

Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

LDL-Apherese verbessert die Mikrozirkulation der oberen Extremitäten

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jannik Rossenbach
aus Würselen

Göttingen 2012

D e k a n:	Prof. Dr. med. C. Frömmel
I. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. M. Koziolk
II. Berichterstatter/in:	Priv.-Doz. Dr. med. J. Riggert
III. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Th. Crozier
Tag der mündlichen Prüfung:	05. März 2012

Diese Schrift gründet sich auf folgende Originalarbeit:

**Rossenbach J, Mueller G A, Lange K, Armstrong VW[†], Schmitto JD,
Hintze E, Helfmann J, Konstantinides S, Koziolk MJ (2011):**

Lipid-Apheresis improves microcirculation of the upper limbs.

J Clin Apher 10.1002

Impact factor: 1,838

INHALTSVERZEICHNIS

	Seitenzahl
1. Inhalt der Publikation und innerer Zusammenhang	
1.1. Einleitung	1-4
1.1.1. Apherese–Therapieverfahren	
1.1.2. Pathomechanismus	
1.1.3. Stand der Forschung	
1.1.4. Studienziele	
1.2. Methodik	5-7
1.2.1. Kapillarmikroskopie	
1.2.2. Photoplethysmographie	
1.2.3. Dopplerverschlussdruckmessung durch pneumatisch segmentale Pulsoszillographie	
1.2.4. Laser-Doppler-Anemometrie (LDA)	
1.2.5. Blutanalysen	
1.3. Ergebnisse	8-14
1.3.1. Kapillarmikroskopie	
1.3.2. Photoplethysmographie	
1.3.3. Dopplerverschlussdruckmessung durch pneumatisch segmentale Pulsoszillographie	
1.3.4. Laser-Doppler-Anemometrie (LDA)	
1.3.5. Blutanalysen	
1.3.6. Diskussion	
1.4. Literaturzitate, die über die Publikation hinausgehen	15-16
2. Publikation	17
Rossenbach J, Mueller G A, Lange K, Armstrong VW[†], Schmitto JD, Hintze E, Helfmann J, Konstantinides S, Koziolk MJ (2011): Lipid-Apheresis improves microcirculation of the upper limbs. <i>J Clin Apher</i> <u>10</u> .1002	

1. Inhalt der Publikation und innerer Zusammenhang

1.1. Einleitung

Eine große Anzahl von Patienten leidet an einer Hypercholesterinämie. Diese stellt einen entscheidenden Risikofaktor für das Entstehen von atherosklerotischen Veränderungen dar, die Prädiktoren für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen, wie koronare Herzkrankheit (KHK), neurovaskuläre Ereignisse oder periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), sind (Rubba^{12*} et al. 1990; Nishimura²⁶ et al. 1999; Mellwig¹ et al. 2006; Morimoto³¹ et al. 2007).

Bei der schweren, oft erblichen Form der familiären Hypercholesterinämie (FH) können trotz maximaler diätetischer und medikamentöser Therapie die Zielwerte für LDL-Cholesterin (LDL-C) nicht erreicht werden (Thompson⁸ et al. 1980; Nishimura²⁶ et al. 1999).

Eine weitergehende Absenkung des LDL-C ist bei der FH nur mit der LDL-Apherese (LDL-A) möglich (Rubba¹² et al. 1990). Hierbei werden pro-atherosklerotischen LDL-C und Lipoprotein a (Lp(a)) aus dem Blut entfernt (Tsuchida⁷ et al. 2006), darüber hinaus wird die Durchblutung von weiteren Faktoren, die bei der LDL-A verändert werden, beeinflusst.

1.1.1. Apherese – Therapieverfahren

Als Verfahren zur extrakorporalen LDL-Elimination werden im Zentrum der Universität Göttingen eingesetzt:

- Direkte Adsorption von Lipoproteinen aus Vollblut (Polyacrylate full blood absorption (PFBA), (DALI[®], Fa. Fresenius AG))
- Heparinpräzipitation (heparininduzierte extrakorporale LDL-Präzipitation (H.E.L.P.), (H. E. L. P.[®], Fa. B. Braun Melsungen AG))
- Membrandifferentialfiltration (double filtration plasmapheresis (DFPP), (Thermofiltration[®], Fa. Diamed GmbH))

* Autoren, die nur im Literaturverzeichnis der Publikation aufgeführt sind, werden hier mit hochgestellter Ordnungszahl zitiert, unter der sie im Literaturverzeichnis der Publikation auf Seite 6/7 erscheinen.

Die drei genannten Therapieverfahren werden jetzt im Einzelnen kurz vorgestellt:

Bei der direkten Adsorption aus Vollblut (DALI[®]) werden apoB-tragende Lipoproteine mittels kovalenter Bindung an polyanionisches Polyacrylamid aus dem Vollblut gefiltert. Das „gereinigte“ Vollblut wird dem Patienten reinfundiert (Bosch 2004).

Bei der H.E.L.P.-Therapie wird zuerst eine Plasmaseparation vorgenommen. Das so gewonnene Plasma wird mit einer sauren Heparinlösung versetzt. Hierdurch bilden sich Komplexe aus Heparin mit Apolipoprotein-B-haltigen Lipiden, Fibrinogen und anderen rheologisch bedeutsamen Proteinen, wie Fibronectin. Diese so gebildeten Komplexe fallen aus und werden mit einem Polykarbonatfilter herausgefiltert. Das überschüssige Heparin wird anschließend chemisch aus dem Plasma entfernt. Im heparin- und nahezu cholesterinfreien Plasma wird anschließend das physiologische Plasmamilieu durch eine Bikarbonatdialyse wiederhergestellt und überschüssige Flüssigkeit entfernt. Das Plasma wird zusammen mit den korpuskulären Blutbestandteilen dem Patienten wieder reinfundiert (Bosch 2005).

Bei der Membrandifferentialfiltration (Thermofiltration[®]) wird das Plasma nach der Plasmaseparation durch einen zweiten Plasmafilter gepresst, dessen Porengröße genau definiert ist und geringfügig unter der Molekülgröße des LDL-C liegt. Dieses wird durch den Filter mechanisch zurückgehalten. Das LDL-C freie Plasma wird dann dem Patienten reinfundiert. Zusätzlich werden auch andere größere Moleküle wie Lp(a) abgefiltert (Klingel et al. 2004).

1.1.2. Pathomechanismus

Sowohl bei der Entstehung der Atherosklerose als auch für deren Progression spielt die Dysfunktion der Endothelien die entscheidende Rolle. Obwohl der Pathomechanismus der endothelialen Dysfunktion noch

nicht in allen Einzelheiten bekannt ist, kommt der Interaktion zwischen LDL-C mit dem in den Endothelzellen synthetisierten Stickstoffmonoxid (NO) große Bedeutung zu. Bei hohen LDL-C Konzentrationen im Blut akkumuliert dieses im subendothelialen Raum (zwischen Intima und Media) und wird dort oxidiert und enzymatisch modifiziert. Dieses modifizierte LDL-C bewirkt eine Inaktivierung von NO (Mellwig et al. 2003), da es zum einen die rezeptor-vermittelte Freisetzung von NO supprimiert und zum anderen die endotheliale NO-Synthase direkt hemmt (Mellwig et al. 2003). Daraus resultiert eine Hemmung der rezeptor- und strömungsvermittelten endothel-abhängigen Vasodilatation. Modifiziertes LDL-C hat aber noch weitere Einflüsse, z.B. die Wirkung auf Fibroblasten, Makrophagen, bei denen die Inflammationsreaktion zu einem Matrixumbau führt und die Entstehung der Plaques voranschreitet, sowie die direkte Wirkung auf das Endothel (Nishimura²⁶ et al. 1999; Mellwig et al. 2003).

1.1.3. Stand der Forschung

Zahlreiche Studien konnten die Wirksamkeit der LDL-A auf den Endpunkt kardiovaskuläres Ereignis (Tod, Myokardinfarkt, Apoplex, Amputation einer Extremität) nachweisen (Ramunni et al. 2003; Schuff-Werner 2003; Krebs et al. 2004; Sachais⁶ et al. 2005). In einer an der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführten retrospektiven Analyse (Koziolek⁵ et al. 2010) konnte die protektive Wirkung der Langzeit-LDL-A bei einem Beobachtungszeitraum von bis zu 20 Jahre bestätigt werden. Die Effizienz der LDL-A scheint jedoch nicht nur auf der Absenkung der pro-atherogenen Lipoproteine LDL-C und des Lp(a) zu beruhen. In verschiedenen Studien konnten absenkende Effekte auf die Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine und Mediatoren, rheologisch bedeutsamer Proteine sowie Wachstumsfaktoren beobachtet werden (Bosch und Keller 2003; Dihazi¹⁷ et al. 2008). Durch *in-vitro*-Testungen konnten positive Effekte auf die Plasmaviskosität und Erythrozytenaggregation nachgewiesen werden (Otto et al. 2004). Die Verbesserung der rheologischen Eigenschaften werden auch bei anderen Indikationen

genutzt, wie beispielsweise bei der Behandlung der Makuladegeneration oder des Hörsturzes (Mösges et al. 2009). Insgesamt resultiert eine Verbesserung der Endstromversorgung (Mellwig et al. 2003; Matschke²⁸ et al. 2004).

Es scheinen jedoch auch Faktoren durch die LDL-A beeinflusst zu werden, die den Gefäßtonus regulieren können. Dazu zählen Bradykinin, Endothelin (ET-1) und NO (Kobayashi et al. 2004; Wang et al. 2004). Für andere Mediatoren, die u.a. bei Hypercholesterinämie erhöht sind, wie z.B. das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA), gibt es bisher keine Daten. Ob Änderungen dieser Mediatoren durch die LDL-A auch *in vivo* zu einer Änderung des Gefäßtonus und der Gefäßreagibilität führen, und damit zu einer Verbesserung der arteriellen und kapillären Durchblutung beitragen, ist bis dato nicht belegt.

1.1.4. Studienziele

Ziel der Studie war es, den Einfluss der LDL-A auf die arterielle/arterioläre und kapilläre Durchblutungssituation *in vivo* zu testen.

Dazu wurden folgende Aspekte näher untersucht:

- Verbesserung der Endstromversorgung durch die LDL-A mittels Kapillarmikroskopie und Laser-Doppler-Anemometrie (LDA)
- Beeinflussung der arteriolären und kapillären Gefäßweite durch die LDL-A mittels Kapillarmikroskopie
- Beeinflussung des arteriolären und kapillären Blutflusses durch die LDL-A mittels Kapillarmikroskopie und LDA
- Beeinflussung der Gefäßreagibilität durch die LDL-A mittels Photoplethysmographie
- Beeinflussung der Konzentration vasokonstriktorischer und vasodilatatorischer Mediatoren durch die LDL-A mittels Blutanalysen
- Unterschiede zwischen den verwendeten LDL-Aphereseverfahren in Bezug auf die untersuchten Effekte.

