

LDL AFERESI: STATO DELL'ARTE

CLAUDIA STEFANUTTI, CLAUDIA MOROZZI, SERAFINA DI GIACOMO

U.O. Tecniche Terapeutiche Extracorporee, U.O.C. Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Roma "La Sapienza", Azienda Policlinico "Umberto I", Roma

SOMMARIO

Nella rassegna si riportano elementi inerenti la Lipidoaferesi e la LDL aferesi (LA, LDL-a). Sono descritte in breve le tecniche, nella loro evoluzione nelle ultime tre decadi, del resto già ampiamente elucidate in letteratura. Le indicazioni consolidate, il trattamento e le nuove possibili indicazioni emergenti, sono illustrate più ampiamente. In particolare, si riportano le evidenze di letteratura sull'uso della LA e della LDL-a nella Ipercolesterolemia Familiare (IF), nella Restenosi, nella Glomerulosclerosi Focale, nell'Arteriosclerosi Obliterante, nella *Sudden Hearing Loss*, nella Maculopatia Degenerativa Senile, nella Sepsi, nel post Trapianto Cardiaco e nello *Stroke*. Si descrivono in sintesi il progetto ed i risultati dello Studio Multicentrico Italiano per la LDL-a, che ha condotto nel 2009 alla II Consensus Conference Italiana sulla LDL-a. Uno spazio più ampio è dedicato agli effetti delle tecniche di LA ed LDL-a sugli *endpoints* cardiovascolari e sulla progressione e regressione dell'arteriosclerosi. La LDL-a pediatrica viene illustrata nelle sue più recenti evidenze. Infine, si conferisce una trattazione ampia e dettagliata sugli effetti *lipid-unrelated* della LDL-a, cioè quelli cd. pleotropici e pleotropici-equivalenti, con particolare riguardo per gli effetti sulla protezione vascolare e sui peptidi mediatori dell'infiammazione. Su questi ultimi sono riportate le evidenze più recenti della letteratura. Infine, vengono brevemente esposti i farmaci ipolipemizzanti di più recente introduzione, con un particolare interesse verso future, promettenti nuove molecole ancora in fase di sperimentazione.

Parole chiave: ipercolesterolemia familiare, lipidoaferesi, LDL aferesi, farmaci ipolipemizzanti, iperLp(a)lipoproteinemia, infiammazione, cardiopatia coronarica, aterosclerosi extracoronarica.

Premessa

Alcuni pazienti con grave IF eterozigote (Etz) e la maggior parte dei pazienti con IF omozigote (Oz) e doppio eterozigote (*compound*) (Detz) non rispondono in modo adeguato alla dieta e ai farmaci ipocolesterolemizzanti o sono intolleranti a questi ultimi

e rimangono ad alto rischio per lo sviluppo e la progressione dell'aterosclerosi (ATS) e delle sue complicanze d'organo. Per ridurre la colesterolemia si è tentato con successo davvero modesto, di utilizzare alcune procedure chirurgiche quali il *bypass* ileale, lo *shunt* porto-cavale e il trapianto epatico ad un costo di significativa morbidità, senza poi evitare la nuova somministrazione di farmaci ipocolesterolemizzanti rivolti a correggere la ipercolesterolemia residua e le problematiche inerenti il rigetto dell'innesto o la ATS progressiva del peduncolo vascolare dell'organo trapiantato (1-3). Inoltre, le suddette procedure altamente invasive rendono profondamente mediocre la qualità di vita dei pazienti.

Indirizzo per la corrispondenza

Prof.ssa Claudia Stefanutti
U.O. Tecniche Terapeutiche Extracorporee
U.O.C. Immunoematologia e Medicina Trasfusionale
Dipartimento di Medicina Molecolare
Università di Roma "La Sapienza"
Az. Policlinico Umberto I
Via Chieti, 7 - 00161 Roma
E-mail: claudia.stefanutti@uniroma1.it
plasmaferesi@tin.it

L'insieme di tutte queste problematiche ha favorito lo sviluppo della LA (1970) e successivamente (1980), della LDL-a, per il trattamento non farmacologico dei pazienti con grave IF. Sebbene le principali indicazioni al trattamento con la LDL-a siano la Oz IF, la Detz o la Etz IF refrattarie alla terapia farmacologica, sono stati pubblicati alcuni studi, ed altri sono ancora in corso, sul trattamento della IperLp(a) lipoproteinemia con la LDL-a, in pazienti con cardiopatia coronarica e/o vasculopatia ATS extracoronarica (4-8). In studi su base sperimentale, la LDL-a è stata utilizzata per prevenire le stenosi coronariche recidivanti dopo angioplastica coronarica transluminale percutanea (ACTP), nonché come supporto terapeutico per rallentare la progressione della glomerulosclerosi focale, condizione refrattaria alla terapia che, usualmente, progredisce verso l'insufficienza renale (9, 10). La LDL-a è stata anche usata nella grave malattia vascolare periferica associata o meno al diabete mellito, quando non è eseguibile un intervento chirurgico (3, 11-13). Più di recente, sono state riportate evidenze in letteratura relative all'uso della LDL-a nella Maculopatia Cronica Degenerativa e nella Perdita Improvvisa dell'Udito (4). Alcuni Autori hanno infine studiato recentemente le proprietà pleiotropiche della LDL-a, con particolare riguardo per alcuni parametri infiammatori (14-20). Questo ultimo orizzonte scientifico rappresenta la nuova frontiera della ricerca per quanto concerne la LDL-a.

Evoluzione dalla Lipidoafèresi alla LDL afèresi

È noto che De Gennes et al. eseguirono per primi la LA nel trattamento della IF nel 1967 (21). La tecnica utilizzata fu il Plasma Exchange (PEX) eseguito con separatore cellulare a flusso discontinuo scarsamente automatizzato, con espansione notevole

dell'aliquota extracorporea del plasma e conseguenti effetti collaterali con tempi di esecuzione estremamente protratti, quindi del tutto inadeguati ad un uso routinario, dato che sia la LA, che la LDL-a, prevedono la necessità di reiterazione delle procedure extracorporee (22). Nel 1975, Thompson et al. descrissero per primi l'evoluzione della PEX con un sistema di separazione cellulare automatizzato, per la prima volta a flusso continuo e con una applicazione sistematizzata e reiterativa delle procedure extracorporee di scambio plasmatico per il trattamento di pazienti con Oz IF (23). Era nato l'approccio clinico e terapeutico che oggi conosciamo e applichiamo nella sua evoluzione tecnologica, per quanto attiene i sistemi di separazione cellulare nel trattamento delle gravi dislipidemie, nota come LDL-a. Il trattamento aferetico dei pazienti Oz IF con la LA dimostrò molto presto la sua efficienza nella rimozione del colesterolo dal plasma e nel tempo, la sua capacità di ridurre la morbilità e di incrementare la sopravvivenza dei pazienti (24).

In tempi più recenti sono state sviluppate procedure più specifiche, le cosiddette tecniche semiselettive e selettive, con le quali è possibile rimuovere quasi esclusivamente le lipoproteine contenenti apolipoproteina B100 (Apo B100): lipoproteine a densità intermedia (*Intermediate Density Lipoproteins*: IDL), lipoproteine a bassa densità (*Low Density Lipoprotein*: LDL), Lipoproteina (a) [Lp(a)], senza la contemporanea rimozione massiva delle lipoproteine ad elevata densità (*High Density Lipoprotein*: HDL), dell'albumina, delle altre proteine plasmatiche, incluse le immunoglobuline ed altri costituenti plasmatici utili, altrimenti rimossi ed eliminati con la LA (PEX) o plasmafèresi terapeutica convenzionale. La rimozione specifica di Apo B100 era stata descritta inizialmente

da Lupien et al. nel 1976; il substrato di rimozione delle LDL era un bioreattore costituito da eparina-agarosio (25). Altre metodiche di LDL-a includono la precipitazione extracorporea delle LDL indotta da eparina (*Heparin induced Extracorporeal LDL Precipitation: H.E.L.P.*), le colonne contenenti anticorpi anti-LDL monoclonali immobilizzati e le colonne contenenti destransolfato su cellulosa (26-28). Una importante e recente evoluzione della LDL-a è rappresentata dal sistema D.A.I.I. (*Direct Adsorption of Lipids*). Tale metodica è molto innovativa rispetto alle precedenti in quanto permette una rimozione selettiva delle lipoproteine contenenti Apo B100 direttamente dal sangue intero. Di questo ultimo sistema emoperfusionale esiste anche una recente versione costituita da destransolfato (29). Infine, negli ultimi anni è stata anche introdotta una tecnica di LDL-a che permette la reiterazione delle proce-

sure nello stesso paziente mediante colonne riutilizzabili, il sistema Lipocollect®200 (30) (*Figura 1*). Le tecniche menzionate, incluse le più recenti, sono riportate nei dettagli, inclusi i meccanismi di azione, nel documento conclusivo della II *Consensus Conference* Italiana sulla LDL-a a cui si rimanda (8, si veda anche <http://ees.elsevier.com/nmcd/>, 22).

Indicazioni alla LDL aferesi e cenni sul trattamento

Per la sua natura relativamente invasiva, per essere una terapia a lungo termine e per l'importanza dei costi, le maggiori compagnie di assicurazione sanitarie ed altri sistemi di copertura dei costi sanitari, hanno formalizzato i criteri diretti a stabilire in quali casi la LDL-a è indicata. In Germania ad esempio, la LDL-a è richiesta per le persone Oz IF o per le persone con "ipercolesterolemia grave che non hanno

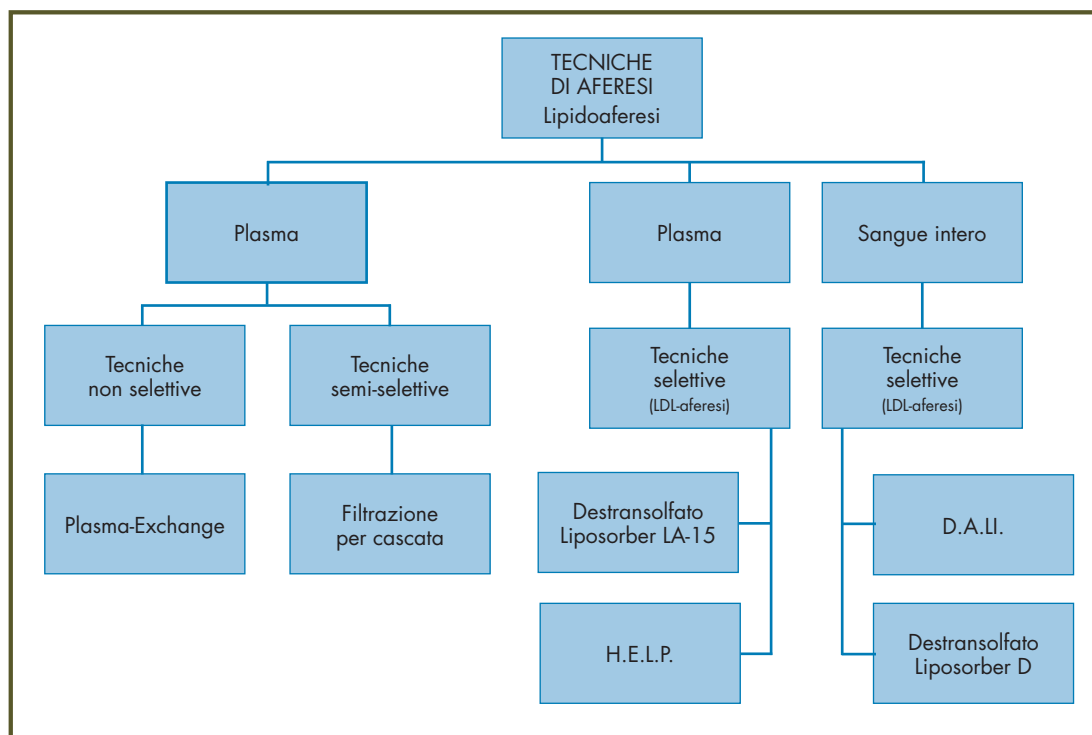


Figura 1 - Algoritmo delle tecniche di aferesi (Lipidoafèresi ed LDL-afèresi).

risposto a dieta e trattamento farmacologico massimali negli ultimi sei mesi". In quest'ultimo gruppo, si valuta anche la coesistenza di altri fattori nella stima del rischio: presenza di una storia familiare positiva per ATS precoce, malattia coronarica **angiograficamente** documentata, elevati livelli plasmatici di Lp(a), bassi livelli di colesterolo-HDL (CHDL), ipertensione arteriosa, diabete mellito ed iperfibrinogenemia. Sono stati presi in considerazione anche l'attitudine all'esercizio fisico e l'interruzione del tabagismo.

A tutt'oggi, non esiste ancora un consenso concernente la durata globale del trattamento della LDL-a. In Germania, le indicazioni devono essere revisionate da una commissione indipendente di esperti alla fine del primo anno di terapia e in seguito ogni due anni (31).

