**FARMACEUTICKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V HRADCI KRÁLOVÉ**

Zdravotnická bioanalytika

# Sledování parametrů aktivace endotelu v souvislosti s rozvojem aterosklerózy

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Hradec Králové 2006

Jana Vránová

Při této příležitosti bych ráda poděkovala panu RNDr. Ctiradu Andrýsovi za odborné vedení, ochotu a pomoc při sestavování této diplomové práce, dále paní Haně Kotlandové za grafické zpracování obrázků a celému kolektivu pracovníků Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové za vstřícnost a přátelské přijetí.

**OBSAH**

**SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK** ..... 3
**1. ÚVOD** ..... 4
**2. CÍL PRÁCE** ..... 6
**3. TEORETICKÁ ČÁST** ..... 7
3.1. PORUCHY METABOLISMU LIPIDŮ ..... 7
3.1.1. Familiární hypercholesterolémie ..... 7
3.1.2. Familiární kombinovaná hyperlipidemie ..... 9
3.2. EXTRAKORPORÁLNÍ ELIMINACE LDL-CHOLESTEROLU ..... 10
3.2.1. Aferéza – obecně ..... 10
3.2.2. Metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu ..... 10
3.2.2.1. Imunoadsorpce LDL-cholesterolu ..... 11
3.2.2.2. Metody založené na filtraci částic ..... 13
3.2.3. Vliv LDL-aferézy na hladiny lipidů ..... 15
3.2.4. Indikace k léčbě LDL-aferézou ..... 16
3.2.5. Účinky léčby LDL-aferézou ..... 16
3.2.5.1. Vedlejší účinky léčby LDL-aferézou ..... 17
3.3. DYNAMIKA A VZÁJEMNÉ VZTAHY VYBRANÝCH UKAZATELŮ ATEROGENEZE ..... 18
3.3.1. Úloha cholesterolu v aterogenezi ..... 18
3.3.2. Ateroskleróza jako zánětlivý proces ..... 20
3.3.3. Selektinové adhezní molekuly a ateroskleróza ..... 24
3.3.4. Monocytární chemotaktický protein-1 a ateroskleróza ..... 27
3.3.5. C-reaktivní protein a ateroskleróza ..... 28
3.3.6. CD 40 ligand a ateroskleróza ..... 30
**4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST** ..... 32
4.1. CHARAKTERISTIKA SOUBORU ..... 32
4.2. MATERIÁL A METODY ..... 33
4.2.1. Imunoadsorpce LDL-cholesterolu ..... 33
4.2.2. Laboratorní metodika stanovení ..... 34
4.2.2.1. ELISA ..... 35
4.2.2.1.1. Kvantitativní stanovení sP-selektinu ..... 35
4.2.2.1.2. Kvantitativní stanovení sE-selektinu ..... 37

4.2.2.1.3. Kvantitativní stanovení MCP-1 ....38
4.2.2.1.4. Kvantitativní stanovení molekuly sCD 40L ....40
4.2.2.2. LEIA ....41
4.2.2.2.1. Kvantitativní stanovení hs CRP ....41
4.3. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ ....43
4.3.1. Základní statistika ....43
4.3.2. Testovací statistika ....43
**5. VÝSLEDKY** ....44
**6. TABULKY A GRAFY** ....48
6.1. PŘEHLED NAMĚŘENÝCH HODNOT ....48
6.2. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ ....48
6.3. GRAFICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ ....48
**7. DISKUZE** ....64
**8. ZÁVĚR** ....69
**9. SEZNAM LITERATURY** ....70

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

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

# 1. ÚVOD

Klinické důsledky aterosklerózy (AT), tj. ischemická choroba srdeční, cévní mozkové příhody a ischemická choroba periferních tepen, jsou nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých státech Evropy a USA (více než 50 % všech úmrtí).

Na počátku 20. století byla AT v České republice poměrně vzácným postižením, pak ale začal její výskyt prudce stoupat až do dnešní doby, kdy patří ČR v úmrtnosti na komplikace AT na přední místa ve světě. Proto se řada výzkumníků a odborníků na danou problematiku snaží objasnit další, dosud nejasné patofyziologické mechanismy, využitelné v prevenci, diagnostice a terapeutické praxi.

Studium patogenetických mechanismů prokázalo imunologickou podstatu tohoto onemocnění. V současné době je na AT pohlíženo jako na chronický zánět, který je výsledkem interakcí mezi chemicky modifikovanými lipoproteiny, buňkami imunitního systému a dalšími buněčnými elementy, jakými jsou endotelové buňky, buňky hladké svaloviny, fibroblasty, mastocyty a trombocyty.

Ateroskleróza se řadí k multifaktoriálním onemocněním, přičemž jedním z klíčových rizikových faktorů je hypercholesterolémie. Mnohé klinické studie prokázaly, že právě vyšší hladina cirkulujícího LDL (low-density lipoproteins) je příčinou akumulace LDL v intimě artérií a mechanismem poškození endotelu iniciuje proces aterogeneze.

Poruchy metabolismu lipidů vedou k předčasné ateroskleróze s těžkými komplikacemi u relativně mladých lidí. Proto je velmi žádoucí u zvláště těžkých forem, jako je familiární hypercholesterolémie (FH) a familiární kombinovaná hyperlipidémie (FCH), snížit maximálně hladinu zejména LDL cholesterolu.

Ačkoliv dietní opatření a úspěšný vývoj hypolipidemik umožňují relativně úspěšnou terapii většiny pacientů, zůstává malá část (asi 5%) heterozygotů FH a všichni homozygotní pacienti, kde je odpověď nedostatečná. U těchto pacientů je doslova životzachraňující metodou extrakorporální eliminace LDL cholesterolu, tzv. hemoreoterapie.

Na pracovišti hemaferézy FN Hradec Králové probíhá léčba těchto pacientů od roku 1996 metodou LDL aferézy (na principu specifické imunoadsorpce), v roce 2003 k ní přibyla reoferéza (na principu filtrace podle velikosti částic).

Pomocí těchto metod lze dosáhnout u pacientů s komplikacemi ateromatózy výrazné redukce nebezpečných složek lipoproteinů – LDL cholesterolu, lipoproteinu

(a) i některých dalších rizikových faktorů. Tyto zákroky mohou mít vliv na celou řadu fyziologických funkcí pacienta. Zejména lze očekávat změny endoteliálních funkcí, které lze monitorovat pomocí vhodných markerů.

Mechanismus, jakým tyto metody ovlivňují mikroprostředí endotelu cév a změny v mikrocirkulaci (reologické, funkční, strukturální) není zatím do detailu prozkoumán.

Mnohé zahraniční studie ve světě se zabývaly skupinou obdobných hyperlipidemických pacientů, léčených metodou extrakorporální hemoreoterapie nebo LDL aferézy. Zpravidla prokazují účinnost léčby, ale řada ukazatelů a vztahů je nejasných (přesné indikace k léčbě, délka procedur a intervaly jejich opakování, prevence možných vedlejších účinků atd.)

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce, která navazuje na výsledky předchozích studií, bylo ověřit a blíže prozkoumat změny v oblasti endotelového mikroprostředí a změny reologických faktorů krve u pacientů s hypercholesterolémií léčených metodou LDL aferézy a reoferézy.

Sledovali jsme změny vybraných ukazatelů aktivace endotelu a dalších ukazatelů aterogeneze a jejich korelaci s hladinou lipidů před a po provedeném zákroku. Jednalo se o solubilní formu adhezních molekul sP-selektin a sE-selektin, monocytární chemotaktický protein – 1 (MCP-1), molekulu sCD 40L a vysoce senzitivní C- reaktivní protein (hsCRP).

Ke stanovení hladin vyšetřovaných markerů v plazmě jsme použili metod enzymoimunoanalýzy a chemiluminiscenční analýzy.

# 3. TEORETICKÁ ČÁST

Poruchy metabolismu lipidů, zejména familiární hypercholesterolemie (FH) a familiární kombinovaná hyperlipidemie (FCH), vedou k předčasné cévní arterioskleróze a nebezpečným komplikacím u relativně mladých lidí.

## 3.1. Poruchy metabolismu lipidů

### 3.1.1. Familiární hypercholesterolemie

FH je z klinického hlediska nejzávažnější formou vrozené dyslipoproteinémie s autozomálně dominantním typem dědičnosti.

Podstatou FH je mutace genu pro LDL-receptor. Při absenci nebo afunkci LDL receptorů nejsou LDL částice vychytávány, ale hromadí se v krvi a jsou odstraňovány pomocí tzv. „scavenger" receptorů makrofágů a jiných fagocytujících buněk, které formují základ aterosklerotických plátů. Chybí inhibiční vliv internalizace LDL-receptoru po navázání LDL-částice na syntézu cholesterolu v buňkách, které tak produkují cholesterol i přes jeho zvýšenou nabídku v krvi.

Výskyt **heterozygotní formy FH** v naší populaci je 1:500. V České republice tedy žije asi 20 000 nemocných s FH, z nichž jen malá část je dispenzarizována a adekvátně léčena. Heterozygotní jedinci mají cca 50 % normálního počtu funkčních LDL-receptorů, hladina cholesterolu je velmi variabilní a pohybuje se kolem 7 - 14 mmol/l. Nemocní mívají předčasné aterosklerotické změny cév a mohou mít šlachové xantomy (viz obr.č.2), xantelasmata na víčkách a arcus cornae senilis (viz obr.č.1).

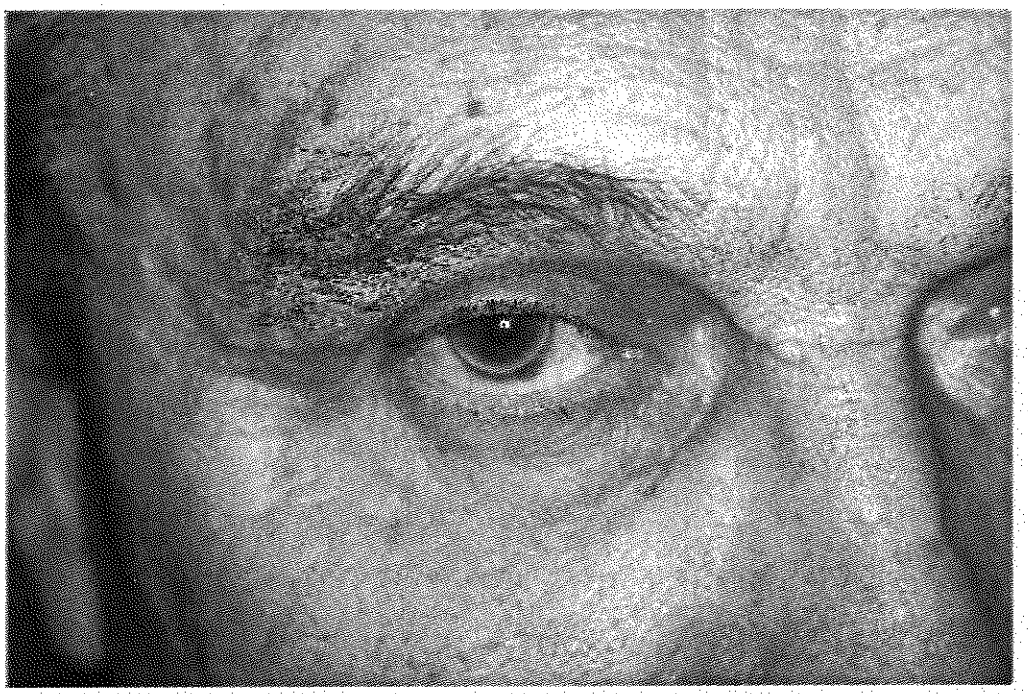
Terapie zahrnuje dietní a režimová opatření a medikamentózní léčbu, především statiny. Pouze cca u 5 % nemocných konzervativní terapie selhává (Borberg, 1997).

Výskyt **homozygotní formy FH** je 1:1.000.000. Míra zvýšení hladiny LDL-cholesterolu v plazmě odpovídá aktivitě reziduálních LDL-receptorů. Hladina cholesterolu se pohybuje v rozmezí 16-30 mmol/l. Ischemická choroba srdeční (ICHS) se u těchto jedinců vyskytuje již v dětství a často vede ke smrti do 20. roku života.

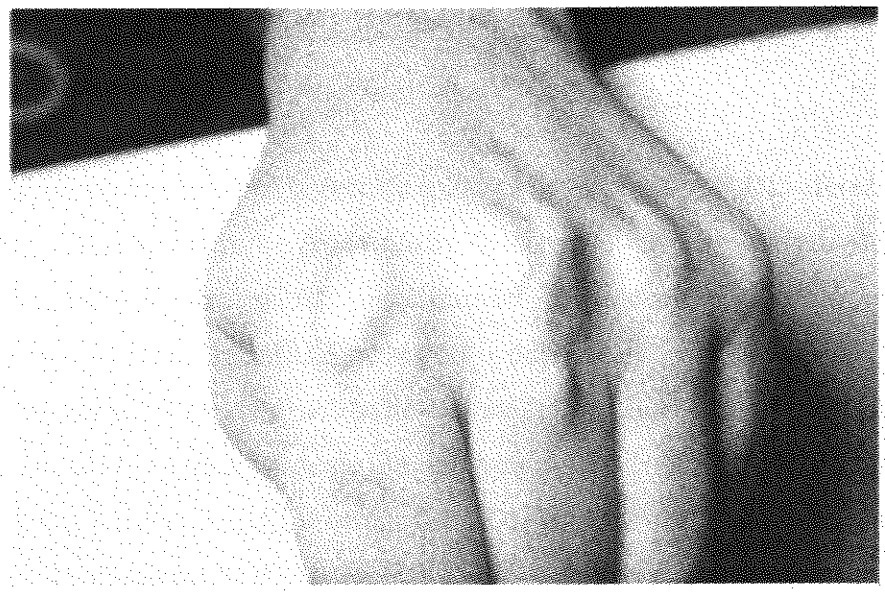
Diagnóza je založena na vyšetření lipidového profilu, rodinné anamnéze, přítomnosti šlachových a kožních xantomů, klinických známek ICHS nebo aterosklerotického postižení kořene aorty, které působí její supravalvulární stenózu a přechází na koronární ústí.

Hypercholesterolemie u homozygotů nereaguje na konzervativní léčbu a dlouhodobá pravidelná extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu je pro tyto pacienty život zachraňujícím postupem (Rader, 2003).

Fenotypově podobný, ale s klinicky lehčím průběhem, je familiární defekt apolipoproteinu B ($apoB_{100}$), podmíněný mutací té části $apoB_{100}$, která se váže na LDL-receptor (Myant, 1993).



***Obr. 1*** *Arcus cornae*



***Obr. 2*** *Šlachové xantomy (zapůjčil R. Češka)*

### 3.1.2.Familiární kombinovaná hyperlipidemie

FCH je nejčastější geneticky podmíněnou poruchou metabolismu lipoproteinů. Její frekvence v populaci je odhadována na 1:50 až 1:100. U nemocných s infarktem myokardu dosahuje výskyt cca 10 %, v rodinách s předčasným infarktem myokardu až 30%.

Molekulární základ FCH je neznámý, choroba má podklad v geneticky determinované zvýšené produkci $apoB_{100}$ a lipoproteinů o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins, VLDL). Někteří pacienti jsou heterozygoty pro deficit lipoproteinové lipázy. Typická je přítomnost různých lipoproteinových fenotypů v rámci jedné rodiny, pacient i jeho pokrevní příbuzní mívají zvýšené hodnoty VLDL-cholesterolu, LDL–cholesterolu nebo obojího. Zvýšení $apoB_{100}$ je pravidlem.

Porucha bývá součástí metabolického Reavenova syndromu, běžným nálezem je nadváha či obezita. Nejsou přítomny kožní ani šlachové xantomy, mohou se vyskytnout xantelasmata očních víček. Dietní a režimová opatření zaměřená na snížení hmotnosti jsou základem léčby, u mnohých je však potřebná kombinovaná medikamentózní léčba (Goldstein, 1977). Extrakorporální eliminace je nutná jen zřídka (Borberg, 1997).

## 3.2. Extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu

### 3.2.1. Aferéza - obecně

Slovo aferéza pochází z řečtiny a znamená odstranění. LDL-aferéza je tedy odstranění LDL-cholesterolu. Tento název byl poprvé užit profesorem Borbergem jako pojmenování pro selektivní eliminaci LDL-cholesterolu na podkladě imunoadsorpce, reakce specifické protilátky s odpovídající strukturou LDL-částice. V tomto smyslu je název stále užíván některými autory (Borberg, 1997, Bláha, 2003).

V literatuře se však můžeme čím dál více setkávat s tímto názvem ve smyslu označujícím všechny metody odstraňující LDL-cholesterol, a to i v případě těch, které nejsou v eliminaci LDL-částic zdaleka tak selektivní, jako je „původní" LDL-aferéza na principu imunoadsorpce.

Selektivní metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu jsou v České republice v současnosti prováděny pouze na pracovišti hemaferézy FN Hradec Králové, spektrum nemocných je velmi omezené a detaily této problematiky se týkají relativně úzkého okruhu odborníků. Proto některé metody extrakorporální eliminace a jejich modifikace nemají zavedený český název.

### 3.2.2. Metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu

První metodou užitou k extrakorporální eliminaci cholesterolu byla **plazmaferéza**.

Principem plazmaferézy je odstranění plazmy obsahující nežádoucí součásti. Její oddělení z plné krve probíhá buď pomocí centrifugace nebo s pomocí membránové separace, spočívající v použití membrán o definované velikosti pórů, zadržujících krevní tělíska. Odstraněná plazma může být nahrazena roztoky krystaloidů nebo koloidů, albuminem nebo plazmou.

Nevýhodou metody je neselektivita eliminace nežádoucí látky, v tomto případě LDL-cholesterolu.

Při déletrvající léčbě dochází k závažným ztrátám imunoglobulinů, hormonů, transportních proteinů a stopových prvků. Nežádoucí je i odstranění lipoproteinů o vysoké hustotě (high density lipoproteins, HDL).

Plazmaferéza se stala východiskem pro vývoj selektivnějších metod, které jsou až na výjimky založeny na dalším zpracování separátorem oddělené plazmy (Thompson, 2003).

Selektivní metody extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu pracují na podkladě imunitní nebo fyzikálně chemické interakce mezi aktivním povrchem eliminačního média a hlavní substancí LDL-částic apolipoproteinem $B_{100}$ (apo $B_{100}$), nebo na principu filtrace podle velikosti částic.

**3.2.2.1. Imunoadsorpce LDL-cholesterolu (IA, LDL-imunoadsorpce)** je nejstarší ze selektivních metod. Využívá specifickou interakci polyklonálních protilátek s antigenními strukturami apo$B_{100}$. Tento princip zajišťuje vysokou selektivitu eliminace.

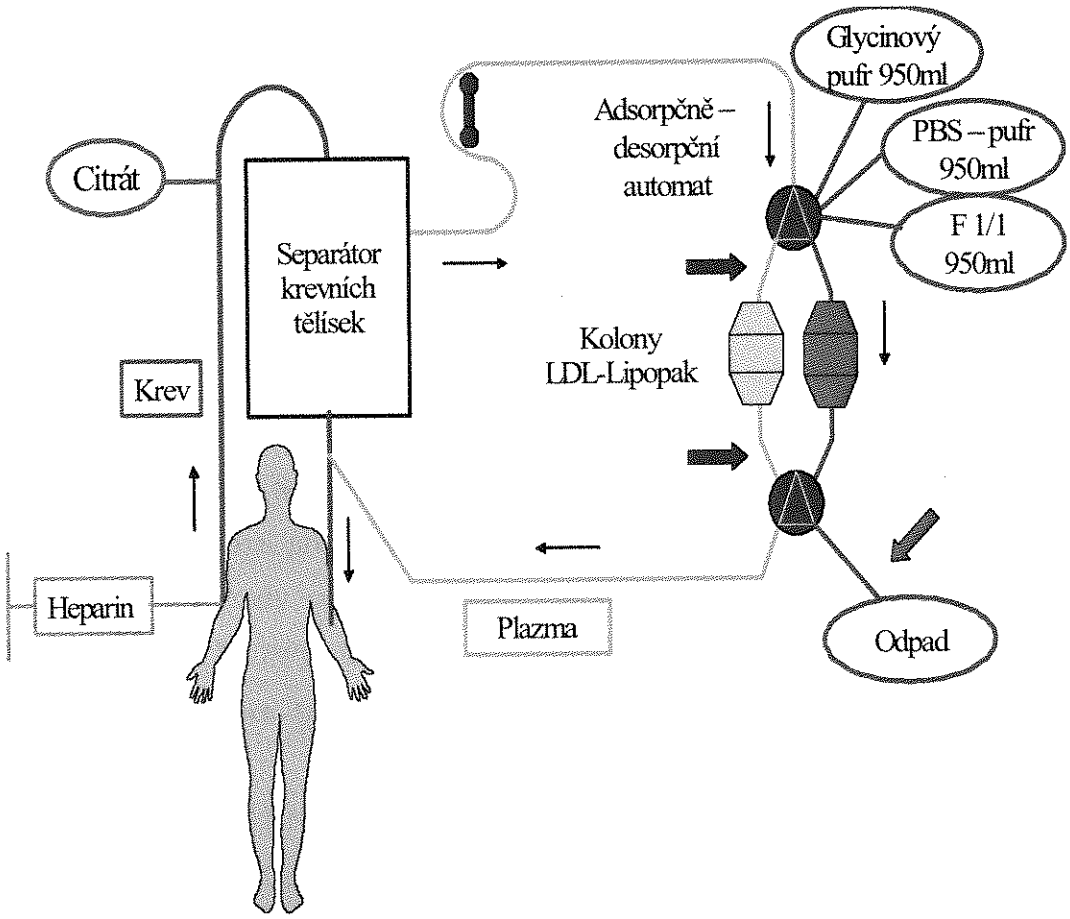
Přístrojový systém (viz *Obrázek 3*) se skládá ze separátoru krevních tělísek, pracujícího na principu buď centrifugace nebo filtrace, a adsorpčně-desorpčního automatu, který řídí střídavou adsorpci a regeneraci (desorpci) dvou kolon, obsahujících protilátky proti lidskému apo$B_{100}$. Kolony jsou určeny k opakovanému použití. (Borberg, 1988). K dispozici jsou například kolony Therasorb firmy Baxter (Unterschleissheim, Německo) nebo LDL-Lipopak, Pocard Ltd. (Moskva, Rusko).

