

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



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

Autoreferát disertační práce

Tomáš Štulc

Praha 2005

OBSAH

1	SUMMARY	2
2	ÚVOD	4
3	PŘEHLED PROBLEMATIKY	5
4	CÍLE PRÁCE	8
5	METODY	9
6	VÝSLEDKY	10
7	DISKUSE	16
8	ZÁVĚRY	20
9	LITERATURA	22
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	24
11	VLASTNÍ PUBLIKACE AUTORA	25

SUMMARY

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

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

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

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

PAPP-A levels were elevated in hypercholesterolemic subjects without clinical signs of atherosclerosis. PAPP-A may therefore not only reflect plaque instability (as

suggested earlier), but also serve as a marker of total atherosclerotic burden in asymptomatic subjects with hyperlipidemia. However, PAPP-A levels were not influenced by atorvastatin treatment.

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

ÚVOD

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

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

Uvedená klinická pozorování spolu s výsledky experimentálních prací vedly k pochopení, že pro rozvoj kardiovaskulárních příhod není rozhodující velikost aterosklerotických lézí, ale množství dalších faktorů, jako je míra endoteliální dysfunkce, mechanická pevnost plátů a lokální rovnováha protrombotických a antitrombotických faktorů (1-3). Dále bylo prokázáno, že tyto faktory jsou přímo ovlivňovány plazmatickou hladinou cholesterolu a že jejich aktivita se při změnách koncentrace cholesterolu mění velmi rychle (4, 5). Do popředí výzkumného zájmu v této oblasti se proto dostalo studium biologických vlastností aterosklerotických lézí. Jsou studovány molekulární a buněčné procesy, které vedou k rozvoji akutních kardiovaskulárních příhod, a hledány cílené léčebné prostředky, kterými by bylo možno tyto procesy příznivě ovlivnit. V oblasti klinického výzkumu jsou pak studovány nové markery, které by bylo možno použít k identifikaci osob s vysokým rizikem kardiovaskulárních příhod nebo k sledování účinnosti léčebných a preventivních opatření.

PŘEHLED PROBLEMATIKY

V předkládané práci se zabývám možnostmi hodnocení různých složek procesu aterosklerózy v souvislosti s poruchami metabolismu lipidů v klinických podmínkách.

Práce zahrnovala čtyři tematické okruhy

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

V následujících odstavcích uvádím stručný přehled problematiky a východiska práce v těchto jednotlivých oblastech.

Leukocytární exprese cytoadhezivních molekul

Zánětlivá infiltrace aterosklerotických lézí leukocyty se významně podílí na všech stádiích procesu aterosklerózy (6). Prvním krokem v přestupu leukocytů z cévního řečiště do subendoteliálního prostoru je jejich adheze na endoteliální buňky. Adheze a transendoteliální migrace leukocytů je zprostředkována pomocí tzv. cytoadhezivních molekul, které se nacházejí na povrchu leukocytů i endoteliálních buněk (7). Různé proaterogenní faktory včetně hyperlipidémie vedou ke zvýšení exprese cytoadhezivních molekul a tento mechanismus zřejmě přispívá k urychlení procesu aterosklerózy (8).

V klinických podmínkách byly dosud studovány především plazmatické koncentrace endoteliálních cytoadhezivních molekul, které jsou nepřímým ukazatelem jejich endoteliální exprese. Jedná se o vyšetření velmi jednoduché, ale - vzhledem k tomu, že se jedná o ukazatel nepřímý - nepřiliš citlivé (9, 10). Na rozdíl od endoteliálních buněk lze leukocytární expresi adhezivních molekul stanovovat i v klinických podmínkách přímo, vyšetřením leukocytů periferní krve. Je proto možno předpokládat, že exprese leukocytární adhezivních molekul bude citlivějším ukazatelem zánětlivé infiltrace než plazmatické koncentrace endoteliálních adhezivních molekul.

Metaloproteináza PAPP-A

Metaloproteináza PAPP-A (akronym „pregnancy-associated plasma protein-A“) byla dosud využívána především v prenatalní diagnostice Downova syndromu; její

fyziologická funkce nebyla donedávna známa. V posledních několika letech bylo zjištěno, že tento enzym zřejmě působí jako lokální modulátor aktivity systému IGF-I a podílí se tak na řízení proliferativních dějů v různých tkáních organismu (11). Vysoká exprese PAPP-A byla prokázána v nestabilních aterosklerotických lézích a výrazně zvýšené koncentrace PAPP-A jsou nacházeny u pacientů s nestabilní anginou pectoris nebo s akutním srdečním infarktem (12- 14). Proto je tato molekula v poslední době studována jako možný laboratorní marker akutních koronárních syndromů (15).