L'attuale legislazione sanitaria italiana, DM del 5/8/92 G.U.R.I. del 12/8/97, ha introdotto nel Prontuario Terapeutico del Servizio Sanitario Nazionale la LDL-a, quale trattamento per le gravi ipercolesterolemie familiari, senza partecipazione alla spesa. La LDL-a è stata confermata dal Consiglio Superiore di Sanità, Sessione LXII-Sezione II, riconosciuta e tariffata nei nomenclatori terapeutici di alcune regioni italiane. Altre regioni hanno identificato Centri specialistici di riferimento abilitati alla erogazione della LDL-a. Alcune Aziende Ospedaliere di rilievo nazionale (es. Policlinici Universitari) hanno consentito l'istituzione di Centri per la erogazione della LDL-a. Infine, si ricorda la normativa che disciplina le **malattie rare** che considera di fatto tali prestazioni "salvavita" equivalenti ed erogabili esclusivamente in un centro specialistico ospedaliero (Suppl. ord. G. U. n. 160 pag. 26 del 12 Luglio 2001 D.L. 29 Aprile 1998 n. 124).

La *Evidence-Based Medicine* (EBM) pone in classe A l'indicazione a trattare

con la LDL-a, il più precocemente possibile, i bambini affetti da Oz IF o con Detz IF, ad intervalli settimanali, in combinazione con la massima dose tollerata di farmaci ipocolesterolemizzanti, eventualmente associati ad ezetimibe. Nell'indicazione sono compresi, oltre agli Oz-Detz IF, i pazienti con le forme più gravi di Etz IF, quelli con eccesso di funzione della *Circulating Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9* (PCSK9) e quelli con Ipercolesterolemia Autosomica Recessiva (ARH).

Anche le recenti *guidelines* della *American Society for Apheresis* (ASFA 2010) hanno confermato al I livello di evidenza l'eleggibilità dei pazienti con Oz IF, mentre per gli Etz IF la ASFA suggerisce l'indicazione alla LDL-a al II livello di evidenza (4). In linea generale, si suggerisce di trattare almeno un volume di plasma, in modo da ridurre ad ogni sessione i livelli plasmatici del colesterolo-LDL (CLDL) di almeno il 60%. Il trattamento dovrebbe essere condotto in Centri di Aferesi con *team* medico-infermieristico particolarmente esperto nella gestione e trattamento dei piccoli pazienti. L'impiego della LDL-a è più controverso negli Etz IF e nelle altre forme di ipercolesterolemia grave, considerando l'efficacia dei farmaci a disposizione e risultati sugli *hard end-points* (mortalità totale e cardiovascolare, recidiva di infarto) ottenuti in numerosi *trials* randomizzati e controllati (32, 33).

Tuttavia, appare legittimo prevedere il trattamento con la LDL-a nei casi di ipercolesterolemia grave, nei quali la malattia coronarica continua a progredire nonostante il trattamento dietetico e farmacologico massimale, oppure quando non si riesce a raggiungere il *target* di CLDL <70 mg/dL, in presenza di eventi coronarici precoci e comunque di un profilo individuale di alto rischio cardiovascolare (CV). Altri candidati eleggibili al trattamento con la LDL-a sono

quei pazienti con Dislipidemia Familiare Combinata (*Familial Combined Hyperlipidemia*), che presentano segni clinici di coronaropatia precoce, in cui il trattamento dietetico o farmacologico massimale (con 1 o 2 farmaci) non è in grado di ridurre il LDL a valori inferiori a 100 mg/dL. Infine è raccomandato il trattamento con la LDL-a nei pazienti che presentano sintomi clinici di cardiopatia coronarica precoce e/o ATS extracoronarica e livelli di Lp(a) superiori a 60 mg/dL [IperLp(a) lipoproteinemia], in particolare se coesistono livelli plasmatici del LDL superiori a 130 mg/dL, nonostante la terapia dietetica e farmacologica massimale (6).

Per concludere, nei pazienti con forme omozigoti e/o con doppia eterozigosi, l'intervallo *standard* di trattamento è di una procedura ogni 5-10 giorni circa, negli eterozigoti ogni 15-20 giorni.

Da tenere in considerazione la variabilità del *rebound* del LDL, e delle altre lipoproteine contenenti ApoB-100, non dimenticando le differenze individuali relative alla patologia di base.

I volumi e la frequenza dell'aferesi dovranno essere stabiliti, per ciascun paziente, attraverso una iniziale attenta valutazione individuale ed un accurato *follow-up*. Infatti, le lipoproteine - LDL, Lp(a) - tendono a diminuire nei primi 6-8 mesi di trattamento, per poi raggiungere un *plateau* pressoché stabile.

Altre potenziali indicazioni alla LDL aferesi

La IF è indubbiamente la maggiore indicazione per la LDL-a, tuttavia alcuni Autori hanno tentato di usare l'aferesi per prevenire la restenosi dopo ACPT, nel trattamento della glomerulosclerosi focale e nel trattamento della ATS obliterante degli arti inferiori (34).

Restenosi

Studi angiografici, rivolti alla valutazione delle modificazioni delle lesioni ATS coronariche in pazienti ipercolesterolemici, hanno mostrato progressione, stabilizzazione o regressione delle lesioni associate in modo inverso ai livelli plasmatici delle lipoproteine aterogene. Trattamenti non farmacologici hanno incrementato la regressione delle lesioni ATS del 15-40% e ridotto la eventualità di progressione delle stesse del 25-35%, in confronto ai controlli. Il ruolo di elevati livelli plasmatici del colesterolo nell'aterogenesi è stato messo in evidenza anche dal confronto tra studi farmacologici ed uno studio inerente l'effetto ipocolesterolemizzante ottenuto mediante tecnica chirurgica di *by-pass* intestinale (1). Anche da questo confronto è emerso in modo evidente e significativo il ruolo che riveste la drammatica riduzione del LDL in relazione alla possibilità di favorire la regressione (34%) e di ridurre la progressione delle lesioni (35%), rispetto ai controlli. Il *LDL-Apheresis Angioplasty Restenosis Trial* era rivolto a 66 pazienti sottoposti a regolare LDL-a in alcuni centri in Giappone (35). Due giorni prima e cinque giorni dopo ACPT, tutti i pazienti sono stati sottoposti ad LDL-a mediante destransolfato su cellulosa. 39 pazienti hanno ricevuto inoltre 10 mg di pravastatina e 1500 mg di niacina al dì. La media del livello delle Lp(a) si è ridotta da 23,3 mg/dL prima dell'aferesi a 10,9 mg/dL, dopo. L'angiografia coronarica prevista a 2 e a 9 mesi dopo l'angioplastica, ha messo in evidenza le restenosi in almeno un segmento, nel 38% dei 137 pazienti-controllo e nel 32% dei pazienti in aferesi. Il gruppo trattato e il gruppo di controllo sono stati stratificati secondo i livelli di Lp(a) considerando il valore di *cut-off* pari a 30 mg/dL e secondo l'entità della diminuzione della Lp(a) durante l'aferesi di più o meno il 50%. È stata così osservata

una differenza statisticamente significativa tra i pazienti trattati con l'aferesi e il gruppo di controllo. In 12 pazienti con livelli di Lp(a) superiore ai 30 mg/dL e con diminuzione del colesterolo maggiore del 50% in aferesi, la recidiva della stenosi è stata riscontrata soltanto nell'8% dei pazienti, mentre nel gruppo di controllo (43 pazienti) la frequenza della restenosi era del 49%. In questo ultimo gruppo i livelli di Lp(a) superavano i 30 mg/dL ($P < 0,01$).

Glomerulosclerosi focale

Alcuni casi studiati in Giappone e negli U.S.A., così come alcuni piccoli studi non controllati hanno suggerito la possibilità di un miglioramento della sclerosi glomerulare focale (è rinvenuta nel 20-25% dei casi di sindrome nefrosica) dopo trattamento intensivo con LDL-a (1-3 trattamenti per settimana, per un periodo da uno a tre mesi). (10, 36-38). In uno studio multicentrico giapponese, 16 pazienti con sindrome nefrosica intrattabile (13 con glomerulosclerosi focali, 3 con glomerulonefrite membranosa) sono stati sottoposti a trattamento con LDL-a usando l'adsorbimento mediante destransolfato su cellulosa (39). Tutti i pazienti avevano fallito la risposta ad un trattamento convenzionale con i corticosteroidi. Il valore del colesterolo totale di base e il livello dei trigliceridi erano 428 mg/dL (13,2 mmol/L) e 337 mg/dL (3,8 mmol/L), rispettivamente. I pazienti sono stati sottoposti a LDL-a ogni settimana per 3 settimane. Dopo un mese i livelli del colesterolo totale mostrarono una riduzione intorno al 40% e nel tempo un decremento di circa il 30%.

I trigliceridi continuarono a diminuire, dimostrando un iniziale decremento del 15% mentre un ulteriore decremento del 30% circa, è stato osservato nei 3 mesi successivi l'inizio del trattamento. I livelli del CHDL sono restati sostanzialmente invariati. In 8 pazienti si osservava un mi-

glioramento dei valori delle proteine totali del plasma; dopo 3 mesi di trattamento si osservava un incremento stabile del 10%. L'escrezione giornaliera di proteine urinarie risultò essere migliorata in 9 pazienti, diminuendo di circa il 50%, da 11,4 g/dL a 5,4 g/dL. La LDL-a è risultata efficace in 9 pazienti con glomerulosclerosi focale, ma non nei pazienti con glomerulonefrite membranosa. È stato anche suggerito che l'ipercolesterolemia sia un importante fattore di rischio nell'alterazione della funzione adrenergica nei pazienti con diabete mellito (40-42). Si segnalano in merito evidenze relative a pazienti con sindrome nefrosica da nefropatia diabetica, in cui la LDL-a ha promosso una diminuzione della proteinuria e un miglioramento della funzione renale (43).

Arteriosclerosi obliterante

La LDL-a è stata anche usata nel trattamento della arteriosclerosi obliterante, una grave forma di malattia vascolare periferica caratterizzata da multiple e gravi lesioni nei territori a valle delle arterie poplitee (44). Molti pazienti con arteriosclerosi obliterante mostrano sintomi di *claudicatio intermittens* e dolore a riposo. Questi pazienti sono inclini a sviluppare ulcere venose e gangrene. La natura diffusa della condizione rende impraticabile la strada chirurgica.

La terapia con la LDL-a è stata associata ad un miglioramento dei sintomi in ogni paziente (11, 45). Oltre alle diverse lesioni occlusive a carico dell'albero arterioso degli arti inferiori, i pazienti con ischemia critica presentano anche alterazioni del microcircolo caratterizzate da disfunzione endoteliale, alterazioni emoreologiche con attivazione leucocitaria e infiammatoria. La dislipidemia (specialmente quando caratterizzata da aumentati livelli del CLDL) e l'aumento dei livelli del fibrinogeno (F)

giocano un ruolo patogenetico nella arteriopatia periferica (*Peripheral Artery Disease: PAD*). Sulla base di questi presupposti, alcuni studi clinici hanno valutato il ruolo della LDL-a in pazienti con PAD nell'ipotesi che il miglioramento della funzione emereologica potesse portare anche ad un miglioramento dei sintomi clinici.

Nel 1994 Lechner P. ha pubblicato uno studio su 16 pazienti con grave vasculopatia periferica complicata da ulcere e gangrena in cui il trattamento con la LDL-a (ciclo di 15 sedute a cadenza bisettimanale) aveva ottenuto la guarigione delle ulcere (in 5 casi per guarigione primaria, in 6 casi dopo l'innesto dermo-epidermico, in 2 casi dopo trasposizione di lembo). In nessun caso era stato necessario procedere con amputazioni (46). Recentemente un gruppo di Dresda ha pubblicato uno studio su 17 pazienti con piede diabetico, nei quali è stato possibile delimitare i processi necrotici, limitando le amputazioni maggiori in soli 3 pazienti (47).

Vi sono inoltre "case report" sull'applicazione della LDL-a in pazienti con piede diabetico anche questi con risultati apprezzabili (48). Inoltre, in pazienti diabetici dializzati con arteriopatia obliterante il trattamento con la LDL-a ha indotto un miglioramento dei parametri di funzione endoteliale e di attivazione piastrinica (49, 50). L'opportunità di migliorare alcuni parametri clinici in questi pazienti, come l'intervallo di marcia libera e soprattutto di ottenere una completa guarigione delle ulcere ischemiche, suggerisce di meglio valutare, attraverso opportuni studi, la possibilità di utilizzare la LDL-a in pazienti con piede diabetico ischemico. Non sono al momento disponibili trials clinici randomizzati che abbiano studiato l'effetto della LDL-a in associazione o in alternativa alla terapia convenzionale: rivascolarizzazione, infusione di prostacicline, ossigenoterapia iperbarica.

Perdita improvvisa dell'udito (Sudden Hearing Loss)

Questa patologia è stata associata ad alterazioni vascolari, iperfibrinogenemia e ipercolesterolemia. La LDL-a ha mostrato di migliorare la funzione uditiva attraverso la drastica riduzione sia dell'ipercolesterolemia che dell'iperfibrinogenemia (4, 51-53).

Sono necessari ulteriori studi di tipo multicentrico.

Maculopatia degenerativa senile (Age-related Macular Degeneration: ADM)

Questa patologia è caratterizzata dalla proliferazione di vasi nella corioide. I fattori di rischio includono il fumo, l'ipertensione arteriosa e l'elevato Indice di Massa Corporea (IMC). Inoltre, è stata riportata una diretta correlazione con i livelli di colesterolo, del F e della $\alpha 2$ -macroglobulina. Il razionale dell'uso della plasmaferesi terapeutica si fonda sull'evidenza che le componenti plasmatiche ad elevato peso molecolare sono associate al rischio di sviluppare la ADM (4, 53). Anche per questa indicazione sono necessari ulteriori studi di tipo multicentrico.