1.2. Methodik

Es wurden 22 Patienten, die sich einmal wöchentlich einer LDL-A Behandlung auf der Apheresestation der Universitätsmedizin Göttingen unterziehen, vor [Anfang Prozedere (AP)] und nach [Ende Prozedere (EP)] LDL-A untersucht. Zur Charakterisierung des Patientenkollektives siehe auch *Rossenbach et al. 2011, Seite 4, Tabelle I.*

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Göttingen genehmigt (Studienprotokoll Nummer 40/12/05). Alle Patienten haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Im Fall von Minderjährigen gaben dies die Eltern.

1.2.1. Kapillarmikroskopie

Mit der Kapillarmikroskopie wurde die Nagelfalz der Fingern II-V beider Hände mit einem Auflichtmikroskop (SMZ-U, Nikon, Japan) in 20-facher Vergrößerung untersucht. Hier wurden *in vivo* der Blutfluss, die Vasomotorik und die Erythrozytenaggregation beurteilt.

Die Datenerhebung erfolgte mittels semiquantitativer Scores: Erhoben wurden der Blutfluss von (+) bis (+++) (+ = verlangsamt, ++ = normal und +++ = beschleunigt), die Vasomotorik von (0) bis (++++) (0 = keine Kapillarfüllung, + = selten gefüllt/kurz sichtbar, ++ = öfter gefüllt/länger sichtbar, +++ = kurze Unterbrechung, ++++ = dauerhafte Füllung) und die Erythrozytenaggregationsneigung von (0) bis (++++) (0 = starke Aggregationsneigung/zerbröckelnde Blutsäule, + = mäßige Aggregation, ++ = leichte Aggregation, +++ = leichte und seltene Aggregation, ++++ = schnelle Zirkulation ohne Aggregation).

1.2.2. Photoplethysmographie

Die Messungen der Photoplethysmographie (Vasoquant VQ4000, ELCAT medical systems, Germany) wurden ebenfalls unmittelbar vor und nach Therapie durchgeführt. Mit diesem Verfahren wurden jeweils unter Ruhebedingungen, Kälte- und Wärmestress Blutfluss und Reagibilität der

Gefäße beurteilt. Zur Beschreibung des Versuchsablaufes, sowie Berechnung des Blutflusses und der Gefäßreagibilität siehe *Rossenbach et al. 2011, Seite 2*.

1.2.3. Dopplerverschlussdruckmessung durch pneumatisch segmentale Pulsoszillographie

Der arterielle Verschlussdruck wurde mit dem OXFORD sonicaid 421 durchgeführt. Hier erfolgte die Messung ebenfalls AP und EP. Gemessen wurden die A. brachialis, A. radialis und A. ulnaris. Bei Patienten mit Shunt wurde die betreffende Seite ausgelassen.

1.2.4. Laser-Doppler-Anemometrie (LDA)

Die LDA wurde von der Laser- und Medizin-Technologie GmbH entwickelt und ist ein optisches Verfahren zur Messung von Strömungsgeschwindigkeiten des Blutflusses der oberen Hautschichten. Bei diesem gemessenen Blutfluss handelt es sich um einen relativen Blutfluss, da das gestreute Licht noch mit einem zweiten Lichtstrahl als Referenz überlagert wird. Das Verfahren beruht auf der Messung der Dopplerverschiebung von in der Haut an Blutkörperchen gestreutem Laser-Licht und Berechnung eines relativen Flusses aus dem gemessenen Doppler-Spektrum. Durch die Bewegung von größtenteils Erythrozyten in den Gefäßen wird eine Doppler-Frequenzverschiebung im detektierten Laserlicht hervorgerufen. Diese Frequenzverschiebung ist proportional zur Geschwindigkeit, wobei jede Fließgeschwindigkeit ein charakteristisches Doppler-Spektrum ergibt. Die Höhe der spektralen Lichtfluktuation ist proportional zur Anzahl der sich bewegenden Blutzellen. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen kapillärer Versorgung und arteriell/venöser Durchblutung. Zur Beschreibung des Versuchsaufbaus siehe auch *Rossenbach et al. 2011, Seite 3*.

1.2.5. Blutanalysen

Des Weiteren wurden eine Reihe vasokonstriktorisches und vasodilatatorisch wirksamer Mediatoren bestimmt. Die Proben wurden vor Beginn und nach Beendigung der Therapie entnommen. Das Blut wurde venös oder bei Vorhandensein eines arterio-venösen Unterarmshunts aus diesem entnommen. Zu den untersuchten Mediatoren zählten ET-1 (Normbereich 0.2-0.7 fmol/ml / untere Nachweisgrenze <0.05 fmol/ml / Intra-Assay-Variationskoeffizient (VK) 4.4-4.5% / Inter-Assay-VK 6.9-7.6%), atriales natriuretisches Peptid (NT-proANP) (Normbereich <1945 fmol/ml / untere Nachweisgrenze 50 fmol/ml / Intra-Assay-VK 2% / Inter-Assay-VK 4%), ADMA (Normbereich 0.4-0.75 µmol/l / untere Nachweisgrenze 0.05 µmol/l / Intra-Assay-VK 4.5-7.5% / Inter-Assay-VK 8.3-10.3%), Adrenalin (Normbereich ≤ 84 ng/l / untere Nachweisgrenze <10 ng/l / Inter-Assay-VK 8.7-9.2%) und Noradrenalin (Normbereich 150-700 ng/l / untere Nachweisgrenze <10 ng/l / Inter-Assay-VK 8.6-9.3%).

Die Blutentnahmen für die ET-1-, NT-proANP- und ADMA-Bestimmungen erfolgten in EDTA-Monovetten. Die prä-analytischen Behandlungen der Proben erfolgten entsprechend der Herstellerangaben: Die ET-1-Proben wurden dabei eiskühlt, die NT-proANP- und ADMA-Proben bei Raumtemperatur ins Labor transportiert. Innerhalb einer Stunde wurden die ET-1- und NT-proANP-Proben abzentrifugiert und bis zur Analytik bei -20°C aufbewahrt. Die ADMA-Proben wurden bei -6°C maximal 24 Stunden gelagert.

Für die Bestimmung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin wurden die Blutproben in Spezialmonovetten „KABAVETTE® Katecholamine“ der Firma KABE abgenommen und entsprechend der Herstellerangaben bearbeitet. Hierfür wurden sie unmittelbar nach der Blutentnahme abzentrifugiert und dann bei -20°C bis zur Analytik aufbewahrt.

1.3. Ergebnisse

1.3.1. Kapillarmikroskopie

Bei den Untersuchungen des Blutflusses mit Hilfe der Kapillarmikroskopie konnten wir einen Anstieg des Medians von AP + auf ++ EP zeigen (*Abbildung 1*). Die Anzahl der perfundierten Kapillaren (Vasomotorik) stieg von AP ++ auf +++ EP (*Abbildung 2*). Auch bei den Auswirkungen auf die Erythrozytenaggregation konnte ein Anstieg von AP ++ auf EP +++ gezeigt werden (*Abbildung 3*).

*Abbildung 1: Effekt der Lipidapherese auf den Blutfluss
(+ = verlangsamt, ++ = normal und +++ = beschleunigt)
(Daten modifiziert nach Rossenbach et al. 2011)*

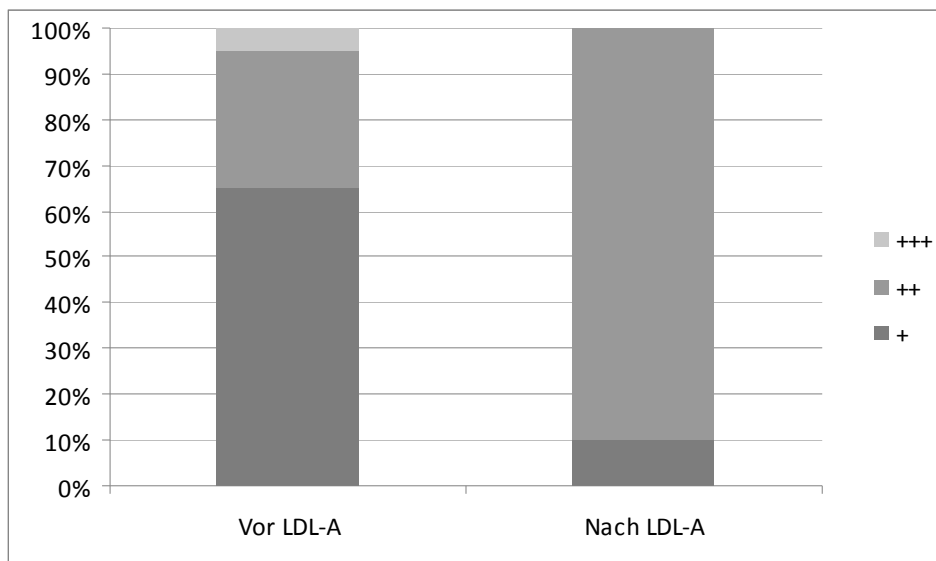


Abbildung 2: Effekt der Lipidapherese auf die Vasomotorik

(0 = keine Kapillarfüllung, + = selten gefüllt/kurz sichtbar, ++ = öfter gefüllt/länger sichtbar, +++ = kurze Unterbrechung, ++++ = dauerhafte Füllung)

(Daten modifiziert nach Rossenbach et al. 2011)