Kolony LDL-Lipopak (Pocard), používané na pracovišti hemaferézy FN HK, obsahují na sefarózový gel navázané polyklonální ovčí protilátky proti lidskému apo$B_{100}$. Při průchodu kolonou jsou z plazmy odstraňovány LDL-částice a očištěná plazma se po spojení s krevními tělísky vrací zpět do oběhu pacienta. Když je kapacita kolony vyčerpána, adsorpčně-desorpční automat odkloní tok plazmy do druhé kolony a zároveň zahájí regeneraci první kolony roztokem glycinového pufru o pH 2,4 (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který uvolňuje vazbu mezi protilátkami a apo$B_{100}$. Následně je pH v koloně upraveno roztokem PBS pufru o pH 7,4 (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který je poté odstraněn pomocí fyziologického roztoku. V automatu tak současně jednou kolonou prochází plazma a druhá kolona je regenerována. Toto sekvenční použití adsorpce a desorpce vede k teoreticky neomezené kapacitě systému, což má výhodu v možnosti nastavení délky procedury podle individuálních potřeb pacienta.

Mezi jednotlivými LDL-aferézami jsou regenerované kolony skladovány při teplotě 2-8°C, naplněny roztokem PBS pufru s příměsí 0,01% azidu sodného

(Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který je před dalším užitím zcela odstraněn fyziologickým roztokem (5000 ml F 1/1 na každou kolonu).

**Obrázek 3. Schéma imunoadsorpce LDL-cholesterolu (Cermanová, 2006)**




Další vysoce selektivní metodou je **adsorpce na dextransulfát (DSA,** firma Kaneka, Osaka, Japonsko), která pracuje na principu elektrostatické interakce mezi kladným nábojem $apoB_{100}$ a záporným nábojem řetězců dextransulfátu (Yokoyama, 1985). Kolona váže VLDL, LDL a lipoprotein (a) [(Lp(a)]. I zde je užívána dvojice kolon (Liposorber LA), které se střídají v pracovním a regeneračním cyklu.

Na principu elektrostatické interakce je založena také **heparinem navozená extrakorporální precipitace LDL-cholesterolu (Heparin Induced Extracorporeal LDL Precipitation; HELP,** firma B. Braun, Melsungen, Německo) a to na interakci mezi heparinem a $apoB_{100}$ při sníženém pH, které zvyšuje počet kladných nábojů v molekule $apoB_{100}$ a usnadňuje precipitaci s heparinem (Wieland,

1983). Precipitát je následně odstraněn filtrací. Fibrinogen, který též precipituje, klesá asi na polovinu. Systém byl zkombinován s hemodialýzou (Eisenhauer, 1991).

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

Kromě odstranění patologické substance, v našem případě LDL-částic, jsou eliminovány i další makromolekuly, jako je fibrinogen, α2-makroglobulin, imunoglobuliny, fibronektin atd.

Výsledkem je zlepšení rheologických vlastností krve, dané především snížením viskozity plazmy, ale i snížením agregace a adhezivity trombocytů a erytrocytů a zlepšením jejich flexibility. Následkem je relativně setrvalé zlepšení mikrocirkulace a tím i tkáňové oxygenace.

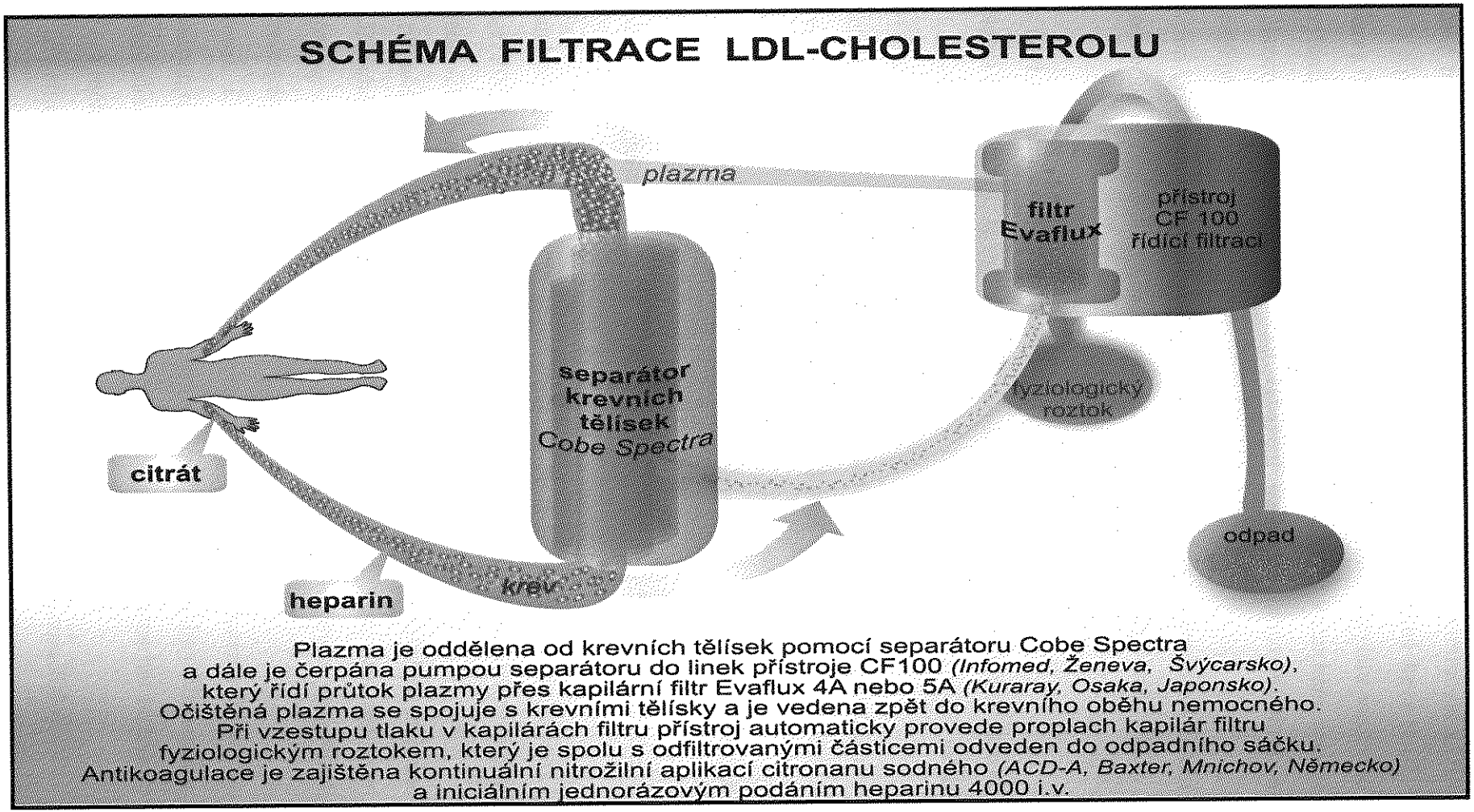
V případě užití primárního přístroje, který pracuje na principu filtrace, jsou modifikace této metody nazývány **dvojitá filtrační plazmaferéza (*double filtration plasmapheresis, DFPP*), kaskádová filtrace, rheoferéza, nebo membránová diferenciální filtrace (*membrane differential filtration, MDF*)** (Agishi, 2000, Klingel, 2000).

Plazma je od krevních tělísek oddělena stejně jako u imunoadsorpce, a to pomocí separátoru Cobe-Spectra (COBE, BCT, Denver, CO, USA), vlastní eliminace LDL-částic je provedena na principu filtrace částic podle jejich velikosti pomocí filtrů Evaflux 4A (Kuraray Co., Osaka, Japonsko), určených k jednorázovému použití. Vlastní filtrační membrány o celkovém povrchu 2 $m^2$ jsou vyrobeny z kopolymeru ethylenu a vinylalkoholu a uspořádány do formy kapilár o vnitřním průměru 175 μm a průměru pórů 0,03 μm. Kapiláry jsou uzavřeny v obalu z polykarbonátové pryskyřice. Schéma celého zařízení, užívaného při filtraci, je znázorněno na *Obrázku 4.*

Na rozdíl od výše popsané mnohem selektivnější imunoadsorpce, dochází u těchto metod k významné eliminaci imunoglobulinů – IgG 15%, IgA 24%, IgM 63% (Matic, 2002).

Z pohledu eliminace LDL-cholesterolu platí, že čím více je metoda selektivní, tím má menší účinky na rheologické vlastnosti krve.

**Obr. č. 4: Schéma filtrace LDL-cholesterolu (Cermanová, 2006)**



Je také možné úvodní separaci plazmy úplně vynechat a eliminovat LDL-cholesterol z plné krve pomocí **přímé adsorpce lipoproteinů z plné krve (LDL-hemoperfuze).** Tato metoda užívá nehemolytického adsorbentu, akrylátu vázaného na polyakrylamid, který umožňuje perfuzi kolony plnou krví. Vynechání úvodní separace plazmy zjednodušuje technické vybavení na jeden pracovní okruh a urychluje celý proces.

Prvním systémem přímé adsorpce LDL-cholesterolu byl systém zvaný **DALI** (***Direct Adsorption of Lipids*** firmy Fresenius, St. Wendel, Německo) (Bosch, 1993).

### 3.2.3. Vliv LDL-aferézy na hladiny lipidů

Některá data ukazují, že metody IA, DSA a HELP jsou srovnatelně účinné ve snižování LDL-cholesterolu s průměrnou redukcí o 62 %, 65 %, resp. 59 % při jedné proceduře (Richter, 1999).

Podle jiné studie jsou IA a DSA stejně účinné a obě mírně účinnější než DALI – snižují LDL–cholesterol o 82 % resp. 84 % oproti 77 % u DALI (Schmaldienst, 2000).

Další studie neshledala signifikantní rozdíly mezi IA a DALI ve změnách LDL, HDL a triacylglyceridů (Baumbauer, 2002).

DSA a DALI mohou snižovat HDL-cholesterol méně než IA (Schmaldienst, 2000).

Redukce Lp(a) při jednom sezení byla 59 % u IA oproti 29 % u DALI (Baumbauer, 2002), podle jiných autorů byla u IA, DSA, HELP i DALI srovnatelná (Schmaldienst, 2000) a pohybovala se v průměru kolem 60 %.

V případě IA je třeba zpracovat větší objemy plazmy k dosažení stejného poklesu LDL-cholesterolu než u DSA (Knisel, 1994). U IA však není množství očištěné plazmy limitováno, adsorpční kapacita, daná střídáním dvou pracovních kolon, je teoreticky nekonečná.

Naopak u metody HELP je rozsah procedury limitován omezenou kapacitou filtru (Schaumann, 1996) a nebezpečím pramenícím z poklesu hladiny fibrinogenu. HELP je vzhledem k nutnosti odstranění precipitátu a zbylého heparinu technicky náročnější než metody založené na adsorpci.

IA je v eliminaci LDL-cholesterolu nejselektivnější (Thompson, 2003).

### 3.2.4. Indikace k léčbě LDL-aferézou

Zvýšený LDL-cholesterol je jedním z nejvýznamnějších rizikových faktorů aterosklerózy a jeho snížení se stalo základním opatřením k zamezení progrese a navození regrese postižení cév.

U nemocných s těžkou familiární hypercholesterolemií může být dosažení cílových hladin LDL-cholesterolu obtížné až nemožné a LDL-aferéza může být jediným život zachraňujícím postupem.

Je to však metoda technicky, časově a finančně náročná. Procedury LDL-aferézy je možné provádět pouze ve specializovaných centrech a je nutné je zpravidla celoživotně a pravidelně opakovat.

Indikace k léčbě LDL-aferézou vycházejí z výše nastíněných specifik a vyvíjí se s úrovní znalostí o rizicích a možnostech prevence aterosklerózy.

Např. v USA jsou podle *Food and Drug Administration* (FDA) indikováni k léčbě LDL-aferézou homozygoti FH s hladinou LDL-cholesterolu >13 mmol/l, což v praxi splňují zpravidla všichni tito nemocní, dále heterozygoti FH s LDL-cholesterolem > 7,8 mmol/l bez ICHS nebo nad 5,2 mmol/l s ICHS. Kritéria jsou hodnocena až po šesti měsících přísné diety a maximální medikamentózní léčby (Vella, 2001).

Podle nových doporučení amerického Národního cholesterolového edukačního programu (National Cholesterol Education Program, NCEP) a Evropské společnosti pro aterosklerózu (European Atherosclerotic Society, EAS) byly rozšířeny indikace k intenzivní cholesterol-snižující terapii u nemocných s ICHS s cílem dosáhnout hladiny LDL-cholesterolu pod 2,6 mmol/l.

Při zvažování indikace léčby LDL-aferézou je nutný individuální přístup k nemocným.

### 3.2.5. Účinky léčby LDL-aferézou

LDL-aferéza nejen redukuje plazmatické hladiny LDL-cholesterolu a Lp(a), ale predominantně snižuje především počet malých denzních LDL-částic, které jsou považovány za nejvíce aterogenní (Schamberger, 2000).

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

charakterizovaného rovnováhou mezi syntézou a odstraňováním cholesterolu (Borberg, 1997).

Pravidelné procedury vedou ke zpomalení nebo zastavení progrese či dokonce k regresi aterosklerotických plátů a v klinické praxi k redukci počtu koronárních příhod (Borberg, 1988, 1997).

Regrese aterosklerotických koronárních plátů po roční léčbě LDL-aferézou byla prokázána studií LACMART (Low density lipoprotein Apheresis Coronary Morphology And Reserve Trial), která porovnávala koronarografické nálezy a výsledky intravaskulárnho ultrazvuku (Matsuzaki, 2002).

LDL-aferéza vedla po 2,5 letech léčby k signifikantní redukci koronárních kalcifikací (Hoffmann, 2003), které podle některých prací (Arad, 2000) mají vztah k riziku koronárních příhod.

### 3.2.5.1. Vedlejší účinky léčby LDL-aferézou

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

Mezi nejčastější nežádoucí účinky hemaferetických procedur patří:

- příznaky citrátové toxicity

  Roztok citrátu umožňuje na principu tvorby chelátů s kalciem účinnou regionální antikoagulaci, potřebnou k zamezení tvorby trombů v přístroji. Je přidáván ke krvi pacienta a po pasáži přístrojem se dostává do jeho oběhu (Hester, 1983).

- individuálně variabilní pokles krevního tlaku

  V závislosti na velikosti poklesu a vnímavosti pacienta může být zcela bez příznaků nebo vyvolat pocit nevolnosti a mdlob a nebo výjimečně vyústit v krátkodobé bezvědomí. Často je spojen s vazo-vagální reakcí.

- aktivace komplementu při kontaktu plazmy s povrchem separačního setu a adsorpčních kolon s následkem uvolnění mediátorů s anafylaktoidními a vazodilatačními účinky (Shiga, 1998).
- alergické a pyretické reakce
- projevy přetížení náhradními roztoky
- vzduchová embolie
- minerálové dysbalance

- hemolýza
- obtíže se zavedením žilních vstupů a jejich komplikace (Borberg, 1997).

## 3.3. Dynamika a vzájemné vztahy vybraných ukazatelů aterogeneze

### 3.3.1. Úloha cholesterolu v aterogenezi

Vysoká hladina cholesterolu je známým rizikovým faktorem aterosklerózy. Cholesterol je v cirkulaci přenášen ve formě lipoproteinů. Dva nejvýznamnější lipoproteiny transportující cholesterol jsou LDL a HDL.

**LDL (low-density lipoproteins)**

Lipoproteiny o nízké hustotě, které tvoří 70% cirkulujícího cholesterolu, vznikají z částic VLDL odevzdáním triacylglyceridů tkáním a odštěpením jiných apolipoproteinů, než je $apoB_{100}$.

Fyziologickou rolí LDL je dodávka cholesterolu do tkání. LDL-částice jsou vychytávány pomocí LDL-receptorů, které reagují s $apoB_{100}$. Po navázání LDL-částice je receptor internalizován, cholesterol je uvolněn a receptor je znovu vystaven na povrchu buňky.

Plazmatická hladina LDL-částic je z větší části určena mírou jejich vychytávání pomocí LDL-receptorů, především v játrech.

Autorem vzorce pro výpočet LDL-cholesterolu je W.T.Friedewald :

**LDL-cholesterol (mmol/l) = celkový CH (mmol/l) - [TG (mmol/l):2.2] - HDL (mmol/l)**

Nativní LDL-částice téměř neindukují in vitro změny související s aterosklerózou. Spouštěcím faktorem, vedoucím k akumulaci LDL-cholesterolu ve stěně cév, je jeho oxidativní modifikace (Navab, 1996). Podstatou oxidativní modifikace je změna chemické struktury apolipoproteinu B, skýtající LDL-částici proinflamatorní, protrombotické a aterogenní vlastnosti (Steinberg, 1989).

Modifikované LDL-částice mají schopnost zvyšovat chemotaxi monocytů prostřednictvím stimulace syntézy chemokinů, např. monocytárního chemotaktického proteinu-1 (MCP-1). Dále mohou stimulovat monocyty k produkci cytokinů, indukovat zvýšenou expresi adhezních molekul na povrchu endotelu a stimulovat makrofágy k proliferaci. Modifikované LDL-částice jsou zvýšeně vychytávány makrofágy, vedou k jejich přeměně v pěnové buňky a indukují u nich apoptózu. Tím přispívají k tvorbě nekrotického jádra aterosklerotického plátu. Vazbou na C-reaktivní protein (CRP) aktivují modifikované LDL-částice komplement klasickou cestou.

K modifikaci dochází až ve stěně arterie za účasti mnoha oxidativních systémů (například lipooxygenázy, myeloperoxidázy, syntetázy oxidu dusnatého), pocházejících převážně z monocytů (Schwenke, 1989).

V závislosti na míře změny chemické struktury je LDL-částice méně či dokonce není vůbec rozpoznávána a vázána LDL-receptorem a naopak reaguje s tzv. „scavenger" receptory makrofágů a hladkých svalových buněk, ze kterých se postupně stávají buňky pěnové. Ty jsou jedním zásadních činitelů časné i pokročilé aterosklerózy (Navab, 1996).

**HDL (high-density lipoproteins)**

Lipoproteiny o vysoké hustotě jsou zásadním činitelem pro reverzní transport cholesterolu ze tkání. Snížení hladiny HDL-cholesterolu pod 1 mmol/l je samostatným rizikovým faktorem aterosklerózy. Naopak jeho zvýšení nad 1,6 mmol/l je tzv. negativním rizikovým faktorem, který snižuje kardiovaskulární riziko a částečně eliminuje vliv jiných rizikových faktorů, včetně zvýšeného LDL-cholesterolu.

**Lipoprotein (a)**

Je strukturou podobný LDL. Kromě apo$B_{100}$ obsahuje apolipoprotein (a), jehož domény jsou strukturálně homologní s plazminogenem. Lp(a) blokuje vazebná místa pro plazminogen na fibrinu a tím inhibuje fibrinolýzu (Loscalzo, 1990).

V procesu aterogeneze má Lp(a) dvojí negativní efekt – aterogenní v užším slova smyslu, daný přítomností apolipoproteinu $B_{100}$, a antifibrinolytický, vázaný na přítomnost apolipoproteinu (a).