Sepsi

La LDL-a, in particolare la H.E.L.P., ha dimostrato di essere efficace nel rimuovere le endotossine e le citochine proinfiammatorie nel plasma. Non sono disponibili studi randomizzati e controllati (4, 54-57). Si tratta, dunque, di una indicazione molto preliminare che deve essere ulteriormente suffragata.

Malattia delle arterie coronarie (Coronary Artery Disease: CAD) e post-trapianto cardiaco

Una dislipidemia può manifestarsi anche in pazienti sottoposti a trapianto cardiaco e può causare lo sviluppo di lesioni ATS nelle arterie del cuore trapiantato. In

questo tipo di pazienti l'associazione terapeutica della LDL-a, della dietoterapia e delle statine, ha permesso un significativo aumento dei diametri delle coronarie, valutati mediante tecniche di *imaging* dell'organo trapiantato, che sono risultate essere maggiormente pervie al flusso. Infine, questo trattamento nel trapianto cardiaco sembra offrire una valida alternativa ai pazienti sottoposti a trattamento combinato con statine e immunosoppressori, in relazione al rischio iatrogeno di effetti avversi dovuti alla terapia plurifarmacologica. La LDL-a sembra anche essere uno strumento preventivo rispetto alla malattia ATS post-intervento di rivascolarizzazione (ACPT, *bypass* aorto-coronarico) (4, 9, 58).

Funzioni cognitive e intellettuali

Il miglioramento delle funzioni cerebrali dei pazienti affetti da cerebrovasculopatia sottoposti ad un intensivo trattamento con LDL-a suggeriscono che questa terapia potrebbe essere in grado di migliorare le funzioni cognitive ed intellettuali in questi pazienti. Usando la H.E.L.P. LDL-a nei pazienti con *stroke* o in quelli in cui una ischemia cerebrale induce demenza si è dimostrato un miglioramento negli *score tests* somministrati prima e dopo un ciclo di trattamento aferetico (4, 60). Le evidenze disponibili tuttavia, sono ancora preliminari.

Lo studio multicentrico italiano LDL aferesi

Particolare interesse ha destato la presentazione dei dati della fase trasversale (2007) dello Studio Multicentrico Italiano LDL-a (SMILDLa) e della più recente *survey* inerente l'attività condotta nei centri nel 2009. Lo studio ha ottenuto una forte risposta partecipativa da parte dei Centri aderenti al *network*. I dati ottenuti sono risultati essere rappresentativi di un'area tecnico-scientifica interdisciplinare che

attendeva da tempo un progetto coordinativo sul tema della aferesi terapeutica nel trattamento delle gravi malattie metaboliche. La costituzione del gruppo è stata la premessa essenziale per la progettazione di una nuova **Consensus Conference Italiana (II)** sul tema della LDL-a. Lo SMILDLa è un *network* fondato nel 2006 sulla base di un progetto sperimentale finalizzato alla conoscenza della realtà Italiana della LDL-a. I 23 Centri oggi afferenti allo SMILDLa, di diversa estrazione disciplinare, condividono un *database* ed obiettivi comuni di tipo clinico, tecnico e scientifico. Gli obiettivi primari sono: lo *sharing* ed analisi retrospettiva multicentrica dei dati conferiti dai centri e la progettazione di studi multicentrici longitudinali. Inoltre, sono stati standardizzati i criteri diagnostici per le gravi dislipidemie geneticamente determinate, l'*assessment* diagnostico strumentale e le procedure di *follow-up* della cardiopatia coronarica e della ATS extracoronarica, nonché, i criteri per una corretta applicazione tecnica e terapeutica della LDL-a e della LA (PEX, filtrazione per cascata). Il controllo di qualità sulle indicazioni e la corretta applicazione delle tecniche (diagnosi - terapia), il *follow-up* inerente gli *endpoints* primari quali gli eventi cardiovascolari e gli interventi di rivascolarizzazione, le indicazioni cliniche innovative, il monitoraggio degli eventi avversi e la sperimentazione di metodiche innovative, sono obiettivi primari del gruppo di lavoro.

Come già avvenuto in altri Paesi Europei ed extraeuropei, tale attività, potrà essere integrata con i Registri Nazionali già esistenti della *Società Italiana di Emaferesi* e della *Società Italiana di Nefrologia*, mentre la *Società Italiana per lo Studio dell'Arteriosclerosi* è chiamata al supporto scientifico per le indicazioni metaboliche della LA e della LDL-a. Obiettivi col-

lateralis dello SMILDLa sono: il supporto tecnico-scientifico e clinico ai nuovi centri emergenti e l'offerta formativa e l'*updating* continui nel settore. In conclusione, lo studio rappresenta, lo strumento di riferimento e di supporto delle iniziative rivolte alla definizione ed estensione delle nuove linee guida e raccomandazioni in materia di aferesi terapeutica delle gravi malattie metaboliche. Lo SMILDLa infine rappresenta lo strumento propulsivo di nuove iniziative sperimentali a base multicentrica (7).

Effetti della LDL aferesi nella prevenzione della cardiopatia coronarica e della vasculopatia aterosclerotica extra coronarica nei pazienti con ipercolesterolemia familiare

Sono state riportate diverse esperienze relative all'uso a lungo termine della LDL-a includendo lo studio del *Rogosin Institute of New York*, lo *Osaka LDL-Apheresis Multicenter Trial Group*, la *LDL-Apheresis Regression Study (LARS)* condotto a Tokio e le esperienze di altri Autori a *Nijmegen* in Olanda, a *Monaco* e *Tubingen* in Germania (61-65). Tutti i centri hanno constatato la sicurezza e l'efficacia della procedura, essendo essa in grado di diminuire significativamente i livelli del CLDL del 60-70 % del valore iniziale, in relazione al volume di plasma trattato. La tecnica rimuove efficacemente anche la Lp(a). Questa lipoproteina, come è noto, risulta essere un fattore predittivo CV indipendente (65, 66). Inoltre, la LDL-a aumenta il livello del CHDL nei pazienti sottoposti a trattamento a lungo termine. Suscitano molto interesse gli effetti della LDL-a a lungo termine sulla ATS coronarica e sul flusso ematico coronarico. Nello studio LARS, le modificazioni delle stenosi nelle arterie coronariche sono state valutate angiograficamente in 7 pazienti Oz IF e in 25 pazienti Etz IF, oltre che in 5 pazienti con severa ipercole-

sterolemia di altra natura. Si è osservata la regressione in 14 casi (38%, 4 Oz IF, 10 Etz IF), mentre non è stata riportata alcuna variazione in 18 casi (49%, 3 Oz IF, 15 Etz IF). La progressione è stata riscontrata in 5 casi (14%, tutti Etz IF) (63). L'intervallo tra le angiografie coronariche era di 49 mesi per gli Oz IF e di 32 mesi per gli Etz IF, in media.

Il *Japan LDL-apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study (L-CAPS)* è uno studio prospettico, controllato, effettuato su 36 pazienti con Etz IF. 25 pazienti venivano trattati con LDL-a in associazione ai farmaci (gruppo aferesi) e 11 pazienti erano sottoposti a trattamento soltanto con i farmaci (gruppo controllo). Tutti i pazienti erano sottoposti a ripetute angiografie nel tempo. Dopo 2.3 anni nel gruppo "aferesi" 2 pazienti hanno avuto la progressione della lesione ATS, 19 non hanno mostrato cambiamenti e in 4 è stata messa in evidenza la regressione della ATS coronarica. Nel gruppo di controllo, al contrario, 7 pazienti hanno mostrato evidenza di progressione, mentre in 4 non sono state osservate variazioni. Questi risultati hanno stimolato l'avvio di studi di intervento terapeutico ipolipemizzante particolarmente intensivo, al fine di ottenere la regressione della ATS coronarica nei pazienti IF ad alto rischio CV individuale (67). Lo studio in cui è stato riportato il maggior numero di dati è il *LDL Apheresis Atherosclerosis Regression Study (LAARS)*, che include 42 pazienti con grave ipercolesterolemia (CLDL ≥ 5.8 mmol/L = 206 mg/dL) e con stenosi \geq del 50% delle due maggiori arterie coronariche. I pazienti erano stati assegnati a due gruppi in modo *random* (dieta e simvastatina con o senza LDL-a bisettimanale). Dopo due anni di trattamento, il tempo medio di transito del mezzo di contrasto (una misura di perfusione coronarica) è diminuito nel gruppo aferesi da $3,35 \pm 1,18$

a $2,78 \pm 0,82$ secondi, mentre non sono stati osservati cambiamenti nel gruppo di controllo. Inoltre, lo studio ha indicato che la LDL-a effettuata regolarmente mostra effetti favorevoli sulla perfusione miocardica regionale contrastando l'ischemia miocardica (64). Questa migliore perfusione è stata attribuita ad un miglioramento della motilità vasale endotelio-mediata (68-70).

Il LAARS è uno studio randomizzato e controllato che è stato condotto in Europa. In questo studio, nel *test* con il cicloergometro, il tempo a 0.1 mV del segmento ST è risultato essere aumentato significativamente nel gruppo sottoposto ad aferesi (LDL-a e simvastatina per 1 e 2 anni) *versus* nessun cambiamento nel gruppo di controllo (soltanto simvastatina). In questo studio controllato, è stato dimostrato per la prima volta che il trattamento settimanale con la LDL-a e una statina, migliora la perfusione miocardica in pazienti con ipercolesterolemia e ATS coronarica. Quindi, i risultati di LAARS suggeriscono che la LDL-a migliora la perfusione miocardica e di conseguenza l'ischemia miocardica (64).

Un meccanismo addizionale riportato con l'uso della tecnica H.E.L.P., è un miglioramento nel flusso sanguigno dovuto alla riduzione della viscosità del sangue. La riduzione della viscosità del sangue è un effetto largamente attribuito alla riduzione del F nel plasma indotta da questa tecnica (71). Mabuchi et al. hanno dimostrato la sicurezza e l'efficacia di una riduzione intensiva del colesterolo in pazienti con Etz IF con la LDL-a per un periodo di sei anni (72). 130 pazienti con CAD confermata angiograficamente, sono stati trattati soltanto con farmacoterapia (87 pazienti) o farmacoterapia più aferesi (43 pazienti). Nei pazienti trattati con l'aferesi in associazione ai farmaci, il CLDL si è ridotto del 58% (da $7,42 \pm 1,73$ mmol/L a $3,13 \pm 0,80$

mmol/L), mentre nel gruppo che riceveva soltanto i farmaci, il CLDL si è ridotto soltanto del 28% (da $6,03 \pm 1,32$ mmol/L a $4,32 \pm 1,53$ mmol/L). Applicando l'analisi di *Kaplan-Meier*, gli eventi coronarici e gli interventi di rivascolarizzazione (infarto miocardico non fatale, ACPT, *bypass* aorto-coronarico, morte per CAD) erano del 72% meno comuni nel gruppo di pazienti in terapia con aferesi e farmaci (10%) rispetto al gruppo in terapia con i soli farmaci (36%, $P=0,0088$). La riduzione del *pool* lipidico di ogni placca può contribuire alla sua stabilizzazione.

La stabilizzazione della ATS è stata anche riportata da Koga e Iwata che hanno studiato un paziente con IF sottoponendolo a trattamento con la LDL-a a lungo termine (73). Nell'esame istopatologico di sezioni seriali di arterie coronariche di questo paziente dopo l'*obitus*, erano presenti lesioni fibro-sclerotiche in corrispondenza di placche ateromasiche, dove la componente lipidica dell'ateroma era stata rimpiazzata dal collagene.

Più recentemente, Gordon et al. del *Rogoin Institute a New York* hanno analizzato i risultati del *follow-up* a cinque anni in 40 pazienti con Oz IF ed Etz IF. Sono stati riscontrati eventi avversi solo nel 3,6% delle procedure. Durante il trattamento con la LDL-a e farmaci ipolipemizzanti, si sono avuti 3,5 eventi cardiovascolari per 1.000 pazienti/mese. Al contrario, si sono avuti 6,3 eventi per 1.000 pazienti/mese nei 5 anni precedenti la terapia con la LDL-a (61).

L'ipercolesterolemia ha dimostrato di essere associata alla disfunzione endoteliale e la somministrazione di farmaci ipolipemizzanti per più di sei mesi è in grado di migliorare tale funzione (74). Inoltre, la funzione endoteliale nell'albero vascolare dell'avambraccio, migliora in seguito alla somministrazione della simvastatina per

un mese (75). Quanto velocemente può la funzione vascolare endoteliale essere migliorata dalla terapia ipolipemizzante? Igarishi et al. hanno riportato che la microcircolazione migliora in pazienti con ipercolesterolemia dopo una singola sessione di LDL-a, in base al grado di vasodilatazione acetilcolina-indotta, osservata immediatamente prima e dopo la procedura (76). Il grado di riduzione del CLDL correla con il grado di vasodilatazione riscontrato in risposta all'acetilcolina. Inoltre, Tamai et al. riportarono che la LDL-a era capace di aumentare la produzione locale di ossido nitrico durante l'infusione di acetilcolina e che questo effetto era correlabile con il grado di vasodilatazione prodotta (77). Questi risultati suggeriscono che ogni singola sessione di LDL-a potrebbe migliorare la funzione endoteliale in breve tempo. Questi interessanti esperimenti anticipano di molti anni l'attuale tendenza sperimentale rivolta allo studio degli effetti della LDL-a sui fattori che promuovono l'infiammazione. Infine, la LDL-a induce l'aumento della resistenza delle LDL all'ossidazione, la riduzione delle LDL piccole e dense, la *downregulation* dell'espressione delle molecole di adesione leucocitaria, la normalizzazione della funzione delle piastrine attivate ed il miglioramento della funzione reologica del sangue (78-81).

