Polska* 1997; 47 155-162
- 9 Thompson G.R., Barbir M., Okabayashi K., i wsp.: Plasmapheresis in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 1989, 9, 1152-7
- 10 Thier J., Seidel D.: LDL - apheresis: clinical experience and indications in the treatment of severe hypercholesterolemia. *Transfus. Sci.* 1993, 14, 249 - 259
- 11 Kitano Y., Thompson G.R.: Role of LDL apheresis in the management of hypercholesterolemia. *Transfus. Sci.* 1993, 14, 269-80
- 12 Phillips NR, Waters D, Havel RJ. Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease, evaluated by angiography and clinical events. *Circulation*. 1993;88:2762-2770
- 13 . Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis: current concepts. *JAMA*. 1990;264:3047-3052
- 14 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.
- 15 Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelium-derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest*. 1992;89:10-18
- 16 Crawford DW, Blankenhorn DH. Arterial wall oxygenation, oxyradicals, and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1991;89:97-108
- 17 Hollander W, Prusty S, Kirkpatrick PJ, Nagraj S. Role of hypertension in ischemic heart disease in the cynomolgus monkey with coarctation of the aorta. *Circ Res*. 1977;40(suppl 1):70-83
- 18 Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. Multiple Risk Factor Intervention Trial: risk factor changes and mortality results. *JAMA*. 1982;248:1465-1477
- 19 Pekkanen J, Nissinen A, Punsar S, Karvonen MJ. Short- and long-term association of serum cholesterol with mortality: the 25-year follow-up of the Finnish cohorts of the Seven Countries Study. *Am J Epidemiol*. 1992;135:1251-1258
- 20 Assmann G, Schulte H. Relation of high density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). *Am J Cardiol* 1992;70:733-737

- 
- 21 Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol [see comments] [published erratum appears in *Lancet* 1997 Jan 18;349(9046):214
  - 22 Rogler G, Lackner KJ, Schmitz G. Effects of fluvastatin on growth of porcine and human vascular smooth muscle cells in vitro. *Am J Cardiol* 1995; 76: 114A-16A
  - 23 Straznicky NE, Howes LG, Lam W, Louis WJ. Effects of pravastatin on cardiovascular reactivity to norepinephrine and angiotensin II in patients with hypercholesterolemia and systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1995; 75: 582-86.
  - 24 Le Quan Sang KH, Levenson J, Megnien JL, Simon A, Devynck MA. Platelet cytosolic Ca<sup>2+</sup> and membrane dynamics in patients with hypercholesterolemia. Effects of pravastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 759-64.
  - 25 McPherson R, Tsoukas C, Baines MG, et al. Effects of lovastatin on natural killer cell function and other immunological parameters in man. *J Clin Immunol* 1993; 13: 439-44.
  - 26 Chowieńczyk PJ; Watts GF; Cockcroft JR; Ritter JM. Impaired endothelium-dependent vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolaemia. *Lancet* 1992, 340(8833):1430-2.
  - 27 Creager MA; Cooke JP; Mendelsohn ME; Gallagher SJ; Coleman SM; Loscalzo J; Dzau VJ.
  - 28 Egashira, Kensuke; Hirooka, Yoshitaka; Kai, Hisashi; Sugimachi, Masaru; Suzuki, Satoshi; Inou, Tetsuzi; Takeshita, Akira Reduction in Serum Cholesterol With Pravastatin Improves Endothelium-Dependent Coronary Vasomotion in Patients With Hypercholesterolemia. *Circulation* 1994, 89(6) 2519-2524
  - 29 Leung WH; Lau CP; Wong CK. Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolaemic patients. *Lancet* 1993; 341 (8859):1496-500.
  - 30 Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. [Review] [76 refs] *New England Journal of Medicine*. 337(6):408-16, 1997
  - 31 Hamsten A, Wiman B, De Faire U, Blombäck M. Increased levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1985;313:1557-1563
  - 32 Newby DE, Wright RA, Labinjoh C, Ludlam CA, Fox KA, Boon NA, Webb DJ. Endothelial dysfunction, impaired endogenous fibrinolysis, and cigarette smoking: a mechanism for arterial thrombosis and myocardial infarction. *Circulation*. 99(11):1411-5, 1999
  - 33 Barabino, G., L.V. McIntire, S.G. Eskin, D.A. Sears, and M. Udden. 1987. Endothelial cell interactions with sickle cell, sickle trait, mechanically injured, and normal erythrocytes under controlled flow. *Blood*. 70:152-157
  - 34 Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*. 1992;140:665-673
  - 35 Rosenfeld ME, Tsukada T, Gown AM, Ross R. Fatty streak initiation in Watanabe heritable hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis*. 1987;7:9-23
  - 36 Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease [see comments]. [Review] [149 refs] *New England Journal of Medicine*. 340(2):115-26, 1999
  - 37 Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. *Circulation*. 1994;90:775-778
  - 38 Matsumoto A, Naito M, Itakura H, Ikemoto S, Asaoka H, Hayakawa I, Kanamori H. Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:9133-9137
  - 39 Klouche M, Gottschling S, Gerl V, Hell W, Husmann M, Dorweiler B, Messner M, Bhakdi S. Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL: selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*. 18(9):1376-85, 1998



- 
- 40 Vora DK., Fang ZT, Liva SM., Tyner TR., Parhami F., Watson AD., Drake TA., Territo MC., Berliner JA. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins *Circ. Res.* 1997; 80: 810-818.