**Non-HDL-cholesterol** je hodnota vypočítaná podle vzorce:

Non-HDL-cholesterol = celkový cholesterol – HDL-cholesterol

Tato hodnota odráží koncentraci všech aterogenních lipoproteinů (LDL, IDL, VLDL, zbytků chylomiker). Význam non-HDL-cholesterolu je zdůrazněn v doporučeních Národního cholesterolového edukačního programu (National Cholesterol Education Program, NCEP) (McKenney, 2003).

### 3.3.2. Ateroskleróza jako zánětlivý proces

Procesu aterogeneze se účastní četné buněčné populace. Jsou to nejen endoteliální buňky, tvořící povrch aterosklerotického plátu, ale významnou roli hrají i cirkulující elementy, jako jsou leukocyty a trombocyty (Libby, 2000).

**Endotel**, tvořící jednobuněčnou výstelku cév a oddělující intravaskulární obsah od okolních tkání, je nyní chápán jako orgán s mnoha dynamickými funkcemi (Luscher, 1997).

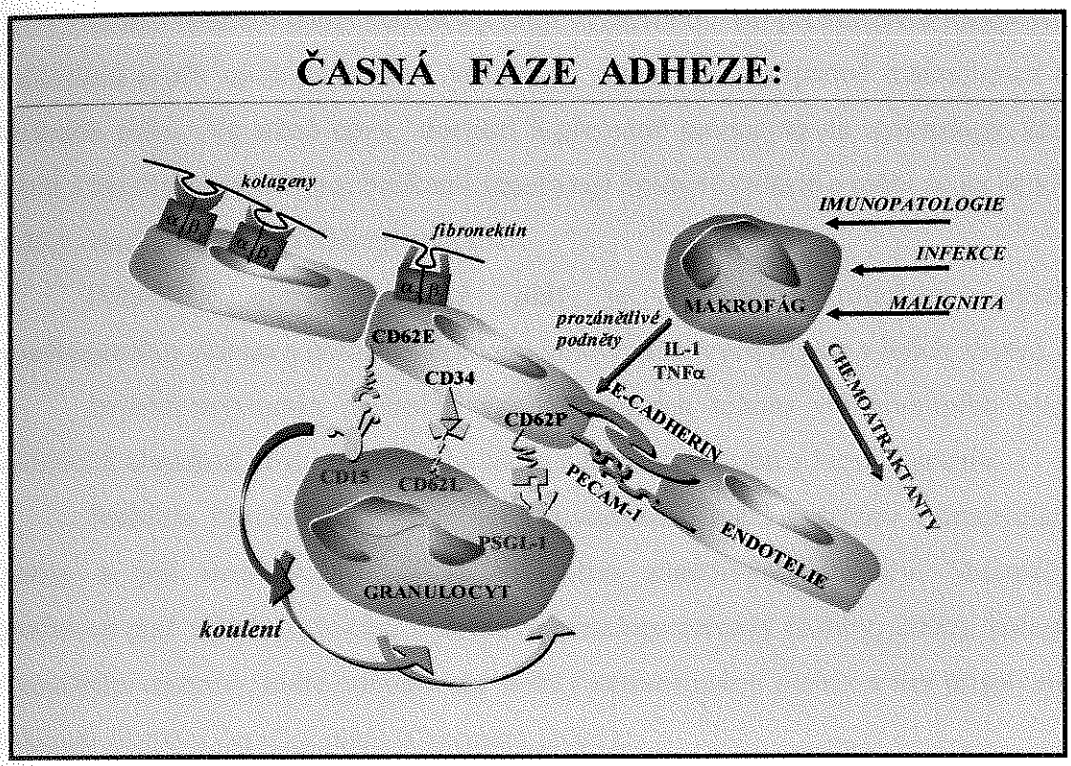
Poskytuje netrombogenní povrch, kontroluje pasáž solutů a makromolekul do tkání, produkuje mnoho faktorů modulujících kontrakce přilehlého hladkého svalstva, zprostředkovává interakce mezi cirkulujícími elementy a stěnou cévy a spouští reakci na patogenní stimuly, jako jsou například hypertenze, hyperglykémie a zplodiny cigaretového kouře. Jednou z těchto odpovědí endotelu je zvýšená exprese adhezních molekul pro leukocyty, která je významným krokem v časné aterogenezi (Libby, 2000).

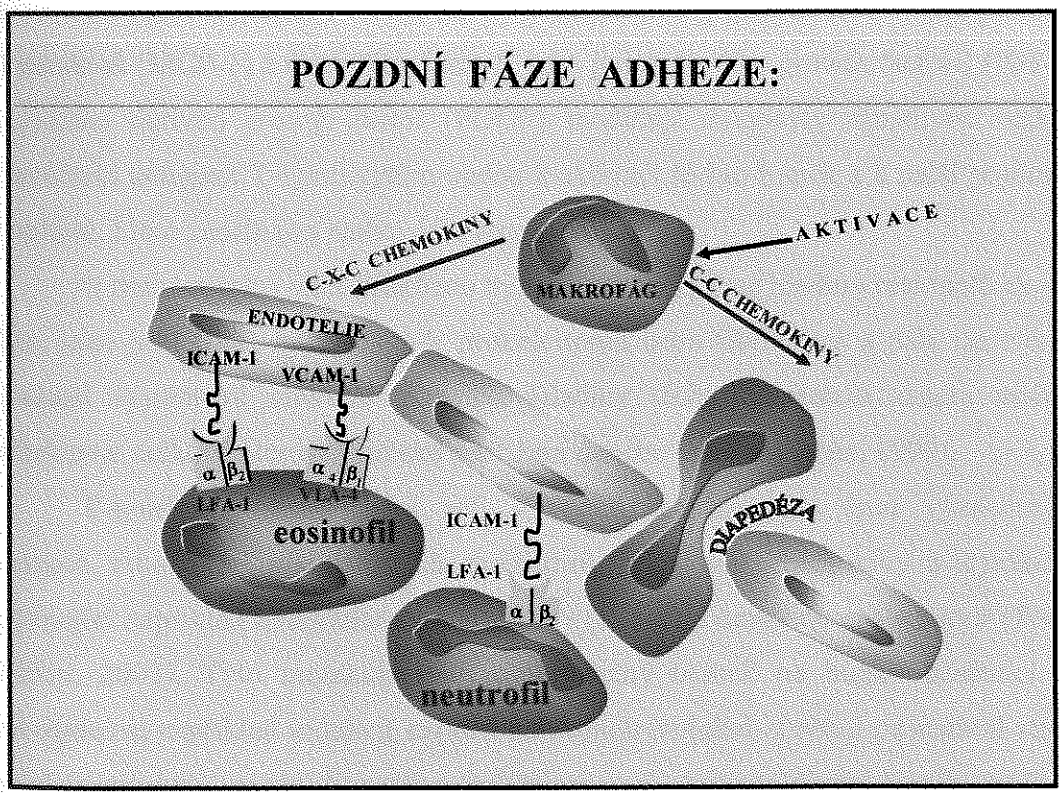
Změny ve funkci endotelu vlivem zvýšené hladiny cholesterolu jsou patrny ještě před vývojem zjevného aterosklerotického plátu a jsou podobné fyziologické odpovědi endotelu na trauma či zánět (Dart, 1999).

**Endoteliální dysfunkce** je jednou z prvních změn, nastávajících při aterogenezi a je doprovázena zvýšenou permeabilitou endoteliálních buněk, ztrátou jejich antikoagulační a antiagregační aktivity a mimo jiné i zvýšenou adhezí monocytů k endotelu následkem zvýšené exprese adhezních molekul (viz *Obrázek 5,6*) (Cines, 1998).

Zánětlivé buňky, zahrnující **monocyty, makrofágy a lymfocyty** (především T) hrají zásadní roli v procesu aterogeneze (Ross, 1999).

## Obr. č. 5,6: Časná a pozdní fáze adheze (Krejsek, 2004)



Cirkulující leukocyty jsou přitahovány do míst s poškozeným endotelem pomocí chemokinů, například monocytárního chemotaktického proteinu-1 (MCP-1).

Leukocytární adhezní molekuly hrají významnou roli při kontaktu leukocytů s endotelem a při jejich následném vstupu do stěny cév a případně transmigraci do okolních tkání. Ve stěně cévy dochází k přeměně monocytů na makrofágy, které spolu s hladkými svalovými buňkami fagocytují lipidové částice a mění se na pěnové buňky, které následně podléhají apoptóze.

Pokročilý **aterosklerotický plát** je tvořen nekrotickým, vysoce trombogenním jádrem s obsahem lipidové hmoty, pěnových buněk a jejich zbytků.

Infarkt myokardu nejčastěji vzniká rupturou tohoto vulnerabilního plátu, vedoucí k obnažení protrombotického jádra a formaci trombu v luminu arterie.

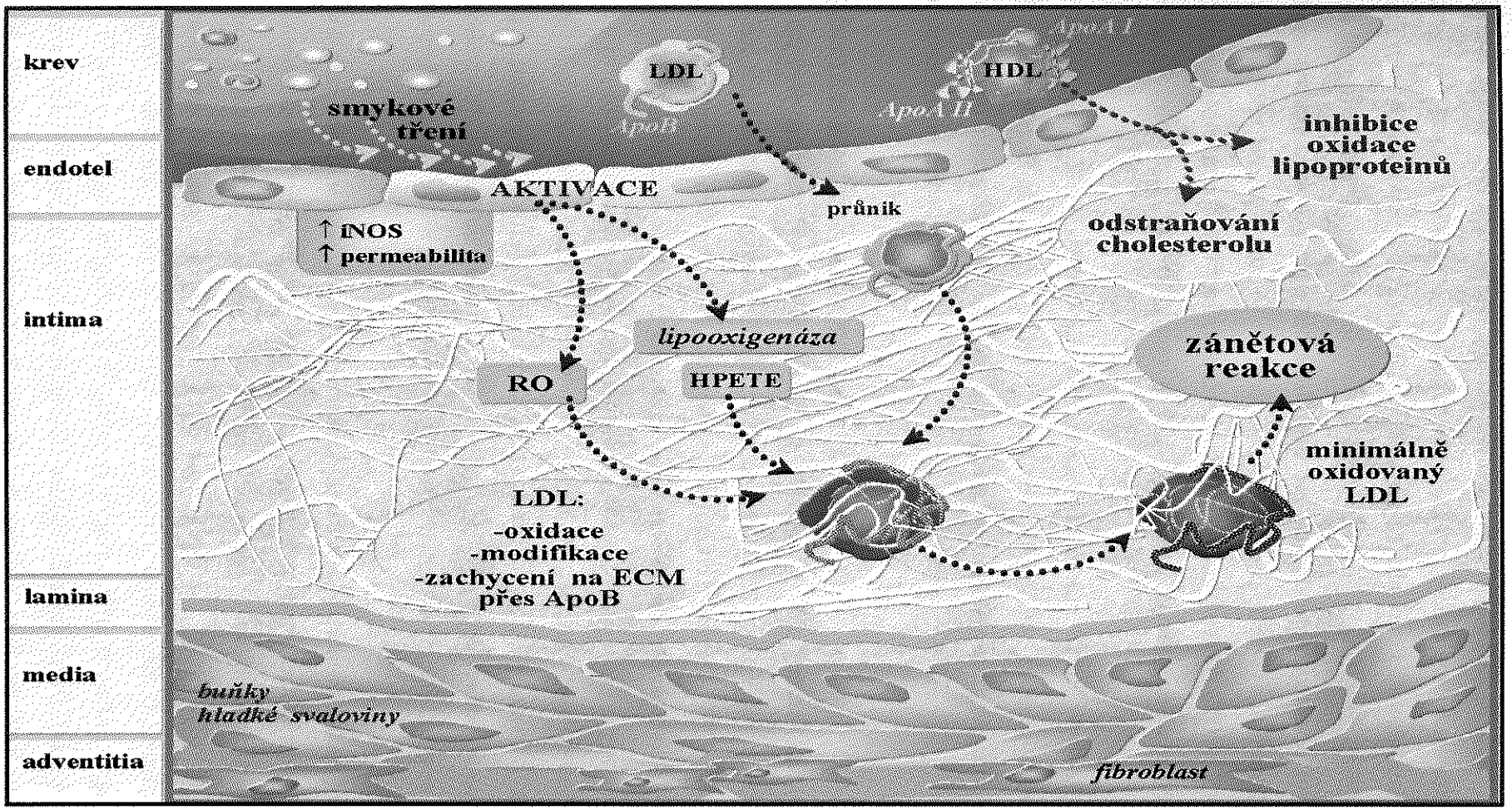
Stabilita fibrózní čepičky je dána rovnováhou mezi syntézou extracelulární matrix a její degradací, obojí je ovlivněno zánětlivými stimuly. Makrofágy produkují pod vlivem cytokinů matrixové metaloproteinázy (Libby, 2000), kolagen degradující enzymy, které odbourávají složky extracelulární matrix a tím přispívají k oslabení fibrózní čepičky plátu (Creemers, 2001).

Produkcí oxidantů uvnitř plátu se monocyty podílejí na vzniku oxidativní modifikace LDL-částic (viz *Obrázek 7*). Produkcí cytokinů, jako je tumor necrosis factor alfa (TNF-α), interleukin-1 (IL-1) a transforming growth factor beta (TGFß), chemokinů (MCP-1) a růstových faktorů, jako je insulin-like growth factor-I (IGF-1) a platelet derived growth factor (PDGF) modulují monocyty zánětlivou reakci. Prezentací antigenů T-lymfocytům vedou k aktivaci těchto buněk a k další produkci cytokinů, které zánětlivou reakci dále amplifikují.

U nemocných s aterosklerózou byly zjištěny zvýšené hladiny reaktantů akutní fáze, jako jsou CRP, interleukin-6, prokalcitonin nebo fibrinogen a dále neopterin, ukazatel systémové imunitní aktivace. Hladiny těchto ukazatelů zánětu mohou reflektovat celkové aterosklerotické postižení daného jedince (Erren, 1999).

**T-lymfocyty** hrají řídící roli v procesu aterogeneze. Jsou významným zdrojem mnoha proinflamatorních mediátorů, jako jsou chemokiny a cytokiny, zahrnující například interleukiny, interferon-γ (INF-γ) a tumor necrosis faktor (TNF) (Libby, 2002). Tyto molekuly mají mnohočetný účinek na buňky účastnící se aterogeneze, například indukují expresi adhezních molekul, zvyšují oxidativní stres, redukují produkci oxidu dusnatého endotelem, ovlivňují proliferaci buněk, inhibují tvorbu kolagenu a zvyšují produkci matrixových metaloproteináz.

**Obr.č.7: Ateroskleróza – chemická modifikace lipoproteinů (Krejsek, 2004)**



**Buňky hladkého svalu** jsou základní strukturální součástí stěny tepen a zajišťují vaskulární tonus. Procesu aterogeneze se účastní migrací z medie do intimy tepen a následnou proliferací, fagocytózou tukových částic a formací pěnových buněk v centru aterosklerotického plátu. Jsou významným zdrojem extracelulární matrix, která formuje fibrózní čepičku, pokrývající lipidové jádro plátu (Libby, 2000).

Adheze **trombocytů** a tvorba murálního trombu hraje významnou roli při formaci aterosklerotického plátu i jeho ruptuře. Trombocyty adherují k dysfunkčnímu endotelu, odhalenému kolagenu a makrofágům (Jebavý, 2003). Po aktivaci uvolňují cytokiny, růstové faktory a další mediátory zánětu, uskladněné v granulích.

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

### 3.3.3. Selektinové adhezní molekuly a ateroskleróza

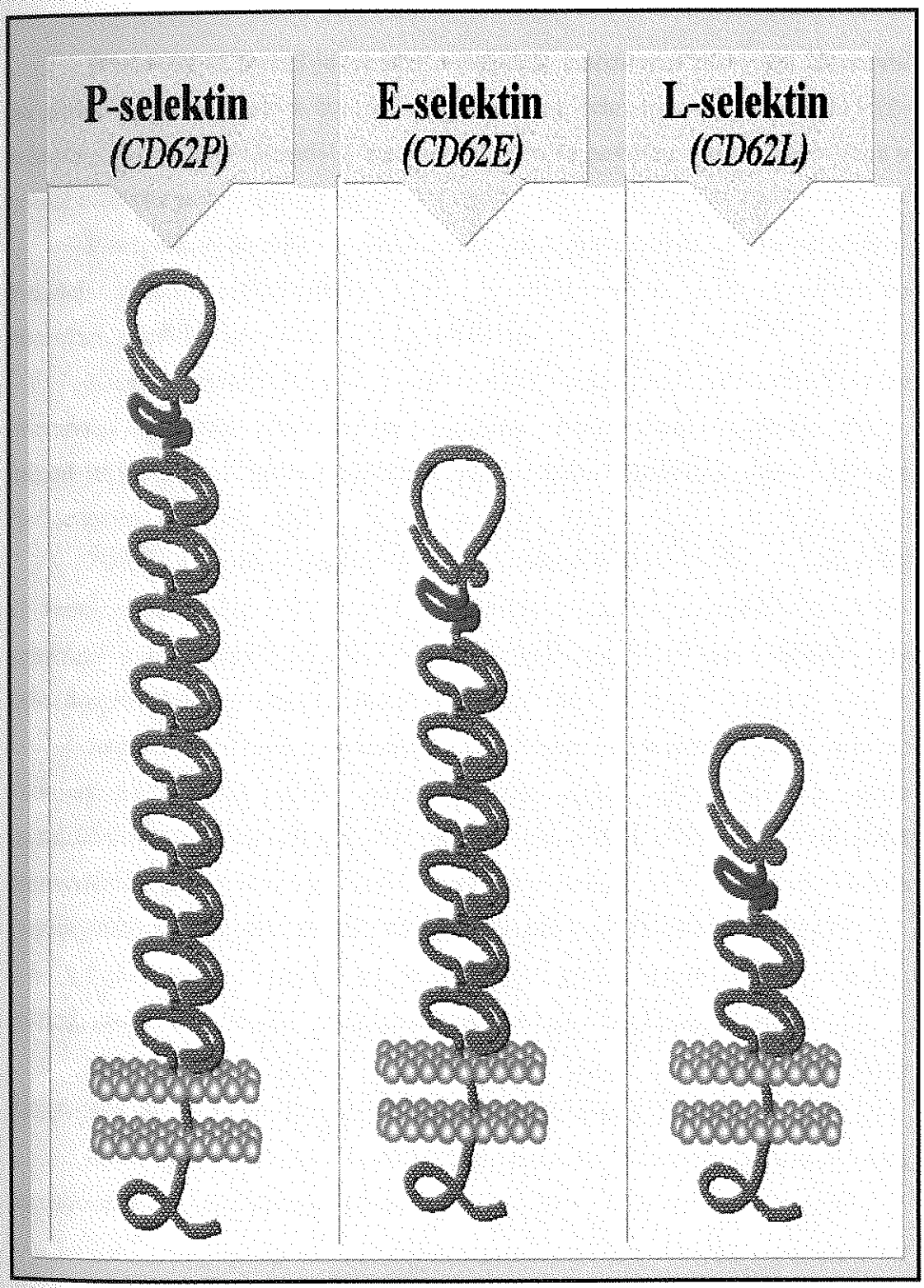
Jak již bylo popsáno v kapitole o roli cholesterolu v aterogenezi, LDL-cholesterol má řadu účinků v iniciální i následné fázi tohoto procesu. Vede mimo jiné ke zvýšené expresi endoteliálních adhezních molekul (Parhami 1993). Ty zajišťují kontakt leukocytů s povrchem endotelu. Následuje migrace leukocytů do stěny cévy a v případě aterogeneze formace aterosklerotického plátu.

První fází interakce mezi leukocyty a endotelem jsou procesy zvané „capture" a „tethering" (volně přeloženo jako „zachycení" či „zajetí" a „uvázání" leukocytu), po kterých následuje tzv. „rolling", valivý pohyb leukocytu po aktivovaném endotelu. Tyto děje zprostředkovávají selektiny viz *Obrázek 8* (Somers, 2000).

V další fázi postupně dochází k pevné adhezi leukocytů k endotelu, která je umožněna integrinovými molekulami na povrchu leukocytů a intracelulárními adhezními molekulami (např. ICAM-1) na straně endotelu. Po pevném přilnutí dochází k transmigraci leukocytů do stěny cévy (Springer, 1990).

K expresi adhezních molekul dochází po aktivaci endoteliálních buněk pomocí IL-1, TNF-α a INF-γ (Springer, 1990). Interakce mezi endotelem a složkami cirkulující krve hraje významnou roli v patogenezi mnoha různých stavů, jako je například ateroskleróza a její komplikace a nádorová onemocnění. Solubilní formy

**Obr. 8: Selektinové adhezní molekuly (Krejsek, 2004)**



selektinů a ICAM-1 jsou považovány za ukazatele zánětlivé aktivace endotelu (Giddings, 2005).