La LDL aferesi in età pediatrica

La LDL-a pediatrica è rivolta al trattamento extracorporeo di bambini affetti da patologie metaboliche geneticamente determinate, caratterizzate da precoce comparsa di lesioni ATS coronariche ed aortiche e quindi ad elevato rischio CV. La storia naturale di questi giovanissimi pazienti, in assenza di trattamento, evolve verso l'*exitus* in I o II decade di vita (82). Per quanto è noto, un approccio terapeutico precoce è auspicabile. In letteratura esi-

stono ormai poche differenze di opinione sull'età di inizio del trattamento (83). Sono riportati casi clinici di pazienti pediatrici sottoposti ad LDL-a dall'età di 3, 3,5 e 4,5 anni (84, 85). Recenti raccomandazioni suggeriscono l'inizio del trattamento tra i 6 e i 7 anni (6, 8). È verosimile che l'età di inizio della LDLa sia subordinata alla diagnosi e soprattutto ad una valutazione clinica approfondita, che deve tenere in considerazione la precocità degli eventi CV nei familiari di I grado, la presenza e diffusione della xantomatosi cutanea ed i risultati di una **completa ed accurata diagnostica cardiovascolare**. La relazione evidenziata in letteratura tra il ritardo nell'inizio del trattamento con plasmaferesi terapeutica (8-9 anni) e la insorgenza e la progressione della **valvulopatia aortica** (VA), va rivista alla luce della recenti evidenze (86-88). La probabile multifattorialità della patogenesi della VA, ancora non del tutto chiarita, evidenzia che il solo trattamento aferetico non evita in tutti i casi l'insorgenza del quadro clinico caratterizzato da lesioni di tipo degenerativo e malformativo dei lembi valvolari aortici, né l'evoluzione più frequente verso la stenoinufficienza della valvola aortica. Tuttavia, si suggerisce da parte di comprovati esperti che la precocità ed intensità del trattamento possano giocare un ruolo cruciale (6, 89).

Tutte le tecniche utilizzate nel trattamento degli adulti, con opportune modifiche, potrebbero essere teoricamente utilizzate anche nei pazienti pediatrici. La necessità di sottoporre ad LDL-a pazienti pediatrici, suggerisce tuttavia l'uso di strumenti che presentino particolare flessibilità ed adattabilità alle diverse condizioni fisiologiche proprie del bambino rispetto all'adulto: ridotta superficie corporea, diversi valori della pressione arteriosa, inferiore portata degli accessi vascolari, di-

versa e più ridotta percentuale del volume plasmatico trasferibile in extracircolo, per garantire la tollerabilità della procedura extracorporea (89). Il trattamento con la LDL-a impone anche in questi giovani pazienti il raggiungimento del *target* terapeutico previsto dal Adult Treatment Panel III (ATP III) per i soggetti ad elevato rischio CV, ovvero una colesterolemia-LDL <70 mg/dL. Quest'ultimo, sembra rappresentare il valore soglia necessario al fine di prevenire l'insorgenza di lesioni ATS nelle arterie native, ovvero di interromperne la progressione e favorirne la regressione (90). Hudgins et al. nel loro recente lavoro condotto su pazienti pediatriche, ammettono che il non raggiungimento del *target* di colesterolemia-LDL, spiega, almeno in parte, la elevata incidenza di progressione delle lesioni ATS da loro riscontrata (91). Al contrario, in uno studio condotto da Stefanutti et al., su un campione di 11 pazienti pediatriche affetti da Oz-Detz IF e ARH, la LDL-a ha permesso di ottenere una interruzione della progressione ed in alcuni casi la regressione e comunque la non insorgenza di nuove lesioni ATS nelle arterie native (92, 93).

Effetti pleiotropici della LDL aferesi

Emocoagulazione e fibrinogeno

Tutte le procedure aferetiche causano una variabile riduzione dei fattori della coagulazione del plasma. Il F plasmatico, i fattori VII e VIII della coagulazione, la proteina S, il tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT) ed il tempo di protrombina (PT) subiscono delle variazioni statisticamente significative o meno in relazione alla tecnica aferetica. Il F plasmatico dopo un trattamento di LDL-a mostra riduzioni variabili in relazione al tipo di tecnica di LDL-a usata (dal 11% al 53% rispettivamente, con le tecniche D.A.L.I. ed H.E.L.P.) (6,

22, 44, 94, 95). Il fattore VII mostra variazioni tra il 4% (D.A.L.I.) e il 36% (H.E.L.P.) mentre il fattore VIII tra il 60% (D.A.L.I.) e il 99% (H.E.L.P.). La proteina S ha mostrato una variazione tra l'11% (D.A.L.I.) e il 30% (H.E.L.P.). Il aPTT ha subito variazioni (+62.7%) che riflettono anche la quantità di eparina usata per la procedura e dell'incremento del PT (+62%) (14, 22, 95, 96, 97). Questi parametri ritornano alla normalità il giorno seguente il trattamento. Solo con un trattamento continuativo con H.E.L.P. LDL-a può verificarsi una riduzione costante del 30% del F (27, 28, 30-33).

Effetti della LDL aferesi sul profilo plasmatico delle citochine

Nell'ultima decade sono stati individuati una varietà di *markers* plasmatici infiammatori in grado di predire un futuro rischio CV. Essi possono essere utilizzati nella stratificazione del rischio al fine di identificare pazienti che possano trarre vantaggio da una terapia di intervento mirato. Evidenze di rilievo indicano come, induttori positivi e negativi della risposta infiammatoria, possano agire consistentemente sulla neovascolarizzazione (neangiogenesi) tipica del processo della ATS, particolarmente in condizioni cliniche post-ischemiche. D'altra parte è stato anche documentato che la maggior parte dei mediatori antiinfiammatori ed antiaterogenici sono in grado di inibire il processo di neovascolarizzazione. Citochine proinfiammatorie come il *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) e l'*Interferon- γ* (IFN- γ), hanno mostrato la capacità di alterare la distribuzione dei recettori di adesione coinvolti nel processo di adesione cellula-cellula (complessi endotelio vascolare caderina-catenina) e prevenire la formazione delle fibrille di F-actina (98). Questo si traduce in una ristrutturazione delle giunzioni intercellulari che determina una perdita

della permeabilità endoteliale. Conseguentemente, viene stimolata la tras migrazione dei leucociti.. Un considerevole corpo di evidenze indica che le cellule coinvolte nel processo aterosclerotico, sono attivate da fattori solubili: le citochine (99). Inoltre, la risposta immuno-infiammatoria (nella genesi) della ATS, è modulata da vie di regolazione in cui l'equilibrio tra citochine anti-infiammatorie e citochine pro-in-

fiammatorie gioca un ruolo cruciale come uno dei maggiori fattori determinanti la stabilità di placca (100). Una volta attivate le cellule presenti all'interno della placca 'infiammata', secernono proteasi capaci di degradare le proteine della matrice extracellulare e di indebolire il 'cap' fibroso predisponendolo alla rottura e allo sviluppo di trombi. Rovers et al., hanno studiato la produzione di citochine lipopolisacca-

Tabella la - Trials esistenti in letteratura in cui sono riportati gli effetti della LDL-a sul profilo plasmatico delle citochine e di altri mediatori dell'infiammazione.

Autori	Anno	Citochine/altri mediatori dell'infiammazione	Tipo di aferesi	Effetti
Books et al.	1995	CRP LPS TNF- α	H.E.L.P. (in vitro)	↓CRP ↓LPS ↓TNF- α
Suzuki et al.	1996	IL-1 β TNF- α	D.F.P.P. termofiltrazione	=IL-1 β =TNF- α
Sanpietro et al.	1997	sICAM-1 sELAM TNF- α IL-6 Proteine di fase acuta	Liposorber [®]	↓sICAM-1 ↓sELAM =TNF- α =IL-6 = Proteine di fase acuta
Samtleben et al.	1997	LPS TNF- α IL-6 CRP	H.E.L.P.	↓LPS ↓TNF- α ↓IL-6 ↓CRP
Samtleben et al.	1998	Endotossina Fibrinogeno TNF- α CRP	H.E.L.P.	↓Endotossina ↓Fibrinogeno ↓TNF- α ↓CRP
Rovers et al.	1998	IL-1 TNF- α CD11a, CD11b, CD11c e CD14 espressi da cellule mononucleate	Liposorber [®]	↓IL-1 ↓TNF- α ↓CD11a, CD11b, CD11c e CD14 espressi da cellule mononucleate
Kojima et al.	2001	HGF	Liposorber [®]	↑HGF
Kojima et al.	2003	IL-6 CRP	Liposorber [®]	↑IL-6 ↓CRP
Nakamura et al.	2003	IL-6 CRP	Liposorber [®]	↓IL-6 ↓CRP

ride-indotte e l'espressione di molecole di adesione da parte di cellule mononucleate di tre pazienti IF omozigoti. Questi autori hanno confrontato i pazienti IF con i familiari di primo grado e con controlli

sani. Nei pazienti con IF è stata osservata la tendenza ad un aumento della produzione di citochine. Tuttavia, l'espressione delle molecole di adesione, in confronto ai controlli, non è apparsa modificata (101).

Tabella Ib - Trials esistenti in letteratura in cui sono riportati gli effetti della LDL-a sul profilo plasmatico delle citochine e di altri mediatori dell'infiammazione.

Autori	Anno	Citochine/altri mediatori dell'infiammazione	Tipo di aferesi	Effetti
Wang et al.	2004	hsCRP sVCAM sE-sel LPB ET-1 MCP-1 Fibrinogeno TF scD40s	H.E.L.P.	↓hsCRP ↓sVCAM ↓sE-sel ↓LPB ↓ET-1 ↓MCP-1 ↓Fibrinogeno ↓TF ↓scD40s
Blaha et al.	2004	P-sel E-sel MCP-1	Colonne per immunoadsorbimento	↑P-sel ↓E-sel ↓MCP-1
Bengsch et al.	2005	CRP IL-6	H.E.L.P.	↓CRP ↓IL-6
Kobayashi et al.	2005	hsCPR MCP-1 Fibrinogeno	Liposorber®	↓hsCPR ↓MCP-1 ↓Fibrinogeno
Moriarty et al.	2006	MCP-1 ET-1 LBP Lp-PLA2 VCAM-1 ICAM-1 E-sel Fibrinogeno OxLDL CRP	H.E.L.P.	↓MCP-1 ↓ET-1 ↓LBP ↓Lp-PLA2 ↓VCAM-1 ↓ICAM-1 ↓E-sel ↓Fibrinogeno ↓OxLDL ↓CRP
Otto et al.	2007	CPR Fibrinogeno IL-6 Mieloperossidasi Resistina	Liposorber D® D.A.LI.	↓CPR ↓Fibrinogeno ↓IL-6 ↓Mieloperossidasi ↓Resistina
Utzumi et al.	2007	sICAM sVCAM P-sel =IL-1β =IL-6 =TNF-α	Liposorber®	↓sICAM ↓sVCAM ↓P-sel =IL-1β =IL-6 =TNF-α

Lo studio *JUPITER (Justification for the Use of statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin)*, relativamente recente, supporta l'utilità clinica di una valutazione del profilo infiammatorio che possa guidare l'intervento terapeutico rivolto a prevenire gli eventi CV (102). Alcuni studi, ancora in numero relativamente esiguo, riportati in letteratura (*Tabelle 1a, 1b, 1c*) (14-18, 44, 50, 54-57, 94, 101-108), hanno indagato gli effetti di diverse tec-

niche di LDL-a su differenti citochine ed altre molecole plasmatiche coinvolte nella risposta infiammatoria. La LDL-a eseguita con Liposorber® (LA-15, Kaneka Corporation, Osaka, Japan), sistema a doppia colonna, inibisce la sintesi di interleuchina-1 (IL-1), di TNF- α e l'espressione di CD11a, CD11b, e CD14. Questo può rappresentare un ulteriore beneficio della LDL-a, oltre il ben noto effetto di riduzione dei livelli plasmatici del CLDL (101).

Tabella 1c - *Trials* esistenti in letteratura in cui sono riportati gli effetti della LDL-a sul profilo plasmatico delle citochine e di altri mediatori dell'infiammazione.