- 41 Frostegard J. Nilsson J. Haegerstrand A. Hamsten A. Wigzell H. Gidlund M. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 87(3):904-8, 1990
- 42 Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Chun T-H, Ogawa Y, Igaki T, Yamashita J, Doi K, Masatsugu K, Nakao K. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human coronary atherosclerosis and its gene regulation by oxidized LDL (Ox-LDL): VEGF as a possible progression factor for human atherosclerosis. *Circulation.* 1997;96(suppl I):I-2.
- 43 Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood.* 1996;87:3336-3343
- 44 Furchgott R.F, Zawadzki J.V., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 1980, 373-376
- 45 Griffith T.M. Edwards D.H., Lewis M.J., Newby A.C., Henderson A.H. The nature of endothelium-derived relaxant factor. *Nature (Lond).* 1984, 308, 645-647
- 46 Rapoport R.M., Murad F. Agonist induced endothelium dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circ.Res.* 1983, 52, 352-357
- 47 Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature (London)*, 1987, 327, 524-526
- 48 Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad Sci.USA.* 1987, 84, 9265-9269.
- 49 Ignarro L.J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 535-60
- 50 Lopez JA, Armstrong ML, Piegors DJ, Heistad DD, Effect of early and advanced atherosclerosis on vascular responses to serotonin, thromboxane A<sub>2</sub>, and ADP. *Circulation*, 1989, 79, 698-705
- 51 Gollino P., Piscione F., Willerson J.T., Divergent effects of serotonin on coronary artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N Engl J Med*, 1991,324,641-8
- 52 Gryglewski R.J., Palmer R.M.J., Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature (London)*, 1986, 320, 454-456
- 53 Hibbs J.B., Jr, Taintor R.R., Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role of L-arginine deiminase activity and imino- nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987. 235, 473-476.
- 54 Moncada S.R., Palmer M.J., Higgs E.A., Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev.*1991,43,109-142
- 55 Stamler J.S, Simon D.I., Osborne J.A., Mullins M.E., Jaraki O., Michle T., Singel D.J., Loscalzo J., S-Nitrosylation of protein with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc.Natl.Acad Sci USA* 1992, 89, 444-448
- 56 Bredt D.S., Hwang P.M., Snyder S.H., Localisation of nitric oxide synthase indicating a neural role of nitric oxide. *Nature (London)* 1990,347,768-770
- 57 Förstermann U. Nakane M. Tracey W.R. Pollock J.S., Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur.Heart.J.* 1993,14,10-15
- 58 Nathan, C., and Q.-W. Xie. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269:13725-13728.
- 59 Ignarro, L.J. 1990. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30:535-560.

- 
- 60 . Feron, O., L. Belhassen, L. Kobzik, T.W. Smith, R.A. Kelly, and T. Michel. 1996. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271:22810-22814
- 61 Murad F. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *JAMA.* 1996;276:1189-1192
- 62 Murad F, ed. Cyclic GMP synthesis, metabolism and function. In: *Advances in Pharmacology.* New York, NY: Academic Press; 1994;26:1-335
- 63 Knowles R.G., Moncada S., Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J.* 1994,298,249-258
- 64 Dembińska-Kieć A., Żmuda A., Wenhryniewicz O., Stachura J., Peskar B.A., Gryglewski R.J.: Selectin-P-mediated adherence of platelets to neutrophils is regulated by prostanoids and nitric oxide. *Int J Tiss Reac* 1993, XV (2), 55-64.
- 65 Mollace V, Salvemini D, Anggard E, Vane JR: nitric oxide from vascular smooth muscle cells: regulation of platelet reactivity and smooth muscle cell guanylate cyclase. *Br J Pharmacol*, 1991, 104, 633-8
- 66 Mathew V, Cannan CR, Miller VM, Barber DA, Hasdai D, Schwartz RS, Holmes DR Jr, Lerman A. Enhanced endothelin mediated coronary vasoconstriction and attenuated basal nitric oxide activity in experimental hypercholesterolemia. *Circulation.* 1997;96:1930-1936.
- 67 Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *Journal of Clinical Investigation.* 89(1):10-8, 1992
- 68 Cosentino F, Katusic ZS. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation.* 1995;91:139-144
- 69 Laufs U., Fata V., Plutzky J., Liao JK. Upregulation of endothelial Nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase Inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1129-1135
- 70 John SS., Schlaich M., Lagenfeld M., Weiprecht H., Schmitz G., Weidinger G., Schmieder R. Increased bioavailability of nitric oxide after lipid lowering therapy in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 1998; 98: 211-216.
- 71 Egashira K, Hirooka Y, Kai H, et al. Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolaemia. *Circulation* 1994; 89: 2519-24.
- 72 Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1995; 322: 481-87
- 73 Eichstadt HW, Eskotter H, Hoffman I, Amthauer HW, Weidinger G. Improvement of myocardial perfusion by short-term fluvastatin therapy in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1995; 76: 122A-25A.
- 74 Wever R; Luscher T. Cosentino F; Rabelink TJ Atherosclerosis and the Two Faces of Endothelial Nitric Oxide Synthase *Circulation.* 1998;97:108-112
- 75 Gorren ACF, List BM, Schrammel A, Pitters E, Hemmens B, Werner ER, Schmidt K, Mayer B. Tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric oxide synthase: evidence for two identical highly anticooperative pteridine binding sites. *Biochem.* 1996;35:16735-16745.
- 76 Heinzl B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J.* 1992;281(pt 3):627-630.