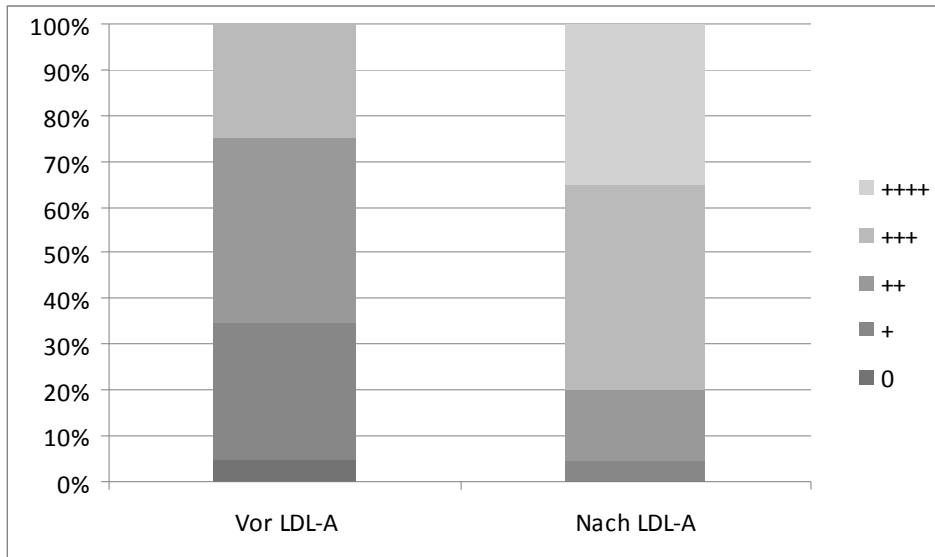
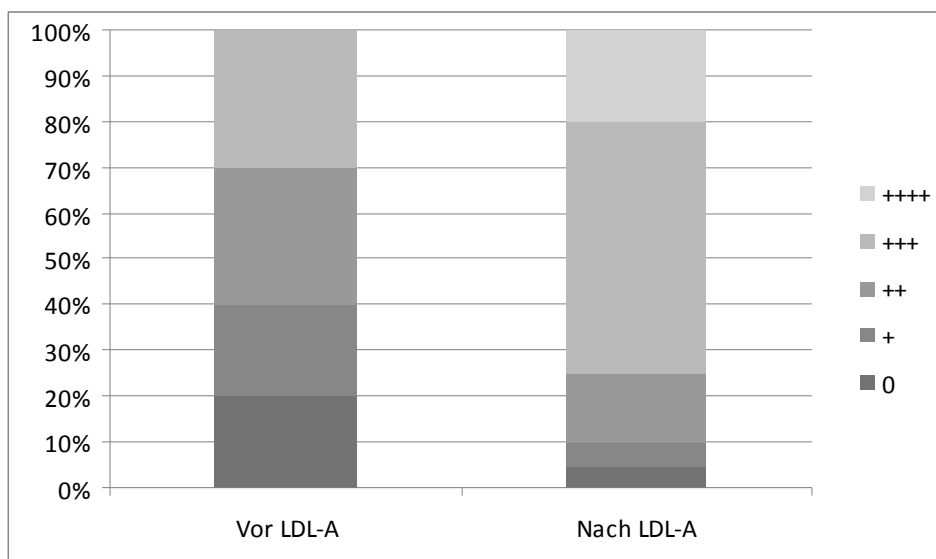


Abbildung 3: Effekt der Lipidapherese auf die Erythrozytenaggregation

(0 = starke Aggregationsneigung/zerbröckelnde Blutsäule, + = mäßige Aggregation, ++ = leichte Aggregation, +++ = leichte und seltene Aggregation, ++++ = schnelle Zirkulation ohne Aggregation)

(Daten modifiziert nach Rossenbach et al. 2011)

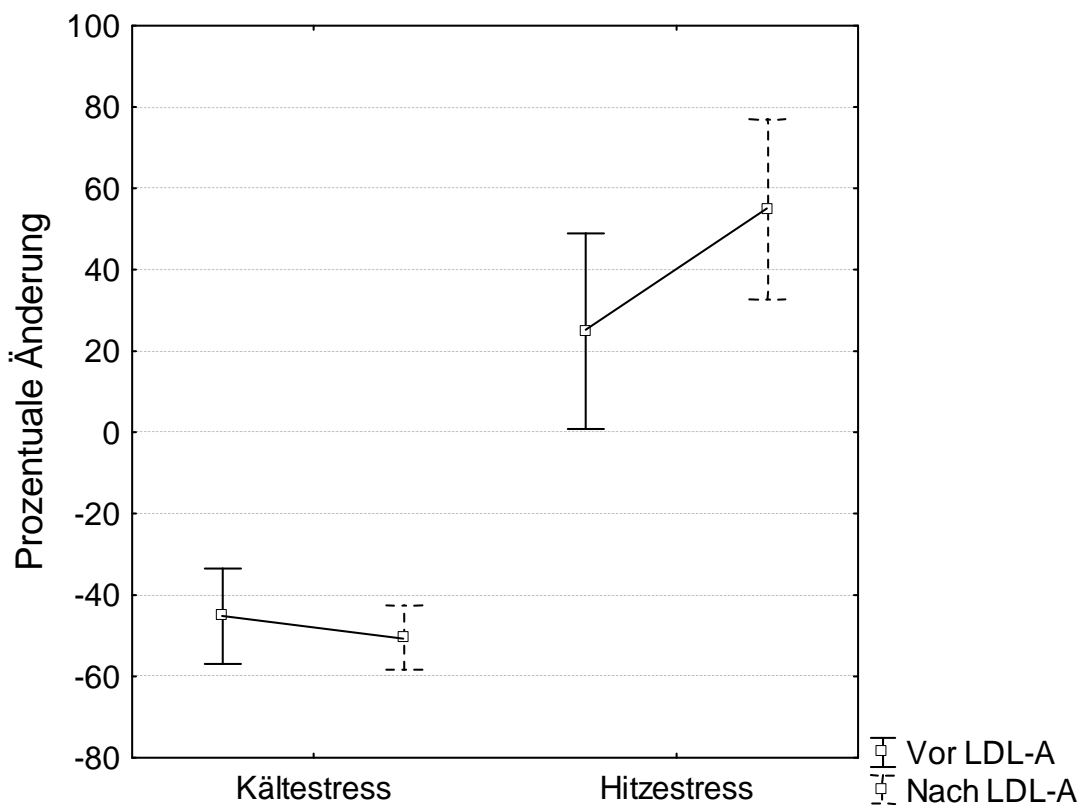


1.3.2. Photoplethysmographie

Es konnten keine signifikanten Änderungen des Blutflusses bei der Photoplethysmographie unter Ruhe-, Kälte- und Hitzebedingungen nachgewiesen werden. Allerdings wurde mit diesem Verfahren eine deutliche Veränderung der Reagibilität der Gefäße unter Kälte- ($R_{C.before\ LA} -45.21 \pm 25.7\%$; $R_{C.after\ LA} -50.5 \pm 17.4\%$; $p=0.3707$) und Hitzestress ($R_{H.before\ LA} 24.9 \pm 52.9\%$; $R_{H.after\ LA} -54.9 \pm 48.7\%$; $p=0.091$) gezeigt (Abbildung 4).

In der Abbildung 4 wurden die prozentualen Änderungen der Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt.

Abbildung 4: Reagibilitätsveränderung unter Kälte- und Hitzestress (erweiterte, modifizierte Daten aus Rossenbach et al. 2011)



1.3.3. Dopplerverschlussdruckmessung durch pneumatisch segmentale Pulsoszillographie

Der Blutdruck bleibt durch die LDL-A weitgehend unbeeinflusst. Von AP zu EP gibt es nur eine leichte Druckveränderung von AP 116.8 ± 15.0 auf EP 118.3 ± 5.7 mm Hg. Lediglich in der Gruppe der mit der DALI[®]-Therapie behandelten Patienten gab es eine signifikante Veränderung ($p=0.0004$) von AP 109.5 ± 8.7 mm Hg, auf EP 121.9 ± 14.7 mm Hg.

1.3.4. Laser-Doppler-Anemometrie (LDA)

Nach der LDL-A kommt es in den oberflächlichen Kapillarschichten zu einem deutlichen Anstieg des Blutflusses von AP zu EP ($\Delta 44.53 \pm 135.81\%$, nicht signifikant (n.s.)). In den tiefer liegenden Kapillaren ist eine solche Veränderung nicht nachweisbar ($\Delta 2.75 \pm 24.84\%$, n.s.).

1.3.5. Blutanalysen

Durch die LDL-A zeigt sich eine signifikante Reduktion des Adrenalins ($-33 \pm 39.2\%$; $p < 0.001$) (*Abbildung 5*), der Noradrenalinspiegel blieb weitestgehend unbeeinflusst ($11.8 \pm 37.0\%$; $p = 0,26$). Für ET-1 zeigte sich nach der LDL-A eine Reduktion von 7.3% ($p = 0.49$). Der ADMA-Spiegel wurde durch die LDL-A ($-74.1 \pm 23\%$; $p < 0.001$) (*Abbildung 6*) reduziert. Die Konzentration von NT-proANP wurde ebenfalls signifikant reduziert ($-28.8 \pm 20.2\%$; $p < 0,001$) (*Abbildung 7*). Als Referenzwerte wurden von uns Fibrinogen ($-45.4 \pm 19.7\%$; $p < 0.0001$) und Gesamt-Protein ($-17.8 \pm 4.0\%$; $p < 0.0001$) bestimmt, bei denen sich jeweils signifikante Reduktionen zeigten.

In den Grafiken 5 bis 7 wurden der Median (0.5-Quantil), das 0.25- und das 0.75-Quantil, sowie Minimum und Maximum angegeben.

Abbildung 5: Adrenalin (Daten modifiziert nach Rossenbach et al. 2011)

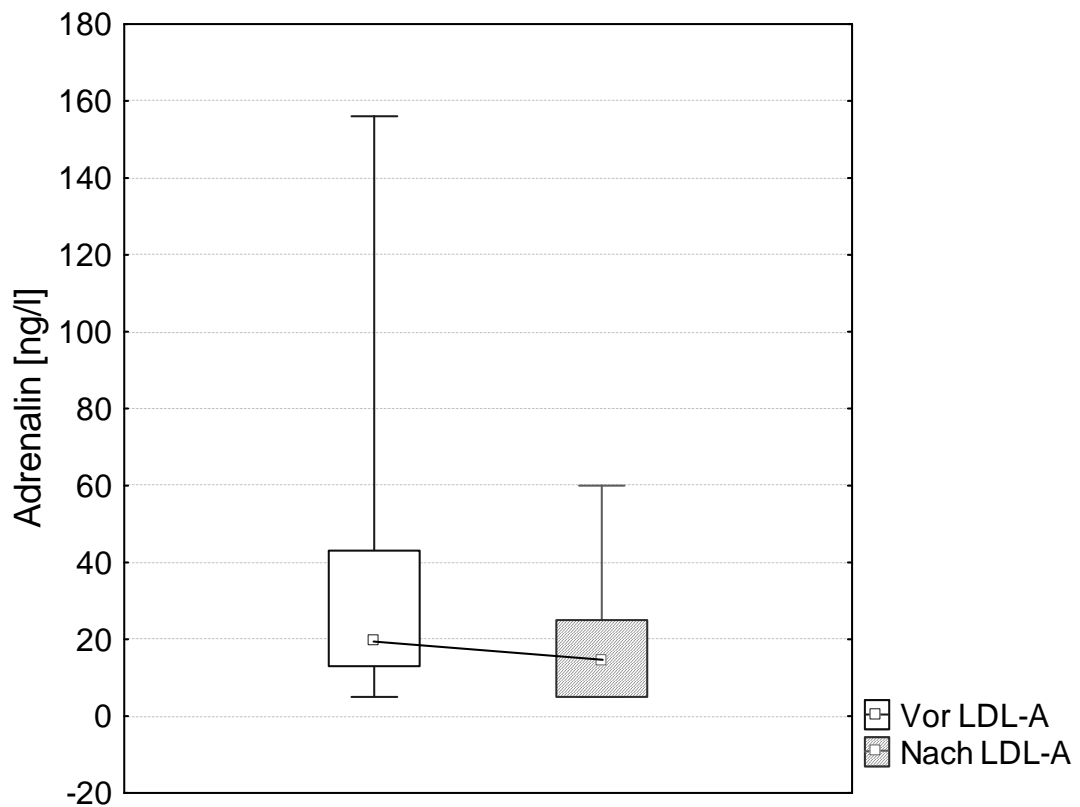


Abbildung 6: ADMA (Daten modifiziert nach Rossenbach et al. 2011)