**P-selektin (CD62P)** je zásadní molekulou, umožňující zachycení leukocytu na aktivovaném endotelu a tzv. tethering a rolling. Jeho ligandem je PSGL-1 (P-selectin Glycoprotein Ligand-1), který je přítomen na povrchu většiny leukocytů a v menší míře i na povrchu trombocytů.

P-selektin je produkován a skladován v alfa granulích destiček a ve Weibel-Paladeho tělíscích endoteliálních buněk a je exprimován na jejich membráně po stimulaci, například trombinem nebo histaminem.

Kinetika membránového P-selektinu je velmi rychlá, během minut je přesunut z intracelulárních zásob do povrchové membrány trombocytů a endotelu, odkud je rychle uvolňován do plazmy, kde plní další funkce. Z membrány opět rychle vymizí (McEver, 1995).

Zatím nebyl přesně popsán poločas solubilní formy P-selektinu (sP-selektin). U nemocných s ischemickou chorobou srdeční byl nalezen diurnální rytmus sP-selektinu s maximem hladin ve večerních hodinách, plazmatické hladiny sE-selektinu zůstaly během dne stabilní (Osmančík, 2004).

Exprese P-selektinu je ukazatelem endoteliální a/nebo trombocytární aktivace (Somers, 2000). Množství cirkulujícího P-selektinu, který je uvolněn z membrán endotelu a trombocytů, odráží rozsah zánětlivého postižení. Ukázkou je myší model aterosklerózy, kde byla prokázána zvýšená hladina sP-selektinu a většina cirkulujících molekul P-selektinu byla endoteliálního původu (Burger, 2003).

Podobně jako u leukocytů, iniciální fází adheze trombocytů je také tzv. rolling, závislý na expresi P-selektinu na povrchu endotelu (Frenette, 1995).

Vlivem P-selektinu se aktivované cirkulující trombocyty sdružují s monocyty (Michelson, 2001) a společně „rolují" po endotelu (Frenette, 2000).

Destičkový i solubilní P-selektin hrají významnou úlohu při vzniku a progresi aterosklerotických lézí (Wagner, 2003).

Některými autory je P-selektin považován za ukazatel destabilizace aterosklerotického plátu (Draz, 2003).

V nepřítomnosti zranění nebo zánětlivého onemocnění může vysoká hladina solubilních P-selektinu sloužit jako ukazatel rizika kardiovaskulárních příhod a jejich komplikací (Hillis, 2002).

**E-selektin (CD62E)**, známý též jako **ELAM-1** (endotelial leukocyte adhezion molecule-1) je solubilní adhezní molekula, zodpovědná za tzv. pomalý rolling leukocytů a přechod rollingu v pevnou adhezi.

Ligandem E-selektinu je molekula ESL-1 (E-Selectin Ligand-1) a několik membránových molekul obsahujících cukernou strukturu označovanou jako sialyl Lewis$^x$ (sLe$^x$) (Krejsek, 2005).

E-selektin je produkován pouze endotelem a kromě solubilní formy v plazmě (sE-selektin) se vyskytuje pouze na endoteliálním povrchu (Springer, 1990; Somers, 2000).

Detekce sE-selektinu se proto považuje za specifickou známku aktivace endotelu (Leeuwenberg,1992).

E-selektin je exprimován na membráně endotelu v řádu hodin po stimulu. Není uvolňován z intracelulárních zásob, ale syntetizován de novo (Gearing, 1993).

### 3.3.4. Monocytární chemotaktický protein-1 a ateroskleróza

Monocytární chemotaktický protein-1 (MCP-1) patří mezi chemokiny, proteiny, které řídí migraci leukocytů do tkání s probíhajícím zánětem (Butcher, 1991).

Transmigrace leukocytů z lumen cévy do místa zánětu je mnohastupňový proces, zahrnující řadu interakcí mezi leukocyty, trombocyty a endoteliálními buňkami (Springer, 1994).

Chemokiny poskytují signál, který změní nízkoafinitní rolling leukocytů, mediovaný selektiny, v pevnou adhezi na endotel, zprostředkovanou integriny a následovanou migrací leukocytů z lumina cévy.

Hlavními stimuly k jejich produkci jsou prozánětlivé cytokiny, jako je IL-1, TNF-α, INF-γ, IL-4, dále virové a bakteriální produkty, například lipopolysacharidy (Garcia-Zepeda, 1996).

V případě aterosklerózy nejsou chemotaktické signály, působící akumulaci leukocytů v aterosklerotických plátech zcela objasněny, ale právě MCP-1 byl zvýšeně detekován v aterosklerotických lézích (Nelken, 1991) a je mu připisována role při akumulaci makrofágů a oxidovaných forem LDL-cholesterolu v aterosklerotických plátech (Aiello, 1999).

MCP-1 přímo stimuluje také proliferaci a migraci buněk hladkého svalu (Porreca, 1997).

Koncentrace solubilního MCP-1 (sMCP-1) narůstá s věkem a tento vzestup může být spojen s progresí aterosklerotických lézí. Elevace hladin MCP-1 je spojena se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem (de Lemos, 2003). Solubilní MCP-1 je spolu s tkáňovým faktorem zvýšen u akutních koronárních syndromů (Nishiyama,1998).

Terapie statiny snížila produkci MCP-1 a tyto změny korelovaly se snížením oxidativní modifikace LDL-cholesterolu (Rosenson, 2005).

Roli makrofágů v aterogenezi a význam MCP-1 při jejich migraci shrnul ve své přehledné práci Boyle (Boyle, 2005).

### 3.3.5. C-reaktivní protein a ateroskleróza

C-reaktivní protein (CRP) je protein akutní fáze produkovaný játry pod vlivem prozánětlivých cytokinů, především interleukinu-6, který je uvolňován makrofágy v místě zánětu (Castell, 1990).

Fyziologickou funkcí CRP je opsonizace mikrobů a aktivace komplementu po navázání na patogen nespecifickou vazbou. CRP stimuluje endoteliální buňky k expresi leukocytárních adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 (Pasceri, 2000). CRP má chemotaktický vliv na monocyty.

Stejně tak jako LDL-cholesterol, i CRP se ukládá ve stěně arterií během aterogeneze, dokonce jeho přítomnost předchází vstup monocytů do časných aterosklerotických lézí (Torzewski, 2000). In vitro bylo prokázáno, že CRP opsonizuje nativní LDL-částice, které bez opsonizace nejsou fagocytovány, a tím umožňuje jejich pohlcení makrofágy (Zwaka, 2001).

V poslední době jsou publikovány četné studie, ukazující CRP jako indikátor kardiovaskulárního rizika. Koncentrace CRP, hodnocené za tímto účelem, jsou podstatně menší, než koncentrace vyskytující se u akutních infekcí.

Pro tento účel byly vyvinuty citlivější metody, které dovolují stanovit CRP od 0,1 mg/l (Myers, 2004). Takto stanovený CRP se nazývá **„high sensitivity CRP" (hsCRP).**

Ke zhodnocení kardiovaskulárního rizika podle hladiny hsCRP byly doporučeny tři kategorie:

| | riziko | hsCRP (mg/l) |
|---|---|---|
| 1. | nízké | < 1,0 |
| 2. | střední | 1,0 - 3,0 |
| 3. | vysoké | >3,0 |

Výhody hsCRP oproti jiným reaktantům akutní fáze spočívají v relativně nízké ceně stanovení, dále ve stabilitě vzorku při pokojové teplotě či při zmražení a v absenci cirkadiánního rytmu hladin CRP.

Souhrn několika populačních studií neshledal významné rozdíly mezi pohlavími (Ford, 2003) ani významné ovlivnění hladin CRP věkem v kategorii od 20 do 70 let (Ford, 2003). Nebyly shledány rozdíly mezi vzorky nalačno a po jídle (Ledue, 2001).

CRP stoupá u kuřáků (Koenig, 1999), vyšší hladiny byly nalezeny jak u abstinentů, tak u ethyliků, na rozdíl od běžných konzumentů alkoholu (Imhof, 2001).

Vyšší koncentrace CRP byla pozorována u lidí s chronickými záněty (chronická bronchitida nebo periodontitida) a s pozitivitou protilátek proti Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, herpetickým virům, viru hepatitidy A a mykoplazmatům. S počtem pozitivních patogenů stoupalo i riziko kardiovaskulárních příhod (Zhu, 2001).

Tvorbu CRP a jeho výslednou hladinu ovlivňují i genetické faktory, především polymorfizmus genu pro CRP (Zee, 2004) a promotoru genu pro interleukin-6 (Basso, 2002).

Zvýšená koncentrace CRP je též rizikovým faktorem pro rozvoj ischemické choroby dolních končetin (Ridker, 1998 B).

Zvýšený CRP byl spojen se zvýšeným rizikem srdečního selhání i u nemocných bez předchozího infarktu myokardu a u nemocných s asymptomatickým aterosklerotickým postižením ve věku nad 65 let (Vasan, 2003).

Dynamika sérových koncentrací CRP během aferéz byla popsána u různých metod extrakorporální eliminace LDL-cholesterolu několika autory. Většina z nich pozorovala pokles CRP po LDL-aferéze (Otto, 2001, Wieland, 2002, Kobayashi, 2002).

Pokles CRP je pokládán za jeden z dalších mechanizmů, kterými LDL-aferéza přispívá k potlačení zánětlivých dějů procesu aterogeneze. Ani při pečlivé rešerši jsme v dosavadní literatuře nenalezli popis změn koncentrací CRP během aferézy s užitím imunoadsorpčních kolon LDL-Lipopak (Pocard, Ltd., Moskva, Rusko).

### 3.3.6. CD40 ligand a ateroskleróza

CD40 ligand (CD40L, známý jako CD154, TRAP [TNF-Related Activation Protein] nebo TBAM [T-cells B-cell activation molecule]) je multifunkčním ligandem, modulujícím zánětlivé děje.

Původně byl objeven na T-lymfocytech, kde pracuje jako mediátor T-buňkami řízené aktivace, proliferace a diferenciace B-lymfocytů a indukuje jejich izotypové přepnutí při produkci imunoglobulinů. Je exprimován především na aktivovaných CD4+ T-buňkách, ale i na ostatních T- a B-lymfocytech, endoteliích, buňkách hladkého svalu, makrofázích, monocytech, aktivovaných destičkách a fibroblastech, mimo jiné i v aterosklerotických lézích.

Je přítomen též v plazmě jako **solubilní protein, sCD40L**. Stimulace cytokiny (interleukinem-1, TNF-α, INF-γ) zvyšuje expresi CD40L na povrchu buněk.

Interakce mezi CD40 a jeho ligandem spouští tvorbu prozánětlivých mediátorů, jako jsou cytokiny, adhezní molekuly, matrix odbourávající enzymy a tkáňový faktor (Schonbeck, 2000).

Je prostředkem řídícího vlivu T-lymfocytů na ostatní složky zánětlivých procesů v aterosklerotickém plátu (Mach, 1998).

Solubilní CD40L se zvyšuje u akutních koronárních příhod. U nemocných s nestabilní anginou pectoris je zvýšení sCD40L ukazatelem zvýšeného rizika koronární příhody (Heeschen, 2003) a možného benefitu z protidestičkové léčby abciximabem (Heeschen, 2003).

Oxidované formy LDL mohou podporovat expresi CD40 a CD40L v aterosklerotickém plátu, která byla spolu s hladinou LDL-cholesterolu snížena léčbou statiny (Schonbeck, 2002).

Zvýšené hladiny sCD40L byly nalezeny u nemocných s familiární hypercholesterolemií a léčba statiny vedla k jejich snížení (Semb, 2003).

Snížení hladiny cholesterolu v krvi mělo za následek redukci CD40 i CD40L, snížení aktivity matrixových metaloproteináz, zvýšení obsahu kolagenu v aterosklerotickém plátu a snížení hladiny tkáňového faktoru. To vše přispívá ke stabilizaci aterosklerotických plátů.

Sledováním hladiny CD40L lze získat informaci o imunitních a zánětlivých dějích v aterosklerotických plátech a o jejich stabilitě. Podle našich nejlepších znalostí nebyly změny hladin CD40L během LDL-aferézy v literatuře popsány.

# 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1. Charakteristika souboru

Vyšetřovaný soubor tvořilo celkem 9 pacientů, pět mužů a čtyři ženy, s těžkou familiární hyperlipidemií, léčených LDL aferézou na principu imunoadsorpce. . Jejich průměrný věk byl 48 ± 16 let, rozmezí 19 – 61 let, medián 57 let. Pět pacientů mělo čistou hypercholesterolemii, jednalo se o homozygoty FH nebo heterozygoty s těžkou formou FH. Čtyři nemocní měli kromě zvýšeného cholesterolu také zvýšené triacylgyceridy – jednalo se o dva nemocné s těžkou formou FCH a dva heterozygoty FH..

Pacienti byli vybíráni specialisty na problematiku dyslipidemií Kliniky gerontologické a metabolické Fakultní nemocnice Hradec Králové a Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) Praha a u všech bylo prokázáno aterosklerotické postižení.

Klinická data nemocných jsou uvedena v *Tabulce 1.*

**Tabulka 1. Klinická charakteristika nemocných léčených LDL-imunoadsorpcí**

| Pacient číslo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pohlaví | M | M | M | M | F | F | F | F | M |
| Věk (v letech) | 61 | 56 | 61 | 38 | 19 | 58 | 60 | 26 | 57 |
| Zvýšení TAG | 0 | ++ | 0 | + | 0 | ± | 0 | 0 | ++ |
| BMI | 22.8 | 29.8 | 31,1 | 28,4 | 23.4 | 32.0 | 18.3 | 19.3 | 32,4 |
| Hypertenze | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + |
| Diabetes mellitus | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + |
| ICHS | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | 0 | 0 |
| Ischemická CMP | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ICHDK | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 |
| Ateroskleróza | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

*M = muž, F = žena, TAG = triacylglyceridy, BMI = body mass index, ICHS = ischemická choroba srdeční, Ischemická CMP = ischemická cévní mozková příhoda, ICHDK = ischemická choroba dolních končetin*

K porovnání průměrných hodnot vybraných parametrů u nemocných s průměrnými hodnotami u zdravých jedinců nám sloužil kontrolní soubor viz *Tabulka 2.*

**Tabulka 2. Průměrné hodnoty kontrolního souboru**

| parametr | N | průměr ± SD |
|---|---|---|
| P-selektin (ng/ml) | 23 | 82 ± 3 |
| E-selektin (ng/ml) | 130 | 46,25 ± 17,15 |
| MCP-1 (pg/ml) | 37 | 461 ± 130,5 |

*N = počet hodnot; SD = hodnota směrodatné odchylky*

## 4.2. Materiál a metody

### 4.2.1. Imunoadsorpce LDL cholesterolu

Na pracovišti hemaferézy Fakultní nemocnice v Hradci Králové se od roku 1996 provádějí LDL-aferézy metodou imunoadsorpce.

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

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

Kolony obsahují na sefarózový gel navázané polyklonální ovčí protilátky proti lidskému apo$B_{100}$. Při průchodu kolonou jsou z plazmy odstraňovány LDL-částice a očištěná plazma se po spojení s krevními tělísky vrací zpět do oběhu pacienta. Když je kapacita kolony vyčerpána, adsorpčně-desorpční automat odkloní tok plazmy do druhé kolony a zároveň zahájí regeneraci první kolony roztokem glycinového pufru o pH 2,4 (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který uvolňuje vazbu mezi protilátkami a apo$B_{100}$. Následně je pH v koloně upraveno roztokem PBS pufru o pH 7,4 (Medicap Clinic, GmbH, Ulrichstein, Německo), který je po té odstraněn pomocí fyziologického roztoku. V automatu tak současně jednou

kolonou prochází plazma a druhá kolona je regenerována. Toto sekvenční použití adsorpce a desorpce vede k teoreticky neomezené kapacitě systému, což má výhodu v možnosti nastavení délky procedury podle individuálních potřeb pacienta.

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

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

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

### 4.2.2. Laboratorní metodika stanovení

Pacientům byly odebrány vzorky krve před a bezprostředně po provedené LDL-aferéze, z ní získané vzorky plazmy či séra byly ihned zmraženy a uchovávány při teplotě -40°C.

K detekci hladin vybraných ukazatelů aterogeneze jsme užili metody enzymoimunoanalýzy (EIA) – ELISA a chemiluminiscenční analýzy LEIA.

4.2.2.1. ELISA

ELISA (Enzyme Linked Immuno – Sorbent Assay) je variantou heterogenní EIA. EIA jako každá imunochemická technika využívá reakce Ag-Ab, kdy je na Ag či Ab kovalentně vázán vhodný enzym. Heterogenní EIA využívá pro separaci Ab či Ag techniku imunosorbentu, kdy jedna ze složek je zakotvena na pevné fázi (Procházková, 1986).

Metodiky ELISA je možno dělit na kompetitivní a nekompetitivní, lze jimi prokazovat jak přítomnost antigenu tak protilátek (Litzman, 1998).

- **ELISA kompetitivní se značeným antigenem**

Při této metodě soutěží Ag séra pacienta s Ag značeným enzymem o vazbu na limitované množství specifických Ab, které jsou navázány na pevnou fázi (polystyrénové zkumavky, titrační destičky, apod.). Vznikají komplexy Ag-Ab a Ag (značený enzymaticky)-Ab. Promytím zbavíme pevnou fázi přebytků jak značeného, tak i pacientova Ag a po přidání substrátu měříme aktivitu enzymu, který je v komplexu Ag (značený enzymaticky)-Ab. Mezi aktivitou enzymu a koncentrací Ag v pacientově séru je úměra nepřímá (Nováková, 1993).

- **ELISA nekompetitivní se značeným antiimunoglobulinem**

V této metodě je Ag navázán na pevnou fázi a prokazujeme množství protilátky přítomné v séru pacienta, které přidáme do nádobek s navázaným Ag. Po vzniku komplexu Ag-Ab můžeme stanovit pomocí enzymem značených antiimunoglobulinů přímo specifickou třídu Ab přítomných v séru. Zde je úměra přímá (Nováková, 1993)

4.2.2.1.1. Kvantitativní stanovení sP-selektinu v lidské plazmě

princip metody: nekompetitivní ELISA

popis soupravy: souprava Parameter®human sP-selectin Immunoassay, firmy R&D Systems (Minneapolis, USA)

- mikrotitrační destička s navázanou protilátkou
- kalibrátory (0,00; 0,82; 7,28; 18,83; 30,76; 45,94 ng/ml)
- roztok pro ředění vzorků

- koncentrovaný konjugát (polyklonální protilátka proti sP-selektinu značená peroxidázou)
- roztok pro ředění konjugátu
- pozitivní kontrola
- koncentrovaný promývací roztok
- substrát (tetramethylbenzidin)
- stop roztok

příprava reagencií: Připravíme promývací roztok naředěním koncentrátu destilovanou vodou v poměru 1:25; pozitivní kontrolu a vyšetřované vzorky naředíme roztokem na ředění vzorků v poměru 1:20 (25 µl kontroly resp. vzorku + 475 µl roztoku pro ředění vzorků).

vlastní postup:
1. Soupravu vytemperujeme na pokojovou teplotu.
2. Do jamek mikrotitrační destičky pipetujeme 100 µl kalibrátorů, pozitivní kontroly a vyšetřovaných vzorků plazmy.
3. Přidáme 100µl enzymového konjugátu do všech jamek mikrotitrační destičky.
4. Překryjeme adhezivní folií a inkubujeme při pokojové teplotě 60 minut.
5. Vylijeme zbytek obsahu jamek a důkladně promyjeme každou jamku 3× promývacím roztokem (300 µl), vysušíme poklepem na savý papír.
6. Pipetujeme 100µl substrátu do každé jamky, překryjeme novou adhezivní folií.
7. Inkubujeme při pokojové teplotě 15 minut.
8. Reakci ukončíme přidáním 100µl stop roztoku do každé jamky, dochází ke změně barvy z modré na žlutou.
9. Jemně promícháme obsah jamek a během 30 minut od zastavení reakce měříme absorbanci při vlnové délce 450 nm s užitím referenčního filtru o vlnové délce 620-650 nm.

Koncentrace solubilního P-selektinu se získá odečtením z kalibrační křivky (v ng/ml), norma – koncentrace 51-113 μg/l.