Autori	Anno	Citochine/altri mediatori dell'infiammazione	Tipo di aferesi	Effetti
Dihazi et al.	2008	Più di 70 proteine funzionali	D.A.LI seguito da H.E.L.P. e D.F.P.P.	↓ chininogeno 1 ↓ Fibronectina ↓ Fibrinogeno ↓ componenti del complemento
Hovland et al.	2009	RANTES HsCPR INF- γ TNF- α PDGF VEGF componenti del complemento IL-1ra IL-10 MCP-1 IL-6 IL-8 MIP-1 α MIP-1 β	DL-75 (adsorbimento da sangue intero) LA-15 (adsorbimento da plasma) EC-50W (plasma filtrazione)	↓ RANTES ↓ HsCPR ↓ INF- γ ↓ TNF- α ↓ PDGF ↓ VEGF ↓ componenti del complemento ↑ IL-1ra ↑ IL-10 ↑ MCP-1 IL-6 IL-8 MIP-1 α MIP-1 β
Stefanutti et al.	2011	IL-1 α IL-4 IL-6 IL-10 IL-12(p70) TNF- α VEGF E-sel P-sel sTNF-R VEGF-R1 IL-12(p40) IL-1ra	Liposorber®	↓ IL-1 α ↓ IL-4 ↓ IL-6 ↓ IL-10 ↓ IL-12(p70) ↓ TNF- α ↓ VEGF ↓ E-sel ↓ P-sel ↑ sTNF-R ↑ VEGF-R1 ↑ IL-12(p40) ↑ IL-1ra

Nel 2008 Dihazi et al., hanno studiato la *clearance* di proteine funzionali ottenuta impiegando tecniche di LDL-a differenti, utilizzando analisi proteomiche (14). È stata rilevata una perdita di proteine legate alla colonna, dipendente dal tipo di colonna utilizzata. Le analisi proteomiche hanno mostrato il più alto numero di 'protein spots' in pazienti trattati con sistema D.A.L.I., seguiti dai pazienti trattati con sistema H.E.L.P. e, infine, da pazienti trattati con D.F.P.P. (*Double Filtration Plasma Apheresis*). Sono state identificate oltre 70 proteine funzionali. Questi peptidi sono coinvolti nel sistema coagulatorio (chitinogeno 1) ed hanno azioni adesive (fibronectina), reologiche (F) ed immunologiche/infiammatorie (componenti complementari). Confrontando i campioni di siero prima e dopo il passaggio nella colonna, l'analisi *western blot* ha mostrato una significativa deplezione ($P < 0,01$) di queste proteine. È stato inoltre dimostrato nel siero dei pazienti una sistematica riduzione delle summenzionate molecole. I risultati dello studio di questi autori hanno dimostrato l'esistenza di una stretta interazione tra le colonne e le proteine seriche durante il trattamento con la LDL-a.

La *clearance* di proteine con caratteristiche adesive, reologiche ed infiammatorie, può avere effetti benefici sulla microcircolazione e probabilmente è in grado di mitigare uno stato infiammatorio cronico. Suzuki et al. (1996) hanno riportato le loro conclusioni dopo aver effettuato un *test* di *crossover* effettuato su pazienti Etz IF. Gli autori hanno trovato che i valori di interleuchina-1 β (IL-1 β) e TNF- α dosati prima e dopo trattamento con D.F.P.P., termofiltrazione e tecniche di LDL-adsorbimento, non mostravano variazioni (15). Sampietro et al. hanno studiato l'andamento di molecole solubili di adesione endoteliale leucocitarie (sELAMs) in pazien-

ti IF sottoposti a trattamento con LDL-a. I livelli di molecole solubili di adesione intercellulare-1 (sICAM-1) e sELAM-1 sono stati misurati prima, immediatamente dopo, due e sei giorni dopo la LDL-a. I valori plasmatici basali di ICAM-1 ed ELAM-1 sono risultati essere più elevati di quelli dei soggetti sani di controllo. Dopo trattamento con la LDL-a erano diminuiti significativamente, mentre il TNF- α , la interleuchina-6 (IL-6) e le proteine della fase reattiva acuta erano immutate. Gli Autori hanno sostenuto l'ipotesi che la *upregulation* della adesività endoteliale indotta dalla LDL-a sia la causa della riduzione plasmatica di sICAM-1 e sELAM-1, mentre hanno escluso la responsabilità dei componenti della circolazione extracorporea (tubatismi, filtri ecc.) nella rimozione delle molecole di adesione (16).

Kojima et al. (2001) hanno riportato che la concentrazione sierica del fattore di crescita epatocitario (HGF) aumentava dopo la LDL-a in tre pazienti affetti da grave ipercolesterolemia. L'ipotesi degli autori era che, il miglioramento dei sintomi ischemici osservato, fosse da correlare all'attività angiogenica del HGF (103). Due anni dopo gli stessi autori riportavano come la LDL-a avesse fallito nel ridurre i livelli plasmatici di IL-6.

Al contrario, il livello di IL-6 era risalito al 170% dei valori preafferetici, malgrado i 3.000 ml di plasma trattato / per procedura. Nel contempo, i livelli di Proteina C-reattiva (CRP) si riducevano significativamente, per essere quasi completamente adsorbiti dalle colonne di destransolfato, mentre i livelli preafferetici di CRP venivano gradualmente diminuiti da procedure reiterate nel tempo (104). Nel 2003, Nakamura et al. sostenevano che le membrane dializzatrici rivestite di vitamina E (*vitamin E-coated membrane dialyzer*) e la LDL-a erano in grado di ridurre signi-

ficativamente i livelli plasmatici di CPR e di IL-6 misurati prima e 10 settimane dopo la sessione di terapia extracorporea (116). In generale, si ritiene che la sintesi della CRP avvenga quasi esclusivamente negli epatociti come fase di risposta acuta dietro stimolazione della IL-6 ed in minore misura di TNF- α ed IL- β , rilasciati dal sito sede di infiammazione.

Blaha et al. (2004) hanno determinato le concentrazioni plasmatiche di E-selectina (ESEL), P-selectina (PSEL), della proteina chemiotattica monocitaria (MPC-1), prima e dopo LDL-a e nella soluzione di lavaggio derivante dalle colonne di immunoadsorbimento, in 6 pazienti IF in trattamento continuativo con LDL-a. I livelli di PSEL erano aumentati nonostante il trattamento intensivo e continuativo, mentre le concentrazioni di ESEL e di MCP-1 erano significativamente ridotte. L'aumento di PSEL è stato interpretato come l'evidenza che il processo aterogenico era ancora attivo, malgrado il trattamento continuativo (106). Nel 2005, Kobayashi et al. hanno confermato che i livelli plasmatici di CRP ad elevata sensibilità (*hsCRP*), la MCP-1 e il F, sono stati significativamente ridotti dalla LDL-a in pazienti con malattia arteriosa occlusiva periferica (44). Due anni dopo, Utsumi et al. hanno riportato che le concentrazioni di sICAM-1, sVCAM-1 e PSEL prima della LDL-a, erano più elevate in 8 pazienti emodializzati, rispetto ai controlli sani.

Le molecole proinfiammatorie si riducono dopo la LDL-a, specialmente il PSEL. Sorprendentemente, i livelli plasmatici di IL-1 β , IL-6 e TNF- α , prima della LDL-a, sono risultati simili a quelli dei controlli e non hanno mostrato modificazioni in seguito al trattamento aferetico (50). Otto et al. (2007) hanno confrontato gli effetti di due sistemi di LDL-a su sangue intero (D.A.LI. Liposorber D[®]), nella grave ipercolesterolemia. I livelli plasmatici di CRP

e F erano più bassi ma, le concentrazioni di IL-6, mieloperossidasi e resistina, erano più elevate dopo trattamento con Liposorber D[®], in confronto al sistema D.A.LI.. Gli autori concludono che CRP e F sono stati rimossi più efficacemente dal sistema Liposorber D[®]. Al contrario, i livelli plasmatici di IL-6 dopo trattamento con sistema Liposorber D[®], erano più elevati che dopo trattamento con D.A.LI..

Questo ultimo dato è stato interpretato come possibile indizio di aumentata attivazione infiammatoria con quest'ultimo sistema (107). Nel 2009 Hovland et al. hanno pubblicato l'ultimo *report* sulla risposta infiammatoria indotta da tre sistemi diversi di LDL-a, utilizzati per il trattamento di tre pazienti EtzIF. Il livello plasmatico di *hsCRP* è stato diminuito da tutti i sistemi (DL-75, adsorbimento su sangue intero, LA-15, plasma-adsorbimento, EC-50W, plasma-filtrazione), indipendentemente dal tipo di tecnica utilizzata.

I livelli di interleuchina-1ra (IL-1ra), interleuchina-10 (IL-10) e MPC-1, sono risultati essere consistentemente aumentati, mentre IFN- γ , TNF- α , *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted* (RANTES), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), e *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), sono risultati essere diminuiti. I livelli di IL-6, interleuchina-8 (IL-8), *Macrophage Inflammatory Protein-1 α* (MIP-1 α) e *Macrophage Inflammatory Protein-1 β* (MIP-1 β), hanno mostrato modeste modificazioni. In generale le colonne per adsorbimento sembrano indurre modificazioni meno pronunciate. Gli autori hanno concluso che le summenzionate tecniche di LDL-a, che pure mostrano effetti ipolipemizzanti pressoché sovrapponibili, differiscono significativamente riguardo al loro impatto sulla risposta infiammatoria (17).

Stefanutti et al. (2011) hanno valutato

gli effetti della LDL-a con sistema Liposorber® sulle citochine plasmatiche, in sei pazienti OzIF con/senza CAD e VA, messe in evidenza mediante angiografia. La LDL-a ha mostrato di avere un impatto sul profilo plasmatico delle citochine circolanti inducendo modificazioni di significato antiinfiammatorio ed antiaterogeno. Infatti, il TNF- α è stato significativamente diminuito (-60%), mentre il *Tumor Necrosis Factor-Receptor* (TNF-R) è risultato aumentato (+15%), sebbene non significativamente. Il livello plasmatico di VEGF è stato significativamente ridotto (-57%), mentre VEGF-R1 significativamente aumentato (+56). I livelli plasmatici di ESEL e PSEL sono diminuiti, ma non in modo statisticamente significativo (-19% e -15%, rispettivamente). I livelli di IL-1 α sono stati marcatamente ridotti (-87%). La concentrazione plasmatica di IL-1ra è risultata essere solo lievemente aumentata. I livelli plasmatici di IL-4 e IL-10 sono risultati essere significativamente diminuiti dopo la LDL-a (-50% e -55%, rispettivamente). La concentrazione di IL-6 mostrava, al contrario, soltanto una lieve riduzione (-8%).

I livelli plasmatici di interleuchina 12p40 (IL-12p40) sono risultati essere significativamente aumentati (+47%), mentre i livelli di interleuchina 12p70 (IL-12p70) hanno mostrato una riduzione. La differenza (-31%) non è risultata essere statisticamente significativa (18). Analizzando i risultati complessivi derivati dalle varie esperienze si può affermare che l'aferesi terapeutica ha indotto un decremento dei livelli di citochine proinfiammatorie e proaterogene nel plasma dei pazienti con dislipidemia grave, con lesioni ATS confermate angiograficamente, ad elevato rischio CV individuale. Studi ulteriori sono necessari per spiegare risultati talora apparentemente contraddittori che emergono da questi lavori che forniscono nuovi dati in un campo altamente

specializzato e molto promettente sotto il profilo scientifico e clinico (108).

I farmaci ipolipemizzanti nei pazienti sottoposti a LDL aferesi

Tutti i pazienti sottoposti ad LDL-a a lungo termine dovrebbero seguire anche una terapia farmacologica ipolipemizzante. La più diffusa attualmente è la cd. doppia inibizione ovvero l'associazione di una statina all'ezetimibe. L'unica eccezione sono i pazienti intolleranti alle statine. Mentre le statine meno recenti sono inefficaci nel diminuire i livelli del LDL in pazienti con Oz IF, la rosuvastatina, ha mostrato una certa efficacia nel ridurre il colesterolo nel plasma dei pazienti con IF, presumibilmente attraverso la riduzione della frazione della secrezione delle lipoproteine a densità molto bassa (*Very Low Density Lipoprotein: VLDL*) a livello epatico (109, 110). In ragione del loro effetto di rallentamento sulla produzione di VLDL, questa nuova classe di statine rallenta anche la frazione di incremento (*rebound*) del LDL che segue il trattamento aferetico (110, 111).

Comunque, anche con questi nuovi farmaci, un sottogruppo di pazienti Etz IF e gran parte dei pazienti con Oz-Detz IF che non rispondono alla terapia farmacologica adeguata per classi di farmaci e per dosi, devono continuare ad essere sottoposti a trattamento con la LDL-a. Inoltre, numerosi studi controllati hanno dimostrato che la somministrazione di statine in combinazione con la LDL-a aumenta l'efficacia terapeutica del trattamento, permettendo di rallentare la risalita della colesterolemia nei giorni successivi al trattamento. Non è escluso che i cd effetti pleiotropici o pleiotropici-equivalenti delle statine possano anche favorire un profilo anti-infiammatorio del plasma. Infine, molto interesse scientifico e clinico suscitano i risultati ottenuti con gli inibitori della *microsomal transport*

protein (MTP) epatica, della sintesi della Apo B100 e della convertasi PCSK9 (112-115). Questi nuovi farmaci ad elevata attività ipolipemizzante, saranno certamente associati alla LDL-a in futuro. È possibile inoltre, che anche i farmaci che stimolano l'incremento plasmatico delle HDL, le cd. molecole, *HDL-enhancers* possano giocare un ruolo importante se associati alla LDL-a (116). In alcuni studi clinici attualmente in corso questa associazione ha già mostrato i primi significativi risultati (117, 118).