Určitá míra exprese PAPP-A byla v experimentu prokázána také ve stabilních aterosklerotických plátech, a je proto možné, že se tato proteáza podílí na vývoji aterosklerotických lézí. Vztah mezi koncentrací PAPP-A a koncentrací plazmatických lipidů ani dalšími rizikovými faktory aterogeneze však dosud studován nebyl.

Mikrovaskulární reaktivita

Endoteliální dysfunkce je v současné době považována za první stádium vývoje aterosklerózy, které lze prokázat dlouho před rozvojem morfologicky prokazatelných aterosklerotických lézí (16). Proto je v současné době rozvoji metod pro hodnocení endoteliální dysfunkce v klinické praxi věnováno značné výzkumné úsilí. Jedním z hlavních projevů endoteliální dysfunkce je porucha tepenné vazodilatace závislé na endotelu. Při vyšetřování vazodilatace závislé na endotelu se měří změna průsvitu tepny v odpověď na různé vazodilatační podněty; všechny metody pro vyšetřování endoteliální dysfunkce jsou však metodicky velmi náročné a často též invazivní (17, 18). Proto jsou studovány a rozvíjeny nové metody, které by umožnily endoteliální dysfunkci posoudit jednodušším a způsobem.

V nedávné době byla vyvinuta metoda vyšetření mikrocirkulace pomocí laser-dopplerovského měření průtoku krve kapilárami (vyšetření mikrovaskulární reaktivity) (19). V klinických podmínkách byla tato metoda zatím využívána především k vyšetření mikrocirkulace u pacientů s diabetem; u pacientů s hyperlipidémií nebo s klinicky manifestní aterosklerózou však byla mikrovaskulární reaktivita studována zatím jen zcela ojediněle (20-22).

Krátkodobá léčba LDL-aférezou

Léčba hyperlipidémií je v současné době nejúčinnějším prostředkem v rámci primární i sekundární prevence kardiovaskulárních chorob. U naprosté většiny pacientů postačuje k úpravě lipidogramu i k stabilizaci klinického stavu kombinace dietní a režimové léčby a podávání hypolipidemik. U menšiny pacientů však prostředky

konzervativní léčby selhávají a riziko koronárních příhod u nich zůstává vysoké; v poslední době se jako nový léčebný postup pro tyto pacienty v omezeném rozsahu využívá LDL-aféze (23).

LDL-aféze je extrakorporální metoda, která umožňuje selektivní eliminaci LDL částic z krve pacienta; v kombinaci s farmakoterapií vede ke snížení koncentrace cholesterolu až o 80% (24). Dosud byla používána především k dlouhodobé léčbě pacientů s těžkými formami ICHS a hyperlipidémií rezistentní na léčbu (25, 23). V poslední době se však objevily první práce, které studovaly možnosti krátkodobé aplikace LDL-afézy u vybraných skupin pacientů (26-28).

Teoretickým východiskem krátkodobé léčby LDL-aférou jsou poznatky o tom, že stabilita plátů je významně ovlivněna koncentrací plazmatických lipidů, a že změny koncentrace LDL-cholesterolu vedou ke změnám vlastností plátů dokonce již během několika hodin až dní. Účinné snížení plazmatického cholesterolu proto může ovlivnit klinický stav pacientů během velmi krátké doby.

CÍLE PRÁCE

Leukocytární exprese cytoadhezivních molekul

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

Metaloproteináza PAPP-A

- porovnat koncentrace PAPP-A u pacientů s těžkou izolovanou hypercholesterolémií s nálezem u zdravých osob
- studovat jejich změny koncentrace PAPP-A po hypolipidemické terapii atorvastatinem.

Mikrovaskulární reaktivita

- vyšetřit mikrovaskulární reaktivitu u pacientů izolovanou hypercholesterolémií, kteří neměli klinické projevy aterosklerózy, a u osob s hyperlipidémií a s ischemickou chorobou srdeční
- u pacientů s hypercholesterolémií studovat vliv hypolipidemické léčby atorvastatinem a u pacientů s ICHS účinek léčby LDL-aférezou
- nálezy u pacientů s hypercholesterolémií a u pacientů s ICHS porovnat s nálezem u zdravých osob a u několika skupin diabetiků, kteří byli již dříve vyšetřeni na našem pracovišti.

Krátkodobá léčba LDL-aférezou

- zavést metodu HELP pro krátkodobou léčbu LDL-aférezou na našem pracovišti
- ošetřit touto metodou skupinu pacientů s hyperlipidémií a těžkou, revaskularizací neřešitelnou ICHS
- posoudit účinnost krátkodobé léčby LDL-aférezou pomocí rozsáhlého souboru klinických, laboratorních a funkčních vyšetřovacích metod.