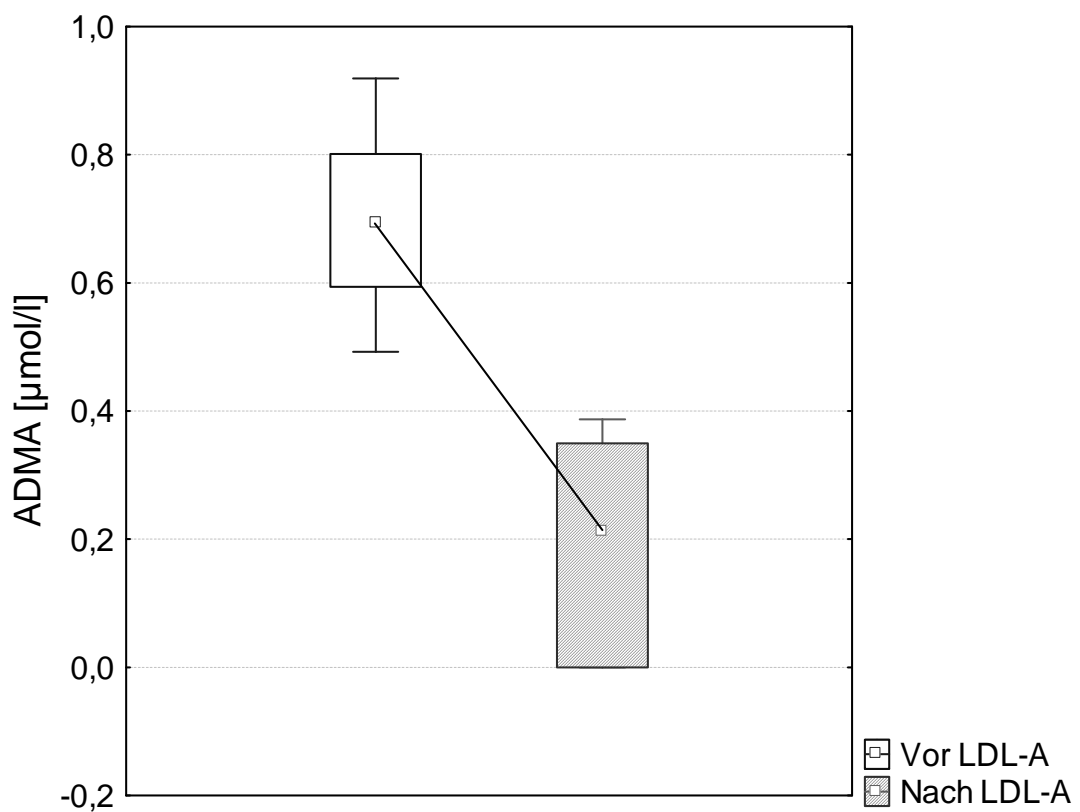
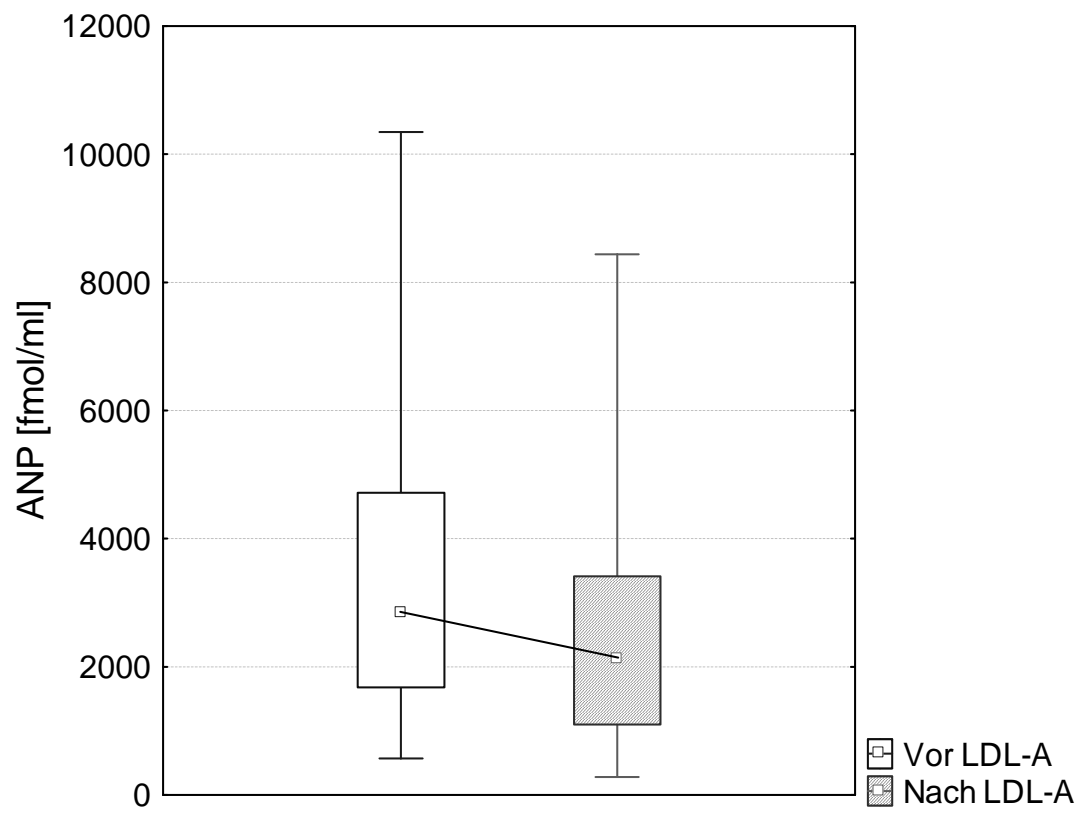


Abbildung 7: ANP (Daten modifiziert nach Rossenbach et al. 2011)



1.3.6. Diskussion

In der Fachliteratur werden seit Jahren positive Effekte der LDL-A auf die Mikrozirkulation des Herzens (Nishimura²⁶ et al. 1999; Mellwig¹ et al. 2006) und des ZNS diskutiert (Walz²⁷ et al. 1995), wobei der therapeutische Mechanismus in der Gänze noch nicht geklärt ist (Nishimura²⁶ et al. 1999; Mellwig¹ et al. 2006; Tsuchida⁷ et al. 2006).

Gemäß dem Hagen-Poiseuille Gesetz (Skinner³² 1979), welches das geflossene Volumen einer laminaren Strömung pro Zeiteinheit beschreibt (den Volumenstrom), wird der Volumenstrom direkt proportional zu dem Produkt aus der vierten Potenz des Gefäßradius mit der Druckdifferenz geteilt durch das Produkt aus Viskosität mit der Gefäßlänge gesetzt. Unter der Annahme, dass zum einen das Blut als homogene Flüssigkeit mit laminarem Strömungsverhalten und zum anderen die Gefäßlänge als konstant betrachtet werden, kann durch die anderen drei Parameter (Radius, Viskosität der Flüssigkeit und Druckdifferenz) die Mikrozirkulation durch die LDL-A beeinflusst werden.

In der Studie "LDL-Apheresis improves microcirculation of the upper limbs" konnten wir zeigen, dass es zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation der oberen Extremität durch die LDL-A kommt, unabhängig davon, welches LDL-A System genutzt wurde (Rossenbach et al. 2011). Zu diesem Effekt der LDL-A kommt es, wie in unserer Studie deutlich wird, durch den Abfall vasokonstriktorischer Mediatoren, vor allem dem ADMA-Abfall, sowie der Zunahme der perfundierten arteriolen und kapillären Gefäße und durch die Abnahme der Erythrozytenaggregation (Bosch und Keller 2003, Rossenbach et al. 2011). Der Blutdruck bleibt weitestgehend unbeeinflusst (Rossenbach et al. 2011). Positive Effekte der LDL-A konnten in weiteren Studien auch durch die Abnahme der Blutviskosität^{27/38} gezeigt werden. Zusammenfassend sind verbesserte Mikrozirkulationseigenschaften schon unmittelbar nach einer LDL-A nachweisbar (Tamai³⁶ et al. 1997; Rossenbach et al. 2011) und nicht ausschließlich auf die Reduktion von LDL-C zurückzuführen. Mutmaßlich wird die physiologische Funktion des Endothels wiederhergestellt und damit die Durchblutung verbessert (Rossenbach et al. 2011).

1.4. Literaturzitate, die über die Publikation hinausgehen

Bosch T (2004): Practical aspects of direct adsorption of lipoproteins from whole blood by DALI LDL-apheresis. *Transfus Apher Sci* 31, 83-8.

Bosch T (2005): Therapeutic apheresis--state of the art in the year 2005. *Ther Apher Dial* 9, 459-68.

Bosch T, Keller C (2003): Clinical effects of direct adsorption of lipoprotein apheresis: beyond cholesterol reduction. *Ther Apher Dial* 7, 341-4.

Klingel R, Mausfeld P, Fassbender C, Goehlen B (2004): Lipidfiltration--safe and effective methodology to perform lipid-apheresis. *Transfus Apher Sci* 30, 245-54.

Kobayashi K, Yamashita K, Tasaki H, Suzuka H, Nihei S, Ozumi K, Nakashima Y (2004): Evaluation of improved coronary flow velocity reserve using transthoracic Doppler echocardiography after single LDL apheresis. *Ther Apher Dial* 8, 383-9.