- 77 . Creager MA, Selwyn A. When 'normal' cholesterol levels injure the endothelium [editorial; comment]. [Review] [36 refs] *Circulation.* 96(10):3255-7, 1997
- 78 Gollino P., Piscione F., Willerson J.T., Divergent effects of serotonin on coronary artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N Engl J Med*, 1991,324,641-8
- 79 Mathew Verghese, M.D; Hasdai, David M.D; Lerman, Amir M.D The Role of Endothelin in Coronary Atherosclerosis *Mayo Clin Proc* 1996; 71:769-777

- 
- 80 MacFaden E.P., Clarke J.G., Davies G.J., Kaski J.C., Haider A.W., Maseri A., Effect of intracoronary serotonin on coronary vessels in patients with stable angina and patients with variant angina. *N Eng J Med*, 1991,324,648-54
- 81 Vrints C., Bult H., Bosmans J., Herman A., Snoeck J., Paradoxical vasoconstriction as a result of acetylcholine and serotonin in diseased human coronary arteries. *Eur Heart J*, 1992,13,824-31
- 82 . Lerman A, Holmes Dr Jr, Bell MR, Garratt KN, Nishimura RA, Burnett JC Jr. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 1995; 92:2426-2431
- 83 Ray SG, McMurray JJ, Morton JJ, Dargie HJ. Circulating endothelin in acute ischaemic syndromes. *Br Heart J* 1992; 67:383-386
- 84 Mathew V. Hasdai D. Lerman A. The role of endothelin in coronary atherosclerosis. [Review] [76 refs] *Mayo Clinic Proceedings*. 71(8):769-77, 1996
- 85 Luscher TF, Oemar BS, Boulanger CM, Hahn AWA. Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors. Part I. Part II. *J Hypertens* 1993; 11:7-11; 121-126
- 86 Haller H, Schaberg T, Lindschau C, Lode H, Distler A. Endothelin increases  $[Ca^{2+}]_i$ , protein phosphorylation, and  $O_2^{\text{minus}}$  production in human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1991; 261:L478-L484
- 87 Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992; 70:1191-1197
- 88 Weber H, Webb ML, Serafino R, Taylor DS, Moreland S, Norman J, et al. Endothelin-1 and angiotensin-II stimulate delayed mitogenesis in cultured rat aortic smooth muscle cells: evidence for common signaling mechanisms. *Mol Endocrinol* 1994; 8:148-158
- 89 Vane J.R. Botting R.M. Regulatory mechanism of the vascular endothelium. *An Update. Pol. J. Pharmacol.*,46,1994,499-521.
- 90 Yarnell JWG, Baker IA, Sweetnam PM et al. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischaemic heart disease. *Circulation* 1991; 83: 836-44.
- 91 Lip GY. Blann AD. Jones AF. Lip PL. Beevers DG. Relation of endothelium, thrombogenesis, and hemorheology in systemic hypertension to ethnicity and left ventricular hypertrophy. *American Journal of Cardiology*. 80(12):1566-71, 1997
- 92 Olofsson BO, Dahlen G, Nilsson TK. Evidence for increased levels of plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator in plasma of patients with angiographically verified coronary artery disease. *Eur Heart J*. 1989;10:77-82
- 93 Tefferi A. Nichols WL. Acquired von Willebrand disease: concise review of occurrence, diagnosis, pathogenesis, and treatment. [Review] [93 refs] *American Journal of Medicine*. 103(6):536-40, 1997
- 94 Ali MN. Villarreal-Levy G. Schafer AI. The role of thrombin and thrombin inhibitors in coronary angioplasty. [Review] [78 refs] *Chest*. 108(5):1409-19, 1995
- 95 Nichols WL. Heit JA. Activated protein C resistance and thrombosis. [Review] [6 refs] *Mayo Clinic Proceedings*. 71(9):897-8, 1996
- 96 Seigneur M. Dufourcq P. Conri C. Constans J. Mercie P. Pruvost A. Boisseau M. Plasma thrombomodulin: new approach of endothelium damage. [Review] [33 refs] *International Angiology*. 12(4):355-9, 1993
- 97 Dembińska-Kieć A. Gryglewska T., Żmuda A., Gryglewski R. J. The generation of prostacyclin by arteries and by coronary vascular bed is reduced in experimental atherosclerosis in rabbits. *Prostaglandins* 1977,14,1025-1035.