METODY

Vyšetřené skupiny osob

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

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

Pacienti s hypercholesterolémií a ICHS (skupina HLP_{ICHS}). V této skupině byli

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

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

Pacienti s diabetem mellitem. Do studie jsme zařadili též pacienty s diabetem mellitem I. a II. typu (skupiny DM1 a DM2); každá z těchto skupin byla dále rozdělena na podskupiny bez retinopatie (DM1₀ a DM2₀) a s lehkou retinopatií (DM1_{RNP} a DM2_{RNP}).

Léčba

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

U pacientů s hypercholesterolémií a ICHS byla provedena celkem tři ošetření LDL-aferezou v týdenních intervalech. LDL-afereza byla prováděna metodou HELP (B.Braun). Pacienti byli vyšetřeni před léčbou, den po první a den po třetí aferéze.

Vyšetření

Expres leukocytárních cytoadhezivních molekul byla měřena průtokovou cytometrií (FACSCalibur, Becton – Dickinson) imunofluorescenční metodou pomocí jednostupňového barvení monoklonálními protilátkami.

Koncentrace endoteliálních molekul v séru byly stanovovány metodou ELISA pomocí komerčně dostupných kitů.

Koncentrace PAPP-A a CRP v séru byly stanovovány imunometricky metodou „time resolved amplified cryptate emission technology“ (TRACE) na přístroji Kryptor (Cezanne).

Reaktivita mikrocirkulace na kůži předloktí po stimulaci termálním a ischemickým podnětem byla vyšetřována laser-dopplerovskou technikou (PeriFlux PF4001, Perimed).

Klinickou účinnost léčby LDL-aferezou jsme posuzovali pomocí upraveného Minnesotského dotazníku kvality života a podle tolerance zátěže během bicyklové ergometrie. K posouzení endoteliální dysfunkce jsme ve studii s LDL-aferezou používali vyšetření vazodilatace závislé na endotelu na a.brachialis metodou "flow-mediated vasodilation" (FMD)

Základní laboratorní vyšetření byla prováděna rutinní metodikou pomocí automatických analyzátorů.

VÝSLEDKY

Leukocytární exprese cytoadhezivních molekul

Do studie bylo zařazeno 29 pacientů s hypercholesterolémií a 27 zdravých osob z kontrolního souboru. Všichni zařazení pacienti studii dokončili; průměrná doba léčby byla 89 ± 8 dní. Základní charakteristiky obou sledovaných skupin jsou uvedeny v tabulce 1.

Expres leukocytárních adhezivních molekul u vyšetřených osob je uvedena v tabulce 2. Pacienti s hyperlipidémií měli na všech leukocytárních populacích zvýšenou expresi L-selektinu i všech vyšetřovaných integrinů s výjimkou LFA-1; rozdíl byl na hranici významnosti u integrinu CD18 a nevýznamný u integrinu VLA-4 na monocytech; ve všech ostatních případech bylo zvýšení statisticky významné. Léčba atorvastatinem vedla k významnému poklesu všech integrinů s výjimkou Mac-1 (opět na všech populacích leukocytů); v případě L-selektinu byl patrný pokles, který byl významný na granulocytech; na lymfocytech a monocytech nedosáhl statistické významnosti.

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

Metaloproteináza PAPP-A

Vyšetřené skupiny pacientů byly stejné jako v předcházející části práci. Koncentrace PAPP-A u pacientů před léčbou byla významně vyšší než u normolipidemických osob. Po léčbě atorvastatinem došlo k mírnému poklesu koncentrace PAPP-A, který však nebyl statisticky významný. Obdobně byla u pacientů zvýšena též koncentrace CRP, na rozdíl od PAPP-A však byl po léčbě patrný výrazný a statisticky významný pokles jeho hodnot (tabulka 1).

Mikrovaskulární reaktivita

Výsledky srovnání parametrů mikrovaskulární reaktivity mezi jednotlivými skupinami jsou shrnuty v tabulce 3. I přes těžkou hypercholesterolémií nebyly ve skupině HLP₀ hodnoty mikrovaskulární reaktivity sniženy. Naopak, ve všech parametrech byly hodnoty vyšší než v kontrolní skupině (v případě paramterů TH statisticky významně). U osob s hyperlipidémií a ICHS (skupina HLP_{ICHS}) byly hodnoty MVR nižší než u kontrol – v případě TH opět statisticky významně.

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

I přes výrazný pokles koncentrací sérových lipidů po léčbě atorvastatinem se hodnoty MVR ve skupině HLP₀ prakticky nezměnily. Ve skupině HLP_{ICHs} vedla léčba LDL-aférou k určitému zlepšení ve všech parametrech MVR (7-30%), které však nebylo statisticky významné (výsledky nejsou uvedeny).