4.2.2.1.2. Kvantitativní stanovení sE-selektinu v lidské plazmě

princip metody: nekompetitivní ELISA

popis soupravy: souprava Parameter®human sE-selektin Immunoassay, firmy R&D Systems (Minneapolis, USA)

- mikrotitrační destička s navázanou protilátkou
- kalibrátory (0,00; 0,51; 2,55; 4,88; 7,74; 10,20)
- roztok pro ředění vzorků
- koncentrovaný konjugát (polyklonální protilátka proti sE-selektinu značená peroxidázou)
- roztok pro ředění konjugátu
- pozitivní kontrola
- koncentrovaný promývací roztok
- substrát (tetramethylbenzidin)
- stop roztok
- adhezivní folie

příprava reagencií: Připravíme promývací roztok naředěním koncentrátu destilovanou vodou v poměru 1:25; pozitivní kontrolu a vyšetřované vzorky naředíme roztokem na ředění vzorků v poměru 1:20 (25μl kontroly resp.vzorku + 475μl roztoku na ředění vzorků). Naředíme také konjugát roztokem pro ředění konjugátu v poměru 1:20.

vlastní postup:
1. Soupravu vytemperujeme na pokojovou teplotu.
2. Do všech jamek mikrotitrační destičky pipetujeme 100μl naředěného enzymového konjugátu.
3. Pipetujeme 100μl kalibrátorů, naředěných vzorků a naředěné pozitivní kontroly.
4. Překryjeme adhezivní folií a inkubujeme při pokojové teplotě

90 minut.

5. Vylijeme zbytek obsahu jamek a důkladně promyjeme každou jamku 5× promývacím roztokem (300 µl), vysušíme poklepem na savý papír.
6. Do všech jamek přidáme 100 µl substrátu, překryjeme novou adhezivní folií.
7. Inkubujeme při pokojové teplotě 30 minut.
8. Reakci ukončíme přidáním 100 µl stop roztoku do každé jamky, dochází ke změně barvy z modré na žlutou.
9. Jemně promícháme obsah jamek a během 30 minut od zastavení reakce měříme absorbanci při vlnové délce 450 nm s užitím referenčního filtru o vlnové délce 620 nm.

Koncentrace solubilního E-selektinu se získá odečtením z kalibrační křivky (v ng/ml), norma – koncentrace 29,1 - 63,4 µg/l.

4.2.2.1.3. Kvantitativní stanovení monocytárního chemotaktického proteinu-1 (MCP-1) v lidské plazmě

princip metody: nekompetitivní ELISA

popis soupravy: souprava Quantikine®human MCP-1 Immunoassay, firmy R&D Systems (Minneapolis, USA)

- mikrotitrační destička s navázanou protilátkou
- kalibrátory (0,0; 31,2; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0; 1000,0 pg/ml)
- roztok pro ředění vzorků
- konjugát (polyklonální protilátka proti MCP-1 značená peroxidázou
- koncentrovaný promývací roztok
- substrát A (tetramethylbenzidin)
- substrát B (peroxid vodíku)
- stop roztok (2M $H_2SO_4$)
- adhezivní folie

příprava reagencií: Naředíme vyšetřované vzorky roztokem pro ředění vzorků v poměru 1:1 (250 µl vzorku + 250 µl roztoku pro ředění vzorků); připravíme promývací roztok naředěním koncentrátu destilovanou vodou v poměru 1:25; substrát A a substrát B smícháme v ekvivalentním poměru asi 15 minut před použitím.

vlastní postup:

1. Soupravu vytemperujeme na pokojovou teplotu.
2. Do jamek mikrotitrační destičky pipetujeme 200 µl kalibrátorů a vyšetřovaných vzorků.
3. Překryjeme adhezivní folií a inkubujeme při pokojové teplotě 2 hodiny.
4. Vylijeme zbytek obsahu jamek a důkladně promyjeme každou jamku 3× promývacím roztokem (400 µl), vysušíme poklepem na savý papír.
5. Přidáme 200 µl konjugátu do všech jamek mikrotitrační destičky a překryjeme novou adhezivní folií.
6. Inkubujeme při pokojové teplotě 2 hodiny.
7. Opakujeme krok č.4 (vylití obsahu jamek, důkladné promytí a vysušení)
8. Do všech jamek pipetujeme 200 µl substrátu a inkubujeme při pokojové teplotě 30 minut.
9. Reakci ukončíme přidáním 50 µl stop roztoku do všech jamek, dochází ke změně barvy z modré na žlutou.
10. Jemně promícháme obsah jamek a během 30 minut od zastavení reakce měříme absorbanci při vlnové délce 450 nm s užitím referenčního filtru o vlnové délce 620 – 650 nm.

Koncentrace MCP-1 se získá odečtením z kalibrační křivky (v pg/ml).
Normální plazmatické hodnoty jsou 200,0 - 722,0 pg/l.

4.2.2.1.4. Kvantitativní stanovení molekuly sCD 40L v lidském séru

princip metody: nekompetitivní ELISA

popis soupravy: souprava Quantikine®human soluble CD 40 Ligand Immunoassay, firmy R&D Systems (Minneapolis, USA)

- mikrotitrační destička s navázanou protilátkou
- kalibrátory (0,0; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000; 4000 pg/ml)
- koncentrovaný promývací roztok
- roztok pro ředění vzorků
- konjugát (protilátka proti sCD 40L značená peroxidázou)
- substrát A (tetramethylbenzidin)
- substrát B (peroxid vodíku)
- stop roztok (2M $H_2SO_4$)
- pozitivní a negativní kontrola

příprava reagencií: Připravíme promývací roztok naředěním koncentrátu destilovanou vodou v poměru 1:25, naředíme vyšetřované vzorky roztokem pro ředění vzorků v poměru 1:5 (50 µl vzorku + 200 µl roztoku pro ředění vzorků). Substrát A a substrát B smícháme v ekvivalentním množství ne více než 15 minut před použitím.

vlastní postup:
1. Soupravu vytemperujeme na pokojovou teplotu.
2. Do jamek mikrotitrační destičky pipetujeme 100 µl kalibrátorů, kontrol a naředěných vzorků a překryjeme adhezivní folií.
3. Inkubujeme při pokojové teplotě 2 hodiny na orbitální třepačce.
4. Vylijeme obsah jamek a důkladně promyjeme 4× promývacím roztokem (400 µl) každou jamku a vysušíme poklepem na savý papír.
5. Do všech jamek pipetujeme 200 µl konjugátu a překryjeme novou adhezivní folií.
6. Inkubujeme při pokojové teplotě 2 hodiny na orbitální třepačce.
7. Opakujeme krok č.4 (vylití obsahu jamek, promytí a vysušení)
8. Do všech jamek pipetujeme 200 µl substrátu.

9. Inkubujeme při pokojové teplotě 30 minut v temnu.
10. Reakci ukončíme přidáním 50 µl stop roztoku do každé jamky, dochází ke změně barvy modré na žlutou.
11. Jemně promícháme obsah jamek a během 30 minut od zastavení reakce měříme absorbanci při vlnové délce 450 nm s užitím referenčního filtru o vlnové délce 540 – 570 nm.

Koncentraci molekuly sCD 40L získáme odečtením z kalibrační křivky (v pg/ml). Normální hodnota sCD40L v séru zdravých dospělých osob je 5 461 ng/l, rozmezí hodnot 0 - 11451 ng/l.

4.2.2.2. LEIA

LEIA (luminoenzymoimunoanalýza) patří mezi enzymoimunoanalýzy, jejichž měřeným signálem je luminiscence.

Tuto techniku jsme užili ke stanovení hsCRP v lidském séru, kdy pevná fáze (polystyrenová partikule) potažená polyklonální protilátkou proti hsCRP je inkubována se sérem pacienta a s konjugátem, po promytí je přidán vhodný substrát, který působením enzymu je přeměněn na luminiskující produkt. Intenzita luminiscence je přímo úměrná koncentraci hsCRP v séru.

4.2.2.2.1. Kvantitativní stanovení „high sensitivity" C-reaktivního proteinu (hsCRP) v lidském séru

princip metody: LEIA

popis soupravy: souprava Immulite®High Sensitivity CRP, firmy DPC (Los Angeles, USA)

- plastové nádobky na vzorky
- reagenční nádobky s polystyrenovou kuličkou potaženou protilátkou proti hs CRP

- nádobka s konjugátem (anti-hs CRP protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou)
- roztok pro ředění vzorků
- koncentrovaný promývací roztok
- pozitivní a negativní kontrola
- chemiluminiscenční substrát

příprava reagencií: Vyšetřovaná séra pacientů naředíme roztokem pro ředění vzorků v poměru 1:101 (10 µl vzorku + 1000 µl roztoku pro ředění vzorků).

vlastní postup:

1. Soupravu vytemperujeme na pokojovou teplotu.
2. Pipetujeme 100 µl předředěných sér či kontrol do plastových nádobek.
3. Dále je stanovení provedeno a vyhodnoceno automaticky na přístroji IMMULITE, DPC.

Výsledky se vyjadřují v mg/l.

## 4.3. Statistické zpracování výsledků

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí software MedCalc (Belgie).

### 4.3.1. Základní statistika

Pomocí *Kolmogorov-Smirnovova* testu byla zjištěna normalita rozložení hodnot sledovaných parametrů v daném souboru i v podsouborech.

Základní charakteristikou je aritmetický průměr (v případě zjištěné normality) či median (při nenormálním rozložení hodnot).

### 4.3.2. Testovací statistika

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

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

Úroveň statistických rozdílů je vyjádřena pomocí parametru p:

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

# 5. VÝSLEDKY

Vyšetřovaný soubor tvořilo celkem devět pacientů, pět mužů a čtyři ženy s těžkou familiární hyperlipidemií, léčených LDL-aferézou na principu imunoadsorpce. U všech bylo prokázáno aterosklerotické postižení.

Sledovali jsme hladiny vybraných ukazatelů aterogeneze a jejich změny po LDL-aferéze. Současně jsme pátrali po možné korelaci mezi jednotlivými parametry. Jednalo se o solubilní formu adhezních molekul sP-selektin, sE-selektin, monocytární chemotaktický protein – 1 (MCP-1), hsCRP a molekulu sCD 40L.

Ke stanovení hladin vyšetřovaných markerů v plazmě jsme použili metod enzymoimunoanalýzy a chemiluminiscenční analýzy.

Koncentrace sledovaných parametrů u nemocných před a po aferéze jsou uvedeny v *Tabulce 3* a *4.*

Statistické zhodnocení podsouborů „PŘED" a „PO" (aferéze) je uvedeno v *Tabulce 7.*

## I. sP-selektin

Ke stanovení sP-selektinu v plazmě byla použita metoda ELISA, souprava Parameter human sP-selectin, firmy RDS (USA). Průměrná koncentrace sP-selektinu kontrolního souboru (n = 23) byla 82 ± 3 ng/ml.

- Podsoubor „P-selektin PŘED" (n = 26) s aritmetickým průměrem 251,67 ± 193 vykazoval normální rozdělení (p > 0,20).
- Podsoubor „P-selektin PO" (n = 26) s aritmetickým průměrem 164,74 ± 140 vykazoval též normální distribuci hodnot (p = 0,098).

Hodnoty sP-selektinu nemocných před aferézou byly ve srovnání s hodnotami kontrolního souboru signifikantně zvýšeny (p = 0,0001).

Pokles koncentrace sP-selektinu po aferéze byl statisticky signifikantní (p=0,0062; tj. střední statistická významnost) a je znázorněn v *Grafu 1.* Nevedl však k normalizaci hladiny sP-selektinu.

Pokles sP-selektinu koreloval na hranici statistické významnosti s poklesem hsCRP po LDL aferéze (r = 0,4063; p = 0,0488) a je znázorněn v *Grafu* 6.

**II. sE-selektin**

Ke stanovení sE-selektinu v plazmě byla stejně jako v předchozím případě použita technika ELISA, souprava Parameter human sE-selektin, firmy RDS (USA). Průměrná koncentrace sE-selektinu kontrolního souboru (n = 130) byla 46,25 ± 17,15 ng/ml.

- Podsoubor „E-selektin PŘED" (n = 26) s aritmetickým průměrem 58,82 ± 43 vykazoval normální rozdělení (p > 0,20).
- Podsoubor „E-selektin PO" (n = 26) s aritmetickým průměrem 51,92 ± 53 měl opět normální distribuci hodnot (p > 0,20).

Hodnoty sE-selektinu nemocných před aferézou byly oproti hodnotám kontrolního souboru statisticky signifikantně zvýšeny (p = 0,0116).

Změny koncentrace sE-selektinu před a po aferéze nebyly statisticky signifikantní (p = 0,1773; tj. bez statistické významnosti) a jsou vyjádřeny v *Grafu 2.*

Byla nalezena statisticky signifikantní korelace sE-selektinu s molekulou sCD 40L před aferézou (r = 0,6098; p = 0,0016) a je znázorněna v *Grafu 7.*

Také pokles hladiny sE-selektinu koreloval statisticky významně s poklesem sCD 40L po aferéze (r = 0,7370; p < 0,0001; tj. vysoká statistická významnost) a je znázorněn *Grafem 8.*

**III. Monocytární chemotaktický protein – 1 (MCP-1)**

Ke stanovení MCP-1 v plazmě byla použita metoda ELISA, souprava Quantikine human MCP-1, firmy RDS (USA). Průměrná koncentrace MCP-1 kontrolního souboru (n = 37) byla 461 ± 130,5.

- Podsoubor „MCP-1 PŘED" (n = 26) s aritmetickým průměrem 258,60 ± 112,5 vykazoval normální distribuci hodnot (p > 0,20).
- Podsoubor „MCP-1 PO" (n = 26) s aritmetickým průměrem 188,24 ± 101 vykazoval opět normální rozdělení (p > 0,20).

Pokles koncentrace MCP-1 po aferéze byl vysoce statisticky významný (p < 0,0001) a je vyjádřen *Grafem 3.* Hodnoty MCP-1 u pacientů po aferéze byly ve srovnání s hodnotami MCP-1 u kontrolního souboru signifikantně sníženy (p < 0,0001).

Koncentrace MCP-1 před aferézou statisticky významně korelovala s koncentrací hsCRP (r = 7655, p < 0,0001) a je znázorněna *Grafem 9.*

Také pokles hladiny MCP-1 koreloval statisticky významně s poklesem hsCRP po aferéze ($r = 0,6755$; $p = 0,0003$) a je vyjádřen *Grafem 10*.

**IV. „high sensitivity" C-reaktivní protein (hsCRP)**

Ke stanovení hsCRP v séru byla použita chemiluminiscenční analýza, souprava IMMULITE High Sensitivity CRP (DPC, Los Angeles, CA, USA). Norma - koncentrace CRP < 5 mg/l.

- Podsoubor „hsCRP PŘED" ($n = 51$) s aritmetickým průměrem $2,43 \pm 2,2$ vykazoval normální distribuci hodnot ($p = 0,084$).
- Podsoubor „hsCRP PO" ($n = 51$) s aritmetickým průměrem $2,14 \pm 2$ vykazoval normální rozdělení ($p = 0,141$).

Pokles koncentrace hsCRP po aferéze nebyl statisticky signifikantní ($p = 0,1305$; tj. bez statistické významnosti) a je znázorněn *Grafem 4*.

Koncentrace hsCRP před aferézou statisticky významně korelovala s koncentrací MCP-1 ($r = 0,7655$; $p < 0,0001$) viz *Graf 9*.

Pokles koncentrace hsCRP vykazoval statisticky významnou korelaci s koncentrací MCP-1 po aferéze ($r = 0,6755$; $p = 0,0003$) viz *Graf 10* a korelaci na hranici statistické významnosti s koncentrací sP-selektinu po aferéze ($r = 0,4063$; $p = 0,0488$) viz *Graf 6*.

**V. molekula sCD 40L**

Ke stanovení koncentrace sCD 40L v séru byla použita metoda ELISA, souprava Quantikine human sCD40 Ligand, firmy RDS (USA). Normální hodnoty koncentrace sCD 40L u zdravých lidí nejsou známy.

- Podsoubor „sCD 40L PŘED" ($n = 51$) s medianem 70,5 vykazoval nenormální distribuci hodnot ($p < 0,01$).
- Podsoubor „sCD 40L PO" ($n = 51$) s medianem 63,9 vykazoval nenormální distribuci hodnot ($p < 0,01$).

Pokles koncentrace sCD 40L po aferéze byl na hranici statistické významnosti ($p = 0,0454$) a je vyjádřen *Grafem 5*.

Koncentrace sCD 40L před aferézou statisticky významně korelovala s koncentrací sE-selektinu ($r = 0,6098$; $p = 0,0016$) viz *Graf 7*.

Pokles hladiny sCD 40L vykazoval vysoce statisticky významnou korelaci s hladinou sE-selektinu po aferéze ($r = 0,7370$; $p < 0,0001$) viz *Graf 8*.

# 6. TABULKY A GRAFY

## 6.1. PŘEHLED NAMĚŘENÝCH HODNOT

V tabulkách 3 a 4 jsou uvedeny naměřené hodnoty všech sledovaných ukazatelů aterogeneze, a to PŘED aferézou (tab.č.3) a PO aferéze (tab.č.4). Přehled průměrných hodnot vybraných parametrů vyšetřovaného a kontrolního souboru uvádí tabulka 5.

## 6.2. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Vyhodnocení statistické významnosti rozdílů průměrných hodnot u vyšetřovaného a kontrolního souboru je uvedeno v tabulce 6.
V tabulce 7 je zachyceno statistické vyhodnocení podsouborů pro jednotlivé sledované parametry a jejich vzájemné porovnávání.

## 6.3. GRAFICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Změny sledovaných parametrů po aferéze jsou znázorněny pomocí sloupcových grafů (Grafy č.1 – 5). Grafy jsou zobrazeny v podobě „Box and Whisker plotu" : Střed obdélníku představuje medián, spodní hrana 25. percentil, horní hrana 75. percentil a úsečky minimum a maximum po vyloučení odlehlých hodnot, které jsou znázorněny samostatnými body.
Statisticky významné korelace hladin vybraných markerů znázorňují grafy č.6 – 10.