Krebs A, Krebs K, Keller F (2004): Retrospective comparison of 5 different methods for long-term LDL-apheresis in 20 patients between 1986 and 2001. *Artif Organs* 27 137-48.

Mellwig KP, Baller D, Schmidt HK, V Buuren F, Wielepp JP, Burchert W, Horstkotte D (2003): Myocardial perfusion under H.E.L.P. -apheresis. Objectification by PET. *Z Kardiol* 92, (Suppl 3):III30-7.

Mösges R, Köberlein J, Heibges A, Erdtracht B, Klingel R, Lehmacher W; RHEO-ISHL Study Group (2009): Rheopheresis for idiopathic sudden hearing loss: results from a large prospective, multicenter, randomized, controlled clinical trial. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266, 943-53.

Otto C, Geiss HC, Empen K, Parhofer KG (2004): Long-term reduction of C-reactive protein concentration by regular LDL apheresis. *Atherosclerosis* 174, 151-6.

Ramunni A, Morrone LF, Baldassarre G, Montagna E, Saracino A, Coratelli P (2003): Effectiveness of long-term heparin-induced extracorporeal LDL precipitation (HELP) in improving coronary calcifications. *Artif Organs* 26, 252-5.

Rossenbach J, Mueller G A, Lange K, Armstrong VW, Schmitto JD, Hintze E, Helfmann J, Konstantinides S, Koziolk MJ (2011): Lipid-Apheresis improves microcirculation of the upper limbs. *J Clin Apher* 10.1002/jca.20285

Schuff-Werner P (2003): Clinical long-term results of H.E.L.P.-apheresis. *Z Kardiol* 92, (Suppl 3):III28-9.

Wang Y, Blessing F, Walli AK, Uberfuhr P, Fraunberger P, Seidel D (2004): Effects of heparin-mediated extracorporeal low-density lipoprotein precipitation beyond lowering proatherogenic lipoproteins--reduction of circulating proinflammatory and procoagulatory markers. *Atherosclerosis* 175, 145-50.

2. Publikation

Rossenbach J, Mueller G A, Lange K, Armstrong VW[†], Schmitto JD, Hintze E, Helfmann J, Konstantinides S, Koziolk MJ (2011):

Lipid-Apheresis improves microcirculation of the upper limbs.

J Clin Apher 10.1002

Lipid-Apheresis Improves Microcirculation of the Upper Limbs

Jannik Rossenbach,¹ Gerhard A. Mueller,¹ Katharina Lange,² Victor W. Armstrong,^{3†} Jan D. Schmitto,⁴ Erik Hintze,⁴ Jürgen Helfmann,⁵ Stavros Konstantinides,⁶ and Michael J. Kozioliek^{1*}

¹Department of Nephrology and Rheumatology, Georg-August-University Göttingen, Robert-Koch-Strasse 40, Göttingen, Germany

²Department of Medical Statistics, Georg-August-University Göttingen, Humboldallee 32, Göttingen, Germany

³Department of Clinical Chemistry, Georg-August-University Göttingen, Robert-Koch-Strasse 40, Göttingen, Germany

⁴Department of Heart-Thoracic-Vascular Surgery, Georg-August-University Göttingen, Robert-Koch-Strasse 40, Göttingen, Germany

⁵Laser-und Medizin-Technologie GmbH, Fabeckstr. 60-62, Berlin, Germany

⁶Department of Cardiology and Pulmonology, Georg-August-University Göttingen, Robert-Koch-Strasse 40, Göttingen, Germany

Lipid-apheresis (LA) is thought to improve microcirculation. However, limited data are available on the effects on peripheral microcirculation. We investigated upper limb microcirculation of 22 patients undergoing regular LA on a weekly basis before and after LA. Using standardized semiquantitative scales, we analyzed blood flow, vasomotor function, and erythrocyte aggregation by capillary microscopy. In addition, capillary blood flow in quiescence and under heat and cryo-stress was evaluated by photoplethysmographic and laser Doppler anemometry. Moreover, levels of vasoactive mediators adrenalin, noradrenalin, endothelin-1 (ET-1), atrial natriuretic peptide (ANP), asymmetrical dimethyl-arginine (ADMA), as well as total protein and fibrinogen were measured. We found a significant increase in blood flow, the number of perfused capillaries and an improvement of erythrocyte aggregation by capillary microscopy. Using laser Doppler anemometry, we were able to show that this increase was predominantly located in the superficial layer capillaries ($\Delta 44.53 \pm 135.81\%$, n.s.) and less so in deeper layer arterioles ($\Delta 2.75 \pm 24.84\%$, n.s.). Vascular response to heat and cryo stress was also improved after LA but failed to reach significance. LA significantly reduced levels of epinephrin ($-33 \pm 39.2\%$), ANP ($-28.8 \pm 20.2\%$), ADMA ($-74.1 \pm 23\%$), and fibrinogen ($-45.4 \pm 19.7\%$) when comparing before LA and after LA values. In summary, we found an improvement in the microcirculation of the upper limbs under LA, which may result from a decrease of vasoconstrictors, improvement of vasomotor function, and a decrease in blood viscosity or erythrocyte aggregation. *J. Clin. Apheresis* 00:000–000, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

Key words: lipid-apheresis; microcirculation; photoplethysmographic; laser Doppler anemometry; ADMA; capillary microscopy; Hagen-Poiseuille

INTRODUCTION

Hypercholesterolemia is a risk factor for the development of cardiovascular diseases. Endothelial

dysfunction is induced by the interaction of LDL-C with different metabolites. LDL-C accumulates within the subendothelial space where it can be oxidized, after

Abbreviations used: ABI, ankle-brachial pressure index; ADMA, asymmetrical dimethyl-arginine; BF_C , blood flow under cryo-stress; BF_H , blood flow under heat-stress; BF_Q , blood flow in quiescence; DALI, direct adsorption of lipoproteins; DFPP, double filtration plasmapheresis; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; ET-1, endothelin-1 (1-21); HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; HELP, apheresis heparin induced extracorporeal lipoprotein precipitation apheresis; HPLC, high performance liquid chromatography; LA, Lipid-Apheresis; LAARS LDL, apheresis atherosclerosis regression study; LDA, laser Doppler anemometry; LDL, low density lipoprotein; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; Lipid-A, Lipid-apheresis; Lp (a), lipoprotein (a); MHz, megahertz; NO, nitric oxide; n.s., not significant; NT-proANP, precursor N-terminal pro atrial natriuretic peptide; PFBA, polyacrylate full blood adsorption; P-LAS, peripheral arterial diseases LDL apheresis multicenter study; POAD, peripheral occlusive artery disease; R_C , responsiveness under cryo stress; R_H , responsiveness under heat stress; RT, room temperature; λ , wavelength

*Correspondence to: Michael J. Kozioliek, Department of Nephrology and Rheumatology, Georg-August-University Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, D-37075 Göttingen, Germany. E-mail: mkozioliek@med.uni-goettingen.de

†Deceased.

Received 19 May 2010; Accepted 2 February 2011

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/jca.20285

which it inactivates nitric oxide (NO) and inhibits NO-synthetase. Endothelial vasodilatation is blocked this way.¹ Patients with hypercholesterolemia have a higher central pulse pressure and stiffer blood vessels than matched controls despite similar peripheral blood pressure (BP).² The incidence of peripheral occlusive arterial diseases (POAD) is a marker for generalized atherosclerosis and a predictor for the occurrence of several vascular events (e.g., myocardial infarction, stroke). These patients have an increased mortality.^{3,4}

In patients with a severe form of familial hypercholesterolemia, it is not possible to reach therapeutic cholesterol target values despite optimal treatment with dietary measures and drugs. In these cases, treatment with Lipid-Apheresis (LA) reduces proatherogenic LDL-C and lipoprotein (a) (Lp(a)) levels. Along with lipoprotein reduction, LA ameliorates the incidence of cardiovascular events.^{3,5,6}

The peripheral arterial diseases LDL apheresis multicenter study (P-LAS) has shown an improvement in symptoms associated with POAD, i.e., the maximum tolerated walking distance as well as the ankle brachial pressure index (ABI) with LA.⁷ However, its significance has been limited by uncontrolled observational study design. Despite LDL-C reduction and progression of atherosclerotic plaques by LA,⁸ the reduction of high LDL-C levels does not contribute to the improvement of limb ischemia alone.⁹ Data on the effects of LA on hemorheology¹⁰⁻¹² and changes in prostaglandin levels¹³ with concomitant improvement of vasodilatation do not explain clinical effects alone. Further insights into LA mediated effects on microcirculation are therefore necessary.

This study was designed to determine how limb microcirculation is influenced by a single LA treatment in vivo. We investigated the microcirculation of upper limbs before (before Lipid-A) and after (after Lipid-A) a single LA session, as well as potential regulatory mechanisms.

METHODS

Patients and Treatment

Twenty-two patients routinely undergoing LA were included in this study. Indications for LA were established according to German recommendations.¹⁴ All patients received an individual risk-adapted drug therapy. The study protocol was approved by the local ethics committee before its initiation (No. 40/12/05). All patients gave their explicit informed consent.

For the extracorporeal LA therapy, double filtration plasmapheresis (DFPP; $n = 9$) as thermofiltration, HELP apheresis ($n = 6$) or polyacrylate full blood adsorption (PFBA, DALI-system; $n = 7$) were used.¹⁵ The Octonova[®] system (Diamed, Cologne, Germany) was applied for DFPP, the Plasmate Futura[®] system

(BBraun, Melsungen, Germany) for HELP apheresis, and the 4008ADS[®] system (Fresenius Medical Care, St. Wendel, Germany) for PFBA. LA was performed on a weekly basis depending on mean LDL cholesterol values. Apheresis modalities (applied LA method, treated volume, blood and plasma flow, anticoagulation) were adjusted to patients' individual details, as well as to national recommendations aimed at a LDL-C decrease of more than 60% or Lp(a) of more than 50% per session,¹⁶ respectively.

Samples Collection and Clinical Chemistry

Plasma and serum samples were taken immediately before and after the end of the LA session from a cubital vein or arteriovenous fistula and stored according to manufacturers' recommendations which is described in the particular chapter. The efficacy of LA was routinely ascertained by the determination of the total LDL-C and HDL-C, triglycerides, fibrinogen, and Lp(a) at every single treatment session before (before LA) and after apheresis treatment (after LA) as previously described.^{5,17}

Analyses Setting

To avoid confounding factors, the experimental procedure was standardized with conditioned room temperature (22°C), daytime, time of rest, quiescence, and patients' position. To avoid interday and interinvestigator variance, all measurements were taken on the same day before and after a single LA session by one examiner.