Krátkodobá léčba LDL-aférou

Zavedli jsme metodu HELP pro léčbu LDL-aférou; jedná se o první použití této metody v zemích bývalého východního bloku.

LDL-aféza vedla k dramatickému poklesu celkového a LDL-cholesterolu a fibrinogenu. Bezprostředně po aféze se snížila hladina celkového cholesterolu o 36%, LDL-cholesterolu o 46% a fibrinogenu o 58%; podle očekávání byl obdobně významný i pokles hladiny apoB (-39%) a Lp(a) (-50%).

Tyto příznivé změny lipidů vedly u pacientů s ICHS k bezprostřednímu zlepšení klinického stavu, zvýšení tolerance tělesné zátěže a zlepšením některých ukazatelů endoteliální funkce a aktivity procesu aterogeneze (tabulka 4). Tyto změny byly však jen přechodné a odezněly krátce po ukončení léčby.

Krátkodobá léčba LDL-aférou byla provázena vyšším výskytem nežádoucích účinků (40%) než léčba dlouhodobá.

	Kontrolní soubor	Pacienti před léčbou	Pacienti po léčbě
Počet	29	27	
Pohlaví (muži/ženy)	9 / 20	8 / 19	
Věk [roků]	47,8 ± 6,5	52,3 ± 11,5	
BMI [kgm ⁻²]	25,2 ± 3,4	26,7 ± 4,3	
Hypertenze	6 (21%)	9 (33%)	
Kouření	5 (17%)	9 (33%)	
TC [mmol/l]	5,14 ± 0,72	8,59 ± 1,60 ^a	5,87 ± 1,12 ^x
LDL-C [mmol/l]	2,99 ± 0,64	6,20 ± 1,39 ^a	3,67 ± 0,94 ^x
HDL-C [mmol/l]	1,61 ± 0,32	1,63 ± 0,32	1,61 ± 0,33
TG [mmol/l]	1,21 ± 0,66	1,67 ± 0,63 ^b	1,33 ± 0,37 ^y
ICAM-1 [mg/l]	405 ± 126	479 ± 136 ^c	495 ± 136
E-selektin [mg/l]	56,3 ± 36,0	58,5 ± 38,3	59,4 ± 34,5
vWF [U/ml]	0,99 ± 0,89	0,84 ± 0,42	0,99 ± 0,47
PAPP-A [mU/l]	6,50 ± 2,54	8,02 ± 1,86 ^c	7,67 ± 1,89
CRP [mg/l]	1,11 ± 1,10	2,21 ± 1,72 ^b	1,63 ± 1,65 ^z

Tabulka 1. Vstupní charakteristika a hladiny lipidů, cytoadhezivních molekul, PAPP-A a CRP u vyšetřených osob

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

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

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

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

Tabulka 2. Leukocytární exprese cytoadhezivních molekul u vyšetřených osob

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

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

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

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

Tabulka 3. Srovnání mikrovaskulární reaktivity mezi jednotlivými vyšetřeny skupinami; charakteristika a označení jednotlivých skupin je uvedeno v oddíle Metody.

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

	Před léčbou	Po 1. aferéze	Po 3. aferéze	Po 8 týdnů
Dotazník	1,00	NA	1,17 ± 0,22	1,11 ± 0,24
Ergometrie	1,00	NA	1,22 ± 0,16	1,17 ± 0,19
FMD [%]	0,76 ± 2,03	NA	^z 2,13 ± 1,45	NA
ICAM-1[mg/l]	265 ± 88	279 ± 42	^z 243 ± 97	279 ± 93
E-selektin [mg/l]	42,5 ± 12,5	^z 29,0 ± 7,9	^z 30,1 ± 11,8	44,6 ± 14,3
P-selektin [mg/l]	102 ± 32	114 ± 38	110 ± 39	113 ± 24

Tabulka 4. Výsledky vyšetření u pacientů s ICHS před léčbou a po léčbě LDL-aferézou.

Skóre kvality života podle Minnessotského dotazníku, tolerance zátěže během bicyklové ergometrie, vyšetření cévní reaktivity (FMD) a koncentrace endoteliálních cytoadhezivních molekul. Vyšetření byla provedena před léčbou, bezprostředně po skončení léčby a za 8 týdnů po skončení léčby. Výsledky hodnocení dotazníku a ergometrie jsou normalizovány na hodnotu před léčbou (=1,00).