Conclusione

Alla fine degli anni settanta la prospettiva di ritardare la progressione della ATS nei pazienti IF sottoposti ad aferesi terapeutica (PEX) appariva essere promettente e sufficientemente convincente (23). Migliori risultati con valori *target* ottimizzati si sono ottenuti negli anni ottanta con i nuovi, selettivi approcci terapeutici extracorporei rappresentati dalla cd. LDL-a. La dimostrazione angiografica di regressione di lesioni in individui ad alto rischio, così come sono i pazienti Oz-Dez-Etz IF, supportava l'idea che l'intervento di riduzione aggressiva del colesterolo era la migliore opzione terapeutica per arrestare la progressione e l'inizio precoce della ATS (63, 64, 72). L'*endpoint* clinico appariva estremamente chiaro: un fattore di rischio altamente aterogeno come il LDL a livelli elevati, doveva essere rimosso - possibilmente quasi del tutto - in pazienti con grave dislipidemia, con lo scopo di raggiungere il migliore *outcome* clinico. La completa rimozione del LDL avrebbe dovuto non solo promettere una ragionevole qualità e speranza di vita, ma anche prevenire costosi e drammatici interventi cardiocirurgici di rivascolarizzazione. Sfortunatamente, in una minoranza di pazienti IF, fattori di rischio addizionali,

quali la insufficienza di *compliance*, unita ad irregolari intervalli tra le procedure ed inadeguati volumi di plasma da trattare, i valori elevati della Lp(a), il basso livello del CHDL e la coesistenza di ulteriori fattori di rischio CV correlati allo stile di vita, hanno disatteso tali aspettative.

Una delle ragioni principali dello sviluppo delle tecniche di LDL-a negli anni ottanta è stata la ricerca della selettività e della sicurezza nel rimuovere le lipoproteine contenenti Apo B100 dal plasma di pazienti IF, senza ridurre contemporaneamente la concentrazione delle HDL, come accadeva invece con le vecchie tecniche extracorporee utilizzate negli anni settanta: in particolare la PEX (22, 23).

Il basso livello di CHDL è un fattore di rischio, in quanto è universalmente riconosciuto che gioca un ruolo cruciale nel trasporto inverso del colesterolo, ma il fatto che le HDL promuovano la proliferazione endoteliale e prevengano e correggano la disfunzione endoteliale, è poco noto, se non del tutto ignorato (119-121). Inoltre, le HDL promuovono la dilatazione vascolare, inibiscono la chemiotassi leucocitaria e l'adesione, producendo così effetti globalmente vasoprotettivi (122, 123). Le HDL possono anche inibire l'ossidazione delle LDL in oxLDL.

È largamente accettato che le oxLDL siano potenti induttrici dell'espressione di molecole di adesione, dell'apoptosi endoteliale e del rilascio di prostaglandine infiammatorie (120-122). In ultimo, le HDL riducono l'adesione delle piastrine, mentre promuovono la fibrinolisi e l'espressione di proteasi (121, 125-127). Le citochine infiammatorie, la CRP, i recettori delle citochine, sono stati indagati come *markers* e mediatori dello *stress* ossidativo e della tossicità endovascolare (128).

È emersa ormai chiaramente l'idea di sviluppare farmaci anti-infiammatori come

gli anticorpi neutralizzanti, i cd. *small molecule inhibitors*, le citochine mutanti, le citochine leganti le proteine, che potrebbero trovare una potenziale applicazione nel trattamento della CAD. Questa possibile terapia anti-infiammatoria, dovrebbe anche essere vista come anti-aterogenica alla luce delle attuali conoscenze riguardo il ruolo dell'infiammazione nella patogenesi della ATS (129). Il quesito che sorge da queste evidenze è: alcuni di questi approcci terapeutici troveranno un'applicazione clinica nel trattamento dei pazienti con grave dislipidemia e CAD? Un modello sperimentale su animali del danno endoteliale suggerisce, che l'intervento a breve termine, per prevenire la diapedesi di cellule infiammatorie e l'adesione ai siti di danno vascolare, può avere utili effetti sul rimodellamento vascolare, pur non prevenendo il reclutamento di cellule progenitrici endoteliali. Inoltre, un'inibizione a breve termine e ad alta intensità dell'attività delle citochine, quale è quello inducibile con la LDL-a, potrebbe essere di grande aiuto nei pazienti sottoposti a rivascolarizzazione (ACTP, *by-pass* aorto-coronarico), rispetto ad un trattamento a lungo termine. Un altro quesito che sorge è: gli agenti inibitori delle citochine potrebbero dare un significativo beneficio ai pazienti che assumono inibitori della HMGCoA-reduttasi? Probabilmente pazienti con ATS accelerata (es. diabetici e pazienti con disturbi immunologici) potrebbero trarre vantaggio dalle recenti terapie anti-infiammatorie in combinazione con le statine.

D'altra parte, poichè sono state sviluppate piccole molecole non dannose, inibitrici dei recettori delle citochine per altre malattie infiammatorie, sarà teoricamente possibile studiare nei *trials* clinici se questi farmaci potranno agire sinergicamente con le statine in sottogruppi di soggetti ad alto rischio individuale, così come nei pa-

zienti affetti da IF e da IperLp(a)lipoproteinemia.

Basandosi sull'esperienza a lungo termine con la LDL-a, ogni fattore di rischio deve essere preso in considerazione almeno con la stessa diligenza che si pone nel trattare il CLDL.

Studi recenti forniscono l'evidenza che i vantaggi clinici della rimozione attraverso la LDL-a delle lipoproteine contenenti Apo B100, possono anche essere indipendenti dai suoi effetti di rimozione del colesterolo. Questi effetti *lipid-unrelated*, non in rapporto cioè con la diminuzione del colesterolo, sono probabilmente pleiotropici o pleiotropici-equivalenti. La soppressione a breve termine delle citochine pro-infiammatorie nel plasma e il decremento dell'espressione delle molecole di adesione, può rappresentare un importante meccanismo attraverso cui la LDL-a può interrompere o ritardare la progressione della malattia ATS e delle sue complicanze ischemiche (64). Gli effetti diretti indotti dall'aferesi sulle citochine e probabilmente sull'espressione recettoriale ad essa correlata, dovrà essere oggetto di altri studi e suffragata da nuove evidenze. Inoltre, non è più ragionevole e condivisibile sotto-stimare la capacità delle tecniche di LDL-a di rimuovere direttamente numerosi peptidi infiammatori dal plasma.

In conclusione, l'azione anti-infiammatoria (antiproliferativa e immunosoppressiva) della LDL-a, ha in sé la proprietà di contrastare effettivamente la disfunzione endoteliale, di invertire la propensione all'incremento dell'attività procoagulatoria e di aumentare la disponibilità dell'ossido nitrico, fornendo stabilità alla placca ATS, come riportato da diversi Autori (16, 77, 106, 108, 130). Infine, una vasta gamma di tecniche di LDL-a ben tollerate e ragionevolmente sicure, sono oggi disponibili per un trattamento non farmacologico ef-

ficace della dislipidemia grave. Gli effetti pleiotropici e non pleiotropici della LDL-a producono un ulteriore comprovato beneficio clinico in individui ad alto rischio di eventi coronarici ed extra-coronarici, che non rispondono per nulla o del tutto insufficientemente a statine, fibrati, ezetimibe

e/o combinazioni di questi farmaci, alle più alte dosi tollerate.

Sono necessari altri studi per valutare prospettivamente l'impatto in cronico della plasmaferesi terapeutica e della LDL-a in particolare, sull'infiammazione e sui suoi mediatori.

Glossario

- LA:** Lipidoaferesi (Lipid apheresis)
LDL-a: LDL aferesi (Low Density Lipoprotein apheresis)
IF: Ipercolesterolemia Familiare
IF Oz: Ipercolesterolemia Familiare Omozigote
IF Etz: Ipercolesterolemia Familiare Eterozigote
IF *compound* Detz: Ipercolesterolemia Familiare Doppio Eterozigote
ATS: Aterosclerosi
ACTP: Angioplastica Coronarica Transluminale Percutanea
PEX: Plasma Exchange
Apo B100: Apolipoproteina B100
IDL: Intermediate Density Lipoproteins
Lp(a): Lipoproteina (a)
HDL: High Density Lipoprotein:
H.E.L.P.: Heparin induced Extracorporeal LDL Precipitation
D.A.LI.: Direct Adsorption of Lipids
CHDL: colesterolo-HDL
EBM: Evidence-Based Medicine
PCSK9: Circulating Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9
ARH: Ipercolesterolemia Autosomica Recessiva
ASFA: American Society for Apheresis
CLDL: colesterolo-LDL
CV: cardiovascolare
F: fibrinogeno
PAD: Peripheral Artery Disease
ADM: Age-related Macular Degeneration
IMC: Indice di Massa Corporea
CAD: Coronary Artery Disease
SMILDLa: Studio Multicentrico Italiano LDL-a
LARS: LDL-Apheresis Regression Study
L-CAPS: Japan LDL-apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study
LAARS: LDL Apheresis Atherosclerosis Regression Study
VA: valvulopatia aortica
ATP III: Adult Treatment Panel III
aPTT: Tempo di Tromboplastina Parziale attivato
PT: Tempo di Protrombina
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
IFN- γ : Interferon- γ

JUPITER: Justification for the Use of statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin
IL-1: Interleuchina-1
D.F.P.P.: Double Filtration Plasma Apheresis
sELAM: soluble Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1
sICAM-1: soluble Intercellular Adhesion Molecular-1
IL-6: interleuchina-6
HGF: fattore di crescita epatocitario
CRP: Proteina C-reattiva
IL- β : interleuchina- β
ESEL: E-selectina
PSEL: P-selectina
MPC-1: Proteina Chemiotattica Monocitaria-1
hsCRP: high-sensitivity CRP
IL-1ra: Interleuchina-1ra
IL-10: Interleuchina-10
RANTES: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
IL-8: Interleuchina-8
MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Protein-1 α
MIP-1 β : Macrophage Inflammatory Protein-1 β
TNF-R: Tumor Necrosis Factor-Receptor
IL-12p40: Interleuchina 12p40
IL-12p70: Interleuchina 12p70
VLDL: Very Low Density Lipoprotein
MTP: Microsomal Transport Protein

Bibliografia

- Buchwald H, Varco RL, Matts JP, Long JM, Fitch LL, Campbell GS, Pearce MB, Yellin AE, Edmiston WA, Smink RD Jr, et al. Effect of partial ileal bypass surgery on mortality and morbidity from coronary heart disease in patients with hypercholesterolemia. Report of the Program on the Surgical Control of the Hyperlipidemias (POSCH). *N Engl J Med.* 1990; 323 (14): 946-55.
- Bilheimer DW. Portacaval shunt and liver transplantation in treatment of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis.* 1989; 9: 158-63.
- Bilheimer DW, Goldstein JL, SM, Starzl TE, Brown MS. Liver transplantation to provide low density-lipoprotein receptors and lower plasma cholesterol in a child with homozygous familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 1984; 311 (26): 1658-64.
- Szczepiorkowski ZM, Winters JL, Bandarenko N, Kim HC, Linenberger ML, Marques MB, Sarode R, Schwartz J, Weinstein R, ShazBH. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice. Evidence-based approach from the apheresis applications committee of the American Society for Apheresis. *J of Clinical Apheresis.* 2010; 25: 83-177.
- Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Borén J, Andreotti F, Watts GF, Ginsberg H, Amarencu P, Catapano A, Descamps OS, Fisher E, Kovanen PT, Kuivenhoven JA, Lesnik P, Masana L, Reiner Z, Taskinen MR, Tokgözoğlu L, Tybjærg-Hansen A, European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Lipoprotein(a) as a cardiovascu-