- 98 Tremoli E. Camera M. Toschi V. Colli S. Tissue factor in atherosclerosis. [Review] [115 refs] *Atherosclerosis*. 144(2):273-83, 1999
- 99 Napoleone-E; Di-Santo-A; Lorenzet-R; *Blood*. 1997 Jan 15; 89(2): 541-9
- 100 Broze, G.J., Jr. 1992. The role of tissue factor pathway inhibitor in a revised coagulation cascade. *Semin. Hematol*. 29:159-169

- 
- 101 Ishii H; Horie S; Kizaki K; Kazama M; Blood 1992; 80: 2556-62
- 102 Brown BG, Zhao X-Q, Sacco DE, Albers JJ. Lipid lowering and plaque regression: new insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation*. 1993;87:1781-1791
- 103 Mann KG, van't Veer C, Cawthorn K, Butenas S. The role of the tissue factor pathway in initiation of coagulation. [Review] [14 refs] *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 9 Suppl 1:S3-7, 1998
- 104 Ruf W. The interaction of activated factor VII with tissue factor: insight into the mechanism of cofactor-mediated activation of activated factor VII. [Review] [45 refs] *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 9 Suppl 1:S73-8, 1998
- 105 Rapaport, S.I. 1989. Inhibition of factor VIIa/tissue factor-induced blood coagulation: with particular emphasis upon a factor Xa-dependent inhibitory mechanism. *Blood*. 73:359-365
- 106 Warn-Cramer, B.J., L.V. Rao, S.L. Maki, and S.I. Rapaport. 1988. Modifications of extrinsic pathway inhibitor (EPI) and factor Xa that affect their ability to interact and to inhibit factor VIIa/tissue factor: evidence for a twostep model of inhibition. *Thromb. Haemost.* 60:453-456
- 107 Sobel BE. Increased plasminogen activator inhibitor-1 and vasculopathy. A reconcilable paradox [editorial]. [Review] [41 refs] *Circulation*. 99(19):2496-8, 1999
- 108 . Gryglewski RJ. Endothelial nitric oxide, prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and tissue plasminogen activator (t-PA): alliance or neutrality?. [Review] [22 refs] *Polish Journal of Pharmacology*. 47(5):467-72, 1995
- 109 Carmeliet-P; Moons-L; Dewerchin-M; Mackman-N; Luther-T; Breier-G; Ploplis-V; Muller-M; Nagy-A; Plow-E; Gerard-R; Edgington-T; Risau-W; Collen-D: *Ann-N-Y-Acad-Sci*. 1997 Apr 15; 811: 191-206
- 110 Christ-G; Hufnagl-P; Kaun-C; Mundigler-G; Laufer-G; Huber-K; Wojta-J; Binder-BR: *Arterioscler-Thromb-Vasc-Biol*. 1997 Apr; 17(4): 723-30
- 111 Lenzi-S; Scanu-A; De-Caterina-R: *G-Ital-Cardiol*. 1996 Oct; 26(10): 1203-25
- 112 Lip GY, Jones AF. Lipoprotein (a) and vascular disease: thrombogenesis and atherogenesis. [Review] [121 refs] *QJM*. 88(8):529-39, 1995
- 113 Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low-density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:2995-8
- 114 Scanu AM, Lawn RM, Berg K. Lipoprotein(a) and atherosclerosis. *Ann Intern Med*. 1991;115:209-18
- 115 Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu AM. Lipoprotein(a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis*. 1990;10:240-5.
- 116 Ferrara N., Henzel W.J., Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 161, 851-858
- 117 Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EH, Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol*, 1993, 264, 995-1002
- 118 Levy Ap, Levy NS, Loscalzo J, Calderone A, Takahashi N, Yeo KT, Koren G, Colucci W, Goldberg MA, regulation of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *Circ res*, 1995, 76, 758-766
- 119 Senger D.R., Van De Water L., Brown L.F., Nagy J.A., Yeo K.T., Yeo T.K., Berse B., Jackman R.W., Dvorak A.M., Dvorak H.F., Vascular Permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev*, 1993,12,303-324
- 120 Dvorak HF, Brown LF, Detmar M., Dvorak AM, Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Path*, 1995, 146, 1029-1039
- 121 Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E., Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 1992 , 359 (6398, 843-5

- 
- 122 Stavri GT, Hong Y, Zachary IC, Breier G, Baskerville PA, Yla-Herttuala S, Risau W, Martin JF, Erusalimsky JD, Hypoxia and platelet-derived growth factor-BB synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters*, 1995, 358, 311-315
- 123 Partyka L, Dembińska-Kieć A. Huk I., Dulak J., Weigel G., Dudek D., Mutual regulation of vascular endothelial growth factor and nitric oxide in blood vessel wall. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1997; 27: suppl. 1, abstract 7
- 124 Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA: Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am. J. Physiol.* 1993; 265 (2 Pt 2): H586-92
- 125 Dembinska-Kiec A. Dulak J. Partyka L. Krzesz R. Dudek D. Bartus S. Polus M. Guevara I. Wybranska I. Krzeminski T. Induction of nitric oxide synthase (NOS) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in experimental model of angioplasty and heart ischemia. *Advances in Experimental Medicine & Biology*. 433:163-7, 1997
- 126 Mayhan WG. VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. *American Journal of Physiology*. 276(5 Pt 1):C1148-53, 1999
- 127 . Dembinska-Kiec A. Dulak J. Partyka L. Huk I. Mailnski T. VEGF-nitric oxide reciprocal regulation. *Nature Medicine*. 3(11):1177, 1997
- 128 Perutelli P. Biglino P. Mori PG. von Willebrand factor: biological function and molecular defects [see comments]. [Review] [68 refs] *Pediatric Hematology & Oncology*. 14(6):499-512, 1997
- 129 Bouneu B, Abbai M et al. Factor VII complex and endothelial damage *Lancet* 1975; i: 1430
- 130 Ruggeri, Z.M., and J. Ware. 1993. von Willebrand factor. *FASEB J*. 7:308-316.