^z p<0,05 proti nálezu před léčbou

DISKUSE

Leukocytární exprese cytoadhezivních molekul

Údajů o expresi cytoadhezivních molekul na leukocytech v klinických podmínkách dosud není mnoho a naše práce patří počtem vyšetřených molekul spolu s prací Rezaie-Majd (31) k největším. Výsledky publikovaných prací nejsou zcela jednotné. U pacientů s hyperlipidémií a aterosklerózou byl nejčastěji studován integrin Mac-1; bylo popsáno zvýšení exprese, v některých případech však jen nevýrazné nebo dokonce žádné. Také efekt hypolipidemické léčby se pohyboval od výrazného snížení exprese až po žádný efekt. U pacientů s hyperlipidémií byla též popsána zvýšená exprese integrinů LFA-1, CD18 a VLA-4 a její pokles po hypolipidemické léčbě, a dále snížená, ale i normální exprese L-selektinu (29-31). V naší práci byla leukocytární exprese většiny studovaných cytoadhezivních molekul u pacientů s hypercholesterolémií zvýšená, a léčba atorvastatinem vedla k jejímu poklesu.

Rozpornost některých výsledků lze pravděpodobně vysvětlit především rozdíly v metodickém přístupu. Většina autorů vyšetřovala separované leukocyty, zatímco jiné práce používaly k měření plnou krev (29, 31). In-vitro manipulace však obecně vede k aktivaci leukocytů, a metody zahrnující separaci leukocytů proto posuzují spíše stimulační potenciál leukocytů, než skutečnou úroveň jejich aktivace in-vivo. V naší práci jsme se snažili in-vitro stimulaci omezit co nejvíce; předpokládáme proto, že výsledky odrážejí skutečnou expresi cytoadhezivních molekul u obou vyšetřených skupin pacientů.

Na rozdíl od leukocytární exprese byly při hyperlipidémií sérové koncentrace endoteliálních molekul zvýšeny jen nekonstantně a hypolipidemickou léčbou nebyly ovlivněny vůbec. Tento náález může být na první pohled překvapivý, protože úloha endotelu v regulaci transendoteliální migrace leukocytů je zcela nepochybná, a ICAM-1 a E-selektin jsou hlavní molekuly, které se na tomto procesu podílejí (6, 8). Přímé vyšetřování endoteliálních buněk (na rozdíl od leukocytů) je však v klinických podmínkách prakticky nemožné, a jako nepřímého ukazatele se proto používá stanovení koncentrace endoteliálních molekul v krvi. Vyšetření sérových koncentrací však není příliš citlivým ukazatelem jejich endoteliální exprese, což je zřejmě hlavní příčina negativního výsledku práce naší i některých dalších autorů (10, 32) i částečné diskrepance experimentálních a klinických pozorování.

V současné době není jasné, jestli se ovlivnění leukocytárních funkcí podílí na antiaterogennímu působení hypolipidemické léčby. Lze však předpokládat, že pokles exprese leukocytárních adhezivních molekul může přispívat k snížení zánětlivé infiltrace a zvýšení stability aterosklerotických plátů. Definitivní odpověď na otázku,

zda se tento účinek na leukocyty podílí na snížení kardiovaskulárního rizika u pacientů léčených statiny, však mohou přinést pouze rozsáhlejší klinické studie.

Metaloproteináza PAPP-A

Naše studie je první prací, která ukázala, že koncentrace PAPP-A v krvi jsou zvýšeny u pacientů s hypercholesterolémií, kteří nemají klinické projevy aterosklerózy.

Dosud publikované práce studovaly souvislost mezi sérovými koncentracemi PAPP-A a akutními koronárními syndromy (12-14); u osob s akutním infarktem myokardu a s nestabilní anginou pectoris byly hladiny PAPP-A výrazně vyšší, než u kontrolních osob. Na základě těchto výsledků byla formulována domněnka, že působení PAPP-A souvisí s nestabilitou aterosklerotických plátů. V naší studii jsme však prokázali významné zvýšení koncentrací PAPP-A u jinak zdravých osob s hypercholesterolémií, navzdory nepřítomnosti klinických projevů aterosklerózy. Je tedy pravděpodobné, že zvýšení PAPP-A nesouvisí pouze s přítomností nestabilních plátů a klinicky manifestní aterosklerózy, ale odráží zřejmě též přítomnost jejich časnějších, klinicky dosud asymptomatických stadií.