- lar risk factor: current status. *Eur Heart J*. 2010; 31: 2844-53.
6. Thompson GR, HEART-UK LDL Apheresis Working Group. Recommendations for the use of LDL apheresis. *Atherosclerosis*. 2008; 198: 247-55.
 7. Stefanutti C and the Italian Multicenter Study on Low-Density Lipoprotein Apheresis Working Group Italian Multicenter Study on Low-Density Lipoprotein Apheresis. Retrospective Analysis (2007). *Therapeutic Apheresis and Dialysis*. 2009; 14 (1): 79-86.
 8. Stefanutti C. The 2009 2nd Italian Consensus Conference on LDL-apheresis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010; 20 (10): 761-2.
 9. Miyamoto T, Niwa A, Sinoda T. State of percutaneous transluminal coronary artery angioplasty and effectiveness of low-density lipoprotein apheresis. *Ther Apher*. 2001; 5 (4): 226-31.
 10. Hattori M, Ito K, Kawaguchi H, Tanaka T, Kubota R, Miyuki K. Treatment with a combination of low-density lipoprotein aphaeresis and pravastatin of a patient with drug-resistant nephrotic syndrome due to focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*. 1993; 7: 196-8.
 11. Agishi T, Kitano Y, Suzuki T, Miura A, Murakami J, Minagawa H, Ban K. Improvement of peripheral circulation by low density lipoprotein adsorption. *ASAIO Trans*. 1989; 35 (3): 349-51.
 12. Takashi I, et al. Clinical trial of low density lipoprotein-apheresis for treatment of diabetic gangrene. *Internal Medicine*. 1997; 36: 898-902.
 13. Satoshi M, et al. Efficacy of low density lipoprotein apheresis in patients with peripheral arterial occlusive disease undergoing hemodialysis treatment. *Am J Nephrology*. 2007; 27: 643-8.
 14. Dihazi H, Koziolk MJ, Sollner T, Kahler E, Klingel R, Neuhoff R, Strutz F, Mueller GA. Protein adsorption during LDL-apheresis: proteomic analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23: 2925-35.
 15. Suzuki M, Yamane S, Matsugane T, Nobuto T, Azuma N, Nishide T, Shinomiya M, Saito K, Sasaki N, Nosé Y. Evaluation of double filtration plasmapheresis, thermofiltration, and low-density lipoprotein adsorptive methods by crossover test in the treatment of familial hypercholesterolemia patients. *Artif Organs*. 1996; 20 (4): 296-302.
 16. Sampietro T, Tuoni M, Ferdeghini M, Ciardi A, Marraccini P, Prontera C, Sassi G, Taddei M, Bionda A. Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecule expression in familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1997; 96: 1381-5.
 17. Hovland A, Hardersen R, Sexton J, Mollnes TE, Lappégard KT. Different inflammatory responses induced by three LDL-lowering apheresis columns. *J Clin Apher*. 2009; 24 (6): 247-53.
 18. Stefanutti C, Vivenzio A, Di Giacomo S, Ferraro PM. Cytokines profile in serum of homozygous familial hypercholesterolemia is changed by LDL-apheresis. *Cytokine*. 2011; 55 (2): 245-50.
 19. Stefanutti C, Vivenzio A, Ferraro PM, Morozzi C, Dany B. Apheresis-inducible cytokine pattern change in severe, genetic dyslipidemias. *Cytokine*. 2011; 56 (3): 835-41.
 20. Stefanutti C, Morozzi C, Petta A. Lipid and low-density-lipoprotein apheresis. Effects on plasma inflammatory profile and on cytokine pattern in patients with severe dyslipidemia. *Cytokine*. 2011; 56 (3): 842-9.
 21. De Gennes JL, Touraine R, Maunand B, Truffert J, Laudat P. Homozygous cutaneous xanthomatosis in an exemplary familial case. Trial of plasmapheresis and heroic treatment. *Bull Mem Soc Med Hop Paris*. 1967; 118: 1377-402.
 22. Stefanutti C, Di Giacomo S, Vivenzio A. Comparison between different techniques of LDL-apheresis. *Int J Art Organs* 1997; 21 (S-6): 66-71.
 23. Thompson GR, Lowenthal R, Myant N. Plasma exchange in the management of homozygous familial hypercholesterolaemia. *Lancet*. 1975; 1: 1208-11.
 24. Thompson GR, Miller JP, Breslow JL. Improved survival with homozygous familial hypercholesterolemia treated with plasma-exchange. *Br Med J*. 1985; 291: 1671-3.
 25. Paul-J. Lupien, Sital Moorjani, John Awad. A new approach to the management of fa-

- miliar hypercholesterolemia: removal of plasma-cholesterol based on the principle of affinity chromatography. *The Lancet*. 1976; 307: 1261-5.
26. Stoffel W, Borberg H, Greve V. Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterolemia. *The Lancet*. 1981; 318: 1005-7.
 27. Stuart D. Saal, Thomas S. Parker, Bruce R. Gordon, Joel Studebaker, Lisa Hudgins, E.H. Ahrens, Albert L. Rubin. Removal of low-density lipoproteins in patients by extracorporeal immunoabsorption. *The American Journal of Medicine*. 1986; 80: 583-9.
 28. Mabuchi H, Michishita I, Takeda M, Fujita H, Koizumi J, Takeda R, Takada S, Oonishi M. A new low density lipoprotein apheresis system using two dextran sulfate cellulose columns in an automated column regenerating unit (LDL continuous apheresis). *Atherosclerosis*. 1987; 68: 19-25.
 29. Bosch T, Wendler T. State of art of LDL-apheresis in the year 2003. *Ther Apher Dial*. 2004; 8: 76-9.
 30. Stefanutti C, Di Giacomo S, Mazzarella B, Castelli A. LDL-apheresis: a novel technique (LIPOCOLLECT 200®). *Artif Organs*. 2009; 33: 1103-8.
 31. Schmitt E, Kundt G, Klinkmann H. Three years with a national apheresis registry. *J Clin Apher*. 1992; 7: 58-62.
 32. La Rosa JC, Grundy SM, Waters DD, et al. Treating to New Targets (TNT) Investigators. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1425-35.
 33. Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, et al. Effect of very high intensive statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA*. 2006; 295: 1556-65.
 34. Agishi T, Wood W, Gordon B. LDL apheresis using the liposorber® LA-15 system in coronary and peripheral vascular disease associated with severe hypercholesterolemia. *Current Therapeutic Research*. 1994; 55: 879-904.
 35. Daida H, Lee YJ, Yokoi H, Kanoh T, Ishiwata S, Kato K, Nishikawa H, Takatsu F, Kato H, Kutsumi Y, et al. Prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty by reducing lipoprotein (a) levels with low-density lipoprotein apheresis. Low-Density Lipoprotein Apheresis Angioplasty Restenosis Trial (LART) Group. *Am J Cardiol*. 1994; 73 (15): 1037-40.
 36. Hasegawa H, Suzuki Y, Tsuji H, et al. Clinical trials of therapeutic plasmapheresis on patients with a drug-resistant nephrotic syndrome. *Therapeutic plasmapheresis*. 1990; 271-4.
 37. Yokoyama K, Sakai S, Yamaguchi Y, Suzuki Y, Hinoshita F, Hara S, Yamada A, Ogura Y, Kawaguchi Y, Sakai O. Complete remission of the nephrotic syndrome due to focal glomerular sclerosis achieved with low density lipoprotein adsorption alone. *Nephron*. 1996; 72 (2): 318-20.
 38. Yokoyama K, Sakai S, Sigematsu T, Take moto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T. LDL adsorption improves the response of focal glomerulosclerosis to corticosteroid therapy. *Clin Nephrol*. 1998; 50 (1): 1-7.
 39. Sakai S, Mune M, Ino Y, et al. Effect of LDL-apheresis in patients with drug-resistant nephrotic syndrome. *Kidney and dialysis*. 1992; 33: 321-8.
 40. Chan DT, Irish AB, Dogra GK, Watts GF. Dyslipidemia and cardiorenal disease: mechanisms, therapeutic opportunities and clinical trials. *Atherosclerosis*. 2008; 196 (2): 823-34.
 41. Tsimihodimos V, Dounousi E, Siamopoulos KC. Dyslipidemia in chronic kidney disease: an approach to pathogenesis and treatment. *Am J Nephrol*. 2008; 28: 958-73.
 42. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for managing dyslipidemias in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2003; 41(Suppl. 3): S1-9.
 43. Nakamura T, et al. Effect of low-density lipoprotein apheresis on urinary protein and podocyte excretion in patients with nephrotic syndrome due to diabetic nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*. 2005; 45: 48-53.
 44. Kobayashi S, Moriya H, Maesato K, Okamoto K, Ohtake T. LDL-apheresis impro-

- ves peripheral arterial occlusive disease with an implication for anti-inflammatory effects. *J Clin Apher.* 2005; 20 (4): 239-43.
45. Rubba P, Iannuzzi A, Postiglione A, Scarpato N, Montefusco S, Gnasso A, Nappi G, Cortese C, Mancini M. Hemodynamic changes in the peripheral circulation after repeated low density lipoprotein apheresis in familial hypercholesterolemia. *Circulation.* 1990; 81 (2): 610-6.
 46. Lechner P, et al. The impact of H.E.L.P. on haemorheology in peripheral arterial disease. *Cinical Hemorheology.* 1994; 14: 181-8.
 47. Rietzsch H, et al. Heparin-induced Extracorporeal LDL precipitation (H.E.L.P.) in diabetic foot syndrome - preventive and regenerative potential? *Hormon Metab Res.* 2008; 40: 487-90.
 48. Takashi I, et al. Clinical trial of low density lipoprotein-apheresis for treatment of diabetic gangrene. *Internal Medicine.* 1997; 36: 898-902.
 49. Satoshi Morimoto, et al. Efficacy of low-density lipoprotein apheresis in patients with peripheral arterial occlusive disease undergoing hemodialysis treatment. *Am J Nephrology.* 2007; 27: 643-8.
 50. Utsumi K, Kawabe M, Hiramata A, Ueda K, Kamada Y, Arii K, et al. Effects of selective LDL apheresis on plasma concentrations of ICAM-1, VCAM-1 and P-selectin in diabetic patients with arteriosclerosis obliterans and receiving maintenance hemodialysis. *Clin Chim Acta.* 2007; 377 (1-2): 198-200.
 51. Heigl F, Hettich R, Suckfuell M, Luebbbers CW, Osterkorn D, Osterkorn K, Canis M. Fibrinogen/LDL apheresis as successful second-line treatment of sudden hearing loss: a retrospective study on 217 patients. *Atheroscler.* 2009; 10 (5): 95-101.
 52. Bianchin G, Russi G, Romano N, Fioravanti P. Treatment with HELP-apheresis in patients suffering from sudden sensorineural hearing loss: a prospective, randomized, controlled study. *Laryngoscope.* 2010; 120 (4): 800-7.
 53. Klingel R, Fassbender C, Fassbender T, Göhlen B. Clinical studies to implement Rheopheresis for age-related macular degeneration guided by evidence-based-medicine. *Transfus Apher Sci.* 2003; 29 (1): 71-84.
 54. Samtleben W, Bengsch S, Boos KS, Seidel D.HELP apheresis in the treatment of sepsis. *Artif Organs.* 1998; 22 (1): 43-6.
 55. Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Saal SD, Wang JC, Sloan BJ, Barie PS, Rubin AL. Low lipid concentrations in critical illness: implications for preventing and treating endotoxemia. *Crit Care Med.* 1996; 24 (4): 584-9.
 56. Boos KS, Trautwein A, Seidel D, Morsch G. Endotoxin removal in septicaemia using the HELP-system: first in vitro results. *Artif Organs.* 1995; 10: 1041.
 57. Bengsch S, Boos KS, Nagel D, Seidel D, Inthorn D. Extracorporeal plasma treatment for the removal of endotoxin in patients with sepsis: clinical results of a pilot study. *Shock.* 2005; 23 (6): 494-500.
 58. Fukuzawa S, Ozawa S, Inagaki M, Morooka S, Inoue T. Secondary prevention with lipid lowering therapy in familial hypercholesterolemia: a correlation between new evolution of stenotic lesion and achieved cholesterol levels after revascularization procedures. *Intern Med.* 1999; 38 (4): 330-5.
 59. Balogun RA, Ogunniyi A, Sanford K, Okafor C, Lobo PI, Siami G, Barcia J, Kaplan AA. Therapeutic apheresis in special populations. *J Clin Apher.* 2010; 25 (5): 265-74.
 60. Jeynes B, Provias J. Evidence for altered LRP/RAGE expression in Alzheimer lesion pathogenesis. *Curr Alzheimer Res.* 2008; 5 (5): 432-7.
 61. Gordon BR, Saal SD. Immunoabsorption and dextran sulfate cellulose LDL-apheresis for severe hypercholesterolemia: the Rogosin Institute experience 1982-1992. *Transfus Sci.* 1993; 14 (3): 261-8.
 62. Kitabatake A, Sato H, Hori M, Kamada T, Kubori S, Hoki N, Minamino T, Yamada M, Kato T. Coronary atherosclerosis reduced in patients with familial hypercholesterolemia after intensive cholesterol lowering with low-density lipoprotein-apheresis: 1-year follow-up study. *The Osaka LDL-*