Capillary Microscopy

Capillary microscopy was used as an in vivo method to monitor skin microcirculation. The morphology of nail fold capillaries on all fingers was examined before LA and after LA at room temperature by intravital capillaroscopy (SMZ-U, Nikon, Japan) according to a standardized protocol¹⁸ using 20-fold magnification. Erythrocyte aggregation (0-++++) (0 = heavy aggregation/blood stand crumble, + = moderate aggregation, ++ = lightly aggregation, +++ = lightly and rare aggregation, ++++ = fast circulation without aggregation), blood flow (+-++++) (+ = retarded, ++ = regular, +++ = accelerated), and vasomotor function (0-++++) (0 = no vessel filling, + = infrequent filling/short visible, ++ = more often filling/long visible, +++ = short disconnected, ++++ = permanently filling) were evaluated semiquantitatively according to established scores.^{19,20}

Photoplethysmography

The mean blood flow in the tissues of each hand was documented by photoplethysmography (Vasoquant

VQ4000, ELCAT medical systems, Germany) of all fingertips (BF_Q). First, blood flow was measured under an exactly conditioned room temperature (quiescence). Cold stress was simulated by bathing the hands in crushed ice water at 0 to 1°C for 30 seconds with subsequent acral photoplethysmography (BF_C). Next, photoplethysmography was repeated after bathing the hands in 40°C water (heat stress) for 3 minutes (BF_H).²¹ The mean change of blood flow (ΔBF) and mean responsiveness of vessels to cryo (R_C) or heat stress (R_H) were calculated according to the following formulas: $\Delta BF_Q = (BF_Q \text{ before LA} - BF_Q \text{ after LA}) / BF_Q \text{ before LA}$, $\Delta BF_C = (BF_C \text{ before LA} - BF_C \text{ after LA}) / BF_C \text{ before LA}$, $\Delta BF_H = (BF_H \text{ before LA} - BF_H \text{ after LA}) / BF_H \text{ before LA}$, $R_C \text{ before LA} = (BF_Q \text{ before LA} - BF_C \text{ before LA}) / BF_Q \text{ before LA}$, $R_H \text{ before LA} = (BF_Q \text{ before LA} - BF_H \text{ before LA}) / BF_Q \text{ before LA}$, $R_C \text{ after LA} = (BF_Q \text{ after LA} - BF_C \text{ after LA}) / BF_Q \text{ after LA}$ and $R_H \text{ after LA} = (BF_Q \text{ after LA} - BF_H \text{ after LA}) / BF_Q \text{ after LA}$. ΔBF represented the changes in blood flow under exactly defined thermo conditions (ΔBF_Q under room temperature, ΔBF_C under cold stress, and ΔBF_H under heat stress), comparing after-LA to pre-LA values. The mean responsiveness (R) demonstrated the changes in blood flow induced by cryo (R_C) or heat stress (R_H) compared with a lack of thermostress.

Closing Pressure Measurement (Duplex Ultrasound Studies)

Arterial pressure was measured before LA and after LA using an OXFORD Sonicaid 421 (Oxford Instruments Medical, UK) with an 8 MHz gauge head. We used a cw-Doppler under acoustic control. Aa. brachial, ulnar, and radial blood flow was measured in both arms using a standardized protocol.²² For statistical analyses, the mean value of these three values was taken. In the case of arteriovenous fistula, the investigation was performed only on the unaffected side.

Laser Doppler Anemometry

The laser Doppler blood flow system detected the relative blood flow of the skin. The method is based on the Doppler frequency shift of irradiating laser light by light scattering through circulating blood cells in the skin capillaries.²³ The laser diode works with a wavelength of 655 nm, where absorption is low so that the light can illuminate the entire dermis. The laser light entering the dermis is multiplicatively scattered by the cells. Each scattering event adds a certain Doppler frequency shift to the light, which is linear in velocity. The backscattered light from circulating cells is captured by a photodiode integrated in the detector head. A subsequent frequency analysis gives the Doppler power spectrum, which in turn is multiplied by the frequency shift and integrated, ultimately providing the Doppler signal proportional to the blood flow. The

measurement was performed both before LA and after LA in a supine position after a resting time of 10 minutes on the inside of the forearm in two different, reproducible positions at RT.

Each measurement was done three times. The first analysis took place without a weight, the second with a weight of 155 g, and the third with a weight of 200 g on top of the sensor head. By increasing the weight of the sensor head, the blood flow in increasingly larger and deeper vessels can be reduced, thus allowing for differentiation between different vessels.

Analyses of Vasoactive Mediators and Routine Parameters

NT-proANP1-98 and endothelin-1 (1-21) (ET-1) were determined in EDTA plasma by an enzyme immunoassay (Biomedica Medical products GmbH, Austria) according to manufacturers' recommendations with a quantification limit of 0.05 nmol/L for NT-proANP and 0.05 fmol/ml for endothelin. The catecholamines norepinephrine and epinephrine were determined through HPLC using fluorescence spectrometry in EGTA/GSH plasma with a modified test kit from Dionex GmbH, Germany. Asymmetrical dimethyl-arginine (ADMA) is a methylated derivative of the amino acid arginine. It interferes with L-arginine in the production of nitric oxide, a key chemical involved in normal endothelial function and, by extension, cardiovascular diseases, diabetes, and kidney diseases.²⁴ It was quantitatively determined in EDTA plasma using an ADMA ELISA kit (DLD Diagnostika GmbH, Germany) according to the manufacturers' recommendations with a sensitivity limit of 0.05 $\mu\text{mol/l}$.

Blood count, LDL-C, total protein, and fibrinogen were analyzed with routine systems.

Statistics

Because the response in capillary microscopy measurements is a score, a normal distribution cannot be assumed. The analysis was therefore done with the help of relative effects. A relative effect is a nonparametric, comparative measure based on the ranks of the data, ranging between 0 and +++/++++, where the higher the value the better it is. Comparative statistical analyses were performed using nonparametric, longitudinal F-tests as described by Brunner et al.²⁵

All other data acquired in tests were analyzed for Gaussian distribution. Photoplethysmography was analyzed with the parametric analysis of variance procedures using the SAS PROC MIXED (SAS Institute, SAS Campus Drive, Cary, North Carolina). Count data were analyzed using Fisher's exact test. Differences were located using two-factor analysis (time·LA method) of variance with repeated measures. Results were regarded as significant if the *P*-values were less

TABLE I. Demographic, Clinical, and Apheresis Data as well as Relevant Concomitant Therapy

	Total	DFPP	HELP-apheresis	PFBA
Demographic data				
Age (years)	53.5 ± 14.5	56.3 ± 14.0	50.0 ± 16.3	52.7 ± 15.0
Gender (m:f)	15:7	6:3	5:1	4:3
Time since start of LA (months)	139.0 ± 73.3	126.3 ± 67.4	116.8 ± 95.8	172.7 ± 53.8
Underlying disease				
Homozygous familial hypercholesterolemia	2/22	0/9	1/6	1/7
Hypercholesterolemia	21/22	9/9	5/6	7/7
Elevated Lp (a)-levels (>0.6 g/L)	12/22	4/9	5/6	3/7
Mean LDL-C (mg/dL) ^a	106.3 ± 28.3	111.0 ± 18.5	98.6 ± 38.5	107.0 ± 32.1
History of end-organ damage				
Coronary artery disease	20/22	8/9	6/6	6/7
Peripheral occlusive artery disease ^b	8/22	5/9	2/6	1/7
Apheresis data				
Treated volume (ml) ^c	–	2922 ± 1045	3000 ± 0	7586 ± 1384
Accumulative heparin dose (IE) ^d	4417 ± 3846	3789 ± 3459	7353 ± 4343	1900 ± 652
Relevant concomitant therapy				
Statins + Ezetimib ^e	20/22	7/9	6/6	7/7
Platelet aggregation inhibitors	16/22	4/9	6/6	6/7
Vitamin K antagonists	5/22	4/9	0/6	1/7
Betablocker	19/22	7/9	6/6	6/7
Calcium channel blockers (dihydropyridin type)	6/22	2/9	3/6	1/7
Diuretics	14/22	7/9	4/6	3/7
Angiotensin conversion enzyme-inhibitors/AT1-blockers	12/22	4/9	4/6	4/7
Pentoxifyllin	1/22	0/9	0/6	1/7
Nitrate analoga (incl. molsidomin)	11/22	5/9	3/6	3/7

Demographic data, the underlying diseases, relevant laboratory values, lipid reduction rates and lipid-lowering therapy are listed.

^aMean LDL-C level = $b + 3.78 \cdot (a - b) / x$, where “a” is the post-apheresis LDL-C level, “b” the preapheresis LDL-C level of the subsequent LA and “x” the treatment interval (days).

^bAccording to the classification of Fontaine.

^cIn case of DFPP and HELP apheresis, plasma volume is shown, and in case of PFBA the treated blood volume is shown.

^dTwo DFPP and all DALI patients did receive a mixed anticoagulation containing citrate.

^eTwo patients did not receive statins or Ezetimibe due to side-effects.

than 5%. The Bonferroni–Holm procedure was applied for multiplicity. Results are presented as mean and standard deviation except for capillary microscopy, where they are presented in relative treatment effects and 95% confidence intervals (95% CI).

RESULTS

Patients

The patients’ characteristics, relevant blood analyses and relevant concomitant therapy are summarized in Table I.

Improvement of Microcirculation by a Single LA Session

Using capillary microscopy we found a significant increase both in blood flow from a median before LA + to a median after LA ++ (relative treatment effect before LA: 0.37+ [95% CI: 0.32+, 0.45+]; after LA: 0.63+ [95% CI: 0.55+, 0.68+]; $P < 0.01$) and in the numbers of perfused capillaries (median before LA ++; median after LA +++; relative treatment effect before LA: 0.32 [95% CI: 0.28+, 0.39+]; after LA: 0.68+ [95% CI: 0.61+, 0.72+]; $P < 0.01$). Erythro-

cyte aggregation improved from median before LA ++ to median after LA +++ (relative treatment effect before LA: 0.37+ [95% CI: 0.32+, 0.43+]; after LA: 0.64+ [95% CI: 0.57+, 0.68+]; $P < 0.01$). Comparing the different LA methods, no difference was detectable. Results are summarized in Figure 1.

Capillary Blood Flow Determined by Photoplethysmography

No changes in blood flow were observed either without thermal stress (ΔBF_Q) or under heat (ΔBF_H) or cryo stress (ΔBF_C). A comparison of the different LA methods showed no differences.