- 131 Fujimura, Y., K. Titani, L. Z. Holland, S.R. Russell, J.R. Roberts, J.H. Elder, Z.M. Ruggeri, and T.S. Zimmerman. 1986. von Willebrand factor. A reduced and alkylated 52/48 kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem*. 261:381-385
- 132 Ruggeri ZM. von Willebrand factor *Journal of Clinical Investigation*. 99(4):559-64, 1997
- 133 Peterson, D.M., N.A. Stathopoulos, T.D. Giorgio, J.D. Hellums, and J.L. Moake. 1987. Shear-induced platelet aggregation requires von Willebrand factor and platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa. *Blood*. 69:625-628
- 134 Savage, B., S.J. Shattil, and Z.M. Ruggeri. 1992. Modulation of platelet function through adhesion receptors: A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin IIb 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J. Biol. Chem*. 267:11300-11306
- 135 . Kroll, M.H., J.D. Hellums, L.V. McIntire, A.I. Schafer, and J.L. Moake. 1996. Platelets and shear stress. *Blood*. 88:1525-1541
- 136 Ikeda, Y., M. Handa, K. Kawano, T. Kamata, M. Murata, Y. Araki, H. Anbo, Y. Kawai, K. Watanabe, I. Itagaki, K. Sakai, and Z.M. Ruggeri. 1991. The role of von Willebrand Factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J. Clin. Invest*. 87:1234-1240
- 137 Kroll MH, Schafer AI, Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood*, 1989; 74: 1181-95
- 138 Blann AD von Willebrand factor and the endothelium in vascular disease. *Br. J. Biomed. Sci.* 1993; 50: 125-34
- 139 . Shah AB, Beamer N, Coull BM. Enhanced in vivo platelet activation in subtypes of ischaemic stroke. *Stroke*. 1985;16:643-647.
- 140 Elwood PC, Renaud S, Sharp DS, Beswick AD, O'Brien JR, Yarnell JW. Ischemic heart disease and platelet aggregation: the Caerphilly Collaborative Heart Disease Study. *Circulation*. 1991;83:38-44.

- 
- 141 Thaulow E, Erikssen J, Sandvik L, Stormorken H, Cohn PF. Blood platelet count and function are related to total and cardiovascular death in apparently healthy men. *Circulation*. 1991;84:613-617.
- 142 De Gennes J. L., et al.: Formes homozygotes cutaneo - tendineus de xanthomatose hypercholesterolemique dans une observation familiale exemplaire. Essai de plasmapherese a titre de traitement heroique. *Bull. Mem. Soc. Hop. Paris* 1967, 118, 1377 - 1402
- 143 Thompson G.R., Lowenthal R., Myant N.B.: Plasma exchange in the management of homozygous familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 1975, I, 1208-11
- 144 Lupien P., i wsp.: A new approach in the management of familial hypercholesterolemia, removal of plasma - cholesterol based on the principle of affinity chromatography. *Lancet* 1976, 1, 1261 - 1264
- 145 Stoffel W., Demant T.: Selective removal of apolipoprotein -containing serum lipoproteins from blood plasma. *Proc. Natl. Sci. Acad. Sci. USA* 1981, 71, 611 - 615
- 146 Homma Y., Mikami Y., Tamachi H., i wsp.: Comparison of selectivity of LDL removal by double filtration and dextran-sulphate cellulose column plasmapheresis and changes of subfractionated plasma lipoproteins after plasmapheresis in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Metabolism* 1987, 36, 419-25
- 147 Yokoyama S., Hayashi R., Satani M., i wsp.: Selective removal of low density lipoprotein by plasmapheresis in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 1985, 5, 613-22
- 148 Armstrong V.W., Niedmann D., Eisenhauer T., i wsp.: Acute and long term effects of low-density lipoprotein apheresis on the serum concentrations of vitamins E and A. *Klin. Wochenschr.* 1988, 66, 123-
- 149 Mol M.J., Stalenhoef A.F: Homozygous familial hypercholesterolaemia: metabolic studies and treatment with LDL apheresis. *Neth. J. Med.* 1990, 36, 279-87
- 150 Uauy R., Zwiener R.J., Phillips M.J., i wsp.: Treatment of children with homozygous familial hypercholesterolemia: safety and efficacy of low-density lipoprotein apheresis. *J. Pediatr.* 1992, 120, 892-8
- 151 Kroon A.A., Swinkels D.W., van Dongen P.W., i wsp.: Pregnancy in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia treated with long-term low-density lipoprotein apheresis. *Metabolism*. 1994., 43, 1164-70
- 152 Teruel J.L., Lasuncion M.A., Navarro J.F., i wsp.: Pregnancy in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia undergoing low-density lipoprotein apheresis by dextran sulfate adsorption. *Metabolism*. 1995, 44, 929-33
- 153 Bartuś S., Konduracka E., Dembińska-Kieć A., Partyka Ł., Piwowarska W., Zdzienicka A., Guevara I., Gołębek I., Dudek D., Działkowiak A., Żmudka K., Dubiel J.S, Sinzinger H. Wpływ LDL-aferezy na poziom naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna (VEGF165), czynnika von Willebranda (vWF), beta tromboglobuliny ( $\beta$ -TG) oraz metabolitów tlenu azotu (NOx) u chorych po zabiegach PTCA lub CABG. *Czynniki Ryzyka* 1997, 3-4 (17/18): 64-69.
- 154 Naito C., Yamamoto A., Saito Y., i wsp.: Long term effect of LDL apheresis in Japan. LDL Apheresis Study Group. *Biomater. Artif. Cells Immobilization Biotechnol.* 1991, 19, 19-26
- 155 Davidson DC, Peart I, Turner S, Sangster M Prevention with icatibant of anaphylactoid reactions to ACE inhibitor during LDL apheresis. *Lancet* 1994;343(8912):1575
- 156 Konduracka E., Bartuś S., Piwowarska W., Dembińska-Kieć A., Partyka Ł., Gołębek I., Hartwig J., Sadowski J.: LDL-afereza jako metoda leczenia opornych hipercholesterolemii-opis przypadku. *Kardiol. Pol.* 1997; 47 133-135
- 157 Fletcher G F, Balady G, Froelicher V F, et al: Exercise standards. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1995; 91:580.