Léčba atorvastatinem nevedla k významnějšímu poklesu koncentrací PAPP-A, navzdory výraznému snížení hladin lipidů. To je v kontrastu k výraznému poklesu koncentrací CRP i cytoadhezivních molekul, který jsme v naší studii zaznamenali. Odlišnou dynamiku PAPP-A a „zánětlivých“ ukazatelů lze nejnázne vysvětlit pravděpodobným mechanismem působení PAPP-A. PAPP-A se zřejmě podílí na řízení proliferativních a reparativních dějů v tkáních, a zvýšené hladiny PAPP-A u osob s hyperlipidémií mohou odpovídat proliferativní aktivitě subklinických aterosklerotických lézí (11). Závislost těchto dějů na změnách koncentrací sérových lipidů však může být zcela odlišná od reakce ukazatelů zánětu; z charakteru fibroproliferativních dějů lze usuzovat na spíše pomalejší dynamiku změn. Je proto možné, že trvání hypolipidemické léčby v naší studii bylo příliš krátké na to, aby pokles koncentrace lipidů v krvi umožnil rozvoj výraznějších změn v hladinách PAPP-A.

Mikrovaskulární reaktivita

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

Srovnání MVR u pacientů s normolipidemickými osobami bylo dosud provedeno pouze v jediné studii (20), ve které měli pacienti s hyperlipidémií a manifestní aterosklerózou hodnoty MVR proti kontrolám podstatně snížené. Podobně i v naší studii měli pacienti s hyperlipidémií a ICHS hodnoty MVR nižší, než zdravé osoby; naproti tomu pacienti s hyperlipidémií, kteří neměli klinické projevy aterosklerózy, měli MVR zcela normální. Vliv hypolipidemické léčby na MVR byl zkoumán celkem v třech studiích (20-22). Všeobecně však lze říci, že změny v MVR po hypolipidemické léčbě (fluvastatinem nebo atorvastatinem) byly v rozmezí od žádné změny po nejvýše mírné zlepšení. V některých případech byl patrný trend k zlepšení, který nedosáhl statistické významnosti – zjevně především pro velkou variabilitu studovaných parametrů. Ve shodě s tím jsme v naší práci neprokázali výraznější vliv léčby atorvastatinem nebo LDL-aférezou na MVR.

Všechny výše uvedené nálezy dohromady svědčí pro to, že hyperlipidémie jako taková má na mikrovaskulární reaktivitu jen malý vliv. MVR zřejmě tedy zřejmě není příliš citlivým ukazatelem časných cévních změn, vyvolaných hyperlipidémií, ale odráží spíše pokročilejší změny, které se objevují v pozdějších stádiích aterosklerózy.

Krátkodobá léčba LDL-aférezou

Krátkodobá léčba LDL-aférezou vedla u pacientů s ICHS a hyperlipidémií k bezprostřednímu a dramatickému poklesu koncentrací celkového a LDL-cholesterolu a fibrinogenu. Tyto změny byly provázeny subjektivním zlepšením klinického stavu, zvýšením tolerance tělesné zátěže a zlepšením některých ukazatelů endoteliální funkce a aktivity procesu aterosklerózy; uvedená zlepšení však odezněla krátce po ukončení léčby. Časová souvislost mezi změnami sledovaných laboratorních i funkčních parametrů a výraznými změnami hladiny cholesterolu během studie je ve shodě s novými poznatky o tom, že změny koncentrace plazmatických lipidů ovlivňují funkční stav cévního řečiště i aterosklerotických lézí velmi rychle. Tato pozorování proto poskytují podporu pro názor, že hypolipidemická terapie u nejvíce ohrožených pacientů by měla být dostatečně razantní, nasazena co nejdříve a neměla by být zbytečně přerušována.

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

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

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

ZÁVĚRY

Leukocytární exprese cytoadhezivních molekul

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

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

Léčba atorvastatinem vedla k významnému poklesu leukocytární exprese těchto molekul.

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

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

Metaloproteináza PAPP-A

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

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

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

Mikrovaskulární reaktivita

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

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

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

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

Krátkodobá léčba LDL-aférou

Zavedli jsme metodu HELP pro léčbu LDL-aférou; jedná se o první použití této metody v zemích bývalého východního bloku.