**Tab. č. 3: Přehled naměřených parametrů před LDL aferézou**

| pacient č. | soubor | sP-selektin (ng/ml) | sE-selektin (ng/ml) | MCP-1 (pg/ml) |
|---|---|---|---|---|
| 5 | před | 508,9 | 43,9 | 171,8 |
| 5 | před | 210,7 | 116,6 | 145,3 |
| 5 | před | 106,1 | 5,1 | 193,1 |
| 5 | před | 60,9 | 5,1 | 179,8 |
| 4 | před | 279,4 | 57,7 | 275,5 |
| 4 | před | 320,9 | 115,9 | 277,1 |
| 4 | před | 80,4 | 71,9 | 333,8 |
| 4 | před | 420,4 | 16,5 | 498,2 |
| 3 | před | 141,1 | 54,3 | 179,9 |
| 3 | před | 106 | 67,7 | 62,6 |
| 6 | před | 332,7 | 121,3 | 212,1 |
| 9 | před | 227,8 | 156,4 | 255,9 |
| 1 | před | 295,3 | 127,1 | 216,4 |
| 1 | před | 109,5 | 115,3 | 303 |
| 1 | před | 315,1 | 48,2 | 324,3 |
| 2 | před | 821,3 | 65,7 | 277,1 |
| 2 | před | 88,1 | 44,9 | 362,6 |
| 2 | před | 299,9 | 12,6 | 448,2 |
| 7 | před | 481,3 | 63,9 | 266,4 |
| 7 | před | 152,3 | 60,6 | 236,6 |
| 7 | před | 122,8 | 7,8 | 406,3 |
| 7 | před | 87,9 | 14,7 | 483,1 |
| 8 | před | 95,7 | 44,6 | 116,2 |
| 8 | před | 110,5 | 47,7 | 145,3 |
| 8 | před | 127,4 | 36,5 | 186,4 |
| 8 | před | 641 | 7,3 | 166,7 |

**Tab. č. 3: Přehled naměřených parametrů před LDL aferézou (pokračování I)**

| pacient č. | soubor | hsCRP (mg/l) | sCD 40L (ng/ml) |
|---|---|---|---|
| 5 | před | 0,2 | 68,6 |
| 5 | před | 0,2 | 0,2 |
| 5 | před | 0,5 | 53,4 |
| 5 | před | 0,5 | 58,7 |
| 4 | před | 0,9 | 269,8 |
| 4 | před | 5,5 | 41,6 |
| 4 | před | 5,4 | 53,5 |
| 4 | před | 4,2 | 88,5 |
| 3 | před | 0,3 | 428,1 |
| 3 | před | 0,6 | 62,8 |
| 6 | před | 0,8 | 979,5 |
| 1 | před | 3,6 | 729,5 |
| 1 | před | 1,9 | 1176,2 |
| 1 | před | 4 | 50,1 |
| 2 | před | 7,4 | 264,4 |
| 2 | před | 2,8 | 32,4 |
| 2 | před | 6,6 | 55,7 |
| 7 | před | 2,2 | 274,9 |
| 7 | před | 3,3 | 462,9 |
| 7 | před | 4,3 | 47,5 |
| 7 | před | 9,5 | 43,6 |
| 8 | před | 0,4 | 143,6 |
| 8 | před | 1 | 85,9 |
| 8 | před | 0,8 | 52,3 |
| 6 | před | 5,3 | 529,3 |
| 6 | před | 0,5 | 80,9 |

**Tab. č. 3: Přehled naměřených parametrů před LDL aferézou (pokračování II)**

| pacient č. | soubor | hsCRP (mg/l) | sCD 40L (ng/ml) |
|---|---|---|---|
| 6 | před | 1 | 59,4 |
| 6 | před | 1,4 | 54,3 |
| 6 | před | 0,9 | 50,8 |
| 1 | před | 5,6 | 59,8 |
| 1 | před | 1,8 | 38,2 |
| 1 | před | 2,5 | 68,8 |
| 3 | před | 0,4 | 41,3 |
| 3 | před | 0,4 | 41,7 |
| 3 | před | 0,3 | 43,9 |
| 7 | před | 2,4 | 42,9 |
| 7 | před | 2,7 | 48,1 |
| 4 | před | 3,4 | 98,1 |
| 2 | před | 2,9 | 48,7 |
| 2 | před | 3,3 | 70,5 |
| 6 | před | 0,78 | 6300 |
| 7 | před | 2,22 | 5171 |
| 4 | před | 0,97 | 3506 |
| 5 | před | 2,24 | 6490 |
| 3 | před | 0,28 | 3971 |
| 1 | před | 3,68 | 7074 |
| 8 | před | 0,44 | 9394 |
| 5 | před | 0,2 | 5361 |
| 4 | před | 1,9 | 8446 |
| 3 | před | 3,03 | 2992 |
| 2 | před | 6,7 | 3494 |

**Tab. č. 4: Přehled naměřených parametrů po LDL aferéze**

| pacient č. | soubor | P-selektin (ng/ml) | E-selektin (ng/ml) | mcp-1 (pg/ml) |
|---|---|---|---|---|
| 5 | po | 190,9 | 50,2 | 95,9 |
| 5 | po | 82,9 | 71,9 | 99,4 |
| 5 | po | 56,8 | 6,2 | 168,8 |
| 5 | po | 34,9 | 2,4 | 121,8 |
| 4 | po | 250,9 | 54,1 | 214,9 |
| 4 | po | 224,7 | 101,9 | 155,7 |
| 4 | po | 55,3 | 71,9 | 224,5 |
| 4 | po | 337,3 | 13,3 | 195,3 |
| 3 | po | 50,9 | 8,1 | 136,3 |
| 3 | po | 92,9 | 50,9 | 40,6 |
| 6 | po | 232,6 | 78,8 | 122,4 |
| 9 | po | 317,9 | 213,7 | 200,7 |
| 1 | po | 330,6 | 123,4 | 185,4 |
| 1 | po | 85,9 | 179,9 | 177,6 |
| 1 | po | 270,6 | 33,7 | 247,3 |
| 2 | po | 567,1 | 54,9 | 241,1 |
| 2 | po | 52,7 | 56,13 | 162,3 |
| 2 | po | 429,9 | 8,7 | 300,7 |
| 7 | po | 121,8 | 34,8 | 159,7 |
| 7 | po | 128,3 | 32 | 192,3 |
| 7 | po | 72,3 | 5,6 | 433,4 |
| 7 | po | 66,2 | 14,2 | 500,7 |
| 8 | po | 56,4 | 42,2 | 154,4 |
| 8 | po | 55,9 | 34,9 | 45,4 |
| 8 | po | 71,5 | 5,6 | 168,4 |
| 8 | po | 45,9 | 0,6 | 149,3 |

**Tab. č. 4: Přehled naměřených parametrů po LDL aferéze (pokračování I)**

| pacient č. | soubor | hsCRP (mg/l) | sCD 40L (ng/ml) |
|---|---|---|---|
| 5 | po | 5,6 | 54,4 |
| 5 | po | 0,1 | 0,1 |
| 5 | po | 0,3 | 46,9 |
| 5 | po | 0,3 | 37,5 |
| 4 | po | 0,7 | 130,4 |
| 4 | po | 2,5 | 55,3 |
| 4 | po | 2,9 | 67,6 |
| 4 | po | 2,3 | 90,2 |
| 3 | po | 0,2 | 218,6 |
| 3 | po | 0,5 | 58,9 |
| 6 | po | 0,6 | 378,7 |
| 9 | po | 1,7 | 679,9 |
| 1 | po | 1,7 | 969,9 |
| 1 | po | 2,8 | 45,7 |
| 1 | po | 6,1 | 565,8 |
| 2 | po | 3,7 | 43,9 |
| 2 | po | 5,3 | 52,8 |
| 2 | po | 1,4 | 150 |
| 7 | po | 2,8 | 152,9 |
| 7 | po | 6,9 | 49,3 |
| 7 | po | 5,3 | 41,3 |
| 7 | po | 0,3 | 58,7 |
| 8 | po | 0,9 | 50,6 |
| 8 | po | 0,8 | 31,2 |
| 8 | po | 6,7 | 660,1 |
| 8 | po | 0,6 | 49 |
| 6 | po | 0,6 | 43,9 |
| 6 | po | 0,8 | 62,1 |

**Tab. č. 4: Přehled naměřených parametrů po LDL aferéze (pokračování II)**

| pacient č. | soubor | hsCRP (mg/l) | sCD 40L (ng/ml) |
|---|---|---|---|
| 6 | po | 0,6 | 43,9 |
| 6 | po | 0,8 | 62,1 |
| 6 | po | 1,1 | 43,7 |
| 1 | po | 6,3 | 67,3 |
| 1 | po | 1,8 | 43,4 |
| 1 | po | 2,7 | 71,7 |
| 3 | po | 0,4 | 34,7 |
| 3 | po | 0,3 | 44,3 |
| 3 | po | 0,3 | 39,2 |
| 7 | po | 2,1 | 48,9 |
| 7 | po | 1,9 | 37,1 |
| 4 | po | 3,2 | 56,8 |
| 2 | po | 2,9 | 63,9 |
| 2 | po | 5,5 | 90,8 |
| 6 | po | 0,75 | 5849 |
| 7 | po | 1,16 | 2752 |
| 4 | po | 0,62 | 1821 |
| 5 | po | 1,29 | 1955 |
| 3 | po | 0,21 | 2632 |
| 1 | po | 1,52 | 8375 |
| 8 | po | 0,32 | 409 |
| 5 | po | 0,1 | 3756 |
| 4 | po | 1,38 | 7324 |
| 3 | po | 2,43 | 1145 |
| 2 | po | 6,36 | 5338 |

**Tab. č. 5: Přehled průměrných hodnot vybraných parametrů vyšetřovaného a kontrolního souboru**

| parametr | před aferézou | | po aferéze | | kontrolní soubor | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N | průměr ± SD | N | průměr ± SD | N | průměr ± SD |
| **P-selektin (ng/ml)** | 26 | 251,67 ± 193 | 26 | 164,74 ± 140 | 23 | 82 ± 3 |
| **E-selektin (ng/ml)** | 26 | 58,82 ± 43 | 26 | 51,92 ± 53 | 130 | 46,25 ± 17,15 |
| **MCP-1 (pg/ml)** | 26 | 258,60 ± 112,5 | 26 | 188,24 ± 101 | 37 | 461 ± 130,5 |

N počet hodnot
SD směrodatná odchylka

**Tab. č. 6: Porovnání průměrných hodnot vybraných parametrů pacientů s kontrolním souborem**

| parametr | soubor | N | průměr ± SD | hodnota p |
|---|---|---|---|---|
| **P-selektin (ng/ml)** | PŘED | 26 | 251,67 ± 193 | p = 0,0001 |
| | PO | 26 | 164,74 ± 140 | p = 0,0068 |
| **E-selektin (ng/ml)** | PŘED | 26 | 58,82 ± 43 | p = 0,0116 |
| | PO | 26 | 51,92 ± 53 | p = 0,3092 |
| **MCP-1 (pg/ml)** | PŘED | 26 | 258,60 ± 112,5 | p < 0,0001 |
| | PO | 26 | 188,24 ± 101 | p < 0,0001 |

Pozn. Hodnota p vyjadřuje statistickou významnost změn průměrných hodnot vyšetřovaného a kontrolního souboru (přehled průměrných hodnot kontrolního souboru viz Tabulka 2).

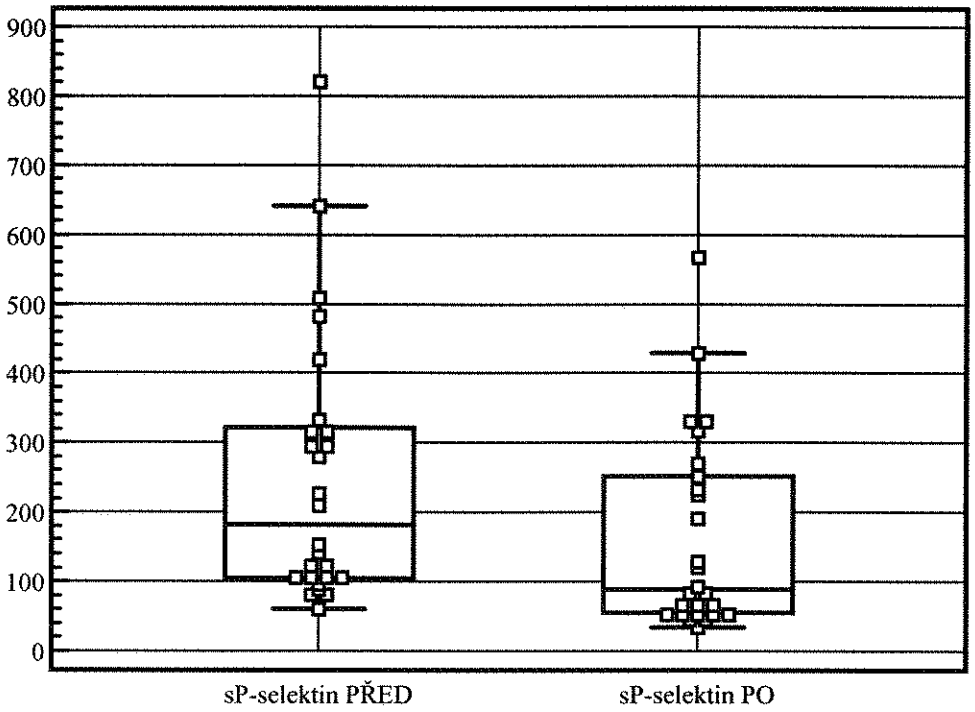
N počet naměřených hodnot
SD směrodatná odchylka

**Tab. č. 7: Statistické zhodnocení jednotlivých parametrů před a po LDL aferéze**

| parametr | před aferézou | | | po aferéze | | | před aferézou × po aferéze | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N | median/AP | rozložení | N | median/AP | rozložení | test | hodnota p |
| **sP-selektin (ng/ml)** | 26 | 251,6692 | NO | 26 | 164,7346 | NO | t-test | p = 0,0062 |
| **sE-selektin (ng/ml)** | 26 | 58,8192 | NO | 26 | 51,9242 | NO | t-test | p = 0,1773 |
| **MCP-1 (pg/ml)** | 26 | 258, 6038 | NO | 26 | 188,2423 | NO | t-test | p < 0,0001 |
| **hsCRP (mg/l)** | 51 | 2,4341 | NO | 51 | 2,138 | NO | t-test | p = 0,1305 |
| **sCD 40L (ng/ml)** | 51 | 70,5 | NE | 51 | 63,9 | NE | Wilcoxon test | p = 0,0454 |

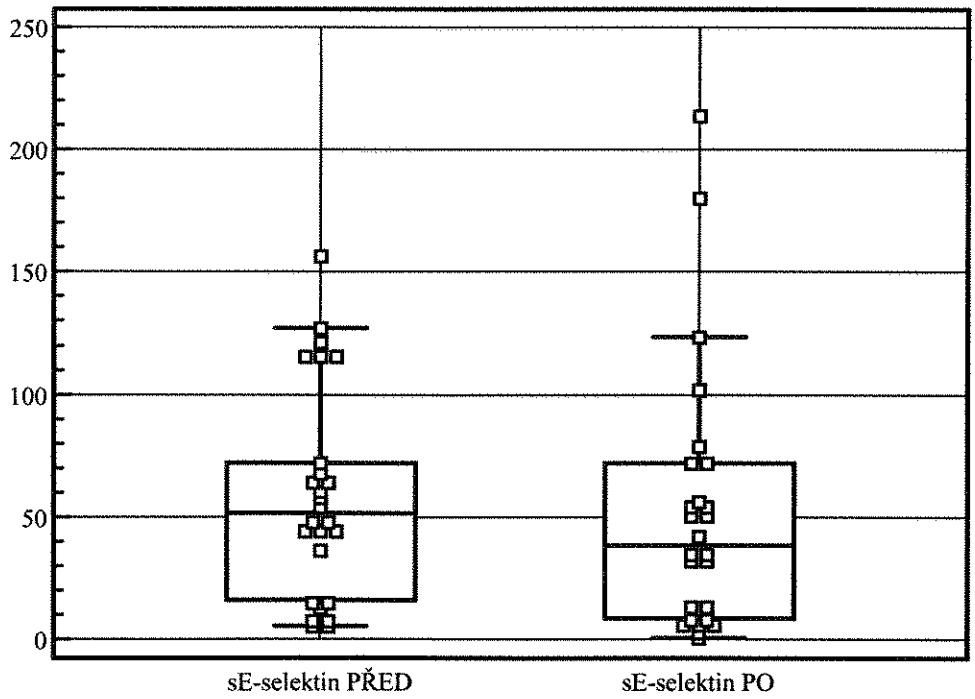
AP aritmetický průměr
N počet pacientů v souboru
NE nenormální rozložení hodnot
NO normální rozložení hodnot
p statistická významnost

**Graf č.1: Porovnání hladin sP-selektinu před a po aferéze**



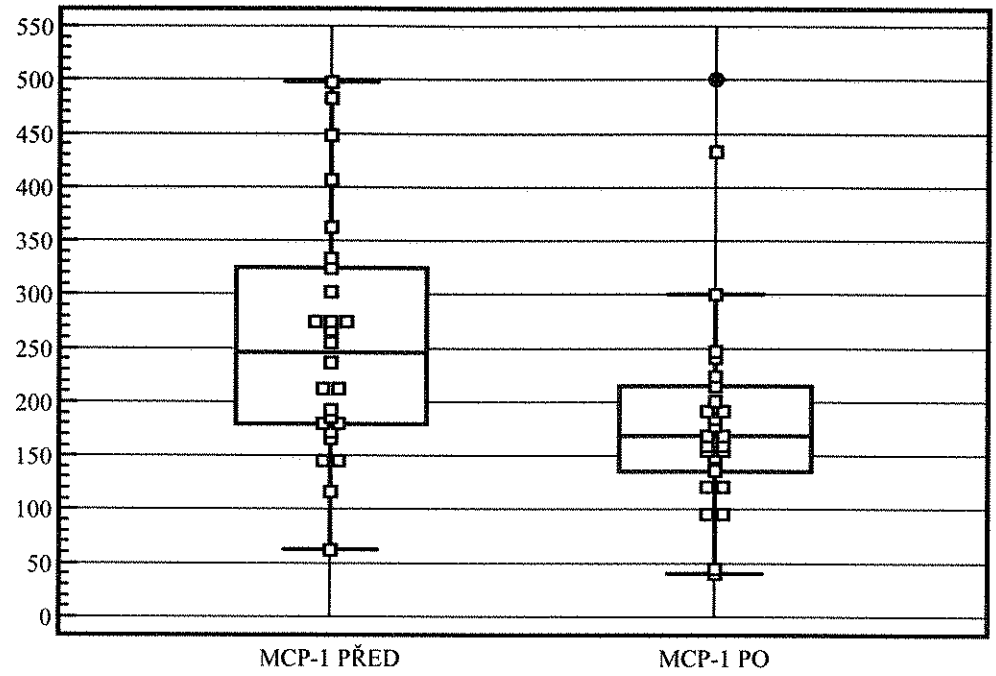

Pokles koncentrace sP-selektinu po aferéze byl statisticky signifikantní ($p = 0,0062$; tj. střední statistická významnost).

**Graf č.2: Porovnání hladin sE-selektinu před a po aferéze**



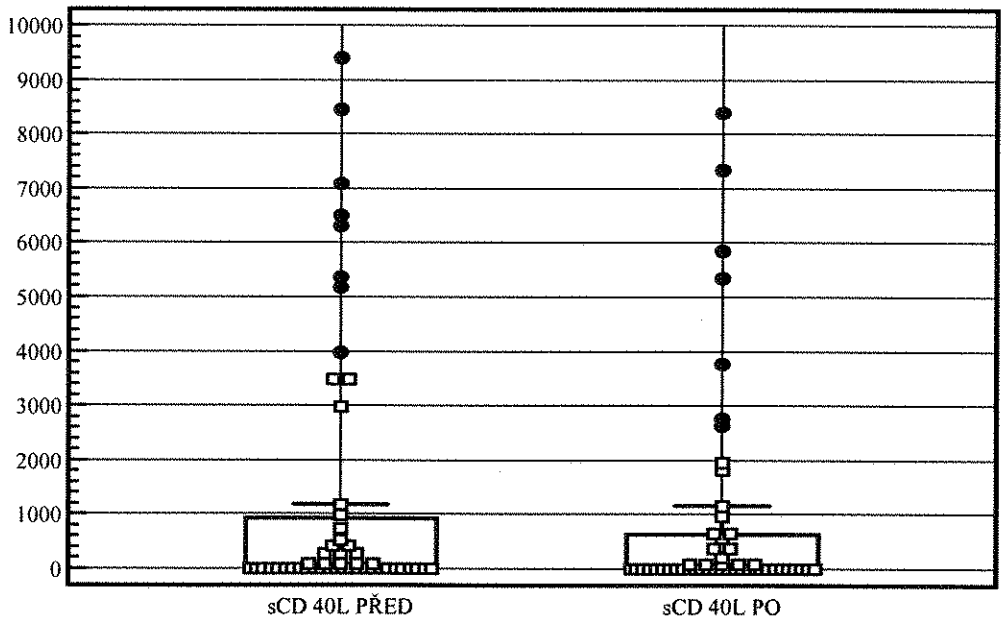

Změny koncentrace sE-selektinu před a po aferéze nebyly statisticky signifikantní ($p = 0,1773$; tj. bez statistické významnosti).

**Graf č.3: Porovnání hladin MCP-1 před a po aferéze**



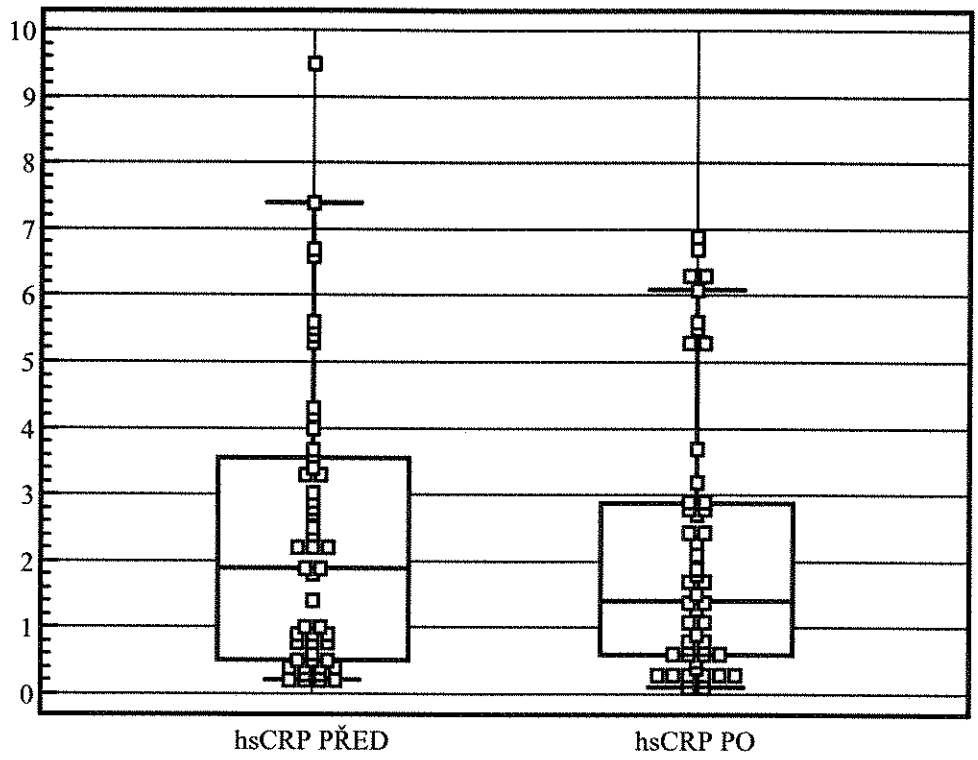

Pokles koncentrace MCP-1 po aferéze byl statisticky signifikantní ($p < 0,0001$; tj. vysoká statistická významnost).