Effects of LDL-A on Superficial and Deeper Layer Microcirculation

Using laser Doppler anemometry, we found an increase in relative blood flow comparing before LA and after LA values. Microcirculatory blood flow increased in the superficial layer capillaries by a mean of 44.5% (n.s.), but with a broad degree of variance. In deeper arterioles, no significant changes were detected.

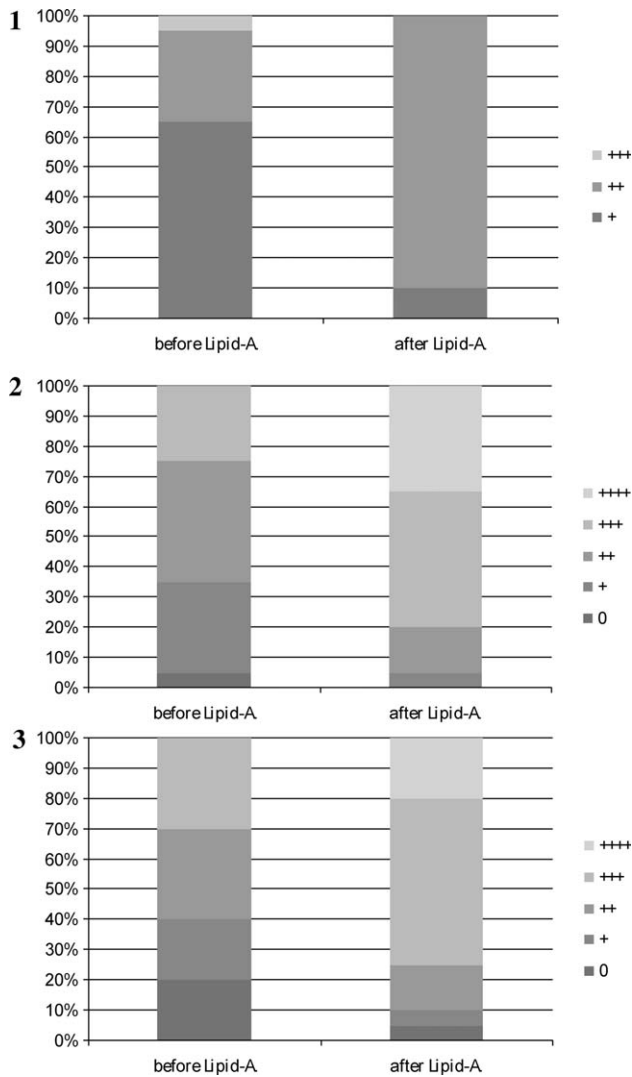


Fig. 1. Effects of LA on blood flow (1), vasomotor function (2), and erythrocyte aggregation (3) as determined by capillary microscopy. Blood flow (1), vasomotor function (2) and erythrocyte aggregation (3) were determined by a standardized semiquantitative score.¹⁸ Results are shown as percentages. Before LA and after LA data were compared with a rank-sum test for longitudinal data.

Response of Microcirculation to Cryo Stress and Heat Stress Improved Through a Single LA Session

We compared the response of microcirculation to cryo (R_C) or heat stress (R_H) using photoplethysmographic evaluation before LA and after LA. Responsiveness to cryo-stress (R_C , before LA $- 45.21 \pm 25.7\%$, R_C , after LA $- 50.5 \pm 17.4\%$; P -value 0.3707) and heat-stress (R_H , before LA $24.9 \pm 52.9\%$; R_H , after LA $- 54.9 \pm 48.7\%$; P -value 0.091) improved, yet failed to reach any significance.

Influence of LA on Closing Pressure

Overall, there was an insignificant increase in closing pressure from before LA 116.8 ± 15.0 to after LA 118.3

± 5.7 mmHg. Comparing the different methods, we found a marked increase in patients undergoing PFBA treatment (before LA 109.5 ± 8.7 mmHg, after LA 121.9 ± 14.7 mmHg), which significantly differed from those under HELP apheresis or DFPP treatment ($P = 0.0004$).

Effects of LA on Mediators of Vasoconstriction and Dilation and Fibrinogen

LA significantly reduced fibrinogen ($-45.4 \pm 19.9\%$; $P < 0.0001$) and total protein ($-17.8 \pm 4.0\%$; $P < 0.0001$). The analysis of the catecholamines epinephrine and norepinephrine showed a significant reduction of epinephrine levels ($-33 \pm 39.2\%$; $P < 0.001$) comparing before LA and after LA values. Norepinephrine levels remained unchanged. ET-1 levels decreased comparing before LA and after LA values (mean decrease of 7.3%), yet without significance ($P = 0.49$). In contrast, ADMA levels were substantially reduced by all LA methods (mean reduction: 74.1%; $P < 0.001$). Levels of NT-proANP were also significantly reduced by all LA methods ($-28.8 \pm 20.2\%$; $P < 0.001$). Significant results are shown in Figure 2.

CONCLUSIONS

Previous studies indicated that the cardiac^{1,26} and cerebral microcirculation²⁷ is improved in vivo in patients undergoing HELP apheresis therapy. This was demonstrated by an increase in coronary flow reserve, minimal coronary resistance,^{1,26} and -intramuscular oxygen tension.²⁸ Additionally, an improvement of microcirculation by LA methods, which are eliminating fibrinogen in a relevant quantity, was discussed as a main therapeutic principle in the treatment of sudden hearing loss²⁹ or ischemic optic neuropathy.³⁰ Tsuchida et al. demonstrated an increase in the ankle-brachial index and maximum tolerated walking distance, as well as an amelioration of microcirculation in ischemic muscle, yet no angiographic changes in occlusive arteries in 31 patients with PAOD undergoing serial LA.⁷ Morimoto et al. reported an improvement of leg pain in 11 hemodialysis patients with PAOD who were treated with dextran sulfate adsorption.³¹ However, therapeutic mechanisms beyond this still remain unclear.^{1,7,26} This study aimed at analyzing the effects of a single LA treatment on the microcirculation of extremities and investigating the mechanisms involved.

Overall, our analyses showed an improvement in the microcirculation of the upper limbs regardless of which LA system was used. However, our study does have some limitations: (1) due to small sample sizes and a large number of hypotheses, this trial should be regarded as explorative and significant results should therefore be confirmed in follow-up trials; (2) a randomization of patients to the particular LA method was not possible due to the individual history and medication of the

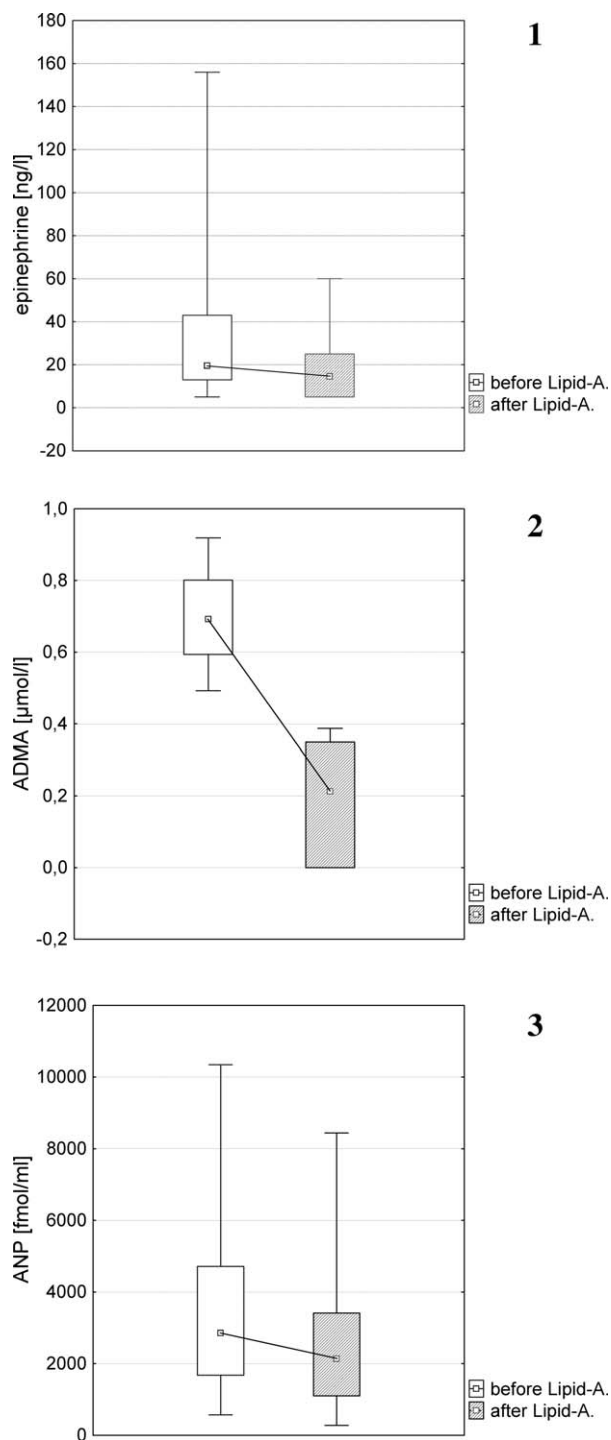


Fig. 2. Effects of LA on levels of epinephrine (1), ADMA (2), and ANP (3). Results are shown as box plot analyses.

patients; (3) patients suffered from different medical conditions and were treated with different drugs; (4) even though capillary microscopy is a subjective method, it was carried out with a standardized protocol.^{19,20}

According to the law of Hagen-Poiseuille,³² microcirculation is directly proportional to the product of vascular radius to the power of four and BP divided by

the product of viscosity and vessel length. Because vessel length is constant, the three other parameters could theoretically be influenced by LA.

The vessel radius is affected by several different factors. The strongest known vasoconstrictor ET-1³³ was insignificantly reduced by LA by a mean of 7.3%, but with broad variation. Moreover, both the vasoconstrictor epinephrine and vasodilatory peptide hormone ANP were significantly reduced by LA in parallel to epinephrine reduction, heart rate significantly decreased comparing pre-LA and post-LA values (data not shown), which, however, might also reflect a change of alert status of nervous system. In addition, we noted a significant reduction in ADMA levels by LA, which interferes with NO synthesis. This observation is complemented by additional data from our group, where an induction of endothelial NO synthetase in circulating endothelial progenitor cells was shown.³⁴ In two patients treated with DSA, Kojima S et al. also demonstrated an increase of NO levels using heparin as an anticoagulant,³⁵ which was confirmed in an another study of six hypercholesterolemic patients with an increase of NO metabolites.³⁶ The mode of interaction of ADMA with LA remains speculative although several studies including our own have shown a broad interaction of a high number of small molecules with different LA columns.¹⁷ Taken together, the homeostasis of vasoconstrictory and dilatative mediators seems to be influenced by LA in favor of vasodilatation.