- 158 Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins of human serum. *J. Clin. Invest* 1955; 43: 1345-1353

- 
- 159 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL., Randall RJ, Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193, 265
- 160 Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microliter plate: its use for the evaluation of antioxidants. *Anal. Bioche.* 1993; 208: 10-15
- 161 Swinkles DW, Hendriks JCM, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Differences in metabolism of three low density lipoprotein subfractions of differing particle size. *Atheroscl.* 1992; 93: 189-199.
- 162 Anderson T.J., Meredith I.T. and Yeung A.C. et al. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *NEJM* 1995, 332:488-493.
- 163 Treasure C.B., Klein J.L. and Weintraub W.S. et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *NEJM* 1995, 332:481-487.
- 164 Stroes E.S.G., Koomans H.A. and de Bruin T.W.A. et al. Vascular function in the forearm of hypercholesterolaemic patients off and on lipid-lowering medication. *Lancet* 1995, 346:467-471
- 165 Brown B.G., Zhao X.-Q., Sacco D.E. and Albers J.J. Lipid lowering and plaque regression. New insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation* 1993, 87:1781-1789.
- 166 Brown B.G. and Maher V.M.G. Reversal of coronary heart disease by lipid-lowering therapy. Observations and pathological mechanisms. *Circulation* 1994, 89:2928-2933
- 167 Phillips N.R., Waters D. and Havel R.J. Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease evaluated by angiography and clinical events. *Circulation* 1993, 88:2762-2770.
- 168 Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 1997 Jan 7;95(1):5-7
- 169 Napoli C., Postiglione A., Scarpato N., i wsp.: Modified-LDL during LDL-apheresis in homozygous hypercholesterolemia. *Circulation* 1995, 92, abstr. 0942
- 170 Aengevaren W, AA Kroon, AFH Stalenhoef, GJH Uijen, T van der Werf. Low density lipoprotein apheresis improves regional myocardial perfusion in patients with hypercholesterolaemia and extensive coronary artery disease. *JACC* 1996; 28 1696-704
- 171 Krauss RM, Lindgren FT, Williams PT, Kelsey SF, Brensike J, Vranizan K, Detre KM, Levy RI. Intermediate-density lipoproteins and progression of coronary artery disease in hypercholesterolaemic men. *Lancet.* 1987;2:62-65
- 172 Dembinska-Kiec A., Gryglewska T., Zmuda A., Gryglewski R.J. The generation of prostacyclin by arteries and by coronary vascular bed is reduced by experimental atherosclerosis in rabbits. *Prostaglandins* 1977, 14;1025-34
- 173 Liao L., Granger D.N. Modulation of oxidized low density lipoprotein-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Am.J.Physiol.* 1995, 268;HH1643-HH1650
- 174 Krauss RM, Miller BD, Fair JM, Haskell WL, Alderman EL, SCRIP Investigators. Reduced progression of coronary artery disease with risk factor intervention in patients with LDL subclass pattern B. *Circulation.* 1992;86(suppl I):I-63. Abstract
- 175 Superko HR, Krauss RM. Differential effects of nicotinic acid in subjects with different LDL subclass patterns. *Atherosclerosis.* 1992; 95:69-76.
- 176 Goulinet S. Chapman MJ. Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology.* 17(4):786-96, 1997
- 177 Howard G, Pizzo S, Lipoprotein (a) and its role in atherothrombotic disease. *Lab. Invest* 1993; 69: 373-386.

- 
- 178 Soma MR, Osnago-Gadda I, Paoletti R, et al. The lowering of lipoprotein(a) induced by estrogen plus progesterone replacement therapy in postmenopausal women. *Arch Intern Med.* 1993;153:1462-1468
- 179 Espeland MA, Marcovina SM, Miller V, Wood PD, Wasilaukas C, Sherwin R, Schrott H, Bush TL. Effect of postmenopausal hormone therapy on lipoprotein(a) concentration. PEPi Investigators. Postmenopausal estrogen/progestin Interventions. *Circulation* 1998. 97(10):979-86
- 180 Rhoads GG, Dahlen G, Berg K, Morton NE, Dannenberg AL. Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction. *JAMA* 1986; 256(18):2540-4, 1986
- 181 Kanemitsu S, Tkekoshi N, Murakami E., Effects of LDL apheresis on restenosis after angioplasty. *Chem and Phys of Lipids* 1994, 68,339-343
- 182 Daida H, Lee YJ, Yokoi H, Kanoh T, Ishiwata S, Kato K, Nishikawa H, Takatsu F, Kato H, Katsumi Y et al., Prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty by reducing lipoprotein (a) levels with low-density lipoprotein apheresis. Low-Density Lipoprotein Apheresis Angioplasty Restenosis Trial (L-ART) Group. *Am J Cardiol* 1994, 73(15), 1037-40
- 183 Allen S, Khan S, Tam Sp, Koschinsky M, Taylor P, Yacoub M Expression of adhesion molecules by lp(a): a potential novel mechanism for its atherogenicity. *FASEB J* 1998 Dec;12(15):1765-76
- 184 Harpel PC, Gordon BR, Parker TS. Plasmin catalyzes binding of lipoprotein (a) to immobilized fibrinogen and fibrin. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:3847-51
- 185 Gonzalez-Gronow M, Edelberg JM, Pizzo SV. Further characterization of the cellular plasminogen binding site: evidence that plasminogen 2 and lipoprotein (a) compete for the same site. *Biochemistry* 1989; 28:2374-7
- 186 Howard G, Pizzo S, Lipoprotein (a) and its role in atherothrombotic disease. *Lab. Invest* 1993; 69: 373-386
- 187 Berg K, Mohr J. Genetics of the Lp system. *Acta Genetica.* 1963;13:349-360.