**Graf č.4: Porovnání hladin sCD 40L před a po aferéze**



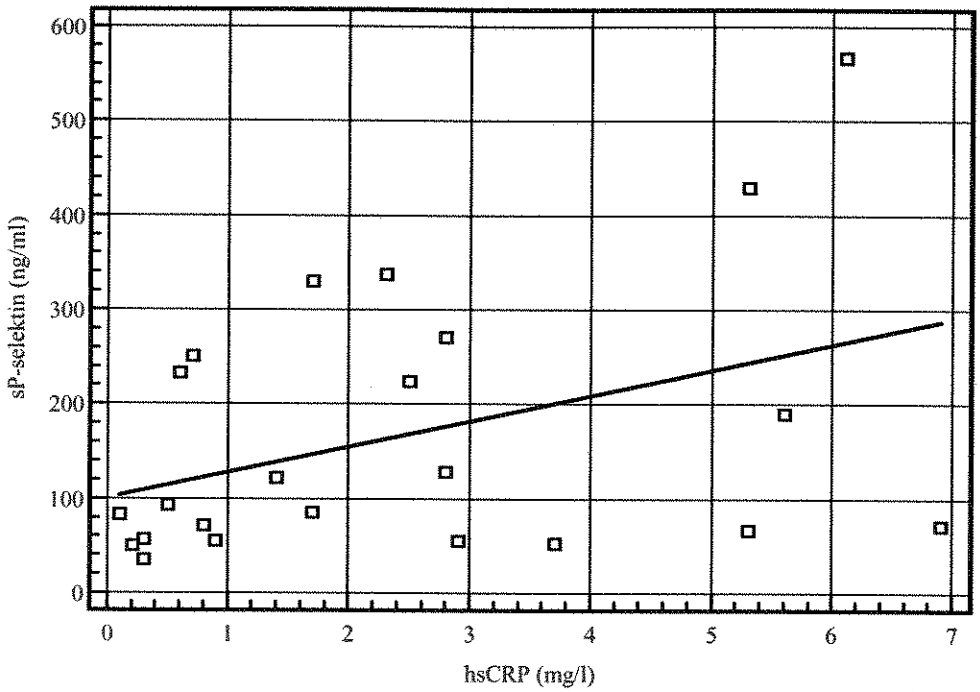

Pokles koncentrace sCD 40L po aferéze byl statisticky signifikantní ($p = 0,0454$; tj. nízká statistická významnost.

**Graf č.5: Porovnání hladin hsCRP před a po aferéze**

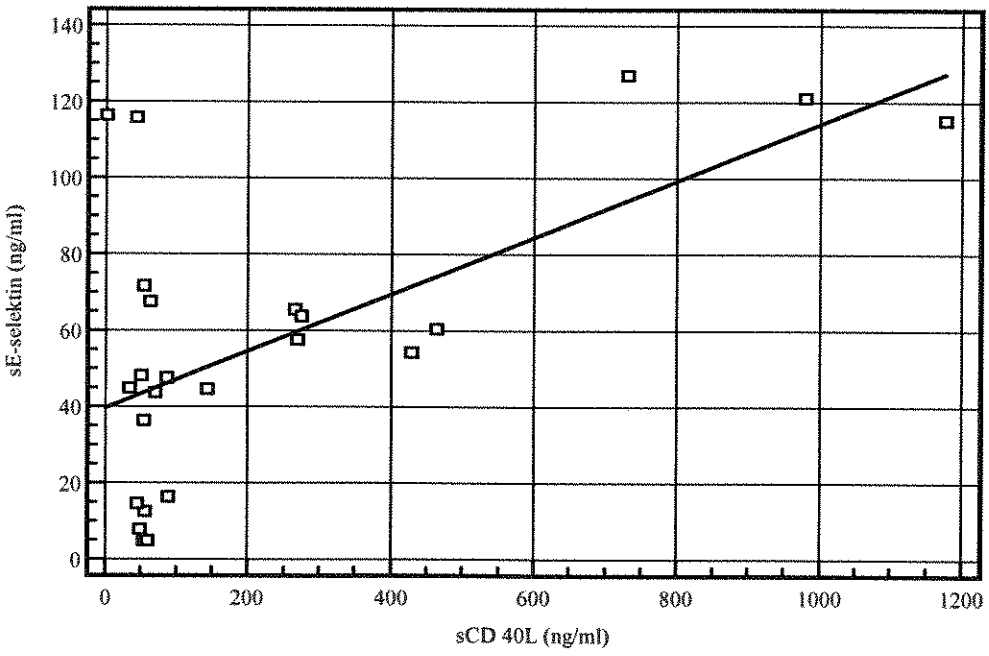



Změny koncentrace hsCRP před a po aferéze nebyly statisticky signifikantní ($p = 0,1305$; tj. bez statistické významnosti.

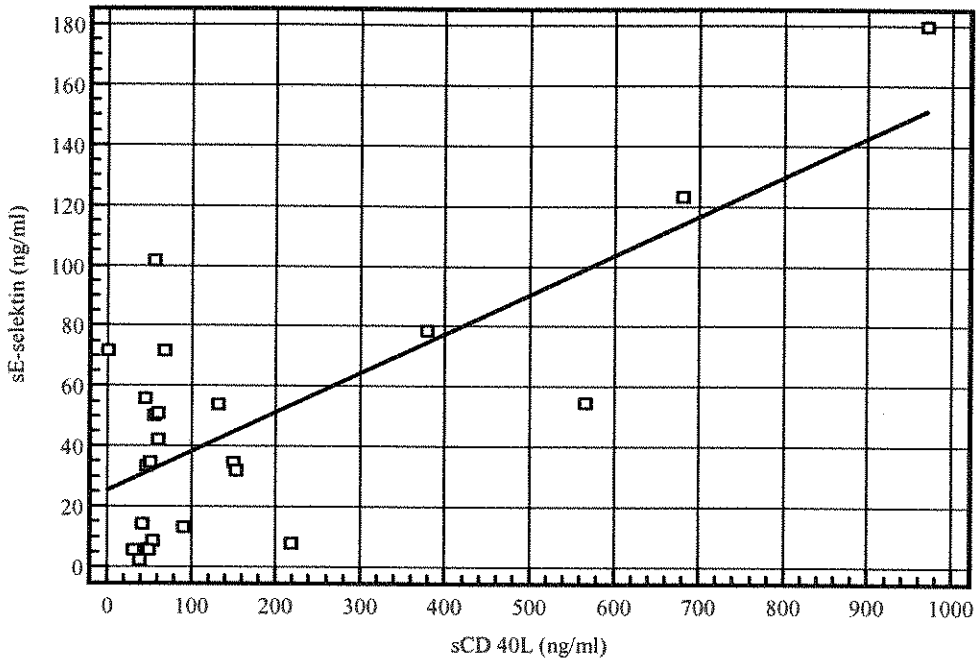
**Graf č.6: Korelace poklesu koncentrace sP-selektinu s koncentrací hsCRP po aferéze (r = 0,4063; p = 0,0488; tj. na hranici statistické významnosti)**



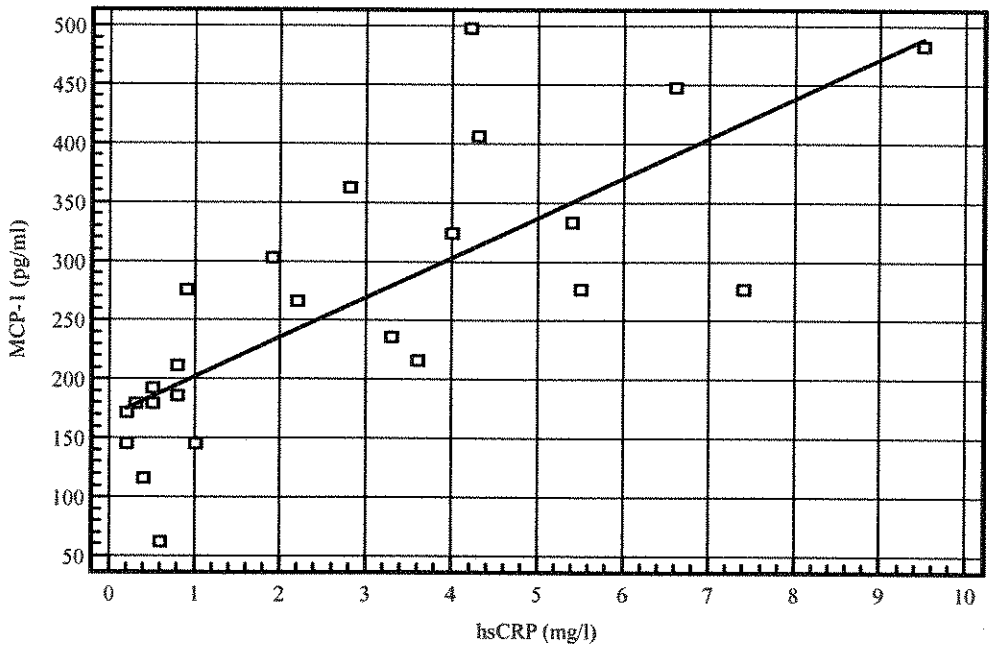

**Graf č.7: Korelace koncentrace sE-sektinu s koncentrací sCD 40L před aferézou (r = 0,6098; p = 0,0016; tj.střední statistická významnost)**



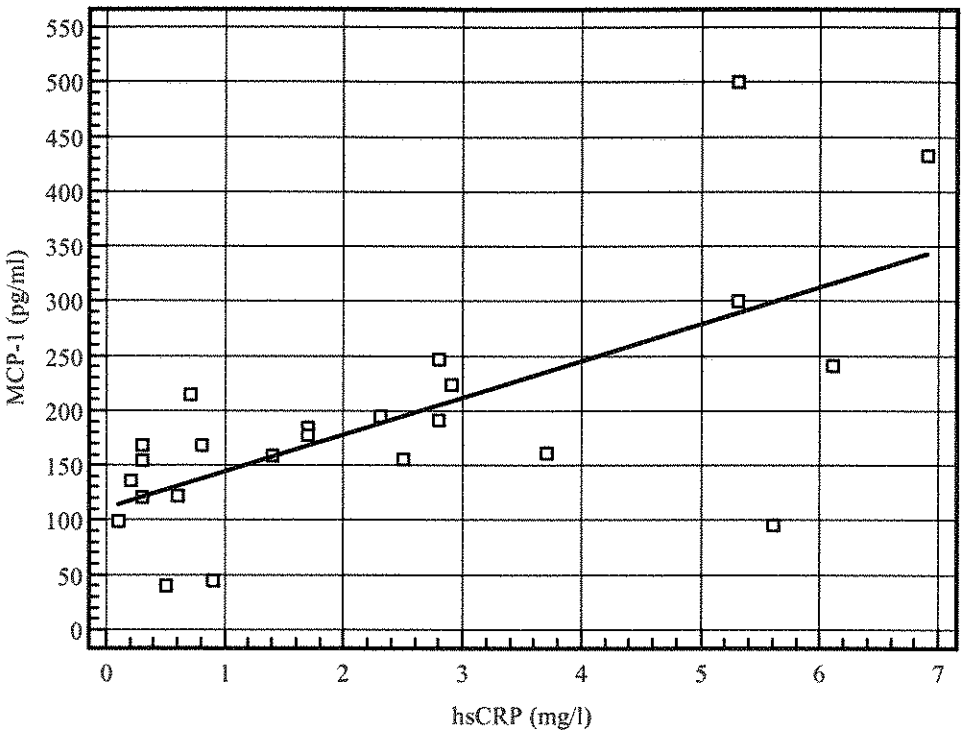
**Graf č.8: Korelace poklesu koncentrace sE-selektinu s koncentrací sCD 40L po aferéze (r = 0,7370; p < 0,0001; tj. vysoká statistická významnost.**




**Graf č.9: Korelace koncentrace MCP-1 s koncentrací hsCRP před aferézou (r = 0,7655; p < 0,0001; tj. vysoká statistická významnost**



**Graf č.10: Korelace poklesu koncentrace MCP-1 s koncentrací hsCRP po aferéze (r = 0,6755; p = 0,0003; tj. vysoká statistická významnost.**



## 7. DISKUZE

Familiární hypercholesterolémie je prokazatelně spojena s dysfunkcí endotelu považovanou za klinicky němou fázi aterosklerózy (Sampietro, 1997).

Je prokázáno, že právě zvýšená hladina cirkulujících LDL částic je příčinou akumulace LDL v intimě arterií a mechanismem poškození endotelu iniciuje proces aterogeneze. Změny endoteliálních funkcí lze monitorovat pomocí vhodných markerů.

V naší práci, která navazuje na výsledky předchozích studií, jsme se zaměřili na změny vybraných ukazatelů aktivace endotelu po LDL aferéze. Současně jsme pátrali po možné korelaci mezi jednotlivými parametry. Jednalo se o solubilní formu adhezních molekul sP-selektin a sE-selektin, dále MCP-1, hsCRP a molekulu sCD 40L.

Vyšetřovaný soubor tvořilo devět pacientů, pět mužů a čtyři ženy s těžkou familiární hyperlipidemií, léčených LDL aferézou na principu imunoadsorpce. U všech bylo prokázáno aterosklerotické postižení.

Existuje mnoho zahraničních studií, které se zabývaly skupinou obdobných hyperlipidemických pacientů, léčených metodou LDL aferézy. Zpravidla prokazují účinnost léčby, ale mechanismus, jakým tyto metody ovlivňují mikroprostředí endotelu cév, není zatím do detailu prozkoumán.

Plazmatické hladiny leukocytárních **adhezních molekul P- a E-selektinu** jsou považovány za ukazatele aktivace endoteliálních buněk. Pomocí sledování dynamiky jejich hladin při léčbě LDL-aferézou jsme studovali možný vliv změn hladin cholesterolu na adhezívní vlastnosti endotelu.

Exprese **P-selektinu** je ukazatelem endoteliální a/nebo trombocytární aktivace (Somers, 2000). Podle posledních znalostí, koncentrace sP-selektinu v plazmě odráží spíše aktivitu endoteliálních buněk. U myšího modelu aterosklerózy byla většina cirkulujících molekul sP-selektinu endoteliálního původu (Burger, 2003). Zvýšení hladiny sP-selektinu je považováno u nemocných bez jiného zánětlivého onemocnění či traumatu za ukazatel kardiovaskulárního rizika (Hillis, 2002).

Hladiny sP-selektinu byly v našem souboru nemocných s těžkou familiární hypercholesterolemií signifikantně zvýšeny i navzdory pravidelné léčbě LDL-aferézou. U nemocných nebylo zjištěno jiné akutní ani chronické zánětlivé

onemocnění. Zvýšená hladina sP-selektinu má pravděpodobnou souvislost s aktivitou procesů aterogeneze, především s aktivitou endoteliálních buněk.

LDL-aferéza způsobila signifikantní reprodukovatelný pokles sP-selektinu, nevedla však k normalizaci jeho hladin. Existuje možná souvislost poklesu hladiny P-selektinu s poklesem hladiny LDL-cholesterolu. LDL-aferéza pravděpodobně měla, a to především prostřednictvím poklesu LDL-cholesterolu za následek pokles zvýšené aktivity endotelu, kterou sP-selektin především odráží. Kromě přímé souvislosti se změnami LDL-cholesterolu je možná i spojitost pozorovaného poklesu hladin sP-selektinu s eliminací či naopak aktivací některých dalších činitelů během LDL-aferézy.

Pokles sP-selektinu po proceduře byl popsán také v případě heparinem indukované precipitace LDL-cholesterolu (metoda HELP firmy B. Braun, Melsungen, Německo), kde se však, na rozdíl od našeho souboru, na poklesu podílela také eliminace P-selektinu v koloně (Pulawski, 2002).

Prokázali jsme též signifikantní korelaci poklesu hladiny sP-selektinu s poklesem hsCRP po aferéze na hranici statistické významnosti. Korelace s ostatními sledovanými parametry nebyly statisticky významné.

Koncentrace **E-selektinu** má původ výhradně v aktivovaném endotelu a je považována za specifický ukazatel aktivace endotelu.

Podobně jako v případě P-selektinu jsme zjistili signifikantní zvýšení bazalní hladiny E-selektinu u nemocných před aferézou. Také Sampietro shledal ve své studii signifikantní zvýšení průměrné hladiny sE-selektinu u 8 nemocných s familiární hypercholesterolemií před pravidelně prováděnou LDL-aferézou, v tomto případě na principu dextransulfátové adsorpce pomocí systému Liposorber LA-15 (Kaneka Co., Osaka, Japonsko) (Sampietro, 1997).

Po LDL-aferéze nedošlo k signifikantnímu poklesu hladin sE-selektinu. Na rozdíl od našich výsledků však Sampietro statisticky významný pokles hladiny sE-selektinu po LDL-aferéze prokázal (o 26%).

Důvodem, proč sP-selektin klesl a sE-selektin ne, může být odlišná kinetika sP- a sE-selektinu. Zatímco změny u membránového P-selektinu se pohybují v řádu minut, u E-selektinu jsou významně pomalejší. Je nutno zdůraznit, že tato fakta se netýkají solubilních, ale membránových selektinových molekul. U solubilních forem není rychlost změn plazmatických hladin do detailu známa. Proto je otázkou, zda je našimi metodami detekovatelný pokles sE-selektinu během 3-4 hodin trvání LDL-

aferézy vůbec možný, pokud není způsoben adsorpcí v koloně nebo v linkách separačního setu. Adsorpce v koloně byla však ve studii Sampietra, který pokles sE-selektinu po adsorpci LDL-cholesterolu na dextransulfát prokázal, vyloučena srovnáním hladin před a po vstupu do kolony. Významná eliminace sE-selektinu kolonami určenými k dextransulfátové adsorpci nebyla potvrzena ani v další studii, která prokázala také signifikantní pokles sE-selektinu po LDL-aferéze (Empen, 2002). Největší pokles E-selektinu byl pozorován v případě heparinem indukované precipitace (31%), kde byla však i největší vazba adhezních molekul v koloně, u zbylých dvou metod klesl E-selektin o 6% (Empen, 2002). Tyto výsledky tedy ukazují, že alespoň v případě dextransulfátové adsorpce je signifikantní pokles E-selektinu, který nebyl způsoben vazbou v koloně, možný i v omezeném časovém intervalu během LDL-aferézy a že byl, stejně tak jako pokles sP-selektinu ve studii naší, způsoben alespoň z části buď snížením syntézy a/nebo uvolňování molekul nebo zvýšením jejich odbourávání, které nastalo během LDL-aferézy.

V naší práci jsme také prokázali signifikantní korelaci hladiny sE-selektinu s hladinou sCD 40L před aferézou a statisticky významnou korelaci poklesu hladiny sE-selektinu s poklesem sCD 40L po aferéze. Korelace sE-selektinu s ostatními parametry nevykazovala statistickou významnost.

**MCP-1** řídí migraci leukocytů do tkání postižených zánětem (Butcher, 1991). Jeho zvýšení je spojeno se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem (de Lemos, 2003).

Plazmatické hladiny MCP-1 byly v souboru nemocných v normě, ve srovnání s kontrolním souborem dokonce nižší. Plazmatické hladiny MCP-1 po LDL-aferéze statisticky signifikantně klesly. Na tomto poklesu se pravděpodobně významně podílela adsorpce MCP-1 v koloně.

Prokázali jsme také statisticky signifikantní korelaci hladin MCP-1 s hladinou hsCRP před aferézou a významně koreloval i pokles hladiny MCP-1 s poklesem hsCRP po aferéze.

Eliminace MCP-1 během LDL-aferézy může teoreticky krátkodobě omezit chemotaxi monocytů a přispět k celkovému příznivému efektu LDL-aferézy.

Pokles **hsCRP** byl pozorován u různých extrakorporálních eliminačních metod LDL-cholesterolu. Redukci koncentrací CRP o 65% popsali shodně u metody HELP Moriarty na souboru 4 pacientů a Wieland na souboru 13 pacientů (Moriarty, 2001 B, Wieland, 2002). Pokles o 56% a 53% v případě adsorpce na dextransulfát (DSA) publikovali u 6 pacientů Kobayashi a u 7 nemocných Kojima (Kobayashi,

2002, Kojima, 2003). Srovnáním několika metod LDL-aferézy se zabýval Otto, který popsal průměrný pokles o 62% u metody HELP (10 pacientů), 56% u DSA (15 pacientů), a shodně 25% u imunoadsorpce (7 pacientů) a přímé adsorpce lipidů z plné krve (DALI) (6 pacientů) při srovnatelném poklesu LDL-cholesterolu (Otto, 2001).