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

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

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

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

LITERATURA

- van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; 89: 36-44.
- Gutstein DE, Fuster V. The pathophysiology and clinical significance of atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 323-333.
- Hackett D, Davies G, Maseri A. Pre-existing coronary stenoses in patients with first myocardial infarction are not necessarily severe. *Eur Haert J* 1988; 9: 1317-1323.
- Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, Theroux P. Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE trial. *Circulation* 1999; 99: 3227-33.
- Tamai O, Matsuoka H, Nishida H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Nomura G, Imaizumi T. Single LDL-apheresis improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 1997; 95: 76-82.
- Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand* 2001; 173: 35-43.
- Rosenfeld ME. Leukocyte recruitment into developing atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 361-363.
- Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J hypertension* 2001; 14: 44S-54S.
- Hernandez C, Lecube A, Barbera G, Chacon P, Lima J, Simo R. Effects of hypolipidemic treatment on serum markers of vascular inflammation in dyslipidemic men. *Med Sci Monit* 2003; 9: 114-119.
- Rosenson RS, Wolff D, Tangney CC. Statins reduce oxidized low-density lipoprotein levels, but do not alter soluble intercellular cell-adhesion molecule-1 and vascular cell-adhesion molecule-1 levels in subjects with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2004; 106: 215-217.
- Bayes-Genis A, Schwartz RS, Lewis DA. Insulin-like growth factor binding protein-4 protease produced by smooth muscle cells increases in the coronary artery after angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 335-341.
- Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2001; 345: 1022-1029.
- Denktas AE, Best PJM, Woodrum JE. Pregnancy associated plasma protein-A levels are elevated in patients with unstable angina. *Eur Heart J* 2002; 23(Abtract Suppl): P2373.
- Qin QP, Laitinen P, Majamaa-Voltti K, Eriksson S, Kumpula E, Pettersson K. Release patterns of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in patients with acute coronary syndromes. *Scand Cardiovasc J* 2002; 36: 358-361.
- Futtermann LG, Lemberg L. Novel markers in the acute coronary syndrome: BNP, IL6, PAPP-A. *Am J Crit Care* 2002; 11: 168-172.
- Berliner JA, Territo MC, Sevanian A. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 1990; 85: 1260-1266.
- Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; 106: 653-658.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111-1115.
- Morris SJ, Shore AC, Tooke JE. Responses to the skin microcirculation to acetylcholine and sodium nitroprusside in patients with IDDM. *Diabetologia* 1995; 38: 1337-1344.
- Khan F, Litchfield SJ, Stonebridge PA, Belch JFF. Lipid-lowering and skin vascular responses in patients with hypercholesterolaemia and peripheral arterial obstructive disease. *Vascular Medicine* 1999; 4: 233-238.
- Asberg A, Hartmann A, Fjeldsa E, Holdaas H. Atorvastatin improves endothelial function in renal-transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1920-1924.
- Haak E, Abletshauser C, Weber S, Goedicke C, Martin N, Hermanns N et al. Fluvastatin therapy improves microcirculation in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2001; 155: 395-401.
- Thompson GR. LDL Apheresis. *Atherosclerosis* 2003; 167: 1-13.
- Bosch T. State of the art of lipid apheresis. *Artif organs* 1996; 30: 292-295.
- Gordon BR, Stein E, Jones P, Illingworth DR. Indications for low-density lipoprotein apheresis. *Am J Cardiol* 1994; 74: 1109-1112.
- Mii S, Mori A, Sakata H, Nakayama M, Tsuruta H. LDL apheresis for arteriosclerosis obliterans with occluded bypass graft: change in prostacyclin and effect on ischemic symptoms. *Angiology* 1998; 49: 175-180.
- Adachi H, Niwa A, Shinoda T. Prevention of restenosis after coronary angioplasty with low-density lipoprotein apheresis. *Artif Organs* 1995; 19: 1243-1247.
- Iizuka T, Takeda H, Inoue H, Miyamoto T, Ito H, Omura M, Tsuji H, Chiba S, Nishikawa T. Clinical trial of low density lipoprotein-apheresis for treatment of diabetic gangrene. *Intern Med* 1997; 36: 898-902.
- Rezaie-Majd A, Prager GW, Bucek RA, Scherthner GH, Maca T, Kress HG, Valent P, Binder BR, Minar E, Baghestanian M. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 397-403.
- Serrano CV Jr, Yoshida VM, Venturinelli ML et al. Effect of simvastatin on monocyte adhesion molecule expression in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2001; 157: 505-512.
- Mazzone A, de Servi S, Mazzucchelli I, Fossati G, Griotti D, Canale C, Cusa C, Ricevuti G. Increased expression of CD11b/CD18 on phagocytes in ischaemic disease: a bridge between inflammation and coagulation. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 648-652.
- Sbarouni E, Kroupis C, Kyriakides ZS, Koniavitou K, Kremastinos DT. Cell adhesion molecules in relation to simvastatin and hormone replacement therapy in coronary artery disease. *Eur Heart J* 2000; 21: 975-80.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