- 188 Daida H., Lee Y.J., Yokoi H., i wsp.: Prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty by reducing lipoprotein (a) levels with low-density lipoprotein apheresis. Low-Density Lipoprotein Apheresis Angioplasty Restenosis Trial (L-ART) Group. *Am. J. Cardiol.* 1994, 73, 1037-40
- 189 Koga, N., Iwata, Y.: Pathological and angiographic regression of coronary atherosclerosis by LDL-apheresis in a patient with FH. *Atherosclerosis* 1991, 90, 9-21
- 190 Kitabatake A., Sato H., Hori M., i wsp.: Coronary atherosclerosis reduced in patients with familial hypercholesterolemia after intensive cholesterol lowering with low-density lipoprotein-apheresis: 1-year follow-up study. The Osaka LDL-Apheresis Multicenter Trial Group. *Clin. Ther.* 1994, 16, 416-28
- 191 Thompson G.R., Maher V.M., Matthews S., i wsp.: Familial Hypercholesterolaemia Regression Study: a randomised trial of low-density-lipoprotein apheresis. *Lancet.* 1995, 345, 811-6
- 192 Waidner T., Franzen D., Voelker W., i wsp.: The effect of LDL apheresis on progression of coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. Results of a multicenter LDL apheresis study. *Clin. Investig.* 1994, 72, 858-63
- 193 Nishimura S., Sekiguchi M., Kano T. et al. Effects of intensive lipid lowering by low-density lipoprotein apheresis on regression of coronary atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia: Japan Low-density Lipoprotein Apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study (L-CAPS). *Atheroscl.* 1999; 144: 409-417.
- 194 Schuff-Werner P. Schettler V. [Plaque stabilization by LDL apheresis?]. [Review] [20 refs] [German] *Herz.* 24(1):57-61, 1999
- 195 Inue M., Itoh H., Ueda M., Naruko T., Kojima A., Komatsu R., Doi K., Ogawa Y., Tamura N., Takaya K., Igaki T., Yamashita J., Chun %TH., Masatsugu K., Becker AE., Nakao K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic



- 
- lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 1998; 98: 2108-2116.
- 196 Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. *JAMA*. 1987;258:1183-6
- 197 Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med*. 1993;118:956-63
- 198 Broadhurst P, Kelleher C, Hughes I, Imeson JD, Raftery EB. Fibrinogen, factor VII clotting activity and coronary artery disease severity. *Atherosclerosis*. 1990;85:169-73
- 199 Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, et al. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet*. 1986;2:533-7
- 200 Montalescot G, Ankril A, Vicaut E, Drobinski G, Grosogoeat Y, Thomas D. Fibrinogen after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis. *Circulation*. 1995;92:31-8
- 201 Smith EB, Thompson WD. Fibrin as a factor in atherogenesis. *Thromb Res*. 1994;73:1-19
- 202 Lee AJ, Lowe GD, Woodward M, Tunstall-Pedoe H. Fibrinogen in relation to personal history of prevalent hypertension, diabetes, stroke, intermittent claudication, coronary heart disease, and family history: the Scottish Heart Health Study. *Br Heart J*. 1993;69:338-42.
- 203 Ernst E, Resch KL. Therapeutic interventions to lower plasma fibrinogen concentration. *Eur Heart J*. 1995;16 Suppl A:47-53
- 204 Konduracka-E; Piwowarska-W; Dembinska-Kiec-A; Bartus-S; Partyka-L; Hartwich-J; Golabek-I; Pietrzak-I; Sadowski-J; Dudek-D LDL-apheresis and its effects on the lipid profile and plasma fibrinogen level in patients with refractory hypercholesterolemia - Preliminary report *Medical-Science-Monitor*. 1998; 4/6 (938-941)
- 205 Bambauer R. Olbricht CJ. Schoeppe E. Low-density lipoprotein apheresis for prevention and regression of atherosclerosis: clinical results. *Therapeutic Apheresis*. 1997, 1(3):242-8
- 206 Behar S. Lowering fibrinogen levels: clinical update. BIP Study Group. Bezafibrate Infarction Prevention. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999;10 Suppl 1:S41-3
- 207 Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest*. 1992;89:10-18
- 208 Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature*. 1990;344:160-162
- 209 Creager MA, Gallagher SJ, Girard XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-Arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*. 1992;90:1248-1253
- 210 Creager 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.
- 211 Wolf A, Zalpour C, Theilmeier G, Wang BY, Ma A, Anderson B, Tsao PS, Cooke JP. Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:479-485
- 212 Theilmeier G, Chan JR, Zalpour C, Anderson B, Wang BY, Wolf A, McEvoy LM, Butcher EC, Tsao PS, Cooke JP. Adhesiveness of mononuclear cells in hypercholesterolemic humans is normalized by dietary L-arginine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:3557-3564
- 213 Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:753-759.