- Apheresis Multicenter Trial Group. *Clin Ther.* 1994; 16 (3): 416-28.
63. Tatami R, Inoue N, Itoh H, Kishino B, Koga N, Nakashima Y, Nishide T, Okamura K, Saito Y, Teramoto T. Regression of coronary atherosclerosis by combined LDL-apheresis and lipid lowering therapy in patients with familial hypercholesterolemia: a multicenter study. *The LAARS Investigators. Atherosclerosis.* 1992; 95: 1-13.
 64. Aengevaeren WR, Kroon AA, Stalenhoef AF, Uijen GJ, van der Werf T. Low density lipoprotein apheresis improves regional myocardial perfusion in patients with hypercholesterolemia and extensive coronary artery disease. *LDL-Apheresis Atherosclerosis Regression Study (LAARS).* *J Am Coll Cardiol.* 1996; 28 (7): 1696-704.
 65. Jaeger BR, Labarrere CA. Genetic variants in Lp(a) lipoprotein and coronary disease. *N Engl J Med.* 2010; 362 (12): 1146-7.
 66. Stefanutti C, D'Alessandri G, Russi G, De Silvestro G, Zenti MG, Marson P, Belotterkovsky D, Vivencio A, Di Giacomo S. Treatment of symptomatic HyperLp(a) lipoproteinemia with LDL-apheresis: a multicentre study. *Atherosclerosis.* 2009; 10 (5): 89-94.
 67. Nishimura S, Sekiguchi M, Kano T, Ishiwata S, Nagasaki F, Nishide T, Okimoto T, Kutsumi Y, Kuwabara Y, Takatsu F, Nishikawa H, Daida H, Yamaguchi H. Effect of intensive lipid lowering by low density lipoprotein apheresis on regression of coronary atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia: Japan Low Density Lipoprotein Apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study (L-Caps). *Atherosclerosis.* 1999; 144: 409-17.
 68. Egashira K, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Inou T, Takeshita A. Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation.* 1994; 89 (6): 2519-24.
 69. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, Zhang J, Bocuzzi SJ, Cedarholm JC, Alexander RW. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 1995; 332 (8): 481-7.
 70. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Freib, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med.* 1995; 332 (8): 488-93.
 71. Schuff-Werner P, Schütz E, Seyde WC, Eisenhauer T, Janning G, Armstrong VW, Seidel D. Improved haemorheology associated with a reduction in plasma fibrinogen and LDL in patients being treated by heparin-induced extracorporeal LDL precipitation (HELP). *Eur J Clin Invest.* 1989; 19 (1): 30-7.
 72. Mabuchi H, Koizumi J, Shimizu M, Kajinami K, Miyamoto S, Ueda K, Takegoshi T. Long term efficacy of low density lipoprotein apheresis on coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *Hokuriku FH LDL-apheresis Study Group. Am J Cardiol.* 1998; 82: 1489-95.
 73. Koga N, Iwata Y. Pathological and angiographic regression of coronary atherosclerosis by LDL apheresis in a patient with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1991; 90: 9-21.
 74. Leung WH, Lau CP, Wong CK. Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolaemic patients. *Lancet.* 1993; 341 (8859): 1496-500.
 75. O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation.* 1997; 95 (5): 1126-31.
 76. Igarashi K, Horimoto M, Takenaka T, Inoue H, Miyata S. Acute cholesterol lowering therapy with LDL-apheresis improves endothelial function of the coronary microcirculation in patients with hypercholesterolemia. *Circulation.* 1995; 92I: 452.
 77. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation.* 1997; 95 (1): 76-82.
 78. Leitinger N, Pirich C, Blazek I, Endler G,

- Sinzinger H. Decreased susceptibility of low-density lipoproteins to in-vitro oxidation after dextran-sulfate LDL-apheresis treatment. *Atherosclerosis*. 1996; 126 (2): 305-12.
79. Inoue I, Takahashi K, Kikuchi C, Katayama S. LDL apheresis reduces the susceptibility of LDL to in vitro oxidation in a diabetic patient with hemodialysis treatment. *Diabetes Care*. 1996; 19 (10): 1103-7.
80. Uno H, Ueki Y, Murashima J, Miyake S, Tominaga Y, Eguchi K, Yano K. Removal of LDL from plasma by adsorption reduces adhesion molecules on mononuclear cells in patients with arteriosclerosis obliterans. *Atherosclerosis*. 1995; 116 (1): 93-102.
81. Sinzinger H, Pirich C, Bednar J, O'Grady J. Ex-vivo and in-vivo platelet function in patients with severe hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis. *Thromb Res*. 1996; 82 (4): 291-301.
82. Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill Information Services Company; 2001; 2: 863-913.
83. Tonstad S, Thompson GR. Management of hyperlipidemia in the pediatric population. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2004; 6 (5): 431-7.
84. Stefanutti C, Di Giacomo S, Vivenzio A, Rabbone I, Cerutti F, Berni A, Colloridi V, Bosco G, Bertolini S. LDL-apheresis in a patient aged 3.5. *Acta Paediatrica*. 2001; 90: 1-7.
85. Stefanutti C, Vivenzio A, Di Giacomo S, Mazzarella B, Notarbartolo A, Bertolini S, Colloridi V, Bosco G, Nigri A, Berni A: LDL-apheresis in a homozygous familial hypercholesterolemic child aged 4.5. *Art. Organs*. 1997; 21 (10): 1126-37.
86. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Bruzzi P, Chambers JB, Egstrup K, Gerds E, Gohlke-Bärwolf C, Holme I, Kesäniemi YA, Malbecq W, Nienaber CA, Ray S, Skjaerpe T, Wachtell K, Willenheimer R; SEAS Investigators: Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2008; 25; 359 (13): 1343-56.
87. Pazzianas M. Calcific aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2009; 1; 360 (1): 85-6.
88. Cawley PJ, Otto CM. Prevention of calcific aortic valve stenosis fact or fiction? *Ann Med*. 2008; 14: 1-9.
89. Stefanutti C, Di Giacomo S, Vivenzio A, Bosco G, Colloridi V, S. Trizza, Berni A, Nigri A, Koga N. LDL-apheresis in the treatment of familial hypercholesterolemia in childhood. *Atherosclerosis*. 1997; 134 (1, 2): 383-4.
90. Journal of the American Heart Association. *New Cholesterol Treatment Guidelines: ATP III Guideline Summary of Updates*. Circulation. 2004.
91. Hudgins LC, Kleinman B, Scheuer A, White S, Gordon BR: Long-term safety and efficacy of low-density lipoprotein apheresis in childhood for homozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 2008; 1; 102 (9): 1199-204.
92. Palcoux JB, Atassi-Dumont M, Lefevre P, Hequet O, Schlienger JL, Brignon P, Roussel B. Low-density lipoprotein apheresis in children with familial hypercholesterolemia: follow-up to 21 years. *Ther Apher Dial*. 2008; 12: 195-201.
93. Moriarty P. LDL-apheresis therapy: current therapeutic practice and potential future use. *Future Lipidology*. 2006; 1 (3): 299-308.
94. Stefanutti C, Vivenzio A, Di Giacomo S, Mazzarella B, Bosco G, Berni A. Aorta and coronary angiographic follow-up of children with severe hypercholesterolemia treated with low-density lipoprotein apheresis. *Transfusion*. 2009; 49 (7) 14: 61-70.
95. Knisel W, Di Nicuolo A, Pfohl M, Muller H, Risler T, Eggstein M, Seifried E. Different effects of two methods of low density lipoprotein apheresis on the coagulation and fibrinolytic systems. *J of Internal Medicine*. 1993; 234: 479-87.
96. Giansante C, Bordin P, Fiotti N, Calabrese S, Petrucco A, Da Col PG, Fonda M, Cattin L. Activation of coagulation by LDL-apheresis device. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996; 7: 447-52.
97. Julius U, Siegert G, Gromeier S. Intraindividual comparison of the impact of two selective apheresis methods (DALI and

- HELP) on the coagulation system. *The International Of Artificial Organs*. 2000; 3: 199-206.
98. Wojciak-Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley AJ. Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1998; 176: 150-65.
99. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006; 86: 515-81.
100. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J*. 2010; 74 (2): 213-20.
101. Rovers C, Netea MG, de Bont N, Demacker PNM, Jacobs C, Kullberg BJ, Van der Meer JVM, Stalenhoef AFH. LPS-induced cytokine production and expression of b2-integrins and CD14 by peripheral blood mononuclear cells of patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1998; 141: 99-105.
102. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ; JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008; 359 (21): 2195-207.
103. Kojima S, Shida M, Tanaka K, Takano H, Yokoyama H, Kuramochi M. Acute changes in plasma levels of hepatocyte growth factor during low-density lipoprotein apheresis. *Ther Apher*. 2001; 5 (1): 2-6.
104. Kojima S, Shida M, Yokoyama H. Changes in C-reactive protein plasma levels during low-density lipoprotein apheresis. *Ther Apher Dial*. 2003; 7 (4): 431-4.
105. Nakamura T, Kawagoe Y, Matsuda T, Takahashi Y, Sekizuka K, Ebihara I, et al. Effects of LDL apheresis and vitamin E-modified membrane on carotid atherosclerosis in hemodialyzed patients with arteriosclerosis obliterans. *Kidney Blood Press Res*. 2003; 26 (3): 185-91.
106. Bláha M, Krejsek J, Bláha V, Andrýs J, Vokurková D, Malý J, Blazek M, Skorepová M. Selectins and monocyte chemotactic peptide as the markers of atherosclerosis activity. *Physiol Res*. 2004; 53 (3): 273-8.
107. Otto C, Berster J, Otto B, Parhofer KG. Effects of two whole blood systems (DALI and Liposorber D) for LDL apheresis on lipids and cardiovascular risk markers in severe hypercholesterolemia. *J Clin Apher*. 2007; 22 (6): 301-5.
108. Wang Y, Blessing F, Walli AK, Uberfuhr P, Fraunberger P, Seidel D. Effects of heparin-mediated extracorporeal low-density lipoprotein precipitation beyond lowering proatherogenic lipoproteins-reduction of circulating proinflammatory and procoagulatory markers. *Atherosclerosis*. 2004; 175: 145-50.
109. Naoumova RP, Marais D, Firth JC, Neuwirth CY, Taylor GW, Thompson GR. Atorvastatin augments therapy of homozygous familial hypercholesterolemia by inhibiting up-regulation of cholesterol synthesis after apheresis and bile acid sequestrant. *Circulation*. 1996; 94: 3410.
110. Marais AD, Naoumova RP, Firth JC, Penny C, Neuwirth CK, Thompson GR. Decreased production of low density lipoprotein by atorvastatin after apheresis in homozygous familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res*. 1997; 38 (10): 2071-8.
111. Schettler V, SchuffWerner P, Schettler E, Wieland E, Muller GA. Effect of atorvastatin vs. simvastatin in patients undergoing regular LDL- apheresis (ASLA I). *Atherosclerosis*. 1997; 134-3.
112. Cuchel M, Bloedon LT, Szapary PO, Kolsky DM, Wolfe ML, Sarkis A, Millar JS, Ikewaki K et al. Inhibition of Microsomal Triglyceride Transfer Protein in Familial Hypercholesterolemia. *New England Journal of Medicine*. 2007; 356 (2): 148-56.
113. Samaha, Frederick F, McKenney J, Bloedon LT, Sasiela WJ, Rader DJ. Impact of the MTP-Inhibitor, AEGR-733, as monotherapy and in combination with ezetimibe on lipid subfractions as measured by NMR spectroscopy. *Circulation*. 2008; 118 (5): 469.
114. Raal FJ, Santos RD, Blom DJ, Marais AD, Charng MJ, Cromwell WC, Lachmann RH,

- Gaudet D, Tan JL, Chasan-Taber S, Tribble DL, Flaim JD, Crooke ST. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2010; 375 (9719): 998-1006.
115. Cariou B, Le May C, Costet P. Clinical aspects of PCSK9. *Atherosclerosis*. 2011; 216 (2): 258-65.
116. Elokda H, Chai SY, Ho D, Sulkowski T. Design and synthesis of tricyclic derivatives as high density lipoprotein cholesterol enhancers. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001; 11 (3): 339-42.
117. Humphries SE, Neely RD, Whittall RA, Troutt JS, Konrad RJ, Scartezini M, Li KW, Cooper JA, Acharya J, Neil A. Healthy individuals carrying the PCSK9 p.R46L variant and familial hypercholesterolemia patients carrying PCSK9 p.D374Y exhibit lower plasma concentrations of PCSK9. *Clin Chem*. 2009; 55 (12): 2153-61.
118. Kastelein JJ. The future of lipid-lowering therapy: the big picture. *Neth J Med*. 2003; 61 (5 Suppl): 35-9.
119. Darbon JM, Tournier JF, Tauber JP, Bayard F. Possible role of protein phosphorylation in the mitogenic effect of high density lipoproteins on cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1986; 261: 8002-8.
120. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420: 868-74.
121. Norata GD, Catapano AL. Molecular mechanisms responsible for the antiinflammatory and protective effect of HDL on the endothelium. *Vasc Health Risk Manag*. 2005; 1: 119-29.
122. Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part I. *Circulation*. 2001; 104: 2376-83.
123. Young CE, Karas RH, Kuvin JT. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. *Cardiol Rev*. 2004; 12: 107-19.
124. Nofer JR, Fobker M, Höbbel G, et al. Activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by HDL-associated lysophospholipid. Involvement in mitogenesis but not in cholesterol efflux. *Biochemistry*. 2000; 39: 15199-207.
125. Griffin JH, Kojima K, Banka CL, Curtiss LK, Fernández JA. High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *J Clin Invest*. 1999; 103: 219-27.
126. Epanand RM, Stafford A, Leon B, et al. HDL and apolipoprotein A-I protect erythrocytes against the generation of procoagulant activity. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 1775-83.
127. Sugatani J, Miwa M, Komiyama Y, Ito S. High-density lipoprotein inhibits the synthesis of platelet-activating factor in human vascular endothelial cells. *J Lipid Mediat Cell Signal*. 1996; 13: 73-88.
128. Rizvi AA. Cytokine biomarkers, endothelial inflammation, and atherosclerosis in the metabolic syndrome: emerging concepts. *Am J Med Sci*. 2009; 338 (4): 310-8.
129. Mackay CR. Moving target: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nature Immunology*. 2008; 9: 988-98.
130. Stefanutti C, Di Giacomo S, Vivencio A, Isacchi GC, Masella R, Caprari P, Vari R, Tarzia A, Mosiello A, Cantafora A. Acute and long term effects of low density lipoprotein (LDL) apheresis on oxidative damage to LDL and reducing capacity of erythrocytes in patients with severe familial hypercholesterolaemia. *Clin Sci*. 2000; 100 (2): 191-8.