Poločas CRP v plazmě je cca 19 hodin. Akutní pokles koncentrace CRP po LDL-aferéze pravděpodobně není pouze následkem omezení zánětlivých dějů během LDL-aferézy, ale nastal pravděpodobně z i jiných příčin. Na prvním místě je třeba zvážit vliv nespecifické vazby CRP v eliminačním mediu. Téměř stoprocentní eliminace v koloně byla potvrzena u metody DSA, kde však byl popsán více než 50% pokles koncentrace hsCRP po aferéze (Kojima, 2003).

V souladu s vysokou selektivitou eliminace LDL-cholesterolu metodou imunoadsorpce nebyl u námi užívaných kolon LDL-Lipopak nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi koncentrací CRP ve vzorku plazmy odebraném před a po aferéze. Na základě těchto nálezů usuzujeme, že eliminace CRP kolonami není významná, a pokud se vůbec na poklesu CRP po LDL-aferéze určitou měrou podílí, pak jistě není jeho hlavní a jedinou příčinou. Předpokládáme, že v eliminaci jiných součástí plazmy, než jsou molekuly obsahující apolipoprotein $B_{100}$, je imunoadsorpce vzhledem k faktu, že odstraňuje tyto molekuly specificky, nejméně účinná ze všech extrakorporálních metod eliminace LDL-cholesterolu. Je možné, že proto právě imunoadsorpce odráží změny aktivity zánětlivých pochodů, vyvolané samotným poklesem LDL, nejselektivněji. Příčina poklesu CRP je velmi pravděpodobně multifaktoriální a zahrnuje výše zmíněné vlivy.

CRP není pouhým ukazatelem aktivity zánětu, ale přímým účastníkem a spouštěcím faktorem zánětlivých pochodů. Jeho pokles během LDL-aferézy pravděpodobně není pouze pasivním následkem nastalých změn, ale může vést k dalšímu omezení prozánětlivých dějů. Tento efekt je u imunoadsorpce menší než u méně selektivních metod LDL-aferézy a je pravděpodobně dočasný, nicméně při dlouhodobé léčbě extrakorporální eliminací LDL-cholesterolu byl pozorován dlouhodobý výrazný pokles hladiny CRP (Otto, 2001), který již lze považovat za odraz snížené aktivity zánětlivých pochodů.

Pokles hladiny **sCD40L** po LDL-aferéze byl signifikantní (na hranici statistické významnosti) a mohl být mimo jiné projevem snížení aktivity buněk imunitního systému následkem eliminace aterogenních činitelů během LDL-aferézy.

V naší studii jsme také prokázali signifikantní korelaci koncentrace sCD 40L s koncentrací sE-selektinu naměřených před aferézou a statisticky významnou korelaci poklesu hladiny sCD 40L s hladinou sE-selektinu po aferéze.

CD40L je považován za prostředek řídícího vlivu T-lymfocytů na ostatní složky zánětlivých procesů v aterosklerotickém plátu (Mach, 1998). Léčba nemocných s těžkou familiární hypercholesterolemií LDL-aferézou tedy pravděpodobně účinně redukuje spouštěcí faktory aktivity aterogeneze. Významná přímá eliminace CD40L kolonami, stejně jako v případě CRP, nebyla prokázána.

## 8. ZÁVĚR

Cílem naší práce, která navazuje na výsledky předchozích studií, bylo ověřit a blíže prozkoumat změny v endotelovém mikroprostředí prostřednictvím sledování změn vybraných ukazatelů aktivace endotelu, a to u pacientů s FH léčených LDL-aferézou. Pátrali jsme zejména po možné korelaci mezi jednotlivými parametry. Jednalo se o adhezní molekuly sP-selektin a sE-selektin, MCP-1, hsCRP a molekulu sCD 40L.

Podařilo se nám prokázat ve shodě s jinými klinickými studiemi statisticky signifikantní pokles hladiny sP-selektinu, MCP-1 a ligandu sCD 40L po LDL-aferéze.

Pokles hladiny sE-selektinu a hsCRP nevykazoval statistickou významnost.

Současně jsme pozorovali statisticky signifikantní korelaci hladiny sE-selektinu s hladinou sCD 40 L a hladiny MCP-1 s hsCRP, v obou případech před i po aferéze.

## 9. SEZNAM LITERATURY


1. **Agishi, T., Kaneko, I., Hasuo, Y., Hayasaka, Y. et al.:** Double filtration plasmapheresis. Ther Apher 2000; 4(1):29-33.
2. **Aiello, R.J., Bourassa, P.A., Lindsey, S., Weng, W. et al.:** Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19(6):1518-25.
3. **Arad, Y., Spadaro, L.A., Goodman, K., Newstein, D. et al.:** Prediction of coronary events with electron beam computed tomography. J Am Coll Cardiol 2000; 36(4): 1253-60.
4. **Basso, F., Lowe, G.D., Rumley, A., McMahon, A.D. et al.:** Interleukin-6 - 174G>C polymorphism and risk of coronary heart disease in West of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 599-604.
5. **Baumbauer, R.:** Low-density lipoprotein apheresis: clinical results with different methods. Artif Organs 2002; 26(2):133-9.
6. **Bláha, M.:** Extracorporeal LDL-cholesterol elimination in the treatment of severe familial hypercholesterolemia. Acta Med (Hradec Králové) 2003; 46(1): 3-7.
7. **Borberg, H., Gaczkowski, A., Hombach, V. Oette, K. et al.:** Treatment of familial hypercholesterolemia by means of specific immunoadsorption. J Clin Apheresis 1988; 4(2-3):59-65.
8. **Borberg, H.:** LDL-apheresis and LDL-elimination therapies. 2nd Seminar of Applied Technology in Haemapheresis (Proceedings). In: European School of Haematology. Paris: ESH, 1997: 1-8.
9. **Bosch, T., Schmidt, B., Blumenstein, M., Gurland, H.J.:** Lipid apheresis by hemoperfusion: in vitro efficacy and ex vivo biocompatibility of a new low-density lipoprotein adsorber compatible with human whole blood. Artif Organs 1993; 17: 640-52.
10. **Boyle, J.J.:** Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. Curr Vasc Pharmacol 2005; 3(1): 63-8.
11. **Burger, P.C., Wagner, D.D.:** Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. Blood 2003; 101(7): 2661-6.

12. **Butcher, E.C.:** Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. Cell 1991; 67(6):1033-6.
13. **Castell, J.V., Gomez-Lechon, M.J., David, M., Fabra, R. et al.:** Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. Hepatology 1990; 12: 1179-86.
14. **Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J. et al.:** Endothelial cells in physiology and the pathophysiology of vascular disorders. Blood 1998; 91(10): 3527-61.
15. **Cermanová, M.:** Disertační práce. Lékařská fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové, 2006.
16. **Creemers, E.E., Cleutjens, J.P., Smits, J.F., Daemen, M.J.:** Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? Circ Res 2001; 89(3): 201-10.
17. **Dart, A.M., Chin-Dusting, J.P.:** Lipids and the endothelium. Cardiovasc Res 1999; 43(2): 308-22.
18. **de Lemos, J.A., Morrow, D.A., Sabatine, M.S., Murphy, S.A. et al.:** Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. Circulation 2003; 107(5): 690-5.
19. **Draz, N., Hamdy, M.S., Gomaa, Y., Ramzy, A.A.:** Soluble P-selectin is a marker of plaque destabilization in unstable angina. Egypt J Immunol 2003; 10(1): 83-7.
20. **Eisenhauer, T., Schuff-Werner, P., Armstrong, V.W.:** Simultaneous heparin-induced extracorporeal LDL precipitation and haemodialysis: first clinical experience. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1991; 37: M494-6.
21. **Empen, K., Otto, C., Brodl, U.C., Parhofer, K.G.:** The effects of three different LDL-apheresis methods on the plasma concentrations of E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1. J Clin Apher 2002; 17(1):.38-43.
22. **Erren, M., Reinecke, H., Junker, R., Fobker, M. et al.:** Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2355-63.
23. **Ford, E.S., Giles, W.H., Myers, G.L., Mannino, D.M.:** Population distribution of high-sensitivity C-reactive protein among US men: findings from National

Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. Clin Chem 2003; 49: 686-90.

24. **Frenette, P.S., Johnson, R.C., Hynes, R.O., Wagner, D.D.:** Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(16): 450-4.
25. **Frenette, P.S., Denis, C.V., Weiss, L., Jurk, K. et al.:** Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. J Exp Med 2000; 191(8):1413-22.
26. **Garcia-Zepeda, E.A., Combadiere, C., Rothenberg, M.E.:** Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. J Immunol 1996; 157: 5613-5626.
27. **Gearing, A.J., Newman, W.:** Circulating adhesion molecules in disease. Immunol Today 1993; 14(10): 506-12.
28. **Giddings, J.C.:** Soluble adhesion molecules in inflammatory and vascular diseases. Biochem Soc Trans 2005; 33: 406-8.
29. **Goldstein, J.L., Brown, M.S.:** The low-density lipoprotein pathway and its realtion to atherosclerosis. Ann. Rewiew Biochem 1977; 46: 897-930.
30. **Heeschen, C., Dimmeler, S., Hamm, C.W., van den Brand, M.J. et al.;** CAPTURE Study Investigators: Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. N Engl J Med 2003; 348: 1104-11.
31. **Hester, J.P., McCullough, J., Mishler, J.M., Szymanski, I.O.:** Dosage regimen for citrate anticoagulans. J Clin Apheresis. 1983; 1:149-157.
32. **Hillis, G.S., Terregino, C., Taggart, P., Killian, A. et al.:** Elevated soluble P-selectin levels are associated with an increased risk of early adverse events in patients with presumed myocardial ischemia Am Heart J.2002;143(2):235-9.
33. **Hoffmann, U., Derfler, K., Haas, M., Stadler, A. et al.:** Effects of combined low-density lipoprotein apheresis and aggressive statin therapy on coronary calcified plaque as measured by computed tomography. Am J Cardiol 2003; 91(4):461-4.
34. **Imhof, A., Froehlich, M., Brenner, H., Boeing, H. et al.:** Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. Lancet 2001; 357: 763-7.

35. **Jebavý, L., Malý, J.:** Hematologie a transfuziologie. In: Vnitřní lékařství pro nelékařské fakulty. Praha: Manus, 2003, s. 141-179. ISBN 80-86571-02-5.

36. **Klingel, R., Fassbender, C., Fassbender, T., Erdtracht, B. et al.:** Rheopheresis: rheologic, functional, and structural aspects. Ther Apher. 2000; 4(5):348-57.

37. **Knisel, W., Pfohl, M., Muller, M., Besenthal, I. et al.:** Comparative long-term experience with immunoadsorption and dextran sulfate cellulose adsorption for extracorporeal elimination of low-density lipoproteins. Clin Investig. 1994; 72(9):660-8.

38. **Kobayashi, J., Katsube, S., Shimoda, M., Furuhashi, K. et al.:** Single LDL apheresis improves serum remnant-like particle-cholesterol, C-reactive protein, and malondialdehyde-modified-low-density lipoprotein concentrations in Japanese hypercholesterolemic subjects. Clin Chim Acta. 2002; 321: 107-12.

39. **Koenig, W., Sund, M., Frohlich, M., Fischer, H.G. et al:** C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. Circulation. 1999; 99: 237-42.

40. **Krejsek, J., Kopecký, O.:** Klinická imunologie. Hradec Králové, Nucleus 2004, 1.vydání.

41. **Ledue, T.B., Rifai, N.:** High sensitivity immunoassays for C-reactive protein: promises and pitfalls. Clin Chem Lab Med. 2001; 39: 1171-6.

42. **Leeuwenberg, J.F., Smeets, E.F., Neefjes, J.J., Shaffer, M.A. et al.:** E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. Immunology. 1992; 77(4):543-9.

43. **Libby, P.:** Changing concepts of atherogenesis. J Intern Med. 2000; 247(3):349-58.

44. **Libby, P.:** Inflammation in atherosclerosis. Nature. 2002; 420(6917):868-74.

45. **Loscalzo, J.:** Lipoprotein (a), fibrin binding and plasminogen activation. Atherosclerosis. 1990; 10: 240-245.

46. **Luscher, T.F., Barton, M.:** Biology of the endothelium. Clin Cardiol. 1997; 20(11 Suppl 2):II-3-10.

47. **Mach, F., Schonbeck, U., Libby, P.:** CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? Atherosclerosis. 1998; 137 Suppl:S89-95..

48. **Matic, G., Kohlschein, P., Wallstab, U., Tiess, M. et al.:** Comparison of two filter combinations for low-density lipoprotein apheresis by membrane differential filtration: a prospective crossover controlled clinical study. Artif Organs. 2002; 26(4):371-7.

49. **Matsuzaki, M., Hiramori, K., Imaizumi, T., Kitabatake, A. et al.:** Intravascular ultrasound evaluation of coronary plaque regression by low density lipoprotein-apheresis in familial hypercholesterolemia: the Low Density Lipoprotein-Apheresis Coronary Morphology and Reserve Trial (LACMART). J Am Coll Cardiol. 2002; 40(2):220-7.

50. **McEver, R.P., Moore, K.L., Cummings, R.D.:** Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. J Biol Chem. 1995; 270(19):11025-8.

51. **McKenney, J.M.:** Update on the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines: getting to goal. Pharmacotherapy. 2003; 23: 26S-33S.

52. **Michelson, A.D., Barnard, M.R., Krueger, L.A., Valeri, C.R. et al.:** Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. Circulation. 2001; 104(13):1533-7.

53. **Moriarty, P.M., Gibson, C.A., Shih, J., Matias, M.S.:** C-reactive protein and other markers of inflammation among patients undergoing HELP LDL apheresis. Atherosclerosis. 2001; 158: 495-8. Citace B.

54. **Myant, N.B.:** Familial defective apolipoprotein B-100: A review, including some comparisons with familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis.1993; 104:1-18.

55. **Myers, G.L., Rifai, N., Tracy, R.P., Roberts, W.L. et al.;** CDC; AHA. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: report from the laboratory science discussion group. Circulation. 2004;110: e545-9.

56. **Navab, M., Berliner, J.A., Watson, A.D., Hama, S.Y. et al.:** The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996; 16: 831-42.

57. **Nelken, N.A., Coughlin, S.R., Gordon, D., Wilcox, J.N.:** Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. J Clin Invest 1991; 88:1121-1127.

58. **Nishiyama, K., Ogawa, H., Yasue, H., Soejima, H. et al.:** Simultaneous elevation of the levels of circulating monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor in acute coronary syndromes. Jpn Circ J. 1998; 62(9):710-2.

59. **Osmančík, P., Kvasnička, J., Widimský, P., Tarnok, A.:** Diurnal variation of soluble E- and P-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 in patients with and without coronary artery disease. Cardiology 2004; 102(4):194-9.

60. **Otto, C. and Schwandt, P.:** C-reactive protein concentration is reduced by different types of LDL apheresis. Atherosclerosis 2001; 2 :81–82.

61. **Parhami, F., Fang, Z.T., Fogelman, A.M., Andalibi, A. et al.:** Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. J Clin Invest 1993; 92(1):471-8.

62. **Pasceri, V., Willerson, J.T., Yeh, E.T.:** Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. Circulation 2000; 102: 2165-8.

63. **Porreca, E., Di Febbo, C., Reale, M., Castellani, M.L. et al.:** Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) is a mitogen for cultured rat vascular smooth muscle cells. J Vasc Res 1997; 34(1):58-65.

64. **Pulawski, E., Mellwig, K.P., Brinkmann, T., Kleesiek, K.:** Influence of single low-density lipoprotein apheresis on the adhesion molecules soluble vascular cellular adhesion molecule-1, soluble intercellular adhesion molecule-1, and P-selectin. Ther Apher 2002; 6(3):229-33.

65. **Rader, J., Cohen, J., Hobbs, H.H.:** Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. J.Clin. Invest 2003; 111: 1795-1803.

66. **Ridker, P.M., Cushman, M., Stampfer, M.J., Tracy, R.P. et al.:** Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. Circulation 1998; 97: 425-8. Citace B.

67. **Richer, W.O., Donner, M.G., Schwandt, P.:** Three low density lipoprotein apheresis techniques in treatment of patients with hypercholesterolemia: a long-term evaluation. Ther Apher 1999; 3:203-8.

68. **Rosenson, R.S., Tangney, C.C., Levine, D.M., Parker, T.S. et al.:** Association between reduced low density lipoprotein oxidation and inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 production in statin-treated subjects. J Lab Clin Med 2005; 145(2):83-7.

69. **Ross, R.:** Atherosclerosis is an inflammatory disease. Am Heart J 1999; 138(5 Pt 2):S419-20.

70. **Rossler, A., Berrouschot, J., Barthel, H., Hesse, S. et al.:** Potential of rheopheresis for the treatment of acute ischemic stroke when initiated between 6 and 12 hours Ther Apher 2000; 4(5):358-62.

71. **Sampietro, T., Tuoni, M., Ferdeghini, M., Ciardi, A. et al.:** Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecule expression in familial hypercholesterolemia. Circulation 1997; 96(5):1381-5.

72. **Semb, A.G., van Wissen, S., Ueland, T., Smilde, T. et al.:** Raised serum levels of soluble CD40 ligand in patients with familial hypercholesterolemia: downregulatory effect of statin therapy. J Am Coll Cardiol 2003; 41: 275-9.

73. **Shiga, Y., Fujihara, K., Onodera, H.:** Complement activation as a cause of transient hypotension during plasmapheresis. Artificial organs 1998; 22:1067-1069.

74. **Schamberger, B.M., Geiss, H.C., Ritter, M.M., Schwandt, P. et al.:** Influence of LDL apheresis on LDL subtypes in patients with coronary heart disease and severe hyperlipoproteinemia. J Lipid Res 2000; 41(5):727-33.

75. **Schaumann, D., Welch-Wichary, M., Voss, A. Schmidt, H. et al.:** Prospective cross-over comparisons of three low-density lipoprotein (LDL)-apheresis methods in patients with familial hypercholesterolaemia. Eur J Clin Invest 1996; 26(11):1033-8.

76. **Schmaldienst, S., Banyai, S., Stulnig, T.M., Heinz, G. et al.:** Prospective randomised cross-over comparison of three LDL-apheresis systems in statin pretreated patients with familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis 2000; 151:493-9.

77. **Schonbeck, U., Mach, F., Libby, P.:** CD154 (CD40 ligand). Int J Biochem Cell Biol 2000; 32: 687-93.

78. **Schwenke, D.C., Carew, T.E.:** Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. Arteriosclerosis 1989; 9: 895-907.

79. **Somers, W.S., Tang, J., Shaw, G.D., Camphausen, R.T.:** Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. Cell 2000; 103(3):467-79.

80. **Springer, T.A.:** Adhesion receptors of the immune system. Nature 1990; 346(6283):425-34.

81. **Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. et al.:** Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med 1989; 320: 915-24.

82. **Thompson, G.R.:** LDL apheresis. Atherosclerosis 2003; 167(1):1-13.

83. **Torzewski, M., Rist, C., Mortensen, R.F., Zwaka, T.P. et al.:** C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20(9): 2094-9.

84. **Vasan, R.S., Sullivan, L.M., Roubenoff, R., Dinarello, C.A. et al.:** Framingham Heart Study. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. Circulation 2003; 107(11): 1486-91

85. **Vella, A., Pineda, A.A., O'Brien, T.:** Low density lipoprotein apheresis for the treatment of refractory hyperlipidemia. Mayo Clin Proc 2001; 76:1039-46.

86. **Wagner, D.D., Burger, P.C.:** Platelets in inflammation and thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23(12):2131-7.

87. **Wieland, H., Seidel, D.:** A simple method for precipitation of low density lipoproteins. J Lipid Res 1983; 24:904.

88. **Wieland, E., Schettler, V., Armstrong, V.W.:** Highly effective reduction of C-reactive protein in patients with coronary heart disease by extracorporeal low density lipoprotein apheresis. Atherosclerosis 2002; 162: 187-91.

89. **Yokoyama, S., Hayashi, R., Satani, M., Yamamoto, A.:** Selective removal of low density lipoprotein by plasmapheresis in familial hypercholesterolemia. Arteriosclerosis 1985; 5:613-22.

90. **Zee, R.Y., Hegener, H.H., Fernandez-Cruz, A., Lindpaintner, K.:** C-reactive protein gene polymorphisms and the incidence of post-angioplasty restenosis. Atherosclerosis 2004; 176: 393-6.

91. **Zhu, J., Nieto, F.J., Horne, B.D., Anderson, J.L. et al.:** Prospective study of pathogen burden and risk of myocardial infarction or death. Circulation 2001; 103: 45-51.

92. **Zwaka, T.P, Hombach, V., Torzewski, J.:** C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. Circulation. 2001; 103: 1194-7.