In vivo, we noted an increase of perfused capillaries in microscopy mainly located to the superficial capillaries, and only to a lesser extent in arterioles by laser Doppler anemometry. The reduction of blood viscosity by LA is a well-known phenomenon. Different investigations^{10,17,37} have demonstrated a substantial reduction of hemorheologically relevant proteins. Moreover, erythrocyte aggregation was improved in our patients in vivo. This corresponds with previous in vitro data, which showed a decrease in the erythrocyte aggregation rate of 42% in PFBA³⁸ and 59% in membrane differential filtration.¹⁰ Furthermore, in our analysis we found an increased, yet insignificant, response to cryo or heat stress from a single LA corroborating the findings of Tamai and coworkers who discussed an improved endothelial function from a single LA session.³⁶

All together, a single LA session may improve microcirculation by influencing the balance of vasoconstrictory and dilatative mediators (mainly ADMA), plasma viscosity, erythrocyte aggregation, and BP. However, these findings are in need of mechanistic confirmation and long-term effects.

REFERENCES

1. Mellwig KP, van Buuren F, Schmidt HK, Wielepp P, Burchert W, Horstkotte D. Improved coronary vasodilatory capacity by

- H.E.L.P. apheresis: comparing initial and chronic treatment. *Ther Apher Dial* 2006;10:510–517.
2. Wilkinson I, Cockcroft JR. Cholesterol, lipids and arterial stiffness. *Adv Cardiol* 2007;44:261–277.
 3. Meves SH, Diehm C, Berger K, Pittrow D, Trampisch HJ, Burghaus I, Tepohl G, Allenberg JR, Endres HG, Schwertfeger M, Darius H, Haberl RL, getABI Study Group. Peripheral arterial disease as an independent predictor for excess stroke morbidity and mortality in primary-care patients: 5-year results of the getABI study. *Cerebrovasc Dis* 2010;29:546–554.
 4. Ramunni A, Brescia P, Quaranta D, Plantamura M, Ria R, Coratelli P. Fibrinogen apheresis in the treatment of peripheral arterial disease. *Blood Purif* 2007;25:404–410.
 5. Koziolok M, Hennig U, Bramlage C, Grupp C, Zapf A, Armstrong V, Strutz F, Mueller GA. Retrospective analysis of long-term LDL-apheresis in a single centre. *Ther Apher Dial* 2010;14:143–152.
 6. Sachais BS, Katz J, Ross J, Rader DJ. Long-term effects of LDL apheresis in patients with severe hypercholesterolemia. *J Clin Apher* 2005;20:252–255.
 7. Tsuchida H, Shigematsu H, Ishimaru S, Iwai T, Akaba N, Umezaki S. Effect of low-density lipoprotein apheresis on patients with peripheral arterial disease. *Peripheral Arterial Disease LDL Apheresis Multicenter Study (P-LAS)*. *Int Angiol* 2006;25:287–292.
 8. Thompson GR, Myant NB, Kilpatrick D, Oakley CM, Raphael MJ, Steiner RE. Assessment of long-term plasma exchange for familial hypercholesterolaemia. *Br Heart J* 1980;43:680–688.
 9. Mii S, Mori A, Sakata H, Nakayama M, Tsuruta H. LDL apheresis for arteriosclerosis obliterans with occluded bypass graft: change in prostacyclin and effect on ischemic symptoms. *Angiology* 1998;49:175–180.
 10. Brunner R, Widder RA, Walter P, Borberg H, Oette K. Change in hemorrheological and biochemical parameters following membrane differential filtration. *Int J Artif Organs* 1995;18:794–798.
 11. Kojima S. Low-density lipoprotein apheresis and changes in plasma components. *Ther Apher* 2001;5:232–238.
 12. Rubba P, Iannuzzi A, Postiglione A, Scarfato N, Montefusco S, Gnasso A, Nappi G, Cortese C, Mancini M. Hemodynamic changes in the peripheral circulation after repeat low density lipoprotein apheresis in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1990;81:610–616.
 13. Kojima S, Ogi M, Yoshitomi Y, Kuramochi M, Ikeda J, Nagawana M, Hatakeyama H. Changes in bradykinin and prostaglandins plasma levels during dextran-sulfate low-density-lipoprotein apheresis. *Int J Artif Organs* 1997;20:178–183.
 14. <http://www.g-ba.de/institution/sys/suche/?search-query=ldl+apherese>
 15. Thompson GR, HEART-UK LDL Apheresis Working Group. Recommendations for the use of LDL apheresis. *Atherosclerosis* 2008;198:247–255.
 16. Schettler V, Wieland E, Armstrong VW, Kleinoeder T, Grunewald RW, Muller GA. First steps toward the establishment of a German low-density lipoprotein-apheresis registry: recommendations for the indication and for quality management. *Ther Apher* 2002;6:381–383.
 17. Dihazi H, Koziolok M, Söllner T, Neuhoff R, Kahler E, Klingel R, Strutz F, Mueller GA. Protein adsorption during LDL-apheresis: proteomic analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:2925–2935.
 18. Hern S, Mortimer PS. Visualization of dermal blood vessels—capillaroscopy. *Clin Exp Dermatol* 1999;24:473–478.
 19. Carpentier P, Franco A. Capillaroscopy and Raynaud's phenomenon. *J des Maladies Vasculaires* 1984;9:23–28.
 20. Carpentier P, Laperrousaz P, Magne JL, Dubois F, De Gaude-maris R, Diamand JM, Franco A. Semiological analysis of Raynaud attacks. *Int Angiol* 1987;6:163–169.
 21. Alnaeb ME, Alobaid N, Seifalian AM, Mikhailidis DP, Hamilton G. Optical techniques in the assessment of peripheral arterial disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2007;5:53–59.
 22. Sheahan NF, MacMahon M, Colgan MP, Walsh JB, Coakley D, Malone JF. Measurement of arterial closing pressure. *Physiol Meas* 1993;14:485–487.
 23. Barnett NJ, Dougherty G, Ward G. A critical review of laser Doppler flowmetry. *J Med Eng Technol* 1990;14:178–181.
 24. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005;97:e53–e59.
 25. Brunner E, Domhof S, Langer F. *Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments*. New York: Wiley; 2002.
 26. 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. Effects of intensive lipid lowering by low-density lipoprotein apheresis on regression of coronary atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia: Japan Low-density Lipoprotein Apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study (L-CAPS). *Atherosclerosis* 1999;144:409–417.
 27. Walzl B, Walzl M, Valetitsch H, Lechner H. Increased cerebral perfusion following reduction of fibrinogen and lipid fractions. *Haemostasis* 1995;25:137–143.
 28. Matschke K, Mrowietz C, Sternitzky R, Jung F, Park JW. Effect of LDL apheresis on oxygen tension in skeletal muscle in patients with cardiac allograft vasculopathy and severe lipid disorder. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004;30:263–271.
 29. Suckfüll M, Hearing Loss Study Group. Fibrinogen and LDL apheresis in treatment of sudden hearing loss: a randomised multicentre trial. *Lancet* 2002;360:1811–1817.
 30. Ramunni A, Giancipoli G, Saracino A, Guerriero S, Salianni MT, Gentile MC, Sborgia C, Coratelli P. LDL-apheresis in acute anterior ischemic optic neuropathy. *Int J Artif Organs* 2004;27:337–341.
 31. Morimoto S, Yano Y, Maki K, Sawada K, Iwasaka T. Efficacy of low-density lipoprotein apheresis in patients with peripheral arterial occlusive disease undergoing hemodialysis treatment. *Am J Nephrol* 2007;27:643–648.
 32. Skinner HB. Velocity-diameter relationships of the microcirculation. *Med Inform (Lond)* 1979;4:243–256.
 33. Ihling C, Göbel heart rate, Lippoldt A, Wessels S, Paul M, Schaefer HE, Zeiher AM. Endothelin-1-like immunoreactivity in human atherosclerotic coronary tissue: a detailed analysis of the cellular distribution of endothelin-1. *J Pathol* 1996;179:303–308.
 34. Patschan D, Patschan S, Henze E, Koziolok M, Müller GA. Lipid apheresis rapidly increases peripheral endothelial progenitor cell proliferation. *J Clin Apher* 2009;24:180–185.
 35. Kojima S, Ogi M, Sugi T, Matsumoto Y, Yoshitomi Y, Kuramochi M. Changes in plasma levels of nitric oxide derivative during low-density lipoprotein apheresis. *Ther Apher* 1997;1:356–361.
 36. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL-apheresis improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 1997;95:76–82.
 37. Otto C, Geiss HC, Laubach E, Schwandt P. Effects of direct adsorption of lipoproteins apheresis on lipoproteins, low-density lipoprotein subtypes, and hemorrheology in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Ther Apher* 2002;6:130–135.
 38. Bosch T, Wendler T, Jaeger BR, Samtleben W. Improvement of hemorrheology by DALI apheresis: acute effects on plasma viscosity and erythrocyte aggregation in hypercholesterolemic patients. *Ther Apher* 2001;5:372–376.

Danksagung

Für die freundliche Überlassung dieses Dissertationsthemas und die wertvolle Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich bei meinem engagierten Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Koziolk sehr herzlich bedanken.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Professor Dr. G. A. Müller für die hilfreiche Unterstützung als Direktor der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Medizinische Statistik der Universität Göttingen danke ich für Beratung und die Hilfe bei der Auswertung und Darstellung der erhobenen Daten.

Ebenfalls möchte ich mich bedanken bei Herrn Professor Dr. V. W. Armstrong, dessen Labor ich nutzen durfte.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. J. D. Schmitto und Herrn Dr. E. Hintze von der Abteilung Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie für die Nutzung der Funktionsvasographie. In diesem Zusammenhang möchte ich besonders Frau Maria Hinz danken, die mir für meine Messungen Ihr Untersuchungszimmer bereitgestellt hat.

Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. J. Helfmann von der Medizin Technik GmbH Berlin für die Überlassung der Laser-Doppler-Anemometry und die freundliche Einarbeitung in Berlin.

Außerdem gilt mein Dank den Patienten der Apherese-Station 1024, ohne deren Mitarbeit die Studie nicht möglich gewesen wäre.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern der Station 1024, Kerstin Schumann-Koziolk, Andrea Klemme und Ilka Lindner, für ihre stets zugewandte Unterstützung bei allen stationären Angelegenheiten und die freundliche Anteilnahme an meiner Arbeit.