- 
- 214 Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, Tsao PS, Cooke JP. Regression or progression: dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:44-50
- 215 Andrews HE, Bruckdorfer KR, Dunn RC, Jacobs M. Low-density lipoproteins inhibit endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Nature.* 1987;327:237-239
- 216 Simon BC, Cunningham LD, Cohen RA. Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery. *J Clin Invest.* 1990;86:75-79
- 217 Mangin EL, Kugiyama K, Nguy JH, Kerns SA, Henry PD. Effects of lysolipids and oxidatively modified low density lipoprotein on endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Circ Res.* 1993;72:161-166.
- 218 Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest.* 1992;89:10-18
- 219 Pritchard KA Jr, Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P, Wolin MS, Stemerman MB. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res.* 1995;77:510-518
- 220 Ohara Y, Peterson TE, Sayegh HS, Subramanian RR, Wilcox JN, Harrison DG. Dietary correction of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production. *Circulation.* 1995;92:898-903
- 221 Stewart-Lee AL, Forster LA, Nourooz-Zadeh J, Ferns GAA, Anggard EE. Vitamin E protects against impairment of endothelium-mediated relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:494-499
- 222 Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Hestad DD, Harrison DG. Chronic treatment with polyethylene glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res.* 1991;69:1293-1300
- 223 Dulak J, Polus M, Guevara I, Polus A, Hartwich J, Dembinska-Kiec A Regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and GTP cyclohydrolase I (GTP-CH I) gene expression by ox-LDL in rat vascular smooth muscle cells *Journal of Physiology & Pharmacology.* 48(4):689-97, 1997
- 224 Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Golabek I, Bartus S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 1998;274(2):177-188
- 225 Bouneu B, Abbai M et al. Factor VII complex and endothelial damage *Lancet* 1975; i: 1430
- 226 Dudek D, Dubiel JS, Żmudka K, Legutko J, Partyka Ł, Guevara I, Zdzienicka A, Dembińska-Kieć A, Von Willebrand Factor Differentiates Endothelial Dysfunction in Patients with Coronary Artery Disease. *The Journal of Invasive Cardiology,* 1997, 9, 9C
- 227 Elwood PC, Renaud S, Sharp DS, Beswick AD, O'Brien JR, Yarnell JW. Ischemic heart disease and platelet aggregation: the Caerphilly Collaborative Heart Disease Study. *Circulation.* 1991;83:38-44
- 228 Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H, Cohen T, Levi BZ. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factor Res.* 1994; 5(1): 89-97
- 229 Couffinhal T, Kearney M, Witzenbichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, Symes J, Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol.* 1997;150:1673-1685
- 230 Partyka L, Dembińska-Kieć A, Huk I., Dulak J., Weigel G., Dudek D. Mutual regulation of vascular endothelial growth factor and nitric oxide in blood vessel wall. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1997; 27: suppl. 1, abstract 7
- 231 Dembinska-Kiec A, Dulak J, Partyka L, Huk I, Mailnski T. VEGF-nitric oxide reciprocal regulation. *Nature Medicine* 1997. 3(11):1177.

- 
- 232 Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA: Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am. J. Physiol.* 1993; 265 (2 Pt 2): H586-92
- 233 Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood.* 1996;87:3336-3343
- 234 Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med.* 1990;172:1535-1545.
- 235 . O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 1994;145:883-894.
- 236 John S. Schlaich M. Langenfeld M. Weihprecht H. Schmitz G. Weidinger G. Schmieder RE. Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Circulation* 1998. 98(3):211-6
- 237 Murata T, Ishibashi T, Khalil A, Hata Y, Yoshikawa H, Inomata H Vascular endothelial growth factor plays a role in hyperpermeability of diabetic retinal vessels. *Ophthalmic-Res.* 1995; 27(1): 48-52
- 238 Kavey RE. Kveselis DA. Gaum WE. Exaggerated blood pressure response to exercise in children with increased low-density lipoprotein cholesterol. *American Heart Journal.* 133(2):162-8, 1997
- 239 Riegger G. Abletshauer C. Ludwig M. Schwandt P. Widimsky J. Weidinger G. Welzel D. The effect of fluvastatin on cardiac events in patients with symptomatic coronary artery disease during one year of treatment. *Atherosclerosis.* 144(1):263-70, 1999
- 240 Park JW. Merz M. Braun P. Effect of HELP-LDL-apheresis on outcomes in patients with advanced coronary atherosclerosis and severe hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 139(2):401-9, 1998
- 241 Broijersen A., Eriksson M., Larsson P.T., i wsp.: Effects of selective LDL-apheresis and pravastatin therapy on platelet function in familial hypercholesterolaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* 1994, 24, 488-98
- 242 Mol M.J., Stalenhoef A.F: Homozygous familial hypercholesterolaemia: metabolic studies and treatment with LDL apheresis. *Neth. J. Med.* 1990, 36, 279-87
- 243 Uauy R. Zwiener RJ. Phillips MJ. Petruska ML. Bilheimer DW. Treatment of children with homozygous familial hypercholesterolemia: safety and efficacy of low-density lipoprotein apheresis. *Journal of Pediatrics.* 120(6):892-8, 1992
- 244 Park J.W., Metz M., Braun P. Regression of transplant coronary artery disease during chronic low-density lipoprotein apheresis. *Clinical Heart Transplantation* 1997, 16: 16 290-7.
- 245 Yokoyama K., Sakai S., Sigematsu T. et al.: LDL adsorption improves the response of focal glomerulosclerosis to corticosteroid therapy. *Clin. Nephrol.* 1998, 50, 1.