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

VLASTNÍ PUBLIKACE AUTORA se vztahem k tématu práce

Publikace v časopisech s uváděným IF

1. Štulc T, Češka R; Cholesterol lowering and the vessel wall: new insights and future perspectives. *Physiological Research* 2001; 50(5): 461-471.
2. Štulc T, Vrablík M, Marinov I, Kasalová Z, Češka R. Atorvastatin reduces expression of leukocyte adhesion molecules in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2003; 166(1): 197-198.
3. Češka R, Štulc T, Fialová L, Zima T, Malbohan I. PAPP-A, a novel marker of unstable plaque, is not influenced by hypolipidemic treatment in contrast to CRP. *Atherosclerosis* 2003; 166(1): 195-196.
4. Štulc T, Kasalová Z, Prázný M, Vrablík M, Škrha J, Češka R. Microvascular reactivity in patients with hypercholesterolemia: the effect of lipid lowering treatment. *Physiological Research* 2003; 52(4): 439-445.
5. Štulc T, Malbohan I, Malík J, Fialová L, Soukupová J, Češka R. Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A in patients with hypercholesterolemia: the effect of atorvastatin treatment. *Am Heart J*. 2003; 146(6): 1060(e21).
6. Škrha J, Štulc T, Hilgertová J, Weiserová H, Kvasnička J, Češka R. Effect of simvastatin and fenofibrate on endothelium in type 2 diabetes. *European Journal of Pharmacology* 2004; 493: 183-189.
7. Malík J, Wichterle D, Haas T, Melenovský V, Šimek J, Štulc T. Repeatability of noninvasive surrogates of endothelial function. *Am J Cardiol* 2004; 94: 693-696.
8. Malík J, Štulc T, Češka R. Matrix metalloproteinases in isolated hypercholesterolemia. *International Angiology* 2005; 24: 300-303.

Ostatní publikace a vybraná abstracta z konferencí

1. Štulc T, Češka R. LDL-aféze - vývoj, technika a léčebné možnosti. *Diabetes, metabolismus, endokrinologie, výživa* 1999; 2(3): 121-127.
2. Štulc T, Češka R. Radikální léčebné postupy u hyperlipoproteinémií. *Diagnóza* 1999; č.29: 11.
3. Štulc T, Sedláček K, Češka R. Snížení cholesterolu: víc než jen regrese aterosklerózy. *Remedia* 2000; 10(2): 170-173.
4. Štulc T, Hořejší B, Češka R. Postavení LDL-afézy v terapii hyperlipoproteinémií. *Medica revue* 2000; 7(2): 28-29.
5. Štulc T, Kasalová Z, Vrablík M, Marinov I, Češka R. Vliv atorvastatinu na leukocytární expresi cytoadhezivních molekul u pacientů s hypercholesterolemii. *Cor et Vasa* 2003; 45 (1): 54-55.
6. Štulc T, Vrablík M. Radikální léčebné postupy u pacientů s hyperlipidémií. *Kardioforum* 2003; 1(3): 29-33.
7. Štulc T, Vrablík M, Marinov I, Kasalová Z, Češka R. Leukocyte expression of cell adhesion molecules in patients with hypercholesterolemia: Effect of atorvastatin treatment. *Atheroscler Suppl* 2002; 3(2): 233.

8. Kasalová Z, Štulc T, Vrablík M, Prázný M, Škrha J, Češka R. Effect of atorvastatin on microvascular reactivity in patients with hypercholesterolemia. *Atheroscler Suppl* 2002; 3(2):233.
9. Štulc T, Kasalová Z, Vrablík M, Prázný M, Škrha J, Češka R. Microvascular reactivity in patients with hypercholesterolemia: effect of atorvastatin treatment. *Eur Hear J* 2002; 23(Abstr suppl): 224.
10. Štulc T, Marinov I, Kasalová Z, Vrablík M, Češka R. Leukocyte but not endothelial cell adhesion molecules are increased in patients with hypercholesterolemia: the effect of atorvastatin treatment. *Eur Heart J* 2003; 24(Abstr suppl): 336.
11. Štulc T, Škrha J, Malbohan I, Fialová L, Malík J, Češka R. Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A in patients with hypercholesterolemia and diabetes: the effect of lipid lowering. *Eur Heart J* 2003; 24(Abstr suppl): 458.
12. Štulc T, Marinov I, Kasalová Z, Vrablík M, Češka R. Leukocyte but not endothelial cell adhesion molecules are increased in patients with hypercholesterolemia: the effect of atorvastatin treatment. *Atheroscler Suppl* 2003; 4(2): 144.
13. Štulc T, Škrha J, Malbohan I, Fialová L, Malík J, Češka R. Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A in patients with hypercholesterolemia and diabetes: the effect of lipid lowering. *Atheroscler Suppl* 2003; 4(2): 331.
14. Prázný M, Kasalová Z, Štulc T, Vrablík M, Škrha J. Microvascular reactivity after statin treatment in hyperlipidemic diabetic and non-diabetic patients. *Journal of Vascular Research* 2004; 41(S2): 21.
15. Prázný M, Kasalová Z, Štulc T, Vrablík M, Škrha J. Microvascular reactivity after statin treatment in hyperlipidemic diabetic and non-diabetic patients. *Journal of Vascular Research* 2004; 41(S2): 21.